



Projet de Fin d'Etudes

Licence Sciences & Techniques
Sciences Biologiques Appliquées et Santé
(LST - SBAS)

**Etude génétique de l'amyotrophie
spinale de l'enfant**

Présenté par : Mane Imane

Encadré par : Pr. El FARRICHA OMAR (FST Fès)

Dr. SAYEL HANANE - CHU-Fès

Soutenu le : 5 Juillet 2022

Devant le jury composé de :

- **Pr. El FARRICHA OMAR (FST Fès)**
- **Dr. SAYEL HANANE - CHU-Fès**
- **Pr. BENCHEIKH RACHID**

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

Année universitaire 2021-2022

Résumé

Les amyotrophies spinales (Spinal Muscular Atrophy) ou SMA sont des affections neuromusculaires de transmission autosomique récessive, caractérisées par une dégénérescence progressive des motoneurones de la corne antérieure de la moelle épinière et souvent des noyaux moteurs du bulbe. Les différentes formes cliniques de la SMA sont associées à une sévérité très variable. Cette sévérité est corrélée au taux de la protéine SMN.

Sur le plan moléculaire, les SMA sont liées dans 98 % des cas à une délétion homozygote des exons 7 et/ou 8 du gène *SMN1* ou *SMN2*.

Le travail présent a permis l'étude concrète d'une série de 10 patients souffrant d'amyotrophie spinale grâce aux moyens de biologie moléculaire.

Ces patients se sont présentés à l'unité de génétique médicale et d'oncogénétique du CHU Hassan II de Fès munis de résultats des nombreux examens et analyses médicales qui détectent leur maladie, mais qui ne permettent pas de préciser le diagnostic définitif et de répondre aux interrogations de ces patients et de leur famille.

L'étude est commencée tout d'abord par l'extraction d'ADN, suivie de sa quantification par dosage spectrophotométrique, les échantillons sont analysés par la suite par PCR (pour amplification du gène recherché responsable de la survie de motoneurone), et enfin la PCR-RFLP permet l'identification de la délétion recherchée.

L'ADN amplifié est digéré ensuite par une enzyme de restriction qui peut reconnaître et couper l'ADN où une courte séquence spécifique. La recherche de la délétion de l'exon 7 du gène *SMN1* a été réalisée par la technique de réaction de polymérisation en chaîne suivie d'une digestion enzymatique (PCR-RFLP). Les produits d'amplification sont contrôlés sur un gel d'agarose à 2 %.

L'identification du gène et de la protéine de cette pathologie a été une avancée majeure dans la compréhension des bases moléculaires de la SMA et a considérablement amélioré le conseil génétique des familles SMA. Le déchiffrement des mécanismes fondamentaux régulant la transcription de *SMN2* permet de découvrir plusieurs approches thérapeutiques susceptibles de diminuer la sévérité du phénotype SMA des patients telles que l'activation du promoteur de *SMN2*. C'est ainsi que l'augmentation de l'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits et la stabilisation des protéines est actuellement en cours d'élaboration pour augmenter l'expression de *SMN2*.



Dédicace

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail :

*A l'homme, mon précieux offre du Dieu, qui doit ma vie, ma réussite et tout mon respect : mon cher père **Mare Mohammed.***

*A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse : mon adorable mère **Maftaka.***

A mes chers frères et mes belles sœurs qui n'ont pas cessé me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études.

A mes chères amies, pour leurs aides et supports dans les moments difficiles.

Puisse Dieu vous donne santé, bonheur, courage et surtout réussite.



Remerciement

Avant tout développement sur cette expérience professionnelle, il apparait opportun de commencer ce rapport de stage par des remerciements, à ce qui m'ont beaucoup aidé au cours de ce stage, et même à ceux qui ont eu la gentillesse de faire de ce stage un moment très profitable.

Principalement :

Pr. FARRICHA OMAR, je suis heureuse d'avoir été l'une de ses étudiantes.

Je le remercie d'avoir accepté d'encadrer ce projet et de me faire part de son expérience. Merci de m'avoir accompagné tout au long de cette expérience professionnelle avec beaucoup de patience et de pédagogie.

Dr. SAYEL HANANE, responsable de Biologie Moléculaire de l'unité génétique médicale et d'oncogénétique au CHU Hassan II de Fès au service laboratoire.

Je la remercie pour m'avoir donné une place des outils, m'avoir montré comment les utiliser dans le travail et assurer la qualité de mon travail tout au long de ces deux mois. Sachant répondre à

toutes mes interrogations sans oublier sa participation à ce rapport.

Mes remerciements vont aussi à tous les membres du jury. Je les remercie pour leur soutien et l'attention qu'ils nous ont prêtés pendant toute la durée de présentation.

Sommaire

Liste des abréviations.....	i
Liste des figures.....	ii
Liste des tableaux.....	iii
Lieu de stage.....	
Introduction générale.....	1
Chapitre I : Revue bibliographie	2
1 Le système neuromusculaire.....	2
1.1 Définition et histologie des muscles squelettiques	2
1.2 Les motoneurones.....	2
2 Amyotrophie spinale.....	3
2.1 Historique :	3
2.2 Caractéristique et classification :.....	4
2.3 Epidémiologie.....	5
2.4 Aspect génétique.....	6
2.4.1 Mode de transmission.....	6
2.4.2 Le locus SMA.....	6
2.4.3 Les gènes <i>SMN1</i> et <i>SMN2</i>	7
2.4.4 La protéine <i>SMN</i>	9
2.4.4.1 Structure de la protéine <i>SMN</i> :	9
2.4.4.2 Localisation de la protéine <i>SMN</i> :	9
2.4.4.3 Le rôle de protéine <i>SMN</i>	9
2.4.5 la SMA : un défaut de protéine <i>SMN</i>	9
2.5 Diagnostic	11
2.6 Stratégies thérapeutiques	11
2.6.1 La thérapie génique : le transfert du gène <i>SMN1</i>	12
2.6.2 Activation d'expression du gène <i>SMN2</i>	12
2.6.3 Inclusion de l'exon 7 dans le transcrit issu du gène <i>SMN</i>	12
2.6.4 Neuroprotection.....	12
Chapitre II : Matériel et méthodes.....	13
1 Matériel utilisé :	13
1.1 Echantillonnage	13
1.1.1 Patients	13
1.1.2 Stratégie de travail.....	13
2 Méthodes :.....	13
2.1 Prélèvement	13
2.2 Extraction de l'ADN génomique	13
2.3 Extraction d'ADN génomique par le Kit « Pure Link™ Genomic DNA ».....	14
2.3.1 Principe.....	14
2.3.2 Réactifs nécessaires	14
2.3.3 Protocole expérimental.....	14
2.4 Dosage de l'ADN	15
2.5 Amplification des séquences nucléotidiques par PCR	16
2.5.1 Principe.....	16
2.5.2 PCR - RFLP pour rechercher la délétion de l'exon 7 du gène <i>SMN1</i>	17
2.5.2.1 Principe.....	17

2.5.2.2	Conditions de la PCR - RFLP.....	18
2.5.2.3	Témoins de la PCR – RFLP du gène SMN1	19
2.6	Visualisation du produit PCR par électrophorèse sur gel d’agarose	19
2.6.1	Principe.....	19
2.6.2	Visualisation du produit de PCR - RFLP du gène SMN1	20
2.6.2.1	Protocole expérimental de préparation du gel d’agarose.....	20
2.6.2.2	Les bandes attendues :	20
Chapitre III : Résultats et Discussions		22
1	Résultats.....	22
1.1	Données épidémiologique :	22
1.1.1	Age	22
1.1.2	Sexe	22
1.2	Antécédents :	23
1.2.1	Consanguinité.....	23
1.2.2	Antécédents familiaux.....	23
1.3	Données cliniques :.....	23
1.3.1	Motif de consultation :	23
1.3.2	Profil clinique :.....	24
1.4	Profil paraclinique :	24
1.4.1	Créatine phosphokinase (CPK) :	24
1.4.2	Electromyogramme (EMG) :.....	24
1.4.3	Etude moléculaire du gène SMN :	24
1.4.3.1	Dosage et qualité de l’ADN extrait:	24
1.4.3.2	Résultats de PCR-RFLP	24
2	Discussions.....	25
2.1	Données épidémiologique :	25
2.1.1	Age	25
2.1.2	Sexe	26
2.2	Antécédents :	26
2.2.1	Consanguinité :.....	26
2.2.2	Antécédents familiaux :	26
2.3	Profil paraclinique	26
2.3.1	CPK :	26
2.3.2	Etude moléculaire :.....	26
Conclusion.....		28

Liste des abréviations

ADN	: Acide désoxyribonucléique
AAV	: Les virus adéno-associés
C	: Cytosine
CPK	: Créatine phosphokinase
DMC	: La dystrophie musculaire congénitale
DM1	: La dystrophie myotonique congénitale
ENMG	: Electroneuromyogramme
MNM	: Les maladies neuromusculaires
MC	: La myopathie congénitale
NAIP	: Neural apoptosis inhibitory protein
PCR	: Réaction de polymérisation en chaîne
PCR-RFLP	: PCR suivie de digestion enzymatique
SMA	: L'amyotrophie spinale
SMN	: Survival motor neuron
SMN1 ou SMNt	: Partie télomérique du gène SMN
SMN2 ou SMNc	: Partie centromérique du gène SMN
SMNΔ7	: Protéine dépourvue de l'exon 7
SNC	: système nerveux centrale
T	: Thymine

Liste des figures

Figure 1 : A. Organisation du système neuromusculaire.	
B. Anatomie du muscle strié squelettique.	P2
Figure 2 : l'amyotrophie spinale à travers le temps	P3
Figure 3 : postures caractéristiques des enfants atteints de SMA type I.	P4
Figure 4 : Mode de transmission autosomique récessive de SMA	P6
Figure 5 : Structure du locus SMA	P7
Figure 6 : Différences de séquence primaire et d'épissage entre les transcrits <i>SMN1</i> et <i>SMN2</i>	P8
Figure 7 : Schéma des gènes <i>SMN1</i> et <i>SMN2</i> , de leurs transcrits et de la protéine SMN	P8
Figure 8 : Génotypes observés chez la plupart des patients atteints de SMA	P10
Figure 9 : Image de spectrophotomètre Nanovue utilisé dans note laboratoire.	P15
Figure 10 : Schéma explicatif de l'amplification in vitro de l'ADN par la technique de PCR.	P16
Figure 11 : Le site de reconnaissance de Dra I dans <i>SMN2</i> crée par l'amorce mésappariée utilisée.	P17
Figure 12 : Réactifs du Kit «Platinum™ Taq DNA Polymerase ».	P18
Figure 13 : Schéma des bandes attendues après digestion enzymatique des produits PCR et migration par électrophorèse.	P21
Figure 14 : Répartition des patients en fonction d'âge.	P22
Figure15: Répartition des patients en fonction le sexe.	P22
Figure 16 : Répartition des patients en fonction la consanguinité.	P23
Figure 17: Arbre généalogique d'un enfant.	P23
Figure 18: Profil d'électrophorèse chez des patients SMA mutés (positifs) et non mutés (négatifs).	P25

Liste des tableaux

Tableau 1: liste des mutations de <i>SMN1</i> entrainant un SMA	P10
Tableau II : Le couple d'amorce utilisé pour l'amplification de l'exon 7 du gène <i>SMN</i> .	P17
Tableau III : Programme de cycle de T° pour l'amplification de l'exon 7 du gène <i>SMN</i> dans le thermocycleur.	P18
Tableau IV : Le milieu réactionnel de digestion par l'enzyme Dra I.	P19
Tableau V : Répartition des cas selon le motif de consultation.	P23
Tableau VI : Fréquence des différents signes cliniques de la maladie.	P24

Lieu de stage

Le laboratoire Central de l'Analyse Médicale est situé au bâtiment J du centre Hospitalier universitaire Hassan II (Fès), 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 où je réalise mon stage est subdivisé 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.

