

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة امحمد بوقرة بومرداس  
Université M'hamed Bougara de Boumerdès



**Faculté des Sciences**  
**Département de Biologie**

Mémoire de projet de fin d'études en vue de l'obtention du Diplôme de Master

**Domaine :** Sciences de la Nature et de la Vie

**Filière :** Sciences Biologiques

**Spécialité :** Génétique

**Thème :**

**Diagnostic moléculaire différentiel chez des patients Algériens  
ayant une neuropathie**

Présenté par :

**ABBAS Nassima**

**BOUDJADJA Asma**

**DJEMA Fathia**

Soutenu le **26/06/2018** devant le Jury composé de :

Président :	M <sup>me</sup> BENHABYLES Nariman.	Maitre de Conférences	UMBB
Promoteur :	M <sup>r</sup> HAMADOUCHE Tarik.	Maitre de Conférences	UMBB
Examineur :	M <sup>r</sup> ARAB Karim.	Professeur	UMBB

Promotion 2017/2018

## REMERCIEMENTS

Tout d'abord nous remercions Dieu Le Tout Puissant qui nous a donné courage, patience, force morale et physique pour accomplir ce modeste travail.

Au terme de ce travail, il nous est agréable de remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce mémoire.

Nous remercions **Mr HAMADOUCHE T.**, d'avoir accepté d'encadrer ce travail, et de nous avoir fait part de son expérience. Les résultats de ce travail doivent beaucoup aux exigences de sa rigueur scientifique, à ses orientations, et à son talent pédagogique. C'est pour nous l'opportunité de lui exprimer notre profonde reconnaissance et nos vifs remerciements pour son esprit ouvert et ses conseils précieux.

Nous voudrions également remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail :

**Mme BENHABYLES N.**, de la Faculté des Sciences de l'UMBB, Boumerdes, qui nous a fait l'honneur de présider le jury de notre soutenance.

**Mr ARAB K.**, de la Faculté des Sciences de l'UMBB, Boumerdes, qui nous a fait l'honneur de participer à ce jury en examinant ce travail.

# *Dédicace*

*Je remercie le bon DIEU le tout puissant qui m'a permis d'arriver à ce but, je dédie en toute modestie ce travail :*

*A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études  
Merci infiniment et que Dieu vous garde*

*A mes chères sœurs **Fatma** et **Akila** et **Lydia** pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral*

*A mes chers frères **Ali** et **Said** pour leur appui et leur encouragement*

*A tous les membres de ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire*

*A mes chers amis **Sarra** , **Nasrine** , **Fatima** et sans oublier **Younes** en témoignage de l'amitié et des bons moments passés ensemble*

*A mon trinôme :**Boudjadja Asma** et **Djemaa Fathia** avec qui j'ai partagé les difficultés et les joies durant ces dernières années.*

*A tous mes camarades de la promotion 2017/2018, et surtout, **Sarah***

*A toute les personnes que j'aime et qui m'aiment*

*Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infaillible,  
Merci d'être toujours là pour moi.*

*Nassima*

*Merci Allah (mon dieu) de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir, la force d'y croire, la patience d'aller jusqu'au bout du rêve.*

*Je dédie ce travail à :*

*A mes très chers parents*

*A ceux que j'aime le plus au monde, A ceux qui m'ont tout donné sans compter. Vous avez été pour moi tout au long de mes études le plus grand symbole d'amour de dévouement qui n'a ni cessé ni diminué.*

*A toute ma famille*

*Je vous dédie ce travail en vous souhaitant tout le bonheur du monde.*

*A mes amis (es) et ceux qui me sont chers*

*Je vous dédie ce travail avec mes sentiments les plus sincères, en mémoire de tous les moments agréables vécus ensemble.*

*A mon trinôme : Nassima Abbas et Fathia Djemaa qui ont supporté mon humeur dans les moments de stress*

*A tous les enseignants qui m'ont aidé durant ces années de Master ,  
Qu'il me soit permis de vous exprimer mon estime et ma sincère reconnaissance.*

*A tous mes camarades de la MII Génétique.*

*Asma*

*Ce travail est dédié tout d'abord à :*

*Ma très chère Mère*

*A la mémoire de mon père*

*A mes frères : Omar, Ali, Mahfoud, Samir, Med Amine, Rabah.*

*A mes sœurs : Ouhiba, Baya, Fouzia, Samira, Amina.*

*A tous les membres de ma famille petits et grands.*

*A toutes mes amies : Saïda, Hadjila, Siham, Khaoula et  
spécialement*

*à ma chère ange Nada SWEELAME.*

*A mon trinôme : Abbas Nassima et Boudjadja Asma avec qui j'ai  
partagé les difficultés et les joies durant ces dernières années.*

*A mes camarades de ma promotion 2017/2018.*

*A tous qui m'ont apporté du soutien toute ma vie.*

*Fathia*

## **LISTE DES ABRIVIATION :**

**ADN:** acide déoxyribonucléique.

**AD-CMT:** Charcot-Marie-Tooth à transmission autosomique dominante.

**AD-EDMD :** dystrophie musculaire d'Emery-Dreyfus autosomique dominante.

**AR-CMT:** Charcot-Marie-Tooth à transmission autosomique récessive.

**ASP:** amyotrophies spinales progressives.

**CMT :**Charcot-Marie-Tooth.

**CMT2:** Charcot-Marie-Tooth type 2 .

**CMT1:** Charcot-Marie-Tooth type 1.

**CMT-I:** Charcot-Marie-Tooth intermédiaire.

**EDTA :** acide éthylène diaminetétracétique.

**ENMG:** électroneuromyogramme.

**HMSN:** neuropathie sensitive et motrice héréditaire.

**LGMD1B :**dystrophie musculaire des ceintures de types 1B .

**LMNA:** lamine A.

**NAIP:** Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein.

**PCR:** quantitative polymerase chain reaction.

**RD:** dermatopathie restrictive.

**SMA:** Spinal Muscular Atrophies.

**SMN:** Survival Motor Neuron.

**VCNM:** vitesses de conduction nerveuse du nerf médian.

## LISTE DES FIGURE:

**Figure01:** Gènes connus responsables des différentes formes de la maladie de Charcot-Marie-Tooth, troubles associés et patho-mécanismes proposés.

**Figure02:** **A.** Représentation schématique de la région SMA inversée dupliquée, comprenant quatre gènes : *H4F5*, *SMN*, *NAIP* et *p44*. La région est flanquée de *HRAD17* et de *TFNR*.  
**B.** Localisation des nucléotides par lesquels *SMN1* peut être distingué de *SMN2*

**Figure03:** Estimation qualitative et semi-quantitative, après électrophorèse sur gel d'agarose 1% en présence de bromure d'éthidium (0.5 µg/ml), de quelques ADN génomiques extraits à partir de sang périphérique prélevés chez nos malades. C1 à C7

**Figure04:** Profils d'amplification après électrophorèse sur gel d'agarose 1.5 % obtenus après amplification de l'exon 5 du gène *LMNA* chez deux individus témoins.

**Figure05:** Profils d'amplification après électrophorèse sur gel d'agarose 1.5 % obtenus après amplification de l'exon 5 du gène *LMNA* chez quelques patients (C1 à C8).

**Figure06:** Schéma illustrant les différents profils de restriction pouvant être obtenus après restriction enzymatique de l'exon 5 du gène *LMNA* par *AciI*.

**Figure07:** . Profils de restriction obtenus après migration électrophorétique sur gel d'agarose 2.5% des produits de digestion par l'enzyme *AciI* de l'exon 5 du gène *LMNA* chez les patients C1 à C9.

**Figure08:** Profils de restriction obtenus après migration électrophorétique sur gel d'agarose 2.5% des produits de digestion par l'enzyme *AciI* de l'exon 5 du gène *LMNA* chez les patients C10 à C18.

**Figure09:** Profils d'amplification de l'exon 7 des gènes *SMN/SMNc* (à gauche) et de digestion par l'enzyme *DraI* (à droite) après électrophorèse sur gel d'agarose chez deux individus témoins T3 et T4

**Figure 10.** Schéma illustrant les différents profils de restriction pouvant être obtenus après digestion enzymatique des produits PCR des exons 7 des gènes *SMN/SMNc* par *DraI*.

**Figure 11.** Profils d'amplification après électrophorèse sur gel d'agarose 1.5 % obtenus après amplification de l'exon 7 des gènes *SMN/SMNc* chez quelques patients (C1 à C8).

**Figure 12.** Profils de restriction obtenus après migration électrophorétique sur gel d'agarose 2.5% des produits de digestion par l'enzyme *DraI* de l'exon 7 des gènes *SMN/SMNc* chez les patients C1 à C9.

**Figure 13.** Profils de restriction obtenus après migration électrophorétique sur gel d'agarose 2.5% des produits de digestion par l'enzyme *DraI* de l'exon 7 des gènes *SMN/SMNc* chez les patients C10 à C18.

**LISTE DE TABLEAUX :**

**Tableau I.** Classification des différentes formes de CMT

**Tableau II.** Données cliniques sur les patients atteints de la maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT).

# **SOMMAIRE**

---

<b>OBJECTIF DU TRAVAIL</b>	01
<b>RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	02
<b>I. Maladie de Charcot-Marie-Tooth</b>	02
<b>I.1. Définition</b>	02
<b>I.2. Classification</b>	02
<b>I.3. Forme CMT2B1 de la maladie de Charcot-Marie-Tooth</b>	03
<b>I.3.1. Aspects cliniques</b>	03
<b>I.3.2. Aspects génétiques</b>	03
<b>I.3.2.1. Gène <i>LMNA</i></b>	03
<b>I.3.2.2. Altérations moléculaires dans <i>LMNA</i> et mutation c.892C&gt;T (p.Arg298Cys)</b>	06
<b>I.3.2.3. Protéines lamines A/C</b>	06
<b>I.3.3. Diagnostic moléculaire</b>	07
<b>II. Amyotrophie spinale progressive ou ASP</b>	08
<b>II.1. Définition</b>	08
<b>II.2. Différents types d'amyotrophies spinales progressives</b>	08
<b>II.3. Epidémiologie des amyotrophies spinales progressives</b>	09
<b>II.4. Diagnostic des ASP</b>	09
<b>II.5. Gènes impliqués dans les amyotrophies spinales progressives</b>	09
<b>II.5.1. Gène <i>SMN</i> et protéine SMN</b>	09
<b>II.5.2. Mutations retrouvées chez les patients atteints d'ASP</b>	10
<b>II.5.3. Autres gènes impliqués</b>	11
<b>II.6. Corrélations phénotype/génotype</b>	11

---

<b>MATERIEL ET METHODES</b>	12
<b>I. Patients</b>	12
<b>II. Méthodes</b>	12
<b>II.1. Extraction d'ADN génomique total par kit QIAmp DNA Mini Kit®</b>	12
<b>II.2. Estimation qualitative et semi-quantitative des ADN extraits des patients par électrophorèse sur gel d'agarose</b>	13
<b>II.3. Amplification par PCR de l'exon 5 du gène <i>LMNA</i> ou de l'exon 7 des gènes <i>SMN/SMNc</i></b>	14
<b>II.4. Révélation des produits d'amplification par électrophorèse sur gel d'agarose</b>	15
<b>II.5. Restriction enzymatique de l'exon 5 du gène <i>LMNA</i> par l'enzyme <i>AciI</i> ou de l'exon 7 des gènes <i>SMN/SMNc</i> par l'enzyme <i>DraI</i></b>	16
<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b>	17
<b>I. Données cliniques et généalogiques</b>	17
<b>II. Extraction de l'ADN génomique total et estimation qualitative et semi-quantitative</b>	19
<b>III. Amplification par PCR de l'exon 5 du gène <i>LMNA</i>, région cible de la mutation c.892C&gt;T (p.Arg298Cys)</b>	20
<b>IV. Etablissement du statut génétique des 18 patients après digestion par l'enzyme <i>AciI</i> de l'exon 5 du gène <i>LMNA</i></b>	22
<b>V. Etablissement du statut génétique des patients sans mutation c.892C&gt;T dans le gène <i>LMNA</i> vis-à-vis de l'amyotrophie spinale proximale</b>	29
<b>CONCLUSION</b>	36
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	37

# **OBJECTIF DU TRAVAIL**

Les neuropathies héréditaires, qui regroupent un ensemble de pathologies neuromusculaires affectant les nerfs sensitifs et moteurs, sont très fréquentes et sont caractérisées par une très grande hétérogénéité clinique, électrophysiologique, anatomopathologique et génétique (Vallat *et al.*, 2005; Tazir *et al.*, 2014).

Tous les modes de transmission y sont rencontrés (dominant ou récessif, autosomique ou lié au chromosome X), mais les formes récessives sont prépondérantes en Algérie à cause du fort taux d'endogamie ou en raison d'effets fondateurs avérés comme pour la forme CMT2B1 due à une mutation unique c.892C>T (p.Arg298Cys) dans le gène *LMNA* (De Sandre-Giovannoli *et al.*, 2002; Hamadouche *et al.*, 2008).

L'amyotrophie spinale progressive représente une entité clinique également très fréquente puisqu'elle se classe en deuxième position des maladies autosomiques récessives fatales chez l'enfant, et est principalement due à la délétion homozygote de l'exon 7 du gène *SMN* (Ogino et Wilson, 2004; Abane, 2006).

L'objectif de notre travail était de réaliser le diagnostic moléculaire de la forme CMT2B1 de la maladie de Charcot-Marie-Tooth en testant la présence de la mutation responsable de cette affection chez 18 patients Algériens pour lesquels un diagnostic clinique CMT avait été évoqué par les médecins traitants au courant de l'année 2018, puis de compléter nos explorations par un test génétique de l'amyotrophie spinale progressive, une motoneuropathie également très fréquente, dont certains symptômes pourraient mimer la maladie.

# **RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **I. Maladie de Charcot-Marie-Tooth**

### **I.1. Définition**

La maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT), ou neuropathie sensitive et motrice héréditaire (HMSN), est un groupe cliniquement et génétiquement hétérogène de neuropathies périphériques et représente la cause la plus fréquente de pathologies héréditaires affectant le système nerveux, avec une prévalence estimée à 1/2.500 (Birouk, 2009; Tazir *et al.*, 2014).

Ce sont des maladies chroniques et progressives qui se caractérisent par une atrophie musculaire, un affaiblissement lent et progressif des muscles des pieds, de la partie inférieure des jambes, des mains et des avant-bras. Leur sévérité est variable, allant de formes asymptomatiques à un handicap nécessitant l'usage d'un fauteuil roulant (Vallat *et al.*, 2005; Tazir *et al.*, 2014).

