

THESE

En vue de l'obtention du : **DOCTORAT**

Centre de Recherche : Génomique des Pathologies Humaines

Structure de Recherche : Laboratoire de Biologie des Pathologies Humaines

Discipline : Biologie

Spécialité : Génétique et Génomique

Présentée et soutenue le :22/07/2022 par :

Yahya BENBOUCHTA

**Caractérisation génomique de deux maladies génétiques rares :
la cardiopathie congénitale syndromique et la dystrophie cornéenne
atypique**

&

**Intérêt des gènes identifiés dans ces deux maladies dans la prédisposition
génétique au cancer**

JURY

Hassan JAZIRI	PES, Université Mohammed V.Faculté des Sciences Rabat	Président
Ahmed BELLMOUDENE	PES. Université Ibn Zohr-Agadir Faculté des Sciences.	Rapporteur/Examineur
Mouna ABABOU	PH, Université Mohammed V.Faculté des Sciences Rabat	Rapporteur/Examineur
Hicham BELLAOUI	PES, Université Mohammed V.Faculté des Sciences Rabat	Rapporteur/Examineur
Fatima BOUBRIK	PES. Université Ibn Zohr-Agadir Faculté des Sciences.	Examinatrice
Abdelaziz SEFIANI	PES, Université Ibn Zohr-Agadir Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat	Co-encadrant
Khalid SADKI	PES, Faculté des Sciences Rabat et Faculté de Médecine et Dentaire de Rabat	Directeur de Thèse

Année Universitaire : 2022

Dédicace

*Je dédie ce travail et ma profonde gratitude à ma mère pour
l'éducation qu'elle m'a prodiguée ; avec tous les moyens et au prix de
tous les sacrifices qu'elle a consentis à mon égard, pour le sens du
devoir qu'elle m'a enseigné depuis mon enfance.*

À mon cher père. Présent toujours dans ma mémoire.

À ma femme Meryem,

À mes enfants Nouhaila, Kawtar et Omar

À ma famille,

À mes ami(e)s,

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse s'est déroulé au sein de la structure de recherche dans le laboratoire de biologie des pathologies humaines, Centre de Recherche en Génomique de Pathologie Humaine de la Faculté des Sciences, Université Mohammed V de Rabat sous la direction de professeur **Khalid SADKI**.

Ce travail de recherche est le fruit d'une étroite collaboration entre la Structure de Recherche dans le Laboratoire de Biologie des Pathologies Humaines, Centre de Recherche en Génomique de Pathologie Humaine et le Laboratoire de Génétique Médicale au sein du Département de Génétique Médicale de l'Institut National d'Hygiène de Rabat sous la direction de professeur **Abdelaziz SEFIANI**.

Je tiens à remercier et à exprimer ma gratitude envers toute personne dont l'intervention a contribué au bon déroulement de ce travail, en particulier :

A mes Directeurs de Thèse

Mr le Professeur Khalid SADKI

Professeur à la Faculté de des Sciences Rabat Université Mohammed V de Rabat. Tout d'abord, je tiens à vous exprimer mes vifs remerciements pour la confiance que vous m'avez accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, Je garderai toujours les meilleurs souvenirs de votre immense savoir et de votre sens du devoir. Qu'il me soit permis de vous exprimer aussi mon profond respect et mon intense admiration pour vos qualités humaines exceptionnelles. Notamment j'avoue que c'était un grand honneur et une extrême fierté de m'avoir permis de réaliser ce travail.

Mr le Professeur Abdelaziz SEFIANI

Professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie Université Mohammed V de Rabat et Directeur du Département de Génétique Médicale à l'Institut National d'Hygiène

Pour la confiance que vous m'avez accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, pour vos multiples conseils et pour toutes les heures que vous m'avez consacrées à diriger cette recherche. J'aimerais également vous exprimer à quel point j'ai apprécié votre grande disponibilité. Enfin, j'ai été extrêmement sensible à vos qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail doctoral.

Mr le Professeur Hassan JAZIRI

Professeur à la Faculté de des Sciences Rabat Université Mohammed V de Rabat Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance pour l'honneur que vous me faites en acceptant de présider mon jury de thèse.

Mr le Professeur Ahmed BELMOUDDENE

Professeur à la Faculté des Sciences. Université Ibn Zohr-Agadir

Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance pour l'honneur que vous me faites en acceptant d'être rapporteur de cette thèse. Votre jugement sera d'une grande valeur dans l'appréciation de ce travail. Veuillez croire, professeur, à l'assurance de mon respect et ma grande reconnaissance.

Mr le Professeur Hicham BELLAOUI

Professeur à la Faculté de Sciences, Université Mohammed V de Rabat.

Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance pour l'honneur que vous me faites en acceptant d'être rapporteur de cette thèse. Votre jugement sera d'une grande valeur dans l'appréciation de ce travail. Veuillez croire, professeur, à l'assurance de mon respect et ma grande reconnaissance.

Mme le Professeur Mouna ABABOU

Professeur à la Faculté de Sciences, Université Mohammed V de Rabat

Je vous en remercie d'avoir accepté de rapporter cette thèse. La grande estime et admiration que je lui porte m'ont naturellement conduit à solliciter son évaluation toute ma gratitude pour vos encouragements, vos conseils, votre efficacité et votre compétence. Veuillez trouver, dans ce travail, l'expression de mon respect et de mon admiration.

Mme le Professeur Fatima BOUBRIK

Professeur à la Faculté des Sciences. Université Ibn Zohr-Agadir

Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance pour l'honneur que vous me faites en acceptant d'être rapporteuse de cette thèse. Votre jugement sera d'une grande valeur dans l'appréciation de ce travail. Veuillez croire, professeur, à l'assurance de mon respect et ma grande reconnaissance.

Je remercie Pr. **Amina BERRAHO** Ophtalmologiste Professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie Université Mohammed V de Rabat avec qui j'ai eu la chance de pouvoir travailler. Sa rigueur, sa capacité d'analyse des problèmes et ses très nombreuses connaissances m'ont permis de progresser et ont répondu à plusieurs de mes préoccupations.

Un très grand merci tout particulier à ma collègue **Dr Saâdia AMASDL** qui m'a énormément aidé, de sa rigueur scientifique et de ses nombreux conseils en matière expérimentale, pour leur humour et nos discussions...

Un grand merci à ma grande collègue **Dr. Wafaa JDIOUI** spécialiste en génétique, d'avoir aidé avec beaucoup d'intérêt et de patience, pour ses conseils avisés et les discussions enrichissantes que nous avons pu avoir. Je vous prie de trouver ici le témoignage de ma reconnaissance et de mon profond respect

Je tiens à exprimer ma reconnaissance et mes sincères remerciements à mon ami **Dr Tarik ALLOUSSI** médecin ophtalmologiste dans le secteur privé qui m'a encouragé et soutenu dans mes moments d'enthousiasme étincelant comme dans les moments de doute inconsolables, Merci Merci Merciii.

Je tiens également à mentionner tout le plaisir que j'ai eu à travailler au sein du Département de Génétique Médicale de l'Institut National d'hygiène, et je remercie ici toute l'équipe pour leurs soutiens et leurs encouragements.

Finalement, je remercie tous ceux qui ont contribué de près ou de loin dans la réalisation de ce travail.

Merci de tout cœur à tous

RESUME

RESUME

Les maladies rares se caractérisent par une grande variété de signes cliniques qui varient non seulement d'une maladie à l'autre mais également d'un patient à un autre atteint de la même maladie. Les maladies rares peuvent apparaître à la naissance ou bien à l'âge adulte. A travers ce travail, nous présentons l'étude génétique de deux syndromes rares : La dystrophie cornéenne atypique chez une grande famille et la cardiopathie congénitale en rapport avec la monosomie 15q chez une patiente isolée.

L'objectif de ce travail est d'établir un diagnostic précis pour ces maladies avec deux approches diagnostiques différentes.

Pour le premier cas, il s'agit d'une forme sporadique de cardiopathie congénitale mais avec une forte suspicion diagnostique. L'approche diagnostique de cytogénétique moléculaire, qui a consisté en une CGH-array, a été réalisée avec succès et nous a permis de reconnaître les quatre gènes incriminés dans cette pathologie : *IGF1R*, *NR2F2*, *MEF2A* et *CHD2* et d'établir de nouvelles corrélations génotype-phénotype pour un intérêt diagnostique et un conseil génétique adéquat.

Pour le deuxième cas, il s'agit d'une dystrophie cornéenne atypique avec une hétérogénéité génétique de faible suspicion diagnostique. Un exome entier a été réalisé pour identifier la mutation causale dans cette famille consanguine et enrichir le spectre mutationnel du gène *TGFBI* chez des patients marocains atteints de cette pathologie, avec mise en évidence d'une nouvelle mutation hétérozygote (**c.1772C>A; p.Ser591Tyr**).

Ces résultats montrent que l'analyse chromosomique par CGH-array, au-delà de son intérêt diagnostique, permet d'établir de nouvelles corrélations génotype-phénotype et d'identifier de nouvelles régions potentiellement impliquées dans cette pathologie.

Nous avons montré également par cette étude la caractérisation des mutations causales qui nous a permis d'adapter la prise en charge médicale des patients, de formuler un conseil génétique adéquat et d'offrir un diagnostic présymptomatique et de statut d'hétérozygote aux apparentés à risque qui le souhaitent. Parallèlement on a étudié l'implication de ces gènes en question dans la prédisposition génétique au cancer.

Mots clés :

Maladies rares, cardiopathie congénitale, dystrophie cornéenne, Array-CGH, Exome, gènes, prédispositions génétiques, cancers.

ABSTRACT

Rare diseases are characterized by a wide variety of clinical signs that vary not only from one disease to another but also from one patient to another with the same disease. Rare diseases can appear at birth or in adulthood. Through this work, we present the genetic study of two rare syndromes: Atypical corneal dystrophy in a large family and congenital heart disease related to monosomy 15q in an isolated patient.

The aim of this work is to establish an accurate diagnosis for these diseases with two different diagnostic approaches.

The first case is a sporadic form of congenital heart disease but with a strong diagnostic suspicion. The diagnostic approach of molecular cytogenetics, which consisted of a CGH-array, was successfully performed and allowed us to recognize the four genes incriminated in this pathology: IGF1R, NR2F2, MEF2A and CHD2 and to establish new genotype-phenotype correlations for diagnostic interest and adequate genetic counselling.

The second case is an atypical corneal dystrophy with genetic heterogeneity and low diagnostic suspicion. A whole exome Sequencing was performed to identify the causative mutation in this consanguineous family and to enrich the mutational spectrum of the TGFBI gene in Moroccan patients with this condition, with the identification of a new heterozygous mutation (c.1772C>A; p.Ser591Tyr). These results show that chromosomal analysis by CGH-array, beyond its diagnostic interest, allows to establish new genotype-phenotype correlations and to identify new regions potentially involved in this pathology.

We have also demonstrated through this study the characterization of causal mutations which has allowed us to adapt the medical management of patients, to formulate adequate genetic counselling and to offer presymptomatic diagnosis and heterozygous status to relatives at risk who so wish. In parallel, the involvement of these genes in genetic predisposition to cancer was investigated.

Keywords:

Rare diseases, congenital heart disease, corneal dystrophy, Array-CGH, Exome, genes, genetic predispositions, cancers.

ملخص

تتميز الأمراض النادرة بمجموعة متنوعة من العلامات السريرية التي تختلف ليس فقط من مرض إلى آخر ولكن أيضًا من مريض لآخر مصاب بالمرض نفسه. يمكن أن تظهر الأمراض النادرة عند الولادة أو في سن الرشد. من خلال هذا العمل، نقدم الدراسة الجينية لإثنتين من المتلازمات النادرة للتوصل إلى تشخيص دقيق: ضمور القرنية غير النمطي لدى عائلة كبيرة لمرض وحالة القلب الخلق لدى مريض منعزل المرتبط بأحادي الشكل 15q

الهدف من هذا العمل هو إجراء التشخيص الجزيئي للمتلازمات الجينية بالأمراض المرتبطة النادرة جدًا. تم اختيار متلازمتين لهذا العمل مع طريقتين مختلفتين للتشخيص.

بالنسبة للحالة الأولى، فهي حالة معزولة لمرض من أمراض القلب الخلقية ولكن مع اشتباه تشخيصي قوي. تم تنفيذ النهج التشخيصي لعلم الوراثة الخلوية الجزيئية، والذي في يتمثل تقنية Array-CGH، بنجاح ومكننا من التعرف على الجينات الأربعة المسؤولة عن هذا المرض: *IGF1R* و *NR2F2* و *MEF2A* و *CHD2* وإنشاء ارتباطات جديدة والنمط الوراثي بين النمط الظاهري مع منح نصيحة وراثية ملائمة. بالنسبة للحالة الثانية، فهي عبارة عن ضمور القرنية غير النمطي مع عدم تجانس وراثي مع اشتباه تشخيصي منخفض. تم إجراء إكسوم كامل لتحديد الطفرة المسببة للمرض لهذه العائلة الأقارب و إثراء الطيف الطفري لجين *TGFBI* لدى المرضى المغاربة المصابين بهذا المرض، مع تحديد طفرة متغايرة الزيكوت جديدة.

(c.1772C>A; p.Ser591Tyr)

تُظهر هذه النتائج أن تحليل الكروموزومات بواسطة تقنية Array-CGH، بالإضافة إلى اهتماماتها التشخيصية، يجعل من الممكن إنشاء ارتباطات جديدة بين النمط الجيني والنمط الظاهري وتحديد مناطق جديدة يحتمل أن تشارك في هذا المرض.

من خلال هذا العمل، أظهرنا أيضًا تمييز الطفرات السببية التي مكنتنا من تكييف الرعاية العلاجية لصياغة نصيحة وراثية مناسبة وتقديم تشخيص سابق لظهور الأعراض وحالة متغايرة الزيكوت للأقارب المعرضين للمرض، في نفس الوقت، تم استنتاج بعض الجينات المسببة للأمراض النادرة المهيأة للإصابة بالسرطان.

الكلمات الرئيسية:

الأمراض النادرة، أمراض القلب الخلقية، ضمور القرنية، Array-CGH، الإكسوم، الجينات، الاستعدادات الوراثية، السرطانات.

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES ABREVIATIONS

ACPA	Analyse Chromosomique sur Puce ADN
AD	Autosomique Dominant
AP	Atrésie Pulmonaire
AR	Autosomique Recessif
CAV	Canal Atrio-Ventriculaire
CC	Cardiopathie Congénitale
CD	Corneal Dystrophy
CDL1	Corneal Dytrophy Laitce de Type 1
CDRB	Corneal dystrophy Reis-Bückle
CGLCD	Combined Granular-Lattice Corneal Dystrophy;
CHED	Dystrophies Endothéliales Congénitales Héréditaires
CHD	Cardiopathies congénitales
CGH	Comparative Genomic Hybridization
CIA	Communication Interauriculaire
CIV	Communication Interventriculaire
CoA	Coarctation de l'Aorte
DI	Déficiencie Intellectuelle
DS	Syndrome de Down
d-TGV	d-Transposition des Gros Vaisseaux
EIM	Epaisseur de l'Intima-Média

ERED	Dystrophie Erosive RécurrenE Epithéliale
FVGCD	France Variant Corneal Dystrophy
GCD	Granular Corneal Dystrophy
GCD1	Dystrophie Cornéenne Granulaire type 1
GH	Growth Hormone
IC3D	Committee for Classification of Corneal Dystrophies
IGF1	Insulin-like Growth Factor 1
LASIK	kératomileusies in Situ Assistée par Laser
LCD	Lattice Corneal Dystrophy
MC	Malformations Congénitales
MECD	Dystrophie Juvénile de Meesmann
NGS	Next Génération Sequencing
NM	Not Mentioned
OCT	Tomographie en Cohérence Optique
OD	Œil Droit
OG	Œil Gauche
pb	Paires de Bases
TSA	Défauts septaux auriculaires
VSD	Défauts septaux auriculo-ventriculaires
PTK	Photokératectomie Thérapeutique
RBCD	Reis Bukler Corneal Dystrophy

RCIU	Retard de Croissance Intra-Utérin
RGD	Arg-Gly-Asp
RHG	Reverse Heart Giemsa
Rpm	Rotation Par Minute
RPv	Rétrécissement Pulmonaire Valvulaire
SHD	Séquençage Haut Débit
T4	Thyroxine Libre
TBCD	Thiel-Behnke Corneal Dystrophy
TGV	Transposition des Gros Vaisseaux
TSH	Thyréostimuline
VDDI	Ventricule Droit à Double Issue
WES	Whole Exome Sequencing
WGS	Whole Genome Sequencing
XR	Recéssif Liée à l’X