Introduction générale

Les maladies neuromusculaires (MNM) ce sont des maladies regroupant des pathologies très variées qui se caractérisent par l'altération de l'un des composants de l'unité motrice [1]. L'unité motrice est la plus petite unité fonctionnelle du système neuro-moteur.

La plupart des MNM sont d'origine génétique. Il existe, cependant, d'autres causes possibles (dysfonctionnement endocrinien, perturbation du système immunitaire, mécanisme de neuro-dégénérescence...).

Il existe plus de 200 maladies différentes peuvent affecter n'importe qui et survenir à tout âge. Les premiers symptômes les plus fréquents sont : troubles de la marche, difficulté de monter les escaliers, courir, se relever et l'hypotonie.

La gravité de l'affection et la vitesse d'évolution sont très variables d'une maladie à l'autre : rétractions articulaires, déformations orthopédiques, insuffisance respiratoire, atteinte cardiaque, troubles de déglutition, troubles digestifs et nutritionnels, douleurs, etc.... [2].

Les pathologies les plus fréquentes sont les myopathies congénitales (MC), les dystrophies musculaires congénitales (DMC), la dystrophie myotonique congénitale ou dystrophie de Steinert (DM1), l'amyotrophie spinale infantile (SMA).

Dans ce travail on s'intéresse sur l'amyotrophie spinale infantile pour mieux approcher cette pathologie, nous rapportons 10 cas d'amyotrophie spinale infantile suivis dans le service de laboratoire de génétique et d'oncogénétique du CHU de Fès dans le but de décrire l'aspect moléculaire de SMA.

Dans les deux mois de stage le travail consiste à rechercher la délétion homozygote de l'exon 7 du gène SMN1 par l'utilisation de la méthode PCR_RFLP.

Chapitre I : Revue bibliographique

1 Le système neuromusculaire

1.1 Définition et histologie des muscles squelettiques

Le muscle squelettique est le tissu le plus abondant dans l'organisme, il représente 40% de poids corporelles [3], il est constitué des faisceaux musculaires formés d'un ensemble de fibres musculaires, chaque fibre musculaire est en contact avec une terminaison nerveuse. Les fibres nerveuses motrices (motoneurones) transmettent l'influx nerveux émis par le SNC (système nerveux central) causant ainsi une contraction musculaire.

Au niveau histologique, chaque fibre musculaire est entouré d'une membrane appelé l'endomysium, l'ensemble des fibres musculaires forment des faisceaux entourés de périmysium et l'ensemble de ces faisceaux forment le muscle lui-même entouré d'une membrane : l'épimysium. Enfin grâce aux tendons l'ensemble des fibres musculaires sont rattachés aux os.[4]

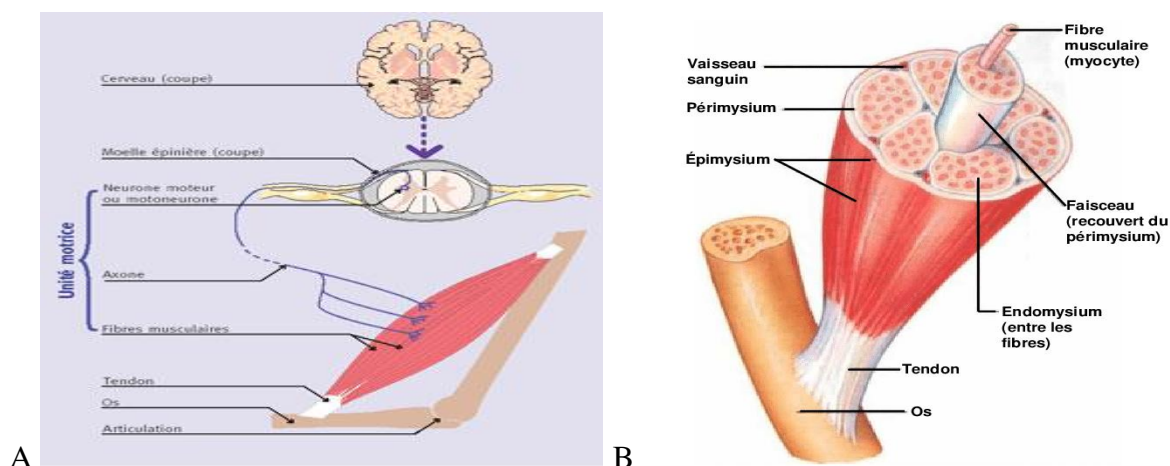


Figure 1 : A. Organisation du système neuromusculaire. B. Anatomie du muscle strié squelettique. D'après Gillies AR et Al., 2011

1.2 Les motoneurones

Les motoneurones sont des cellules nerveuses spécialisés dans le contrôle des mouvements. Il existe deux principaux types de motoneurones, le premier est dit central, situé dans le cerveau, où il transmet les premières informations du cerveau à la moelle épinière. Le second est dit périphérique, où il transmet le message de la moelle épinière aux fibres musculaires (figure 1-A). L'axone de ce second MN sort des vertèbres et parcourt les tissus pour innover directement le muscle, ce qui provoque une contraction musculaire.[6]

La diminution progressive des motoneurones situés dans la corne antérieure de la moelle épinière due à une faiblesse musculaire (paralysie). Parmi les causes de cette diminution la présence d'une délétion d'une partie de gène SMN qui est responsable de la survie des motoneurones.

2 Amyotrophie spinale

2.1 Historique :

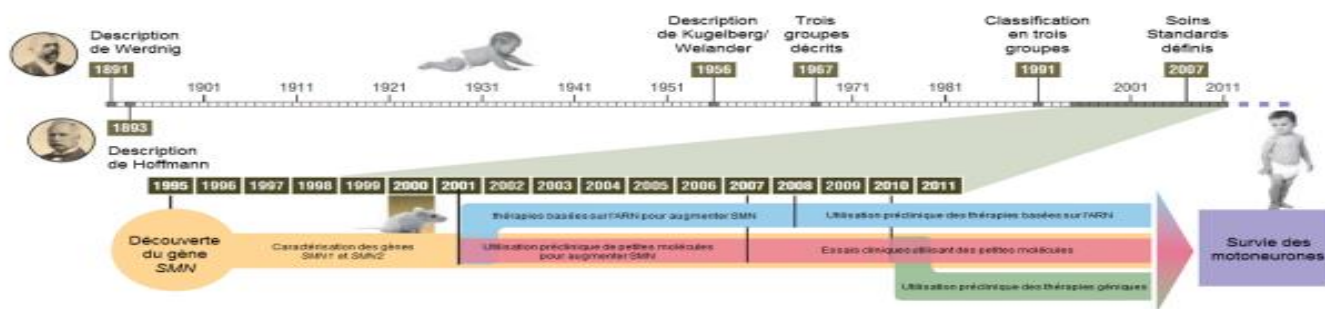


Figure 2: l'amyotrophie spinale à travers le temps [7]

En 1891- Guido Werdnig a observé pour la première fois deux enfants atteints d'« atrophie musculaire progressive » à laquelle il a donné son nom. Cette maladie débutait avant la fin de la première année. Elle avait atteint les membres, le cou, le dos. L'évolution était sévère. L'un des enfants était décédé à 3 ans et l'autre à 6 ans. A l'autopsie, l'examen de la moelle épinière avait montré des lésions dégénératives des motoneurones.[8]

En 1893- Johann Hoffmann, a publié quatre observations d'atrophie musculaire infantile progressive. ils étaient rapprochées des deux cas décrits par Werdnig et cette pathologie avait pris ainsi le nom de maladie de Werdnig-Hoffmann.[9]

Il s'agit d'une maladie dégénérative, familiale, débutant au cours des six premiers mois de la vie par une faiblesse musculaire d'évolution progressive. Par conséquent le taux de mortalité est élevé vers l'âge de 4ans.

En 1900, Hermann Oppenheim décrit les premières formes congénitales de la maladie sous l'appellation de « myotonie congénitale »[10]. Parallèlement, en 1902, Edward Beavor, note des anomalies des mouvements fœtaux chez les mères ayant donné naissance à des enfants atteints d'amyotrophie spinale, et évoque présence de forme prénatales.[11]

C'est en 1950, Le danois Sven Brandt démontre le caractère autosomique récessif et la grande hétérogénéité clinique de la maladie par le traitement de 112 patient issues de 69 familles.[12]

En 1973, Pearn établit formellement la responsabilité d'un gène autosomique récessif dans tous les cas familiaux de SMA précoce.[13]

Au fil des années 90, grâce aux méthodes de génétique inverse, le gène responsable de la SMA est localisé sur le bras long du chromosome 5.[14]

En 1995, les gènes SMN1 et SMN2, pour Survival of Motor Neuron, codant la protéine du même nom, jusque-là inconnue, sont identifiés en France par l'équipe de Judith Melk.[15]

2.2 Caractéristique et classification :

L'amyotrophie spinale (SMA) est une maladie génétique héréditaire à transmission autosomique récessive se caractérise par une dégénérescence des motoneurones. Ce dernier est essentiel au contrôle de mouvement et de la force musculaire, Il régule l'activité musculaire par l'envoi des signaux émis par le système nerveux centrale(SNC) qui comprend le cerveau et la moelle épinière.[16]

La dégénérescence des motoneurones est en relation avec le gène SMN c'est le gène responsable de la survie des motoneurones qui code pour la protéine SMN, lorsqu'il y a un déficit de ce protéine ceci entraîne une atrophie musculaire et conduisant finalement à la paralysie.

La plupart des patients souffrant d'amyotrophie spinale présentent des signes cliniques de la maladie dès l'enfance.

Les SMA sont d'une grande hétérogénéité clinique et pronostique. Il existe une forte corrélation entre l'âge d'apparition des symptômes et la sévérité de l'atteinte, de sorte que, plus la maladie commence précocement et moins le pronostic vital est favorable. Selon ce critère que les SMA infantiles ont été classées en 4 types :[17]

Le type I : maladie de Werdnig-Hoffmann ou amyotrophie spinale infantile sévère :



Figure 3 : postures caractéristiques des enfants atteints de SMA type I.[9].

La maladie de **Werdnig-Hoffmann** est la forme la plus aiguë, elle représente environ 35% de la totalité des amyotrophies spinales, les premiers signes cliniques apparaissent dans les 6 premiers mois de la vie (en générale avant 3 mois), la faiblesse et l'atrophie musculaire touchent la racine des membranes c'est-à-dire au niveau des hanches et des épaules pour remonter jusqu'aux extrémités (pieds et mains) L'enfant présentant ce type de faiblesse ne pourra pas tenir sans appui en position assise. Le plus dangereux est l'atteinte des muscles du système respiratoire. Les difficultés respiratoires sont généralement la cause majeure du décès de ces enfants.[9]

Le type II : amyotrophie spinale infantile intermédiaire

Cette maladie est la plus fréquente, elle représente environ 45 % de totalités des amyotrophies spinales. Les premiers signes cliniques apparaissent avant l'âge de 18mois. Les enfants sont atteints d'une paraplégie (l'absence de mouvements, plus ou moins complète des membres inférieurs et de la partie basse du corps) ou d'une tétraplégie (la paralysie de la moitié inférieure du corps), ils sont capable de maintenir la position assise, mais, en revanche, incapables de se mettre debout et de marcher sans aide extérieure. Le plus grand danger vient des affections respiratoires, pneumonie ou autres. [18]

Le type III : maladie de Kugelberg-Welander ou amyotrophie spinale juvénile

Ce type représente environ 8% de la totalité des amyotrophies spinales. La maladie de Kugelberg-Welander apparaît après l'acquisition de la marche. Les premiers signes cliniques apparaissent dès l'âge de 3 et 4ans. Les enfants peuvent s'asseoir, marcher et se tenir debout, mais sa capacité diminuent avec la croissance. Le processus de perte de la marche est souvent corrélé à des poussées de croissance ou des maladies et s'échelonne sur des années. Il n'y a pas d'atteinte respiratoire. [18]

Le type IV :

Ce dernier type est la forme adulte de la maladie, pour laquelle les symptômes se déclarent entre 18 et 35 ans. Les signes cliniques sont peu marqués et la progression de la maladie est très lente. Les muscles des cuisses et des bras s'affaiblissent peu à peu. Les fonctions respiratoires ne sont pas touchées et les patients présentent une durée de vie normale. [18]

2.3 Epidémiologie

La SMA est la maladie neuromusculaire la plus fréquente chez l'enfant, après la dystrophie musculaire de Duchenne, avec une incidence variante de 1/6 000 à 1/10 000 naissances selon les auteurs. [19]

La prévalence du gène à l'état hétérozygote (porteur sain) est estimée entre 1/50 à 1/80 dans la population Européenne.[20]

Au Maroc, une étude récente a montré que la fréquence des porteurs sains est estimée à 1/25 et que la prévalence est près de 1/1800 pour tous les types confondus [21], ce qui est très élevé par rapport à la population Européenne et cela à cause du taux élevé de la consanguinité au Maroc (15,25 %) [22].

