

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

**MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA
FACULTE DES SCIENCES AGROMOMIQUES ET BIOLOGIQUES**

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master en biologie
option Génétique et physiologie



Thème

Analyse génétique de patients atteints du syndrome de Bardet Biedl

Soutenu publiquement le : 22/09/2013

Par l'étudiante : Belattar Hydaya

Membres du jury :

Mr Oussadou L.	MAA	Président	USDB
Mme Aissani R.	MAA	Examinatrice	USDB
Melle Rahim .	MAA	Examinatrice	USDB
Mme Guessaibia N.	MCB	Promotrice	USDB
Mme Bouhamed-Chaabouni H	Pr	Co-promotrice	Université El Manar Tunis

2012 _ 2013

Remerciements

J'ai beaucoup appris ces dernières années, tant sur le plan scientifique qu'humain. Et si aujourd'hui mon bilan personnel est positif, c'est grâce aux nombreuses personnes qui m'ont entourée, soutenue et accompagné dans la réalisation, l'écriture et l'expertise de ce mémoire. Je profite donc de ces quelques paragraphes pour les remercier.

Je remercie Mr Oussadou L, de m'avoir fait l'honneur de présider mon jury.

Je remercie Mme Aissani R et Melle Charrallah A d'avoir accepté d'examiner ce travail, de faire partie du jury et pour votre disponibilité. Je tiens à vous exprimer ma reconnaissance et à vous assurer de mon profond respect. Merci

Tout d'abord je tiens à remercier Pr Habiba Bouhamed-Chaabouni de m'avoir permis d'effectuer ce travail au sein de son Laboratoire de Génétique Humaine et de m'avoir apporté les moyens nécessaires à la réalisation de mes travaux avec la plus incroyable générosité.

Aucun mot ne pourrait exprimer ma profonde reconnaissance et mon éternelle gratitude. Merci

Je remercie Dr Nadia Guessaibia de m'avoir encadré et de m'avoir initié au métier de chercheur. Ma reconnaissance à votre égard est énormément large, je tiens à vous dire, du plus profond de mon cœur, Merci. J'espère être digne de la chance qu'elle m'est donnée et de la confiance qu'elle a bien voulu m'accorder. Merci

Je remercie également Mr Oussama M'hamdi, mon maitre de stage, de m'avoir initié aux techniques de génétique moléculaire, de m'avoir transmis une partie de nombreuses connaissances. Merci de m'avoir consacré une énorme partie de temps malgré ses responsabilités, merci pour sa disponibilité, sa patience, son explication, sa générosité et surtout ses qualités humaines. Merci

Merci à Mr Ramdane Mohamed Said, ce projet n'aurait pas été possible, ni facile, sans votre appui administratif, votre soutien, vos conseils et votre disponibilité sans pareil durant notre parcours universitaire. C'est avec le plus grand plaisir et un excellent souvenir que je vous dis également Merci.

Je remercie également tous les membres du Laboratoire de Génétique Humaine de la faculté de médecine de Tunis, ainsi que du service à l'hôpital Charles Nicolle de Tunis pour leurs soutien et gentillesse (Riadh, Hanen, Sameh, Hend) et surtout mes collègues et amies pour les sympathiques moments qu'on a passé ensemble (Marwa, Asma, Wided, Azza, amel, malek et Oussama).

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont également à l'encontre de toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail ; je ne saurais remercier ici les personnes dont la collaboration a été essentielle pour la réalisation de certaines étapes de ce travail sans citer les noms, en particulier Mme Zeggar Khamssa, ma tante Lezzoum Naima, Boukhari Fouad et Sellali Sihem.

Résumé

Le syndrome de Bardet-Biedl (BBS) est une ciliopathie de transmission autosomique récessive. Le BBS est une maladie génétiquement hétérogène, à ce jour 17 gènes sont décrits de *BBS1* à *BBS17*. Le triallélisme est décrit chez 1-5% des familles. L'objectif de ce travail est l'analyse moléculaire de 15 familles Tunisiennes de BBS par séquençage direct des deux mutations fondatrices p.R189* au niveau du gène *BBS2*, et c.459+1G>A au niveau du gène *BBS8* et d'autres mutations rapportées chez des familles Tunisiennes tel que la M390R et la c.1473+1G>A au niveau du gène *BBS1*, la p.L50R et la p.G42E*11 au niveau du gène *BBS5*, la c.1272+1G>A(*BBS6*), la C91Lfs*95 et la p.S396Lfs*6 au niveau du gène *BBS10*, la p.G67D*45 et l'exon1 du gène *BBS12* et la p.R133S (*BBS8*) .

Deux mutations ont été identifiées : p.R189* au niveau du gène *BBS2* chez deux patients, l'un à l'état homozygote et l'autre à l'état hétérozygote. Et une nouvelle mutation p.R133S au niveau de gène *BBS8* à l'état hétérozygote chez une seule famille. Le séquençage du reste du gène *BBS8* est nécessaire pour la recherche de la 2^{ème} mutation à l'état hétérozygote chez ce patient. Pour les deux autres patients, ce résultat prouve l'effet fondateur de la mutation p.R189* malgré l'origine géographique différente des ces deux familles.

Cette étude préliminaire montre une hétérogénéité génétique du BBS dans la population Tunisienne. L'identification de la mutation p.R189* aura un impact dans le diagnostic moléculaire du BBS.

Mots-clés : Syndrome de Bardet-Biedl, ciliopathie, gènes BBS, triallélisme.

Liste des figures

Figure 1 :	10 principaux organes cibles dans la ciliopathie.....	05
Figure 2 :	Cils immobiles (9+0) et cils mobiles (9+2).....	08
Figure 3 :	Schéma de la structure d'un cil primitif et la localisation de différentes protéines BBS.....	09
Figure 4 :	Hétérogénéité du Bardet Biedl. Le pourcentage de mutations de chaque gène dans les familles BBS et leurs localisations.....	15
Figure 5 :	Modèles d'héritage.....	17
Figure 6 :	Spectre des ciliopathies. Manifestations cliniques le plus souvent observées et leur présence dans les différentes ciliopathies.....	19
Figure 7 :	Amplification exponentielle de l'ADN par PCR.....	26
Figure 8 :	Différentes étapes de la PCR.....	28
Figure 9 :	Variation de température pendant un cycle de PCR.....	29
Figure10 :	Arbres généalogique des 15 familles analysées sur le plan moléculaire.....	41
Figure 11 :	Amplification de l'exon 3 du gène <i>BBS5</i>	42
Figure 12 :	Amplification de l'exon 5 du gène <i>BBS8</i>	43
Figure 13 :	Mutation fondatrice p.R189* chez la famille M.....	44
Figure 14 :	Mutation fondatrice p.R189* chez la famille N.....	45
Figure 15 :	Image prise du logiciel PolyPhen2.....	46
Figure 16 :	Alignement multiple de la séquence protéique qui contient l'acide aminé arginine	47
Figure 17 :	Diagramme de notre étude moléculaire.....	51

Liste des tableaux

Tableau I :	Critères cliniques du diagnostic du syndrome de Bardet-Biedl et leurs fréquences.....	07
Tableau II :	Gènes du BBS.....	10
Tableau III:	Amorces utilisées.....	23
Tableau IV:	Composants de la réaction de séquence.....	35
Tableau V :	Conditions de la réaction de séquence.....	35
Tableau VI:	Caractéristiques cliniques des patients atteints de BBS	39
Tableau VII	Tableau récapitulatif des mutation testées chez les patients BBS.....	48

Liste des abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
BBS	Syndrome de Bardet-Biedl
BET	Bromure d'éthidium
dNTP	Désoxynucléotide triphosphate
ddNTP	Didésoxyribonucléotide triphosphate
DHPLC	Denaturing High Performance Liquid Chromatography
DMSO	Diméthylsulfoxyde
D.O	L'absorbance de l'ADN
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
F	Forward
MgCl ₂	Chlorure de magnésium
MKKS	Syndrome de Mc Kusick-Kaufman
MKS	Syndrome de Meckel-Gruber
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NPHP	<i>Nephronophtise</i>
OMIM	Oline Mendelian Inheritance in Man
PCM	Matériel péricentriolaire
R	Reverse
SA	Semaine d'aménorrhée
SDS	Dodécylsulfate de sodium
Shh	Sonic hedgehog
SLS	Syndrome de Senior-Loken
SLR	Solution de lyse des globules rouges
SNParry	Single nucleotide polymorphism
TBE	Tris, Borate, EDTA
TE	Tri EDTA
Th	Température d'hybridation
TIF	Transport intraflagellaire
Tm	Température de fusion
UCSC	Université de Californie à Santa Cruz
Wnt	wingless

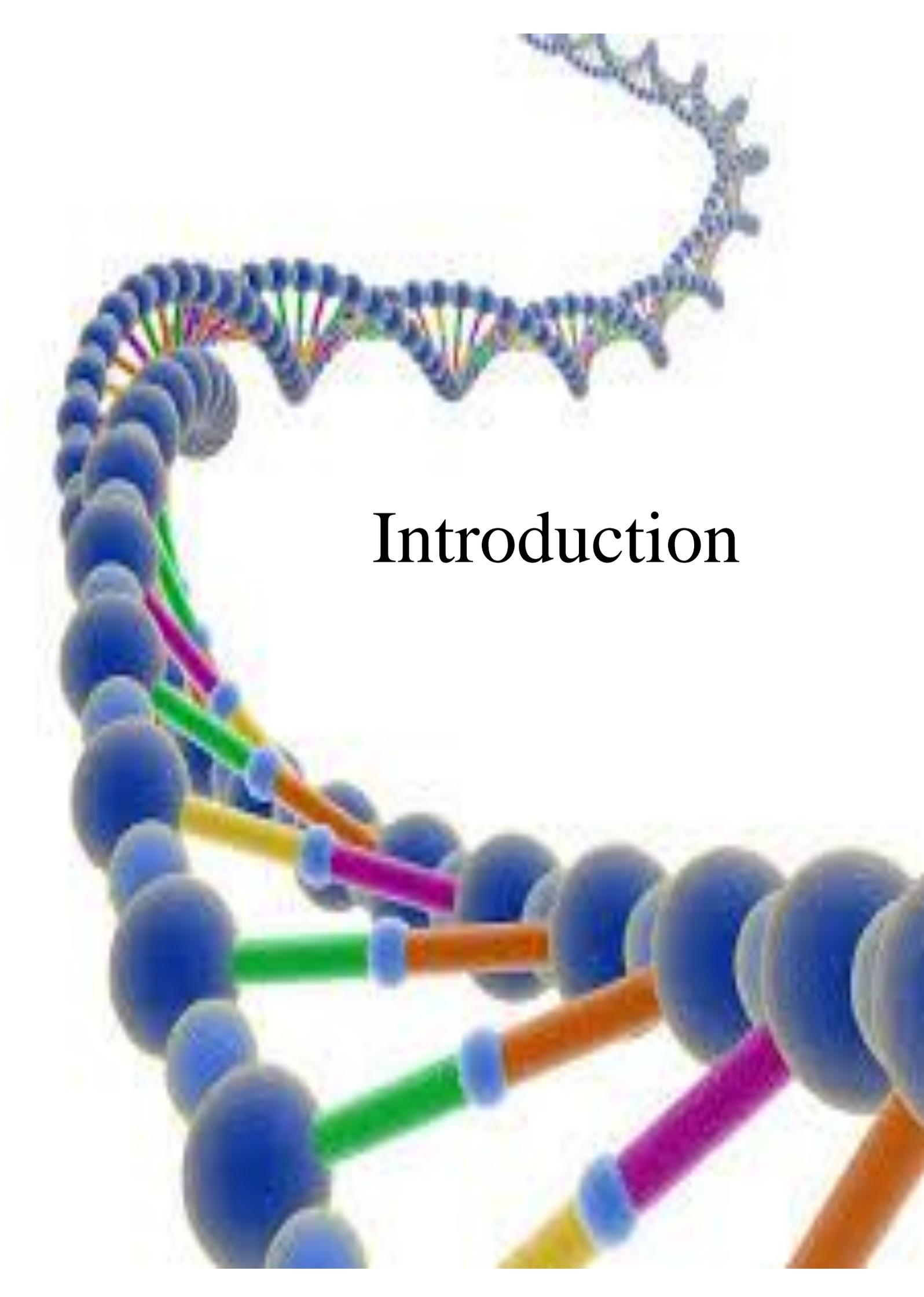
Glossaire

Anosmie :	Un trouble de l'odorat qui se traduit par une perte ou une diminution forte de la sensibilité aux odeurs
Ataxie :	Une pathologie neuromusculaire qui consiste en un manque de coordination fine des mouvements volontaires. Elle n'est pas liée à une déficience physique des muscles mais plutôt à une atteinte du système nerveux.
Atrésie vaginale :	Un développement incomplet ou une malformation du vagin.
Bronchorrhée :	Sécrétion en quantité anormale (pathologique) du mucus (sorte de glaire) dans les bronches.
Cardiomyopathie :	Maladie du muscle cardiaque.
Cardiomyopathie dilaté :	Une forme de cardiomyopathie dans laquelle les cavités cardiaques sont dilatées diminuant de façon significative la capacité du muscle cardiaque à assurer sa fonction de "pompe"
Cil :	Les cils sont de minuscules poils, que l'on trouve par exemple dans la muqueuse nasale. Leur rôle est de filtrer les particules ou de faire circuler des substances le long du revêtement muqueux, grâce à leurs mouvements vibratoires.
Chondrodysplasie de l'os :	Est une anomalie de l'ostéogénèse touchant principalement la métaphyse des os longs par retard de la maturation des chondrocytes.
Cryptorchidie :	Est l'absence d'un ou des deux testicules.
Diabète insipide néphrogénique :	L'impossibilité pour les reins de concentrer les urines.
Dysplasie kystique :	C'est une anomalie du développement rénal, caractérisée par un gros rein kystique.
Dyslipidémie :	Anomalie du taux de graisses dans le sang
Fibrose hépatique :	La résultante commune aux maladies chroniques du foie, caractérisée par l'accumulation anormalement élevée de constituants de la matrice extracellulaire dans le parenchyme hépatique
Hydrocolpos :	Se définit par une dilatation kystique du vagin.
Hypospadias :	Une malformation du fœtus masculin
Hypoplasie de l'émail dentaire :	Trouble par insuffisance de développement de l'émail dentaire.
Inversus :	Maladie congénitale dans laquelle les principaux viscères et organes sont inversés dans une position en miroir par rapport à leur situation normale
Nephronophtise :	Appelée également maladie kystique de la médullaire, est une maladie concernant le parenchyme rénal c'est-à-dire la partie active du rein
Sinusite :	Une inflammation ou une infection d'un ou de plusieurs des quatre sinus (maxillaire, frontal, sphénoïdal ou ethmoïdal) que comporte le corps humain.
SNPmicroarray :	Puce à ADN qui permet d'effectuer un très grand nombre de mesures en parallèle en une seule manipulation

Sommaire

Introduction	01
Synthèse Bibliographique	03
1. Définition.....	03
2. Historique.....	03
3. Epidémiologie.....	04
4. Manifestation clinique.....	04
4.1 Rétinite pigmentaire.....	04
4.2 Obésité.....	04
4.3 Anomalie rénale.....	05
4.4 Polydactylie poste-axiale.....	06
4.5 Hypogonadisme.....	06
4.6 Retard mental et trouble cognitif.....	06
4.7 Autres manifestations.....	06
5. Aspect génétique du Bardet-Biedl Syndrome.....	08
5.1 Les gènes impliqués dans le syndrome de Bardet-Biedl.....	10
5.2 Spectre mutationnel des gènes BBS dans le monde.....	15
5.3 Le BBS un nouveau model d'hérédité dite « triallélique ».....	16
6. Diagnostic.....	18
7. Prise en charge.....	20
8. Conseil génétique.....	21
Matériel et Méthodes	22
1. Matériel.....	22
1.1 Patients.....	22
1.2 Les gènes étudiés.....	22
1.3 Choix des amorces.....	22
2. Méthodes.....	24
2.1 Méthode bioinformatique.....	24
2.2 Analyse moléculaires.....	25
2.2.1 Extraction d'ADN génomique.....	25
2.2.2 Amplification des gène par la PCR.....	26

2.2.3 Séquençage.....	33
Résultats et Discussion.....	38
1. Résultats.....	38
1.1 Résultats cliniques.....	38
1.2 Résultats de l'analyse moléculaire.....	42
2. DISCUSSION.....	49
Conclusion et perspectives.....	52
Références bibliographiques.....	53
Annexes.....	58



Introduction

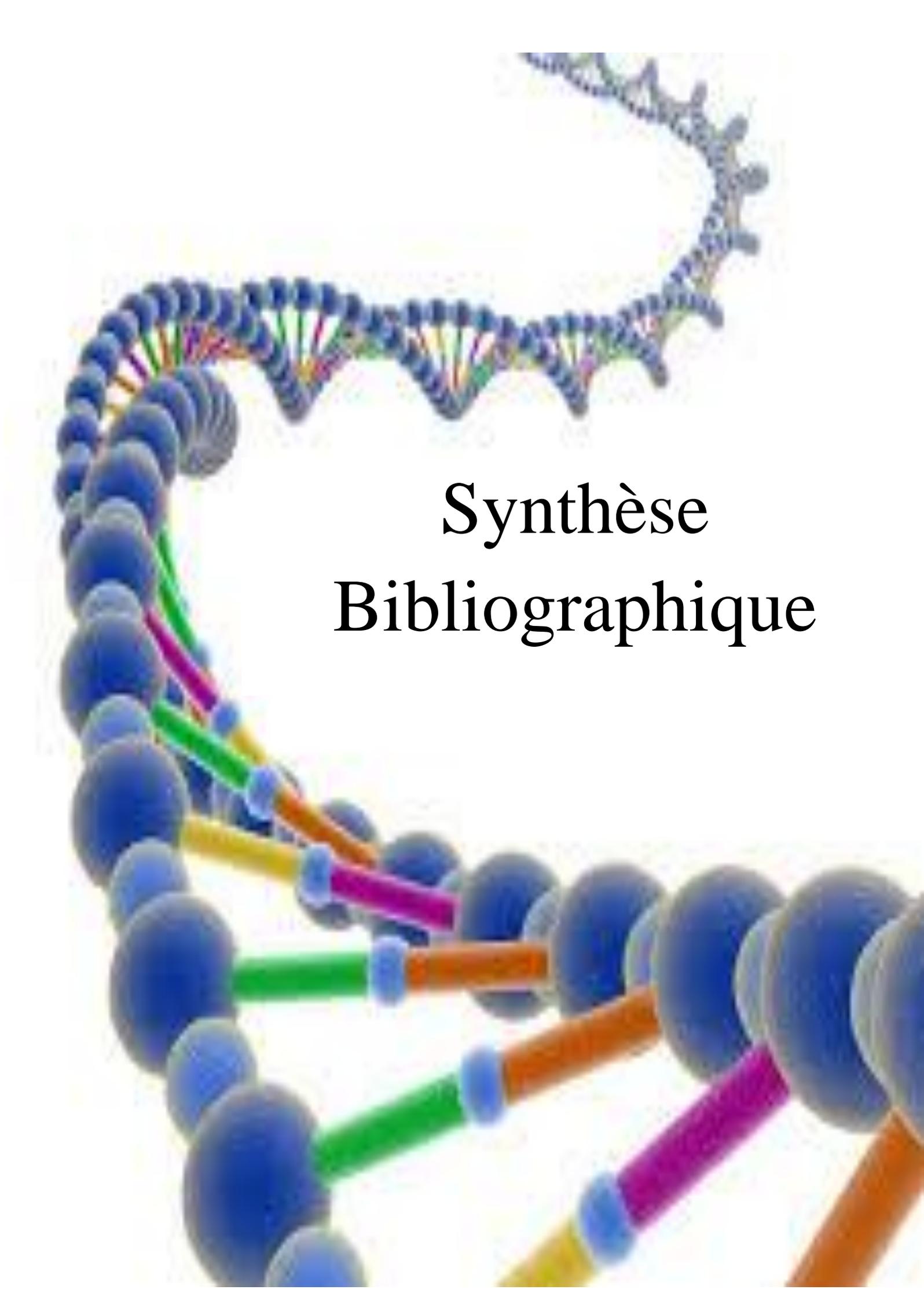
Introduction

Le syndrome Bardet-Biedl (BBS) est une maladie génétique autosomique qui se caractérise par un tableau clinique complexe. Le BBS est une maladie rare. Le BBS est une maladie génétiquement très hétérogène, à ce jour 17 gènes sont décrits. 70 à 80% des mutations sont identifiées (Muller et al. 2010). Le BBS se transmet selon le mode autosomique récessif. Cependant un troisième allèle muté a été décrit dans un nombre très limité des patients BBS. La fréquence du triallélisme est de 5% dans le BBS (Badano et al. 2003).