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	Erreur ! Signet non défini.
RESUME.....	v
LISTE DES ABREVIATIONS	xvii
TABLE DES MATIERES	xxi
LISTE DES ILLUSTRATIONS	xxv
A. INTRODUCTION.....	1
B.REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	4
CHAPITRE 1 : CARDIOPATHIE CONGENITALE	4
I. DESCRIPTION CLINIQUE DE LA CARDIOPATHIE CONGENITALE	5
1. Définition	5
2. Epidémiologie	6
3. Etiologie	6
4. Classification des cardiopathies congénitales	7
5. Diagnostic des cardiopathies congénitales.....	7
6. Catégories de cardiopathies congénitales	7
6.1. Cardiopathies congénitales non cyanogènes.....	7
6.2. Cardiopathies congénitales cyanogènes.....	8
7. Prise en charge	11
II. ASPECTS GENETIQUES	11
1. Généralités	11
2. Anomalies cytogénétiques de nombre associées aux cardiopathies congénitales	11
2.1. Trisomie 21	11
2.2. Syndrome de Turner	12
2.3. Syndrome de Patau (trisomie 13).....	12
2.4. Syndrome d'Edwards (trisomie 18)	12
3. Anomalies de structure sans anomalie de nombre	13
4. Syndromes microdélétionnels	13
4.1. Microdélétion du chromosome 22q11 (syndrome de Di George ou syndrome vélo-cardio-facial).....	13
4.2. Syndrome de Williams et Beuren	14

III. INTERET DE LA REGION CHROMOSOMIQUE 15q ET PREDISPOSITION GENETIQUE AU CANCER.....	16
1. Prédisposition génétique au cancer	16
2. Maladies génétiques rares et leur association avec le développement du cancer	18
3. Implication des gènes de la cardiopathie congénitale de la région 15q dans la prédisposition au cancer	19
CHAPITRE 2 : LA DYSTROPHIE CORNEENNE.....	20
I. ASPECTS CLINIQUES	20
1. Généralités	20
2. Etiologie et facteurs de risque.....	21
3. Classification.....	21
3.1. Les principales dystrophies épithéliales et sous-épithéliales	24
3.1.1. La dystrophie cornéenne de Meesmann-1 (MECD1)	24
3.1.2. La dystrophie de la membrane basale épithéliale (EBMD)	24
3.2. Les principales dystrophies de la couche de Bowman.....	25
3.2.1. Dystrophie de Reis-Bückler (RBCD).....	25
3.2.2. Dystrophie de Thiel-behnke (TBCD).....	25
3.3 Les dystrophies stromales	26
3.3.1. La dystrophie grillagée de type 1	26
3.3.2. La dystrophie granulaire de type 2 granulaire-grillagée	26
3.4. Les dystrophies endothéliales	26
3.4.1. La dystrophie de FUCHS	26
3.4.2. La dystrophie postérieure polymorphe de Schlichting.....	27
4. Méthodes diagnostiques.....	27
5. Evolution et pronostic	28
6. La prise en charge thérapeutique	28
II. GENETIQUE DE LA DYSTROPHIE CORNEENNE TYPE THIEL-BEHNKE 29	29
1. Le gène <i>TGFBI</i>	29
2. Implication du gène <i>TGFBI</i> dans le développement du cancer	33
III. STRATEGIE DU DIAGNOSTIC DES SYNDROMES RARES PAR NGS.....	34
C. OBJECTIFS DU TRAVAIL	37
D. PATIENTS ET METHODES	38
1. Patients	39

1.1. Patiente de la cardiopathie congénitale	40
1.2. Famille marocaine atteinte d'une dystrophie cornéenne.....	41
2. Méthodes de cytogénétique classique (Caryotype métaphasique) appliquées au cas de la cardiopathie congénitale	46
2.1. Principe	46
2.2. Culture cellulaire.....	47
2.3. Blocage des cellules en métaphase	47
2.4. Choc hypotonique	47
2.5. Fixation	47
2.6. Préparation et étalement sur lames	48
2.6.1. Préparation des lames.....	48
2.6.2. Etalement sur lames	48
2.7. Marquage chromosomique en bande R: RHG (Reverse banding using Heat and Giemsa).....	48
2.8. Coloration au Giemsa 5%	48
2.9. Lecture au Cytoscan.....	49
3. Méthodes de cytogénétique moléculaire ou analyse sur puces à ADN (ACPA) de la cardiopathie congénitale	49
3.1. Principe	49
3.2. Extractions d'ADN	50
3.3. Digestion et purification de l'ADN génomique.....	50
3.4. Purification de l'ADN génomique digéré et marqué	51
3.5. Puce utilisée	51
3.6. Technique d'hybridation.....	52
3.7. Analyse des résultats.....	52
3.8. Analyse bio-informatique	53
4. Diagnostic moléculaire par Séquençage Haut Débit de la dystrophie cornéenne.....	54
4.1. Prélèvements sanguins	54
4.2. Techniques d'extraction de l'ADN à partir d'un prélèvement sanguin	54
4.3. Dosage et vérification de la qualité de l'échantillon d'ADN	56
5. Séquençage à haut débit de l'Exome entier (Whole Exome Sequencing-WES)	56
6. Analyse bio-informatique des données de l'exome :	57
7. Interprétations des variants	59

8.	Outils bio-informatiques utilisés.....	63
9.	Séquençage par la méthode Sanger.....	64
9.1.	Détermination de la séquence à amplifier.....	64
9.2.	Conception des amorces	64
9.3.	PCR et contrôle	64
9.4.	Purification du produit de PCR.....	66
9.5.	Réaction de Séquence	66
9.6.	Purification de la réaction de séquence par Sephadex G50	66
E.	RESULTATS.....	69
1.	Résultat génétique de la patiente atteinte d'une Cardiopathie Congénitale	70
2.	Résultats d'une famille marocaine atteinte de dystrophie cornéenne atypique	72
F.	DISCUSSIONS.....	79
1.	Discussion du cas de la Cardiopathie Congénitale	79
2.	Etude génétique d'un cas familial atteint de la dystrophie cornéenne.....	85
3.	Place des gènes identifiés dans la prédisposition génétique au cancer	94
G.	CONCLUSION	99
1.	CONCLUSION.....	100
2.	PERSPECTIVES ET RECOMMANDATIONS	102
2.1.	PERSPECTIVES	102
2.2.	RECOMMANDATIONS	103
	REFERENCES.....	104
	WEBOGRAPHIE.....	125
	ANNEXES	126

LISTE DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma de la circulation du sang au niveau du cœur	5
Figure 2 : Évolution clonale de la tumeur (Jacob, Tremblay et al. 2017)	18
Figure 3 : A. Anatomie de l'œil humain, (B, C) présentation de la cornée (Dunham, Fabian et al. 1991).....	20
Figure 4 : Coupe histologique d'une cornée normale	21
Figure 5 : Emplacement moléculaire du gène <i>TGFBI</i> (Dietrich, Pandis et al. 1995)	30
Figure 6 : Illustration schématique de la structure génomique du gène <i>TGFBI</i> et localisation des mutations recensées (Jean-Louis DUFIER et Josseline K APLAN 2005).....	32
Figure 7 : Les différentes approches du séquençage à haut débit	35
Figure 8 : Arbre généalogique de la famille avec un cas sporadique présentant une malformation cardiaque congénitale, un retard de croissance et une déficience intellectuelle	41
Figure 9 : Arbre généalogique d'une famille de cinq générations avec la dystrophie cornéenne de Thiel-Behnker.....	42
Figure 10 : A. Oeil droit sans dilatations. B. L'aspect de la partie antérieure auparavant mal individualisée avec des bords flous de l'œil droit sous forme de microvacuoles. C. Oeil gauche sans dilatation. D. L'apparition des opacités auparavant mal individualisées avec des bords flous de l'œil gauche sous forme de microvacuoles très visibles après dilatation	43
Figure 11 : A, B. Deux coupes OCT montrant la forme de microvacuoles sous forme de plaques minces (flèches bleues) et de dépôts en dents de scie sur la membrane de Bowman (flèches blanches). C, D. Le même aspect est observé dans l'œil controlatéral.....	43
Figure 12 : Aspect peu distinctif des opacités antérieures, avec des bords flous de l'œil droit (A) et gauche (B) clairement visibles sous forme de microvacuoles	44
Figure 13 : A, B. Deux coupes d'OCT cornéenne de l'OD. Irrégularité des couches antérieures avec des dépôts hyperréfléchissants plus épais d'une apparente opacité centrale (flèches). C, D. Deux coupes d'OCT, irrégularité des couches épithéliales antérieures et stromales antérieures avec des dépôts hyperréfléchissants plus épais (flèches)	44
Figure 14 : A. L'œil droit à un épithélium central et paracentrique blanc, jaunâtre, gélatineux et une opacité cornéenne. B Épaississement central hétérogène et marques dans l'œil gauche et une opacité centrale évidente de bords flous.....	45
Figure 15 : A, B. Deux coupes d'OCT cornéenne d'OD. Dépôts (flèches blanches), un remodelage important de la cornée. Désorganisation de la couche épithéliale, absence de	

membrane de Bowman et de bulles dans la cornée intrastromale antérieure (flèches blanches). C, D. Deux coupes d'OCT cornéenne de l'œil gauche, irrégularité de la surface cornéenne et désorganisation de la couche épithéliale, absence de membrane de Bowman en différents sites et présence d'une épaisse couche de dépôt intrastromal au centre (flèches)....	46
Figure 16 : Principe de la méthodologie par puce à ADN	50
Figure 17 : Mélange réactionnel et différents cycles de la PCR	65
Figure 18 : Principe de la réaction de séquence	67
Figure 19 : Principe de séquençage automatisé d'ADN par la méthode de Sanger	68
Figure 20 : (a,c) Caryotype du propositus en bandes R à haute résolution (Flèche rouge). (b,c) caryotype partiel (RHG) montrant une délétion du chromosome 15q avec un bras q anormalement court.....	71
Figure 21 : A. Résultat de la CGH-array montrant une perte terminale de 9,15 Mb en 15q26.1-q26.3 impliquant 93 275 228 - 102 429 113 points d'arrêt. B. La base de données du génome UCSC (GRCh37 / hg19) mettant en évidence des gènes impliqués dans le segment de perte	72
Figure 22 : Analyses bioinformatiques du séquençage de l'exome entier chez trois membres de la famille atteinte de dystrophie cornéenne atypique (IV-7, IV-8 et III-2) (Benbouchta, Cherkaoui Jaouad et al. 2021)	73
Figure 23 : A. Électrophérogrammes montrant la mutation c.1772C > A hétérozygote chez les patients (IV-7, IV-8 et III-2) et l'absence de la mutation chez les individus non affectés (IV-1, IV-3). B. Alignement de séquences protéiques orthologues de TGFBI provenant de différentes espèces avec mise en évidence de la conservation de l'acide aminé sérine en position 591 (https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Tools/Blast)	74
Figure 24 : A. Résultat de la protéine TGFBI normale. B. Résultat de la protéine mutée S591Y par Swiss-Model.....	75
Figure 25 : : Structures tridimensionnelles de : A. la protéine sauvage représentée par le résidu serine en position 591 et B. la protéine mutée par la présence du résidu tyrosine qui est dû à la substitution de C en A (c.1772 C>A (p.S591Y)) au niveau de l'exon 13 du gène <i>TGFBI</i> (https://swissmodel.expasy.org/interactive)	77
Figure 26 : Diagramme de la délétion 15q26.1-q26.3 montrant les trente-six gènes absents ainsi que les quatre gènes impliqués dans le phénotype de notre patiente	80

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Distribution des cardiopathies congénitales à révélation néonatale (%).....	10
Tableau 2 : Principales prédispositions génétiques et principaux gènes associés.....	17
Tableau 3 : Résumé des dystrophies cornéennes et de leurs phénotypes, exposés au travers de la transcription de la classification IC3D des dystrophies cornéennes d'après Weiss et al	22
Tableau 4 : Mutations décrites au niveau du gène <i>TGFBI</i> (HGMD 2021)	31
Tableau 5 : Avantages et limites actuelles du séquençage haut débit	36
Tableau 6 : Score de qualité Phred et probabilité d'identification incorrecte	57
Tableau 7 : Types de fichiers de données brutes de séquençage et leurs caractéristiques	60
Tableau 8 : Bases de données publiques utilisées dans l'interprétation des données de NGS .	62
Tableau 9 : Données cliniques et cytogénétiques chez les patients atteints d'une délétion « pure » 15q26	83
Tableau 10 : Variants pathogènes détectés dans le gène <i>TGFBI</i>	87

LISTE DES Annexes

Annexe 1 : Fiche d'exploitation clinique au sein du laboratoire de Génétique Médicale	127
Annexe 2 : Fiches de consentement	128
Annexe 3 : Milieu de culture.....	129
Annexe 4 : Lyse des globules rouges	129
Annexe 5 : Méthode SANGER	129
Annexe 6 : Exosap.....	130
Annexe 7 : Séphadex.....	130

A. INTRODUCTION

Une maladie est dite rare ou orpheline si sa fréquence est inférieure ou égale à 1/2000 (Hampton 2006, Daliri, Haghpars et al. 2009, Boycott, Vanstone et al. 2013, Adams, Deutsche et al. 2014). Selon la base de données OMIM, Les maladies rares recensées sont au nombre de 8000. Chaque année 200 à 300 nouvelles autres pathologies sont découvertes dont 80% sont en rapport avec des anomalies génétiques (Donnart, Viollet et al. 2013, Maiella, Rath et al. 2013). Les patients atteints de maladies rares, sont estimés à 5% de la population mondiale, environ 30 millions en Europe et 1,5 millions au Maroc (Aymé and Schmidtke 2007, Moussayer 2017). Jusqu'à l'heure actuelle, l'étiologie moléculaire de plus de 5000 troubles rares monogéniques ont été identifiés. (www.omim.org).(A and Tajvidi 2019)[9]

Les maladies rares se caractérisent par une grande variabilité clinique concernant le début qui peut être précoce ou tardif, les différences interindividuelles et entre pathologies. La majorité de ces maladies ne disposent pas de thérapeutiques spécifiques.(Donnart, Viollet et al. 2013). Ce sont des maladies graves, évolutives, chroniques et invalidantes à l'origine d'un handicap, errance diagnostique entraînant le plus souvent un retard de prise en charge suite à de multiples consultations médicales spécialisées, et des bilans coûteux (biologiques, radiologiques, histologiques, etc.), qui parfois n'aboutissent pas à un diagnostic précis retardant ainsi la prise en charge (Simone Baldovino, Domenica Taruscio et al. 2016). Enfin, cette errance diagnostique est à l'origine d'un diagnostic erroné et retarde l'indispensable conseil génétique. Alors qu'une prise en charge précoce aurait un impact bénéfique et retarderait certaines complications (Santillán-Garzón, Diego Álvarez et al. 2015). De même, un conseil génétique précis et potentiellement un diagnostic prénatal ne pourraient être prodigués (Yang, Muzny et al. 2013). Le pronostic des individus atteints est de degré variable selon les pays et les moyens investis. La prise en charge sanitaire et sociale de ces maladies et l'accès limité à un diagnostic est une source importante de souffrance pour les familles et leurs patients.

En revanche, l'identification des causes de ces syndromes génétiques est un point de départ important pour poser le diagnostic de certitude, de proposer une thérapeutique spécifique, parfois d'apporter quelques informations pronostiques. Ce résultat constitue aussi un prérequis permettant de proposer un test génétique prédictif à ses apparentés, de façon à identifier les porteurs de la mutation en cause afin de proposer une surveillance et une prise en charge précoce (Gilissen, Hoischen et al. 2012).

L'identification des gènes en cause de ces maladies rares est un véritable challenge et requiert des approches spéciales telles que l'étude de fonctionnement des protéines. En outre les difficultés dans l'identification des causes génétiques sont dûes à l'hétérogénéité génétique (Simone Baldovino, Domenica Taruscio et al. 2016).

Le diagnostic des maladies rares fait appel à différentes techniques pour permettre au généticien de poser le diagnostic moléculaire et cytogénétique précis :

➤ Le caryotype est l'examen de référence lorsqu'une anomalie chromosomique est suspectée il permet de détecter les anomalies de nombres et les anomalies de structures, équilibrés ou déséquilibrés. Jusqu'à récemment, le caryotype était un élément essentiel du bilan d'un patient présentant une déficience intellectuelle associée ou non à une dysmorphie faciale, à une ou des malformations congénitales.

➤ L'hybridation génomique comparative (en anglais, *Comparative Genomic Hybridization* ou *CGH-array*) est une technique de cytogénétique moléculaire permettant d'analyser les variations du nombre de copies dans l'ADN : CNV « *Copy Number Variant* » en comparant le nombre de molécules d'ADN d'un individu par rapport à un autre.

➤ Le séquençage de l'ADN est la détermination de la succession des nucléotides qui le composent, il s'agit d'une technique de routine pour les laboratoires de génétique moléculaire. La technique de SANGER basée sur le marquage radioactif a été développée en 1975. Quelques années plus tard, le premier appareil de séquençage automatisé fait son apparition, basé sur le principe d'électrophorèse capillaire.

La publication de la séquence du génome humain a été faite en 2001 puis sous une forme complète en 2003 est l'une des plus grandes avancées de la science et plus précisément de médecine. Le projet génome humain a permis d'identifier les gènes impliqués dans différentes maladies héréditaires.

A partir de 2005, de nouvelles technologies de séquençage plus efficaces et moins chères ont fait leur apparition. Ces machines sont capables de réaliser plusieurs millions de réactions de séquence en parallèle (Van Dijk, Auger et al. 2014). Cette méthode est appelée le Séquençage Haut Débit ou Séquençage de nouvelle génération (Bai, Edwards et al. 2005) .

Le Séquençage Haut Débit (SHD) est donc aujourd'hui l'un des outils de diagnostic et de « médecine personnalisée ».