2.4 Aspect génétique

En 1990, les expériences de clonage positionnelle montre que le gène responsable du SMA se situe dans le bras long du chromosome 5, dans la région 5q11.2q13.3 grâce à des liens génétiques établis entre le locus de la maladie et des marqueurs génétiques polymorphes à partir d'un ensemble informatif de famille.[23]

2.4.1 Mode de transmission

L'amyotrophie spinale est une maladie autosomique récessive, ce qui signifie que pour qu'un enfant soit affecté par la maladie, il doit recevoir un gène *SMN1* muté de chacun de ses parents. Si un enfant reçoit seulement un gène *SMN1* muté, il est considéré comme « porteur » mais ne présente généralement pas les symptômes de l'amyotrophie spinale.[24]

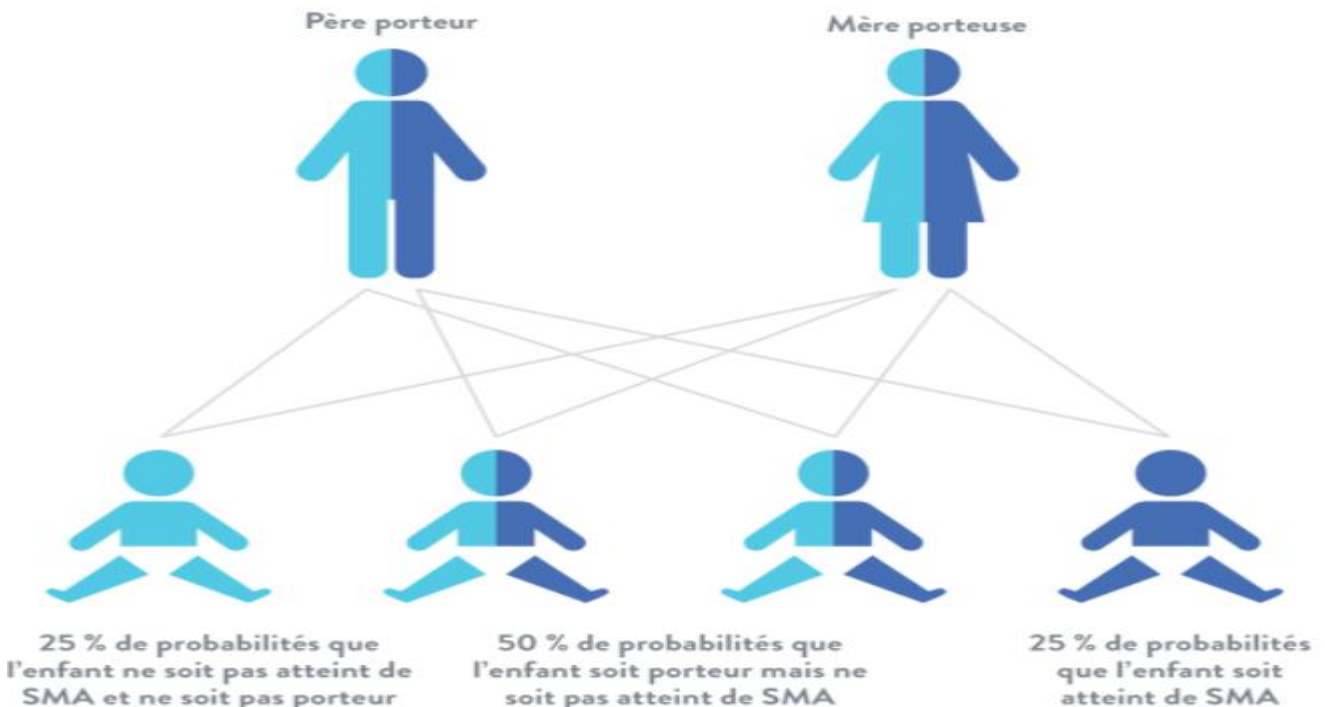


Figure 4 : Mode de transmission autosomique récessive de SMA [24].

2.4.2 Le locus SMA

Les gènes responsables de la SMA sont les gènes de la famille *SMN*. Ils sont localisés dans une région instable et très complexe du chromosome 5. En effet, cette région contient des pseudo-gènes (un gène devenu inactif à cause d'une modification ou d'altération génétique), des séquences multiples de copies répétitives et des séquences analogues à des transposons [(gène sauteur), une séquence d'ADN capable de se déplacer de manière autonome dans un génome par mécanisme appelé transposition].[25] D'autre part, cette région présente une duplication inversée d'environ 500Kb, dont chaque élément contient 4 gènes : le gène *SMN*, le gène codant la protéine *NAIP* (Neuronal Apoptosis Inhibitory

Protein)[26], le gène codant la protéine p44[27], qui est une sous-unité du facteur de transcription TFIIF, et enfin le gène *H4F5*[28], dont la fonction est inconnue. Pour chacun de ces gènes il y a donc une copie en direction centromérique et une copie en direction télomérique.

L'analyse génétique a montré pour 95% des sujets atteints de SMA une partie du gène *SMN1* est absente, et 5% sont des patients normaux même si la partie centromérique appelé *SMN2* est absente, ce qui indique qu'il n'est pas indispensable à la survie des motoneurones, par conséquent le gène *SMN1* lié à la maladie.

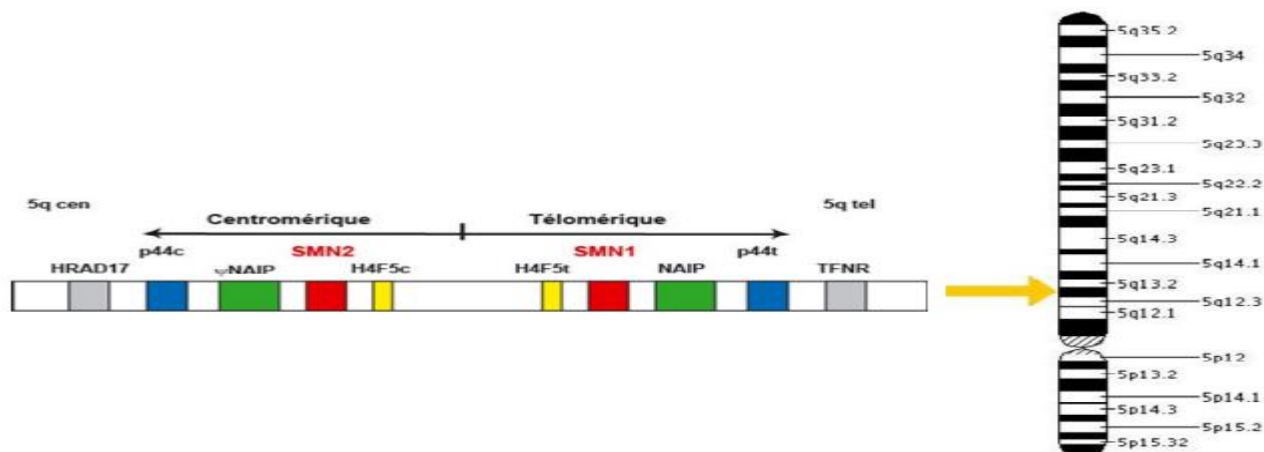


Figure 5: Structure du locus SMA [19]

2.4.3 Les gènes *SMN1* et *SMN2*

Le gène *SMN* est un gène de 27Kpb, composé des 9 exons, transcrit en ARNm de 1,7Kb et codant pour une protéine d'une masse de 32KDa (294 acide aminé). Le codant stop situé après l'exon 7. Chez l'homme, il existe deux gènes codant pour la protéine *SMN* : *SMN1* et *SMN2*. [29]

Le gène ancestral *SMN1* (*SMNt*) localisé dans la partie télomérique et se copie inversés *SMN2* (*SMNc*) dans la partie centromérique.

Le gène *SMN1* diffère de sa copie centromérique *SMNc* par 5 bases (1 dans l'intron 6, 1 dans l'exon 7, 2 dans l'intron 7 et 1 dans l'exon 8), cette différence n'a aucun effet sur la séquence des acides aminés de la protéine, puisqu'elles sont silencieuses. [30]

Les ARNm obtenus à partir des 2 gènes sont identiques à l'exception de 2 nucléotides situés dans les exons 7 et 8. Plus précisément, une transition en position +6 de l'exon 7 est responsable de l'épissage alternatif de l'ARN pré-messager du gène *SMN2*. Quand le nucléotide est une cytosine (C) comme dans le gène *SMN1*, l'exon 7 est reconnu et inclus dans la protéine. Si c'est une thymine (T), comme dans le gène *SMN2*, l'exon 7 est exclu de la majorité des ARNm. . Même si c'est une mutation silencieuse et donc n'affectant pas la séquence d'acides aminés de la protéine codée, elle affecte gravement l'épissage correct de l'exon 7. [31]

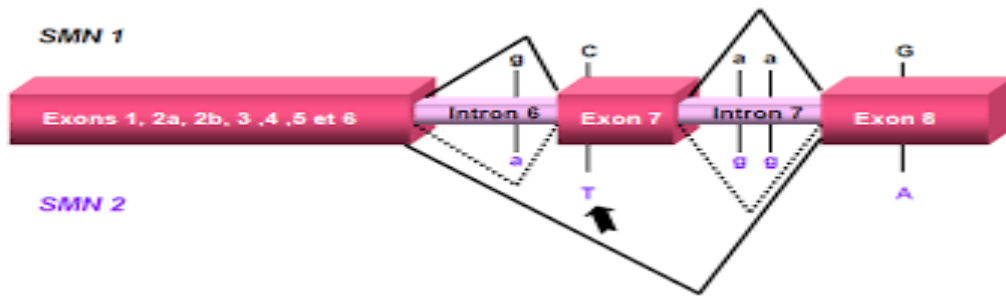


Figure 6: Différences de séquence primaire et d'épissage entre les transcrits *SMN1* et *SMN2*[31]

Le gène *SMN2* diffère en 5 positions par rapport au gène *SMN1*. La substitution d'une cytosine (C) en thymine (T) dans l'exon 7 du transcrite du gène *SMN2* (voir flèche) entraîne un épissage alternatif de l'exon 7. Les traits pleins représentent les séquences de l'ARN pré-messager majoritairement épissées. Les traits en pointillés représentent les séquences minoritairement épissées