Le spectre mutationnel des gènes BBS est divergent dans les différentes populations. En effet dans la population Maghrébine les gènes les plus fréquents sont *BBS1*, *BBS2* et *BBS8* (Smaoui et al. 2006; Chen et al. 2010; M'hamdi et al. 2013). Les progrès récents des technologies de la deuxième génération du séquençage ont permis l'accélération de la détection de nouveaux gènes de cette pathologie ainsi que les mutations en cause. Cette révolution technologique a facilité le diagnostic moléculaire du BBS, le conseil génétique ainsi que la prise en charge des patients. En Tunisie le BBS est une maladie rare, l'exploration génétique des patients BBS a montré l'hétérogénéité génétique de cette maladie. Deux mutations fondatrices sont identifiées et confirmées par l'étude des haplotypes.

Le but de ce travail, qui a été fait au sein du Laboratoire de Génétique Humaine à la Faculté de Médecine en collaboration avec le Service des Maladies Héréditaires et Congénitales à l'hôpital Charles Nicolle à Tunis, est l'analyse moléculaire de 15 familles Tunisiennes de BBS par séquençage direct des deux mutations fondatrices p.R189* au niveau du gène *BBS2*, et c.459+1G>A au niveau du gène *BBS8* et d'autres mutations rapportées chez des familles Tunisiennes tel que la M390R et la c.1473+1G>A au niveau du gène *BBS1*, la p.L50R et la p.G42E*11 au niveau du gène *BBS5*, la c.1272+1G>A(*BBS6*), la C91Lfs*95 et la

p.S396Lfs*6 au niveau du gène BBS10, la p.G67D*45 et l'exon1 du gène BBS12 et la p.R133S (BBS8).



Synthèse Bibliographique

Synthèse Bibliographique

1. Définition :

Le syndrome de Bardet-Biedl (BBS) est une maladie génétique de transmission autosomique récessive qui appartient au groupe des ciliopathies. Le BBS se caractérise cliniquement par l'association d'une rétinopathie pigmentaire, une polydactylie post axiale, une obésité, un hypogonadisme chez les garçons atteints, un retard mental et des anomalies rénales comme la polykystose rénale. Les signes cliniques apparaissent dans les premières années de la vie, sauf la polydactylie qui est le signe détecté à la naissance (Abu Safieh et al., 2012).

Le BBS est une affection génétiquement hétérogène, à ce jour 17 gènes sont identifiés (Marion et al., 2013). Ces gènes sont impliqués dans le développement et le fonctionnement du cil primaire. Le cil primaire joue le rôle d'une antenne à la surface cellulaire qui capte et transforme les signaux du milieu extracellulaire. Lorsque ces cils sont défectueux, certaines fonctions cellulaires et moléculaires peuvent être altérées. Les cils ont un rôle important dans la vision au niveau de la rétine et dans le fonctionnement des reins, ce qui explique le déficit visuel et les anomalies rénales éventuelles dans le syndrome de Bardet-Biedl (Marion et al., 2013).

2. Historique :

En 1866, John Zachariah Laurence et Robert Charles Moon, deux ophtalmologues Anglais décrivent une famille de quatre enfants dont chacun présente à la fois une obésité, une dystrophie rétinienne, hypogénitalisme chez les garçons et atteinte cognitive avec des difficultés d'apprentissage, sans la présence d'une polydactylie (Forsythe et al., 2012).

En 1920, un pédiatre français, Dr Georges Louis Bardet, suivi deux ans plus tard par le Pr Arthur Biedl, un pathologiste hongrois, étaient les premiers à décrire (chez des individus touchés de manière semblable) un syndrome très proche, complexe connu sous le nom Bardet-Biedl syndrome (BBS). Solis Cohen et Weiss en 1925 suggèrent donc de réunir le syndrome de Laurence-Moon et le syndrome de Bardet-Biedl (Roorycha et al., 2008).

3. Epidémiologie :

La prévalence du BBS varie selon la population ; elle est de 1/156000 au Maghreb (M'hamdi et al., 2013), 1/125 000 à 1/175 000 pour les populations Européenne et d'Amérique du Nord et elle peut atteindre 1/17 000 dans certaines populations isolées (Bédouins du Koweït) à forte taux de consanguinité, voire 1/13 500 (Terre Neuve) (Forsythe et al., 2012 ; Teebi et al., 1987).

4. Manifestation clinique :

Le BBS est une affection multiviscérale qui se caractérise par un tableau clinique complexe associant à la fois chez un même patient une rétinopathie pigmentaire, une polydactylie post axiale, une obésité, un hypogonadisme chez les garçons, un retard mental (Figure1) et des signes mineurs qui varient d'un patient à un autre (nyctagmus, surdité, fibrose hépatique...) (Agha et al., 2013).

4.1 Rétinite pigmentaire

La rétinite pigmentaire est une dégénérescence de la rétine qui mène à une perte progressive de la vision périphérique qui peut être illustrée par une vision dans un tunnel car elle atteint initialement les bâtonnets en périphérique de la rétine puis les cornets au centre (rod-cone dystrophy), dont le premier signe consiste en une perte de la vision nocturne avec des difficultés d'adaptation à l'obscurité puis une diminution du champ visuel périphérique , le plus souvent, vers l'âge de 5 à 6 ans et peut conduire à une cécité avant l'âge de 20 ans chez les patient atteint de BBS.

La rétinite pigmentaire est un signe clinique majeur qui oriente les cliniciens vers le BBS avec une fréquence allant de 75% à 90% (Tableau1) (Rooryck et al., 2008).

4.2 Ob sitt 

C'est le second critère majeur du BBS (72 à 86% des patients BBS), elle survient précocement, parfois après la première année de vie alors que le poids à la naissance est normal. Elle tend à s'aggraver avec le temps et elle peut être à l'origine d'un diabète.

Les cellules graisseuses (ou adipocytes) des patients atteints du BBS présentent un défaut au niveau des cils. Cette anomalie leur confère une capacité à accumuler les graisses et à induire l'ob sitt  (Guo et al., 2011).

L'obésité entraîne une morbidité accrue du fait des complications associées, un diabète de type 2, dyslipidémie, hypertension artérielle, complication orthopédique, des complications respiratoire à type d'asthme.....etc (Guo et al., 2011).

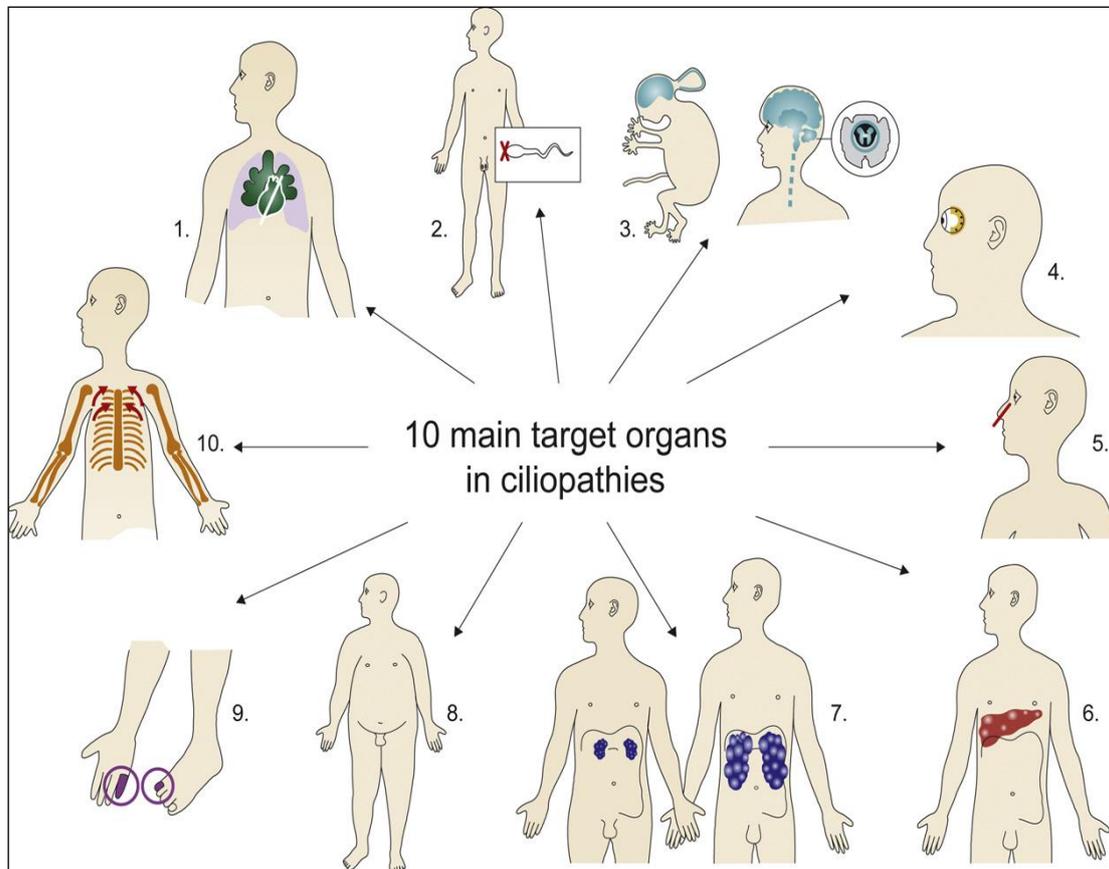


Figure 1 : 10 principaux organes cibles dans la ciliopathie. (1) le cœur inversus, (2) gonadisme (l'infertilité), (3) le système nerveux central avec encéphalocèle occipitale ou hypoplasie du vermis cérébelleux, (4) rétine pigmentaire, (5) le système olfactif avec anosmie, (6)le foie et la fibrose hépatique, (7) le rein avec une dysplasie kystique ou néphronophthise, (8)l'obésité, (9) une polydactylie et (10) chondrodysplasie de l'os (Mockel A., 2011).

4.3 Anomalies rénales

Les anomalies rénales peuvent se manifester par une insuffisance rénale diagnostiquée dans 30% à 60% des cas, l'atteinte rénale représente la première cause de mortalité et de morbidité dans le BBS (Dollfus et al., 2005).

D'après Beales et al ; 2008, il pourrait exister, chez les parents d'enfants atteints de BBS un risque accru de cancer du rein, augmentant 17 fois par rapport à la population normale.

4.4 Polydactylie poste-axiale

La polydactylie post axiale se caractérise par l'existence de doigts surnuméraires. C'est le seul signe qui peut être observé en échographie avant la naissance ou à la naissance.

Dans le BBS, la polydactylie consiste habituellement en une hexadactylie post-axiale (dédoublément des cinquièmes doigts), dans 21% des cas sont présentés sur les quatre membres, 9 % sont seulement sur les mains dans et 21% sont au niveau des pieds (Rooryck et al., 2008). Elle peut être partielle avec un appendice sur le bord externe des mains ou des pieds ou complète.

4.5 Hypogonadisme

C'est une anomalie congénitale qui se caractérise par une perte de fonction des gonades (testicule et ovaire), présent chez 90% (Tableau1) des garçons qui se manifeste par une cryptorchidie, un micropénis et/ou un retard pubertaire, alors que chez les filles, des malformation des organes génitaux sont possibles (une atrésie vaginale avec hydroméetrocolpos à la naissance, ou une hypoplasie des trompes de Fallope) plus des irrégularités du cycle menstruel. (Forsythe et al., 2013).

4.6 Retard mental et trouble cognitif :

Le retard mental est l'un des critères majeurs du BBS. Les symptômes neuropsychiatriques dans le BBS incluent un retard de développement, un retard mental, une difficulté d'apprentissage et des troubles de mémorisations.

Dans la série de Beales et al; 1999, des troubles neurologiques ont été décrits, elles incluent une ataxie et des troubles de la coordination chez 40% des patients avec une mâchoire anormale chez 33% des patients de BBS.

4.7 Autres manifestations

En plus des signes majeurs décrits précédemment des signes cliniques dits mineurs ont été décrits dans le BBS (Tableau1). Parmi ces derniers on peut citer une surdité (mixte et de transmission), des malformations cardiaques congénitales (7% des cas), des cardiopathies, une dysmorphie faciale, petite taille, fibrose hépatique, anomalies dentaires.

D'autres signes peuvent être observés qui peuvent être un diabète non-insulino dépendant, un diabète insipide néphrogénique, une hypertension artérielle, une hypoplasie de l'émail dentaire, une atrésie anale, un asthme, une anosmie ou une maladie de Hirschprung (Rooryck et al., 2008).

Tableau I : Critères clinique du diagnostic du syndrome de Bardet-Biedl et leurs fréquences (Forsythe et al., 2013 ; Rooryck et al., 2008).

Les critères	Fréquence
Critères majeurs :	
Rétinopathie pigmentaire	93%
Polydactylie post-axiale	69%-81%
Obésité	72%-92%
Difficulté d'apprentissage	62%
Hypogonadisme	59%-90%
Anomalies rénales	52%
Critères mineur :	
Retard ou trouble de mémoire	60%
Strabisme/cataracte/astigmatisme	07%
Brachydactyle/syndactylie	54%
Retard de développement	50%
Polyurie/polydipsie	33%
Ataxie/mauvaise coordination/Déséquilibre	40%
Spasticité légère en particulier des membres inférieurs	02%
Diabète sucré	06%
Dysharmonie dento-maxillaire / hypodontie / petites racines ou palais ogival	27%
Hypertrophie ventriculaire gauche/cardiopathie congénitale	07%
Fibrose hépatique	n/a
Dysmorphie craniofaciale	n/a
Maladie de Hirschsprung	n/a

4. Aspect génétique du Bardet-Biedl Syndrome:

Le BBS est une maladie multiviscérale, il appartient au groupe des ciliopathies liée à une atteinte du cil primitif. Le cil est un prolongement cellulaire de la plupart des cellules eucaryotes, ressemblant à un poil, qui est hautement conservé au cours de l'évolution. Il est composé de deux structures connues sous le nom d'axonème et corpuscule basal dont l'axonème est formé de neuf doublets de microtubules périphériques autour d'un cœur central qui contient ou non deux microtubules centraux (axonème 9 + 0 ou 9 + 2) (Figure2). Il est couvert d'une membrane plasmique qui s'étend de la surface cellulaire vers l'espace extracellulaire, bien que le corpuscule basal représente le point d'ancrage de l'axonème. Près du corpuscule basal, se situe le centrosome entouré par du matériel péricentriolaire (PCM) qui sert de centre de formation pour les microtubules. Grâce à un transport protéique intraflagellaire (TIF), les protéines ciliaires circulent le long de l'axonème (bidirectionnelle) pour assurer le maintien et la croissance du cil (Figure3).

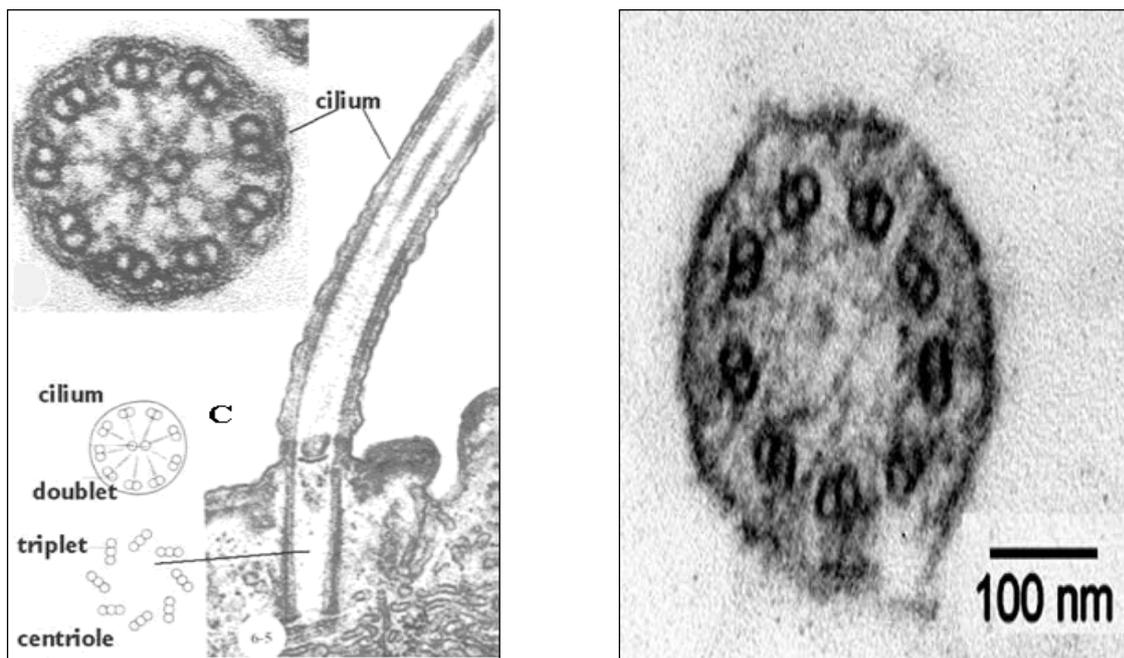


Figure 2 : Cils immobiles (9+0) et cils mobiles (9+2) (Riazuddin et al., 2010)

Les cils (9+2) sont mobiles, ils sont présents en grand nombre à la surface des cellules. Une anomalie au niveau des cils mobiles peut conduire à une dyskinésie ciliaire primaire qui se manifeste par une bronchorrhée chronique et une sinusite chronique (Zaghloul et al., 2009).

Les cils primitifs (9+0) sont au contraire des organites uniques et immobiles à la surface cellulaire présents sur la majorité des cellules de l'organisme. Ils ont un rôle de capteur d'informations sensorielles (chimique ou mécanique), qu'ils relayent et coordonnent au sein de différentes voies de signalisation cellulaires (voie de Sonic Hedgehog, voie non canonique WNT de polarité planaire cellulaire), dans le développement embryonnaire, postnatal et également dans le maintien de la fonction cellulaire et de l'homéostasie (Zaghloul et al., 2009).

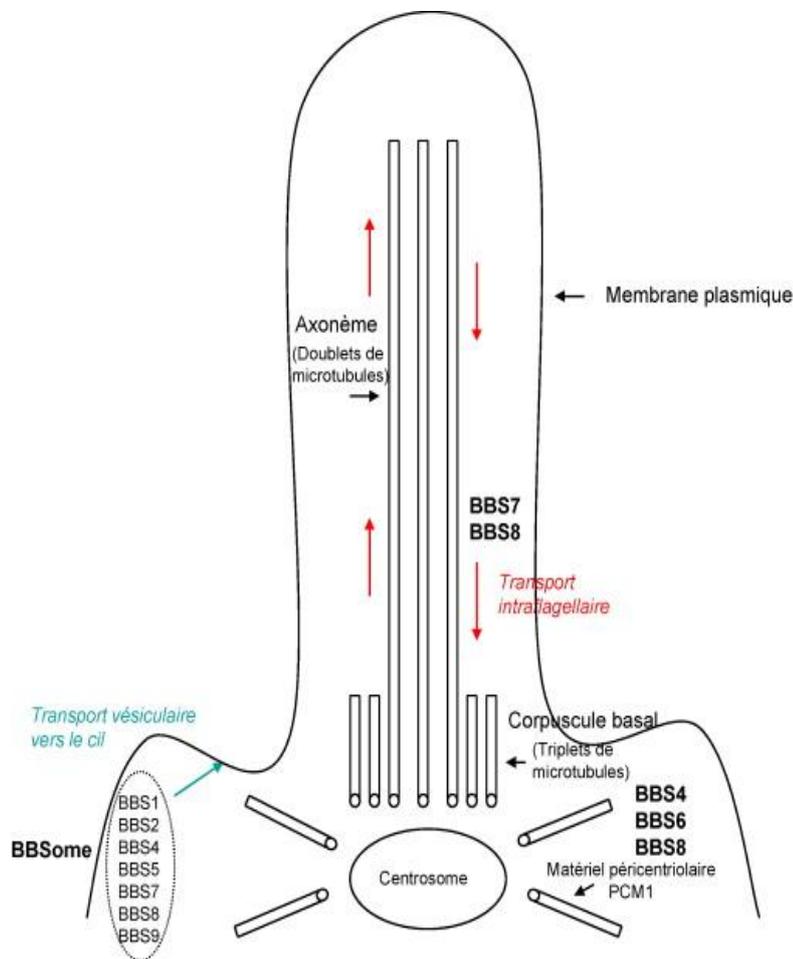


Figure 3: Schéma de la structure d'un cil primitif et la localisation de différentes protéines BBS. (Rooryck et al., 2008)

5.1 Les gènes impliqués dans le Bardet-Biedl Syndrome:

Le BBS est une maladie génétiquement hétérogène. A ce jour 17 gènes sont décrits.