On distingue différentes approches d'utilisation du SHD en diagnostic :

- L'analyse d'un panel de gènes possiblement responsables d'une maladie génétiquement hétérogène.
- L'analyse d'un grand panel de gènes composé d'un ensemble de gènes identifiés comme étant impliqués dans des maladies humaines. Il s'agit du séquençage d'exome clinique.
- L'analyse entière de l'exome (WES : Whole Exome Sequencing), est le séquençage de l'ensemble des gènes codant pour des protéines ($\approx 2\%$ du génome entier).

Dans cette étude menée au sein de Département de Génétique Médicale de l'Institut National d'Hygiène de Rabat, nous exposons l'étude génétique de deux syndromes rares : la dystrophie cornéenne atypique chez une grande famille, la cardiopathie congénitale chez une patiente isolée et nous montrons à travers une revue bibliographique, plusieurs gènes des maladies rares qui sont associés à un risque élevé de développer un cancer.

Le but de cette étude est d'identifier la variante pathogène responsable de la cardiopathie congénitale chez une patiente isolée et la dystrophie cornéenne dans une grande famille marocaine et de décrire le phénotype clinique avec ses différents stades d'évolutions sévères. Parallèlement à ce travail, nous soulignons l'importance des gènes entraînant un risque élevé de développer un cancer. Ces anomalies constitutionnelles sont identifiées sur des gènes que l'on qualifie de gènes de susceptibilité et sont impliquées dans de nombreuses pathologies humaines incluant notamment les maladies génétiques rares et en particulier les cancers.

Dans ce travail, la première partie, traite d'un cas sporadique d'une fille issue d'un mariage consanguin avec malformation cardiaque, retard de croissance et une déficience intellectuelle. Cette patiente a bénéficié d'un caryotype constitutionnel et d'une CGH-array.

En ce qui concerne la deuxième partie, l'étude a été réalisée sur une famille marocaine consanguine atteinte d'une dystrophie cornéenne atypique par la réalisation du séquençage d'exome entier. Sur le plan génétique, cent cinq gènes sont impliqués dans la dystrophie cornéenne (CD : Corneal dystrophy) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc>.

**B.REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE**

CHAPITRE 1 : CARDIOPATHIE CONGÉNITALE

I. DESCRIPTION CLINIQUE DE LA CARDIOPATHIE CONGÉNITALE

1. Définition

Les cardiopathies congénitales sont les malformations les plus fréquentes à la naissance (Bourdial, Jamal-Bey et al. 2012), (Figure. 1) représentant approximativement un tiers des malformations de l'enfant (Khoshnood, Lelong et al. 2012). Elles sont de complexités variables sur le plan anatomopathologique, avec des conséquences physiopathologiques plus au moins sévères. La CIV (communication interventriculaire) représente la malformation cardiovasculaire la plus fréquente chez l'enfant. Les malformations cardiaques congénitales sont beaucoup plus fréquentes que les cardiopathies acquises et sont souvent graves. Les symptômes des maladies cardiaques sont divers. Mais le tableau clinique peut être parfois trompeur et être asymptomatique pendant trois à cinq jours de vie, jusqu'à la fermeture du canal artériel, voire pendant des semaines en cas de shunt partiellement équilibré par des résistances vasculaires pulmonaires physiologiquement élevées à la naissance.

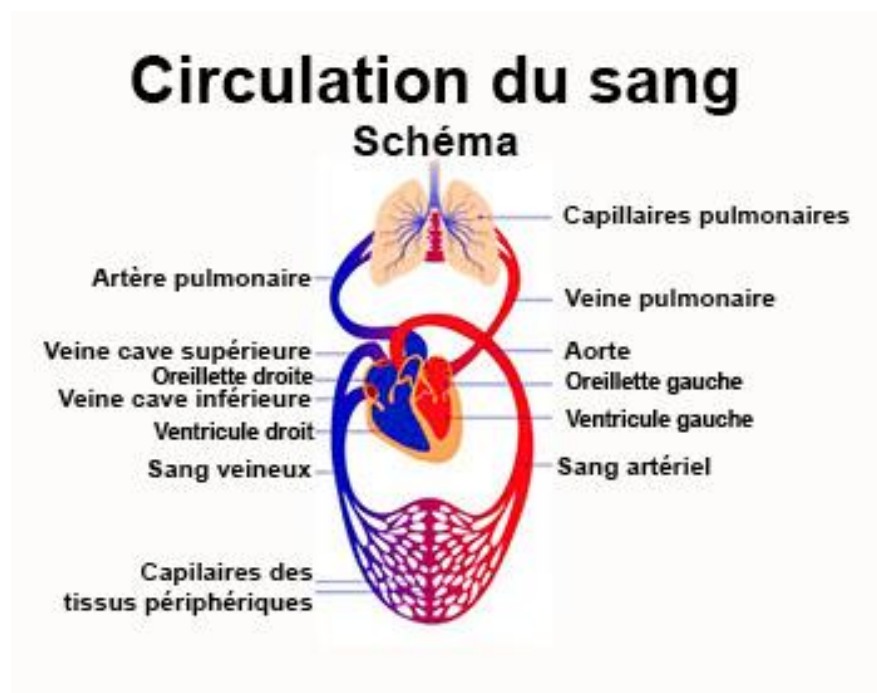


Figure 1 : Schéma de la circulation du sang au niveau du cœur

2. Epidémiologie

La prévalence et la distribution des types de cardiopathies congénitales sont stables dans le temps (Robert-Gnansia, Francannet et al. 2004), elle est estimée entre 4 et 8 pour 1000 naissances vivantes (Heitz 1998). Elle est légèrement supérieure chez le garçon (sex-ratio M/F : 1,08, (Heitz 1998). La distribution par fréquence des cardiopathies varie avec le sexe : Prédominance chez le garçon des lésions obstructives du cœur gauche et des cardiopathies

3. Etiologie

Une malformation congénitale, en particulier cardiaque, n'est pas obligatoirement héréditaire et peut correspondre à un accident isolé et qui ne se reproduira pas. Dans 85% des cas, les cardiopathies congénitales sont d'origine inconnue (Øyen, Diaz et al. 2016). Le diabète chez la mère (dit pré-gestationnel, c'est-à-dire connu avant le début de la grossesse) serait un facteur de risque (Emmanuel and Thorne 2015). De même, l'épilepsie maternelle multiplie par trois le risque de malformation cardiaque (Bossi and Roth 1980) mais le risque est plus grand chez les femmes traitées par les hydantoïnes et la carbamazépine. Des études danoise et suédoise ont montrée l'influence de certains médicaments anti inflammatoires non stéroïdiens, sans spécificité sur la nature des malformations cardiaques (Musante, Kehl et al. 2003, Ericson A 2001) alors que la thalidomide augmente surtout le risque de Fallot, et l'isotrétinoïne celui des cardiopathies conotruncales (Robert-Gnansia, Francannet et al. 2004). L'hyperthermie pendant le premier trimestre de grossesse et l'infection à la rubéole pourra aussi augmenter le risque de cardiopathie congénitale (Viot 2002, Robert-Gnansia, Francannet et al. 2004, Lin and Ardinger 2005). De plus, Ferencz et al (Ferencz 1997) ont découvert une relation : Le tabagisme maternel est associé à un risque accru de survenue de cardiopathie congénitale chez le fœtus notamment la d-transposition des gros vaisseaux (d-TGV) et le rétrécissement pulmonaire valvulaire (RPv), mais uniquement dans certains sous-groupes (âge maternel avancé et antécédents de fausses couches). Il existe peu de preuves de la contribution de certains facteurs environnementaux à la causalité des CHD.

La grande diversité des malformations cardiaques oblige à recourir à une classification :

4. Classification des cardiopathies congénitales

Classification anatomique

Basée sur l'analyse des différents segments cardiaques : Trois segments principaux : Oreillettes, ventricules et gros vaisseaux(Arlettaz and Bauersfeld 2005).

Classification embryologique

Regroupant des malformations anatomiquement différentes sous un même chapeau morphogénétique et moléculaire(Hoffman 1995, Robida, Folger et al. 1997, Marijon, Tivane et al. 2006).

Classification physiopathologique

Quatre principaux groupes seront envisagés : les shunts gauche-droite, les malformations obstructives, les cardiopathies cyanogènes et enfin les cardiopathies qui n'appartiennent pas à ces trois grands groupes, appelées cardiopathies complexes.

Cardiopathies complexes.

Cette analyse systématique est indispensable dans l'étude des cardiopathies complexes. L'identification des différents segments cardiaques de leurs connexions et de leur localisation spatiale est possible par l'échocardiographie.

5. Diagnostic des cardiopathies congénitales

Après avoir évoqué le diagnostic d'une cardiopathie sur les données de l'interrogatoire et l'examen clinique général et cardiovasculaire, l'échocardiographie bidimensionnelle avec doppler pulsé et doppler couleur fait preuve d'une sensibilité et d'une efficacité très élevées et elle représente l'investigation complémentaire de choix dans le diagnostic d'une cardiopathie congénitale

6. Catégories de cardiopathies congénitales

6.1. Cardiopathies congénitales non cyanogènes

Les cardiopathies non cyanogènes sont dus à un shunt gauche-droit avec mélange de sang oxygéné à du sang non oxygéné, n'entraînant pas de cyanose. Plusieurs types de malformations conduisent à des pathologies différentes : Les anomalies de communication entre les compartiments cardiaques, dans ce cas, deux régions cardiaques ne devant normalement pas être reliées communiquent par un trou dans la paroi du cœur. Deux pathologies en découlent,

la communication interauriculaire (lorsque les deux oreillettes communiquent) et la communication interventriculaire (lorsque les deux ventricules communiquent).

- Le canal artériel persistant : Pendant la vie fœtale, il existe un petit canal qui relie l'artère pulmonaire et l'aorte. En temps normal, celui-ci se résorbe peu de temps après la naissance. Lorsqu'il subsiste, il gêne le travail du cœur et peut, à terme, engendrer une hypertension artérielle pulmonaire.
- Les rétrécissements, ou « sténoses » : Il s'agit de rétrécissement des artères, des veines ou des anomalies des valves cardiaques qui impactent le bon passage du sang. On distingue ainsi les sténoses aortiques et les sténoses pulmonaires.

6.2. Cardiopathies congénitales cyanogènes

C'est un vaste groupe de cardiopathies qui ont pour point commun une désaturation en oxygène du sang artériel, avec comme conséquence une coloration anormale des téguments et des muqueuses appelée cyanose.

Il existe plusieurs cardiopathies congénitales cyanogènes. Les plus fréquentes sont :

- ✓ La tétralogie de Fallot
- ✓ La transposition des gros vaisseaux : Dans ce cas, il y a inversion des artères du cœur (pulmonaire et aorte).

La sténose valvulaire pulmonaire, souvent avec dysplasie. La cardiomyopathie hypertrophique peut être présente à la naissance ou se développer pendant l'enfance. D'autres défauts structurels comprennent des défauts septaux auriculaires et ventriculaires, une sténose de l'artère pulmonaire et une tétralogie de Fallot (Allanson and Roberts 2021). Il s'agit d'un groupe d'anomalies congénitales affectant les gros vaisseaux cardiaques : Tétralogie de Fallot (ce syndrome combine plusieurs malformations cardiaques : une communication interventriculaire, une sténose pulmonaire, un déplacement de l'artère pulmonaire et une hypertrophie du ventricule droit.), atrésie pulmonaire (malformation qui affecte la valve pulmonaire avec obstruction empêchant le passage du sang du ventricule droit vers les poumons), atrésie pulmonaire à septum ouvert (communication interventriculaire avec absence de passage entre le ventricule droit et l'artère pulmonaire), tronc artériel commun (présence d'un seul tronc artériel à la base du cœur qui donne naissance à l'aorte et aux artères pulmonaires), ventricule droit à double issue (l'aorte et l'artère pulmonaire naissent tous les deux du ventricule droit, prédominance chez la fille de la communication interauriculaire et la persistance du canal artériel (communication entre l'aorte et l'artère pulmonaire (Heitz

1998). Il apparaît fondamental de les reconnaître en raison de leur risque de récurrence. Le tableau 1 illustre la distribution de certaines cardiopathies congénitales à révélation néonatale.

Sur le plan génétique, la fréquence et le type de cardiopathie varient en fonction de la nature de l'aberration chromosomique. Si l'on considère l'ensemble des enfants atteints d'anomalies chromosomiques, la proportion des malformations cardiaques est de 3%. Elle est de près de 100% dans la trisomie 18, de 40% dans la trisomie 21 (Iselin 1999). Les malformations cardiaques relevant d'affections monogéniques à transmission mendélienne autosomique ou gonosomique représentent environ 3% des cardiopathies(Iselin 1999).

Tableau 1 : Distribution des cardiopathies congénitales à révélation néonatale (%)
(Valeurs moyennes à partir de plusieurs séries publiées).(Heitz 1998)

Type de cardiopathie congénitale	Fréquence (%)
Transposition des gros vaisseaux	13.0
Tétralogie de Fallot	10.0
Hypoplasie du cœur gauche	9.8
CIV pérимembraneuse	9.8
CAV (Canal atrio-ventriculaire)	7.0
CIV musculaire	5,4
Atrésie pulmonaire	4.6
Coarctation de l'aorte	4.3
Sténose aortique	3.9
Sténose pulmonaire	3.2
VDDI (ventricule droit à double issue)	2.9
CIA (communication interauriculaire)	2.4
Divers	16.6

7. Prise en charge

Ces anomalies sont la cause d'une mortalité et morbidité néonatale importante et ceci malgré les diverses possibilités correctrices et palliatives qu'offrent la chirurgie cardiovasculaire. La chirurgie n'a plus le monopole du traitement curatif des cardiopathies néonatales. Même si sa place reste prépondérante, le cathétérisme interventionnel consiste à effectuer un geste thérapeutique palliatif ou curatif.

Au Maroc, la prise en charge de ces anomalies pose dans bien des cas des problèmes diagnostiques et ou thérapeutiques, en raison des problèmes d'accès aux soins, errance diagnostique et manque de sensibilisation de la population du personnel de la santé vis-à-vis des maladies rares.

II. ASPECTS GENETIQUES

1. Généralités

Le mode de transmission des cardiopathies congénitales est différent selon le type de cardiopathie congénitale. Environ 10 à 15% des patients atteints de cardiopathies congénitales sont porteurs d'une anomalie chromosomique, la majorité sont représentés par des anomalies de nombre (Bonnet 2017). Le syndrome de Down et le syndrome vélocardiofacial sont les syndromes génétiques les plus courants chez les patients atteints de cardiopathie congénitale (Blue, Kirk et al. 2012). Plus de 30 gènes ont été liés à des formes non syndromiques de CHD (Blue, Kirk et al. 2012). Leur contribution au CHD demeure inconnue, mais est supposée être relativement petite.

2. Anomalies cytogénétiques de nombre associées aux cardiopathies congénitales

2.1. Trisomie 21

Le syndrome de Down (DS) est l'une des maladies génétiques les plus fréquentes et bien connue qui est associée à un risque accru de morbidité, surtout les cardiopathies congénitales (CHD) (Kim, Lee et al. 2014). La trisomie 21 est responsable d'environ 10% des hospitalisations en cardiologie congénitale. La fréquence de CHD varie d'une population à une autre. Chez les individus caucasiens, le canal atrioventriculaire représente la cardiopathie la plus fréquente, avec des caractéristiques anatomiques particulières. En effet, il s'agit le plus souvent d'une forme complète, avec deux ventricules équilibrés et sans anomalies sur la voie gauche. Il existe une possibilité d'association avec une tétralogie de Fallot alors qu'il n'y a presque jamais d'anomalie du septum interventriculaire musculaire ou d'anomalie du situs

cardiaque ou de la position du cœur au sein le thorax. Ces caractéristiques échocardiographiques anténatales permettent de faire la distinction entre le phénotype des canaux atrioventriculaires de la trisomie 21 et celui des fœtus normaux ou ceux ayant des hétérotaxies. Les autres cardiopathies décrites dans la trisomie 21 sont les communications interventriculaires, interauriculaires, la persistance du canal artériel et la tétralogie de Fallot. Les cardiopathies complexes sont très rares. Les cardiopathies dégénératives sont fréquentes avec l'âge et concernent surtout les valves mitrales et aortiques (Hamerton, Briggs et al. 1961, Castilla, Lugarinho et al. 1998, Frid, Drott et al. 1999). Une surveillance cardiaque est nécessaire chez les adultes trisomiques 21 même s'ils ne présentent pas de cardiopathie congénitale.

2.2. Syndrome de Turner

Les cardiopathies du syndrome de Turner surviennent essentiellement au niveau de la voie gauche. Elles vont de l'hypoplasie du cœur gauche à une simple bicuspidie aortique, en passant par les coarctations de l'aorte. La recherche d'une monosomie X ou de l'une de ses variantes est recommandée devant toutes les formes de cardiopathie obstructive du cœur gauche. La surveillance cardiaque des patientes ayant un syndrome de Turner est nécessaire même en l'absence de cardiopathie congénitale car elles sont à risque de développer une hypertension artérielle et une dilatation de l'aorte ascendante, avec risque de dissection aortique. Des recommandations particulières ont été formulées en cas de grossesse chez les patientes atteintes du syndrome de Turner en présence du risque cardiovasculaire.

2.3. Syndrome de Patau (trisomie 13)

Il est exceptionnellement vu après la période néonatale car un grand nombre de signes extracardiaques conduisent au diagnostic chez le fœtus. Une cardiopathie congénitale est observée dans 80% des cas (Heitz 1998). Il s'agit fréquemment de communications interventriculaires mais aussi des cardiopathies conotruncales, de dysplasies polyvalvulaires ou de malpositions vasculaires notamment le ventricule droit à double issue (Heitz 1998).