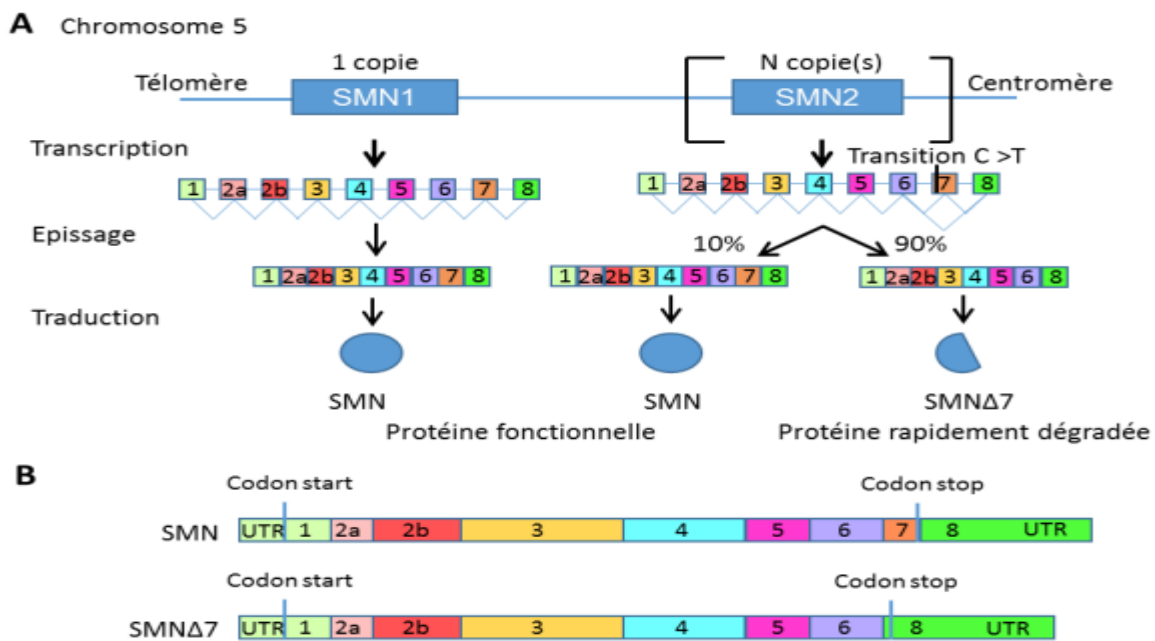


Figure 7: Schéma des gènes *SMN1* et *SMN2*, de leurs transcrits et de la protéine *SMN*. [32]

(A) Organisation et expression des gènes *SMN1* et *SMN2* sur le chromosome 5. (B) ARNm transcrits à partir des gènes *SMN1* et *SMN2*.

Les transcrits complets sont presque exclusivement produits par *SMN1* alors que la forme prédominante codée par *SMN2* (90 %) est dépourvue de l'exon 7 (*SMNΔ7*). Le transcrite tronqué, sans exon 7, code une protéine raccourcie de 16 résidus du côté carboxyterminal. La protéine *SMNΔ7* est fonctionnellement déficiente et instable. Cette propriété explique pourquoi l'expression de la protéine issue du gène *SMN2* est incapable de compenser le défaut d'expression du gène *SMN1* chez les patients atteints de SMA. [29]

2.4.4 La protéine SMN

2.4.4.1 Structure de la protéine SMN :

SMN est une protéine de petite taille (38 kDa) comportant 294 acides aminés. Elle ne possède aucune homologie significative avec des protéines déjà connues [29].

Le gène SMN1 et sa copie centromérique SMN2 [33]. Elle est présente dans de nombreux tissus à savoir la moelle épinière et les muscles squelettiques.

2.4.4.2 Localisation de la protéine SMN:

La protéine SMN est d'expression ubiquitaire. Elle est présente au niveau cellulaire dans les tissus de nombreux organes (moelle épinière, muscles squelettique et cardiaque, cerveau, foie, rein, fibroblastes, lymphocytes). [34].

Elle a une localisation diffuse dans le cytoplasme. Elle est également présente dans le noyau, où elle est concentrée dans des corps nucléaires appelés «Gems».[35]

2.4.4.3 Le rôle de protéine SMN

La protéine SMN est présente dans toutes les cellules de l'organisme. Elle joue un rôle dans la synthèse des protéines, dans le transport cellulaire, dans l'apoptose.[36]

✓ SMN et synthèse des protéines :

Le métabolisme des ARN : à savoir l'assemblage du spliceosome (complexe moléculaire nécessaire à la maturation des ARN messagers), et la maturation des ARN messagers.

✓ SMN et transport cellulaire :

La protéine SMN est aussi impliquée dans le transport de molécules et même d'organites le long de l'axone. Ce transport s'effectue entre le corps cellulaire du motoneurone et la jonction neuromusculaire, dans les deux sens.

✓ SMN et apoptose :

L'apoptose est une mort cellulaire physiologique, qui se déroule de manière ordonnée en plusieurs étapes au terme desquelles l'ensemble de la cellule et de son contenu est éliminé sans que les cellules avoisinantes soient endommagées. L'apoptose est en équilibre constant avec la multiplication des cellules pour assurer le renouvellement cellulaire.

2.4.5 La SMA : un défaut de protéine SMN

Chez 95% des patients atteints SMA, la maladie résulte d'une délétion homozygote des exons 7 et 8 de gène *SMN1*. Ces patients peuvent porter un nombre variable de copies SMN2 influencé la sévérité de la maladie. La plupart des patients atteints de SMA de type I ont une ou deux copies du gène SMN2, la plupart des patient de type II en ont trois et la plupart des patient atteint de SMA de type III en

possèdent trois ou quatre. Quelques patients peuvent avoir cinq ou 6 copies. La présence d'une seule copie semble être très rare; elle est associée à un phénotype très sévère de SMA et la présence d'au moins 2 copies du gène SMN2 est requise pour que les patients atteints de SMA de type I survivent quelques mois.[29,37]

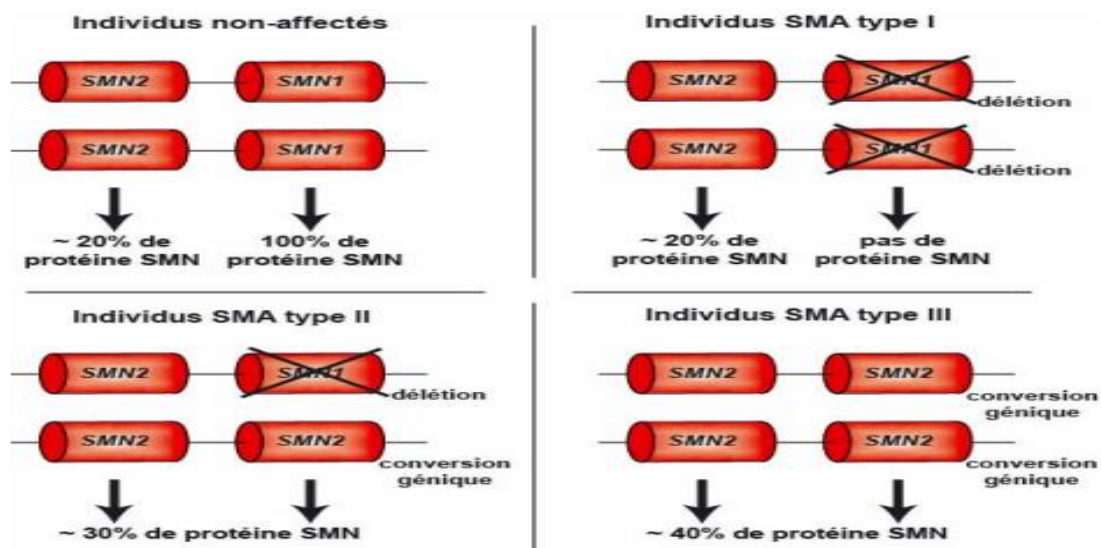


Figure 8: Génotypes observés chez la plupart des patients atteints de SMA. [36]

Par ailleurs, les 5% restants des patients atteints de SMA portent la délétion des exons 7 et 8 à l'état hétérozygote du gène SMN1. A l'heure actuelle, 40 mutations ont déjà été identifiées, parmi lesquelles des mutations non-sens et faux-sens, des décalages du cadre de lecture, des délétions, des inversions et des mutations dans un site d'épissage. La plupart des mutations faux-sens sont localisées dans une région très conservée des exons 6 et 7. [37]

Tableau 1: liste des mutations de *SMN1* entrainant un SMA.[38]

Type de mutation	Mutation de <i>SMN1</i>	Type de SMA	Références
Délétions	Exon 8 Intron 4 à Intron 6	II et III I	(Gambardella et coll., <i>Ann Neurol</i> , 1998) (Wirth et coll., <i>Am J Hum Genet</i> , 1999)
Mutations non-sens	Exon 1 : Q15X Exon 3 : W102X	I, II et III III	(Wirth et coll., <i>Am J Hum Genet</i> , 1999) (Sossi et coll., <i>Eur J Hum Genet</i> , 2001)
Décalage du cadre de lecture	Exon 1 : 27insG Exon 2a : 124insT Exon 2b : 241-242ins4 Exon 3 : 425del5 Exon 3 : 430 del4 Exon 3 : 472del5 Exon 4 : 542delGT Exon 4 : 591delA Exon 4 : 618insT Exon 6 : 773insC Exon 6 : 813ins/dup11 Intron 6 : c.867+2T→G	II I III III I, II et III I I, II et III II I III I et II I	(Skordis et coll., <i>Hum Genet</i> , 2001) (Wirth et coll., <i>Am J Hum Genet</i> , 1999) (Wirth et coll., <i>Am J Hum Genet</i> , 1999) (Sossi et coll., <i>Eur J Hum Genet</i> , 2001) (Bussaglia et coll., <i>Nat Genet</i> , 1995) (Brahe et Bertini, <i>J Mol Med</i> , 1996) (Parsons et coll., <i>Am J Hum Genet</i> , 1998) (Wirth et coll., <i>Am J Hum Genet</i> , 1999) (Clermont et coll., <i>Lancet</i> , 1995) (Martin et coll., <i>Hum Genet</i> , 2002) (Parsons et coll., <i>Hum Mol Genet</i> , 1996) (Martin et coll., <i>Hum Genet</i> , 2002)
Mutation d'un site d'épissage	Intron 6 : c.868-11del7 Intron 7 : c.922+3del4 Intron 7 : c922+6T→G	I II III	(Lefebvre et coll., <i>Cell</i> , 1995) (Lefebvre et coll., <i>Cell</i> , 1995) (Wirth et coll., <i>Am J Hum Genet</i> , 1999)
Mutation faux-sens	Exon 1 : A2G Exon 3 : E134K Exon 6 : P245L Exon 6 : S261I Exon 6 : Y272C Exon 6 : T274I Exon 6 : G275S Exon 7 : G279C Exon 7 : G279V	II et III I III III I, II et III II et III III II et III I	(Parsons et coll., <i>Am J Hum Genet</i> , 1998) (Clermont et coll., <i>Lancet</i> , 1995) (Rochette et coll., <i>Neurogenetics</i> , 1997) (Hahnen et coll., <i>Hum Mol Genet</i> , 1997) (Lefebvre et coll., <i>Cell</i> , 1995) (Hahnen et coll., <i>Hum Mol Genet</i> , 1997) (Burglen et coll., <i>Genomics</i> , 1996) (Wang et coll., <i>Neurogenetics</i> , 1998) (Talbot et coll., <i>Hum Mol Genet</i> , 1997)

2.5 Diagnostic

Le diagnostic de SMA est avant tout clinique, il s'agit d'une atteinte motrice périphérique qui se traduit par une hypotonie ou une faiblesse musculaire qui prédomine à la racine des membres.

Chez le petit enfant (types I et II) : hypotonie par déficit musculaire de l'axe et des 4 membres symétrique, prédominant en proximal.

Chez le plus grand enfant (type III) ou l'adulte la présentation est pseudo-myopathique : déficit des ceintures responsable d'une démarche dandinante, absence de troubles sensitifs.