### **I.2. Classification**

Les neuropathies périphériques sont classées selon 3 critères : la nature de l'atteinte du nerf (myéline ou axone), le mode de transmission et l'anomalie génétique en cause.

Selon l'aspect électrophysiologique ou les vitesses de conduction nerveuse du nerf médian (VCNM), trois formes peuvent être distinguées : Charcot-Marie-Tooth type 1 (CMT1), dite forme démyélinisante et dans laquelle les vitesses de conduction sont  $<35$  m/s, Charcot-Marie-Tooth type 2 (CMT2), dite forme axonale et dans laquelle les vitesses de conduction sont  $>40$  m/s, des VCNM intermédiaires correspondant à la forme dite intermédiaire (CMT-I) (LeGuern *et al.*, 1996; Birouk, 2009).

Chaque type (CMT1, CMT2 et CMT-I) peut être à transmission autosomique dominante (AD-CMT1 et AD-CMT2), autosomique récessive (AR-CMT1 ou CMT4 et AR-CMT2) ou encore liée au chromosome X (CMTX). Les formes dominantes sont en général les plus fréquentes, mais les formes autosomiques récessives prédominent dans les régions à fort taux d'endogamie, notamment en Algérie (Vallat *et al.*, 2005; Bernard *et al.*, 2006; Tazir *et al.*, 2014).

D'un point de vue moléculaire, une très grande hétérogénéité des anomalies génétiques a été rapportée pour le CMT, et leur classification actuelle repose, d'une part, sur la distinction entre formes démyélinisantes et formes axonales, et, d'autre part, sur le mode de transmission et les données de la biologie moléculaire (**Tableau I, Figure 1**) (Rossor *et al.*, 2013; Tazir *et al.*, 2014).

### **I.3. Forme CMT2B1 de la maladie de Charcot-Marie-Tooth**

#### **I.3.1. Aspects cliniques**

La forme CMT2B1 est une forme de CMT autosomique récessive axonale, décrite uniquement dans des familles d'origine Algérienne et Marocaine (Nord-Ouest de l'Algérie et Est du Maroc). Elle apparaît à la deuxième décennie, avec une atteinte des membres supérieurs (mains et avant-bras). Elle se caractérise principalement par une faiblesse et une amyotrophie distale des membres inférieurs et proximale des muscles de la ceinture pelvienne, une déformation des pieds, des troubles sensitifs douloureux qui diffèrent d'un patient à un autre. Les vitesses de conduction nerveuse sont relativement normales et la biopsie nerveuse montre des axones anormalement myélinisés, mais pas de processus de démyélinisation-remyélinisation (Bouhouche *et al.*, 1999; Chaouch *et al.*, 2003; Tazir *et al.*, 2004).

#### **I.3.2. Aspects génétiques**

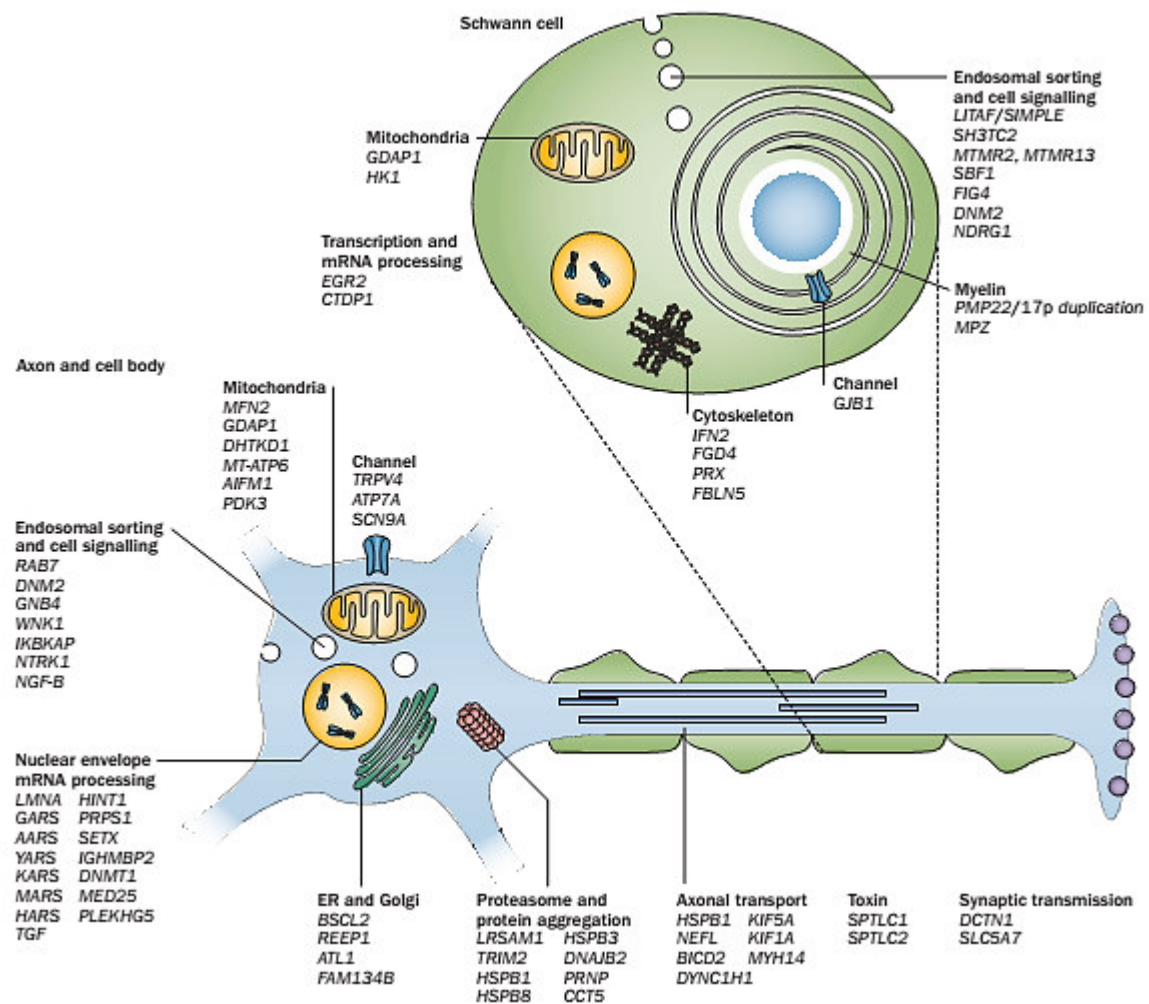
##### **I.3.2.1. Gène *LMNA***

Le gène *LMNA* est localisé en 1q21.2-q21.3 et couvre une région de 24 kb. Il est constitué de 12 exons et code pour quatre transcrits par épissage alternatif : les lamines A et C sont les deux isoformes majeures, tandis que la lamine A $\Delta$ 10 et la lamine C2 sont minoritaires et spécifiquement exprimées dans une lignée tumorale et dans la lignée germinale mâle, respectivement. Le site d'épissage alternatif différenciant la lamine C de la lamine A se situe dans l'exon 10. La partie du gène codant spécifiquement pour la lamine A correspond aux 90 premières paires de bases de l'exon 10, suivies des exons 11 et 12. La lamine C contient toute la séquence de l'exon 10 (De Sandre-Giovannoli *et al.*, 2002; Navarro *et al.*, 2008).

**Tableau I.** Classification des différentes formes de CMT (Tazir *et al.*, 2014).

Type	Gene or cytogenetic location	Age of onset	Evocative phenotypes
<b>Autosomal dominant CMT1 (AD-CMT1)</b>			
CMT1A	<i>PMP22</i> (duplication)	All ages	Classic form. Hypertrophy of nerves
HNPP	<i>PMP22</i> (deletion)	2 to 64 years	Recurrent entrapment neuropathies. Multifocal neuropathies
CMT1B	<i>MPZ</i>	1st–2nd decade	Clinically more severe than CMT1A
CMT1C	<i>LITAF</i>	Childhood	Abnormal gait. Occasional nerve hypertrophy.
CMT1D	<i>EGR2</i>	1st decade	Rarely deafness DSS/CHN. Possible cranial nerve involvement. Scoliosis
CMT1E	<i>PMP22</i>	Childhood	Associated with deafness
CMT1F	<i>NEFL</i>	1–13 years	CMT1 with early onset. Severe disease
CMT 'plus'	<i>FBLN5</i>	4th–5th decade	Skin hyperelasticity. Age-related macular degeneration
<b>Autosomal dominant CMT2 (AD-CMT2)</b>			
CMT2A	<i>MFN2</i>	6 months to 50 years	Prominent distal weakness. Late proximal weakness. Optic atrophy. CNS involvement
CMT2B	<i>RAB7</i>	2nd decade	Severe sensory loss. Foot ulcers. Arthropathy and amputations
CMT2C	<i>TRPV4</i>	Birth to 60 years	Younger more severe. Motor predominance. Vocal cord, diaphragm, respiratory involvement/dHMN
CMT2D	<i>GARS</i>	16 to 30 years	Distal upper limb predominance dHMN
CMT2E	<i>NEFL</i>	1st–5th decade	Hearing loss. Hyperkeratosis
CMT2F	<i>HSPB1</i>	Adult	Classic/dHMN
CMT2G	12q12–q13.2	2nd decade	Classic
CMT2I	<i>MPZ</i>	Late	Classic
CMT2J	<i>MPZ</i>	Late	Deafness and pupillary abnormalities
CMT2K	<i>GDAP1</i>	Variable	vocal paralysis and pyramidal features
CMT2L	<i>HSPB8</i>	15 to 33 years	Classic/dHMN
CMT2M	<i>DNM2</i>	1st–2nd decade	Tremor
CMT2N	<i>AARS</i>	15 to 50 years	Classic
CMT2O	<i>DYNC1H1</i>	Early childhood	Sometimes learning difficulties
CMT2P	<i>LRSAM1</i>	27 to 40 years	Mild. Sometimes asymmetry
CMT2Q	<i>DHTKD1</i>	13 to 25 years	Classic CMT
HMSN-P	<i>TFG</i>	17 to 55 years	Proximal involvement. Tremor. Diabetes mellitus
CMT2	<i>HARS</i>	Late onset	Sensory predominant
CMT2	<i>MARS</i>	Late onset	Motor-sensory
CMT2	<i>MT-ATP6</i>	1st–2nd decade	Motor predominant. Pyramidal signs
<b>Dominant and recessive X linked CMT</b>			
CMTX1	<i>CJB1</i>	1st–2nd decade	Classic. Occasional deafness
CMTX4	<i>AIFM1</i>	Early childhood	Mental retardation. Deafness
CMTX5	<i>PRPS1</i>	Childhood	Mild–moderate neuropathy Deafness. Late optic atrophy
CMTX6	<i>PKD3</i>	Childhood	Classic CMT
<b>Dominant intermediate CMT</b>			
DI-CMTA	10q24.1–q25.1	7 to 72 years	Classic CMT
DI-CMTB (CMT2M)	<i>DNM2</i>	1st–2nd decade	Classic CMT with neutropenia and early onset cataract
DI-CMTC	<i>YARS</i>	7–59 years	Classic CMT
DI-CMTD	<i>MPZ</i>	30–50 years	Sensory loss and weakness. Deafness/pupil disorders
DI-CMTE	<i>INF2</i>	5 to 28 years	Glomerulosclerosis and proteinuria
DI-CMTF	<i>GNB4</i>	5 to 45 years	Classic CMT
<b>Autosomal recessive CMT1 AR-CMT1 (CMT4)</b>			
AR-CMT1A	<i>GDAP1</i>	<2 years	Severe and progressive. Vocal cord and diaphragm paralysis in some cases
AR-CMT1B1	<i>MTMR2</i>	3 years	Severe CMT1. Facial/bulbar weakness. Scoliosis
AR-CMT1B2	<i>MTMR13 (SBF2)</i>	4–13 years	Severe CMT1. Glaucoma. Kyphoscoliosis
AR-CMT1B3	<i>MTMR5 (SBF1)</i>	5–11 years	Pes planus. Scoliosis
AR-CMT1C	<i>SH3TC2</i>	Early onset 1st–2nd decade	Severe to moderate CMT1 Scoliosis. Deafness
AR-CMT1D	<i>NDRG1</i>	<10 years	Severe CMT1. Deafness. Tongue atrophy
AR-CMT1E	<i>EGR2</i>	Birth	Congenital hypotonia. Respiratory failure. Arthrogyposis
AR-CMT1F	<i>PRX</i>	Birth to first decade	CMT1. Prominent sensory involvement
AR-CMT1G (HMSN-Russe)	<i>HK1</i>	8–16 years	Severe to moderate CMT1
AR-CMT1H	<i>FGD4</i>	<2 years	Delayed milestones. Scoliosis. Severe course
AR-CMT1J	<i>FIG4</i>	Congenital, childhood or adult	Severe disorder Similarities to motor neuron disease
AR-CMT1	<i>SURF1</i>	Childhood	Severe. Associated to cerebellar ataxia, brain MRI abnormalities and lactic acidosis
<b>Autosomal recessive CMT2 AR-CMT2 (CMT2)</b>			
AR-CMT2A (CMT2B1)	<i>LMNA</i>	2nd decade	Severe course. Distal and proximal weakness
AR-CMT2B (CMT2B2)	<i>MED25</i>	28 to 42 years	Classic CMT2
AR-CMT2C (CMT2B5)	<i>NEFL</i>	1st decade	Severe form
AR-CMT2F/dHMN	<i>HSPB1</i>	Variable	Sometimes proximal leg weakness
AR-CMT2H	<i>GDAP1</i>	1st decade	Pyramidal involvement. Vocal cord involvement
AR-CMT2K (rarely AD)	<i>GDAP1</i>	Early-onset form	Severe form. Vocal cord paralysis. Skeletal deformities. Milder dominant form
AR-CMT2P (HMSN VI)	<i>LRSAM1</i>	3rd–4th decade	Cramps. Erectile dysfunction
ARAN-NM	<i>MFN2</i>	Early onset	Optic atrophy
GAN	<i>HINT1</i>	1st decade	Neuromyotonia
GAN	<i>GAN</i>	Childhood	Severe axonal neuropathy with early onset CNS involvement. Milder form CMT-like

Abbreviations: AARS, alanyl-tRNA synthetase; AD, autosomal dominant; AIFM1, apoptosis-inducing factor mitochondrion-associated 1; AR, autosomal recessive; CHN, congenital hypomyelinating neuropathy; CNS, central nervous system; DHTKD1, dehydrogenase E1 and transketolase domain-containing 1; DI, dominant intermediate; DNM2, dynamin 2; DSS, Dejerine Sottas Syndrome; DYNC1H1, dynein cytoplasmic 1 heavy chain 1; EGR2, early growth response 2; FBLN5, fibulin 5; FGD4, actin filament-binding protein frabin; FIG4, FIG4 homolog SAC1 lipid phosphatase domain containing; GAN, Giant axonal neuropathy; CJB1, gap-junction protein  $\beta$ -1; GARS, glycyl-tRNA synthetase; GDAP1, ganglioside-induced differentiation-associated protein 1; HARS, histidyl-tRNA synthetase; HK1, hexokinase 1; dHMN, distal hereditary motor neuropathy; HMSN, hereditary motor and sensory neuropathy; HNPP, hereditary neuropathy with liability to pressure palsies; HSPB1, heat shock protein B1; HSPB8, heat shock protein B8; LITAF, lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor; LMNA, lamin A/C; LRSAM1, leucine-rich repeats and sterile alpha motif-containing 1; MARS, methionyl-tRNA synthetase; MED25, mediator complex subunit 25; INF2, inverted formin 2; MFN2, mitofusin 2; MPZ, myelin protein zero; MT-ATP6, ATP6 subunit of the mitochondrial ATP synthase; MTMR2, myotubularin-related protein 2; MTMR5, myotubularin-related protein 5; MTMR13, myotubularin-related protein 13; NDRG1, N-myc downstream-regulated gene 1 protein; NEFL, neurofilament light chain; PDK3, pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 3; PMP22, peripheral myelin protein 22; PRPS1, phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1; PRX, periaxin; RAB7, RAS-associated protein RAB7; SBF1, SET binding factor 1; SBF2, SET binding factor 2; SH3TC2, SH3 domain and tetratricopeptides repeats 2; SURF1, Surfteil 1; TFG, TRK-fused gene; TRPV4, transient receptor potential cation channel subfamily V member 4; YARS, tyrosyl-tRNA synthetase.



