



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Projet de Fin d'Études

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

***Prédisposition génétique au cancer
lié au gène VHL***

PRESENTE PAR : SAHI Aya

ENCADRE PAR: Pr GUISSI Sanae (FST Fès)

**Dr BOUGHENOUCHE Leila (Laboratoire de génétique
et d'oncogénétique)**

SOUTENU LE : 07/06/2018

DEVANT LE JURY COMPOSE DE :

- Pr Guissi Sanae
- Pr Tlmçani Rachida
- Dr Hakoud Mohammed
- Dr Trhanint Said

Stage effectué à : Hôpital Hassan II de Fès

Année universitaire 2017-2018



REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier dans un premier temps, toute l'équipe pédagogique de la licence sciences biologiques appliquées et santé de la faculté de science et technique de Fès. Un grand respect pour nos chers professeurs de nous avoir assuré les enseignements théoriques dans des conditions favorables.

Je remercie également Pr. **Ouldim Karim** responsable de l'unité de génétique médicale et d'oncogénétique au centre hospitalier Hassan II (CHU) de Fès de m'avoir intégré au sein de son laboratoire et de m'avoir accordé toute sa confiance.

Je remercie Pr. **Guissi Sanae** pour son encadrement et sa disponibilité chaque fois que je l'ai sollicitée. A ses côtés, le travail inspire d'avantage de rigueur et d'ardeur. Permettez-moi madame, de vous exprimer à travers ce travail, toute ma gratitude pour votre compréhension et votre aide.

Je tiens à remercier tout particulièrement et à témoigner toute ma reconnaissance au Dr. **Boughenouch Leila** pour l'expérience enrichissante et pleine d'intérêt qu'elle m'a fait vivre.

Je remercie infiniment les membres de jury : **Mme Tlemçani Rachida, Dr Ahakoud Mohamed** et **Dr Trhanint Said**.

Je tiens également à remercier toute l'équipe du service pour avoir facilité mon intégration au sein de cette équipe dynamique ainsi que toutes les personnes qui ont concouru à rendre ce passage au centre agréable, et particulièrement madame **Abbasi Meryem** pour son aide dans l'acquisition des techniques de biologie moléculaire.



Dédicace :

A mes très chers Parents,

Votre remarquable bonté, votre immense tendresse et votre présence à chaque fois que j'ai besoin de vous, sans exemplaires pour cela et pour beaucoup d'autres innombrables et belles choses, je voudrais vous dire que tous les mots, toutes les phrases et même tous les textes du monde ne sauraient exprimer l'amour, le respect et la reconnaissance que j'ai pour vous.

Je voudrais vous remercier même si je sais que c'est la moindre chose que je puisse faire, et surtout remercier dieu en le priant, le suppliant et l'invoquant par grâce infinie de vous donner santé, longévité et bonheur éternel.

A ma chère sœur Meryem et mes chers frères,

Source de soutien et de tendresse, je tiens à vous remercier d'être toujours à mes côtés pendant toute mon enfance. Votre présence a été pour moi un apport capital durant mes études.

A travers ce travail, je vous exprime tout mon amour, mon affection et ma reconnaissance. Je vous souhaite la réussite dans votre vie privée et personnelle.

MERCI



Liste des abréviations :

VHL	Von Hippel Lindau
VEGF	Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
HIF	l'hypoxie
PDGF-β	Platelet derivative Growth factor.
EPO	Érythropoïétine
TGF-α	Transforming Growth Factor
EGF-R	Récepteur Epidermal Growth factor
IRM	Scanner hypersignal en T2
MIBG	scintigraphie au Métaiodobenzylguanidine
CCR	Carcinome à cellule rénale
BET	Bromure d'éthidium

Liste des tableaux :

Tableau 1	La répartition des différents types d'atteintes du gène VHL en fonction de la fréquence et de l'âge moyen de survenue
Tableau 2	Comparaison des caractéristiques des tumeurs du rein dans la maladie de Von Hippel-Lindau et dans les formes sporadiques
Tableau 3	Mélange réactionnel pour chaque gène pour volume totale de 25 μ l
Tableau 4	Programme de cycle de température au niveau du Thermocycleur (Applied Biosystème)
Tableau 5	Programme de Thermocycleur pour la purification de ExoSAP.
Tableau 6	La réparation du fluorochrome accepteur par les différents ddNTPs
Tableau 7	Données cliniques chez les patients de VHL
Tableau 8	températures optimales d'hybridations (théoriques et calculés) des amorces (F et R)
Tableau 9	Les différentes mutations de gène VHL



Liste des figures :

Figure 1 Hémangioblastome kystique du cervelet chez une patiente de 40 ans, déjà opérée à cinq reprises d'hémangioblastomes du SNC

Figure 2 Hémangioblastome radiculaire L3 chez une patiente de 44 ans, déjà opérée à trois reprises d'hémangioblastomes spinaux. (IRM T1 Gadolinium).

Figure 3 C : Hémangioblastome rachidien (IRM) (Richard et al., 2005).
D : Hémangioblastome rétinien (angiographie) (Richard et al., 2005).

Figure 4 Localisation du gène VHL en position 3p25-26.

Figure 5 Schéma du gène VHL et de la protéine pVHL.

Figure 6 Arbre généalogique de la famille étudiée atteinte de VHL.

Figure 7 Répartition selon l'âge de VHL

Figure 8 Répartition selon le sexe de VHL

Figure 9 Répartition selon les atteintes de VHL

Figure 10 Électrophorèse en gel d'agarose 2% des produits d'amplification par PCR avec les amorces à partir de l'ADN génomique de l'exon 1

Figure 11 Électrophorèse en gel d'agarose 2% des produits d'amplification par PCR avec les amorces à partir de l'ADN génomique de l'exon 2

Figure 12 Électrophorèse en gel d'agarose 2% des produits d'amplification par PCR avec les amorces à partir de l'ADN génomique de l'exon 3

Figure 13 chromatogramme de la séquence partielle de l'exon 1 du gène VHL

Figure 14 chromatogramme de la séquence partielle de l'exon 2 du gène VHL

Figure 15 chromatogramme de la séquence partielle de l'exon 3 du gène VHL

Figure 16 Résultat du Blast montrant l'alignement des séquences de l'exon 1

Figure 17 Résultat du Blast montrant l'alignement des séquences de l'exon 2

Figure 18 Résultat du Blast montrant l'alignement des séquences de l'exon 3



SOMMAIRE :

Liste des tableaux

Liste des figures

Abréviations et définitions

Introduction générale 7

PRESENTATION GENERALE 9

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 10

I. Généralités 11

II. Épidémiologie 11

III. Physiopathologie de la maladie de Von Hippel Lindau 11

IV. Aspect clinique 14

V. Traitement de la maladie 18

MATERIEL ET METHODES 21

I. Matériel 22

II. Méthodes 22

1-Prélèvements 22

2-Techniques de préparation et de purification des acides 22

2.1-Par sel 22

2.2-Par kit 23

3-Dosage de l'ADN 24

4-Amplification des séquences nucléotidiques par PCR 24

4.1-Principe 24

4.2-Condition de PCR 24

4.3-Témoin de la réaction PCR 26

4.4-Contrôle des produits PCR 26

4.5-Séquençages d'ADN 26



4.5.1-Purification par ExoSAP	26
4.5.2-Réaction de séquençage par BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing	27
4.5.3-Purification de la réaction de séquence avec le Kit BigDye –XTerminator	28
4.5.4-Détermination de la séquence	28
RESULTATS ET DISCUSSION	29
I-Évaluation clinique	30
II-Mise au point et optimisation de la spécificité de la réaction PCR	31
1-Condition de température optimale d'appariement pour les amorces	32
2-Concentration d'ADN	33
3-Concentration des dNTPs	33
4-Séquençage du gène VHL	35
CONCLUSION	39
Annexe 1 : lyse des hématies TE 20/5 :10	40
Annexe 2 : lyse des globules blancs	40
Annexe 3 : préparation de protéinase K	40
Annexes 4: Solution de conservation de la méduse d'ADN 200ml TE 10/1	41
Annexes 5 : BET à 10mg/ml	41
Annexes 6 : Gel d'agarose à 2%	42
Annexes : Tampon de charge	42
Référence	43



INTRODUCTION GENERALE

Le cancer est une maladie génétique de la cellule, considéré comme un dogme que les vingt dernières années de recherche n'ont cessé de vérifier. En effet, la transformation tumorale d'une cellule est un processus clonal, procédant par des étapes successives constituées en général, de mutations. Ces dernières peuvent être activatrices, conduisant à une hyperactivité de la protéine correspondante, à une amplification génique, à son expression constitutive (mutation faux-sens) ou à la création d'une nouvelle protéine (fusion génique). La mutation d'un seul allèle suffit à conférer un avantage sélectif à la cellule dont le gène cible de cette mutation est un gène «oncogène».

À l'inverse, il peut s'agir de mutations inactivatrices (codon stop, insertion ou délétion de quelques nucléotides, anomalies d'épissage, faux-sens, réarrangements de grande taille du gène, etc.). Ces mutations sont dans la majorité des cas, associées à une inactivation du second allèle tumoral, le plus souvent par perte de la région chromosomique contenant le gène en question. D'autres gènes mis en évidence par la recherche parle de la régulation négatif de la prolifération cellulaire se traduisent par une perte d'hétérozygotie et sont nommés gènes suppresseur de tumeur. L'acquisition de mutations dans les gènes oncogènes ou suppresseurs de tumeur peut être secondaire aux erreurs de réplication de l'ADN survenant lors de chaque division cellulaire et elle est naturellement favorisée par l'exposition de la cellule aux agents mutagènes. On comprend ainsi, que des mutations dans les gènes de réparation de l'ADN, mais aussi dans les gènes impliqués dans la stabilité des chromosomes, aient également un rôle clé, bien qu'indirect, dans le processus tumoral, en augmentant le taux de mutations dans les gènes oncogènes ou suppresseurs de tumeurs, et donc la probabilité de voir émerger un processus tumoral ^[1].

Les études conduites au cours de ces 30 dernières années ont constitué un apport majeur pour la compréhension de la transformation tumorale avec un domaine nouveau de la génétique, qui est l'étude des prédispositions aux cancers. En effet, les situations les plus simples de prédisposition ont été identifiées monogéniques et au risque tumoral élevé et des phénotypes associés. Aujourd'hui, plus de 70 gènes ont été identifiés et une grande partie d'entre eux font l'objet de tests génétiques. Les efforts sont à poursuivre pour identifier les facteurs génétiques et non génétiques modificateurs des risques tumoraux. Ce domaine a pu permettre l'étude des facteurs de susceptibilité qui, associés à des risques plus faibles et dont la combinaison et l'interaction avec des facteurs d'environnement pourrait conduire à des risques individuels élevés (prédisposition multifactorielle). Les progrès de la recherche d'un nouveau domaine sont ouverts : celui de la part constitutionnelle de l'hôte dans le pronostic tumoral et dans la réponse aux traitements.

En se basant sur ces travaux, notre projet s'inscrit dans un nouveau cadre qui est la prédisposition génétique liée au gène VHL responsables de la maladie de Von Hippel-Lindau. Cette maladie est une prédisposition héréditaire au développement de tumeurs bénignes et



malignes richement vascularisées et qui est due à des mutations germinales du gène suppresseur de tumeur *VHL*.

Ce gène possède un rôle fondamental dans l'angiogénèse et plus généralement dans la réponse tissulaire à l'hypoxie. Des altérations acquises du gène *VHL* sont également à l'origine de la majorité des cancers du rein à cellules claires sporadiques et d'une partie des hémangioblastomes sporadiques.

La description du spectre des mutations constitutionnelles de ce gène devrait permettre une meilleure compréhension de la pathogénie de cette phacomatose méconnue.