(Tableau 2)

Tableau II: Gènes du BBS (Slavotinek et al., 2011)

Gene	Nom du gène	Locus	Mutation	Fréquence
<i>BBS1</i>	-	11q13	M, N, S, F	23% - 39%
<i>BBS2</i>	-	16q12.2	M, N, S, F	8% - 9%
<i>BBS3</i>	<i>ARL6</i>	3p12.p13	M, N	0,4% - 2%
<i>BBS4</i>	-	15q22.3-q23	M, N, S, F, D	1% - 3%
<i>BBS5</i>	-	2q31	N, S, D	0.4% - 3%
<i>BBS6</i>	<i>MKKS</i>	20p12	M, N, F	4% - 5.8%
<i>BBS7</i>	-	4q27	M, F, D	1.5% - 2%
<i>BBS8</i>	<i>TTC8</i>	14q32.11	S, D	1.2%
<i>BBS9</i>	-	7p14.3	M, N, S, F	6%
<i>BBS10</i>	<i>C12ORF58</i>	12q21.2	M, N, F	20%
<i>BBS11</i>	<i>TRIM32</i>	9q33.1	M	0.4%
<i>BBS12</i>	<i>C4ORF24</i>	4q27	M, N, F, D	5%
<i>BBS13</i>	<i>MKS1</i>	17q22	M, F, D	4.5%
<i>BBS14</i>	<i>CEP290</i>	12q21.32	N	0.6%
<i>BBS15</i>	<i>WDPCP</i>	2p15	S, M	-
<i>BBS16</i>	<i>SDCCAG8</i>	1q43	F, S, M	-
<i>BBS17</i>	<i>LZTFL1</i>	3p21.3	D, M	-

M : Mutation faux-sens. N : mutation non sens. F : décalage de cadre de lecture. S : mutation site d'épissage. D : Délétion.

A/ Le gène *BBS1*

Il a été identifié en 2002, localisé en 11q13.2, contient 17 exons qui s'étendent sur 23Kb environ. Il code pour une des sept protéines BBS qui forment le complexe BBSome. La mutation la plus fréquente dans la population Européenne au niveau du gène *BBS1* est le M390R.

Une analyse par le Northern blot a démontré que le *BBS1* est exprimé d'une manière ubiquitaire dans le tissu fœtal, les testicules, la rétine et les tissus adipeux, Son profil d'expression est similaire à celui observé dans les gènes *BBS2* *BBS4* et *BBS6* (Shah et al., 2008).

B/ Le gène *BBS2*

C'est le premier gène qui a été identifié chez une large famille consanguine Israélienne (d'origine maghrébine) . Le gène *BBS2* code pour une protéine de 721acides aminés faisant partie du complexe BBSome, conservée sur le plan phylogénique et affiche un large motif d'expression tissulaire, y compris le cerveau, les reins, les glandes surrénales et la glande thyroïde (Nishimura et al en 2004).

Nachury et al. 2007 a démontré que les gènes *BBS1*, *BBS2*, *BBS4*, *BBS5*, *BBS7*, *BBS8*, et *BBS9* appartiennent au complexe BBSome qui assure le trafic vésiculaire vers le cil.

C/ Le gène *BBS3*

Il a été identifié en 2004 par Fan et al. Nommé aussi *ARL6* (Tableau2) (ADP-ribosylation factor (ARF)-like-6), il code pour une protéine impliquée dans le trafic vésiculaire.

ARL6 fait partie d'un sous groupe de la famille ARF (qui sont des Ras), qui régulent diverses fonctions cellulaires, y compris la régulation de la circulation intracellulaire.

La protéine Bbs3 est localisée au niveau des cellules ganglionnaires, des fibres nerveuses et les cellules des photorécepteurs (Khan et al., 2013).

D/ Le gène *BBS4*

Le *BBS4* contient 16 exons et s'étend jusqu'à 52Kb. Il code pour une protéine appartenant au complexe BBSome. Kim et al. (2004) montrent que la protéine Bbs4 est localisée au niveau du centrosome et le corps basal des cils primitifs où elle fonctionne comme un adaptateur de la p150 (sous-unité de la machinerie de transport de la dynéine DCTN1) pour recruter matériel-1 péricentriolaire (PCM1). Si *BBS4* est endommagé, il y aura une mauvaise localisation des PCM ainsi qu'un mauvais ancrage de microtubules, ce qui entraîne l'arrêt de la division et conduit à l'apoptose.

E/ Le gène *BBS5*

Il a été identifié chez une large cohorte de familles d'origine de Terre Neuve (Li et al., 2004). Localisé en 2q31, il contient 12 exons et code pour une protéine de 341 acides aminés, qui fait partie du complexe BBSome. La protéine Bbs5 est localisée dans le corps basal chez les souris et *C.elegans* et elle est nécessaire pour la génération des cils et des flagelles (Li et al. 2004).

F/ Le gène *BBS6*

Le gène *BBS6* ou *MKKS*, est également responsable du syndrome Mc Kusick-Kaufman. Localisé en 20p12, code pour une protéine chaperonne, il est composé de 570 acides aminés (Stone et al., 2000) .

Slavotinek et al.; 2000 ont suggéré que les caractéristiques cliniques de BBS peuvent être causées par l'incapacité des protéines chaperonnes (Beales et al., 2001) et ont trouvé des *MKKS* mutés dans 4 à 11% des patients du BBS.

Fath et al (2005) ont suggéré que l'absence complète du gène *MKKS* conduit au BBS tandis que le phénotype McKusick-Kaufman est dû probablement à des mutations spécifiques.

G/ Le gène *BBS7*

Le gène *BBS7* a été identifié en 2003, il est formé de 19 exons et code pour une protéine de 672 acides aminés faisant partie du complexe BBSome. La fréquence des mutations du gène *BB7* reste très faible chez les patients BBS (Bin et al., 2009).

H/ Le gène *BBS8*

Le gène *BBS8* (*TTC8*) a été identifié en 2003 chez des familles saoudiennes, il contient 14 exons et code pour une protéine qui fait partie du BBSome. La mutation *TTC8* ne représente qu'environ 2-10% des mutations du BBS (Bin et al., 2009).

Le gène *BBS8* présente plusieurs isoformes, l'un contient 515 acides aminés en incluant l'expression de l'exon A2, l'autre contient 505 acides aminés et exclu l'exon A2, un troisième isoforme avec 475 identifié sans l'exon A2 et l'exon 5 (Riazuddin et al., 2010).

La protéine *BBS8* présente une forte expression au niveau des testicules, l'ovaire, le poumon, le cerveau, le foie, le pancréas, et les reins avec une faible expression dans le cœur, le placenta, le thymus et la rate (Ansley et al., 2003).

I/ Le gène *BBS9*

Le gène *BBS9* a été identifié en 1999 par Adams et al. La protéine Bbs9 fait partie du complexe BBSome. Il est formé de 24 exons qui s'étend à 700Kb. La protéine Bbs9 est exprimée chez les adultes au niveau du cœur, des muscles squelettiques, du poumon, du foie,

du rein, du placenta et du cerveau, et est exprimée chez le fœtus au niveau des reins, poumon, foie et cerveau (Adams et al., 1999).

J/ Le gène *BBS10*

Le gène *BBS10* a été identifié en 2006 (Stoetzel et al., 2006). Il code pour une protéine chaperonne de 723 acides aminés. L'immuno-histochimie a montré que les deux protéines Bbs10 et Bbs12 sont localisées au niveau du corpuscule basal des cils primitifs, et les deux protéines maintiennent leur localisation dans les cellules adipeuses non ciliées. Chez le poisson zébre, la suppression du *BBS10* exacerbe les phénotypes du BBS (Stoetzel et al., 2006).

K/ Le gène *BBS11*

En 2006, Chiang et al ont pu identifier le gène TRIM32 (Tripartite Motif-Containing) en utilisant les SNP microarray. Ce gène code pour une protéine à activité ubiquitine ligase E3 de 653 acides aminés. elle est localisé au niveau de la ligne Z dans le muscle squelettique, se lie en ubiquitine avec la protéine dysbindine ce qui augmente sa dégradation en évitant une dystrophie musculaire.

L/ Le gène *BBS12*

En 2007, Stoetzel et al; ont identifié le gène *C4ORF24*. Le gène *BBS12* code pour une protéine de 710 acides aminés. Les protéines BBS12, BBS6 et BBS10 appartiennent à la branche de la superfamille des protéines chaperonnes de type II. Knock-down des *BBS12* et *BBS10* réduit le nombre des cellules ciliées et diminue la phosphorylation des GSK3 (régulateur clé de l'adipogénèse) ce qui conduit à une obésité (Marion et al., 2009).

M/ Le gène *BBS13* ou *MKS1*

En 2006 le gène *MKS1* a été identifié dans une région de 100Kb du chromosome 17q23 chez des familles finlandaises atteinte du syndrome de Meckel. *BBS13* ou *MKS1* a été identifié en 2006 par Kyttala et al en 2006 (responsable du syndrome Meckel), il contient 18 exons qui s'étendent sur 14Kb. La protéine codée par ce gène est localisée dans le corps basal et est nécessaire pour la formation du cil primaire dans les cellules épithéliales ciliaires (Bialas et al., 2009). Le gène code pour 559 acides aminés contenant le domaine B9, le plus conservé entre les espèces.

L'hybridation in situ a montré une large expression du gène *BBS13* dans l'embryon des souris et aussi une expression particulière dans le cerveau, foie, reins et les membres supérieurs (Weatherbee et al., 2009). Une étude fonctionnelle chez les poissons zèbres a montré que la protéine Bbs13 est nécessaire pour la gastrulation.

N/ Le gène *BBS14* ou *CEP290*

CEP290 (centrosome protein 290KD) localisé en 12q21.32, comprend 55 exons qui s'étend à 93,2Kb. Code pour une protéine impliquée dans l'assemblage et le trafic ciliaire (Coppieters et al., 2010).

Le gène *BBS14* est exprimé au niveau de la rétine et de l'épithélium olfactif, la moelle osseuse, moelle épinière, la glande thyroïdienne, le testicule, le cœur, le poumon, le cervelet et l'utérus. Une faible expression a été détectée dans le cerveau, le rein, le thymus, le muscle, les glandes salivaires, le foie et le placenta. (Papon et al., 2010).

O/ Le gène *BBS15* ou *WDPCP*

Le gène *BBS15* code pour une protéine de 713 acides aminés qui joue un rôle primordial dans le mouvement des cellules collectives et la ciliogénèse (Kim et al., 2010). Ce gène peut également jouer un rôle dans le syndrome de Meckel Gruber (Kim et al., 2010). La fréquence des mutations dans le gène BBS reste très faible.

P/ Le gène *BBS16* ou *SDCCAG8*

Kenedy et al ont identifié une protéine de 713 acides aminés qui a un rôle dans l'établissement de la polarité cellulaire et la formation de lumière épithéliale, codé par le gène *SDCCAAG8*.

La protéine Sdccag8 est localisée au niveau du centrosome et à une certaine distance du centriole (Otto et al 2010).

Q/ Le gène *BBS17* (*LZFL1*): leucine zipper transcription factor-like1)

Une délétion homozygote de 5pb qui conduit à un codon stop prématuré (p. Pro136Thrfs*5) dans le gène *LZFL1* a été identifié chez une famille algérienne (Marion et al en 2012). Deux transcrits ont été détectés (1,7 et 3,6 Kb), dont le plus court est exprimé principalement dans les testicules, le cœur, les reins, les muscles squelettiques, le pancréas, le

thymus et le fœtus, alors que le plus long est exprimé au niveau du pancréas, thymus, testicule, reins et fœtus.

La protéine Bbs17 est récemment révélée être un important régulateur négatif du BBSome et de la voie de signalisation Shh, par une activation massive de la voie de signalisation Shh lors de l'absence du Bbs17 (Marion et al., 2012).

5.2 Spectre mutationnel des gènes BBS dans le monde

Les mutations au niveau des deux gènes *BBS1* et *BBS10* sont les plus fréquentes dans la population de l'Europe du nord (Figure 4). Au niveau du gène *BBS1* la mutation faux sens M390R est la mutation la plus récurrente dans plus de 50% des cas liés au *BBS1* et C91Lfs*95 est la mutation la plus fréquente dans le cas de *BBS10* (Mockel et al., 2010), alors que des mutations dans *BBS4*, *BBS5* et *TTC8* sont retrouvées chez les patients du Moyen-Orient et de l'Afrique du Nord (Puech et al., 2012 ; M'hamdi et al., 2013).

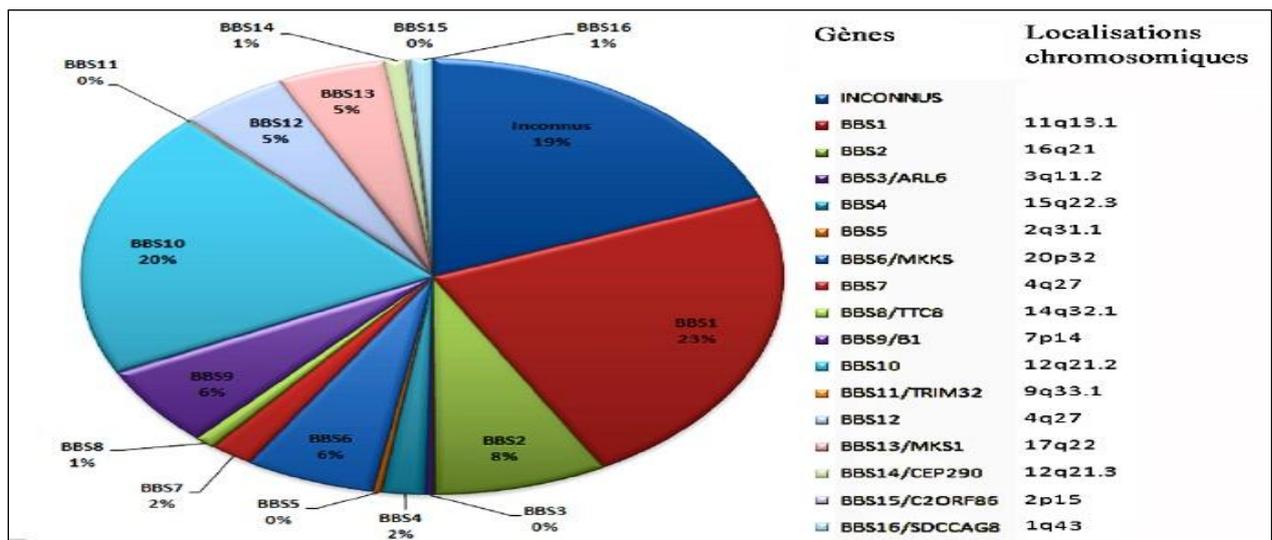


Figure 4 : Hétérogénéité du Bardet Biedl dans la population Européenne. Le pourcentage de mutation de chaque gène dans les familles BBS et leurs localisations (Puech et al., 2012).

5.3 Le BBS un nouveau model d'hérédité dite « triallélique » :

L'hérédité peut être triallélique, c'est-à-dire qu'un premier gène est porteur de deux allèles mutés et qu'un second gène, muté sur un seul allèle. Le triallélisme est décrit chez 1 à 5 % des patients BBS (Roocky et al., 2008).

En 2001, un nouveau modèle d'hérédité triallélique a été mis en évidence chez les patients atteints du BBS ce qui ajoute un niveau de complexité. Il est apparu chez une famille ou les parents ne sont pas affectés malgré qu'ils portent deux mutations au niveau du gène *BBS2* alors que leurs enfants atteints ont présenté une troisième mutation soit dans le gène *BBS1* ou dans *BBS6*. Les mutations hétérozygotes du deuxième gène modifient le phénotype (gènes modificateurs avec variation d'expressivité) (Figure5) ou plus encore, sont nécessaires à l'apparition du phénotype (hérédité triallélique) (Hichri et al., 2005).

Katsanis et al, ont observé chez un patient porteur d'une mutation faux-sens au niveau de gène *BBS6* et d'autre mutation M390R (*BBS1*) à l'état homozygote, une précoce obésité et un retard mental plus sévère que sa sœur qui était homozygote pour M390R seulement (Figure5).

Une mutation *BBS3* a été également identifiée comme un modificateur du phénotype associé au *BBS1*. Ces travaux soulignent encore une fois la complexité génétique de ce syndrome.

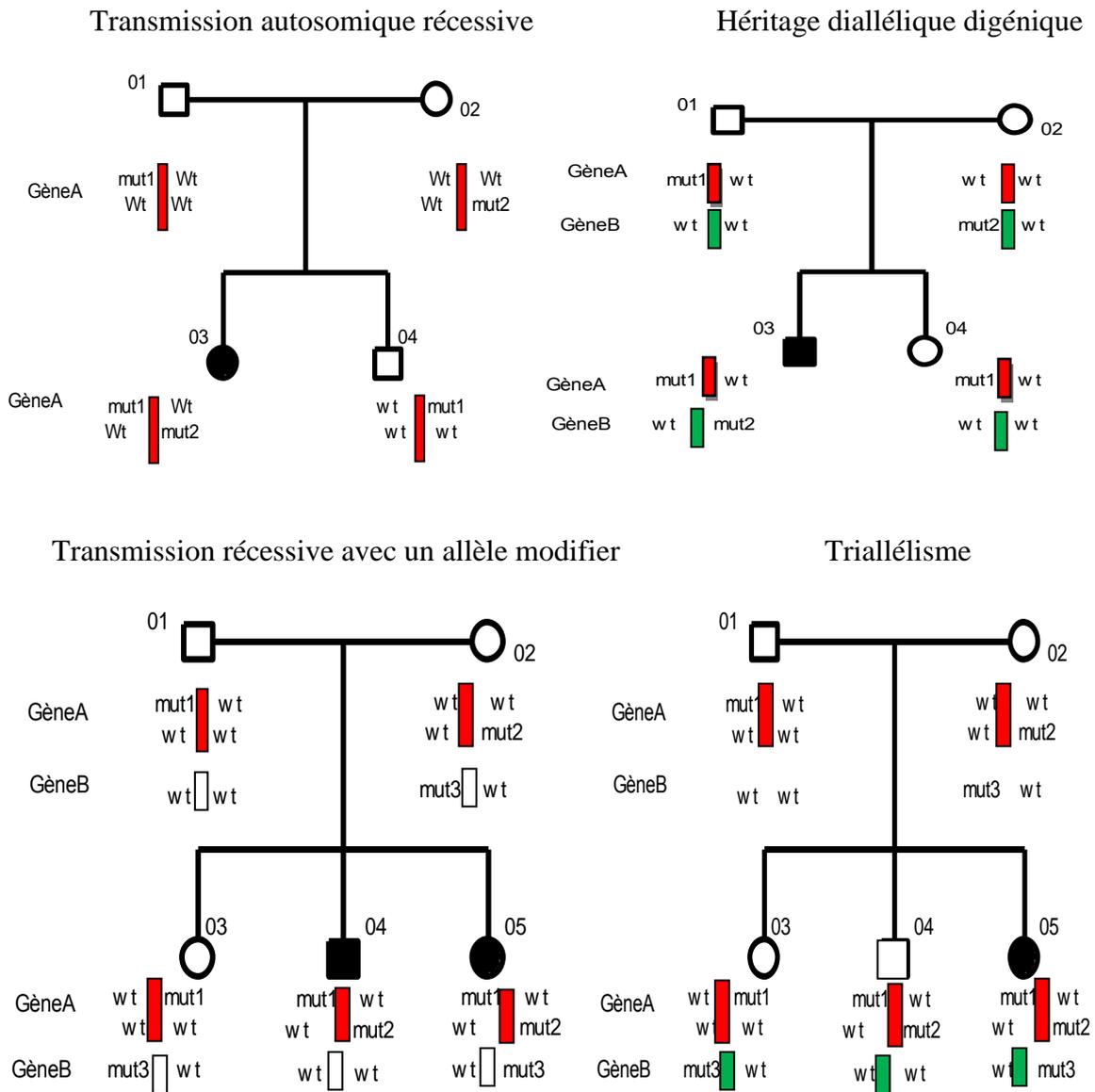


Figure 5: Modèles d'héritage. Il ya 3 mutations pathogènes, mut1, mut2 et mut3. Dans le pedigree supérieur droit, deux mutations dans deux loci différents peuvent causer la maladie. Ce mode de transmission n'a pas été observé de façon convaincante dans les ciliopathies. Dans la partie inférieure gauche pedigree, deux mutations dans un locus provoquent la maladie, une troisième mutation à un second locus aggrave les phénotypes, Dans la partie inférieure droite pedigree, trois mutations à deux loci sont nécessaires pour provoquer la maladie (Mockel et al., 2011).

6. Diagnostic

L'âge moyen du diagnostic clinique du BBS est de 2-3 ans, il peut être soupçonné avant la naissance. Le diagnostic clinique du BBS est évoqué si au moins trois critères majeurs et deux mineurs sont présents chez le patient.