**Figure 1.** Gènes connus responsables des différentes formes de la maladie de Charcot-Marie-Tooth, troubles associés et patho-mécanismes proposés (Rossor *et al.*, 2013).

### **I.3.2.2. Altérations moléculaires dans *LMNA* et mutation c.892C>T (p.Arg298Cys)**

Des centaines de mutations dans le gène *LMNA* sont associées à un large spectre d'affections (une vingtaine de pathologies multi-systémiques ou tissus-spécifiques) faisant partie des laminopathies, tels que la dystrophie musculaire d'Emery-Dreyfus autosomique dominante (AD-EDMD), la dermatopathie restrictive (RD), la dystrophie musculaire des ceintures de types 1B (LGMD1B), le syndrome de Hutchinson-Gilford, ... (Navarro *et al.*, 2006; Worman et Bonne, 2008).

L'implication du gène *LMNA* dans la neuropathie CMT2B1 a été initialement démontrée par cartographie par homozygotie dans des familles consanguines Marocaines et Algériennes, alors que l'étude de familles algériennes a permis d'identifier, chez les individus atteints, la mutation à effet fondateur c.892C>T dans le gène *LMNA*, seule mutation dans ce gène à l'origine d'une neuropathie périphérique pure (Bouhouche *et al.*, 1999; De Sandre-Giovannoli *et al.*, 2002; Bouhouche *et al.*, 2007; Hamadouche *et al.*, 2008).

La mutation c.892C>T (p.Arg298Cys) conduit à une substitution de l'acide aminé arginine en cystéine localisé dans le domaine  $\alpha$ -hélicoïdal de la protéine LMNA, affectant ainsi les quatre produits de transcription du gène et altérant un domaine essentiel pour les interactions protéine-protéine qui assurent la régulation du développement des axones et/ou leur survie et le maintien de la fonction cellulaire (De Sandre-Giovannoli *et al.*, 2002; Mounkes *et al.*, 2003).

### **I.3.2.3. Protéines lamines A/C**

Les lamines A (70 kDa, 646 acides aminés) et C (65 kDa, 572 acides aminés) sont les principales isoformes des lamines, obtenues à partir de deux transcrits alternatifs du gène *LMNA* (identiques pour les 566 premiers acides aminés). Elles font partie des lamines nucléaires tapissant la face interne de la membrane nucléaire. Ces protéines ubiquitaires ont un rôle structural et interagissent avec des facteurs de transcription régulant l'expression des gènes, intervenant ainsi dans plusieurs processus cellulaires. La mutation p.Arg298Cys, où l'arginine est un acide aminé conservé, se situe au niveau du domaine central et affecterait probablement l'interaction de la lamine avec un ou plusieurs de ses partenaires protéiques exprimés dans les tissus nerveux (Capell *et al.*, 2006; Worman et Bonne, 2007).

La lamina nucléaire agit comme un élastique qui préserve l'intégrité du noyau, et les lamines A et C contribuent principalement à cette rigidité nucléaire. La lamina est en lien avec le cytosquelette et la membrane plasmique via un réseau d'interactions protéiques à la chromatine et à d'autres protéines de l'enveloppe, créant ainsi une connexion physique entre l'intérieur du noyau et le cytoplasme. Ces interactions, sont nécessaires à la localisation correcte de ces protéines et jouent un rôle crucial dans le positionnement du noyau lors de la migration cellulaire, lors de la différenciation des fibres musculaires où le noyau migre sous la jonction neuromusculaire, et permettent l'ancrage du noyau au sein des cellules (Mounkes *et al.*, 2003; Capell *et al.*, 2006; Starr et Fridolfsson, 2010).

Les lamines A/C jouent aussi un rôle important dans le contrôle de l'expression génique en modulant l'organisation de la chromatine, à travers des interactions directes avec l'ADN et les histones mais aussi via de nombreux facteurs transcription (Capell *et al.*, 2006; Worman et Bonne, 2007).

### **I.3.3. Diagnostic moléculaire**

Le diagnostic de CMT2B1 commence par la détermination du mode de transmission autosomique récessif. Un diagnostic clinique attentif permet d'écartier d'autres formes d'AR-CMT étant donné que certains critères peuvent être révélateurs, tel que l'âge d'apparition des symptômes qui, contrairement aux autres formes, apparaît généralement pour CMT2B1 durant la deuxième décennie. L'électromyogramme (EMG) permet de confirmer l'atteinte axonale. Le diagnostic moléculaire reste cependant le plus précis, reposant sur la mise en évidence de l'unique mutation incriminée pour ce phénotype, c.892C>T, dans l'exon 5 du gène *LMNA*. Le criblage de cette mutation peut alors se faire par simple technique PCR-RFLP (De Sandre-Giovannoli *et al.*, 2002, Chaouch *et al.*, 2003).

En Algérie, un diagnostic moléculaire peut être effectué dès lors qu'un patient présente une neuropathie périphérique récessive étant donné que la forme CMT2B1 est la forme la plus fréquemment rencontrée, notamment chez les patients originaires du Nord-Ouest du pays en raison d'un effet fondateur (De Sandre-Giovannoli *et al.*, 2002; Bernard *et al.*, 2006; Hamadouche *et al.*, 2008).

## **II. Amyotrophie spinale progressive ou ASP**

### **II.1. Définition**

Les amyotrophies spinales progressives (ASP) (ou SMA, *Spinal Muscular Atrophies*) sont des maladies autosomiques récessives, caractérisées par une dégénérescence des motoneurons alpha des cellules de la corne antérieure de la moelle épinière, entraînant une atrophie et une faiblesse musculaire proximale progressive et, dans les formes les plus sévères, une paralysie. Elles représentent aussi la cause génétique principale de la mortalité infantile (Abane, 2006; Verhaart *et al.*, 2017).

### **II.2. Différents types d'amyotrophies spinales progressives**

Les amyotrophies spinales progressives sont classées selon l'âge de début des symptômes et la sévérité du phénotype, individualisant quatre types (Ogino *et al.*, 2004; Abane, 2006) :

- La maladie aiguë de Werdnig-Hoffmann (type I), se caractérisant par l'apparition d'une faiblesse musculaire sévère et une hypotonie dans les premiers stades de la vie, avec une insuffisance respiratoire fatale qui se produit généralement avant l'âge de 2 ans. Les neurones sensoriels peuvent également être affectés chez les patients ASP de type I.

- La forme intermédiaire (type II), où il y a apparition d'une faiblesse musculaire proximale précoce (avant 18 mois), la capacité de s'asseoir mais pas de marcher sans aide, et une survie au-delà de 4 ans.

- La maladie de Kugelberg-Welander (type III), caractérisée par l'apparition d'une faiblesse musculaire proximale après l'âge de 2 ans, la capacité de marcher indépendamment jusqu'à ce que la maladie progresse, et la survie jusqu'à l'âge adulte. L'ASP de type III peut être subdivisée en types IIIa et type IIIb, en fonction de l'âge d'apparition (type IIIa avant 3 ans et type IIIb après 3 ans).

- Enfin, la forme adulte (type IV), qui est une forme atypique d'ASP, définie par un âge de début après 30 ans.

### II.3. Épidémiologie des amyotrophies spinales progressives

Les études épidémiologiques ont montré que les amyotrophies spinales avaient une incidence variant de 1/10.000 à 1/25.000 naissances, l'amyotrophie spinale étant, après la dystrophie musculaire de Duchenne, la maladie neuromusculaire la plus fréquente chez l'enfant. Elles sont, parmi les maladies à transmission autosomique récessive létales les plus fréquentes après la mucoviscidose (Lefebvre *et al.*, 1995; Abane, 2006; Verhaart *et al.*, 2017).

Près d'un individu sur 40 en est porteur sain, de même qu'un sexe ratio (femmes: hommes) de 0.66 témoigne d'une nette prédominance masculine. La consanguinité est un facteur favorisant surtout dans les pays méditerranéens et moyens orientaux où la prévalence est parfois multipliée par 10 (Souirti *et al.*, 2009; Verhaart *et al.*, 2017).

### II.4. Diagnostic des ASP

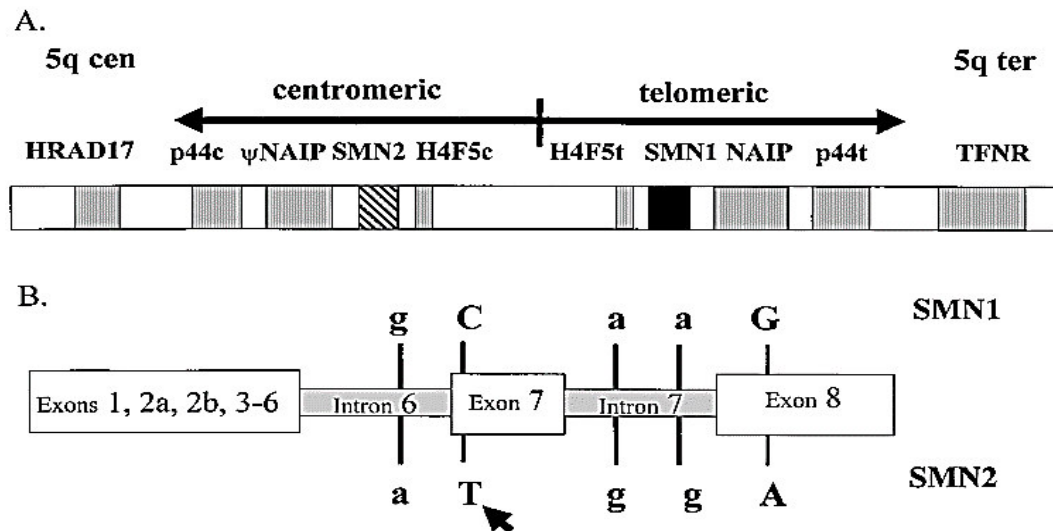
Le diagnostic des ASP est avant tout clinique, mais le diagnostic moléculaire en amène la certitude. Sa pratique est généralisée est quasi-systématique dès que la clinique est évocatrice, ayant supplanté tous les autres moyens diagnostiques paracliniques, en particulier la biopsie musculaire et l'électromyogramme (Abane, 2006).

### II.5. Gènes impliqués dans les amyotrophies spinales progressives

#### II.5.1. Gène *SMN* et protéine SMN

Le gène déterminant d'ASP, *SMN* (*Survival Motor Neuron*) (ou *SMN* ou *SMN1*) pour le différencier de sa copie centromérique *SMNc* (ou *SMN2*), est un petit gène de 20 kb et de 9 exons, codant une protéine ubiquitaire de 32 kDa (294 acides aminés) (Lefebvre *et al.*, 1995).

La région chromosomique contenant le gène *SMN* est dupliquée en miroir, *SMN* (*SMN1*) se situant dans sa partie télomérique alors que *SMNc* (*SMN2*) est localisé dans sa partie centromérique. Bien que *SMN1* et *SMN2* aient une homologie de séquence très élevée, ne différant que de 5 paires de bases dont un seul nucléotide en séquence codante, *SMN1* produit en majorité un transcrit complet alors que le transcrit majoritaire de *SMN2* ne contient pas d'exon 7 (**Figure 2**) (Monani *et al.*, 1999; Cotton, 2000).



**Figure 2.** **A.** Représentation schématique de la région SMA inversée dupliquée, comprenant quatre gènes : *H4F5*, *SMN*, *NAIP* et *p44*. La région est flanquée de *HRAD17* et de *TFNR*. **B.** Localisation des nucléotides par lesquels *SMN1* peut être distingué de *SMN2*(Cotton, 2000).

La différence nucléotidique (transition C>T) dans la séquence codante de l'exon7 de *SMN2* ne modifie pas un acide aminé, mais affecte l'épissage et provoque l'absence de l'exon 7 dans 90% des transcrits de *SMN2*(Lorson *et al.*, 1999).

La protéine SMN est essentielle pour la biogenèse des petits ARN nucléaires (snRNA) et les ribonucléoprotéines (snRNP), les principaux composants de la machinerie d'épissage des pré-ARNm. La SMN unrip (unr-interacting protein), avec les protéines Gemins2-8, forment un complexe macromoléculaire fonctionnel dans l'assemblage des petites ribonucléoprotéines nucléaires(Gabanella *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008).