Par la suite le diagnostic est paraclinique qui comporte :

Les CPK (Créatine phosphokinase) modérément augmentées supérieures que la valeur normale qui varie entre 0 et 195 UI/l [39]. Son rôle est de reconstituer les réserves en ATP.

L'électroneuromyogramme (ENMG) : tracé neurogène, vitesses de conduction motrices et sensitives normales ou légèrement diminuées.

Le test génétique, ce dernier permet de confirmer la délétion à l'état homozygote d'au moins l'exon 7 du gène *SMN*.

2.6 Stratégies thérapeutiques

Malgré les avancées thérapeutiques, les patients atteints de SMA ne bénéficient d'aucun traitement curatif permettant une guérison. Bien que le mécanisme moléculaire responsable de la pathologie SMA n'ait pas encore été précisément défini, les connaissances accumulées ces dernières

années ont permis l'émergence de différentes approches thérapeutiques. De nombreuses stratégies thérapeutiques sont explorées dans l'amyotrophie spinale proximale liée au gène *SMN1* (SMA) [40] :

- ✓ transférer le gène *SMN1* par thérapie génique,
- ✓ augmenter la production de protéine SMN en augmentant l'expression du gène *SMN2*
- ✓ modifier l'ARN messager de *SMN2* pour réintégrer l'exon 7,
- ✓ protéger le motoneurone,
- ✓ améliorer le fonctionnement de la jonction neuromusculaire,
- ✓ augmenter la masse et la force musculaires.

2.6.1 La thérapie génique : le transfert du gène *SMN1*

La thérapie génique consiste à remplacer le gène défectueux ou manquant par un gène thérapeutique, à l'aide d'un transporteur (vecteur). Ce n'est que depuis quelques années que les motoneurons sont devenus accessibles à la thérapie génique avec le développement de nouveaux vecteurs viraux (comme les virus adéno-associés ou AAV) capables d'atteindre la moelle épinière. [40]

2.6.2 Activation d'expression du gène *SMN2*

Cette technique permet de stimuler spécifiquement l'inclusion de l'exon 7 dans les ARNm issus du gène *SMN2* et ainsi augmenter la quantité de protéine SMN fonctionnelle.

Plusieurs études ont montré qu'il y a des composés capables de désactiver les histones déacétylases (HDAC), des enzymes impliquées dans la modulation de l'expression des gènes.

Certains de ces inhibiteurs sont capables d'activer le promoteur de le gène *SMN2*, par conséquent, augmenté la production de protéine SMN, c'est le cas de l'acide valproïque. [40]

2.6.3 Inclusion de l'exon 7 dans le transcrit issu du gène *SMN*

Une augmentation du taux de protéine SMN par l'utilisation des molécules induisant l'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits *SMN2*. C'est le cas de le salbutamol (albuterol) a permis une augmentation rapide et significative des transcrits *SMN2* pleines longueurs dans des fibroblastes de patients atteints de SMA. Il existe aussi des stratégies non pharmacologiques qui utilise des oligonucléotides antisens pour augmente l'incorporation de l'exon 7 dans les transcrits *SMN2*. [40]

2.6.4 Neuroprotection

La protection des motoneurons est accomplie par l'utilisation d'une molécule qui empêche les mitochondries de libérer des facteurs favorisant la mort des motoneurons, appelé : L'olésoxime (TRO19622). [40]

Chapitre II : Matériel et méthodes

1 Matériel utilisé :

1.1 Echantillonnage

1.1.1 Patients

Il s'agit d'une étude portée sur une série de 10 patients. Ces patients ont été colligés au sein du laboratoire de génétique médicale et oncogénétique de CHU de Fès, afin d'évaluer l'implication du gène SMN comme facteur prédictif et pronostic dans le diagnostic.

1.1.2 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). Suivi par PCR - RFLP pour la recherche de la délétion.

2 Méthodes :

2.1 Prélèvement

Avant tout prélèvement, les patients doivent signer une fiche qui porte les renseignements, l'accord et le consentement dans laquelle ils expriment leur accord d'utiliser leur prélèvement dans l'étude.

Pour chaque patient de la série d'étude, un prélèvement sanguin (3 à 5 ml) a été réalisé dans un tube EDTA (Ethylène Diamine Tétra-acétique acide). Les tubes peuvent être conservés à +4°C ou -20°C pour utilisation ultérieure.

2.2 Extraction de l'ADN génomique

L'extraction de l'ADN est nécessaire pour initier toute étude génétique. C'est une technique qui sert à isoler de l'ADN à partir des cellules en quantité et en qualité suffisante pour permettre son analyse.

Il existe différents protocoles pour extraire l'ADN, qui suivent approximativement le même schéma de principe :

- Lyse des cellules (globules rouges et globules blancs)
- Elimination des protéines et des impuretés (autres acides nucléiques : ARN, etc.)
- Précipitation et concentration de l'ADN

Au niveau du laboratoire de Génétique médicale et d'oncogénétique, l'extraction peut être effectuée à l'aide de deux méthodes, soit par Sel (salting-out) ou par Kit commercialisé (invitrogène).

2.3 Extraction d'ADN génomique par le Kit « Pure Link™ Genomic DNA »

2.3.1 Principe

L'extraction d'ADN par Kit sur suspension cellulaire est une technique qui permet d'isoler l'ADN à partir d'une suspension cellulaire grâce à un kit muni d'une colonne qui après lyse cellulaire va permettre de collecter l'ADN dispersé dans la solution sur une membrane permettant ainsi de le purifier avec un rendement maximal. Ce qui rend cette technique avantageuse lorsqu'il y a un faible volume de sang.

2.3.2 Réactifs nécessaires

Kit Pure Link™ Genomic DNA Kits contenant les solutions suivantes :

- Pure Link™ Genomic Lysis / Binding Buffer : 10 ml
- Pure Link™ collection tubes (2ml) : 100
- Pure Link™ spin columns with collection tubes : 50
- Pure Link™ Genomic Elution Buffer
- Pure Link™ Genomic Wash Buffer 1 (concentré) : 10 ml
- Ajouter 15 ml d'éthanol absolu
- Pure Link™ Genomic Wash Buffer 2 (concentré) : 7,5 ml
- Ajouter 17,5 ml d'éthanol absolu
- RNase A (20 mg/ml) : 1ml
- Protéinase K (20 mg/ml) : 1ml
- Ethanol absolu

2.3.3 Protocole expérimental

➤ Lyse des cellules avec la protéinase K et le tampon de lyse

Prévoir un bain marie à 55° C ou une étuve à 55°C. Dans un tube Eppendorf de 1 ,5 ml :

- Ajouter 200 µl de sang + 20µl de protéinase K + 20µl de RNase A
- Vortexer environ 15 secondes
- Incuber 2 minutes à température ambiante ;
- Ajouter 200 µl de Pure Link™ Genomic Lysis / Binding Buffer ;
- Vortexer environ 15 secondes ;
- Incuber 10 minutes à 55°C ;
- Ajouter 200µl d'éthanol absolu, vortexer environ 5 secondes ;

➤ Adsorption de l'ADN sur la membrane

- Mettre le mélange dans la colonne Pure Link™ et centrifuger 1 minute à 8000rpm ;

- Mettre la colonne dans un tube collecteur de 2ml (fourni dans le kit) et jeter le tube contenant le filtrat ;

➤ **Elimination des contaminants résiduels**

- Ajouter 400ml de tampon Wash Buffer 1 et centrifuger 1 minute à 8000rpm ;
- Mettre la colonne dans un tube collecteur de 2ml (fourni dans le Kit) et jeter le tube contenant le filtrat ;
- Ajouter 400ml de tampon Wash Buffer 2 et centrifuger 3 minutes à 1400rpm ;
- Placer la colonne dans un tube Eppendorf de 1,5ml ;
- Mettre 50 ou 100 ml de tampon Pure Link™ Genomic Elution buffer et incuber 1 à 5 minutes à température ambiante ;
- Centrifuger 1minute 8000rpm ;
- Faire une deuxième élution : remettre les 50ml dans la colonne et centrifuger 1minute à 8000rpm ;
- Conserver l'ADN extrait 0 +4°C ou -20°C.

2.4 Dosage de l'ADN

La concentration d'ADN extrait est déterminée par spectrophotométrie. En effet, les acides nucléiques présentent un pic d'absorption dans l'ultra-violet se situant à 260nm, alors que les protéines absorbent à 280 nm. Une unité DO à 260 nm = 50 µg/ml d'ADN. La valeur de l'absorbance (ou densité optique DO) à 280 nm permettra de déterminer toute contamination protéique. Ainsi, le ratio DO260/DO280 est utilisé pour estimer la pureté de l'ADN. Un extrait d'ADN est considéré pur lorsqu'il présente un rapport DO260 / DO280 comprise entre 1.8 et 2.

Au laboratoire de génétique médicale, le Spectrophotomètre Nanovue plus est l'appareil utilisé pour doser la concentration d'ADN. Il suffit de déposer dans l'appareil 2µl d'ADN extrait pour déterminer sa concentration.



Figure 9 : Image de spectrophotomètre Nanovue utilisé dans notre laboratoire.

2.5 Amplification des séquences nucléotidiques par PCR

2.5.1 Principe

Une fois l'extrait d'ADN est obtenu, on peut procéder à la technique de réaction de polymérisation en chaîne PCR (Polymerase Chain Reaction). C'est une technique qui permet d'amplifier in vitro un gène ou une région spécifique d'un gène en utilisant deux amorces oligonucléotidiques d'orientation opposée (Forward & Reverse primer) qui s'hybrident en des sites complémentaires sur les 2 brins de la région l'ADN que l'on veut amplifier.

Cette réaction est en effet réalisée en une succession de cycles de températures, chacun comprend 3 étapes : dénaturation de l'ADN, l'hybridation des 2 amorces (F et R) et l'élongation (polymérisation) à partir des amorces, par une enzyme thermorésistante, la Taq polymérase, dérivé d'une bactérie thermophile « *Thermus aquaticus* ». Les copies d'ADN obtenues à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant. L'amplification est donc exponentielle (2^n). A la fin de chaque cycle, les produits sont sous forme d'ADN double brin. Les températures d'hybridation des amorces avec les brins d'ADN complémentaires dépendent du gène amplifié (nombre de bases nucléotidiques C et G). La température d'hybridation est calculée ainsi à partir la formule suivante : $T_m = [2(A+T) + 4(C+G)]$.

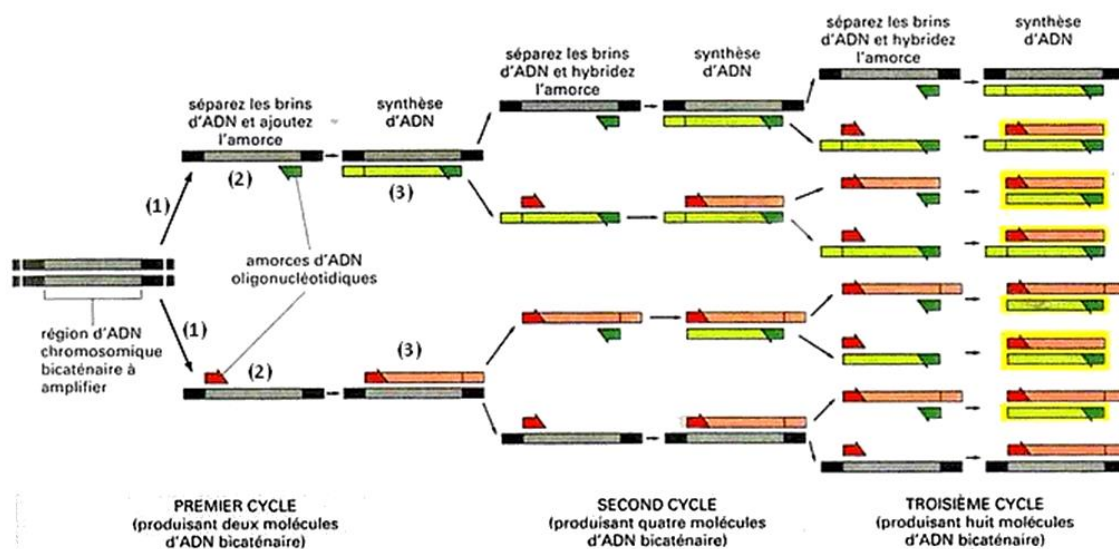


Figure 10 : Schéma explicatif de l'amplification in vitro de l'ADN par la technique de PCR.[41]

Dans notre travail, nous avons procédé nos analyses moléculaires à :

- PCR - RFLP : pour identifier la délétion de l'exon 7 du gène *SMN1*, responsable de l'amyotrophie spinale infantile.