6.1 Diagnostic clinique

Les critères des diagnostics les plus utilisés sont ceux proposés par Beales et al ;1999, qui reposent sur la présence de quatre critères majeurs tels que la rétinopathie pigmentaire, la polydactylie, l'obésité, l' hypogonadisme, ou trois signes majeurs et deux signes mineurs de BBS incluant le retard ou trouble de langage, le retard de développement, les autres anomalies ophtalmologiques, l'ataxie et les troubles de la coordination, le diabète, les anomalies dentaires..Etc (Forsythe et al., 1999).

6.2 Diagnostic moléculaire

Le diagnostic moléculaire permet de confirmer le diagnostic clinique. A ce jour, le diagnostic moléculaire reste un peu difficile, plusieurs stratégies sont proposées, tel que le séquençage direct des 17 gènes BBS ou analyse par DHPLC ou par séquençage à haut débit. Dans la population Caucasienne, les deux gènes *BBS1* et *BBS10* sont les deux gènes majeurs impliqués dans 45 à 50 % des cas (Rooryck et al., 2008). Le gène *BBS1* est muté chez environ 20- 25% des patients BBS (Rooryck et al., 2008). Le gène *BBS10* est muté dans 21% des familles avec une mutation prédominante dans la population Caucasienne C91Lfs*95.

6.3 Diagnostic prénatal

Le diagnostic peut être suspecté après une échographie anténatale, une polydactylie et des anomalies rénales avec des reins hyperéchogènes.

Un diagnostic moléculaire prénatal peut être proposé lorsqu' un couple a déjà un enfant atteint, ce diagnostic repose sur l'ADN extrait des villosités choriales à partir de la 11ème semaine d'aménorrhée (SA) ou du liquide amniotique à partir de la 14ème SA, si les mutations sont bien identifiées au préalable sur un ou plusieurs gènes dans la famille concernée.

6.4 Diagnostic différentiel

Le BBS partage avec d'autres ciliopathies plusieurs signes cliniques parmi ces signes on peut distinguer ceux observés dans la figure 6.

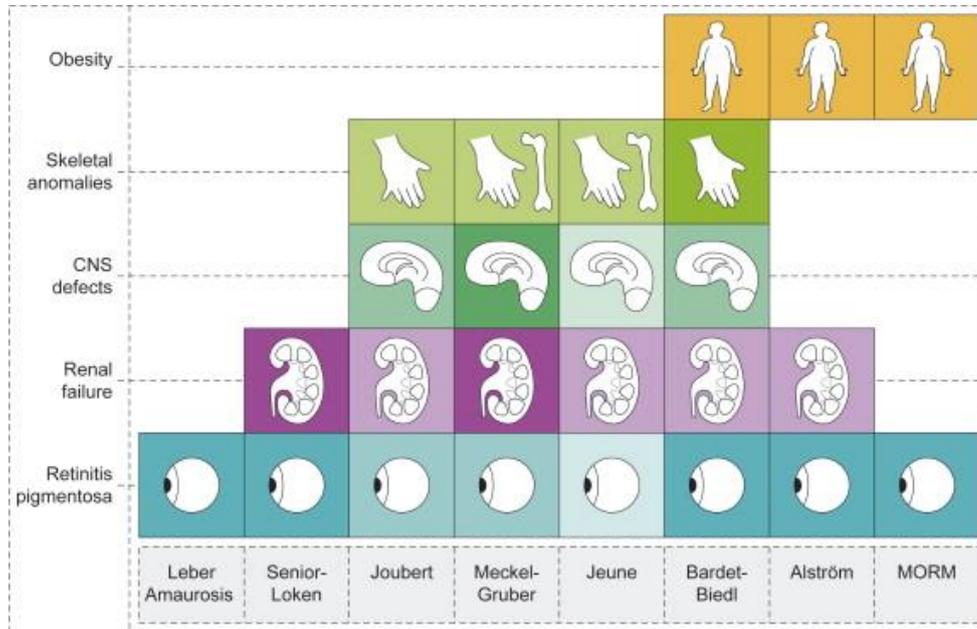


Figure 6: Spectre des ciliopathies. Des manifestations cliniques le plus souvent observées et leur présence dans les différentes ciliopathies (Mockel et al., 2011).

6.4.1 Syndrome d'Alström :

Il est caractérisé par une rétinite pigmentaire à cônes, une obésité, une surdité de transmission progressive, une cardiomyopathie dilatée, un diabète non insulino-dépendant et un retard mental. Contrairement au BBS, il n'y a pas de polydactylie, et le déficit visuel lié à la rétinopathie est plus précoce.

Le syndrome d'Alström est dû à des mutations du gène *ALMS1* et il se transmet sur le mode autosomique récessif.

6.4.2 Syndrome de Mc Kusick-Kaufman (MKKS) :

Ce syndrome est caractérisé par un hydrométroncolpos et une polydactylie post-axiale, il semble difficile à distinguer du BBS jusqu'à l'âge de cinq ans selon certains auteurs.

La maladie est à transmission autosomique récessif et le gène responsable *MKKS* a été localisé en 20p12 (*MKKS* est aussi appelé *BBS6*) (Mockel et al., 2011).

6.4.3 Syndrome de Meckel-Gruber (MKS) :

Il se caractérise par la combinaison de kystes rénaux et des anomalies de développement du système nerveux central (généralement une encéphalocèle occipitale), une dysplasie des voies biliaires et des kystes hépatiques, et une polydactylie. Il existe, une grande hétérogénéité génétique dans ce syndrome, plusieurs loci ont été cartographiés : *MKS1* sur le chromosome 17q, *MKS2* sur le 11q, et *MKS3* sur le 8q (Weatherbee et al., 2009).

6.4.4 Syndrome de Senior-Loken (SLS) :

Le Syndrome de Senior-Loken est une maladie autosomique récessive avec les principales caractéristiques de néphronophtise (NPHP) et amaurose congénitale de Leber. SLS1 est causé par une mutation dans le gène *NPHP1* sur le chromosome 2q13.

6.4.4 Les néphronophtise (NPHP):

La néphronophtise est une maladie génétique récessive qui fait partie des groupe des ciliopathie, a ce jour dix gène (*NPHP1/NPHP10*) ont été identifiés dont leurs produits sont localisés au niveau des cils primaires et des centrosomes.

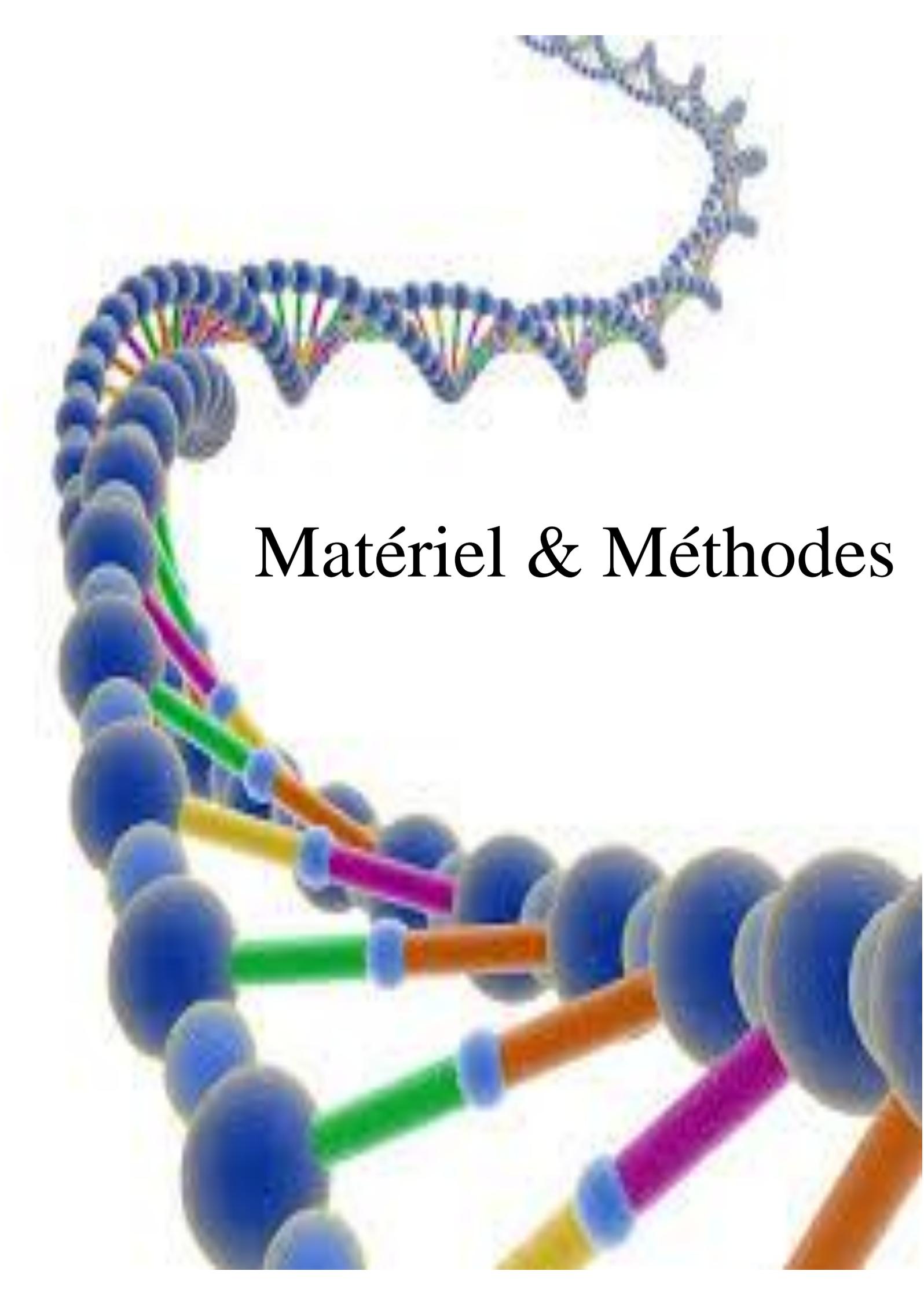
7. Prise en charge

La prise en charge du BBS est multidisciplinaire du fait que l'atteinte est sévère chez les patients. Différents modes de prises en charge doivent être cependant envisagées telles que la psychothérapie, le régime pour l'obésité, le traitement de l'hypercholestérolémie, du diabète, de l'hypertension artérielle et des complications cardiaques. La chirurgie doit être envisagée pour le traitement de la polydactylie, de l'hydrocolpos, de l'atrésie vaginale ou de l'hypospadias. La cataracte doit être opérée lorsqu'elle devient invalidante. La surveillance de la fonction rénale doit être systématique. L'insuffisance rénale pouvant conduire à la greffe de rein. Il est très important de prendre en charge le plus tôt possible les différentes manifestations du syndrome pour éviter les complications (Rooryck et al., 2008).

8. Conseil génétique

Le généticien doit expliquer aux parents le mode de transmission de la maladie et le risque d'avoir un enfant atteint. L'affection est de transmission autosomique récessive mais elle peut être beaucoup plus compliquée en cas de triallélisme qui représente 1-5% des cas.

Par conséquent, toute fratrie avec un enfant atteint a un risque de 25% d'avoir un deuxième enfant atteint, 50% de risque d'avoir des enfants porteurs et 25% d'avoir des enfants sains et non porteurs. En cas où la mutation causale a été déjà identifiée chez un autre membre de la famille, un diagnostic prénatal en biologie moléculaire peut être proposé, en revanche, chez une famille où la mutation est inconnue, l'échographie peut permettre le dépistage de l'hexadactylie et des anomalies rénales à partir du deuxième trimestre, mais ces deux signes sont inconstants et non spécifiques, soumis parfois à des variations intrafamiliales et ne sont pas l'unique apanage du syndrome de Bardet-Biedl.



Matériel & Méthodes

Matériel et Méthodes

1. Matériel

1.1 Patients :

Dans cette étude, 15 familles BBS ont été recensées, où il existe au moins un malade par famille.

Les patients étudiés ont été recrutés et examinés à l'hôpital Charles Nicolle de Tunis au niveau du service des maladies Héritaires et Congénitales. Le choix des patients BBS a été effectué selon des critères suivants :

- 1/ au moins trois critères majeurs sont présents chez les patients. (Tableau VI)
- 2/ deux critères mineurs minimum sont présents chez le patient. (Tableau VI)
- 3/ Le mode de transmission de la maladie répond à un schéma autosomique récessif.

Le quinzième patient est en fait un fœtus, et donc on a fait un diagnostic moléculaire prénatal sur ce patient.

1.2 Les gènes étudiés :

Le BBS est un syndrome très hétérogène, donc on ne peut pas étudier tous les gènes BBS et pour cela on commence par la recherche des mutations à effet fondateur *BBS2* (*p.R189**) et *BBS8* (*c.459 +1G>A*). Les résultats obtenus étant négatifs, on a procédé à l'étude d'autres mutations au niveau des gènes *BBS1*, *BBS2*, *BBS5*, *BBS6*, *BBS8*, *BBS10* et *BBS12*.

1.3 Choix des amorces :

Le choix des amorces est fait à l'aide d'un logiciel bioinformatique appelé « Primer3 » qui dispose d'un programme de conception d'amorces PCR très puissant permettant un contrôle considérable sur la nature des amorces y compris la taille du produit désiré, la gamme Tm, leur contenu en GC et la possibilité de former des dimères.

Tableau III: Amorces utilisées pour la PCR

Gène	Taille (pb)	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')	Tm (°C)
<i>BBS1</i> M390R	229	CCATCCCCTGTCTTGCTTTC	CATGCTTCATTTCCACCT CC	55
<i>BBS1</i> c.1473+1G>A	228	CGCAAAGCTAAAATGCCA	AGTCAAATGGATTAGG GC	58
<i>BBS2</i> p.R189*	240	AGAAGCAGCATGCCAAAGT AC	TCATCTGACAGTACTGA TCTA	52
<i>BBS5</i> p.G42E*11	248	TCCCTAAATAGATTGCAAG CAG	CACTGACAAATGATGCT GTTTC	56
<i>BBS5</i> pL50R	497	GAGCAAAGCTATTGGCAGA GA	GACACAAAATGGACAAA CCAAA	55
<i>BBS6</i> c.1272+1G>A	450	TGATGTGAACGTCTGATTC T	TATACATGCACCCCGAA CC	53
<i>BBS8</i> c.459 +1G>A	800	TCCCTATTTAGATTCATGC	GGCCACACACACCAACA AATG	56
<i>BBS10</i> p.S396Lfs*6	539	GATGTGGGAAGCCAGCCTT C	GGCCAGTGACACCAACA TTC	57
<i>BBS10</i> C91Lfs*95	417	GAAGCCGTCTACCCCGGCT	CGCATCGCCTCAGGATG GGA	59
<i>BBS12</i> Exon1	300	GAAGCAGCATGCCTTGTT	ATACATGCACCCCGAAG GTCC	52
<i>BBS12</i> p.G67D*45	479	GTTACAAGTTTTTATTTTGT TTGCAG	GAAAATGTTTTTGTGCTG TCCA	57

p : protéine, M : méthionine, R : arginine, G : glycine, E : acide glutamique, S : serine,

D : acide aspartique, * : codon stop.

c : ADN complémentaire, A : adénine, G : guanine.

2. Méthodes

2.1 Outils bioinformatique :

La consultation des différentes bases des données (NCBI, OMIM, ENSEMBL, PRIMER) nous a facilité le travail.

❖ **OMIM:** (Online Mendelian Inheritance in Man)

Catalogue des maladies génétiques humaines. À chaque maladie donnée, une fiche OMIM fournit un corpus d'information mise à jour régulièrement. OMIM possède d'autres caractéristiques précieuses comme des informations des gènes morbides et la banque offre des liens vers de nombreuses bases de données.

❖ **Le serveur Ensembl :**

Ensembl est un projet commun de collaboration entre EMBL (The European Molecular Biology), EBI (The European Bioinformatics Institute) et l'institut Sanger. Cette base de données a pour objectif l'analyse des grands génomes, elle permet l'accès vers d'autres serveurs spécialisés dans la génomique comme UCSC, NCBI, OMIM.

Cette base de données fournit une présentation claire de la carte physique, et la description du gène ciblé (nombre d'exons, la protéine et ses différents domaines, les marqueurs microsatellites, les primers).

❖ **Le serveur NCBI :**

C'est une base de données qui permet de mener des recherches en bioinformatique et d'analyser les données via des logiciels comme Blast. Permet la diffusion des travaux de recherche dans le domaine biomédical.

Ce serveur constitue une toile communicante vers d'autres serveurs spécialisés dans la génomique fonctionnelle ou comparative.

Les principales données fournies par ce serveur sont: la publication des travaux de recherche les plus récents (pub med), l'analyse des séquences nucléiques (Gen Bank), la localisation physique des gènes et des marqueurs microsatellites (OMIM, Uni STS).

❖ **UCSC Genome Browser:**

Organisée par Université de Californie, Santa Cruz (UCSC). Il s'agit d'une offre de site web interactif avec accès aux données de la séquence du génome d'une variété d'espèces de

vertébrés et d'invertébrés et principaux organismes modèles, intégrés à une vaste collection d'annotations alignés.

La base de données du génome du navigateur, les outils de navigation, les fichiers de données téléchargeables, et la documentation peuvent être trouvés sur l'UCSC Genome.

2.2 Analyses moléculaires :

2.2.1 Extraction de l'ADN génomique par Salting out:

Le principe consiste à extraire de l'ADN à partir des leucocytes de sang récupérés sur (20 ml) EDTA, une centrifugation pendant 10 minutes à 2500 tours/min, puis une étape de lyse des leucocytes, et enfin l'ADN est précipité par l'éthanol absolu à haute force ionique.

❖ Lyses des leucocytes :

Le culot leucocytaire est mélangé initialement à 20 ml d'une solution SLR1X afin d'éclater les globules rouges. La lyse est réalisée à température ambiante pendant 10 à 20 minutes, ensuite le lysat est centrifugé pendant 15 minutes à 3500 tours /mn .Après élimination du surnageant le culot contenant les leucocytes est lavé avec 20 ml de tampon de lyse 1X (SLR1X), une centrifugation pendant 10mn à 3500 tours/mn. La même étape est répétée avec 10 ml de tampon de lyse 1X. Si le culot contient encore des globules rouges on ajoute quelques gouttes de la solution SLR1X, on centrifuge pendant 10 mn à 3500 tours /mn puis on procède au lavage par le tampon de lyse 1X .On obtient dans ce cas un culot propre auquel on ajoute 5ml de tampon de lyse (SLB), 250µl de SDS 10% et 100µl de protéinase K. On laisse incuber pendant toute une nuit à 37°C (la protéinase K a pour objectif la digestion des protéines associées à l'ADN).

❖ Précipitations :

Cette étape consiste à additionner 2 volumes d'éthanol absolu glacial au mélange. L'ADN se précipite sous forme de méduse, cette dernière sera transférée dans un tube eppendorf de 1,5 ml à l'aide d'une pipette pasteur, une centrifugation pendant 20 mn, l'excès d'éthanol est éliminé, l'ADN est dissout dans le TE (Tri EDTA) et stocké à +4 °C.

❖ Contrôle de la qualité et de la quantité de l'ADN:

Le contrôle de la qualité de l'ADN se fait à l'aide d'un appareil le nanodrop qui permet

de donner automatiquement la concentration, ainsi que le rapport DO 260nm/280 nm.

Ce rapport nous donne la qualité de notre échantillon d'ADN, ce rapport doit être compris entre 1,8 et 2. Une valeur inférieure à 1,8 indique une contamination par les phénols ou les protéines, alors qu'une valeur supérieure à 2 témoigne d'une contamination par les sels.

2.2.2 Amplification des gènes par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) :

PCR ou « Polymerase Chain Reaction » décrite en 1985 par Karry Mullis, est une technique d'amplification enzymatique des séquences d'ADN de manière spécifique *in vitro* afin d'obtenir un grand nombre de copies identiques d'ADN dont on dispose initialement (Figure7).