### II.5.2. Mutations retrouvées chez les patients atteints d'ASP

L'absence du gène *SMN1* à l'état homozygote est plus fréquemment observée chez les patients atteints d'ASP I et II (96% et 94%, respectivement) que chez les patients atteints d'ASP III (86%). Alors que la majorité des patients ASP I sont porteurs de réelles délétions de *SMN1*, une partie des patients ASP II et III présentent une absence du gène *SMN1* à l'état homozygote en raison de la conversion de *SMN1* en *SMN2*, générant une augmentation du nombre de copies du gène *SMN2*. Cette conversion porte soit sur le gène entier, soit sur une partie de celui-ci(Wirth *et al.*, 1999; Ogino *et al.*, 2003).

De plus, plusieurs autres mutations ponctuelles ont été identifiées, parmi lesquelles des mutations non-sens ou 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 et il a été montré que ces mutations réduisaient la capacité d'oligomérisation de la protéine SMN (Lorson *et al.*, 1998; Wirth *et al.*, 1999).

### II.5.3. Autres gènes impliqués

Identifié en même temps que *SMN*, *NAIP* (*Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein*), code pour une protéine qui interviendrait dans le processus programmé naturel de la mort cellulaire. La délétion du gène *NAIP* entraînerait l'absence de cette protéine et la survenue précoce de la mort motoneuronale. Le gène *NAIP* est fréquemment muté chez les patients atteints d'ASP, avec des suppressions homozygotes chez 45-67% des patients ASP de type I et 20-42% de type II/III, respectivement (Chang *et al.*, 1997).

Le gène *P44* code l'une des sous-unités du complexe de transcription général TFIIF et est retrouvé muté chez 15% des malades atteints d'amyotrophie spinale, toutes formes confondues (Bürglen *et al.*, 1997).

## II.6. Corrélations phénotype/génotype

La protéine SMN, produit du gène *SMN*, est d'expression ubiquitaire et son niveau d'expression est étroitement corrélé au phénotype morbide. Les faibles niveaux de SMN ne sont en effet pas suffisants pour soutenir la survie et la fonction des neurones moteurs, conduisant ainsi à la dénervation musculaire progressive, la dégénérescence axonale et à la perte éventuelle des neurones moteurs de la colonne vertébrale (Fallini *et al.*, 2012).

Il n'y a toutefois pas de corrélation entre la taille des délétions au niveau du gène *SMN1* et la sévérité clinique d'ASP, quoiqu'il existe une relation étroite entre le nombre de copies du gène *SMN2* et la gravité de l'ASP, ce qui suggère que la détermination de nombre de copies *SMN2* peut être un bon indicateur du type d'ASP (Sifi *et al.*, 2013).

# **MATERIEL ET METHODES**

## I. Patients

Notre travail a porté sur un panel de 18 patients Algériens (C1 à C18), qui avaient été amenés à consulter au niveau du Service de Neurologie du Centre Hospitalo-Universitaire d'Alger Centre durant le premier semestre de l'année 2018, pour un diagnostic génétique confortant ou écartant une suspicion clinique de neuropathie périphérique de type maladie de Charcot-Marie-Tooth CMT2B1, ensuite complété durant nos explorations moléculaires par un test génétique pour l'amyotrophie spinale proximale.

## II. Méthodes

### II.1. Extraction d'ADN génomique total par kit QIAmp DNA Mini Kit<sup>®</sup> (Qiagen<sup>®</sup>)

- **Principe**

Le principe de cette extraction repose sur les propriétés de liaison sélective de composés sur une membrane à base de silice (SiO<sub>2</sub>) tapissant la colonne d'extraction. En effet, dans les conditions chimiques apportées par la composition des différents tampons, l'ADN se lie à la membrane de silice tandis que les contaminants passent à travers. La précipitation de l'ADN est provoquée par l'ajout d'éthanol. La liaison de l'ADN à la membrane est réalisée grâce au transfert du mélange dans la colonne d'extraction, alors que deux lavages permettent successivement l'élimination des protéines, puis des sels. L'élution de l'ADN est accomplie en le décrochant de la membrane par l'ajout d'un tampon aqueux.

- **Mode opératoire**

1. Préparer un culot de globules blancs par lyse des globules rouges du sang total dans une solution SLR (10 mM Tris, pH 7.6, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaCl).
2. Rajouter 200 µl de tampon de lyse AL<sup>®</sup> à 200 µl de culot de globules blancs.
3. Rajouter 20 µl de Protéinase K et vortexer pendant 15 sec.
4. Incuber à 65°C pendant 30 min.
5. Rajouter 200 µl d'Ethanol 100% et vortexer.
6. Déposer le mélange dans une colonne disposée sur un tube de collecte et centrifuger à 10.000 tpm pendant 2 min.

7. Placer la colonne sur un nouveau tube de collecte, y rajouter 500 µl de tampon de lavage AW1<sup>®</sup> et centrifuger à 10.000 tpm pendant 2 min.
8. Placer la colonne sur un nouveau tube de collecte, y rajouter 500 µl de tampon de lavage AW2<sup>®</sup> et centrifuger à 10.000 tpm pendant 2 min.
9. Placer la colonne sur un microtube de 1.5 ml, y rajouter 200 µl de tampon TE, laisser incuber pendant 5 min à température ambiante et centrifuger à 10.000 tpm pendant 1 min.

## II.2. Estimation qualitative et semi-quantitative des ADN extraits des patients par électrophorèse sur gel d'agarose

- **Principe**

L'électrophorèse en gel d'agarose est une technique de biologie moléculaire qui est utilisée à des fins analytiques pour séparer et identifier des fragments d'ADN, et pour déterminer leur taille et en estimer la quantité. Placés dans un gel d'agarose et soumis à un champ électrique, des fragments d'ADN de taille différente migrent ainsi plus ou moins rapidement suivant leur masse moléculaire. L'estimation de la quantité d'ADN peut également être effectuée en la comparant à une gamme d'ADN de concentrations connues (ADN du phage  $\lambda$  à différentes concentrations) (Sambrook *et al.*, 1989).

- **Mode opératoire**

1. Préparer un gel d'agarose à 1 % dans du tampon TBE 1x (89 mM Tris, 89 mM Acide borique, 2 mM EDTA, pH 8.0) supplémenté de 0.5 µg/ml de Bromure d'éthidium (Promega<sup>®</sup>).
2. Préparer les échantillons à déposer : 1 µl ADN génomique + 9 µl H<sub>2</sub>O + 5 µl Bleu de dépôt (0.05% Bleu de bromophénol, 60% Glycérol).
3. Préparer la gamme de concentration à partir d'un ADN  $\lambda$  (50 ng/µl, Pharmacia<sup>®</sup>) : 100 ng, 200 ng et 300 ng.
4. Déposer les échantillons et la gamme dans les puits du gel.
5. Lancer l'électrophorèse dans du tampon TBE 1x pendant 30 min à 100 V.
6. Visualiser l'ADN sous rayons UV.

### II.3. Amplification par PCR de l'exon 5 du gène *LMNA* ou de l'exon 7 des gènes *SMN/SMNc*

- **Principe**

La PCR ("Polymerase Chain Reaction") est une technique qui repose sur la capacité d'une enzyme, la Taq polymérase, à synthétiser de manière cyclique le brin complémentaire d'un ADN servant de matrice. Elle consiste à amplifier un fragment d'ADN spécifique délimité par des amorces, constituées de 17 à 30 bases, dont l'association à l'ADN cible est suivie d'une élongation par la Taq polymérase, aboutissant à la synthèse d'un ADN double brin. Cette amplification est répétée successivement 20 à 35 fois dans un appareil dénommé thermocycler, afin d'obtenir une quantité d'ADN suffisante pour être détectée. Chacun des cycles est constitué d'une étape de dénaturation, qui permet la séparation des deux brins d'ADN à 94-96°C pendant 30 secondes, d'une étape d'hybridation de la matrice avec les amorces (la température d'hybridation étant définie selon la séquence des amorces entre 45-60°C) et enfin d'une étape d'élongation de l'ADN par la Taq polymérase à partir des amorces, réalisée à 72°C entre 30 secondes et 5 minutes selon la longueur du fragment d'ADN qui doit être amplifié (Mullis *et al.*, 1994).

Durant notre mémoire nous avons utilisé la PCR pour amplifier l'exon 5 du gène *LMNA* ou l'exon 7 des gènes *SMN/SMNc*, siège d'altérations moléculaires impliquées respectivement dans la forme CMT2B1 de neuropathie périphérique (De Sandre-Giovannoli *et al.*, 2002) ou l'amyotrophie spinale proximale ASP (van der Steege *et al.*, 1995).

- **Mode opératoire**

1. La PCR a été réalisée dans un volume final de 25 µl contenant :
  - 50 ng d'ADN génomique
  - 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Promega<sup>®</sup>)
  - 0.2 mM de chacun des quatre dNTPs (Promega<sup>®</sup>)
  - 20 pmol de chacune des deux amorces (Eurogentec<sup>®</sup>)
  - 1 U de Taq polymérase (Promega<sup>®</sup>)dans un tampon PCR 1x (Promega<sup>®</sup>) final.

2. Le thermocycler est programmé pour exécuter le profil d'amplification :
- CMT2B1 - 94°C, 5min  
 - [94°C, 30 sec - 55°C, 30 sec - 72°C, 30 sec] 35x  
 - 72°C, 5 min  
 - 4°C, infini
- ASP - 94°C, 5min  
 - [94°C, 30 sec - 57°C, 30 sec - 72°C, 30 sec] 35x  
 - 72°C, 5 min  
 - 4°C, infini

#### II.4. Révélation des produits d'amplification par électrophorèse sur gel d'agarose

- **Principe**

Le contrôle des produits PCR se base sur le principe de la séparation et l'identification des fragments d'ADN amplifié d'éventuels fragments non spécifiques en fonction de leur taille et leur purification du reste des réactifs d'amplification dans un champ électrique homogène (Sambrook *et al.*, 1989).

- **Mode opératoire**

1. Préparer un gel d'agarose à 1.5% dans du tampon TBE 1x (89 mM Tris, 89 mM Acide borique, 2 mM EDTA, pH 8.0) supplémenté de 0.5 µg/ml de Bromure d'éthidium (Promega®).
2. Préparer les échantillons à déposer : 5 µl produit PCR + 5 µl Bleu de dépôt (0.05% Bleu de bromophénol, 60% Glycérol).
3. Préparer le marqueur de taille : 1 µl de marqueur de taille (100-base pair ladder, Pharmacia®) + 9 µl H<sub>2</sub>O + 5 µl Bleu de dépôt.
4. Déposer les échantillons et le marqueur de taille dans les puits du gel.
5. Lancer l'électrophorèse dans du tampon TBE 1x pendant 1 h à 100 V.
6. Visualiser les produits d'amplification sous rayons UV.

## II.5. Restriction enzymatique de l'exon 5 du gène *LMNA* par l'enzyme *AciI* ou de l'exon 7 des gènes *SMN/SMNc* par l'enzyme *DraI*

### • Principe

Les enzymes de restriction reconnaissent des séquences nucléotidiques spécifiques dans l'ADN double brin et le clivent en des points spécifiques, les sites de restriction. L'abolition ou la création d'un site de restriction dans une séquence mutée, comparativement à une séquence normale, produit alors des différences de longueur des fragments de digestion, que l'électrophorèse sur gel d'agarose permet d'individualiser pour dresser le profil de restriction correspondant (Sambrook *et al.*, 1989).

Dans notre travail, les enzymes que nous avons utilisées sont *AciI* pour CMT2B1 ou *DraI* pour ASP, qui reconnaissent les sites de restriction suivants :



### • Mode opératoire

1. Préparer la réaction de digestion en ajoutant à 20 µl de produits PCR, 5 µl de mix de digestion composé de 2.5 U d'enzyme *AciI* (Biolabs<sup>®</sup>) pour CMT2B1 ou *DraI* (Biolabs<sup>®</sup>) pour ASP dans un tampon de restriction 1x final.
2. Incuber à 37°C toute une nuit.
3. Préparer un gel d'agarose à 2.5% dans du tampon TBE 1x, supplémenté de 0.5 µg/ml de Bromure d'éthidium (Promega<sup>®</sup>).
4. Préparer les échantillons à déposer : 25 µl produit digestion + 5 µl Bleu de dépôt (0.05% Bleu de bromophénol, 60% Glycérol).
5. Préparer le marqueur de taille : 1 µl de marqueur de taille (100-base pair ladder, Pharmacia<sup>®</sup>) + 9 µl H<sub>2</sub>O + 5 µl Bleu de dépôt.
6. Déposer les produits de digestion et le marqueur de taille dans les puits du gel.
7. Lancer l'électrophorèse dans du tampon TBE 1x pendant 1h30 à 100 V.
8. Visualiser les produits d'amplification sous rayons UV.

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

## I. Données cliniques et généalogiques

Notre travail au sein du Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Faculté des Sciences de l'UMBB a principalement porté sur le diagnostic moléculaire de la neuropathie héréditaire sensitivo-motrice de type CMT2B1 pour 18 patients Algériens, tous issus de familles indépendantes, qui étaient suivis au niveau du Service de Neurologie du Centre Hospitalo-Universitaire d'Alger Centre (**Tableau II**), et pour lesquels nous avons été amenées à tester la présence de la mutation c.892C>T dans le gène *LMNA*.

**Tableau II.** Données cliniques sur les patients atteints de la maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) explorés (AR-CMT, CMT à transmission autosomique récessive; AR-CMT1, CMT démyélinisant à transmission autosomique récessive; AR-CMT2, CMT axonal à transmission autosomique récessive; CMT2, CMT axonal; CMT2B1, CMT axonal de type CMT2B1; F, féminin; M, masculin).

Patients	Sexe	Age	Clinique
C1	M	15 ans	AR-CMT
C2	F	22 ans	AR-CMT
C3	M	19 ans	CMT
C4	M	23 ans	CMT2B1
C5	F	12 ans	CMT
C6	F	13 ans	CMT2
C7	F	27 ans	CMT
C8	M	32 ans	CMT
C9	F	15 ans	CMT
C10	M	24 ans	AR-CMT2
C11	F	12 ans	CMT2
C12	F	17 ans	CMT2B1
C13	M	11 ans	AR-CMT1
C14	M	22 ans	CMT
C15	F	21 ans	CMT
C16	M	16 ans	AR-CMT1
C17	F	14 ans	CMT2B1
C18	M	31 ans	CMT

Le diagnostic clinique de CMT2B1 pouvait en effet être tout à fait plausible pour nos patients étant donné que cette forme de CMT est décrite comme la forme la plus fréquente de neuropathie héréditaire sensitivo-motrice en Algérie, rendant d'ailleurs compte d'une grande partie de toutes les formes de la maladie de Charcot-Marie-Tooth dans les familles de notre population (Hamadouche *et al.*, 2008; Tazir *et al.*, 2014).

