

الشعبية الديمقراطية الجزائرية الجمهورية

République Algérienne Démocratique et Populaire



Ministère de l'enseignement supérieur
et de la Recherche scientifique

العلمي والبحث العالي التعليم وزارة

1 الجزائر جامعة

Université d'Alger 1
Faculté de Pharmacie

الصيدلة كلية



**THÈSE EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE DOCTORAT
EN SCIENCES MEDICALES**

**Recherche et Identification des Anomalies Moléculaires dans les Maladies
Héréditaires du Métabolisme :**

Application à l'Étude des Maladies de Wilson, Gaucher, et Fabry

Candidat

Dr. HALLAL SIHAM

Maître-assistante en Biochimie médicale - Faculté de Pharmacie - Université d'Alger 1

Jury

Président :

Professeur Imessaoudène Belaid - Biochimie - Faculté de Pharmacie - Université d'Alger 1

Membres Examineurs :

Professeur Otmani Fifi - Médecine interne - Faculté de Médecine - Université d'Alger 1

Professeur Djabi Farida - Biochimie - Faculté de Médecine - Université de Sétif

Professeur Hadji Lehtihet Amel - Pédiatrie - Faculté de Médecine - Université d'Alger 1

Directeur de thèse :

Professeur Yargui Lyèce - Biochimie - Faculté de Médecine - Université d'Alger 1

Date de soutenance : 24 Octobre 2023

Dédicaces

Louange à Allah, Seigneur de l'univers, qui éclaire mon chemin, et qui nous guide au quotidien, et nous donne le courage et la force d'accomplir ce modeste travail.

À ma chère et tendre maman

À la plus douce et la plus merveilleuse de toutes les mamans. Les mots ne suffisent pas pour exprimer l'amour, le dévouement et le respect que je porte pour toi.

Je te dédie ce modeste travail, qui n'est que le fruit de tes sacrifices, comme témoignage de ma reconnaissance et ma profonde estime.

Puisse Dieu tout puissant te protéger, et te procurer longue vie.

À mon cher papa

Merci de m'avoir appris le courage et la persévérance, merci pour ta confiance en moi et ta patience durant toutes ses années. Que Dieu te garde pour nous.

À ma sœur Amina et mon frère Mohamed Zakaria

Vous êtes ma source de joie et d'énergie. Je vous souhaite beaucoup de succès dans la vie, beaucoup de santé et de bonheur.

À mes deux nièces Sabrinelle et Nihel

À mon défunt oncle Allel,

Tu as rêvé de ce moment pour moi, le jour où tu as appris ma réussite au concours. Tu resteras, à tout jamais, dans nos cœurs. Puisse Dieu t'accorder sa miséricorde et t'accueillir dans son vaste paradis

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur **Yargui Lyèce**, mon chef de service à l'hôpital Mustapha, de m'avoir confié ce travail de recherches pertinent. Notre rencontre remonte à l'internat de Pharmacie, où l'ensemble des étudiants lui témoignait dès lors, estime et reconnaissance pour ses performances pédagogiques. Passionné des erreurs innées du métabolisme, sa maîtrise tant clinique que biologique du sujet, lui confère la place de référent dans sa discipline.

Je le remercie pour avoir mis à ma disposition tous les moyens nécessaires à l'accomplissement de ce travail, et m'avoir encouragé à concrétiser ce travail.

J'adresse également mes vifs remerciements à Monsieur le président de jury, **le Professeur Imessaoudène** pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

Je le remercie de m'avoir tant appris en Biologie Moléculaire à mes débuts de praticienne hospitalière au CHU Mustapha.

Je remercie l'ensemble des membres du jury, **le Professeur Otmani, le Professeur Djabi et le Professeur Hadji-Lehtihet** d'avoir accepté l'évaluation de ce travail.

J'exprime ma gratitude, au **Professeur Berhoun**, qui a œuvré durant sa carrière à l'implantation du diagnostic des maladies métaboliques en Algérie. Que dieu le préserve.

Mes profonds remerciements s'adressent au **Professeur El Mokhefi**, et au **Docteur Mokhtari** pour leurs précieux conseils et constants encouragements.

Que dieu vous protège.

Je remercie mes amis et collègues, le **Dr Ali** et le **Dr Kassoul**, pour qui je souhaite beaucoup de réussites.

Je remercie les personnes qui ont travaillé à mes côtés au sein de l'unité de Biologie moléculaire, pour la réalisation de ce travail, Zahra, Sarah, et l'ensemble des résidents affectés au sein de l'unité.

Mes vifs remerciements s'adressent à l'ensemble du Personnel du laboratoire, biologistes, et paramédicaux auprès de qui j'éprouve beaucoup de plaisir à venir travailler chaque jour.

Table des matières

| | |
|---|------------|
| DEDICACES | I |
| REMERCIEMENTS | II |
| TABLE DES MATIERES | III |
| LISTE DES ABREVIATIONS | X |
| LISTE DES TABLEAUX | XI |
| LISTE DES FIGURES | XIV |
| INTRODUCTION | 1 |
| I. PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS | 3 |
| I.1 PROBLEMATIQUE | 3 |
| I.2 OBJECTIFS | 4 |
| I.2.1 Objectif principal | 4 |
| I.2.2 Objectifs secondaires | 4 |
| II. REVUE DE LA LITTERATURE | 6 |
| II.1 REPERES HISTORIQUES | 6 |
| II.1.1 Maladie de Wilson | 6 |
| II.1.2 Maladie de Gaucher | 6 |
| II.1.3 Maladie de Fabry | 7 |
| II.2 LES ERREURS INNEES DU METABOLISME | 8 |
| II.2.1 Classification des maladies métaboliques | 8 |
| II.2.1.1 Maladies d'intoxication | 8 |
| II.2.1.2 Maladies énergétiques | 9 |
| II.2.1.3 Les anomalies de synthèse et de catabolisme de molécules complexes | 9 |
| II.2.1.4 Les déficits vitamino-dépendants | 9 |
| II.2.2 Diagnostic des maladies métaboliques : | 9 |
| II.2.2.1 Diagnostic clinique : | 9 |
| II.2.2.2 Diagnostic biologique | 10 |
| II.2.2.2.1 La Biochimie générale | 10 |
| II.2.2.2.2 La Biochimie spécialisée | 10 |
| II.2.2.2.3 La Biologie moléculaire | 10 |
| II.2.3 Maladies métaboliques et Génétique | 10 |
| II.3 LA MALADIE DE WILSON | 11 |
| II.3.1 Epidémiologie | 11 |
| II.3.2 Métabolisme du cuivre | 11 |
| II.3.2.1 Généralités | 11 |
| II.3.2.2 Les apports en cuivre et sa répartition dans l'organisme | 12 |
| II.3.2.3 L'absorption et le transport | 12 |
| II.3.2.4 Elimination | 13 |
| II.3.2.5 Les mécanismes de toxicité du cuivre | 13 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| II.3.3 | La génétique de la maladie de Wilson | 14 |
| II.3.3.1 | Le gène | 14 |
| II.3.3.2 | La protéine | 14 |
| II.3.3.3 | Les mutations | 16 |
| II.3.3.3.1 | Les conséquences des mutations | 17 |
| II.3.4 | Signes cliniques | 17 |
| II.3.4.1 | Les atteintes hépatiques | 18 |
| II.3.4.2 | Les atteintes neurologiques | 19 |
| II.3.4.3 | Les atteintes ophtalmologiques | 21 |
| II.3.4.4 | Les atteintes psychiatriques | 21 |
| II.3.4.5 | Les autres signes cliniques | 22 |
| II.3.5 | Diagnostic de la maladie de Wilson | 24 |
| II.3.5.1 | La clinique | 24 |
| II.3.5.2 | La biologie | 26 |
| II.3.5.2.1 | Hémogramme et bilan d'hémostase | 26 |
| II.3.5.2.2 | Bilan hépatique | 26 |
| II.3.5.2.3 | Bilan cuprique | 26 |
| II.3.5.3 | L'imagerie | 31 |
| II.3.5.4 | La biologie moléculaire | 31 |
| II.3.5.4.1 | Les techniques de biologie moléculaire | 31 |
| II.3.5.4.2 | Indications | 34 |
| II.3.6 | Enquête familiale | 34 |
| II.3.7 | Le score de Leipzig | 34 |
| II.3.8 | Traitement | 35 |
| II.3.8.1 | Le traitement pharmacologique | 35 |
| II.3.8.2 | La transplantation hépatique | 37 |
| II.3.8.3 | Les perspectives thérapeutiques | 38 |
| II.3.9 | La surveillance des malades Wilsoniens | 39 |
| II.4 | LA MALADIE DE GAUCHER | 40 |
| II.4.1 | Epidémiologie | 40 |
| II.4.2 | Aspects métaboliques | 40 |
| II.4.2.1 | Métabolisme des sphingolipides | 40 |
| II.4.2.2 | Le déficit enzymatique | 42 |
| II.4.2.2.1 | Voie principale | 42 |
| II.4.2.2.2 | Voie métabolique alternative | 44 |
| II.4.2.2.3 | Défaut d'adressage ou de repliement de l'enzyme au niveau du lysosome | 44 |
| II.4.2.2.4 | Déficit en Saposine C | 44 |
| II.4.3 | Génétique | 46 |
| II.4.3.1 | Gène GBA | 46 |
| II.4.3.2 | L'enzyme : β -glucocérebrosidase | 47 |
| II.4.3.3 | Les mutations | 48 |
| II.4.3.4 | Relation entre le gène GBA et syndrome parkinsonien | 49 |
| II.4.4 | Classification clinique | 49 |

| | | |
|--|--|-----------|
| II.4.4.1 | Maladie de Gaucher type I | 50 |
| II.4.4.2 | La maladie de Gaucher type 2 | 51 |
| II.4.4.3 | La maladie de Gaucher type 3 | 51 |
| II.4.4.4 | La forme fœtale | 52 |
| II.4.4.5 | Maladies associées chez l'adulte | 52 |
| II.4.5 | Diagnostic de la maladie de Gaucher | 52 |
| II.4.5.1 | Diagnostic d'orientation | 53 |
| II.4.5.2 | Diagnostic de certitude | 54 |
| II.4.5.2.1 | Diagnostic enzymatique | 54 |
| II.4.5.2.2 | Diagnostic moléculaire | 55 |
| II.4.5.3 | Marqueurs biochimiques du suivi de la maladie de Gaucher | 56 |
| II.4.5.3.1 | Chitotriosidase | 56 |
| II.4.5.3.2 | Chémokine CCL18 | 56 |
| II.4.5.3.3 | Glucosylsphingosine ou lyso GL1 | 57 |
| II.4.5.3.4 | Autres | 57 |
| II.4.6 | Traitement | 57 |
| II.4.7 | Surveillance des malades Gaucher | 60 |
| II.4.8 | Transition des patients Gaucher Pédiatrie/Adulte : | 61 |
| II.4.9 | Pronostic de la maladie | 61 |
| II.5 | MALADIE DE FABRY | 66 |
| II.5.1 | Epidémiologie | 66 |
| II.5.2 | Trouble Métabolique | 66 |
| II.5.3 | Génétique | 68 |
| II.5.3.1 | Gène GLA | 68 |
| II.5.3.2 | L'enzyme Alpha-galactosidase | 68 |
| II.5.3.3 | Mutations | 69 |
| II.5.3.4 | Transmission génétique de la maladie de Fabry | 70 |
| II.5.4 | Manifestations et formes cliniques | 71 |
| II.5.5 | Diagnostic | 73 |
| II.5.5.1 | Présomption clinique | 73 |
| II.5.5.1 | Mesure de l'activité enzymatique de l'α-galactosidase | 75 |
| II.5.5.2 | Dosage des céramides urinaires | 75 |
| II.5.5.3 | Analyse du gène GLA | 76 |
| II.5.6 | Traitement | 77 |
| II.5.7 | Pronostic de la maladie | 79 |
| DEUXIEME PARTIE : PRESENTATION DE NOTRE TRAVAIL | | 80 |
| I. MATERIEL ET METHODE | | 80 |
| I.1 TYPE D'ETUDE | | 80 |
| I.2 INSTRUMENTATION | | 80 |
| I.3 REACTIFS ET CONSOMMABLES | | 81 |
| I.3.1 | Réactifs | 81 |
| I.3.2 | Consommables | 81 |
| I.4 TRAITEMENT DES DONNEES | | 82 |

| | | |
|-------------|--|------------|
| I.4.1 | Saisie des données | 82 |
| I.5 | ANALYSE STATISTIQUE | 82 |
| I.6 | PATIENTS | 83 |
| I.6.1 | Critères d'inclusion : | 83 |
| I.6.2 | Critères d'exclusion : | 83 |
| I.7 | ORGANISATION DE L'ETUDE | 84 |
| I.7.1 | Arbre généalogique et enquêtes familiales | 84 |
| I.7.2 | Prélèvement et conditions pré-analytiques | 84 |
| I.7.2.1 | Mesure biochimique | 84 |
| I.7.2.1.1 | Maladie de Wilson | 84 |
| I.7.2.1.2 | Maladie de Gaucher/Fabry | 84 |
| □ | Recueil du culot leucocytaire : | 84 |
| I.7.2.2 | Analyse moléculaire | 85 |
| I.7.3 | Diagnostic biochimique de confirmation | 85 |
| I.7.3.1 | Maladie de Wilson : | 86 |
| I.7.3.1.1 | La détermination de l'activité oxydative cuivre dépendante de la céruloplasmine | 86 |
| I.7.3.1.2 | Dosage du cuivre plasmatique et urinaire par méthode colorimétrique à la bathocuproïne | 87 |
| I.7.3.2 | Maladie de Gaucher | 88 |
| I.7.3.2.1 | Détermination de l'activité enzymatique de la β -glucocérebrosidase | 88 |
| I.7.3.2.2 | Détermination de l'activité de la chitotriosidase | 89 |
| I.7.3.3 | Maladie de Fabry | 90 |
| I.7.3.3.1 | Méthode de dosage de l' α -galactosidase | 90 |
| I.7.4 | Analyse moléculaire de gène | 91 |
| I.7.4.1 | Extraction d'ADN | 91 |
| I.7.4.2 | Dosage de l'ADN | 93 |
| I.7.4.3 | Réaction de PCR (Polymerase Chain Reaction) | 93 |
| I.7.4.3.1 | Gène ATP7B | 94 |
| I.7.4.3.2 | Gène <i>GBA</i> | 95 |
| I.7.4.3.3 | Gène <i>GLA</i> | 97 |
| I.7.4.4 | Electrophorèse sur gel d'agarose | 98 |
| I.7.4.5 | Séquençage d'ADN | 99 |
| 4- | Identification et nomenclature des variants : | 101 |
| II. | RESULTATS | 102 |
| II.1 | MALADIE DE WILSON | 102 |
| II.1.1 | Cas index | 102 |
| II.1.1.1 | Description statistique de la population d'étude | 102 |
| II.1.1.2 | Caractéristique clinique | 103 |
| II.1.1.2.1 | Répartition des formes cliniques selon la tranche d'âge | 103 |
| II.1.1.2.2 | Symptômes | 104 |
| II.1.1.2.3 | Représentation des fréquences des symptômes par tranche d'âge | 104 |
| II.1.1.2.4 | Lien entre Age au diagnostic et sévérité clinique | 105 |

| | | |
|-------------|--|------------|
| II.1.1.3 | Résultats génétiques _____ | 106 |
| II.1.1.4 | Lien entre le statut génétique et les résultats du bilan cuprique _____ | 109 |
| II.1.1.4.1 | Résultats de la céruléoplasmine _____ | 110 |
| II.1.1.4.2 | Résultats du cuivre plasmatique _____ | 113 |
| II.1.1.4.3 | Résultats du cuivre urinaire _____ | 113 |
| II.1.2 | Apparentés _____ | 114 |
| II.1.2.1 | Caractéristique clinique _____ | 114 |
| II.1.2.2 | Caractéristique génétique _____ | 114 |
| II.1.2.3 | Résultat du bilan cuprique selon le statut génétique _____ | 115 |
| II.1.2.3.1 | Résultats de la céruléoplasmine _____ | 115 |
| II.1.2.3.2 | Résultats du cuivre plasmatique _____ | 115 |
| II.1.2.3.3 | Résultats du cuivre urinaire _____ | 116 |
| II.1.3 | Analyse statistique Cas index/apparentés _____ | 117 |
| II.1.3.1 | Répartition de l'Age moyen selon la clinique _____ | 117 |
| II.1.3.2 | Céruléoplasmine moyenne selon le groupe _____ | 118 |
| II.1.3.3 | Comparaison du bilan cuprique selon les groupes « Cas index / apparentés » _____ | 120 |
| II.1.3.4 | Comparaison du bilan cuprique selon les groupes « Apparentés normaux / Apparentés Hétérozygotes » _____ | 121 |
| II.1.3.5 | Caractéristiques des patients selon le groupe d'étude _____ | 121 |
| II.2 | LA MALADIE DE GAUCHER : _____ | 123 |
| II.2.1 | Cas index : _____ | 123 |
| II.2.1.1 | Description statistique de l'échantillon _____ | 123 |
| II.2.1.2 | Caractéristiques cliniques _____ | 124 |
| II.2.1.2.1 | Comparaison des caractéristiques (Age moyen et signes cliniques) entre les deux formes _____ | 124 |
| II.2.1.2.2 | Comparaison des symptômes cliniques selon la classe d'âge : _____ | 125 |
| II.2.1.2.3 | Corrélation entre les classes d'âges et la fréquence de forme clinique type1/type3 _____ | 126 |
| II.2.1.3 | Résultats génétiques : _____ | 126 |
| II.2.1.3.1 | Lien entre le statut génétique et les caractéristiques (Age moyen et signes cliniques) _____ | 128 |
| II.2.1.3.2 | Lien entre les statuts génétiques et la sévérité de la maladie chez les cas index _____ | 129 |
| II.2.1.4 | Résultats biochimiques : _____ | 130 |
| II.2.1.4.1 | Comparaison des taux de β -glucocérebrosidase pour le type I et le type III _____ | 130 |
| II.2.1.4.2 | Comparaison des taux de β -glucocérebrosidase moyen selon la classe d'âge _____ | 131 |
| II.2.1.5 | Lien entre le statut génétique et les résultats enzymatiques chez les cas index _____ | 132 |
| II.2.1.5.1 | Lien entre la β -glucocérebrosidase et le statut génétique _____ | 132 |
| II.2.1.5.2 | Lien entre la Chitotriosidase et le statut génétique _____ | 132 |
| II.2.2 | Les apparentés _____ | 133 |

| | | |
|--------------|--|------------|
| II.2.2.1 | Caractéristiques cliniques : | 133 |
| II.2.2.2 | Caractéristiques génétiques | 133 |
| II.2.2.3 | Résultats de l'activité enzymatique selon le statut génétique | 134 |
| II.2.2.3.1 | Lien entre la β -glucocérebrosidase et le statut génétique | 134 |
| II.2.2.3.2 | Lien entre la Chitotriosidase et le statut génétique | 135 |
| II.2.2.4 | Analyse statistique cas index/apparentés | 135 |
| II.2.2.4.1 | Comparaison des résultats de l'activité enzymatiques entre cas index/apparentés | 135 |
| II.2.2.4.2 | Comparaison des résultats de l'activité enzymatiques entre apparentés normaux/ et apparentés hétérozygotes | 136 |
| II.2.2.5 | Caractéristiques des patients selon les groupes d'étude | 136 |
| II.3 | MALADIE DE FABRY | 138 |
| II.3.1 | Cas index | 138 |
| II.3.1.1 | Caractéristiques cliniques | 138 |
| II.3.1.1.1 | Description de l'échantillon des cas index | 138 |
| II.3.1.1.2 | Signes cliniques | 139 |
| II.3.1.2 | Caractéristiques génétiques | 139 |
| II.3.1.3 | Caractéristiques biochimiques : | 139 |
| II.3.2 | Apparentés | 140 |
| II.3.2.1 | Caractéristiques cliniques : | 140 |
| II.3.2.2 | Caractéristiques génétiques | 140 |
| II.3.3 | Analyse statistique cas index/apparentés | 140 |
| II.3.3.1 | Corrélation entre le taux de l' α -galactosidase et le statut génétique | 140 |
| II.3.3.2 | Comparaison des taux de l' α -galactosidase entre deux groupes d'apparentés normaux/conductrices | 141 |
| II.3.4 | Caractéristiques de patients selon le groupe d'étude | 142 |
| III. | DISCUSSION | 143 |
| III.1 | AVANTAGES ET LIMITES DE NOTRE TRAVAIL | 143 |
| III.2 | MALADIE DE WILSON : | 145 |
| III.2.1 | Description statistique et clinique de cas index | 145 |
| III.2.2 | Résultats génétiques | 146 |
| III.2.2.1 | L'étude de corrélation mutations spécifiques-phénotypes : | 147 |
| III.2.2.2 | Polymorphismes : | 156 |
| III.2.3 | Statut génétique et bilan cuprique | 157 |
| III.2.4 | Enquête familiale | 158 |
| III.2.5 | Caractéristiques des patients selon le groupe d'étude | 159 |
| III.3 | MALADIE DE GAUCHER | 160 |
| III.3.1 | Caractéristiques statistiques et cliniques des cas index | 160 |
| III.3.2 | Résultats génétiques | 161 |
| III.3.3 | Résultats biochimiques | 163 |
| III.3.4 | Les apparentés : | 163 |
| III.3.5 | Caractéristiques des patients selon les groupes d'étude | 164 |

| | |
|--|------------|
| III.4 LA MALADIE DE FABRY | 165 |
| III.4.1 Caractéristiques cliniques et statistiques des cas étudiés | 165 |
| III.4.2 Résultat génétique | 165 |
| III.4.3 Les apparentés | 167 |
| III.4.4 Caractéristiques des patients selon les groupes d'étude | 168 |
| CONCLUSION | 169 |
| PERSPECTIVES ET RECOMMANDATIONS | 171 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 172 |
| ANNEXES | 187 |

Liste des abréviations

| | |
|-----------------|---|
| 4MU | 4-Méthylumbéliciférol |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| AF | Amorce Forward (sens) |
| AR | Amorce Reverse (anti-sens) |
| ARN | Acide ribonucléique |
| ATOX1 | Antioxydant 1 Copper Chaperone |
| ATP7B | ATPase Copper Transporting 7 Beta |
| COMMD1 | Copper Metabolism MURR1 Domain-containing protein 1 |
| ddNTP | Didésoxyribonucléotides |
| DMT1 | Divalent Metal ion Transporter 1 |
| EDTA | Éthylène Diamine Tétra Acétique |
| FLAIR | Fluid Attenuated Inversion Recovery |
| GB3 | Globotriaosyl céramide |
| GBAP | GBA-Pseudogène |
| GLA | Galactosidase alpha |
| hCTR1 | Human Copper Transporter 1 |
| LC-MS/MS | Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry |
| LIPM-2 | Lysosomal intergal membran protein |
| MLPA | Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification |
| MTX1 | Métaxine |
| OMIM | Online Mendelian Inheritance in Man |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| PSAP | Prosaposine |
| REC | Relative Exchangeable Copper |
| SCARB2 | Scavenger receptor class B member 2 |
| SNIR-AM | Système national d'information inter-régimes de l'Assurance maladie |
| SREBP2 | Sterol regulatory element-binding protein-2 |
| TMS4 | Transmembrane segments 4 |
| TTM | Tétrathiomolybdate |
| XIAP | X-Linked Inhibitor of Apoptosis |

Liste des tableaux

| | |
|---|-----|
| TABLEAU 1: LES CONCENTRATIONS DE CUIVRE DANS DIVERS ALIMENTS (33) | 12 |
| TABLEAU 2: QUAND EVOQUER LA MALADIE DE WILSON ? | 25 |
| TABLEAU 3: LES VALEURS USUELLES DU BILAN CUPRIQUE..... | 30 |
| TABLEAU 4: SCORE DE LEIPZIG (57)..... | 35 |
| TABLEAU 5: TRAITEMENT DE LA MALADIE DE WILSON (45)..... | 36 |
| TABLEAU 6: PRINCIPALES INDICATIONS THERAPEUTIQUES DANS LA MG (118)..... | 58 |
| TABLEAU 7: SUIVI DES PATIENTS ADULTES ATTEINTS DE MALADIE DE GAUCHER DE TYPE 1 ASYMPTOMATIQUES (93) | 62 |
| TABLEAU 8: SUIVI DES PATIENTS ADULTES ATTEINTS DE MALADIE DE GAUCHER DE TYPE 1 TRAITES | 63 |
| TABLEAU 9: SUIVI DES PATIENTS PEDIATRIQUES ATTEINTS DE MALADIE DE GAUCHER DE TYPE 1 NON TRAITES | 64 |
| TABLEAU 10: SUIVI DES PATIENTS PEDIATRIQUES ATTEINTS DE MALADIE DE GAUCHER DE TYPE 1 TRAITES (93)..... | 65 |
| TABLEAU 11: MODE OPERATOIRE DU DOSAGE DE LA CERULEOPLASMINE | 86 |
| TABLEAU 12: MODE OPERATOIRE DU DOSAGE DU CUIVRE..... | 88 |
| TABLEAU 13: DOSAGE DE LA B-GLUCOCEREBROSIDASE..... | 89 |
| TABLEAU 14: DOSAGE DE LA CHITOTRIOSIDASE..... | 90 |
| TABLEAU 15: DOSAGE DE L'A-GALACTOCEREBROSIDASE | 91 |
| TABLEAU 16: TAILLES ET T _m RESPECTIVES DES EXONS DU GENE ATP7B | 95 |
| TABLEAU 17: TAILLES ET T _m RESPECTIVES DES EXONS DU GENE GLA | 98 |
| TABLEAU 18: DESCRIPTION DE L'ECHANTILLON DES CAS INDEX | 102 |
| TABLEAU 19: REPRESENTATION DES FORMES CLINIQUES SELON LA TRANCHE D'AGE..... | 103 |
| TABLEAU 20: SIGNES CLINIQUES INCRIMINES POUR CHAQUE FORME DE LA MALADIE | 104 |
| TABLEAU 21: FREQUENCES DES SYMPTOMES PAR TRANCHE D'AGE..... | 105 |
| TABLEAU 22: LIEN ENTRE AGE AU DIAGNOSTIC ET SEVERITE CLINIQUE..... | 105 |
| TABLEAU 23: LIEN ENTRE AGE AU DIAGNOSTIC ET SEVERITE CLINIQUE PAR TRANCHE D'AGE | 105 |
| TABLEAU 24: LES MUTATIONS IDENTIFIEES AU SEIN DE LA POPULATION ETUDIEE..... | 106 |
| TABLEAU 25: LES VARIATIONS DE SEQUENCE NON DECRITES DE SIGNIFICATION INCERTAINE | 107 |
| TABLEAU 26: LES POLYMORPHISMES IDENTIFIES AU SEIN DE LA POPULATION ETUDIEE | 108 |
| TABLEAU 27: COMPARAISON DES TAUX DE CERULEOPLASMINE SELON LE STATUT GENETIQUE DES CAS INDEX | 110 |
| TABLEAU 28 : REPARTITION DE L'AGE MOYEN DES CAS SELON LA CLASSE DE CERULEOPLASMINE | 110 |
| TABLEAU 29: REPARTITION DES FORMES CLINIQUES EN FONCTION DE LA CERULEOPLASMINEMIE | 111 |
| TABLEAU 30: ESTIMATION DE LA CERULEOPLASMINE MOYENNE SELON LA TRANCHE D'AGE. | 112 |
| TABLEAU 31: COMPARAISON DES TAUX DU CUIVRE PLASMATIQUE SELON LE STATUT GENETIQUE DES CAS INDEX | 113 |
| TABLEAU 32: COMPARAISON DES TAUX DU CUIVRE URINAIRE SELON LE STATUT GENETIQUE DES CAS INDEX | 113 |

| | |
|---|-----|
| TABLEAU 33: COMPARAISON DES TAUX DE CERULEOPLASMINE SELON LE STATUT GENETIQUE DES APPARENTES | 115 |
| TABLEAU 34: COMPARAISON DES TAUX DU CUIVRE PLASMATIQUE SELON LE STATUT GENETIQUE DES APPARENTES | 115 |
| TABLEAU 35: COMPARAISON DES TAUX DU CUIVRE URINAIRE SELON LE STATUT GENETIQUE DES APPARENTES | 116 |
| TABLEAU 36: REPARTITION DE L'AGE MOYEN SELON LA CLINIQUE | 117 |
| TABLEAU 37: ESTIMATION DE LA CERULEOPLASMINE MOYENNE SELON LA FORME CLINIQUE CAS INDEX/APPARENTES ASYMPTOMATIQUES..... | 118 |
| TABLEAU 38: COMPARAISON DES PARAMETRES DU BILAN CUPRIQUE ENTRE LES CAS INDEX ET LES APPARENTES | 120 |
| TABLEAU 39: COMPARAISON DES PARAMETRES DU BILAN CUPRIQUE ENTRE LES APPARENTES NORMAUX/ HETEROZYGOTE | 121 |
| TABLEAU 40: CARACTERISTIQUES STATISTIQUES DE LA POPULATION ANALYSES SELON LA FORME CLINIQUE | 122 |
| TABLEAU 41: DESCRIPTION STATISTIQUE DE CAS INDEX GAUCHER..... | 123 |
| TABLEAU 42: COMPARAISON DES CARACTERISTIQUES (AGE MOYEN ET SIGNES CLINIQUES) ENTRE LES DEUX FORMES | 124 |
| TABLEAU 43: COMPARAISON DES SYMPTOMES CLINIQUES SELON LA CLASSE D'AGE..... | 125 |
| TABLEAU 44: STATUT GENETIQUE DES CAS INDEX | 126 |
| TABLEAU 45: REPARTITION DU STATUT GENETIQUE SELON L'AGE | 127 |
| TABLEAU 46: LIEN ENTRE LE STATUT GENETIQUE ET LES CARACTERISTIQUES (AGE MOYEN ET SIGNES CLINIQUES)..... | 128 |
| TABLEAU 47: COMPARAISON DES STATUTS N370S/L444P/N370S+L444P PAR RAPPORT A LA SEVERITE | 129 |
| TABLEAU 48: COMPARAISON DES TAUX DE B-GLUCOCEREBROSIDASE POUR LE TYPE I ET LE TYPE III | 130 |
| TABLEAU 49: COMPARAISON DES TAUX DE B-GLUCOCEREBROSIDASE MOYEN SELON LA CLASSE D'AGE..... | 131 |
| TABLEAU 50: LIEN ENTRE LA B-GLUCOCEREBROSIDASE ET LE STATUT GENETIQUE..... | 132 |
| TABLEAU 51: LIEN ENTRE LA CHITOTRIOSIDASE ET LE STATUT GENETIQUE CHEZ LES CAS INDEX | 132 |
| TABLEAU 52: LIEN ENTRE LA B-GLUCOCEREBROSIDASE ET LE STATUT GENETIQUE..... | 134 |
| TABLEAU 53: LIEN ENTRE LA CHITOTRIOSIDASE ET LE STATUT GENETIQUE | 135 |
| TABLEAU 54: COMPARAISON DES RESULTATS DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUES ENTRE CAS INDEX/APPARENTES | 135 |
| TABLEAU 55: COMPARAISON DES RESULTATS DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE ENTRE APPARENTES NORMAUX ET HETEROZYGOTES | 136 |
| TABLEAU 56: COMPARAISON DES CARACTERISTIQUES DES PATIENTS SELON LES GROUPES D'ETUDE..... | 137 |
| TABLEAU 57: DESCRIPTION DE L'ECHANTILLON DES CAS INDEX | 138 |
| TABLEAU 58: PRINCIPAUX SYMPTOMES DES CAS INDEX | 139 |
| TABLEAU 59: NOMENCLATURE DES MUTATIONS DU GENE GLA DES CAS INDEX | 139 |

| | |
|---|-----|
| TABLEAU 60 : LIEN ENTRE LE TAUX DE L'A-GALACTOSIDASE ET LES DIFFERENTS STATUTS | |
| GENETIQUES | 140 |
| TABLEAU 61 : LIEN ENTRE LE TAUX DE L'A-GALACTOSIDASE ET LES DIFFERENTS STATUTS | |
| GENETIQUES | 141 |
| TABLEAU 62 : COMPARAISON DES CARACTERISTIQUES STATISTIQUES ENTRE CAS INDEX ET | |
| APPARENTES | 142 |

Liste des figures

| | |
|---|-----|
| FIGURE 1: REACTION BIOCHIMIQUE PRESENTANT UN DEFICIT ENZYMATIQUE | 8 |
| FIGURE 2: EMBLEMMENT DU GENE ATP7B SUR LE CHROMOSOME 13 | 14 |
| FIGURE 3: STRUCTURE PROTEIQUE DE L'ATP7B | 15 |
| FIGURE 4: CONSEQUENCES DES MUTATIONS SUR LE TRANSPORT DU CUIVRE | 17 |
| FIGURE 5: SEQUENÇAGE CAPILLAIRE SELON LA METHODE DE SANGER | 32 |
| FIGURE 6: PRINCIPE DE LA TECHNIQUE MLPA | 33 |
| FIGURE 7: STRUCTURE DES SPHINGOLIPIDES | 41 |
| FIGURE 8: METABOLISME DES SPHINGOLIPIDES..... | 41 |
| FIGURE 9: CATABOLISME DES GLYCOSPHINGOLIPIDES | 43 |
| FIGURE 10: A- HYDROLYSE DU GLUCOSYLCERAMIDE (GLCCER) PAR LA B- GLUCOSYLCEREBROSIDASE DANS LE LYSOSOME B- CELLULES DE GAUCHER INFILTRANT LES DIVERS ORGANES (FOIE, RATE, MOELLE EPINIÈRE)..... | 43 |
| FIGURE 11: DEFICIT ENZYMATIQUE B-GLUCOCEREBROSIDASE (VOIE PRINCIPALE / VOIE ALTERNATIVE) | 45 |
| FIGURE 12: STRUCTURE DU GENE GBA ET LA REPARTITION DES DIFFERENTES MUTATIONS | 46 |
| FIGURE 13: LE CONTINUUM PHENOTYPIQUE : DESCRIPTION MODERNE DE LA MG | 51 |
| FIGURE 14: METABOLISME DU GLOBOTRIAOSYLCERAMIDE GB-3..... | 67 |
| FIGURE 15: ORGANISATION GENOMIQUE DU GENE GLA | 68 |
| FIGURE 16: STRUCTURE 3D DE L'A-GALACTOSIDASE A | 69 |
| FIGURE 17: SEGREGATION DU MODE DE TRANSMISSION LIE A L'X A - CAS DE MERE CONDUCTRICE/ B- CAS DE PERE ATTEINT | 71 |
| FIGURE 18: PRINCIPALES MANIFESTATIONS CLINIQUES DE LA MALADIE DE FABRY..... | 72 |
| FIGURE 19: ALGORITHME DIAGNOSTIQUE DE LA MALADIE DE FABRY CHEZ L'HOMME ET LA FEMME | 74 |
| FIGURE 20: EXTRACTEUR AUTOMATIQUE MAXWELL® 16..... | 93 |
| FIGURE 21: THERMOCYCLEUR T-100 THERMAL CYCLER® BIORAD | 94 |
| FIGURE 22: HISTOGRAMME DE LA REPARTITION DES FORMES CLINIQUE PAR TRANCHE D'AGE 103 | |
| FIGURE 23: REPARTITION DES MUTATIONS DU GENE ATP7B AU SEIN DE LA POPULATION ETUDIEE..... | 109 |
| FIGURE 24: REPRESENTATION DE L'AGE MOYEN EN FONCTION DE LA CERULEOPLASMINEMIE | 111 |
| FIGURE 25: REPARTITION DES FORMES CLINIQUES EN FONCTION DE LA CERULEOPLASMINEMIE..... | 112 |
| FIGURE 26: REPARTITION DE L'AGE MOYEN SELON LA CLINIQUE..... | 118 |
| FIGURE 27: ESTIMATION DE LA CERULEOPLASMINEMIE MOYENNE SELON LA FORME CLINIQUE CAS INDEX/APPARENTES ASYMPTOMATIQUES..... | 119 |
| FIGURE 28: REPRESENTATION DE LA FORME CLINIQUE SELON LA TRANCHE D'AGE..... | 126 |
| FIGURE 29: TAUX DE B-GLUCOCEREBROSIDASE MOYEN SELON LA FORME CLINIQUE | 130 |
| FIGURE 30: TAUX DE B-GLUCOCEREBROSIDASE MOYEN SELON LA TRANCHE D'AGE | 131 |

Introduction

Introduction

Les erreurs innées du métabolisme sont un groupe de pathologies extrêmement hétérogènes. Ce sont des maladies génétiques transmises, pour la plupart, selon un mode autosomique récessif, et plus rarement selon un mode lié à l’X **(1)**.

Elles résultent, le plus souvent, de la déficience d’une enzyme impliquée dans l’une des voies métaboliques des acides aminés, des sucres simples, des acides gras, des bases puriques, pyrimidiques, ou de structure complexes telles que les sphingolipides.

Elles constituent environ un tiers des maladies génétiques d’étiologie connue, avec une incidence estimée chez l’enfant à 1 cas pour 2000 naissances **(2)**.

Le diagnostic de ces maladies est biochimique. Il fait appel à la détermination de l’activité de l’enzyme déficiente, ou le dosage du métabolite accumulé dans le sang ou dans les urines. Le diagnostic génotypique, par la recherche de la mutation sur le gène délétère spécifique à chaque affection, reste l’outil de confirmation idéale **(3)**.

Ces dernières années, certains de ces désordres métaboliques peuvent enfin bénéficier d’un traitement pharmacologique. Ceci a été permis grâce à l’apparition de nouvelles molécules médicamenteuses substitutives de l’enzyme déficiente ou encore chélatrices de substances toxiques générées par le blocage enzymatique en cause.

Ce présent travail de recherche s’adresse à l’étude des maladies héréditaires du métabolisme (MHM), qui justifient un traitement médicamenteux d’une part, et dont les produits pharmaceutiques sont disponibles dans notre pays d’autre part (arrêté ministériel du 6 février 2013 paru au journal officiel N°50, fixant la liste des maladies rares ainsi que les produits pharmaceutiques destinés à leur traitement). Les Maladies de Wilson, Gaucher, et Fabry figurent dans la liste de ces MHM qui bénéficient d’une thérapeutique spécifique. Elles constituent, aussi, le motif de demande d’exploration le plus fréquent dans notre laboratoire qui assure le diagnostic phénotypique de certitude depuis plusieurs années

Très peu d’études multicentriques, ont été menées à ce jour au Maghreb, et dans les autres pays arabes, en témoignent les publications consultées. Il s’agit d’un terrain de recherche scientifique vierge dont les répercussions sur la prise en charge des patients atteints rendra service aussi bien au biochimiste praticien, qu’au clinicien thérapeute. Sans oublier le bénéfice d’une possibilité de l’analyse moléculaire dans notre pays évitant l’errance diagnostique et le déplacement des malades dans les pays étrangers.

La première partie de ce travail donne un état des connaissances et une revue de la littérature portant sur les données essentielles entourant les maladies de Wilson, de Gaucher, et de Fabry. Nous avons fourni un aperçu métabolique, une description clinique et la conduite thérapeutiques de ces désordres héréditaires du métabolisme. Par ailleurs, nous avons rapporté les moyens de leur diagnostic biochimique et leur surveillance thérapeutique.

La deuxième partie englobe les modalités pratiques de notre travail, et les résultats obtenus. Ont été développés, les moyens humains et matériels requis, la méthodologie suivie ainsi que la discussion des résultats.

La dernière partie rappelle l'issue de notre travail et réunit les recommandations que nous jugeons utiles d'évoquer.

Problématique
et
Objectifs

I. Problématique et objectifs

I.1 Problématique

La recherche et l'identification des anomalies moléculaires responsables des MHM est l'une des pratiques spécialisées en biochimie. Rares sont les laboratoires exerçant cette activité car celle-ci nécessite la disposition d'un équipement spécifique et une maîtrise approfondie des techniques de génétique moléculaire.

En parallèle, l'étude des MHM constitue l'une des préoccupations souscrites de nos autorités sanitaires afin de concevoir une correcte et complète prise en charge médicale de ces pathologies diverses et assez complexes. Les mesures de soins et de prévention aménagées trouvent comme attribut l'incidence certainement élevée de ces affections dans notre population. En effet, les mariages consanguins caractérisent encore plusieurs foyers familiaux algériens, prédisposant ainsi le développement de ces maladies à diagnostic souvent difficile.

Le recours aux tests génétiques moléculaires est souvent évoqué secondairement vu leur lourdeur tant financière qu'analytique, alors qu'il prévaut au diagnostic de certitude de ces maladies. Cependant, compte tenu du grand nombre de MHM et des exigences techniques pour chacune d'entre elles, le laboratoire serait contraint de réaliser les examens de génétique pour lesquels il aura acquis une expertise suffisante.

C'est dans cette optique que le choix des maladies à étudier, dans ce travail, a été mesuré en ciblant les MHM :

- qui bénéficient d'un traitement médicamenteux et pour lesquelles l'identification des mutations permettrait de guider la bonne conduite thérapeutique (indication et prévision de l'état de réponse)
- dont le diagnostic phénotypique de certitude, par le dosage de marqueurs biochimiques sériques, reste insuffisant pour différencier les sujets atteints pré-symptomatiques de ceux hétérozygotes.
- dont l'outil génétique serait le moyen efficace pour adopter des règles préventives dans le cadre de l'économie des marchés des molécules médicamenteuses destinées aux maladies dites rares ou orphelines.

A cette approche, se surajoutent évidemment les limites techniques des tests génétiques et l'évolution des connaissances scientifiques.

I.2 Objectifs

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un projet de thèse en sciences fondamentales, appuyé par des tests de génétique moléculaire à visée diagnostique et pronostique, dédié à certaines maladies héréditaires du métabolisme bénéficiant d'un traitement médicamenteux. Il constitue un tribut partiel à la prise en charge préventive et thérapeutique de ces maladies qui posent un problème de santé publique dans notre pays.

I.2.1 Objectif principal

Recherche et identification des anomalies moléculaires incriminées dans la genèse de trois maladies héréditaires du métabolisme bénéficiant d'un traitement médicamenteux dans la population algérienne :

- La maladie de Wilson : Etude du gène ATP7B, circonscrit sur le chromosome 13, et comptant 21 exons.
- La maladie de Gaucher : Analyse du gène GBA, situé sur le chromosome 1 en q21, et formé de 11 exons.
- La maladie de Fabry : Etude du gène GLA, localisé en Xq 22.1, et comprenant 7 exons.

I.2.2 Objectifs secondaires

- Réalisation d'une enquête familiale, chez tout cas index identifié, par étude de l'arbre généalogique complet, pour la mise en évidence des membres atteints dans les différentes générations, en suivant le mode d'hérédité pour chaque affection : autosomique récessif pour la maladie de Wilson et Gaucher, et récessif lié à l'X pour la maladie de Fabry.
- Proposition d'un conseil génétique avec établissement du statut définitif de chaque membre de la fratrie d'un malade diagnostiqué : atteints ou hétérozygotes pour les affections transmises selon le mode autosomique récessif, et les conductrices pour les transmissions liées à l'X.
- Sélection de la démarche diagnostique optimale à adopter devant toute suspicion de maladie métabolique, impliquant une équipe pluridisciplinaire, pour une meilleure prise en charge des patients, et une bonne observance de l'efficacité thérapeutique.

- Etablissement d'un répertoire de mutations propres à notre population, en comparant les résultats obtenus aux bases de données internationales établies pour chacune des maladies métaboliques étudiées.
- Une discrimination détaillée des mutations retrouvées sera discutée, tout en précisant s'il s'agit de mutations communes fréquemment décrites notamment dans le bassin méditerranéen, ou de mutations nouvelles spécifiques à notre population de patients.
- Etude de corrélations, existantes ou pas, entre le type de mutations et la réponse thérapeutique attendue avec une évaluation du pronostic avant et post-traitement.

Revue de la littérature

II. Revue de la littérature

II.1 Repères historiques

II.1.1 Maladie de Wilson

La première description clinique de la maladie de Wilson, baptisée dégénérescence hépatolenticulaire progressive en **1912**, revient à **Samuel Alexander Kinnier Wilson**. L'anneau cornéen pigmentaire a été identifié et rapporté par **Bernhard Kayser** en **1902**, puis reconfirmé par **Bruno Fleischer** en **1912**. L'implication du cuivre, dans la maladie, fut constatée, en **1913**, par **Rumpel Alfred** et reconfirmée par **John Nathaniel Cumings** qui suggéra, en **1948**, l'utilisation du Dimercaprol (BAL) comme traitement (4). Cette molécule, aux multiples effets secondaires, fut remplacée par la D-pénicillamine proposée par **John Walshe**, en **1956** (5). **Gerrit Schouwink**, en **1961**, montra que le sulfate de zinc administré par voie orale pourrait réduire considérablement chez les patients, l'absorption intestinale du cuivre.

En **1963**, **John Walshe** rapporta que la triéthylènetétramine 2HCl (trientine) était un agent chélateur du cuivre valable et constituait une alternative à la D-pénicillamine. En **1984**, ce même auteur montra la capacité du tétrathiomolybdate à mobiliser le cuivre du foie avec une amélioration clinique.

La transplantation hépatique dans le traitement de l'insuffisance hépatique secondaire à la maladie de Wilson a été réalisée pour la première fois par **Thomas Earl Starzl**, en **1982**.(6)

La dernière avancée scientifique, est arrivée en **1993** lorsque trois groupes indépendants et distincts (**Bull PC** et al. - **Tanzi RE** et al. - **Yamaguchi Y** et al.) annoncèrent dans *Nature and Genetics* l'identification du gène de la maladie de Wilson ; une ATPase de type P, (ATPase 7B) située sur le chromosome 13q14 (7).

II.1.2 Maladie de Gaucher

Dans sa thèse de Doctorat en médecine en **1882**, **Phillipe Gaucher** décrivit initialement la maladie qui devait porter son nom, comme un épithélioma primitif de la rate à l'autopsie d'une patiente de 32 ans présentant une splénomégalie massive.

La nature familiale de l'affection fût reconnue par **Nathan Edwin Brill** qui lui donna l'éponyme de maladie de Gaucher en **1905**. La nature du substrat lipidique accumulé dans les tissus et les organes des patients fût identifiée au glucocérebroside par **Henriette Aghion** en **1934**.

Le défaut métabolique, attribué au déficit de la β -glucocérébrosidase, enzyme qui, en présence de son cofacteur la saposine C, hydrolyse le glucosylcéramide en céramide et glucose, a été décrit par **Roscoe Owen Brady**, en **1965**.

La localisation lysosomale de la β -glucosidase acide fût démontrée par **Neal Joseph Weinreb** en **1968**, classant ainsi la maladie de Gaucher parmi les maladies lysosomales.(8)

Le gène de la β -glucosidase acide a été localisé sur le bras long du chromosome 1. L'ADN complémentaire fût cloné en 1985 (9), et l'organisation génomique décrite en 1989 (10).

Un traitement par enzymothérapie substitutive fût proposé, par administration de glucocérébrosidase exogène, initialement d'origine extractive en 1990, fût remplacée par une glucocérébrosidase recombinante en 1996, produite par les cellules de hamster Chinois.(11)

II.1.3 Maladie de Fabry

La maladie de Fabry fût décrite pour la première fois en **1898**, de façon indépendante par deux dermatologues, **William Anderson** en Angleterre et **Johannes Fabry** en Allemagne.(12)

Elle fut classée comme sphingolipidose, grâce aux travaux de **Charles Crawford Sweeley** et **Bernard Klionsky** après identification et caractérisation des deux glycosphingolipides neutres accumulés ; le globotriaosylcéramide, et le galabiosylcéramide, en **1963**.

Le mode de transmission autosomal récessif lié à l'X a été objectivé par **John Marius Opitz Opitz**, en **1965** (13).

La maladie fût attribuée à un déficit enzymatique, en céramide trihexosidase, une galactosidase lysosomale nécessaire au catabolisme du globotriaosylcéramide par **Roscoe Owen Brady**, en **1967**. L'enzyme fût précisée comme étant une α -galactosidase en **1973**, par **Ernest Beutler**.

Des études de cartographie ont localisé le gène GLA, en Xq22, et la caractérisation de la séquence complète de l'ADN complémentaire fût établie par **David H. Calhoun**, en **1985**, permettant l'identification de mutations en cause.

Deux traitements enzymatiques recombinants différents (algalsidase alpha, agalsidase beta) sont disponibles depuis **2001** (14).

II.2 Les erreurs innées du métabolisme

Les erreurs innées du métabolisme sont un groupe de pathologies extrêmement hétérogènes. Ce sont des maladies génétiques transmises pour la plupart selon un mode autosomique récessif, et plus rarement selon un mode lié à l’X (15).

Elles impliquent un trouble d’une des réactions biochimiques du métabolisme intermédiaire (Acides aminés, glucides, acides gras, bases puriques, pyrimidiques, ou de structure complexes telles que les sphingolipides) (16), due à un déficit enzymatique pour la plupart, ou à un déficit en son cofacteur, qui se traduit par une accumulation du substrat ou un défaut en produit.

Les maladies héréditaires du métabolisme (MHM) se manifestent le plus souvent en période néonatale, chez l’enfant ou encore à l’âge adulte. La symptomatologie clinique affecte le foie le plus souvent, le rein, le cœur, l’œil, ou le système nerveux central (1).

Elles constituent environ un tiers des maladies génétiques d’étiologie connue. Plus de 500 maladies différentes (17) sont actuellement connues, avec une incidence estimée chez l’enfant à 1 cas pour 20 000 naissances (15).

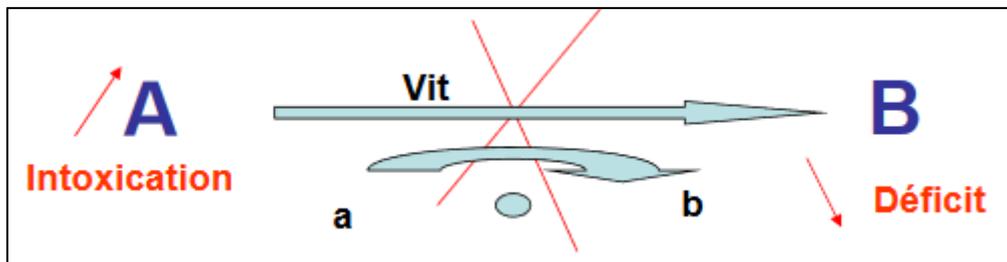


Figure 1: Réaction biochimique présentant un déficit enzymatique

II.2.1 Classification des maladies métaboliques

II.2.1.1 Maladies d’intoxication

Elles sont secondaires à une accumulation de métabolites toxiques retenus en amont d’un bloc enzymatique (18). On retrouve :

- Les aminoacidopathies
- Aciduries organiques
- Désordres métaboliques des éléments traces et métaux dont le cuivre
- Anomalies du cycle de l’urée
- Troubles du métabolisme du galactose et du fructose.

On décrit un développement fœtal normal, les symptômes apparaissent après un intervalle libre, à prédominance d’atteinte neuro(psychiatriques) et hépatique. Elles sont traitables, et nécessitent une prise en charge urgente (3).

II.2.1.2 Maladies énergétiques

Elles sont dues à un défaut de production ou d'utilisation énergétique au niveau cellulaire, avec des conséquences fréquentes sur le développement fœtal. On retrouve :

- Les maladies de la chaîne respiratoire (Déficits en pyruvate carboxylase, pyruvate déshydrogénase du cycle de Krebs)
- Les déficits de l'oxydation des acides gras
- Les glycogénoses

L'atteinte est néonatale, sans intervalle libre, qui associe une acidose lactique, une myocardiopathie, une hypoglycémie, une insuffisance hépatocellulaire sévère et rapidement évolutive, selon le déficit (17).

II.2.1.3 Les anomalies de synthèse et de catabolisme de molécules complexes

Ce sont les maladies dites d'organelles, on décrit :

- Les maladies lysosomales
- Les maladies peroxysomales
- Les syndromes d'hypoglycosylation des protéines
- Les déficits des voies de synthèse endogène des protéines.

Elles touchent le plus souvent l'enfant. Les symptômes sont permanents et progressifs.

On observe, pour la plupart, une atteinte neurologique, hépatique, rénale, digestive, et osseuse (2).

Les traitements par enzymothérapie substitutive existent, notamment pour certaines maladies lysosomales (16).

II.2.1.4 Les désordres du métabolisme des vitamines et cofacteurs

Le traitement consiste à la supplémentation vitaminique et permet de remédier radicalement à l'atteinte (19).

II.2.2 Diagnostic des maladies métaboliques

La suspicion d'une maladie métabolique est évoquée sur la base d'un faisceau d'arguments clinico-biologiques (20).

II.2.2.1 Diagnostic clinique

Le tableau clinique est hétérogène, souvent multi-systémique, dont le pronostic dépend de la rapidité du diagnostic, permettant l'instauration précoce de mesures diététiques, et/ou un traitement efficace.

Elle dépend de la nature du déficit, s'il est complet ; les manifestations sont néonatales décrivant un coma progressif, une hypotonie axiale, une hypertrophie périphérique, avec atteinte hépatique. Lorsque le déficit est partiel, les signes sont retardés, ils s'observent chez l'enfant voire l'adulte jeune, pouvant affecter un ou plusieurs organes (on identifie des

vomissements et un coma, une atteinte hépatique, rénale, un tableau psychiatrique, un retard mental isolé) (21).

II.2.2.2 Diagnostic biologique

Il implique trois niveaux d'investigations (22):

II.2.2.2.1 La Biochimie générale

Elle permet de réaliser des bilans d'orientation, par de simples outils de base comme l'ionogramme, le pH, les gaz du sang, une glycémie, et le bilan hépatique, tout comme des techniques semi-spécialisées pour les dosages de l'ammoniac, lactates et acide urique.

II.2.2.2.2 La Biochimie spécialisée

Elle confirme le diagnostic par l'analyse du métabolite spécifique ou l'enzyme. Elle s'effectue dans des unités spécialisées, qui requiert des compétences techniques, théoriques, ainsi que des équipements spécialisés tels que : fluorimètre, HPLC, et spectrométrie de masse.

II.2.2.2.3 La Biologie moléculaire

Elle ne constitue pas le moyen de diagnostic couramment utilisé. Elle analyse le gène caractérisé, lorsque les autres outils (détermination enzymatique, dosage du substrat) sont insuffisants.

Elle s'effectue dans des unités spéciales, dotées d'équipements complexes avec de nombreux outils de biologie moléculaire. Les protocoles sont complexes et longs.

Elle reste l'unique examen permettant d'établir avec certitude l'enquête familiale, et le diagnostic prénatal (23).

II.2.2.3 Maladies métaboliques et Génétique

A ce jour, on a identifié 30 à 50 000 gènes responsables d'erreurs innés du métabolisme, situés sur le génome nucléaire, mais aussi mitochondriale. Il s'agit de mutations qui peuvent être héritées ou survenir de novo.

En fonction du mode de transmission, on identifie :

- Une Mutation (pour la transmission autosomique dominante, liée à l'X)
- Une ou deux mutations (hétérozygotie composite) par pathologie lors de la transmission autosomique récessive (24).

II.3 La Maladie de Wilson

La maladie de Wilson ou « dégénérescence hépato-lenticulaire progressive » est une maladie héréditaire du métabolisme de transmission autosomique récessive. Elle est due à des mutations du gène du transporteur de cuivre l'*ATP7B* (MIM#606882), porté par le chromosome 13, responsable d'un défaut de transport tissulaire du cuivre, entraînant son accumulation essentiellement au niveau hépatique, cérébral et péri-cornéen.(25)

Son diagnostic repose sur un faisceau d'arguments cliniques, radiologiques, biochimiques et génétiques. Il s'agit d'une maladie qui bénéficie d'un traitement, et dont le pronostic dépend de la précocité du diagnostic.

II.3.1 Epidémiologie

En 1984, la prévalence générale de la maladie de Wilson était estimée à 1 sur 30.000 dans les populations non isolées, avec une fréquence d'hétérozygotes (porteurs de mutation d'un seul allèle) de 1 sur 90 (près de 1% de la population). (26)

La prévalence varie géographiquement, de même, l'apparition de mutations spécifiques varie entre certains groupes ethniques. (27)

Des données récentes de génétique obtenues grâce au séquençage NGS tendent à démontrer que la prévalence génétique serait plus importante ; ainsi un individu sur 42 au Royaume-Uni et un individu sur 31 en France, serait porteur d'un variant potentiellement pathogène. (28)

II.3.2 Métabolisme du cuivre

II.3.2.1 Généralités

Reconnu dès 1973 par l'OMS comme oligo-élément essentiel faisant partie des 14 métaux lourds indispensables aux fonctions biologiques normales, le cuivre est le troisième élément trace le plus abondant du corps humain.(29). Il est nécessaire au niveau du site actif de nombreuses enzymes en agissant comme cofacteur dans la catalyse de réactions d'oxydoréduction.(26)

Ces enzymes interviennent dans de nombreux systèmes métaboliques tels que :

- La respiration cellulaire : production d'énergie mitochondriale : **cytochrome oxydase**
- La défense contre les radicaux libres : **superoxyde dismutase**.
- La synthèse de neurotransmetteurs : **dopamine bêta-hydroxylase**
- Activation des peptides neuroendocriniens : **peptidyl- α -monooxygénase**
- La synthèse du tissu conjonctif notamment : **lysyl oxydase**

Essentiel à l'état de trace, le cuivre peut se révéler très toxique s'il est présent en excès sous forme libre (30). Son transport et métabolisme sont finement régulés pour maintenir son homéostasie.

II.3.2.2 Les apports en cuivre et sa répartition dans l'organisme

L'apport en cuivre est essentiellement alimentaire, avec un besoin journalier recommandé de 1mg/j (31). Les apports par l'eau de boisson sont très variables, car ils dépendent de la nature des canalisations d'adduction d'eau et de la robinetterie. (32)

Tableau 1: Les concentrations de cuivre dans divers aliments (33)

| Type d'aliments | Concentration ($\mu\text{g}/\text{kg}$ poids humide) |
|---------------------------|---|
| Fruits de mer | 1.49 |
| Viande | 3.92 |
| Œufs et produits laitiers | 1.76 |
| Légumes | 1.17 |
| Fruits | 0.82 |
| Graines et céréales | 2.02 |
| Huiles et graisses | 4.63 |

Les concentrations tissulaires de cuivre sont maximales dans le foie, le cerveau, l'œil, les reins et les os. Dans la circulation, différentes protéines lient le cuivre, principalement la céruléoplasmine.

Le cuivre non lié à la céruléoplasmine comprend le cuivre lié à l'albumine (appelé cuivre échangeable), ainsi que le cuivre lié à des acides aminés et le cuivre libre. (32)

II.3.2.3 L'absorption et le transport

50 % du cuivre alimentaire est absorbé essentiellement dans le duodénum, au niveau du pôle apical des cellules intestinales avant d'être excrété au niveau baso-latéral dans la veine porte.

Après réduction du Cu^{+2} en Cu^{+} , le cuivre pénètre au niveau du pôle apical de l'entérocyte grâce à deux transporteurs hCTR1 et DMT1, puis est excrété dans la circulation porte grâce au transporteur ATP7A (protéine de Menkes). L'ATP7A est ubiquitaire et est majoritairement présent au niveau intestinal. Cette absorption peut être perturbée au cours de pathologies digestives (maladie de Crohn, rectocolite hémorragique), ou par la prise concomitante de médicaments tels que des sels de zinc.

Le cuivre est ensuite libéré dans la circulation sanguine et transporté par l'albumine (ou autres protéines) jusqu'au foie.