2.4. Syndrome d'Edwards (trisomie 18)

Une cardiopathie congénitale est présente dans près de 75% des cas (Peterson, Kochilas et al. 2017). On peut observer des communications interventriculaires, des canaux atrioventriculaires, tétralogies de Fallot, dysplasies polyvalvulaires mais également des anomalies fonctionnelles comme les cardiomyopathies ou la fibrose myocardique (Kurien and Duke 1968).

3. Anomalies de structure sans anomalie de nombre

Les cardiopathies congénitales sont fréquemment associées à certaines anomalies chromosomiques de structure. Par exemple, dans la trisomie 22 partielle (syndrome Cat Eye), on retrouve une cardiopathie dans un tiers des cas. Les malformations cardiaques décrites sont très variées : tétralogie de Fallot, retour veineux pulmonaire anormal, shunts gauche-droit mais aussi cœur univentriculaire. Dans 20% des cas de délétion 5p- ou syndrome du cri du chat, une cardiopathie congénitale est décrite, le plus souvent à type de shunt gauche-droit. Cette même anomalie est retrouvée dans la délétion 4p- ou syndrome de Wolf-Hirschhorn dans 40% des cas. Des cardiopathies très variées comme l'hypoplasie du cœur gauche, les shunts gauche-droit et la malformation d'Ebstein sont détectées chez des patients atteints de la délétion 11p- ou syndrome de Jacobsen. La monosomie 18q- est associée surtout à des malformations type shunt gauche-droit et des tétralogies de Fallot dans 40 % des cas. Pour les cardiomyopathies, elles sont fréquentes dans la délétion 1pter. La délétion 8p23 est responsable classiquement de canal atrioventriculaire avec un aspect particulier : association à la tétralogie de Fallot, à une anomalie de position du cœur et des retours veineux anormaux.

4. Syndromes microdélétionnels

4.1. Microdélétion du chromosome 22q11 (syndrome de Di George ou syndrome vélo-cardio-facial)

Le principal signe d'appel échographique anténatal de la microdélétion 22q11 est la présence d'une cardiopathie conotruncale ou d'une anomalie des arcs aortiques. La recherche d'une microdélétion 22q11 par hybridation in situ en fluorescence peut être proposée dans toutes les cardiopathies à type de : tétralogie de Fallot, atrésie pulmonaire à septum ouvert, agénésie des valves pulmonaires, ventricule droit à double issue, communication interventriculaire avec mal alignement du septum conal, interruption de la crosse aortique et coarctation de l'aorte (van Mil et al, 2020). La fréquence d'association à une microdélétion 22q11 varie d'une cardiopathie conotruncale à une autre et la force de cette association peut être impliquée en cas de diagnostic tardif (Breviere et al, 1999). Ainsi, environ 45 % des interruptions de la crosse aortique et 12 % des communications par mal alignement sont en rapport avec une microdélétion 22q11 (Quarello et al, 2011). Le gène *TBX-1* est le principal gène contenu dans la région 22q11 et responsable du phénotype cardiaque. La décision d'interruption ou de poursuite de la grossesse est le plus souvent discutée en association à cette anomalie cytogénétique. Etant donné que la plupart des cardiopathies de type conotruncale sont traitables

avec un bon pronostic, le principal motif de cette décision d'interruption de grossesse est le risque de retard intellectuel et de troubles psychotiques de survenue tardive. Certaines variantes anatomiques peuvent parfois aggraver le pronostic cardiaque, comme la présence d'anomalies complexes des artères pulmonaires dans les formes sévères de tétralogie de Fallot, plus fréquentes en cas de microdélétion 22q11. Le risque opératoire n'est pas plus élevé, notamment sur le plan infectieux, en rapport avec l'hypoplasie thymique. Les anomalies de la calcémie, surtout en période néonatale, doivent faire l'objet d'une prise en charge adaptée, car elles augmentent le risque d'insuffisance cardiaque.

4.2. Syndrome de Williams et Beuren

Le syndrome de Williams et Beuren est une maladie génétique assez homogène, facile à reconnaître. Il est dû à une microdélétion au niveau de la région 7q11.23 mise en évidence par hybridation in situ en fluorescence. La prise en charge des patients atteints doit se faire dans un cadre multidisciplinaire. Il existe parfois des anomalies dentofaciales et linguales. Le profil cognitif spécifique est surtout caractérisé par un déficit des fonctions visuo-spatiales, contrastant avec un langage normal. Les anomalies cardiovasculaires sont décrites dans 75 % des cas, le phénotype cardiaque du syndrome de Williams et Beuren est en rapport avec la délétion du gène de l'élastine. Les malformations caractéristiques de ce syndrome sont la sténose aortique supra- valvulaire et les sténoses des branches de l'artère pulmonaire. Ces dernières régressent le plus souvent, alors que les anomalies de la voie gauche sont évolutives. Les anomalies valvulaires septales sont plus rares (Lacroix et al, 2009). L'hypertension artérielle est retrouvée dans un tiers des cas et la pression artérielle doit être régulièrement contrôlée chez ces patients. Des sténoses des branches collatérales de l'aorte sont parfois décrites : artères rénales, cérébrales ou coronaires, responsables d'hypertension artérielle rénovasculaire ou d'accidents ischémiques cérébraux ou cardiaques. L'augmentation de l'épaisseur intima-média de la paroi des artères élastiques de moyen calibre est un critère important du diagnostic dont l'objectif est d'établir une corrélation entre l'EIM (l'épaisseur de l'intima-média) carotidienne chez des patients asymptomatiques et les facteurs de risque vasculaire (FDR) chez ces patients (Herinirina, Rajaonarison et al. 2015).

Dans la plupart des cas, la cardiopathie congénitale est liée à des facteurs génétiques et environnementaux. Par exemple, la microdélétion 22q11 prédispose surtout aux malformations conotruncales, en outre, les récurrences familiales ont montré que des membres d'une même famille n'avaient pas souvent la même cardiopathie congénitale, les cardiopathies congénitales étant soit « concordantes » soit « discordantes » (Robert-Gnansia, Francannet et al. 2004).

une famille, une personne présente une CIV, une autre une TGV et un fœtus avait une hétérotaxie avec cardiopathie congénitale complexe (Robert-Gnansia et al, 2004), l'anomalie la plus précoce est le défaut de latéralisation car la formation de la boucle cardiaque est la première étape de la morphogenèse cardiaque. Les personnes présentant la CIV et la TGV sont considérées comme ayant Épidémiologie, étiologie et génétique des cardiopathies congénitales. Une expression atténuée (retardée) du même défaut génétique que le fœtus. Au contraire, une fratrie avec plusieurs cas de CIV isolées correspondra à une anomalie tardive du développement. Deux études récentes modifient et précisent le modèle classiquement admis d'hérédité polygénique avec influence de l'environnement (Robert-Gnansia, Francannet et al. 2004, M. 2010). Le mode de transmission des cardiopathies congénitales est différent selon le type de cardiopathie congénitale cependant dans des populations à taux élevé de mariages consanguins, certaines cardiopathies congénitales sont plus prévalentes (CIV, CIA, CAV, RPv, atrésie pulmonaire [AP]) mais au contraire d'autres ne sont pas plus prévalentes (Fallot, CoA, PCA). D'autre part la mutation du gène (*MTHFR*) qui induit une réduction enzymatique d'environ 50 % avec augmentation de l'homocystéine plasmatique, est associé au risque de cardiopathies congénitales (Källén 1999).

Les cardiopathies congénitales sont considérées comme les « orphelines » de la génétique moléculaire en cardiologie pour plusieurs raisons telles que :D'abord, la mortalité importante des cardiopathies complexes et le manque de précision diagnostique avant l'ère échographie cardiaque n'ont pas permis d'étudier la fréquence de l'hérédité mendélienne de certaines de ces anomalies. Par ailleurs, la fréquence des cardiopathies congénitales en rapport avec des anomalies chromosomiques ou héritées sur un mode mendélien était estimée à 8% (Bonnet, Rauzier et al. 1998). En effet, le mode de transmission de la cardiopathie est suspecté sur les données de l'arbre généalogique. Chez l'homme, la cardiopathie congénitale la plus fréquente est l'hypoplasie du cœur gauche. L'observation de plusieurs récurrences dans des familles consanguines était en faveur d'une hérédité autosomique récessive. Cependant, quelques observations de parents d'enfants atteints ayant une forme légère de maladie obstructive du cœur gauche (coarctation, membrane sous-aortique, malformation mitrale congénitale...) sont en faveur d'un mode de transmission plutôt autosomique dominant (Brenner, Troy et al. 1989, Glick and Roberts 1994).

III. INTERET DE LA REGION CHROMOSOMIQUE 15q ET PREDISPOSITION GENETIQUE AU CANCER

1. Prédisposition génétique au cancer

Les altérations pathogènes de la lignée germinale dans les gènes de susceptibilité au cancer sont les causes les plus fréquentes de cancer héréditaire (Sobol et al, 2004). La tendance croissante de la proportion de patients atteints de cancer subissant des tests génétiques, suivie de tests prédictifs dans les familles de nouveaux patients index, entraîne une augmentation significative des porteurs sains de la mutation., les altérations génétiques responsables de ces cancers sont transmissibles à la descendance et peuvent être recherchées chez des personnes dont les antécédents médicaux, personnels et/ou familiaux, sont évocateurs d'une forme héréditaire de cancer. L'oncogénétique est une discipline médicale dont le but est d'identifier et prendre en charge les familles présentant des variations dans ces gènes de prédisposition (tableau. 2). Les tests génétiques ne sont réalisés qu'après une consultation oncogénétique. Celle-ci a pour but de décider pour quelle famille il y a une indication en fonction du contexte clinique. Cela passe par le recueil de nombreuses informations comme l'âge d'apparition des cancers dans la famille, le sexe des personnes,

Tableau 2 : Principales prédispositions génétiques et principaux gènes associés

(<https://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/L-organisation-de-l-offre-de-soins/Oncogenetique-et-plateformes-de-genetique-moleculaire/Les-predispositions-genetiques>)

(Ei, H et al. 2018)[49]

Prédispositions génétiques	Principaux gènes associés
Syndrome seins-ovaires	<i>BRCA1, BRCA2, PALB2, RAD51</i>
Syndrome de Lynch	<i>MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, EPCAM</i>
Adénomes hypophysaires familiaux	<i>AIP</i>
Ataxie-télangiectasie	<i>ATM, MRE11A</i>
Cancer gastrique diffus familial	<i>CDH1</i>
Carcinome papillaire rénal héréditaire	<i>FH, MET</i>
Hyperparathyroïdisme	<i>CDC73, CASR</i>
Maladie de Cowden	<i>PTEN, PIK3CA, AKT1</i>
Maladie de Fanconi	<i>FANCA</i>
Maladie de Von Hippel-Lindau	<i>VHL</i>
Mélanome malin familial	<i>CDKN2A, MITF, BAP1, POT1, CDK4</i>
Néoplasies endocriniennes	<i>MEN1, RET, CDKN1B</i>
Neurofibromatoses	<i>NF1, NF2, LZTR1, SMARCB1, SPRED1, SMARCE1</i>
Phéochromocytome-paragangliome héréditaire	<i>SDH, TMEM127, MAX, EPAS1</i>
Polypes adénomateux familiaux	<i>APC, MUTYH, POLE, POLD1, NTHL1</i>
Rétinoblastome	<i>RB1</i>
Syndrome de Birt-Hogg-Dubé	<i>FLCN</i>
Syndrome de Bloom	<i>BLM</i>
Syndrome de Carney	<i>PRKAR1A, ARMC5</i>
Syndrome de Gorlin	<i>PTCH1, PTCH2, SUFU</i>
Syndrome de Li-Fraumeni	<i>TP53, CHEK2</i>
Syndrome de Nijmegen	<i>NBN</i>
Syndrome de Peutz-Jeghers	<i>STK11</i>
Syndrome de polyposse juvénile	<i>BMPR1A, SMAD4</i>
Syndrome de Werner	<i>WRN</i>
Xeroderma pigmentosum	<i>XP</i>

Le type de cancer (histologie, statut primitif ou métastatique, bilatéralité, sévérité de l'infiltration). Si une composante héréditaire est suspectée dans la famille, une analyse moléculaire sera proposée au meilleur candidat de la famille en fonction des informations collectées (ex. cancer chez l'individu le plus jeune dans la famille, cancer le plus évocateur du spectre). Lors de cette analyse moléculaire, seuls les gènes impliqués dans le spectre seront étudiés comme par exemple les gènes impliqués dans les cancers du spectre sein-ovaire. Par conséquent, les gènes impliqués dans la prédisposition au cancer du sein ont

un rôle dans un de ces systèmes biologiques (Hanahan and Weinberg 2011). L'instabilité génétique est un des points clés du processus de tumorigénèse. En effet, c'est grâce à cette instabilité génétique que des mutations drivers vont survenir et permettre l'obtention des caractéristiques biologiques propres aux cellules cancéreuses (figure. 2)

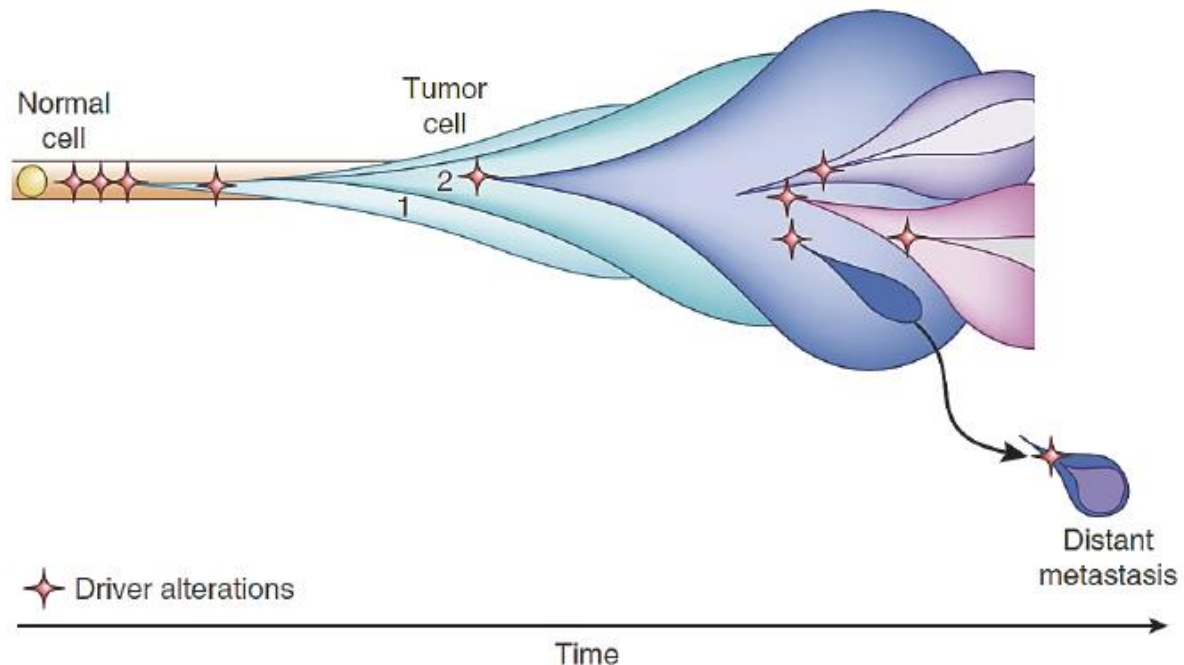


Figure 2 : Évolution clonale de la tumeur (Jacob, Tremblay et al. 2017)

2. Maladies génétiques rares et leur association avec le développement du cancer

Le dispositif d'oncogénétique permet à ces personnes de bénéficier de consultations spécialisées et de tests, en tenant pour objectif, le cas échéant, de leur proposer une prise en charge personnalisée. Dans les laboratoires d'oncogénétique, on recherche des mutations germinales à risque élevé d'avoir un cancer par exemple des mutations majoritaires du gène *MYH* : Cancer du côlon sur polypose atténuée : MAP (MUTYH- associated polyposis) qui se traduit généralement par une polypose adénomateuse colorectale atténuée, avec un nombre de polypes compris entre 15 et 100, associée à un risque très élevé de cancer colorectal. Elle peut être associée à des adénomes duodénaux. L'âge moyen au diagnostic est d'environ 45 ans. Le risque de cancer colorectal ne semble pas significativement augmenté chez les individus porteurs d'une seule mutation (Sieber, Lipton et al. 2003). La recherche des mutations des exons 12 et 13 du gène *RET* : Néoplasies endocriniennes multiples type 2A et la recherche des mutations au niveau des gènes *BRCA1* et *BRCA2* (Mulligan, Eng et al. 1994, Eygelaar, van Rensburg et al. 2022).

3. Implication des gènes de la cardiopathie congénitale de la région 15q dans la prédisposition au cancer

Au niveau de la région 15q, quatre gènes sont connus comme étant impliqués dans des cardiopathies congénitales et potentiellement associés à un risque de développer un cancer au futur.