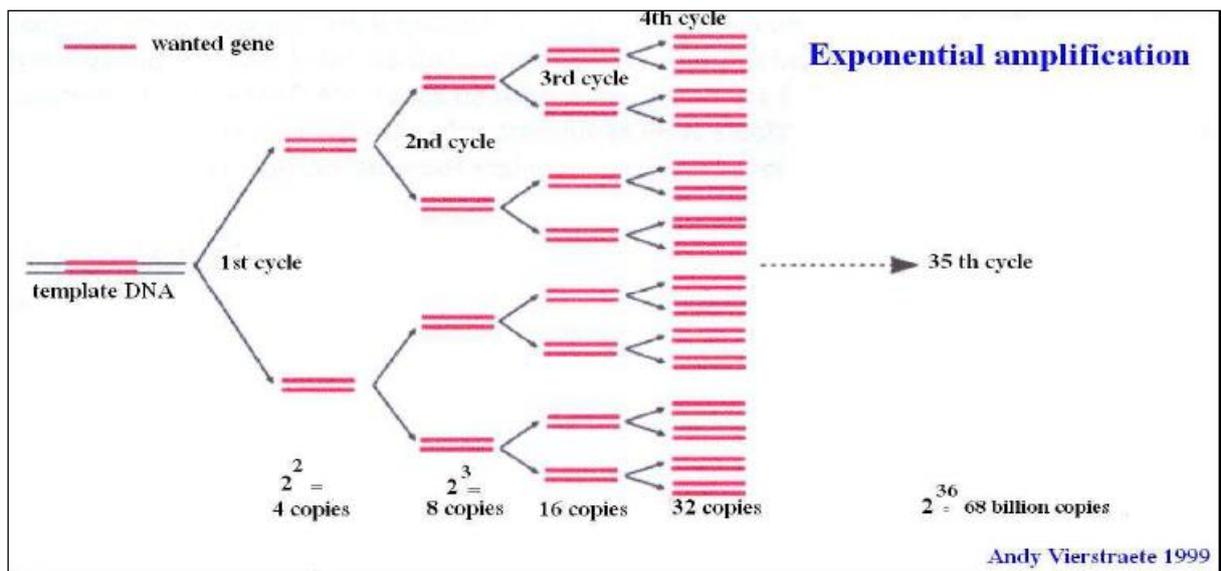


Figure 7: Amplification exponentielle de l'ADN par PCR (Vierstraete et al.,1999).

❖ Principe :

Il s'agit de réaliser une succession de réaction de réplifications d'une matrice double brin d'ADN. C'est en fait une cyclisation in vitro effectuée à l'aide de deux amorces (primer) oligonucléotidiques spécifiques qui définissent la séquence à amplifier en la bordant, et qui sont également le point de départ à la polymérisation du brin d'ADN complémentaire par l'ADN polymérase thermorésistante extraite de la bactérie *thermus aquaticus* (Taq polymérase).

❖ Les étapes :

Une réaction PCR correspondant à la succession d'une trentaine de cycle comportant chacun trois phases différentes à trois températures différentes (Figure8) :

- Dénaturation de l'ADN pour obtenir des matrices simples brin, réalisée à une température d'environ 95°C pour une dissociation complète des deux brins d'ADN.
- Hybridation : le choix de la température d'hybridation résulte d'un compromis entre plusieurs paramètres (la longueur et la nature des amorces), elle est inférieure à la température de dénaturation, et varie de 50 à 65°C. cette température va déterminer la stabilité des hybrides une fois que l'appariement amorce/matrice est réalisé.
- Elongation : c'est l'étape de polymérisation à 72°C. au cours de cette étape, l'ADN polymérase synthétise les brins complémentaires de l'ADN matrice de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'.

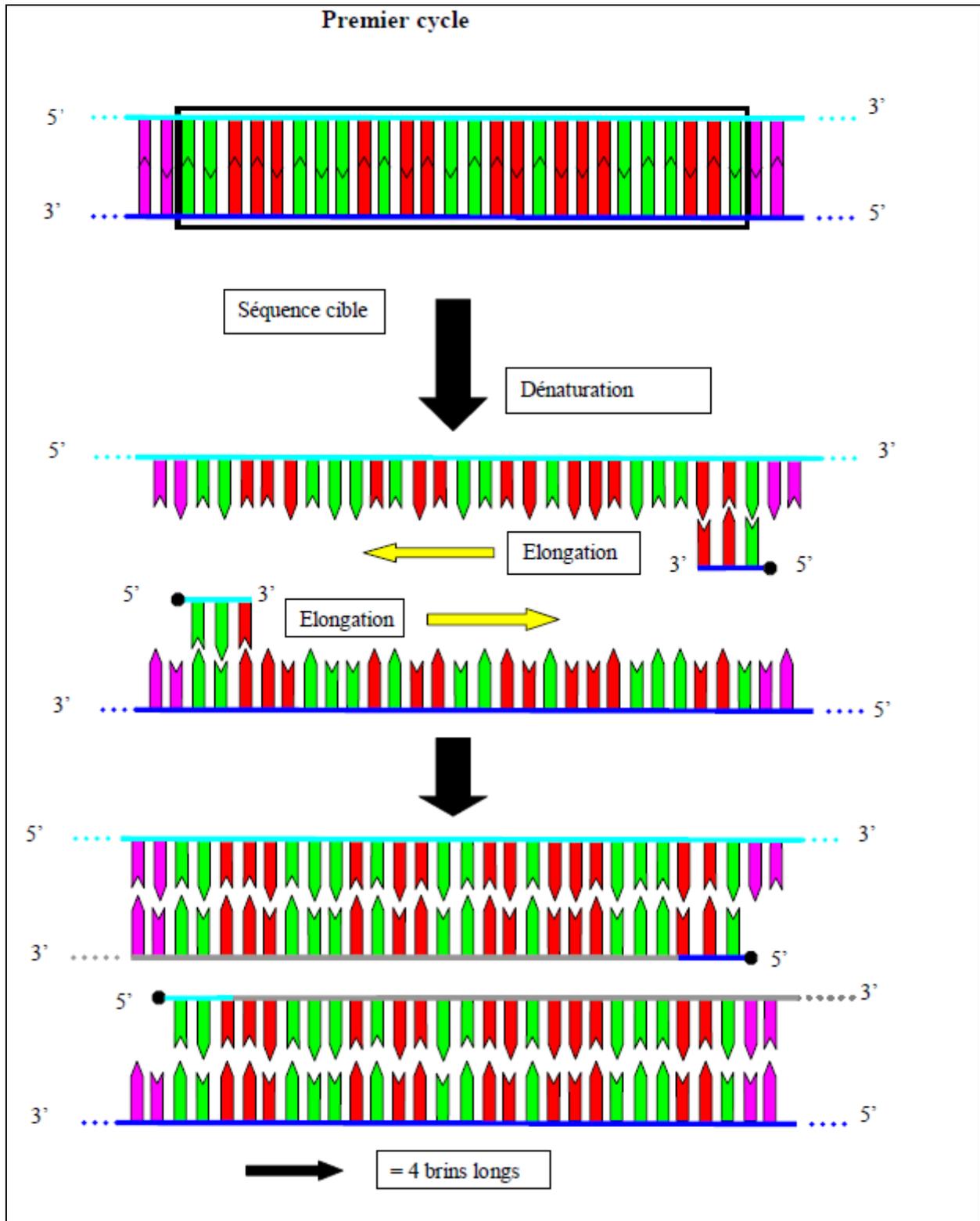


Figure 8: Différentes étapes de la PCR (Loistron et al.,2009)

❖ Programme du thermocycleur :

Chaque amplification nécessite une programmation spécifique du thermocycleur (Figure9).

-**1cycle** : 2 à 3minutes c'est une étape qui sert à bien dénaturer totalement l'ADN dès le départ

-**30cycles de répliation** : 30 secondes de dénaturation à 95°C

30 secondes d'hybridation à T_m

1 minute d'élongation à 72°C

-**5minutes d'extension finale** à 72°C

- **étape du froid** à +4°C

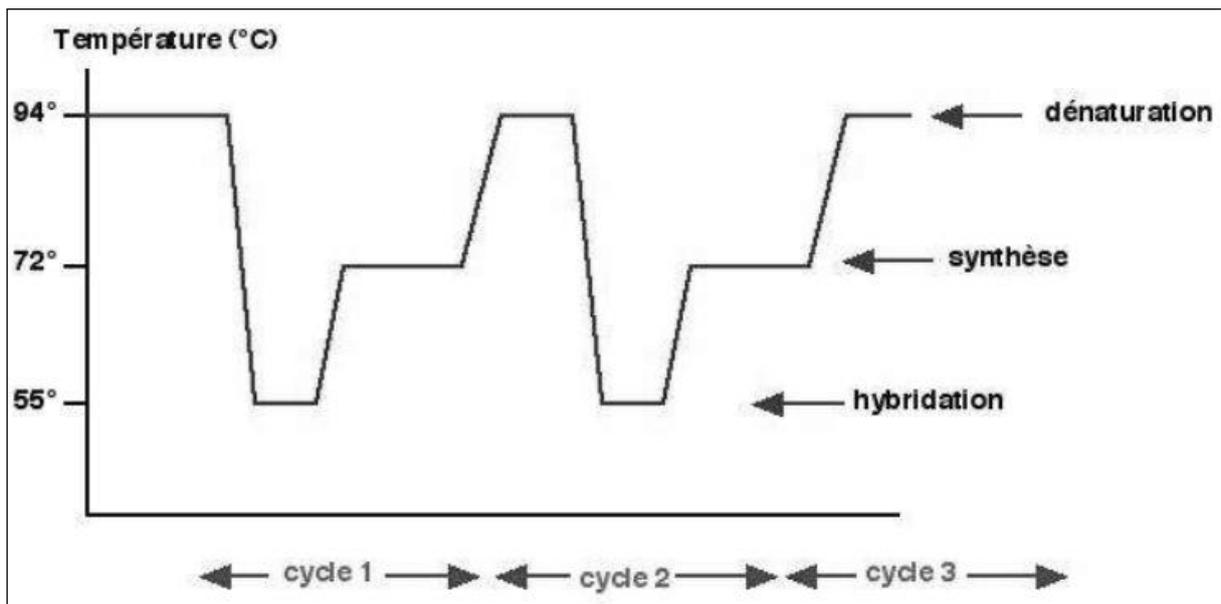


Figure 9: Variation de température pendant un cycle de PCR (Loistron et al.,2009)

❖ Conditions expérimentales :

L'amplification des 12 exons des gènes BBS a nécessité plusieurs mises au point qui ont consisté à réaliser différentes combinaisons de modification de la température d'hybridation des amorces, de la concentration de MgCl₂ et du choix de la taq polymérase.

- **ADN :** la molécule d'ADN, sous forme de double brin, contient le fragment à amplifier. Après avoir mesuré la concentration d'ADN avec le Nanodrop, l'ADN doit être dilué.
- **Amorce (Primer) :** on a besoin de deux amorces : sens et anti-sens, ce sont des petits brins d'oligonucléotides d'environ 20bases, capables de s'hybrider de façon spécifique grâce à la complémentarité des bases avec le brin d'ADN permettant de définir la séquence de l'amplicon, et servant de points de départ à la synthèse du brin complémentaire de la matrice par l'ADN polymérase. Pour chaque exon la température d'hybridation devra être calculée. Cette température d'hybridation dépend de la composition en bases des amorces.
- **DNTP :** ATP, TTP, GTP et CTP sont communément appelés DNTP (désoxyribonucléotides triphosphates). Utilisés par la Taq polymérase pour synthétiser le brin d'ADN complémentaire.
- **MgCl₂ :** chlorure de magnésium est un cofacteur essentiel de la Taq polymérase, il doit être déterminé à chaque fois qu'un nouveau fragment est à amplifier. Car on réalise une gamme du MgCl₂ pour optimiser la réaction de PCR.
- **La Taq DNA polymérase (GO Taq promega®) :**
Thermus aquaticus est la bactérie dont cette ADN polymérase est extrait. Une enzyme thermorésistante, résistante à l'ébullition et pourvu d'activité d'édition (5'→3' exonucléase).
- **Tampon de la Taq :** il est indispensable à l'activité de l'enzyme et est livré avec elle, il sert à tamponner le milieu réactionnel afin de garder un niveau optimal pour la Taq polymérase.
- **DMSO:** il est utilisé pour optimiser la réaction de PCR surtout lorsqu'il s'agit d'une séquence riche en bases GC difficile à dénaturer. Ce réactif améliore la dénaturation de deux brins en facilitant la rupture des liaisons hydrogènes reliant les deux brins de la molécule de l'ADN.
- **H₂O**

❖ **Electrophorèse sur gel d'agarose :**

Une fois la réaction de PCR terminée, les produits PCR sont visualisés sur un gel d'agarose à 2% (2 g d'agarose dans 100 ml de TBE 1%). Le pourcentage d'agarose varie selon la taille du fragment d'ADN à séparer.

L'électrophorèse sur gel d'agarose est basée sur la séparation des acides nucléiques en fonction de leurs poids moléculaire sous l'effet d'un champ électrique en présence d'un tampon TBE (tri-borate EDTA). Pour chaque série d'échantillons on a besoin d'un témoin négatif qui atteste l'absence de contamination, d'un marqueur de taille (pour déterminer approximativement la longueur des fragments) et d' 1/10 ml de réaction qui sont utilisés pour la vérification de l'amplification.

Protocole :

Avant de placer les échantillons d'ADN dans les puits du gel on doit :

- ✓ mélanger 8µl de chaque produits PCR avec 8µl de bleu de dépôt (0,25% de xylème de cyanol, 0,25% de bleu de bromophénole et 30% de glycérol) qui permet de visualiser la migration.
- ✓ prélever le mélange avec une micropipette réglée sur le volume approprié
- ✓ Remplir les puits avec la pointe de la pipette.
- ✓ Placer le support avec le gel chargé dans la cuve d'électrophorèse en positionnant les puits du côté de la cathode.
- ✓ Remplir la cuve de tampon TBE1X.
- ✓ Laisser migrer jusqu'à ce que le colorant de charge arrive à proximité du bord du gel (environ 30min à 160 V).

• **Visualisation des bandes :**

Après la migration, le gel sera placé sur une plaque UV pour être visualisé. En effet, le BET ou Red Safe a la propriété de s'intercaler entre les bases de la double hélice d'ADN lors de sa migration. Sous rayons UV, il émet un signal fluorescent permettant de visualiser les bandes résultant de la réaction d'amplification.

La présence d'une bande unique et de taille correspondant au fragment attendu atteste d'une bonne amplification ; par contre, la présence de bandes supplémentaires témoigne

d'amplifications non spécifiques nécessitant soit de diminuer la quantité de MgCl₂, soit d'augmenter la température d'amplification voir de changer les oligonucléotides.

❖ **Purification des produits PCR :**

Il est très important de bien purifier les produits PCR en éliminant les amorces et les dNTPs non incorporés lors de la réaction, afin d'obtenir une bonne qualité d'ADN à séquencer. En effet les résultats du séquençage en dépendent.

Protocole :

- ✓ Mélanger 84ul de « DNA Binding Buffer » avec nos produits PCR.
- ✓ Mettre le mélange dans un spine en dessous d'un tube.
- ✓ centrifugation 14000tours /1min
- ✓ premier lavage : rajouter 200ul de « DNA Wash Buffer »
- ✓ deuxième lavage : rajouter 200ul de « DNA Wash Buffer »
- ✓ centrifugation 14000tours /1min
- ✓ Ajouter 10ul d'H₂O stérile dans les spines
- ✓ Incuber 5 à 10 min à une température ambiante
- ✓ Centrifuger 14000tours /1min
- ✓ Récupérer les tubes et ajouter 30ul d'H₂O

2.2.3 Séquençage de l'ADN:

❖ **Principe : la méthode de Sanger**

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre des nucléotides sur la molécule d'ADN. La méthode utilisée par Sanger en 1977 (prix nobel de chimie en 1980), repose sur l'utilisation de nucléotides particuliers appelés didésoxynucléotides, qui bloquent la synthèse d'ADN par l'ADN polymérase après leur incorporation. Ce blocage est dû à l'impossibilité qu'ont ces nucléotides à former une liaison phosphodiester avec un autre nucléotide en raison de l'absence du groupement hydroxyle sur le carbone 3'.

Le fragment d'ADN à séquencer (il peut s'agir par exemple d'un exon du gène d'intérêt) est obtenu par PCR puis mis en présence d'un milieu réactionnel contenant :

- Les amorces
- Les 4 désoxynucléotides
- Les 4 didésoxynucléotides (ddA, ddT, ddC, ddG) marqués chacun par un fluorochrome distinct
- Une ADN polymérase (Taq polymérase)
- Tampon

L'ensemble est soumis à une succession de cycles de polymérisation au cours desquels l'ADN polymérase peut, au niveau de chaque nucléotide de l'ADN matrice, incorporer un désoxynucléotide ou un didésoxynucléotide.

❖ **Séquençage automatique :**

La détection des fragments par séquençage automatique est basée sur l'analyse des fragments marqués par des molécules fluorescentes (fluorescéine, NBD (4-chloro-7-nitrobenzo-2oxa-1-diazole), rouge Texas et tétraméthylrhodamine).

Les séquenceurs automatiques possèdent un laser infrarouge et un système de filtres tournants permettant à la fois l'excitation et l'émission des longueurs d'ondes des fluorochromes. Cette excitation provoque une émission de lumière à une longueur d'onde dépendant de la nature du fluorochrome porté par les didésoxynucléotides. Cette rotation des filtres est organisée de telle sorte qu'un fluorochrome particulier est détecté spécifiquement lors de chaque balayage par le laser du gel. Au bout de quatre balayages successifs, un ensemble de données décrivant le contenu de chacune des pistes d'électrophorèse est ainsi obtenu. Dans la stratégie de notre étude, le séquençage automatique s'est avéré le moyen le plus précis et rapide pour la recherche de nouvelles mutations.

• **Les étapes du séquençage automatique :**

1) Réaction séquence :

La réaction de séquence est réalisée en utilisant le produit de purification. C'est une amplification asymétrique de l'amplicon déjà purifié avec une seule amorce et les 4 ddNTPs (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) dont chacun est marqué par un fluorochrome émettant une couleur différente lors de l'excitation par le laser. Ainsi chacun de ces ddNTPs va donner de façon aléatoire des fragments de tailles différentes et correspondantes aux 4 couleurs spécifiques.

La réaction de séquence est effectuée par le Big Dye Mix, un mélange réactionnel qui contient les désoxyribonucléotides et les quatre didésoxyribonucléotides, et l'ADN polymérase thermostable (Applied Biosystème).

Ses constituants sont donnés dans le tableau 4, et ses conditions dans le tableau 5 :

Tableau IV: Composants de la réaction de séquence

Composant	Concentration	Volume
ADN (Produit PCR)	35ng/μl	3μl
Amorce (sens ou antisens)	1pm/μl	0.2μl
Tampon BigDay	-	2μl
Buffer	-	3μl
Eau stérile	-	11.8μl

Tableau V: Conditions de la réaction de séquence

Etape	Température °C	Temps	
Dénaturation initiale	96	1min	
Dénaturation	96	10sec	27 Cycles
Hybridation	Tm	10sec	
Elongation	60	4min	
Elongation finale	75		

2) Purification des produits de réaction de séquence par le Magnésil :

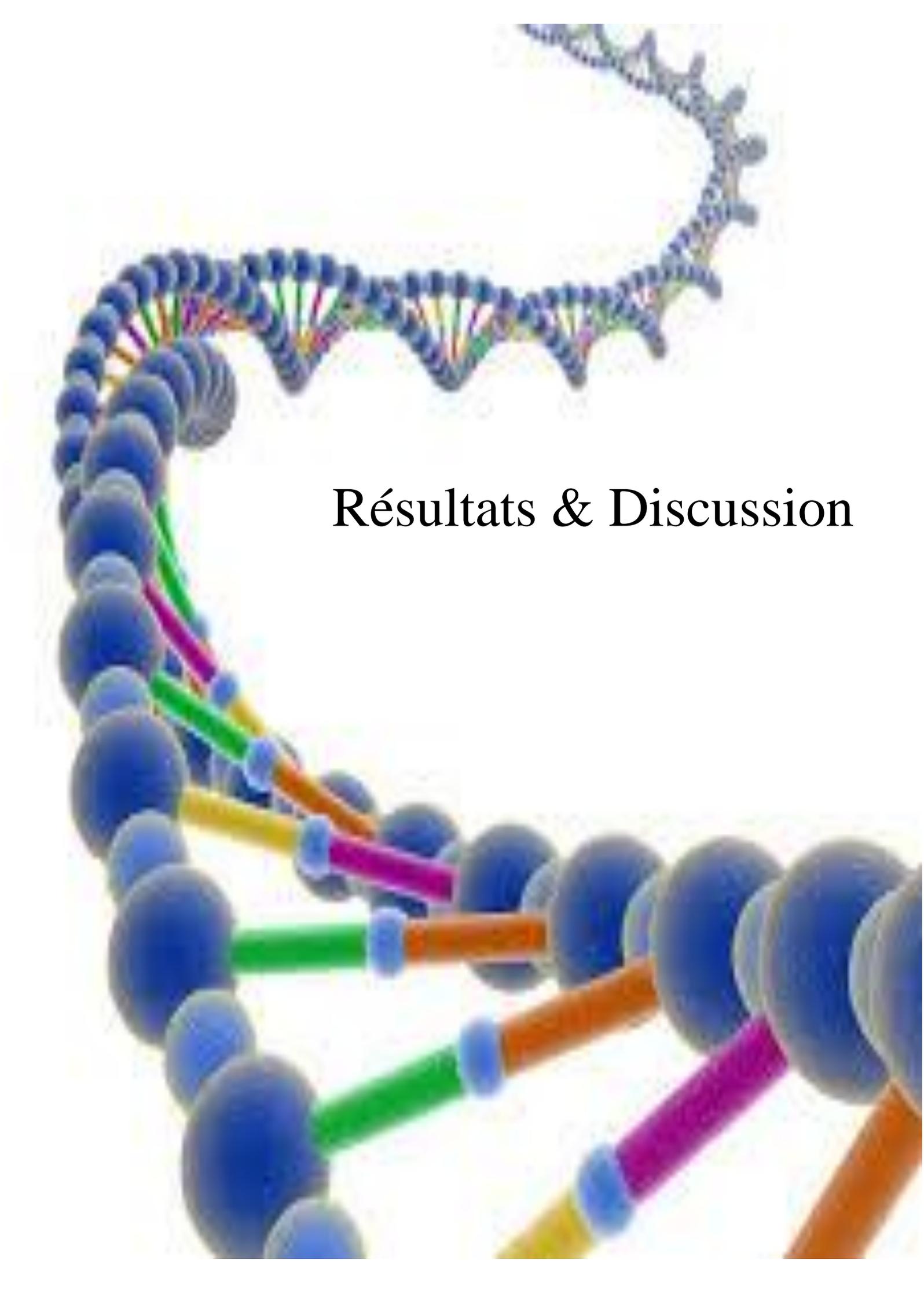
Les produits de réaction de séquence vont être purifiés par centrifugation en utilisant le Magnésil afin d'éliminer les amorces et les ddNTPs marqués.