Au niveau des hépatocytes, le passage intracellulaire du cuivre s'effectue grâce au transporteur hCTR1. Il est ensuite pris en charge par des protéines chaperonnes telles que ATOX1, partenaire cytosolique spécifique de l'*ATP7B*. Dès lors, l'*ATP7B*, localisée dans l'appareil de Golgi, permet la liaison du cuivre à l'**apocéruléoplasmine** formant ainsi l'**holocéruléoplasmine**. (31) Enfin, l'holocéruléoplasmine et l'albumine transportent le cuivre vers les tissus où il agit comme cofacteur. (32)

La Céruléoplasmine : Principale protéine transporteuse de cuivre dans le sang, liant 70 à 95% du cuivre en circulation (5). Il s'agit d'une α 2-glycoprotéine, synthétisée dans les microsomes hépatiques sous forme d'une apoprotéine inactive. Chargée de 6 atomes de cuivre, elle est excrétée dans la circulation sous forme d'holoprotéine.(34)

II.3.2.4 Elimination

La principale voie d'excrétion du cuivre est biliaire. Une fois dans la bile, le cuivre n'est plus réabsorbé, il est éliminé directement dans les selles. (35)

La protéine *ATP7B* joue un rôle majeur, en permettant l'acheminement du cuivre vers la bile. En effet, au cours d'une élévation des concentrations en cuivre intracellulaire, il existe une hyper-phosphorylation de l'*ATP7B* qui migre de l'appareil de Golgi vers un compartiment cytoplasmique à proximité de la membrane canaliculaire où elle libère le cuivre.

Une faible partie est filtrée par les glomérules rénaux, la cuprurie physiologique atteint 2 μ mol/24heures, soit 1 à 2 % du cuivre absorbé.(36)

II.3.2.5 Les mécanismes de toxicité du cuivre

Le cuivre est un élément toxique, avec une marge physiologique étroite. Il intervient au niveau de la chaîne respiratoire, exerçant une activité délétère dans les mitochondries en favorisant la formation de radicaux hydroxyles. En outre, il accélère l'apoptose, entraînant une destruction cellulaire et la libération du cuivre dans le sang.(32)

Sa toxicité est une conséquence de son activité redox, qui entraîne un stress oxydatif et des dommages subséquents aux lipides, aux protéines, à l'ADN et aux molécules d'ARN. D'autres mécanismes possibles de la toxicité du cuivre comprennent : (26)

- La découverte in vitro d'une liaison entre la protéine COMMD1, qui interagit avec la protéine *ATP7B*, et la protéine anti-apoptotique XIAP responsable d'apoptose cellulaire.
- L'accumulation du cuivre affecte spécifiquement les processus dépendants du zinc.(37)

L'augmentation du cuivre hépatique inhiberait le fonctionnement de la protéine SREBP-2, facteur de transcription jouant un rôle clé dans la biosynthèse du cholestérol hépatique.

II.3.3 La génétique de la maladie de Wilson

II.3.3.1 Le gène

Le gène responsable de la maladie de Wilson a été localisé sur le chromosome 13, dans la région 13q14.3. Il contient 21 exons, pour une longueur génomique totale de 80 kb. Il est le plus exprimé dans le foie, mais on le trouve aussi dans d'autres organes.(27)

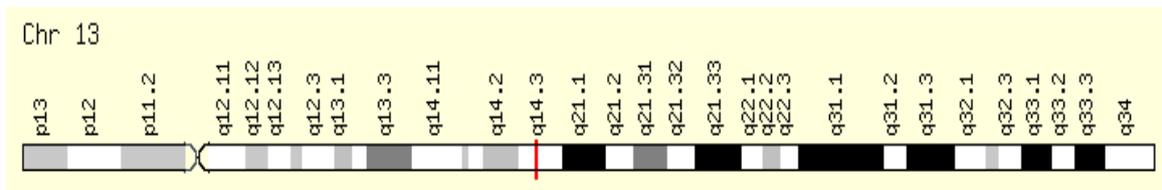


Figure 2: Emplacement du gène ATP7B sur le chromosome 13

II.3.3.2 La protéine

L'ATP7B est une protéine transmembranaire du système de Golgi, elle comprend 1465 acides aminés (7500 Kb) pour une masse de 165 kDa.

Elle assure deux rôles fondamentaux ;(35)

- L'incorporation de six molécules de cuivre dans l'apocéruléoplasmine pour former l'holocéruléoplasmine qui est excrétée dans la circulation sanguine.
- L'élimination biliaire du cuivre en excès.

Elle appartient à la classe 1B (PIB) de la superfamille ATPase de type P, qui permettent le transfert de cations (Cu^{+2}), lors de la déphosphorylation de l'ATP. Elle est composée de 17 domaines protéiques :

- **Un domaine de fixation du cuivre**

La partie N-terminale est constituée de 630 acides aminés, incluant un petit segment nécessaire au trafic de l'ATP7B vers la membrane apicale de l'hépatocyte, suivi par une chaîne de 6 domaines de liaisons aux métaux MBDs (Metal Binding Domains), Chaque MBDs est composée de motifs CxxC (Cystéine-X-X-cystéine), responsable de la chélation des ions cuivre par les fonctions thiols.(38)

Dans la cellule, l'ATP7B reçoit le cuivre de la protéine chaperonne ATOX1. Des études suggèrent que le cuivre est transféré de l'ATOX1 à une partie ou à la totalité des MBDs, puis au site de cuivre dans le domaine transmembranaire et enfin à des protéines dépendantes du cuivre de l'autre côté de la membrane. Cependant, le trajet exact n'a pas encore été élucidé. (39)

Il est à noter que des mutations causant la maladie de Wilson ont été signalées dans chaque MBD, mais les MBD5 et MBD6 contiennent les deux tiers des mutations. Cela est probablement dû à leur emplacement près du site d'entrée du cuivre dans la partie membranaire de l'ATP7B.(7)

- Boucles et de domaines transmembranaires

La protéine est composée de 8 hélices transmembranaires, le domaine TM1 est directement en contact avec le domaine de fixation du cuivre, les domaines TM2, TM3, TM4, TM5 sont reliés par les boucles 1,2,3,4, et 5. La boucle 4 comporte un domaine conservé TGEA.

Le TM6 forme avec TM7 un canal ionique, ces deux domaines sont reliés au domaine de liaison de l'ATP. Le domaine TM6 comprend un motif hautement conservé, CPC (cystéine-proline-cystéine) entre les ATPases à métaux lourds.

- Domaine de liaison à l'ATP

Présente des séquences conservées, un domaine à résidu aspartique (DKTGT), et un résidu Histidine dans un motif SEHPL en forme de boucle. Ce dernier est le motif de liaison à l'ATP.

- Domaine C-terminale

IL comprend 93 acides aminés, indispensable à l'adressage de la protéine vers le système de Golgi.(27)

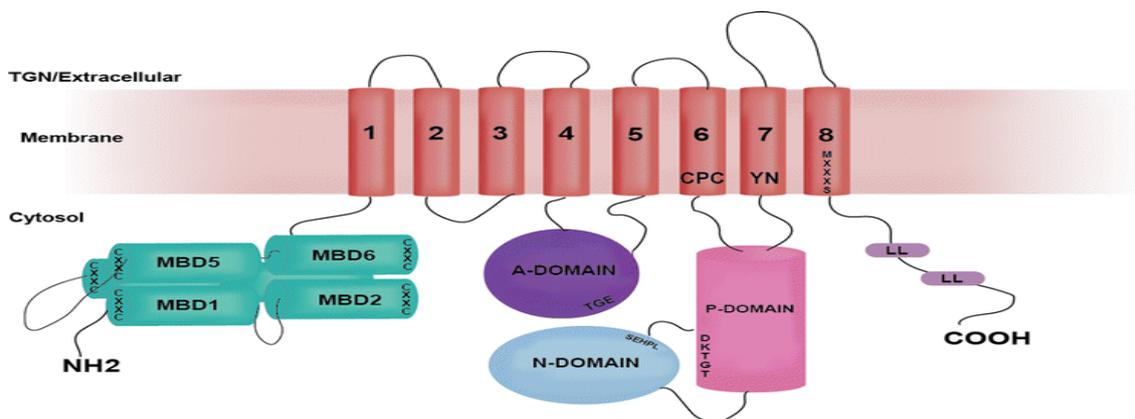


Figure 3: Structure protéique de l'ATP7B (7)

II.3.3.3 Les mutations

Actuellement, 1187 mutations ont été décrites. Elles sont réparties en :(40)

- Mutations ponctuelles ; avec
 - 724 mutations Faux-sens, non-sens
 - 113 mutations au niveau de site d'épissage
 - 18 mutations au niveau des séquences régulatrices
- 179 Petites délétions
- 96 petites insertions
- 17 petites insertion-délétions
- 36 grosses délétions
- 1 mutation complexe

Les sujets atteints de la maladie de Wilson peuvent avoir un statut génétique homozygote ou hétérozygote composite.(41)

Les hétérozygotes composites sont prédominants dans la maladie de Wilson, rendant les corrélations phénotype-génotype difficiles. De plus, dans certaines familles, la forme clinique de la maladie peut être très différente entre frères et sœurs. Ceci peut s'expliquer, en partie, par des facteurs environnementaux et en particulier nutritionnels (alimentation riche en cuivre). L'intervention de gènes modificateurs dans l'expression phénotypique de la pathologie, comme ceux de la famille COMMD, gènes responsables d'une toxicose cuprique, et ATOX1 est fortement suggérée. (42)

Les résultats des études tentant des corrélations génotype – phénotype n'ont pas été concluantes, en partie en raison de la mauvaise caractérisation phénotypique des patients atteints de la maladie de Wilson, diagnostic tardif et chevauchement des atteintes neurologiques, psychiatriques et manifestations hépatiques de diverses sévérités. Les facteurs génétiques et environnementaux interagissent probablement pour influencer le phénotype complexe de la maladie.(26)

II.3.3.3.1 Les conséquences des mutations

Le déficit fonctionnel en *ATP7B* entraîne une accumulation hépatique du cuivre sous forme liée à la métallothionéine (protéine de stockage), et sous forme libre. Il n'est plus incorporé dans l'apocéruloplasmine, ce qui entraîne une diminution de la concentration de l'holocéruloplasmine sérique, et une élimination urinaire plutôt que biliaire du cuivre, c'est la toxicose cuprique.

Le cuivre libre qui s'échappe du foie se dissémine alors dans l'organisme avec une prédilection pour le cerveau et la cornée. D'une maladie hépatique initiale, la maladie de Wilson devient alors multi-systémique.(43)

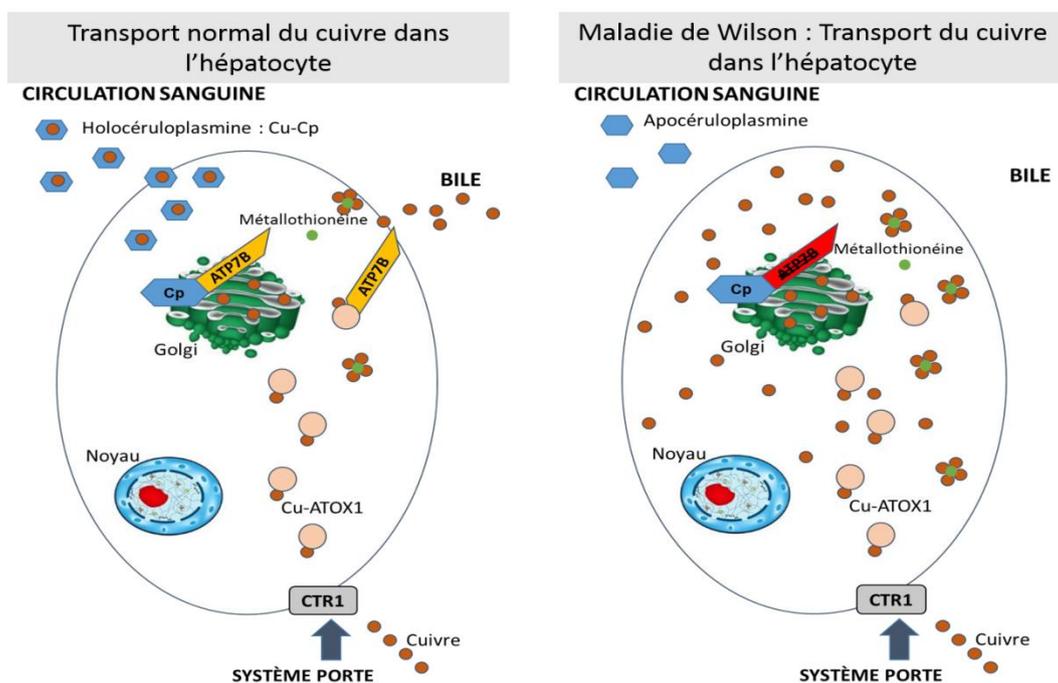


Figure 4: Conséquences des mutations sur le transport du cuivre (38)

II.3.4 Signes cliniques

Les caractéristiques cliniques associées à la maladie de Wilson sont hétérogènes, dans leur présentation, mais aussi par rapport à la date de survenue des premiers troubles.(44)

La maladie se révèle chez 45% des patients par une symptomatologie liée à l'atteinte hépatique, chez 35% des patients par des signes neurologiques et chez 10% des patients par des troubles psychiatriques.(30)

Les atteintes hépatiques prédominent chez l'enfant alors que les atteintes neurologiques sont plus fréquentes au-delà de 18 ans. L'apparition tardive et atypique de la maladie peut représenter un défi diagnostique important car les symptômes cliniques sont similaires à d'autres affections courantes liées à l'âge.

Environ 10% sont asymptomatiques lorsqu'ils sont diagnostiqués, ils sont généralement détectés lors de l'enquête familiale avec un frère étiqueté maladie de Wilson, ou lors des tests de laboratoire de routine lorsqu'une élévation inexplicée des enzymes hépatiques est retrouvée. (44)

II.3.4.1 Les atteintes hépatiques

Il existe un spectre de symptômes du dysfonctionnement hépatique dans la maladie de Wilson, allant d'une cytolysé asymptomatique avec élévation des transaminases à l'insuffisance hépatique fulminante (45). Il convient d'évoquer l'hypothèse d'une maladie de Wilson devant toute hépatopathie chronique non virale et non toxique. Quatre tableaux cliniques peuvent être révélateurs :

II.3.4.1.1 L'hépatite aiguë

Tableau superposable à une hépatite aiguë virale ou une hépatite auto-immune (45). C'est un mode fréquent de révélation de la maladie chez l'enfant. (46)

II.3.4.1.2 L'hépatite chronique

Le plus souvent asymptomatiques, les lésions hépatiques se constituent progressivement à bas bruit, on décrit une asthénie isolée, une anorexie, des douleurs abdominales intermittentes, des nausées ou plus rarement un ictère. Un examen clinique attentif, peut retrouver une hépatomégalie. On retrouve une élévation modérée mais persistante des transaminases parfois pendant des années. (46)

II.3.4.1.3 L'insuffisance hépatocellulaire

L'hépatite fulminante est rare avant 10 ans. Habituellement observée chez l'adolescent ou l'adulte jeune, l'insuffisance hépatique survient brutalement avec ictère, décompensation oedémato-ascitique, insuffisance rénale aigue, encéphalopathie et troubles de la coagulation avec syndrome hémorragique (TP effondré <50%).

Sur le plan biologique, on retrouve une augmentation des transaminases prédominant sur les ASAT (contrairement à ce qui est observé dans les autres formes d'hépatites), avec une insuffisance hépatocellulaire sévère.

Par ailleurs, il y a des signes d'hémolyse intravasculaire associés à une bilirubinémie plus marquée. En effet, une grande quantité de cuivre est relâchée brutalement par les hépatocytes, ce qui induit une anémie hémolytique aiguë à test de Coombs négatif. Ce tableau est mortel en l'absence de transplantation hépatique. (46)

II.3.4.1.4 La cirrhose

On note en premier lieu **une cirrhose compensée**, elle est généralement découverte de façon fortuite, qui progresse vers **une cirrhose décompensée** avec ascite, ictère, hémorragie digestive et encéphalopathie. L'évolution vers un carcinome hépatocellulaire est plus rare que dans les autres étiologies de cirrhose (46), (47).

En l'absence d'une corrélation génotype-phénotype établie, les symptômes et la gravité de la forme hépatique peuvent varier selon les patients et les familles. L'âge de survenue des manifestations, la durée de la surcharge en cuivre, et le sexe semblent avoir un effet modificateur.(26)

II.3.4.2 Les atteintes neurologiques

L'âge de début de la forme neurologique initiale est plus tardif et atypique que pour la forme hépatique.(43)

Les symptômes neurologiques de la maladie de Wilson sont variés, mais la plupart se réfèrent à un dysfonctionnement dans le système extrapyramidal. (45)

Trois présentations cliniques sont classiquement observées : (43)

- **La pseudo-sclérotique** : associant un tremblement (de repos ou d'attitude), une ataxie et une diminution des capacités fonctionnelles.
- **La parkinsonienne ou l'hypokinétique**: avec un syndrome parkinsonien akinéto-rigide associant une rigidité souvent à prédominance axiale et une akinésie observée dans les mouvements répétitifs.
- **L'hyperkinétique**: avec une dystonie focale, de fonction ou généralisée, quand elle touche le visage, elle réalise le « rire sardonique » caractéristique de la maladie. Les postures dystoniques des membres ou du tronc peuvent perturber les gestes de la vie quotidienne.

Ces trois tableaux neurologiques sont souvent associés chez un même patient rendant l'interprétation des signes cliniques difficile. (43)

Habituellement, l'installation des signes se fait sur quelques semaines à quelques mois et les plus fréquents sont : le tremblement et la dysarthrie (hypophonique, dystonique ou tremblante). (43)

II.3.4.2.1 Les mécanismes moléculaires au cours de l'atteinte neurologique

La quantité de cuivre dans le cerveau des patients atteints de la maladie de Wilson avec des symptômes neurologiques est augmentée de 10 à 15 fois par rapport à des sujets non malades.(48)

Les mécanismes moléculaires responsables de la neurotoxicité du cuivre dans la maladie de Wilson sont partiellement élucidés à ce jour et semblent être d'une grande complexité. A l'instar des mécanismes décrits pour le foie, le stress oxydant engendré par le cuivre libre au même titre que l'apparition de processus inflammatoires font partie des mécanismes de neurotoxicité connus.

Un mécanisme spécifique de l'atteinte neurologique par le cuivre concerne l'excitotoxicité, processus d'altération et de destruction neuronale lié à l'hyperactivation par l'acide glutamique et ses analogues (NMDA et acide kainique). Ces neurotransmetteurs vont activer en premier lieu des récepteurs NMDA qui vont, par la suite, impacter les récepteurs GABAergiques et AMPAergiques. Ce mécanisme pathologique est incriminé dans d'autres pathologies neurodégénératives.

Il a également été montré que le contenu cuprique cérébral dans la maladie de Wilson n'est pas toujours corrélé à la sévérité de l'atteinte neurologique. Cela soulève l'hypothèse qu'il doit exister d'autres facteurs ou mécanismes ignorés à ce jour en dehors de la toxicité cuprique contribuant au développement de l'atteinte neurologique. (48)

II.3.4.2.2 Les symptômes neurologiques de l'encéphalopathie hépatique

Des symptômes neurologiques supplémentaires dus à l'encéphalopathie hépatique peuvent se produire au cours des insuffisances hépatocellulaires. Cela comprend des symptômes neurologiques / psychiatriques allant du : dysfonctionnements cognitifs, troubles du cycle veille-sommeil ou altération de la conscience.

On peut observer des tremblements, une ataxie, une hypertonie, des signes pyramidaux avec déficits neurologiques focaux, des crises d'épilepsie et enfin un coma.

Les symptômes neurologiques de l'encéphalopathie hépatique sont probablement causés par l'accumulation de substances neurotoxiques (ammoniac et manganèse) normalement éliminées du sang par le foie. (49)

II.3.4.3 Les atteintes ophtalmologiques

II.3.4.3.1 L'anneau de Kayser-Fleischer

L'anneau de KF, de coloration grise ou dorée, est causée par le dépôt de cuivre dans la membrane cornéenne de Descemet, il ne modifie pas l'acuité visuelle et est objectivé par un examen spécifique totalement indolore à la lampe à fente. (50)

C'est un élément fondamental du diagnostic, il complète la triade classique de la maladie de Wilson (symptômes hépatiques, neurologiques et psychiatriques), il est très évocateur de la maladie même s'il n'est pas pathognomonique, pouvant être observé dans d'autres atteintes hépatiques généralement avec une composante cholestatique, comme la cirrhose biliaire primitive. (51)

Chez l'enfant dont l'atteinte du système nerveux est plus rare, l'anneau de KF est en général absent lorsque l'atteinte hépatique est modérée, en revanche dans les formes graves avec cirrhose du foie et/ou insuffisance hépatique, il est le plus souvent présent. (36)

II.3.4.3.2 La cataracte en « fleur de tournesol »

Une cataracte en tournesol due à la surcharge cuprique cristalline sans retentissement visuel est plus rare. Il s'agit d'un disque gris ou brun doré, siégeant à la partie centrale du cristallin et d'où partent des radiations en pétales de fleur.

En cas de traitement efficace par les chélateurs de cuivre, les symptômes oculaires cités précédemment disparaissent progressivement. (51)

II.3.4.4 Les atteintes psychiatriques

Les atteintes psychiatriques ont été décrites à toutes les étapes de la maladie de Wilson.(52) Isolées ou en association avec l'atteinte neurologique, elles se traduisent par des troubles thymiques (irritabilité, anxiété, dépression), psychotiques et cognitifs (difficultés de concentration, d'attention et de mémoire). (31)

On retrouve quatre types de signes psychiatriques, qui peuvent être présents ensembles : (52)

- Le changement de personnalité est commun, particulièrement avec l'apparition d'irritabilité et de comportements agressifs.
- Les troubles de l'humeur forment l'expression la plus commune sur le plan des pathologies psychiatriques, incluant à la fois des éléments dépressifs et maniaques.
- Bien que moins fréquente, la présentation sous forme schizophrénie-like, voire catatonique, est décrite et souvent sévère.
- L'existence d'hallucinations est fréquente.(36)

Il est important d'évoquer la maladie de Wilson chez un adolescent présentant des troubles du caractère ou des modifications de l'humeur (tendance anxio-dépressive ou hypomaniaque).

Sur le plan cognitif, les troubles sont essentiellement liés à l'atteinte des ganglions de la base et des boucles sous-corticales frontales. Ils sont marqués par une dysfonction exécutive pouvant aller du simple trouble attentionnel au syndrome frontal marqué. (43)

Le mécanisme exact de la façon dont le cuivre participe au cours de l'atteinte psychiatrique n'est pas connu. On décrit que l'excès de cuivre sérique peut affecter l'activité de la dopamine par plusieurs enzymes qui sont dépendantes du cuivre (Dopa-décarboxylase, Beta-hydroxylase, Monoamine oxydase).

Des anomalies de sérotonine ont été décrites dans la maladie de Wilson, en particulier des anomalies de la densité du SERT pré-synaptique. Une corrélation négative significative a été trouvée entre la gravité de la dépression dans la maladie de Wilson et la densité de SERT dans la région thalamus-hypothalamus. (52)

II.3.4.5 Les autres signes cliniques

La maladie de Wilson peut être une maladie multi-systémique, non limitée aux lésions hépatiques ou cérébrales.

Le cuivre s'accumule dans différents organes et altère leurs fonctions, on observe des atteintes hématologiques, rénales, dermatologiques, ostéo-articulaires, cardiaques et endocriniennes.(53)

II.3.4.5.1 Les atteintes hématologiques

Ils comprennent l'anémie hémolytique, la thrombopénie, la leucopénie ainsi que le dysfonctionnement des paramètres de coagulation. (54)

II.3.4.5.1.1 L'anémie hémolytique

La maladie de Wilson peut se révéler par une anémie hémolytique à test de Coombs négatif (36). En cas d'insuffisance hépatique grave, une hémolyse marquée d'installation brutale peut résulter d'une augmentation du cuivre non lié à la céruléoplasmine, libéré massivement par des hépatocytes altérés dans la circulation. L'inhibition des enzymes érythrocytaires et l'effet oxydatif puissant du cuivre circulant en sont responsables. (55)

II.3.4.5.1.2 La thrombopénie et la leucopénie

Une thrombopénie associée à une leucopénie est fréquente dans les cas de cirrhose, car cette dernière engendre un hypersplénisme qui séquestre tous les éléments figurés du sang dont les plaquettes. Il y a donc une accélération de la destruction plaquettaire. (36,46)

II.3.4.5.1.3 La diminution des facteurs de la coagulation

Elle est liée à l'insuffisance hépatocellulaire qui entraîne un déficit en facteur II, V, VII et X, antithrombine III, et fibrinogène. (46)

II.3.4.5.2 Les atteintes rénales

Dans la maladie de Wilson, l'excès de cuivre est éliminé par les reins, entraînant une augmentation de l'excrétion urinaire de cuivre. Ce dernier s'accumule dans les reins et peut altérer la fonction rénale (54).

- Un dysfonctionnement tubulaire (acidose tubulaire), calculs rénaux et une diminution de la filtration glomérulaire.
- Une insuffisance rénale
- Les atteintes les plus fréquentes au laboratoire comprennent la protéinurie, la glycosurie, la phosphaturie, l'uricosurie, et l'hématurie microscopique.(53)

II.3.4.5.3 Les atteintes dermatologiques

On décrit :

- Des changements cutanés consécutifs à la cirrhose et concernent principalement les araignées vasculaires et l'érythème palmaires. (54)
- Une hyperpigmentation cutanée partielle ou diffuse. (36)
- La coloration bleutée des lunules des ongles. (26)

II.3.4.5.4 Les atteintes ostéo-articulaires

Les atteintes ostéo-articulaires sont fréquentes, et comprennent l'ostéopénie, l'ostéoporose, les anomalies squelettiques et l'arthropathie (55). Les articulations les plus touchées sont les genoux et les poignets. Les causes probables de ces atteintes sont : (46)

- L'effet toxique direct des dépôts de cuivre sur les articulations
- L'acidose tubulaire rénale responsable d'une déminéralisation osseuse

II.3.4.5.5 Les atteintes cardiaques

Peuvent être observés, des troubles du rythme, une fibrillation auriculaire, et une insuffisance cardiaque.(55)

II.3.4.5.6 Les atteintes endocriniennes

Les troubles endocriniens ont rarement été rapportés comme présentation initiale de la maladie de Wilson. (53) Chez la femme, les dysménorrhées et aménorrhées sont fréquentes. La période menstruelle réapparaît après quelques mois de traitement (53). Les mécanismes pathologiques de cette aménorrhée sont la conséquence de troubles hypothalamiques, hypophysaires ou ovariens. (53) Un dysfonctionnement de l'aromatase folliculaire ovarienne a également été décrit ce qui conduit à des perturbations ovariennes.(55)

En cas de grossesse, les avortements répétés avant traitement de la maladie sont fréquents.

Des troubles de la croissance et de la puberté, hypothyroïdie, hypoparathyroïdie ont également été décrits. (55)

Le diabète vrai est exceptionnel.(36)

II.3.5 Diagnostic de la maladie de Wilson

Le diagnostic repose sur un faisceau d'arguments : cliniques, biologiques, radiologiques et génétiques. (32)

II.3.5.1 La clinique

Les différentes atteintes cliniques de la maladie de Wilson ont été précédemment détaillées, elle est le motif de consultation dans différents services hospitaliers (pédiatrie, médecine interne, hépato-gastro-entérologie, neurologie et psychiatrie).

Tableau 2: Quand évoquer la maladie de Wilson ?

| | |
|------------------------------|---|
| Découverte fortuite | Anomalies biologiques : cytolyse, thrombopénie, anémie hémolytique (Coombs négatif) Hépatomégalie isolée Splénomégalie isolée |
| Atteintes hépatiques | Hépatite aiguë de degré variable (voire fulminante) Hépatite chronique Cirrhose compensée ou décompensée |
| Atteintes neurologiques | Syndrome extrapyramidal |
| Atteintes ophtalmologiques | Anneaux de KF |
| Atteintes psychiatriques | Troubles thymiques Troubles psychotiques Troubles cognitifs |
| Atteintes rénales | Lithiases Aminoacidurie Insuffisance rénale |
| Atteintes dermatologiques | Araignées vasculaires Erythèmes palmaires |
| Atteintes ostéo-articulaires | Ostéoporose |
| Atteintes cardiaques | Troubles du rythme Cardiomyopathie |
| Atteintes endocriniennes | Aménorrhée Fausses couches à répétition Hypoparathyroïdie Trouble de la croissance |

II.3.5.2 La biologie

II.3.5.2.1 Hémogramme et bilan d'hémostase

L'hémogramme est réalisé pour rechercher une cytopénie.

Le bilan d'hémostase, par le dosage du facteur V et du taux de prothrombine permet d'estimer l'insuffisance hépatocellulaire

II.3.5.2.2 Bilan hépatique

L'exploration des anomalies du bilan hépatique comprend le dosage :

- Des transaminases (ASAT et ALAT), et de la ferritine pour mettre en évidence une cytolysse
- GGT, phosphatases alcalines, bilirubine totale et conjuguée pour évaluer la cholestase

Un bilan biologique hépatique normal n'élimine pas une atteinte hépatique (56).

II.3.5.2.3 Bilan cuprique

Le bilan cuprique regroupe le dosage de la céruléoplasmine, de la cuprémie et de la cuprurie des 24 heures (57).

II.3.5.2.3.1 La Céruléoplasmine

La céruléoplasmine plasmatique peut être déterminée par deux types de techniques (58) :

- Dosage de la protéine par méthode immuno-enzymatique, radio-immunologique, immunodiffusion, ou par néphélométrie (5).
- Détermination de l'activité oxydative cuivre dépendante de la céruléoplasmine par méthode colorimétrique à la para-phénylènediamine comme substrat. (59)

Les résultats sont généralement considérés comme équivalents (60), mais les méthodes immunologiques mesurent les deux formes de la céruléoplasmine, par conséquent, la concentration précise de l'holocéruléoplasmine a tendance à être surestimée. (44)

Le taux plasmatique de la céruléoplasmine est recommandé comme première étape du diagnostic biologique de la maladie de Wilson (44).

Au cours de la maladie de Wilson, le déficit fonctionnel de l'ATP7B ne permet plus au cuivre d'être incorporé dans l'apocéruléoplasmine, ce qui entraîne une diminution de la concentration de l'holocéruléoplasmine sérique et la libération de cuivre sous forme libre dans la circulation. (61)

Cependant, environ 10 % des patients atteints de la maladie de Wilson ont une concentration de céruléoplasmine normale (31). Ceci n'élimine donc pas le diagnostic, en particulier au cours des hépatopathies sévères où la céruléoplasminémie peut être normale presque une fois sur deux. (36)

D'autre part, le taux de céruloplasmine peut être diminué dans d'autres circonstances :

- Chez 20 % des sujets hétérozygotes.
- Au cours de la maladie de Menkès, de l'acéruloplasminémie, des carences en cuivre, du syndrome néphrotique ou lors des affections hépatiques très sévères non wilsoniennes. (45)
- Chez le nouveau-né et le jeune enfant sain de moins d'un an en raison de l'immaturation du métabolisme cuprique. (36)

À l'inverse, la concentration augmente dans les états inflammatoires (protéine active en phase aiguë), lors de la grossesse et des traitements oestrogéniques. (45)

Toutes ces variations rendent l'interprétation de la concentration de la céruléoplasmine difficile à établir et peu fiable en tant que biomarqueur isolé (61), et donc des tests de confirmation supplémentaires sont nécessaires. (44)

II.3.5.2.3.2 La Cuprémie

La cuprémie totale inclut la mesure du cuivre sérique non lié (libre) et du cuivre lié à des protéines (céruloplasmine et albumine). (45)

La maladie de Wilson est une maladie de surcharge. Le dosage sérique du cuivre total est diminué (en lien avec le taux de céruloplasmine qui est abaissé) (62), et non effondré du fait de l'augmentation de la fraction libre du cuivre plasmatique.(36)

La cuprémie totale peut être augmentée dans certaines formes de maladie de Wilson avec hépatite aiguë ou hémolyse, témoignant d'une libération importante de cuivre par le foie. (62)

La valeur du cuivre totale isolée n'est pas très utile dans le diagnostic de la maladie de Wilson. Cependant, une attention significative a été consacrée au cuivre plasmatique libre reflétant au mieux l'homéostasie du cuivre car seul ce dernier est biologiquement actif. (44)

Les différentes fractions du cuivre sont dosées par (32) :

- Spectrométrie d'absorption atomique (**SAA**), à l'aide d'une flamme air acétylène oxydante en utilisant une lampe à cathode creuse au cuivre, à la longueur d'onde de 324,7 nm.(63)
- Spectrométrie de masse couplée à une torche à plasma (**ICP-MS**) : au contact de l'argon, l'échantillon est nébulisé puis transporté jusqu'au centre du plasma où la température est proche de 8000 °K. Il est alors atomisé puis ionisé dans sa totalité sous forme de cations monovalents.

Dans ces conditions, le cuivre est ionisé à plus de 90 %. L'interface entre la torche à plasma et le quadripôle est composée de deux cônes de nickel et d'une série de lentilles permettant de stopper les photons et de focaliser les ions pour les amener au quadripôle, où ils sont séparés en fonction du rapport de leur masse atomique sur leur charge.

Spectrophotométrie à la bathocuproïne : Elle est basée sur les propriétés d'absorption du cuivre à une longueur d'onde du spectre UV-visible. Le dosage suit la loi de Beer-Lambert, où la concentration de l'analyte à analyser est directement proportionnelle à l'intensité de la coloration.

Le dosage du cuivre par cette méthode repose sur les propriétés Red /Ox du couple (Cu²⁺/Cu⁺). Les ions Cu²⁺ une fois réduits en Cu⁺ réagissent avec la bathocuproïne pour former un complexe jaune orangé, qui absorbe à 480 nm.

II.3.5.2.3.3 Cuivre libre

La concentration du cuivre libre est calculée par la formule (61) :

$$\text{Cuivre libre (umol/L)} = \text{Cuivre sérique total (umol/L)} - 0,049 \times \text{Céruleoplasmine (mg/L)}$$

Le facteur multiplicatif dérive du poids moléculaire de la céruléoplasmine et du nombre d'atomes de cuivre liés à cette dernière. (64)

Le calcul du cuivre libre, potentiellement toxique, a longtemps été proposé comme test de diagnostic, mais s'est avéré peu fiable du fait du manque de précision à faible concentration des méthodes de dosage de la céruléoplasmine (45). Il est donc plus utile dans le suivi pharmaco-thérapeutique des patients. (31)

II.3.5.2.3.4 Cuivre échangeable

Il représente une fraction de cuivre labile, faiblement complexé à l'albumine dans la circulation. Son dosage consiste à incuber du sérum avec un chélateur (1h avec EDTA), réaliser une ultrafiltration sur une membrane afin d'éliminer les principales protéines vectrices du cuivre, puis centrifuger et libérer libérer le cuivre lié à l'albumine (61).

Le ratio (cuivre échangeable/cuivre total sérique) appelé REC est un excellent biomarqueur de diagnostic. Il a une sensibilité et une spécificité proche de 100 %, lorsque sa valeur est > 18,5 %. Il permet de différencier les hépatopathies wilsoniennes des hépatopathies d'autre origine. De plus, le REC permettrait de différencier les porteurs hétérozygotes ou les sujets sains des sujets malades. (65)

Le cuivre échangeable est un marqueur de l'atteinte extra-hépatique et signe sa sévérité. Une valeur > 2,08 mmol/L oriente vers une atteinte de la cornée et du cerveau. (43)

II.3.5.2.3.5 La Cuprurie

La quantité de cuivre excrétée dans l'urine, sur une période de 24 heures, peut être utile pour le diagnostic de la maladie Wilson et pour le suivi du traitement. (62)

L'interprétation de la cuprurie peut être difficile, en effet, l'excrétion urinaire du cuivre peut être augmentée dans certaines hépatopathies (hépatite auto-immune, cholestase et insuffisance hépatique aiguë ou chronique). (62)

Le test de provocation à la D-Pénicillamine peut être un test de diagnostic complémentaire utile (36) chez les enfants symptomatiques si l'excrétion urinaire basale de cuivre est < 100µg/24heures (1.6 µmol/24heures). (62)

Pendant le test, 500 mg de DPA est administré. Cela peut augmenter la quantité de cuivre excrété chez les enfants et peut distinguer la maladie de Wilson des autres maladies chroniques du foie. Néanmoins, la sensibilité n'est que de 12,5%. (61)

Les valeurs de référence pour les enfants atteints de la maladie Wilson sont supérieures à 25µmol/24heures (1600 µg/24heures) (61). La valeur prédictive de ce test chez l'adulte est inconnue. (62)

L'excrétion urinaire de cuivre chez les patients traités dépend également des agents chélateurs. Par conséquent, son rôle dans la surveillance du traitement est limité. (61)

Le cuivre urinaire peut être dosé par SAA, ICP-MS, ou par la méthode spectrophotométrique à la bathocuproïne. (32)

II.3.5.2.3.6 Le cuivre hépatique

Il s'agit d'un dosage quantitatif du cuivre réalisé sur un foie sec à partir d'une biopsie hépatique.

Le dosage du cuivre intra-hépatique permet d'augmenter le rendement du diagnostic (61), et peut être nécessaire chez les patients dont la présentation hépatique est prédominante.(44)

Un taux élevé de cuivre hépatique ne permet pas à lui seul d'affirmer le diagnostic, puisque observé chez les hétérozygotes et dans des affections hépatiques, comme la cholestase chronique, qui modifie l'excrétion biliaire du cuivre.(44)

Aussi, le résultat du dosage de cuivre intra-hépatique doit être interprété en fonction du contexte et des données de l'histologie hépatique. Du fait de l'hétérogénéité de la distribution du cuivre dans le foie, un taux normal n'exclut pas le diagnostic. (64)

Outre la mesure du cuivre hépatique, la biopsie permet une étude histologique du tissu hépatique donnant une appréciation des lésions (stéatose, fibrose portale et péri-portale et à un stade plus avancé une cirrhose micronodulaire).(41)

Tableau 3: Les valeurs usuelles du bilan cuprique

| | Sujet sain | Sujet « Wilson » |
|---|-------------|--|
| Céruleplasminémie (µmol/L) Référence établie au laboratoire de biochimie CHU Mustapha | 1.65 - 2.32 | < 1 Normale chez 10 % des patients « wilsoniens » |
| Cuprémie (µmol/L) (66) | 10 - 26 | < 10 Normale voire élevée en cas d'hépatite aigue et d'hémolyse |
| Cuprurie (µmol/24heures) Référence établie au laboratoire de biochimie CHU Mustapha | 0 - 30 | > 30 Normal dans certaines formes hépatiques. |
| Cuivre hépatique (µg/g de poids humide) (66) | 3 - 6 | >50 Un taux normal n'exclut pas le diagnostic |
| REC (36) | < 18.5% | > 18.5% |

II.3.5.3 L'imagerie

L'atteinte hépatique inhérente à la maladie de Wilson nécessite la réalisation systématique au diagnostic d'une échographie hépatique (détection de cirrhose), d'un Fibroscan® ou élastométrie impulsionnelle (évaluation de la fibrose hépatique et l'hypertension portale) et d'une fibroscopie gastrique (recherche de varices œsophagiennes). (43)

Dans les formes neurologiques, l'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) présente des anomalies non spécifiques (44), liées à l'effet direct des dépôts de cuivre intracérébraux, mais aussi parfois à l'effet indirect d'une encéphalopathie hépatique par shunt porto-systémique. L'IRM cérébrale est indispensable au diagnostic ainsi qu'au suivi, dans les formes neurologiques puisqu'elle permet la distinction entre une maladie de Wilson et une maladie de Parkinson. (31)

L'IRM peut également aider au diagnostic des formes hépatiques ayant un bilan cuprique peu perturbé ; une diminution du coefficient de diffusion pouvant être détectée dans le putamen avant la survenue des symptômes neurologiques. (67)

II.3.5.4 La biologie moléculaire

Le diagnostic génétique a été performé ces dernières années, il permet de palier aux limites du bilan cuprique, observés dans certaines situations. Il met en évidence les mutations du gène ATP7B. (65)

Il repose sur la recherche de mutations du gène ATP7B, qui comprend 21 exons. Plus de 600 mutations ont été décrites à ce jour, il s'agit pour la plupart de mutations hétérozygotes composites que de mutations homozygotes. De nombreux polymorphismes ont été identifiés.

II.3.5.4.1 Les techniques de biologie moléculaire

II.3.5.4.1.1 La méthode de SANGER

La recherche de la mutation familiale par séquençage selon le principe de SANGER est une méthode qualitative, elle permet la reconstitution linéaire des bases nucléotidiques A, C, G et T prenant part à la structure de l'ADN. Elle détecte la présence d'une variation qualitative de séquence (polymorphisme/et ou mutation), grâce à la comparaison à une séquence de référence. (68)

Son principe repose sur l'amplification à partir du produit PCR cible simple brin et d'amorce sens/ou anti-sens. La synthèse s'effectue par une polymérase qui incorpore les dNTP complémentaires, et aléatoirement les ddNTP marqués par un fluorophore dans le sens 5'-3'. Lors de l'intégration des ddNTP, on assiste à un arrêt de l'élongation, les fragments amplifiés présentent des tailles différentes qui seront séparés par électrophorèse capillaire.

Cette technique permet l'analyse de séquences de longueur comprises entre 400 à 900 Pb.

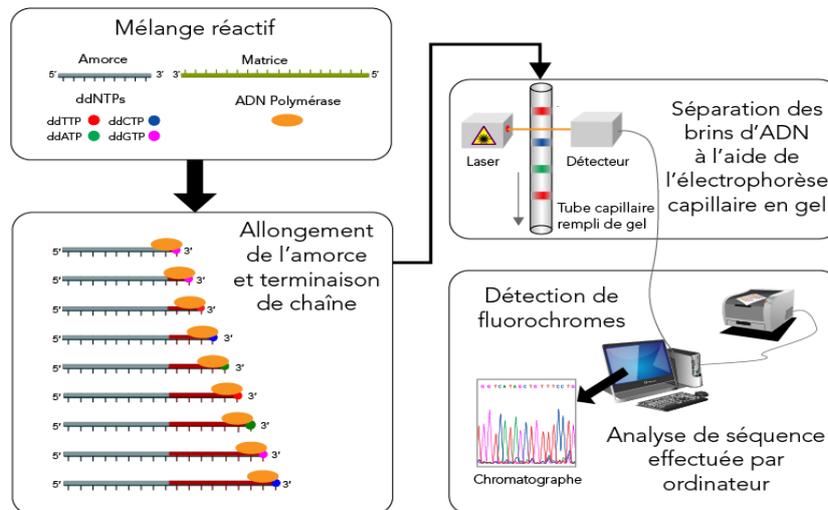


Figure 5: Séquençage capillaire selon la méthode de Sanger (69)

Le séquençage de Sanger est relativement coûteux, long, et d'interprétation difficile par le nombre de mutations et leur diversité. Celles-ci ne sont pas toujours identifiées, et de ce fait l'analyse génétique ne permet pas toujours de confirmer le diagnostic. (67)

II.3.5.4.1.2 La technique MLPA

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification est une méthode moléculaire semi-quantitative basée sur une PCR multiplexe qui sert à identifier des délétions et des duplications d'un ou plusieurs exons.(70) Associée au séquençage Sanger, elle améliore considérablement l'informativité du test génétique. (71)

La technique utilise des sondes fluorescentes spécifiques pour la séquence d'ADN cible. L'ADN du patient est ensuite comparé à une séquence de référence ; la présence de sondes supplémentaires indique une duplication alors que l'absence de détection de la sonde indique une délétion.

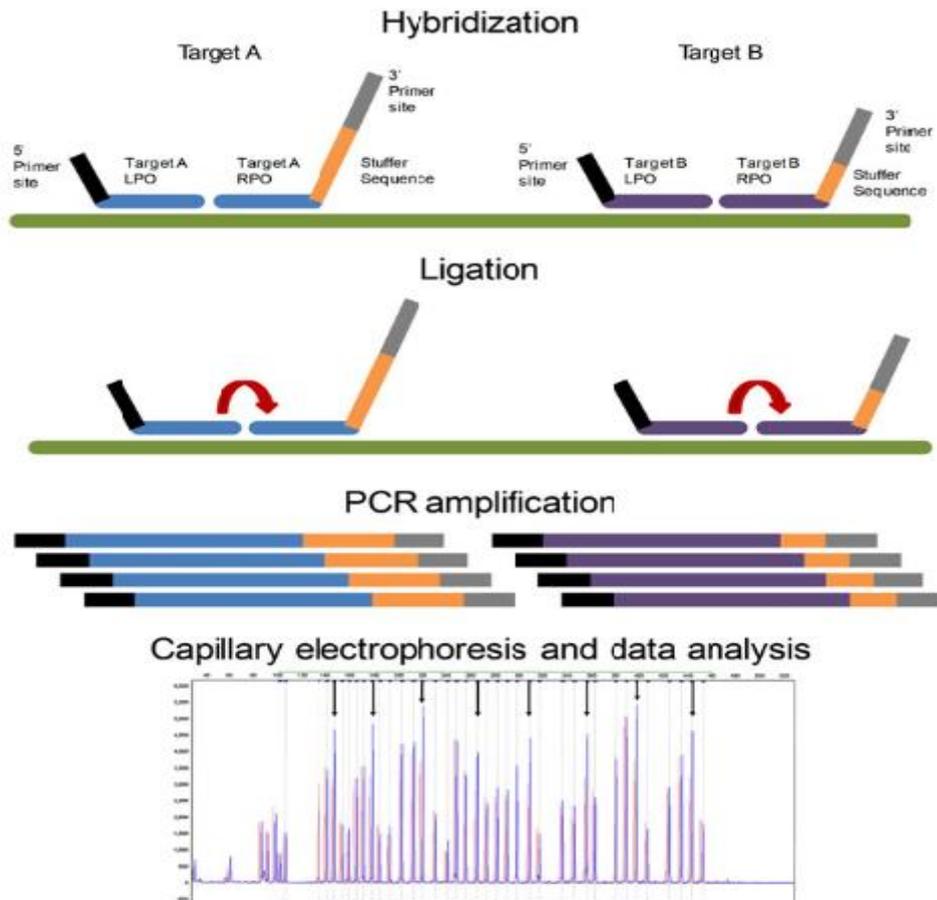


Figure 6: Principe de la technique MLPA (72)

II.3.5.4.1.3 La méthode NGS (Next Generation Sequencing)

L'émergence de ces techniques de séquençage à haut débit offre une analyse rapide et complète de la séquence de codage ATP7B par rapport au séquençage traditionnel de Sanger. Elle permet le séquençage rapide de millier à des millions de molécules d'ADN, en déterminant l'ordre unique et spécifique des bases des acides nucléiques.

La technologie NGS repose sur la génération massive de données de séquences obtenues par des cycles successifs d'incorporation de nucléotides, et ainsi l'émission de signaux qui sont ensuite convertis en information de séquences. Il permet une augmentation toujours croissante des capacités de séquençage associée à une diminution progressive des coûts.(26)

Le NGS a développé 3 stratégies d'analyse de mutation :

- a- Panel de gènes :** Il permet l'analyse simultanée de la séquence d'un certain nombre de gènes d'intérêt, l'analyse est centrée sur les régions codantes des gènes et les bornes introniques flanquantes, où sont localisée la majorité des mutations délétères. Cette approche est actuellement la plus utilisée en diagnostic génétique, notamment pour analyser des listes de gènes connus.

- b- Analyse d'exome (Whole Exome Analysis/WES) :** Elle consiste en l'analyse simultanée de la totalité des séquences codantes (et des jonctions exons-introns) de tous les gènes du génome (environ 20 000), correspondant à environ 1 % du génome, soit environ 180 000 exons et 30 millions de paires de bases.
- c- Analyse du génome (Whole Genome Analysis/WGS),** dans son intégralité soit 3 milliards de bases, comprenant les séquences codantes et non codantes. Cette technique permet le diagnostic de la maladie de Wilson dans 98% des cas. (65)

II.3.5.4.2 Indications

La recherche des mutations ATP7B fait désormais partie de l'approche diagnostique de routine. Les tests génétiques sont utilisés pour confirmer le diagnostic ou réaliser un dépistage familial.

Cependant, la disponibilité de nouvelles technologies ne signifie pas nécessairement que les variants délétères peuvent être identifiés chez tous les patients. (42)

II.3.6 Enquête familiale

Consécutivement au diagnostic de la maladie de Wilson au sein d'une famille, elle permet d'identifier le statut génétique des apparentés, et de ce fait diagnostiquer et traiter les formes pré-symptomatiques. (56)

L'outil génétique est le seul moyen de dépistage qui permet de déterminer le statut des patients. La probabilité qu'un frère ou une sœur soit homozygote est de 25 %. Chez les descendants de familles non consanguines, le risque estimé est d'environ 0,5 %. (62)

II.3.7 Le score de Leipzig

Compte tenu des difficultés de diagnostic de la maladie de Wilson, le score de Leipzig a été conçu par un groupe d'experts pour faciliter le diagnostic. (73)

Il inclut des critères cliniques (anneaux de KF, atteinte neurologique), biologiques (céruloplasmine, test de Coombs, biopsie hépatique, dosage du cuivre urinaire) et génétiques (Tableau 4).

Tableau 4: Score de Leipzig (57)

| Critères cliniques-biologiques | | Points |
|--------------------------------|--|--------|
| Anneaux de KF | Présent | 2 |
| | Absent | 0 |
| Symptômes neurologiques | Sévère | 2 |
| | Modéré | 1 |
| | Absent | 0 |
| Céruplasminémie <0.1g/L | Normale 0.2g/L | 0 |
| | 0.1-0.2g/L | 1 |
| | | 2 |
| Cuprurie de 24h | Normale | 0 |
| | 1-2×LNS | 1 |
| | >2×LNS | 2 |
| | Normale mais >5×LNS après DPA | 2 |
| Anémie hémolytique Coombs (-) | Présent | 1 |
| | Absent | 0 |
| Cuivre hépatique (umol/g) | >5×LNS | 2 |
| | Elevé | 1 |
| | Normal | -1 |
| | Granules rhodamine-positive | 1 |
| Mutations | Présente sur 2 chromosomes | 4 |
| | Présente sur 1 chromosome | 1 |
| | Absente | 0 |
| Score total | Diagnostic établi | ≥ 4 |
| | Diagnostic possible, tests complémentaire nécessaire | 3 |
| | Diagnostic peu probable | ≤ 2 |

II.3.8 Traitement

II.3.8.1 Le traitement pharmacologique

Il repose sur la prise à vie de chélateurs du cuivre : la **D Penicillamine DPA (Trolovol®)**, et la **Triéthylènetétramine (Trientine®)** qui induisent une élimination urinaire du cuivre, ou de **sels de zinc** qui inhibent l'absorption intestinale du cuivre (74). Les médicaments varient en termes de mécanisme, d'effets secondaires et d'efficacité (tableau 5). (45)

Tableau 5: Traitement de la maladie de Wilson (45)

| Médicaments | Mécanisme d'action | Posologie | Effets secondaires | Efficacité |
|---------------------|--|--|--|---|
| DPA | Chélateur de cuivre Favorise son excrétion urinaire | 1g/jour en 2-4 prises (30 minutes avant ou 2heures après les repas) | Fièvre Rash Adénopathie Anémie Toxicité de la Moelle osseuse Syndrome Lupus-Like Aggravation neurologique | Très efficace pour atteindre une balance cuprique négative |
| Trientine | | 1g/jour en 2-4 prises (30minute avant ou 2heures après les repas) | Protéinurie, Toxicité de la Moelle osseuse, Réaction auto-immune Anémie sidérolastique, Aggravation neurologique | Moins efficace pour atteindre une balance cuprique négative |
| Sels de zinc | Induction d'une métallothionéine intestinal Inhibe l'absorption du cuivre | 50 mg 3×/jour (1 heure avant ou après les repas) | Irritation gastrique Pancréatite | Faible |

Aucun des médicaments disponibles pour la maladie de Wilson ne rétablit l'homéostasie du cuivre. (44)

L'association à un régime pauvre en cuivre est recommandée au moins durant la première année de traitement (43).

Le traitement comporte deux phases : (43)

- **La phase initiale de chélation active** : Dont le choix du chélateur est souvent orienté par le profil de tolérance du traitement.
- **La phase d'entretien** : Où la chélation doit être plus modérée pour éviter la carence en cuivre. Au cours de cette phase, il existe deux possibilités :
 - Le maintien d'un chélateur du cuivre si possible la Trientine, qui n'a pas d'effets secondaires notoires au long cours contrairement à la DPA.
 - La monothérapie aux sels de zinc.

Le traitement par chélateur instauré précocement, induit une amélioration de la fonction hépatique et des atteintes neurologiques à partir du troisième au sixième mois de traitement. L'anneau de KF disparaît progressivement. (75)

Il existe parfois un risque d'aggravation de la maladie hépatique et/ou neurologique en particulier, celle-ci s'observe avec la DPA. Une instauration progressive du traitement permettrait de prévenir ce risque d'aggravation.

Dans de rares cas, cette aggravation est irréversible, la maladie continuant à évoluer sous traitement. (44)

Les sels de zinc sont utilisés : (75)

- Dans les formes asymptomatiques
- Dans les formes sévères (associée à un autre chélateur)

Durant la grossesse, le traitement par chélateur ou sels de zinc ne doit pas être interrompu, la posologie du traitement est le plus souvent réduite et adaptée au bilan cuprique. (43)

II.3.8.2 La transplantation hépatique

La transplantation hépatique est le traitement de référence des formes hépatiques fulminantes ou des cirrhoses décompensées (76). Elle permet de normaliser définitivement le métabolisme du cuivre en remplaçant un foie malade et porteur de l'anomalie génétique par un organe au fonctionnement normal et génétiquement sain. (45)

Dans les formes neurologiques ne répondant pas au traitement médical bien conduit, la transplantation hépatique est également discutée au cas par cas. (43)

Les manifestations psychiatriques constituent une contre-indication à la transplantation hépatique en raison du manque de compliance au traitement immunosuppresseur consécutif. (77)

On constate une normalisation des paramètres du métabolisme du cuivre sur une période moyenne de 6 mois. (76)

II.3.8.3 Les perspectives thérapeutiques

II.3.8.3.1 Le Tétrathiomolybdate d'ammonium (TTM)

C'est un chélateur spécifique qui agit à travers deux mécanismes différents : (78)

- Au cours des repas, il forme dans l'intestin un complexe tripartite avec le cuivre et les protéines alimentaires, réduisant l'absorption du cuivre.
- En dehors des repas, il est absorbé et passe au niveau sanguin où il forme un complexe tripartite avec le cuivre et l'albumine. Le cuivre libre perd ainsi sa toxicité.

Les premières études ont révélé que le TTM agissait rapidement en quelques semaines en neutralisant le cuivre libre et qu'il n'induisait que de très rares cas d'aggravation neurologique initiale à l'instauration du traitement, à la différence des autres chélateurs classiques. Il a par ailleurs des propriétés anti-inflammatoires en inhibant des cytokines cupro-dépendantes et a un profil de sécurité et de tolérance satisfaisant. (43)

Ce composé offre plusieurs avantages potentiels et est l'un des nouveaux agents les plus prometteurs, en particulier pour les patients présentant une atteinte neurologique. (44)

II.3.8.3.2 Les systèmes de supports colloïdaux

Tous les chélateurs disponibles ne traversent pas la barrière hémato-encéphalique. Une stratégie pour surmonter cet obstacle est le transfert de médicaments à travers la barrière hémato-encéphalique avec des systèmes de supports colloïdaux comme les liposomes. Un exemple de ce concept est la Trientine vectorisée par les liposomes.

Cependant, plusieurs questions restent non résolues, y compris le sort des vecteurs. (44)

II.3.8.3.3 La thérapie génique – La transplantation cellulaire

La thérapie génique « in vitro » consiste à transférer un gène d'un donneur dans le corps d'un receveur (79), ayant pour objectif la restauration de métabolisme hépatique du cuivre précocement, avant l'apparition des signes hépatiques ou neurologiques. (43)

La transplantation de cellules comprend principalement la transplantation d'hépatocytes et de cellules souches. Ces dernières présentent l'avantage d'une plus grande capacité de prolifération « in vitro » que les hépatocytes. (79)

II.3.9 La surveillance des malades Wilsoniens

La surveillance clinique, biologique et radiologique régulière est fondamentale afin de vérifier l'efficacité et la tolérance du traitement ainsi que sa bonne observance. Le suivi est adapté à la phase du traitement ;

- Lors de la phase initiale de chélation active, il permet de surveiller l'efficacité du traitement, de diagnostiquer les éventuelles aggravations neurologiques initiales paradoxales et les effets secondaires précoces.
- Lors de la phase d'entretien, le suivi se focalisera sur l'observance, le dépistage d'éventuels carcinomes hépatocellulaires compliquant les cirrhoses ou de carence en cuivre induite par une chélation trop importante et l'apparition d'effets secondaires chroniques. (43)

II.4 La maladie de Gaucher

La maladie de Gaucher (OMIM 230800, 230900, 231000) est une erreur innée du métabolisme des sphingolipides, de transmission autosomique récessive, secondaire à des mutations du gène GBA, codant pour une enzyme lysosomale la β -glucocérébrosidase (ou β -glucosidase acide), localisée sur le chromosome 1q21.(80)

Ce déficit entraîne une accumulation pathologique du substrat glycosylcéramide dans le système réticulo-endothélial. Le foie, la rate, et la moelle osseuse sont affectés par la surcharge.(81)

Elle présente une très grande hétérogénéité phénotypique. Trois types sont décrits selon l'absence (type 1), ou la présence (type 2 et 3) de manifestations neurologiques.

Elle est une maladie génétique accessible à un traitement spécifique, par thérapie enzymatique substitutive, ou inhibiteur de substrat.(82)

II.4.1 Epidémiologie

Il s'agit de la maladie de surcharge lysosomale la plus fréquente (15%) avec une prévalence estimée à 1/100 000 dans la population générale (83).

Les données épidémiologiques fondées sur les fréquences géniques, rapportent un cas pour 850 naissances, chez la population Juive ashkénaze (84).

II.4.2 Aspects métaboliques

II.4.2.1 Métabolisme des sphingolipides

Les sphingolipides sont de molécules lipidiques complexes, constituant des membranes plasmiques des leucocytes et érythrocytes.

La structure de base associe un céramide, qui est constitué d'un alcool appelé sphingosine lié à un acide gras (AG) à longue chaîne (palmitate C 18 : 0, ou stéarate C 16 : 0, ou encore plus rarement nevrionate C 24 :1 ou behenoate C 22 : 0).(85)

Selon la fraction surajoutée à ce céramide, on identifie :

- Les cérébrosides : Céramide + sucre simple (glucose ou galactose)
- Les gangliosides : Céramide + Polysaccharide ou dérivés de sucre (Acide sialique)
- La sphingomyéline : Céramide + Phosphorylcholine (**Figure 7**)(85)

Le métabolisme des sphingolipides est représenté par la **figure 8**. On y retrouve les déficits enzymatiques spécifiques à chacune des étapes et générant les diverses sphingolipidoses dont la maladie de Gaucher.