I. Présentation générale :

Le centre hospitalier universitaire Hassan II de Fès a été réalisé de nature à promouvoir un nouveau pôle sanitaire et médical au service du développement régional, à réduire la pression sur les unités hospitalières de rabat et Casablanca et à croître les capacités universitaires régionales. L'ouverture de cette infrastructure sanitaire moderne contribue à la fois à l'amélioration des services médicaux fournis à la population et à la promotion de la recherche scientifique dans ce domaine.

Ce complexe hospitalo-universitaire est construit sur une superficie de 120000 m², dont 78102m² couverts, il comprend un hôpital des spécialités, un hôpital Mère-enfant, un bloc opératoire, une salle de diagnostic, un pavillon de consultations externes et un laboratoire central qui comprend 7 services qui se répartissent de la manière suivantes :

- ✓ Rez-de-chaussée : service de biochimie de toxicologie et de pharmacologie.
- ✓ Premier étage : service de bactériologie de sérologie et d'hématologie.
- ✓ Deuxième étage : service de génétique médicale, d'oncogénétique et d'anatomopathologie.

L'unité de génétique médicale et d'oncogénétique, représente une première expérience dans un CHU au MAROC, elle est activement mise en place depuis sa création en mars 2009. Il est constitué de plusieurs unités permettant le bon déroulement et l'exécution des examens tout en respectant l'organisation du travail au sein du service.

L'unité de génétique médicale et d'oncogénétique est subdivisé en trois disciplines (clinique, cytogénétique et moléculaire). Elle assure des activités variées qui comprennent :

- 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 (analyses de chromosomes)
 - Cytogénétique classique (caryotype)
 - Cytogénétique moléculaire (FISH : Hybridation In Situ en Fluorescence)
 - Génétique moléculaire (analyse des gènes)
 - Amplification de gène par PCR.



Synthèse bibliographique



II. Synthèse bibliographique :

1. Généralités :

La maladie de Von Hippel-Lindau est une prédisposition héréditaire au développement de tumeurs bénignes et malignes richement vascularisées qui est due à des mutations germinales du gène suppresseur de tumeur *VHL*. En effet les manifestations cliniques majeures comprennent des hémangioblastomes du SNC et de la rétine, des tumeurs du sac endolymphatique, des cancers à cellules claires et des kystes rénaux des phéochromocytomes, des kystes et des tumeurs endocrines du pancréas.

En quelques années, la maladie était surtout connue pour l'atteinte de la rétine (décrite par Eugen Von Hippel en 1895) et du névraxe (identifiée par Arvid Lindau en 1926) et les lésions viscérales de l'affection étaient sous-estimées (en dépit de leur parfaite description par Lindau)^[2]. Elles sont maintenant au premier plan de l'affection et responsables de la maladie de Von Hippel-Lindau. Dernièrement, des progrès considérables ont été réalisés dans la caractérisation fonctionnelle du gène *VHL* dont le rôle est fondamental dans l'angiogénèse et plus généralement la réponse tissulaire à l'hypoxie. Ainsi, des altérations acquises du gène *VHL* sont également à l'origine de la majorité des cancers du rein à cellules claires sporadiques et d'une partie des hémangioblastomes sporadiques. Ces découvertes majeures ont ouvert la voie au développement de nouvelles approches thérapeutiques qui pourraient avoir également des applications en cancérologie.

2. Épidémiologie :

La prévalence est estimée à 1/53 000, l'incidence annuelle à la naissance à 1/36 000 et la transmission est autosomique dominante^[3]. Un conseil génétique devrait être proposé aux patients et aux familles.

3. Physiopathologie de la maladie de Von Hippel Lindau :

Le gène *VHL* est un gène suppresseur de tumeur et le développement d'une tumeur nécessite donc l'inactivation successive des deux copies du gène. Les patients porteurs de la maladie de VHL ont une mutation d'origine germinale dans toutes leurs cellules et une seule mutation somatique dans les tissus cibles est suffisante pour le développement des tumeurs : celles-ci sont en général multiples et apparaissent précocement. Chez les patients qui présentent une tumeur sporadique (non héréditaire), les deux mutations du gène *VHL* sont au contraire nécessairement somatiques et les tumeurs sont en général uniques et surviennent à un âge plus avancé. Les étapes de la tumorigénèse commencent à être comprises pour les deux tumeurs principales de la maladie de VHL qui sont l'hémangioblastomes et les kystes et les cancers rénaux)^[4].

En effet, pour la première tumeur qui est l'hémangioblastome, les études de microdissection laser ont montré que les cellules stromales étaient les véritables cellules tumorales et étaient responsables du développement secondaire des vaisseaux sanguins. Très



récemment, il a été suggéré que les cellules stromales dériveraient de précurseurs mésenchymateux angioformateurs bloqués au stade de maturation ; on témoignerait aussi la présence de récepteurs à l'EPO) ^[5].

L'inactivation du gène VHL entraîne l'accumulation de HIF et la surexpression de ses gènes cibles. Ainsi, le VEGF stimule la prolifération des cellules endothéliales et le PDGF- β agit sur les péricytes, aboutissant au développement de néocapillaires sanguins. Comme le VEGF est également le facteur de perméabilité vasculaire, sa surexpression expliquerait aussi la survenue des kystes. En effet, la production anormale de l'EPO par les cellules stromales est responsable de la polyglobulie secondaire qui accompagne certains hémangioblastomes du cervelet. Enfin, le TGF- α et son récepteur (EGF-R), sont également surexprimés par les cellules stromales et suggèrent l'existence d'une boucle autocrine stimulant leur prolifération ^[4].

La deuxième tumeur est les Kystes et les cancers rénaux, dans ce cas le problème est plus complexe car les patients peuvent développer des kystes bénins, des kystes atypiques et de véritables cancers. Les cellules épithéliales bordant les kystes bénins présentent déjà une inactivation des deux copies du gène VHL et des altérations génétiques supplémentaires sont certainement requises pour la transformation maligne, comme le laissent présager les nombreux remaniements chromosomiques observés dans les cancers rénaux ^[6]. Les cellules épithéliales rénales sont très sensibles aux effets mitogènes du TGF- α dont la surexpression expliquerait le développement des kystes en conjonction avec des anomalies dans l'assemblage de la matrice extracellulaire. Après, la transformation maligne des cellules, la production anormale de VEGF et PDGF β serait responsable, comme pour les hémangioblastomes, du développement important de la vascularisation ^[4].

Tableau 1: La répartition des différents types d'atteintes du gène VHL en fonction de la fréquence et de l'âge moyen de survenue

Atteinte	Fréquence (%)	Age moyen de survenue (années)
Angiomatose rétinien	> 55	25
Hémangioblastome cérébelleux	35-55	29
Cancer du rein	25-30	39-44
Kystes rénaux	20	44
Phéochromocytome	10 à 20	27
Hémangioblastome Médullaire	10 à 15	30
Kystes pancréatiques	10 à 15	37



- **Mutations germinales et corrélations génotype-phénotype :**

Les mutations germinales du gène *VHL* sont maintenant identifiées chez près de 100 % des patients^[7]. Plus de 160 mutations distinctes dans 500 familles ont déjà été rapportées. La majorité des mutations correspondent à des mutations ponctuelles incluant des mutations faux-sens (entraînant une substitution d'acide aminé), des mutations non-sens (codon stop), des micro-insertions ou des micro-délétions aboutissant à la synthèse d'une protéine tronquée^[8]. Dans 30 % des cas, il s'agit de délétions étendues du gène *VHL*, responsables d'une absence totale de *pVHL*.

L'étude des corrélations génotype-phénotype a confirmé la distinction clinique basée sur le phéochromocytome (**tableau 1**). Le risque minime de phéochromocytome est quand la majorité des mutations aboutissent à la production d'une protéine tronquée. Ainsi, le risque élevé de phéochromocytome est quand la majorité des mutations correspondent à une substitution d'acide aminé (protéine de longueur normale mais non fonctionnelle). On distingue trois types :

✓ **Le type 2B** : est associé à un risque élevé de cancer rénal et de tumeur endocrine du pancréas et les mutations responsables touchent la région du contact entre la pVHL et l'élongine C avec un « hot-spot » au codon 167^{[6], [8]}.

✓ **Le type 2A** : est associé à un risque faible de cancer rénal et de tumeur pancréatique et il est dû à un effet fondateur survenu en Allemagne au 16^e siècle : la mutation touche le codon 98 et empêcherait la fixation de HIF à la pVHL^[9].

✓ **le type 2C** : est caractérisé par la survenue de phéochromocytomes isolés et la mutation la plus caractéristique (codon 188) conserve la capacité de dégrader HIF, suggérant un autre mécanisme pour le développement tumoral^[10].

Par ailleurs, l'existence de gènes modificateurs à l'origine de l'hétérogénéité phénotypique intrafamiliale est suspectée mais demande à être précisée^[11].

- **Gène *VHL* et tumeurs sporadiques**

L'inactivation du gène *VHL* (par mutation ou hyperméthylation du gène) est habituelle dans les cancers du rein à cellules claires sporadiques (jusqu'à 75 %) et les hémangioblastomes sporadiques (environ 40 %)^{[6], [12]}. En effet, dans le cancer rénal, des mutations spécifiques du gène *VHL* ont été décrites chez les patients ayant présenté une exposition professionnelle à forte dose au trichloréthylène. Des mutations somatiques ont été mises en évidence dans les tumeurs du sac endolymphatique sporadiques mais elles sont en revanche très rares dans les phéochromocytomes.



Tableau 2 Comparaison des caractéristiques des tumeurs du rein dans la maladie de Von Hippel-Lindau et dans les formes sporadiques.

	Von Hippel-Lindau	Forme sporadique
Age au diagnostic	39 ± 10 ans	61 ans
Bilatéralité	60 - 75%	1 - 2%
Multifocalité	> 60%	7 - 20%

4. Aspect clinique :(une maladie à impact tissulaire multiple)

La maladie de VHL est une affection autosomique dominante dont l'incidence à la naissance est d'environ 1 sur 36 000 et la pénétrance est quasi complète à 60 ans. Ainsi, elle se révèle en général entre 18 et 30 ans mais peut aussi se manifester dès l'enfance (*tableau 2*). Il existe le plus souvent une histoire familiale démonstrative et le diagnostic clinique requiert la présence d'une seule manifestation majeure. Les formes « cryptiques » dues à des néomutations sont estimées à 20 % et le diagnostic clinique nécessite alors la présence d'au moins deux lésions majeures dont un hémangioblastome. Dans une même famille, il existe également une hétérogénéité phénotypique, certains patients souffrant d'une forme grave avec de multiples tumeurs nécessitant des interventions répétées tandis que d'autres ont seulement un petit nombre de lésions sans retentissement clinique. Ceci peut expliquer les différentes mutations en cas de la maladie de Von Hippel Lindau :

- **L'hémangioblastome du SNC** est la manifestation la plus emblématique de la maladie de VHL^{[13], [14]}. Il s'observe chez 60 à 80 % des patients et révèle l'affection dans près de la moitié des cas (*figures 1*). Il s'agit d'une tumeur vasculaire bénigne constituée de cellules tumorales au cytoplasme clarifié « cellules stromales » séparées par un abondant réseau capillaire sanguin. Les hémangioblastomes sont souvent multiples et se développent avec prédilection dans la fosse postérieure (cervelet et tronc cérébral) et le cordon médullaire, les localisations sustentorielles étant très rares. En IRM, les hémangioblastomes sont bien mis en évidence sur les séquences T1 après injection de gadolinium et s'accompagnent souvent d'un kyste parfois volumineux. Une cavitation centromédullaire est fréquente dans les localisations spinales. Les localisations infratentorielles sont responsables d'hypertension intracrânienne et de syndrome cérébelleux. En effet, les hémangioblastomes spinaux s'accompagnent de paresthésies ou de douleurs radiculaires et peuvent se compliquer de paralysies. La classique polyglobulie secondaire s'observe dans environ 20 % des hémangioblastomes cérébelleux et est due à une production d'érythropoïétine par la tumeur. La grossesse peut s'accompagner de l'apparition d'un kyste ou de l'augmentation rapide de volume d'un kyste préexistant, parfois à l'origine de complications dramatiques.