Les étapes de la purification sont les suivantes :

- ✓ Déposer les produits dans une plaque
- ✓ Ajouter 180ul de Magnésil tout en agitant
- ✓ Incuber 2.5min à une température ambiante
- ✓ Agiter de nouveau
- ✓ Incuber 2.5min
- ✓ Mettre la plaque sur la barre magnétique (promega)
- ✓ Eliminer le surnageant
- ✓ Ajouter 100ul d'Ethanol 90% en agitant
- ✓ Incuber 2.5 min
- ✓ Agiter de nouveau
- ✓ Incuber 2.5min
- ✓ Agiter de nouveau
- ✓ Mettre la plaque sur la barre magnétique (promega)
- ✓ Eliminer le surnageant
- ✓ Ajouter 100ul d'Ethanol 90% en agitant
- ✓ Incuber 2.5 min
- ✓ Agiter de nouveau
- ✓ Incuber 2.5min
- ✓ Agiter de nouveau
- ✓ Mettre la plaque sur la barre magnétique et éliminer le surnageant
- ✓ Incuber 15min
- ✓ Ajouter 20ul de Formamide
- ✓ Incuber 5min
- ✓ Mettre la plaque sur la barre magnétique (promega)
- ✓ Récupérer le surnageant et le mettre dans la plaque du séquenceur et on séquence par un séquenceur capillaire (ABI Prism 3130xl).

❖ **Lecture des séquences :**

Les résultats obtenus sont traités par deux logiciels : Sequencing Analysis et Seqscape v2.5. L'un est chargé d'analyser les données brutes de séquençage et les traduire en un chromatogramme lisible, l'autre est un outil de comparaison de séquences.



Résultats & Discussion

Résultats et Discussion

1. Résultats

1.1 Résultats cliniques :

Notre étude a regroupé un nombre total de 15 familles du BBS recrutées à l'hôpital Charles Nicolle de Tunis à partir du service des maladies Héritaires et Congénitales, 15 patients malades ont été sélectionnés en se basant sur les critères de sélection des patients BBS. Toutes les familles sont consanguines.

L'examen clinique des patients a montré une hétérogénéité clinique et une variabilité interfamiliale entre les patients BBS. Le tableau 6 résume les signes cliniques des patients analysés.

Tableau VI: Caractéristiques cliniques des patients atteints de BBS

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
Sexe	♀	♂	♀	♂	♀	♀	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♀	♂	fœtus
Age (ans)	14	11	17	09	--	19	37	14	13	35	19	15			
Age à l'examen (1^{ère} consultation)	7,5	11	17	09	9,5	10	37	05	04	35	19	15	10	11	
Poids (kg)	29.5	49	65	43	53	59	85	25	23	81	74	45	46	48	
Taille (cm)	109	131	148	133	139	125	159	105	103	166	160	143	120	131	
PC (périmètre crânien)	51	50	53	54	55	58	57	52	50	--	56	--	51	50	
Obésité (Kg)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	--	+	+	+	
Rétinite pigmentaire	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
Polydactylie post axiale	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	--	+		+
Difficultés d'apprentissage	+	+	+	-	+	-	-	+	--	+	+	+	-	+	
Hypogonadisme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	
Anomalies rénales	-	-	+	+	-	+	-	-	-	--	-	-	+	-	
	Critères mineurs														
Troubles de langage	+	+	+	-	--	-	--	--	--	--	--	+	-	-	
Retard du développement	+	-	+	+		+	+	-	--	-	-	+	-	-	
Brachydactylie / Syndactylie	-	+	-	+	+	+	--	--	--	+	--	+	-	-	
Ataxie/ troubles de coordination	-	-	--	-	--	-	-	-	--	--	--	--	-	-	
Troubles de comportement	-	--	--	-	--	-	--	--	--	-	+	--	-	-	
Anomalies dentaires	+	--	+	+	+	-	+	--	--	+	--	-	-	-	
Surdité	+	-	-	-	-	+	-	-	-		-	-	-	-	
Malformation cardiaque	-	--	--	-	+	-	+	-	-		-	-	-	-	
Autres anomalies ophtalmologiques	+	--	+	--	--	+	-	+	--	+	+	--	-	-	
Diabète sucré	-	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	-	-	
Fibrose hépatique	-	--	-	--	--	--	--	-	--	--	--	--	-	-	
Polyurie/polydypsie	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	-		

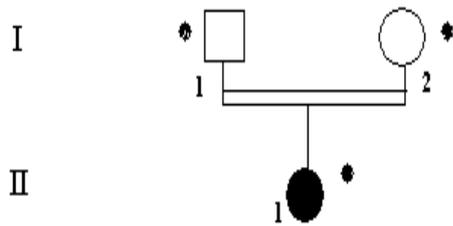
+ : Présent

- : Absent

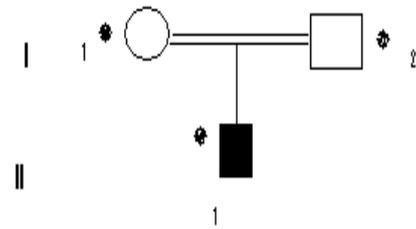
-- : non mentionné dans le dossier

❖ **Les cas indexent:**

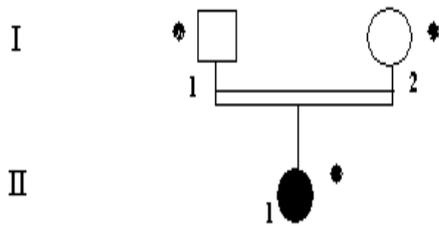
Pour chaque famille un arbre généalogique a été dressé, on assigne à chaque génération un chiffre romain et à chaque individu un numéro permettant d'identifier les différents membres de la famille (Figure10).



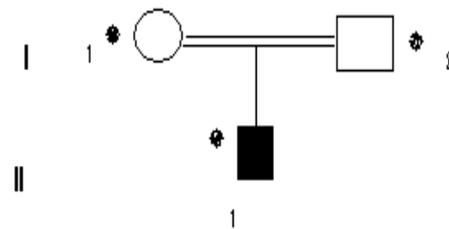
Famille A



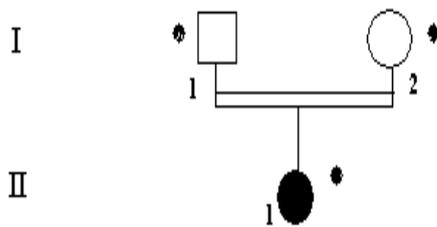
Famille B



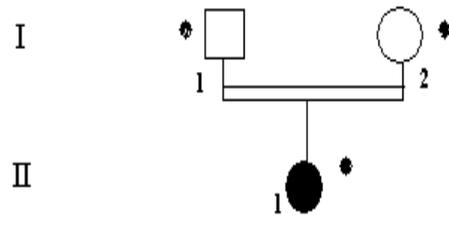
Famille C



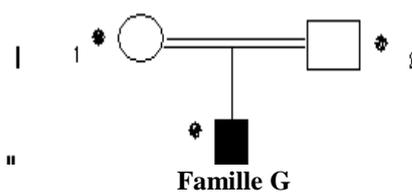
Famille D



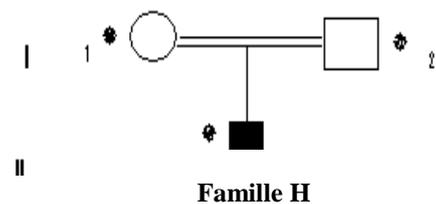
Famille E



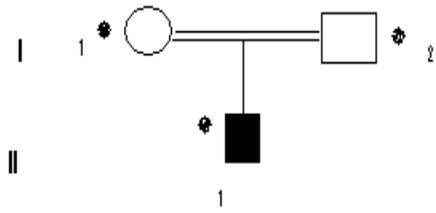
Famille F



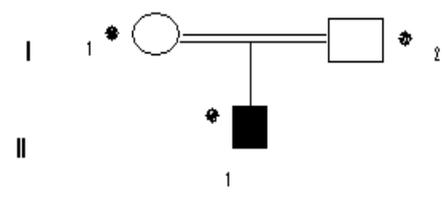
Famille G



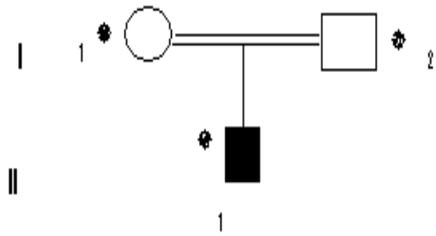
Famille H



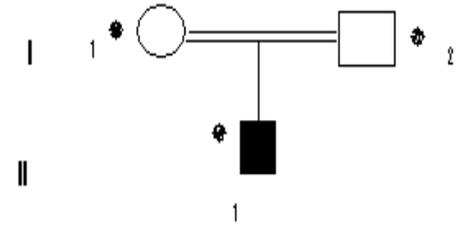
Famille I



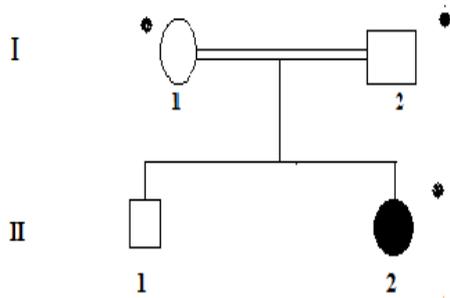
Famille J



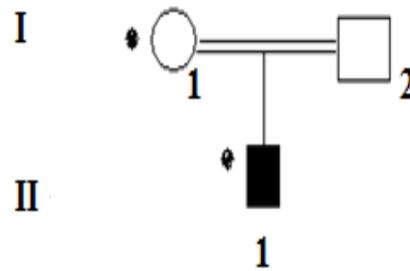
Famille K



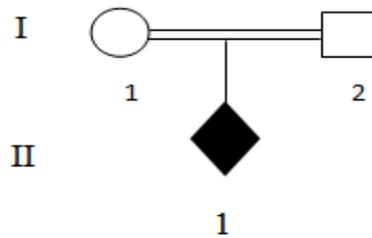
Famille L



Famille M



Famille N



Famille O

Figure10: Arbres généalogique des 15 familles analysées sur le plan moléculaire
 * : Disponibilité de l'ADN, ◆ : un fœtus atteint.

1.2 Résultats de l'analyse moléculaire :

L'analyse moléculaire a concerné 14 patients et un fœtus. Cette étude consiste à analyser par PCR puis par séquençage des mutations décrites chez des familles Tunisiennes dont 2 sont fondatrices p.R189* au niveau du gène *BBS2* et c.459+1G>A au niveau du gène *BBS8* chez les 15 patients.

❖ Amplification des amplicons des gènes BBS :

Les amplicons qui contiennent les mutations à tester sont amplifiés par une réaction de PCR. Les produits PCR sont contrôlés sur gel d'agarose (2%), les résultats obtenus sont présentés ci-dessous (figure 11) (Figure 12).

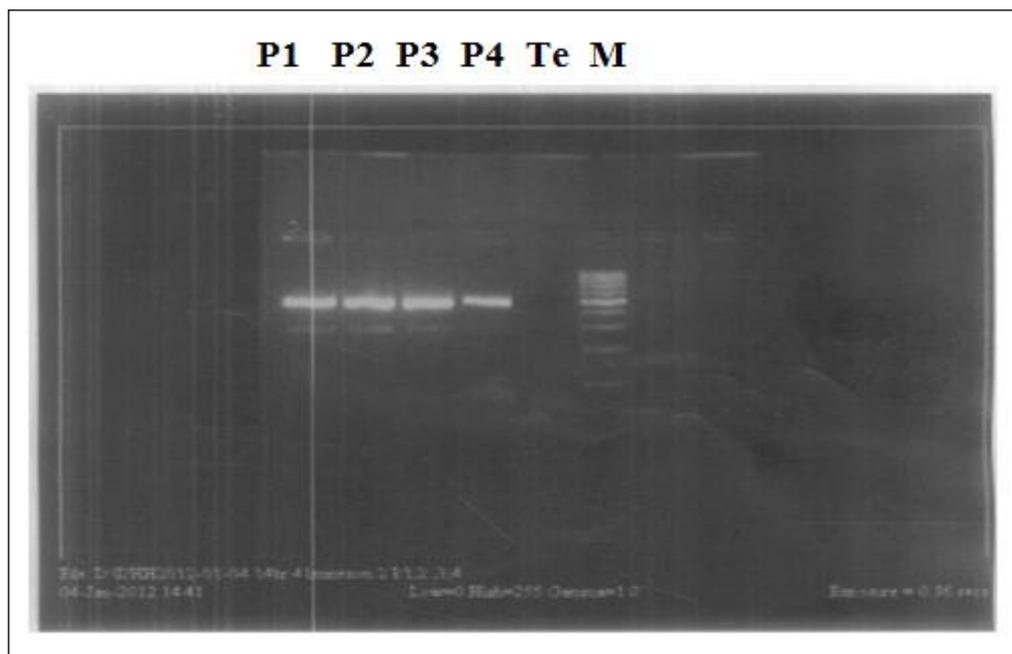


Figure 11 : Amplification du de l'exon 3 du gène *BBS5*

P : Patient ; Te: Témoin négatif; M: Marqueur de taille

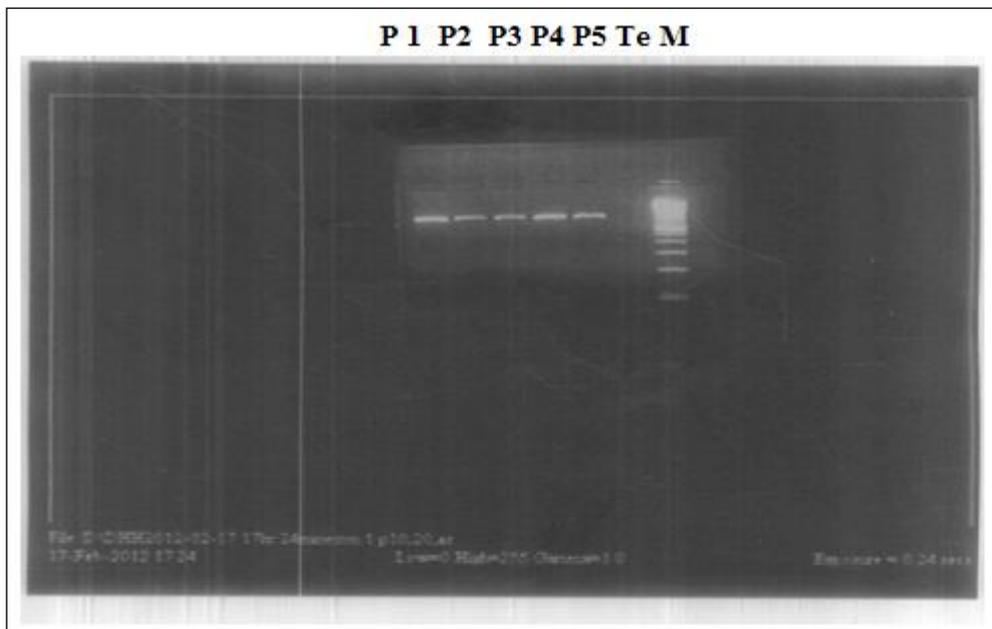


Figure 12 : Amplification de l'exon 5 du gène *BBS8*

P : Patient ; Te: Témoin négatif ; M: Marqueur de taille

❖ Séquençage :

Les résultats du séquençage ont révélé la présence de la mutation fondatrice pR189* (*BBS2* Exon 5) chez deux patients (M, N) l'une à l'état homozygote (Figure13) et l'autre à l'état hétérozygote (Figure14). Chez la patiente M, l'étude de ségrégation a révélé que la mutation est à l'état hétérozygote chez les deux parents.

Chez le patient N, la mutation p.R189* est à l'état hétérozygote, de même chez sa mère, le statut du père n'est pas déterminé étant donné que l'ADN n'est pas disponible. La recherche de la deuxième mutation au niveau du gène *BBS2* est envisageable car il pourra s'agir d'un hétérozygote composite ou même un modèle de triallelisme (on peut pas affirmer que cette mutation est à l'origine de cette affection).

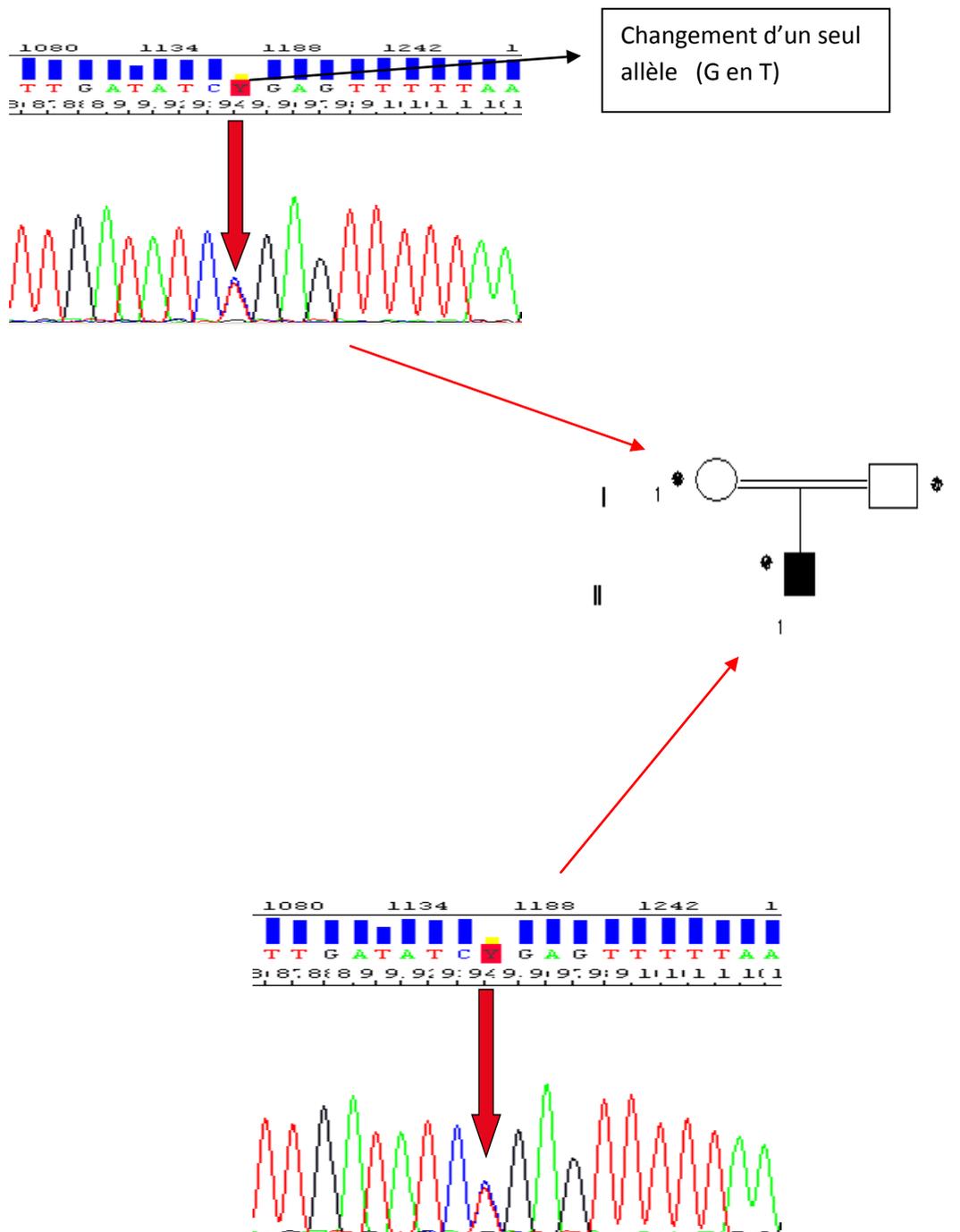


Figure 14 : Séquençage de la mutation fondatrice p.R189* chez la famille N

Pour les autres patients, les deux mutations fondatrices n'ont pas été détectées, ce qui nous a conduit à tester d'autres mutations (Tableau 7)

L'analyse de ces mutations a permis de détecter la mutation c.399A>T ; p.R133S au niveau du gène *BBS8* à l'état hétérozygote chez le fœtus O. L'étude de ségrégation de la mutation chez les deux parents n'a pas été effectuée à cause de la non disponibilité de l'ADN des deux parents.

