



PROJET DE FIN D'ETUDES

Licence en Sciences & Techniques :
Sciences Biologiques appliquées et Santé

**Apport de la biologie moléculaire dans la détection de
la mutation du gène NKX2.5 impliqué dans les
cardiopathies congénitales**

Présenté par : Bensalah Khaoula

Encadré par :

Pr. Ouldim Karim CHU - Fès -

Pr. Guissi Sanae FSTF

Soutenu le : 16 /06/2015

Devant le jury composé de :

Pr. Guissi Sanae : Présidente

Pr. Ouldim karim : Encadrant

Pr. Tahri Jouti Ali : Examineur

Stage réalisé à l'unité de génétique et d'oncogénétique, Centre Hospitalier
Universitaire Hassan II Fès.

Année Universitaire : 2014-2015

Dédicaces

Je dédie cet humble travail à toutes les personnes qui me sont très chères, et avec lesquelles j'ai tout partagé :

A ma très chère mère Najia :

Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.

Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A mon cher papa Chakib :

Autant de phrases et d'expressions aussi éloquents soit-elles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance.

Tu as su m'inculquer le sens de la responsabilité, de l'optimisme et de la confiance en soi face aux difficultés de la vie.

Tes conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite.

Ta patience sans fin, ta compréhension et ton encouragement sont pour moi le soutien indispensable que tu as toujours su m'apporter.

Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester ta fierté et ne jamais te décevoir.

Que Dieu le tout puissant te préserve, t'accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et te protège de tout mal.

A mes très chères sœurs *Khadija* et *Hiba* :

Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous.

Mes accompagnantes dans les moments les plus délicats de cette vie mystérieuse.

Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

A mon cher grand-père paternel **Si Ahmed Bensalah** :

Que ce modeste travail, soit l'expression des vœux que vous n'avez cessé de formuler dans vos prières.

Que Dieu vous préserve santé et longue vie.

A

La mémoire de mon grand père maternel

La mémoire de ma grand-mère maternelle

La mémoire de ma grand-mère paternelle

Qui ont été toujours dans mon esprit et dans mon cœur, que Dieu, le miséricordieux, vous accueille dans son éternel paradis.

A mon très cher oncle **Abdelghani Bensalah** et sa famille :

Vous avez toujours été présents pour les bons conseils.

Votre affection et votre soutien m'ont été d'un grand secours au long de ma vie professionnelle et personnelle.

Veillez trouver dans ce modeste travail ma reconnaissance pour tous vos efforts.

Remerciements

Au terme de ce travail, il m'est particulièrement agréable d'exprimer ma reconnaissance et mes vifs remerciements à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à sa réalisation. Principalement :

Pr. GUISSI SANAE, je suis fière et heureuse d'avoir été l'une de ses étudiantes.

Je la remercie d'avoir accepté d'encadrer ce projet et de me faire part de son expérience. Les résultats de ce travail doivent beaucoup aux exigences de sa rigueur scientifique, à ses orientations, et à son talent pédagogique. C'est pour moi, l'opportunité de lui exprimer ma profonde reconnaissance et mes vifs remerciements pour son esprit ouvert et ses conseils précieux. Je ne saurais exprimer ma reconnaissance, certes, car sa bonté est indescriptible.

Pr. OULDIM KARIM, responsable de l'Unité de génétiques médicales et d'oncogénétique au Centre hospitalier Hassan II (CHU) de Fès au service de Laboratoire. Je le remercie de m'avoir encouragé et m'avoir accordé toute sa confiance, sa disponibilité, l'aide et les conseils concernant les missions évoquées lors des différents suivis tout au long de ces deux mois.

Pr. Tahri Jouti Ali, qui a bien voulu juger ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de ma considération et ma reconnaissance les plus distinguées.

Sommaire

Liste des Abréviations.....	i
Liste des Figures	ii
Liste des tableaux.....	iii
Lieu de Stage.....	iv
Objectif de stage.....	v
Introduction générale	1
Chapitre 1 : Revue bibliographique	
I-Rappel sur le cœur	2
II- Embryologie et circulation fœtale.....	3
A – Embryologie.....	3
1- Cloisonnement du cœur	3
a- Cloisonnement de l'oreillette	3
b- Cloisonnement du CAV.....	3
c- Cloisonnement des ventricules	3
B- Circulation fœtale	3
III- Epidémiologie et étiologie des cardiopathies congénitales.....	4
IV- Classification des cardiopathies congénitales	6
V- Bases moléculaires et génétiques des cardiopathies Congénitales.....	7
VI- Diagnostic des cardiopathies congénitales.....	8
A- Clinique	8
B- Para clinique.....	8
C- VII- Traitement des cardiopathies Congénitales.....	9
A-Traitement médicamenteux.....	9
B-Traitement chirurgical.....	9
C- Cathétérisme interventionnel.....	10
Chapitre 2 : Matériel et méthodes.....	
A) Matériel utilisé :.....	11
1- Echantillonnage.....	11
a- Patients	11
2- Stratégie de travail	11
B)- Méthode	11
D)- extraction d'ADN.....	11
1)- principe.....	11
2)-Protocole expérimental.....	11
a)-lyse des globules rouges	11

b)-lyse des globules blancs.....	12
c)- Dénaturation et précipitation des protéines et impuretés.....	12
d)- Précipitation et lavage de l'ADN	12
II- Dosage de l'ADN extrait.....	12
III. Amplification de l'ADN extrait par PCR	12
1-Principe.....	13
2-Réactifs nécessaires	13
3- Protocole expérimental.....	15
IV)- Visualisation du produit PCR par électrophorèse sur gel d'agarose.....	16
1- Principe	16
2- Protocole expérimental.....	16
V)- séquençage des produits PCR du gène NKX2.5.....	17
A- Purification du produit PCR par ExoSAP.....	17
1)-principe.....	17
2)- réactifs nécessaires.....	17
3)- protocole expérimental	17
B- Réaction de séquence par BigDye.....	17
1)-principe.....	17
2)- réactifs nécessaires.....	18
3)- protocole expérimental	18
C- Purification du produit de la réaction de séquence.....	18
1)-principe.....	18
2)- réactifs nécessaires.....	18
3)- protocole expérimental	19
D- Chargement de l'appareil.....	19
I- Les outils bioinformatiques.....	19
Chapitre 3 : Résultats et discussion.....	
I-Dosage et qualité d'ADN extrait	20
II- La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et séquençage.....	20
A- Résultats de la PCR des exons du gène NKX2.5 des différents patients	20
B- Séquençage, analyse des séquences et mutations détectées	23
Conclusion.....	27
Références bibliographique	

Liste des abréviations

A : Adénine	ml :millilitre
ADN : Acide désoxyribonucléique	mn :minute
Arg : Arginine	NaCl: Chlorure de Sodium
BLAST : Basic local Alignement Search tool	ng: Nanogramme
C : Cytosine	nM:nanomolaire
CAV: Canal atrioventriculaire	OD: Oreillete droite
CIA: Communication interauriculaire	OG: oreillete gauche
CIA-OP: .. Ostium premium	Pb:paire de base
CIA-OS: .. Ostium secundum	PCR:Réaction de polymerization en chaine
CIV : Communication interventriculaire	R: Revers
Cys : Cysteine	SLB : Solution de lyse des globles blancs
DdNTP:Didésoxyribonucléotides triphosphates	SPO2 : Saturation artérielle en oxygène
dNTP: désoxyribonucléotide Triphosphates	T : Témoin
ECG: Electrocardiogramme	T : Thymine
EDTA: Ethylène Diamine Tétra-Acétique Acide	Taq : Thermusaquaticus
F : Forward	TBE : Tris Borate EDTA
G : Guanosine	TE : Tris EDTA
G : Gramme	Tr : Tour
Glu : Acide Glutamique	UV : ultra-violet
IRM : Imagerie par résonance magnétique	V : Volume
KDa : Kilo dalton	VD : Ventricule droit
M : Molaire	VDDI/Ventricule Droit à double issues

Listes des figures

Figures	page
Figure 1 : Schéma de la circulation sanguine et des différents composants anatomiques cardiaques.	2
Figure 2 : Thermocycleur Applied Bisosystem 2700	16
Figure 3 : Photo de l'électrophorèse dans le gel d'agarose	16
Figure 4 : Photo d'un séquenceur automatique (Genetic Analyzer 3500Dx).	19
Figure 5 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification par PCR de l'exon 1 du gène NKX2.5 pour les 9 patients	21
Figure 6 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification par PCR de l'exon 2.1 du gène NKX2.5 pour les 9 patients	22
Figure 7 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification par PCR de l'exon 2.2 du gène NKX2.5 pour les 9 patients	22
Figure 8 : Electrophorégramme de la séquence de l'exon 1 du gène NKX2.5 du sujet sain (control négatif)	23
Figure 9 : Alignement de la séquence obtenue à partir du séquençage de l'exon 1 du sujet sain .	24
Figure 10 : Electrophorégramme de la séquence de l'exon 1 mentionnant la mutation hétérozygote	24
Figure 11 : Alignement de la séquence obtenue à partir du séquençage de l'exon 1 du sujet malade .	25
Figure 12 : Schéma de la protéine NKX2.5 avec les domaines fonctionnels : homéodomaine ;NK2, domaine nucléotidique de kinase ;TN ,domaine Tinman.	26

Liste des Tableaux

Tableau	Page
Tableau 1 : distribution de certaines cardiopathies congénitales à révélation néonatale.	5
Tableau 2 : Conditions de la réaction de PCR en utilisant le couple d'amorce NKX2.5 EX1 F/R	13
Tableau 3 : Conditions de la réaction de PCR en utilisant le couple d'amorce NKX2.5 EX2.1	14
Tableau 4 : Conditions de la réaction de PCR en utilisant le couple d'amorce NKX2.5 EX2.2	15
Tableau 5 : Programme de l'ExoSap	17
Tableau 6 : Volumes des réactifs du mix de la réaction de séquence	18
Tableau 7 : Programme de la réaction de séquence	18
Tableau 8 : illustre les concentrations d'ADN extrait à partir des différents patients	20

Présentation de l'établissement

Le Laboratoire Central d'Analyses Médicales est situé au bâtiment J et conçu comme un pôle d'activité hospitalière comportant plusieurs spécialités d'analyses médicales :

- Anatomie pathologique;
- Bactériologie-Immunoanalyses;
- Parasitologie;
- Biochimie et pharmacotoxicologie;
- Hématologie;
- Génétique médicale et biologie moléculaire.

