

Étude moléculaire du syndrome de Usher

S. ABDI^{1,2}, M. MAKRELOUF², A. BEHLOULI², Y. ROUS³, A. ZENATI²

Laboratoire central de biologie, CHU Blida, faculté de médecine Université Blida-1
Laboratoire de recherche de biochimie génétique, CHU Bab El Oued, université Alger-1
Service ORL, CHU Blida

1 Définition et historique :

Le syndrome de Usher est une forme de surdité syndromique caractérisée par l'association d'une surdité congénitale de perception, d'une rétinite pigmentaire pouvant évoluer jusqu'à la cécité [J.P. Hardelin 2004] et dans certains cas d'un dysfonctionnement vestibulaire [Lenarduzzi et al 2015, Garcia 2013].

Il a été décrit pour la première fois en 1858 par le professeur allemand Albrecht Von Graefe [Von Graefe 1858] (1828-1870) chez trois patients atteints de surdité congénitale et de rétinopathie pigmentaire évolutive associée [Singapore et al 2007]. Des observations similaires avaient été faites par Liebreich qui avait examiné une population berlinoise présentant des syndromes incluant une surdité et une rétinite pigmentaire [R Liebreich 1862].

C'est seulement en 1914 que l'ophtalmologue anglais Charles Usher (1865-1942) [Usher C 1914] a démontré le caractère héréditaire de cette pathologie et la décrit comme un syndrome spécifique à qui il a donné son nom [C. Petit 2001, J. Reiners et al 2005].

2 Épidémiologie et incidence :

Le syndrome de Usher est une maladie rare. Les anciennes études épidémiologiques ont estimé sa prévalence à 1/25000 [Boughnam et al 1983] mais des études récentes ont proposé une prévalence qui varie entre 1/6000 [W. J. Kimberling et al 2010] et 1/10000 [C. Hope et al 1997]. La prévalence du syndrome de Usher n'est pas connue en Algérie ni dans le grand Maghreb car aucune étude épidémiologique n'a été faite sur cette pathologie.

3 Manifestations cliniques générales :

Le syndrome de Usher est caractérisé par 3 types d'atteintes :

3-1 L'atteinte auditive : Elle est de type neurosensoriel et elle est très variable selon le type de Usher. La surdité est congénitale, profonde et non évolutive dans le type 1. Elle est pré-linguale moyenne à sévère et lentement évolutive dans le type 2. Elle est post-linguale rapidement évolutive et le plus souvent diagnostiquée lors de la première décennie dans le type 3 [C. Petit 2001].

3-2 L'atteinte vestibulaire : Le dysfonctionnement vestibulaire se manifeste par un retard d'acquisition de la marche et des problèmes d'équilibre. Ces troubles sont présents dans le type 1.

Cette atteinte se traduit par une réponse modérée au test calorique [F. Denoyelle 2003].

3-3 L'atteinte ophtalmologique : Le premier signe de la rétinite pigmentaire est une perte de la vision nocturne [M. Abani 2005] souvent vers 10 ans, mais le fond d'œil systématique peut permettre le diagnostic bien avant cet âge, dès 3-4 ans [Weil D et al 2003]. Toutefois des anomalies

de l'électrorétinogramme peuvent être détectées de façon très précoce avant les symptômes visuels, mais cet examen est invasif et désagréable. La rétinite pigmentaire se développe progressivement jusqu'à aboutir à une cécité vers l'âge de 40 à 60 ans [Roux AF et al 2005].

4 Classification clinique :

Il existe trois formes cliniques du syndrome d'Usher qui se différencient par la sévérité et l'évolution de la surdité, la présence ou l'absence de troubles vestibulaires ainsi que par la précocité des signes ophtalmologiques en rapport avec la rétinopathie [C. Bonnet et al 2011].

4-1 Le syndrome de Usher de type 1 : C'est la forme la plus fréquente et la plus sévère de surdité cécité héréditaire, elle représente 40% des cas de syndrome de Usher [Pang L et al 2009]. Cette forme congénitale se caractérise par une atteinte neurosensorielle bilatérale avec une surdité sévère à profonde dès la naissance. Dans certains cas la perte de l'audition devient profonde et sévère durant la première année [Sahly et al 2012].

Une aréflexie vestibulaire touchant les fonctions d'équilibre est observée et conduit à un retard du développement moteur.

La perte progressive de la vision secondaire à la rétinite pigmentaire se manifeste dans l'enfance, presque toujours vers l'âge de 10 ans. Cependant, chez les enfants âgés de plus de 4 ans qui présentent l'association altération bilatérale de l'audition et déficit vestibulaire, l'électrorétinogramme (ERG) peut révéler des anomalies de la vision et constitue un outil de dépistage utile pour le diagnostic précoce du syndrome d'Usher. Le déficit visuel se traduit par des troubles de la vision nocturne et un rétrécissement progressif du champ visuel.

A l'âge de 30-40 ans, les malades atteints de syndrome de Usher de type 1 ont généralement un champ visuel de 5-10 degrés ou moins. Cependant, les patients "typiques" atteints de la forme USH1 ne deviennent généralement pas aveugles. Ils peuvent présenter ultérieurement une cataracte et un œdème maculaire.

4-2 Le syndrome de Usher de type 2 : C'est le plus fréquemment observé. Il représente 50 à 60% de tous les cas de Usher [Millan JM et al 2011, Spandau UH 2002].