2.5.2 PCR - RFLP pour rechercher la délétion de l'exon 7 du gène *SMN1*

2.5.2.1 Principe

C'est une autre variante de PCR classique, par laquelle le produit d'amplification est soumis, après l'amplification, à une digestion par des enzymes de restriction spécifiques qui reconnaissent et clivent dans un site spécifique de l'ADN, permettant ainsi de différencier entre 2 allèles différents, généralement entre un allèle normal et un autre muté.

Dans le cas de SMA, le diagnostic repose sur la recherche de la délétion de l'exon 7 du gène *SMN1* ; pour cela, une amplification de l'exon 7 des deux gènes *SMN1* et *SMN2* est effectuée.

Comme il n'y a pas de site de reconnaissance spécifique d'enzyme de restriction dans l'exon 7 du gène *SMN*, une amorce oligonucléotidique mésappariée (portant des bases non complémentaires) est utilisée pour introduire spécifiquement une différence (changement) nucléotidique entre les deux gènes (*SMN1* et *SMN2*). Ce changement de nucléotide introduit par cette amorce, en combinaison avec la différence de nucléotide simple native, crée un site de restriction artificiel pour l'enzyme « Dra I » sur *SMN2* seulement.

Dra I est une enzyme de restriction produite par « *Deinococcus radiophilus* ». Elle reconnaît et clive la séquence suivante : 5'...TTT ▼ AAA...3'

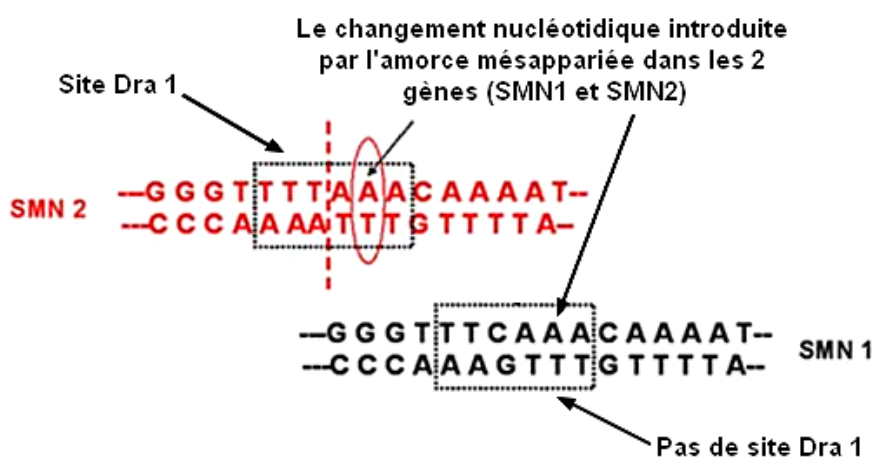


Figure 11 : Le site de reconnaissance de Dra I dans *SMN2* créé par l'amorce mésappariée utilisée.

2.5.2.2 Conditions de la PCR - RFLP

La PCR RFLP a été réalisée sur un extrait d'ADN dilué à 100 ng/μl. Elle repose sur l'utilisation d'une couple amorce (F et R) choisie de façon à encadrer la séquence exon 7 à la fois de *SMN1* et *SMN2* :

Tableau II : Le couple d'amorce utilisé pour l'amplification de l'exon 7 du gène *SMN*.

N° Exon	Taille (pb)	Amorces		T° Hybridation
7	200	F	5'-AGACTATCAACTTAATTTCTGATCA-3'	56°C
		R	5'-CCTTCCTTCTTTTGATTTTGTTT-3'	

La réaction de PCR RFLP pour le gène *SMN1* est réalisée avec le Kit « Platinum™ Taq DNA Polymerase », contenant : le Platinum® Taq DNA Polymerase, le PCR Buffer (no magnesium chloride), le magnésium chloride (MgCl₂) et les dNTP (dATP, dTTP, dCTP et dGTP).



Figure 12 : Réactifs du Kit «Platinum™ Taq DNA Polymerase ».

Pour chaque échantillon, on prépare un milieu réaction (Mix) dans un tube Eppendorf, contenant chacun (sous forme de tableau) :

- 4 µl Tampon de Taq (10X)
- 21,6 µl de l'eau
- 4 µl de MgCl₂ (50 mM)
- 4 µl dNTP (10 mM)
- 4µl des amorces (2 µl F et 2 µl R)
- 2µl d'ADN (100 ng/µl)
- 0,4 µl de Taq

Les mélanges préparés sont aliquotés à raison d'un volume final de 40 µl par tube.

Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 1 min, puis déposés dans un thermocycleur (Applied Biosysteme) (figure) ; l'amplification est effectuée en 35 cycles de températures, précédée par une étape de dénaturation allongée de 10 min à 95°C, et terminée par une étape d'élongation finale de 7min à 72°C. L'ensemble se déroule dans 2h environ.

Tableau III ; Programme de cycle de T° pour l'amplification de l'exon 7 du gène *SMN* dans le thermocycleur.

Etape	T°	Durée	Nombre de cycle
Dénaturation initiale	95°C	10 min	X 1
Dénaturation	95°C	30 secs	X 35
Hybridation	56°C	30 secs	
Elongation	72°C	1 min	
Elongation finale	72°C	7 min	X 1

A la fin de la réaction d'amplification PCR, les produits d'ADN ainsi amplifiés sont soumis à une digestion enzymatique par Dra I, réalisé par un milieu réactionnel contenant (tableau) :

Tableau IV : Le milieu réactionnel de digestion par l'enzyme Dra I

Réactif	Volume (en µl)
Tampon	2 µl
Enzyme DraI	0,5 µl
H2O	7 µl
Produit PCR	10 µl

:

Par la suite, les tubes sont incubés pendant une nuit dans un bain marie à 37°C.

2.5.2.3 Témoins de la PCR – RFLP du gène *SMN1*

Les témoins inclus pour chaque réaction PCR comprennent :

- Le témoin Positif : Il est représenté par l'ADN d'un sujet malade, qui produira ainsi le signal attendu, permettant d'éviter les FAUX NEGATIFS
- Le témoin Négatif : Il est représenté par l'ADN d'un sujet sain.

Le blanc : Il comprend tous les réactifs de PCR sauf l'ADN.

2.6 Visualisation du produit PCR par électrophorèse sur gel d'agarose

2.6.1 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.

En effet, A pH neutre, les groupes de phosphates de l'ADN se trouvent chargés négativement, ce qui permet leur migration, sous un champ électrique, de la cathode (-) vers l'anode (+) dans un tampon de migration (TBE) [204]. La vitesse et la distance de migration dépend de la taille des fragments d'ADN migrés. Le gel agit comme un tamis moléculaire laissant passer plus facilement les petits fragments d'ADN

Les échantillons (produits PCR) sont mélangés au bleu de bromophénol, colorant qui possède une masse moléculaire faible et qui permet de détecter le front de migration. La visualisation des bandes ADN se fait sous l'UV, grâce au BET (Bromure d'éthidium), agent intercalant entre les bases de l'ADN.

Cette étape a pour but d'un contrôle des produits PCR pour s'assurer que l'amplification du gène/partie du gène considéré est passée dans des bonnes conditions et sans contamination (en comparant avec un Blanc), pour passer par la suite soit au séquençage pour identifier une mutation

ponctuelle spécifique, ou bien à une interprétation basé sur la visualisation des bandes d'ADN sur gel pour mettre en évidence la ou les délétions existé au niveau de la région d'ADN étudiée.

2.6.2 Visualisation du produit de PCR - RFLP du gène *SMN1*

Un contrôle des produits PCR est effectué, avant tout digestion enzymatique, par une électrophorèse sur gel d'agarose. Il permet de contrôler la taille des fragments amplifiés ainsi que d'assurer l'absence de toute contamination de l'ADN au cours de la PCR.

Après la digestion enzymatique de produit PCR (exon 7) par l'enzyme de restriction Dra I, une visualisation des fragments d'ADN fluorescents sous l'UV après une électrophorèse sur gel d'agarose, permettra de différencier entre un allèle normal (*SMN1* intact) et un allèle délété (*SMN1* délété).

2.6.2.1 Protocole expérimental de préparation du gel d'agarose

Comme pour le cas de PCR - multiplexe, la préparation du gel d'agarose est réalisé par le même protocole, sauf que dans ce cas, on pèse 3g de poudre gel d'agarose (3%) et on fait dissoudre avec un volume de 50 ml de TBE 1X (Tris Borate EDTA), auquel est additionné 2 µl de BET (Bromure d'éthydiuim).

Dans puits créés dans le gel, on dépose un mélange de 10 µl de produit PCR et 3 µl de solution de charge.

Une fois la migration (130V pendant 1h30min) est terminée, nous visualisons les fragments d'ADN sous forme des bandes fluorescentes sous la lumière ultra-violette, pour distinguer l'allèle normal de l'allèle délété du gène *SMN1*.

2.6.2.2 Les bandes attendues :

En effet, après la digestion par l'enzyme Dra I, une électrophorèse en gel d'agarose, a montré que chez un sujet normal, le produit *SMN1* exon 7 (188 pb) ne sera pas digéré (il ne contient pas de site Dra I) présentant une bande lourde, alors que le produit d'amplification de l'exon 7 de *SMN2* sera digéré par Dra I en 2 fragments de 164 et 24 paires de bases ; la bande correspondant au petit fragment (24 pb) est invisible, du fait migre rapidement du gel.

Chez un patient atteint de SMA, le gel de l'exon 7 montre un seul fragment (164 pb) digéré du gène *SMN2*, mais pas de produit du gène *SMN1* (pas de bande), ce qui permet de confirmer une absence homozygote du gène *SMN1*.

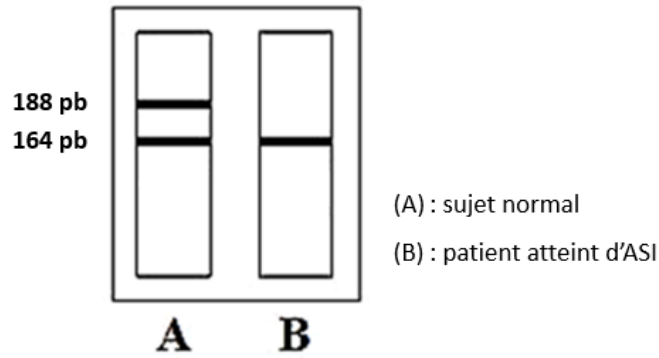


Figure 13 : Schéma des bandes attendues après digestion enzymatique des produits PCR et migration par électrophorèse.