Une suspicion clinique de la forme CMT2B1 avait en effet été clairement posée pour 3 d'entre eux (C4, C12 et C17), voire de manière moins affirmée pour les patients C1 et C2 (CMT à transmission autosomique récessive, AR-CMT), C10 (AR-CMT2, axonal), ou C13 et C16 (AR-CMT1, démyélinisant), mais indiquant un mode de transmission autosomique récessif de la maladie, tout à fait compatible avec le mode de ségrégation de cette forme de CMT.

Pour les patients C6 et C11 (CMT2, axonal), une atteinte axonale avait également été soulevée, en accord avec les données électrophysiologiques connues pour cette forme de neuropathie (Bouhouche *et al.*, 1999; Chaouch *et al.*, 2003 et Tazir *et al.*, 2004), mais sans toutefois être plus précis sur la ségrégation de l'atteinte dans la famille.

Enfin, 8 des patients de notre panel (C3, C5, C7, C8, C9, C14, C15 et C18) (soit près de la moitié) n'avaient que pour étiquette clinique CMT (maladie de Charcot-Marie-Tooth), sans autre indication ni sur l'atteinte des nerfs périphériques (axonale ou démyélinisante), ni sur le mode de transmission de leur maladie.

Bien que l'étendue des âges de nos patients était assez large, s'étalant de 11 à 32 ans, nous avons tout de même noté que plus de la moitié d'entre eux (10 sur 18, soit 55%) s'étaient vus poser un diagnostic de leur maladie au plus tard durant la deuxième décennie (10 à 20 ans), alors qu'un tiers d'entre eux (6 sur 18, soit 33%) avaient été diagnostiqués durant la troisième décennie (20-30 ans) de leur vie, voire pour leur grande majorité avant 24 ans.

Ces données s'accordent tout à fait avec les descriptions cliniques précédemment faites par Chaouch *et al.*, 2003 et Tazir *et al.*, 2004 sur des cohortes de patients Algériens, et ayant souligné que l'âge de début de la maladie pour la forme CMT2B1 suspectée pouvait s'étendre de la première à la troisième décennie avec toutefois une évolutivité variable.

Un sexe ratio (hommes: femmes) de 9:9, soit 1.0, caractérisait notre panel de malades, n'indiquant aucune prédominance pour l'un ou l'autre sexe, compatible avec un mode de ségrégation autosomique indépendant du sexe.

Compte tenu du peu de renseignements cliniques, électrophysiologiques, anatomo-pathologiques ou généalogiques disponibles, et qui auraient pourtant donné tout son sens à notre protocole diagnostique, on pouvait toutefois d'emblée s'attendre à ce qu'un certain nombre d'entre eux se retrouvent sans résultat moléculaire positif, raison pour laquelle nous pouvions envisager d'étendre nos explorations moléculaires à d'autres pathologies.

## **II. Extraction de l'ADN génomique total et estimation qualitative et semi-quantitative**

L'extraction et la purification des acides nucléiques constituent les étapes cruciales dans la majorité des études de biologie moléculaire, notamment car la quantité et la pureté de ces acides nucléiques comptent parmi les facteurs les plus critiques pour l'analyse PCR.

La première étape de notre travail était donc d'obtenir de l'ADN à partir de nos patients, un ADN génomique total qui peut être extrait à partir de diverses sources tissulaires ou cellulaires, voire même de biopsies nerveuses dans le contexte des neuropathies qui affectent les nerfs périphériques, quoique par défaut d'inaccessibilité de ce substrat biologique et compte tenu de la nature héréditaire de la maladie, l'ADN pouvait fort heureusement être isolé d'une autre source plus accessible, telle le sang périphérique.

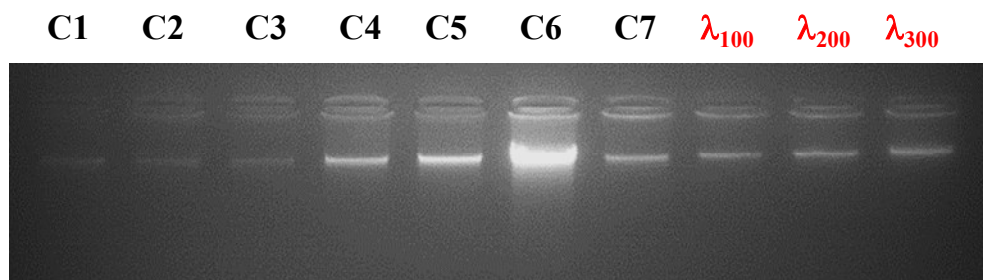
Simple à obtenir et ne nécessitant que quelques millilitres de sang, l'extraction de l'ADN génomique est ainsi facilement réalisable de manière rapide, générant une quantité de qualité satisfaisante, et garantissant le succès, du prélèvement de l'échantillon jusqu'à l'obtention des résultats.

Nous avons choisi la méthode d'extraction de l'ADN génomique à l'aide d'un kit (QIAmp DNA Mini Kit<sup>®</sup> de Qiagen<sup>®</sup>), en raison de sa disponibilité.

Ce kit offre en effet l'avantage de minimiser l'interaction avec l'utilisateur, ce qui permet de manipuler des échantillons accessibles en petite quantité ou potentiellement

infectieux en toute sécurité. Les procédures de cette extraction sont également conçues pour limiter la contamination croisée d'un échantillon à l'autre, ce qui fait d'elle une méthode simple, très rapide, rentable et sécurisée.

Comme l'illustre la **Figure 3**, montrant la migration électrophorétique sur gel d'agarose 1% de quelques ADN génomiques totaux extraits à partir de nos patients, ces extraits étaient en quantité importante et suffisante (comparativement à une gamme de concentration d'un ADN contrôle lambda à 100, 200 et 300 ng) et de bonne qualité (comme en témoigne la présence d'une seule bande intense unique et non dégradée), critères qui attestent des avantages de cette technique d'extraction et qui nous permettaient surtout d'entreprendre les explorations moléculaires envisagées.



**Figure 3.** Estimation qualitative et semi-quantitative, après électrophorèse sur gel d'agarose 1% en présence de bromure d'éthidium (0.5 µg/ml), de quelques ADN génomiques extraits à partir de sang périphérique prélevés chez nos malades. C1 à C7, ADN génomiques extraits à partir des patients C1 à C7. λ<sub>100</sub>, λ<sub>200</sub>, λ<sub>300</sub>, gamme de concentrations réalisée à partir d'un ADN λ. Le sens de migration est de haut vers bas.

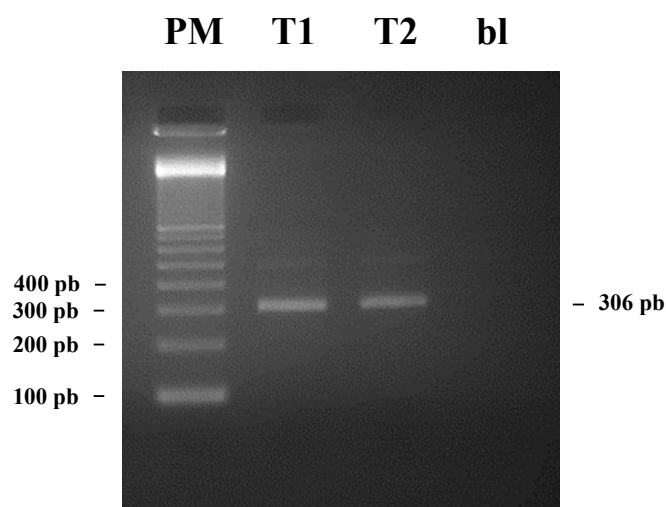
### III. Amplification par PCR de l'exon 5 du gène *LMNA*, région cible de la mutation c.892C>T (p.Arg298Cys)

Le but et l'utilité de la PCR étant d'obtenir une quantité d'ADN suffisamment importante d'un fragment cible pour des analyses ultérieures, une fois l'étape d'extraction des ADN génomiques totaux réalisée chez tous nos patients, nous avons entrepris d'amplifier l'exon 5 du gène *LMNA* en vue de conduire le diagnostic moléculaire de la forme de

neuropathie périphérique à transmission autosomique récessive CMT2B1 en recherchant la mutation c.892C>T (p.Arg298Cys) qui siège dans cette partie du gène.

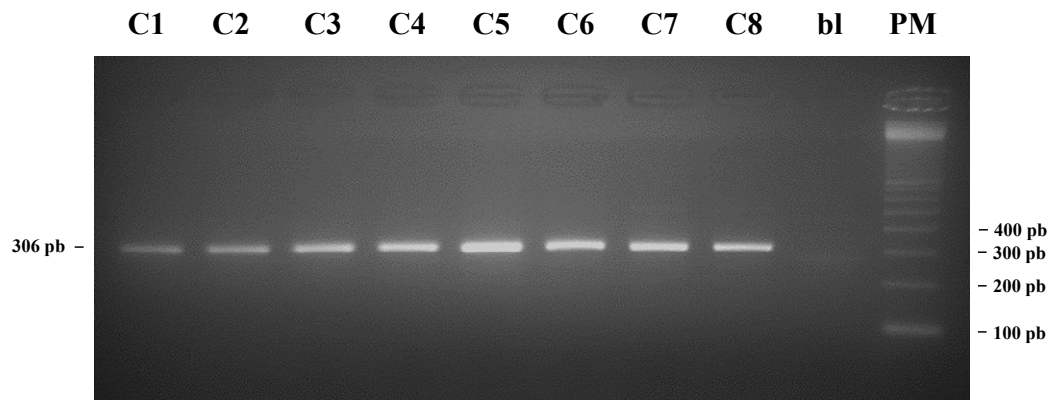
Cette mutation est en effet l'altération exclusivement responsable de la forme CMT2B1, en raison d'un effet fondateur avéré dans les familles principalement et majoritairement Algériennes originaires du Bassin Méditerranéen, alors que la forte prévalence de cette maladie est due au fort taux d'endogamie qui caractérise notre population (De Sandre-Giovannoli *et al.*, 2002; Hamadouche *et al.*, 2008).

Toutefois, avant de réaliser l'amplification ciblée de cette région chez nos patients, nous avons d'abord validé l'étape PCR du protocole en la réalisant chez deux individus témoins, T1 et T2, montrant ainsi que les conditions opératoires permettaient d'obtenir un produit à la taille attendue de 306 pb, sans aucune autre amplification aspécifique, et en quantité suffisante pour l'étape subséquente du diagnostic (**Figure 4**).



**Figure 4.** Profils d'amplification après électrophorèse sur gel d'agarose 1.5 % obtenus après amplification de l'exon 5 du gène *LMNA* chez deux individus témoins. T1 et T2, individus témoins. bl, blanc PCR. PM, marqueur de taille 100-base pair ladder<sup>®</sup>. A droite est indiquée la taille attendue du produit PCR (306 pb). Le sens de migration est de haut vers bas.

Sur la base de ces résultats, nous avons alors suivi le même protocole pour chacun de nos 18 patients, remplissant de fait les mêmes critères de réussite permettant de réaliser le protocole pour connaître leur statut génétique vis-à-vis de la mutation c.892C>T recherchée, comme le montre l'obtention d'un produit spécifique de 306 pb, en quantité suffisante et sans autre produit d'amplification parasite ou contamination (**Figure 5**).



**Figure 5.** Profils d'amplification après électrophorèse sur gel d'agarose 1.5 % obtenus après amplification de l'exon 5 du gène *LMNA* chez quelques patients (C1 à C8). C1 à C8, patients C1 à C8. bl, blanc PCR. PM, marqueur de taille 100-base pair ladder<sup>®</sup>. A gauche est indiquée la taille attendue du produit PCR (306 pb). Le sens de migration est de haut vers bas.

#### IV. Etablissement du statut génétique des 18 patients après digestion par l'enzyme *AciI* de l'exon 5 du gène *LMNA*

Les produits d'amplification de l'exon 5 du gène *LMNA*, siège de la mutation c.892C>T, ayant été obtenus pour tous nos 18 patients, la suite de notre protocole consistait à établir le statut génétique de chacun d'eux par PCR-RFLP en utilisant l'enzyme de restriction spécifique *AciI*.

En effet, la mutation c.892C>T qui affecte le gène *LMNA* génère, au niveau de la séquence codante de l'exon 5 de ce gène, une substitution d'une base C par une base T, ce qui entraîne l'abolition d'un site de restriction qui, lui, est présent dans la séquence normale ou "wild-type", la séquence normale étant ...GCATCCGCATCG..., tandis que les individus

homozygotes pour la mutation c.892C>T ont une séquence ... GCATCTGCATCG... et ceux hétérozygotes la séquence ... GCATCC/TGCATCG..., les bases qui sont soulignées étant celles reconnues par l'enzyme de restriction *AciI*.