L'analyse de l'impact de cette variation sur le logiciel PolyPhen2 (prediction of functional effects of human nsSNPs) a révélé que cette variation pourrait être pathogène avec un score de 0.99 (Figure 15).

PolyPhen-2 report for BBS8 R133S				
Query				
Protein Acc	Position	AA ₁	AA ₂	Description
BBS8	133	R	S	N/A
Results				
Prediction/Confidence			PolyPhen-2 v2.2.2r398	
HumDiv				
This mutation is predicted to be PROBABLY DAMAGING with a score of 0.999 (sensitivity: 0.14 ; specificity: 0.99)				

Figure 15 : Image prise du logiciel PolyPhen2

L'alignement multiple de la séquence protéique qui contient la mutation p.R133S par le logiciel ClustalX2.0.10 (Figure 16) a montré que l'acide aminé Arginine est conservé au cours de l'évolution ce qui prouve son rôle au niveau de la protéine et que sa substitution peut altérer la fonction protéique.

Le séquençage du reste des gènes *BBS* (en commençant par le *BBS8*) est nécessaire à la recherche de la deuxième mutation (autre que la p.R133S) car il pourra s'agir d'un hétérozygote composite ou même d'un modèle de triallélisme.

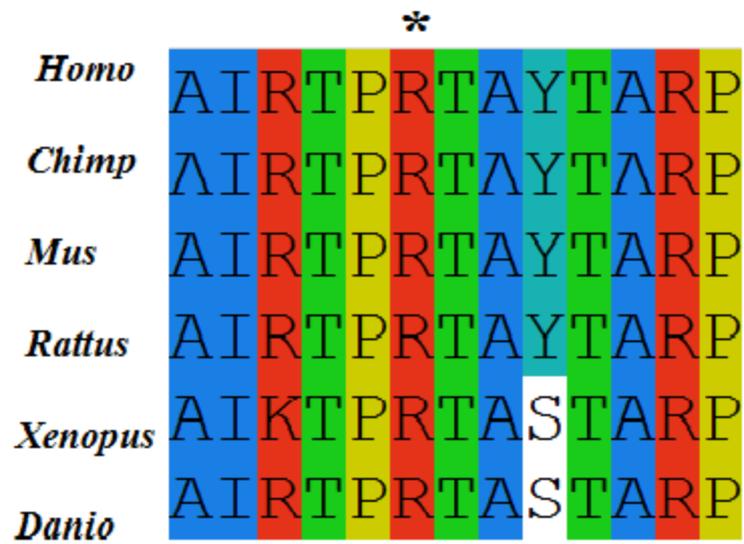


Figure 16 : Aligement multiple de la séquence protéique qui contient l'acide aminé Arginine.

* : p.R133S ; Homo: Homo Sapiens; Chimp: Chimpanzé; Mus: Mus Musculus;
 Rattus: Rattus norvegicus; Xenopus: Xenopus Tropicalis; Danio: Danio rerio

2. Discussion

Dans ce travail on s'est intéressé à l'étude des gènes BBS. L'objectif de ce travail est l'analyse moléculaire de 15 familles tunisiennes du Bardet Biedl syndrome. Les patients sont sélectionnés selon des critères fixés par Beales et al. 1999 (au moins 3 signes majeurs et deux mineurs). L'analyse génétique est divisée en deux étapes dont la première est l'analyse moléculaire de 15 familles Tunisiennes de BBS par séquençage direct des deux mutations fondatrices p.R189* au niveau du gène *BBS2*, et c.459+1G>A au niveau du gène *BBS8* et d'autres mutations rapportées chez des familles Tunisiennes tel que la M390R et la c.1473+1G>A au niveau du gène *BBS1*, la p.L50R et la p.G42E*11 au niveau du gène *BBS5*, la c.1272+1G>A(*BBS6*), la C91Lfs*95 et la p.S396Lfs*6 au niveau du gène *BBS10*, la p.G67D*45 et l'exon1 du gène *BBS12* et la p.R133S (*BBS8*). Les patients qui ne présentent aucune mutation sont analysées dans la deuxième étape par l'approche de capture ciblée couplée au séquençage à haut débit qui consiste à séquencer pour chaque patient 30 gènes (16 gènes *BBS*, 12 gènes *NPHP*, le gène *ALMS1* et le gène *CCDC28B*) (Redin et al. 2012; M'hamdi et al. 2013). Dans la présente étude les résultats de la première étape sont présentés et discutés.

L'analyse du tableau clinique des patients a montré une concordance des signes cliniques avec les séries du BBS rapportés dans des études précédentes (Beales et al. 1999 ; M'hamdi et al. 2013).

Le BBS est une maladie autosomique récessive qui se caractérise par une hétérogénéité génétique. A ce jour 17 gènes sont identifiés (Marion et al.2012) dont 70-80% des mutations sont identifiées (Muller et al. 2010; Redin et al. 2012; M'hamdi et al. 2013).

Le BBS est considéré comme étant une maladie rare (M'hamdi et al. 2011). Les deux gènes *BBS2* et *BBS8* sont les plus fréquemment mutés dans la population Tunisienne (Samoui et al. 2006; Chen et al.2010). Les gènes *BBS3*, *BBS4* et *BBS10* sont les gènes le moins fréquents (Smaoui et al.2006; Abu Safieh et al. 2012).

L'analyse moléculaire de cette série a révélé la mutation p.R189* chez deux familles, la première famille à l'état homozygote, la deuxième famille à l'état hétérozygote.

La mutation p.R189* est une mutation non sens, entraînant la création d'un codon stop au niveau de l'exon 5 du gène *BBS2* ce qui génère une protéine tronquée. Le gène *BBS2* code pour une protéine faisant partie du complexe BBSome nécessaire à la ciliogenèse et la signalisation cellulaire (Cben et al. 2011; Nachury et al. 2007).

D'autre part, une autre mutation a été détectée au niveau de l'exon 5 du gène *BBS8* à l'état hétérozygote. C'est une mutation faux-sens entraîne un changement d'acide aminé Arginine par Sérine en position 133; p.R133S. L'alignement de la séquence d'AA siège de la mutation avec celle d'autres séquences de différentes espèces par le logiciel ClustalX2.0.10 montre que l'acide aminé R est hautement conservé au cours de l'évolution.

L'analyse de l'impact de la mutation avec les programmes PolyPhen2 et Sift Prediction a révélée le rôle probablement pathogène de cette mutation. Le séquençage du reste du gène *BBS8* chez ce patient est nécessaire pour la recherche de la deuxième mutation.

La protéine Bbs8 joue un rôle direct dans le recrutement et l'assemblage sélectif de certains composants protéiques d'IFT (Transport intraflagellar) au niveau du corps basal du cil. Sa structure contient plusieurs répétitions tétratricopeptides commune (EPC) qui sont impliquées dans les interactions protéine-protéine. Un seul défaut au niveau de ces répétitions conduit forcément à des malformations structurelles et fonctionnelles des cils (Blacque OE et al. 2004).

Pour les autres patients de la série, aucune mutation n'a été détectée, ce qui prouve bien l'hétérogénéité génétique du BBS (Muller et al. 2010; Pereiro et al. 2011) et le caractère privé des mutations ce qui constitue un problème au niveau du diagnostic moléculaire de cette pathologie.

Plusieurs stratégies ont été proposées pour optimiser la détection des mutations comme l'homozygotité mapping chez les familles consanguines (Abu Safieh et al. 2012), le séquençage direct des gènes BBS (Smaoui et al. 2006; Muller et al. 2010, Hjortshoj et al. 2010), le développement des puces qui contiennent toutes les mutations BBS (Asper Ophthalmic) (Pereiro et al.2011). Malgré leurs sensibilités importantes dans la détection des mutations, les résultats apportés par ces méthodes restent limités à cause de leurs couts et le temps long pour avoir les résultats.

Les cinq dernières années l'émergence des technologies de la deuxième génération du séquençage, des stratégies alternatives ont été proposées. L'approche de la capture ciblée

couplée au séquençage à haut débit constitue une nouvelle approche pour l'analyse moléculaire du BBS. Le principe qui consiste à séquençer 30 gènes (16 gènes *BBS*, 12 gènes *NPHP*, le gène *ALMS1* et le gène *CCDC28B*) a montré une grande sensibilité de détection des mutations chez les patients BBS qui présentent des signes cliniques classiques du BBS (Redin et al. 2012; M'hamdi et al. 2013). L'analyse moléculaire par cette approche ne dépasse pas 3 semaines entre préparation des bibliothèques, séquençage et analyse des résultats avec un cout qui ne dépasse pas 500\$ /patient.

L'exome/whole exome sequencing est aussi une autre approche efficace dans l'analyse moléculaire du BBS. Par sa couverture assez importante du séquençage du génome, cette technique a permis l'identification d'un nouveau gène *BBS17* chez une famille Algérienne (Marion et al. 2012) et une nouvelle mutation au niveau du gène *BBS1* (Quamar et al. 2012).

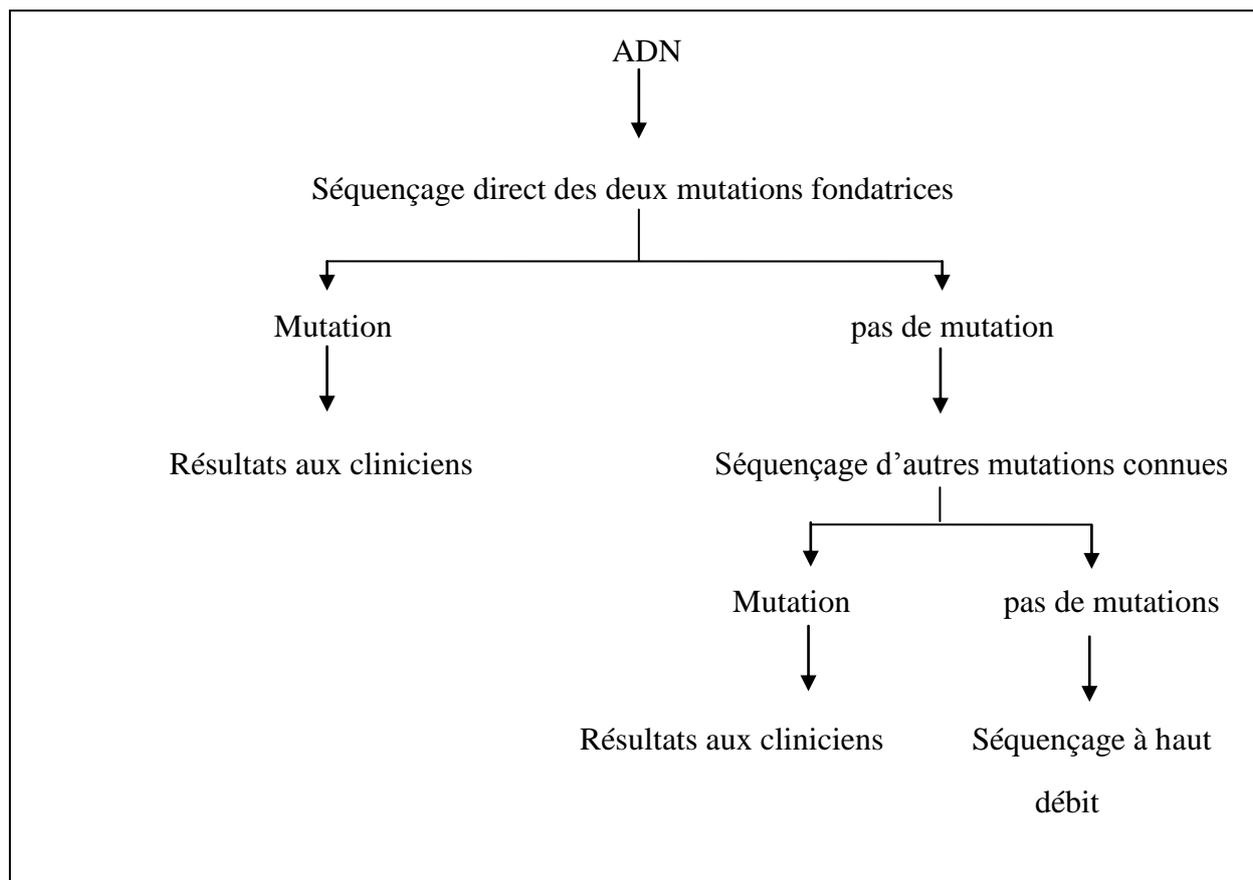
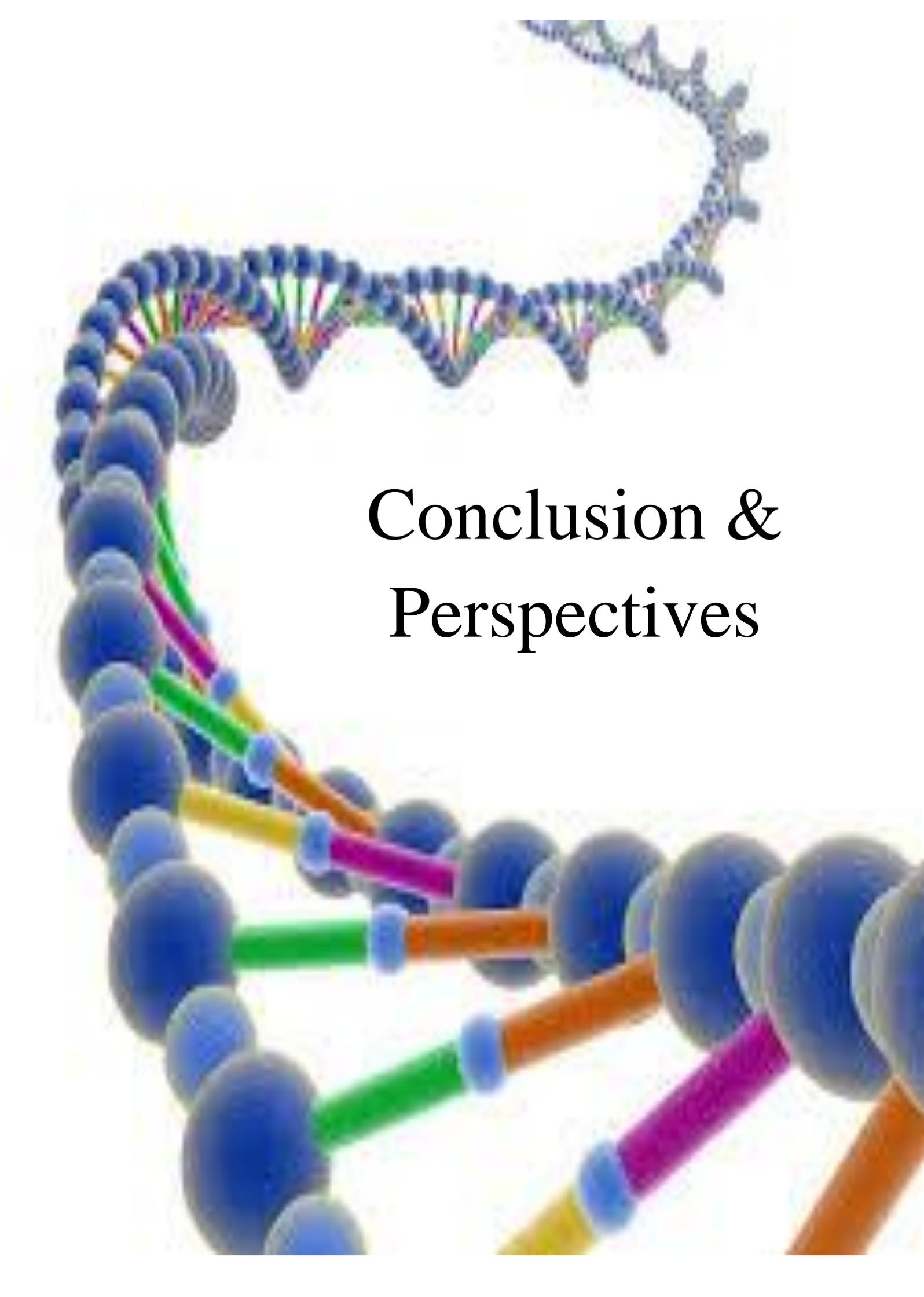


Figure 17: Schéma décisionnel d'analyse moléculaire des patients

Tunisiens atteints du BBS.

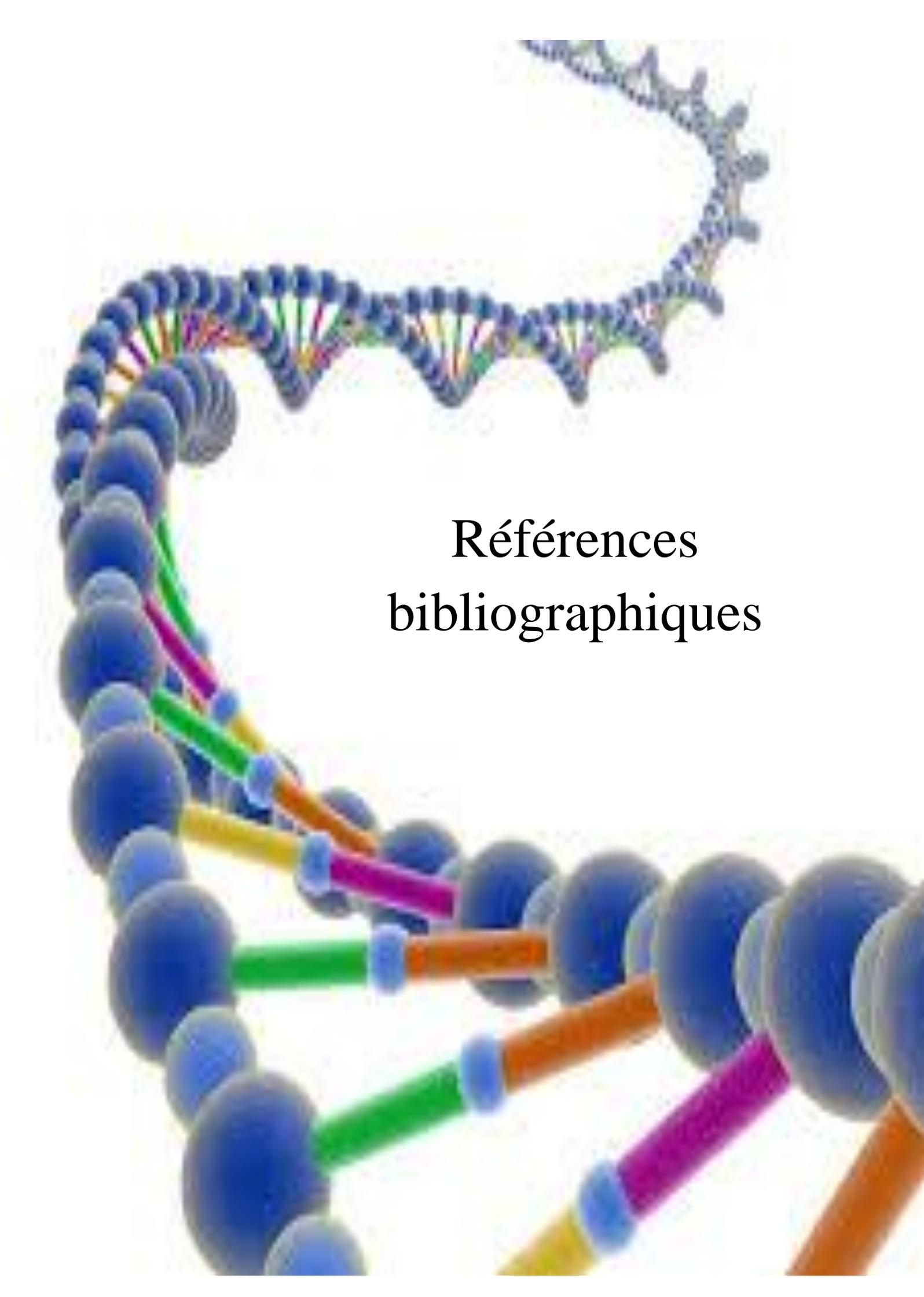


Conclusion & Perspectives

Conclusion et perspectives

Le BBS est une maladie génétique de transmission autosomique récessive appartenant à la famille des ciliopathies. Le BBS est génétiquement très hétérogène. A ce jour 17 gènes sont décrits (*BBS1-BBS17*) dont 70 à 80% des mutations sont identifiées. L'objectif de cette étude est d'analyser 15 familles consanguines du BBS. L'analyse moléculaire est divisée en deux étapes dont la première a fait l'objet de ce travail qui consiste à tester deux mutations fondatrices p.R189* *BBS2*, c.459+1G>A *BBS8* et d'autres mutations fréquentes décrites dans des études ultérieures chez des familles Tunisiennes. Les résultats moléculaires ont permis l'identification de la mutation p.R189* *BBS2* chez deux familles dont une à l'état homozygote et l'autre à l'état hétérozygote. Une autre nouvelle mutation à l'état hétérozygote p.R133S au niveau du gène *BBS8* est identifiée chez un seul patient. Les patients qui ne présentent aucune mutation seront analysés dans la deuxième étape par l'approche de la capture ciblée couplée au séquençage à haut débit qui consiste à séquencer 30 gènes (16 gènes *BBS*, 12 gènes *NPHP*, le gène *ALMS1* et le gène *CCDC28B*). Cette étude affirme l'extrême hétérogénéité génétique de BBS. Le nombre limité des mutations identifiées dans cette étude a limité l'interprétation de la corrélation génotype/phénotype dans cette cohorte. La présence de deux mutations fondatrices chez les patients BBS dans la population Tunisienne facilitera dans l'avenir le diagnostic moléculaire de cette pathologie et la prise en charge des patients qui reste pluridisciplinaire.