Il se compose de :

- Salle de réception;
- Salle de prélèvements;
- Laboratoire de biochimie/Pharmacotoxicologie;
- Laboratoire d'hématologie;
- Laboratoire de bactériologie /Immunologie;
- Laboratoire de parasitologie;
- Laboratoire de génétique;
- Laboratoire d'anatomie pathologique.

L'unité de génétique médicale et d'oncogénétique UGMO, représente une première expérience dans un CHU au MAROC, elle est activement mise en place depuis sa création en Mars 2009.

L'unité de génétique médicale et d'oncogénétique est subdivisée en trois disciplines qui assurent des activités variées :

Génétique clinique (activité clinique)

- Consultation de génétique (au centre du diagnostic)
- Conseil génétique (au centre du diagnostic)
- Consultation d'oncogénétique (au centre du diagnostic)
- Avis du médecin généticien dans les services cliniques
- Hôpital de jour (en coordination avec les services cliniques)

Génétique chromosomique (analyse des chromosomes)

- Cytogénétique classique (caryotype) ;
- Cytogénétique moléculaire (FISH : Hybridation In Situ en Fluorescence).

Génétique moléculaire (analyse des gènes)

- Amplification de gène par PCR ; séquençage.

Objectif du stage

Le stage est une étape indispensable pour l'étudiant, en vue d'apprendre les méthodes de travail, les problèmes du domaine, et surtout de pratiquer ce qui a été acquis durant les études.

Ce stage, d'une durée de deux mois a consisté à mettre en place les techniques de la biologie moléculaire au sein du laboratoire de génétique et d'oncogénétique de CHU de Fès.

Ainsi, ce projet effectué au sein de ce laboratoire, consiste à mettre en œuvre l'apport de la biologie moléculaire (PCR et séquençage) dans la détection de la mutation du gène NKX2.5 impliqué dans les cardiopathies congénitales.

Ce stage s'est avéré très intéressant et très enrichissant pour ma propre expérience dans le domaine médical. En effet, ma formation (BS) s'inscrit précisément dans ce cadre, et grâce à ce stage, j'ai eu l'opportunité de mettre en pratique mes connaissances théoriques acquises durant ma formation à la FST.

Introduction générale

Les cardiopathies congénitales appartiennent aux malformations congénitales les plus fréquentes, et qui sont des anomalies cardiaques survenant au cours de la formation du cœur pendant la vie intra-utérine.

On recense aujourd'hui plus de 200 cardiopathies congénitales différentes, de la plus simple à la plus complexe.

Elles peuvent être définies comme des malformations du cœur et/ou de Vaisseaux, présentes à la naissance elle touche près de 1 % et c'est la cause la plus commune de mortalité infantile, en rapport avec une anomalie du développement. Plus de 29 % des enfants qui meurent d'une anomalie congénitale ont un défaut cardiaque.

Les cardiopathies congénitales sont le plus souvent isolées, leur caractère familial conduit à une demande génétique.

Leur diagnostic est facile grâce aux nouvelles techniques non invasives d'exploration comme l'échocardiographie, le doppler pulsé ou l'IRM, et leur prise en charge fait appel, dans la grande majorité des cas, aux techniques chirurgicales modernes qui ont transformé le pronostic de ces malformations.

Les malformations cardiaques sont actuellement de mieux en mieux connues au Maroc grâce à la disponibilité de l'échocardiographie doppler qui constitue la base du diagnostic.

De grandes avancées ont été réalisées ces dernières années pour la compréhension des bases moléculaires et génétiques des cardiopathies congénitales humaines. L'identification de gènes impliqués dans les malformations cardiaques a conduit à une nouvelle approche clinique chez les enfants atteints de cardiopathies et leurs familles. Ces progrès ont été faits grâce aux techniques de biologie moléculaire.

Récemment, la recherche s'est tournée vers la mise en évidence des facteurs de transcription qui contrôlent le programme génétique cardiaque et jouant ainsi un rôle critique dans la régulation transcriptionnelle.

Les défauts de reptations cardiaque sont des maladies génétiques autosomiques dominant caractérisée par un shunt gauche-droit, a peu près 50% des maladies cardiaques congénitales sont due à des défauts de septation, et qui sont considérés comme les plus

fréquentes cardiopathies congénitales. Parmi les gènes responsables des défauts de septation on trouve le gène NKX2.5, un gène homéotique indispensable pour le développement cardiaque normal qui est cartographié sur le chromosome 5q35, codant un facteur de transcription NKX2.5, qui joue un rôle prépondérant dans la régulation de la septation et la morphogenèse cardiaque. Les mutations de ce gène sont associées à des maladies cardiaques congénitales humaines dont fait partie les défauts de septation cardiaque.

I- Rappel sur le cœur :

Le cœur est l'élément central du système cardiovasculaire, il propulse le sang grâce aux contractions de son tissu musculaire appelé myocarde. Une épaisse cloison le divise en deux moitiés (cœur gauche, cœur droit) et chacune d'elle comporte deux cavités : l'oreillette et le ventricule (figure 1).

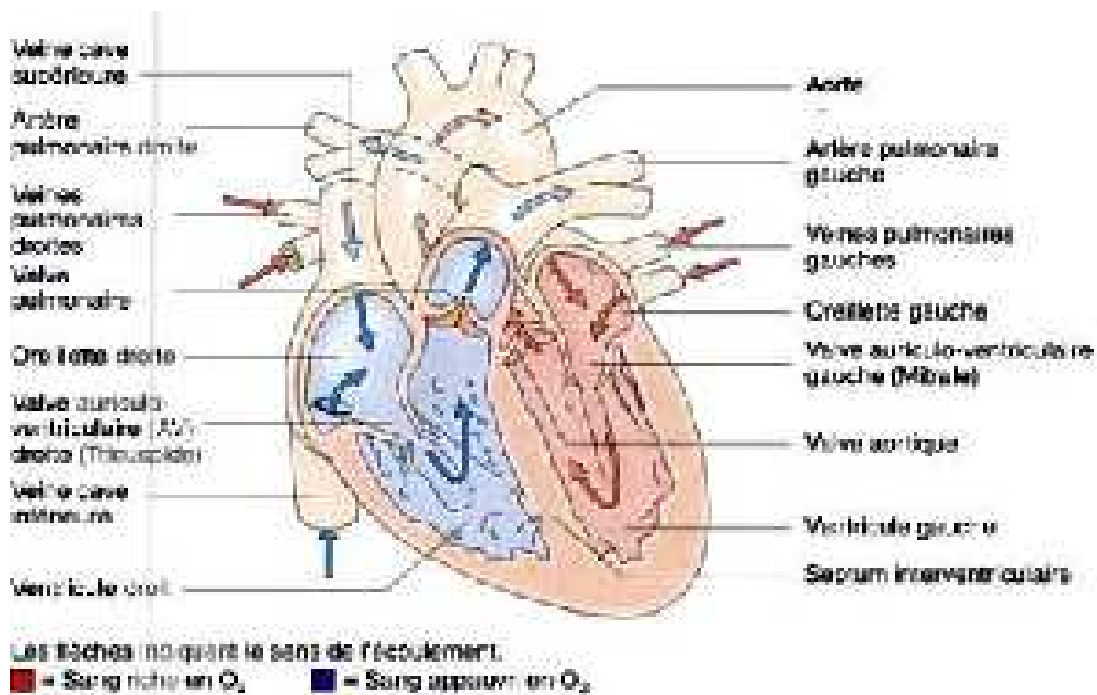


Figure 1 : Schéma de la circulation sanguine et des différents composants anatomiques cardiaques Lauralee Sherwood – 2006

II- Embryologie :

Le cœur est le seul organe assurant une fonction vitale chez le fœtus aux premiers stades de vie, les autres étant en majorité ou en totalité remplacés par le placenta qui, entre autres, assure à la place du poumon l'oxygénation du fœtus.

Généralement, le cœur du fœtus est complètement formé après 2 mois de la fécondation.

Le tube cardiaque, impair et médian, est organisé selon un axe antéropostérieur.

Les cavités veineuses et atriales occupent une position caudale, alors que les cavités ventriculaires et artérielles ont une position plus rostrale. La croissance du tube conduit à des mouvements de repli. Le tube se déforme d'abord en S puis subit une rotation selon l'axe céphalo-caudal. Il en résulte que le pôle veineux cardiaque occupe une position dorsale alors que le pôle artério ventriculaire se place au niveau ventral.

1-Cloisonnement des oreillettes :

La première étape de la séparation de circulation systémique et pulmonaire correspond au cloisonnement partiel des oreillettes et à la division du CAV en deux portions : une droite et une gauche. Le septum inter-auriculaire de l'adulte résulte de la fusion de deux septa : le septum primum et le septum secundum. Chacun d'eux est muni d'une large ouverture qui permet le shunt de droite à gauche du sang pendant la gestation. Ce cloisonnement auriculaire commence autour du 26^{ème} jour. Les deux mécanismes sont étroitement impliqués ; cloisonnement du CAV et cloisonnement de l'oreillette proprement dit.

2-Cloisonnement du CAV :

Le CAV prend une forme allongée de droite à gauche due au positionnement du cône artériel sur sa partie antérieure. A cet endroit, des bourrelets endocardiques vont se développer. Les plus importants sont les bourrelets endocardiques inférieur et supérieur. Les deux autres, droit et gauche, sont moins fondamentaux dans l'organisation du cœur. Ces bourrelets endocardiques, antérieur et supérieur, vont fusionner très rapidement pour créer deux canaux auriculo-ventriculaires, l'un droit et l'autre gauche.