La confirmation génétique de la pathologie SMA consiste à mettre en évidence l'altération du gène *SMN*, par une délétion homozygote de l'exon 7 de la copie télomérique du gène *SMN* (*SMNt*). Pour cela, nous avons procédé au clonage de cette région d'ADN grâce à la PCR, en utilisant une amorce oligonucléotidique mésappariée spécifique qui incorpore sélectivement une différence de nucléotides entre les 2 copies du gène (*SMN1* et *SMN2*), suivie d'une digestion par une enzyme de restriction spécifique « DraI ». L'enzyme DraI reconnaît et coupe ainsi dans le site artificiellement créé au niveau de l'exon 7 du gène *SMN2*, par l'amorce oligonucléotidique mésappariée utilisé ; mais aucun site n'est reconnu au niveau du fragment dérivé de l'exon 7 de *SMN1*. La taille attendue de l'amplimère (*SMN*) avant la digestion est de l'ordre de 188 pb.

Chapitre III : Résultats et Discussion

1 Résultats

1.1 Données épidémiologiques :

Dans notre étude, nous avons recensé 10 cas de myopathie infantile spinale qui sont diagnostiqués entre 2019 et 2021.

1.1.1 Age

Les symptômes apparaissent généralement chez les enfants dont l'âge varie de 2 mois à 7 ans, mais la majorité des patients avait un âge supérieur à 18 mois.

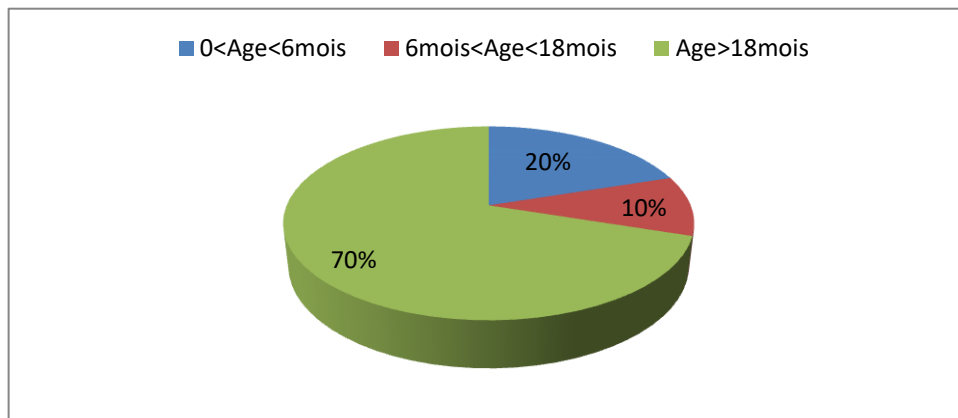


Figure 14 : Répartition des patients en fonction d'âge

1.1.2 Sexe

Les patients étudiés présentent un sexe ratio H/F de l'ordre de 4 avec 8 garçons représentant 80% versus 2 filles (20%).

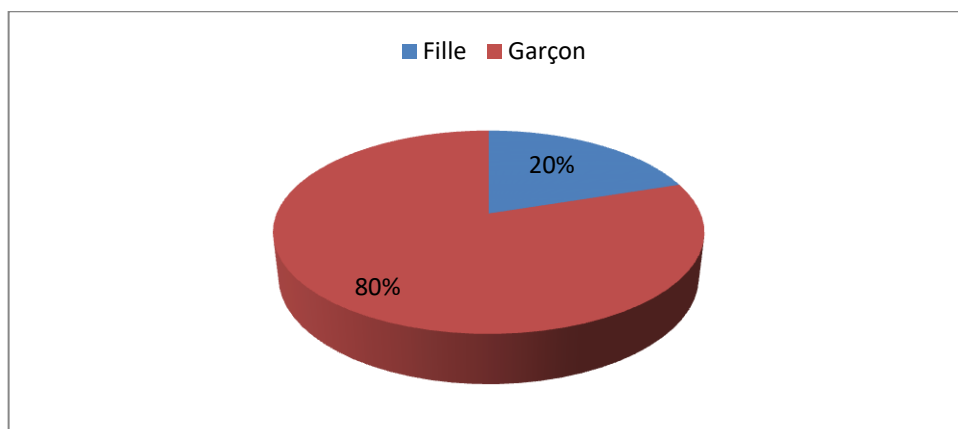


Figure 15 : Répartition des patients en fonction du sexe

1.2 Antécédents :

1.2.1 Consanguinité

Parmi nos patients étudiés, Deux étaient consanguins au premier degré.

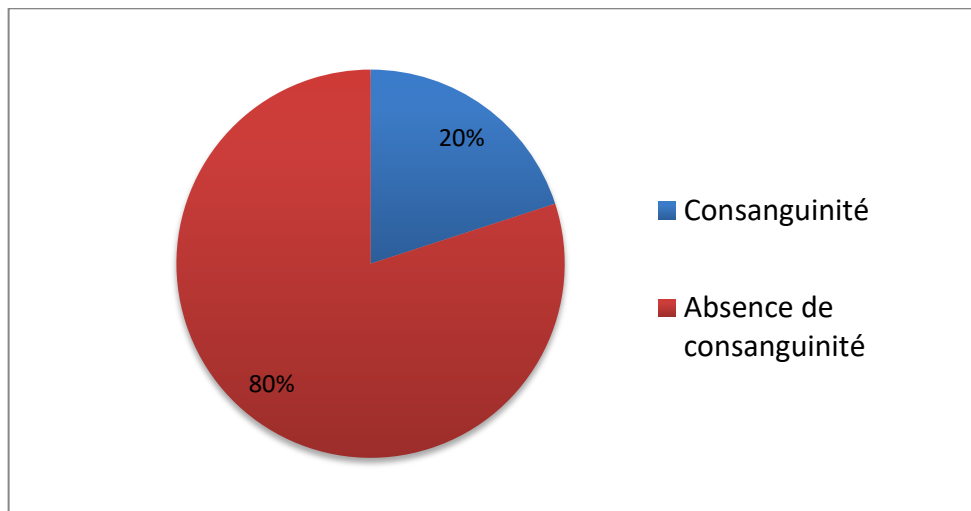


Figure 16 : Répartition des patients selon la consanguinité

1.2.2 Antécédents familiaux

Parmi nos patients étudiés, deux patients atteints avaient des cas similaires dans leurs familles qui étaient atteints de l'amyotrophie spinale.

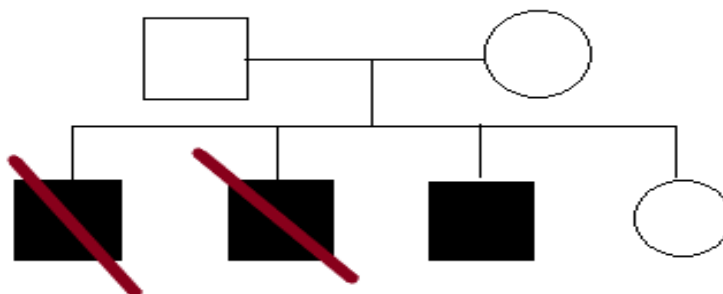


Figure 17: Arbre généalogique d'un enfant

Dans le cas de cet enfant ses frères sont morts de l'amyotrophie spinale.

1.3 Données cliniques :

1.3.1 Motif de consultation :

Le motif de consultation le plus fréquent était l'impotence fonctionnelle des membres inférieurs.

Tableau V : Répartition des cas selon le motif de consultation.

Motif de consultation	Nombre de cas
Impotence fonctionnelle des deux membres inférieurs	4
Détresse respiratoire	2
Trouble de la marche	3
Retard de langage	1

1.3.2 Profil clinique :

L'examen clinique à l'admission a trouvé les signes suivants

Tableau VI : Fréquence des différents signes cliniques de la maladie.

Clinique	Nombre de cas
Hypotonie	8
Détresse respiratoire	2
Diminution des forces musculaires	5
Trouble de la marche	3
Amyotrophie	2

1.4 Profil paraclinique :

1.4.1 Créatine phosphokinase (CPK) :

La CPK réalisée chez les 10 cas s'est révélée :

- Normale chez 9 patients.
- Légèrement élevée chez 1 patient.

1.4.2 Electromyogramme (EMG) :

Dans notre série, l'EMG a été demandé chez tous nos patients mais réalisé seulement chez 3 cas. Il a montré un tracé neurogène en faveur d'un syndrome de la corne antérieure.

1.4.3 Etude moléculaire du gène *SMN* :

Elle était réalisée chez tous nos patients au sein de laboratoire du CHU de Fès. Cette étude moléculaire a confirmé le diagnostic de l'amyotrophie spinale infantile en mettant en évidence la délétion homozygote de l'exon 7 du gène *SMN*.

1.4.3.1 Dosage et qualité de l'ADN extrait:

La qualité de l'ADN obtenu après extraction requiert une importance majeure, car elle influence directement sur la qualité des résultats de la PCR et du Séquençage.

L'extraction d'ADN a été réalisée par la méthode classique à partir des tissus tumoraux des patients étudiés. Le rapport de l'absorbance DO260/DO280 est compris pour la majorité des échantillons entre les valeurs 1,8 et 2, ce qui permet de conclure que ces extraits ne sont contaminés ni par l'ARN ni par les protéines et peuvent être qualifiés de purs.

1.4.3.2 Résultats de PCR-RFLP

Un profil normal est caractérisé généralement par 2 bandes fluorescentes :

- une bande lourde représentant le fragment de l'exon 7 de *SMN1* intact non digéré (188 pb).

- une bande moins lourde représentant le grand fragment résultant de la digestion de l'exon 7 de *SMN2* (164 pb).

Par contre, chez un sujet présentant une délétion homozygote de l'exon 7 de *SMN1*, nous avons observé l'absence de la bande 188 pb de l'exon 7 de *SMN1*, en laissant ainsi une seule bande claire correspondant au grand fragment de l'exon 7 issu de *SMN2* (164 pb) qui résulte de la digestion enzymatique de *SMN2*.

L'autre fragment court (24 pb), résultant de la digestion de l'exon 7 de *SMN2*, est habituellement invisible dans le gel, du fait qu'il en migre rapidement vu sa petite taille.

L'analyse des gels obtenus pour chaque patient a permis de constater l'absence de la délétion de l'exon 7 du *SMN1* chez 5 patients (soit 50%), alors les autres avaient effectivement une délétion homozygote de l'exon 7 du gène *SMN1*.

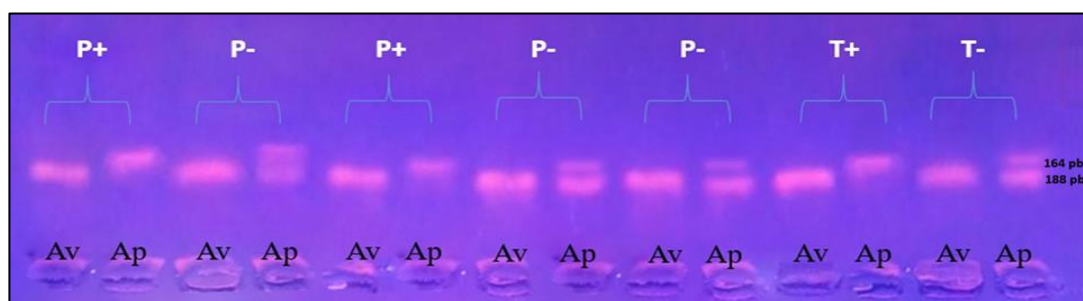


Figure 18: Profil d'électrophorèse chez des patients SMAI mutés (positifs) et non mutés (négatifs). T+ : Témoin positif ; T- : Témoin négatif ; P+ : Patient positif (présence de délétion) ; P- : Patient négatif (absence de délétion) ; Av : Avant l'addition de l'enzyme de restriction

2 Discussion

2.1 Données épidémiologique :

2.1.1 Age

Dans notre travail, l'âge d'apparition de la maladie était à la naissance chez les patients de type I, entre 6 à 18 mois avec une moyenne de 15 mois chez les cas type II et il variait entre 2 à 6 ans avec une moyenne de 3.3 ans chez les patients type III

Dans la série de Sifi [42], l'âge de début du type 1 était entre la naissance et 6 mois avec une moyenne de 5 mois; pour le type 2, il était entre 8 à 18 mois avec une moyenne de 12,7 mois; et pour le type 3, il a débuté après la première année de la vie.