C'est une forme moins grave qui se caractérise par une atteinte neurosensorielle congénitale avec un déficit auditif modéré à sévère stable et non évolutif [Ramesh et al 2014].

La plupart des enfants présentant un syndrome de Usher de type 2 ont de bonnes capacités de communication à l'oral. La rétinite pigmentaire peut débuter au moment de la puberté ou après, avec une symptomatologie typique associant cécité nocturne et rétrécissement du champ visuel (vision en tunnel) et éventuellement baisse de l'acuité visuelle centrale.

Contrairement aux autres formes de syndrome de Usher, la fonction vestibulaire est normale et les enfants marchent à l'âge normal entre 10 et 14 mois.

4-3 Le syndrome de Usher de type 3 :

C'est le type le plus rare, il touche surtout la population juive ashkénase où il est responsable de plus de 40% des cas de Usher [Adato et al 2002, Ness SL 2003] et la population Finlandaise [Joensuu T et al 2001, PakarinenL et al 1995]. Contrairement aux autres formes de syndrome de Usher, l'audition et la fonction vestibulaire sont normales (ou quasi normales) à la naissance [Saihan et al 2009].

L'atteinte de la fonction auditive débute typiquement durant les deux premières décennies de la vie, après le développement du langage (post linguale) et s'aggrave avec le temps (altération progressive de l'audition). L'atteinte ultérieure de la fonction vestibulaire est variable.

A l'âge adulte, la plupart des enfants touchés présentent une surdité profonde.

L'âge d'apparition de la rétinite pigmentaire peut varier, mais dans la plupart des cas elle débute à la fin de l'enfance ou au début de l'âge adulte. Vers 40 à 50 ans, ces patients deviennent généralement aveugles. La fonction vestibulaire peut se détériorer avec le temps et l'équilibre peut être affecté chez environ la moitié des malades atteints de syndrome de Usher de type 3 [Joensuu et al 2001, Ness et al 2003].

5 Description et classification génétique :

Le syndrome de Usher est une maladie autosomique récessive, les parents de l'enfant malade portent chacun une copie du gène muté, mais ils sont typiquement asymptomatiques. Pour chaque grossesse ultérieure, le risque que l'enfant à naître soit malade est de 25%, le risque qu'un enfant non malade soit porteur d'une copie du gène muté est de 50% et il y a 25% de chance pour qu'un enfant non touché ne soit pas porteur de la mutation.

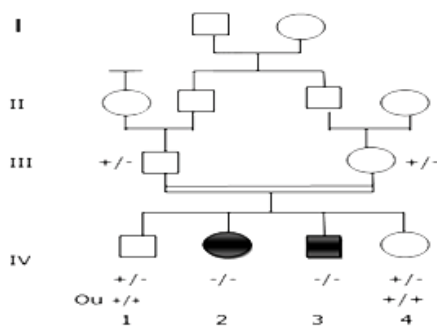


Figure 1: Caractéristiques de l'hérédité autosomique récessive

Légende : + : allèle normal ; - : allèle muté ; == consanguinité

Le syndrome de Usher est caractérisé par une grande **hétérogénéité génétique**. Un même phénotype peut être le résultat de différents gènes mutés [Friedman TB et al 2011, C.Bonnet et al 2011].

A ce jour dix (10) gènes sont décrits comme responsables de ce syndrome [Maria Aparizi et al 2014].

-six gènes pour le syndrome de Usher de type 1 : Myo7A, USH1C, CDH23, PCDH15, USH1G et CIB2

-trois gènes pour le syndrome de Usher de type 2 : USH2A, USH2C et USH2D.

-un seul gène pour le type 3 : CLNR1.

En outre, la plupart de ces gènes sont également responsables de surdité isolée ou non syndromique ou de rétinite pigmentaire isolée [JM Milan et al 2011, S.Riazuddin et al 2012].

Les anomalies génétiques sont des mutations non sens,

faux sens, avec décalage du cadre de lecture et délétions. Beaucoup de mutations sont récurrentes.

Tableau 1 : taille des gènes et des protéines impliquées dans le syndrome de Usher.

GÈNE	NOMBRE D'EXONS	PROTÉINE	NOMBRE D'ACIDES AMINÉS
USH1C	27	HARMONINE	910
USH1F	33	PROTOCOLADHERINE 15 OU PCDH15	1955
CIB2	6	CALCIUM AND INTEGRIN-PROTEIN2	187
USH2C	90	VLGR1	6306
USH3A	6	CLRN-1	232

6 Stratégie du Diagnostic moléculaire du Syndrome de Usher

Le diagnostic moléculaire du syndrome de Usher est basé sur des critères cliniques, paracliniques et génétiques.

6-1 Etude clinique :

Elle est faite par le médecin ORL car les premières manifestations cliniques de la maladie sont représentées par la surdité. Cette surdité est remarquée par l'entourage familial du patient en l'absence de réaction aux bruits ou d'orientation vers la source sonore (à partir de 6 mois), une absence ou un retard d'apparition du langage (ou un langage qui se dégrade s'il s'agit d'une surdité évolutive) [M.Ridal et al 2014].

Elle est prelinguale dans le cas de syndrome de Usher de type 1, l'enfant n'acquiert jamais le langage. Il est muet.