- Le gène **IGF1R** (Insulin Like Growth Factor 1 Receptor) qui est fortement surexprimé dans la plupart des tissus malins où il agit comme un agent anti-apoptotique (fourni par RefSeq, mai 2014).
- Le gène **NR2F2** (Nuclear Receptor Subfamily 2 Group F Member 2) intervient dans la prédisposition aux tumeurs de Wilms qui est le type le plus courant de cancer du rein chez l'enfant (Palculict 2015).
- Le gène **MEF2A** (Myocyte Enhancer Factor 2A) : est impliqué dans le cancer du pancréas et de la prostate (Pan, Yan et al. 2017).
- Le gène **CHD2** (Chromodomain helicase DNA binding protein 2) est associé à une susceptibilité aux lymphomes et au risque de cancer de la thyroïde différencié (Nagarajan, Onami et al. 2009).

CHAPITRE 2 : LA DYSTROPHIE CORNEENNE

I. ASPECTS CLINIQUES

1. Généralités

La dystrophie cornéenne est définie comme une anomalie intéressant une ou plusieurs couches de la cornée d'origine génétique ou épigénétique héréditaire. Parfois décelable dès la naissance, mais surtout tardivement dans la seconde décennie, d'évolution progressive et plus spécifiquement lorsqu'il existe des antécédents familiaux ou des cas de familles consanguines (Brini, Offret et al. 1974). Les dystrophies de cornée concernent 0,09 % de la population, 60 % surviennent au niveau de la couche endothéliale (Reinhart, Musch et al. 2011).

Les dystrophies cornéennes se caractérisent par une accumulation progressive de dépôts insolubles à différentes profondeurs de la cornée. Elles sont dues à des mutations sur des gènes. Leur survenue est en rapport avec des facteurs environnementaux, inflammatoires ou systémiques, qui peuvent parfois influencer sur leur évolution (Brini, Offret et al. 1974). La cornée est un tissu conjonctif transparent, en dôme, recouvrant la pupille et l'iris. Elle a un rôle de dioptrique convergent ; sa transparence est garantie par son caractère avasculaire et par le contrôle de son degré d'hydratation par son endothélium postérieur (figure 3).

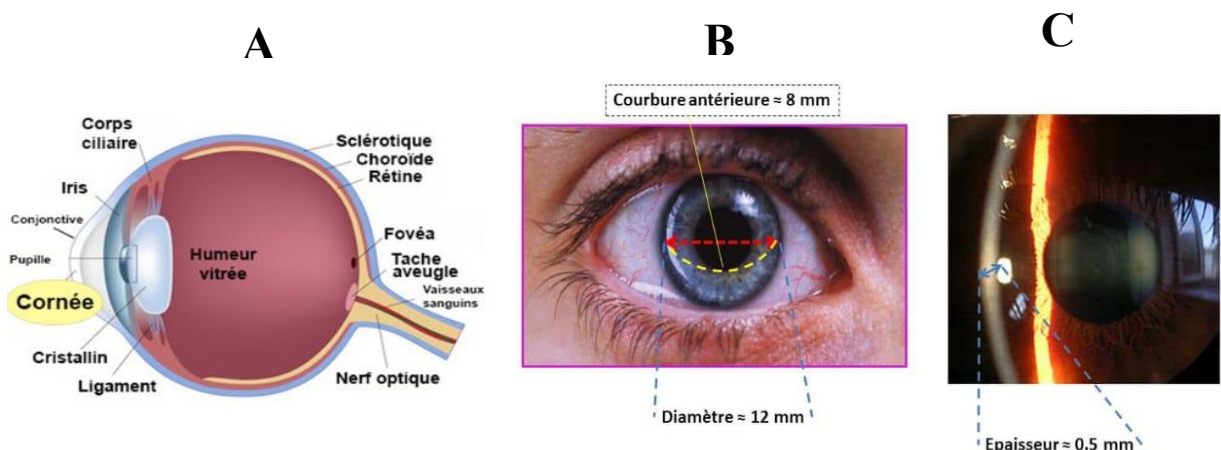


Figure 3 : A. Anatomie de l'œil humain, (B, C) présentation de la cornée (Dunham, Fabian et al. 1991)

Sur le plan histologique, la cornée est composée de 5 couches parallèles entre elles : l'épithélium et le film lacrymal précornéen, la membrane de Bowman, le stroma, la membrane de Descemet et l'endothélium (figure. 4).

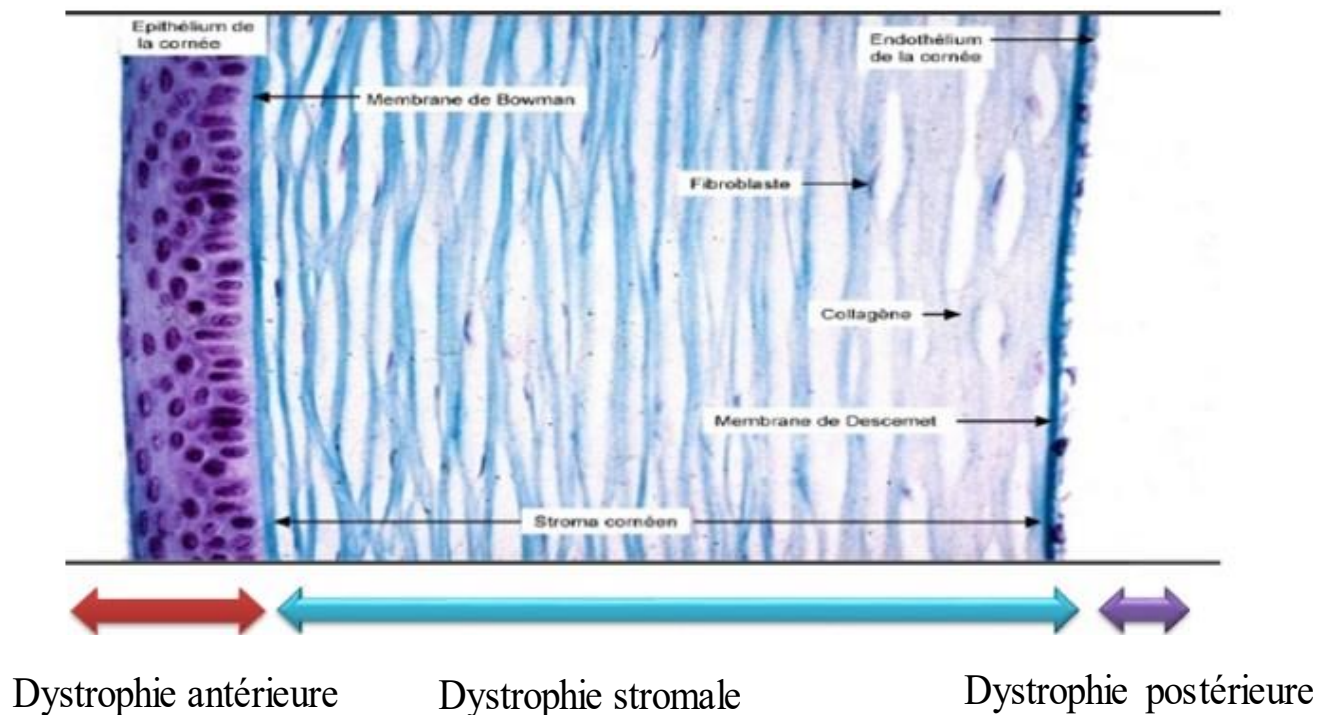


Figure 4 : Coupe histologique d'une cornée normale

2. Etiologie et facteurs de risque

Les dystrophies cornéennes sont des maladies génétiques hétérogènes avec plusieurs modes de transmission (autosomique dominant, autosomique récessif et récessif lié à l'X). Dans la plupart des cas, il s'agit de formes familiales. A ce jour, cent cinq gènes ont été identifiées comme étant responsables de cette maladie (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc>).

Les principaux gènes impliqués sont les suivants : *CHST6*, *COL8A2*, *KRT3*, *KRT12*, *PIP5K3*, *SLC4A11*, *TACSTD2*, *TCF4*, *TGFBI* et *UBIA*. Le gène *TGFBI* est le gène le plus fréquemment muté (Yang, Han et al. 2010).

3. Classification

La classification internationale proposée par l'International Committee for Classification of Corneal Dystrophies (IC3D) est actuellement la plus utilisée (Weiss, Møller et al. 2008, Weiss, Møller et al. 2015). Il existe quatre catégories : (tableau 1)

(1) dystrophies épithéliales et sous-épithéliales

(2) dystrophies épithéliales-stromales liées au *TGFBI*

(3) dystrophies stromales

(4) dystrophies endothéliales.

Elle combine les dimensions phénotypiques et génétiques. Sa révision de 2015 montre combien le classement des dystrophies est discutable (tableau. 3) (Bourges 2017).

Tableau 3 : Résumé des dystrophies cornéennes et de leurs phénotypes, exposés au travers de la transcription de la classification IC3D des dystrophies cornéennes d'après Weiss et al

Légendes : Les dystrophies y sont qualifiées par catégories de certitude de 1 à 4 :

1 : Dystrophie cornéenne bien définie avec gène cartographié, identifié et mutation spécifique connue

2 : Dystrophie cornéenne bien définie, gène cartographié sans être encore identifié

3 : Dystrophie cornéenne bien définie dont l'anomalie génétique n'a pas encore été rapportée

4 : Dystrophie cornéenne documentée d'individualisation, à part entière, sans niveau de preuve scientifique encore suffisant. Ainsi des entités autrefois qualifiées de dystrophies (exemple : Grayson-Wilbrandt, syndrome de Meretoja, CHED2) ne sont pas indiquées dans ce tableau, faute d'argument pour être considérées comme telles

AD : Autosomique Dominant

AR : Autosomique Récessif

XR : Récessif Lié à l'X

Dystrophie	Mode de Transmission	Catégorie	Phénotype
Meesmann	AR	1	Microvacuoles épithéliales diffuses
Microkystique de Cogan			Triadegéographie/microkystes épithéliaux/empreintes digitales
EER atraumatique	AD	1	Ulcère(s) épithélial(aux) récidivants
Gélatineuse	AD	4	Opacité grisatrecentro-cornéenne en relief
Lisch	XR	2	Opacité épithéliale brune, progression centripète en plumeau
Thiel-Behnke	AD	1	Opacités antérieures mal individualisées, à bords flous
Reis-Bücklers	AD	1	Opacités antérieures en réseau (rayon de miel)
Granulaire type 1 (Goenouw 1)	AD	1	Opacités granulaires épargnant le limbe, dans tout le stroma, prédominant en partie antérieure
Granulaire type 2 (Avellino)	AD	1	Opacités de granulaire type 1 associées à des dépôts fusiformes stellaires
Grillagée type 1 et 3 (Lattice)	AD	1	Cordons intrastromaux centraux et paracentraux, fins/rares pour le type 1 et épais/denses pour le type 3
Maculaire granulaire (Goenouw 2)	AR	1	Dépôts granulaires à bords flous (neige sale), dans toutes les couches cornéennes, dans toute l'aire, du centre au limbe

Schnyder	AD		Opacités cristallines centrales ou blanches paralimbiques
Congénitale stromale (Turpin)	AD	2	Opacités nuageuses translucides stromales diffuses
François-Neetens (FLEK/Speckled)	AD	3	Opacités mouchetées grisâtres dans un stroma par ailleurs normal
François	AD	4	Opacités blanchâtres écailleuses du stroma postérieur
Amorphe postérieure	AD	1	Opacification du tiers stromal postérieur, anomalies uvéales
Pré-endothéliale	AD	4	Granulation réfringente polychromatique du stroma postérieur moins dense en périphérie, association possible avec l'ichtyose liée à l'X
Grillagée type 2	AD	1	Dépôts en cordons fins translucides prédominants en périphérie, dans tout le stroma et dans les s. Polyneuropathies et affection systémiques associées à l'amylose
Fuchs (précoce)	AD	1	Aspect martelé de la Descemet prédominant au centre, avec œdème possible. Apparition dès la deuxième décade
Fuchs (tardive)	AD	1 et 2	Apparition à partir de la cinquième décade
Postérieure polymorphe	AD	1 et 2	Plages endothélio-descemetiques irrégulières en vésicule, en cordons ou en nappe, œdème possible en regard
Endothéliale congénitale héréditaire (CHED)	AR	1	Œdème bleuâtre diffus, cornée épaissie, nystagmus et surdité cochléaire tardive possibles
Endothéliale liée à l'X	XR	2	Idem CHED, association possible avec une kératopathie en bandelette, transmission liée à l'X

3.1. Les principales dystrophies épithéliales et sous-épithéliales

Les manifestations cliniques se caractérisent par une dégénérescence cornéenne récidivante, des lésions épithéliales des porteurs de lentilles, de kératites ponctuées superficielles, ou de toxicité médicamenteuse notamment :

3.1.1. La dystrophie cornéenne de Meesmann-1 (MECD1)

Il s'agit d'une maladie héréditaire caractérisée par la présence de multiples kystes à l'intérieur de l'épithélium antérieur dont le nombre et la densité augmentent avec l'âge et détecté au cours d'un examen oculaire de routine. Elle est rarement asymptomatique. Un phénotype plus sévère avec érosions et cicatrices cornéennes peut entraîner une perte significative de l'acuité visuelle nécessitant un traitement par kératoplastie ou greffe de cornée, des chercheurs étudient l'utilisation de l'ARN si spécifique à un allèle contre des mutants à spécificité mononucléotidique comme méthode potentielle de traitement de la MECD (Bardi, Fenger et al. 1995, Greiner, Lindsay et al. 2017).

Sur le plan génétique, le mode de transmission est autosomique dominant avec une pénétrance incomplète. Le gène de la kératine 3 (*KRT3*) du chromosome 12q13.13 et le gène de la kératine 12 (*KRT12*) du chromosome 17q21.2 codent respectivement pour les cytokératines K3 et K12 spécifiques de la cornée. La caractéristique essentielle de la cytokératine 3 et 12 (filaments intermédiaires du cytosquelette des cellules épithéliales) est un marqueur de différenciation cornéenne de l'épithélium de la surface oculaire. Vingt-six mutations dans les gènes *KRT3* et *KRT12* ont été identifiées chez des individus atteints de Meesmann dystrophie cornéenne (OMIM 122100) et ont été localisées dans les motifs des limites de l'hélice des protéines kératiniques respectives (Chen, Lin et al. 2015). La MECD illustre une hétérogénéité génotypique avec des symptômes plus sévères, dûe à une pénétrance de deux variantes (c.3156C> T et c.334G> A) qui a été distinguée de la dystrophie de type ERED (Dystrophie Erosive Récurrente Epithéliale) sur le chromosome 10 (Oliver, van Bysterveldt et al. 2016).

3.1.2. La dystrophie de la membrane basale épithéliale (EBMD)

Cette dystrophie est également connue sous le nom de Cogan Dystrophie purement épithéliale appelée microkystique de Cogan ou map-dot-fingerprint dystrophy (OMIM 121820). Divers aspects sont retrouvés à l'examen, parfois associés à des vésicules intra-épithéliales grisâtres, opacités punctiformes grisâtres, lésions en « empreintes digitales ». Elles sont observées au mieux en rétro-illumination sur pupille dilatée. La symptomatologie fonctionnelle apparaît à

l'âge adulte, majoritairement non héréditaire, dégénérative et rarement dominante, cette dystrophie entraîne une vision trouble, une sensation de corps étranger, érosions récurrentes ou intolérance aux lentilles de contact (Luxenberg, Friedland et al. 1975, Ehlers and Andersen 1987). L'amincissement du film lacrymal vu comme la valence cornéenne dans l'EBMD est cause d'irrégularités épithéliales minuscules, produites par les kystes et l'excès de membrane basale matière, augmentant le taux de contamination lipidique du couche de mucine du film lacrymal (Luxenberg, Friedland et al. 1975, Holly 1985). Le traitement repose sur l'utilisation de solutions hypertoniques, de lubrifiants cornéens et de lentilles thérapeutiques. A un stade avancé, une photokératectomie thérapeutique (PKT) au laser Excimer peut être proposée. Souvent sporadique non héréditaire, le mode de transmission est autosomique dominant dans les formes héréditaires. La génétique moléculaire de cette dystrophie est encore mal connue, mais des mutations ont été retrouvées sur le gène de la kérato-épithéline (Paliwal, Sharma et al. 2010).

3.2. Les principales dystrophies de la couche de Bowman

3.2.1. Dystrophie de Reis-Bückler (RBCD)

On note la présence d'une opacification fine, réticulaire de la couche de Bowman, ensuite des opacités réticulées sous-épithéliales après apparaissent des opacités stromales antérieures, au niveau de la région centrale de la cornée. La symptomatologie est de survenue précoce, lentement progressive, provoquant une baisse d'acuité visuelle vers la quatrième décennie. Sur le plan histologique, on constate des dépôts de tissu collagène épaissi, ainsi que des digitations en dents de scie au niveau de la couche de Bowman. La transmission est autosomique dominante avec pénétrance complète. Dans tous les cas rapportés dans la littérature, la mutation R124L a été identifiée. Des corrélations génotype-phénotype ont été mise en évidence.

3.2.2. Dystrophie de Thiel-behnke (TBCD)

Cette maladie apparait dès l'enfance, altérant l'acuité visuelle progressivement, mais plus tardivement que pour la forme précédente. L'examen biomicroscopique retrouve de multiples opacités de petite taille, sous l'épithélium, avec un aspect en « rayons de miel ». Le traitement est d'abord médical, puis, lorsqu'il est insuffisant ou qu'il existe une baisse d'acuité visuelle, une photokératectomie thérapeutique peut être proposée, voire une kératoplastie lamellaire antérieure profonde. Le délai de récurrence est de 10 à 15 ans (retraitement). Le mode de transmission est autosomique dominant avec présence de filament arciforme et pénétrance complète. Le gène responsable est le gène *TGFBI* (*Transforming Growth Factor, Beta induced*).