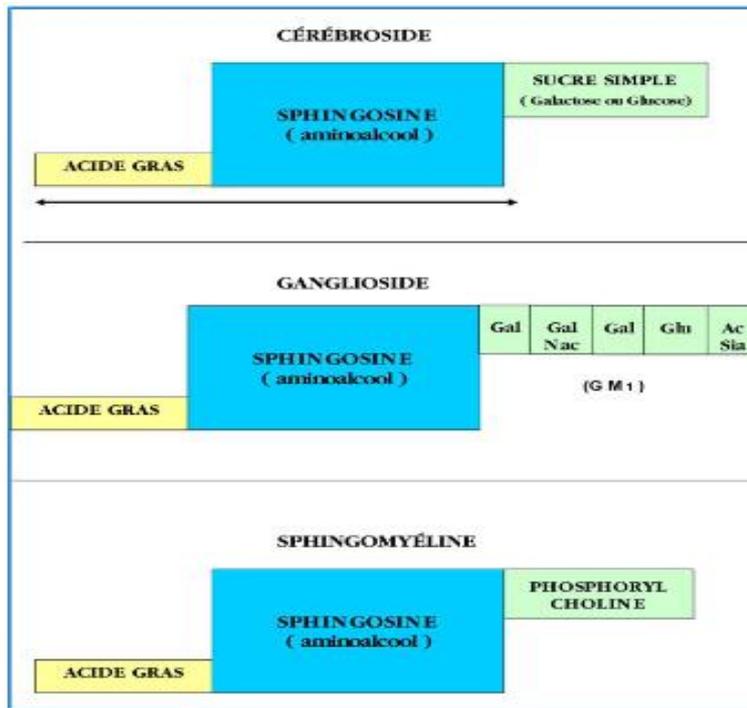


Figure 7: Structure des sphingolipides (85)

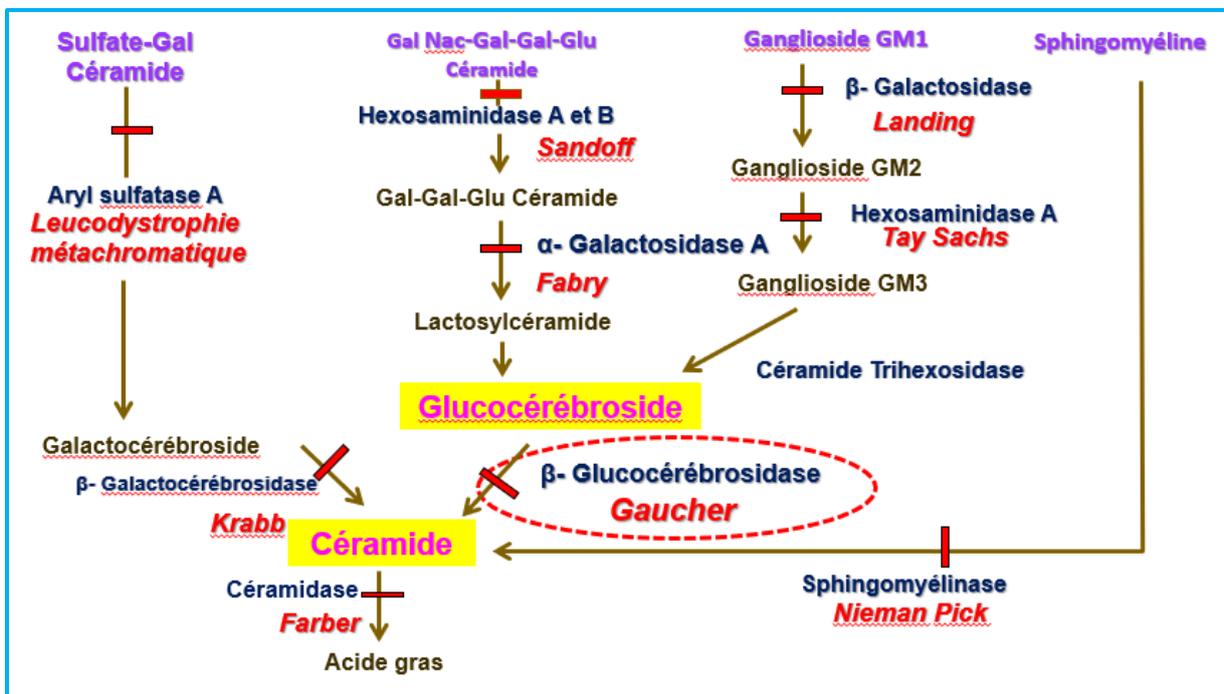


Figure 8: Métabolisme des sphingolipides

II.4.2.2 Le déficit enzymatique

II.4.2.2.1 Voie principale

La maladie de Gaucher concerne l'accumulation de substrat glucocérebroside encore appelé D-glucosylcéramide (Gcer), due à des mutations du gène GBA. Il s'agit d'un céramide, lié en β avec le glucose provenant de la dégradation d'un ganglioside, molécule plus complexe.

Le déficit enzymatique en cause touche la β -glucocérebrosidase (β -glucosidase acide, ou Glucosylcéramide hydrolase) (Enzyme Commission [EC] 3.2.1.45), enzyme qui hydrolyse la liaison entre le céramide et le D-glucose (Figures 8 et 9).

L'accumulation du Gcer au sein du lysosome de certaines cellules, notamment les macrophages de type M2, jouant un rôle important dans la dégradation de la membrane des hématies et des leucocytes, particulièrement riches en glucosphingolipides. Le Gcer accumulé au sein de ces macrophages prend l'aspect d'agrégats fibrillaires torsadés et leur donne l'image caractéristique de cytoplasme dit en « papier froissé ». Ils sont alors appelés cellules de Gaucher (86) (Figure 10).

Les cellules de Gaucher infiltrent tout l'organisme. Elles sont particulièrement présentes au niveau de la rate, du foie et de l'os. Elles sont responsables au niveau :

- Du foie et de la rate : d'hépatomégalie et de splénomégalie. Cette dernière entraîne la séquestration de cellules sanguines, avec pour conséquence des thrombopénies, voire des pancytopénies.
- Des macrophages de la moelle osseuse : d'occlusions vasculaires et compressions à l'origine des complications nécrotiques.

Le turnover du Gcer dans les neurones est très faible et son accumulation n'est significative que lorsque l'activité résiduelle de l'enzyme est très basse, c'est-à-dire uniquement pour certains types de mutation du gène GBA1.

Il est à signaler que dans la MG, il existe une augmentation de la ferritine dans les cellules de Gaucher et une augmentation de synthèse de l'hepcidine, qui inhibe l'absorption intestinale de fer. La transcription du gène de l'hepcidine est augmentée dans la cellule de Gaucher par certaines cytokines (IL-6, et IL-1-bêta notamment). Les macrophages ainsi activés peuvent également induire une rétention de fer par un mécanisme autocrine, ainsi qu'une diminution des capacités de glycosylation, engendrant une baisse de la ferritine glycosylée.(87)

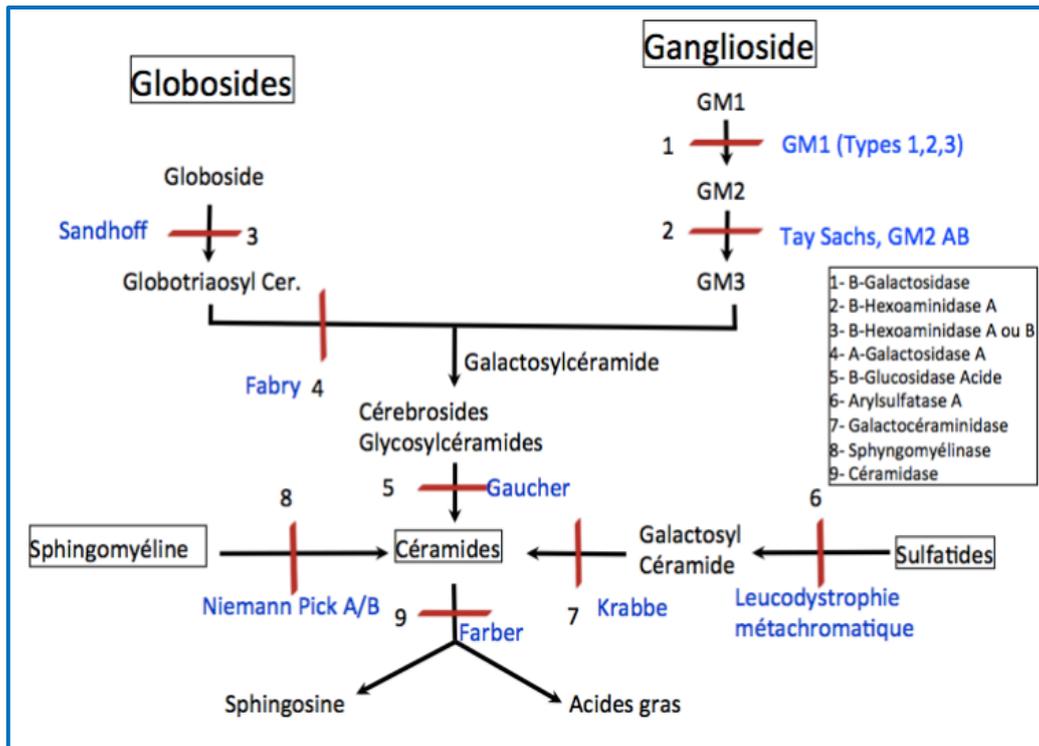


Figure 9: Catabolisme des glycosphingolipides (87)

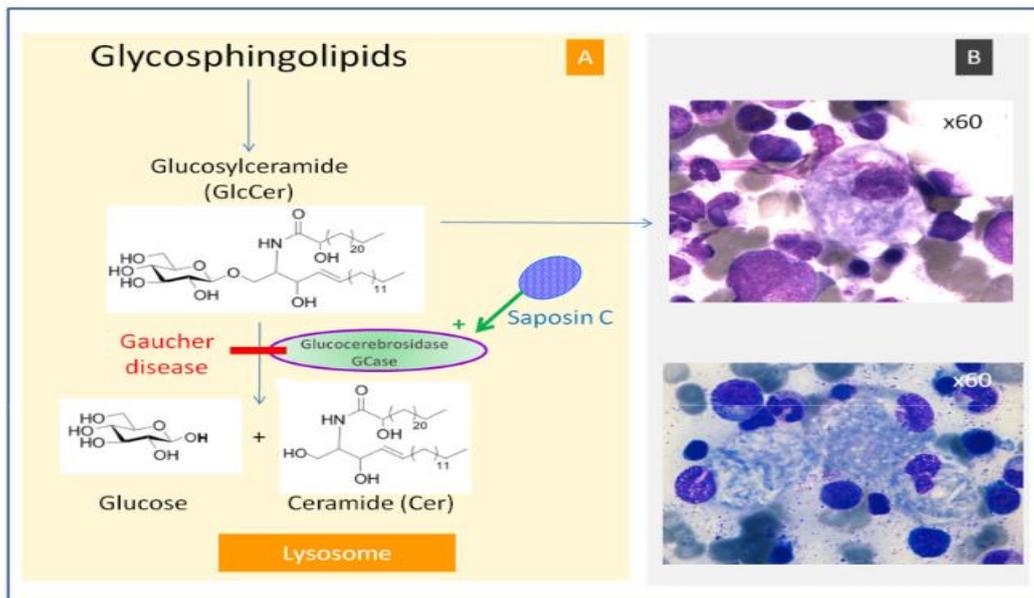


Figure 10: a- Hydrolyse du Glucosylcéramide (GlcCer) par la β -glucosylcérébroside dans le Lysosome
b- Cellules de Gaucher infiltrant les divers organes (Foie, rate, moelle épinière) (86)

II.4.2.2.2 Voie métabolique alternative

Des données nouvelles indiquent que les mécanismes pathogéniques de la maladie de Gaucher sont multiples et loin d'être tous élucidés. Cette voie métabolique alternative pour le Gcer est favorisée lorsque la voie classique de la Gcase est déficiente.

Dans cette voie, le Gcer est transformé en glucosphingosine par une céramidase. Au sein du cytoplasme, la glucosphingosine est à son tour métabolisée par une autre Gcase, active à pH neutre (gène GBA2), en sphingosine et sphingosine-1-phosphate (S1P).

La sphingosine serait particulièrement toxique pour l'os et les neurones. C'est d'ailleurs la principale hypothèse expliquant l'atteinte neurologique dans la maladie puisque les cellules de Gaucher ne pénètrent pas dans le cerveau. En effet, les études *in vitro* ont démontré que la sphingosine augmentait la libération de Ca^{2+} intracellulaire induisant une apoptose des neurones. (88)

Le rôle de la S1P est l'induction de la différenciation et la migration de plusieurs cellules comme les lymphocytes et les macrophages, contribuant à l'état d'inflammation observé.

Le déséquilibre du ratio sphingosine/Gcer est à l'origine d'une perturbation de la formation de la barrière épidermique, responsable de l'ichtyose congénitale observée dans certains phénotypes. (83)

II.4.2.2.3 Défaut d'adressage ou de repliement de l'enzyme au niveau du lysosome

L'adressage de la GCase n'est pas dépendant du système du récepteur mannose-6-phosphate cation, mais fait intervenir d'autres molécules telles que la lysosomal integral membran protein 2 (LIMP-2) ; la GCase devient active après dissociation de sa liaison avec la LIMP-2 dans le lysosome, à pH acide. Des mutations de LIMP-2 ont été décrites, associées à des troubles neurologiques, entraînant la dégradation de l'enzyme par le protéasome. (**Figure 11**)

II.4.2.2.4 Déficit en Saposine C

La maladie peut être due, dans des cas exceptionnels, à une mutation du gène PSAP conduisant à un déficit en Saposine C sans déficit en GCase. Elle se manifeste habituellement avec une atteinte neurologique analogue à celle du type 3.(87)

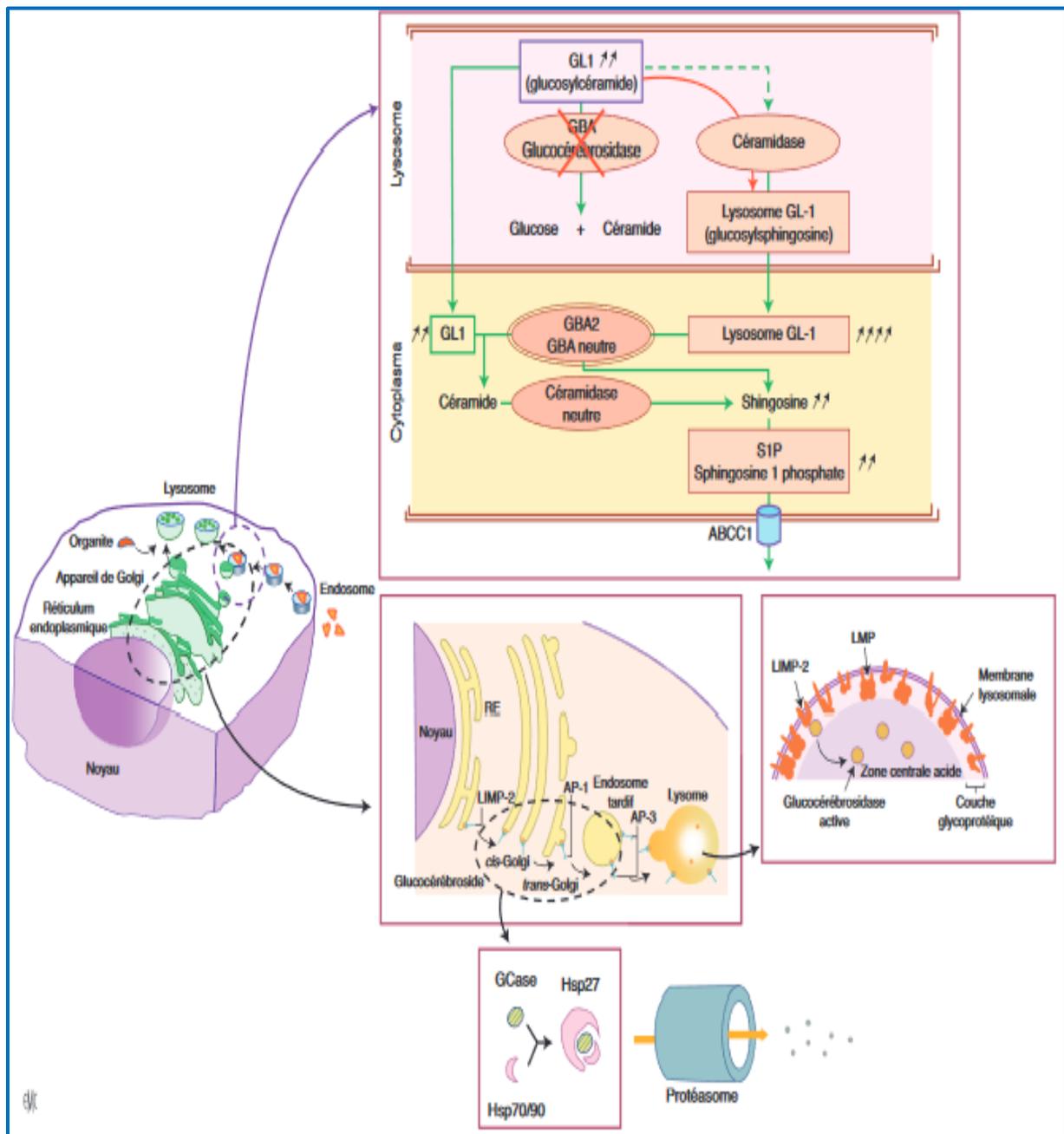


Figure 11: Déficit enzymatique β -Glucocérebrosidase (Voie principale / Voie alternative) (83)

II.4.3 Génétique

II.4.3.1 Gène GBA

Le gène GBA comprend 11 exons et 10 introns, couvrant une séquence de 7,6 kb. Un pseudogène hautement homologue (GBAP), est situé à 16 kb en aval du gène et s'étend sur une longueur de 5,7 kb.

Malgré la différence de longueur entre le gène et le pseudogène, causée par des insertions Alu au niveau des introns du gène GBA, il existe 96% d'homologie de séquence entre les deux.

Le pseudogène porte une délétion de 55 pb au niveau de l'exon 9.

La présence du pseudogène au même locus, est hautement conservée et significative, puisqu'il a été démontré que de nombreux changements nucléotidiques distribués tout au long du pseudogène, étaient retrouvés au niveau de l'allèle muté du gène actif.(11)

La région entourant le gène GBA est particulièrement riche en gènes, on retrouve sept gènes et deux pseudogènes. La région présente une taille de 85 Kb (Figure 12)

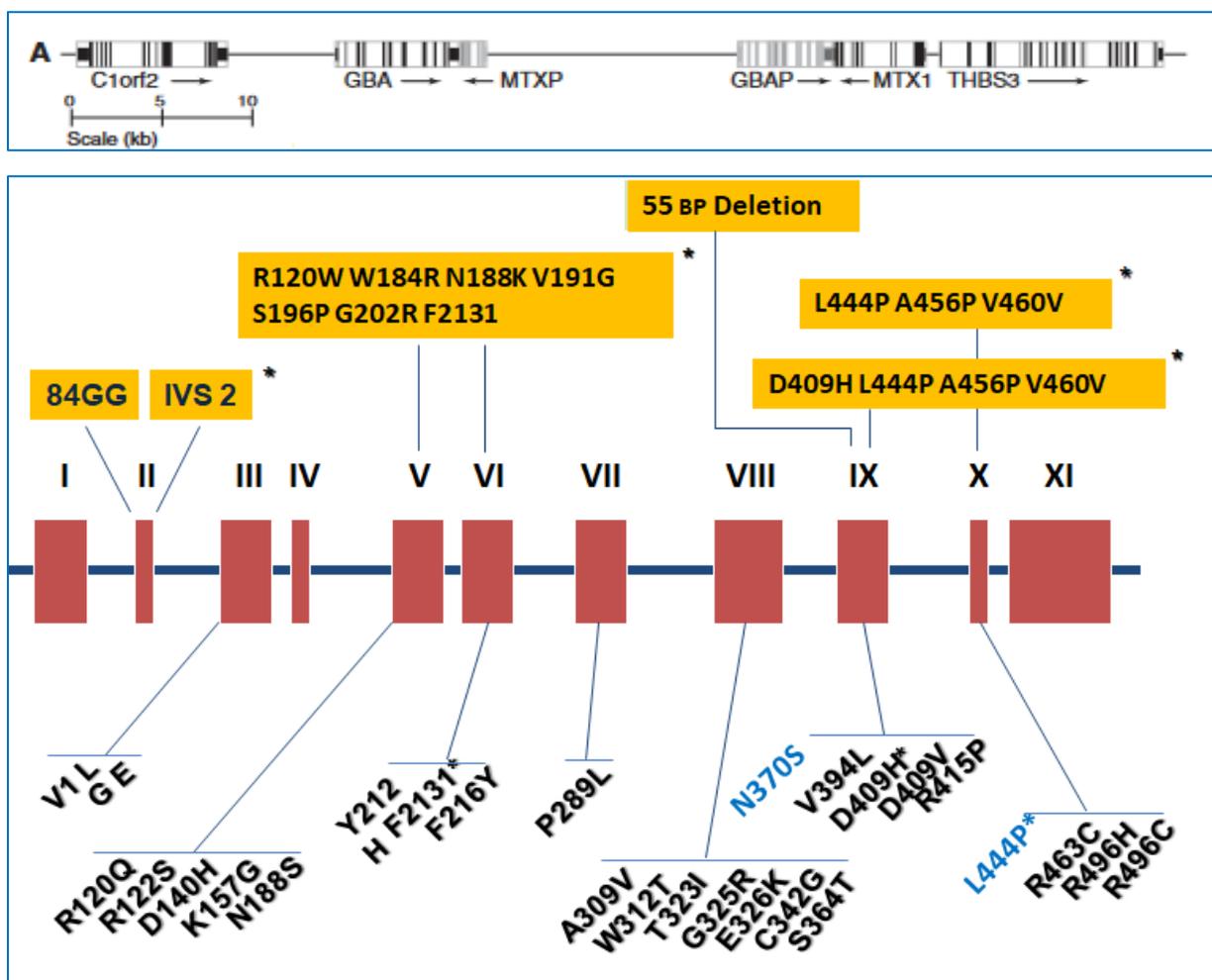


Figure 12: Structure du gène GBA et la répartition des différentes mutations (89)

Le gène le plus proche en aval est la métaxine (MTX1), qui est transcrite de manière convergente en GBA. La métaxine semble jouer un rôle dans la pré-protéine complexe d'import dans la membrane mitochondriale externe et partage un promoteur bidirectionnel avec le gène de la thrombospondine 3.

La métaxine présente également un pseudogène, qui est situé dans la région de 16 kb entre GBA et GBAP. Les deux pseudogènes semblent résulter d'une duplication de cette région. Plusieurs ARNm ont été détectés, attribués à des variants d'épissage, à la présence de sites de polyadénylation alternés, ou à la transcription du pseudogène.

Ont été identifiés deux codons ATG d'initiation de la traduction, au niveau de l'exon 1 et au niveau de l'exon 2. Deux polypeptides sont synthétisés, possédant des peptides signal de taille différente :

- 1^{er} ATG : Peptide signal de 39 acides aminés
- 2^e ATG : Peptide signal de 19 acides aminés

Les deux sont transformés en enzyme mature de 497 Acides aminés.

II.4.3.2 L'enzyme : β -glucocérebrosidase

La β -glucocérebrosidase est une enzyme de classe Glycoside hydrolase. Elle présente une taille de 497 d'acides aminés (90).

Elle est constituée de trois domaines (91) :

- **Le domaine I** (du résidu 1 à 27 et de 383 à 414) : est un feuillet β antiparallèle à trois brins principaux flanqué d'un brin amino-terminal perpendiculaire et d'une boucle. Il contient deux ponts disulfure (résidus 4–16 et 18–23).
- **Le domaine II** (du résidu 30 à 75 et de 431 à 497) : comprend deux feuilles β étroitement associés qui forment un domaine indépendant, ressemblant à un pli d'immunoglobuline.
- **Le domaine III** (du résidu 76 à 381 et de 416 à 430) : est un assemblage en tonneau (β/α) 8TIM, qui contient le site catalytique. Il contient trois cystéines libres (aux positions 126, 248 et 342). Les résidus catalytiques sont situés à p.Glu274 et à p.Glu379.

Les domaines II et III sont reliés par une charnière flexible, alors que le domaine I interagit étroitement avec le domaine III

La protéine présente quatre sites de glycosylation : p.Asn58, p.Asn98, p.Asn185, et p.Asn309

L'enzyme glycosylée est reconnue par le système SCARB2 (scavenger receptor class B member 2).

Le complexe GBA/SCARB2 est adressé vers l'appareil de Golgi, au niveau de vésicules endocytaires, pour atteindre son site d'action, le lysosome (92).

II.4.3.3 Les mutations

Les mutations du gène GBA sont classiquement décrites sur la base de la position des acides aminés de l'enzyme mature, avec p.Ala40 désigné comme premier résidu. Actuellement les règles de nomenclature imposent de numéroter les acides aminés à partir de la méthionine initiale de la séquence signal complète de 39 résidus d'acides aminés (89).

A ce jour, 590 mutations ont été décrites (40), réparties comme suit :

- Mutations ponctuelles : majoritairement regroupées entre l'exon 8 et 11 (Figure 12)
 - 441 mutations Faux-sens, non-sens
 - 35 mutations au niveau de site d'épissage
- 43 Petites délétions
- 18 petites insertions
- 8 petites insertion-délétions
- 12 grosses délétions
- 3 grosses insertions
- 26 mutations complexes de type :
 - Réarrangement.
 - Recombinaison du gène avec le pseudogène consécutive a des mécanismes de conversion, fusion, et duplication du gène (89).

Il existe des mutations récurrentes, dont la fréquence et la distribution dépendent des populations étudiées :

- Mutation p.Asn409Ser (ancienne nomenclature : p.N370S).
- Mutation c.84ins G : la plus fréquente dans la population juive ashkénaze (93)
- Mutation p.Leu483Pro (ancienne nomenclature : p.L444P) : fréquente dans les populations nordiques et européennes (11)
- Deux allèles complexes :
 - RecNcil (L444P, A456P, et V460V)
 - RecTL (D409H, L444P, A456P, V460V) (84)

La maladie de Gaucher est une maladie **autosomique récessive**. Pour que la maladie se manifeste, les patients doivent être porteurs d'une **mutation délétère sur les deux allèles** du gène GBA, soit **homozygote**, ou **hétérozygote composite**.

Le **génotype** renseigne sur le **pronostic** ainsi que sur le **phénotype** :

- La **mutation N370S** : est la plus fréquente. Elle est associée aux phénotypes les moins sévères de la maladie, ce qui peut retarder le diagnostic (94).
L'enzyme est altérée mais garde une activité résiduelle.
La majorité des patients portant cette mutation présentent une maladie de Gaucher de type 1, sans atteinte neurologique (92).
- La **mutation L444P** : le phénotype est plus sévère, souvent de type 2 ou 3, et particulièrement en cas de forme homozygote (95).
- La **mutation c.84insG** : est une mutation non-sens où aucune protéine n'est synthétisée. Les patients atteints sont hétérozygotes, car la forme homozygote serait létale in utero.

II.4.3.4 Relation entre le gène GBA et syndrome parkinsonien

Une prédisposition des patients atteints de MG de type I à l'égard de la maladie de Parkinson est décrite. Une mutation hétérozygote du gène GBA est considérée comme un facteur de risque de syndrome parkinsonien (86).

La prévalence des mutations hétérozygotes (essentiellement N370S, L444P, 84GG, IVS+1, V394L et R496H) varie de 3 à 8 % chez les patients parkinsoniens caucasiens, et elle est plus élevée dans la population juive ashkénaze, atteignant 15 % à 31 % (96).

L'accumulation du G_{cer} favorise la formation de polymères d' α -synucléine, dont les agrégats forment les corps de Lewy dans les neurones de patients. De plus, ces polymères ont un effet inhibiteur sur la GC_{ase} (97). Les études les plus récentes montrent que cet effet pourrait être modulé par le coactivateur de la GC_{ase}, la saposine C, ce qui pourrait partiellement expliquer la pénétrance limitée de cette atteinte neurologique chez les patients atteints de MG (98).

II.4.4 Classification clinique

La présentation de la MG est très hétérogène. Elle comprend une hépato-splénomégalie ainsi qu'une atteinte osseuse et médullaire chez pratiquement la totalité des patients. L'atteinte neurologique s'y associe dans certaines formes.

La sévérité de la maladie est très variable, pouvant être totalement asymptomatique ou rapidement létale.

Le début de la symptomatologie peut survenir à n'importe quel âge. De manière générale, plus le déficit enzymatique est profond, plus la maladie est sévère et survient précocement (99).

Trois phénotypes et une forme fœtale sont classiquement distingués (100).

La corrélation entre génotype et phénotype est parfois difficile à établir, cependant il semble exister **un continuum** entre ces différents phénotypes ; basé sur la présence et l'intensité des manifestations neurologiques.(100).

II.4.4.1 Maladie de Gaucher type I

La MG de type 1 (ORPHA77259) est la plus fréquente (95 % des cas), Elle est définie classiquement par l'absence d'atteinte neurologique (94).

La présentation clinique est très hétérogène, l'âge moyen du diagnostic est estimé entre 10 et 20 ans, mais peut se manifester dès 1 an, ou rester asymptomatique tout au long de la vie (83). La MG type I met en jeu parfois le pronostic fonctionnel, mais exceptionnellement le pronostic vital (101).

La symptomatologie retrouve une hépato-splénomégalie, une atteinte osseuse et médullaire. Sont fréquemment associés ; l'asthénie (50% des cas), ainsi qu'un retard de croissance ou un retard pubertaire (1/3 des enfants).

À l'encontre de la définition classique du phénotype 1 de la MG, certaines manifestations neurologiques sont maintenant décrites au cours de l'évolution de la MG de type 1.

Les patients atteints de MG de type 1 ont un risque accru d'apparition de neuropathies périphériques, d'un syndrome parkinsonien ($\times 4$ à 20), précoce et résistant aux agonistes dopaminergiques, maladie d'Alzheimer, démence à corps de Levy (94).

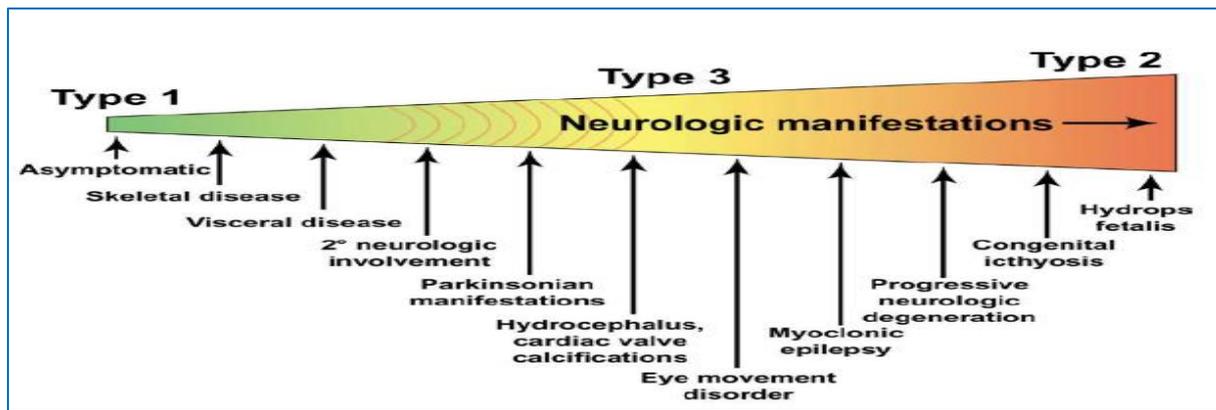


Figure 13: Le continuum phénotypique : Description moderne de la MG (100)

II.4.4.2 La maladie de Gaucher type 2

La MG de type 2 (ORPHA77260) est plus rare (102). C'est la forme neuronopathique aiguë, caractérisée par une atteinte neurologique précoce et sévère, débutant chez le nourrisson de 3 à 6 mois par une atteinte systémique avec hépatosplénomégalie et manifestations neurologiques. On observe une triade très évocatrice associant des accès toniques de la nuque et du tronc (opisthotonos), des signes bulbaires (en particulier des troubles sévères de la déglutition), cause de décès, et une paralysie oculomotrice ou un strabisme fixe bilatéral.

Le développement psychomoteur est souvent altéré. Des convulsions, plus tardives, se manifestent par une épilepsie myoclonique résistante aux traitements antiépileptiques. La splénomégalie est constante, associée à une thrombopénie dans 60 % des cas.

Le retard de croissance (30 %) peut être le premier signe d'alerte, associé parfois à une cachexie. L'atteinte pulmonaire peut être associée, et il n'y a pas d'atteinte osseuse.

Le décès survient avant l'âge de 2 ans, des suites d'une atteinte pulmonaire infiltrative ou d'une apnée prolongée. Le traitement enzymatique est inefficace (103).

II.4.4.3 La maladie de Gaucher type 3

La MG de type 3 (ORPHA77261) regroupe moins de 5% des cas (80).

C'est la forme neuronopathique subaiguë ou chronique.

Comme pour la MG de type 1, l'expression clinique de la MG de type 3 est très hétérogène, avec un début en général avant l'âge de 2 ans. Certains cas, plus lentement évolutifs, sont diagnostiqués à l'âge adulte.

En plus des atteintes du type 1, s'y ajoutent des signes neurologiques, allant d'une atteinte modérée avec une ophtalmoplégie horizontale supranucléaire, jusqu'aux formes plus invalidantes : syndrome cérébelleux et encéphalopathie progressive associant épilepsie

myoclonique, myoclonies non épileptiques, spasticité, troubles du comportement voire démence.

Les signes neurologiques peuvent survenir plusieurs années avant les autres manifestations cliniques. Une infiltration interstitielle pulmonaire, une cyphose souvent invalidante et de volumineuses adénopathies généralement abdominales sont parfois retrouvées (104).

Les exceptionnels déficits en saposine C comportent quasiment toujours une atteinte neurologique de type 3 (83).

II.4.4.4 La forme fœtale

La forme fœtale est la plus rare et la plus grave (< 1 %).

Elle se révèle au stade fœtal par une anasarque fœtoplacentaire, une hépatosplénomégalie, une ichtyose, une arthrogrypose, une dysmorphie faciale et une thrombopénie fœtale.

La mort survient souvent in utero ou rapidement après la naissance (105).

II.4.4.5 Maladies associées chez l'adulte

- **Cancers** : l'incidence de certains cancers solides comme le carcinome hépatocellulaire, le mélanome, et le cancer du pancréas semble augmentée chez les patients atteints de MG. Cette association serait en relation avec :
 - la perturbation du microenvironnement cellulaire et cytokinique, avec activation de macrophages M2, et des réponses anormales des lymphocytes T, avec une réduction des cellules NK.
 - un défaut catabolique de la cellule néoplasique elle-même (106).
- **Myélome multiple** : La prévalence des pics monoclonaux est augmentée chez les patients atteints de MG, oscillant entre 1 % et 35 % selon les séries. Le mécanisme étiologique expliquant ces pics monoclonaux dans la MG n'est pas clairement défini. Le dysfonctionnement lipidique serait incriminé (102).

II.4.5 Diagnostic de la maladie de Gaucher

Le diagnostic de la MG est souvent retardé de plusieurs années par rapport à l'apparition des premiers signes clinico-biologiques, problème régulièrement constaté avec les maladies rares de symptomatologie progressive.

II.4.5.1 Diagnostic d'orientation

II.4.5.1.1 Bilan biochimique

Le dosage des protides totaux avec électrophorèse des protéines sériques et éventuellement une immunofixation, qui met en évidence une hypergammaglobulinémie polyclonale (25–91 %).

Bilan hépatique : transaminases, gammaglutamyl transférase (Gamma GT), phosphatases alcalines (PAL) et bilirubine totale. On observe une cholestase, rarement une cytolysse.

La protéine C réactive (CRP) peut être élevée en cas de crises osseuses (infarctus osseux) ou de complications infectieuses (102).

Le dosage de la calcémie, de la phosphorémie et de la vitamine D est conseillé ; la carence en vitamine D semble plus fréquente dans la MG que dans la population générale (86).

II.4.5.1.2 Bilan hématologique

Une thrombopénie est fréquente (90 % des cas), de degré variable. L'anémie est moins fréquente (36 % des cas) et modérée, le taux d'hémoglobine étant rarement inférieur à 9 g/dl ; une leucopénie est rare. En cas d'antécédent de splénectomie, l'hémogramme peut être normal (82).

Plusieurs anomalies de l'hémostase ont été décrites dans la MG dont l'allongement du taux de prothrombine (TP) et du temps de céphaline activée (TCA) pouvant être lié à un déficit en facteur de coagulation, le facteur X, en facteur V, en thrombine, voire à un déficit plus global ; le déficit en facteur XI (107).

Le myélogramme n'est pas nécessaire pour confirmer un diagnostic de MG, de moins en moins effectué actuellement devant une thrombopénie isolée et/ou une splénomégalie. Il révèle des cellules de Gaucher très évocatrices.

Il demeure un examen invasif, qualitatif, puisque les cellules parfois peu nombreuses, peuvent être sous-estimées. Il requiert une expérimentation du cytologiste pour distinguer les cellules de Gaucher typiques, des cellules « pseudo-Gaucher » observées dans certaines pathologies hématologiques ou infectieuses.

II.4.5.1.3 Imagerie médicale

L'échographie abdominale reste largement utilisée en première intention, car facilement disponible. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) abdominale est l'examen de choix

pour évaluer les dimensions de la rate et du foie, ainsi que leur morphologie (86). La rate peut contenir des nodules en rapport avec des « gaucheromes », devant faire éliminer le diagnostic du lymphome (83).

L'IRM osseuse : est l'examen de choix (108). Elle permet de :

- Quantifier le degré d'infiltration osseuse par les cellules de Gaucher altérant le signal médullaire normal (hyposignal en T1 et T2).
- Apprécier l'extension des lésions, leur caractère récent (œdème magnétique d'une ostéonécrose aseptique ou d'un infarctus récent) ou ancien.
- Suivre le degré d'infiltration au cours de la maladie et sous traitement.
- Objectiver des lésions d'ostéocondensation ou d'ostéosclérose des os plats, des os longs, un amincissement de la corticale, des lésions lytiques, et la déformation fémorale (109).

L'ostéodensitométrie permet de détecter une ostéopénie ou une ostéoporose. La sévérité de l'ostéopénie, définie par un T-score compris entre -1 et -2,5, est corrélée au génotype, et à l'hépatosplénomégalie (86).

II.4.5.2 Diagnostic de certitude

II.4.5.2.1 Diagnostic enzymatique

Il repose sur la détermination du déficit enzymatique en β -glucocérébrosidase, avec activité résiduelle inférieure à 20-30% de la valeur normale.

La détermination du déficit enzymatique est la méthode de référence qui doit être systématiquement utilisée pour confirmer le diagnostic de la maladie de Gaucher.

L'activité enzymatique est exprimée dans la plupart des tissus :

- Leucocytes totaux de sang périphérique (où le dosage est majoritairement effectué), et les lymphocytes. Le prélèvement est effectué sur anticoagulant EDTA (101).
- Fibroblastes, villosités choriales, cellules amniotiques.
- Foie, rate.

Le dosage recommandé et de référence emploie une technique fluorimétrique. Il s'agit d'une méthode *in vitro*, qui utilise un substrat synthétique fluorogène (couplé au 4 méthylumbelliferyl ou 4MU). Il est réalisé dans des laboratoires spécialisés.

L'analyse par spectrométrie de masse sur taches de sang (DBS dried blood spot) peut être utilisée. Elle permet la facilité d'envoi de l'échantillon sur papier buvard. Cependant, le matériel reste coûteux et nécessite une expertise médicale.

II.4.5.2.2 Diagnostic moléculaire

II.4.5.2.2.1 Etude du gène GBA

Elle est réalisée en seconde intention, par la mise en évidence de la/des mutation(s) responsable(s) de la maladie. Elle s'effectue par le séquençage du gène GBA par :

- Séquençage de type Sanger
- Séquençage NGS (next generation sequencing), actuellement dans les pays développés, l'exploration du gène GBA est comprise dans un panel de diagnostic de maladies lysosomales. Il est systématiquement proposé à l'ensemble des patients, après confirmation du déficit enzymatique.

L'analyse génétique représente actuellement la meilleure méthode en théorie pour compléter le diagnostic, les seules limites concernent l'identification de variants de signification inconnue non encore rapportés par la littérature, ou encore du fait de l'absence d'identification de mutation pour certains malades.

L'intérêt du diagnostic génétique est triple :

- **Intérêt pronostique**, au vu des corrélations phénotypes-génotypes attribuées pour la maladie de Gaucher. Les mutations concernées correspondent aux plus communes la N370S et la L444P.

La mutation N370S « neuroprotectrice », permet de différencier le type 1 et 3 chez les enfants, puisque la présence de la mutation N370S à l'état homo- ou hétérozygote permet d'exclure un type 3 (11).

La mutation L444P est à très haut risque de développer une atteinte neurologique.

La mutation D409H à l'état homozygote, exceptionnelle, associe une atteinte valvulaire cardiaque caractéristique (mitrale et aortique), avec opacité cornéenne.

Les patients porteurs de deux mutations « nulles », c'est-à-dire responsables d'une absence totale d'activité enzymatique (**RecNciI, c.84dupG**) ne peuvent survivre au-delà de la période périnatale (formes fœtales incompatibles avec la vie) (86).

- **Conseil génétique** : Il permet le dépistage des asymptomatiques et des hétérozygotes dans les familles.
- **Diagnostic prénatal** : L'analyse génétique tend, ces dernières années (102), à remplacer l'analyse biochimique qui est effectuée par la mesure de la β -glucocérébrosidase sur villosités chorales à 10-12 semaines d'aménorrhée, ou des cellules amniotiques en culture vers 16 semaines d'aménorrhée.

Pour des raisons éthiques il n'est proposé que pour les couples ayant eu un enfant atteint de MG de type 2 ou 3.

II.4.5.2.2 Etude du gène PSAP

Un exceptionnel déficit en saposine C doit être recherché en cas d'activité β -glucocérébrosidase normale alors que le tableau clinique et les biomarqueurs (notamment chitotriosidase très élevée) sont en faveur d'une MG. Ce diagnostic est fait par séquençage du gène PSAP (86).

II.4.5.3 Marqueurs biochimiques du suivi de la maladie de Gaucher

II.4.5.3.1 Chitotriosidase

La chitotriosidase (de la famille des chitinases), sécrétée par les macrophages activés, est le biomarqueur le plus intéressant pour le suivi du traitement enzymatique. Elle aurait une certaine valeur pronostique (110). Ses taux peuvent atteindre 100 à 5000 fois les valeurs normales (600 fois en moyenne) et sont souvent corrélés à la sévérité de la maladie (111).

Cependant, l'activité chitotriosidase initiale de chaque patient est variable du fait de la présence d'une mutation (duplication de 24 pb) sur le gène CHIT1 qui conduit soit à un déficit total, en cas d'homozygotie pour la mutation chez 6 % de la population générale, soit à une activité réduite de moitié, en cas de mutation hétérozygote retrouvée chez un tiers de la population.

Cette variation rend difficilement interprétable le dosage de chitotriosidase, qui ne permet pas de réelle comparaison entre les patients. Par ailleurs, l'activité de la chitotriosidase peut être augmentée dans des pathologies infectieuses de type leishmaniose et dans la sarcoïdose (112).

II.4.5.3.2 Chémokine CCL18

Le CCL18 est produit aussi bien par les cellules de Gaucher que par les macrophages de type M2, et les cellules dendritiques (113). Il favorise le recrutement de lymphocytes T régulateurs (TReg), par le biais du chémokine receptor (CCR).

Le CCL18 peut être augmenté au cours de réactions allergiques, de maladies chroniques inflammatoires, notamment la fibrose pulmonaire idiopathique, certains cancers, et la sclérodermie.

Le dosage de CCL18 est proposé comme biomarqueur de la maladie pour les patients présentant la mutation du gène de la chitotriosidase.

Dans la maladie de Gaucher, l'élévation du taux sérique du CCL18 est franche, soit de 10 à 40 fois la normale, détectable chez tous les individus atteints (110).

Son dosage est réalisé par méthode immuno-enzymatique (technique ELISA).

II.4.5.3.3 Glucosylsphingosine ou lyso GL1

Il s'agit d'un biomarqueur dont la sensibilité et la spécificité sont supérieures à celles de la chitotriosidase et du CCL18. Ses valeurs sont toujours élevées chez les patients atteints de MG par déficit enzymatique ou déficit en saposine C. Son élévation est corrélée à la sévérité hématologique (hépto-splénomégalie, cytopénie), mais pas à l'atteinte osseuse (114).

Son dosage est réalisé par la LC-MS/MS (115).

II.4.5.3.4 Autres

L'**hyperferritinémie** est prédictive des complications osseuses et pourrait être liée à une activation macrophagique par l'accumulation de glucosylcéramide ou d'un rétrocontrôle de l'hepcidine par les cytokines sécrétées par le macrophage.

L'**enzyme de conversion de l'angiotensine** et les **phosphatases acides tartrates résistantes**, deux marqueurs souvent élevés dans la MG, ne sont plus utilisés en routine (86).

II.4.6 Traitement

La maladie de Gaucher est l'une des rares maladies génétiques accessibles à un traitement spécifique (11). Il existe actuellement deux types de traitements spécifiques de la MG, l'enzymothérapie de substitution, qui constitue le traitement de référence, et le traitement par réduction de substrat (TRS), alternative actuellement de seconde intention (116). Les principaux objectifs du traitement sont l'amélioration des symptômes et la qualité de vie ainsi que la prévention des complications irréversibles. Le traitement spécifique n'est pas systématique, il doit être discuté en particulier au cours des formes asymptomatiques ou peu symptomatiques lors de RCP. Les principales indications de traitement dans la MG sont résumées dans le (Tableau 6).

Une fois instauré, le traitement spécifique est généralement maintenu à vie. L'efficacité sur l'atteinte neurologique dans la MG de type 3 reste discutée (101).

Le traitement doit être instauré précocement avant l'instauration de séquelles invalidantes et inaccessibles aux traitements, a type de splénomégalie fibreuse, arthrose secondaire, ostéonécrose, déformations après tassement vertébral, fibrose hépatique, ou fibrose pulmonaire.

II.4.6.1 Enzymothérapie substitutive

L'introduction de l'enzymothérapie substitutive (ES) depuis les débuts des années 1990 a été une révolution dans traitement des patients atteints de MG, entraînant une diminution de

l'hépatosplénomégalie, des cytopénies et une prévention des évènements osseux. Deux enzymes recombinantes sont actuellement commercialisées (117) pour le traitement de la MG de type 1 et de type 3 :

- **Imiglucérase, Cerezyme®** (Société Genzyme) : ces enzymes ont été déglycosylées, permettant d'exposer leurs résidus mannoses et ainsi favoriser leur captation par les récepteurs des macrophages et leur transfert vers les lysosomes.
- **Vélaglucérase, Vpriv®** (Laboratoires Shire) : produite par des fibroblastes humains. Ces deux médicaments compensent la diminution de l'activité de la β -glucocérébrosidase, permettant de réduire les conséquences cellulaires du déficit.

Tableau 6: Principales indications thérapeutiques dans la MG (118)

| |
|---|
| <p>MG type 3</p> <p>MG type 1, avec atteintes symptomatiques cliniquement :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Thrombopénie symptomatique ou taux de plaquettes $\leq 60\ 000$ - Anémie symptomatique et/ou taux d'hémoglobine ≤ 10 g/dL - Hépatomégalie et/ou splénomégalie symptomatique - Atteinte osseuse cliniquement symptomatique, passée ou présente, en rapport avec : <ul style="list-style-type: none"> Crises douloureuses osseuses Ostéonécrose Infarctus osseux Fractures pathologiques Atteinte osseuse radiologique Infarctus, ostéonécrose, fracture pathologique, lésions lytiques, amincissement de la corticale Ostéoporose (T- ou Z-score $\leq -2,5$) - Atteinte d'autres organes liés à la MG (après exclusion de toute autre étiologie) : <ul style="list-style-type: none"> pneumopathie interstitielle, fibrose hépatique, atteinte cardiaque ou toute atteinte viscéral |
|---|

Cerezyme® et Vpriv® s'administrent à la dose initiale de 60 U/kg par voie intraveineuse tous les 15 jours. Ces traitements sont en général bien tolérés, avec uniquement d'exceptionnels cas de réactions anaphylactiques généralement modérées. Ils peuvent être administrés pendant la grossesse (116). Certains patients développent des anticorps contre l'enzyme substitutive, habituellement sans traduction clinique (119).

Il n'y a actuellement pas d'indication à l'ES dans le traitement de la MG de type 2, en l'absence d'efficacité dans la réduction ou la stabilisation des atteintes neurologiques.

Un biosimilaire Emiglucérase Absertine, très utilisé actuellement chez nous pour la maladie de Gaucher type I. Il relève d'un laboratoire coréen, ISU Abxis, représenté par le laboratoire Algérien Algen Pharm.

II.4.6.2 Réducteurs de substrat

Ils constituent le traitement de deuxième intention dans la maladie de Gaucher, proposé lorsque l'enzymothérapie substitutive n'est plus acceptée par le patient ou du fait d'une intolérance. Il vise à diminuer la production des Gcer.

Deux molécules ont été développées (119) :

- **Miglustat (Zavesca®)** (Laboratoires Actelion) :

Est un inhibiteur de la Gcer synthétase qui permet de réduire la synthèse du Gcer dans les cellules de Gaucher. Il a obtenu une AMM européenne en novembre 2002 pour le traitement de la MG de type 1 légère à modérée.

Le Miglustat est efficace sur la viscéromégalie, mais moins sur les troubles hématologiques et osseux. De même, son efficacité sur les troubles neurologiques n'est pas démontrée, malgré son passage à travers la barrière hémato-encéphalique. Il est formellement contre-indiqué en cas de grossesse.

Il est administré par voie orale, à la posologie recommandée de 100 mg trois fois par jour, avec une augmentation progressive des doses en début de traitement.

Il peut donner des effets indésirables (diarrhée, amaigrissement, tremblements des extrémités, possible neuropathie périphérique), régressant en général à la diminution des doses ou à l'arrêt du traitement (120).

- **Eliglustat (Cerdelga®)** (Société Genzyme / Laboratoires Sanofi)

Il s'agit également d'un inhibiteur de la glucosylcéramide synthase, administré par voie orale. Les essais cliniques ont montré une tolérance satisfaisante et une efficacité significative, y compris sur le plan osseux. Ce médicament pourrait être proposé en première ligne chez le patient ayant une MG de type 1.

L'éliglustat est principalement métabolisé par l'isoforme 2D6 du cytochrome P450 hépatique (CYP2D6), dont l'activité est variable d'un individu à l'autre. Un génotypage du CYP2D6 est donc obligatoire avant toute prescription d'éliglustat, afin de déterminer le statut métaboliseur

rapide (conduisant à la prescription de deux comprimés par jour) ou lent (imposant la posologie d'un comprimé par jour).

Ce traitement n'est pas indiqué chez les métaboliseurs ultra-rapides ou de génotype indéterminé, en cas de cardiopathie, d'insuffisance rénale et hépatique, pendant la grossesse ou en association avec certains traitements (en raison de nombreuses interactions médicamenteuses qu'il faut systématiquement vérifier) (121).

II.4.6.3 Autres traitements spécifiques

- La **greffe de moelle osseuse** pourrait théoriquement guérir la maladie, mais au vu de l'efficacité du traitement substitutif et les risques de la greffe, ce traitement n'est réservé qu'à une minorité de patients (116).
- La **splénectomie** quant à elle, autrefois utilisée pour prévenir les cytopénies, n'est plus réalisée en raison de sa tendance à aggraver les signes osseux, pulmonaires et hépatiques de la maladie, en plus de ses risques propres (11).
- La **thérapie génique**, consistant à un transfert du gène GBA1 dans les cellules hématopoïétiques, s'est révélée décevante avec des taux de GCCase trop faibles pour obtenir un effet clinique (122).
- Les **molécules chaperonnes** constituent une option thérapeutique au stade de développement. Elles pourraient restaurer l'activité de la GCCase même mutée (123).

II.4.7 Surveillance des malades Gaucher

La surveillance est à la fois clinique, biologique et radiologique (111). Les modalités de suivi diffèrent selon le type de MG, patients traités ou non traités, sujets adultes ou enfants (Tableaux 7 et 8).

L'enzymothérapie substitutive améliore les anomalies hématologiques et la qualité de vie en quelques mois. Les biomarqueurs (chitotriosidase, CCL18 et ferritine) diminuent, assez rapidement, avant la normalisation des plaquettes et de l'hémoglobine. La diminution de l'hépatosplénomégalie est plus progressive, en général sur une période de deux ans (86).

L'amélioration des anomalies osseuses est habituellement observée après deux à quatre ans de traitement. Certaines anomalies restent cependant irréversibles (fibrose hépatique ou splénique, séquelles d'ostéonécroses et d'infarctus osseux) (109).

Dans une proportion significative de cas, les cytopénies ou organomégalies s'améliorent de façon incomplète.

Les patients atteints de MG de type 3 nécessitent un suivi neurologique, en plus du suivi proposé pour le type 1.

Le suivi des patients pédiatriques est plus étroit : un examen clinique et une évaluation biologique complète sont réalisés tous les six mois, l'imagerie tous les deux ans et l'évaluation neuropsychiatrique est effectuée à des âges clés, en plus d'explorations orientées par d'éventuels points d'appel.

II.4.8 Transition des patients Gaucher Pédiatrie/Adulte :

Une transition réussie nécessite un effort d'organisation et d'adaptation important de la part de l'équipe pédiatrique, mais aussi de l'équipe de médecine d'adultes qui va prendre en charge le patient. Eviter la rupture de suivi pour le patient au moment du passage de relais, est un facteur crucial évitant l'installation de signes d'aggravation de la maladie, en particulier les douleurs osseuses.

II.4.9 Pronostic de la maladie

La qualité de vie est améliorée sous traitement spécifique de la MG(116) .

Avant la disponibilité de l'ES, la diminution de la survie était de 9 ans par rapport à la population générale. Les patients décédaient de cirrhose, d'insuffisance hépatocellulaire, d'infection et de complications de la splénectomie. La survie sous l'enzyme de substitution semble proche de celle de la population générale, les causes de décès qui sembleraient plus fréquentes sont la survenue de cancers, hémopathies malignes, et la maladie de Parkinson (118). Chez les patients ayant une MG de type 3, l'enzymothérapie ne permet pas d'enrayer la dégradation neurologique progressive (119).

Tableau 7: Suivi des patients adultes atteints de maladie de Gaucher de type 1 asymptomatiques (93)

| | Diagnostic initial | Première année | | | | A2 | A3 | Ax |
|--|--|-------------------|----|----|------------|------------|------------------|----|
| | | J0-M3 | M3 | M6 | M12 | | | |
| Examen clinique | + | + | + | + | + | + | + | |
| Glucocérébrosidase | + | / | / | / | / | / | / | |
| Génotype | + | / | / | / | / | / | / | |
| Myélogramme | Si indication au cours de l'évolution (Ig monoclonale) | | | | | | | |
| Hémogramme | + | | + | + | Semestriel | Semestriel | Semestriel | |
| Bilan hémostase | | | | + | + | + | 1 fois /an | |
| Bilan biochimique | | | | + | + | + | 1 fois /an | |
| Électrophorèse des protéines sériques → Immuno-fixation | | | | + | + | + | 1 fois /an | |
| Quantification Ig | Si indication au cours de l'évolution (Ig monoclonale) | | | | | | | |
| Chitotriosidase | + | / | + | + | + | + | 1 fois /an | |
| CCL18 | + | / | + | + | + | + | 1 fois /an | |
| Ferritine | + | / | + | + | + | + | 1 fois /an | |
| Bilan radiologique | | | | | | | | |
| IRM ou écho rate, foie | + | / | / | / | / | + | 1 fois/3 à 4 ans | |
| IRM rachis, fémur, bassin, tibias ou corps entier | + | / | / | / | / | + | 1 fois/3 à 4 ans | |
| Radiographies (rayons X thorax, squelette) | + | Si signes d'appel | | | | | | |
| Ostéodensitométrie | + | / | / | / | / | + | 1 fois/3 à 4 ans | |
| EFR, TDM thoracique | Si signes d'appel | | | | | | | |
| Échographie cardio/Doppler, ECG | + | Si signes d'appel | | | | | 1 fois/2 à 3 ans | |

Tableau 8: Suivi des patients adultes atteints de maladie de Gaucher de type 1 traités

| | Diagnostic initial | Première année | | | | A2 | A3 | Ax |
|--|--|-------------------|----|----|-----|------------|------------|------------------|
| | | J0-M3 | M3 | M6 | M12 | | | |
| Examen clinique | + | | + | + | + | Semestriel | + | 1 fois / an |
| Glucocérébrosidase | + | | / | / | / | / | / | / |
| Génotype | + | | / | / | / | / | / | / |
| Myélogramme | Si indication au cours de l'évolution (Ig monoclonale) | | | | | | | |
| Hémogramme | + Tous les 14 jours j | | + | + | + | Semestriel | Semestriel | Semestriel |
| Bilan hémostase | + | | + | + | + | + | + | + |
| Bilan biochimique | + | | / | / | + | Semestriel | Semestriel | Semestriel |
| Électrophorèse des protéines sériques → Immuno-fixation | + | | / | / | + | + | + | 1 fois /an |
| Quantification Ig | Si indication au cours de l'évolution (Ig monoclonale) | | | | | | | |
| Chitotriosidase | + | | + | + | + | Semestriel | + | + |
| CCL18 | + | | + | + | + | Semestriel | + | + |
| Ferritine | + | | + | + | + | Semestriel | + | 1 fois /an |
| Bilan radiologique | | | | | | | | |
| IRM ou écho rate, foie | + | | / | + | + | Semestriel | + | 1 fois/3 ans |
| IRM rachis, fémur, bassin, tibias ou corps entier | + | | / | / | + | / | + | 1 fois/3 à 4 ans |
| Radiographies (rayons X thorax, squelette) | + | Si signes d'appel | | | | | | |
| Ostéodensitométrie | + | | / | / | / | + | / | 1 fois/3 à 4 ans |
| EFR, TDM thoracique | Si signes d'appel | | | | | | | |
| Échographie cardio/Doppler, ECG | + | Si signes d'appel | | | | | | 1 fois/2 à 3 ans |

Tableau 9: Suivi des patients pédiatriques atteints de maladie de Gaucher de type 1 non traités

| | Diagnostic initial | Première année | | | | A2 | A3 | Ax |
|--|--------------------|---------------------------------------|----|----|-----|----|------------|--------|
| | | J0-M3 | M3 | M6 | M12 | | | |
| Examen clinique | + | / | / | + | + | + | Annuel | |
| Glucocérébrosidase | + | / | / | / | / | / | / | |
| Génotype | + | / | / | / | / | / | / | |
| Myélogramme | Non | Si indication au cours de l'évolution | | | | | | |
| Hémogramme | + | | | + | + | + | Annuel | |
| Bilan hémostase | + | | | | | | | |
| Bilan biochimique | + | | | | | + | Bi-annuel | |
| Chitotriosidase | + | / | / | + | + | + | 1 fois /an | |
| CCL18 | + | / | / | + | + | + | 1 fois /an | |
| Ferritine | + | / | / | + | + | + | 1 fois /an | |
| Bilan radiologique | | | | | | | | |
| IRM ou écho rate, foie | + | / | / | / | / | + | Bi-annuel | |
| IRM rachis, fémur, bassin, tibias ou corps entier | + | / | / | / | / | + | Bi-annuel | |
| Radiographies (rayons X thorax, squelette) | + | Si signes d'appel | | | | | | |
| Ostéodensitométrie | + | / | / | / | + | / | Bi-annuel | |
| EFR, TDM thoracique, Échographie cardio/Doppler, ECG | Si signes d'appel | | | | | | | |
| Evaluation neuropsychiatrique | Si signes d'appel | | | | | | | |
| Qualité de vie | + | | | | + | + | + | Annuel |

Tableau 10: Suivi des patients pédiatriques atteints de maladie de Gaucher de type 1 traités (93)

| | Diagnostic initial | Première année | | | | A2 | A3 | Ax |
|--|--|-------------------|----|----|------------|------------|------------------|----|
| | | J0-M3 | M3 | M6 | M12 | | | |
| Examen clinique | + | / | + | + | Semestriel | Semestriel | Semestriel | |
| Glucocérébrosidase | + | / | / | / | / | / | / | |
| Génotype | + | / | / | / | / | / | / | |
| Myélogramme | Si indication au cours de l'évolution (Ig monoclonale) | | | | | | | |
| Hémogramme | + | / | + | / | Semestriel | Semestriel | Semestriel | |
| Bilan hémostase | + | / | + | + | + | + | + | |
| Bilan biochimique | + | / | / | + | Semestriel | Semestriel | Semestriel | |
| Chitotriosidase | + | / | + | + | Semestriel | Semestriel | Semestriel | |
| CCL18 | + | / | + | + | Semestriel | Semestriel | Semestriel | |
| Ferritine | + | / | + | + | Semestriel | Semestriel | Semestriel | |
| Bilan radiologique | | | | | | | | |
| IRM ou écho rate, foie | + | / | / | + | Semestriel | + | 1 fois/3 ans | |
| IRM rachis, fémur, bassin, tibias ou corps entier | + | / | / | + | / | + | 1 fois/3 à 4 ans | |
| Radiographies (rayons X thorax, squelette) | + | Si signes d'appel | | | | | | |
| Ostéodensitométrie | + | / | / | / | + | / | Bi annuel | |
| EFR, TDM thoracique, Échographie cardio/Doppler, ECG | Si signes d'appel | | | | | | | |
| Evaluation neuropsychiatrique | + | Si signes d'appel | | | | | | |

II.5 Maladie de Fabry

La maladie de Fabry (OMIM : 301500), également appelée maladie d'Anderson-Fabry, ou angiokeratoma corporis diffusum universale, est une maladie héréditaire du métabolisme des sphingolipides de transmission liée au chromosome X. Elle est due à des mutations du gène GLA codant pour l'alpha-galactosidase A, une enzyme lysosomale responsable de l'hydrolyse de glycosphingolipides (124).