S'il s'agit d'un type 2, la surdité étant moyenne ou sévère, le diagnostic est fait un peu plus tard lorsque l'enfant est scolarisé le plus souvent. Dans le syndrome de Usher de type 3, l'atteinte de la fonction auditive débute typiquement durant les 2 premières décennies de la vie après le développement du langage, la surdité est post linguale et elle s'aggrave progressivement avec le temps.

Lorsqu'une aréflexie vestibulaire touchant les fonctions d'équilibre est associée (cas de syndrome de Usher de type 1) les enfants ont un retard du développement moteur, ils tiennent leur tête et la position assise plus tard que la normale et ne commencent généralement à marcher que tardivement vers l'âge de 24 mois ou plus. Les enfants plus âgés sont souvent victimes de traumatismes accidentels secondaires à des troubles de l'équilibre. Ils présentent des difficultés à pratiquer des activités ou des sports nécessitant un bon sens de l'équilibre.

Quant à la rétinite, il est très difficile de faire son diagnostic en début de la maladie surtout quand il n'y a pas une histoire familiale. En effet, La perte visuelle commence par la détérioration de la vision périphérique et nocturne, donc une légère cécité nocturne (héméralopie) due à la disparition du champ visuel périphérique est le symptôme principal. Celui ci, souvent ignoré par le malade est pris pour une maladresse par l'entourage familial. Cette cécité devient apparente à l'âge de l'adolescence [Iannacome A 2003, J.Tombran 2007].

A un stade plus avancé la cécité est évidente la nuit avec des difficultés de déplacement.

Le patient prend conscience de la perte de son champ visuel périphérique qui évoluera vers une vision tubulaire c'est-à-dire que le patient verra comme s'il regardait dans un tunnel. Au stade tardif la vision centrale sera également atteinte et la cécité devient également diurne.



Figure 2: champ visuel normal Figure 3: vision tubulaire

La rétinite pigmentaire est due à une destruction progressive des bâtonnets puis des cônes ce qui a pour conséquence l'apparition progressive de petits dépôts pigmentés noirs dans la rétine donnant ainsi le nom à la maladie. La destruction des cellules photo réceptrices de la rétine crée un phénomène inflammatoire et une cicatrisation des cellules épithéliales pigmentaires.

6-2 Les examens complémentaires : Ils sont réalisés pour évaluer la gravité des différentes atteintes : la perte d'audition, les troubles vestibulaires et l'altération de la vision.

6-2-1 Les examens de l'atteinte auditive : Ils sont nombreux, ces tests permettent de mesurer la perte de l'audition ou pour trouver son origine.

6-2-1-1 Les oto-émissions acoustiques (OEA) : Ce test permet de vérifier le bon fonctionnement des cellules ciliées de la cochlée. En effet à l'état normal, les cellules ciliées externes de la cochlée émettent des vibrations lorsqu'elles sont stimulées par un son. Ces vibrations sont appelées oto-émissions acoustiques ou OEA. Ce test souvent utilisé en dépistage précoce est rapide et facile à effectuer même chez le nouveau-né.

6-2-1-2 Les potentiels évoqués auditifs (PEA) : La mesure des PEA permet d'étudier l'activité électrique du cerveau en réponse à un signal sonore.

Ils permettent de confirmer et de quantifier la surdité de perception, de différencier l'atteinte endocochléaire de l'atteinte retro cochléaire. Cet examen évalue les seuls auditifs sans la participation consciente du sujet, ce qui peut s'avérer intéressant chez un tout petit. Des sons brefs sont émis et la réaction du cerveau est enregistrée grâce à des capteurs électriques (électrodes) qui sont fixées à l'aide d'une pâte conductrice sur le sommet du crâne et les lobes des oreilles. Dans le syndrome de Usher de type 1, le tracé de l'enregistrement des PEA est anormal puisque les cellules ciliées de la cochlée sont incapables de traduire l'onde sonore en signal électrique transmis au cerveau.

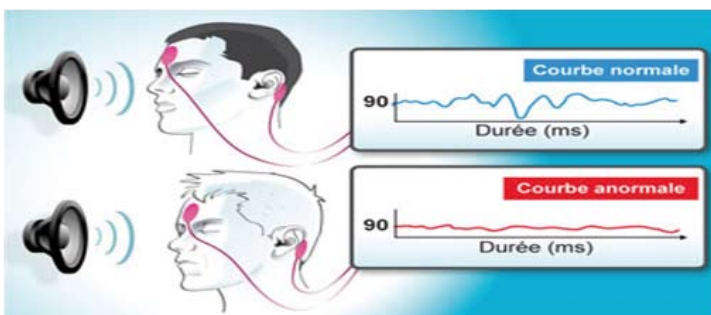


Figure 4 : tracé normal et pathologique d'un examen de PEA .

6-2-1-3 l'audiométrie tonale : C'est le test le plus courant de dépistage (Audiogramme tonal). Elle permet de confirmer la surdité en général (perception, mixtes et transmission) et de déterminer le seuil en dessous duquel la personne n'entend plus les sons (seuil d'audition). Les fréquences étudiées varient entre 125 Hz (graves) et 8000 Hz .