L'absence de fusion de ces bourrelets détermine une cardiopathie grave : la persistance du canal atrioventriculaire.

3-Cloisonnement des ventricules :

La cloison interventriculaire est composée d'une épaisse portion musculaire et d'une mince portion membraneuse. Elle est formée par la fusion du bourrelet endocardique auriculo-ventriculaire inférieur, du bourrelet aortopulmonaire droit, et du bourrelet aortopulmonaire gauche. L'absence de soudure entre ces éléments entraîne la persistance d'une CIV.

4-Circulation fœtale normale :

L'hémodynamique fœtale intervient de façon très importante dans le développement des malformations cardiaques, en raison de la relation étroite qui existe entre d'une part, la croissance des cavités, le calibre des vaisseaux et la taille des communications (foramen ovale et canal artériel), et d'autre part, le flux qui traverse toutes ces structures.

5-Les modifications circulatoires postnatales :

Chez le fœtus, l'ensemble réseau circulatoire fonctionne à basse pression. Cette relative uniformité de la pression sanguine tient en l'existence de 2 shunts entre les futures circulations droite et gauche :

- La CIA physiologique (foramen ovale et ostium secundum)
- Le canal artériel

Ces shunts permettent de satisfaire 3 impératifs de la circulation fœtale :

- Privilégier le cerveau et le cœur, grands consommateurs d'oxygène.
- Court-circuiter le poumon (où les résistances vasculaires sont élevées).
- Assurer un débit sanguin maximal au niveau du placenta où les résistances vasculaires sont basses.

A la naissance interviennent 2 faits essentiels:

- L'interruption de la circulation placentaire lors de la ligature du cordon.
- Le déplatement du poumon qui prend le relais du placenta pour les échanges gazeux.

Ces 2 événements ont pour conséquence la fermeture des shunts physiologiques et l'instauration de 2 systèmes circulatoires :

- l'un à haute pression ou grande circulation, au départ du ventricule gauche.
- l'autre à basse pression ou petite circulation, centré sur le ventricule droit.

III- Epidémiologie et étiologie des cardiopathies congénitales :

Dans les pays occidentaux, les malformations cardiaques congénitales représentent la première cause de mortalité et de morbidité chez l'enfant de moins de 1 an (Bossi et al 1999). Elles sont pourvoyeuses de nombreux handicaps et constituent à ce titre, un problème majeur de santé publique. En effet, on estime que 2 à 3% des enfants qui naissent en France, sont

atteints d'une ou de plusieurs malformations, ce qui représente 15 à 25 000 naissances. En Europe, les malformations cardiaques congénitales ont une prévalence de 0,4% à 0,8 % (Guillum RF, 1994 ; petriniJ et al., 1997 ; Chevaliier B et al.,2008) .

La prévalence et la distribution des types de cardiopathies congénitales sont stables dans le temps, elle est estimée entre 4 et 8 pour 1000 naissances vivantes.

Elle est légèrement supérieure chez le garçon (sex-ratio M/F : 1,08).La distribution par fréquence des cardiopathies varie avec le sexe :

- prédominance chez le garçon, des lésions obstructives du cœur gauche et des cardiopathies « conotruncales » : tétralogie de Fallot, atrésie pulmonaire à septum ouvert, tronc artériel commun, ventricule droit à double issue, atrésie pulmonaire...
- prédominance chez la fille, de la communication interauriculaire et du canal artériel.

Le tableau 1 illustre la distribution de certaines cardiopathies congénitales à révélation néonatale.

Tableau 1 : distribution de certaines cardiopathies congénitales à révélation néonatale.

Type de cardiopathie congénitale	Fréquence (%)
Transposition des gros vaisseaux	13.0
Tétralogie de Fallot	10.0
Hypoplasie du cœur gauche	9.8
CIV périmembraneuse	9.8
CAV	7.0
CIV musculaire	5.4
Atrésie pulmonaire	4.6
Coarctation de l'aorte	4.3
Sténose aortique	3.9
Sténose pulmonaire	3.2
VDDI	2.9
CIA	2.4
Divers	16.6

D'après une étude marocaine réalisée par Akkar O en 2010, la fréquence globale des cardiopathies congénitales est de 4,41 % , la découverte des ces cardiopathies va de la naissance à l'âge de 16 ans avec une moyenne de 39 mois , la répartition selon le sexe a

montré une légère prédominance masculine : 53,16 % pour 46,84 % de sexe féminin soit 1,13 garçon pour une fille , les shunts gauche-droite sont les plus fréquents avec 70,60 % de l'ensemble des malformations congénitales cardiaques suivis des cardiopathies cyanogènes 16,27 % et des malformations obstructives 13,12 % .

Malgré que plusieurs facteurs étiologiques ont pu être étudiés des façon assez précise, les causes de la majorité des cardiopathies congénitales restent obscures dans la plupart des cas.

La tendance qui prévaut actuellement est de considérer qu'environ 90 % des malformations cardiaques sont le résultat de la combinaison de prédispositions génétiques et de facteurs d'environnement (Iselin M, 1999).

Facteurs d'environnement :

C'est dans les 2 premiers mois de la gestation, que leur action serait susceptible d'entraîner une malformation.

□□ Virus

La rubéole congénitale peut provoquer une persistance du canal artériel, une sténose pulmonaire, une CIA ou une CIV. Sa fréquence est en nette diminution avec les campagnes de vaccination. Le rôle tératogène d'autres virus (Cytomégalovirus, Coxsackie) est vraisemblable mais non démontré.

□□ Toxiques

Un certain nombre de substances sont tératogènes si elles sont administrées pendant les premières semaines de la grossesse : antiépileptiques (hydantoïne), triméthadione, isotrétinoïne, lithium.

Le rôle des oestroprogestatifs est discuté. Le syndrome d'alcoolisme fœtal (dysmorphie, retard mental...) comporte dans 30 % des cas, une cardiopathie.

□□ Affections maternelles

Le diabète maternel, Le lupus érythémateux disséminé et les syndromes lupiques peuvent être responsables de troubles de conduction intracardiaque ou d'atteinte myocardique.

Les patientes atteintes de phénylcétonurie doivent se soumettre, avant la conception, à un régime pauvre en phénylalanine. En effet la phénylcétonurie augmente le risque de survenue des cardiopathies congénitales notamment la tétralogie de Fallot, les CIV, et la persistance du canal artériel.

□ Aberrations chromosomiques

La fréquence et le type de cardiopathie varient en fonction de la nature de l'aberration. Les anomalies chromosomiques cliniquement patentes se retrouvent chez 6 à 10 % des nouveau-nés atteints de malformations cardiaques. Si l'on considère l'ensemble des enfants atteints d'anomalies chromosomiques, la proportion des malformations cardiaques est de 33 %. Elle est de près de 100 % dans la trisomie 18, de 40 % dans la trisomie 21.

□ Affections géniques

Les malformations cardiaques relevant d'affections monogéniques à transmission mendélienne autosomique ou gonosomique représentent environ 3 % des cardiopathies. Il apparaît fondamental de les reconnaître en raison de leur risque de récurrence.

IV- Classification des cardiopathies congénitales

La grande diversité des malformations cardiaques oblige à recourir à une classification:

- Classification anatomique ou exactement segmentaire, c'est-à-dire réalisant une description précise de chacun des éléments de l'anatomie cardiaque ainsi que leurs rapports respectifs, y compris avec les viscères avoisinants.
- Classification physiopathologique, plus souvent utilisée et basée sur les perturbations hémodynamiques créées par les malformations cardiaques.

Fréquence des cardiopathies :

Les cardiopathies congénitales concernent environ 6 à 8 naissances sur 1000.

Il en existe de deux types:

Les cardiopathies non cyanogènes dont :

- La CIV (32 %)
- La persistance du canal artériel (12%)
- La CIA (6 %)
- La coarctation de l'aorte (6 %)
- La sténose aortique (5 %)

Les cardiopathies cyanogènes comme:

- La sténose pulmonaire (8 %)
- La tétralogie de Fallot (6 %)

-La transposition des gros vaisseaux (5 %)

V- Bases moléculaires et génétiques des cardiopathies congénitales.

De grandes avancées ont été réalisées ces dernières années dans la compréhension des bases moléculaires et génétiques des cardiopathies congénitales humaines. L'identification de gènes de malformations cardiaques a conduit à une nouvelle approche clinique chez les enfants atteints de cardiopathies et leurs familles.

Bien que les cardiopathies congénitales soient le plus souvent isolées, leur caractère familial ou syndromique conduit fréquemment à une demande de conseil génétique.

Les cardiopédiatres ont amélioré leur description des phénotypes cardiovasculaires mais l'hétérogénéité génétique fait que l'approche moléculaire est encore compliquée pour une anomalie donnée .

Depuis une quinzaine d'années, le caractère monogénique des certaines cardiopathies congénitales a permis par des techniques de biologie moléculaire, d'identifier de nombreux gènes de développement cardiaque (Gruber PJ ; Epstein JA ,2004). Certains de ces gènes sont mutés chez des patients ayant des cardiopathies congénitales isolées ou associées à des malformations extracardiaques dans le cadre de syndromes génétiques identifiés.

Communication interauriculaire :

La communication interauriculaire (CIA) correspond à un défaut de développement du septum interauriculaire, dont la formation dépend de plusieurs évènements morphogénétiques régulés de manière spatiale et temporelle. Actuellement, quatre gènes de CIA, isolée ou syndromique, sont connus chez l'homme. TBX5 dans le syndrome cardiosquelettique de HOLT-Oram, NKX2.5, GATA4 et MYH6 (Ching YH et al., 2005 ; Gruber PJ ; Epstein JA,2004) . les trois premiers gènes codent des facteurs de transcription dont les interactions, au cours du développement embryonnaire murin, ont été montrées (Bruneau BG,2002).