Le déficit enzymatique entraîne l'accumulation de Globotriaosyl céramide, appelé Gb₃ dans l'organisme, responsable d'une atteinte progressive multi-systémique, avec manifestations dermatologiques, rénales, cardiaques, gastro-intestinales, et neurologiques.

On identifie des formes dites classiques débutant durant l'enfance ou l'adolescence, et des formes dites non classiques ou tardives (125).

Elle affecte principalement les hommes, mais aussi les femmes, qui ne sont pas uniquement conductrices, mais également symptomatiques, en raison de l'inactivation aléatoire du chromosome X (126).

Le diagnostic est primordial, car des traitements spécifiques sont disponibles et d'autant plus efficaces s'ils sont mis en place précocement (127).

II.5.1 Epidémiologie

La maladie de Fabry (MF) est la maladie de surcharge lysosomale la plus fréquente après la maladie de Gaucher (128).

Elle est panethnique, avec une incidence de 1/40 000 à 1/117 000 dans la population générale, mais les prévalences réelles semblent plus élevées. Son épidémiologie dépend nécessairement des critères diagnostiques utilisés ; cliniques, biochimiques et/ou génétiques, intégrant des programmes de screening génétique néonatal. Les données récentes suggèrent une prévalence comprise entre 1/3000 et 1/22,000 (129).

Il est à noter la fréquence plus importante de la MF en Asie, avec une prévalence estimée de 1/1250 à Taiwan (130).

II.5.2 Trouble Métabolique

La maladie de Fabry est liée à l'absence (forme typique de la maladie) ou à un défaut (variante de la maladie) d'activité d'une enzyme lysosomale, l'alpha Gal A (127).

Il en résulte une accumulation de glycolipides, en premier le globotriaosylcéramide (Gb₃ ou GL₃) et sa forme désacétylée, le lyso-globotriaosylcéramide (lyso-Gb₃) (Figures 9 et 14). Cette accumulation progressive et ubiquitaire, dans les lysosomes, et également au niveau

des membranes plasmiques, est à l'origine des manifestations cliniques multisystémiques, qui apparaissent lorsque l'activité enzymatique est inférieure à 30 % de la normale.(12)

Au niveau cellulaire, l'accumulation lysosomale de Gb3 entraîne premièrement une perturbation du métabolisme énergétique, un dysfonctionnement du canal Ca^{2+} / K^{+} des cellules endothéliales, et un stress oxydatif responsables d'une ischémie puis d'une mort cellulaire.

Secondairement, le processus inflammatoire qui s'installe serait responsable des lésions vasculaires, d'une perturbation de la maturation d'auto-phagocytose et d'une fibrose tissulaire irréversible.

Le Gb3 s'accumule principalement dans les vaisseaux, au niveau de l'endothélium vasculaire et des cellules musculaires lisses. Également au sein des ganglions spinaux et autonomes, du rein (glomérule, tubule et interstitium), du cœur, de la peau ou des cellules endothéliales de la cornée (131).

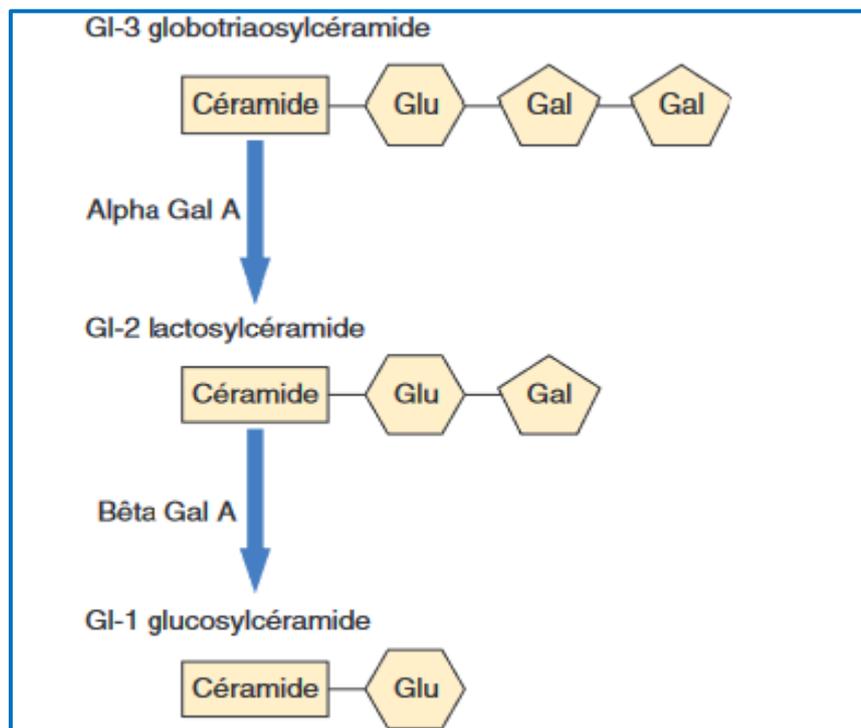


Figure 14: Métabolisme du Globotriaosylcéramide Gb-3 (124)

II.5.3 Génétique

II.5.3.1 Gène GLA

Le gène Galactosidase alpha (GLA), est constitué de sept exons répartis sur une longueur de 12 436 paires de bases sur le bras long du chromosome X, au locus Xq22 (Figure 15).

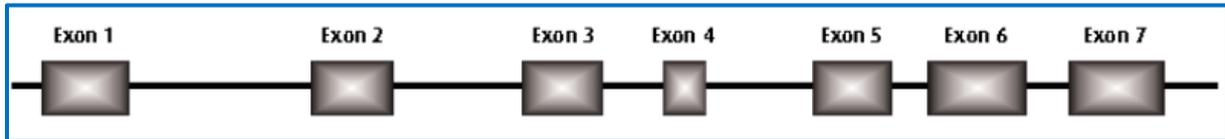


Figure 15: Organisation génomique du gène GLA (132)

Les exons ont une taille comprise entre 92 et 291 paires de bases et les introns entre 200 pb et 3,7 kb. L'exon 1 contient la totalité de la région 5' non-traduite, la séquence codant le peptide signal et les 33 premiers acides aminés de l'enzyme mature (133).

L'ADNc comporte 60 nucléotides de séquence 5' non-traduite, le codon d'initiation et un cadre de lecture ouvert de 1290 pb, codant pour les 31 acides aminés du peptide signal et les 398 résidus de l'enzyme mature. Il a la particularité de ne pas posséder de région 3' non traduite (134).

II.5.3.2 L'enzyme Alpha-galactosidase

L' α -D-galactoside galactohydrolase (EC 3.2.1.22) est une enzyme lysosomale d'environ 101 kDa. Cette enzyme est un homodimère (135). Chaque monomère est constitué de 398 acides aminés et possède un site actif. Les deux résidus d'acide aspartique en position 170 et 231 constituent le site catalytique qui permet de libérer l' α -galactose du substrat de l'enzyme (Figure 16).

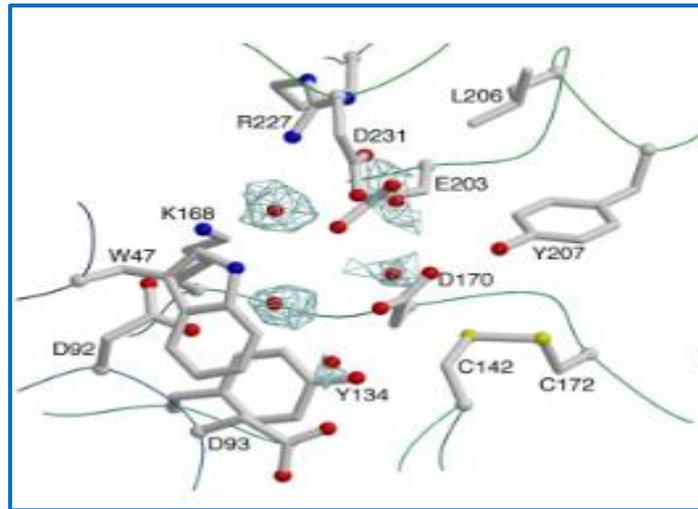


Figure 16: Structure 3D de l' α -galactosidase A (135)

L'enzyme est synthétisée sous la forme d'un précurseur polypeptidique de 429 acides aminés, dont les 31 premiers constituent le peptide signal qui est clivé dans le réticulum endoplasmique. L' α -Gal A subit des modifications post-traductionnelles dans l'appareil de Golgi ; au niveau du compartiment cis-golgi, la N-glycosylation de l'enzyme permet l'acquisition des résidus mannose-6-phosphate (M6P). Le complexe M6P-enzyme se lie au récepteur M6P, cette liaison permet le transport de l'enzyme vers l'endosome. À ce niveau, le pH acide permet de dissocier l'enzyme du récepteur M6P. Au final, la déphosphorylation de l'enzyme permet d'obtenir une enzyme mature et fonctionnelle (136).

Les patients ayant une activité enzymatique nulle ou effondrée, ont généralement un phénotype plus sévère, et les patients ayant une activité résiduelle ont plutôt des phénotypes plus atténués (non classiques ou tardifs) (137).

II.5.3.3 Mutations

1154 mutations ont été rapportées (40). Pour leur majorité, elles sont des mutations de novo et présentes dans une seule famille. La présence d'un variant non pathogène du gène GLA est rapportée chez 12 % de la population (133).

Les mutations sont réparties comme suit :

- Mutations ponctuelles :
 - 775 mutations Faux-sens, non-sens
 - 55 mutations au niveau de site d'épissage
 - 9 mutations impliquées dans le site de régulation de l'expression de l'enzyme
- 174 Petites délétions
- 60 petites insertions

- 21 petites insertion-délétions
- 43 grosses délétions
- 9 grosses insertions
- 9 mutations complexes

Il n'y a pas de corrélation claire entre génotype et phénotype et on observe des phénotypes de sévérité différente au sein d'une même famille. Néanmoins, certaines mutations sont classiquement associées à des formes sévères (129).

Les mutations non-sens au niveau des sites d'épissage ou à l'origine d'un décalage du cadre de lecture sont généralement à l'origine d'une activité enzymatique nulle ou très abaissée et aux phénotypes de MF classique.

Les mutations faux sens sont généralement associées à une activité enzymatique résiduelle abaissée, mais non effondrée et donc à l'origine de phénotypes cliniques plus modérés (138).

II.5.3.4 Transmission génétique de la maladie de Fabry

La transmission génétique de la maladie de Fabry est dite « liée au chromosome X ». Les hommes hémizygotés mutés sont atteints, et les femmes dites « conductrices » peuvent être atteintes (y compris de formes sévères) par biais d'inactivation du chromosome X (126).

L'homme malade n'a aucun risque de transmettre la maladie de Fabry à ses fils, par contre, toutes les filles de cet homme atteint seront hétérozygotes, conductrices de la maladie et parfois symptomatiques.

Une femme hétérozygote transmet la maladie à la moitié de ces fils, et la moitié des filles sont hétérozygotes (Figure 17).

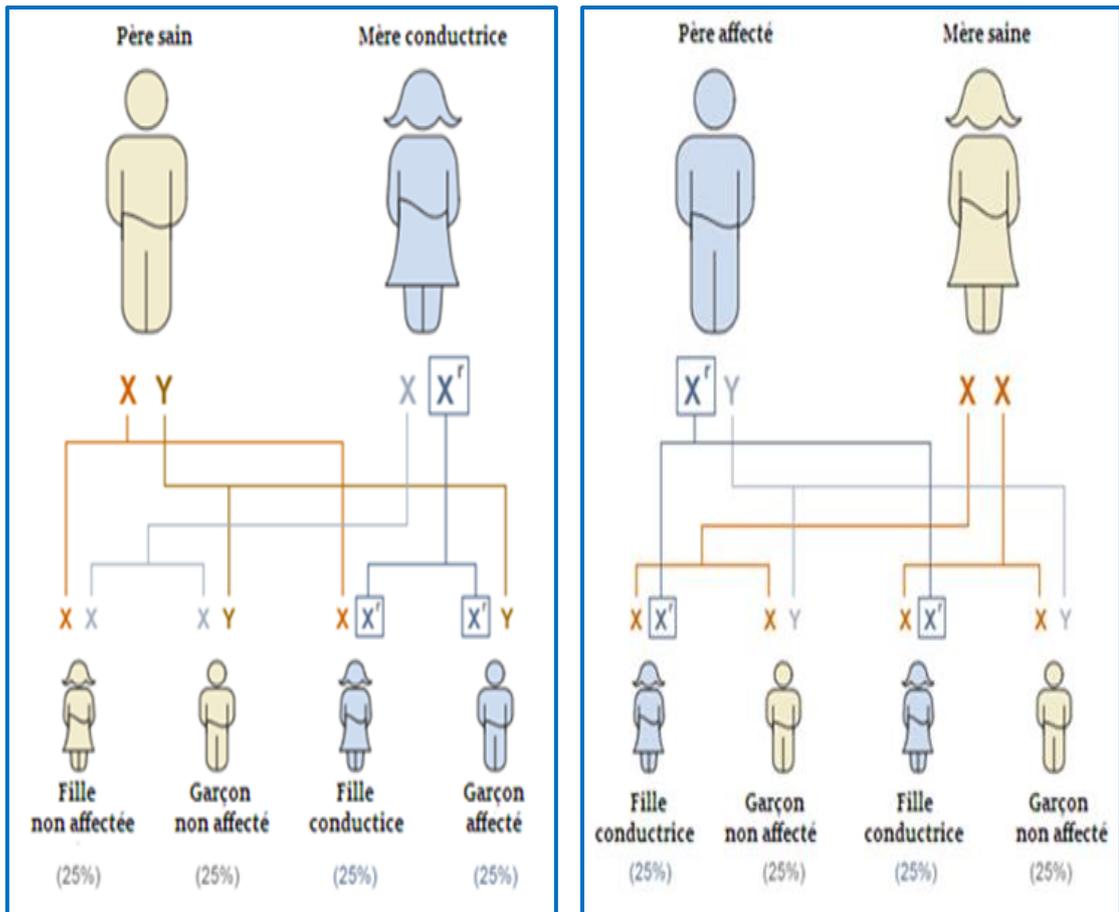


Figure 17: Ségrégation du mode de transmission lié à l'X
 A - Cas de mère conductrice/ B- Cas de père atteint

II.5.4 Manifestations et formes cliniques

La MF peut être suspectée chez des patients présentant un tableau systémique, mais également en cas d'atteinte isolée d'organes (139).

L'âge moyen d'apparition des symptômes est de 3 et 10 ans pour les garçons, et entre 6 et 15 ans pour les filles (140).

En général, les neuropathies périphériques, ainsi que les manifestations dermatologiques et ophtalmologiques, apparaissent dès la petite enfance alors que les atteintes neurologiques, rénales et cardiaques, se révèlent à un âge plus avancé (141).

Les causes de décès les plus fréquentes sont cardiaques (50 %), cérébro-vasculaires (12 %) et rénales (10 %), avec un âge moyen de 55 ans chez les hommes et 70 ans chez les femmes. Les décès de cause infectieuse sont également fréquents (142).

La figure 35 illustre les principales manifestations cliniques (précoces et tardives) rencontrées au cours de la maladie de Fabry.

Dans la maladie de Fabry, 3 formes cliniques (classique, atypique et forme de la femme) sont à distinguer (131).

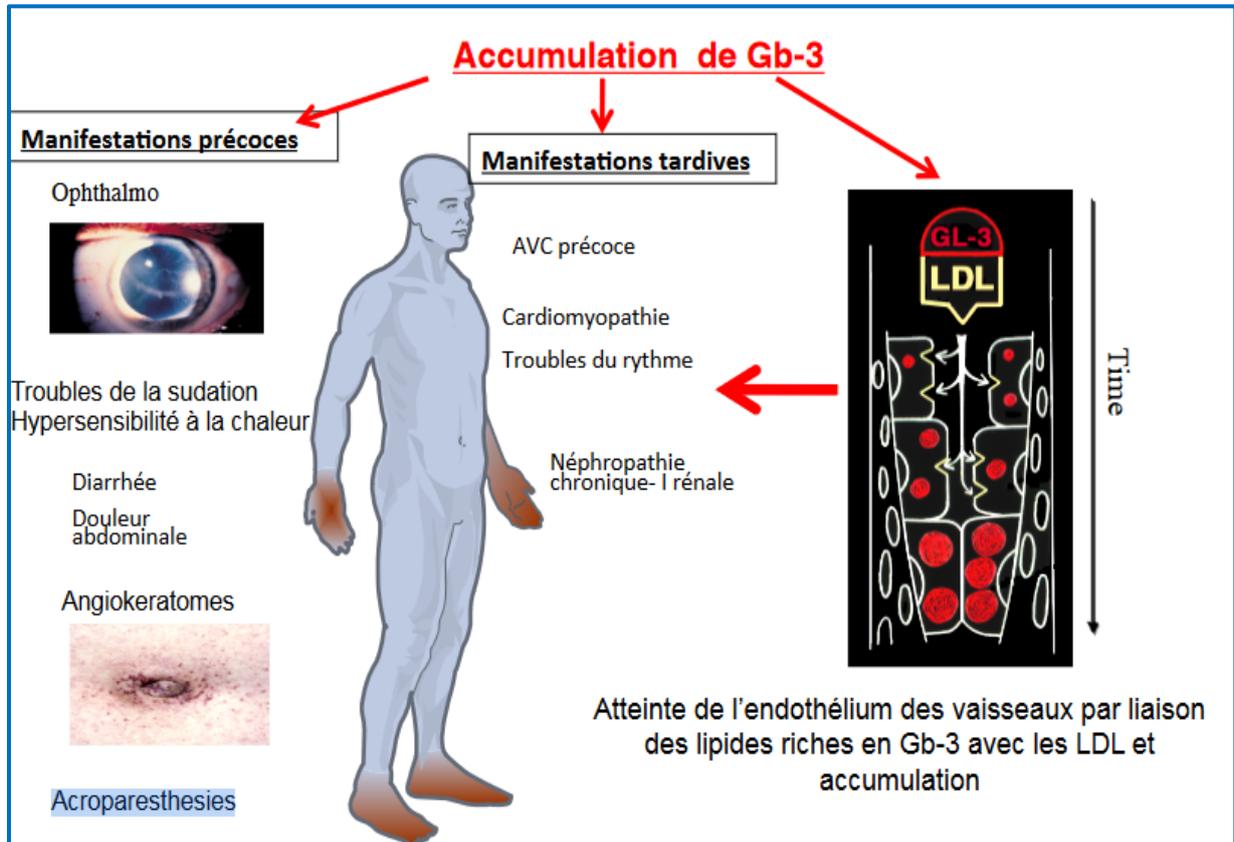


Figure 18: Principales manifestations cliniques de la maladie de Fabry

- **Maladie de Fabry classique**

Elle se développe chez les hommes qui ont un déficit complet en alpha Gal A ou résiduelle (<3%). Les premières manifestations cliniques apparaissent habituellement dès l'enfance ou à l'adolescence. Les patients atteints d'une forme classique présentent généralement le tableau clinique habituel et précoce de la MF avec les acroparesthésies, la cornée verticillée et les angiokératomes. Surviennent ensuite la cardiopathie hypertrophique, l'atteinte rénale progressive et les événements neurovasculaires. Les formes sévères sont fréquentes, mais surviennent habituellement plus tardivement, avec un décalage de 10 à 20 ans (143).

- **Maladie de Fabry atypique**

Elle est dite forme tardive. Elle présente un phénotype plus modéré, avec une activité enzymatique résiduelle plus importante, mais inférieure à 30 % chez l'homme.

Il s'agit fréquemment de patients diagnostiqués au sein de populations ciblées (AVC, insuffisance rénale, CMH) d'étiologie indéterminée, avec un phénotype plus restreint, moins systémique.

L'âge moyen du diagnostic est estimé à 40 ans chez l'homme (144).

- **Maladie de Fabry affectant la femme**

Les femmes sont actuellement reconnues comme pouvant être atteintes avec une pénétrance variable. 70% d'entre elles présentent une cornée verticillée, dont la présence est très utile pour le dépistage.

Les acroparesthésies et les angiokératomes sont observés dans 10 et 40% des femmes respectivement.

Des formes sévères évoluant vers la cardiomyopathie et l'insuffisance rénale terminale s'observent chez moins de 1 % d'entre elles (145).

II.5.5 Diagnostic

Le diagnostic de la MF est le plus souvent tardif. Il est posé au minimum 3 ans après l'apparition des premiers symptômes. Savoir évoquer et diagnostiquer la MF reste un enjeu important au sein des services de dermatologie, de cardiologie, de pédiatrie, de médecine interne et d'ophtalmologie évitant l'installation de lésions irréversibles non accessibles au traitement proposé.

II.5.5.1 Présomption clinique

Le clinicien doit systématiquement penser à la MF devant un sujet jeune présentant des signes cliniques de la MF inexplicables. Le caractère progressif et hétérogène des manifestations de cette maladie rare, et la coexistence fréquente d'une atteinte systémique et de signes généraux non spécifiques, rendent en effet le diagnostic clinique difficile (146).

Les angiokératomes sont toujours le signe d'un phénotype de MF classique (mais leur absence de l'élimine pas). Un algorithme diagnostique pratique est résumé à la figure 19.

En présence de symptômes et/ou de signes cliniques suggestifs de la maladie, la constitution d'un arbre généalogique permet de rechercher les éléments évocateurs d'une affection héréditaire à transmission liée à l'X.

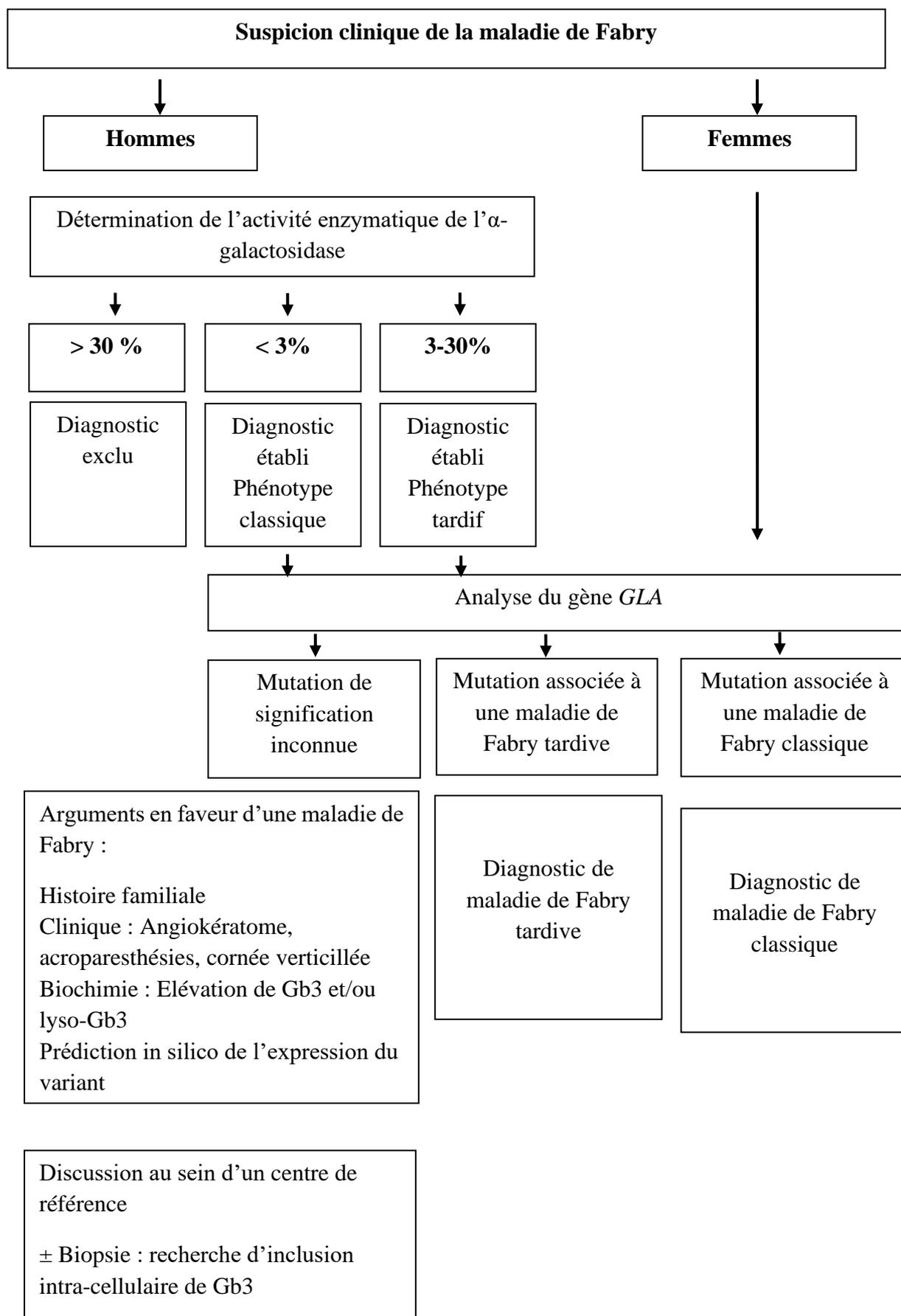


Figure 19: Algorithme diagnostique de la maladie de Fabry chez l'homme et la femme (125).

II.5.5.1 Mesure de l'activité enzymatique de l' α -galactosidase

La détermination de l'activité α -Gal A est la méthode de référence pour la confirmation diagnostique des hémizygotés. Elle permet aussi de distinguer les hémizygotés atteints des variants de la maladie, qui ont une activité α -Gal A résiduelle allant de 3 à 30 % de la normale.

L'identification des femmes conductrices de la maladie par l'enzymologie est beaucoup moins fiable, les hétérozygotés présentent des valeurs intermédiaires, allant théoriquement de zéro à la normale. Chez la femme atteinte de forme classique, le dosage est normal dans la moitié des cas (147)

Le déficit enzymatique en α -Gal A peut être mis en évidence dans :

- Les leucocytes
- Les fibroblastes cutanés en culture
- Les villosités choriales.
- Liquide amniotique
- Une goutte de sang fixée sur papier buvard.

La mesure de l'activité enzymatique de l' α -Gal A est réalisée par :

- **Mesure fluorométrique** : l' α -Gal A catalyse l'hydrolyse d'un substrat artificiel, le 4-méthylumbelliféryl- α -D-galactopyranoside.

La spécificité de la réaction enzymatique est améliorée par l'addition de la N-acétyl D-galactosamine, qui inhibe l' α -N-acétyl galactosaminidase (147).

- **Spectrométrie de masse** : technique très sensible et spécifique, réalisée sur DBS.

II.5.5.2 Dosage des céramides urinaires

Comme pour la plupart des pathologies de surcharge lysosomale, la mesure du substrat accumulé est proposée dans le diagnostic d'orientation et le suivi après traitement. Le globotriaosylcéramide (Gb3) et le globotriaosylsphingosine (lysoGb3) sont les candidats utilisés en pratique.

- **Globotriaosylcéramide (Gb3)**

Le Gb3 urinaire, plasmatique, ou tissulaire a servi de marqueur diagnostique de la MF (148). Le Gb3 urinaire provenant de la desquamation des cellules tubulaires rénales s'est révélé plus élevé chez le patient au phénotype classique, mais peut être normal chez certaines femmes hétérozygotés (149).

Son dosage est effectué par :

- Mesure sur sédiment des urines de 24h par chromatographie sur couche mince, ou par HPLC.
- Spectrométrie de masse en tandem, technique sensible et spécifique qui permet le dosage sur les urines fraîches du matin.

Le résultat du Gb3 total est ensuite rapporté à la créatinine urinaire.

Il s'est révélé non utile, pour le suivi des patients sous traitement, par manque de corrélation entre les taux de Gb3 et la clinique. Son tend à être abandonné, en dehors de la phase de diagnostic.

- **Globotriaosylsphingosine (lysoGb3)**

Sa mesure plasmatique est plus sensible et spécifique. Son dosage est effectué par UPLC-MS/MS (147).

La concentration plasmatique de lyso-Gb3 est corrélée à la sévérité du phénotype, puisqu'indépendamment associée à la créatinine. Une concentration élevée suggère un phénotype classique. Elle décroît sous traitement et représente le marqueur adopté pour le suivi thérapeutique des patients.

Chez la femme, le lyso-Gb3 s'élève dans 40 à 60 % des cas. La mesure combinée de l' α -Gal A et du lyso-Gb3 plasmatique augmente la valeur diagnostique chez les femmes adultes symptomatiques.

Cependant, le lyso-Gb3 plasmatique est parfois normal en cas de variant cardiaque (150).

II.5.5.3 Analyse du gène GLA

L'analyse complète du gène GLA comprend les sept exons et les jonctions exons-introns. Elle est réalisée par le séquençage Sanger, ou actuellement par NGS dans un panel d'analyse de maladies lysosomales. Elle est proposée en seconde intention chez l'hémizyote après détermination de l'activité enzymatique (133).

Si le cas index familial est une femme, la confirmation du diagnostic se base sur les résultats du test génétique.

Il existe une variabilité phénotypique pour une même mutation, mais certaines sont associées aux formes classiques et d'autres aux formes tardives (151).

L'identification de la mutation responsable, est le point de départ pour la réalisation de l'**enquête familiale**, qui permet d'affirmer ou d'exclure le diagnostic chez les apparentés, par l'identification du statut génétique (152).

Au sein de la famille d'un patient ayant une maladie de Fabry, un **diagnostic prénatal** peut être effectué à partir d'un prélèvement de villosités chorales (entre la 9-10^e semaine de grossesse) ou d'une culture de cellules amniotiques obtenues par amniocentèse (entre la 13-15^e semaine de grossesse) (153).

Il est à signaler que dans les cas de discordance clinico--biologique, notamment en présence d'un phénotype tardif restreint à une atteinte d'organe avec une mutation de signification indéterminée et une concentration de lyso-Gb3 plasmatique non concluante, le recours à une biopsie cutanée ou rénale est souvent proposé.

La mise en évidence, à l'examen anatomo-pathologique, de dépôts glycolipidiques de Gb3, d'une micro-vacuolisation cellulaire et surtout d'inclusions denses intracellulaires ou figures myéliniques sont des signes révélateurs de la MF (154).

II.5.6 Traitement

La prise en charge de la MF est multidisciplinaire et spécialisée. Les objectifs de la prise en charge visent à améliorer, ou ralentir l'évolution de la maladie et de prévenir les complications.

Il n'existe pas de traitement curatif de la MF. Les moyens disponibles reposent sur l'enzymothérapie substitutive, la substance chaperonne et la médication symptomatique couvrant les atteintes organiques induites par la maladie.

- L'enzymothérapie substitutive

Elle correspond à l' α -galactosidase A recombinante, disponible sous deux formulations distinctes commercialisées par deux laboratoires différents.

- **L'agalsidase alpha** (REPLAGAL - laboratoires Shire) 1 mg/mL (solution à diluer pour perfusion), administrée à 0,2 mg/kg, une semaine sur deux, en perfusion intraveineuse de 40 minutes.
- **L'agalsidase bêta** (FABRAZYME - Société Genzyme) 35 mg (poudre pour solution à diluer pour perfusion), administrée par voie veineuse à 1 mg/kg, une semaine sur deux.

Elle est indiquée :

- Chez l'homme atteint de forme classique. Elle est introduite à partir de 18 ans, même en l'absence de symptômes.
- Chez l'homme hémizygoté et la femme hétérozygote atteints de la forme à révélation plus tardive. L'instauration du traitement ne sera pas systématique avant l'âge de 35/ 40 ans respectivement, et devra être discuté en fonction du bilan clinique et biologique.
- Chez le garçon porteur d'une forme classique de la maladie de Fabry à partir de l'âge de 7 ou 8 ans (131).

L'enzymothérapie substitutive réduit significativement les concentrations de Gb-3 et de lyso-Gb3 plasmatiques, urinaires et tissulaires dans la peau, le cœur et le rein.

Elle est efficace sur la diminution du débit de filtration glomérulaire chez les patients ayant une atteinte débutante (protéinurie $\leq 0,5$ g/24 h), et âgés de moins de 40 ans. Sur l'atteinte cardiaque, elle a montré la réduction et la stabilisation de l'HVG. La masse cardiaque diminue chez les patients de moins de 30 ans, se stabilise chez les patients de moins de 40 ans, mais reste inchangée chez les patients de plus de 50 ans (155).

Elle améliore la qualité de vie, par action sur les symptômes gastro-intestinaux et les manifestations douloureuses.

Un traitement précoce reste indispensable pour atteindre les buts thérapeutiques. Cependant le traitement à long terme induit l'apparition d'anticorps IgG anti-agalsidase (140).

- **Molécule chaperonne**
- **Le Migalastat**, Galafold (Amicus Therapeutics) est une molécule chaperonne orale qui se lie à l' α -Gal A au sein du réticulum endoplasmique, stabilise l'enzyme, prévient sa dégradation, améliore son adressage vers le lysosome et potentialise son activité enzymatique (156).

Le Migalastat est un traitement oral, administré à la dose fixe de 123 mg, tous les 2 jours, chez l'adulte âgé de plus de 16 ans et avec un débit de filtration glomérulaire supérieur à 30 mL/min/1,73m² (156).

Il est administré uniquement pour des patients présentant des mutations bien identifiées du gène GLA, limitant son utilisation à un tiers des patients. Il s'agit de mutations qui préservent la synthèse de la protéine, mais avec une instabilité chimique, ce qui empêche son acheminement intra-lysosomal nécessaire à la fonction enzymatique (140).

Ce médicament ne doit pas être utilisé en association avec un traitement enzymatique substitutif.

II.5.7 Pronostic de la maladie

La maladie de Fabry est une erreur héréditaire du métabolisme rare et souvent sous-diagnostiquée. L'espérance de vie est diminuée de 20 ans en moyenne pour les hommes et de 10 ans pour les femmes.

Le pronostic vital est lié à l'IR terminale, la nécessité de dialyse, de greffe, de survenue d'AVC, et des complications cardiaques.

Des traitements spécifiques sont disponibles, permettant d'améliorer ou de stabiliser les atteintes d'organes. Leur efficacité reste conditionnée par la précocité de leur instauration (157).

Deuxième partie

Présentation de notre travail

Matériel et Méthodes

Deuxième partie : Présentation de notre travail

I. Matériel et Méthodes

I.1 Type d'étude

Il s'agit d'une étude descriptive transversale prospective, réalisée au Laboratoire Central de Biochimie du CHU Mustapha d'Alger. L'ensemble des dosages a été réalisé au sein même de notre service par les équipements et les protocoles de mesure dont nous disposons. La présente étude couvre une période allant de Mars 2018 à Mai 2022.

I.2 Instrumentation

- Centrifugeuse de paillasse Eppendorf
- Centrifugeuse réfrigérée pour plaque Sigma 3-16P
- Agitateur type vortex thermoscientific
- Agitateur magnétique chauffant Stirrer
- Machine à glace Brema
- Congélateur -80°C et -20°C
- Micro-ondes Samsung
- Appareil de désionisation, à eau ultra-pure Elga
- Hotte à flux laminaire pour PCR Captair Bio
- Balance de précision Sartorius
- pH-mètre hanna instruments
- Jeux de micropipettes réglables et fixes avec leurs portoirs Eppendorf (10,20,100, 200 et 1000 µl)
- Extracteur automatique Maxwell MDX 16 Promega.
- Spectrophotomètre ADN/ARN Eppendorf Biophotometer
- Thermocycleur: Biorad T100
- Speed vac Savant DNA 120 Concentrator
- Cuve d'électrophorèse avec générateur de courant : Biorad Power Pac Universal
- Lecteur UV pour gel Biorad
- Séquenceur automatique 3130 Applied Biosystems

I.3 Réactifs et consommables

I.3.1 Réactifs

A- Paramètres biochimiques

Il s'agit de réactifs préparés au laboratoire, à partir de produits chimiques. Le protocole de préparation sera cité lors de la description de la méthode de mesure.

B- Analyse génétique

- Kit d'extraction d'ADN (Maxwell®16; Promega)
- Kit DNA polymérase pour réaction PCR (Qiagen Hot Start Polymerase), il contient :
 - Tampon (Buffer) 10 X
 - MgCl₂ 25 mM
 - Solution Q
 - dNTP (A-T-C-G) 100 mM
 - Taq polymérase 5 U/μl
- Kit de purification de produits PCR : ExoSap-it
- Amorces spécifiques pour chaque partie codante du gène étudié (annexe III, V, VII)
- Kit de séquençage Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), il contient :
 - BigDye 3.1(5X)
 - Tampon (10X)
- Réactifs pour séquenceur 3130 Applied Biosystems : Polymère (Pop 7 Applied Biosystem), et tampon (Buffer, EDTA 10X Applied Biosystems)
- Agarose et tampon d'électrophorèse
- Sephadex G50 fine

I.3.2 Consommables

- Gants en latex
- Embouts pour pipettes et micropipettes de différents volumes.
- Tubes eppendorf de 1,5 et 2 ml.
- Tubes falcons de 15 et 50 ml.
- Barrettes PCR et couvercle 0.8 μl
- Consommables pour séquenceur : Plaque de 96 puits, Capillaires
- Plaque ELISA noire
- Parafilm

I.4 Traitement des données

I.4.1 Saisie des données

Automatique, en utilisant un fichier Excel 2010 pour répertorier l'ensemble des patients.

Chaque patient s'est vu attribué un numéro de famille, et un numéro d'ADN relatif au prélèvement.

I.5 Analyse statistique

La saisie et l'analyse statistique des données ont été réalisées par l'utilisation du logiciel SPSS 21.1 (Statistical Package For the Social Science). Les variables numériques ont été exprimées en moyenne \pm écart type. La comparaison des différentes variables a été réalisée en utilisant pour :

a- Les tests paramétriques :

- Test t de student : pour la comparaison de deux moyennes avec homogénéité des variances.
- Test Anova : pour la comparaison de plusieurs moyennes avec homogénéité des variances.

b- Les tests non-paramétriques :

- Test de Wilcoxon-Mann-Whitney : pour la comparaison de deux moyennes avec hétérogénéité des variances.
- Test de Kruskal Wallis : pour la comparaison de plusieurs moyennes avec hétérogénéité des variances.

Le test du khi-deux χ^2 a été employé pour comparer la fréquence de variables qualitatives. Les variables suivent une loi normale.

- La formule de calcul de l'échantillonnage à étudier prévue pour l'enquête, est celle de Schwartz (158), qui stipule : $N = \frac{\epsilon^2 \cdot P_0 \cdot q_0}{i^2}$

$\epsilon^2 = 4$ pour un risque d'erreur de 5% ; N : Taille de la population

P_0 : Prévalence de la déficience ; $q_0 = 1 - P_0$ (non déficients)

i : Degré de précision retenue à 5%

Son utilisation autorise un recrutement minimum d'un patient/maladie.

Le risque d'erreur consenti pour ces différentes analyses statistiques est de 5% et les résultats seront donc exprimés dans un intervalle de confiance de 95%.

I.6 Patients

Nous avons traité pendant cette période un nombre de demandes pour suspicion de maladie de Wilson, Gaucher et Fabry correspondant à 2208, 1130, et 25 prescriptions pour le bilan cuprique, et la détermination d'activité enzymatique α -glucocérébrosidase, et β -galactosidase.

Le recrutement des patients pour le test génétique, a été réalisé sur un ensemble total de **226 patients** répartis comme suit :

- 41 Malades Wilson et 83 apparentés
- 30 Malades Gaucher et 52 apparentés
- 4 Malades Fabry et 16 apparentés

Les prescriptions ont été adressées par les services de Pédiatrie, Neurologie, Gastro-entérologie, Hépatologie et de Médecine Interne sans distinction régionale.

I.6.1 Critères d'inclusion :

- Patients dont le diagnostic biochimique phénotypique, réalisé dans notre service, objective :
 - Une maladie de Gaucher avec une activité de β -Glucocérébrosidase inférieure à 30% la normale (valeur normale = 3-8 nmol/h/mg de protéines).
 - Une maladie de Fabry avec une activité de α -Galactosidase inférieure à 25-55 nmol/h/mg de protéines.
 - Une maladie de Wilson avec une perturbation du bilan cuprique montrant une céruléoplasmine plasmatique $< 1,65 \mu\text{mol/l}$, une cuprémie $< 10 \mu\text{mol/l}$, et une cupriurie $> 30 \mu\text{mol/24h}$.
- Parents et fratrie du cas diagnostiqué (Gaucher, ou Fabry, ou Wilson).
- Membres de la branche maternelle du cas diagnostiqué Fabry.

I.6.2 Critères d'exclusion :

- Patients ne souhaitant pas participer à l'étude génétique.

I.7 Organisation de l'étude

I.7.1 Arbre généalogique et enquêtes familiales

Un arbre généalogique complet était systématiquement établi pour chaque patient, dans le but de vérifier le mode de transmission de la maladie suspectée, et de reprendre l'histoire familiale de la maladie. On identifie ainsi la présence de cas similaires au sein de la même famille, et la notion de décès dans le même contexte clinique.

Après validation du bilan biochimique, chaque patient identifié atteint de la maladie de Wilson, Gaucher, ou Fabry, bénéficie systématiquement d'une analyse moléculaire du gène incriminé.

Une enquête familiale est secondairement réalisée, par le recrutement de l'ensemble des membres de sa famille (Parents, et fratrie) pour l'analyse génétique.

Une fiche de renseignement qui regroupe l'ensemble des informations relatives aux patients, a été établie, elle doit être dûment remplie et accompagnée de l'arbre généalogique (Annexe I).

I.7.2 Prélèvement et conditions pré-analytiques

I.7.2.1 Mesure biochimique

I.7.2.1.1 Maladie de Wilson

- Deux tubes contenant l'héparine de lithium comme anticoagulant pour le dosage de la céruléoplasmine et la cuprémie.
- Collecte des urines de 24 heures pour le dosage de la cupriurie. (Flacon propre sans conservateur)

Le recueil du plasma s'effectue après centrifugation, et une conservation à -20°C est requise, si le dosage est différé.

Une mesure de la diurèse des 24 heures est réalisée, avec récolte d'échantillon, et conservation à -20°C.

I.7.2.1.2 Maladie de Gaucher/Fabry

a- Mesure des activités enzymatiques intra-leucocytaires

Deux tubes contenant EDTA comme anticoagulant

- Recueil du culot leucocytaire :

L'extraction des globules blancs se fera le même jour du prélèvement ; par la méthode au plasmagel, qui comprend les étapes suivantes :

- Transvaser la quantité contenue dans les deux tubes EDTA dans un tube en verre.
- Ajouter 2 volumes (20ml) de plasmagel.

Mélanger par retournement plusieurs fois, et laisser décanter entre 45 à 60 min à 37 °C dans un incubateur.

- Transvaser le surnageant dans un tube sec de 10 ml, à l'aide d'une pipette

Centrifuger 5 minutes à 2500 tours/min

- Jeter le surnageant, et garder le culot rougeâtre
- Reprendre le culot avec du NH₄cl jusqu'à 10 ml

Homogénéiser et incuber pendant 15 à 30 min à 37 °C

- Centrifuger 5 min à 3000 tours/min
- Jeter le surnageant, si le culot est blanchâtre (si culot rouge, effectuer un dernier lavage avec de l'eau physiologique)
- Conservation du culot leucocytaire sec à -20°C jusqu'à exécution de l'analyse.
- Avant l'analyse, reprendre le culot avec 500µl de Triton X-100 à 0.025%

Détermination du taux de protides du culot leucocytaire par la méthode de Lowry, il doit être compris entre 2 et 5 g/l.

b- Dosage de la chitotriosidase

Plasma récupéré immédiatement, après centrifugation sur sang total prélevé sur tube EDTA

I.7.2.2 Analyse moléculaire

Chaque patient adulte, ou le tuteur légal (cas des enfants), signe un consentement éclairé, après avoir reçu les explications concernant les principales indications du test génétique. (Annexe II)

Le prélèvement est réalisé sur un tube contenant EDTA comme anticoagulant. Les prélèvements (sang total) peuvent être conservé maximum 48 Heures à +4°C.

I.7.3 Diagnostic biochimique de confirmation

Tous les dosages de confirmation ont été effectués dans notre service.

Il s'agit de la première étape nécessaire au recrutement des patients, destinés à l'analyse moléculaire des gènes.

I.7.3.1 Maladie de Wilson :

I.7.3.1.1 La détermination de l'activité oxydative cuivre dépendante de la céruloplasmine

a- Principe

Le dosage de la céruloplasmine par méthode enzymatique colorimétrique à la PPDA comme substrat, est une technique permettant d'évaluer l'activité oxydative de la céruloplasmine par la détermination spécifique des taux d'holocéruloplasmine, en suivant l'oxydation du PPDA par spectrophotométrie à **546nm**.

b- Réactif

- Tampon acétate de sodium 194 mM-pH 5.6
- Substrat p-phénylène-diamine : Ajuster pH à 5,6
 - PPDA,Hcl : 0.25 mM
 - PPDA, pur 0.2 mM
 - Tampon acétate
- Azide de sodium

c- Mode opératoire

En présence du tampon acétate de sodium, un substrat le PPDA, à pH 5.6 et une température de 37°C, la céruléoplasmine présente dans le plasma oxyde le PPDA. Après l'arrêt de la réaction par l'addition de l'azide de sodium, on effectue la lecture de l'intensité de la coloration par le **spectrophotomètre** à une longueur d'onde **546nm**.

Tableau 11: Mode opératoire du dosage de la céruléoplasmine

| | Blanc | Echantillon |
|---|--------------|--------------------|
| Echantillon (µl) | 20 | 20 |
| Azide de sodium (µl) | 200 | - |
| Substrat (µl) | 1000 | 1000 |
| Mélanger, incuber 15 min à 37°C | | |
| Azide de sodium (µl) | - | 200 |
| Mélanger, incuber 15 min à Température ambiante Lire l'extinction au spectrophotomètre contre le blanc échantillon à 546 nm | | |

Céruléoplasmine (µmol/l) = (Do dosage - Do blanc) ×15.76

I.7.3.1.2 Dosage du cuivre plasmatique et urinaire par méthode colorimétrique à la bathocuproïne

a- Principe

Le dosage du cuivre plasmatique et urinaire par méthode colorimétrique repose sur les propriétés d'absorption du cuivre cuivreux Cu^+ complexé à la bathocuproïne.

b- Réactif

- **Solution réductrice :**

- Hydroquinone 90 mmol/l
- Hcl 1N

- **Solution d'acide trichloroacétique 20%**

- **Réactif de révélation :**

- Acide bathocuproïne disulfonique, sel disodique : 0.9 mmol
- Acétate d'ammonium 3 mmol/l

- **Etalon de cuivre : 31.5 $\mu\text{mol/l}$**

c- Mode opératoire

En milieu acide, le cuivre lié à la céruloplasmine est libéré, en présence d'une solution réductrice d'hydroquinone, le Cu^{+2} (cuivrique) est réduit en Cu^+ (cuivreux).

Après déprotéinisation avec l'acide trichloroacétique (à 20%) et récupération du surnageant, le cuivre cuivreux réagit avec la bathocuproïne sulfoné, et forme un complexe coloré jaune orange, lu à **480nm**. L'absorbance est directement proportionnelle à la concentration du cuivre dans l'échantillon. Au niveau des urines, le dosage s'effectue sans déprotéinisation si la protéinurie est négative.

Tableau 12: Mode opératoire du dosage du cuivre

| | Blanc | Etalon | Echantillon |
|---|--------------|---------------|--------------------|
| Eau distillée (µl) | 1000 | - | - |
| Etalon (µl) | - | 1000 | - |
| Echantillon (µl) | - | - | 1000 |
| Solution réductrice (µl) | 500 | 500 | 500 |
| Mélanger, laisser reposer 20 min à T° ambiante | | | |
| TCA (µl) | 500 | 500 | 500 |
| Mélanger, centrifuger, continuer le dosage dans des tubes secs | | | |
| Surnagent (µl) | 1000 | 1000 | 1000 |
| Batocuproïne (µl) | 500 | 500 | 500 |
| Mélanger, incuber 5 min à 37°C | | | |
| Lire l'extinction au spectrophotomètre contre le blanc échantillon à 480 nm | | | |

Cuivre (µmol/l) = (Do dosage-Do étalon) × 31.5

I.7.3.2 Maladie de Gaucher

I.7.3.2.1 Détermination de l'activité enzymatique de la β-glucocérébrosidase

a- Principe

Détermination de l'activité enzymatique de la β-glucocérébrosidase acide intraleucocytaire par technique fluorométrique, en utilisant un substrat synthétique la 4 Méthyl-umbelliféryl-β- D- Glucopyranoside à 37°C et à pH 5,5.

b- Réactif

- Tampon :

- Tampon citrate-phosphate 0.2 M pH= 5.5
 - Acide citrique 0.2 mol/l
 - Dihydrogénophosphate de sodium, dihydraté 0.2mol/l
- Tampon glycine 1 M pH= 10 (tampon d'arrêt)

- Substrat :

- 4 Méthyl-umbelliféryl-β-D- Glucopyranoside 5 Mm (à diluer dans le tampon citrate phosphate)
- 1% taurocholate

- **Etalon** : 4 Méthyl-umbelliférone 10 nmol/ml

c- Mode opératoire

La β -Glucosidase hydrolyse le substrat 4 Méthylumbelliféryl β -D- Glucopyranoside à 37°C pH 5,5, en 4 Méthylumbelliférone et β -D Glucopyranoside .

Après arrêt de la réaction par addition du tampon glycine pH 10, une détermination de la fluorescence du 4 Méthylumbelliférone libéré sera faite comparativement à un étalon à 366/ 446nm.

Tableau 13: Dosage de la β -glucocérebrosidase

| | Blanc | Etalon | Echantillon |
|---|--------------|---------------|--------------------|
| Culot leucocytaire (µl) | - | - | - |
| Etalon (µl) | - | 10 | 10 |
| Eau distillée | 10 | - | - |
| Substrat (µl) | 50 | 50 | 50 |
| Incubation 1 heure à 37°C sous agitation | | | |
| Tampon glycine carbonate (µl) | 200 | 200 | 200 |
| Lecture au fluorimètre $\lambda_{excitation}=366/ \lambda_{émission}=446nm$. | | | |

Les résultats sont exprimés en nmol / Heure / mg de protéines.

I.7.3.2.2 Détermination de l'activité de la chitotriosidase

a- Principe

Le substrat fluorogénique, constitué de 4-méthylumbelliférone (4-Mu) liée à du β -D-tri-acétyl-chitotrioside, libère la 4-méthylumbelliférone sous l'action de la chitotriosidase contenue dans le plasma. La 4-MU ainsi libérée émet, à pH alcalin, une fluorescence proportionnelle à l'activité enzymatique contenue dans le plasma.

b- Réactif

- **Tampon :**

- Tampon acétate 1 M, pH= 4.5
- Tampon carbonate/ bicarbonate 0.5 M/ 0.5 M, pH= 10.6 (tampon d'arrêt)

- **Substrat :**
 - 4 Méthyl-umbelliféryl- β -D-N,N',N''-triacétylchitotrioside (à diluer dans le tampon acétate)
- **Etalon :** 4 Méthyl-umbellifénone 10 nmol/ml

c- Mode opératoire

Etape préalable : Diluer les échantillons de plasma au 1/10^{ème}, dans une solution d'albumine 2 g/l

Tableau 14: Dosage de la chitotriosidase

| | Blanc | Etalon | Echantillon |
|---|--------------|---------------|--------------------|
| Plasma (μl) | - | - | - |
| Etalon (μl) | - | 2 | 2 |
| Eau distillée | 2 | - | - |
| Substrat (μl) | 40 | 40 | 40 |
| Incubation 1 heure à 37°C sous agitation | | | |
| Tampon carbonate bicarbonate(μl) | 150 | 150 | 150 |
| Lecture au fluorimètre $\lambda_{excitation}=366/ \lambda_{émission}=446nm$. | | | |

Valeurs usuelles : 00-130 nmol/h/ml plasma

I.7.3.3 Maladie de Fabry

I.7.3.3.1 Méthode de dosage de l' α -galactosidase

a- Principe

Le substrat fluorogénique 4-Méthylumbelliféryl α -D- Galactopyranoside, libère la 4-Méthylumbellifénone sous l'action de l' α -galactosidase contenue dans la suspension cellulaire. La 4 Méthylumbellifénone ainsi libérée émet, a pH alcalin, une fluorescence proportionnelle à l'activité enzymatique contenue dans la cellule.

b- Réactif

- **Tampon :**
 - Tampon citrate-phosphate 0.1 M pH= 4.5
 - Acide citrique 0.1 mol/l
 - Dihydrogénophosphate de sodium, dihydraté 0.1mol/l

- Tampon glycine-carbonate 1M pH= 10 (tampon d'arrêt)
 - **Substrat :**
 - 4 Méthyl-umbelliféryl- α -D- Galactopyranoside 5 Mm (à diluer dans le tampon citrate phosphate)
 - **Inhibiteur :**
 - N-acétyl-D-galactosamine 500 mM (à diluer dans le tampon citrate phosphate)
 - **Etalon :** 4 Méthyl-umbelliférone 10 nmol/ml
- c- Mode opératoire**

Tableau 15: Dosage de l' α -galactocérebrosidase

| | Blanc | Etalon | Echantillon |
|--|--------------|---------------|--------------------|
| Culot leucocytaire (μl) | - | - | - |
| Etalon (μl) | - | 10 | 10 |
| Eau distillée | 10 | - | - |
| Substrat (μl) | 40 | 40 | 40 |
| Inhibiteur (μl) | 10 | 10 | 10 |
| Incubation 1 heure à 37°C sous agitation | | | |
| Tampon glycine carbonate (μl) | 200 | 200 | 200 |
| Lecture au fluorimètre $\lambda_{excitation}=366 / \lambda_{émission}=446nm$. | | | |

Les résultats sont exprimés en nmol / Heure / mg de protéines.

I.7.4 Analyse moléculaire de gène

L'extraction d'ADN à partir du sang périphérique est primordiale, avant toute analyse génétique.

La stratégie de détection de mutations, concernant l'analyse des gènes *ATP7B*, *GBA*, et *GLA* implique la réalisation de PCR, suivie du séquençage direct de Sanger.

I.7.4.1 Extraction d'ADN

Extraction automatique sur Maxwell MDX 16

L'ADN est extrait par séparation magnétique, basée sur la liaison réversible de l'ADN à une surface solide-billes-particules magnétiques. Après liaison de l'ADN, les billes sont séparées

des autres composants cellulaires contaminants, lavées et finalement l'ADN purifié est élué par extraction à l'éthanol.

Les étapes réalisées automatiquement par l'appareil Maxwell sont :

- 1- Lyse de l'échantillon en présence d'un agent chaotropique et de détergent.
- 2- Liaison des acides nucléiques aux particules de silice magnétisées.
- 3- Lavages des particules liées à l'ADN de manière à éliminer les autres composants cellulaires.
- 4- Élué des acides nucléiques dans un tampon.

L'ADN extrait peut être utilisé pour une amplification par PCR.

Nous avons réalisé une extraction d'ADN automatisée par l'appareil **Maxwell® 16**, doté de kit d'extraction Promega (Maxwell 16 Blood DNA Purification, Kit 48), sous forme de cartouche à 7 puits préremplis. L'extraction a été optimisée pour un volume de sang total = 400µl, et mis en suspension dans volume de tampon = 400µl.

Temps d'extraction était de 40 minutes.

On attribue aux ADN un numéro qui identifie les patients, et seront systématiquement rangés dans des boîtes store-box de 81 positions.

La banque d'ADN est rangée dans le congélateur à -20°C.

Le manipulateur retire en fonction du besoin, l'échantillon d'ADN, et le reclasse systématiquement après validation du résultat.



Figure 20: Extracteur automatique Maxwell® 16

I.7.4.2 Dosage de l'ADN

Il permet la validation de la technique d'extraction

Il s'agit d'un dosage spectrophotométrique, par la mesure de l'absorbance des acides nucléiques à 260 nm, ainsi que celles des protéines à 280 nm

Le dosage est réalisé sur **Biophotometer Eppendorff**

Les échantillons d'ADN sont dilués au 1/50 (1 Unité d'ADN= 50 ng/μl)

La concentration s'affiche directement, elle est exprimée en **ng/μl**

Noter le rapport DO 260/280 qui renseigne sur la qualité de l'ADN extrait, et doit être compris entre 1.7 et 2.

I.7.4.3 Réaction de PCR (Polymerase Chain Reaction)

La Technique d'amplification d'ADN in vitro est une étape indispensable, à toute analyse génétique. Elle permet de cibler le gène à analyser et d'obtenir un très grand nombre de copies.

Un thermocycleur, permet d'automatiser la réaction PCR en programmant les cycles consécutifs. Il assure une variation rapide de température.



Figure 21: Thermocycleur T-100 thermal cycler®Biorad

I.7.4.3.1 Gène ATP7B

L'analyse par PCR est réalisée pour chacun des 21 exons du gène ATP7B.