3.3 Les dystrophies stromales

Il existe les dystrophies liées au gène *TGFBI* d'aspect grillagé et granulaire et d'autres formes de dystrophies stromales.

3.3.1. La dystrophie grillagée de type 1

La dystrophie granulaire de type I (OMIM 121900), entraîne des signes fonctionnels à un âge très jeune, provoquant des érosions cornéennes récidivantes, et donnant progressivement une baisse d'acuité visuelle, qui devient gênante vers l'âge de 40 ans. La cornée devient de couleur jaunâtre et est marquée par des lignes cristallines, responsable de cet aspect grillagé. En fin d'évolution, on constate une opacité centrale effaçant le quadrillage. Sur le plan histologique, des dépôts amyloïdes stromaux antérieurs caractéristiques sont présents. Des mutations spécifiques ont été retrouvées au niveau du chromosome 5q31. La kératoplastie lamellaire antérieure profonde représente le traitement de choix. Cette dystrophie est de transmission autosomique dominante avec pénétrance complète, elle fait partie du groupe de dystrophies liées au gène de la kérato-épithéline.

3.3.2. La dystrophie granulaire de type 2 granulaire-grillagée

Il existe deux sous-types : la dystrophie granulaire de type 1 classique, dite de Groenouwtype1 et la dystrophie granulaire de type 2 granulaire-grillagée, dite d'Avellino selon l'ancienne nomenclature. L'examen retrouve essentiellement par dépôts granuleux blanchâtres, de petite taille, centraux, en « flocons de neige », avec des intervalles de cornée avec baisse importante d'acuité visuelle, qui commence dès la 3ème décennie. Le mode de transmission est de type autosomique dominant avec expression variable, pénétrance complète et dominance incomplète. Le phénotype Avellino de type granulaire I est en rapport avec la mutation R124H.

3.4. Les dystrophies endothéliales

Elles sont caractérisées par trois lésions : Aspect progressivement irrégulier des cellules endothéliales, sécrétion d'une couche de collagène au niveau de la partie postérieure de la membrane de Descemet et troubles du fonctionnement de l'endothélium entraînant un œdème de cornée global. Le mode de transmission est majoritairement autosomique récessif pour la forme (CHED2: Dystrophie congénitale héréditaire endothéliale). Il existe une forme autosomique dominante moins fréquente CHED1 (Davidson, Liskova et al. 2016).

3.4.1. La dystrophie de FUCHS

Cette forme se caractérise cliniquement par des dépôts centraux derrière la membrane de

Descemet, donnant un aspect en « argent battu » au cours de l'examen en rétro-illumination, avec présence de quelques vésicules en « goutte d'eau », ce qui correspond à un stade de « Cornea Guttata ». Ensuite, on note l'apparition d'un œdème au niveau de la couche stromale avec présence de larges bulles épithéliales douloureuses à la rupture, puis le plus souvent survient une diminution d'acuité visuelle. Les femmes sont plus atteintes que les hommes. Cette forme est génétiquement hétérogène avec un mode de transmission de type autosomique dominant. Des mutations au niveau du gène *COL8A2*, localisé en 1p34.1p32 sont retrouvées dans 10% des cas (Biswas, Munier et al. 2001).

3.4.2. La dystrophie postérieure polymorphe de Schiliching

L'examen ophtalmologique met en évidence de petites vacuoles ou épaissements au niveau de la membrane de Descemet. A un stade tardif, on note l'apparition d'un œdème, avec lésions importantes de la couche endothéliale, augmentation de la tension intra-oculaire dans 15 % des cas et troubles de clivage de la chambre antérieure. L'œdème cornéen se propage très précocement dans toute la cornée, entraînant une baisse d'acuité visuelle associée à des douleurs.

Les patients atteints de la dystrophie cornéenne peuvent bénéficier des progrès de la thérapie cellulaire en raison des spécificités du tissu cornéen avasculaire et immunitairement privilégié. Les cellules transplantées sont mieux tolérées en comparaison avec d'autres tissus et organes vascularisés (Kocaba, Katikireddy et al. 2018).

La transmission est autosomique dominante avec expression et pénétrance variable. Le gène *VSX1* localisé en 20p11.2q11.2 et l'autre gène sus-décrit *COL8A2*, sont impliqués dans moins de 10 % des familles. (D'ophtalmologie, 2005)

4. Méthodes diagnostiques

Toute anomalie de la transparence cornéenne ou opacité d'apparition spontanée devrait faire évoquer le diagnostic d'une dystrophie cornéenne, surtout en cas d'atteinte bilatérale, présence de cas familiaux ou consanguinité malgré la variabilité d'expression clinique.

Le diagnostic clinique tient compte de l'âge de début et l'aspect clinique de la cornée lors de l'examen à la lampe à fente. Une étude histologique du tissu cornéen en microscopie optique ou électronique de transmission permet d'obtenir un diagnostic précis. Pour les formes familiales de dystrophies cornéennes avec identification préalable de la mutation causale un diagnostic moléculaire peut être proposé pour confirmer le diagnostic chez les autres membres

de la famille le souhaitant.

5. Evolution et pronostic

Des études ont démontré que les lésions de la surface de la cornée déclenchent l'apoptose des kératocytes et une réponse de cicatrisation ultérieure dans le stroma. (Wilson 2002).

Le pronostic va d'un effet minimal sur la vision à la cécité cornéenne avec une variabilité phénotypique marquée (Klintworth 2009).

6. La prise en charge thérapeutique

A ce jour, il n'existe aucun moyen efficace pour prévenir la survenue de la dystrophie cornéenne. À l'avenir, la thérapie génique pourrait représenter un outil utile pour modifier les gènes impliqués dans cette maladie. En ce qui concerne le traitement de la dystrophie cornéenne, celui-ci dépend de son type, des symptômes présentés par le patient et la gravité du tableau clinique. Les patients asymptomatiques n'ont pas besoin de traitement. www.coss-ophtalmologie.paris/

Les patients présentant des érosions récurrentes sont traités avec des collyres et des pommades lubrifiantes, une lentille de contact thérapeutique ou avec un laser excimer (PTK :Photokératectomie thérapeutique) en fonction de la gravité de l'érosion et selon la réponse à chaque traitement. Les patients présentant une perte de vision importante due à des dépôts de matériaux ou de substances anormales dans le stroma nécessiteront une greffe de cornée, soit une greffe de pleine épaisseur (kératoplastie pénétrante) ou uniquement des couches les plus antérieures (kératoplastie antérieure lamellaire profonde).

Chez les patients présentant un œdème cornéen en raison d'un dysfonctionnement des cellules endothéliales, aux premiers stades de la maladie, le traitement consistera à prescrire des collyres et pommades hyperosmolaires. Si la diminution de l'acuité visuelle progresse et limite le patient dans ses activités quotidiennes, la greffe de cornée pourrait être une option à envisager, qu'il s'agisse d'une greffe de pleine épaisseur ou d'une greffe des cellules endothéliales uniquement (kératoplastie postérieure). www.coss-ophtalmologie.paris/

En bref, le traitement varie d'une dystrophie à l'autre. Certaines dystrophies sont traitées médicalement ou par l'excision ou l'ablation du tissu cornéen atteint, par kératoplastie lamellaire profonde endothéliale ou kératotomie photothérapeutique. Les dystrophies moins invalidantes ou asymptomatiques ne requièrent pas de traitement www.coss-ophtalmologie.paris/

II. GENETIQUE DE LA DYSTROPHIE CORNEENNE TYPE THIEL-BEHNKE

Les différentes dystrophies cornéennes sont dues à des mutations sur les gènes *CHST6*, *COL8A2*, *KRT3*, *KRT12*, *PIP5K3*, *SLC4A11*, *TACSTD2*, *TCF4*, *TGFBI* et *UBIAD1*. La connaissance des mutations génétiques responsables a conduit à une meilleure compréhension de leur défaut d'origine et à des tests moléculaires pour un diagnostic précis. Les gènes responsables d'autres dystrophies cornéennes ont été localisés sur des loci chromosomiques spécifiques, mais n'ont pas été identifiés à ce jour. Les caractéristiques cliniques et le mode de transmission de chacune des dystrophies cornéennes sont parfaitement établis, le conseil génétique peut être offert aux patients, notamment en vue des traitements et pronostics.(Klintworth 2009).

Nous nous intéresserons spécifiquement au type TBCD, qui est dû à des mutations au niveau du gène *TGFBI*, qui se présente sous la forme d'opacités épithéliales réticulées bilatéralement, avec aspect en nids d'abeilles et une symétrie remarquable, avec accumulation de tâches réticulaires au niveau de la membrane de Bowman. Le mode de transmission est autosomique dominant (Thiel 1967). Cette forme peut être confondue avec le RBCD au cours des deux premières décennies de la vie.

1. Le gène *TGFBI*

✓ Localisation du gène *TGFBI*

Le gène *TGFBI* (OMIM : 601692) est constitué de 17 exons avec une taille de 34,92kb (*Ensembl*-Janvier 2019 : NM_000358.3). Sa localisation cytogénétique se trouve au niveau du chromosome 5q31.1 (Figure.5) et sa position moléculaire est la suivante :136,028,988-136,063,818pb sur le chromosome 5 (*Homo sapiens Annotation Release 201, GRCh38.p13 : NCBI*).

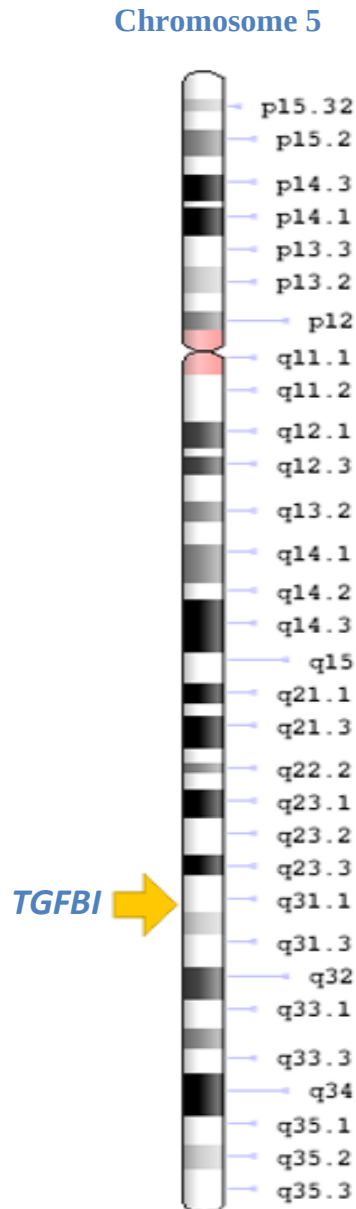


Figure 5 : Emplacement moléculaire du gène *TGFBI* (Dietrich, Pandis et al. 1995)

Protéine TGFBI

•TGFBI (transformant growth factor, beta-induced) est une protéine de matrice extracellulaire de 68 kD avec 4 domaines similaires à la fascicline-1 d'insecte et une séquence arg-gly-asp (RGD) C-terminale. La protéine TGFBI est sécrétée dans l'espace extracellulaire (Ivanov, Ivanova et al. 2008). Cette protéine se trouve dans de nombreux tissus du corps, y compris l'enveloppe externe transparente de l'œil (la cornée). Son rôle :

- ✓ Interaction collagène-cellule au niveau du cartilage
- ✓ Adhésion extracellulaire de la peau
- ✓ Formation de l'os endochondral
- ✓ Médiation de l'adhésion cellulaire et de la migration au niveau de l'épithélium cornéen.

Variants du gène *TGFBI*

Plus de 125 variants du gène *TGFBI* ont été décrits au niveau des bases de données génomiques (**Ensembl et HGMD, Clinvar**). Soixante-dix-huit de ces variants ont été retrouvées chez des patients atteints de dystrophie cornéenne, ce sont des variants polymorphes : mutations non-sens, faux-sens, délétions et insertions (Mohammadi, Ahmadi Shadmehri et al. 2020) .Soixante-dix d'entre elles sont disponibles sur la base de données HGMD (version publique) sur un total de 86 (version professionnelle) (tableau 4).

Tableau 4 : Mutations décrites au niveau du gène *TGFBI* (HGMD 2021)

Type des mutations	Nombre des mutations
Faux sens / Non-sens	62
Sites d'épissage (splicing)	0
Petites délétions	6
Petites insertions	1
Petites insertions-délétions	1
Grandes délétions	0
Grandes insertions ou duplications	0
Réarrangements complexes	0

Mutations du gène *TGFBI*

La majorité des mutations au niveau du gène *TGFBI* sont responsables de la dystrophie cornéenne. Dans la littérature, Munier Frueh et al, en 2002, ont identifié 16 mutations distinctes causant la maladie dans le gène *TGFBI* chez 50 des 61 (83 %) patients atteints de dystrophie cornéenne (Munier, Frueh et al. 2002). La corrélation génotype-phénotype était spécifique au domaine protéique, avec tous les changements se produisant à la limite ou dans le domaine fasc4 de la protéine TGFBI (figure. 6). Chez la population indienne Chakravarthi, Kannabiran et al ont identifié en 2005 des mutations du gène *TGFBI* chez 14 des 18 patients atteints de CDL1 (Corneal Dytrophy Laitce de type 1) et 19 des 19 patients atteints de GCD1 (dystrophie cornéenne granulaire type 1) (Chakravarthi, Kannabiran et al. 2005).

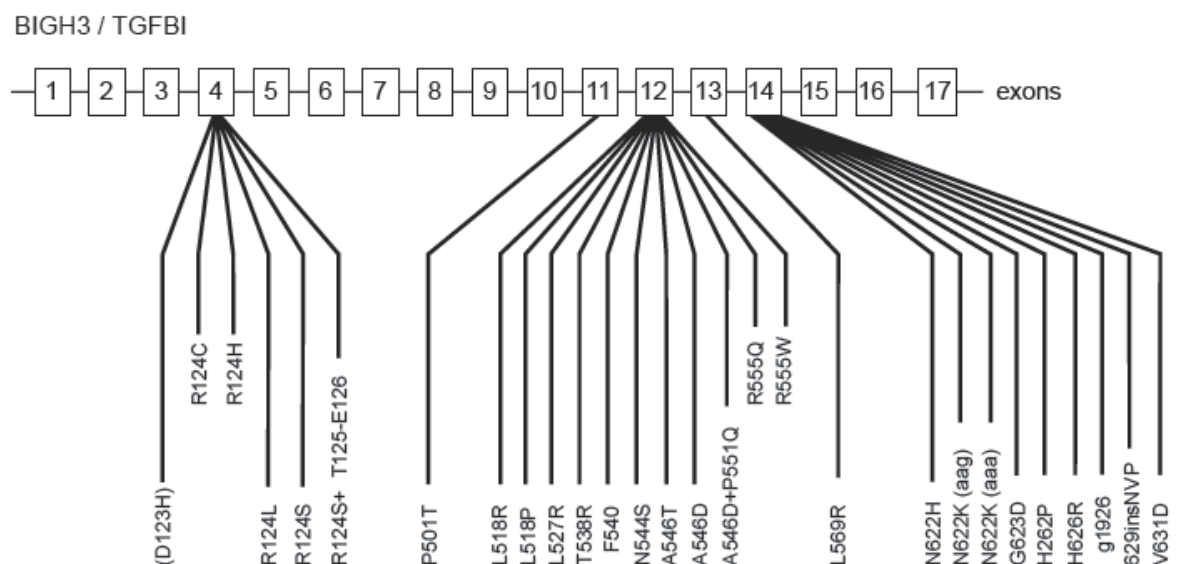


Figure 6 : Illustration schématique de la structure génomique du gène *TGFBI* et localisation des mutations recensées (Jean-Louis DUFIER et Josseline K APLAN 2005).

Il existe deux hotspots mutationnels qui ont été identifiés correspondant aux résidus arginine en position 124 et 555 de la protéine TGFBI, ceux-ci étant les sites de mutation les plus fréquents dans diverses populations. La majorité des mutations identifiées impliquent le quatrième domaine protéique de type fascicline de la protéine TGFBI (Kannabiran and Klintworth 2006). La mutation p.Arg555Trp a été découverte dans plusieurs groupes ethniques distincts et semble être récurrente (Xiang, Yuan et al. 2019). La plupart des mutations du gène *TGFBI* se concentrent au niveau des exons 12 et 14 (figure. 6).

Il existe une grande variabilité phénotypique associée à la mutation Arg124Cys

Y. BENBOUCHTA **FSR**

(Kannabiran and Klintworth 2006).

Les études portant sur des patients porteurs des mutations Arg124Leu et Arg555Gln ont montré de bonnes corrélations de ces deux mutations avec leurs phénotypes clinico-pathologiques respectifs spécifiques qui sont distincts les uns des autres (Dighiero, Drunat et al. 2000, Dighiero, Valleix et al. 2000).

Une forme clinique particulièrement sévère de la maladie a été corrélée avec la mutation Arg124Leu tandis que les autres mutations Arg555Trp et Arg124Cys ont été associées à un phénotype moins sévère (Kannabiran and Klintworth 2006).