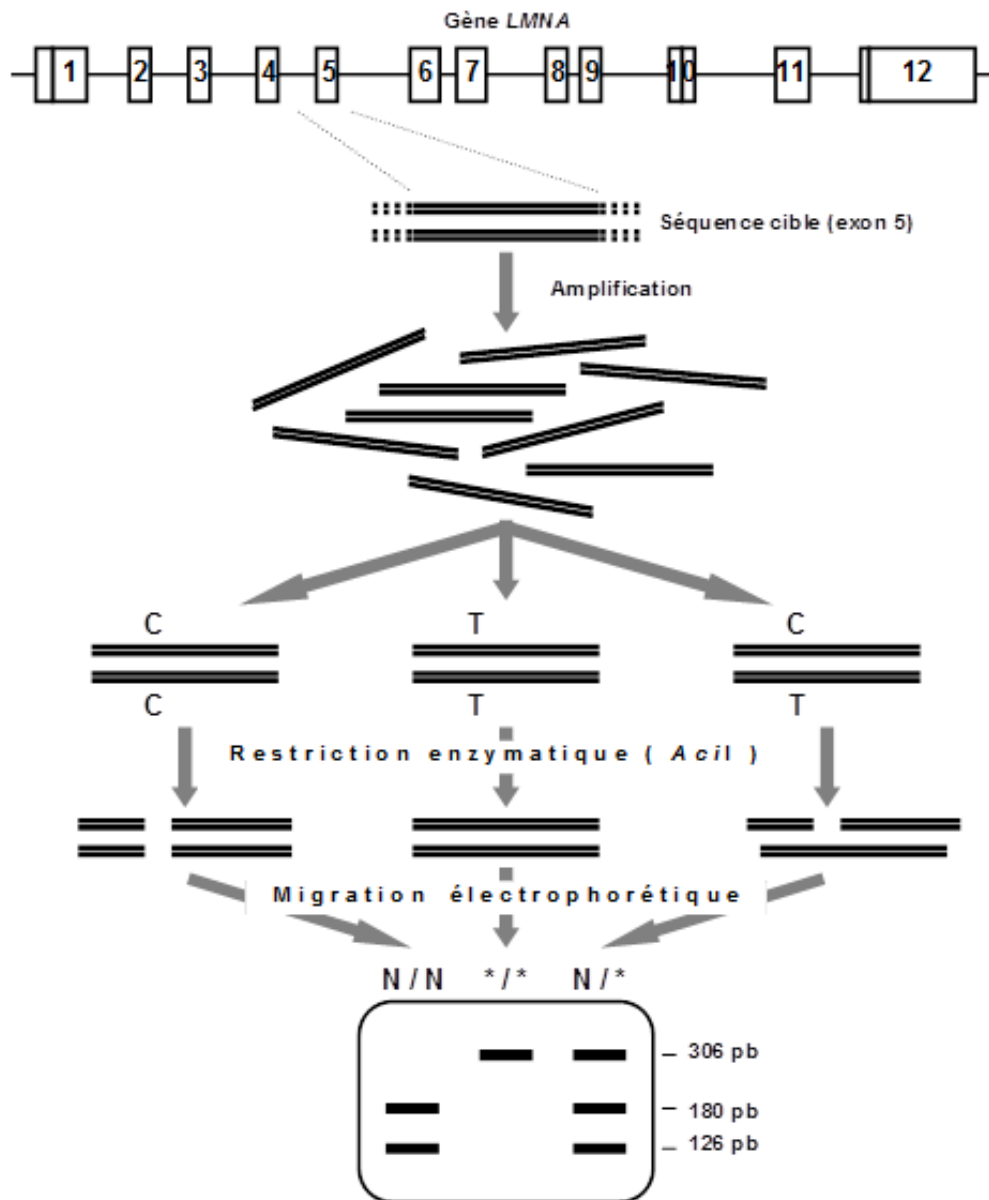
L'abolition du site de restriction *AciI* nous permet donc de caractériser aisément les individus qui sont porteurs de la mutation, que ce soit à l'état homozygote ou à l'état hétérozygote, de même que le maintien de ce site permet de confirmer que les individus sont normaux vis-à-vis de cette altération.

Il est donc possible d'obtenir trois profils de restriction après digestion par *AciI* de l'exon 5 du gène *LMNA* par *AciI*, individualisant chacun un statut génétique différent (**Figure 6**) :

- Un profil caractérisé par la présence de deux bandes de tailles 180 pb et 126 pb, attestant de la présence du site de restriction *AciI* : ce profil de restriction est celui d'un individu homozygote normal.

- Un profil montrant la présence d'une seule bande de 306 pb, soulignant la non-digestion de l'exon 5 du *LMNA* en raison de l'abolition du site de restriction *AciI* : ce profil de restriction est celui d'un individu homozygote muté présentant la mutation c.892C>T dans le gène *LMNA*.

- Un profil illustrant la présence de trois bandes de tailles 306 pb, 180 pb et 126 pb, soulignant la présence du site de restriction *AciI* sur l'un des allèles parentaux et l'abolition de ce site sur l'autre allèle : ce profil de restriction est celui d'un individu hétérozygote pour la mutation c.892C>T dans le gène *LMNA*, et ayant ainsi un statut de porteur asymptomatique.



**Figure 6.** Schéma illustrant les différents profils de restriction pouvant être obtenus après restriction enzymatique de l'exon 5 du gène *LMNA* par *AciI* : homozygote normal (N/N), homozygote muté (\*/\*) et hétérozygote (N/\*). Chaque fragment de restriction est représenté par une bande, dont la taille est indiquée à droite.

Comme l'illustrent les **Figures 7 et 8**, montrant la migration électrophorétique sur gel d'agarose 2.5% des produits de digestion des produits d'amplification de l'exon 5 du gène *LMNA* chez nos 18 patients, les résultats que nous avons obtenus ont permis d'établir que :

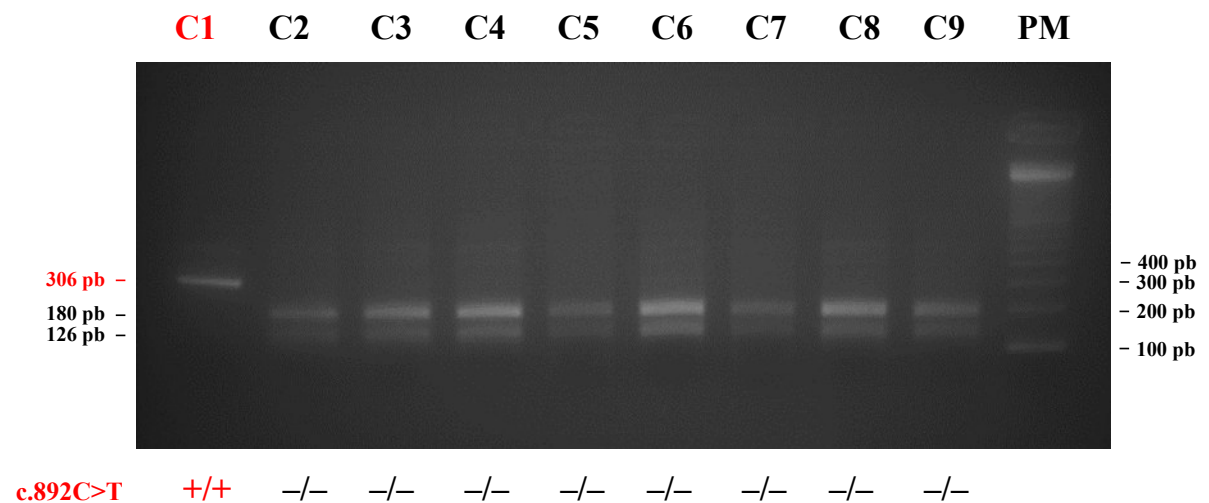
- Les malades C1 et C17 avaient un profil caractéristique d'un individu homozygote muté pour la mutation c.892C>T dans le gène *LMNA*, comme le montre la présence d'une bande unique de taille 306 pb, permettant alors de poser au plan moléculaire un diagnostic génétique de neuropathie périphérique sensitivo-motrice de type CMT2B1 pour ces deux individus.

- Les 16 autres patients (C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, C13, C14, C15, C16 et C18) avaient le profil d'un individu homozygote normal pour la mutation c.892C>T dans le gène *LMNA*, comme l'atteste la présence de deux bandes de tailles respectives 180 et 126 pb, autorisant d'écarter cette altération moléculaire comme cause de leur phénotype clinique.

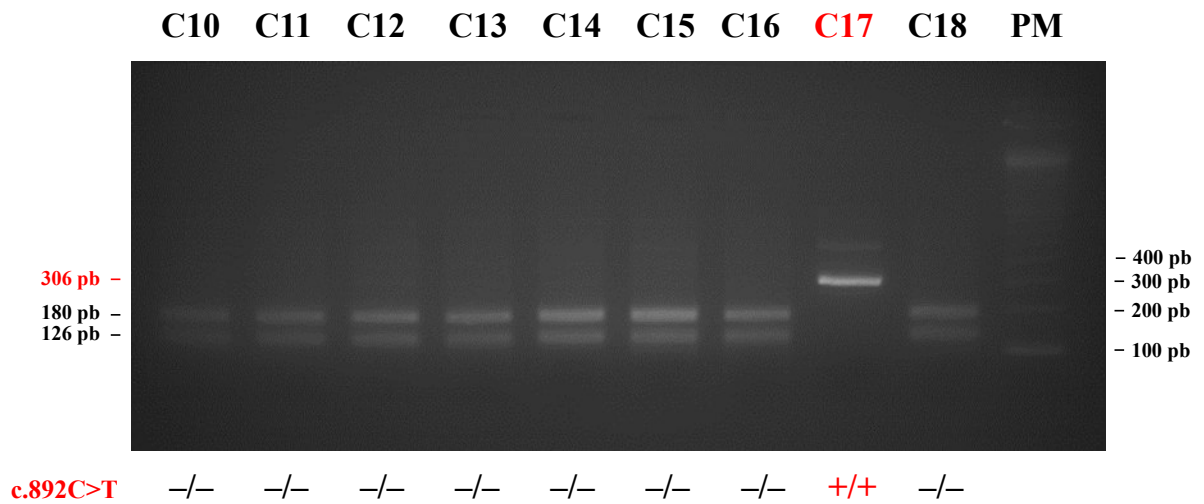
Les patients C1 et C17, de sexes différents, soulignaient bien que la forme CMT2B1, de par son mode de transmission autosomique récessif, affectaient indistinctement les individus de sexe masculin ou féminin.

De plus, la proximité d'âge de ces deux malades (15 ans pour le patient C1, et 14 ans pour la patiente C17), était tout à fait comparable avec l'âge médian de 14-15 ans décrit pour la forme de neuropathie CMT2B1 (Bouhouche *et al.*, 1999; Chaouch *et al.*, 2003 et Tazir *et al.*, 2004).

Nous noterons que le diagnostic clinique initialement soulevé avait pu être correctement posé pour la patiente C17 (CMT2B1), mais plus nuancé pour le patient C1 (AR-CMT) où seule la récessivité autosomique de la transmission de l'atteinte semblait saillante, soulignant ainsi toute la difficulté de suspecter une forme particulière de neuropathie tant ces affections sont extrêmement hétérogènes, tant cliniquement, qu'électrophysiologiquement, anatomo-pathologiquement ou génétiquement (Tazir *et al.*, 2014).



**Figure 7.** Profils de restriction obtenus après migration électrophorétique sur gel d'agarose 2.5% des produits de digestion par l'enzyme *AciI* de l'exon 5 du gène *LMNA* chez les patients C1 à C9. C1 à C9, patients C1 à C9. PM, marqueur de taille 100-base pair ladder<sup>®</sup>. La présence/l'absence des bandes de 306 pb, 180 pb, et 126 pb, permettent d'établir le statut génétique de chaque individu :  $-/-$ , homozygote normal;  $+/+$ , homozygote muté c.892C>T. En bas du gel, en-dessous de chaque patient, est indiqué son statut génétique (sont mentionnés en rouge les individus homozygotes c.892C>T dans le gène *LMNA*). Le sens de migration est de haut vers bas.



**Figure 8.** Profils de restriction obtenus après migration électrophorétique sur gel d'agarose 2.5% des produits de digestion par l'enzyme *AciI* de l'exon 5 du gène *LMNA* chez les patients C10 à C18. C10 à C18, patients C10 à C18. PM, marqueur de taille 100-base pair ladder<sup>®</sup>. La présence/l'absence des bandes de 306 pb, 180 pb, et 126pb, permettent d'établir le statut génétique de chaque individu :  $-/-$ , homozygote normal;  $+/+$ , homozygote muté c.892C>T. En bas du gel, en-dessous de chaque patient, est indiqué son statut génétique (sont mentionnés en rouge les individus homozygotes c.892C>T dans le gène *LMNA*). Le sens de migration est de haut vers bas.

D'ailleurs, les patients C4 et C12, avec pourtant une suspicion de forme CMT2B1, ne présentaient pas la mutation c.892C>T dans le gène *LMNA*, permettant de l'écarter comme cause de leur maladie et laissant envisager qu'un réexamen clinique plus attentif puisse orienter les généticiens vers des gènes responsables d'autres formes de CMT.

Pour les 16 patients de notre panel, sans mutation c.892C>T dans le gène *LMNA*, nous pourrions également évoquer plusieurs possibilités :

- Ils pourraient avoir une autre altération dans le gène *LMNA*, différente de la mutation c.892C>T. Cette éventualité est toutefois fortement improbable sachant que, jusqu'à l'heure actuelle, une mutation unique a été caractérisée dans le gène *LMNA*, seule responsable du phénotype CMT2B1.

- Ils pourraient avoir des altérations moléculaires dans d'autres gènes responsables de formes axonales AR-CMT2, voire démyélinisantes AR-CMT1, et il faudrait alors envisager d'explorer les gènes qui en sont responsables sur la base d'indications cliniques plus précises et orientées. Devant le nombre important de gènes potentiellement impliqués, on ne pourrait en effet s'engager dans aucune analyse moléculaire sans l'établissement préalable d'un phénotype clinique complet et le plus richement documenté, seule condition à même d'orienter les explorations génétiques à réaliser.

- Le diagnostic clinique pourrait être en partie erroné et mériterait alors d'être affiné. Les neuropathies héréditaires, notamment les formes autosomiques récessives, sont en effet caractérisées par une grande hétérogénéité clinique qui, elle-même, est sous-tendue par une grande hétérogénéité génétique, d'où souvent un recouvrement et un chevauchement des symptomatologies (Tazir *et al.*, 2014).

Cet état de fait rend pourtant un diagnostic précis extrêmement difficile, et il se pourrait alors que les patients aient une autre affection dont certains symptômes chevauchent ceux de la maladie de Charcot-Marie-Tooth.

Dans ce contexte, nous avons pris avantage de la disponibilité d'un test génétique réalisé au laboratoire de biologie moléculaire de l'UMBB pour compléter nos analyses moléculaires, à savoir celui du diagnostic de l'amyotrophie spinale proximale, une

motoneuropathie à transmission autosomique récessive très fréquente qui chevauche parfois les symptômes de la maladie de Charcot-Marie-Tooth, pouvant alors induire en erreur les médecins lorsque l'examen clinique n'est pas correctement réalisé, d'autant plus qu'ont déjà été décrites des mutations dans le gène *LMNA* et mimant cette affection héréditaire (Rudnik-Schöneborn *et al.*, 2006) et que des formes progressives d'atrophies musculaires spinales pouvaient en effet mimer des neuropathies ou des polyneuropathies (Visser *et al.*, 2002).