Les séquences des amorces F et R choisies (Annexe III) permettent l'analyse des jonctions exons-introns.(159)

Les séquences nucléotidiques d'ADN sauvage des différents exons du gène ATP7B, ainsi que les tailles des différents fragments a amplifié, ont été reporté à partir de la base de données UCSC Genom Browser.(160) (Annexe IV)

La PCR des 21 exons du gène ATP7B a été optimisé au laboratoire, dans un volume final de 25 μ l, au niveau du thermocycleur T-100 thermal cycler® ;

- ADN 2 μ l (85 ng)
- Tampon 1X
- MgCl₂ 2 mM
- Solution Q 1X
- dNTP 0.2 mM
- Amorces sens (F) : 0.2 μ M
- Amorces anti-sens (R) : 0.2 μ M
- Taq polymérase 1.5 Unités (Taq Hot Start, Qiagen)
- Eau qsp 25 μ l

Le programme de la PCR est le suivant, en respectant la Tm de chacun des exons, mentionnées dans le tableau (annexe III) ;

- Dénaturation initiale : 95°C/ 10 minutes
 - Dénaturation : 95°C/ 40 secondes
 - Hybridation : Tm/ 40 secondes
 - Elongation : 72°C/ 45 secondes
 - Elongation finale : 72°C/ 7 minutes
 - Conservation : 4°C/ ∞
- } 35 fois

Tableau 16: Tailles et Tm respectives des exons du gène ATP7B

| Exon | Tm | Taille | Exon | Tm | Taille |
|------------|----|--------|--------------|----|--------|
| 1 | 50 | 194 | 9 | 60 | 229 |
| 2.1 | 53 | 531 | 10-11 | 54 | 510 |
| 2.2 | 54 | 359 | 12 | 58 | 270 |
| 2.3 | 54 | 374 | 13 | 50 | 332 |
| 2.4 | 50 | 302 | 14 | 62 | 334 |
| 3 | 58 | 393 | 15 | 60 | 289 |
| 4 | 48 | 314 | 16 | 60 | 254 |
| 5 | 56 | 298 | 17 | 56 | 280 |
| 6 | 54 | 220 | 18-19 | 60 | 556 |
| 7 | 56 | 276 | 20 | 60 | 240 |
| 8 | 56 | 360 | 21 | 54 | 419 |

I.7.4.3.2 Gène *GBA*

L'analyse du gène *GBA* a porté sur la recherche des deux mutations les plus fréquentes ; à savoir la mutation N370S, et L444P, retrouvée au niveau des exons 9 et 10 respectivement.

La séquence nucléotidique sauvage des exons 9, et 10 du gène *GBA* a été reporté. (Annexe V).

Les séquences d'amorces employées sont mentionnées (voir annexe VI).

La PCR a été optimisé dans un volume final de 50 μ l ;

- **N370S :**
 - ADN : 2 μ l (85 ng)
 - Tampon 1X
 - $MgCl_2$ 2 mM
 - Enhancer 5 μ l
 - dNTP 0.125 mM
 - Amorce sens (F) : 0.25 μ M
 - Amorce anti-sens (R) : 0.25 μ M
 - Taq polymérase 2.5 Unités (Taq gold, Applied Biosystem)
 - Eau qsp 50 μ l

Le programme de la PCR est le suivant ;

- Dénaturation initiale : 95°C/ 5 minutes
 - Hybridation : 58/ 1 minute
 - Elongation : 72°C/ 2 minutes
 - Dénaturation :95°C/ 30 secondes
 - Hybridation : 58°C/ 30 secondes
 - Elongation finale : 72°C/ 10 minutes
 - Conservation : 4°C/ ∞
- } 40 fois

Taille du fragment amplifié : **120 pb**

- **L444P :**
 - ADN : 2 μ l (85 ng)
 - Tampon 1X
 - $MgCl_2$ 2 mM
 - Enhancer 5 μ l
 - dNTP 0.14 mM
 - Amorce sens (F) : 0.24 μ M
 - Amorce anti-sens (R) : 0.24 μ M
 - Taq polymérase 2.5 Unités (Ampli Taq, Applied Biosystem)
 - Eau qsp 50 μ l

Le programme de la PCR est le suivant ;

- Dénaturation initiale : 95°C/ 2 minutes
 - Dénaturation : 95°C/ 30 secondes
 - Hybridation : 58/ 30 secondes
 - Elongation : 72°C/ 2 minutes
 - Elongation finale : 72°C/ 7 minutes
 - Conservation : 4°C/ ∞
- } 40 fois

Taille du fragment amplifié : **635 pb**

I.7.4.3.3 Gène GLA

L'analyse par PCR est réalisée pour chacun des 7 exons du gène *GLA*

Les séquences des amorces F et R choisies (Annexe VII) permettent l'analyse des jonctions exons-introns.

Les séquences nucléotidiques d'ADN sauvage des différents exons du gène *GLA*, ainsi que les tailles des différents fragments a amplifié, ont été reporté à partir de la base de données UCSC Genom Browser.(160) (Annexe VIII)

La PCR des 7 exons du gène *GLA* a été optimisé au laboratoire, dans un volume final de 25 µl, au niveau du thermocycleur **T-100 thermal cycler®** ;

- ADN 2µl (85 ng)
- Tampon 1X
- Mgcl₂ 2 mM
- Solution Q 1X
- dNTP 0.2 mM
- Amorces sens (F) : 0.2 µM
- Amorces anti-sens (R) : 0.2 µM
- Taq polymérase 1.5 Unités (Taq Hot Start, Qiagen)
- Eau qsp 25 µl

Le programme de la PCR est le suivant, en respectant la T_m de chacun des exons, mentionnées (tableau 17) ;

- Dénaturation initiale : 95°C/ 10 minutes
 - Dénaturation : 95°C/ 40 secondes
 - Hybridation : T_m/ 40 secondes
 - Elongation : 72°C/ 45 secondes
 - Elongation finale : 72°C/ 7 minutes
 - Conservation : 4°C/ ∞
- } 35 fois

Tableau 17: Tailles et T_m respectives des exons du gène GLA

| Exon | Taille | T _m |
|------|--------|----------------|
| 1 | 409 | 58 |
| 2 | 796 | 54 |
| 3 | 305 | 58 |
| 4 | 247 | 54 |
| 5 | 481 | 54 |
| 6-7 | 932 | 64 |

I.7.4.4 Electrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse est une technique séparative, son principe consiste à soumettre les produits PCR à un champ électrique, ce qui entraîne la migration des fragments en fonction de leurs tailles et charges.

Les produits PCR ont été vérifié, par **électrophorèse sur gel d'agarose 2 %**.

Etapes :

- **Préparation du gel d'agarose à 2%**, par peser de 2g d'agarose dans 100 ml de tampon de migration Tris Borate EDTA, en présence de 3 µl d'agent intercalant : le **Syber Green**.
- **Préparation de l'échantillon**, par addition de 1 µl bleu de charge (formé de Bleu de bromophénol, glycérol, et xylène cyanol), à 10µl du fragment PCR.

Les ADN sont déposés au niveau des puits du gel qui se situe au niveau de la cathode.

- **Migration électrophorétique**, pendant 30 minutes à 120Volt. (Cuve d'électrophorèse **PowerPac Universal, Biorad**).

L'utilisation d'un marqueur de taille qui migre parallèlement aux amplicons, permet de valider la taille des produits spécifiques à chacun des exons.

- **Révélation de l'ADN**, par lecture sous UV, de la fluorescence émise par le **SYBR Green** une fois intercalé au niveau des différents fragments d'ADN doubles brins. La lecture est faite sur **GelDoc Go, Biorad**.

I.7.4.5 Séquençage d'ADN

a- Traitement de purification

La PCR étant une réaction enzymatique, optimisée en condition saturante en substrat, une purification des produits PCR est recommandée.

La purification par méthode enzymatique (**ExoSap-It**), a été utilisée. Elle se déroule en deux temps à deux températures différentes, permettant l'élimination des contaminants de types dNTPs et amorces non consommées.

ExoSap-It utilise deux enzymes hydrolytiques : l'exonucléase I et la phosphatase Alcaline.

Protocole :

- ExoSap-it : 2µl
- Produit PCR : 7µl

Programme :

- 1- 15 minutes à 37°C
- 2- 15 minutes à 80 °C

Programmer dans le thermocycleur : **T-100 thermal cycler**

b- Séquençage Sanger

La méthode de Sanger est une technique directe de détection de mutations, elle rétablit la constitution nucléotidique des 21/ 7/ et 2 exons codants, ainsi que leurs jonctions exons-introns des gènes *ATP7B/ GLA/* et *GBA*. Chaque exon du gène est amplifié et séquencé de façon bidirectionnelle.

Le séquençage est basé sur l'incorporation aléatoire par une ADN polymérase de ddNTP, interrupteurs de chaîne, marqués avec quatre fluorochromes différents (A, T, C, G). L'allongement de la chaîne est alors interrompu ce qui entraîne l'obtention d'un ensemble de fragments d'ADN marqués, de tailles variables, pour un exon donné.

Une électrophorèse capillaire automatique permet la séparation des fragments en fonction de la taille et de la composition.

Le séquençage s'effectue en 3 étapes :

- Réaction de séquence
- Purification
- Electrophorèse capillaire

1- Réaction de séquence

Nous avons réalisé une réaction de séquence des produits PCR purifiés, dans le thermocycleur **T-100 thermal cycler®**, en respectant les conditions spécifiques à la réaction PCR (T_m des amorces).

La réaction PCR a été optimisée pour chaque amorce à part, en utilisant le kit Big Dye Terminator version 3.1 (Applied Biosystems)

Dans un Volume final=10 μ l ; suivant le protocole :

- Tampon 1X
- Amorce sens/ ou anti-sens 0.33 μ M
- Big Dye 0.75X
- Eau qsp 10 μ l

2- Purification de la réaction de séquence- Technique au Sephadex

La chromatographie d'exclusion permet de piéger les particules de bas poids moléculaire sur une **colonne Sephadex** constituée de billes perforées, présentant une porosité adéquate.

Les petites particules de diamètre inférieur aux billes sont retenues. À l'inverse, les grosses particules traversent les billes et seront éluées.

Lors de la purification de la réaction de séquence, les ddNTP libres, et les amorces en excès seront retenus.

Elle permet d'améliorer les signaux fluorescents spécifiques lors de l'électrophorèse.

Nous avons réalisé une purification du produit de séquence sur colonnes de résine Sephadex-G50-fine, en deux temps ; **la plaque 96 puits MultiScreen HV** est utilisée comme support inerte de la résine Sephadex-G50 fine.

2.a - préparation des colonnes

- Répartir la poudre de Sephadex-G50 sur la plaque, et distribuer 300µl d'eau distillée dans chacun des puits de la plaque
- Laisser reposer 2 heures à + 4°C.
- Centrifuger pendant 5 minutes à 2800 tours/minute pour éliminer l'excès d'eau.

2.b- Filtration des produits de séquence :

- Déposer les produits de la réaction de séquence à purifier
- Centrifuger pendant 6 minutes à 3200 tours/minute.

Les filtrats récupérés seront immédiatement analysés.

3- Électrophorèse capillaire

Une électrophorèse capillaire permet la séparation des produits de la réaction de séquence purifiée. L'enregistrement et l'analyse spectrale de la fluorescence spécifique du ddNTP permettra alors d'assigner la base correspondante et de déterminer la séquence nucléotidique du brin matrice. Ces différentes étapes de séparation et d'analyse sont réalisées sur un Analyseur Génétique ; 4 capillaires le **3130 Applied Biosystems**. La matrice de séparation (gel), se présente sous forme d'un fluide très résolutif (**Pop 7 Applied Biosystems**).

Le séquenceur est piloté par une plate-forme PC permettant la collection des données par le **logiciel Sequencing Analysis**.

La détection des mutations chez les patients lors de la lecture des électrophoregrammes, s'effectue par comparaison par rapport à la séquence dite sauvage.

4- Identification et nomenclature des variants

Les variations de séquence identifiées sont nommées, en consultant la base de données Ensembl Genom Browser (au niveau de l'ADNc et protéine).(161)

La consultation de HGMD académique (en accès libre), a permis de vérifier si les variants répertoriés ont été préalablement décrits ou pas dans la littérature.

Les variants non décrits à ce jour dans la littérature, ont suscité le recours à la version professionnelle HGMD

Résultats

II. Résultats

II.1 Maladie de Wilson

II.1.1 Cas index

II.1.1.1 Description statistique de la population d'étude

Au total, **41** cas index ont fait partie de cette étude, pour lesquels le diagnostic de la maladie de Wilson a été retenu après validation des résultats du bilan cuprique.

Il s'agit de patients originaires majoritairement de **l'Est Algérien**, l'âge moyen au diagnostic est de $18,20 \pm 1,44$ (valeurs extrêmes entre 3 à 45 ans). Le taux de consanguinité retrouvé est de 70.7%, avec un sexe ratio de 1.9.

Sur le plan clinique ; les patients présentaient la forme hépatique (73.2%), la forme mixte (17.1%), et la forme neurologique (9.8%)

Tableau 18: Description de l'échantillon des cas index

| Variable | Paramètres étudiés | Valeurs |
|--------------------------------|--|-------------------|
| Age au diagnostic | Valeurs extrêmes | 3 à 45 |
| | Moyenne \pm Ecart-type | $18,20 \pm 1,44$ |
| | Médiane \pm Intervalle interquartile | $14,00 \pm 10,00$ |
| Sexe | Sex-ratio : H / F | 27 / 14 |
| Consanguinité | Effectif (%) | 29/41 = 70,7% |
| Nombre de familles apparentées | | 25 |
| Origine (Wilaya) | Alger | 1 |
| | Batna | 8 |
| | Bejaia | 2 |
| | Boumerdes | 2 |
| | Chlef | 1 |
| | Constantine | 2 |
| | Djelfa | 1 |
| | Jijel | 1 |
| | Khenchela | 3 |
| | Mila | 3 |
| | Msila | 3 |
| | Souk Ahras | 1 |
| | Sétif | 5 |
| | Tebessa | 2 |
| | Tizi-Ouzou | 6 |
| Forme clinique | Hépatique | 30 (73,2%) |
| | Neurologique | 4 (9,8%) |
| | Mixte | 7 (17,1%) |

II.1.1.2 Caractéristique clinique

II.1.1.2.1 Répartition des formes cliniques selon la tranche d'âge

L'effectif majoritaire des malades recrutés est la population pédiatrique, présentant pour la plupart un âge de diagnostic compris entre 10 et 18 ans.

L'atteinte hépatique prédomine au sein de la population pédiatrique, alors que les formes mixtes et neurologiques touchent l'adulte.

Tableau 19: Représentation des formes cliniques selon la tranche d'âge

| Forme clinique | [3 10[| [10 18[| [18 30[| ≥ 30 | P value |
|----------------|--------|---------|---------|------|---------------------------|
| Hépatique | 4 | 18 | 7 | 1 | < 10 ⁻⁴ S** |
| Neurologique | 0 | 0 | 1 | 3 | |
| Mixte | 0 | 1 | 6 | 0 | |

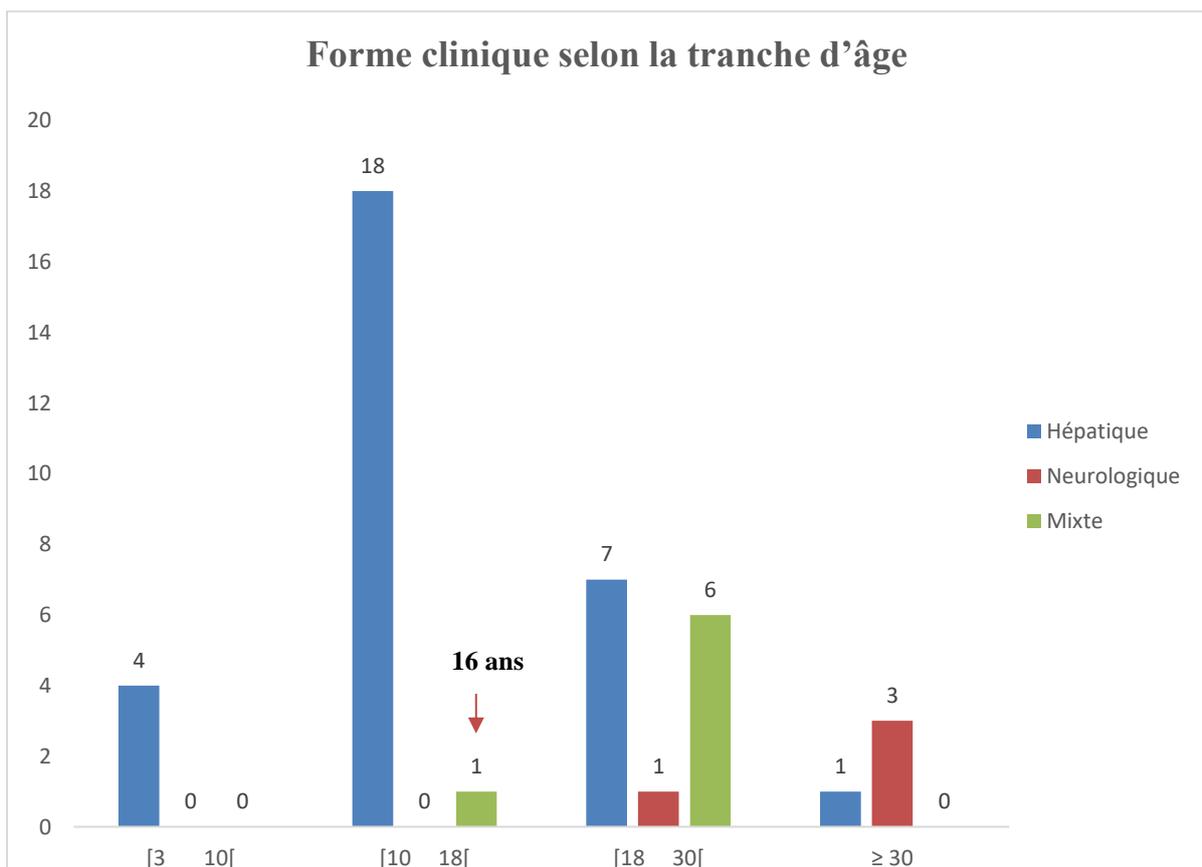


Figure 22: Histogramme de la répartition des formes clinique par tranche d'âge

II.1.1.2.2 Symptômes

Le contexte clinique évoquant la maladie, dépend de la forme clinique ; concernant l'atteinte hépatique, les patients présentaient un tableau d'hépatopathie chronique au stade de cirrhose pour la moitié de notre effectif.

Les tremblements et les troubles de langage sont les principaux symptômes décrits au moment du diagnostic de la forme neurologique.

La forme mixte est prédominée par une atteinte neurologique, dont le bilan étiologique (Imagerie et biologie) retrouve le tableau d'hépatopathie fulminante sous-adjacentes.

L'examen ophtalmologique est revenu normal pour l'ensemble des patients de notre cohorte.

Tableau 20: Signes cliniques incriminés pour chaque forme de la maladie

| Signes cliniques | Forme clinique | | |
|--------------------------------|----------------|------------------|-----------|
| | Hépatique (30) | Neurologique (4) | Mixte (7) |
| Ictère | 25 (83,3%) | 0 (0%) | 4 (57,1%) |
| Ascite | 9 (30,0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| Hépatomégalie | 14 (46,7%) | 0 (0%) | 3 (42,9%) |
| Cirrhose | 16 (53,3%) | 0 (0%) | 4 (57,1%) |
| Insuffisance hépato-cellulaire | 9 (30,0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| Hypertension portale | 29 (96,7%) | 0 (0%) | 7 (100%) |
| Troubles neurologiques | 0 (0%) | 4 (100%) | 7 (100%) |
| Anneau Kayser Fleischer | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |

II.1.1.2.3 Représentation des fréquences des symptômes par tranche d'âge

L'hépatomégalie associée à l'hypertension portale sont les symptômes constants reliés à la forme hépatique. Ils sont décrits systématiquement pour les formes viscérales et mixte.

Les signes de sévérité à savoir ;

- L'insuffisance hépato-cellulaire étaient plus fréquente chez les enfants (7/23), par rapport aux adultes (2/15).
- L'atteinte neurologique prédominait chez l'adulte (9/15), comparativement aux enfants (2/23)

Tableau 21: Fréquences des symptômes par tranche d'âge

| | < 18 | ≥ 18 | P value | Test utilisé |
|-------------------------------|------|------|-----------------------|--|
| Effectif | 23 | 18 | 41 | |
| Ictère | 20 | 9 | 0,010 S* | Test du χ^2 |
| Ascite | 8 | 1 | 0,062 LS** | Test du χ^2 avec corrigé de Yates |
| Hépatomégalie | 11 | 6 | 0,350 NS**** | Test du χ^2 |
| Cirrhose | 13 | 8 | 0,443 NS**** | Test du χ^2 |
| IHC | 7 | 2 | 0,138 NS**** | Test du χ^2 |
| HTP | 22 | 14 | 0,150 NS**** | Test exact de Fisher |
| Troubles neurologiques | 1 | 10 | < 10 ⁻³ S* | Test du χ^2 |
| Anneau KF | 0 | 0 | | Impossible de réaliser le test |

S*=Significatif ; LS**=Limite de la significativité ; NS****=Non significatif

II.1.1.2.4 Lien entre Age au diagnostic et sévérité clinique

La sévérité clinique est définie par l'existence d'une cirrhose et/ou une insuffisance hépatocellulaire et/ou des troubles neurologiques.

Au total 28 patients, sur les 41 cas index, ont une forme sévère (**68,3%**).

Tableau 22: Lien entre Age au diagnostic et sévérité clinique

| Sévérité | Effectif | Age au diagnostic (années) | | | | P value |
|----------|----------|----------------------------|---------|---------|------------|---------------|
| | | Valeurs extrêmes | Moyenne | Médiane | Ecart-type | |
| Non | 13 | 3 à 24 | 14,00 | 13,00 | 5,64 | 0,063 LS** |
| Oui | 28 | 8 à 45 | 20,14 | 17,00 | 9,98 | |

*LS = Limite de la significativité

Tableau 23: Lien entre Age au diagnostic et sévérité clinique par tranche d'âge

| Age | Pas de Sévérité | Sévérité | P value |
|------|-----------------|----------|---------|
| < 18 | 9 | 14 | 0,248 |
| ≥ 18 | 4 | 14 | NS**** |

Lorsqu'on regroupe les classes d'âge ; on ne retrouve plus de lien significatif entre les classes.

On note cependant une tendance à l'augmentation de la sévérité avec l'âge.

II.1.1.3 Résultats génétiques

L'analyse moléculaire a concerné les 41 cas index, elle s'est révélée informative chez 30 familles (73 %), permettant l'identification de mutations délétères.

Tableau 24: Les mutations identifiées au sein de la population étudiée

| Exon/ Intron | Nucléotide | Codon | Domaine protéine | Mutation | Type |
|-----------------|--------------|------------------|---------------------|-------------|------------------------------------|
| Intron 1 | c.51+4 A>T | / | Cu1 | Décrite | Epissage |
| 3 | c.1477C>T | p.Q493X | Cu 5 | Non décrite | Non-sens |
| 7 | c. 1993 A>G | p.M665V | TM1 | Décrite | Faux-sens |
| 8 | c.2128G>A | p.G710S | TM2 | Décrite | Faux-sens |
| 8 | c.2204 T>C | p.L735P | TM3 | Non décrite | Faux-sens |
| 8 | c.2297C>T | p.T766M | TM4 | Décrite | Faux-sens |
| Intron 9 | c.2448-1 G>A | / | TM4 | Décrite | Epissage |
| 10 | c.2532 DelA | Val845SerfsTer28 | Bo4 | Décrite | Décalage du cadre de lecture |
| 10 | c.2558A>G | p.D853G | Bo4 | Décrite | Faux-sens |
| 11 | c.2668G>A | p.V890M | Bo4/TM5 | Décrite | Faux-sens |
| 11 | c.2693A>G | P.Q898R | ATP | Décrite | Faux-sens |
| 13 | c.3059 A>G | p.K1020R | ATP | Décrite | Faux-sens |
| Intron 13 | c.3060+5G>A | / | ATP | Décrite | Epissage |
| 17 | c.3620A>G | p.H1207R | ATP | Décrite | Faux-sens |
| 17 | c.3694A>C | p.T1232P | ATP | Décrite | Faux-sens |
| 18 | c.3809A>G | p.N1270S | ATP | Décrite | Faux-sens |
| Intron 18 | c.3904-2A>G | / | ATP | Décrite | Epissage |
| 19 | c.3960 G >C | p.R1320S | ATP | Décrite | Faux-sens |
| 21 | c.4301C>T | p.T1434M | ATP | Décrite | Faux-sens |

Parmi les mutations identifiées, deux mutations n'ont pas été décrites dans la littérature, et ont été retenues délétères (Pathogènes), selon les recommandations of American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) (162).

Il s'agit de la mutation :

- **c.1477C>T (p.Q493X)**
- **c.2204 T>C (p.L735P)**

L'analyse de gène a permis d'identifier deux variations de significations incertaines (Probablement pathogène) ; il s'agit de ;

Tableau 25: Les variations de séquence non décrites de signification incertaine

| Exon | Nucléotide | Codon | Domaine protéine | Type |
|-------------|-------------------|--------------|-------------------------|-------------|
| 14 | c.3070 G>A | p.V1024M | ATP | Faux-sens |
| 2 | c.726 T>G | p.N242K | Bo2 | Faux-sens |

L'analyse a permis d'identifier un grand nombre de polymorphismes ;

Tableau 26: Les polymorphismes identifiés au sein de la population étudiée

| Exon/ Intron | Nucléotide | Codon | Classification |
|---------------------|-------------------|--------------|---------------------------------------|
| Exon 2 | c.1216T>G | p.S406A | Réduit l'accumulation du cuivre |
| Exon 3 | c.1366G>C | p.V456L | Maladie Alzheimer |
| Exon 3 | c.1394G>A | p.R465K | Non décrit |
| Exon 8 | c.2292C>T | p.F764F | Silencieuse |
| Intron 9 | c.2448-25G>A | / | Silencieuse |
| Exon 10 | c.2495A>G | p.K832R | Maladie Alzheimer |
| Exon 12 | c.2855G>A* | p.R952K | Maladie Alzheimer |
| Intron 12 | c.2866-13G>C | / | Silencieuse |
| Exon 13 | c.3009 G>A | p.A1003A | Silencieuse |
| Exon 15 | c.3419C>T | p.V1140A | Polymorphisme |
| Intron 19 | c.3903+6 T>C | | Non décrit |
| Intron 20 | c.4021+50G>C | / | Non décrit |
| Exon 21 | c.4302 G>A | p.T1434T | Silencieuse |

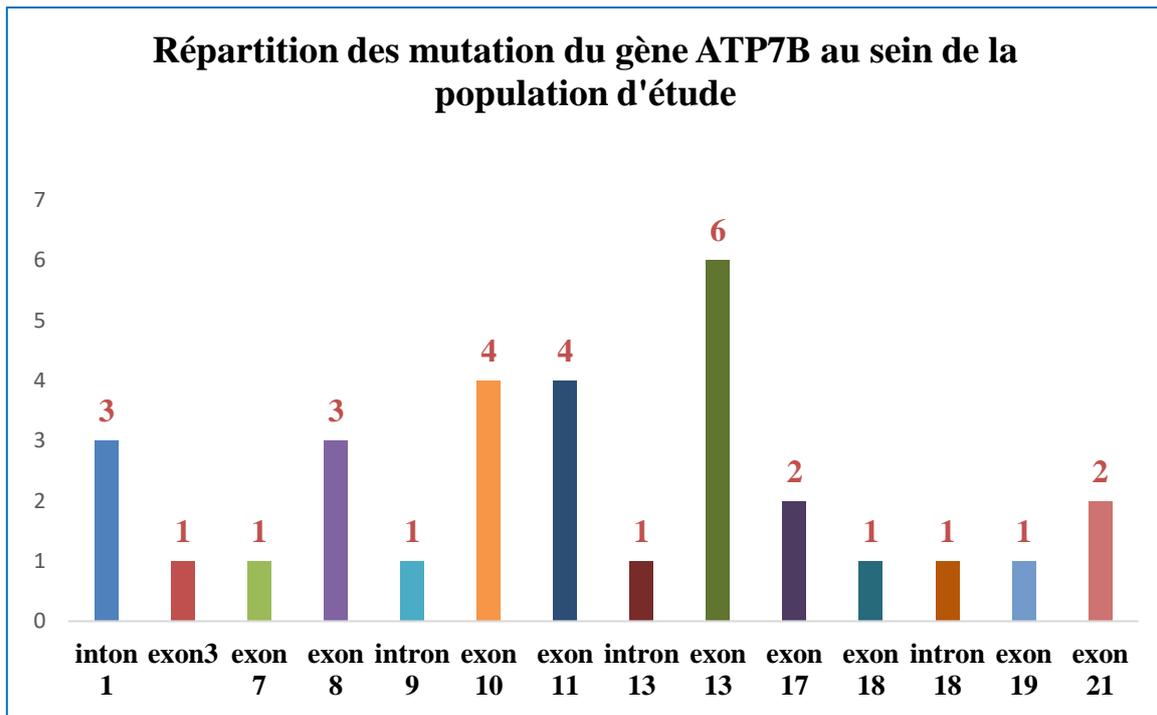


Figure 23: Répartition des mutations du gène ATP7B au sein de la population étudiée

II.1.1.4 Lien entre le statut génétique et les résultats du bilan cuprique

Parmi les 41 patients « Cas index », le statut génétique est :

- Absence d'anomalie dans 11 cas (où les résultats des tests génétiques se sont révélés non informatifs)
- Homozygote dans 24 cas
- Hétérozygote composite avec identification complète (IC) dans 2 cas
- Hétérozygote composite avec identification incomplète (II) dans 4 cas

II.1.1.4.1 Résultats de la céruléoplasmine

La comparaison de la céruléoplasminémie en fonction des différents statuts génétiques des cas index est non significative. On note des valeurs effondrées de céruléoplasmine pour la quasi-totalité des malades.

Tableau 27: Comparaison des taux de céruléoplasmine selon le statut génétique des cas index

| Statut génétique | Céruléoplasmine | | | | P value |
|----------------------|------------------|---------|---------|------------|--------------|
| | Valeurs extrêmes | Moyenne | Médiane | Ecart-type | |
| Non identifié | 0,03 à 0,79 | 0,36 | 0,30 | 0,24 | 0,316 NS* |
| Homozygote | 0,06 à 1,20 | 0,53 | 0,43 | 0,33 | |
| Hétérozygote avec IC | 0,10 à 0,29 | 0,20 | 0,20 | 0,13 | |
| Hétérozygote avec II | 0,06 à 1,02 | 0,49 | 0,43 | 0,48 | |

*NS = Non significatif

II.1.1.4.1.1 Répartition de l'âge moyen en fonction de la céruléoplasminémie

Les taux de céruléoplasmine retrouvés chez les cas index sont indépendants de l'âge moyen du diagnostic des patients.

Tableau 28 : Répartition de l'Age moyen des cas selon la classe de céruléoplasmine

| Céruléoplasmine | Effectif | Age | | | | Quartiles | P value |
|-----------------|----------|------------------|---------|---------|------------|----------------|--------------|
| | | Valeurs extrêmes | Moyenne | Médiane | Ecart-type | | |
| < 0,5 | 25 | 3 à 36 | 16,88 | 15 | 7,50 | 12 ; 21 | 0,485 NS* |
| [0,5 et 1 [| 12 | 8 à 45 | 19,67 | 14 | 11,86 | 11,5 ; 23,5 | |
| ≥ 1 | 4 | 14 à 38 | 22,00 | 18 | 11,31 | 14,0 ; 30,0 | |

*NS = Non significatif

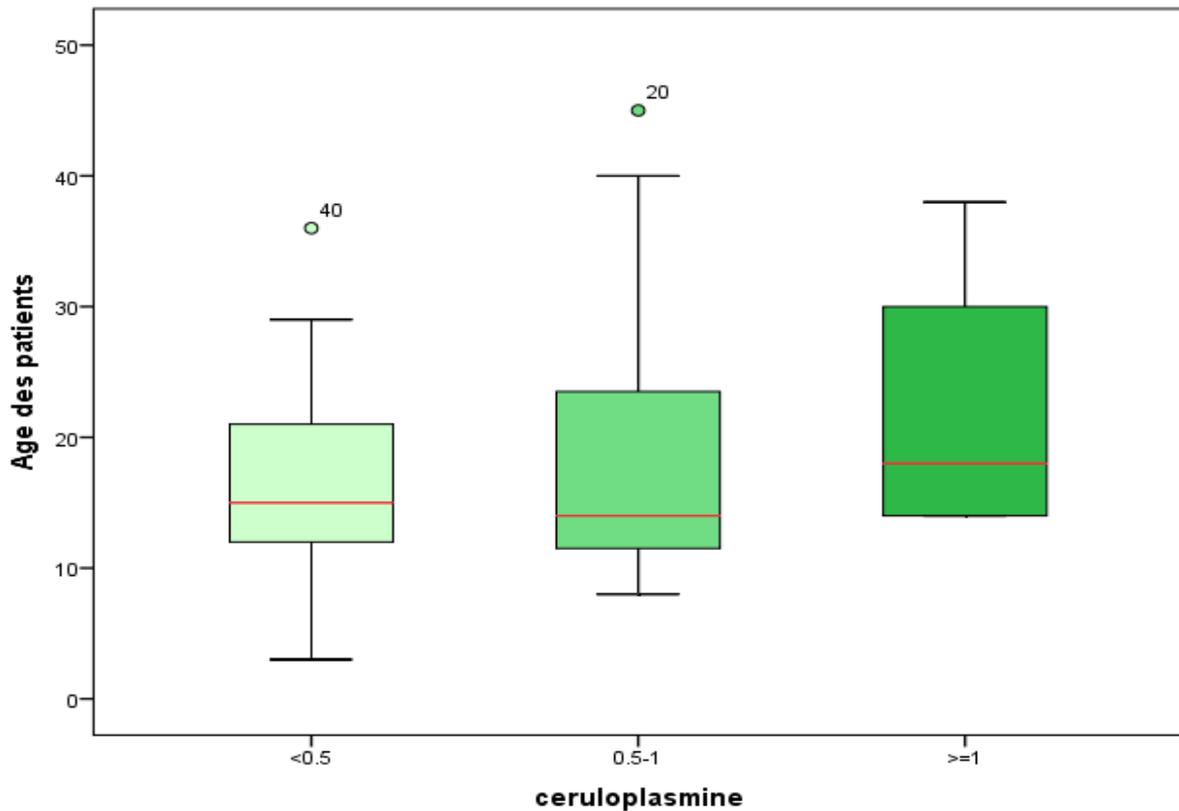


Figure 24: Représentation de l'Age moyen en fonction de la céruléoplasminémie

II.1.1.4.1.2 Représentation des formes cliniques en fonction de la céruléoplasminémie

La comparaison des taux de céruléoplasmine entre les différentes formes cliniques de la maladie est non significative chez les cas index.

Tableau 29: Répartition des formes cliniques en fonction de la céruléoplasminémie

| Forme clinique | Céruléoplasmine < 0,5 | Céruléoplasmine [0,5 et 1[| Céruléoplasmine ≥ 1 | P value |
|----------------|--------------------------|-------------------------------|------------------------|---------|
| Hépatique | 19 | 9 | 2 | 0,471 |
| Neurologique | 1 | 2 | 1 | NS |
| Mixte | 5 | 1 | 1 | |

*NS = Non significatif

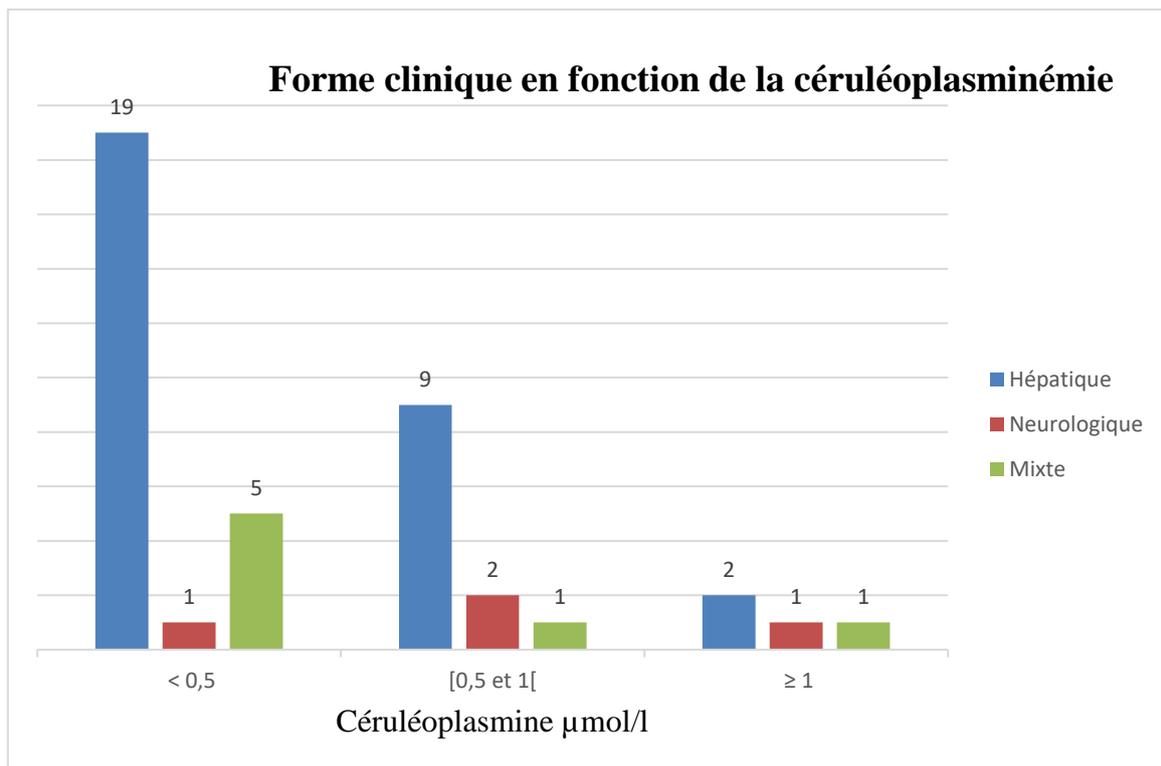


Figure 25: Répartition des formes cliniques en fonction de la céruléoplasminémie

II.1.1.4.1.3 Estimation de la céruléoplasmine moyenne selon la tranche d'âge

Les taux de céruléoplasmine observés sont indépendants de la tranche d'âge des cas index.

Tableau 30: Estimation de la céruléoplasmine moyenne selon la tranche d'âge

| Tranche d'âge | Effectif | Céruléoplasmine | | | | P value |
|---------------|----------|------------------|---------|---------|------------|--------------|
| | | Valeurs extrêmes | Moyenne | Médiane | Ecart-type | |
| [3-10[| 4 | 0,03 à 0,88 | 0,40 | 0,35 | 0,37 | 0,485 NS* |
| [10-18[| 19 | 0,06 à 1,20 | 0,46 | 0,41 | 0,32 | |
| [18-30[| 14 | 0,10 à 1,00 | 0,42 | 0,32 | 0,32 | |
| ≥ 30 | 4 | 0,30 à 1,00 | 0,66 | 0,67 | 0,29 | |

*NS = Non significatif

II.1.1.4.2 Résultats du cuivre plasmatique

La comparaison des résultats du cuivre plasmatique est non significative entre les différents statuts génétiques des cas index. Le cuivre plasmatique bas ne permettra pas de préciser le statut génétique.

Tableau 31: Comparaison des taux du cuivre plasmatique selon le statut génétique des cas index

| Statut génétique | Cuivre plasmatique | | | | P value |
|----------------------|--------------------|---------|---------|------------|--------------|
| | Valeurs extrêmes | Moyenne | Médiane | Ecart-type | |
| Absence d'anomalie | 2 à 8 | 4,55 | 4,00 | 1,92 | 0,170 NS* |
| Homozygote | 1 à 13 | 6,13 | 6,50 | 3,76 | |
| Hétérozygote avec IC | 9 | 9,00 | 9,00 | 0,00 | |
| Hétérozygote avec II | 4 à 17 | 8,20 | 6,00 | 5,12 | |

*NS = Non significatif

II.1.1.4.3 Résultats du cuivre urinaire

La comparaison des résultats du cuivre urinaire est non significative entre les différents statuts génétiques des cas index. L'élévation du cuivre urinaire ne permettra pas de préciser le statut génétique.

Tableau 32: Comparaison des taux du cuivre urinaire selon le statut génétique des cas index

| Statut génétique | Cuivre urinaire | | | | P value |
|----------------------|------------------|---------|---------|------------|--------------|
| | Valeurs extrêmes | Moyenne | Médiane | Ecart-type | |
| Non identifié | 16 à 158 | 78,00 | 64,00 | 49,15 | 0,468 NS* |
| Homozygote | 112 à 118 | 53,13 | 46,50 | 29,27 | |
| Hétérozygote avec IC | 25 à 56 | 40,50 | 40,50 | 21,92 | |
| Hétérozygote avec II | 32 à 54 | 44,50 | 46,00 | 10,02 | |

*NS = Non significatif

II.1.2 Apparentés

Au total, 83 apparentés ont fait partie de cette étude.

II.1.2.1 Caractéristiques cliniques

Parmi les 83 apparentés, on note :

- 64 non malades
- 9 malades présentant une symptomatologie similaire au cas index
- 7 asymptomatiques consécutives à l'analyse génétique
- 3 asymptomatiques consécutives au résultat du bilan cuprique

II.1.2.2 Caractéristiques génétiques

La répartition des patients selon le statut génétique est la suivante :

- ✚ Apparentés des 11 cas index, ou aucune mutation n'a été identifiée par la technique utilisée :
 - Absence d'anomalie : 15 patients (18,1%)
- ✚ Apparentés des 30 cas index ou la mutation a été identifiée :
 - 11 sont homozygotes (13,3%)
 - 41 sont hétérozygotes simples (49,4%)
 - 15 sont normaux (18,1%)
 - 1 est hétérozygote composite avec identification complète (1,2%)

II.1.2.3 Résultat du bilan cuprique selon le statut génétique

II.1.2.3.1 Résultats de la céruléoplasmine

La comparaison des taux de céruléoplasmine chez les apparentés est fortement significative, permettant ainsi d'identifier les membres normaux, des membres atteints.

Tableau 33: Comparaison des taux de céruléoplasmine selon le statut génétique des apparentés

| Statut génétique | Céruléoplasmine | | | | P value |
|----------------------|------------------|---------|---------|------------|---|
| | Valeurs extrêmes | Moyenne | Médiane | Ecart-type | |
| Absence d'anomalie | 0,10 à 2,25 | 1,26 | 1,51 | 0,79 | < 10 ⁻⁶ S*** Résultat fortement significatif |
| Homozygote | 0,10 à 1,83 | 0,55 | 0,30 | 0,57 | |
| Hétérozygote simple | 1,13 à 2,43 | 1,51 | 1,47 | 0,28 | |
| Normaux | 1,42 à 2,66 | 2,02 | 2,04 | 0,30 | |
| Hétérozygote avec IC | 0,22 | 0,22 | 0,22 | 0,00 | |

***S = Significatif

II.1.2.3.2 Résultats du cuivre plasmatique

La comparaison des taux de cuivre plasmatique chez les apparentés est fortement significative, permettant ainsi d'identifier les membres normaux, des membres atteints.

Tableau 34: Comparaison des taux du cuivre plasmatique selon le statut génétique des apparentés

| Statut génétique | Cuivre plasmatique | | | | P value |
|----------------------|--------------------|---------|---------|------------|---|
| | Valeurs extrêmes | Moyenne | Médiane | Ecart-type | |
| Absence d'anomalie | 4 à 28 | 13,87 | 14,00 | 7,92 | < 10 ⁻⁴ S*** Résultat fortement significatif |
| Homozygote | 1 à 21 | 7,18 | 6,00 | 5,72 | |
| Hétérozygote simple | 7 à 39 | 13,39 | 12,00 | 5,65 | |
| Normaux | 10 à 40 | 20,20 | 17,00 | 8,57 | |
| Hétérozygote avec IC | 9 | 9,00 | 9,00 | 0,00 | |

***S = Significatif

II.1.2.3.3 Résultats du cuivre urinaire

La comparaison des taux de cuivre urinaire chez les apparentés est fortement significative, permettant ainsi d'identifier les membres normaux, des membres atteints.

Tableau 35: Comparaison des taux du cuivre urinaire selon le statut génétique des apparentés

| Statut génétique | Cuivre urinaire | | | | P value < 10 ⁻³ S*** |
|----------------------|------------------|---------|---------|------------|---------------------------------------|
| | Valeurs extrêmes | Moyenne | Médiane | Ecart-type | |
| Absence d'anomalie | 6 à 92 | 26,40 | 24,00 | 20,58 | Résultat fortement significatif |
| Homozygote | 15 à 234 | 63,18 | 51,00 | 60,44 | |
| Hétérozygote simple | 6 à 38 | 22,10 | 24,00 | 9,33 | |
| Normaux | 4 à 25 | 15,80 | 15,00 | 6,28 | |
| Hétérozygote avec IC | 40 | 40 | 40 | 0,00 | |

***S = Significatif

II.1.3 Analyse statistique Cas index/apparentés

II.1.3.1 Répartition de l'Age moyen selon la clinique

Au sein de notre population étudiée, la répartition de l'âge moyen en fonction des 3 formes cliniques des cas index, et des asymptomatiques identifiés est fortement significative. La forme hépatique est à prédominance infantile (14.87 ± 6.59), la forme neurologique est à manifestation adulte. La forme mixte est transitoire.

Tableau 36: Répartition de l'Age moyen selon la clinique

| Groupe | Effectif | Age | | | | | P value |
|---------------------------------------|----------|------------------|---------|---------|------------|-------------|---------------------------|
| | | Valeurs extrêmes | Moyenne | Médiane | Ecart-type | Quartiles | |
| Forme hépatique chez les cas index | 30 | 3 à 36 | 14,87 | 14 | 6,59 | 11 ; 18 | < 10 ⁻⁶ S** |
| Forme neurologique chez les cas index | 4 | 27 à 45 | 37,50 | 39 | 7,59 | 32,5 ; 42,5 | |
| Forme mixte chez les cas index | 7 | 16 à 27 | 21,43 | 22 | 3,60 | 18,0 ; 23,0 | |
| Apparentés asymptomatiques | 10 | 3 à 27 | 13,90 | 13 | 8,20 | 9,0 ; 18,0 | |

**S = Significatif

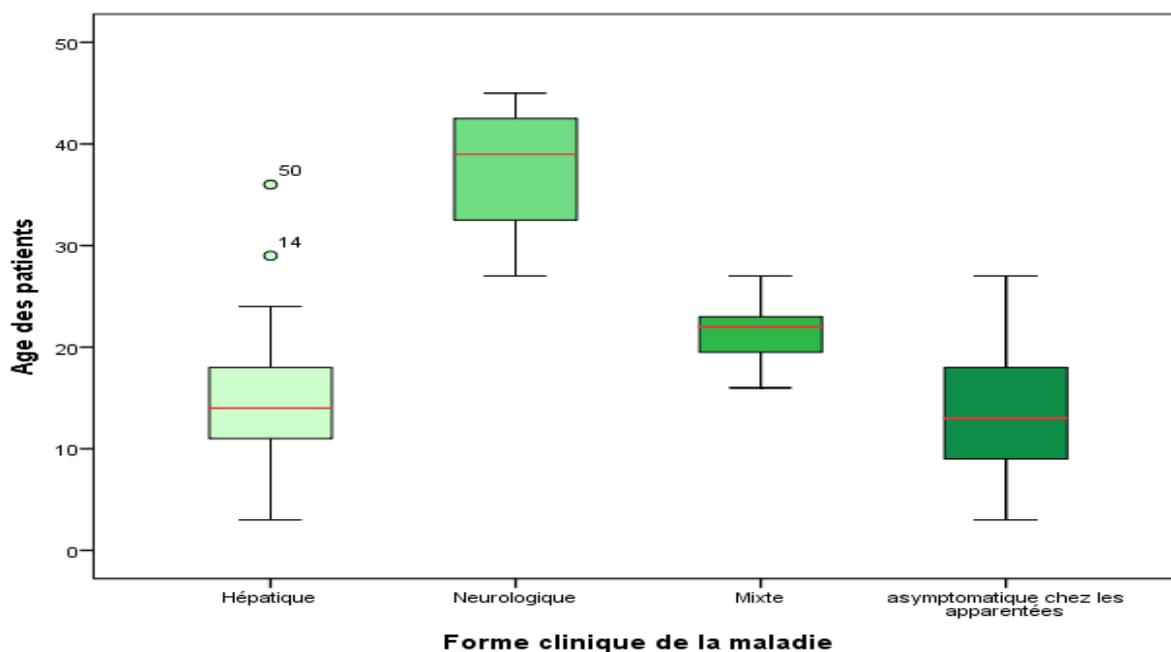


Figure 26: Répartition de l'Age moyen selon la clinique

II.1.3.2 Céruléoplasmine moyenne selon le groupe

La comparaison des taux de céruléoplasmine entre les trois formes cliniques de la maladie, et les asymptomatiques est non significative. Le taux de céruléoplasmine bas pose le diagnostic de certitude de la maladie de Wilson.

Tableau 37: Estimation de la Céruléoplasmine moyenne selon la forme clinique cas index/apparentés asymptomatiques

| Groupe | Effectif | Céruléoplasmine | | | | | P value |
|---------------------------------------|----------|------------------|---------|---------|------------|-------------|--------------|
| | | Valeurs extrêmes | Moyenne | Médiane | Ecart-type | Quartiles | |
| Forme hépatique chez les cas index | 30 | 0,03 à 1,20 | 0,442 | 0,41 | 0,309 | 0,21 ; 0,55 | 0,416 NS* |
| Forme neurologique chez les cas index | 4 | 0,10 à 1,00 | 0,607 | 0,67 | 0,381 | 0,34 ; 0,88 | |
| Forme mixte chez les cas index | 7 | 0,06 à 1,00 | 0,473 | 0,36 | 0,368 | 0,26 ; 0,98 | |
| Apparentés asymptomatiques | 10 | 0,14 à 1,83 | 0,663 | 0,56 | 0,551 | 0,14 ; 0,96 | |

*NS = Non significatif

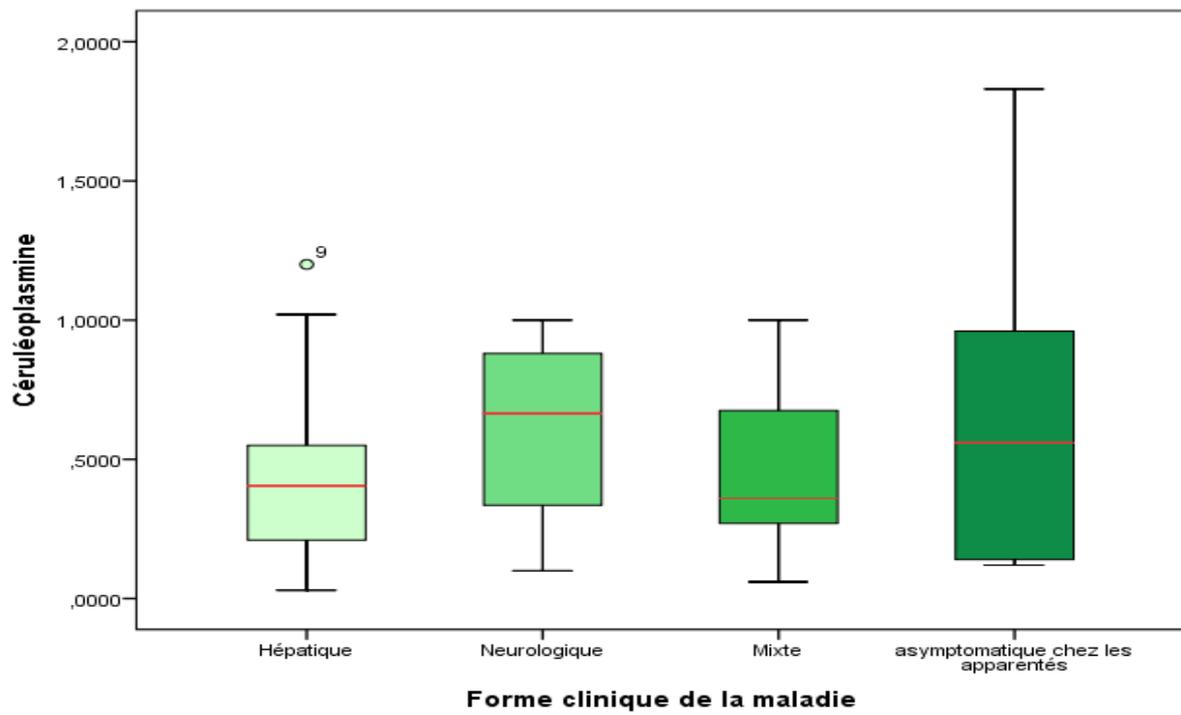


Figure 27: Estimation de la Céruleoplasmine moyenne selon la forme clinique cas index/apparentés asymptomatiques

II.1.3.3 Comparaison du bilan cuprique selon les groupes « Cas index / apparentés »

La comparaison des paramètres du bilan cuprique entre les cas index et les apparentés est très significative, permettant de poser un diagnostic de maladie de Wilson dans la plupart des cas.

Tableau 38: Comparaison des paramètres du bilan cuprique entre les cas index et les apparentés

| Variable | Modalités | Cas index | Apparentés | P value |
|--------------------|-----------|---------------|---------------|---------|
| Effectif | | 41 | 83 | |
| Céruleoplasmine | M ± ET* | 0,46 ± 0,32 | 1,41 ± 0,63 | 0,000 S |
| | < 0,90 | 34 | 15 | 0,000 S |
| | 0,90-1,20 | 7 | 7 | |
| | 1,21-1,65 | 0 | 32 | |
| | >1,65 | 0 | 29 | |
| Cuivre urinaire | M ± ET* | 58,34 ± 35,69 | 27,40 ± 27,92 | 0,000 S |
| | < 30 | 8 | 60 | 0,000 S |
| | 30-50 | 13 | 16 | |
| | >50 | 20 | 7 | |
| Cuivre plasmatique | M ± ET* | 6,02 ± 3,62 | 13,83 ± 7,52 | 0,000 S |
| | < 5 | 18 | 5 | 0,000 S |
| | 5-10 | 18 | 14 | |
| | 10-26 | 5 | 58 | |
| | >26 | 0 | 6 | |

II.1.3.4 Comparaison du bilan cuprique selon les groupes « Apparentés normaux / Apparentés Hétérozygotes »

La comparaison des paramètres du bilan cuprique entre le groupe des apparentés normaux et apparentés hétérozygotes dans notre série de patient, s'est révélé significative, avec des valeurs seuils pour les hétérozygotes. Ce résultat pourrait être due à la taille de l'échantillon analysé, puisque le bilan cuprique ne permet pas de distinguer entre les deux groupes d'apparentés.

Tableau 39: Comparaison des paramètres du bilan cuprique entre les apparentés normaux/ hétérozygote

| Variable | Modalités | Apparentés Hétérozygotes | Apparentés normaux | P value |
|--------------------|-----------|--------------------------|--------------------|----------|
| Effectif | | 41 | 15 | |
| Céruleoplasmine | M ± ET* | 1,51 ± 0,28 | 2,02 ± 0,30 | 0,000 S |
| | 0,90-1,20 | 4 | 0 | 0,000 S |
| | 1,21-1,65 | 29 | 1 | |
| | >1,65 | 8 | 14 | |
| Cuivre urinaire | M ± ET* | 22,10 ± 9,33 | 15,80 ± 6,28 | 0,019 S |
| | < 30 | 30 | 15 | 0,026 S |
| | 30-50 | 11 | 0 | |
| | >50 | 0 | 0 | |
| Cuivre plasmatique | M ± ET* | 13,39 ± 5,65 | 20,20 ± 8,57 | 0,000 S |
| | < 5 | 0 | 0 | 0,136 NS |
| | 5-10 | 3 | 0 | |
| | 10-26 | 36 | 12 | |
| | >26 | 2 | 3 | |

II.1.3.5 Caractéristiques des patients selon le groupe d'étude

Les 4 groupes étudiés ont été réparti :

- G1 = La forme hépatique chez les cas index : 30 patients
- G2 = La forme neurologique chez les cas index : 4 patients
- G3= La forme mixte chez les cas index : 7 patients
- G4= Les apparentés : 83 patients

Tableau 40: Caractéristiques statistiques de la population analysés selon la forme clinique

| Variable | Modalités | Groupe 1 | Groupe 2 | Groupe 3 | Groupe 4 | P value |
|--|------------------------------|---------------|--------------|--------------|---------------|-------------|
| Sexe | Hommes | 21 | 4 | 2 | 51 | 0,083 LS |
| | Femmes | 9 | 0 | 5 | 32 | |
| Age au diagnostic | M ± ET* | 14,9±6,6 | 32,5±7,6 | 21,4±3,6 | 17,0±11,0 | 0,003 S |
| Délai (Cas index) au diagnostic (mois) | M ± ET* | 6,8±8,6 | 6,5±2,1 | 13±17,2 | 0,93±0,17 | 0,000 S |
| Consanguinité | Non | 8 | 2 | 0 | 18 | 0,252 NS |
| | Oui | 22 | 2 | 7 | 65 | |
| Cas similaire fratrie | Non | 13 | 4 | 2 | 0 | 0,000 S |
| | Oui | 17 | 0 | 5 | 83 | |
| Atteinte hépatique | Pas d'atteinte | 0 | 4 | 0 | 73 | 0,000 S |
| | Ictère | 25 | 0 | 4 | 7 | 0,000 S |
| | HPM | 14 | 0 | 3 | 9 | 0,000 S |
| | HTP | 29 | 0 | 7 | 8 | 0,000 S |
| | Cirrhose | 17 | 0 | 4 | 1 | 0,000 S |
| | Ascite | 9 | 0 | 0 | 0 | 0,000 S |
| | IHC | 9 | 0 | 0 | 1 | 0,000 S |
| Troubles neurologiques | Non | 30 | 0 | 0 | 83 | 0,000 S |
| | Oui | 0 | 4 | 7 | 0 | |
| Céruleoplasmine | < 0,90 | 26 | 3 | 5 | 15 | 0,000 S |
| | 0,90-1,20 | 4 | 1 | 2 | 7 | |
| | 1,21-1,65 | 0 | 0 | 0 | 32 | |
| | >1,65 | 0 | 0 | 0 | 29 | |
| Cuivre urinaire | < 30 | 6 | 1 | 1 | 60 | 0,000 S |
| | 30-50 | 9 | 1 | 3 | 16 | |
| | >50 | 15 | 2 | 3 | 7 | |
| Cuivre plasmatique | < 5 | 14 | 0 | 4 | 5 | 0,000 S |
| | 5-10 | 14 | 3 | 1 | 14 | |
| | 10-26 | 2 | 1 | 2 | 58 | |
| | >26 | 0 | 0 | 0 | 6 | |
| Mutations délétères | Normal | 0 | 0 | 0 | 15 (18,3%) | 0,000 S |
| | Homozygote I | 17 (56,7%) | 1 (25,0%) | 6 (85,7%) | 11 (13,4%) | |
| | Hétérozygote composite IC+II | 4 (13,3%) | 2 (50,0%) | 0 (0,0%) | 1 (1,2%) | |
| | Hétérozygote | 0 | 0 | 0 | 41 (49,4%) | |
| | Non identifié | 9 (30,0%) | 1 (25,0%) | 1 (14,3%) | 15 (18,3%) | |

II.2 La maladie de Gaucher

II.2.1 Cas index

II.2.1.1 Description statistique de l'échantillon

Au total, **30 cas index** ont fait partie de cette étude, réparti en 28 enfants et 2 adultes (Nous avons considéré comme enfant, un âge < 18 ans). Il s'agit de patients émanant des différents services de pédiatrie, médecine interne, gastro-entérologie, et neurologie du territoire nationale. La moyenne d'âge est de $8,43 \pm 10,36$ (valeurs extrêmes comprises entre 1 à 50 ans), La consanguinité est estimée à 76.7%, et le sexe ratio calculé à 1.7.