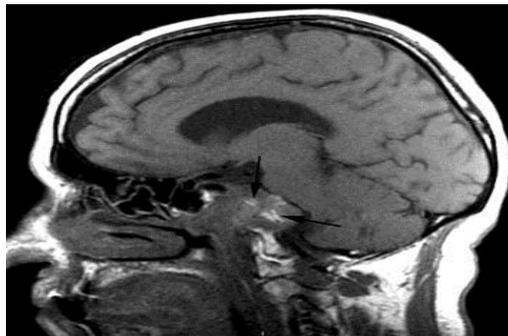


Figure1 : Hémangioblastome kystique du cervelet chez une patiente de 40 ans, déjà opérée à cinq reprises d'hémangioblastomes du SNC. (IRM T1 Gadolinium).

▪ **La tumeur du sac endolymphatique** est un adénocarcinome papillaire de bas grade, parfois bilatéral, affectant jusqu'à 11 % des patients ^{[7], [9], [13]}. Sa fréquence est peut-être sous-estimée en raison de l'absence d'IRM systématique centrée sur les rochers. Les tumeurs du sac endolymphatique se développent dans l'angle ponto-cérébelleux ou vers l'oreille moyenne en érodant ou détruisant le temporal. En imagerie (scanner et IRM), il s'agit d'une lésion destructrice centrée sur la région rétro labyrinthique, fortement rehaussée après injection de produit de contraste. Ainsi, les symptômes sont essentiellement otologiques (acouphènes, vertiges, perte d'audition progressive ou brusque).



Figure 2 : Hémangioblastome radiculaire L3 chez une patiente de 44 ans, déjà opérée à trois reprises d'hémangioblastomes spinaux. (IRM T1 Gadolinium).

▪ **Les hémangioblastomes rétiens** surviennent chez la moitié des patients et révèlent l'affection une fois sur trois, souvent dans l'enfance ^[16]. Il s'agit de tumeurs rougeâtres situées le plus souvent en périphérie rétinienne avec une artère nourricière tortueuse et une veine de drainage, toutes deux dilatées. Les lésions sont souvent multiples et bilatérales et leur taille peut atteindre plusieurs diamètres papillaires. Les localisations papillaires sont observées dans 15 % des cas. En l'absence de découverte et de traitement précoce, les hémangioblastomes rétiens peuvent se compliquer de décollement rétinien, d'hémorragies



et de glaucome pouvant conduire à la perte de la vision. Le diagnostic est fait par l'examen du fond d'œil et l'angiographie à la fluorescéine (figure 3).

- **Le cancer du rein à cellules claires** représente actuellement une complication majeure de la maladie de VHL. Il s'observe chez un patient sur deux et est devenu la principale cause de décès^[17]. Il est souvent bilatéral et multicentrique et se révèle 20 ans plus tôt que le cancer du rein sporadique. La majorité des tumeurs rénales sont asymptomatiques et sont découvertes lors des explorations radiologiques, trop souvent à un stade avancé. En effet, les kystes rénaux bénins s'observent également et leur possible transformation cancéreuse est encore discutée.

- **Le phéochromocytome** touche de 10 à 25 % des patients et se voit essentiellement dans certaines familles^[18]. Le phéochromocytome est souvent bilatéral mais rarement malin. Il peut entraîner des palpitations, des sueurs, des céphalées, et de l'hypertension artérielle en relation avec la production de catécholamines.

- **L'atteinte pancréatique** consiste le plus souvent en kystes multiples ou cystadénomes séreux bénins, s'accompagnant de calcifications, observés chez 70 % des patients et n'entraînant pratiquement jamais de retentissement clinique^[19]. L'échographie et le scanner sont les examens de choix pour leur diagnostic.

- **Les tumeurs neuroendocrines TNE** sont souvent multifocales, sont présentes chez 12 % des patients et présentent un réel potentiel malin. Leur diagnostic suspecté sur l'imagerie de routine est affirmé par l'échoendoscopie et la scintigraphie à l'octroïde marqué.

- **Les cystadénomes papillaires de l'épididyme** surviennent chez la moitié des hommes affectés par la maladie de VHL et sont souvent bilatéraux^[20]. Ils sont non spécifiques, généralement asymptomatiques et décelés à l'examen clinique ou à l'échographie. Lorsque les kystes sont volumineux et bilatéraux, ils peuvent occasionner un gêne mécanique et être responsable d'une baisse de la fertilité.

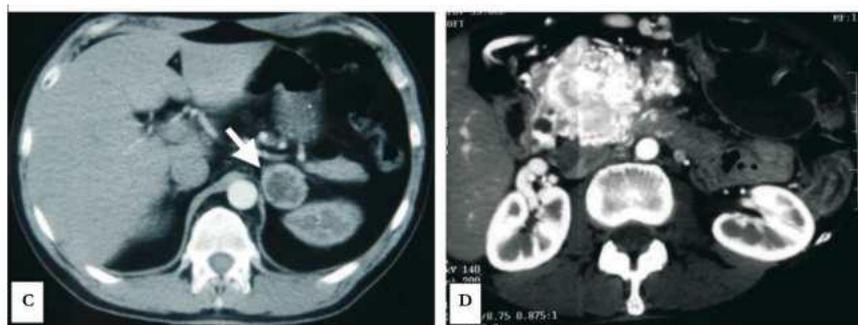


Figure 3 C : Hémangioblastome rachidien (IRM) (Richard et al., 2005).

D : Hémangioblastome rétinien (angiographie) (Richard et al., 2005).

- **Les cystadénomes du ligament large** semblables histologiquement et sont observés de manière très rare chez les patientes et le diagnostic est fait par l'échographie et le scanner^[21].



- Progrès génétiques :

Le gène *VHL* a été identifié en 1993 et des progrès majeurs ont été faits dans les cinq dernières années dans la compréhension de ses fonctions. Il apparaît maintenant comme un gène essentiel aux fonctions multiples, dont le nombre total de gènes cibles pourrait être de plusieurs centaines.

- Rôle du gène *VHL* dans la réponse tissulaire à l'hypoxie :

Le gène *VHL* est situé sur la partie distale du bras court du chromosome 3 (3p25-26). Il est composé de trois exons codant une protéine de 213 acides aminés (pVHL) exprimée dans tous les tissus et localisée majoritairement dans le cytosol (figure 4). La pVHL fait partie d'un complexe multiprotéique, comprenant également les élongines B et C et la culline 2, qui est impliquée dans la dégradation des protéines cellulaires.

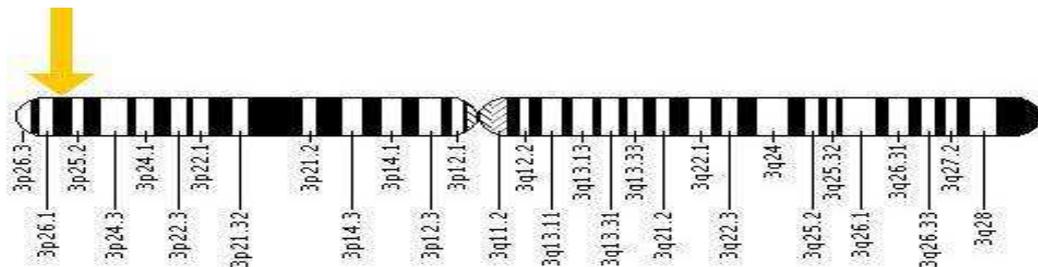


Figure4 : Localisation du gène *VHL* en position 3p25-26.

Une des caractéristiques des tumeurs associées à la maladie de *VHL* est l'hypervascularisation qui résulte en grande partie de la surexpression du facteur de croissance vasculaire VEGF. Il fut d'abord montré que la pVHL régulait négativement le VEGF puis d'autres gènes inductibles par l'hypoxie comme l'érythropoïétine (EPO), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF- β), le facteur de croissance transformant α (TGF- α), le transporteur du glucose Glut-1 et un grand nombre d'autres gènes aux fonctions variées.

Le mécanisme de cette fonction est maintenant en grande partie élucidé^[6] dont HIF joue un rôle critique dans la réponse tissulaire à l'hypoxie et est responsable de l'activation de plus de 40 gènes cibles impliqués dans l'angiogénèse, le métabolisme ou l'apoptose.

En effet, HIF est composé d'une sous-unité α cytosolique, rapidement dégradée dans le protéasome en normoxie grâce à la pVHL, et d'une sous-unité β nucléaire. En situation d'hypoxie, la sous-unité α est au contraire stabilisée et passe dans le noyau où elle se conjugue à la sous-unité β . L'hétérodimère formé par les deux sous-unités se fixe ensuite sur des séquences d'ADN spécifiques des gènes cibles pour activer leur transcription.



La pVHL possède d'autres fonctions indépendantes du facteur HIF et le nombre de ses gènes cibles s'accroît régulièrement. Il est ainsi impliqué notamment dans la régulation du cycle cellulaire, la différenciation et la polarité cellulaire, l'inhibition de contact des cellules cancéreuses et l'assemblage de la matrice extracellulaire ^[6] (figure 5) .

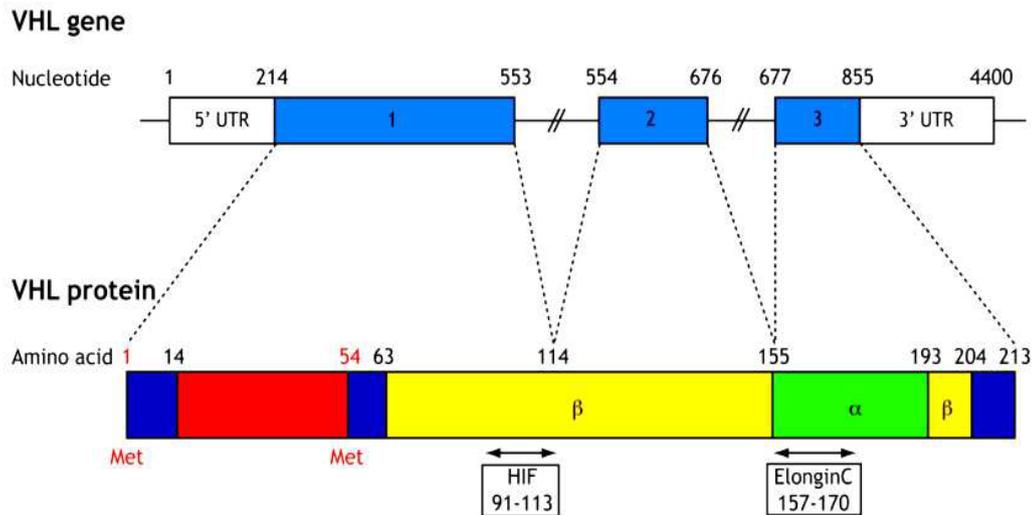


Figure 5: Schéma du gène VHL et de la protéine pVHL.

5-Traitement de la maladie :

La maladie de VHL est une affection qui peut être grave et menacer la vie des patients mais la plupart des tumeurs sont accessibles à un traitement efficace, sous réserve d'un diagnostic précoce et d'une prise en charge multidisciplinaire. En effet, le diagnostic devrait être facilement évoqué chez un patient porteur de manifestations cliniques typiques même en l'absence d'histoire familiale. L'expérience quotidienne montre que ce n'est pas toujours le cas et que le diagnostic est fréquemment tardif. Ainsi, la mise en évidence d'une mutation germinale du gène *VHL* apparaît ainsi essentielle pour un diagnostic précoce et proposer ensuite un dépistage présymptomatique chez les personnes à risque de l'entourage familial. Conformément à la législation et aux règles éthiques, la mise en œuvre d'un test génétique nécessite une consultation spécialisée avec un généticien et le recueil du consentement éclairé avant toute analyse.

-Mutations germinales chez les patients avec tumeur apparemment sporadique :

Un problème crucial est de ne pas méconnaître une maladie de VHL devant une tumeur apparemment isolée. L'indication d'un test génétique apparaît ainsi très souhaitable chez les patients présentant l'une des tumeurs pouvant faire partie de la maladie de VHL.