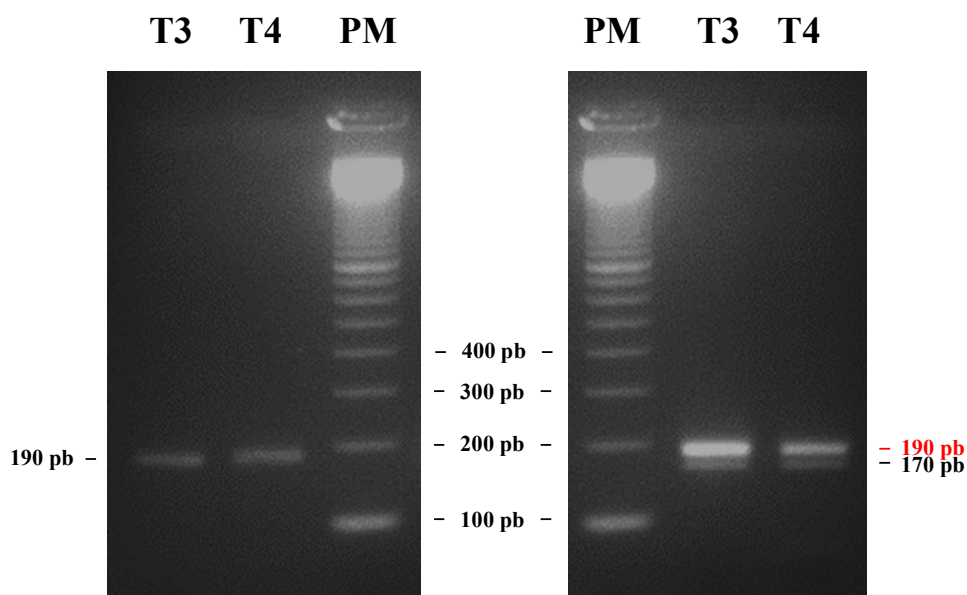
#### V. Etablissement du statut génétique des patients sans mutation c.892C>T dans le gène *LMNA* vis-à-vis de l'amyotrophie spinale proximale

Le test diagnostique de l'amyotrophie spinale proximale s'appuie sur l'identification d'anomalies dans le gène *SMN* par la mise en évidence de l'altération moléculaire la plus fréquemment rencontrée, c'est-à-dire la délétion homozygote d'au moins l'exon 7 du gène *SMN* retrouvée chez la majorité (90-98%) des malades (van der Steege *et al.*, 1995; Ogino *et al.*, Wirth, 2004).

Pour caractériser cette mutation, il est toutefois nécessaire de disposer d'une quantité suffisante de la région cible à analyser, d'où l'utilisation de la PCR pour générer les fragments d'ADN nécessaires pour la suite des explorations moléculaires, en l'occurrence une restriction enzymatique.

Au préalable, nous avons toutefois procédé à la validation de l'ensemble du protocole diagnostique en réalisant d'abord l'amplification de la région cible porteuse de l'anomalie moléculaire chez deux individus témoins T3 et T4, grâce à l'utilisation de deux amorces encadrant l'exon 7 des gènes *SMN/SMNc*, permettant ainsi de générer suffisamment d'amplificat, à la taille attendue de 190 pb, et sans aucune autre amplification parasite visible sur gel d'agarose, comme l'illustre la **Figure 9**.

La restriction enzymatique du produit d'amplification de l'exon 7 des gènes *SMN/SMNc* constituait alors la suite du protocole diagnostique, permettant d'individualiser l'exon 7 de chacun des deux gènes, *SMN* et *SMNc*.



**Figure 9.** Profils d'amplification de l'exon 7 des gènes *SMN/SMNc* (à gauche) et de digestion par l'enzyme *DraI* (à droite) après électrophorèse sur gel d'agarose chez deux individus témoins T3 et T4. T3 et T4, individus témoins sains. PM, marqueur de taille 100-base pair ladder<sup>®</sup>. A gauche est indiquée la taille attendue du produit PCR (190 pb). A droite sont indiquées les tailles des fragments de restriction (190 pb et 170 pb, correspondant à l'exon 7 des gènes *SMN* et *SMNc*, respectivement). Le sens de migration électrophorétique est de haut vers bas.

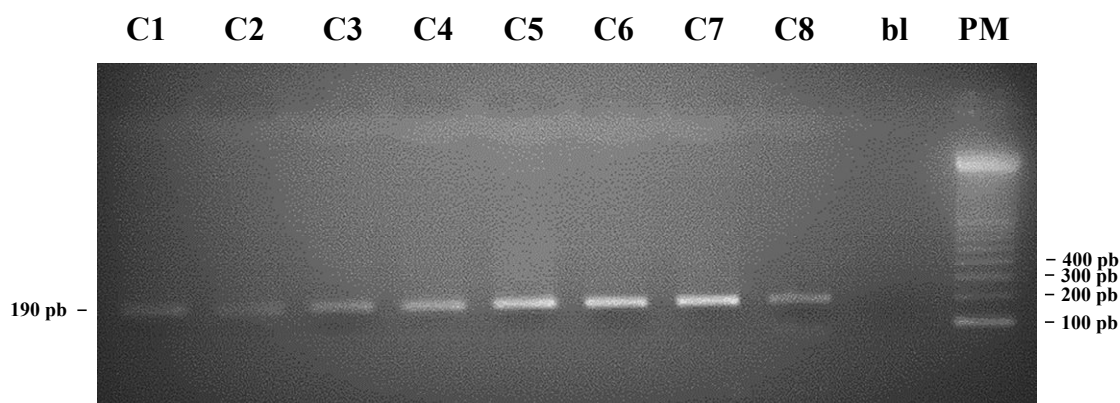
Les gènes *SMN* et *SMNc* ne diffèrent au niveau de leur exon 7 que par une seule différence nucléotidique, mais cette unique variation ne génère, ni n'abolit, aucun site de restriction normal pour une enzyme de restriction connue : une variante de PCR, la PCR-RSI ("PCR-Restriction Site Insertion" ou PCR avec insertion d'un site de restriction) a alors été mise au point en utilisant une amorce modifiée, permettant de caractériser sans aucune ambiguïté chacun des deux exons 7 que porte normalement chaque individu, l'exon 7 du gène *SMN* produit ne possédant pas de site de restriction pour *DraI*, tandis que l'exon 7 du gène *SMNc* est clivé par cette même enzyme (van der Steege *et al.*, 1995).

Le profil de restriction d'un individu normal se caractérise alors par la présence de deux fragments, l'un de 190 pb (celui du produit d'amplification non digéré de l'exon 7 du gène *SMN*) et l'autre de 170 pb (celui du produit d'amplification digéré de l'exon 7 du gène



La restriction enzymatique par l'enzyme *DraI* qui constituait la finalité de notre protocole diagnostique a permis de vérifier que les deux individus témoins T3 et T4 avaient un profil de restriction normal caractérisé par la présence de l'exon 7 des deux gènes *SMN* et *SMNc*, comme l'illustre la **Figure 9**.

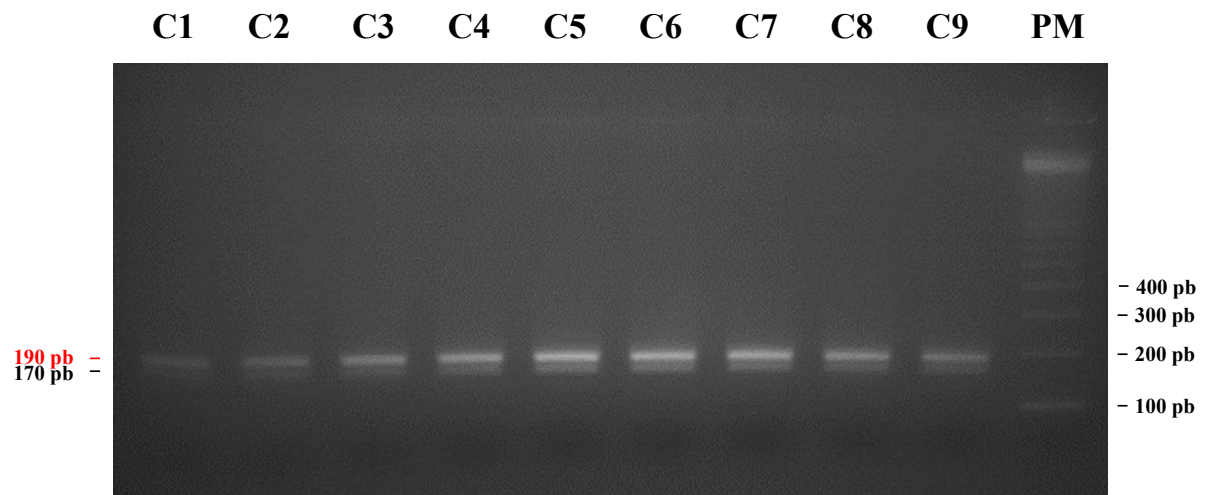
Compte tenu des résultats de validation de l'étape de digestion chez ces deux individus témoins, nous avons alors d'abord procédé à l'amplification ciblée de l'exon 7 des gènes *SMN/SMNc* pour chacun des 18 patients (comme l'illustre la **Figure 11**, montrant pour certains patients les amplifications qui se sont révélées spécifiques et générant un produit PCR unique en quantité suffisante pour poursuivre le protocole) que nous avons ensuite soumis à une digestion par l'enzyme de restriction *DraI*.



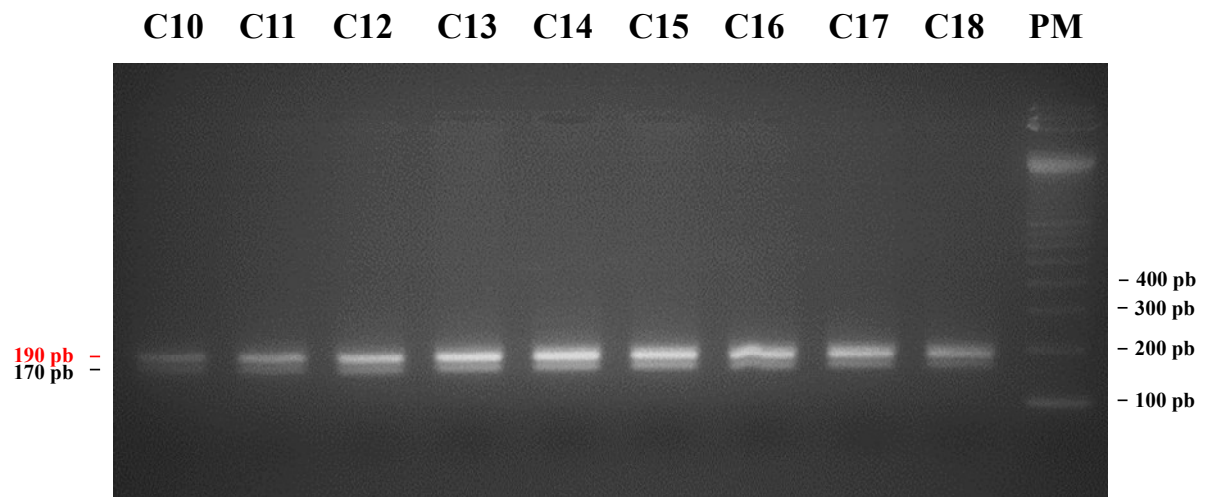
**Figure 11.** Profils d'amplification après électrophorèse sur gel d'agarose 1.5 % obtenus après amplification de l'exon 7 des gènes *SMN/SMNc* chez quelques patients (C1 à C8). C1 à C8, patients C1 à C8. bl, blanc PCR. PM, marqueur de taille 100-base pair ladder<sup>®</sup>. Le sens de migration est de haut vers bas.

L'analyse moléculaire de tous nos 18 patients a finalement permis d'obtenir un profil normal identique (**Figures 12 et 13**), avec présence des deux fragments de 190 pb (exon 7 non digéré de *SMN*) et de 170 pb (exon 7 digéré de *SMNc*), écartant la délétion homozygote de l'exon 7 du gène *SMN* comme cause de leur maladie chez tous nos patients.

En finalité, ce test moléculaire additif n'aura pas permis de caractériser d'autres anomalies moléculaires chez nos patients, confortant que l'examen clinique initial était compatible avec une suspicion de maladie de Charcot-Marie-Tooth en tant que neuropathie périphérique sensitivo-motrice, sans aucune atteinte des neurones moteurs.



**Figure 12.** Profils de restriction obtenus après migration électrophorétique sur gel d'agarose 2.5% des produits de digestion par l'enzyme *DraI* de l'exon 7 des gènes *SMN/SMNc* chez les patients C1 à C9. C1 à C9, patients C1 à C9. PM, marqueur de taille 100-base pair ladder<sup>®</sup>. A gauche sont indiquées les tailles des fragments de restriction (190 pb et 170 pb, correspondant à l'exon 7 des gènes *SMN* et *SMNc*, respectivement). Le sens de migration électrophorétique est de haut vers bas.



**Figure 13.** Profils de restriction obtenus après migration électrophorétique sur gel d'agarose 2.5% des produits de digestion par l'enzyme *DraI* de l'exon 7 des gènes *SMN/SMNc* chez les patients C10 à C18. C10 à C18, patients C10 à C18. PM, marqueur de taille 100-base pair ladder<sup>®</sup>. A gauche sont indiquées les tailles des fragments de restriction (190 pb et 170 pb, correspondant à l'exon 7 des gènes *SMN* et *SMNc*, respectivement). Le sens de migration électrophorétique est de haut vers bas.

# **CONCLUSION**

La neuropathie héréditaire périphérique à transmission autosomique récessive CMT2B1 est due à une mutation unique, c.892C>T (p.Arg298Cys) à l'état homozygote dans l'exon 5 du gène *LMNA*, et représente une forme de neuropathie très fréquente dans la population Algérienne en raison d'un effet fondateur.

En raison de chevauchements cliniques, d'autres neuropathies mimant cette maladie peuvent toutefois induire en erreur le clinicien et écarter d'autres explorations moléculaires disponibles et qui pourraient apporter leur contribution.

Durant notre mémoire, nous avons pu nous initier à la réalisation de tests génétiques, soulignant la rapidité de leur exécution, la facilité de leur mise en œuvre et la précision qu'ils apportent dans le cadre de l'exploration de patients pour lesquels une suspicion clinique initiale avait été soulevée par les médecins traitants.

Nous avons ainsi pu confirmer sur un plan moléculaire la forme CMT2B1 chez deux patients, tout en écartant son implication chez les autres malades, de même que le test génétique d'amyotrophie spinale progressive que nous avons réalisé a pu écarter un phénotype d'ASP pour l'ensemble des individus.