Les mutations du gène *TGFBI* sont impliquées dans d'autres types de dystrophie cornéenne, notamment la dystrophie cornéenne de Groenouw, la dystrophie cornéenne d'Avellino, la dystrophie cornéenne en réseau de type IIIA, la dystrophie cornéenne de Reis-Bucklers, la dystrophie cornéenne de Thiel-Behnker et la dystrophie cornéenne de la membrane basale épithéliale. Pour résumer, des mutations différentes du gène *TGFBI* sont à l'origine de plusieurs formes cliniques différentes de dystrophies cornéennes. On ne peut non plus écarter l'hypothèse que, dans certains cas, les mutations en cause bloquent des voies et des processus différents (Jean-Louis DUFIER et Josseline K APLAN 2005)

Les mutations dans les codons 124 et 555 dans le gène *TGFBI* sont associées à chacune des dystrophies *TGFBI* classiques, avec formes cliniques variantes liées à un certain nombre de mutations rares dispersées sur 5 des 17 exons du gène.(Jonsson, Byström et al. 2015).

2. Implication du gène *TGFBI* dans le développement du cancer

Au niveau germinale, le gène *TGFBI* est impliqué dans la dystrophie cornéenne.

Le gène *TGFBI* pourrait jouer un rôle également dans la prédisposition au cancer. En effet, une étude a suggéré que certains polymorphismes de ce gène peuvent être associés à une susceptibilité à développer la tumeur de Wilms (**Ishibashi, de Oliveira et al. 2021**).

Sur le plan somatique, la voie de signalisation TGFBI est dérégulée dans plusieurs pathologies, dont le cancer. Par ailleurs, le gène *TGFBI* joue un rôle central de médiateur dans la reprogrammation métabolique du microenvironnement tumoral et soutient les programmes tolérogènes chez l'hôte.

L'expression du gène *TGFBI* est associée positivement ou négativement au pronostic de divers cancers et représente aussi une cible thérapeutique intéressante en matière d'immunothérapie anticancéreuse étant donnée sa participation à plusieurs réponses immunitaires.

III. STRATEGIE DU DIAGNOSTIC DES SYNDROMES RARES PAR NGS

La description clinique détaillée et précise est un critère important dans le choix du test approprié lors d'une consultation génétique. L'enjeu de l'étape clinique est à la fois médical (faire le bon diagnostic) et économique (ne pas prescrire de multiples analyses coûteuses inutiles)

Le choix de la technique de séquençage haut débit à utiliser se fait au cas par cas. Il peut s'agir d'une approche panel de gènes, séquençage d'exome ou génome entier (Figure. 7) : Le panel de gènes comporte presque la totalité des gènes déjà décrits dans la littérature pour une maladie donnée. La composition du panel peut être déterminée au préalable par la plateforme de NGS qui le commercialise ou conçue à la demande du client par des spécialistes en bioinformatique.

Le séquençage de l'exome clinique est une technique de diagnostic moléculaire qui permet de séquencer en parallèle près de 5000 gènes répertoriés au niveau de la base de données OMIM et impliqués dans des maladies génétiques bien déterminées. Les avantages de cette stratégie par rapport au séquençage d'exome entier et le panel de gènes est qu'elle est située à un niveau intermédiaire entre les deux en termes de couverture, elle permet d'étudier presque tous les gènes rapportés pour une maladie donnée (une couverture plus importante qu'un panel de gènes) avec une quantité moindre de variants détectés et à analyser.

Le séquençage de l'exome entier offre une analyse de la totalité des exons codants des gènes contenus dans le génome (environ 1 à 2% du génome ce qui représente 62 Mb d'ADN), au niveau desquels sont présentes la majorité des mutations.

Enfin, l'analyse du génome entier permet de séquencer l'ensemble de l'ADN d'un individu donné, sans enrichissement (environ 3,2 Gb). Cette technique reste très onéreuse et génère une quantité importante de données. Il n'est actuellement pas utilisé en pratique diagnostique courante. Il reste le dernier recours pour certains patients dont la symptomatologie évoque très probablement une origine génétique et dont le séquençage d'exome entier n'a pas permis d'identifier de mutations causales.

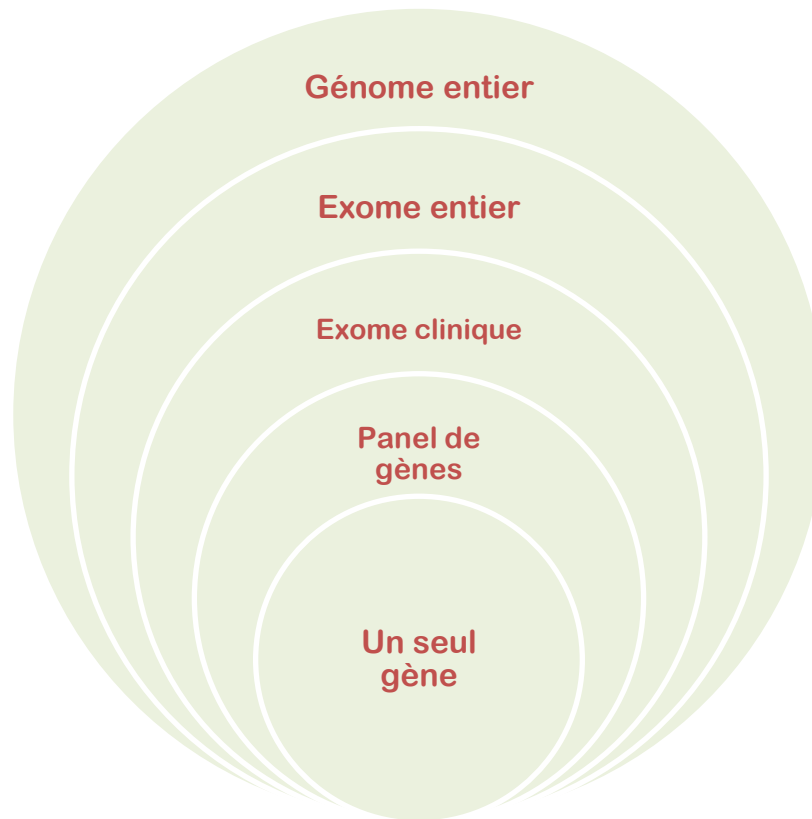


Figure 7 : Les différentes approches du séquençage à haut débit

Néanmoins, lorsque les signes cliniques sont peu spécifiques et que les explorations paracliniques sont non contributives, mais avec une forte suspicion de maladie monogénique, le Whole Exome Sequencing WES est le plus adapté pour obtenir une chance d'avoir un diagnostic. La confirmation par séquençage Sanger de la mutation identifiée par NGS est nécessaire.

Tableau 5 : Avantages et limites actuelles du séquençage haut débit

Avantages	Limites
-Analyse hautement sensible - Analyse de l'exome/génome avec une grande variété d'anomalies génomiques détectées (délétions, translocations, nombre de copies) - Approprié pour différents types de prélèvements (tissu tumoral fixe au formol, ADN libre circulant, cellules tumorales circulantes) - Découverte de nouvelles mutations et une meilleure étude de l'oncogenèse	- Consentement spécifique obligatoire pour l'analyse mutationnelle somatique et germinale - Coût du test et des équipements élevés - Nécessité d'une analyse bioinformatique par une équipe expérimentée - Nécessité d'une forte capacité de stockage des données au niveau de l'institution - Découverte de polymorphismes de signification indéterminée -Problème éthique par rapport à l'usage de certaines données de séquençage

Sur le plan éthique trois points principaux sont évoqués :

- ✓ Education et information du patient.
- ✓ Nécessité d'un consentement éclairé.
- ✓ Caractère anonyme et confidentiel des données de l'analyse.

C. OBJECTIFS DU TRAVAIL

L'objectif de ce travail étant d'analyser le profil mutationnel et la réalisation d'une caractérisation moléculaire de deux maladies génétiques rares chez des patients marocains en utilisant la technologie du séquençage à haut débit et la CGH-array.

Pour le premier cas, il s'agit d'une forme sporadique de cardiopathie congénitale, avec une forte suspicion diagnostique. Une stratégie diagnostique de cytogénétique moléculaire a été appliquée.

Pour la deuxième famille, il s'agit d'une dystrophie cornéenne avec hétérogénéité génétique et faible suspicion diagnostique. Pour ce cas, un séquençage à haut débit a été effectué pour identifier la mutation responsable de la maladie dans cette famille consanguine.

Enfin, un dernier objectif a été réalisé dans le but de discuter la potentielle implication des gènes candidats identifiés lors des explorations moléculaires du diagnostic de la CC et la DC dans la prédisposition aux cancers.

D. PATIENTS ET METHODES

1. Patients

Notre étude s'inscrit dans le cadre du diagnostic précis des maladies rares par CGH-array et séquençage à haut débit au sein du laboratoire de génétique médicale de l'Institut National d'Hygiène de Rabat. Les patients ont été adressés de différents services privés et publics d'ophtalmologie et de cardiologie pédiatrique, avec les principales données cliniques et paracliniques ainsi que le(s) critère(s) d'inclusion de chaque malade, suite à la sensibilisation de plusieurs cliniciens collaborateurs sur la possibilité d'investigations de cardiopathies génétiques et de maladies oculaires génétiques dans le cadre de notre travail de recherche. Ainsi, chaque patient a bénéficié d'une consultation de génétique avec réalisation d'un dossier médical (remplissage d'une fiche d'exploitation) comportant l'identité, l'âge, l'origine ethnique, l'arbre généalogique, les antécédents personnels et familiaux les signes cliniques détaillés, les résultats des investigations paracliniques de cardiologie et d'ophtalmologie (examen à la lampe à fente et OCT) (annexe. 1). Un ensemble d'informations et d'explications simples et claires ont été données à tous les patients sur les principes et les objectifs de cette étude. Un consentement éclairé et écrit de tous les patients ou les tuteurs légaux a été requis (Annexe. 2). Notre étude a porté sur un cas sporadique de cardiopathie congénitale et sur cinq patients issus d'une grande famille consanguine du sud marocain atteints de dystrophie cornéenne.

1.1. Patiente de la cardiopathie congénitale

Le proposant, une fillette de quatre ans, a attiré notre attention en raison d'une dysmorphie faciale particulière associée à une cardiopathie congénitale. Elle était la seule enfant de parents sains et consanguins (Figure. 8). Il n'y avait pas de problèmes de santé dans la famille ni d'antécédents de fausses couches. Elle est née à terme par césarienne, après un antécédent de retard de croissance intra-utérin (RCIU), associé à un oligoamnios, qui correspond à une quantité insuffisante de liquide amniotique par rapport à l'état d'avancement de la grossesse. Le RCIU a été noté dès le quatrième mois de grossesse, sans que des causes maternelles ou placentaires aient été identifiées. Son poids de naissance était de 950 g (< 3^{ème} percentile : unité de mesure sur la courbe de croissance). Les antécédents cliniques étaient évocateurs d'un retard psychomoteur et d'une hypotonie congénitale. A l'examen clinique, son poids était de 8 kg (< 3^{ème} percentile), taille 81 cm (< 3^{ème} percentile) et périmètre crânien 43 cm (< 3^{ème} percentile). Par ailleurs, la patiente présentait des signes dysmorphiques, notamment un front large, un hypertélorisme (augmentation de la distance entre les deux yeux), des fentes palpébrales rétrécies, des oreilles basses, une columelle saillante et un cou court. Elle présentait également des anomalies squelettiques, en particulier une clinodactylie du 5^{ème} doigt, pied droit en varus équin, pied bot gauche, cinquième doigt biphalangé et des orteils largement espacés. De plus, elle avait un retard de dentition et un strabisme divergent. La radiographie pulmonaire montrait une scoliose dorsale et une silhouette cardiaque élargie, avec un ratio cardiothoracique de 70 %. Un échocardiogramme montrait un shunt gauche-droite de bon débit, la présence de deux communications interauriculaires de 1 cm et 7 mm de largeur, dilatant les cavités cardiaques droites et le tronc artériel pulmonaire, avec des pressions droites normales. Son âge osseux était de deux ans pour un âge chronologique de quatre ans. Le dépistage des déficits endocriniens a montré des concentrations sériques normales des hormones T4, TSH, GH et IGF1. L'évaluation oculaire et celle du potentiel acoustique du tronc cérébral ont révélé un strabisme et une surdité neurosensorielle respectivement. D'autres investigations à savoir une calcémie, une IRM cérébrale, une tomodensitométrie du cerveau et une échographie abdominale étaient normales.

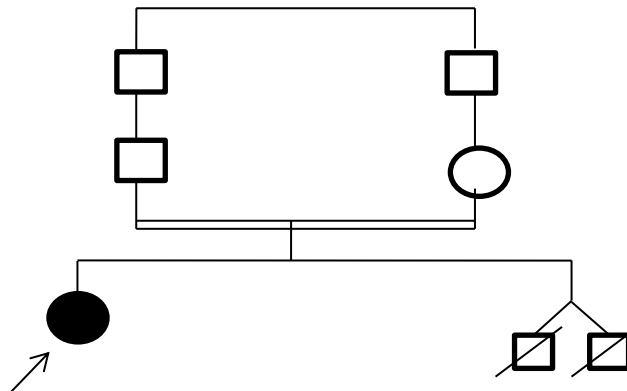


Figure 8 : Arbre généalogique de la famille avec un cas sporadique présentant une malformation cardiaque congénitale, un retard de croissance et une déficience intellectuelle

Légendes

- | | |
|------------------------------|------------------------|
| ○ Sexe Féminin | ↗ Le proposant |
| □ Sexe masculin | □=○ Mariage consanguin |
| ● Sujet malade | □-○ Mariage |
| ☐☐ Jumeaux dizygotes décédés | |

1.2. Famille marocaine atteinte d'une dystrophie cornéenne

Trois patientes d'une même famille consanguine d'origine du sud du marocain ont été adressées à notre laboratoire de Génétique Médicale pour dystrophie cornéenne. Un pedigree sur cinq générations a été construit après un entretien approfondi de la mère affectée (III-2). Les trois membres de la famille disponibles étaient affectés (IV-7, IV-8 et III-2), y compris deux individus phénotypiquement non affectés (IV-1, IV-3). Un mode de transmission autosomique dominant a été déterminé (Figure. 9). Les caractéristiques cliniques des patients sont présentées ci-dessous.

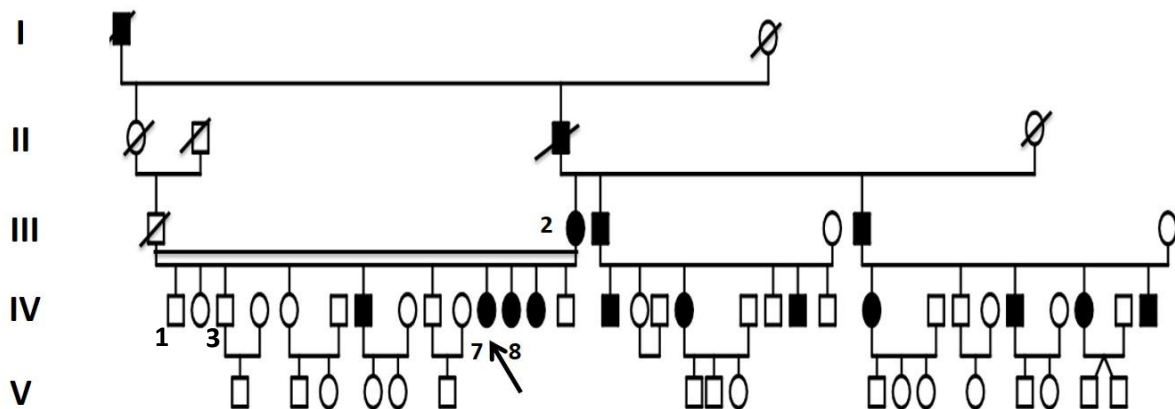


Figure 9 : Arbre généalogique d'une famille de cinq générations avec la dystrophie cornéenne de Thiel-Behnker.

Légendes.

○ Sexe Féminin

□ Sexe masculin

■●Sujet malade

⧻ ⧻ Sujets décédés

↗ Le proposant

□=○ Mariage consanguin

□—○ Mariage

I – II En chiffres romains les générations

2,7 et 8. En chiffres arabes le nombre des enfants

Il s'agit d'un cas N 1 (IV-7) : Mme R.B. 34 ans : présente des épisodes de kératalgies récidivantes depuis l'âge de 18 ans, associés à une baisse de l'acuité visuelle, qui s'installe progressivement. Actuellement, elle est en vision de loin à 4/10 en œil droit (OD) et 6/10 en œil gauche (OG) inaméliorable. L'examen à la lampe à fente montre en ODG (œil droit gauche) : une dystrophie cornéenne épithéliale et stromale antérieure, sous forme de microvacuoles espacées d'un épaissement hétérogène de l'épithélium dû à un épaissement d'une couche fibreuse sous-épithéliale anormale et des opacités antérieures mal individualisées, à bords flous (figure.10 : A, B, C, D). Le reste de l'examen du segment antérieur est normal, notamment un iris normal, un cristallin clair et un tonus oculaire à 17 mmHg en ODG, avec un fond d'œil normal.