En premier lieu, on cite les hémangioblastomes rétiens qui sont quasi-pathognomoniques de la maladie de VHL et la recherche d'une maladie de VHL devrait être



la règle dans tous les cas. Pour les autres tumeurs, le test génétique est recommandé en cas de révélation précoce ou de lésions multiples. Ainsi, les tumeurs du sac endolymphatique sont associées dans 20 % des cas à une maladie de VHL mais ce pourcentage est sans doute sous-estimé en l'absence d'étude génétique systématique. En deuxième lieu, la fréquence des prédispositions héréditaires est de 24 % chez les patients porteurs de phéochromocytome et une mutation du gène *VHL* est en cause dans près de la moitié des cas. Enfin, pour le cancer rénal à cellules claires la proportion de patients avec maladie de VHL est estimée à moins de 2 %.

-Diagnostic présymptomatique chez les personnes à risque :

Lorsque la mutation causale du gène *VHL* est identifiée chez un patient, un diagnostic présymptomatique peut être proposé aux membres à risque de la famille^[18]. Le test génétique est actuellement proposé à partir de l'âge de 4 ou 5 ans en France, aucune manifestation clinique de la maladie n'ayant été observée avant cet âge dans les familles suivies par le Groupe d'Étude Francophone de la maladie de VHL (GEFVHL). Ce test a transformé la prise en charge des familles en permettant de proposer une surveillance clinique aux seuls porteurs d'un gène muté et de rassurer définitivement les personnes indemnes.

-Possibilités thérapeutiques actuelles :

Les découvertes actuelles ont mis en évidence des possibilités thérapeutiques pour chaque mutation:

- **Les hémangioblastomes du SNC** nécessitent une intervention neurochirurgicale à un moment ou à un autre chez la majorité des patients, souvent dans un contexte d'urgence. Le caractère multiple des tumeurs et les possibles localisations inextirpables expliquent que les hémangioblastomes du SNC restent encore une cause importante de décès. L'embolisation préopératoire peut s'avérer utile dans certaines circonstances pour éviter un saignement opératoire excessif. La radiochirurgie stéréotaxique est apparue récemment comme une alternative possible à la chirurgie qui permettrait de contrôler la majorité des hémangioblastomes cérébelleux inférieurs à 3 cm. Cette méthode permet aussi de traiter plusieurs lésions en une seule séance mais ne prévient pas la formation éventuelle de kystes et des interventions complémentaires peuvent être nécessaires.
- **Les tumeurs du sac endolymphatique** sont traitées chirurgicalement et une intervention précoce est souhaitable pour éviter la perte de l'audition. Une embolisation préopératoire est parfois réalisée pour limiter le saignement de ces tumeurs particulièrement vascularisées mais l'exérèse complète de tumeurs localement avancées s'avère rarement possible.
- **Les hémangioblastomes rétiniens** sont traités par photocoagulation laser pour les tumeurs de petite taille ou cryothérapie quand les lésions font plus de 3 mm^[7]. Une



chirurgie vitréo-rétinienne est parfois nécessaire dans le cas de lésions évoluées. Le traitement précoce n'évite pas toujours la baisse de la vision et l'énucléation est parfois inévitable en cas d'œil non fonctionnel douloureux.

- **Le cancer rénal** représente actuellement le problème le plus délicat en raison de la multiplicité fréquente des tumeurs nécessitant des interventions répétées ^[7]. Chaque fois qu'elle est réalisable, la chirurgie conservatrice est recommandée et les tumeurs solides sont enlevées à partir d'une taille de 3cm ainsi que les kystes atypiques. Elle apparaît comme la meilleure solution pour préserver la fonction rénale tout en minimisant le risque de dissémination et les grandes équipes en ont maintenant une expérience de plus de 10 ans.
- **Les phéochromocytomes** sont traités chirurgicalement, par coelioscopie quand les tumeurs ne sont pas trop volumineuses ^[7]. Une surrénalectomie partielle quand elle est possible est précieuse pour préserver la fonction corticosurrénalienne et la qualité de vie.
- **Les TNE du pancréas** nécessitent une exérèse chirurgicale lorsque leur taille dépasse 2 à 3 cm afin d'éviter un envahissement locorégional et le risque de métastases à distance ^[20]. Les kystes ne justifient aucun geste chirurgical mais un drainage percutané ou la mise en place d'un sent biliaire est indiquée lors de compression mécanique.

La chirurgie est aussi indiquée pour les kystes symptomatiques de l'épididyme et les lésions volumineuses du ligament large.



Matériel et méthodes :



I. Matériel :

Patients :

Dans ce travail, le recrutement des patients présentant des symptômes cliniques pour la maladie VHL sont adressés aux différents services du centre hospitalier Hassan II Fès comme suit :

Les patients présentant les mutations d'hémangioblastomes du système nerveux central sont adressés au service de neurochirurgie.

Les patients présentant les mutations du sac endolymphatique sont adressés au service de l'urologie. D'autres services peuvent aussi être impliqués comme celui de la neuroradiologie.

II. Méthodes :

1. Prélèvement :

Avant tout prélèvement, une fiche portant les renseignements, l'accord et le consentement de l'intéressé est obligatoire.

Un prélèvement de sang est ensuite réalisé dans deux tubes EDTA chacun de 5ml en vue d'une extraction d'ADN par kit et par sel. Les tubes peuvent être conservés à 4°C ou à -20°C pour une utilisation ultérieure.

2. Techniques de préparation et de purification des acides nucléique

L'extraction d'ADN (acide désoxyribonucléique) est une technique qui isole de l'ADN à partir d'une cellule en quantité et en qualité suffisante pour permettre son analyse.

Au niveau de laboratoire de génétique et d'oncogénétique, l'extraction se fait selon deux méthodes : soit par sel ou par kit commercialisé (in vitrogène).

2.1 Par sel :

Pour 10ml du sang complet, une décongélation est réalisée toute la nuit à 4°C. Le sang est ensuite dilué au 1/3 dans du TE 20/5(20 ml) (Tris-HCL 20Mm à ph 7,6 et EDTA 5mM à ph 8). L'échantillon est laissé 20min dans la glace puis centrifugé pendant 5min à 2500 tr/min, A la fin de la centrifugation, le surnageant est prélevé. Cette dernière étape est répétée 2 à 5 fois au maximum, jusqu'à l'obtention d'un culot clair qui montre l'absence de trace de globule rouge.

Le culot est resuspendu dans 3ml de tampon de lyse des globules blancs. Ensuite 100ul de la protéinase K sont ajoutés et une incubation à 42°C durant toute la nuit sous agitation douce est réalisée. Le lendemain 4ml H₂O stérile et 4ml NaCl 5 M sont ajoutés. L'ensemble est bien mélangé et puis centrifugé à 3000tr/min pendant 30min. Ensuite, le surnageant est repris dans un nouveau tube de 50 ml et 2 volumes d'éthanol absolu froid sont ajoutés au surnageant. L'éthanol absolu est ajouté pour le lavage et enfin, la méduse est séchée puis dissoute dans 500ul de TE 10/1.



2.2 Par kit :

Dans un tube stérile de 50ml, les billes magnétiques sont ajoutées et resuspendues par le vortex dans le tampon de lyse (L13). Les billes sont mélangées en tourbillonnant doucement le tube jusqu'à ce que ces dernières soient bien distribuées.

L'incubation se fait à température ambiante pendant 5 minutes pour permettre à l'ADN de se lier aux billes. Pendant l'incubation, le tube est agité doucement de temps en temps. Après, le tube de 50ml est placé sur le Support de Séparateur Magnétique, le surnageant est éliminé soigneusement en utilisant une pipette de 5ml sans toucher les billes. Après, le tube est enlevé du Séparateur Magnétique et 5 ml du tampon de lyse (L13) sont ajoutés au tube sans tenir compte du volume du sang. Le tube est inversé doucement 3 fois pour bien mélanger les billes et enlever les contaminations résiduelles par lavage. Enfin, une incubation à température ambiante pendant 30 secondes est réalisée et le tube est placé sur le Séparateur Magnétique pendant 20 secondes, après le surnageant est éliminé en utilisation une pipette de 5ml sans toucher les billes.

L'étape suivante est la digestion par la protéase, après l'addition du tampon de protéase et la protéase, le tube est vortexé pour disperser les billes (30 secondes).

L'incubation du tube est réalisée à 65°C pendant 10 minutes et ensuite à température ambiante (10-20minutes).

La troisième étape consiste en le lavage de l'ADN par l'ajout d'isopropanol (IPA) 100% au tube. Ce dernier est mélangé en l'inversant doucement jusqu'à l'apparition d'une forme d'agrégation visible, les échantillons sont ensuite placés sur le Séparateur magnétiques pendant 30secondes à une minute. Le surnageant est éliminé en utilisant une pipette de 5 ml sans toucher les billes et 3ml d'isopropanol 50% sont ajoutés sans tenir compte du volume de sang. L'échantillon est mélangé en inversant doucement le tube 5 fois, et ensuite replacé sur le Séparateur Magnétique pendant 30 secondes. Le surnageant est éliminé en utilisation une pipette de 5ml sans toucher les billes et le tube est gardé sur le Séparateur Magnétique pendant une minute.

Après, le surnageant est éliminé en utilisation une pipette de 1ml et 250 µl du tampon lavant (W12 sans tenir compte du volume de sang) sont ajoutés aux cotés des puits de tube en face de la boulette de billes pour s'assurer que cette dernière n'est pas déplacée. L'incubation est par la suite réalisée pendant 1minute à température ambiante et le surnageant est par la suite prélevé de la même manière. La solution W12 est rajoutée et le surnageant est éliminé :

La dernière étape est l'élution d'ADN : 1ml du tampon d'élution (E5) est ajouté sans tenir compte du volume de sang et l'échantillon est ensuite agité doucement en tourbillonnant le tube pour sortir la boulette de bille du mur de tube. L'incubation se fait à 65°C pendant 1heure et après, à l'aide d'une pipette de 800ul, le tube est mélangé pour disperser la boulette complètement. Sans enlever le tube du Séparateur Magnétique, le surnageant contenant l'ADN est soigneusement prélevé en employant une pipette 1ml, sans toucher la boulette de billes et ensuite transféré dans un tube stérile.

Finalement, l'ADN peut être stocké à -20°C ou à 4°C pour une utilisation immédiate.



3. Dosage d'ADN :

Souvent perçu comme une évidence, le dosage des acides nucléiques est un point fondamental qu'il faut pourtant considérer comme le premier monitoring important d'une expérience de biologie moléculaire. Souvent, ce que l'on souhaite déterminer par le dosage, c'est la concentration d'acides nucléiques qui est estimée par spectrophotométrie. Les acides nucléiques présentent un pic d'absorption dans l'ultra violet, le maximum de cette absorption se situe à 260nm.

Une fois l'ADN extrait, un dosage au Nanodrop sera réalisé pour obtenir sa concentration ainsi que la courbe d'absorption. Un ADN est considéré pur lorsqu'il présente un rapport DO260/DO280 compris entre 1,8 et 2.

4. Amplification des séquences nucléotidiques par PCR :

4.1 Principe :

La réaction de PCR (polymérase chaîne 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 se faire, une série de réactions permettant la réplication d'une matrice d'ADN double brin est répétée en boucles. 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.

La réaction de PCR se déroule en trois étapes :

- ✓ Dénaturation de l'ADN pour obtenir des matrices simples brins
- ✓ Hybridation des amorces spécifiques
- ✓ Réalisation de la réaction de polymérisation du brin complémentaire par l'enzyme Taq polymérase

A la fin de chaque cycle, les produits sont sous forme d'ADN double brin.

4.2 Condition de PCR :

La PCR a été effectuée et optimisée sur l'ADN génomique préalablement dilué à 100ng/μl en utilisant les amorces spécifiques pour le gène étudié (tableau 3).