La figure ci-dessous (Fig 20) représente un audiogramme tonal (courbe rouge) caractérisé par une audition normale dans les fréquences graves et moyennes (125 à 2000 Hz) car la courbe est proche du zéro de référence .En revanche on observe une chute brutale dans les fréquences aiguës, au-delà de 4000 Hz, ce qui marque une perte auditive importante (surdité sévère).

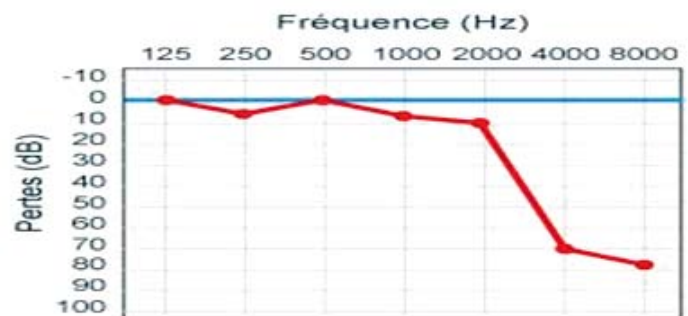


Figure 5 : tracé d'un audiogramme tonal

6-2-1-4 l'audiométrie vocale :

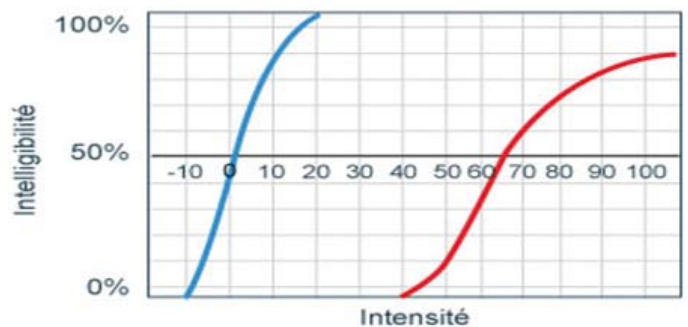


Figure 6 : Graphe d'un audiogramme vocal

Cette méthode permet de déterminer à partir de quel niveau sonore (intensité) le sujet peut comprendre la parole et permet d'évaluer le retentissement social de la surdité.

C'est une méthode de dépistage de l'intelligibilité d'un son. Elle permet l'évaluation du niveau de compréhension du niveau sonore sans avoir recours à l'utilisation des instruments. Sur le graphe ci-dessous, la courbe bleue représente l'audiogramme vocal d'un sujet normo-entendant. La courbe rouge représente l'audiogramme d'un sujet malentendant. Il ne commence à entendre qu'à partir de 65 dB et la courbe n'atteint jamais 100% d'intelligibilité même lorsqu'on augmente l'intensité, ce qui traduit d'importantes difficultés de compréhension.

6-2-1-5 les examens d'Imagerie : Le scanner des Rochers est demandé pour éliminer une surdité de transmission due à une otite moyenne chronique ou une fracture du rocher ou une malformation de l'oreille ou une dilatation de l'aqueduc du vestibule.

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) du conduit auditif interne et de l'angle ponto cérébelleux permet d'éliminer une tumeur de l'angle ponto cérébelleux comme le neurinome du nerf acoustique.

6-2-2 les examens de l'atteinte visuelle : Les troubles de la vue sont évalués grâce à plusieurs examens dont certains permettent de rechercher des modifications de la rétine et d'autres de mesurer leurs conséquences sur la vision.

6-2-2-1 L'examen du fond d'œil : L'examen du fond d'œil permet de voir directement la rétine après dilatation par un mydriatique. Dans la rétinite pigmentaire, de petites taches sont présentes en périphérie de la rétine (dépôts pigmentés ou pseudo-ostéoblastes) mais elles peuvent être absentes au début de la maladie.



Figure7 : Fond d'œil normal droit [F.Rigaudiere 2014]

Figure8 : Fond d'œil avec rétinite pigmentaire [C Hamel 2006]

6-2-2-2 L'électrorétinogramme (ERG) : Cet examen permet de diagnostiquer la rétinite pigmentaire en enregistrant la réponse électrique de la rétine à une stimulation par de la lumière. Les deux yeux sont stimulés en même temps grâce à un flash qui envoie des éclairs de lumière d'intensité et de fréquence variable. La stimulation se fait en deux étapes : une première série de flashes à l'obscurité et une deuxième série à la lumière.

L'enregistrement de la réponse de la rétine se fait grâce à des électrodes ayant la forme de grosses lentilles oculaires qui sont placées sous les paupières après application d'un collyre anesthésique (pour améliorer le confort). La personne est assise dans un fauteuil (ou allongée si c'est un petit enfant ou un bébé).

En cas de suspicion de syndrome d'Usher de type 1, l'ERG peut être réalisé à partir de l'âge de 6 mois. Dans de nombreux cas, les réponses sont diminuées par rapport à celles d'un enfant normal et cela permet de confirmer le diagnostic. Il y a néanmoins des formes de syndrome de Usher de type 1 peu sévères dans lesquelles les réponses ne seront altérées qu'à l'adolescence. On note des différences de réponse au stimulus lumineux selon le type de Usher. En effet la forme de l'onde de l'ERG n'est pas la même entre le syndrome de type 1 ou le type 2. Dans l'USH1, le temps de latence n'est pas affecté. Par contre, l'USH2 se caractérise par un allongement de ce temps de latence, ce qui est également observé dans la rétinite pigmentaire isolée [Seeliger MW et al 2001].