2.1.2 Sexe

Le sexe est variable selon les séries, avec une prédominance du sexe masculin dans la majorité des séries rapportées avec un sexe ratio à 2 dans l'étude de Pires en 2011 à Portugal [43].

Les mêmes résultats dans notre travail.

2.2 Antécédents :

2.2.1 Consanguinité :

La consanguinité comme dans toutes les maladies récessives est un facteur favorisant important dans l'émergence de la maladie. Le taux de consanguinité est nettement plus élevé chez les couples ayant donné naissance à des enfants atteints de SMA par rapport aux couples n'ayant pas d'enfants malades.

Dans notre travail, la consanguinité a été retrouvée chez 2 cas, ce qui rejoint les chiffres rapportés par l'étude réalisée au CHU de Rabat a rapporté que 25 % des cas étaient consanguins [44].

2.2.2 Antécédents familiaux :

L'amyotrophie spinale est une maladie génétique ayant des conséquences lourdes, Il est important de chercher la présence ou non de cas similaires dans la famille.

Dans la série de Belarbi et al faite au CHU de Rabat [44], 23% des cas avaient des cas familiaux.

2.3 Profil paraclinique

2.3.1 CPK :

Le taux de la CPK, dans l'amyotrophie spinale infantile, est normal ou légèrement augmenté. Le dosage de cet enzyme chez ces enfants est pratiqué pour écarter les étiologies d'origines musculaires (myopathies) [45].

Dans notre série, les CPK réalisées chez les 10 cas, étaient normales chez 9 et légèrement augmentées chez un cas.

2.3.2 Etude moléculaire :

L'étude génétique est confirmé le diagnostic lorsque on observe dans le gène *SMN1* une délétion homozygote.

La PCR a objectivé la délétion homozygote de l'exon 7 du gène *SMN1* chez 5 de nos patients.

Conclusion

L'amyotrophie spinale progressive est une maladie neuromusculaire assez fréquente et qui semble méconnue. Elle est souvent classée en quatre types selon l'âge de début des symptômes. Le tableau clinique est dominé par un déficit moteur, une amyotrophie et une abolition des réflexes prédominant aux membres inférieurs et en proximal, et s'associe

souvent à des déformations des membres inférieurs et du rachis.

L'électroneuromyographie montre des signes d'atteinte diffuse de la corne antérieure.

Les CPK sont normales ou modérément élevées voire franchement élevées faisant évoquer une myopathie. Le diagnostic moléculaire se fait par la mise en évidence de la délétion de l'exon 7 du gène SMN1. A défaut d'analyse génétique, les données cliniques et électrophysiologiques peuvent être suffisantes pour retenir le diagnostic d'amyotrophie spinale.

Référence :

- [1] : Péliissier J. Les maladies neuromusculaires. Paris: Masson. 1996.
- [2] : CAO-NaNG Thi Huyên-Trang. La consultation multidisciplinaire des maladies neuromusculaires.2000.
- [3] : Poortmans, J. R., Boisseau, N. Biochimie des activités physique. 2e Édition(2003)
- [4] : Perry, S. VRelation between chemical and contractile function and structure of the skeletal muscle cell. *Physiol Rev* . (1956) 36:1-76.
- [5] : Kolb SJ, Kissel JT. Spinal muscular atrophy: a timely review. *Arch Neurol*. (2011) 68:979-984
- [6] : Kanning, K.C., Kaplan, A., and Henderson, C.E. Motor neuron diversity in development and disease. *Annu. Rev. Neurosci*. (2010). 33, 409–440.
- [7] : Werdnig G. Two early infantile hereditary cases of progressive muscular atrophy simulating dystrophy, but on a neural basis. *Arch. psychiatr.*,1891, 22: 437-481.
- [8] : Hoffmann J. Über chronische spinale Muskelatrophie im Kindsalter, auf familiärer Basis. *Dtsch. Z. Nervenheilkd.*, 1893, 3: 427-470.
- [9] : Oppenheim H. Über allgemeine und localisierte Atonie der Muskulatur (Myatonia) im frühen Kindsalter. *Monatsschr Psychiatr Neurol* (1900) 8:232-233
- [10] : Beevor C A case of congenital spinal muscular atrophy (family type) and a case of hemorrhage into the spinal cord at birth giving similar symptoms. *Brain*. (1902) 25:85- 108
- [11] : Brandt S Werdnig-Hoffmann's infantile progressive muscular atrophy : clinical aspects, pathology, heredity and relation to Oppenheim's amyotonia congenita and other morbid conditions with laxity of joints or muscles in infants. *Ejnar Munksgaard* 1950
- [12] : Pearn JH, Carter CO, Wilson J. The genetic identity of acute infantile spinal muscular atrophy. *Brain*. 1973 96:463-470
- [13] : Gilliam TC, Brzustowicz LM, Castilla LH, Lehner T, Penchaszadeh GK, Daniels RJ, Byth BC, Knowles J, Hislop JE, Shapira Y, et al. Genetic homogeneity between acute and chronic forms of spinal muscular atrophy. *Nature* 1990. 345:823-825
- [14] : Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M, et al. (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80:155-165.
- [15] : Souchon F, Simard LR, Lebrun S, Rochette C, Lambert J, Vanasse M Clinical and genetic study of chronic (types II and III) childhood onset spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord*. 1996 6:419-424.
- [16] : Lunn MR, Wang CH. Spinal muscular atrophy. *Lancet*. 2008;371(9630):2120-2133
- [17] Chang T, Gieron-Korthals M Spinal muscular atrophy: an update. *Fetal Pediatr Pathol*. 2011 30:130-136.
- [18] : Russman BS. Spinal muscular atrophy : clinical classification and disease heterogeneity. *J. Child. Neurol*. 2007 ; 22 : 946–951.
- [19] : Prior T.W , Snyder P.J , Rink B.D , Pearl D.K, Pyatt R.E. Newborn and carrier screening for spinal muscular atrophy *Am J Med Genet A* , 2010, 152A:1605-1607

- [20] : Mostacciuolo M.L, Danieli G.A, Trevisan C. Epidemiology of spinal muscular atrophies in a sample of the Italian population *Neuroepidemiology.*, 1992, 11:34–38.
- [21] : Lyahyai J, Sbiti A, Barkat A, Ratbi I, Sefiani A Spinal muscular atrophy carrier frequency and estimated prevalence of the disease in moroccan newborns *Genet Test Mol Biomarkers*, 2012, 3(16) : 215-218
- [22] : Jaouad I.C, Elalaoui SC, Sbiti A. Consanguineous marriages in Morocco and the consequence for the incidence of autosomal recessive disorders *Genet Test Mol Biomarkers*, 2009, 13:511–513
- : Hendrickson BC, Donohoe C, Akmaev VR, Sugarman EA, Labrousse P, Boguslavskiy L et al. Differences in SMN1 allele frequencies among ethnic groups within North America. *J. Med. Genet.* 2009 ; 46 : 641–644
- [23] : Brzustowicz LM, Lehner T, Castilla LH, Penchaszadeh GK, Wilhelmsen KC, Daniels R, Davies KE, Leppert M, Ziter F, Wood D, et al. Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2-13.3. *Nature.* 1990.344:540-541.
- [24] : National Organization for Rare Disorders. Spinal Muscular Atrophy. 2012. Available at: <https://rarediseases.org/rare-diseases/#causes>. Accessed January 9, 2017
- [25] : Melki J, Lefebvre S, Burglen L, Burlet P, Clermont O, Millasseau P et al., De novo and inherited [26] : deletions of the 5q13 region in spinal muscular atrophies. *Science.* 1994 ; 264, 5164 : 1474-1477.
- Roy N, Mahadevan MS, McLean M, Shutler G, Yaraghi Z, Farahani R, Baird S, Besner-Johnston A, Lefebvre C, Kang X, et al. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell.* 1995 80:167-178.
- [27] : Biros I, Forrest S. Spinal muscular atrophy: untangling the knot? *J Med Genet.* 1999 36:1-8.
- [28] : Burglen L, Seroz T, Miniou P, Lefebvre S, Burlet P, Munnich A, Pequignot EV, Egly JM, Melki J The gene encoding p44, a subunit of the transcription factor TFIIF, is involved in large-scale deletions associated with Werdnig-Hoffmann disease. *Am J Hum Genet* 1997 60:72-79.
- [29] : Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophydetermining gene [see comment]. 1995*Cell* 80(1): 155- 165
- [30] : Burglen L, Lefebvre S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Cruaud C, Munnich A, Melki J. Structure and organization of the human survival motor neurone (SMN) gene. *Genomics.* 1996 ; 32, 3 : 479-482.
- [31] : Wirth B, Brichta L, Schrank B, Lochmüller H, Blick S, Baasner A et al. Mildly affected patients with spinal muscular atrophy are partially protected by an increased SMN2 copy number. *Hum.Genet.* 2006 ; 119 : 422–428.
- [32] : Singh, R.N., Howell, M.D., Ottesen, E.W., and Singh, N.N. (2017). Diverse role of survival motor neuron protein. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* 1860, 299–315.
- [33] : Coover D.D, Le T.T, Mc Andrew P.E, Strasswimmer J, Crawford T.O. The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*, 1997, 6(8): 1205-1214.
- [34] : Liu Q, Dreyfuss G.A. novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *Embo J.* 1996, 15: 3555-3565.

- [35] : Young P.J, Le T.T, Thi Man N. The relationship between SMN, the spinal muscular atrophy protein, and nuclear coiled bodies in differentiated tissues and cultured cells. *Exp Cell Res*, 2000, 256:365-374.
- [36] : Wirth B, Brichta L, Hahnen E. Spinal Muscular Atrophy: From Gene to Therapy. *Semin Pediatr Neurol*, 2006,13(2):121-31.
- [37] : Talbot K, Ponting CP, Theodosiou AM, Rodrigues NR, Surtees R, Mountford R, Davies KE Missense mutation clustering in the survival motor neuron gene: a role for a conserved tyrosine and glycine rich region of the protein in RNA metabolism? *Hum Mol Genet*. 1997 6 (3): 497-500
- [38] : Wirth GHJ B. An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Human Mutation*. 2000 ; 15 : 228– 237.
- [39] : Zhang Y, Huang JJ, Wang ZQ, Wang N, Value of muscle enzyme measurement in evaluating different neuromuscular diseases. Wu ZY. *Clin Chim Acta*, 2012; 413(3-4): 520-524
- [40] : Wirth B, Brichta L, Hahnen E Spinal muscular atrophy: from gene to therapy. *Semin Pediatr Neurol*. 200613(2): 121-131
- [41] : Sifi Y , Sifi K , Boulefkhad A. Clinical and genetic study of algerian patients with spinal muscular atrophy *Journal of Neurodegenerative Diseases*, 2013 ,V : 1-7
- [42] : https://police-scientifique.webnode.fr/_files/2000_00066-62a54639f2/pcr6.png
- [43] : Pires M, Marreiros H, Francisco R.C, Soudo A, Vieira J.P. Atrofia muscular espinhal análise descritiva de uma série de casos *Acta Med Port*, 2011, 24(S2): 95-102
- [44] : Belarbi S , Belaid H. Amyotrophies spinales progressive : etude Clinique et électroneuromyographique de 52 cas <http://www.jnlf.fr/data/ModuleProgramme/PageSite/2011-1/Resume/7776.asp>, consulté le 10 Octobre 2013
- [45] : udnik-Schöneborn S, Lützenrath S, Borkowska J, Karwanska A, HausmanowaPetrusiewicz I, Analysis of creatine kinase activity in 504 patients with proximal spinal muscular atrophy types I-III from the point of view of progression and severity. Zerres K. *Eur Neurol*, 1998; 39(3):154-162.