Les réactions PCR ont été effectuées et mises au point pour chaque exon dans un volume final de 25 μl du mélange réactionnel (tableau 4).

Les tubes sont enfin déposés dans un Thermocycleur (Applied biosystème) selon un programme déterminé (tableau 5).

**Tableau5: Amorces utilisées pour les réactions de PCR**

Pour le gène ciblé, les amorces sens et anti sens sont indiquées, ainsi que la taille attendue pour chaque produit amplifié.

Le gène	Amorce séquence F :	Amorce séquence R :	Taille de l'amplicon (pb)
VHL ex -1	F : GCGCGTTCCATCCTCTAC	R : GGCCTCCATCTCCTCCTC	300 pb
VHL ex -2	F : ACCGGTGTGGCTCTTTAACA	R : TCCTGTACTIONTACCACAACAACCTT	215 pb
VHL ex-3	F : GCCACTGAGGATTTGGTTTT	R : CAAAAGCTGAGATGAAACAGTG	215 pb

Tableau 4 Mélange réactionnel à volume totale de 25 µl

Composition	VHL Ex 1	VHL Ex 2	VHL Ex 3
Gène			
Tampon 5X	5	5	5
dNTP 10µmol	1	1	1
Amorce F10µmol	1	1	1
Amorce R 10µmol	1	1	1
ADN polymérase (AmpliTaq Gold) 5U/µl	0.2	0.2	0.2
ADN (100ng/µl)	1	1	1
Eau (qsp 25 µl)	15.8	15.8	15.8

**Tableau 5** programme de cycle de température au niveau du Thermocycleur (Applied Biosystème)

Étapes	Activation d'ADN polymérase		Dénaturation		Hybridation		Élongation		Poursuivis de cycle		Nombre de Cycles
	C°	Tps (min)	C°	Tps (sec)	T _m	Tps (sec)	C°	Tps (sec)	C°	Tps (min)	
VHL Ex 1	95	9	94	30	55	30	72	60	72	9	30
VHL Ex 2	96	8	95	30	56	30	73	60	71	8	30
VHL Ex 3	94	8	93	30	58	30	71	60	70	8	30

4.3 Témoins de la réaction PCR :

Deux témoins sont inclus pour chaque réaction PCR :

- Témoin positif qui est utilisé pour s'assurer des bonnes conditions de la PCR, ce témoin est représenté par l'ADN d'un sujet normal sain.
- Témoin négatif ne contenant pas l'ADN et qui est utilisé pour s'assurer de l'absence de contamination.

4.4 Contrôle des produits PCR :

Les produits PCR sont contrôlés sur gel d'agarose 2% en présence d'un marqueur de taille, permettant de vérifier la taille et la spécificité du produit amplifié.

4.5 Séquençage d'ADN :

L'objectif du séquençage est pour détecter les différentes mutations responsables des maladies étudiées. Avant de séquencer nos produits PCR, il faudra les purifier pour éliminer l'excès d'amorces, des dNTP et de l'ADN polymérase pour ne pas s'interférer avec la réaction de séquence. La purification se fait selon 3 réactions essentielles:

4.5.1 Purifications par ExoSAP

ExoSAP-IT est conçu pour une purification rapide et efficace des produits de PCR. Il comporte deux enzymes hydrolytiques : l'exonucléase (Exo) qui dégrade les ADN simple brins et la phosphatase alcaline de crevette (SAP) qui hydrolyse les dNTPs libres, et en excès



sans interférence avec les applications en aval. L'enzyme est active à 37°C et inactive à 80°C. Les fragments simples brins inférieurs à 100pb sont ainsi dégradés.

- 2ul de l'enzyme ExoSAP sont mélangés avec 10ul du produit PCR
- Le tube est ensuite placé au niveau du Thermocycleur selon le cycle suivant :

Tableau 6 : Programme de Thermocycleur pour la purification d' ExoSAP.

Température	Durée
37°C	3 mn
80°C	15mn
10°C	∞

4.5.2 Réaction de séquence par BigDye Terminator v3cycle séquencing

Elle se fait selon la réaction de Sanger qui repose sur l'incorporation aléatoire par cette ADN polymérase, de didéoxynucléotides interrupteurs de chaîne (ddNTP) eux aussi présents dans le milieu réactionnel et dont chacun est marqué par un fluorochrome spécifique dont le spectre d'émission est spécifique. Une analyse spectrale va différencier les différents fluorochromes associés à la base correspondante et donc définir la séquence nucléotidique du brin d'ADN initial. Les fragments d'ADN synthétisés portent ce fluorochrome terminal ; ils sont appelés des terminateurs d'élongation ou BigDye Terminators.

La technologie BigDye Terminators utilise un système de transfert d'énergie par résonance (FRET) entre deux fluorochromes fixés sur le même ddNTP et reliés entre eux par un linker. Le premier est une fluorescéine (6 carboxyfluorescéine) appelé fluorochrome donneur, commun aux quatre ddNTP et le second est une dichlororhodamine (dRhodamine) qui joue le rôle de fluorochrome accepteur.

Le fluorochrome donneur est excité par un rayon laser à argon à 488nm et 514,5nm. Son énergie de fluorescence émise (515-520nm) est captée intégralement par le fluorochrome accepteur qui est excité à son tour. Le fluorochrome accepteur ou dichloroRhodamine est différent pour chaque type de ddNTP.

Tableau 7: La réparation du fluorochrome accepteur par les différents ddNTPs

DdNTP	dichloroRhodamines utilisées	Spectre d'émission maximum
A	Dr6G	560-565nm
T	Drox	615-620nm
C	dR110	530-535nm
G	DTAMRA	590-595nm



Le spectre de la fluorescence émise sera ainsi spécifique de chaque type de ddNTP. Le transfert du signal de la fluorescéine vers la Drhodamine permet une amplification du signal et par conséquent une augmentation de la sensibilité de la technique.

25 cycles d'amplification sont effectués sur le thermocycleur dans des conditions spécifiques à la réaction de séquence. Chaque cycle correspond à :

Une étape de dénaturation de l'ADN à 96°C pendant 10secondes pour obtenir l'ADN sous forme simple brin.

Une étape d'hybridation à 50°C pendant 5secondes (température moyenne d'hybridation pour la majorité des amorces utilisées).

Une étape d'élongation d'ADN par la Taq polymérase à 60°C pendant 2min.

Cette dernière ralenti la Taq et va déplacer l'équilibre pour permettre une meilleur incorporation des ddNTP. Une fois l'étape de Thermocyclage effectuée, il est nécessaire de purifier la réaction de séquence.

4.5.3 Purification de la réaction de séquence avec la kit BigDye TERMINATOR :

Le kit BigDye Xterminator permet la purification des produits de réaction de séquence en capturant les dyes non incorporés dans la réaction, les sels et autres molécules chargées qui pourraient interférer lors de la détection des bases par le séquenceur.

Le kit contient :

- ✓ un flacon SAM Solution (stockage à T° ambiante).
- ✓ Un flacon Xterminator Solution (stockage à 4°C, ne pas congeler).

un mix sera préparé comme suit :

- 45ul de solution SAM par puits
- 10ul de XTerminator Solution par puits à l'aide des cônes spécifiques.

Le flacon XTerminator Solution est vortexé pendant 10secondes la quantité nécessaire est prélevée immédiatement.

Le mélange est vortexé et 55µl sont ajoutés dans chaque puits à l'aide de la pipette. 10ul de produits de réaction de séquence sont déposés dans la plaque, et cette dernière est scellée correctement avec un film adhésif. La plaque est ensuite placée sur l'agitateur à 1800 rpm pendant 30min. Les plaques peuvent se conserver 7jours à 4°C avant d'être analysées avec le séquenceur.

4.5.4 Détermination de la séquence :

Les séquences d'ADN sont déterminées par séquençage automatique (séquenceur à 4 capillaries 3130 Génétic Analyser Applied Biosystem).



Résultats et discussion :

**I. Évaluation clinique :**

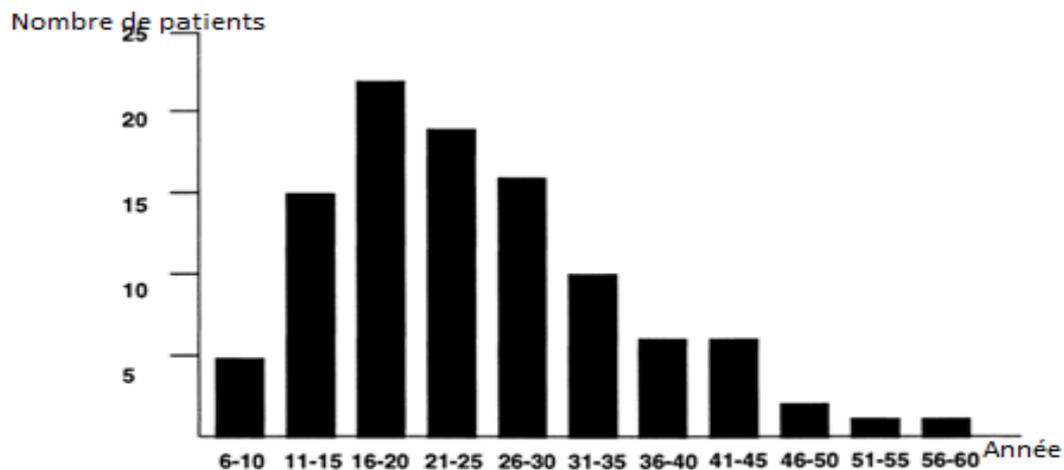
Les données cliniques ont été recueillies pour chaque patient recruté pour l'analyse et la recherche de mutation de la maladie de Von Hippel Lindau. Pendant la période de stage, les patients étaient recommandés à faire le test génétique de VHL. Les patients atteints ont fait un examen clinique, un examen abdominal, un examen neurologique et un examen radiologique.

Tableau 8: Données cliniques chez les malades de VHL

Données cliniques	Patients (n=3)
Ages des patients :	
- Avant 20 ans	0
- Entre 20 et 40 ans	1
- > 40 ans	2
Sexe :	
- Féminin :	1
- Masculin	2
Atteintes :	
-Hémangioblastomes rétiniens	2
-polykystes rénale + hémangioblastomes cérébraux	1

RAS

RAS : rien à signaler

**Figure 6 : Répartition selon l'âge de la maladie VHL.**

- Nous avons enregistré une prédominance masculine avec un sex-ratio de 1,9/1.

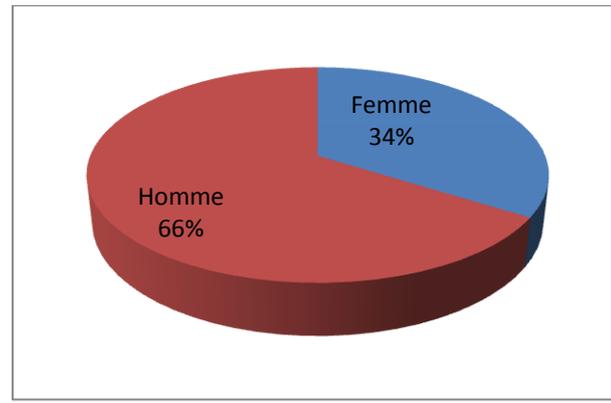


Figure 7 : Répartition selon le sexe de la maladie VHL

- L'analyse anatomopathologique a montré que le hémangioblastome du SNC était le type histologique le plus fréquent, cependant, d'autres types ont été trouvés telle que l'hémangioblastome rétiens.