6-2-2-3 La mesure du champ visuel : Le champ visuel doit être testé, à la recherche de « trous » dans le champ de vision (scotomes) ou d'un rétrécissement du champ de vision. L'examen est réalisé par des appareils automatiques ou manuels, mais nécessite la coopération active de la personne testée. Il doit être effectué dès que l'âge de l'enfant le permet, à partir de 7 ans environ.

6-2-2-4 L'Optical Coherence Tomography (OCT) : L'OCT est une technique d'observation de la rétine très performante.

Elle permet d'observer les différentes couches de la rétine avec une résolution de quelques dizaines de microns. L'atteinte de la couche des photorécepteurs peut ainsi être observée directement, ce qui permet de confirmer la dégénérescence rétinienne dans les formes débutantes.

Au cours de l'évolution de la RP, l'OCT permet de mettre facilement en évidence l'amincissement progressif de la macula qui est due à la mort des cônes et des bâtonnets [Duffier JL 2005].

Cet examen a permis de confirmer le diagnostic de syndrome de Usher en retrouvant des signes de rétinite pigmentaire chez des familles tunisiennes ayant des cas de surdité mais dont le fond d'œil était normal [Z.Riahi 2015]. A un stade plus évolué de la maladie, il est possible de rechercher un gonflement de la rétine (œdème maculaire), ou, au contraire, une atrophie du centre de la rétine (atrophie maculaire).

6-2-3 les examens de l'atteinte vestibulaire :

6-2-3-1 Les épreuves rotatoires :

Elles permettent une stimulation physique des 2 vestibules en même temps et se basent sur l'observation grâce à des caméras infrarouges des mouvements du nystagmus spontané ou déclenché par différentes prises de positions du corps et de la tête ce qui stimule les canaux semi-circulaires horizontaux de la tête et du corps et permet d'accéder aux propriétés dynamiques du réflexe vestibulo-oculaire horizontal (RVOH) [Ballo RW.1990].

L'examen consiste à faire tourner la personne testée sur elle-même (sur une chaise en rotation), à différentes vitesses et plus ou moins longtemps.

Quand le médecin stoppe la rotation de la chaise, le mouvement des yeux (nystagmus) est enregistré puis analysé. Cet enregistrement peut se faire grâce à une caméra vidéo fixée sur un masque porté par la personne testée (nystagmoscopie), ou par le biais d'électrodes placées autour des yeux et qui enregistrent l'impulsion électrique provoquée par le mouvement des globes oculaires (nystagmogramme). Si les vestibules sont normaux, le nystagmus induit bat dans le sens de la rotation du fauteuil [De Waele.C 2005].

6-2-3-2 les épreuves caloriques :

Elles permettent d'apprécier l'excitabilité des ampoules des canaux semi-circulaires horizontaux et elles ont une valeur quantitative [Ballo RW 1977]. Les épreuves caloriques permettent une stimulation thermique du vestibule : de l'eau chaude (44°) puis de l'eau froide (30°) est introduite dans chaque oreille. Le mouvement des yeux (nystagmus) est enregistré de la même manière que pour les épreuves rotatoires.

Elle permet de stimuler un seul vestibule à la fois. Normalement le nystagmus induit bat du côté de l'oreille stimulée lors des épreuves chaudes, et du côté opposé à l'oreille stimulée lors des épreuves froides. Ce test se déroule dans l'obscurité ; et peut être anxiogène pour les personnes communiquant en langue des signes. Chez les enfants atteints du syndrome de Usher type 1, il existe toujours une atteinte vestibulaire bilatérale (aréflexie vestibulaire bilatérale) dès les premières années de vie. C'est pourquoi les épreuves rotatoire et calorique ne déclenchent ni nystagmus, ni vertige.

6-3 L'étude génétique :

Elle permettra d'identifier les gènes et les mutations qui sont la cause du double déficit auditif et visuel. Elle se fait sur du matériel génétique c'est-à-dire l'ADN.

L'ADN est extrait à partir de sang total recueilli sur un tube avec l'EDTA comme anticoagulant.

Il est ensuite soumis à une réaction de polymérisation en chaîne ou polymérisation en chaîne (PCR) qui permet d'augmenter la quantité du matériel biologique.

Les produits d'amplification obtenus seront par la suite purifiés et soumis au séquençage.

Ce séquençage consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides pour un fragment d'ADN donné. Il se fait selon 2 méthodes différentes, le séquençage de l'exome ou séquençage à haut débit (WES) et la méthode de Sanger.

6-3-1 L'approche de Sanger :

C'est une méthode par synthèse enzymatique qui consiste à initier la polymérisation de l'ADN à l'aide d'un petit oligonucléotide (amorce) complémentaire à une partie du fragment d'ADN à séquencer [F.Sanger et al 1977]. L'élongation de l'amorce est réalisée par une ADN polymérase en présence d'un mélange des quatre désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) et une faible concentration de quatre didésoxynucléotides (ddATP, ddCTP, ddGTP ou ddTTP) chacun associé à un marqueur fluorescent différent. Une fois incorporés dans le nouveau brin synthétisé, ces didésoxynucléotides empêchent la poursuite de l'élongation. Il en résulte un mélange de fragments d'ADN de tailles croissantes, qui se terminent à toutes les positions dans la séquence.