Sur le plan clinique, les enfants présentaient une maladie de Gaucher type I pour 11/28 (39.3%), et un type III pour 17/28 (60.7%). Les deux adultes avaient une maladie de Gaucher de type I. La classification clinique a été réorientée à l'issu des résultats du test génétique.

Tableau 41: Description statistique de cas index Gaucher

| Variable | Paramètres étudiés | Valeurs |
|--------------------------------|--------------------------|------------------|
| Age au diagnostic | Valeurs extrêmes | 1 à 50 |
| | Moyenne \pm Ecart-type | 8,43 \pm 10,36 |
| | Médiane | 5,00 |
| | Intervalle interquartile | 2,00 ; 11,00 |
| Sexe | Sex-ratio : H / F | 19 / 11 |
| Consanguinité | Effectif (%) | 23/30 = 76,7% |
| Nombre de familles apparentées | | 25 |
| Origine (Wilaya) | Alger | 4 |
| | Ain Defla | 1 |
| | Batna | 2 |
| | Bejaia | 3 |
| | Blida | 1 |
| | Bouira | 1 |
| | Boumerdes | 1 |
| | El Oued | 1 |
| | Jijel | 3 |
| | Msila | 1 |
| | Oued Souf | 1 |
| | Sétif | 3 |
| | Tebessa | 1 |
| | Tiaret | 2 |
| | Tipaza | 1 |
| | Tizi-Ouzou | 4 |
| Forme clinique | Type I | Enfant : 11/28 |
| | | Adulte : 2/2 |
| | Type III | Enfant : 17/28 |
| | | Adulte : 0/2 |

II.2.1.2 Caractéristiques cliniques

II.2.1.2.1 Comparaison des caractéristiques (Age moyen et signes cliniques) entre les deux formes

Au sein de notre population étudiée, le type III prédomine par rapport au type I de la maladie (17/13).

Le type III est une forme infantile, avec un âge moyen de $4,24 \pm 3,35$ ans, tandis que le type I s'est manifestée à un âge plus avancé de $13,92 \pm 13,67$ ans.

HSM est la cytopénie sont des manifestations constantes, identifiées dans les deux formes de la maladie.

On décrit une HSM, cytopénie et des douleurs osseuses pour le type I, alors que le type III est associé en plus de HSM, et de la cytopénie, aux troubles neurologiques, et au strabisme

Tableau 42: Comparaison des caractéristiques (Age moyen et signes cliniques) entre les deux formes

| | | Type I | Type III | P value |
|------------------------------------|-----------------|-------------------|-----------------|---------------------------|
| Effectif | | 13 | 17 | |
| Sexe | Masculin | 9 | 10 | 0,557 |
| | Féminin | 4 | 7 | NS* |
| Age (M \pm ET) | | 13,92 \pm 13,67 | 4,24 \pm 3,35 | 0,004 S** |
| HSM (n) | | 13/13 | 17/17 | 1,000 NS* |
| Cytopénie (n) | | 13/13 | 17/17 | 1,000 NS* |
| Douleurs osseuses (n) | | 8/13 | 4/17 | 0,013 S** |
| Troubles neurologiques (n) | | 0/13 | 10/17 | 0,001 S** |
| Strabisme (n) | | 0/13 | 16/17 | < 10 ⁻⁶ S** |

II.2.1.2.2 Comparaison des symptômes cliniques selon la classe d'âge

Notre population analysée est à prédominance infantile, avec une répartition majoritaire de la tranche 0-6 ans (17/13).

Le type III est le plus identifié pour les tranches d'âge 0-12 ans, les deux adultes de la série présentent un type I de la maladie de Gaucher.

Tableau 43: Comparaison des symptômes cliniques selon la classe d'âge

| Variable | | [0 - 6[| [6 - 12[| [12 - 18[| ≥ 18 | P value |
|-----------------------------|-----------------|---------|----------|-----------|------|-------------|
| Effectif | | 17 | 6 | 5 | 2 | |
| Sexe | Male | 11 | 3 | 3 | 2 | 0,647 NS |
| | Femelle | 6 | 3 | 2 | 0 | |
| Forme clinique | Type I | 4 | 3 | 4 | 2 | 0,043 S |
| | Type III | 13 | 3 | 1 | 0 | |
| Hépatosplénomégalie | | 17/17 | 6/6 | 5/5 | 2/2 | 1,000 NS |
| Cytopénie | | 17/17 | 6/6 | 5/5 | 2/2 | 1,000 NS |
| Douleurs osseuses | | 1/17 | 5/6 | 4/5 | 2/2 | 0,007 S |
| Trouble neurologique | | 6/17 | 3/6 | 1/5 | 0/2 | 0,536 NS |
| Strabisme | | 12/17 | 3/6 | 1/5 | 0/2 | 0,087 LS |

II.2.1.2.3 Corrélation entre les classes d'âges et la fréquence de forme clinique type1/type3

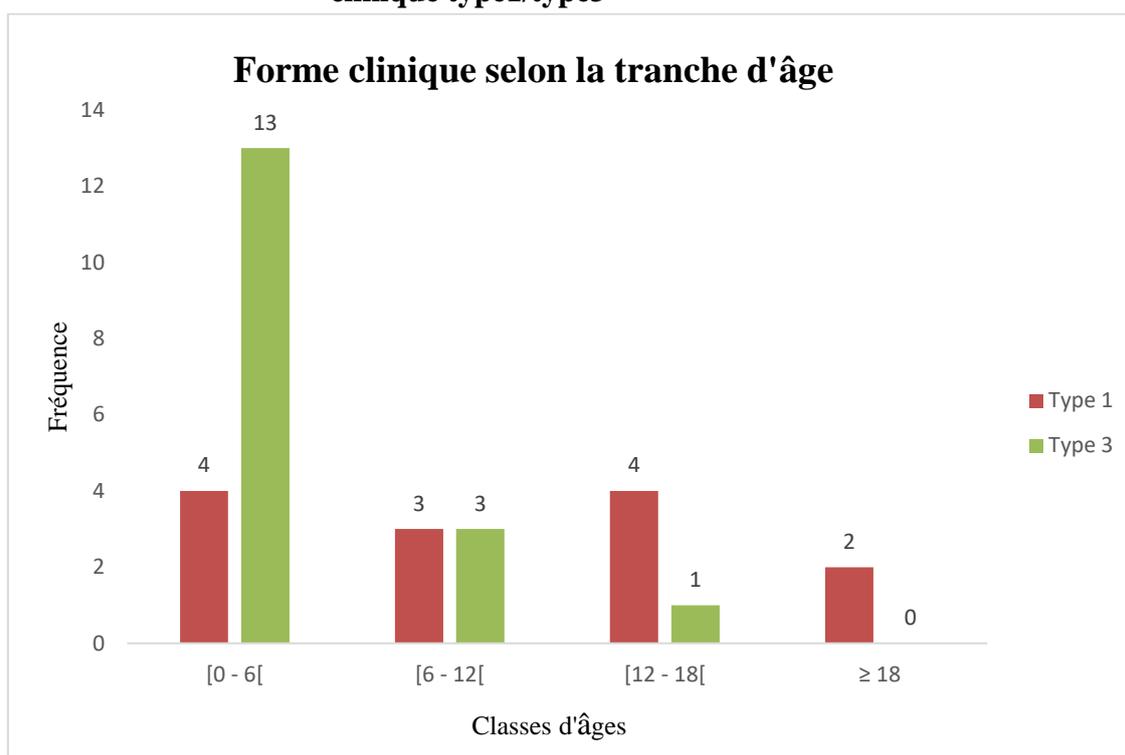


Figure 28: Représentation de la forme clinique selon la tranche d'âge

II.2.1.3 Résultats génétiques :

La recherche des deux mutations récurrentes a été informative pour 26/30 patients « Cas index », soit 87%.

Le statut génétique est reporté dans le tableau ci-dessous :

Tableau 44: Statut génétique des cas index

| Statut génétique | L444P Homozygote | N370S Homozygote | L444P+N370S Composite | N370S Composite incomplet | Absence L444P N370S |
|------------------|------------------|------------------|-----------------------|---------------------------|---------------------|
| Effectif | 15 | 4 | 4 | 3 | 4 |

Tableau 45: Répartition du statut génétique selon l'âge

| Statut génétique | L444P Homozygote | N370S Homozygote | L444P+N370S Composite | N370S Composite incomplet | Absence L444P N370S |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| Enfant N= 28 | 15 | 3 | 3 | 3 | 4 |
| Adulte N= 2 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |

La mutation L444P homozygote est la mutation prédominante dans notre série (15/11), suivie des mutations N370S homozygotes, et de L444P+N370S composites.

La L444P prédomine largement en population infantile, alors que la N370S est identifiée essentiellement chez l'adulte.

Le profil composite N370S incomplet, requiert de compléter par le génotype en entier du gène GBA, il appuie les arguments d'une maladie de Gaucher, mais nous limite dans la réalisation d'enquête familiale.

II.2.1.3.1 Lien entre le statut génétique et les caractéristiques (Age moyen et signes cliniques)

Le statut génétique réoriente la classification clinique, puisque les profils L444P sont classés type III systématiquement. Ce statut est largement représenté chez la tranche d'âge 0-5 ans. La comparaison de la symptomatologie clinique entre les 3 statuts génétiques révèle qu'il n'y a pas de différence significative entre HSM et la cytopénie. Les douleurs osseuses quant à eux sont à la limite de la significativité, tandis que les troubles neurologiques sont spécifiquement décrits pour les statuts L444P.

Tableau 46: Lien entre le statut génétique et les caractéristiques (Age moyen et signes cliniques)

| Variables | Modalités | L444P Homozygote | N370S Homozygote Où Composite incomplet | L444P+N370S | P value |
|-----------------------------------|-----------------|---------------------|---|---------------|----------------------|
| Effectif | | 15 | 7 | 4 | / |
| Age (M ± ET) | | 4,33 ± 3,52 | 12,57 ± 10,42 | 19,75 ± 20,60 | 0,006 S |
| Classe d'âge | < 5 (n = 14) | 10 | 1 | 1 | 0,047 S |
| | ≥ 5 (n = 16) | 5 | 6 | 3 | |
| Hépatosplénomégalie (n) | | 15 | 7 | 4 | 1,000 NS |
| Pancytopenie (n) | | 15 | 7 | 4 | 1,000 NS |
| Douleurs osseuses (n) | | 3 | 4 | 3 | 0,066 LS |
| Troubles neurologiques (n) | | 10 | 0 | 0 | 0,026 S |
| Strabisme (n) | | 14 | 0 | 0 | < 10 ⁻⁴ S |

II.2.1.3.2 Lien entre les statuts génétiques et la sévérité de la maladie chez les cas index

La sévérité est définie par l'apparition de troubles neurologiques et de complications osseuses pour le type I

II.2.1.3.2.1 Comparaison des statuts N370S/L444P/N370S+L444P par rapport à la sévérité

La comparaison des 3 profils génétiques en fonction de la sévérité clinique est fortement significative, avec une répartition des formes sévères uniquement pour le statut L444P homozygote.

Tableau 47: Comparaison des statuts N370S/L444P/N370S+L444P par rapport à la sévérité

| | Légères | Sévères | P value |
|--|---------|---------|------------|
| L444P Homozygote | 5 | 10 | 0,025 S |
| L444P+N370S | 4 | 0 | |
| N370S Homozygote où Composite incomplet | 7 | 0 | |

II.2.1.4 Résultats biochimiques :

L'ensemble des malades retenus pour l'étude avaient une activité enzymatique déficiente

II.2.1.4.1 Comparaison des taux de β -glucocérébrosidase pour le type I et le type III

La comparaison des taux de β -glucocérébrosidase entre le type I et le type III ne retrouve pas de différence significative. Le taux de l'enzyme déficiente ne permet pas d'identifier la forme clinique

Tableau 48: Comparaison des taux de β -glucocérébrosidase pour le type I et le type III

| Forme clinique | Taux β -glucocérébrosidase | | | | | | P value |
|----------------|----------------------------------|------------------|---------|---------|------------|-----------|-------------|
| | Effectif | Valeurs extrêmes | Moyenne | Médiane | Ecart-type | Quartiles | |
| Type I | 13 | 0,66 à 3,20 | 1,51 | 1,50 | 0,81 | 1,1 ; 2,1 | 0,216 NS |
| Type III | 17 | 0,10 à 4,10 | 1,11 | 0,80 | 0,90 | 0,6 ; 1,3 | |

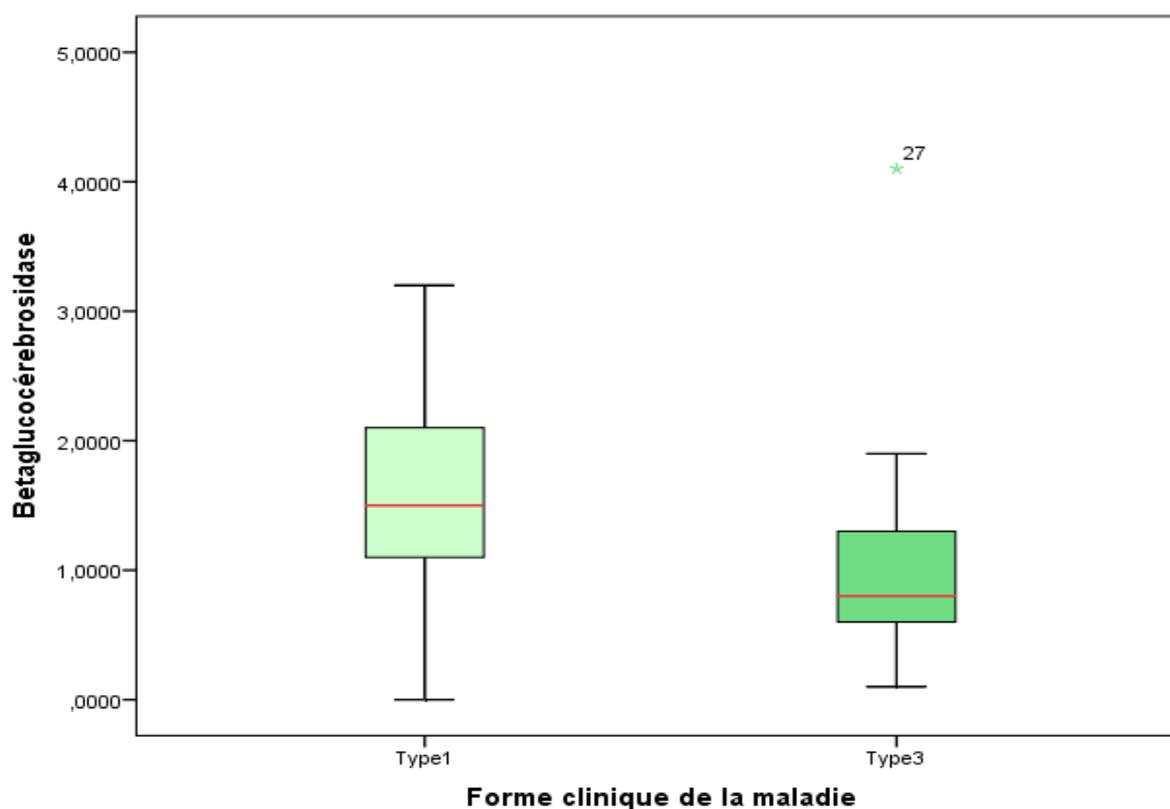


Figure 29: Taux de β -glucocérébrosidase moyen selon la forme clinique

II.2.1.4.2 Comparaison des taux de β -glucocérebrosidase moyen selon la classe d'âge

L'analyse du déficit en enzyme β -glucocérebrosidase entre les différentes classes d'âge, ne montre pas de différence significative.

Tableau 49: Comparaison des taux de β -glucocérebrosidase moyen selon la classe d'âge

| Tranche d'âge | Taux de β -glucocérebrosidase | | | | | | P value |
|---------------|-------------------------------------|------------------|---------|---------|------------|-----------|-------------|
| | Effectif | Valeurs extrêmes | Moyenne | Médiane | Ecart-type | Quartiles | |
| [0 - 6[| 17 | 0,50 à 4,10 | 1,47 | 1,20 | 0,99 | 0,7 ; 1,9 | 0,439 NS |
| [6 - 12[| 6 | 0,10 à 2,30 | 1,18 | 1,25 | 0,83 | 0,4 ; 1,8 | |
| [12 - 18[| 5 | 0,66 à 1,1 | 0,74 | 0,90 | 0,44 | 0,7 ; 1,0 | |
| ≥ 18 | 2 | 1,20 à 1,60 | 1,40 | 1,40 | 0,28 | 1,2 ; 1,6 | |

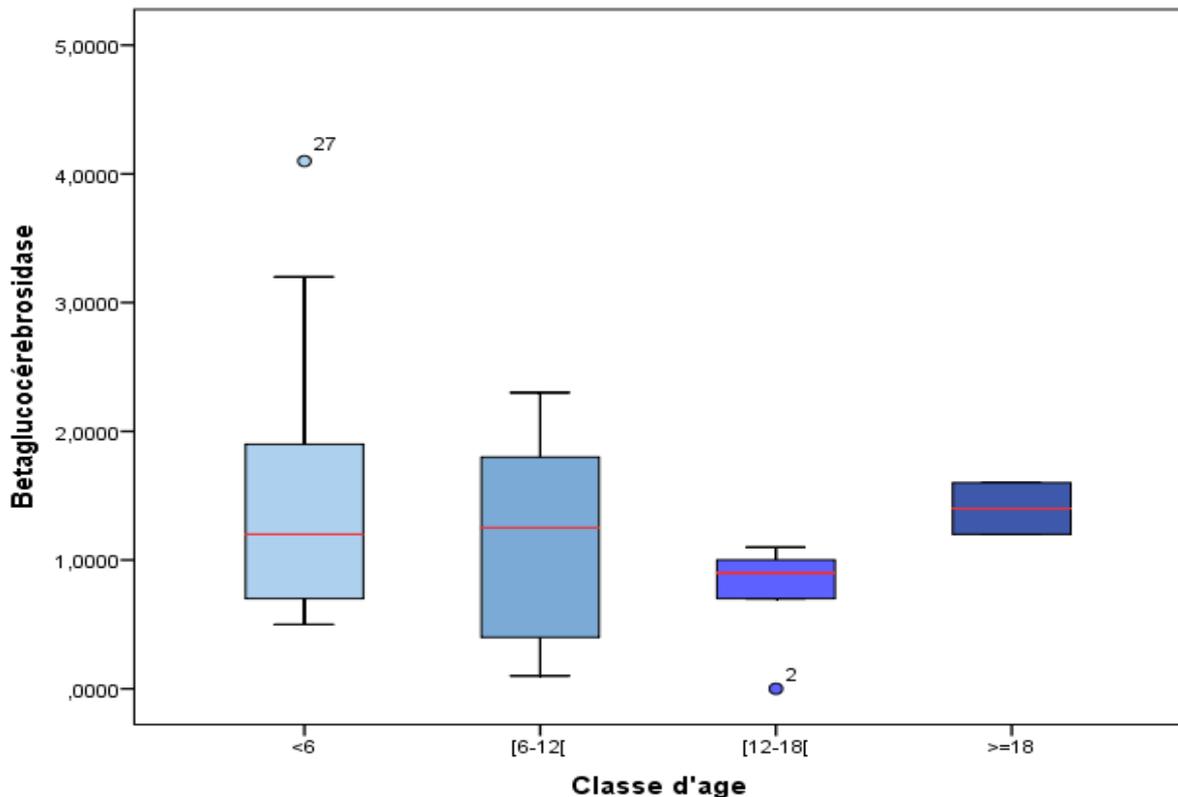


Figure 30: Taux de β -glucocérebrosidase moyen selon la tranche d'âge

II.2.1.5 Lien entre le statut génétique et les résultats enzymatiques chez les cas index

II.2.1.5.1 Lien entre la β -glucocérebrosidase et le statut génétique

La comparaison des taux de β -glucocérebrosidase entre les différents statuts génétiques identifiés chez les cas index ne révèle pas de différence significative. L'activité enzymatique ne renseigne pas sur le statut génétique.

Tableau 50: Lien entre la β -glucocérebrosidase et le statut génétique

| Statut génétique | β -glucocérebrosidase | | | | P value |
|---|-----------------------------|---------|---------|------------|--------------|
| | Valeurs extrêmes | Moyenne | Médiane | Ecart-type | |
| Non identifié | 0,6 à 1,8 | 1,15 | 1,10 | 0,59 | 0,668 NS* |
| L444P Homozygote | 0,1 à 4,1 | 1,10 | 0,80 | 0,94 | |
| N370S Homozygote | 1,1 à 2,1 | 1,40 | 1,20 | 0,47 | |
| L444P+N370S | 0,9 à 2,1 | 1,60 | 1,70 | 0,51 | |
| Hétérozygote composite N370S incomplet | 0,95 à 3,2 | 1,83 | 2,30 | 1,65 | |

*NS = Non significatif

II.2.1.5.2 Lien entre la Chitotriosidase et le statut génétique

La comparaison des taux de Chitotriosidase entre les différents statuts génétiques identifiés chez les cas index ne révèle pas de différence significative.

Tableau 51: Lien entre la Chitotriosidase et le statut génétique chez les cas index

| Statut génétique | Chitotriosidase | | | | P value |
|---|------------------|---------|---------|------------|--------------|
| | Valeurs extrêmes | Moyenne | Médiane | Ecart-type | |
| Non identifié | 654 à 1542 | 967,75 | 837,50 | 392,53 | 0,456 NS* |
| L444P Homozygote | 560 à 21100 | 6036,80 | 1420,00 | 7647,78 | |
| N370S Homozygote | 874 à 1420 | 1098,25 | 1049,50 | 242,77 | |
| L444P+N370S | 641 à 18540 | 5473,25 | 1356,00 | 8717,81 | |
| Hétérozygote composite N370S incomplet | 980 à 1470 | 1183,33 | 1100,00 | 255,41 | |

*NS = Non significatif

II.2.2 Les apparentés

II.2.2.1 Caractéristiques cliniques :

Parmi les 52 patients « Apparentés », on note :

- 40 non malades
- 4 présentant une symptomatologie similaire aux cas index
- 8 asymptomatiques

Les signes cliniques étaient peu fréquents chez les apparentés :

- Hépatosplénomégalie chez 6 patients (11,5%)
- Pancytopénie chez 6 patients (11,5%)
- Douleurs osseuses chez 3 patients (5,8%)
- Troubles neurologiques chez 2 patients (3,8%)
- Strabisme chez aucun patients (0,0%)

II.2.2.2 Caractéristiques génétiques

Parmi les 52 patients « Apparentés », le statut génétique est :

- **Absence de mutation** dans 3 cas (correspondant aux 4 familles, dont le test génétique n'a pas été informatif)
- **Statut homozygote ;**
 - L444P Homozygote dans 5 cas
 - N370S Homozygote dans 1 cas
 - Hétérozygote composite L444P+N370S dans 4 cas
- **Statut hétérozygote :**
 - L444P Hétérozygote dans 19 cas
 - N370S Hétérozygote dans 6 cas
- **Statut normal** : relatif aux cas index avec un génotype N370S homozygote, L444P homozygote, ou N370S+L444P
 - N370S normal dans 5 cas
 - L444P normal dans 8 cas
 - N370S+L444P normal dans 1 cas

II.2.2.3 Résultats de l'activité enzymatique selon le statut génétique

II.2.2.3.1 Lien entre la β -glucocérebrosidase et le statut génétique

La comparaison des taux de β -glucocérebrosidase en fonctions des différents statuts génétiques identifiés chez les apparentés est fortement significative. L'enzyme déficiente est retenue pour distinguer entre les apparentés normaux sur le plan clinique et les éventuels atteints de la maladie.

Tableau 52: Lien entre la β -glucocérebrosidase et le statut génétique

| Statut génétique | Beta glucocerebrosidase | | | | P value |
|---------------------------------------|-------------------------|---------|---------|------------|--------------|
| | Valeurs extrêmes | Moyenne | Médiane | Ecart-type | |
| Absence de mutations | 0,8 à 10 | 6,27 | 8,00 | 4,84 | 0,000 S** |
| L444P Homozygote | 0,9 à 1,4 | 1,02 | 0,90 | 0,22 | |
| N370S Homozygote | 4 | 4,00 | 4,00 | 0,00 | |
| L444P Hétérozygote | 6 à 17 | 8,81 | 8,00 | 2,44 | |
| N370S Hétérozygote | 7,2 à 17,4 | 11,52 | 9,60 | 4,50 | |
| Hétérozygote composite L444P+N370S | 0 à 2,9 | 1,25 | 1,05 | 1,39 | |
| N370S normal | 8 à 17,2 | 13,40 | 14,50 | 3,49 | |
| L444P normal | 6,2 à 19 | 13,81 | 13,60 | 4,50 | |
| N370S+L444P normal | 19,2 | 19,20 | 19,20 | 0,00 | |

*NS = Non significatif

II.2.2.3.2 Lien entre la Chitotriosidase et le statut génétique

La comparaison des taux de chitotriosidase en fonctions des différents statuts génétiques identifiés chez les apparentés est fortement significative.

Tableau 53: Lien entre la Chitotriosidase et le statut génétique

| Statut génétique | Chitotriosidase | | | | P value 0,000 S** |
|---------------------------------------|------------------|---------|---------|------------|-------------------------|
| | Valeurs extrêmes | Moyenne | Médiane | Ecart-type | |
| Absence de mutations | 95 à 254 | 151,33 | 105,00 | 89,05 | |
| L444P Homozygote | 1850 à 19850 | 9248,20 | 15800 | 8042,74 | |
| N370S Homozygote | 3450 | 3450 | 3450 | 0,00 | |
| L444P Hétérozygote | 25 à 150 | 63,68 | 84,00 | 35,75 | |
| N370S Hétérozygote | 35 à 84 | 59,33 | 74,00 | 20,47 | |
| Hétérozygote composite L444P+N370S | 1873 à 15400 | 5203,25 | 2220 | 6205,50 | |
| N370S normal | 32 à 135 | 84,60 | 96,00 | 40,15 | |
| L444P normal | 35 à 125 | 70,88 | 64,00 | 29,70 | |
| N370S+L444P normal | 25 | 25,00 | 25,00 | 0,00 | |

*NS = Non significatif

II.2.2.4 Analyse statistique cas index/apparentés

II.2.2.4.1 Comparaison des résultats de l'activité enzymatiques entre cas index/apparentés

Les groupes considérés sont les suivants :

- Groupe 1 : Cas index (n = 30)
- Groupe 2 : Apparentés en totalité (n = 52)

Tableau 54: Comparaison des résultats de l'activité enzymatiques entre cas index/apparentés

| Variable | Groupe 1 | Groupe 2 | P value |
|-------------------------|-------------|-------------|------------------------|
| Beta glucocerebrosidase | 1,29 ± 0,88 | 8,96 ± 5,39 | < 10 ⁻⁶ S** |
| Chitotriosidase | 4142 ± 6465 | 1414 ± 4007 | < 10 ⁻⁶ S** |

II.2.2.4.2 Comparaison des résultats de l'activité enzymatiques entre apparentés normaux/ et apparentés hétérozygotes

La comparaison des taux de β -glucocérebrosidase entre les apparentés hétérozygotes et les apparentés normaux est significative dans notre étude, avec des valeurs basses pour les hétérozygotes. Cependant le taux de l'enzyme ne permet pas de distinguer les deux statuts génétiques. Il en est de même pour la chitotriosidase dont la comparaison des valeurs entre les deux groupes est non significative.

Tableau 55: Comparaison des résultats de l'activité enzymatique entre apparentés normaux et hétérozygotes

| | Apparentés hétérozygotes | Apparentés normaux | P value |
|--|---------------------------------|---------------------------|----------------|
| β-glucocerebrosidase | 9,46 \pm 3,17 | 14,05 \pm 4,11 | 0,000 S |
| Chitotriosidase | 62,64 \pm 32,40 | 72,50 \pm 34,68 | 0,380 NS |

II.2.2.5 Caractéristiques des patients selon les groupes d'étude

Les groupes étudiés sont les suivants :

- Groupe 1 : L444P Homozygotes : n = 15
- Groupe 2 : L444P+N370S : n = 4
- Groupe 3 : N370S homozygote ou composite : n = 7
- Groupe 4 : Apparentés : n = 52

Les caractéristiques étudiées sont :

- L'âge
- La consanguinité
- Les signes cliniques : l'hépatosplénomégalie, la pancytopenie, les douleurs osseuses, les troubles neurologiques et le strabisme
- Les résultats enzymatiques, de manière globale, puis par classes.

Tableau 56: Comparaison des caractéristiques des patients selon les groupes d'étude

| Variable | Groupe 1 L444P | Groupe 2 L444P+N370S | Groupe 3 N370S | Groupe 4 Apparentés | P value |
|-----------------------------|-------------------|-------------------------|-------------------|------------------------|--------------|
| Age (en années) | 4,33 ± 3,52 | 19,75 ± 20,60 | 12,57 ± 10,42 | 11,27 ± 11,75 | 0,017 S** |
| Consanguinité | 13/15 | 3/4 | 4/7 | 41/52 | 0,477 NS |
| Cas similaire | 7/15 | 3/4 | 2/7 | 52/52 | 0,000 S** |
| Hépatosplénomégalie | 15/15 | 4/4 | 7/7 | 6/52 | 0,000 S** |
| Pancytopénie | 15/15 | 4/4 | 7/7 | 6/52 | 0,000 S** |
| Douleurs osseuses | 3/15 | 3/4 | 4/7 | 3/52 | 0,000 S** |
| Troubles neurologique | 10/15 | 3/4 | 0/7 | 2/52 | 0,000 S** |
| Strabisme | 14/15 | 3/4 | 0/7 | 0/52 | 0,000 S** |
| Beta- Glucocérebrosidase | 1,10 ± 0,94 | 1,60 ± 0,51 | 1,59 ± 1,04 | 8,96 ± 5,39 | 0,000 S** |
| β-gluco 0-3 | 14 | 4 | 6 | 10 | 0,000 S** |
| B-gluco 3-6 | 1 | 0 | 1 | 1 | |
| B-gluco 6-25 | 0 | 0 | 0 | 41 | |
| Chitotriosidase | 6037 ± 7648 | 5473 ± 8718 | 1135 ± 231 | 1414 ± 4007 | 0,000 S** |
| Chito : 0-130 | 0 | 0 | 0 | 39 | 0,000 S** |
| Chito : 130-2000 | 10 | 3 | 7 | 6 | |
| Chito : > 2000 | 5 | 1 | 0 | 7 | |

II.3 Maladie de Fabry

II.3.1 Cas index

II.3.1.1 Caractéristiques cliniques

II.3.1.1.1 Description de l'échantillon des cas index

Au total, 4 cas index ont fait partie de cette étude. Il s'agit d'adulte jeune de sexe exclusivement masculin, présentant une moyenne d'âge estimée à $41,50 \pm 6,95$ (Valeurs extrêmes comprises entre 32 à 41). Aucune consanguinité n'a été rapporté au sein des familles.

Tableau 57: Description de l'échantillon des cas index

| Variable | Paramètres étudiés | Valeurs |
|--------------------------------|--|-------------------|
| Age au diagnostic | Valeurs extrêmes | 32 à 41 |
| | Moyenne \pm Ecart-type | $41,50 \pm 6,95$ |
| | Médiane \pm Intervalle interquartile | $43,00 \pm 11,50$ |
| Sexe | Hommes | 4 (100%) |
| Consanguinité | Effectif (%) | 0/4 = 0,0% |
| Nombre de familles apparentées | | 4 (100%) |
| Origine (Wilaya) | Alger | 1 (25%) |
| | Ghardaia | 1 (25%) |
| | Sétif | 1 (25%) |
| | Tebessa | 1 (25%) |
| Cas similaire | 1 | 1 (25%) |
| | 2 | 3 (75%) |

II.3.1.1.2 Signes cliniques

L'ensemble des patients ont consulté pour exploration d'insuffisance rénale chronique terminale, d'étiologie inconnu, les symptômes associés sont cités ci-dessous ;

Tableau 58: Principaux symptômes des cas index

| Signes cliniques | Effectif (%) |
|-----------------------------------|--------------|
| Insuffisance rénale aigue | 0 (0,0%) |
| Insuffisance rénale chronique | 4 (100%) |
| Atteinte cardiaque | 1 (25,0%) |
| Hypertension artérielle | 3 (75,0%) |
| Accident vasculaire cérébral | 1 (25,0%) |
| Angiokératome et acroparesthésies | 3 (75,0%) |

II.3.1.2 Caractéristiques génétiques

L'analyse du gène GLA a révélé la présence de 4 mutations différentes relatives à chaque famille.

Tableau 59: Nomenclature des mutations du gène GLA des cas index

| Exon/Intron | Nomenclature | Codon | Mutation | Type |
|-------------|------------------|---------|-------------|------------------------------|
| Exon 6 | c.838-849 Del 12 | / | Non décrite | Décalage du cadre de lecture |
| Exon 7 | c.1028 Del C | / | Non décrite | Décalage du cadre de lecture |
| Exon 7 | c.1072G>A | p.E358K | Décrite | Faux-sens |
| Exon 7 | c.1088 G>C | p.R363P | Décrite | Faux-sens |

II.3.1.3 Caractéristiques biochimiques :

L'ensemble des cas index, ont été diagnostiqué sur la base de la mesure de l'activité enzymatique de l' α -galactosidase qui est revenu déficiente, estimée en moyenne à $4,87 \pm 1,89$ (valeurs extrêmes comprises entre 2.14 et 6.15 nmol/h/mg de protéine).

L'ensemble des cas index avaient une protéinurie positive

II.3.2 Apparentés

II.3.2.1 Caractéristiques cliniques :

Ont été analysés 16 apparentés au total, réparti en 8 femmes et 8 hommes.

Parmi les patients « Apparentés », on note :

- 10 non malades
- 6 présentant une symptomatologie similaire aux cas index

II.3.2.2 Caractéristiques génétiques

Les statuts génétiques sont :

- Hémizygote : 6
- Hétérozygote (Conductrice) : 6
- Normal : 4

II.3.3 Analyse statistique cas index/apparentés

II.3.3.1 Corrélation entre le taux de l' α -galactosidase et le statut génétique

Le lien a été recherché entre le taux de l' α -galactosidase et les groupes d'étude :

- Groupe 1 : Cas index
- Groupe 2 : Apparentés normaux
- Groupe 3 : Apparentés atteints
- Groupe 4 : Apparentée conductrice

Tableau 60 : Lien entre le taux de l' α -galactosidase et les différents statuts génétiques

| α -galactosidase | Cas index | Apparentés normaux | Apparentés atteints | Apparentés conductrices | P value |
|-------------------------|-----------------|--------------------|---------------------|-------------------------|----------|
| Effectif | 4 | 4 | 6 | 6 | |
| M \pm ET | 4,87 \pm 1,89 | 30,50 \pm 3,32 | 6,56 \pm 2,73 | 23,25 \pm 4,80 | 0,000 S* |
| [0 – 10[| 4 | 0 | 6 | 0 | 0,000 S* |
| [10 – 20 [| 0 | 0 | 0 | 2 | |
|]20 – 35 [| 0 | 4 | 0 | 4 | |

II.3.3.2 Comparaison des taux de l' α -galactosidase entre deux groupes d'apparentés normaux/conductrices

Le lien a été recherché entre le taux de l' α -galactosidase et les groupes d'étude :

- Groupe 2 : Apparentés normaux
- Groupe 4 : Apparentée conductrice

Tableau 61 : Lien entre le taux de l' α -galactosidase et les différents statuts génétiques

| α -galactosidase | Apparentés normaux | Apparentés conductrices | P value |
|-------------------------|--------------------|-------------------------|------------|
| Effectif | 4 | 6 | |
| M \pm ET | 30,50 \pm 3,32 | 23,25 \pm 4,80 | 0,031 S* |
| [0 – 10[| 0 | 0 | 0,628 NS** |
| [10 – 20 [| 0 | 2 | |
| [20 – 35 [| 4 | 4 | |

II.3.4 Caractéristiques de patients selon le groupe d'étude

Tableau 62 : Comparaison des caractéristiques statistiques entre cas index et apparentés

| Variable | Modalités | Cas index | Apparentés | P value |
|----------------------------|--------------------|--------------|---------------|----------------|
| Sexe | Hommes | 4 | 8 | 0,117 |
| | Femmes | 0 | 8 | NS** |
| Age au diagnostic | M ± ET* | 41,50 ± 6,95 | 42,44 ± 8,44 | 0,840 NS** |
| Délai au diagnostic (mois) | M ± ET* | 11,50 ± 8,43 | 0,963 ± 0,102 | 0,000 S |
| Consanguinité | Non | 4 | 16 | 1,000 NS** |
| | Oui | 0 | 0 | |
| Cas similaire fratrie | 1 cas | 1 | 0 | 0,010 S* |
| | 2 cas | 3 | 4 | |
| | 3 cas | 0 | 12 | |
| Signes cliniques | IRA | 0/4 | 2/16 | 0,852 NS** |
| | IRCT | 4/4 | 5/16 | 0,026 S* |
| | Atteinte cardiaque | 1/4 | 0/16 | 0,200 NS** |
| | HTA | 3/4 | 7/16 | 0,582 NS** |
| | AVC | 1/4 | 0/16 | 0,200 NS** |
| | Angiokératome | 3/4 | 7/16 | 0,582 NS** |
| Alpha galactosidase | [00-10[| 4 | 6 | 0,082 LS*** |
| | [10-25[| 0 | 4 | |
| | [25-55[| 0 | 6 | |
| Protéinurie | Positive | 4 | 7 | 0,094 |
| | Négative | 0 | 9 | LS*** |
| Mutations délétères | Atteints | 4 | 6 | 0,233 |
| | Conductrices | 0 | 6 | NS** |

Discussion

III. Discussion

III.1 Avantages et limites de notre travail

Le présent travail a porté sur l'implantation de trois protocoles opératoires de biologie moléculaire dans notre laboratoire de Biochimie au CHU Mustapha d'Alger. Il s'agit de l'analyse moléculaire des gènes ATP7B, GBA et GLA rentrant dans le cadre de l'exploration biochimique de trois MHM, la maladie de Wilson, maladie de Gaucher et maladie de Fabry. L'installation de l'ingénierie génétique dans notre laboratoire remonte à l'année 2001 et a été subventionnée par le Comité National Médical de Génétique présidé par le Pr Oukaci Youcef. Son orientation initiale a été dédiée au diagnostic des maladies génétiques responsables du retard mental.

Le bilan cuprique et la détermination de l'activité enzymatique intra-leucocytaire de la β -glucocérébrosidase et de l' α -galctosidase ont été les examens clés dans la sélection des patients à inclure dans l'étude génétique. Ces dosages constituent une partie du panel des paramètres biochimiques destinés à l'exploration des MHM, introduits par le professeur Berhoune Arezki, depuis 1980.

L'analyse moléculaire des gènes ATP7B, GBA et GLA ciblée sur les patients dont le diagnostic de certitude a été établi par les dosages biochimiques pratiqués, a renforcé d'une part l'exactitude du diagnostic retenu. D'autre part, elle constitue l'unique moyen valable et admis pour réaliser l'enquête familiale, et nous a permis de déterminer le statut génétique définitif des membres apparentés, et d'établir un conseil génétique adapté aux différentes familles.

Une description des mutations délétères rencontrées dans notre population a été établie, et confrontée à la symptomatologie clinique relevée.

L'identification des porteurs asymptomatiques de la maladie a été un atout diagnostique majeur avant la survenue des formes sévères. En effet, ces sujets ont bénéficié d'un suivi régulier, et d'une mise précoce sous traitement, avant l'installation des manifestations cliniques.

Le risque de récurrence de la maladie, pourrait être écarté en étiquetant les hétérozygotes potentiels au sein des familles, en proposant un conseil génétique adéquat.

Ce travail présente quelques limites :

Concernant l'identification de mutations, et en dépit de l'automatisation des techniques proposées à ce jour, les méthodes d'analyse et d'interprétation du résultat sont relativement longues (10 jours-1 mois), et de ce fait non adaptées à un contexte d'urgence.

En biologie moléculaire, différentes anomalies génétiques sont possibles au sein du même gène (qualitative, quantitative), devant être explorées par des techniques distinctes, et présentant des taux d'informativité variable. L'identification de la mutation délétère requiert parfois l'utilisation de plus d'une technique de biologie moléculaire.

Notre panel de tests proposés devra entre autres être élargi par les techniques de mise en évidence de nombre de copie du gène ; la MLPA. L'analyse complète du gène GBA est requise pour améliorer l'informativité du test génétique, et ceux essentiellement pour le diagnostic des formes adultes de la maladie.

S'ajoute à cela, l'identification de nouveaux variants, dont l'interprétation et la signification doit être argumentée sur les bases des recommandations of American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG), qui constitue une difficulté supplémentaire à la validation du test génétique. Le résultat final nécessite par ailleurs, d'être présenté et discuté au sein de comité multidisciplinaire.

III.2 Maladie de Wilson

III.2.1 Description statistique et clinique de cas index

La répartition des patients présentant des extrêmes d'âge réparties entre 3 et 45 ans, à prédominance de forme pédiatrique (56%)/ adulte (44 %), est similaire aux différents travaux réalisés portant sur la caractérisation du gène ATP7B.(163,164)

Le taux de consanguinité de **70,7 %** rejoint la description portant sur une cohorte pédiatrique, ou il a été estimé à 75% en Egypte (165). Les récentes études en chine et en Inde ne rapportent pas cette caractéristique.

Le sexe ratio est équilibré dans les différents travaux, il est de 1,9 dans notre étude. (166)

Le phénotype hépatique est le plus fréquent (30/40 cas index), suivi de la forme mixte (7/41), et neurologique (4/41), une répartition représentée dans la plupart des études.

La sévérité des symptômes initiaux observés pour chacune des descriptions cliniques est indépendantes de l'âge. Cependant nous avons signalé une tendance à l'augmentation de la sévérité avec l'âge.

En effet, les enfants ont présenté une atteinte hépatique, avec des signes de sévérité qui ont concernés **61%** de l'effectif, présentant un âge compris entre 8 et 15 ans. La forme mixte a été représentée pour un enfant de 16 ans.

On ne rapporte pas dans notre étude, une atténuation des atteintes hépatique avec l'âge de survenue de la maladie (167), probablement due à l'errance diagnostique et au délai diagnostique étendu, estimé en moyenne à $7,53 \pm 10,13$ (valeurs extrêmes : 1 à 48 mois).

La forme mixte et neurologique concerne l'adulte, avec une augmentation des symptômes avec l'âge d'apparition de la maladie.

L'anneau de KF n'a pas été décrit dans notre étude, il est largement cité dans les études asiatiques, et signalé moins présent chez l'enfant par rapport aux adultes.(164,168,169)

III.2.2 Résultats génétiques

L'analyse du gène ATP7B par séquençage direct Sanger, a été informative dans 73% des cas, suggérant de compléter à l'avenir l'exploration par l'étude du nombre de copie du gène, ainsi que l'analyse de séquences 5'UTR, et 3'UTR, et à l'étude du transcrit.

La maladie de Wilson est très homogène sur la plan génétique (il n'y a pas d'autres gènes incriminés), l'hérédité manquante relèverait probablement de mutation intronisée profonde.

Nos résultats semblent prometteurs, étant donné qu'un travail similaire effectué par (Li et al 2021) en Chine, rend compte d'une identification de 48 mutations pour 103 malades Wilson (soit 47%).(168)

Le caractère hérité a été vérifié pour la totalité des patients, probablement en relation directe avec le taux de consanguinité relativement élevé de la population étudiée, écartant l'éventualité d'une mutation de novo.

Les mutations les plus fréquentes ont été réparties sur l'exon 13, 10, et 11. L'ensemble des exons ont été concernés, à l'exception de l'exon 4, 5, 6, 9, et 12.

Ont été décrites 13 mutations faux-sens, 1 délétion, et 4 mutations qui touchent un site cryptique d'épissage, et une mutation non-sens.

Les mutations décrites dans notre population, concernent des mutations fréquemment décrites dans le bassin de la méditerranée, pour la plupart (170–172). Elles sont identifiées majoritairement au statut homozygote 24/30 mutations (80%), rejoignant la description de (Abdelghafar et al, 2008).

La mutation la plus fréquente dans notre étude est c.3059 A>G /p.(Lys1020Arg), au niveau de l'exon 13, qui est largement incriminée dans la littérature (173,174), suivie de la délétion c.2532 Del A au niveau de l'exon 10, et de la mutation c.2668G>A.

III.2.2.1 L'étude de corrélation mutations spécifiques-phénotypes

✓ ATP7B(NM_000053.4) : c.51+4 A>T /IVS1+4A>T

Il s'agit d'une mutation consensuelle d'épissage localisée dans le site d'épissage donneur de l'intron 1.(175)

Elle a été précédemment rapportée dans deux populations différentes. Tout d'abord, signalée au Brésil sans expression clinique de la maladie (176), puis elle a été signalée dans 13 % des chromosomes dans une population normale des îles Canaries (171). Plus tard cette observation fût controversée, et argumentée par le manque de sensibilité de la technique SSCP employée.(177)

En conséquence, tous les patients présentant cette mutation avaient l'expression clinique de la maladie de Wilson, et des études de corrélations génotypes phénotypes ont été établi. Le phénotype sévère est fréquemment associé, avec anémie hémolytique sévère, associée à une insuffisance hépato-cellulaire chez un sujet de 41 ans. Elle a été détectée chez un sujet de 17 ans qui présente une forme neurologique précoce. Mais aussi chez des enfants (6,7,12 ans) asymptomatiques, présentant un tableau biologique de cytolysé hépatique.

Elle a été retrouvée dans notre étude dans deux familles distinctes ;

- 1- A l'état hétérozygote composite, associée à une autre mutation impliquée dans un site d'épissage ; c.3904-2 A>G au niveau de l'intron 18, chez deux sœurs de la famille H, âgée de 22, et 21 ans présentant une forme hépatique avec ictère, HTP, et hépatomégalie. Mises sous traitement, depuis 2018. Leurs évolutions restent stables, et n'ont pas présenté de signes d'aggravations.
- 2- A l'état homozygote, chez deux frères de la famille B. le cas index avait 13 ans, et présentait une forme purement hépatique, son frère de 10 ans asymptomatique au moment du diagnostic. La ségrégation des allèles, a révélé la présence de la mutation à l'état hétérozygote chez les parents.

Nos résultats rejoignent les descriptions établies pour cette mutation dans les travaux de (Walter O. et al 2014), et ceux de (Lovicu M. et al 2009), à l'exception du fait que la mutation n'était décrite qu'à l'état hétérozygote au sein des populations du Brésil et d'Espagne.(175,177)

✓ **ATP7B(NM_000053.4) : c.1477C>T / (p.Q493X)**

Il s'agit d'une mutation non-sens, non décrite sur les bases de données. Cette variation unique à la population algérienne, est classée pathogène de classe 5 par l'American College of Medical Genetics l'ACMG . Elle se situe au niveau de l'exon 3, et crée un codon stop prématurée. La protéine contient 493/1464 acides aminés, perdant 162 pb du domaine de fixation du cuivre, qui s'étend jusqu'au codon 655. Elle sera dépourvue de la totalité des domaines fonctionnels transmembranaire (TM1 jusqu'à TM8), des 6 boucles, du domaine de liaison à l'ATP, et du domaine c- terminale.

Ce résultat retient la mutation pour le diagnostic de la maladie de Wilson, après vérification de la répartition de la mutation à l'état hétérozygote chez les parents. De plus un contrôle réalisé chez 80 personnes a été effectué.

L'enquête familiale a permis de révéler la mutation au statut hétérozygote chez 3 frères, et a été le point de départ au diagnostic de la maladie chez un cousin germain maternel.

Sur le plan clinique, il s'agit d'un patient âgé de 6 ans au moment du diagnostic, issu d'un mariage consanguin de premier degré, avec notion de décès dans la fratrie à l'âge de 6 ans, dans un tableau d'insuffisance hépato-cellulaire. (Annexe IX) Le malade présente la forme mixte de la maladie.

Le motif de la consultation était initialement dominé par l'atteinte purement viscérale, et les résultats du bilan cuprique ont permis de confirmer le diagnostic.

Un traitement à la D-penicillamine a été instauré précocement, à la dose d'un comprimé 3 fois par jour, permettant de stabiliser les constantes hépatiques, cependant quelques années plus tard les manifestations neurologiques se sont installées à type de tremblements et perte de la parole.

✓ **ATP7B(NM_000053.4) : c.1993A>G / p.M665V**

IL s'agit d'une mutation présente au niveau de l'exon 7 du gène, situé à 47 pb du site accepteur d'épissage, avec un impact sur le domaine TM1 au niveau de la protéine.

Elle a été retrouvée chez un patient de 38 ans, de sexe masculin, présentant une forme purement neurologique avec syndrome extra-pyramidal évocateur. Les résultats du bilan cuprique confirment le diagnostic de la maladie de Wilson. Nos résultats rejoignent les travaux de **(Srirenakumar et al 2018)**, qui incriminent le variant au sein de patients présentant entre autres des manifestations psychiatriques à type de schizophrénie.(178)

✓ **ATP7B(NM_000053.4) : c.2128G>A / p.Gly710Ser**

Une mutation située au niveau de l'exon 8, ayant pour action une modification d'un acide aminé au niveau du domaine TM2. Elle a été rapportée dans différents travaux (179,180) en Europe, Hongrie, et en Inde (181). Selon les travaux de **(Simsek Papur et al, 2013)**, la mutation est décrite comme étant la seconde mutation la plus fréquente en Turquie. Le phénotype associé dans ce travail, concerne une forme hépatique, infantile (182).

Un cas particulier purement neurologique de maladie de Wilson associée à un pseudo déficit en arylsulfatase A fût rapporté par **(Battisti et al 1999)**(183), ou la mutation a été identifiée au statut composite, associé à p.H1069Q.

Nos résultats rejoignent les différents travaux cités, même si les corrélations phénotypes-génotypes sont rarement établis et même au sein de la famille.

La mutation est décrite dans notre série, à l'état homozygote, chez la patiente R. de 22 ans, présentant une forme mixte de la maladie, et sa sœur I. asymptomatique au moment du diagnostic. L'atteinte neurologique a prédominé, et ce n'est qu'au moment du diagnostic ou un foie de cirrhose a été révélé à l'échographie.

✓ **ATP7B(NM_000053.4) : c.2204T>C / p.Leu735Pro**

Il s'agit d'une mutation présente au sein de l'exon 8, et qui impacte le domaine TM3. La mutation n'a pas été décrite à ce jour dans la littérature.

Au vu des arguments cliniques et biologiques suivants, ce variant est retenu pathogène ;

- Il est absent des bases de données de polymorphisme humain, et de notre série interne de contrôle comportant 80 échantillons.
- Les prédictions bio-informatiques Polyphen2 très en faveur du caractère pathogène
- Situé dans le 3^{ème} domaine transmembranaire de la protéine
- Avec un phénotype du patient concordant avec le diagnostic de maladie de Wilson, sujet de 23 ans, de sexe masculin, et issu de mariage consanguin. Sur le plan clinique, on décrit une manifestation mixte à prédominance neurologique (tremblement et perte de parole), et biologique avec un bilan cuprique perturbé.
- La ségrégation d'allèle retrouve la mutation à l'état hétérozygote chez les parents, appuyant nos arguments de classification.

La littérature rapporte une publication récente de **(Singh et al 2019)**, avec un variant de signification différente, à la même position (c.2204 T>G/ p.L735R), incriminé pathogène, en Inde.(181)

✓ **ATP7B(NM_000053.4) : c.2297C>T / p.(Thr766Met)**

Il s'agit de la mutation faux sens au niveau de l'exon 8, qui touche le domaine TM4 de la protéine. Décrite dans des travaux au préalable en Angleterre, et en Inde récemment selon les travaux de **(Singh et al 2019)**. (181,184)

La mutation a été identifiée dans notre étude, à l'état hétérozygote composite, chez un sujet de sexe masculin, âgé de 27 ans, présentant un phénotype purement neurologique de la maladie de Wilson. La mise sous traitement a été suivie d'une phase d'aggravation à type de tremblements, et perte d'équilibre, avant de constater une nette stabilisation après plus d'une année de traitement.

✓ **ATP7B(NM_000053.4) : c.2448-1G>A (IVS9-1G>A)**

La mutation IVS9-1 G>A) dans le site accepteur de l'intron 9 entraînerait la suppression de l'exon 10 de la transcription, avec une perte de 43 acides aminés dans le domaine de transduction. Ce variant a été rapporté une seule fois, selon les travaux de **(Kumar et al 2005)**, portant sur la caractérisation du gène ATP7B dans une population indienne (185).

Le phénotype associé au statut hétérozygote dans notre étude, concerne une forme hépatique pure, chez un jeune adulte 19 ans, de sexe masculin, où le diagnostic de la maladie a été évoqué devant une HTP et une hépatomégalie. L'instauration du traitement spécifique a été immédiatement suivie d'une amélioration des symptômes.

✓ **ATP7B(NM_000053.4) : c.2532del A/ p.(Val845SerfsTer28)**

Il s'agit d'une mutation par délétion d'une adénine au niveau de l'exon 10, entraînant l'apparition d'un codon stop prématuré 28 pb en aval, la protéine est tronquée. La mutation a été rattachée à la population méditerranéenne (Italie, Sardaigne, Albanie, Egypte et en Turquie), selon les travaux de **(Figus et al 1995)**(170). Elle a récemment été identifiée accidentellement en Corée, lors d'analyse d'un panel de séquençage de gène chez des sujets de sexe masculin, présentant une obésité sévère (186). Le phénotype décrit est associé aux formes légères de la MW (187).

La mutation a été identifiée aux seins de 3 familles distinctes faisant partie de notre étude, il s'agit de 3 présentations cliniques distinctes :

- 1- Identifié en premier au statut homozygote, chez un enfant de 9 ans, originaire de Msila, présentant un tableau d'hépatopathie aiguë, son évolution demeure stable après mise sous traitement.
- 2- Le deuxième phénotype, identifié au statut homozygote, implique une forme mixte de la maladie, dont les principaux symptômes sont neurologiques et psychiatriques, l'atteinte hépatique sous-jacente fût révélée après examen échographique. Il s'agit d'une jeune femme de 23 ans, originaire de la même wilaya, Msila.
- 3- Le troisième cas, **ou** la mutation est identifiée sous forme de composite, implique une jeune femme de 18 ans, originaire du centre, et présente une forme purement hépatique de la maladie.

Cette description répond aux différentes constatations signalées en analyse génétique, **ou** les corrélations semblent très difficiles à établir (43). Les deux premières familles sont issues de la même wilaya, suggérant le caractère ancestral du gène muté.

✓ **ATP7B(NM_000053.4) : c.2558 A>G p.(Asp853Gly)**

Il s'agit d'un variant présent au niveau de l'exon 10, rapporté récemment, une seule fois, dans une étude menée à Vienne selon les travaux de **(Ferenci et al 2019)** (174), comme pathogène, en se basant sur les prédictions bio-informatiques de Polyphen2, et du fait que l'acide aspartique du codon 853 soit hautement conservé.

Notre mutation a été identifiée chez deux frères, âgés de 14 et 12 ans, présentant un tableau d'hépatopathie fulminante, évoluant devant l'errance diagnostique au stade d'insuffisance hépatocellulaire chez le plus âgé. Il décède quelques jours après le diagnostic. La mise sous traitement du jeune frère a permis le contrôle et le maintien de sa fonction hépatique.

✓ **ATP7B(NM_000053.4) : c.2668 G>A p.(Val890Met)**

C'est une mutation de l'exon 11 du gène ATP7B, située à 63 pb du site donneur d'épissage. Il est à l'origine du remplacement de la Valine ; hydrophobe en position 890 en acide aminé soufré méthionine. Cet acide aminé est situé au niveau de la 4^{ème} boucle.

La mutation a été décrite dans deux travaux en Chine, établis par **(Li et al.2018)**, identifiant la mutation au statut de composite dans un contexte de dépistage familial de MW, en absence de signes digestifs ou neurologiques. L'étude de **(Gu et al en 2003)**, l'associe au phénotype hépatique (188,189).

La mutation a été décrite dans notre travail, au sein de 3 familles apparentées, originaire de l'Est, consanguines, identifiée à l'adolescence et/ou adulte jeune. (Annexe X : Arbre généalogique). Il s'agit des premières familles MW diagnostiquées dans notre laboratoire, pour laquelle le tableau clinique est strictement hépatique, cependant les signes de sévérité varient considérablement, en fonction de la précocité du diagnostic.

La première famille a enregistré un décès à l'âge de 29 ans dans un tableau d'insuffisance hépato-cellulaire, alors que 2 autres membres S. (24 ans), et A.R (15 ans) ont bénéficié d'un traitement précoce, à la suite de l'enquête familiale effectuée en 2008 par le bilan cuprique, et qui était fortement révélateur.

L'enquête génétique réalisée quelques années plus tard, a permis d'identifier les statuts génétiques, un conseil génétique adéquat leur a été dispensé. Leur évolution est stable sous D-Penicillamine.

On note cependant, qu'un cousin germain a présenté une symptomatologie précoce à l'âge de 3 ans, toujours dans un contexte hépatique.

✓ **ATP7B(NM_000053.4) : c.2693A>G p.(Gln898Arg)**

Il s'agit d'une mutation faux-sens située au niveau de l'exon 11, à 38 pb du site donneur d'épissage. L'acide aminé 898 modifié en Arginine est localisé dans le site de liaison à l'ATP.

Décrite une seule fois en Angleterre par **(Butler et al 2001)**, où la mutation était identifiée au statut composite, dans un contexte de maladie de Wilson d'évolution fastidieuse. Il s'agissait d'un adulte jeune de 29 ans, consultant pour des crampes abdominales. L'examen clinique est revenu normal (bilan hépatique normal, et absence de signes de maladie du foie chronique). Le diagnostic MW était retenu, à la suite des résultats du bilan cuprique, et de l'IRM, qui révèlent une cirrhose avec des dépôts de cuivre au niveau des ganglions. (190)

Le contexte d'identification de la maladie au sein de notre population d'étude, est différent ; la mutation est décrite chez un enfant de 14 ans de sexe masculin, présentant un tableau d'hépatopathie fulminante, avec une IHC au stade du diagnostic. Le patient décède quelques jours après. Sa sœur de 16 ans, diabétique a été révélée asymptomatique à la suite de l'enquête familiale, pour laquelle un traitement a été entrepris.

✓ **ATP7B(NM_000053.4): c.3059 A>G p.(Lys1020Arg)**

Il s'agit d'une mutation faux-sens, localisée au niveau de l'exon 13, distante de 2 pb par rapport au site donneur d'épissage. L'acide aminé 1020 est situé dans le domaine de liaison de l'ATP. Identifiée dans différentes travaux en Europe, et en Australie.(191,192)

Des travaux récents réalisés en France par (**Couchonnal et al, 2021**) portant sur une population pédiatrique, a identifié la mutation au statut homozygote au sein de deux enfants (âge moyen 11 ans), atteints de la forme hépatique de la maladie. Une autre étude menée par (**Bost et al.2012**), rapporte la mutation au phénotype mixte chez un adulte jeune de 29 ans. (163,193)

Notre travail a révélé qu'il s'agit de la mutation la plus fréquente au sein de notre cohorte, puisqu'elle a été étiquetée au sein de **6 familles distinctes** ;

Rejoignant les travaux français, puisqu'elle a été identifiée dans notre travail, chez des enfants pour 5 familles, avec forme hépatique, souvent sévère (3/4), et pour adulte de 21 ans avec phénotype mixte.

L'ensemble des familles étaient consanguines, 3 familles étaient originaires de la même wilaya ; Khenchla.