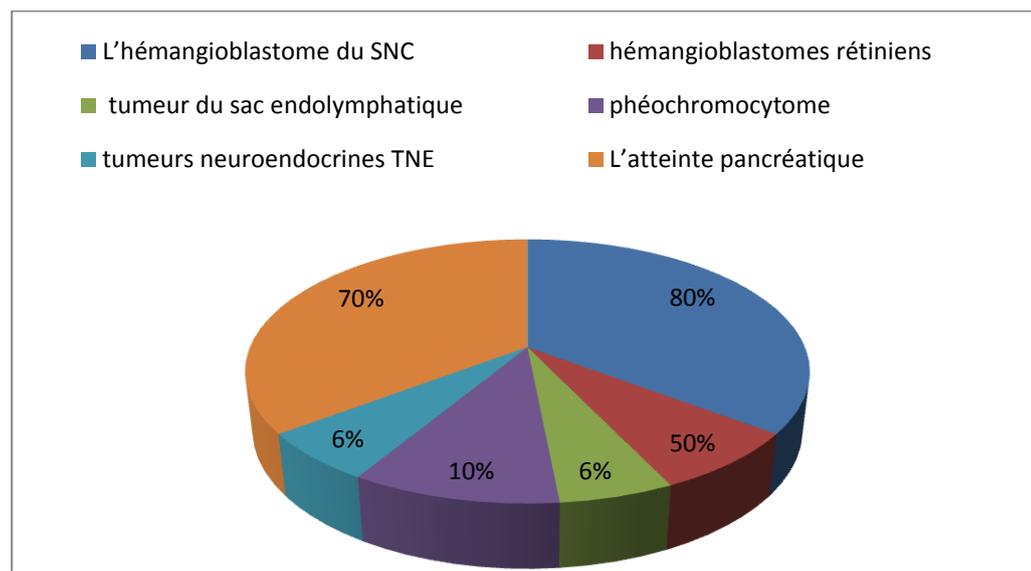


Figure 8: Répartition selon les atteintes de la maladie VHL

- L'étude est réalisée sur une patiente âgée de 43 ans, mariée et mère de 4 enfants .Elle a un hémangioblastome hémisphère ; polykystes rénale et pancréatique ; une lésion maligne des 2 reins PBR à cellule claires .Arbre généalogique de la famille de la patiente P2 étudiée représenter dans la Figure 6.



□ ○ Sujets cliniquement sains de sexe masculin et féminin respectivement

■ ● VHL

◻ ◯ Décédés

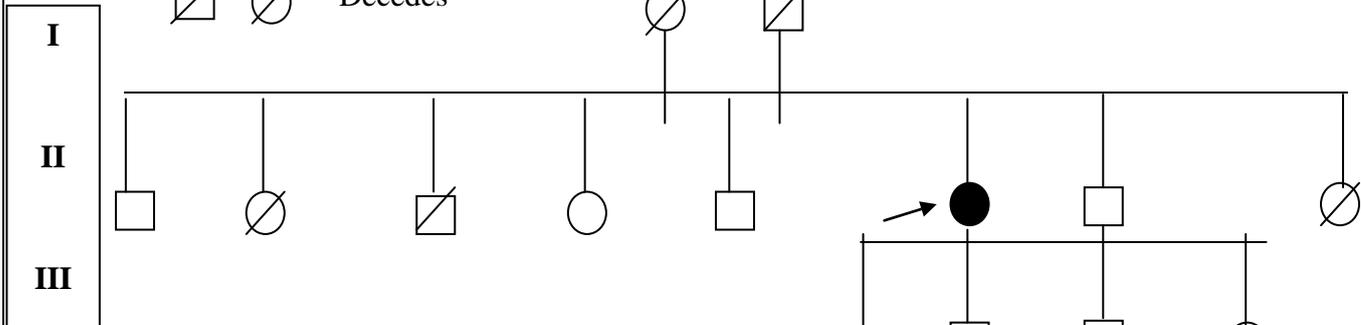


Figure 9: Arbre généalogique de la famille de la patiente P2 étudiée atteinte de VHL .La flèche indique la patiente P2 étudiée.

II. Mise au point et optimisation de la spécificité de la réaction PCR pour détecter les mutations étudiées :

La PCR permet d'amplifier rapidement une portion précise d'ADN sur un chromosome en ciblant précisément un locus particulier. Pour cela, deux amorces d'ADN complémentaires à la séquence du gène à amplifier sont mises au point, une même démarche est toujours suivie quel que soit le polymorphisme étudié. Nous commençons d'abord par le design des amorces nécessaires à l'amplification, puis leur température optimale d'appariement sera déterminée dans un deuxième temps. Finalement, l'optimisation du rendement de nos réactions PCR sera réalisée en modifiant les concentrations des différents réactifs (DNTP, $MgCl_2$ et tampon).

1- Conditions de températures optimales d'appariement pour les amorces

Tel que nous l'avons mentionné précédemment, nous commençons toujours par établir les conditions de température optimales d'appariement pour les amorces, c'est-à-dire la température d'amplification la plus élevée sans diminution appréciable du rendement. Pour ce faire, nous procédons par gradient de températures (intervalles de 6-8°C) en nous inspirant des valeurs calculées selon les pourcentages de liens AT et GC selon la relation : $[4(A+T)^* + 2(C+G)]$. Les températures calculées sont proche à la température théorique retrouvée par l'institut de synthèse des amorces.



Tableau 8: Températures optimales d'hybridations (théoriques et calculés) des amorces (F et R)

Gène	Tm calculé = 2 (T+ A) * 4 (C+G)		Tm théorique	
	F	R	F	R
VHL - ex 1	55	58	55	54
VHL- ex 2	57	56	56	56
VHL - ex 3	57	58	58	58

2- Concentration d'ADN

Une Forte concentration d'ADN peut inhiber la réaction de PCR, de même une concentration faible, ne permettra pas son amplification. Pour cela il faut rechercher la concentration idéale d'ADN, et ceci est réalisé par un gamme de concentration croissante de 50ng/μl jusqu'à 600ng/μl. La vérification de la bonne concentration se fait sur gel des produits PCR, jusqu'à l'absence de tout Smear et présence d'une bande de taille attendue et d'intensité satisfaisante.

3- Concentration des dNTPs :

Les dNTPs sont des bases de nucléotides (A, C, G et T), leurs concentrations varient selon la taille du fragment amplifié. Ainsi, un long fragment a besoin de plus de nucléotide pour sa synthèse qu'un fragment de petite taille.

Gène VHL :

Dans cette étude, les amorces ont été choisies pour amplifier spécifiquement à partir de l'ADN génomique des patients, le gène VHL. Le résultat est montré comme suit dans les figures (5 ; 6 et7).

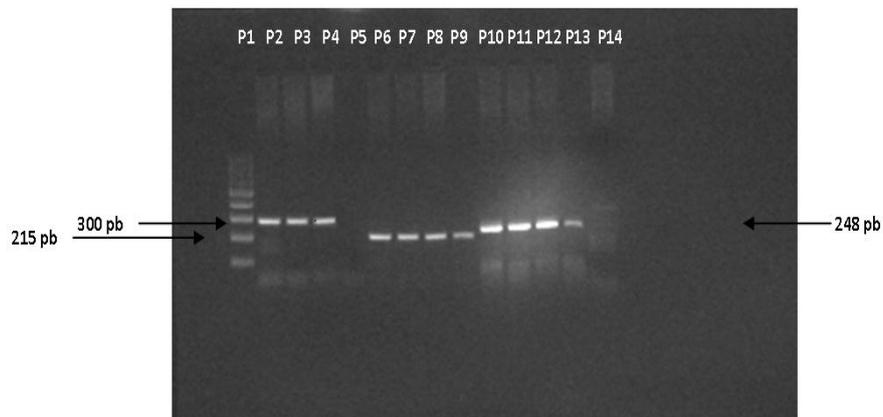


Figure 10: Électrophorèse en gel d'agarose 2% des produits d'amplification par PCR avec les amorces à partir de l'ADN génomique de l'exon 1

P1 : Marqueur de taille (100 pb) **P2, P3 et P4** : Échantillons 1, 2 et 3 de la partie 1 de l'Exon 1 (300 pb) **P5** :Témoin négatif de lyse (Lys-) ; **P6, P7, P8 et P9** : échantillons 4, 5, 6 et 7 de la partie 2 de l'Exon 1 (215 pb) **P10, P11, P12 et P13** : échantillons 8, 9, 10 et 11 de la partie 3 de l'Exon 1 (248 pb) .

La figure montre que le couple d'amorce F et R du gène VHL exon 1 génère un fragment de la taille attendue de 300pb à partir de l'ADN génomique.

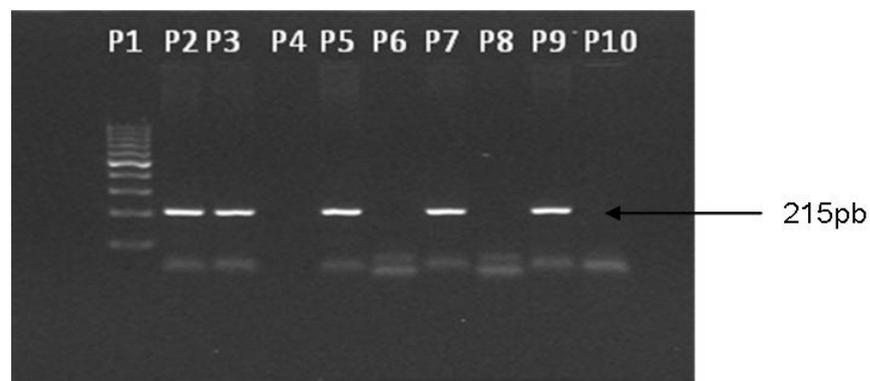


Figure 11: Électrophorèse en gel d'agarose 2% des produits d'amplification par PCR avec les amorces à partir de l'ADN génomique de l'exon 2

P1 : Marqueur de taille (100 pb) **P2 et P3** : échantillons 1 et 2 (215 pb), **P4** : Témoin négatif de lyse (Lys-) ; **P5** échantillons 3 (215 pb) **P6** : Tube blanc **P9** : Témoin positif de la PCR et **P10** : Témoin négatif de la PCR.

La figure montre que le couple d'amorce F et R du gène VHL exon 2 génère un fragment de la taille attendue de 215pb à partir de l'ADN génomique.

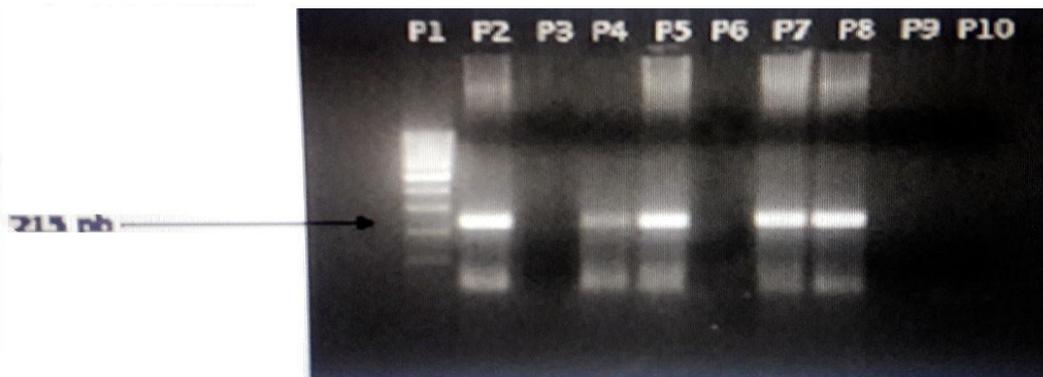


Figure 12: Electrophorèse en gel d'agarose 2% des produits d'amplification par PCR avec les amorces à partir de l'ADN génomique de l'exon 3

P1 : Marqueur de taille ; P2, P4, P5 et P7 échantillons 1 et 2, 3 et 4 (215 pb), P3 : Témoin négatif de lyse (Lys-) P6 : témoin négatif de PEP (PEP-); P8 : témoin positif de la PCR; P9 et P10 : témoin négatif de la PCR.

La figure montre que le couple d'amorce F et R du gène VHL exon 3 génère un fragment de la taille attendue de 215pb à partir de l'ADN génomique.