Le séquençage des produits d'amplification est effectué sur un séquenceur et les séquences seront alignées aux séquences de référence Genbank en utilisant un logiciel approprié.

6-3-2 L'analyse de l'exome ou séquençage à haut débit ou whole exome sequencing [S.Ellar et al 2015]:

L'exome est la partie du génome d'un organisme eucaryote constituée par les exons c'est-à-dire les parties des gènes qui sont exprimées pour synthétiser les produits fonctionnels sous forme de protéines. Il représente 1% de l'ensemble du génome humain, soit près de 28 Mb selon la base CCDS (consensus coding DNA sequence project) du NCBI [National center for biotechnology information] [C.Audrey 2010] il contient à lui seul 85% des mutations mises en cause dans les maladies génétiques [Choim et al 2009].

Par cette technique, l'amplification de l'échantillon à analyser ne s'effectue pas en solution mais sur un support solide s'il s'agit de la technologie ILLUMINA. La réaction de séquençage est alors réalisée directement sur le support où l'ADN a été amplifié.

Les séquences obtenues sont alignées sur le génome de référence afin de localiser la position de la séquence. Tous les résultats sont générés avec leur score de qualité et le statut homozygote/hétérozygote des bases mutées. La position sur le génome, sur le gène, sur le transcrit, dans la protéine, sur les mRNA, type de mutation, changement d'acide aminé ou de phase de lecture sont aussi précisés. L'existence ou non des variants (SNP) est vérifiée dans les bases de données dbSNP.

7 Patients et méthodes

Dans le cadre de la recherche de l'origine génétique des surdités neurosensorielles en Algérie, une centaine de familles a été recrutée au niveau du service ORL du CHU de Blida. Ce recrutement s'est fait sur la période allant de Janvier 2011 à Juin 2015.

La surdité est le motif de consultation des familles. Il s'agit d'une surdité de perception sévère à profonde qui a nécessité la pose d'implant cochléaire dans la plupart des cas.

Ce stade d'exploration a permis d'orienter vers le syndrome de Usher 19 familles.

7-1 Méthodes :

7-1 Extraction de l'ADN :

Cette extraction s'est faite au laboratoire de recherche de génétique du CHU Bab El Oued.

L'ADN génomique est extrait à partir des leucocytes contenus dans 3 ml de sang recueilli sur tube EDTA par la technique aux sels sans phénol « Salting out » avec le Kit Wizard Promega.

Après avoir détruit les membranes cellulaires des éléments figurés du sang par une solution de lyse, les globules blancs sont récupérés puis soumis à l'action d'une solution de lyse des noyaux. L'ADN est par la suite récupéré après sa précipitation sous forme de méduse par une solution de précipitation. Il est ensuite soumis à l'action d'une solution de réhydratation qui permet la solubilisation de la méduse d'ADN.

• Conservation de l'ADN

Selon les délais d'utilisation, l'ADN peut être conservé à +4°C ou congelé à -80°C si l'utilisation est ultérieure.

• Dosage de l'ADN obtenu :

Tous les ADN recueillis ont été quantifiés et soumis à un contrôle de qualité par leur dosage à 260 nm et à 280 nm. Le calcul du rapport DO 260/DO 280 permet de calculer la pureté de l'échantillon.

Sa valeur doit être comprise entre 1,8 - 2.

S'il est < 1,8 cela signifie une contamination protéique.

S'il est > 2 cela signifie une contamination par les sels et l'ARN.

7-2 le séquençage à haut débit d'exome humain ou Whole Exome Sequencing

(www.integrangen.com, <http://www.illumina.com>)

C'est un séquençage de tout l'exome humain (les parties codantes du génome humain).

Il a concerné tous les cas index des 19 familles.

Il se déroule en plusieurs étapes et se fait sur un support solide.

• Préparation des échantillons :

Après le recueil d'informations relatives au sexe, à la consanguinité, aux volumes et concentrations (g/μl) de l'ADN, la préparation a porté sur 5 μg d'ADN de chaque cas index.

• Préparation de la librairie d'ADN :

L'ADN sera fragmenté par sonication en fragments de 150 à 200 pb, ensuite il y a une ligation de quelques nucléotides à l'extrémité de chaque brin d'ADN afin de permettre la fixation d'une courte séquence oligonucléotidique qui s'appelle adaptateur. Les ADN ayant fixé ces adaptateurs seront sélectionnés puis purifiés et amplifiés par une réaction de PCR pendant 6 cycles. Les produits de PCR obtenus constituent ce qu'on appelle une librairie d'ADN, la durée de cette étape est d'environ 6 heures.