Famille 1 :

Il s'agit de M.A, de sexe masculin (13 ans) et originaire de Tebessa, présentant une HTP, et une hépatomégalie.

Famille 2 :

La patiente F.R. âgée de 14 ans, originaire de Khenchla, rapportant 3 décès au sein de la fratrie, et consultant au stade de cirrhose.

Famille 3 :

Le patient M.M. âgé de 12 ans, originaire de Khenchla, aux antécédents de 2 décès au sein de la fratrie. Il présente une forme hépatique (ictère, HTP, et hépatosplénomégalie).

Famille 4 :

La patiente H.M de 11 ans, et son frère O. (4 ans) asymptomatique au moment du diagnostic, originaire de Khenchla. Le phénotype est purement hépatique.

Famille 5 :

La patiente H.Z. 8 ans, originaire de Bejaia, sans antécédents familiaux. Il a présenté une forme hépatique au stade de cirrhose au moment du diagnostic.

Famille 6 :

Identifiée chez A.A 21 ans, et sa sœur L. (3 ans) asymptomatique, originaire de Msila. Elle a présenté une forme mixte, dominé par l'installation de signes neurologiques ; tremblement, dysarthrie, et dystonie. L'imagerie révèle l'atteinte hépatique au stade de cirrhose.

✓ **ATP7B(NM_000053.4) : c.3060+5G>T / IVS 13+5G>T**

La mutation intervient au niveau d'un site cryptique d'épissage au niveau de l'intron 13, décrit en Espagne pour la première fois selon les travaux de (**Margarite et al, 2005**) associés à un phénotype hépatique, au statut de composite.(171)

Nos résultats rejoignent la description établie, puisque la mutation a été identifiée chez un jeune adulte de 24 ans, aux antécédents de décès au sein de la famille, et qui a présenté une hépatomégalie, stable sous traitement.

✓ **ATP7B(NM_000053.4) : c.3620A>G / p.(His1207Arg)**

La mutation est de type faux-sens, située au niveau de l'exon 17, à 64 pb près du site accepteur d'épissage, à l'origine du remplacement de l'Histidine en position 1207 par une arginine. Cet acide aminé est présent dans le domaine de fixation de l'ATP.

Il s'agit d'une mutation décrite dans une étude égyptienne par (Abd El Ghafer et al, 2008, 2011), et nos résultats rejoignent la description phénotypique, puisqu'elle est identifiée à l'état composite chez un enfant de 14 ans, présentant une forme hépatique pure de la maladie.(165,166)

✓ **ATP7B(NM_000053.4) : c.3694A>G / p. (Thr1232Pro)**

Mutation faux sens, à distance de 7 pb du site donneur d'épissage, l'acide aminé modifié en position 1232 est présent au niveau du site de liaison de l'ATP.

Rapporté par **(Deguti et al. 2005)**, dans une étude menée au Brésil sur une population pédiatrique et adulte, la mutation était décrite au statut composite, chez deux enfants de 16 et 15 ans, présentant une forme mixte de la maladie de Wilson.(176)

La mutation a été identifiée au sein de notre travail au statut homozygote, chez un enfant de sexe masculin de 12 ans présentant une forme hépatique au stade de cirrhose.

✓ **ATP7B(NM_000053.4) : c.3809A>G / p. (Asn1270Ser)**

Mutation faux sens au niveau de l'exon 18, elle a été décrite en Egypte, au Brésil, et en Chine.(165,169,176)

Elle est identifiée, dans notre étude au statut homozygote, chez un enfant de sexe féminin, âgé de 14 ans, présentant une forme précoce d'atteinte hépatique, avec un diagnostic de la maladie au stade de cirrhose du foie.

✓ **ATP7B(NM_000053.4) : c.3904-2A>G / IVS18-2A>G**

Mutation présente au niveau de l'intron 18, au site cryptique d'épissage. Décrite précédemment au sein de la population pédiatrique, et en Egypte.(165,193)

L'étude de **(Abdelghafer et al, 2011)** rapporte une forme fulminante hépatique, à l'âge de 8 ans, tandis que son frère 10 ans a manifesté une forme purement neurologique, sans aucune atteinte hépatique jusqu'à l'âge de 15 ans.

L'identification de notre mutation a été faite chez la patiente H.B. et R (20 et 21 ans), au statut de composite, avec c.51+4 A>T dans un tableau hépatique pur présentant un ictère, une HTP, et une hépatomégalie.

Notre résultat diffère de la description faite en Egypte, tant sur la sévérité, que sur la manifestation précoce, pouvant être expliqué du fait de la présence de la mutation au statut de composite atténuant ainsi les symptômes.

✓ **ATP7B(NM_000053.4) : c.3960 G>C p.(Arg1320Ser)**

La mutation faux sens identifiée au niveau de l'exon 19, située à 57 pb du site accepteur d'épissage. La mutation a été décrite selon les travaux de (Li et al.2019), aucune corrélation génotype-phénotype n'a été précisée.

La mutation a été décrite dans notre série, au statut composite, associée à c.51+4 A>T, chez un enfant de sexe masculin, originaire de Jijel, âgé de 15 ans, et issu de famille non consanguine. Il présente une maladie de Wilson avec atteinte hépatique pure, au stade de cirrhose lors du diagnostic.

✓ **ATP7B(NM_000053.4) : c.4301 C>T p.(Thr1434Met)**

Il s'agit de mutation faux-sens localisé au niveau de l'exon 21, identifiée en Turquie et récemment rapportée par (Collet et al.2018), sur une cohorte Française de génotype ATP7B par NGS. L'étude a signalé que le patient était originaire d'Afrique.(173)

La mutation décrite dans notre étude, est présente au statut d'homozygote, chez un enfant de 14 ans, aux antécédents de décès dans la fratrie et qui a présenté une forme hépatique précoce, et sévère, puisqu'il a été diagnostiqué au stade de cirrhose.

III.2.2.2 Polymorphismes

Notre travail a identifié des variations non décrites, prédites de signification incertaine par la base bio-informatique Polyphen2. (Tableau 25) Les variants sont associés à un phénotype mixte, avec atteinte hépatique fulminante avec deux décès enregistrés au sein de la fratrie.

Le variant **p.Asn242Lys**, présent au statut de composite associé à **p.Val1024Leu** ont été classés, classe 2 et 3 respectivement, ne nous permettent pas ainsi de conclure définitivement, et suggérant de rechercher une délétion de l'autre allèle, ou une mutation en 5' ou 3'UTR, ou éventuellement des arguments fonctionnels pour la pathogénicité des deux variants.

Un certain nombre de polymorphismes, rapportés dans les bases de données ont été identifiés (Tableau 26), parmi eux (c.2855G>A, c.1366G>C, c.2495A>G), décrits lors de manifestations psychiatriques, a type de schizophrénie, de troubles bipolaires, ou de maladie d'Alzheimer .(194)

Au vu de la diversité des mutations, l'établissement de corrélations phénotype-génotype est difficile ;

On observe des symptomatologies, et un intervalle libre non similaire au sein de la même famille, qui pourrait probablement être dûs à des facteurs environnementaux.(165)

La mutation non-sens non décrite à ce jour dans la littérature, est précoce, et concerne un phénotype mixte sévère, alors que les mutations par décalage du cadre de lecture ont concerné un phénotype sévère, précoce et hépatique, mais aussi une atteinte mixte chez le jeune adulte. Un phénotype moins sévère a été décrit pour le statut hétérozygote de la même mutation. Nos résultats diffèrent des conclusions faites par **(Collet et al.2018)** rattachant les mutations frame shift aux atteintes strictement hépatiques.

Les descriptions signalées des mutations du site d'épissage décrivent une forme mixte (165), l'ensemble de nos malades ont présenté une atteinte hépatique, probablement due à leur présence au statut hétérozygote pour la majorité, et a concerné le jeune adulte (19-24 ans).

III.2.3 Statut génétique et bilan cuprique

La sélection de malades a été établie sur la base des perturbations du bilan cuprique, avec des résultats de céruléoplasmine, et cuivre urinaire bas, et devant l'élévation du cuivre urinaire.

✚ Céruléoplasmine :

L'ensemble des patients retenus pour l'analyse, ont présenté un déficit en céruléoplasmine (valeurs extrêmes : 0.03-1.02), avec une prédominance de patients (61%) présentant une activité enzymatique résiduelle de 0.5-30% (taux <0.5 $\mu\text{mol/l}$).

La comparaison de la concentration en céruléoplasmine en fonction des formes cliniques, ou de l'âge d'apparition de symptômes n'a révélé aucune différence significative entre les différentes classes, rejoignant les conclusions de **(Cheng et al, 2017)**.(195)

Il est précisé qu'une concentration en céruléoplasmine peut être normale chez 5 % des formes neurologiques, et pour plus de 40 % de forme hépatique de la maladie de Wilson.(196)

De plus, une baisse en céruléoplasmine, n'est pas spécifique de la maladie de Wilson. La concentration est abaissée en cas d'insuffisance hépatique sévère, de cirrhose décompensée, de perte protéique dans les entéropathies, le syndrome néphrotique, et en cas de mal nutrition.

Le dosage a été effectué par méthode enzymatique, basée sur son activité oxydative cuivre dépendante. Les résultats de (Merle et al, 2009), suggère que la méthode enzymatique est plus sensible que la méthode immunologique pour le diagnostic de la maladie de Wilson.(197)

Cuivre plasmatique et urinaire :

La comparaison des valeurs du cuivre urinaire et plasmatique, n'a pas révélé de différences significatives entre les statuts génétiques de cas index.

Les patients ont présenté des valeurs extrêmes en cuivre plasmatique comprise entre 1-17 $\mu\text{mol/l}$, et en cuivre urinaire entre 16-158 $\mu\text{mol/24h}$.

Selon les données de la littérature, le cuivre plasmatique est diminué et corrélé au taux de céruléoplasmine (198), les résultats effondrés de cuivre plasmatique n'ont pas été observés chez tous les patients, nous avons observé des taux normaux chez 5 patients (valeurs 9-17 $\mu\text{mol/l}$).

Le cuivre urinaire est un paramètre indispensable au diagnostic, et au suivi thérapeutique des patients. Un taux normal a concerné 8 des 41 cas index (valeurs extrêmes : 16-30 $\mu\text{mol/24h}$). Les taux élevés ont été observés lors du test de provocation à la DPA.

Ces résultats se rapportent au manque de sensibilité de la technique de dosage du cuivre plasmatique et urinaire employée. Cette technique tend à être remplacée par les méthodes de spectrométrie d'absorption atomique, qui permettent des mesures répétées et précises du cuivre dans les différents milieux biologiques.

Les résultats du bilan cuprique ne sont pas toujours francs, et ne permettent pas à chaque fois d'affirmer le diagnostic de la maladie.

III.2.4 Enquête familiale

La comparaison des résultats du bilan cuprique entre les différents statuts génétiques des apparentés s'est révélé fortement significative. On note parmi les apparentés, des descriptions cliniques distinctes, à savoir normaux, ou atteints ayant une symptomatologie similaire, ou encore asymptomatiques.

Les dosages biochimiques manquent de sensibilité, et ne permettent pas de différencier entre les statuts normaux/ hétérozygotes, même si la comparaison au sein des apparentés normaux et hétérozygote s'est révélée significative avec des valeurs normales ;

- Plus basses pour la céruléoplasmine et le cuivre plasmatique.
- Plus élevées concernant le cuivre urinaire pour les hétérozygotes

Les résultats du bilan cuprique ne permettent pas en dehors du test génétique d'identifier le statut (Tableau 39).

Notre étude nous a permis d'identifier 10 sujets asymptomatiques (12%), parmi les apparentés, présentant un âge moyen de 13.9 ± 8.2 (valeurs extrêmes : 3-27 ans).

Les patients asymptomatiques ont présenté une distribution d'âge médian, similaire à la forme hépatique. (Figure 26/ Tableau 36)

En effet, 8/10 d'entre eux étaient apparentés à des MW à manifestation hépatique pure, les deux autres à la forme mixte.

La comparaison de la concentration en céruléoplasmine n'a pas révélé de différence significative entre les asymptomatiques et les cas index.

III.2.5 Caractéristiques des patients selon le groupe d'étude

Pour conclure, les caractéristiques cliniques et biologiques de la population étudiée sont :

- L'atteinte hépatique est prédominante en population infantile, l'âge du diagnostic estimé à 11.86 ± 2.17 avoisine l'estimation faite en Egypte de 10 ans, en Iran de 11 ans, plus tardif au Japon 12.2, et plus précoce en Inde 7.2.(166)
- L'atteinte hépatique au stade de cirrhose a concerné 57% de formes hépatiques et de formes mixtes respectivement, et concerne les deux tiers des enfants.
- L'anneau de KF non identifié, même au sein de l'atteinte mixte et neurologique, qui est pathognomonique de la maladie de Wilson.(199)
- Le taux de consanguinité extrêmement élevé 70,7%, avec des cas similaires dans la fratrie 22/41.
- 5 patients sont décédés en cours de diagnostic
- Les résultats du bilan cuprique ont été performants concernant les cas index,
 - Céruléoplasmine : activité effondrée pour la totalité des patients
 - Cuivre urinaire normal : 8/41 (19 % des patients)
 - Cuivre plasmatique normal 5/41 (12 % des patients)

- L'analyse génétique a identifié le panel de mutations relatives à notre population, avec la découverte de deux mutations pathogènes. Les autres mutations sont communes aux études établies dans le bassin méditerranéen.
- La répartition des mutations est équilibrée entre le domaine de fixation du cuivre, et le domaine de fixation de l'ATP.
- L'analyse génétique est un atout indispensable pour la réalisation de l'enquête familiale, permettant l'identification des asymptomatiques (12% des apparentés).

Il est à noter que le seul traitement disponible en Algérie, est la D-pénicillamine, et qu'une évolution tardive sans traitement expose aux signes de sévérité de la maladie.

L'ensemble des patients (87%) ont évolué favorablement, impliquant un réseau multidisciplinaire (biologistes, pédiatres, internistes, gastro-entérologues, et neurologues) au sein de notre structure hospitalière.

Aucune greffe hépatique n'a été proposée à ce jour pour les MW. L'identification des cas asymptomatiques a permis de les traiter précocement avant l'apparition de signes cliniques.

III.3 Maladie de Gaucher

III.3.1 Caractéristiques statistiques et cliniques des cas index

Il s'agit d'une description infantile de malades Gaucher (28/30= 93.3%), et de deux adultes (0.7%). La consanguinité a été estimée à 76.7%, avec un sexe ratio de 1.7.

25 familles étaient apparentées, à l'origine de la réalisation d'enquête familiale, ayant concerné un total de 52 apparentés.

La forme adulte correspondait au type I de la maladie, alors que le type III (60.7%) était majoritaire pour la manifestation pédiatrique.

La pancytopénie et l'hépatosplénomégalie ont été décrites pour la totalité des malades, les douleurs osseuses ont concernées 8/13 (soit 61.5%) de type I, tandis que le type III est caractérisé par des troubles neurologiques décrits pour 10/17 (58,8%), et un strabisme observé pour 16/17 patients (94%).

L'effectif majoritaire correspond à la classe d'âge 1-6 ans, pour un total de 17 enfants, dont 35% présentaient des troubles neurologiques, associés au strabisme (70%).

L'analyse des formes cliniques, rapporte une prédominance nette du type III pour la classe 1-6 ans (13/6), une atteinte équilibrée pour les 6-12 ans, et un type I pour les 12-50 ans.

III.3.2 Résultats génétiques

L'analyse s'est limitée à la recherche des deux mutations les plus fréquentes, à savoir N370S, et la L444P. Nos résultats ont permis d'identifier la mutation délétère chez 26 patients. (Soit 87% des cas).

Les données de la littérature, indique que la recherche de ces mutations au sein de la population juive ashkénaze permet de diagnostiquer 86% des allèles, alors qu'elles ne représentent que 70% du total des allèles délétères au sein des populations non juives.(11)

Au total nous avons identifié :

- La L444P homozygote (50%)
- La N370S Homozygote (13.3%)
- L444P+N370S (13.3%)
- La N370S (10%)

Concernant l'enfant, la mutation L444P a été la plus identifiée ; 18/28 enfants (64.3%), tandis que la N370S a concerné 6/28 enfants (21.4%), et la totalité des adultes (2/2).

La fréquence et la distribution de ces mutations dépendent de la population étudiée.(89)

La mutation N370S est la plus fréquente au sein des Ashkénazes, tandis que la mutation L444P a été rapportée dans diverses études, et fût qualifiée de panethnique. Sa prévalence est estimée à 24 % au sein des patients Français atteints de Maladie de Gaucher, une prévalence deux fois moins élevée que la mutation N370S (40-45%) (11).

Nos résultats ne rejoignent pas les données des différentes études européennes, et même ceux réalisées au Maghreb, puisque les travaux de (Cherif et al, 2012) indiquent que la N370S est la plus fréquente en Tunisie et en Italie (200,201).

Nos résultats se rapprochent des références japonaises, où la L444P est la plus caractérisée.(202)

Les mutations N370S et L444P présentent un intérêt pronostic ;

L'homozygotie des mutations L444P et N370S dans notre étude est corrélée respectivement avec la forme neurologique et la forme modérée de type I, largement rapportée dans la population caucasienne (104), alors que les mutations homozygotes L444P dans la population japonaise peuvent exprimer des phénotypes non neurologiques du moins dans la 2^e et 3^e décennie.(203)

Le génotype L444P homozygote est associé aux manifestations viscérales précoces (10/15 avant 5 ans), avec atteintes neurologiques (10/15), et strabisme 14/15 patients (Tableau 46),

Le génotype N370/L444P a concerné une forme adulte avec un âge de diagnostic à 50 ans, et 3 formes infantiles ; 2 présentant une manifestation précoce (4, et 5 ans), et une autre à 14 ans. Cette description rejoint en partie les données publiées, qui rapportent une atteinte précoce et plus sévère que la N370S.

Nous n'avons pas constaté lors de nos travaux, de différences significatives de sévérité par rapport au statut N370S, probablement en relation avec la taille de l'échantillon relativement faible.

Aucun des composite N370S+L444P n'a présenté de signes neurologiques, attestant de l'effet neuroprotecteur de la mutation N370S.

Si le statut composite N370S permet de prédire l'absence d'évolution vers une forme neurologique, il ne permet pas de prédire l'évolution de l'atteinte viscérale qui reste variable, et dépend du délai diagnostic.

La comparaison des différents statuts génétiques n'a pas révélé de statut sévère pour les statuts N370S et les composites L444P+N370S, il n'existe pas de différence significative entre les statuts composite L444P et les statuts N370S homozygote, ou composite.

La réalisation du génotype complet permettra d'améliorer les performances des tests proposés, et élargir les conclusions émises lors de ces travaux, notamment par l'exploration des phénotypes adultes, et établir le répertoire mutationnel propre à notre population, en complétant les descriptions phénotypes-génotypes avancées.

III.3.3 Résultats biochimiques

L'ensemble des patients retenus présentent une activité enzymatique β -glucocérebrosidase intra-leucocytaire déficiente, ainsi qu'une élévation de la chitotriosidase plasmatique.

Le diagnostic enzymatique, n'est pas à même de différencier les types de la maladie de Gaucher. La comparaison des concentrations de la β -glucocérebrosidase entre les deux formes cliniques, est non significative. On note des concentrations plus basses pour le type III.

De même la comparaison des concentrations de β -glucocérebrosidase, et de chitotriosidase, entre les différentes mutations identifiées des cas index est non significative.

La détermination de l'activité enzymatique de la β -glucocérebrosidase est la méthode de référence pour le diagnostic de la maladie de Gaucher. Elle présente plusieurs inconvénients parmi lesquels le caractère labile de l'activité enzymatique, obligeant l'analyse de l'échantillon dans les 48h. De plus cette analyse n'est pas une méthode satisfaisante pour la réalisation des enquêtes familiales.

Des progrès remarquables ont été franchis dans les pays industrialisés, où le dépistage de la maladie de Gaucher fait partie des programmes de dépistage néonatal, comme c'est le cas au Japon, et aux états unis (204). Les méthodes de DBS associant la Spectrométrie de masse, et le NGS permettent l'analyse à grande échelle, dans un intervalle de temps réduit.

III.3.4 Les apparentés

La comparaison des activités enzymatiques entre les différents statuts enzymatiques des apparentés est fortement significative, cependant la mesure de l'enzyme n'est pas adaptée pour les enquêtes familiales, et l'identification des cas asymptomatiques et des hétérozygotes.

Même si les hétérozygotes présentent des activités enzymatiques généralement diminuées par rapport aux valeurs normales, il existe une variabilité considérable, qui empêche de conclure formellement dans la majorité des cas.

Seule l'analyse moléculaire permettra d'identifier les différents statuts génétiques.

III.3.5 Caractéristiques des patients selon les groupes d'étude

L'analyse de la comparaison des principaux statuts génétiques des cas index, et des apparentés selon les caractéristiques cliniques et biologiques, nous permet d'énumérer les spécificités inhérentes à notre cohorte ;

- Le statut dominant est la L444P, associant un phénotype III précoce, avec atteinte neurologique.
- Les statuts composite N370S+L444P et N370S (homozygote, et composite) sont des phénotypes atténués de la maladie de Gaucher, se limitant à l'atteinte viscérale et hématologique.
- Le taux de consanguinité relativement important **76.7%**
- Le caractère hérité pour la totalité des allèles vérifié
- Les manifestations neurologiques précoces ont concerné 66% des patients.
- Le nombre élevé de cas similaire au sein de la fratrie
- Une activité enzymatique déficiente avec un taux < 30% pour la majorité des patients.
- L'identification de 10/52 asymptomatiques (soit 19% des apparentés)

Le traitement par enzymothérapie substitutive est disponible dans notre pays, l'ensemble des patients mis sous traitement évolue favorablement. Son efficacité dépend de la précocité de son instauration, notamment pour le type III, et nécessite une surveillance clinique et biologique étroite.

La corrélation entre l'atténuation de la surcharge et les taux de chitotriosidase est parfaitement établie, ce qui permet d'apprécier l'observance thérapeutique, par le suivi de sa cinétique.

III.4 La maladie de Fabry

III.4.1 Caractéristiques cliniques et statistiques des cas étudiés

Notre analyse a concerné 4 adultes de sexe masculin, pour lesquels aucune consanguinité n'a été décrite.

Le diagnostic de la maladie de Fabry était suggéré, dans le cadre de l'exploration d'une insuffisance rénale chronique familiale.

Sur le plan clinique, l'insuffisance rénale au stade de dialyse a concerné la totalité des patients, l'angio-kératome et l'HTA ont été caractérisées chez $\frac{3}{4}$ des patients (75%). Un patient a présenté un AVC ischémique et une hypertrophie ventriculaire gauche concentrique.

L'ensemble des malades ont été sélectionnés sur la base des résultats de l'activité enzymatique en α -galactosidase déficiente, qui est la méthode de référence pour le diagnostic des hommes hémizygotés.

L'ensemble des patients ont été traités par enzymothérapie substitutive, l'Agalsidase beta disponible en Algérie, à la dose de 1mg/kg/14jours.

III.4.2 Résultat génétique

L'analyse du gène GLA nous a permis d'identifier **4 mutations** relatives à chaque famille, parmi lesquelles 2 mutations par délétion, non décrites à ce jour dans la littérature.

Nous avons identifié 2 mutations faux-sens, et deux délétions, réparties entre les exons 6 et 7.

GLA(NM_000169.3) c.838-849del12

Elle entraîne une délétion de 4 acides aminés au niveau de l'exon 6, qui survient en position 280, l'enzyme est dépourvue de 4 acides aminés (Q-V-T-Q).

La mutation est de classe 5, selon les critères ACMG. Un contrôle a été réalisé chez 80 échantillons, et n'a pas mis en évidence la mutation.

La mutation a concerné le consultant, et son frère. L'analyse chez la maman décédée n'a pu être réalisée.

Le patient était originaire de Tébessa (37 ans), avec un cas similaire dans la fratrie, présentant une manifestation de maladie de Fabry classique, avec insuffisance rénale chronique, l'HTA, et angio-kératome.

✚ **GLA(NM_000169.3) c.1028delC p.(Pro343Leufster5)**

Il s'agit d'une mutation non décrite au préalable dans la littérature, c'est une délétion d'une cytosine en position 1028 au niveau de l'exon 7, située à 30 pb du site accepteur, et entraînant l'apparition d'un codon stop prématuré perturbant les 86 derniers acides aminés de la protéine.

Le patient est originaire de Ghardaïa, au tableau de maladie de Fabry classique. L'identification de la mutation a été établie chez la mère, et les deux sœurs conductrices de malades Fabry, diagnostiquées au stade d'IRCT.

On note un décès au sein de la fratrie dans un contexte clinique similaire.

✚ **GLA(NM_000169.3) c.1072G>A (p.Glu358Lys)**

Il s'agit d'une mutation faux-sens au niveau de l'exon 7, entraînant un changement de l'acide glutamique par la lysine au codon 358 de la protéine GLA (p.Glu358Lys). Le résidu d'acide glutamique est hautement conservé au niveau de la protéine.

Cette variation a été observé chez des individus atteints de la maladie de Fabry classique (152,205–207).

Notre description clinico-biologique rejoint les données de la littérature, ou la mutation a été identifié chez un patient de 48 ans, et son frère 37 ans originaire de Sétif, présentant un tableau de Fabry classique (IRCT, HTA, et angiokératome).

✚ **GLA(NM_000169.3) c.1088G>C (p.Arg363Pro)**

Il s'agit d'une mutation faux-sens au niveau de l'exon 7, distante à 89 pb du site accepteur d'épissage.

Cette mutation a été citée une seule fois, au cours des travaux de (Vujasinovic et al, 2015), en Slovénie, portant sur l'incrimination de l'altération de la fonction pancréatique exocrine chez les patients Fabry. L'étude mentionne un diagnostic de la maladie d'un patient de 49 ans, présentant des douleurs abdominales (Ballonnements, diarrhée, sensation de satiété) au moment de la confirmation du diagnostic.(208)

Notre description concerne un homme de 45 ans, aux antécédents de frère en hémodialyse, un autre présentant un éléphantiasis, et d'un frère décédé à 40 ans, ayant une IRCT.

Le patient a présenté des antécédents personnels de pyélonéphrite depuis une vingtaine d'année, d'HTA cinq année précédant le diagnostic, et d'AVC ischémique au moment du diagnostic, coïncidant avec la découverte de l'IRCT au moment de son hospitalisation.

Il a présenté par ailleurs, une atteinte cardiaque à type d'hypertrophie ventriculaire gauche.

Son activité enzymatique revenue effondrée (<10%), et l'analyse génétique a permis de réaliser une enquête familiale, qui a retenu la présence de la mutation chez 3 autres frères.

Les corrélations génotypes-phénotypes semblent difficiles, puisqu'il s'agit de mutation privée, avec un nombre de patients relativement faible, s'ajoute à cela la nécessité d'une évaluation clinique rigoureuse. Notre description, correspond aux phénotypes de Malades Fabry relativement de type classique pour la plupart (¾ des patients), à l'exception du dernier patient.

Les signes de sévérité ont été décrits pour la totalité des malades, ou le diagnostic a été confirmé après l'installation de l'insuffisance rénale chronique terminale, probablement due à l'errance, et au diagnostic tardif de la maladie au sein de notre population.

L'absence du traitement expose en effet aux complications majeures de la maladie, et nécessite l'implication des autorités compétentes pour une meilleure sensibilisation des services de pédiatrie, de médecine interne, et de dermatologie au dépistage de la maladie à un stade précoce, avant l'installation de l'IRCT.

Des modèles de dépistage néonatal ont intégré l'analyse du gène *GLA*, notamment en Italie et en Taiwan (130,209), pour identifier les malades précocement avant l'installation de complications irréversibles. Ces études ont révélé par ailleurs une fréquence élevée de formes dites tardives de la maladie.

III.4.3 Les apparentés

L'analyse des apparentés par détermination du taux d' α -galactosidase permet d'identifier les cas similaires au sein de la famille, avec des taux effondrés en enzyme.

La détermination de l'activité enzymatique, ne permet pas de différencier entre les statuts normaux et hétérozygotes, puisque la comparaison des concentrations entre les deux groupes est non significative.

L'analyse moléculaire est l'outil indispensable à la détermination du statut génétique, visant à identifier les conductrices hétérozygotes de la maladie.

Les résultats de l'enquête familiale réalisée sur un total de 16 apparentés, nous ont permis d'identifier 6 cas similaires (37%), 6 conductrices (37%), et 10 statuts normaux.

Aucune des conductrices n'a présenté de symptomatologie clinique.

L'identification du statut hétérozygote des femmes à risque au sein des familles est essentielle pour le conseil génétique, et représente l'unique moyen de limiter le risque de récurrence, et de diagnostic retardé.

III.4.4 Caractéristiques des patients selon les groupes d'étude

La comparaison des caractéristiques cliniques et biologiques, entre cas index et apparentés nous permet d'attirer l'attention sur quelques points ;

- L'âge au diagnostic chez l'adulte jeune (moyenne de 41.5 ± 6.95).
- Absence de consanguinité
- Le nombre de cas au sein de la fratrie est important (2 à 3)
- Le retard diagnostique, avec des signes de sévérité pour la totalité des patients. Le diagnostic a été retenu au stade irréversible d'IRCT.
- L'analyse génétique permet d'identifier les conductrices, et les cas similaires.
- Les cas similaires étaient déjà symptomatiques au moment du diagnostic de la maladie, puisque 5/6 présentaient une IRCT, et un seul une IRA.

Conclusion
et
Perspectives

Conclusion

Les maladies métaboliques sont un groupe de pathologie héréditaire représentant un problème de santé publique majeur, caractérisée par une variabilité clinique remarquable, expliquée en partie par le génotype des patients.

La maladie de Wilson est une toxicose cuprique, due à un défaut de transport tissulaire du cuivre, par anomalie du gène ATP7B situé sur le chromosome 13.

Les maladies de Gaucher et de Fabry sont les plus fréquentes des maladies de surcharge lysosomale, et dont le traitement par enzymothérapie substitutive est accessible. La maladie de Gaucher est due à un déficit en β -glucocérébrosidase, responsable d'accumulation de sphingolipides dans les lysosomes des macrophages, à l'origine d'une surcharge métabolique avec hépatosplénomégalie, infiltration de la moelle osseuse, et plus rarement atteinte neurologique.

La maladie de Fabry est de transmission récessive liée à l'X, due au déficit en enzyme α -galactosidase A. La forme classique affecte l'homme hémizygote, responsable d'une surcharge en globotriaosylcéramide des cellules endothéliales, et musculaires lisses des vaisseaux. La maladie affecte le cœur, le rein, et le cerveau.

Notre étude réalisée sur une période de 4 années, au sein du Laboratoire Central de Mustapha, spécialisée dans le diagnostic des maladies métaboliques depuis les années 1980, et prenant en charge l'ensemble des demandes du territoire national, nous a permis de démontrer le rôle du diagnostic moléculaire dans la prise en charge de ces affections.

Il est à noter que le diagnostic de l'ensemble des pathologies concernées est posé sur la base des résultats biochimiques, par la mesure du substrat accumulé pour la maladie de Wilson, ou par détermination de l'activité enzymatique déficiente pour les maladies de Fabry et Gaucher.

L'analyse moléculaire proposée en seconde intention, permettra de confirmer le diagnostic par la détermination de la mutation familiale incriminée, et d'identifier le statut génétique des apparentés.

Le dépistage de cas asymptomatiques permettra un suivi médical régulier, et surtout d'instaurer le traitement précocement, évitant ainsi les complications graves de la surcharge.

L'étiquetage des hétérozygotes et des femmes conductrices pour le Fabry, impose un conseil génétique adapté, pour limiter la répétition de la maladie aux générations futures.

Les corrélations génotypes-phénotypes sont souvent difficiles à établir, en raison de la multiplicité des mutations, de l'hétérogénéité des manifestations, s'ajoute à cela le nombre de malades restreints, et les retards diagnostiques.

L'évaluation de nos résultats, démontrent que nos objectifs initiaux ont été atteints, concernant la maladie de Gaucher, l'étude a porté sur la recherche des deux mutations récurrentes, N370S, et L444P. Le génotype dominant au sein de la population pédiatrique analysée est la L444P, fortement corrélé à une atteinte neurologique.

L'analyse du gène ATP7B pour la maladie de Wilson nous a permis d'étiqueter 2 mutations non décrites dans la littérature, en absence de travaux à grande échelle réalisée au sein de notre population, et au Maghreb.

Le diagnostic de la Maladie de Fabry survenu tardivement, au stade d'IRCT, nous oblige à une meilleure sensibilisation pour améliorer le pronostic des patients.

Les avancées technologiques par Spectrométrie de masse, et NGS permettent actuellement un usage des techniques de dépistage biochimique, et moléculaire à grande échelle, et adapté aux urgences. Cette stratégie instaurée dans les pays développés, permet un étiquetage aisé des malades au sein de la population.

Nous constatons une fréquence élevée de ces affections au sein de notre population, en relation directe avec le taux de consanguinité élevé, pour les maladies de Gaucher et de Wilson.

La généralisation des descriptions établies au cours de ce travail, implique un recrutement plus important, sur une période plus étendue.

Vaincre les maladies rares, ne peut se faire que par une réelle implication des autorités sanitaires, avec élaboration d'action de dépistage pour éviter les errances diagnostiques.

Perspectives et recommandations

- Elaborer un registre national de maladies rares, et identification d'un groupe d'experts multidisciplinaires pour la prise en charge et le suivi des malades.
- Acquérir l'équipement un NGS, avec panel maladies métaboliques serait un atout majeur au diagnostic des MHM.
- Etablir un conseil génétique adapté, et proposer un diagnostic prénatal au sujet à risque, permettra de limiter la récurrence de la maladie aux générations futures.
- Concernant le diagnostic de la **maladie de Wilson** ;
 - Améliorer la sensibilité des techniques analytiques, par l'acquisition d'une spectrométrie de masse et l'intégration du dosage du cuivre échangeable en pratique quotidienne.
 - Améliorer l'informativité du test en génétique par la technique MLPA, pour la mise en évidence des anomalies du nombre de copies de gènes.
- Pour la **maladie de Gaucher** ;
 - Assurer un plus large recrutement de patients, et réaliser une étude similaire chez l'adulte, pour déterminer le génotype prédominant au sein de notre population. Ceci ne pourra être réalisé que par l'instauration de l'analyse complète du gène GBA.
- Et pour la **maladie de Fabry** ;
 - Potentialiser les efforts du diagnostic précoce, en réalisant des enquêtes de dépistage massive de la maladie à l'échelle nationale, pour limiter l'installation de complications délétères de la surcharge.

Références

Bibliographiques

Références bibliographiques

1. Rice GM, Steiner RD. Inborn Errors of Metabolism (Metabolic Disorders). *Pediatrics in Review*. 2016;37(1):3-17.
2. Benoist JF, Garnotel R, Acquaviva Bourdain C. Biochemical diagnosis of inherited metabolic diseases: metabolic profiles and difficulties for validating methods. *Annales de Biologie Clinique*. 2020;78(5):469-70.
3. Kamboj M. Clinical approach to the diagnoses of inborn errors of metabolism. *Pediatr Clin North Am*. 2008;55(5):1113-27, viii.
4. Tanner S. Chapter 1 - A History of Wilson Disease. In: Kerkar N, Roberts EA, éditeurs. *Clinical and Translational Perspectives on WILSON DISEASE* [Internet]. Academic Press; 2019 [cité 14 juin 2023]. p. 1-11. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012810532000001X>
5. Mohr I, Weiss KH. Biochemical Markers for the Diagnosis and Monitoring of Wilson Disease. *Clin Biochem Rev*. 2019;40(2):59-77.
6. Rodriguez-Castro KI, Hevia-Urrutia FJ, Sturniolo GC. Wilson's disease: A review of what we have learned. *World J Hepatol*. 2015;7(29):2859-70.
7. Ariöz C, Li Y, Wittung-Stafshede P. The six metal binding domains in human copper transporter, ATP7B: molecular biophysics and disease-causing mutations. *Biometals*. 2017;30(6):823-40.
8. Mehta A. Epidemiology and natural history of Gaucher's disease. *Eur J Intern Med*. 2006;17 Suppl:S2-5.
9. Sorge J, West C, Westwood B, Beutler E. Molecular cloning and nucleotide sequence of human glucocerebrosidase cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(21):7289-93.
10. Horowitz M, Wilder S, Horowitz Z, Reiner O, Gelbart T, Beutler E. The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: Structure and evolution. *Genomics*. 1989;4(1):87-96.
11. Germain DP. La maladie de Gaucher : aspects cliniques, génétiques et thérapeutiques. *Pathologie Biologie*. 2004;52(6):343-50.
12. Branton MH, Schiffmann R, Sabnis SG, Murray GJ, Quirk JM, Altarescu G, et al. Natural history of Fabry renal disease: influence of alpha-galactosidase A activity and genetic mutations on clinical course. *Medicine (Baltimore)*. 2002;81(2):122-38.
13. Gaggli M, El-Hadi S, Aigner C, Sunder-Plassmann G. The Renal History of Fabry Disease. *G Ital Nefrol*. 2016;33 Suppl 66:33.S66.14.
14. Lidove O, Barbey F, Joly D. Traitement de la maladie de Fabry : succès, échecs, espoirs. *Néphrologie & Thérapeutique*. 2016;12:S105-13.
15. Lee PJ, Lachmann RH. Acute presentations of inherited metabolic disease in adulthood. *Clin Med (Lond)*. 2008;8(6):621-4.

16. Caillaud C. Diagnostic des maladies lysosomiales. *La revue de médecine interne*. 2007; 28(S4):288-298.
17. Ricquier D. Maladies héréditaires du métabolisme et apports de la métabolomique. *Med Sci (Paris)*. 2005;21(5):512-6.
18. De Lonlay P, Dubois S, Valayannopoulos V. Prise en charge médicale et diététique des maladies héréditaires du métabolisme de LONLAY Pascale. Librairie Lavoisier [Internet]. [cité 14 févr 2023]. Disponible sur: https://www.lavoisier.fr/livre/medecine/prise-en-charge-medicale-et-dietetique-des-maladies-hereditaires-du-metabolisme/de-lonlay/descriptif_2158870
19. Ford L, Kennedy AD, Goodman KD, Pappan KL, Evans AM, Miller LAD, et al. Precision of a Clinical Metabolomics Profiling Platform for Use in the Identification of Inborn Errors of Metabolism. *The Journal of Applied Laboratory Medicine*. 2020;5(2):342-56.
20. William L N. Atlas of Inherited Metabolic Diseases - 4th Edition - [Internet]. [cité 15 févr 2023]. Disponible sur: <https://www.routledge.com/Atlas-of-Inherited-Metabolic-Diseases/Nyhan-Hoffmann/p/book/9781138196599>
21. Guerrero RB, Salazar D, Tanpaiboon P. Laboratory diagnostic approaches in metabolic disorders. *Ann Transl Med*. 2018;6(24):470.
22. Levy PA. Inborn errors of metabolism: part 1: overview. *Pediatr Rev*. 2009;30(4):131-7; quiz 137-8.
23. Scriver, C. R., Beaudet, A L, Sly W S, Valle D, Childs B, Kinzler K W, and Vogelstein B. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th ed., McGraw-Hill, New-York, 2001. *Biochemistry (Moscow)*. 2002;67(5):611-2.
24. Boycott KM, Hartley T, Biesecker LG, Gibbs RA, Innes AM, Riess O, et al. A Diagnosis for All Rare Genetic Diseases: The Horizon and the Next Frontiers. *Cell*. 2019;177(1):32-7.
25. Collet C, Woimant F, Laplanche JL, Poujois A. Collet C, Woimant F, Laplanche JL, Poujois A. ADN: études génétiques en vue du diagnostic de la maladie de Wilson. *EMC Biologie médicale* 2019; 14 (1): 1-6.
26. Członkowska A, Litwin T, Dusek P, Ferenci P, Lutsenko S, Medici V, et al. Wilson disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4(1):21.
27. CHANG IJ, HAHN SH. The genetics of Wilson disease. *Handb Clin Neurol*. 2017;142:19-34.
28. Coffey AJ, Durkie M, Hague S, McLay K, Emmerson J, Lo C, et al. A genetic study of Wilson's disease in the United Kingdom. *Brain*. 2013;136(5):1476-87.
29. Chappuis P, Bost M, Misrahi M, Duclos-Vallée JC, Woimant F. La maladie de Wilson : aspects clinicobiologiques. *Ann Biol Clin*. 2005;63.

30. Hedera P. Wilson's disease: A master of disguise. *Parkinsonism & Related Disorders*. 2019;59:140-5.
31. Feugray G, Guillerme J, Fraissinet F, Brunel V, Chagraoui A, Dumant-Forest C, et al. Acute hemolysis crisis revealed a Wilson disease. *Annales de Biologie Clinique*. 2020;78(4):425-32.
32. Emile C. Nouveautés dans le diagnostic et le suivi de la maladie de Wilson. *Option/Bio*. 2015;26(528-529):19-20.
33. INSPQ [Internet]. [cité 21 mai 2023]. Cuivre. Disponible sur: <https://www.inspq.qc.ca/eau-potable/cuivre>
34. Trocello JM. Maladie de Wilson : avancées récentes – Recent advances in Wilson's disease. *MISE AU POINT*.
35. Poujois A, Woimant F. Wilson's disease: A 2017 update. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*. 2018;42(6):512-20.
36. Woimant F, Trocello JM, Girardot-Tinant N, Chaine P, Sobesky R, Duclos-Vallée JC, et al. Maladie de Wilson. *EMC - Neurologie*. 2013;10(2):1-14.
37. Barber RG, Grenier ZA, Burkhead JL. Copper Toxicity Is Not Just Oxidative Damage: Zinc Systems and Insight from Wilson Disease. *Biomedicines*. 2021;9(3):316.
38. Lacombe M. Développement de méthodes d'analyse protéomique pour l'exploration translationnelle de la maladie de Wilson.
39. Yu CH, Dolgova NV, Dmitriev OY. Dynamics of the metal binding domains and regulation of the human copper transporters ATP7B and ATP7A. *IUBMB Life*. 2017;69(4):226-35.
40. HGMD® mutation result [Internet]. [cité 15 mars 2023]. Disponible sur: <https://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/all.php>
41. Woimant F, Djebrani-Oussedik N, Collet C, Girardot N, Poujois A. The hidden face of Wilson's disease. *Revue Neurologique*. 2018;174(9):589-96.
42. Espinós C, Ferenci P. Are the new genetic tools for diagnosis of Wilson disease helpful in clinical practice? *JHEP Reports*. 2020;2(4):100114.
43. Poujois A, Chaine P, Woimant F. La maladie de Wilson en 2018. *Pratique Neurologique - FMC*. 2018;9(3):173-85.
44. Hedera P. Update on the clinical management of Wilson's disease. *Appl Clin Genet*. 2017;10:9-19.
45. Mulligan C, Bronstein JM. Wilson Disease: An Overview and Approach to Management. *Neurol Clin*. 2020;38(2):417-32.
46. Mercier-Jacquier M. La maladie de Wilson: revue de la littérature à propos de 19 observations. :190.

47. Shah D. Wilson's disease: hepatic manifestations. *Dis Mon.* sept 2014;60(9):465-74.
48. Poujois A, Mikol J, Woimant F. Wilson disease: brain pathology. *Handb Clin Neurol.* 2017;142:77-89.
49. Dusek P, Litwin T, Członkowska A. Neurologic impairment in Wilson disease. *Ann Transl Med [Internet].* avr 2019 [cité 15 mai 2021];7(Suppl 2). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6531649/>
50. Guindi M. Wilson disease. *Semin Diagn Pathol.* 2019;36(6):415-22.
51. Roberts EA, Cox DW. Chapter 63 - Wilson Disease. In: Boyer TD, Manns MP, Sanyal AJ, éditeurs. *Zakim and Boyer's Hepatology (Sixth Edition) [Internet].* Saint Louis: W.B. Saunders; 2012 [cité 15 mai 2021]. p. 1110-26. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781437708813000632>
52. Zimbrea P, Seniów J. Cognitive and psychiatric symptoms in Wilson disease. In: *Handbook of Clinical Neurology [Internet].* Elsevier; 2017 [cité 22 févr 2023]. p. 121-40. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444636256000112>
53. Poujois A, Woimant F. Challenges in the diagnosis of Wilson disease. *Ann Transl Med.* 2019;7(Suppl 2):S67.
54. Dzieżyc-Jaworska K, Litwin T, Członkowska A. Clinical manifestations of Wilson disease in organs other than the liver and brain. *Ann Transl Med.* 2019;7(Suppl 2):S62.
55. Dzieżyc K, Litwin T, Członkowska A. Other organ involvement and clinical aspects of Wilson disease. *Handb Clin Neurol.* 2017;142:157-69.
56. Trocello JM, Corbillon E, Bourdain F, Xie J, Sobesky R, Woimant F. Maladie de Wilson. Protocole national de diagnostic et de soins. Les points importants pour le neurologue. *Pratique Neurologique - FMC.* 2010;1(3):208-16.
57. Lahary A, Fraissinet F, Jennifer G, Guillaume F, Chagraoui A, Brunel V. Acute Hemolysis Crisis Revealed a Wilson Disease. *Annales de biologie clinique.* 2020;78.
58. Bienvenu F. Céruloplasmine [Internet]. *EM-Consulte Biologie médicale.* [cité 17 juin 2021]. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/article/168455/ceruloplasmine>
59. Cerón JJ, Martínez-Subiela S. An automated spectrophotometric method for measuring canine ceruloplasmin in serum. *Vet Res.* 2004;35(6):671-9.
60. Roberts EA, Schilsky ML. Diagnosis and treatment of Wilson disease: An update. *Hepatology.* 2008;47(6):2089-111.
61. Mohr I, Weiss KH. Biochemical Markers for the Diagnosis and Monitoring of Wilson Disease. *Clin Biochem Rev.* 2019;40(2):59-77.
62. Ferenci P. Chapter 14 - Diagnosis of Wilson disease. In: Członkowska A, Schilsky ML, éditeurs. *Handbook of Clinical Neurology [Internet].* Elsevier; 2017 [cité 21 mai 2021].

p. 171-80. (Wilson Disease; vol. 142). Disponible sur:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444636256000148>

63. Garcia Hejl C, Astier HT, Servonnet A, Ramirez JM. Validation d'une méthode de dosage du cuivre dans le sérum par spectrométrie d'absorption atomique électrothermique. *Ann Toxicol Anal.* 2009;21(2):55-9.
64. Trocello JM, Chappuis P, Chaîne P, Rémy P, Debray D, Duclos-Vallée JC, et al. Maladie de Wilson. *La Presse Médicale.* 2009;38(7):1089-98.
65. Habes D, Lachaux A, Guillaud O, Ory-Magne F, Oussedik-Djebrani N, Poujois A, et al. Maladie de Wilson : les 10 essentiels pour optimiser la prise en charge des patients en pédiatrie. *Perfectionnement en Pédiatrie.* 2020;3(3):229-35.
66. fr-Wilson.pdf [Internet]. [cité 17 juin 2021]. Disponible sur:
<https://www.orpha.net/data/patho/FR/fr-Wilson.pdf>
67. Woimant F, Trocello JM, Girardot-Tinant N, Chaîne P, Sobesky R, Duclos-Vallée JC, Chappuis P, El Balkhi S, Poupon J. Maladie de Wilson. *EMC Neurologie.* 2013; (12)58 193-5.
68. Quesada C, Guitton J. Forme neurologique de la maladie de Wilson : physiopathologie, diagnostic et prise en charge du patient [Internet]. 2019 [cité 15 mai 2021]. Disponible sur: <http://docelec.univ-lyon1.fr/login?url=https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cat06264a&AN=bul.503349&lang=fr&site=eds-live>
69. Parlons sciences [Internet]. [cité 17 juin 2021]. Séquençage de Sanger. Disponible sur:
<https://parlonssciences.ca/ressources-pedagogiques/documents-dinformation/sequencage-de-sanger>
70. Stuppia L, Antonucci I, Palka G, Gatta V. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. *Int J Mol Sci.* 2012;13(3):3245-76.
71. Reeve JL, Frayling IM, Twomey PJ. Challenges in molecular diagnosis of Wilson disease. *Journal of Clinical Pathology.* 2020;73(4):181-2.
72. Willis AS, Van Den Veyver I, Eng CM. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and prenatal diagnosis: MLPA in prenatal diagnosis. *Prenat Diagn.* 2012;32(4):315-20.
73. Roberts EA. Update on the Diagnosis and Management of Wilson Disease. *Curr Gastroenterol Rep.* 2018;20(12):56.
74. Członkowska A, Litwin T. Wilson disease - currently used anticopper therapy. *Handb Clin Neurol.* 2017;142:181-91.
75. Quemeneur AS, Trocello JM, de Vernejoul MC, Woimant F, Lioté F. Manifestations rhumatologiques associées à la maladie de Wilson. *Revue du Rhumatisme Monographies.* 2011;78(4):224-30.

76. Ahmad A, Torrazza-Perez E, Schilsky ML. Liver transplantation for Wilson disease. *Handb Clin Neurol.* 2017;142:193-204.
77. Wagner S, Brunet AS, Bost M, Lachaux A, Broussolle E, Des Portes V, et al. Maladie de Wilson, penser aux formes neurologiques chez l'enfant. *Archives de Pédiatrie.* 2012;19(3):271-6.
78. Giampietro R, Spinelli F, Contino M, Colabufo NA. The Pivotal Role of Copper in Neurodegeneration: A New Strategy for the Therapy of Neurodegenerative Disorders. *Mol Pharmaceutics.* 2018;15(3):808-20.
79. Liu J, Luan J, Zhou X, Cui Y, Han J. Epidemiology, diagnosis, and treatment of Wilson's disease. *IRDR.* 2017;6(4):249-55.
80. Belmatoug N, Caubel I, Stirnemann J, Billette de Villemeur T. La Maladie de Gaucher. *J Soc Biol.* 2002;196(2):141-9.
81. Jack A, Amato D, Morris G, Choy FYM. Two novel mutations in glucocerebrosidase, C23W and IVS7-1 G>A, identified in Type 1 Gaucher patients heterozygous for N370S. *Gene.* 2014;538(1):84-7.
82. Dandana A, Ben Khelifa S, Chahed H, Miled A, Ferchichi S. Gaucher Disease: Clinical, Biological and Therapeutic Aspects. *Pathobiology.* 2016;83(1):13-23.
83. Masson E. EM-Consulte. [cité 6 mars 2023]. Maladie de Gaucher. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/article/1023535/maladie-de-gaucher>
84. Guggenbuhl P, Grosbois B, Chalès G. La maladie de Gaucher. *Revue du Rhumatisme.* 2008;75(3):198-206.
85. Yargui L, Mokhtari S, Arab M, Berhoune A. Le diagnostic biochimique de la maladie de Gaucher. *Archives de Pédiatrie.* 2005;12(8):1301-9.
86. Stirnemann J, Belmatoug N, Camou F, Serratrice C, Froissart R, Caillaud C, et al. A Review of Gaucher Disease Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatments. *IJMS.* 2017;18(2):441.
87. Jeyakumar M, Butters TD, Dwek RA, Platt FM. Glycosphingolipid lysosomal storage diseases: therapy and pathogenesis. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2002;28(5):343-57.
88. Platt FM. Sphingolipid lysosomal storage disorders. *Nature.* 2014;510(7503):68-75.
89. Hruska KS, LaMarca ME, Scott CR, Sidransky E. Gaucher disease: mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA). *Hum Mutat.* 2008;29(5):567-83.
90. X-ray structure of human acid- β -glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease [Internet]. [cité 13 mars 2023]. Disponible sur: <https://www.embopress.org/doi/epdf/10.1038/sj.embor.embor873>

91. Fabrega S, Durand P, Codogno P, Bauvy C, Delomenie C, Henrissat B, et al. Human glucocerebrosidase: heterologous expression of active site mutants in murine null cells. *Glycobiology*. 2000;10(11):1217-24.
92. Indelicato R, Trinchera M. The Link between Gaucher Disease and Parkinson's Disease Sheds Light on Old and Novel Disorders of Sphingolipid Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(13):3304.
93. pnds_maladie_de_gaucher_cetg_avril_2022.pdf [Internet]. [cité 6 mars 2023]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2022-05/pnds_maladie_de_gaucher_cetg_avril_2022.pdf
94. Costard D, Hermans C. Maladie de Gaucher de type 1: enjeux diagnostiques et thérapeutiques.
95. Alaei MR, Tabrizi A, Jafari N, Mozafari H. Gaucher Disease: New Expanded Classification Emphasizing Neurological Features. *Iran J Child Neurol*. 2019;13(1):7-24.
96. Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, Aharon-Peretz J, Annesi G, Barbosa ER, et al. Multicenter Analysis of Glucocerebrosidase Mutations in Parkinson's Disease. *N Engl J Med*. 2009;361(17):1651-61.
97. Futerman AH, van Meer G. The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5(7):554-65.
98. Gruschus JM, Jiang Z, Yap TL, Hill SA, Grishaev A, Piszczek G, et al. Dissociation of glucocerebrosidase dimer in solution by its co-factor, saposin C. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2015;457(4):561-6.
99. Atul B. Mehta. Common hereditary lysosomal storage di- seases. *BMJ Best Practice*. 2019.
100. Sidransky E. Gaucher disease: complexity in a "simple" disorder. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2004;83(1):6-15.
101. Stirnemann J, Vigan M, Hamroun D, Heraoui D, Rossi-Semerano L, Berger MG, et al. The French Gaucher's disease registry: clinical characteristics, complications and treatment of 562 patients. *Orphanet J Rare Dis*. 2012;7(1):77.
102. Nguyen Y, Stirnemann J, Belmatoug N. La maladie de Gaucher : quand y penser ? *La Revue de Médecine Interne*. 2019;40(5):313-22.
103. Mignot C, Doummar D, Maire I, De Villemeur TB, French Type 2 Gaucher Disease Study Group. Type 2 Gaucher disease: 15 new cases and review of the literature. *Brain Dev*. 2006;28(1):39-48.
104. Tylki-Szymańska A, Vellodi A, El-Beshlawy A, Cole JA, Kolodny E. Neuronopathic Gaucher disease: demographic and clinical features of 131 patients enrolled in the International Collaborative Gaucher Group Neurological Outcomes Subregistry. *J Inherit Metab Dis*. 2010;33(4):339-46.

105. Mignot C, Gelot A, Bessières B, Daffos F, Voyer M, Menez F, et al. Perinatal-lethal Gaucher disease. *Am J Med Genet A*. 2003;120A(3):338-44.
106. Regenboog M, van Dussen L, Verheij J, Weinreb NJ, Santosa D, vom Dahl S, et al. Hepatocellular carcinoma in Gaucher disease: an international case series. *J Inherit Metab Dis*. 2018;41(5):819-27.
107. Hollak CEM, Belmatoug N, Cole JA, Vom Dahl S, Deegan PB, Goldblatt J, et al. Characteristics of type I Gaucher disease associated with persistent thrombocytopenia after treatment with imiglucerase for 4-5 years. *Br J Haematol*. 2012;158(4):528-38.
108. Hollak C, Maas M, Akkerman E, den Heeten A, Aerts H. Dixon quantitative chemical shift imaging is a sensitive tool for the evaluation of bone marrow responses to individualized doses of enzyme supplementation therapy in type 1 Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis*. 2001;27(6):1005-12.
109. Hughes D, Mikosch P, Belmatoug N, Carubbi F, Cox T, Goker-Alpan O, et al. Gaucher Disease in Bone: From Pathophysiology to Practice. *J Bone Miner Res*. 2019;34(6):996-1013.
110. Raskovalova T, Deegan PB, Yang R, Pavlova E, Stirnemann J, Labarère J, et al. Plasma chitotriosidase activity versus CCL18 level for assessing type I Gaucher disease severity: protocol for a systematic review with meta-analysis of individual participant data. *Systematic Reviews*. 2017;6(1):87.
111. Guggenbuhl P, Grosbois B, Chalès G. La maladie de Gaucher. *Revue du Rhumatisme*. 2008;75(3):198-206.
112. Raskovalova T, Deegan PB, Mistry PK, Pavlova E, Yang R, Zimran A, et al. Accuracy of chitotriosidase activity and CCL18 concentration in assessing type I Gaucher disease severity. A systematic review with meta-analysis of individual participant data. *Haematologica*. 2021;106(2):437-45.
113. Javier RM, Guggenbuhl P. Maladie de Gaucher : diagnostic, suivi et traitement. *Revue du Rhumatisme Monographies*. 2011;78(4):246-53.
114. Hurvitz N, Dinur T, Becker-Cohen M, Cozma C, Hovakimyan M, Oppermann S, et al. Glucosylsphingosine (lyso-Gb1) as a Biomarker for Monitoring Treated and Untreated Children with Gaucher Disease. *IJMS*. 2019;20(12):3033.
115. Pettazzoni M, Froissart R, Pagan C, Vanier MT, Ruet S, Latour P, et al. LC-MS/MS multiplex analysis of lysosphingolipids in plasma and amniotic fluid: A novel tool for the screening of sphingolipidoses and Niemann-Pick type C disease. *PLoS One*. 2017;12(7):e0181700.
116. Pastores GM, Weinreb NJ, Aerts H, Andria G, Cox TM, Giralt M, et al. Therapeutic goals in the treatment of Gaucher disease. *Semin Hematol*. 2004;41(4 Suppl 5):4-14.
117. Andersson HC, Charrow J, Kaplan P, Mistry P, Pastores GM, Prakash-Cheng A, et al. Individualization of long-term enzyme replacement therapy for Gaucher disease. *Genet Med*. 2005;7(2):105-10.