Implication du gène NKX2.5 dans les cardiopathies congénitales :

Le gène NKX2.5 appartient à la famille NK2 des facteurs de transcription à homéoboite. Le gène Tinman de la drosophile, homologue à NKX2.5 est nécessaire à la spécification de la région cardiogénique du mésoderme dorsal (Bodmer R, 1993).

Chez les vertébrés, NKX2.5 est exprimé précocement dans les cellules du tube cardiaque linéaire et du deuxième champ cardiaque. les embryons NKX2.5 -/- forment un tube cardiaque mais la courbure et la suite de développement du cœur sont bloquées et les embryons meurent après (Lyons I et al.,1995).

Des données récentes suggèrent que ce phénotype est associé avec une augmentation des cellules progénitrices du cœur et une surexpression des gènes du deuxième champ cardiaque qui bloqueraient la suite de la différenciation du myocarde (Prall OWJ et al. , 2007).

NKX2.5 est localisé sur le chromosome 5 humain, dans une région impliquée dans des cardiopathies congénitales hétérogènes, et des mutations de NKX2.5 ont été identifiées chez des patients (Schott JJ et al., 1998). Les malformations observées comprennent des défauts de septation notamment du septum secondaire des oreillettes, du système conducteur et de septation des ventricules ainsi que la voie efférente.

La réduction de plus de 50 % du niveau d'expression de NKX2.5 avec un allèle hypomorphe entraîne des défauts plus sévères de la voie efférentes et de la septation auriculaire et ventriculaire (Prall OWJ et al.,2007).

NKX2.5 est donc requis pour plusieurs aspects de développement cardiaque, des étapes précoces au maintien du système conducteur pendant la vie adulte.

VI- Diagnostic des cardiopathies congénitales :

A .Clinique :

Elle constitue et demeure la base indispensable du raisonnement diagnostique, en individualisant deux signes dominants, la cyanose et l'insuffisance cardiaque, qui parfois, peuvent être associés.

L'examen général doit rechercher surtout un syndrome dysmorphique, et des signes en faveur de prématurité.

L'examen cardiaque doit être effectué de façon systématique et comprend, en plus des signes vitaux et de la palpation abdominale à la recherche d'une hépatomégalie, l'inspection et la palpation cardiaque, l'auscultation, la palpation des pouls périphériques, et la recherche de signes d'insuffisance cardiaque. Il est préférable de réaliser cet examen après 24 heures de vie.

B. Paraclinique :

- **ECG :**

Il est réalisé dans le but de rechercher une anomalie de la fréquence cardiaque, du rythme, une hypertrophie auriculaire ou ventriculaire, un bloc de branche etc.

- **Saturomètre :**

La saturation en oxygène est la concentration d'oxygène dans le sang. Elle mesure le pourcentage de sites de fixations d'hémoglobine dans le flux sanguin occupé par l'oxygène. Une valeur de SpO₂ supérieure ou égale à 95% est considérée comme normale (Rosenberg D,2003). Elle présente un intérêt surtout pour les cardiopathies congénitales cyanogènes.

- **Radiographie thoracique :**

Actuellement, le cliché thoracique fait partie intégrante de l'approche diagnostique non invasive des cardiopathies congénitales. Il constitue la première étape avant la réalisation du bilan échocardiographique.

Elle doit être d'excellente qualité pour être valablement interprétée. Une incidence suffit, elle doit être rigoureusement de face, en bonne inspiration et correctement exposée. Son analyse doit porter systématiquement sur trois éléments: silhouette cardiaque, gros vaisseaux et la vascularisation pulmonaire.

- **Échocardiographie :**

L'échocardiographie est d'un apport essentiel dans le domaine des cardiopathies congénitales, plus encore, que dans les autres domaines de la cardiologie. Elle a en effet l'énorme avantage d'être totalement non invasive et de pouvoir être réalisée, et éventuellement répétée, quels que soient l'âge, le poids et l'état clinique du patient. Les jeunes enfants ont la particularité d'être constamment très échogènes, du fait de la faible épaisseur de leur paroi thoracique, ce qui permet d'utiliser dans cette population des transducteurs de haute

fréquence, et donc d'obtenir une définition d'imagerie supérieure à celle obtenue chez l'adulte.

- **IRM :**

L'IRM est utile seulement en cas d'échec de l'échographie. En effet, les causes d'échec de l'échographie peuvent être une paroi thoracique épaisse, des poumons emphysémateux, une scoliose.

VII- Traitement des cardiopathies congénitales :

A- Traitement médicamenteux

Les prostaglandines et les inhibiteurs de l'enzyme de conversion sont devenus des piliers de la thérapeutique médicale des CC. Ce qui est nouveau, c'est l'apparition des vasodilatateurs pulmonaires sélectifs, comme le monoxyde d'azote inhalé et des antagonistes des récepteurs de l'endothéline. Cette avancée est à la base de progrès dans la prise en charge des suites opératoires d'interventions à haut risque (CAV complet, TAC, RVPAT). Elle ouvre aussi une brèche d'espoir dans le mur épais du traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire primitive ou secondaire.

B- Traitement chirurgical :

Les progrès constants sur le plan technologique (machine cœur –poumons, biomatériaux, homogreffes, fils de suture, tubes synthétiques), les innovations techniques, l'évolution des connaissances physiopathologiques pré- et postopératoires, et la sophistication des techniques de réanimation sur le plan de la ventilation, du monitoring, et de la pharmacologie, ont permis d'aborder la plupart des malformations de façon de plus en plus sûre, puis de plus en plus précoce. Lorsqu'une réparation chirurgicale est envisageable, son principe général dépendra de l'anatomie et de la physiopathologie des lésions.

C- Cathétérisme interventionnel

Le cathétérisme interventionnel consiste à réaliser un acte thérapeutique palliatif ou curatif au cours d'un cathétérisme cardiaque, artériel ou veineux. Cet acte peut être effectué à tout âge, aussi bien chez le nouveau-né que chez l'adolescent atteint d'une cardiopathie congénitale pour :

- améliorer l'état hémodynamique de cardiopathie congénitale pour complexe ;

- traiter définitivement une cardiopathie congénitale ;
- compléter un acte chirurgical ou traiter une récurrence d'une lésion.

Le cathétérisme interventionnel doit être proposé aux parents dès que les risques ne sont pas supérieurs à ceux de la chirurgie.

Matériel et méthodes

A-Matériel utilisé :

1°) Echantillonnage : patients

Il s'agit d'une étude portée sur une série de 9 patients. Ces patients ont été colligés au sein du laboratoire d'oncologie et biologie moléculaire de CHU de Fès, afin d'évaluer l'implication du gène NKX2.5 comme facteur prédictif et pronostic dans le diagnostic et le traitement.

Dans notre cas (gène NKX2.5), l'extraction est réalisée à partir du sang.

2°) Stratégie de travail :

Une extraction de l'ADN est d'abord réalisée à partir du sang, suivie de sa quantification par dosage spectrophotométrique. Par la suite, les échantillons sont analysés par PCR (pour amplification de gène recherché). Le séquençage du fragment amplifié permet l'identification de la mutation recherchée.

B- Méthode :

I. Extraction d'ADN par sel :

1. Principe :

L'extraction d'ADN sur suspension cellulaire est une technique qui permet d'isoler l'ADN à partir d'une suspension cellulaire par lyse des cellules suivie d'une élimination des protéines et tout débris cellulaire, puis une précipitation de l'ADN par l'alcool.

2. Protocole expérimental :

Pour l'extraction d'ADN, le sang conservé dans le tube EDTA et qui a été stocké à -20°C sera utilisé. Il est décongelé juste avant la manipulation :

a) Lyse des globules rouges :

Le sang est récupéré dans un tube de 15 ml, deux volumes du tampon d'extraction TE 20/5 qui va lyser les globules rouges sont ajoutés. Une incubation dans la glace est ensuite réalisée pendant 20 mn.

Après incubation et centrifugation à 2500 tr/mn pendant 5 mn, le surnageant est éliminé jusqu'à 1ml.

Les étapes précédentes sont répétées (ajout de deux volumes de TE 20/5, incubation.....) jusqu'à obtenir un culot blanc ne renfermant que les globules blancs.

b) Lyse des globules blancs :

Le culot est suspendu dans 3 ml de SLB, homogénéisé, puis additionné de 100 µl de protéinase K. Ensuite, une incubation est réalisée à 42°C pendant une nuit sous agitation douce.

c) Dénaturation et précipitation des protéines et impuretés :

Le lendemain, 4 ml d'eau distillée stérile et 4 ml de NaCl 5 M sont ajoutés .Après homogénéisation, une centrifugation à 3000 tr/mn pendant 30 mn est réalisée.

d) Précipitation et lavage de l'ADN :

Le surnageant est récupéré dans un nouveau tube de 50 ml, deux volumes d'éthanol absolu froid sont ajoutés. L'homogénéisation fait apparaitre enfin "la méduse" d'ADN.

La méduse est récupérée dans un tube eppendorf de 1.5 ml, un lavage à l'éthanol 75% est réalisé et ensuite les traces de l'éthanol sont évaporées.

Après évaporation, l'ADN est dilué dans 200 µl de TE et stocké à +4°C pour toute utilisation ultérieure (pour un stockage prolongé il est préférable de conserver l'ADN à -20°C).

II- Dosage de l'ADN extrait :

La concentration d'ADN extrait est déterminée par spectrophotométrie. Notons que les protéines absorbent à 280 nm alors que les acides nucléiques absorbent à 260nm .Une unité de densité optique à 260 nm correspond à 50 µg /ml d'ADN double brin. La valeur de

L'absorbance à 280 nm permet de déterminer toute contamination protéique. L'extrait d'ADN sera considéré comme pur si le rapport A260/A280 est compris entre 1,8 et 2.

Au laboratoire le <NANODROP> est l'appareil utilisé pour réaliser ce dosage. Il suffit de déposer dans l'appareil 2 µl d'ADN extrait pour déterminer sa concentration et obtenir la courbe qui renseigne sur sa pureté.