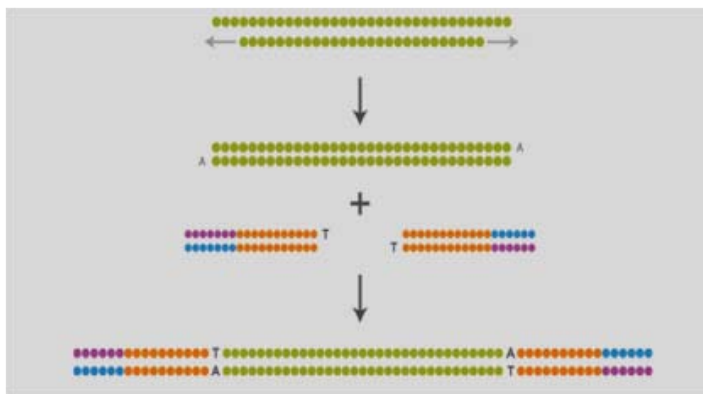


Figure 9 : Représentation schématique de la formation de la librairie d'ADN (The Illumina HiSeq 2000 Sequencing Technology: http://www.dkfz.de/gpcf/hiseq_technology.html)

• **La génération des clusters :**

À partir de la librairie d'ADN obtenue pour chaque échantillon, 500 ng sont prélevés, dénaturés en simple brin. Ils sont par la suite fixés à la surface d'un support solide appelé le flow cell.

Le flow cell est une petite lame sur laquelle sont greffées des séquences complémentaires aux adaptateurs qui sont déjà fixés aux extrémités de l'ADN. Une étape d'extension se fait par PCR en utilisant de l'ADN polymérase très fidèle afin d'éviter les incorporations erronées des nucléotides à l'ADN matrice.

La structure double brin sera dénaturée. Le brin matrice sera éliminé par une étape de clivage et lavage. Le brin nouvellement synthétisé sera plié et fixé à une autre amorce adjacente à la surface du flow cell ce qui initie la synthèse d'un autre brin par polymérisation: formation des ponts (bridges). La polymérisation se répète plusieurs fois jusqu'à l'obtention de plusieurs copies de ponts.

Les ponts formés seront linéarisés et dénaturés, les brins anti sens seront clivés et éliminés par lavage, ainsi les clusters obtenus sont constitués uniquement de brins sens. À la fin de cette étape nous aurons plus de 200 millions de clusters par flow cell, chaque cluster contient 1000 copies (Figure 28). Cette étape dure 5 heures et permet l'obtention de 40 millions de clusters par échantillon soit 80 millions de lectures (6Gb).

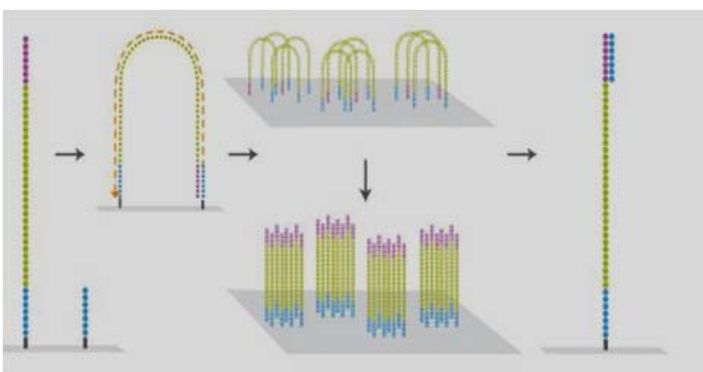


Figure 10 : Représentation schématique de la formation des ponts et la génération des clusters (The Illumina HiSeq 2000 Sequencing Technology)

• **Le séquençage :**

Une étape d'hybridation aux amorces qui sont des kits de capture 'Agilent Sure Select All Exon V5 50 Mb' pendant 24 heures.

Ces amorces vont s'hybrider spécifiquement aux bornes des exons (5'UTR, 3'UTR, région codante, +/- 25 pb de l'intron).

Le séquençage se fait directement sur les clusters sur la plateforme Illumina HiSeq2000 (paired-end en 2x75 bases), il dure de 4 à 9 jours. L'élongation se fait base par base en utilisant 4 nucléotides marqués par une fluorescence. Chaque nucléotide fixé, sera excité par un rayon laser et émet par la suite un signal dont la longueur d'onde correspond à sa fluorescence (Figure ci contre). Le marqueur fluorescent sera par la suite clivé permettant la fixation d'un autre nucléotide.

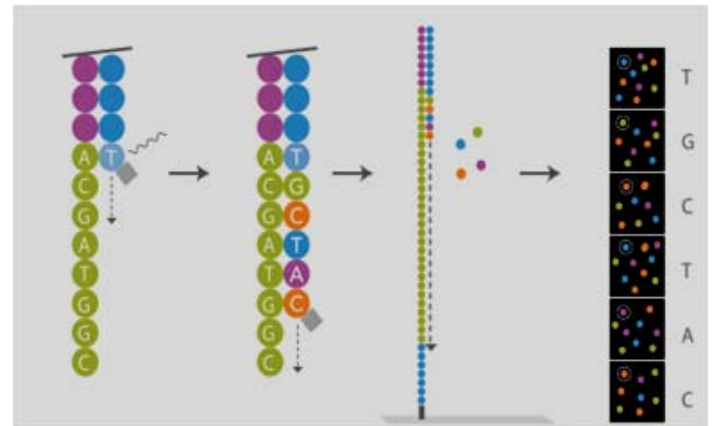


Figure 11 : Représentation schématique de l'hybridation des amorces et l'addition par complémentarité des nucléotides marqués par fluorescence (The Illumina HiSeq 2000 Sequencing Technology <http://www.dkfz.de/gpcf/hiseqtechnology.html>)

Après le séquençage, les résultats sont soumis à une analyse bio-informatique.