4- Séquençage du gène VHL et recherche des mutations :

Le gène VHL a été séquençé pour chaque patient, puis chaque séquence a été comparée à celles la banque des séquences NCBI pour « Blast ». Ce séquençage a concerné le gène VHL en utilisant

- Les amorces de l'exon 1: F : GCGCGTTCCATCCTCTAC
R : GGCCTCCATCTCCTCCTC
- Les amorces de l'exon 2: F : ACCGGTGTGGCTCTTTAACA
R : TCCTGTACTIONACCACAACAACCTT
- Les amorces de l'exon 3: F : GCCACTGAGGATTTGGTTTT
R : CAAAAGCTGAGATGAAACAGTG

La technique de séquençage direct du gène cible permet de représenter la succession des nucléotides au sein de la séquence recherché et elle est représentée comme suit :



Séquence de l'EXON 1 :

CGCACGCAGCTCCGCCCCGCGTCCGACCCGCGGATCCCGCGGCGTCCGGCCCCGGTGGTCTGGATC
GCGGAGGGAATGCCCGGAGGGCGGAGAAGTGGGACGAGGCCGAGGTAGGCGCGGAGGAGGCA
GGCGTCAAGAGTACGGCCCTGAAGAAGACGGCGGGGAGGAGTCCGGCGCCGAGGAGTCCGGCC
CGGAAGAGTCCGGCCCCGAGGAACTGGGCGCCGAGGAGGAGATGGAGGCCGGGCGGCCGCGGCC
CGTGCTGCGCTCGGTGAACTCGCGGAGCCCTCCAGGTCATCTTCTGCAATCGCAGTCCGCGCGTC
GTGCTGCCCCGTATGGCTCAACTTCGACGGCGAGCCGCAGCCCTACCCAACGCTGCCGCCTGGCACGG
GCCGCCGATCCACAGCTACCGAGGTACGGGCCCGGCGCTTAGGCCCGACCCAGCAGGGACGATAG
CACGGTCTGAAGCCCTCTACGCCCCGGGGT

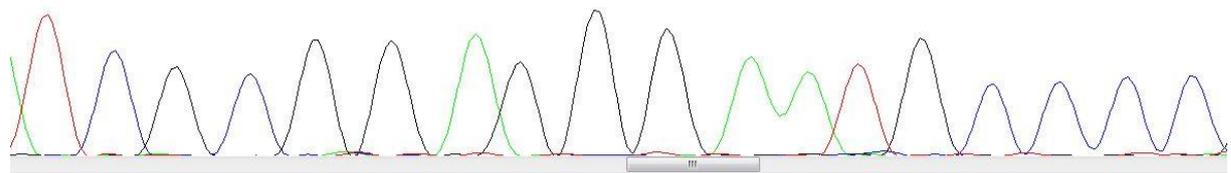
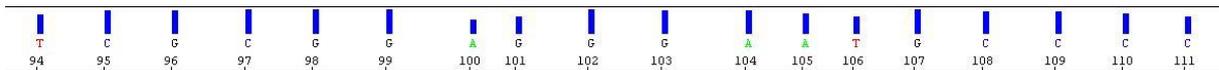


Figure 13 : Chromogramme de la séquence partielle de l'exon 1 du gène VHL.

Sequence de l'exon 2 :

GCTGGGATTACAGGTGTGGGCCACCGTGCCAGCCACCGGTGTGGCTCTTTAACAACTTTGCTTGT
CCCGATAGGTCACCTTTGGCTCTTCAGAGATGCAGGGACACACGATGGGCTTCTGGTTAACCAA
GAATTATTTGTGCCATCTCTCAATGTTGACGGACAGCCTATTTTTGCCAATATCACACTGCCAGGTACT
GACGTTTTACTTTTTAAAAAGATAAGGTTGTTGTGGTAAGTACAGGATAGACCACTTGAAAAATTA
GC

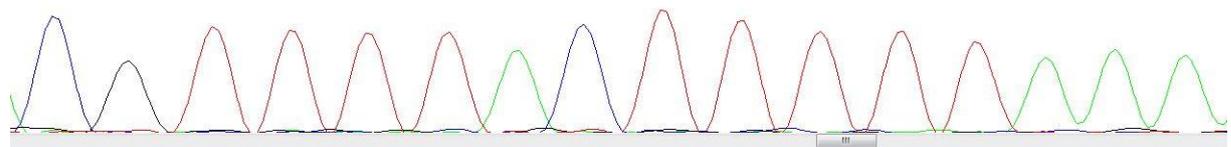
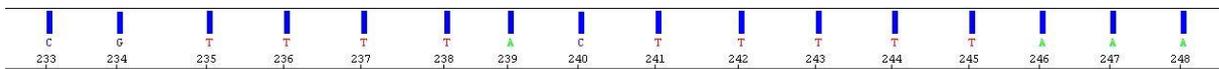


Figure 14: Chromogramme de la séquence partielle de l'exon 2 du gène VHL.



Sequence de l'exon 2 :

TTGGCAAAGCCTCTTGTTCTGTTCTTGTACTGAGACCCTAGTCTGCCACTGAGGATTTGGTTTTTGCCC
TTCCAGTGTATACTCTGAAAGAGCGATGCCTCCAGGTTGTCCGGAGCCTAGTCAAGCCTGAGAATTA
CAGGAGACTGGACATCGTCAGGTCGCTCTACGAAGATCTGGAAGACCACCCAAATGTGCAGAAAGA
CCTGGAGCGGCTGACACAGGAGCGCATTGCACATCAACGGATGGGAGATTGAAGATTTCTGTTGAA
ACTTACACTGTTTCATCTCAGCTTTTGATGGTACTGATGAGTCTTGATCTAGATAACA

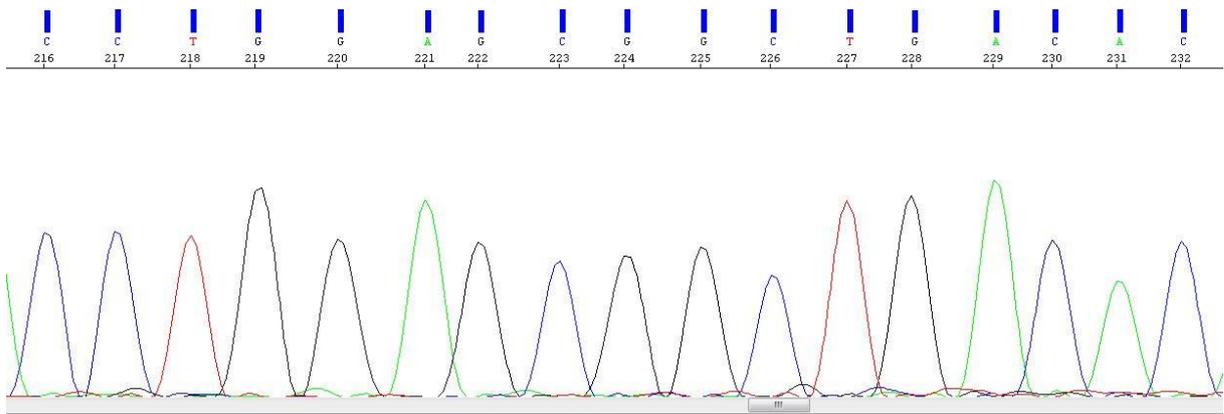


Figure 15 : Chromogramme de la séquence de l'exon 3 du gène VHL.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
904 bits(489)	0.0	489/489(100%)	0/489(0%)	Plus/Plus
Query 1		CGCACGCAGCTCCGCCCCGCGTCCGACCCGCGGATCCC GCGGCGTCCGGCCCCGGTGGTC		60
Sbjct 10141773		CGCACGCAGCTCCGCCCCGCGTCCGACCCGCGGATCCC GCGGCGTCCGGCCCCGGTGGTC		10141832
Query 61		TGGATCGCGGAGGGAAATGCCCCGGAGGGCGGAGAACTGGGACGAGGCCGAGGTAAGGCGCG		120
Sbjct 10141833		TGGATCGCGGAGGGAAATGCCCCGGAGGGCGGAGAACTGGGACGAGGCCGAGGTAAGGCGCG		10141892
Query 121		GAGGAGGCAGGCGTGAAGAGTACGGCCCTGAAGAAGACGGCGGGGAGGAGTCGGGCGCC		180
Sbjct 10141893		GAGGAGGCAGGCGTGAAGAGTACGGCCCTGAAGAAGACGGCGGGGAGGAGTCGGGCGCC		10141952
Query 181		GAGGAGTCCGGCCCCGGAAGAGTCCGGCCCGGAGGAACTGGGCGCCGAGGAGGAGATGGAG		240
Sbjct 10141953		GAGGAGTCCGGCCCCGGAAGAGTCCGGCCCGGAGGAACTGGGCGCCGAGGAGGAGATGGAG		10142012
Query 241		GCCGGGCGGCCGCGGCCCGTGTGCGCTCGGTGAACTCGCGCGAGCCCTCCCAGGTCATC		300
Sbjct 10142013		GCCGGGCGGCCGCGGCCCGTGTGCGCTCGGTGAACTCGCGCGAGCCCTCCCAGGTCATC		10142072
Query 301		TTCTGCAATCGCAGTCCGCGCGTGTGCTGCCCGTATGGCTCAACTTCGACGGCGAGCCG		360
Sbjct 10142073		TTCTGCAATCGCAGTCCGCGCGTGTGCTGCCCGTATGGCTCAACTTCGACGGCGAGCCG		10142132
Query 361		CAGCCCTACCCAACGCTGCCGCTGGCACGGGCGCCGCATCCACAGCTACCGAGGTACG		420
Sbjct 10142133		CAGCCCTACCCAACGCTGCCGCTGGCACGGGCGCCGCATCCACAGCTACCGAGGTACG		10142192
Query 421		GGCCCCGGCGCTTAGGCCCGGACCCAGCAGGGACGATAGCACGGTCTGAAGCCCCCTTACCG		480
Sbjct 10142193		GGCCCCGGCGCTTAGGCCCGGACCCAGCAGGGACGATAGCACGGTCTGAAGCCCCCTTACCG		10142252
Query 481		CCCCGGGGT 489		
Sbjct 10142253		CCCCGGGGT 10142261		

Figure 16 : Résultat du Blast montrant l'alignement des séquences de l'exon 1.



Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
503 bits(2/2)	2e-140	2/2/2/2(100%)	0/2/2(0%)	Plus/Plus
Query 1		gctgggattacaggtgtggggccaccgtgcccagccACCGGTGTGGCTCTTTAACAAACCTT		60
Sbjct 10146439		GCTGGGATTACAGGTGTGGGGCCACC GT6CCCA6CCACCGGTGTGGCTCTTTAACAAACCTT		10146498
Query 61		TGCTTGTCCCGATAGGTCACCTTTGGCTCTT CAGAGATGCAGGGACACACGATGGGCTTC		120
Sbjct 10146499		TGCTTGTCCCGATAGGTCACCTTTGGCTCTT CAGAGATGCAGGGACACACGATGGGCTTC		10146558
Query 121		TGGTTAACCAAACCTGAATTATTTGTGCCATCTCTCAATGTTGACGGACAGCCATTTTTTG		180
Sbjct 10146559		TGGTTAACCAAACCTGAATTATTTGTGCCATCTCTCAATGTTGACGGACAGCCATTTTTTG		10146618
Query 181		CCAATATCACACTGCCAGGTA CTGACGTTTTACTTTTTAAAAAGATAAGGTTGTTGTGGT		240
Sbjct 10146619		CCAATATCACACTGCCAGGTA CTGACGTTTTACTTTTTAAAAAGATAAGGTTGTTGTGGT		10146678
Query 241		AAGTACAGGATAGACCACCTTGAAAAATTAAGC 272		
Sbjct 10146679		AAGTACAGGATAGACCACCTTGAAAAATTAAGC 10146710		

Figure 17 : Résultat du Blast montrant l’alignement des séquences de l’exon 2.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
601 bits(325)	1e-169	325/325(100%)	0/325(0%)	Plus/Plus
Query 1		TTGGCAAAGCCTCTTGTTCGTTCCCTTGTACTGAGACCCTAGTCTGCCACTGAGGATTTGG		60
Sbjct 10149712		TTGGCAAAGCCTCTTGTTCGTTCCCTTGTACTGAGACCCTAGTCTGCCACTGAGGATTTGG		10149771
Query 61		TTTTTGCCCTTCCAGTGTATACTCTGAAAAGAGCGATGCCTCCAGGTTGTCCGGAGCCTAG		120
Sbjct 10149772		TTTTTGCCCTTCCAGTGTATACTCTGAAAAGAGCGATGCCTCCAGGTTGTCCGGAGCCTAG		10149831
Query 121		TCAAGCCTGAGAATTACAGGAGACTGGACATCGTCAGGTCGCTCTACGAAGATCTGGAAG		180
Sbjct 10149832		TCAAGCCTGAGAATTACAGGAGACTGGACATCGTCAGGTCGCTCTACGAAGATCTGGAAG		10149891
Query 181		ACCACCCAAATGTGCAGAAAAGACCTGGAGCGGCTGACACAGGAGCGCATTGCACATCAAC		240
Sbjct 10149892		ACCACCCAAATGTGCAGAAAAGACCTGGAGCGGCTGACACAGGAGCGCATTGCACATCAAC		10149951
Query 241		GGATGGGAGATTGAAGATTTCTGTTGAAACTTACACTGTTTCATCTCAGCTTTTGATGGT		300
Sbjct 10149952		GGATGGGAGATTGAAGATTTCTGTTGAAACTTACACTGTTTCATCTCAGCTTTTGATGGT		10150011
Query 301		ACTGATGAGTCTTGATCTAGATACA 325		
Sbjct 10150012		ACTGATGAGTCTTGATCTAGATACA 10150036		

Figure 18 : Résultat du Blast montrant l’alignement des séquences de l’exon 3.