Une dilution des échantillons d'ADN extraits est effectuée pour arriver à une concentration finale d'ADN de 40 ng (Wang et al., 2011)

III. Amplification de l'ADN extrait par PCR :

1- Principe :

La réaction PCR (Polymérase Chain Réaction) permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier.

Pour ce faire, une série de réactions permettant la réplication d'une matrice d'ADN double brin est répétée en boucle. Ainsi, au cours de la réaction PCR, les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant, l'amplification est donc exponentielle.

2- Réactifs nécessaires :

Tableau2 : Conditions de la réaction de PCR en utilisant le couple d'amorce NKX2.5 EX1 F/R

Tableau : PCR simplexe						
Gène	NKX2.5	Locus	5q35.1	Nombre d'exons	1	
Taille de l'amplification	Amorce Forward (5'>3')			Amorce Revers (5'>3')		
477pb	CACGATGCAGGG AAGCTG			AGTTTCTTGGGG ACGAAAGC		
Conditions expérimentales			Programme PCR			
Réactif	concentration	V (µl)	Etape	T (°C)	Temps	Cycles
Tampon	10 X	2.5	Dénaturation initiale	94 °C	7 min	1
MgCl2	50 mM	0,35				
Dntp	10 mM	1				
Amorces	EX 1 F	10 mM	2	Dénaturation	94°C	40 s
	EX1 R	10 mM	2			
				Hybridation	59°C	30 s
				Elongation	72°C	40 s
H2O	qsp	17,95				
Taq	5 u/µl	0.2				
ADN	100 ng/µl	1	Elongation finale	72°C	7 min	1
Volume total	25 µl					

Tableau3 : Conditions de la réaction de PCR en utilisant le couple d'amorce NKX2.5 EX2.1

Tableau : PCR simplexe							
Gène	NKX2.5	Locus	5q35.1	Nombre d'exons	1		
Taille de l'amplifia	Amorce Forward (5'>3')			Amorce Revers (5'>3')			
463 pb	CCTCCACGAGGATCC CTTAC			CGAGTCCCCTAGGCATGG			
Conditions expérimentales				Programme PCR			
Réactif	concentration	V (µl)	Etape	T (°C)	Temp s	Cycles	
Tampon	10 X	2.5	Dénaturation initiale	94 °C	7 min	1	
MgCl2	50 mM	0,5					
dNTP	10 mM	1					
Amorces EX 2.1	EX 2.1 F	10 mM	1	Dénaturation	94°C	40 s	
	EX 2.1 R	10 mM	1				
				Hybridation	61°C	30 s	30
				Elongation	72°C	40 s	
H2O	Qsp	17,80					
Taq	5 u/µl	0.2					
ADN	100 ng/µl	1	Elongation finale	72°C	7 min	1	
Volume total	25 µl						

Tableau 4 : Conditions de la réaction de PCR en utilisant le couple d'amorce NKX2.5 EX2.2

Tableau : PCR simplexe						
Gène	NKX2.5	Locus	5q35.1	Nombre d'exons	1	
Taille de l'amplifia	Amorce Forward (5'>3')			Amorce Revers (5'>3')		
473 pb	AGAACCGGCGCTA CAAGTG			GAGTCAGGGAGCTGTTGAGG		
Conditions expérimentales			Programme PCR			
Réactif	concentration	V (µl)	Etape	T (°C)	Temp s	Cycles
Tampon	10 X	2,5	Dénaturation initiale	94 °C	7 min	1
MgCl2	50 mM	0,5				
Dntp	10 mM	1				
Amorces EX 2.2	EX 2.2 F	10 mM	1	Dénaturation	94°C	40 s
	EX 2.2 R	10 mM	1			
H2O	qsp	17,80	Elongation	72°C	40 s	30
ADN	100 ng/µl	1				
Volume total	25 µl		Elongation finale	72°C	7 min	1

3-Protocole expérimental :

Dans un premier temps, des tubes eppendorfs de 0.2 ml sont préparés selon le nombre des échantillons qu'on veut amplifier. Deux contrôles positifs (l'ADN d'un homme 46, XY normal et d'une femme 46, XX normale), un contrôle négatif (ne contenant aucun ADN) et l'ADN de(s) patient(s) qu'on veut tester sont préparés. Le mix PCR contenant le volume des différents constituants signalés précédemment est préparé, chacun est multiplié par le nombre des ADN qu'on veut amplifier.

Le mix préparé est réparti dans les différents tubes en raison de 24 μl par tube puis, 1 μl d'ADN correspondant est ajouté.

Les tubes sont placés dans le ThermoCycleur et le programme de dénaturation/hybridation/élongation illustré précédemment est lancé.

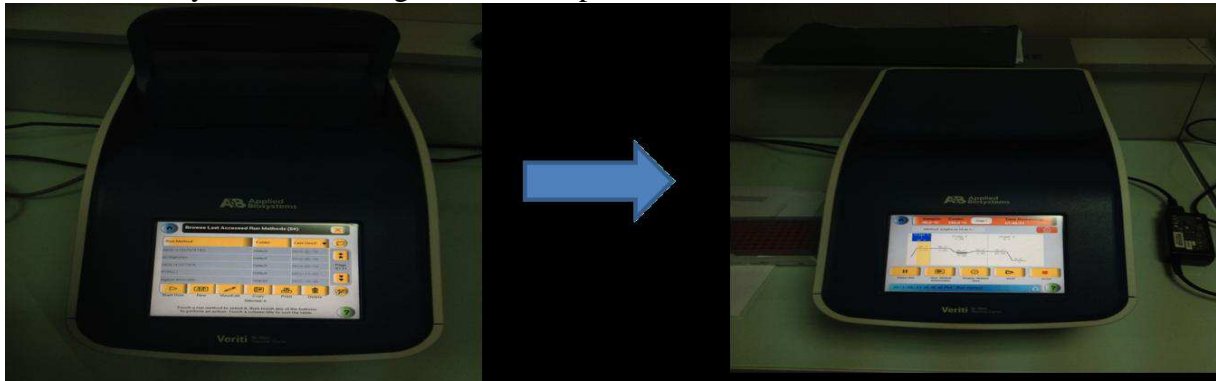


Figure2 : ThermoCycleur Applied Biosystem 2700

A la fin de la réaction, les tubes sont récupérés et conservés à $+4^{\circ}\text{C}$ jusqu'à leur utilisation

IV- Visualisation du produit PCR par électrophorèse sur gel d'agarose.

1. Principe :

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une technique qui permet la séparation des molécules chargées sous l'action d'un champ électrique en fonction de leur taille et de leur charge électrique. A pH neutre, les molécules d'ADN chargées négativement en raison de la présence du phosphate, migrent vers l'anode. Le BET s'étant intercalé entre les bases de l'ADN va permettre de visualiser les bandes d'ADN sous UV.

2. Protocole expérimental :

Dans un premier temps, un gel d'agarose 2 % est préparé. Pour cela, 2 g de poudre d'agarose et 50 ml de TAE 1X, sont portés à ébullition. 2 μl de BET qui est un agent révélateur par sa fluorescence sous U.V et qui va s'intercaler entre les bases sont ajoutés.

Le gel est coulé dans le moule à électrophorèse avec un peigne préalablement placé. Ce dernier sera retiré après refroidissement du gel en laissant à sa place des puits où sera déposé l'ADN.

Après refroidissement, le moule est placé dans la cuve qui est remplie du tampon de migration (TAE 1X). Dans dans chaque puits, un mélange de 8.5 μl de produit PCR et 1.5 μl de solution de charge qui a pour rôle de stabiliser l'ADN au fond du puits sont déposés. La migration est lancée à 100 V, et enfin, les bandes d'ADN fluorescentes sont visualisées sous UV.

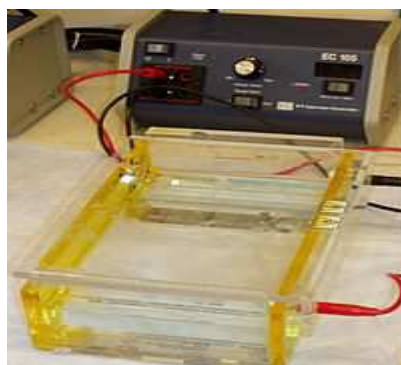


Figure 3 : Photo de l'électrophorèse dans le gel d'agarose

V. Séquençage des produits PCR du gène NKX2.5 :

Le séquençage est un procédé qui permet d'obtenir la séquence nucléotidique exacte d'un fragment d'ADN. Initialement appliquée par Frederick Sanger, cette technique a connu depuis un énorme progrès consistant en l'utilisation de kits spécifiques, marquage par quatre types de fluorochromes, automatisation du processus...

Avant de procéder au séquençage proprement dit, il est nécessaire de passer par des étapes de préparation du produit à séquencer à fin d'obtenir un résultat optimal.

A. Purification du produit PCR par ExoSAP

1. Principe :

La purification du produit PCR consiste à éliminer les traces des constituants de la réaction de PCR, à savoir, les amorces, les résidus, les dNTP... et ne garder que l'ADN à séquencer pour ne pas gêner les réactions en aval.

2. Réactifs nécessaires :

- ✚ Produit PCR
- ✚ L'ExoSap-IT® qui est constitué principalement de deux enzymes:
 - ◆ L'exonucléase S1 qui dégrade tous les brins monocaténares et donc toutes les amorces résiduelles.
 - ◆ La phosphatase alcaline qui va déphosphoryler tous les dNTP non incorporés dans la réaction précédente.

3. Protocole expérimental :

Dans un tube eppendorf de 0.2 ml, 1 µl de la solution ExoSap est ajouté en présence de 4 µl du produit PCR dilué (la dilution dépend de la bande obtenue lors de la migration). Le mélange réactionnel est placé dans le ThermoCycleur et le programme spécifique de l'ExoSap est lancé.