Pour ce faire, l'alignement se fait sur le génome humain de référence. Les lectures dupliquées multi alignées et présentant des anomalies d'orientation seront éliminées. L'identification des variants se fait à l'aide du logiciel CASAVA 1.8 associés à leur position, profondeur, comptage des bases lues, génotypes associés, statuts homozygotes/hétérozygotes et scores qualités associés.

Ce logiciel permet: -d'annoter chaque variant sur le gène, génome, transcrit, protéine, ARNm et par rapport à la distance de l'intron.

- de donner le type de mutations trouvées (intron, sens, non-sens, faux-sens, 3'UTR, 5'UTR).
- de donner le type de changement d'acides aminés et de phase de lecture.

7-3 Validation des mutations retrouvées par le WES :

Toutes les mutations retrouvées par le WES sont par la suite validées chez les cas index testés par un séquençage classique selon la méthode de Sanger. Elles sont également recherchées chez tous les membres de leurs familles afin d'établir les ségrégations familiales.

A cet effet, pour les différentes familles a été réalisée une amplification des exons mutés avec séparation électrophorétique sur gel d'agarose à 2% des produits obtenus. L'utilisation du logiciel Primer 3 nous a permis de choisir les amorces nécessaires à l'amplification des exons mutés.

La révélation des produits de migration a été faite grâce à l'utilisation d'un marqueur d'ADN (Gel Red) incorporé aux produits PCR qui devient fluorescent quand il est exposé aux rayons Ultraviolet. Les migrations obtenues sont photographiées et enregistrées sur ordinateur

Tableau II: Caractéristiques des mutations retrouvées dans les familles algériennes

PATIENT	AGE	GENE	ALLELE1	ALLELE2	REFERENCECE
S31	8	MYO7A	p.Lys1810*	p.Lys1801*	S. Abdi et al 2016
S17	14	MYO7A	p.Arg212His	p.Arg212His	Weston et al., 1996
7605	4	MYO7A	c.2283-1G>T	c.2283-1G>T	Roux et al., 2006
A6710	18	MYO7A	c.2283-1G>T	c.2283-1G>T	Roux et al., 2006
7476	3	MYO7A	p.Gly163Arg	c.2283-1G>T	Roux et al., 2006
9495	10	Myo7A	c.470 + 1G>A	c.470 + 1G>A	Adato et al 1997
7492	5	USH1C	p.Glu260*	p.Glu260*	S. Abdi et al 2016
9220	3	USH1C	p.Glu260*	p.Glu260*	
7482	3	CDH23	p.Tyr39His	p.Tyr39His	S.Abdi et al 2016
7579	10	CDH23	p.Ser1950Ser	p.Ser1950Ser	S.Abdi et al 2016
7632	<2	CDH23	c.6829+1G>A	c.6829+1G>A	Besnard et al. 2014
7635	54	CDH23	p.Gln2113*	p.Gln2113*	Oshimaet al2008
7647	6	CDH23	p.Gly291Arg	p.Gly291Arg	Aparisi et al 2014
A6423	7	CDH23	p.Gln362*	p.Asp1501Asn	S.Abdi et al 2016
7495	17	PCDH15	Exons 10-14 deleted	Exons 10-14 deleted	S.Abdi et al 2016
SA4	26	USH2A	c.2299delG	c.2299delG	Eudyet al., 1998
8190	18	USH2A	p.Thr5006Met	p.Thr5006Met	S.Abdi et al 2016
6380	9	USH1G	p.Ala397del	p.Ala397del	S.Abdi et al 2016
S39	7	VLGR1	p.Pro567Leufs*15	-----	S.Abdi et al 2016

8 Conclusion :

Le syndrome de Usher de type 1 est majoritairement retrouvé. Il a été diagnostiqué chez 16 patients avec une prédominance de mutations dans le gène CDH23 (7 mutations). Cinq mutations sont retrouvées dans le gène Myo7A et une mutation a concerné chacun des 3 autres gènes suivants à savoir USH1C, USH1G et PCDH15.

Le syndrome de Usher de type 2 a été diagnostiqué chez les 3 autres familles, 2 mutations bi-alléliques ont concerné le gène USH2A et une mutation à l'état hétérozygote a été trouvée dans le gène VLGR1 ou GPR98.

Dix nouvelles mutations non décrites dans les différentes bases de données des mutations concernant le syndrome de Usher ont été rapportées dans cette étude. Huit mutations ont concerné les gènes USH1 dont une dans le gène Myo7A, quatre dans le gène CDH23, une dans le gène USH1C, une dans le gène USH1G et une grande délétion dans le gène PCDH15.

Deux nouvelles mutations ont concerné les gènes du syndrome de Usher de type2 à savoir une mutation dans le gène USH2A et une autre dans le gène USH2C (VLGR1 ou GPR98).

Nous constatons une corrélation phénotype/génotype totale, les données génétiques correspondent bien au diagnostic clinique qui a été posé chez les 19 patients.

De la pertinence de l'étude clinique, découverte lors de ce travail collaboratif et en considération de l'actuelle insuffisance des moyens matériels pour réaliser en totalité le diagnostic génotypique, émerge l'importance de l'entreprise d'enquête génétique chez tout enfant atteint de surdité neurosensorielle

Pour cela une bonne coordination entre médecins ORL, ophtalmologues, neurologues et médecins biologistes est



CHIRURGIE VISCERALE
INNOVATION ET FORMATION

PUB

Paris, 19-21 sept.