L'identification d'autres gènes BBS reste un objectif primordial pour le pronostic, le conseil génétique et la prise en charge des patients et leurs familles. La connaissance de leurs fonctions permet de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques à l'origine du BBS et peut être à long terme d'envisager des perspectives thérapeutiques.



Références bibliographiques

Bibliographies

1. Abu-Safieh L, Al-Anazi S, Al-Abdi L et al. In search of triallelism in Bardet-Biedl syndrome. *European Journal of Medical Genetics* 2012, 20:420-427.
2. Adams A, Rosenblatt M, Suva L et al. Identification of novel parathyroid hormone responsive gene in human osteoblastic cells. *Bone* 1999; 24:305-313.
3. Agha Z, Iqbal Z, Azam M et al. A novel homozygous 10 nucleotide deletion in BBS10 causes Bardet-Biedl syndrome in a Pakistani family. *Gene* 2013; 01-05.
4. Ansley S, Bandno J, Blaque O et al. Basal body dysfunction is a likely cause of pleiotropic Bardet-Biedl syndrome. *Nature* 2003 ; 425 :628-633.
5. Aloulou H, Cheikhrouhou H, Belguith N et al. Le syndrome de Bardet- Biedl chez l'enfant. Etude de 11 observations. *La tunisie medicale* 2011 ; 89: 31 – 36.
6. Balbo B, Vincentini F, Mazzucchi E et al. Infundibular stenosis in Bardet-Biedl syndrome. *Kidney international* 2011, 80:322.
7. Bialas N, Inglis P, Li C et al. Functional interaction between the ciliopathie-associated Meckel syndrome 1 protein and novel MKS1-related proteins. *J.Cell.Sci* 2009; 122:611-624.
8. Bin J, Madhavan J, Ferrini W et al. BBS7 and TTC8 (BBS8) mutations play a minor role in the mutational load of Bardet-Biedl syndrome in a multiethnic population. *Hum Mutat* 2009; 7: 737-746.
9. Blaque O, Reardon M, Li C et al. Loss of *C. elegans* BBS-7 and BBS-8 protein function results in cilia defects and compromised intraflagellar transport. *Genesdev* 2004. 18 :1630-1642.
10. Chen J, Smaoui N, Ben Hamed Hammer M et al. Molecular Analysis of Bardet-Biedl Syndrome Families: Report of 21 Novel Mutations in 10 Genes. *IOVS* 2011. 52.
11. Coppiesters F, Lefever S, Leroy B et al. CEP290 a gene with many faces : mutation overview and presentation of CEP290base. *Hum* 2010 ; 31 :4565-4575.
12. Cox KF, Kerr NC, Kedrov M et al. Phenotypic expression of Bardet-Biedl syndrome in patients homozygous for the common M390R mutation in the BBS1 gene. *j.visres* 2012, 75: 77–87.

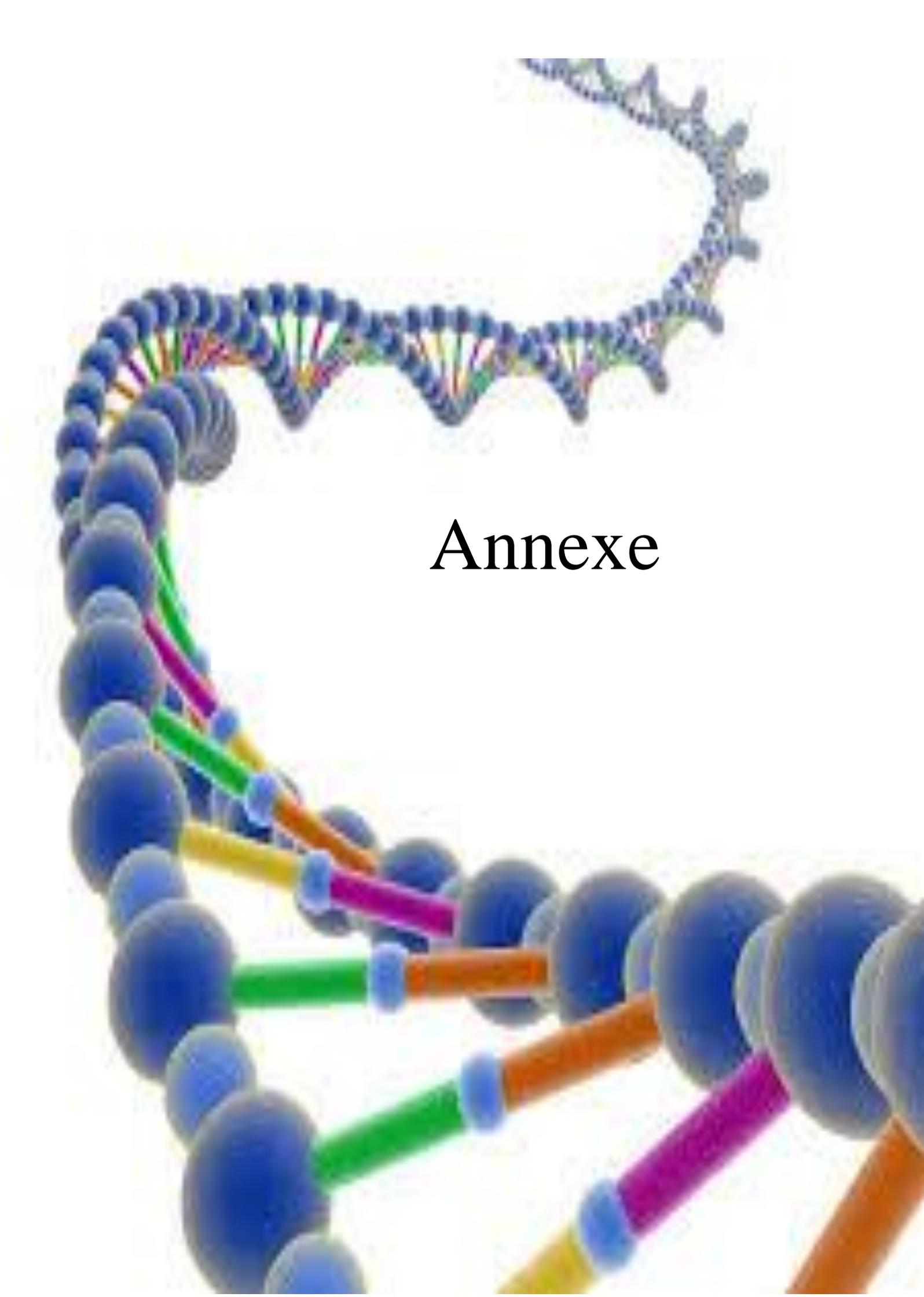
13. Davis E and Katsanis N. The ciliopathies: a transitional model into systems biology of human genetic disease. *Current Opinion in Genetics & Development* 2012, 22:290–303.
14. Dollfus H, Verloes A, Bonneau D et al. Le point sur le syndrome de bardet-biedl. *J.Fr.olphamol* 2005, 28:01-07.
15. Farag TI and Teebi AS. High incidence of Bardet Biedl syndrome among the Bedouin. *Clin Genet* 1989; 36 (6): 463-464.
16. Forsythe E and Beales PL. Bardet–Biedl syndrome. *European Journal of Human Genetics* 2013; 21: 8–13.
17. Gargah T, Gharbi Y, Moussa MB et al. Uropathies et Néphropathies dans le Syndrome de Bardet-Biedl chez l’Enfant. *La Tunisie Medicale* 2010, 88: 737 – 741.
18. Gilliam JC, Chang JT, Ivette M et al. Three-Dimensional Architecture of the Rod Sensory Cilium and Its Disruption in Retinal Neurodegeneration. *Cell* 2012; 151:1029–1041.
19. Guo D and Rahmouni K. Molecular basis of the obesity associated with Bardet–Biedl syndrome. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2011, 22: 287-293.
20. Hattula K, Furuholm J, Arffman A et al. A Rab8-specific GDP/GTP Exchange Factor Is Involved in Actin Remodeling and Polarized Membrane Transport. *Molecular Biology of the Cell* 2002. 13 :3268–3280.
21. Hichri H, Stoetzel C, Laurier V et al. Testing for triallelism: analysis of six BBS genes in a Bardet-Biedl syndrome family cohort. *European Journal of Medical Genetics* 2005, 13 :607-616.
22. Jin H, White SR, Shida T et al. The Conserved Bardet-Biedl Syndrome Proteins Assemble a Coat that Traffics Membrane Proteins to Cilia. *j.cell*.2010, 141: 1208–1219.
23. Kaplan OI, Doroquez DB, Cevik S et al. Rappoport, Sengupta P and Oliver E Blacque. Endocytosis Genes Facilitate Protein and Membrane Transport in *C. elegans* Sensory Cilia. *Current Biology* 2012; 22:451–460.
24. Khan S, Ullah I, Irfanullah et al. Novel homozygous mutations in the genes ARL6 and BBS10 underlying Bardet–Biedl syndrome. *Gene* 2013; 515: 84–88.
25. Kim S, Shindo A, Park T et al. Planar cell polarity acts through septins to control collective cell movement and ciliogenesis. *Science* 2010; 329:1337-1340.
26. Laurier V, Stoetzel C, Muller J et al. Pitfalls of homozygosity mapping: an extended consanguineous Bardet–Biedl syndrome family with two mutant genes (BBS2,

- BBS10), three mutations, but no triallelism. *European Journal of Human Genetics* 2006. 14 :1195–1203.
27. Li J, Gerdes J, Haycraft C et al. Comparative genomics identifies a flagellar and basal body proteome that includes the BBS human disease gene. *Cell* 2004 ;117 :541-552.
 28. Marion V, Stutzmann F, Gérard M et al. BBS-Induced Ciliary Defect Enhances Adipogenesis, Causing Paradoxical Higher-Insulin Sensitivity, Glucose Usage and Decreased Inflammatory Response. *J.Cmet* 2012; 16:363–377.
 29. M'hamdi O, Ouertani I, Maazoul F et al. Prevalence of Bardet–Biedl syndrome in Tunisia. *J Community Genet* 2011. 2:97–99.
 30. M'hamdi O, Redin C, Stoetzel C et al. Clinical and genetic characterization of Bardet–Biedl syndrome in Tunisia: defining a strategy for molecular diagnosis. *Clin Genet* 2013.
 31. Mockel A, Perdomo Y, Stutzmann F et al. Retinal dystrophy in BardeteBiedl syndrome and related syndromic ciliopathies. *j.preteyeres* 2011, 30: 258-274.
 32. Muller J, Stoetzel C, Vincent MC et al. Identification of 28 novel mutations in the Bardet-Biedl syndrome genes: the burden of private mutations in an extensively heterogeneous disease. *Hum Genet* 2010: 127: 583-593.
 33. Nashinura D, Searbey C, Carni R et al. Positional cloning of a novel gene on chromosome 16q causing Bardet-Biedl syndrome (BBS2). *Human molecular genetics* 2001. 10 :865-874.
 34. Nachury MV, Loktev AV, Zhang Q et al. A Core Complex of BBS Proteins Cooperates with the GTPase Rab8 to Promote Ciliary Membrane Biogenesis. *Cel* 2007. 129 :1201-1213.
 35. Nishimura D, Fath M, Mullins R et al. Bbs2-null mice have neurosensory deficits, a defect in social dominance, and retinopathy associated with mislocalization of rhodopsin. *Pnas* 2004. 101 :16588-16593.
 36. Otto E, Hurd T, Airik R et al. Candidate exome capture identifies mutation of SDCCAG8 as the cause of a retinal ciliopathy. *Nature Genet* 2010 ; 42 :840-850.
 37. Papon J, Perrault I, Coste A et al. Abnormal respiratory cilia in non-syndromic leber congenital amaurosis with CEP290 mutation. *J.Med.Genet* 2010. 47 :829-834.
 38. Pawlik B, Mir A, Iqbal H et al. A Novel Familial BBS12 Mutation Associated with a Mild Phenotype: Implications for Clinical and Molecular Diagnostic Strategies. *Epub* 2010, 27-34.

39. Puech B. Bardet-Biedl Syndrome in ophthalmology. *European Journal of Medical Genetics* 2012, 01-19.
40. Putoux A, Attie-Bitach T, Martinovic J et al. Phenotypic variability of Bardet-Biedl syndrome: focusing on the kidney. *Pediatr Nephrol* 2012, 27:7–15.
41. Redin C, Le Gras S, Mhamdi O et al. Targeted high-throughput sequencing for diagnosis of genetically heterogeneous diseases: efficient mutation detection in Bardet-Biedl and Alstrom Syndromes. *J Med Genet* 2012; 49:502–512.
42. Riazuddin S, Iqbal M, Wang Y et al. Asplice-site mutation in a retina-specific exon of BBS8 causes nonsyndromic retinitis pigmentosa. *Hum Genet* 2010; 5:805-812.
43. Roorycka C and Lacombea D. Le syndrome de Bardet-Biedl. *J.ando* 2008, 69 : 463-471.
44. Sapp C, Nishimura D, Johnston JJ et al. Recurrence risks for Bardet-Biedl syndrome: Implications of locus heterogeneity. *Genetics in Medicine* 2010, 10:623-627.
45. Schaefer E, Durand M, Stoetzel C et al. Molecular diagnosis reveals genetic heterogeneity for the overlapping MKKS and BBS phenotypes. *j.ejmg* 2011, 54: 157-160.
46. Seo S, Baye LM, Schulz NP et al. BBS6, BBS10, and BBS12 form a complex with CCT/TRiC family chaperonins and mediate BBSome assembly. *J.pnas* 2010, 107: 1488–1493.
47. Shah A, Farmen S, Moninger T et al. Loss of Bardet-Biedl syndrome proteins alters the morphology and function of motile cilia in airway epithelia. *Proc.Nat Acad* 2008; 105:3380-3385.
48. Shawky RM and Sadik DI .Genetics of obesity. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 2012; 13:11–17.
49. Slavotinek A and Beales P. Clinical utility gene card for: Bardet-Biedl syndrome. *European Journal of Medical Genetics* 2011, 19:01-04.
50. Smaoui N, Chaabouni M, Sergeev YV et al. Screening of the Eight BBS Genes in Tunisian Families: No Evidence of Triallelism. *IOVS* 2006. 47.
51. Stoetrel C, Laurier V, Davis E et al. BBS10 encodes a vertebrate-specific chaperonin-like protein and is a major BBS locus. *Nature Genet* 2006 ;38 :521-524.
52. Thomas W, Ferkol M, Margaret W et al. Ciliopathies: The Central Role of Cilia in a Spectrum of Pediatric Disorders. *jpeds* 2011, 160: 366-371.
53. Vincent M, Fanny S, Marion G et al. Exome sequencing identifies mutations in LZTFL1, a BBSome and smoothed trafficking regulator, in a family with

BardeteBiedl syndrome with situs inversus and insertional polydactyly. *J Med Genet* 2012; 49:317-321.

54. walsh DM, Shalev SA, Simpson MA et al. Acrocallosal syndrome: Identification of a novel KIF7 mutation and evidence for oligogenic inheritance. *European Journal of Medical Genetics* 2013, 56: 39-42.
55. Washinsky M, Davin K, Quinn M et al. Delirious Mania Associated with Bardet-Biedl Syndrome, an Inherited Ciliopathy. *Psychosomatics* 2012; 4: 01-04.
56. Zaghoul N and Nicholas Katsanis. Mechanistic insights into Bardet-Biedl syndrome, a model ciliopathie. *J. Clin. Invest* 2009; 119:428–437.



Annexe

72°C 5 mn

Protocole expérimental Invitrogen :

- H2O : 30µl
- dNTP : 04µl
- MgCl2 : 02µl
- Tampon 10X: 05µl
- Amorces: F 01µl
- R 01µl
- Taq polymérase: 0.5µl
- ADN 1.5µl

- *BBS5* Exon2

Programme de la réaction du PCR pour *BBS5* Exon2 :

96°C	5 min	
96°C	30 sec	} 30 cycles
56°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	5 mn	

Protocole expérimental Invitrogen:

- H2O : 30µl
- dNTP : 04µl
- MgCl2 : 02µl
- Tampon 10X: 05µl
- Amorces: F 01µl
- R 01µl
- Taq polymérase: 0.5µl

➤ ADN 1.5µl

• *BBS5* Exon3

Programme de la réaction du PCR pour *BBS5* Exon 3 :

96°C	5 min	
96°C	30 sec	} 30 cycles
55°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	5 mn	

Protocole expérimental Invitrogen:

- H₂O : 30µl
- dNTP : 04µl
- MgCl₂ : 02µl
- Tampon 10X : 05µl
- Amorces: F 01µl
- R 01µl
- Taq polymérase: 0.5µl
- ADN 1.5µl

• *BBS6* Exon 5

Programme de la réaction du PCR pour *BBS6* Exon5 :

96°C	5 min	
96°C	30 sec	} 30 cycles
53°C	30 sec	
72°C	30 sec	

72°C

5 mn

Protocole expérimental Invitrogen:

- H2O : 30µl
- dNTP : 04µl
- MgCl2 : 02µl
- Tampon10X : 05µl
- Amorces: F 01µl
- R 01µl
- Taq polymérase: 0.5µl
- ADN 1.5µl

- *BBS8* (c.459+1G>A=

Programme de la réaction du PCR pour *BBS8* Exon :

96°C	5 min	} 30 cycles
96°C	30 sec	
56°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	5 mn	

Protocole expérimental Invitrogen:

- H2O : 30µl
- dNTP : 04µl
- MgCl2 : 02µl
- Tampon 5X: 05µl
- Amorces: F 01µl
- R 01µl

- Taq polymérase: 0.5µl
- ADN 1.5µl
- *BBS10* Exon 1

Programme de la réaction du PCR pour *BBS10* Exon 1 :

96°C	5 min	
96°C	30 sec	} 30 cycles
59°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	5 mn	

Protocole expérimental Proméga :

- H₂O : 26,25µl
- dNTP : 08µl
- MgCl₂ : 7,5µl
- Tampon 5X : 05µl
- Amorces: F 01µl
- R 01µl
- Taq polymérase: 0.3µl
- ADN 1.5µl

- *BBS10* Exon 2

Programme de la réaction du PCR pour *BBS10* Exon 2 :

96°C	5 min	
96°C	30 sec	} 30 cycles
57°C	30 sec	
72°C	30 sec	

- Taq polymérase: 0.3µl
- ADN 1.5µl

Calcul de Tm

Les températures d'hybridation Tm varient en fonction des paires d'amorces utilisées, elles sont donc calculées par les formules suivantes :

$$Tf = 2(A+T) + 4(G+C)$$

$$Tr = 2(A+T) + 4(G+C)$$

$$Thf = Tf - 4^{\circ}\text{C}$$

$$Thr = Tr - 4^{\circ}\text{C}$$

$$\mathbf{Tm = ((Thf + Thr) / 2) - 2}$$

Dilution des nucléotides :

dNTPs	02 mM	500 µl
dATP	100Mm	6.25 µl
dTTP	100mM	6.25 µl
dGTP	100mM	6.25 µl
dCTP	100mM	6.25 µl
H2O stérile	-	475 µl

TBE 10X

Tris base.....108 g

Acide borique.....55 g

EDTA.....8,3 g

Bleu de contrôle sur gel :

Bleu de bromophénol25 g

Xylène glycérol.....25 g

Glycérol.....30 g

H₂O.....100 g

Bromure d'éthidium (BET) 1% :

BET.....10µl

TBE 1X pH8.....1 ml