Tableau 5: Programme de l'ExoSap

Stade	Température	Temps	Cycles
1	37°C	30 mn	1
2	80°C	15 mn	1
3	10°C	∞	1

B. Réaction de séquence par BigDye

1. Principe

Cette technique, comme la PCR, est basée sur la copie d'un fragment d'ADN que l'on désire séquencer par une Taq polymérase, sauf que dans cette réaction, on ajoute en plus des 4 dNTP, une faible quantité des 4 ddNTP (didésoxyribonucléotides) dont le groupement OH du carbone 3' du désoxyribose est remplacé par un atome d'hydrogène de façon à bloquer la réaction d'élongation chaque fois incorporé. Chaque type de ddNTP est marqué par un fluorochrome différent qui servira à la détection des bases au niveau du séquenceur.

2. Réactifs nécessaires :

Le Kit utilisé est celui de la réaction de séquence ABI®BigDye® Terminator V1.1 cycle sequencing Kits

qui contient tous les réactifs nécessaires pour la réaction de séquence.

3. Protocole expérimental :

Dans des tubes eppendorf de 0.2ml, le mix illustré dans le tableau suivant est préparé. 4 tubes sont réalisés pour chaque patient.

Tableau 6 : Volumes des réactifs du mix de la réaction de séquence

Tubes de réaction	BigDye e (µl)	Amorces 10mM (µl)	Pr. PCR purifié (µl)	Eau stérile (µl)	Tampon	Volume finale (µl)
Tube 1 F (contenant les amorces F de la séquence)	2	1	4	1	2	10
Tube 1 R (contenant les amorces R de la séquence)	2	1	4	1	2	10

Le tube dans est placé dans le ThermoCycleur et le programme suivant est lancé:

Tableau 7: Programme de la réaction de séquence

Stade	Température	Temps	Cycles
1	96°C	1 min	1
	96°C	10 s	
2	50°C	5 s	25
	60°C	3 min	
3	10°C	∞	1

A la fin de la réaction, les tubes feront l'objet d'une purification du produit de séquence.

C. Purification du produit de la réaction de séquence

1. Principe :

Cette purification consiste à éliminer l'excès des réactifs de la réaction de séquençage pour ne pas gêner le séquençage.

2. Réactifs nécessaires :

Kit "BigDye® XTerminator™ purification Kit" contenant:

- ◆ SAM™Solution (tampon)
- ◆ BigDye®XTerminator™Solution (résines)

3. Protocole expérimental :

Dans le puits de la plaque, seront placés 45 µl du produit SAM™Solution, 10 µl du produit BigDye®XTerminator™, (Solution préalablement vortexée pour suspendre les résines) et 10 µl du produit de la réaction de séquençage. Ensuite, la plaque est placée sous agitation légère pendant 30 min, suivie d'une centrifugation à 13000 pendant 3 minutes. Le surnageant contenant les fragments à séquencer est enfin transféré dans les puits de la plaque du séquenceur.

D. Chargement du séquenceur :

La plaque est placée dans le séquenceur qui est un automate d'électrophorèse capillaire qui lance un flux électrique d'ions à travers un capillaire, ce qui entraîne la migration des

fragments d'ADN. Une fois arrivés au site de détection, les quatre fluorochromes des ddNTP terminaux seront excités. Suite à cette excitation, chaque fluorochrome émettra une lumière à une longueur d'onde différente qui sera détectée puis convertie en séquence par le logiciel d'analyse des séquences.



Figure 4: Photo d'un séquenceur automatique (Genetic Analyzer 3500Dx).

I- Les outils de bioinformatique :

Logiciel BLAST :

BLAST (acronyme de basic local alignment search tool) est un algorithme utilisé en bioinformatique permettant de trouver les régions similaires entre deux ou plusieurs séquences de nucléotides ou d'acides aminés.

Ce programme permet de calculer significativement les pourcentages de similitude (parfois abusivement qualifiés de « pourcentages d'homologie » entre les séquences en les comparant avec des banques de données.

Il existe différents types d'analyses du programme BLAST. Dans notre étude, on a utilisé l'outil BLAST pour comparer les séquences obtenues après séquençage avec les séquences répertoriées dans la banque de données.

Résultats & discussion :

L'utilisation des techniques moléculaires nous a permis de mettre en évidence la présence d'éventuelles mutations du gène NKX2.5 , codant pour un facteur de transcription à

domaine homéotique composé de trois hélices alpha, et qui fait partie d'une famille très conservée depuis la drosophile jusqu'à l'homme , ce gène étant impliqué dans les défauts de septation cardiaque .

I-Dosage et qualité d'ADN extrait :

La pureté et la qualité de l'ADN extrait requiert une importance majeure, car elle influence directement la qualité des résultats obtenus grâce aux techniques de biologie moléculaire (PCR, Séquençage) exploités dans la recherche des éventuelles mutations du gène NKX2.5 . L'extraction d'ADN a été réalisée par la méthode classique de <salting out > à partir du sang total des patients étudiés.

Le rapport de l'absorbance DO260 /DO280, est compris pour la plupart des échantillons entre les valeurs 1,8 et 2 ce qui montre que les échantillons sont purs, exempt de toutes impuretés protéiques.

Le tableau 8 : illustre les concentrations d'ADN extrait à partir des différents patients :

- Concentration en ng des différents échantillons d'ADN extraits par la technique de salting- out .

Patients	Concentration ADN ng /μl
P1	407
P2	371
P3	365
P4	400
P5	106
P6	237
P7	317
P8	313
P9	128

II- La réaction de polymérisation en chaine (PCR) et séquençage

A- Résultats de la PCR des exons du gène NKX2 .5 des différents patients :

Après extraction d'ADN, la PCR des 2 exons du gène NKX2.5 a été réalisée selon le protocole expérimental adopté par le laboratoire et qui se base sur les températures d'hybridations commercialisées avec les amorces commandées.

On a procédé à l'amplification de ce gène chez les 9 échantillons d'ADN correspondants aux 9 patients (P1 à P9) de la série d'étude, grâce aux conditions de stringence optimisées 59°C / MgCl₂ 0,35 µM , 61°C / MgCl₂ 0,5 µM ,et 64°C / MgCl₂ 0,5 µM respectivement pour l'Exon 1 , Exon 2,1 , Exon 2,2 (voir matériel et méthodes) . Les résultats obtenus sont les suivants :

La PCR a donné une amplification spécifique pour tous les échantillons d'ADN des 9 patients. Les produits d'amplification ont été visualisés sous UV après électrophorèse sur gel d'agarose et la spécificité des produits amplifiés (bande de 477,463 et 473 pb) a été confirmée par comparaison à des marqueurs de taille.

a)-Résultat de l'amplification de l'exon 1 :

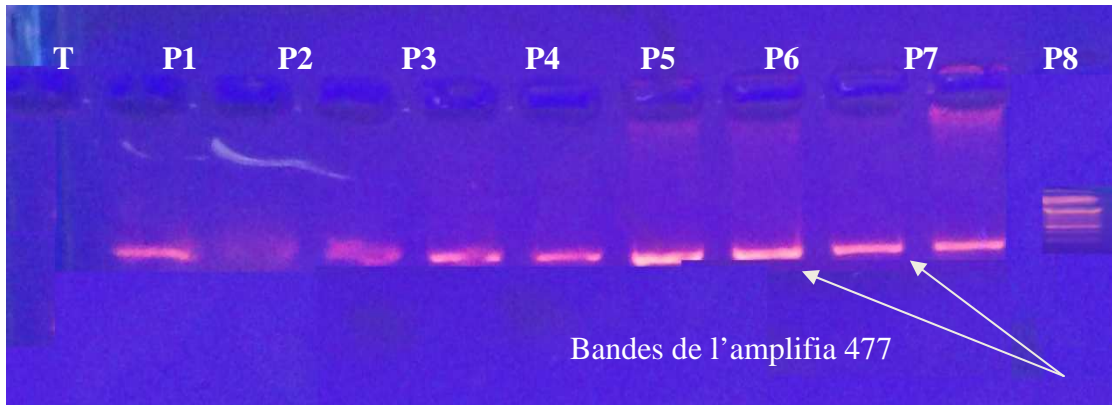


Figure 5: Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification par PCR de l'exon 1 du gène NKX2.5 pour les 9 patients

P1, P2.....P9 = patients étudiés.

T= témoin négatif.

Le résultat illustré dans le profil électrophorétique montre que le produit amplifié, dans le but d'être séquencé, ne contient pas de contaminants, et que la taille recherchée du produit d'amplification (477 pb) a été obtenue.

b)-Résultat de l'amplification de l'exon 2.1

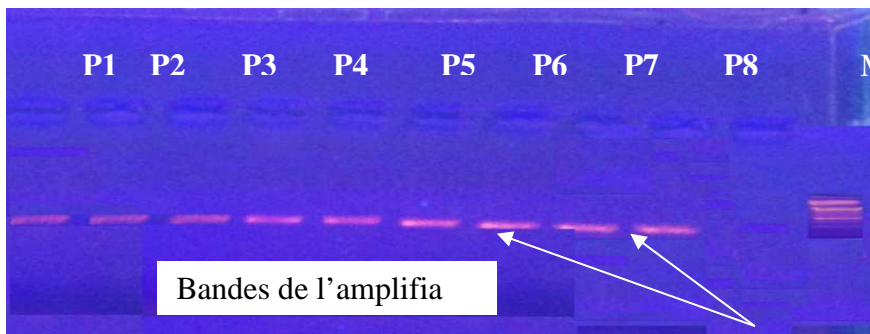


Figure6 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification par PCR de l'exon

2.1 du gène NKX2.5 pour les 9 patients.

P1, P2,.....P9 = patients étudiés.