Après l’obtention de la séquence du gène en cause par bioinformatique des séquences, et après l’identification des ressemblances entre la séquence requête et la séquence de la banque de données par le Logiciel « Blast » et après L’alignement avec la séquence de la banque de donnée, nous avons constaté que l’exon 1 du gène VHL du sujet étudié (par le pourcentage d’identité ainsi que le nombre de Gaps incorporées) ne contient aucune mutation, c’est un cas Normal.

Les différentes mutations qui peuvent altérer le gène VHL sont présentées dans le tableau suivant :



Tableau 9 : Tableau des mutations du gène *VHL*

	Nombre de mutations germinales du gène <i>VHL</i>	Nombre de mutations somatiques du gène <i>VHL</i>
Frameshifts	83	136
Délétions	56	113
Insertions	27	23
Mutations ponctuelles	302	85
Mi-sens	253	64
Non-sens	49	21
Mutation complexe	1	1
Transitions	64	41
Transversions	36	59
Total	386	222



Conclusion :

Dans ce travail on a traité la maladie de Von Hippel-Lindau (VHL) qui est un syndrome familial de prédisposition aux cancers, associé à des néoplasmes malins ou bénins, surtout hémangioblastomes rétiens, cérébelleux, de la moelle épinière, carcinomes des cellules rénales (CCR) et phéochromocytome. Dans on a fait l'étude aux patients porteur d'un adénocarcinome rénal, d'un phéochromocytome et de Kystes rénaux dont nous avons suspecté une maladie de Von-Hippel Lindau qui n'a pas été confirmée par la présence d'autres lésions évocatrices, surtout du système nerveux central et de l'absence d'atteinte d'autres membres de la famille pour cela il sera obligatoire de pratiquer un examen de biologie moléculaire pour établir définitivement s'il est ou non atteint de cette phacomatose.

La littérature a montré l'intérêt de penser à la maladie de Von Hippel Lindau qui peut être en associations tumorales. L'importance d'un suivi codifié des patients à risque est aussi à signaler un autre intérêt est de rechercher lors de bilan pré-opératoire d'un cancer rénal, un phéochromocytome au moindre signe d'appel, et éventuellement de prélever la surrenale homolatérale en cas de doute.

Ces différents problèmes illustrent bien la nécessité d'un travail pluridisciplinaire.

En conclusion, nos résultats montrent que l'analyse génétique moléculaire appliqué à identifier que la patiente n'est pas atteinte de VHL .Ce résultat est très innovant et ouvre plusieurs perspectives nouvelles. Entre autre, il nous permet d'avancer l'hypothèse que demain le diagnostic de VHL réalisé par oncogénétique moléculaire sera plus complet et plus sensible qu'à l'heure actuelle. Ceci représenterait une avancée spectaculaire dans le domaine de la médecine personnalisée et de l'oncologie prédictive et non invasive.

Ce travail constitue une approche ciblée réalisée dans le but de contribuer modestement à une meilleure compréhension et traitement du cancer de VHL par l'identification plus spécifique des mutations grâce à une approche innovante d'oncologie moléculaire. L'élaboration d'un test prédictif non invasif et fiable en oncologie constitue une espérance pour de nombreux patients, chercheurs et cliniciens afin d'aider à la mise au point de nouvelles stratégies de suivi thérapeutique.



LISTES DES ANNEXES :

Annexes 1 :

+ Lyse des hématies TE 20/5 : 1l

- 20ml tris-HCL pH 7.6 1M
- 10ml EDTA disodique pH 8 0.5M
- H₂O distillée

• Tris HCL 1M pH 7.6

- Tris base 121.1g
- Eau distillée 1Litre
- Le pH est ajusté à 7.6 par du HCL concentré (12N)
- Autoclaver

• EDTA-Na₂ 0.5M à pH 8

- EDTA-Na₂-2H₂O 186012g
- Eau distillée 1litre
- Ajuster le pH à 8 par du NaOH en pastilles
- Autoclaver et conserver à +4°C

Annexes 2 :

+ Lyse des globules blancs

- 10ml Tris-HCL pH 7.6 1M
- 20ml EDTA disodique pH 8 0.5M
- 20ml SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) 10%
- 10ml NaCl 5 M

• SDS à 10 %

- 25g de SDS + E.D q.s.q 250ml
- Conserver à température ambiante

Annexes 3 :

+ Préparation de la protéinase K :



Pour 100 ml de tampon de stockage :

50ml	CaCl 50Mm
50ml	Tris-HCL 250Mm

Pour 10ml de protéinase K solution mère :

- Ajouter 10ml du tampon de reconstitution à 100mg de protéinase K (Promega)
- Mettre 200ul de la solution mère dans des tubes eppendorf de 1.5 ml
- stocker à -20°C

• Préparation du CaCl₂ 50 mM

Dissoudre 1,375 g de CaCl₂ (PM=110) dans 250 ml d'eau distillée

• Préparation du Tris-HCL 250 mM

- Prendre 25ml de la solution Tris-HCL 1M
- Compléter jusqu'à 100ml

Annexes 3 :

✚ Solution de conservation de la méduse d'ADN (200ml) TE 10/1 :

- 2ml tris-HCL pH 7,6 1M
- 400 ul EDTA disodique pH 8 0,5M

Annexes 4 :

✚ BET (Bromure d'éthidium) à 10mg/ml :

- BET : 0,5 g
- Eau distillée : qsq 50ml
- laisser dissoudre
- Conserver à 4°C et à l'abri de la lumière

Annexes 5 :

✚ Gel d'agarose à 2% :

- Agarose : 1g
- Tampon TAE 1X : 50ml



- Chauffer à ébullition
- Couler le gel dans la cuve d'électrophorèse

• **Tampon TAE (Tris-Acétate-EDTA) 50X :**

- Tris-base : 242g
- EDTA 0,5M pH 8 : 100ml
- Acide acétique : 57ml
- Eau distillée : qsp 1000ML
- Alliquoter et autoclaver
- Conserver à 4°C

Annexes 6 :

✚ **Tampon de charge :**

- Bleu de bromophénol : 0,1g
- Sucrose : 50 g
- Eau distillée : qsp 100ml
- Conserver la solution à 4°C



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Elsevier Masson. 2010 SAS
2. RICHARD S, GRAFF J, LINDAU J, RESCHE F., 2004 Von Hippel-Lindau disease. *Lancet* ; 363: 1231-1234.
3. Elsevier Masson. 2015 Prise en charge des maladies rares en anesthésie et analgésie obstétricale ©
4. Masson., 2005 J. *Neuroradiol.*, 32, 157-167 Dossier thématique © Masson, Paris.
5. VORTMEYER AO, FRANK S, JEONG S., 2003 *et al.* Developmental arrest of angioblastic lineage initiates tumorigenesis in von Hippel-Lindau disease. *Cancer Res* ; 63: 7051-7055.
6. KAELIN WG., 2002 Jr. Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nat Rev Cancer* ; 2: 673-682.
7. LONER RR, GLENN G, WALTHER McC, CHEW EY, LIBUTTI SK, LINEHAN WM., 2003 OLDFIELD EH. Von-Hippel-Lindau disease. *Lancet* ; 361: 2059-2067.
8. ZBAR B, KISHIDA T, CHEN F. , 1996 *al.* Germline mutations in the von Hippel-Lindau disease (VHL) gene in families from North America, Europe, and Japan. *Hum Mutat* ; 8: 348-357.
9. BENDER BU, ENG C, OLSCHESKI M., 2001 *al.* VHL c.505 T>C mutation confers a high age related penetrance but no increased overall mortality. *J Med Genet* ; 38: 508-514.
10. HOFFMAN MA, OHH M, YANG H, KLCO JM, IVAN M, KAELIN ., 2001 Jr WG Jr. Von Hippel-Lindau protein mutants linked to type 2C VHL disease preserve the ability to downregulate HIF. *Hum Mol Genet* ; 10: 1019-1027
11. WEBSTER AR, RICHARDS FM, MAC RONALD FE, MOORE AT, MAHER ER., 1998 An analysis of phenotypic variation in the familial cancer syndrome von Hippel-Lindau disease : evidence for modifier effects. *Am J Hum Genet* ; 63: 1025-1035.
12. RICHARD S ., 2003 Von Hippel-Lindau disease: recent advances and therapeutic perspectives. *Exp Rev Anticancer Therapy*; 3: 215-233.
13. RICHARD S, DAVID Ph, MARSOT -DUPUCH K., 2000 *al.* Central nervous system hemangioblastomas, endolymphatic sac tumors and von Hippel-Lindau disease. *Neurosurg Rev* ; 23: 1-22.
14. SEMENZA GL., 2002 HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med* ; 8: S27-S31.



15. MANSKI TJ, HEFFNER DK, GLENN GM.,1997 *al.* Endolymphatic sac tumors. A source of morbid hearing loss in von Hippel-Lindau disease. *JAMA* ; 277: 1461-1466.
16. DOLLFUS H, MASSIN P, TAUPIN P., 2002 . *al.* Ocular manifestations in von Hippel-Lindau disease: a clinical and molecular study. *Invest OphthalmolVis Sci* ; 43: 3067-3074.
17. CHAUVEAU D, DUVIC C, CHRETIEN Y., 1996 *al.* Renal involvement in von Hippel-Lindau disease. *Kidney Int* ; 50: 944-951.
18. HES FJ,HOPPENER JW,LIPS CJ., 2003 Clinical review 155: Pheochromocytoma in von Hippel-Lindau disease. *J Clin Endocrinol Metab* ; 88: 969-974.
19. HAMMEL P, VILGRAIN V, TERRIS B., 2000 *al.* Pancreatic involvement in von Hippel-Lindau's disease: prevalence, course and impact in the management of patients. *Gastroenterology* ; 119: 1087-1095.
20. LONER RR,GLENN G,WALTHER McC,CHEW EY,LIBUTTI SK, LINEHAN WM,OLDFIELD .,2003Von-Hippel-Lindaudisease. *Lancet* ; 361: 2059-2067.
21. GIRAUD S, PLAUCHU H, DOLLFUS H, RICHARD S., 2001 La maladie de von Hippel-Lindau. Fiche de recommandations de la Société Française de Génétique Humaine. Les Cahiers du diagnostic génétique, INSERM.