118. Kaplan P, Baris H, De Meirleir L, Di Rocco M, El-Beshlawy A, Huemer M, et al. Revised recommendations for the management of Gaucher disease in children. *Eur J Pediatr.* 2013;172(4):447-58.
119. Riboldi GM, Di Fonzo AB. GBA, Gaucher Disease, and Parkinson's Disease: From Genetic to Clinic to New Therapeutic Approaches. *Cells.* 2019;8(4):364.
120. Hughes D, Cappellini MD, Berger M, Droogenbroeck JV, de Fost M, Janic D, et al. Recommendations for the management of the haematological and onco-haematological aspects of Gaucher disease. *Br J Haematol.* 2007;138(6):676-86.
121. gaucher-disease-type-1-eliglustat-id7097.pdf [Internet]. [cité 29 mars 2023]. Disponible sur: <https://www.nice.org.uk/guidance/hst5/documents/gaucher-disease-type-1-eliglustat-id7097>
122. Dahl M, Doyle A, Olsson K, Månsson JE, Marques ARA, Mirzaian M, et al. Lentiviral gene therapy using cellular promoters cures type 1 Gaucher disease in mice. *Mol Ther.* 2015;23(5):835-44.
123. Sawkar AR, Cheng WC, Beutler E, Wong CH, Balch WE, Kelly JW. Chemical chaperones increase the cellular activity of N370S beta -glucosidase: a therapeutic strategy for Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(24):15428-33.
124. Stephan F, Haber R. Maladie de Fabry. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie.* 2017;144(2):137-46.
125. Michaud M, Mauhin W, Belmatoug N, Bedreddine N, Garnotel R, Catros F, et al. [Fabry disease: A review]. *Rev Med Interne.* 2021;42(2):110-9.
126. Henda C, Nerjes G, Adnen M, Selima F, Abdelhedi M. Maladie de Fabry : aspects clinique, biologique et thérapeutique. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée.* 2013;28(5):309-15.
127. Germain DP. Maladie de Fabry (déficit en alpha-galactosidase A) : Physiopathologie, signes cliniques et aspects génétiques. *J Soc Biol.* 2002;196(2):161-73.
128. Germain DP. Fabry disease. *Orphanet Journal of Rare Diseases.* 2010;5(1):30.
129. Smid BE, Hollak CEM, Poorthuis BJHM, van den Bergh Weerman MA, Florquin S, Kok WEM, et al. Diagnostic dilemmas in Fabry disease: a case series study on GLA mutations of unknown clinical significance. *Clin Genet.* 2015;88(2):161-6.
130. Hwu WL, Chien YH, Lee NC, Chiang SC, Dobrovolny R, Huang AC, et al. Newborn Screening for Fabry Disease in Taiwan Reveals a High Incidence of the Later-Onset Mutation c.936+919G>A (IVS4+919G>A). *Hum Mutat.* 2009;30(10):1397-405.
131. pnds_de_la_maladie_de_fabry_-_version_finale_-_20211115.pdf [Internet]. [cité 3 avr 2023]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2021-11/pnds_de_la_maladie_de_fabry_-_version_finale_-_20211115.pdf

132. Varela P, Caldas MM, Pesquero JB. Novel GLA Mutation Promotes Intron Inclusion Leading to Fabry Disease. *Frontiers in Genetics* [Internet]. 2019 [cité 3 avr 2023];10. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2019.00783>
133. Duro G, Zizzo C, Cammarata G, Burlina A, Burlina A, Polo G, et al. Mutations in the GLA Gene and LysoGb3: Is It Really Anderson-Fabry Disease? *Int J Mol Sci*. 2018;19(12):3726.
134. Structural organization of the human alpha-galactosidase A gene: further evidence for the absence of a 3' untranslated region. [Internet]. [cité 28 avr 2023]. Disponible sur: <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.85.11.3903>
135. Guce AI, Clark NE, Salgado EN, Ivanen DR, Kulminskaya AA, Brumer H, et al. Catalytic mechanism of human alpha-galactosidase. *J Biol Chem*. 2010;285(6):3625-32.
136. Garman SC, Garboczi DN. The molecular defect leading to Fabry disease: structure of human alpha-galactosidase. *J Mol Biol*. 2004;337(2):319-35.
137. Schaefer E, Mehta A, Gal A. Genotype and phenotype in Fabry disease: analysis of the Fabry Outcome Survey. *Acta Paediatr Suppl*. 2005;94(447):87-92; discussion 79.
138. Saito S, Ohno K, Sakuraba H. Fabry-database.org: database of the clinical phenotypes, genotypes and mutant α -galactosidase A structures in Fabry disease. *J Hum Genet*. 2011;56(6):467-8.
139. Michaud M, Mauhin W, Belmatoug N, Garnotel R, Bedreddine N, Catros F, et al. When and How to Diagnose Fabry Disease in Clinical Practice. *Am J Med Sci*. 2020;360(6):641-9.
140. Germain DP, Fouilhoux A, Decramer S, Tardieu M, Pillet P, Fila M, et al. Consensus recommendations for diagnosis, management and treatment of Fabry disease in paediatric patients. *Clin Genet*. 2019;96(2):107-17.
141. Mehta A, Hughes DA. Fabry Disease. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Gripp KW, et al., éditeurs. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cité 3 avr 2023]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1292/>
142. Waldek S, Patel MR, Banikazemi M, Lemay R, Lee P. Life expectancy and cause of death in males and females with Fabry disease: Findings from the Fabry Registry. *Genetics in Medicine*. 2009;11(11):790-6.
143. Wanner C, Oliveira JP, Ortiz A, Mauer M, Germain DP, Linthorst GE, et al. Prognostic indicators of renal disease progression in adults with Fabry disease: natural history data from the Fabry Registry. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5(12):2220-8.
144. Ishii S, Chang HH, Kawasaki K, Yasuda K, Wu HL, Garman SC, et al. Mutant alpha-galactosidase A enzymes identified in Fabry disease patients with residual enzyme activity: biochemical characterization and restoration of normal intracellular processing by 1-deoxygalactonojirimycin. *Biochem J*. 2007;406(2):285-95.

145. Maier EM, Osterrieder S, Whybra C, Ries M, Gal A, Beck M, et al. Disease manifestations and X inactivation in heterozygous females with Fabry disease. *Acta Paediatr Suppl.* 2006;95(451):30-8.
146. Weidemann F, Strotmann JM, Breunig F, Niemann M, Maag R, Baron R, et al. Misleading terms in Anderson-Fabry disease. *Eur J Clin Invest.* 2008;38(3):191-6.
147. Boutin M, Gagnon R, Lavoie P, Auray-Blais C. LC-MS/MS analysis of plasma lyso-Gb3 in Fabry disease. *Clin Chim Acta.* 2012;414:273-80.
148. Riccio E, Sabbatini M, Capuano I, Pisani A. Early Biomarkers of Fabry Nephropathy: A Review of the Literature. *NEF.* 2019;143(4):274-81.
149. Aerts JM, Groener JE, Kuiper S, Donker-Koopman WE, Strijland A, Ottenhoff R, et al. Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(8):2812-7.
150. Auray-Blais C, Ntwari A, Clarke JTR, Warnock DG, Oliveira JP, Young SP, et al. How well does urinary lyso-Gb3 function as a biomarker in Fabry disease? *Clin Chim Acta.* 2010;411(23-24):1906-14.
151. Friedman JM, Jones KL, Carey JC. Exome Sequencing and Clinical Diagnosis. *JAMA.* 2020;
152. Germain DP, Shabbeer J, Cotigny S, Desnick RJ. Fabry disease: twenty novel alpha-galactosidase A mutations and genotype-phenotype correlations in classical and variant phenotypes. *Mol Med.* 2002;8(6):306-12.
153. Prenatal diagnosis of Fabry disease - PubMed [Internet]. [cité 6 mai 2023]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17533632/>
154. Navarro C, Teijeira S, Dominguez C, Fernandez JM, Rivas E, Fachal C, et al. Fabry disease: an ultrastructural comparative study of skin in hemizygous and heterozygous patients. *Acta Neuropathol.* 2006;111(2):178-85.
155. Ortiz A, Germain DP, Desnick RJ, Politei J, Mauer M, Burlina A, et al. Fabry disease revisited: Management and treatment recommendations for adult patients. *Mol Genet Metab.* 2018;123(4):416-27.
156. Germain DP, Nicholls K, Giugliani R, Bichet DG, Hughes DA, Barisoni LM, et al. Efficacy of the pharmacologic chaperone migalastat in a subset of male patients with the classic phenotype of Fabry disease and migalastat-amenable variants: data from the phase 3 randomized, multicenter, double-blind clinical trial and extension study. *Genet Med.* 2019;21(9):1987-97.
157. Biegstraaten M, Arngrímsson R, Barbey F, Boks L, Cecchi F, Deegan PB, et al. Recommendations for initiation and cessation of enzyme replacement therapy in patients with Fabry disease: the European Fabry Working Group consensus document. *Orphanet J Rare Dis.* 2015;10:36.
158. C. E. Schwartz Daniel — Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes. *Population.* 1964;19(5):1004-1004.

159. Panichareon B, Taweechue K, Thongnoppakhun W, Aksornworanart M, Pithukpakorn M, Yenichitsomanus P thai, et al. Six novel ATP7B mutations in Thai patients with Wilson disease. *European Journal of Medical Genetics*. 2011;54(2):103-7.
160. UCSC Genome Browser Home [Internet]. [cité 12 mai 2023]. Disponible sur: <https://genome.ucsc.edu/>
161. Ensembl genome browser 110 [Internet]. [cité 1 oct 2023]. Disponible sur: <https://www.ensembl.org/index.html>
162. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405-24.
163. Bost M, Piguet-Lacroix G, Parant F, Wilson CMR. Molecular analysis of Wilson patients: direct sequencing and MLPA analysis in the ATP7B gene and Atox1 and COMMD1 gene analysis. *J Trace Elem Med Biol*. 2012;26(2-3):97-101.
164. Qian Z, Cui X, Huang Y, Liu Y, Li N, Zheng S, et al. Novel mutations found in the ATP7B gene in Chinese patients with Wilson's disease. *Mol Genet Genomic Med*. 2019;7(5):e649.
165. Abdelghaffar TY, Elsayed SM, Elsobky E, Bochow B, Büttner J, Schmidt H. Mutational analysis of ATP7B gene in Egyptian children with Wilson disease: 12 novel mutations. *J Hum Genet*. 2008;53(8):681.
166. Abdelghaffar TY, Elsayed SM, Elnaghy S, Shadeed A, Elsobky ES, Schmidt H. Phenotypic and genetic characterization of a cohort of pediatric Wilson disease patients. *BMC Pediatr*. 2011;11:56.
167. Li X, Lu Z, Lin Y, Lu X, Xu Y, Cheng J, et al. Clinical features and mutational analysis in 114 young children with Wilson disease from South China. *Am J Med Genet A*. 2019;179(8):1451-8.
168. Li M, Ma J, Wang W, Yang X, Luo K. Mutation analysis of the ATP7B gene and genotype–phenotype correlation in Chinese patients with Wilson disease. *BMC Gastroenterol*. 2021;21:339.
169. Wu Z, Wang N, Murong S, Lin M. [Missense mutations of exons 14 and 18 of Wilson's disease gene in Chinese patients]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 1999;16(2):91-3.
170. Figus A, Angius A, Loudianos G, Bertini C, Dessi V, Loi A, et al. Molecular pathology and haplotype analysis of Wilson disease in Mediterranean populations. *Am J Hum Genet*. 1995;57(6):1318-24.
171. Margarit E, Bach V, Gómez D, Bruguera M, Jara P, Queralt R, et al. Mutation analysis of Wilson disease in the Spanish population -- identification of a prevalent substitution and eight novel mutations in the ATP7B gene. *Clin Genet*. 2005;68(1):61-8.

172. Sapuppo A, Pavone P, Praticò AD, Ruggieri M, Bertino G, Fiumara A. Genotype-phenotype variable correlation in Wilson disease: clinical history of two sisters with the similar genotype. *BMC Med Genet.* 2020;21(1):128.
173. Collet C, Laplanche JL, Page J, Morel H, Woimant F, Poujois A. High genetic carrier frequency of Wilson's disease in France: discrepancies with clinical prevalence. *BMC Med Genet.* 2018;19(1):143.
174. Ferenci P, Stremmel W, Członkowska A, Szalay F, Viveiros A, Stättermayer AF, et al. Age and Sex but Not ATP7B Genotype Effectively Influence the Clinical Phenotype of Wilson Disease. *Hepatology.* 2019;69(4):1464-76.
175. Lovicu M, Lepori MB, Incollu S, Dessì V, Zappu A, Iorio R, et al. RNA analysis of consensus sequence splicing mutations: implications for the diagnosis of Wilson disease. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2009;13(2):185-91.
176. Deguti MM, Genschel J, Cancado ELR, Barbosa ER, Bochow B, Mucenic M, et al. Wilson disease: novel mutations in the ATP7B gene and clinical correlation in Brazilian patients. *Hum Mutat.* 2004;23(4):398.
177. Arruda WO, Munhoz RP, de Bem RS, Deguti MM, Barbosa ER, Zavala JA, et al. Pathogenic compound heterozygous ATP7B mutations with hypoceruloplasminaemia without clinical features of Wilson's disease. *J Clin Neurosci.* 2014;21(2):335-6.
178. Sriretnakumar V, Harripaul R, Vincent JB, Kennedy JL, So J. Enrichment of pathogenic variants in genes associated with inborn errors of metabolism in psychiatric populations. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2019;180(1):46-54.
179. Firneisz G, Lakatos PL, Szalay F, Polli C, Glant TT, Ferenci P. Common mutations of ATP7B in Wilson disease patients from Hungary. *Am J Med Genet.* 2002;108(1):23-8.
180. Waldenström E, Lagerkvist A, Dahlman T, Westermark K, Landegren U. Efficient detection of mutations in Wilson disease by manifold sequencing. *Genomics.* 1996;37(3):303-9.
181. Singh N, Kallollimath P, Shah MH, Kapoor S, Bhat VK, Viswanathan LG, et al. Genetic analysis of ATP7B in 102 south Indian families with Wilson disease. *PLoS One.* 2019;14(5):e0215779.
182. Simsek Papur O, Akman SA, Cakmur R, Terzioglu O. Mutation analysis of ATP7B gene in Turkish Wilson disease patients: identification of five novel mutations. *Eur J Med Genet.* 2013;56(4):175-9.
183. Battisti C, Loudianos G, Rufa A, Dotti MT, Sangiorgi S, Dessì V, et al. Detection of a rare Wilson disease mutation associated with arylsulfatase A pseudodeficiency. *Am J Med Genet.* 1999;85(2):175-8.
184. Cox DW, Prat L, Walshe JM, Heathcote J, Gaffney D. Twenty-four novel mutations in Wilson disease patients of predominantly European ancestry. *Hum Mutat.* 2005;26(3):280.

185. Kumar S, Thapa BR, Kaur G, Prasad R. Identification and molecular characterization of 18 novel mutations in the ATP7B gene from Indian Wilson disease patients: genotype. *Clin Genet.* 2005;67(5):443-5.
186. Im M, Song A, Kim J, Kim MS, Lee SM, Kim MJ, et al. Wilson disease diagnosed incidentally by targeted gene panel sequencing in a Korean boy with severe obesity. *Ann Pediatr Endocrinol Metab.* 2022;27(3):229-35.
187. Ferenci P. Phenotype-genotype correlations in patients with Wilson's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2014;1315:1-5.
188. Li H, Liu L, Li Y, He S, Liu Y, Li J, et al. Familial screening of children with Wilson disease: Necessity of screening in previous generation and screening methods. *Medicine (Baltimore).* 2018;97(27):e11405.
189. Gu YH, Kodama H, Du SL, Gu QJ, Sun HJ, Ushijima H. Mutation spectrum and polymorphisms in ATP7B identified on direct sequencing of all exons in Chinese Han and Hui ethnic patients with Wilson's disease. *Clin Genet.* 2003;64(6):479-84.
190. Butler P, McIntyre N, Mistry PK. Molecular diagnosis of Wilson disease. *Mol Genet Metab.* 2001;72(3):223-30.
191. Ferenci P. Chapter 14 - Diagnosis of Wilson disease. In: Członkowska A, Schilsky ML, éditeurs. *Handbook of Clinical Neurology* [Internet]. Elsevier; 2017 [cité 24 mai 2023]. p. 171-80. (Wilson Disease; vol. 142). Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444636256000148>
192. Liver EA for the S of the. EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease. *Journal of Hepatology.* 2012;56(3):671-85.
193. Couchonnal E, Bouchard S, Sandahl TD, Pagan C, Lion-François L, Guillaud O, et al. ATP7B variant spectrum in a French pediatric Wilson disease cohort. *Eur J Med Genet.* 2021;64(10):104305.
194. Squitti R, Polimanti R, Siotto M, Bucossi S, Ventriglia M, Mariani S, et al. ATP7B variants as modulators of copper dyshomeostasis in Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med.* 2013;15(3):515-22.
195. Cheng N, Wang H, Wu W, Yang R, Liu L, Han Y, et al. Spectrum of ATP7B mutations and genotype-phenotype correlation in large-scale Chinese patients with Wilson Disease: Spectrum of ATP7B mutations and genotype-phenotype correlation in large-scale Chinese patients. *Clin Genet.* 2017;92(1):69-79.
196. Mulligan C, Bronstein JM. Wilson Disease: An Overview and Approach to Management. *Neurol Clin.* 2020;38(2):417-32.
197. Merle U, Eisenbach C, Weiss KH, Tuma S, Stremmel W. Serum ceruloplasmin oxidase activity is a sensitive and highly specific diagnostic marker for Wilson's disease. *J Hepatol.* 2009;51(5):925-30.
198. Ardelean-Jaby D, de Broucker T, Cailliez M. Maladie de Wilson : un cas et revue de la littérature. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée.* 2001;16(6):368-75.

199. Dhawan A, Taylor RM, Cheeseman P, De Silva P, Katsiyiannakis L, Mieli-Vergani G. Wilson's disease in children: 37-year experience and revised King's score for liver transplantation. *Liver Transpl.* 2005;11(4):441-8.
200. Diagnostic moléculaire de la maladie de Gaucher en Tunisie - EM consulte [Internet]. [cité 31 mai 2023]. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/article/802880/diagnostic-moleculaire-de-la-maladie-de-gaucher-en>
201. Filocamo M, Mazzotti R, Stroppiano M, Seri M, Giona F, Parenti G, et al. Analysis of the glucocerebrosidase gene and mutation profile in 144 Italian gaucher patients. *Hum Mutat.* 2002;20(3):234-5.
202. Koto Y, Sakai N, Lee Y, Kakee N, Matsuda J, Tsuboi K, et al. Prevalence of patients with lysosomal storage disorders and peroxisomal disorders: A nationwide survey in Japan. *Molecular Genetics and Metabolism.* 2021;133(3):277-88.
203. Eto Y, Ida H. Clinical and molecular characteristics of Japanese Gaucher disease. *Neurochem Res.* 1999;24(2):207-11.
204. Kang L, Zhan X, Gu X, Zhang H. Successful newborn screening for Gaucher disease using fluorometric assay in China. *J Hum Genet.* 2017;62(8):763-8.
205. Lukas J, Scalia S, Eichler S, Pockrandt AM, Dehn N, Cozma C, et al. Functional and Clinical Consequences of Novel α -Galactosidase A Mutations in Fabry Disease. *Hum Mutat.* 2016;37(1):43-51.
206. Uribe A, Mateus HE, Prieto JC, Palacios MF, Ospina SY, Pasqualim G, et al. Identification of mutations in Colombian patients affected with Fabry disease. *Gene.* 2015;574(2):325-9.
207. Miyazaki T, Kajita M, Ohmori S, Mizutani N, Niwa T, Murata Y, et al. A novel mutation (E358K) in the alpha-galactosidase A gene detected in a Japanese family with Fabry disease. *Hum Mutat.* 1998;Suppl 1:S139-140.
208. Vujasinovic M, Tepes B, Vujkovic B, Cokan Vujkovic A, Tretjak M, Korat V. Exocrine pancreatic insufficiency is not a cause of abdominal complaints in patients with Fabry disease. *Wien Klin Wochenschr.* 2015;127(23-24):931-4.
209. Gragnaniello V, Burlina AP, Polo G, Giuliani A, Salviati L, Duro G, et al. Newborn Screening for Fabry Disease in Northeastern Italy: Results of Five Years of Experience. *Biomolecules.* juin 2021;11(7):951.

Annexes

| | |
|--|-----|
| Annexe I : Fiche de renseignement | 188 |
| Annexe II : Consentement éclairé pour la réalisation de tests génétiques | 189 |
| Annexe III : Amorces du gène <i>ATP7B</i> | 190 |
| Annexe IV : Séquence nucléotidique du Gène <i>ATP7B</i> | 191 |
| Annexe V : Amorces du gène <i>GBA</i> | 198 |
| Annexe VI : Séquence nucléotidique du gène <i>GBA</i> | 199 |
| Annexe VII : Amorces <i>GLA</i> | 200 |
| Annexe VIII : Séquence du gène <i>GLA</i> | 201 |
| Annexe IX : Arbre généalogique B | 204 |
| Annexe X : Arbre généalogique CK | 205 |

Annexe I : Fiche de renseignement

Diagnostic moléculaire des Maladies Métaboliques

Fiche de renseignements

Nom :

Prénom :

Age :

Adresse :

Numéro de téléphone :

Médecin traitant (Préciser le Service) :

Notion de consanguinité :

Préciser le lien

Signes cliniques :

.....

.....

.....

Date de début des signes :

Antécédents familiaux :

Antécédents médicamenteux :

Annexe II : Consentement éclairé pour la réalisation de tests génétiques

CONSENTEMENT POUR LA RÉALISATION D'EXAMENS DES CARACTÉRISTIQUES GÉNÉTIQUES D'UNE PERSONNE

Je soussigné(e) né(e) le,

..... Demeurant à :

.....

- Reconnais avoir reçu par le Dr. les informations sur les examens des caractéristiques génétiques qui seront réalisés afin de :
 - Confirmer ou d'infirmer le diagnostic d'une maladie génétique en relation avec mes symptômes
 - Confirmer ou d'infirmer le diagnostic pré-symptomatique d'une maladie génétique
 - Identifier un statut de porteur sain (recherche d'hétérozygote)

- Pour cela, je consens :
 - au prélèvement qui sera effectué chez moi
 - au prélèvement qui sera effectué chez mon enfant mineur ou une personne majeure sous tutelle.

- Je suis informé(e) que les résultats de l'examen des caractéristiques génétiques me seront transmis par le Docteur sus-nommé dans le cadre d'une consultation individuelle. Si l'examen révèle des résultats autres que ceux recherchés, le Docteur sus-nommé déterminera la conduite à tenir lors d'une consultation individuelle.

- Si une partie du prélèvement reste inutilisée après examen, je consens à ce qu'il puisse être intégré, le cas échéant, à des fins de recherche scientifique. Dans ce cas, l'ensemble des données médicales me concernant seront protégées grâce à une anonymisation totale. En conséquence, je suis conscient(e) que ces études scientifiques effectuées ne seront sans aucun bénéfice ni préjudice pour moi.

Fait, à

Le,

Signature du patient adulte ou du représentant
légal de l'enfant ou du tuteur légal de
l'adulte sous tutelle :

Annexe III : Amorces du gène ATP7B

| Exon | Amorces F 5' ---» 3' | Amorces R 5' ---» 3' | Tm °C |
|---------------|-------------------------|--------------------------|-------|
| 1 (288Pb) | gcaactttgaatcatccgtgt | cgggggaacaaaactcac | 50 |
| 2.1 (531Pb) | gggatgtttagaaaaatat | gacttcactactccttg | 53 |
| 2.2 (359Pb) | tctgtgtcagctccatt | atattcaagacgaagactt | 54 |
| 2.3 (374Pb) | aaggaagccatgtggca | ggaatggacacaggatgc | 54 |
| 2.4 (302Pb) | cagggcacatgcagtac | ctataccaccatccagg | 50 |
| 3 (393Pb) | tcaccaagagccctgaaacc | cgaggtctatacgcagcatt | 58 |
| 4 (314Pb) | tcggttatattgactgtg | taatcacaagatggatg | 48 |
| 5 (298 Pb) | actggctttcacaggctt | tctcatttttctcactgattat | 56 |
| 6 (220Pb) | tccaaagctgaaaagtgc | ggtagaggaagggacttaga | 54 |
| 7 (276Pb) | tgtaatccaggtgacaagcag | cacagcatggaagggagag | 56 |
| 8 (360 Pb) | gtgtcgtcattgaactctc | ttcagaggaagtgagatttg | 56 |
| 9 (229Pb) | ggtttgacaggtctgctttc | tcaatacaacatgggcatctg | 60 |
| 10-11 (510Pb) | gtgaccgaatgagtggc | ttcccagaactttcaca | 54 |
| 12 (270Pb) | tgcttgggtgttttatttc | aagaacaggatcaatgtcagtag | 58 |
| 13 (332Pb) | gaaatgtccttatgtgatt | agtaaacagatactactttcatc | 50 |
| 14 (334Pb) | aggttgggtgaagtctgcc | ggacatggtgaggaataaaagagc | 62 |
| 15 (289Pb) | tttcacttccccctcttgg | tgctctctgtggttgacc | 60 |
| 16 (254Pb) | gcatggtttttagttcacagtg | aactgtatttctgagagagcg | 60 |
| 17 (280Pb) | caagtgtggtatcttgggtg | ctggtgcttacttttgtctc | 56 |
| 18-19 (556Pb) | gggcaagggtaacttgagg | aggttctctgctgggggta | 60 |
| 20 (240Pb) | tctcctggctcctctccc | ggcaagttccactgtgctaag | 60 |
| 21 (419Pb) | taaaagatggatgagaggc | gcttgtggtgagtggagg | 54 |

Annexe IV : Séquence nucléotidique du Gène ATP7B

Exon 1 : 194 Pb/288 Pb

ctcatccccgtgccccaggtcgggaggacggcgggcgcgcaactttgaat
catccgtgtgaagagggctgcggcttccccggtcccaaatgaaggggcg
TTCCCGGACCCCTGTTTGCTTTAGAGCCGAGCCGCGCCGATGCCCTCACA
CTCTGCGCCTCCTCTCCCGGACTTTAACACCCCGCTCTCCTCCACCGAC
CAGGTGACCTTTTGCTCTGAGCCAGATCAGAGAAGAATTCCGGTGTCCGTG
CGGGACGATGCCTGAGCAGGAGAGACAGATCACAGCCAGAGAAGGGGCCA
GTCGGAAAgtgagttttgttccccgcgtcgcgcagcgtgctcactccc
accaggaggattttcctccccgcgttcggegcttactcgccccaggggg

Exon 2 :

gggatggttagaaaatatttggtttcaaggtta
aaaaatggtattttcttttcttttagATCTTATCTAAGCTTTCTTTGCCT
ACCCGTGCCTGGGAACCAGCAATGAAGAAGAGTTTGGCTTTTGACAATGT
TGGCTATGAAGGTGGTCTGGATGGCCTGGGCCCTTCTTCTCAGGTGGCCA
CCAGCACAGTCAGGATCTTGGGCATGACTTGCCAGTCATGTGTGAAGTCC
ATTGAGGACAGGATTTCCAATTTGAAAGGCATCATCAGCATGAAGGTTTC
CCTGGAACAAGGCAGTGCCACTGTGAAATATGTGCCATCGGTTGTGTGCC
TGCAACAGGTTTGCCATCAAATTGGGGACATGGGCTTCGAGGCCAGCATT
GCAGAAGGAAAGGCAGCCTCCTGGCCCTCAAGGTCCTTGCCGCCCAGGA
GGCTGTGGTCAAGCTCCGGGTGGAGGGCATGACCTGCCAGTCCTGTGTCA
GCTCCATTGAAAGCAAGGTCCGGAAACTGCAAGGAGTAGTGAGAGTCAAA
GTCTCACTCAGCAACCAAGAGGCCGTCATCACTTATCAGCCTTATCTCAT
TCAGCCCGAAGACCTCAGGGACCATGTAAATGACATGGGATTTGAAGCTG
CCATCAAGAGCAAAGTGGCTCCCTTAAGCCTGGGACCAATTGATATTGAG
CGGTTACAAAGCACTAACCCAAAGAGACCTTTATCTTCTGCTAACCAGAA
TTTTAATAATTCTGAGACCTTGGGGCACCAAGGAAGCCATGTGGTCACCCC
TCCAAGTGAATAAGATGGAATGCATTGTAAGTCTTGCGTCTTGAATATT
GAAGAAAATATTGGCCAGCTCCTAGGGGTTCAAAGTATTCAAGTGCCTT
GGAGAACAAAAGTCCCAAGTAAAGTATGACCCCTTCTTGTACCAGCCCAG
TGGCTCTGCAGAGGGCTATCGAGGCACTTCCACCTGGGAATTTTAAAGTT
TCTCTTCCCTGATGGAGCCGAAGGGAGTGGGACAGATCACAGGTCTTCCAG
TTCTCATTTCCCCTGGCTCCCCACCGAGAAACCAGGTCCAGGGCACATGCA
GTACCACTCTGATTGCCATTGCCGCATGACCTGTGCATCCTGTGTCCAT
TCCATTGAAAGGCATGATCTCCCAACTGGAAGGGTGCAGCAAATATCGGT
GTCTTTGGCCGAAGGACTGCAACAGTTCTTTATAATCCCTCTGTAATTA
GCCCAGAAGAACTCAGAGCTGCTATAGAAGACATGGGATTTGAGGCTTCA
GTCGTTTCTGgtacgtagtggtttgaggcatgtcctgagcttgtctcct
tttctctttgtgtcttatagctcctggatggtggtataggtgagccctgc

2.1F

2.2F

2.3F

2.4F

2.1R

2.2R

2.3R

2.4R

Exon 3 : 393 Pb

tcaccaagagccctgaaacctcttgttctgaaaaacata
ttatttgctcttctaatttgaatattttctgacattttatcctagAAAGC
TGTTCTACTAACCCTCTTGAAACCACAGTGCTGGGAATTCCATGGTGCA
AACTACAGATGGTACACCTACATCTGTGCAGGAAGTGGCTCCCCACACTG
GGAGGCTCCCTGCAAACCATGCCCGGACATCTTGCCAAAGTCCCCACAA
TCAACCAGAGCAGTGGCACCCGAGAAGTGCTTCTTACAGATCAAAGGCAT
GACCTGTGCATCCTGTGTGTCTAACATAGAAAGGAATCTGCAGAAAGAAG
CTGgtaagagatgaacgcccatggtgaacttaggaatgctgcgtatagac
Ctcgtatt

Exon 4 : 314 Pb

tgtgtttcttgggttcggttatattgactgtgtcaacctagaggccctgcc
caccagagtgttacagccatgacctgatggttccagGTGTTCTCTCCGT
GTTGGTTGCCTTGATGGCAGGAAAGGCAGAGATCAAGTATGACCCAGAGG
TCATCCAGCCCCTCGAGATAGCTCAGTTCATCCAGGACCTGGGTTTTGAG
GCAGCAGTCATGGAGGACTACGCAGGCTCCGATGGCAACATTGAGCTGAC
Agtaagtactgtgggtgcttacgggttacaggcttctgacagtttgca
ttttggacacatccatctttgtgattagtaaatttccccatcttgacgt

Exon 5 : 298 Pb

Actggctttcacaggctttccttgatcctgggtctgtgggattcttgcca
tcctgtggtgcagATCACAGGGATGACCTGCGCTCCTGTGTCCACAACA
TAGAGTCCAAACTCACGAGGACAAATGGCATCACTTATGCCTCCGTTGCC
CTTGCCACCAGCAAAGCCCTTGTTAAGTTTGACCCGAAATTATCGGTCC
ACGGGATATTATCAAATTTATTGAGgtaagtaattcattaaaaaattgta
gtcacctttttaaaaacagtaatatataatcagtgaagaaaaatgagaaa

Exon 6 : 220 Pb

cccacaaagtctactgaggcacttttagattcactttctaatttccaaag
ctgaaaagtgctttctgccaatgcatattttaaccaagtaccttcctcct
ttttccccaccctctcttttttaatgacaagGAAATTGGCTTTCATGCTT
CCCTGGCCCAGAGAAACCCCAACGCTCATCACTTGGACCACAAGATGGAA
ATAAAGCAgtaggtagaacacaaaagataaactccagctctcatctaagt
cccttcctctacctgggcccactctgccagctggtcttcttccatg

Exon 7 : 276 Pb

gaaggggagtggtcttgtaatccaggtgacaagcagcatctgatatatctg
tggttgctgcatttgctttccagGTGGAAGAAGTCTTTCCTGTGCAGCCTG
GTGTTTGGCATCCCTGTCATGGCCTTAATGATCTATATGCTGATACCCAG
CAACGAGCCCCACCAGTCCATGGTCCTGGACCACAACATCATTCAGGAC
TGTCCATTCTAAATCTCATCTTCTTTATCTTGTGTACCTTTGTCCAGgta
Tatatgagaaagtgggcagacctctcccttccatgctgtgtgtggccctc

Exon 8 : 360 Pb

aaagctagaggctttgccatccccagggcccttggccctgtgtcgctcat
tgaactctcctccctacttgctggcagccttcaactgtccttgcttttcag
CTCCTCGGTGGGTGGTACTTCTACGTTTCAGGCCACAAATCTCTGAGACA
CAGGTCAGCCAACATGGACGTGCTCATCGTCCTGGCCACAAGCATTGCTT
ATGTTTATTCTCTGGTCATCCTGGTGGTTGCTGTGGCTGAGAAGGCGGAG
AGGAGCCCTGTGACATTCTTCGACACGCCCCCATGCTCTTTGTGTTCAT
TGCCCTGGGCCGGTGGCTGGAACACTTGGCAAAGgtaacagcagcttcag
gttcagaaaagagctgctccttcagtaaacaaatctcacttcctctgaac

Exon 9 : 229 Pb

ctctaacaccacgcttgtgactctcaggctgggtttggacaggtctgctt
tcgatagctctcatttcacattctggttatctcctagAGCAAACCTCAG
AAGCCCTGGCTAAACTCATGTCTCTCCAAGCCACAGAAGCCACCGTTGTG
ACCCCTGGTGAGGACAATTTAATCATCAGgtgagttatggttatcaaatg
tctttgtggttggtatctatcaatctgtgtgagctgcatcagatgcccat
gttgattgacattgcaatagacctgtgagtggtgggcagagacacagta

Exon 10-11 : 510 Pb

agcaaatacagtgtaactattgtaacagctggcctagaacctgaccgggt
gaccgaatgagtggccatgtgagtgataagtggcgtttggttcagGGAGG
AGCAAGTCCCCATGGAGCTGGTGCAGCGGGCGATATCGTCAAGGTGGTC
CCTGGGGGAAAGTTTCCAGTGGATGGGAAAGTCTTGGAAAGCAATACCAT
GGCTGATGAGTCCCTCATCACAGgtgagatggcttggttcatgttccctc
aggaggatatcatagcagctgtcaggtcacatgagtgctggatggggctg
agcaagtgcagttgtctctttccctacgtctagGAGAAGCCATGCCAGTC
ACTAAGAAACCCGGAAGCACTGTAATTGCGGGGTCTATAAATGCACATGG
CTCTGTGCTCATTAAAGCTACCCACGTGGGCAATGACACCACTTTGGCTC
AGATTGTGAAACTGGTGGAAAGAGGCTCAGATGTCAAAGgtaatgaagaaa
tttttaaaacttcatctttctcgttttagaaattatgtgaagagtt
ctgggaaatcagacagttttattgagtagagattgattagtaaatgtggt

Exon 12 : 270 Pb

taaatgaaggagattatcccaatctttatccatgcttggtggttttatt
tcttcataggttgtaatttcccatggtccttggtggttttattttcatagGC
ACCCATTCAGCAGCTGGCTGACCGTTTAGTGGATATTTTGTCCCATTTA
TCATCATCATGTCAACTTTGACGTTGGTGGTATGGATTGTAATCGGTTTT
ATCGATTTTGGTGTGTTTCAGAGATACTTTCTGtaagttgaatgccttg
ggctatatggtggttggtgtgttttaataatctactgacattgatcctgttc
tttcatatcttagattcactggtgctttaaattattcattacattttatttg

Exon 13 : 332 Pb

aaccaagttcgtcacggttggtccagtgccccctgaaatgtccttatg
tgattagagttctgaggagcttccttattgaactctcaacctgcctctgac
tctgtcctgttttcagAACCCCAACAAGCACATCTCCCAGACAGAGGTGA
TCATCCGGTTTGTCTTCCAGACGTCATCACGGTGCTGTGCATTGCCTGC
CCCTGTCCCTGGGGCTGGCCACGCCACGGCTGTCATGGTGGGCACCGG
GGTGGCCGCGCAGAACGGCATCCTCATCAAGGGAGGCAAGCCCCTGGAGA
TGGCGCACAAGgtcagcctgtagcacggctttcccatcctgagaggatga
aagtagtatctgtttactatttcacattgagagaaaagcctgagagccac

Exon 14 : 334 Pb

tttctgtctgagggcaggttgggtgaagttctgcctcaggagtgtagta
tggagccctccatctgtattgtggtcagtgagttgtggttggttttg
cagATAAAGACTGTGATGTTTACAAAGACTGGCACCATTACCCATGGCGT
CCCCAGGGTCATGCGGGTGCTCCTGCTGGGGGATGTGGCCACACTGCCCC
TCAGGAAGGTTCTGGCTGTGGTGGGGACTGCGGAGGCCAGCAGTGAACAC
CCCTTGGGCGTGGCAGTCACCAATACTGTAAAGAGgtacgtggacttgg
gcgtggcctgcctccccgccaatgctcttttattcctcaccatgtcct

Exon 15 : 289 Pb

tcacctgtgtccctgtcctgcctgcccctccctttcaacttaccctct
tggtcttacagtttccctcttctctctttccaccttcccagGAACTTGGA
CAGAGACCTTGGGATACTGCACGGACTTCCAGGCAGTGCCAGGCTGTGGA
ATTGGGTGCAAAGTCAGCAACGTGGAAGGCATCCTGGCCCACAGTGAGCG
CCCTTTGAGTGCACCGGCCAGTCACCTGAATGAGGCTGGCAGCCTTCCCC
CAGAAAAAGgtatttgctggcttttctctctgcagctggttaaagtagag
gtgggtcaaaccacagagagcaccacgcccagcagtgattgcctctgctg

Exon 16 : 254 Pb

tacaaggttacagtttttcagaatggttaaaggatattttgctgttaa
aggatt~~gcatggtttttagttcacagt~~aaattggaccatttagaataa
ccacagcctcttttgaatagATGCAGTCCCCAGACCTTCTCTGTGCTGA
TTGGAAACCGTGAGTGGCTGAGGCGCAACGGTTAACCATTTCTAGCGAT
GTCAGTGACGCTATGACAGACCACGAGATGAAAGGACAGACAGCCATCCT
GGTGGCTATTGACGgtatcttctgcttctgccttccttc~~cgctctctcag~~
~~aaatacagtt~~ttctgcagatatcaggcaaaagagtctctctttataaaag

Exon 17 : 280 Pb

ttttgcacataatattatgatgagaacattg~~caagtgtggtatcttgg~~
~~tg~~cggggtgccccaaacttgtgtagctgctgatgctggctggttcgctcca
gGTGTGCTCTGTGGGATGATCGCAATCGCAGACGCTGTCAAGCAGGAGGC
TGCCCTGGCTGTGCACACGCTGCAGAGCATGGGTGTGGACGTGGTTCTGA
TCACGGGGGACAACCGGAAGACAGCCAGAGCTATTGCCACCCAGgtacag
ccctttaatggtgcaaactgtgtaaagctcataaaagcagtta~~gagac~~aa
~~aagtaagcaccag~~ttggcccagcactgagctgtactcctgctctttctcc

Exon 18-19 : 556 Pb

aacatcactgactggaccagaggccgagggcagagg~~gggcaagggtaac~~
~~ttgagg~~tttctgctgctatctgataccttttgccaacactaggcattgccc
ttccttttgtcttagGTTGGCATCAACAAAGTCTTTGCAGAGGTGCTGCC
TTCGCACAAGGTGGCCAAGGTCCAGGAGCTCCAGAATAAAGGGAAGAAAG
TCGCCATGGTGGGGATGGGGTCAATGACTCCCCGGCCTTGGCCAGGCA
GACATGGGTGTGGCCATTGGCACCGGCACGGATGTGGCCATCGAGGCAGC
CGACGTCGTCCTTATCAGAgtgagcgtggctgcagccaggctgtgggtgc
tgggagggcaatgggcagacccttctcactgtgtgctcctctccatca
gAATGATTTGCTGGATGTGGTGGCTAGCATTACCTTTCCAAGAGGACTG
TCCGAAGGATACGCATCAACCTGGTCCTGGCACTGATTTATAACCTGGTT
GGGATACCCATTGCAGCAGgttaggcagctcttaccactgtgctccagct
gcccagaaaggcttctgtctccc~~aggttctctgctgggggta~~gtgagtg
gctcactcactggctgg

Exon 20 : 240 Pb

cactgggggcccgtgaggggtggggcagcccgggtgcctgaagccctctcct
ggctcctctccccagacctaggtgtgagtgcgagttctttcttccccagG
TGTCTTCATGCCCATCGGCATTGTGCTGCAGCCCTGGATGGGCTCAGCGG
CCATGGCAGCCTCCTCTGTGTCTGTGGTGTCTCATCCCTGCAGCTCAAG
TGgtgagtccccctcaggtggagcatctgtgggaggctcccaggaggcctt
gtcattctgcatgcttagcacagtggaacttgcctctcatttccattca

Exon 21 : 419Pb

aggttttgatactgaatgttattaaaagatggatgagaggccttcaccag
gcttagaaaaaaaaaaagccttgtttctagaatggctcagatgctgttgc
gttcctgctttccagCTATAAGAAGCCTGACCTGGAGAGGTATGAGGCAC
AGGCGCATGGCCACATGAAGCCCCGACGGCATCCCAGGTCAGTGTGCAC
ATAGGCATGGATGACAGGTGGCGGGACTCCCCAGGGCCACACCATGGGA
CCAGGTCAGCTATGTCAGCCAGGTGTCGCTGTCTCCCTGACGTCCGACA
AGCCATCTCGGCACAGCGCTGCAGCAGACGATGATGGGGACAAGTGGTCT
CTGCTCCTGAATGGCAGGGATGAGGAGCAGTACATCTGATGACTTCAGGC
AGGCGGGCCGGGCAGGGACTTGCCTCCACTCACCACAAGCTGAGCAGGA
CAGCCAGCAGCAGGATGGGCTGAGCTAGCCTCCAGCTTTGGGGACTTCCG
CTCCCTGGATATGTCCAGTCATCCTGCCCTGCAGCACGCGGCCTTGTCTG
GGTGCAGCTGGGCTTGGCCTGGAGAGGACGGCCCTGCCTGCCTCTTGGCC
TCACGGGACCGTCAGCATGGGCTTTGTCTTGGACTCTAGTCCCTTGGCTGG
ACTGTAGAAGGTGAGAGGCGAGTCACCCTCCTCACAGACCTCTGCTTGGGA
GTATTTAGGATGACTGCTGTGAAATGGAGAACAGTTTCATCAGGACCAAAA
AAACCTCACTGGGCCCTTCCAGAGAACTGCAGACCTCACTGTCAGGGTCT
TTCTGATGACGCTGTCTGTGTGCATCATGTTTCTGAGACCACAGTTTAC
CTCAGGTGTGCCTGTGCTTTCTTCCCTGCATAGTCTGTTCCCTTTCTTCGT
ACATAGTCTGTTCCCTTTTCTCTCCTGTGTGCTTGTGAGTGGGGACCCCTC
GCAACCCTGCCTGTCACCTGGGAGGGTGGGACCAATGTCCTTGTGGTCTT
TGCTGCTGCTCTCAGGCGCTTCTCCAATGCTCTGGAGTGTGCATTTACAGC
TTGAACCTGCTTCCCTGGCTCACACATCCCCAGCCAGGGAGCTTGCCACAC
TCTTCTCAAGTTGAGGAGAGTTCTTTTTTGGCTTAAAGCCCCCTTCTCCA
TGGAGTGTGGCTTCTCAATAGAGTGTGTTGCTGACCAGCTGGAGTGAG
GGCCTCAGAGCCTGACCTGAGAGTCCGTACTCGGCTTCCCTGTGGGGTGT
GGTTCTCGCGATTACAGGACGTCCCTCCATATCCCTGCCAGCCTGTGGTG
CTTGAAACGTTTGGCCCATGGGAAACGTATGTGTGCAGGAGCCTCCCTGC
ACGGCCCAAGGGGCTTCGTTTTTCACTTTCTGACTGTCACCTCGTGGGGT
TCAGTAGAGAATTCATGTGACTAGCGCCTGGCCTTGTGTGGCTTGGAGGA
AATGGTACTGCCCAAATAGGAGGAAAACACAGCCTCCCTGAGCCTGCATT
CTGCACGCTGCCAGGGGCTTCAGAAAAGGAGTGGCCACAGCACCCCGAA
GGGAGCATCTGTTTACCTGGCAGTGGCTCTCAGAGCAGCAGAACGGGTTC
AGTTTTAGACTCTGAAGTTGGTTGTGATTGACAGAACCCTTTGGGAGCAA
ACTAGTAGAGTTGGATTAAATTCTGGGTGAAACCCTTTTCTCCACACAA
AATAGTTTTAGTGATTTTTTTCATTGTCCATTACTTGCCAGGGGCAGTTT
TAGCAGCACTTTTGATAGATTACGTCTAATCCTCCCAACCAACCAGCAGG
GTAGCTATTACTGTCCACATTTTACAGGCAAGGAAACAGGCTCCAAGAGG
CTGAGGACTTTGCCAGGATGACATAGCCAATGGACAAGCAGTGTCTGTC
AGCTGTGAAGGCTTCACTCTTATTGTCCTTCTACCTTGAATAGAAGTTTT
CCTGATAAGAATAAACGAGGAAAAGTCTTGCCTCCTGGAAGAACAAT

CTACCAGGTGATCTATTCATTGTTTCAACTCAGAATGCACTTGATTGAGG
AGGTCATCTGACCTTCACCTTGGATGGTTAGTTTCACTTTTTACATATAG
TTTTTGCAGGGTTTTATTTTATAAAAATCCAAGCGCGCTGTTGATTGTGTT
TTCCTTGTTTTTCAGCCCCCCTCCAGCCCGCAGCACATTTCCGCTGTC
CGTCAGTAATTGTGTCCTCTCTTTATGCTTGCTTGGGGAATGTTGTTTTC
TGACTAGGCTGATCATTATCTAAAGAATCTAATTCTGTTGATTTTTAAAA
CTTTTAGGACCATAAACGTTGTGTTTCATATATGGACATGGAAATATTTAT
ATAATTTTATAGAAAATAACCTTTTAGATGGTCAAAGTGTAAGGAGTTTT
TTTGTGAGATAATCATTCTACTTCAAAAACATTTTCATGCAATATTAGAA
TAAAGTTCCTGTCATTCTCTAAAAatctgcctgtgagtgagatgcgtgg

Annexe V : Amorces du gène GBA

| Exon | AMORCE (5'-3') |
|---------------------|---|
| Primer 370 F | 5'-GTCTCTTTGCCTTTGTCCTTACCCTCGA-3' |
| Primer 370 R | 5'-ACTGTCGAC AAAGTTACGCACCCAAT -3 |
| Primer 444 F | 5'-TTGGGTGCGTAACTTTGTCG-3' |
| Primer 444 R | 5'-AGGCCCCCAACGCTGTCTTC -3 |

Annexe VI : Séquence nucléotidique du gène *GBA*

N370S

ctctcccacatgtgacccttacctacactctctggtgggacccccagtggtg
cgccttttgtctctttgctttgtccttaccctagAACCTCCTGTACCATG
TGGTCGGCTGGACCGACTGGAACCTTGCCCTGAACCCCGAAGGAGGACCC
AATTGGGTGCGTAACTTTGTCGACAGTCCCATCATTGTAGACATCACCAA
GGACACGTTTTACAAACAGCCCATGTTCTACCACCTTGGCCACTTCAGgt
gagtggagggcgggcacccttccataaccaggcctatcatctcctaca
tcggatggcttacatcactctacaccacgagggagcaggaaggtgttcag
ggtggaacctcggaagaggcacacccatccccttttgcaccatggaggca
ggaagtgactaggttagcaacagaaaacccaatgcctgaggctggactgc
gatgcagaaaagcagggtcagtgccagcagcatggctccaggcctagag
agccagggcagagcctctgcaggagtatgggggtgggtccgtgggtgggt
gacttcttagatgagggtttcatgggaggtaccccgagggactctgacca
tctgttcccacattcagCAAGTTCATTCCTGAGGGCTCCCAGAGAGTGGG
GCTGGTTGCCAGTCAGAAGAACGACCTGGACGCAGTGGCACTGATGCATC
CCGATGGCTCTGCTGTTGTGGTCGTGCTAAACCGgtgagggcaatggtga
ggtctgggaagtgggctgaagacagcgttgggggcttggcaggatcaca

L444P

Annexe VII : Amorces GLA

| Amorce | Séquence | Quantité |
|---------------------|--|-----------------|
| GLA-Exon 1 | F : 5'- ACCGTCCCAGTTGCCAGA-3' | 1 |
| | R : 5'- ACTGTTCCCGTTGAGACTC-3' | 1 |
| GLA-Exon 2 | F : 5'- CCTATTTTGTTTGGGGTTTT -3' | 1 |
| | R : 5'- CATGAGGGCTGTTTCTTTTT -3' | 1 |
| GLA-Exon 3 | F : 5'- CTCTCTTTCTGCTACCTCACG -3' | 1 |
| | R : 5'- TCAGCTACCATGGCCTCA -3' | 1 |
| GLA-Exon 4 | F : 5' -TATATAGCCCCAGCTGGAA -3' | 1 |
| | R : 5'- GTAAGTAACGTTGGACTTTG -3' | 1 |
| GLA-Exon 5 | F : 5'- TGGCCTACTTCTGAAGCA -3' | 1 |
| | R : 5'-AACCACTTCCACAGCAT-3' | 1 |
| GLA-Exon 6+7 | F : 5'- GAGCAGGATGCTGTGGAA-3' | 1 |
| | R : 5'- AGCCTTGAGCTTTTAAAGTG-3' | 1 |

Annexe VIII : Séquence du gène GLA

Exon 1 : 409 Pb

1F

a ccg tcc cag ttg cca gag

AAA CAA TAA CGT CAT TAT TTA ATA AGT CAT CGG TGA TTG GTC CGC CCC TGA GGT
TAA TCT TAA AAG CCC AGG TTA CCC GCG GAA ATT TAT GCT GTC CGG TCA CCG TGA
CAA TGC AGC TGA GGA ACC CAG AAC TAC ATC TGG GCT GCG CGC TTG CGC TTC GCT
TCC TGG CCC TCG TTT CCT GGG ACA TCC CTG GGG CTA GAG CAC TGG ACA ATG GAT
TGG CAA GGA CGC CTA CCA TGG GCT GGC TGC ACT GGG AGC GCT TCA TGT GCA
ACC TTG ACT GCC AGG AAG AGC CAG ATT CCT GCA TCA Ggt atc aga tat tgg gta ctc cct tcc
ctt tgc ttt tcc atg tgt ttg ggt gtg ttt ggg gaa ctg gag agt ctc aac ggg aac agt tgagccccgag

1R

Exon 2 : 796 Pb

2F

ttt ctc att cct att ttg ttt ggg gtt tt agg gcg gga ata tta acg gga taa gag aga caa aag aaa atc tgg
aaa aac aat tca ttt tac ctt aca ttg ctt gtg att act acc aca cta tta ctg ggt tgg aaa aaa ttg tga aat ccc
aag gtg cct aat aaa tgg gag gta cct aag tgt tca ttt aat gaa ttg taa tga tta ttg gaa ttt ctc ttt cag
TGA GAA GCT CTT CAT GGA GAT GGC AGA GCT CAT GGT CTC AGA AGG CTG
GAA GGA TGC AGG TTA TGA GTA CCT CTG CAT TGA TGA CTG TTG GAT GGC
TCC CCA AAG AGA TTC AGA AGG CAG ACT TCA GGC AGA CCC TCA GCG CTT
TCC TCA TGG GAT TCG CCA GCT AGC TAA TTA Tgt gag ttt ata gat aat gtt ctt gtt cat
tca gag gac tgt aag cac ttc tgt aca gaa gct tgt tta gaa aca gcc ctc atg gcc ggg cgt ggt ggc tca cgc
ctg taa tcc caa cac ttt ggg agg ccg agg cgg gtg gat cac ctg agg tca aga gtt caa gac cag cct ggc
caa cat ggt gaa acc cca act cta tta aaa gta caa aaa att agc tgg gca tgg tgg tga acg cct gta acc cca
gct act tgg gag gct gag gca gga gaa tgc ctt gaa ccc agg agg tgg aag ttt cag tga gct gag atc acg
cca ttg cac tct agc ctg ggc aac aaa aga gaa act cca tct caa aaa aaa caa gga aaa aaa gaa aca
gcc ctc atg aca ctt aga aag tag aat agc tgg ctg tta tct gaa cat tga a

2R

Exon 3 : 305 Pb

3F

ctc tet ttc tgc tac ctc acg att gtg ctt cta caa tgg tga ctc ttt tcc tcc ctc tca ttt cag GTT CAC
AGC AAA GGA CTG AAG CTA GGG ATT TAT GCA GAT GTT GGA AAT
AAA ACC TGC GCA GGC TTC CCT GGG AGT TTT GGA TAC TAC GAC ATT
GATGCC CAG ACC TTT GCT GAC TGG GGA GTA GAT CTG CTA AAA TTT GAT
GGT TGT TAC TGT GAC AGT TTG GAA AAT TTG GCA GAT Ggt aat gtt tca ttc cag aga
3R ttt agc cac aaa gga aag aac ttt gag gcc atg gta gct gag cca aag

Exon 4 : 247 Pb

4F

tat ata tat agc ccc agc tgg aaa ttc att tet ttc cct tat ttt acc cat tgt ttt ctc ata cag GTT ATA AGC
ACA TGT CCT TGG CCC TGA ATA GGA CTG GCA GAA GCA TTG TGT ACT CCT
GTG AGT GGC CTC TTT ATA TGT GGC CCT TTC AAA AGg tga gat agt gag ccc aga atc
4R caa tag aac tgt act gat aga tag aac ttg aca aca aag gaa acc aag gtc tcc ttc aaa gtc caa cgt tac tta
cta tc

Exon 5 : 481 Pb

5F

tgg cct act tet gaa gca aac ttc tta cag tga aaa ttc att ata agg gtt tag acc tcc tta tgg aga cgt tca
atc tgt aaa ctc aag aga agg cta caa gtg cct cct tta aac tgt ttt cat ctc aca agg atg tta gta gaa agt
aaa cag aag agt cat atc tgt ttt cac agC CCA ATT ATA CAG AAA TCC GAC AGT ACT GCA
ATC ACT GGC GAA ATT TTG CTG ACA TTG ATG ATT CCT GGA AAA GTA TAA
AGA GTA TCT TGG ACT GGA CAT CTT TTA ACC AGG AGA GAA TTG TTG ATG
TTG CTG GAC CAG GGG GTT GGA ATG ACC CAG ATA TGg taa aaa ctt gag ccc tcc ttg
5R ttc aag acc ctg cgg tag gct tgt ttc cta ttt tga cat tca agg taa ata cag gta aag ttc ctg gga gga ggc
ttt atg tga gag tac tta gag cag gat gct gtg gaa agt ggt ttc tcc ata tgg gtc atc tag gta act tta ag

Exon 6-7: 932 Pb

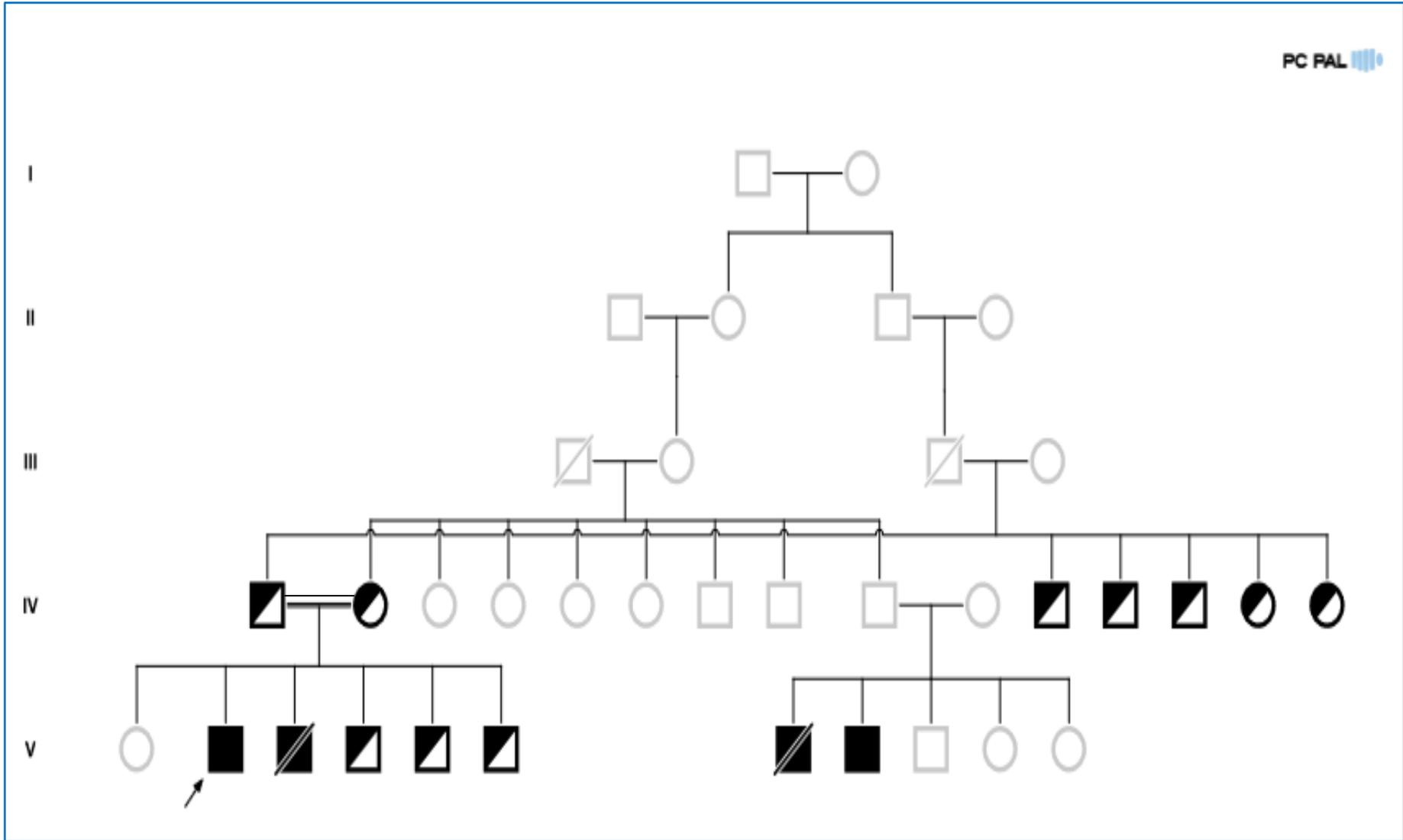
6F

gag cag gat gct gtg gaa agt ggt ttc tcc ata tgg gtc atc tag gta act tta aga atg ttt cct cct ctc ttg ttt
gaa tta ttt cat tct ttt tct cag TTA GTG ATT GGC AAC TTT GGC CTC AGC TGG AAT CAG
CAA GTA ACT CAG ATG GCC CTC TGG GCT ATC ATG GCT GCT CCT TTA TTC
ATG TCT AAT GAC CTC CGA CAC ATC AGC CCT CAA GCC AAA GCT CTC CTT
CAG GAT AAG GAC GTA ATT GCC ATC AAT CAG GAC CCC TTG GGC AAG CAA
GGG TAC CAG CTT AGA CAG gta aat aag agt ata tat ttt aag atg gct tta tat acc caa tac caa
ctt tgt ctt ggg cct aaa tct att ttt ttc cct tgc tet tga tgt tac tat cag taa taa agc ttc ttg cta gaa aca tta
ctt tat ttc caa aat aat gct aca gga tca ttt taa ttt ttc cta caa gtg ctt gat agt tet gac att aag aat gaa
tgc caa act aac agg gcc act tat cac tag ttg cta agc aac cac act ttc ttg gtt ttt cag GGA GAC AAC
TTT GAA GTG TGG GAA CGA CCT CTC TCA GGC TTA GCC TGG GCT GTA GCT
ATG ATA AAC CGG CAG GAG ATT GGT GGA CCT CGC TCT TAT ACC ATC GCA
GTT GCT TCC CTG GGT AAA GGA GTG GCC TGT AAT CCT GCC TGC TTC ATC
ACA CAG CTC CTC CCT GTG AAA AGG AAG CTA GGG TTC TAT GAA TGG ACT
TCA AGG TTA AGA AGT CAC ATA AAT CCC ACA GGC ACT GTT TTG CTT CAG
CTA GAA AAT ACA ATG CAG ATG TCA TTA AAA GAC TTA CTT TAA AAT GTT
TAT TTT ATT GCC aac tac tac ttc ctg tcc acc ttt ttc tcc att cac ttt aaa agc tca agg cta ggt
ggc tcat gcc tgt aat ccc

7R

Annexe IX : Arbre généalogique B.

PC PAL



Annexe X : Arbre généalogique CK