T = témoin négatif

Le résultat illustré dans le profil électrophorétique montre que le produit amplifié, dans le but d'être séquencé ne contient pas de contaminants, et que la taille recherchée du produit d'amplification (463 Pb) a été obtenue.

c)- Résultat de l'amplification de l'exon 2.2 :

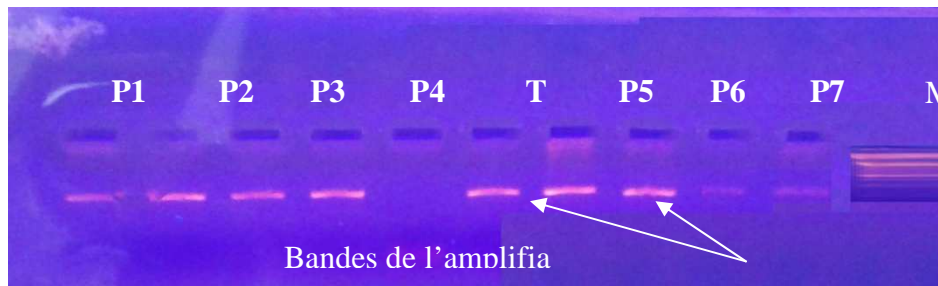


Figure 7 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification par PCR de l'exon

2.2 du gène NKX2.5 pour les 9 patients.

P1, P2,P9 = patients étudiés.

T = témoin négatif.

Le résultat illustré dans le profil électrophorétique montre que le produit amplifié, dans le but d'être séquencé, ne contient pas des contaminants, autrement dit ne contient aucune bande non spécifique, et que la taille recherchée du produit d'amplification (473 pb) à été obtenue.

L'obtention d'un produit PCR de bonne qualité nous a permis d'entamer la réaction de séquençage.

Remarque : La dilution du produit PCR doit être réalisée selon l'intensité de la bande obtenue sur gel d'agarose.

B. Séquençage, analyse des séquences et mutation détectées :

Dans le but de mettre en évidence la présence ou l'absence des éventuelles mutations affectant le gène NKX2.5 , les deux exons du gène NKX2.5 des neuf patients ont été séquencés .

Après alignement (BLAST) et correction (Logiciel sequencing Analysis software v5.4) des séquences obtenues, les résultats ont montré la présence de deux types de substitutions au niveau du gène NKX2.5 chez la majorité des patients étudiés.

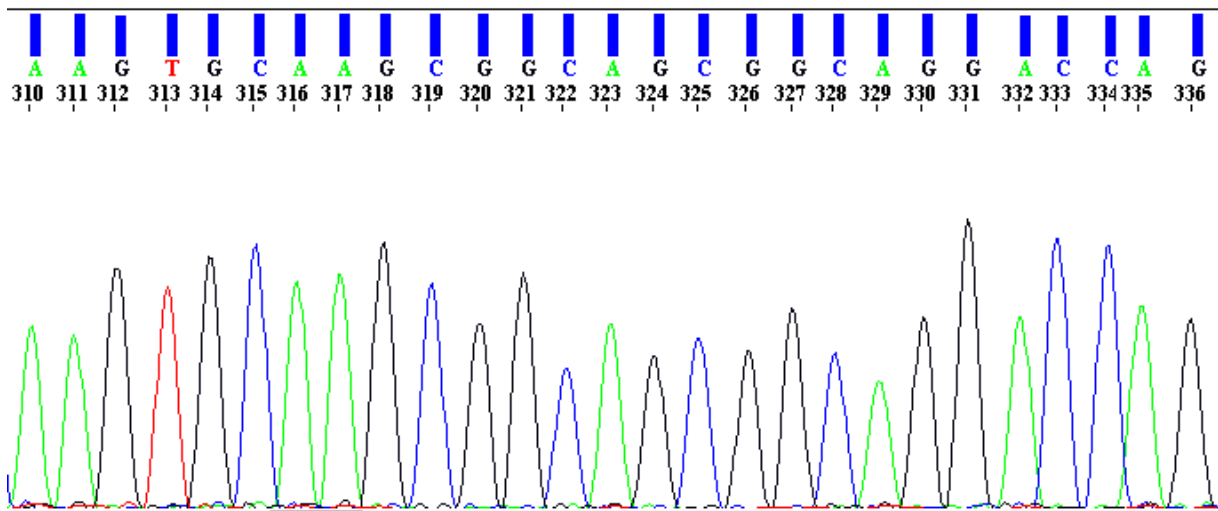


Figure 8 : Electrophorégramme de la séquence de l'exon 1 du gène NKX2.5 du sujet sain (contrôle négatif)

L'alignement avec la séquence requête de la base de données BLAST nous a permis de confirmer l'absence de mutations chez les patients P3, P5 et P7, ce qui montre que pour leur cas, la CIA dont ils souffrent n'est pas due à une déficience du gène NKX2.5 .

Homo sapiens NK2 homeobox 5 (NKX2-5), transcript variant 1, mRNA
 Sequence ID: [reflNM_004387.3](#) Length: 1669 Number of Matches: 1

Range 1: 562 to 931 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Pr

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	684 bits(370)	0.0	370/370(100%)	0/370(0%)	Plus/Plus
Query	46	AGAGCTGTGCGCGCTGCAGAAGCGGTGGAGCTGGAGAAGACAGAGGCGGACAACGCGGA	105		
Sbjct	562	AGAGCTGTGCGCGCTGCAGAAGCGGTGGAGCTGGAGAAGACAGAGGCGGACAACGCGGA	621		
Query	106	GCGGCCCGGGCGCGACGGCGGAGGAAGCCGCGGTGCTCTTCTCGCAGGCGCAGGTCTA	165		
Sbjct	622	GCGGCCCGGGCGCGACGGCGGAGGAAGCCGCGGTGCTCTTCTCGCAGGCGCAGGTCTA	681		
Query	166	TGAGCTGGAGCGGCGCTTCAAGCAGCAGCGGTACCTGTGCGCCCCGAACGCGACAGCT	225		
Sbjct	682	TGAGCTGGAGCGGCGCTTCAAGCAGCAGCGGTACCTGTGCGCCCCGAACGCGACAGCT	741		
Query	226	GGCCAGCGTGCTGAAACTCACGTCCACGCGAGGTCAAGATCTGGTTCCAGAACCGGCGCTA	285		
Sbjct	742	GGCCAGCGTGCTGAAACTCACGTCCACGCGAGGTCAAGATCTGGTTCCAGAACCGGCGCTA	801		
Query	286	CAAGTGAAGCGGCGAGCGGACGAGACTCTGGAGCTGGTGGGGCTgccccgccc	345		
Sbjct	802	CAAGTGAAGCGGCGAGCGGACGAGACTCTGGAGCTGGTGGGGCTGCCCCGCCGCC	861		
Query	346	gccccgcccctgccccgAGGATCGCGGTGCCAGTGTGGTGCAGGATGGCAAGCCATGCCT	405		
Sbjct	862	GCCGCCGCTGCCCGCAGGATCGCGGTGCCAGTGTGGTGCAGGATGGCAAGCCATGCCT	921		
Query	406	AGGGGACTCG 415			
Sbjct	922	AGGGGACTCG 931			

Figure 9 : Alignement de la séquence obtenue à partir du séquençage de l'exon 1 du sujet sain.

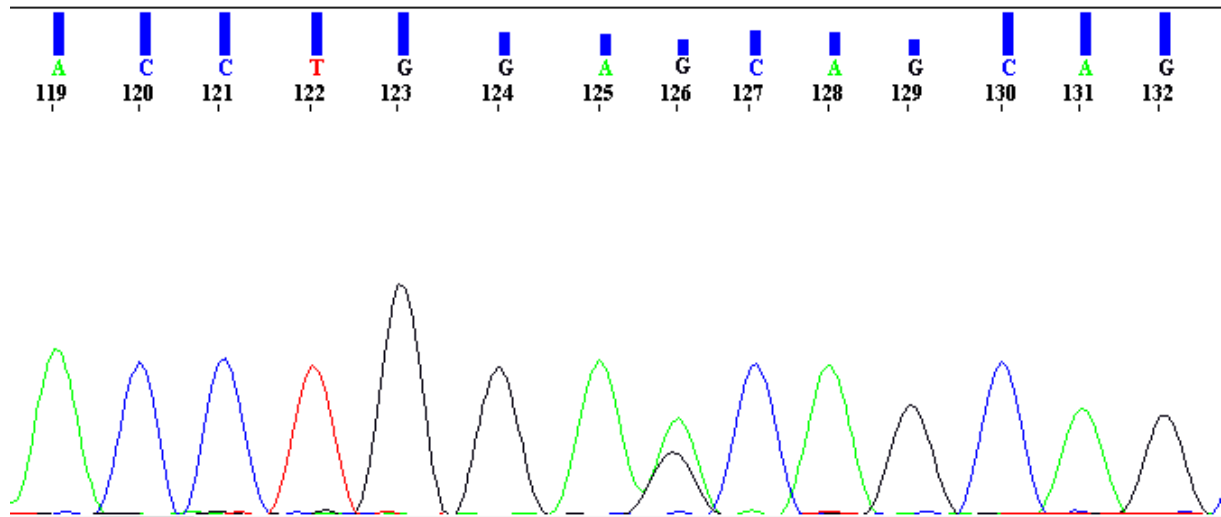


Figure 10 : Electrophorégramme de la séquence de l'exon 1 mentionnant la mutation hétérozygote

L'alignement avec la séquence requête de la base de données BLAST nous a permis de confirmer la présence de la substitution hétérozygote chez le patient P9, ce qui montre que pour ce cas, la CIA dont il souffre est due à une déficience du gène NKX2.5 .