Notre travail aura ainsi souligné l'utilité de combiner ces deux tests moléculaires dans le cadre d'un diagnostic génétique différentiel des neuropathies, renforçant la nécessité de les réaliser en routine.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Abane, B. (2006) Amyotrophies spinales. Collection Savoir & Comprendre, AFM, France.
- Bernard, R., De Sandre-Giovannoli, A., Delague, V. et Levy, N. (2006) Molecular genetics of autosomal-recessive axonal Charcot-Marie-Tooth neuropathies. *Neuro. Mol. Med.* **8**: 87-106.
- Birouk, N. (2009) La maladie de Charcot-Marie-Tooth. *Presse Med.* **38**: 200-209.
- Bouhouche, A., Benomar, A., Birouk, N., Mularoni, A., Meggouh, F., Tassin, J., Grid, D., Vandenberghe, A., Yahyaoui, M., Chkili, T., Brice, A., et LeGuern, E. (1999) A locus for an axonal form of autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease maps to chromosome 1q21.2-q21.3. *Am. J. Hum. Genet.* **65**: 722-727.
- Bouhouche, A., Birouk, N., Azzedine, H., Benomar, A., Durosier, G., Ente, D., Muriel, M.P., Ruberg, M., Slassi, I., Yahyaoui, M., Dubourg, O., Ouazzani, R., et LeGuern, E. (2007) Autosomal recessive axonal Charcot-Marie-Tooth disease (ARCMT2): phenotype/genotype correlations in 13 Moroccan families. *Brain* **130**: 1062-1075.
- Bürglen, L., Seroz, T., Miniou, P., Lefebvre, S., Burlet, P., Munnich, A., Pequignot, E.V., Egly, J.M., et Melki, J. (1997) 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.* **60**: 72-79.
- Capell, C., Brain, C., Francis, S., et Collins, S. (2006) Human laminopathies: Nuclei gone genetically awry. *Nature* **7**: 940-952.
- Chang, J.G., Jong, Y.J., Lin, S.P., Soong, B.W., Tsai, C.H., Yang, T.Y., Chang, C.P., et Wang, W.S. (1997) Molecular analysis of survival motor neuron (SMN) and neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP) genes of muscular atrophy patients and their parents. *Hum. Genet.* **100**: 577-581.
- Chaouch, M., Allal, Y., De Sandre-Giovannoli, A., Vallat, J.M., Amer-el-Khedoud, A., Kassouri, N., Chaouch, A., Sindou, P., Hamadouche, T., Tazir, M., Levy, N., et Grid, D. (2003) The phenotypic manifestations of autosomal recessive axonal Charcot-Marie-Tooth due to a mutation in lamin A/C gene. *Neuromuscul. Disord.* **13**: 60-67.
- Cotton, R.G.H. (2000) An update of the mutation spectrum of the Survival Motor Neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Hum. Mutat.* **15**: 228-237.
- De Sandre-Giovannoli, A., Chaouch, M., Kozlov, S., Vallat, J.M., Tazir, M., Kassouri, N., Szepetowski, P., Hammadouche, T., Vandenberghe, A., Stewart, C.L., Grid, D., et Lévy, N. (2002) Homozygous defects in *LMNA*, encoding lamin A/C nuclear-envelope proteins, cause autosomal recessive axonal neuropathy in human (Charcot-Marie-Tooth disorder type 2) and mouse. *Am. J. Hum. Genet.* **70**: 726-736.
- Fallini, C., Bassell, G.J., et Rossoll, W. (2012) Spinal muscular atrophy: the role of SMN in axonal mRNA regulation. *Brain Res.* **1462**: 81-92.
- Gabanella, F., Butchbach, M.E., Saieva, L., Carissimi, C., Burghes, A.H., et Pellizzoni, L. (2007) Ribonucleoprotein assembly defects correlate with spinal muscular atrophy severity and preferentially affect a subset of spliceosomal snRNPs. *PLoS One* **2**: 921.

- Hamadouche, T., Poitelon, Y., Genin, E., Chaouch, M., Tazir, M., Kassouri, N., Nouioua, S., Chaouch, A., Boccaccio, I., Benhassine, T., De Sandre-Giovannoli, A., Grid, D., Lévy, N., et Delague, V. (2008) Founder effect and estimation of the age of the c.892C>T (p.Arg298Cys) mutation in *LMNA* associated to Charcot-Marie-Tooth subtype CMT2B1 in families from North Western Africa. *Ann. Hum. Genet.* **72**: 590-597.
- Lefebvre, S., Bürglen, L., Reboullet, S., Clermont, O., Burlet, P., Viollet, L., Bénichou, B., Cruaud, C., Millasseau, P., Zeviani, M., Le Paslier, D., Frézal, J., Cohen, D., Weissenbach, J., Munnich, A., et Melki, J. (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* **80**: 155-165.
- Leguern, E., Birouk, N., Guilbot, A., Lopes, J., Rouger, H., Tardieu, S., Ravisé, N., Bouche, P., Agid, Y., et Brice, A. (1996) La maladie de Charcot-Marie-Tooth. *Ann. Institut. Pasteur Paris* **7**: 179-185.
- Lorson, C.L., Strasswimmer, J., Yao, J.M., Baleja, J.D., Hahnen, E., Wirth, B., Le, T., Burghes, A.H., et Androphy, E.J. (1998) SMN oligomerization defect correlates with SMA severity. *Nat Genet.* **19**: 63-66.
- Lorson, C. L., Hahnen, E., Androphy, E. J., et Wirth, B. (1999) A single nucleotide in the *SMN* gene regulates splicing and responsible for spinal muscular atrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 6307-6311.
- Monani, U.R., Lorson, C.L., Parsons, D.W., Prior, T.W., Androphy, E.J., Burghes, A.H., et McPherson, J.D. (1999) A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene *SMN1* from the copy gene *SMN2*. *Hum. Mol. Genet.* **8**: 1177-1183.
- Mounkes, L., Kozlov, S., Burke, B., et Stewart, C.L. (2003) The laminopathies: Nuclear structure meets disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**: 223-230.
- Mullis, K.B., Ferre, K.B.F., and Gibbs, R.A. (1994) The polymerase chain reaction. Ed. Birkhäuser, Boston-Basel-Berlin.
- Navarro, C.L., Cau, P., et Levy, N.(2006) Molecular based of progeroid syndromes. *Hum. Mol. Genet.* **15**: R151-161.
- Navarro, C.L., Poitelon, Y., et Lévy, N. (2008) Lamines A et syndromes progéroïdes: une farnésylation persistante aux conséquences dramatiques. *Med. Sci. (Paris)* **24**: 833-840.
- Ogino, S., Gao, S., Leonard, D.G., Paessler, M., et Wilson, R.B. (2003) Inverse correlation between *SMN1* and *SMN2* copy numbers : evidence for gene conversion from *SMN2* to *SMN1*. *Eur. J. Hum. Genet.* **11**: 275-277.
- Ogino, S., et Wilson, R.B. (2004) Spinal muscular atrophy: molecular genetics and diagnostics. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **4**: 15-29.
- Rossor, A.M., Polk, J.M., Houlden, H., et Reilly, M.M. (2013) Clinical implications of genetic advances in Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat. Rev. Neurol.* **9**: 562-571.
- Rudnik-Schöneborn S, Botzenhart E, Eggermann T, Senderek J, Schoser BG, Schroder R, Wehnert M, Wirth B, et Zerres K (2007) Mutations of the *LMNA* gene can mimic autosomal dominant proximal spinal muscular atrophy. *Neurogenet.* **8**: 137-142.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., et Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. 2<sup>nd</sup> edition, New York, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sifi, Y., Sifi, K., Boulefkhad, A., Abadi, N., Bouderd, Z., Cheriet, R., Magen, M., Bonnefont, J.P., Munnich, A., Benlatreche, C., et Hamri, A. (2013) Clinical and genetic study of Algerian patients with spinal muscular atrophy. *J. Neurodegener. Dis.* **2013**: 903875.
- Souirti, Z., Slimani, C., Birouk, N., Bouhouche, A., Belaidi, H., Kably, B., Benomar, A., Yahyaoui, M., et Ouazzani, R. (2009) Amyotrophies spinales progressives. *Ann. Med. Therapeut.* **1**: 18-21.
- Starr, D.A., et Fridolfsson, H.N. (2010) Interactions between nuclei and the cytoskeleton are mediated by SUN-KASH nuclear-envelope bridges. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **26**: 421-444.
- Tazir, M., Azzedine, H., Assami, S., Sindou, P., Nouioua, S., Zemmouri, R., Hamadouche, T., Chaouch, M., Feingold, J., Vallat, J.M., LeGuern, E., et Grid, D. (2003) Phenotypic variability in autosomal recessive axonal Charcot-Marie-Tooth disease due to the R298C mutation in lamin A/C. *Brain* **127**: 154-163.
- Tazir, M., Hamadouche, T., Nouioua, S., Mathis, S., et Vallat, J.M. (2014) Hereditary motor and sensory neuropathies or Charcot-Marie-Tooth diseases: An update. *J. Neurol. Sci.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2014.10.013>.
- Vallat, J.M., Tazir, M., Magdelaine, C., Sturtz, F., et Grid, D. (2005) Autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth diseases. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **64**: 363-370.
- Van der Steege, G., Grootsholten, P. M., Van der Vlies, P., Draaijers, T.G., Osinga, J., Cobben, J. M., Scheffer, H., et Buys, C.H.C.M. (1995) PCR-based DNA test to confirm clinical diagnosis of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Lancet* **345**: 985-986.
- Verhaart, I.E.C., Robertson, A., Wilson, I.J., Aartsma-Rus, A., Cameron, S., Jones, C.C., Cook, S.F., et Lochmüller, H. (2017) Prevalence, incidence and carrier frequency of 5q-linked spinal muscular atrophy - A literature review. *Orphanet J. Rare Dis.* **12**: 124.
- Visser, J., van den Berg-Vos, R.M., Franssen, H., van den Berg, L.H., Vogels, O.J., Wokke, J.H.J., de Jong, J.M.B.V., and de Visser, M. (2002) Mimic syndromes in sporadic cases of progressive spinal muscular atrophy. *Neurol.* **58**: 1593-1596.
- Wirth, B., Herz, M., Wetter, A., Moskau, S., Hahnen, E., Rudnik-Schoneborn, S., Wienker, T., et Zerres, K. (1999) Quantitative analysis of survival motor neuron copies: identification of subtle *SMN1* mutations in patients with spinal muscular atrophy, genotype-phenotype correlation, and implications for genetic counseling. *Am. J. Hum. Genet.* **64**: 1340-1356.
- Worman, H.J., et Bonne, G. (2007) Laminopathies: A wide spectrum of human diseases. *Exp. Cell. Res.* **313**: 2121-2133.
- Zhang, Z., Lotti, F., Dittmar, K., Younis, I., Wan, L., Kasim, M., et Dreyfuss, G. (2008) SMN deficiency causes tissue-specific perturbations in the repertoire of snRNAs and widespread defects in splicing. *Cell* **133**: 585-600.

اعتلالات الأعصاب الوراثية تشمل مجموعة من الأمراض التي تؤثر على الأعصاب الحسية والحركية وهي أمراض شائعة للغاية تتميز بتجانس سريري كبير وكهروفيزيولوجي أو تشريح تشريحي و جيني. تسود الأشكال المتنحية في الجزائر بسبب ارتفاع زواج الأقارب، وخاصة شكل CMT2B1 بسبب طفرة واحدة في تأثير المؤسس c.892C>T في جين LMNA. بحثنا عن هذه الطفرة عن طريق PCR-RFLP في 18 مريضا من عائلات مستقلة ومع نم CMT الظاهري مما يبرز وجوده في شخصين. لدينا استكشافات من خلال اختبار وراثي للضمور العضلي التدريجي في العمود الفقري وهو اعتلال عديد الحركة أيضا شائع جدا، يمكن لبعض الأعراض تقليد المرض باستثناء مشاركته في جميع المرضى. يسלט عملنا الضوء على مساهمة هذين الاختبارين الجزيئيين كجزء من التشخيص الجيني التفريقي للاعتلال العصبي، مما يعزز الحاجة للقيام بها بشكل روتيني.

كلمات المفتاحية: مرض شاركوت ماري توث CMT2B1، جين LMNA، طفرة جينية c.892C>T ، ضمور العضلات الشوكي التدريجي، جين SMA ، حذف شامل، تشخيص تفاضلي.

## Résumé

Les neuropathies héréditaires regroupent un ensemble de pathologies affectant les nerfs sensitifs et moteurs. Ce sont des maladies extrêmement fréquentes, caractérisées par une très grande hétérogénéité clinique, électrophysiologique, anatomopathologique et génétique. Les formes récessives sont prépondérantes en Algérie en raison du fort taux d'endogamie, notamment la forme CMT2B1 due à une mutation unique à effet fondateur c.892C>T dans le gène *LMNA*. Nous avons recherché cette mutation par PCR-RFLP chez 18 patients, issus de familles indépendantes et avec un phénotype CMT, mettant en évidence sa présence chez deux individus. Nous avons complété nos explorations par un test génétique de l'amyotrophie spinale progressive, une motoneuropathie également très fréquente, dont certains symptômes pourraient mimer la maladie, écartant son implication chez tous les malades. Notre travail souligne l'apport de ces deux tests moléculaires dans le cadre d'un diagnostic génétique différentiel des neuropathies, renforçant la nécessité de les réaliser en routine.

**Mots-clés :** Maladie de Charcot-Marie-Tooth CMT2B1, gène *LMNA*, mutation c.892C>T, amyotrophie spinale progressive, gène *SMN*, délétion intragénique, diagnostic différentiel.

## Summary

Hereditary neuropathies are a group of pathologies affecting sensory and motor nerves. These are extremely common diseases, characterized by a great clinical, electrophysiological, anatomopathological and genetic heterogeneity. Recessive forms predominate in Algeria because of the high level of endogamy, especially the CMT2B1 subtype due to a single mutation with founder effect c.892C>T in the *LMNA* gene. We searched for this mutation by PCR-RFLP in 18 patients, from independent families and with a CMT phenotype, highlighting its presence in two individuals. We completed our explorations with a genetic test of progressive spinal muscular atrophy, a motoneuropathy also very common, whose symptoms could mimic the disease, excluding its involvement in all our patients. Our work highlights the contribution of these two molecular tests in the context of a differential genetic diagnosis of neuropathies, reinforcing the need to perform them routinely.

**Keywords :** Charcot-Marie-Tooth disease CMT2B1, *LMNA* gene, c.892C>T mutation, progressive spinal amyotrophy, *SMN* gene, intragenic deletion, differential diagnosis.