Homo sapiens NK2 homeobox 5 (NKX2-5), transcript variant 3, mRNA
 Sequence ID: [reflNM_001166176.1](#) Length: 1924 Number of Matches: 1

Range 1: 201 to 564 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Pre

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
667 bits(361)	0.0	363/364(99%)	0/364(0%)	Plus/Plus
Query 1	CCTGGCGCTGTGAGACTGGCGCTGCCACCATGTTCCCCAGCCCTGCTCTCACGCCACGC	60		
Sbjct 201	CCTGGCGCTGTGAGACTGGCGCTGCCACCATGTTCCCCAGCCCTGCTCTCACGCCACGC	260		
Query 61	CCTTCTCAGTCAAAGACATCCTAAACCTGAGCAGCAGCAGCGCAGCCTGGCTGCCGCCG	120		
Sbjct 261	CCTTCTCAGTCAAAGACATCCTAAACCTGAAACAGCAGCAGCGCAGCCTGGCTGCCGCCG	320		
Query 121	GAGAGCTCTCTGCCCGCCTGGAGGCGACCCCTGGCGCCCTCCTCCTGCATGCTGGCCGCCT	180		
Sbjct 321	GAGAGCTCTCTGCCCGCCTGGAGGCGACCCCTGGCGCCCTCCTCCTGCATGCTGGCCGCCT	380		
Query 181	TCAAGCCAGAGGCCTACGCTGGGCCCGAGGCGGCTGCGCCGGGCTCCCAGAGCTGCGCG	240		
Sbjct 381	TCAAGCCAGAGGCCTACGCTGGGCCCGAGGCGGCTGCGCCGGGCTCCCAGAGCTGCGCG	440		
Query 241	CAGAGCTGGGCCGCGCGCCTTACCAGGCAAGTGTGCGTCTGCCTTTCCCGCCGCCCCCG	300		
Sbjct 441	CAGAGCTGGGCCGCGCGCCTTACCAGGCAAGTGTGCGTCTGCCTTTCCCGCCGCCCCCG	500		
Query 301	CCTTCTATCCACGTGCCTACAGCGACCCCGACCCAGCCAAGGACCCTAGAGCCGAAAAGA	360		
Sbjct 501	CCTTCTATCCACGTGCCTACAGCGACCCCGACCCAGCCAAGGACCCTAGAGCCGAAAAGA	560		
Query 361	AAGG 364			
Sbjct 561	AAGG 564			

Figure 11 : Aligement de la séquence obtenue à partir du séquençage de l'exon 1 du sujet malade.

Il s'est avéré dans cette population, 5 personnes ont un polymorphisme (P1, P2, P4, P6, P8), 3 personnes sont normales (P3, P5, P7), et le dernier (P9) est muté.

Après analyse bioinformatique, il a été établi que les patients (P3, P5, P7) ne présentent aucune substitution puisque les pics sont tous bien individualisés, ce qui montre que ces patients ne renferment aucune mutation dans ce gène. Donc, la maladie peut être due à une anomalie située dans un autre gène

Pour les patients (P1, P2, P4, P6, P8), la présence du polymorphisme (c.63 A>G , p . Glu 21=) a été trouvé. Cette substitution peut être qualifiée de silencieuse parce qu'elle n'aboutit pas au changement de l'acide aminé en question dans l'ADN.

Pour le patient P9, la présence de la mutation (c.73 C>T, p.Arg 25 Cys) a été notée., Cette mutation peut avoir de graves conséquences sur le phénotype . En effet, le changement d'un seul nucléotide peut changer l'acide aminé. Cela peut donc se traduire par un déficit au niveau de la protéine et expliquer une éventuelle implication de cette mutation dans le phénotype cardiopathologique de CIA isolé observé chez les patients.

Dans cette étude , le séquençage des deux exons du gène NKX2.5 nous a permis d'identifier 2 mutations dans une série comprenant 9 patients présentant une communication inter auriculaire isolée. L'interprétation clinique suggère qu'une seule mutation parmi les 2 est pathogénique (c.73 C>T ,p.Arg 25 Cys), alors que l'autre n'est pas pathogénique(c.63 A> G , p . Glu 21=)

En 1999, Benson et al ont identifié la transition C-T hétérozygote dans la région 5' codante du gène NKX2.5 , ce qui entraîne une arg25cys (R25C), cette substitution transforme un acide aminé très conservé basique(Arg) en un acide aminé neutre (Cys) .

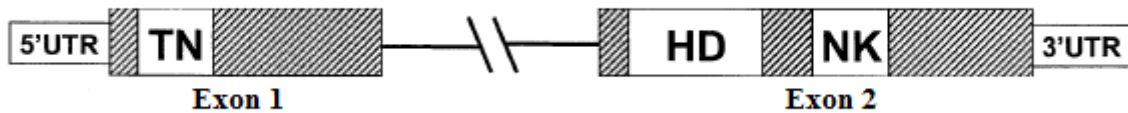


Figure 12 : Schéma de la protéine NKX2.5 avec les domaines fonctionnels : homéodomaine ;NK2, domaine nucléotidique de kinase ;TN ,domaine Tinman.

Conclusion

A travers cette étude réalisée dans le cadre de ce mémoire, l'impact de certaines mutations sur le fonctionnement du facteur de transcription NKX2.5 codé par ce gène a été mis en évidence. Parmi les mutations révélées, une seule mutation s'est montrée pathogénique et affectant l'intégrité fonctionnelle de la protéine NKX2.5. Cette mutation a été révélée grâce aux techniques de la biologie moléculaires (PCR, Séquençage ..).

De grandes avancées ont été réalisées ces dernières années dans la compréhension des bases moléculaires et génétiques des cardiopathies congénitales humaines. L'identification de gènes de malformations cardiaques a conduit à une nouvelle approche clinique chez les enfants atteints de cardiopathies et leurs familles. Ces progrès ont été faits grâce aux techniques de biologie moléculaire. Bien que les cardiopathies congénitales soient le plus souvent isolées, leur caractère familial ou syndromique conduit fréquemment à une demande de conseil génétique. Les cardiopédiatres ont amélioré leur description des phénotypes cardiovasculaires mais l'hétérogénéité génétique fait que l'approche moléculaire soit encore compliquée pour une anomalie donnée. Ainsi, le conseil génétique reste difficile.

En conclusion le gène NKX2.5 joue un rôle crucial dans la régulation transcriptionnelle prépondérante pour un développement cardiaque normal, ce dernier est impliqué également dans la septation cardiaque. Plusieurs mutations ont été identifiées ainsi que leur implication dans les cardiopathies congénitales non syndromiques.

La détection de la mutation du gène NKX2.5 permet de donner naissance à un type de traitement appelé la thérapie ciblée.

Ces thérapies ciblées sont adaptées à chaque patient selon les caractéristiques génétiques et permettent d'obtenir dans certain cas des survies prolongées.

Le travail effectué a permis de prendre en charge les patients dont le diagnostic a été définitif, d'éliminer également certaines hypothèses et poser d'autres pour les patients qui nécessitent plus de recherche avant de préciser le diagnostic définitif.

Références bibliographiques

- Akkar O. 2010** Profil épidémiologique et étiologique des cardiopathies congénitales (Etude rétrospective à propos de 427 cas) . THESE de Doctorat: médecine : Université sidi Mohammed ben abdellah faculté de médecine et de pharmacie ; 190
- Baudet E. 2004** Chirurgie des cardiopathies congénitales. Archives de pédiatrie 11, : 642-643.
- Beghetti M. 2006** Current treatment options in children with pulmonary arterial hypertension and experiences with oral bosentan.. Eur J Clin Invest .36, Suppl 3:16-24.
- Bodmer R. 1993** The gene Tinman is required for specification of the heart and visceral muscles in Drosophila Development.;118:719-29.
- Bossi G , Scorrano M , TosatoG, Forini E , Cahkrokh R . 1999** The Italian Multicentric Study on Epidemiology of congenital Heart Disease : First step of the analysis . Working Party of the Italian Society of Pediatric Cardiology Cardiol Young , 9(3) ,:291-9.
- Chetboul V , Pouchelon J.-L. 2004** Diagnostic échodoppler des cardiopathies congénitales . EncyclMédChir,Vétérinaire 1 : 175.
- Ching YH,Ghosh TK ,Cross SJ et al . 2005** Mutation in myosin heavy chain 6 cause's atrial septal defect . Nat Genet .;37:423-8.
- D. Sidi 4, November 2004** Physiologie - physiopathologie et pathologie cardiovasculaire foetale *EMC - Pédiatrie, Volume 1, Issue 4, Pages 341-350.*
- F. Bajolle , S. Zaffran , D. Bonnet 2009** Genetics and embryological mechanisms of congenital heart diseases . Archives of Cardiovascular Disease , 102 :61.
- J.Wills Hurst et al. 2007-2008** / McGraw-Hill.< Les grands atlas médicaux, le cœur > Cours de cardiologie pédiatrique de 2eme année médecine UCL, édition Medsi.
- Iselin M. 1999** Cardiopathies congénitales . EncyclMédChir (Elsevier,Paris), Radiodiagnostic-cœur-poumon, 32-015-A-12. Pédiatrie, :4-070-A-05,6p.
- Iselin M. 1999** Classification des Cardiopathies congénitales. EncyclMédChir (Elsevier, Paris), Radiodiagnostic-cœur-poumon,32-015-A-11.,3p.
- Iselin M. 1999** Explorations radiologique des cardiopathies congénitales. EncyclMédChir (Elsevier, Paris) , Radiodiagnostic-cœur-poumon ,32-015-A-15.,11p.

Gnansia RE, Francannet C . 2004 Epidémiologie, étiologie et génétique des cardiopathies congénitales .EMC-cardiologie,11-940-A-20 .

Gruber PJ, Epstein JA. 2004 Development gone awry : congenital heart disease . Circ Res .;94:273-83.

Guillum RF. 1994 Epidemiology of congenital Heart disease in the united states .Am Heart J , 127(4 Pt 1) ,: 919-27.

Lauralee Sherwood -2006 *Physiologie Humaine.* ; chapitre introduction anatomie du cœur page 241 .

Lyons I et al. 1995 Myogenic and morphogenetic defects in the heart tube of murine embryos lacking the homeo box gene NKX2.5. GenesDev. 9:1654-66.

Prall OWJ, Menon Mk, Solloway MJ, et al. 2007 NKX2.5 /BMP2/Smad1negative feedback loop orchestrates cardiac progenitor cell specification and proliferation in the second heart field. Cell ; 128:947-59.

Rey C. 2004 Traitement des cardiopathies congénitales par cathétérisme interventionnel. Archives de pédiatrie 11: 639.

Rosenberg D. 2003 Dépistage des cardiopathies congénitales par l'oxymétrie de pouls. Archives de pédiatrie, 10: 853.