La tomographie en cohérence optique (OCT) de la cornée a montré : Une irrégularité des couches épithéliales par une couche confluyente homogène de dépôts hyper-réfléchis, avec une bordure antérieure dentelée, prenant l'aspect en dent de scie, remplaçant la couche Bowman et

atteignant le stroma antérieur ((figure11: A,B,C,D). La couche est plus épaisse au centre et devient plus mince en périphérie et disparaît vers le limbe. La pachymétrie est à 512 μm en OD et 523 μm en OG.

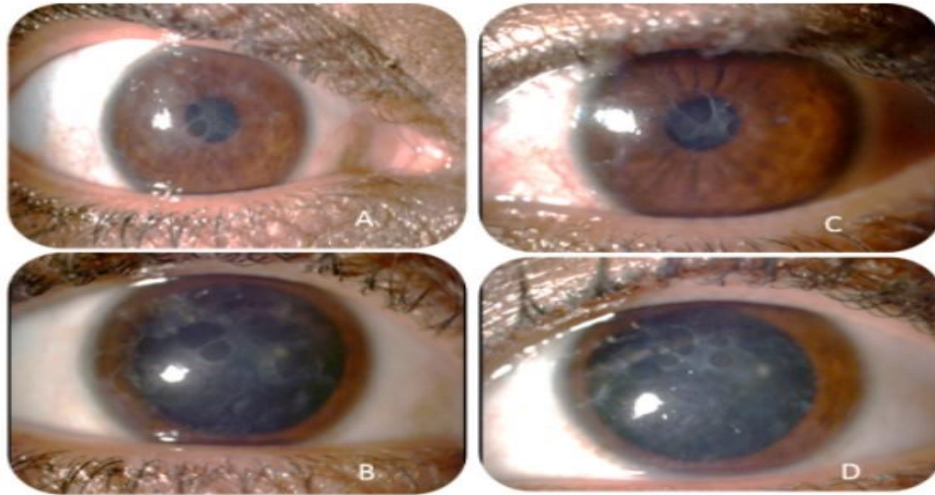


Figure 10 : A. Oeil droit sans dilatations. B. L'aspect de la partie antérieure auparavant mal individualisée avec des bords flous de l'œil droit sous forme de microvacuoles. C. Oeil gauche sans dilatation. D. L'apparition des opacités auparavant mal individualisées avec des bords flous de l'œil gauche sous forme de microvacuoles très visibles après dilatation

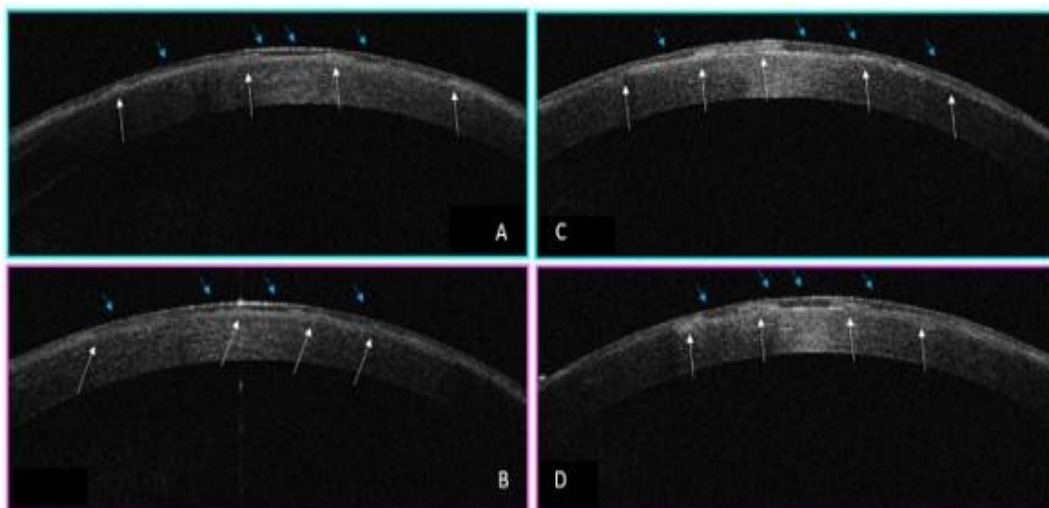


Figure 11 : A, B. Deux coupes OCT montrant la forme de microvacuoles sous forme de plaques minces (flèches bleues) et de dépôts en dents de scie sur la membrane de Bowman (flèches blanches). C, D. Le même aspect est observé dans l'œil controlatéral

Il s'agit d'un cas N 2 (IV-8): Mme. R. A. 44 ans : présente des épisodes de kératalgies récurrentes, avec une baisse d'acuité visuelle d'installation progressive depuis l'âge de 20 ans. L'acuité visuelle : OD : compte les doigts à 3m / OG à 2/10 : Inaméliorable. L'examen à la lampe à fente montre en ODG une dystrophie cornéenne épithéliale et stromale antérieure sous forme de microvacuoles, surtout en périphérie, avec un épaissement hétérogène de l'épithélium plus marqué au centre, donnant une opacité centrale importante à bords flous au niveau des deux yeux (figure. 12 : A et B). Le cristallin est clair, le tonus oculaire est à 15 mmHg en OD et 14 mmHg en OG et le fond d'œil est normal. L'OCT de la cornée montre une irrégularité des couches épithéliales et stromales antérieures avec des dépôts hyperréfléchissants plus épais et une opacité centrale manifeste au niveau des deux yeux (figure. 13 : A, B, C, D). La pachymétrie est à 538 μm en OD et 543 μm en OG.

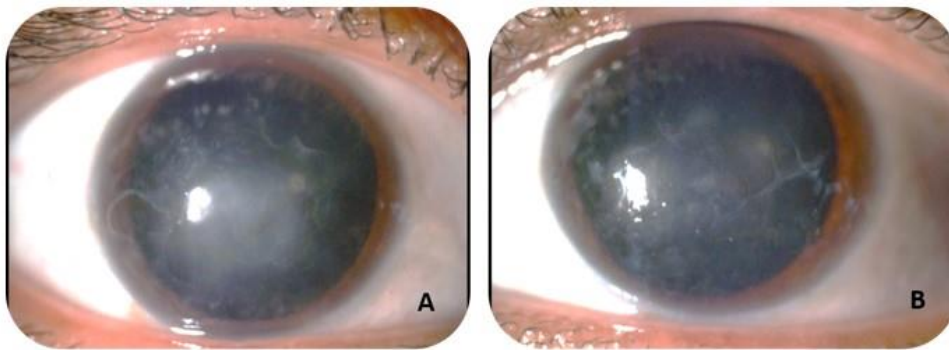


Figure 12 : Aspect peu distinctif des opacités antérieures, avec des bords flous de l'œil droit (A) et gauche (B) clairement visibles sous forme de microvacuoles

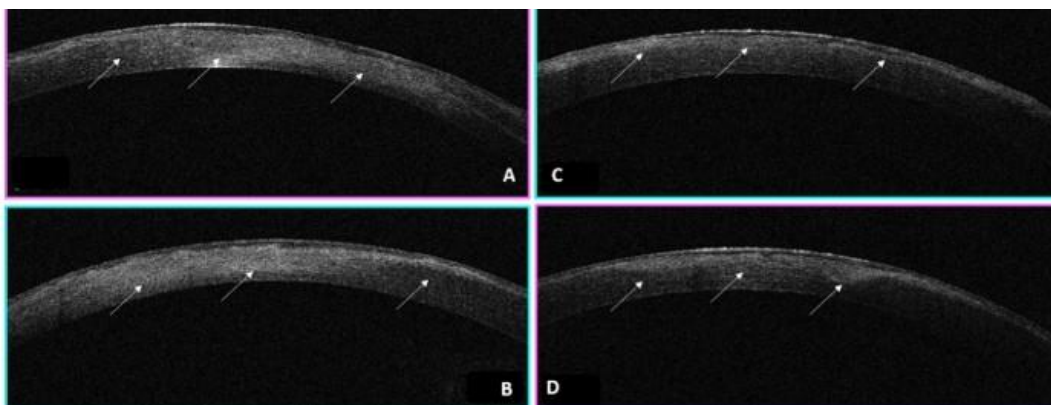


Figure 13 : A, B. Deux coupes d'OCT cornéenne de l'OD. Irrégularité des couches antérieures avec des dépôts hyperréfléchissants plus épais d'une apparente opacité centrale (flèches). C, D. Deux coupes d'OCT, irrégularité des couches épithéliales antérieures et stromales antérieures avec des dépôts hyperréfléchissants plus épais (flèches)

Il s'agit d'un cas N 3(III-2): Mme R.Z 79ans : Mère suivie pour gonarthrose bilatérale, elle rapporte des épisodes de kératalgies récidivantes. Acuité visuelle : en vision de loin OD : mouvement des doigts / OG : compte les doigts à 3m : Inaméliorable. Examen à la lampe à fente : Œil droit : dépôts blancs jaunâtres et gélatineux épithéliaux centraux et paracentriques associés à une opacité cornéenne plus profonde que la précédente et qui intéresse les couches épithéliales, la membrane de Bowman et le stroma antérieur sous formes de couche fibreuse sous-épithéliale prenant la quasi-totalité de la surface cornéenne (figure. 14 : A). Le reste de l'examen est gêné par la dystrophie très importante de l'œil droit, fond d'œil inéclairable. Examen de l'œil gauche : dystrophie cornéenne qui intéresse les couches épithéliales, la membrane de Bowman et le stroma antérieur, sous forme d'un épaissement hétérogène de l'épithélium, plus important au centre, associé à des opacités à limites floues et une cataracte cortico-nucléaire (figure. 14 : B). Fond d'œil : Lueur pupillaire : rétine à plat. L'OCT de la cornée faite montre : Au niveau de l'œil droit : Dépôts (flèches bleues) associés à une perte importante des cellules épithéliales avec désorganisation des couches épithéliales avec absence de la membrane de Bowman, bulles en intrastromal antérieur (flèches blanches). Pachymétrie à 586 μ m. (figure. 15 : A,B). Au niveau de l'œil gauche : Irrégularité de la surface cornéenne avec désorganisation des couches épithéliales, absence de la membrane de Bowman par endroit et remaniement stromal antérieur surtout au centre (figure. 15 : C, D).

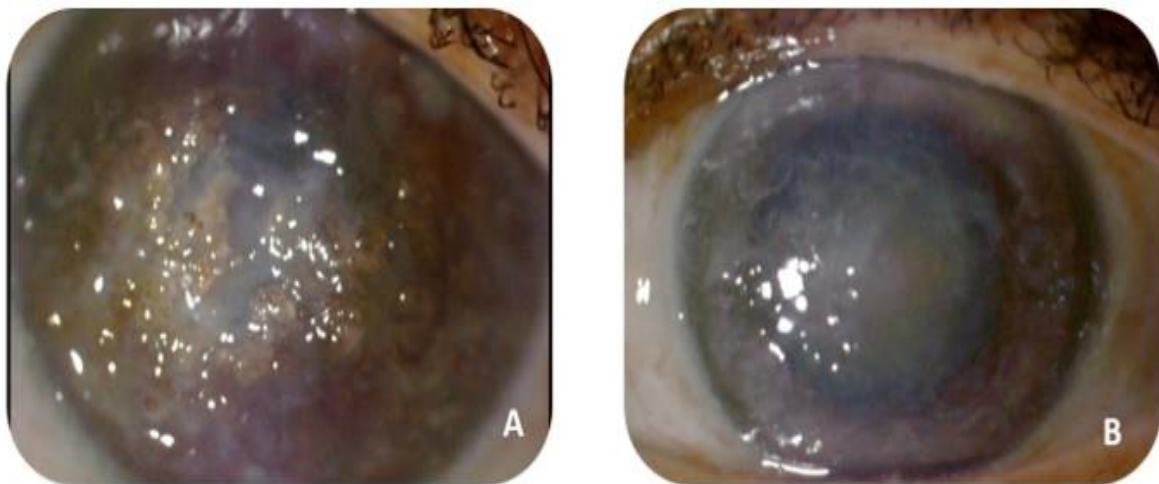


Figure 14 : A. L'œil droit à un épithélium central et paracentrique blanc, jaunâtre, gélatineux et une opacité cornéenne. B Épaississement central hétérogène et marques dans l'œil gauche et une opacité centrale évidente de bords flous

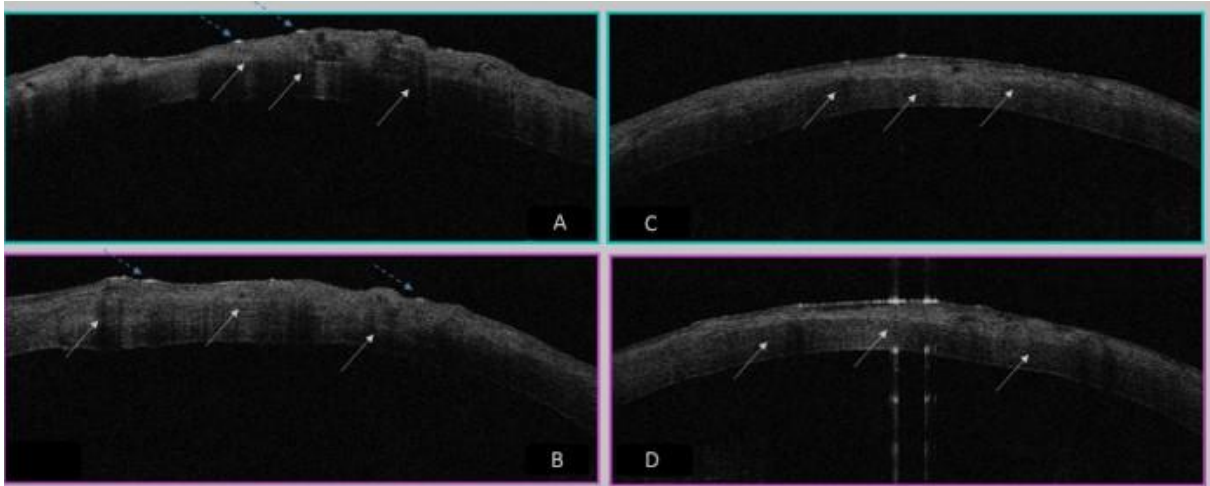


Figure 15 : A, B. Deux coupes d'OCT cornéenne d'OD. Dépôts (flèches blanches), un remodelage important de la cornée. Désorganisation de la couche épithéliale, absence de membrane de Bowman et de bulles dans la cornée intrastromale antérieure (flèches blanches). C, D. Deux coupes d'OCT cornéenne de l'œil gauche, irrégularité de la surface cornéenne et désorganisation de la couche épithéliale, absence de membrane de Bowman en différents sites et présence d'une épaisse couche de dépôt intrastromal au centre (flèches).

2. Méthodes de cytogénétique classique (Caryotype métaphasique) appliquées au cas de la cardiopathie congénitale

La cytogénétique est une science qui s'occupe de l'analyse du nombre et de la structure des chromosomes et ceci par l'intermédiaire des techniques spécifiques de préparations chromosomiques afin d'établir le caryotype.

2.1. Principe

Le caryotype permet l'observation et la classification des chromosomes présents au cours de la métaphase ou de la prométaphase de la mitose, il est donc réalisé à partir de cellules nucléées capables de se diviser in vitro (culture cellulaire.).

En pratique, on utilise le plus souvent les lymphocytes du sang veineux. Son obtention nécessite, dans la majorité des cas, une culture cellulaire dont la durée varie de 72h pour le sang et une à deux semaines pour les prélèvements réalisés en prénatal et les prélèvements cutanés. La technique classique consiste à bloquer les cellules en métaphase grâce à la colchicine (poison du fuseau mitotique), réaliser un choc hypotonique pour faire gonfler et éclater les cellules et disperser le cytoplasme puis fixer et étaler la préparation cellulaire sur une lame, afin d'obtenir une dispersion chromosomique satisfaisante. Enfin, des méthodes de dénaturation avant la coloration par Giemsa permettent d'obtenir un marquage en bandes R (RHG par dénaturation thermique), en alternance, le long des chromosomes de bandes transversales claires et sombres spécifiques de chaque paire chromosomique.

2.2. Culture cellulaire

Après avoir récolté le prélèvement sur tube d'héparine de lithium ou de sodium, les UV sont allumés sous la hotte, au moins 30mn avant la mise en culture.

Mise en culture : Elle s'effectue dans des conditions aseptiques, sous une hotte à flux laminaire vertical, dans des tubes coniques en polystyrène, ayant une contenance de 12 à 15 ml ou des flacons de 50 ml. Le contenu des tubes est homogénéisé soigneusement (annexe. 2). Ces derniers sont disposés de façon inclinée à 30° dans l'étuve à 37°C pendant 72 heures.

2.3. Blocage des cellules en métaphase

Les divisions cellulaires sont arrêtées par l'addition dans chaque tube de 100 µl de colchicine à 10 ng/ml. Après une homogénéisation manuelle, les tubes sont remis à l'étuve à 37° C pendant 50 minutes.

NB : Toutes les centrifugations sont faites à 1500 t/mn et pendant 5 minutes.

2.4.Choc hypotonique

A la fin du traitement par la colchicine, les tubes sont centrifugés, le surnageant est éliminé par aspiration de telle façon à laisser quelques gouttes de milieu au-dessus du culot, ce dernier est remis en suspension dans quelques gouttes de la solution hypotonique [chlorure de potassium kcl à 0,065 M) réchauffé à 37°C], puis complété jusqu'à 12ml avec cette solution hypotonique. Les tubes sont homogénéisés délicatement puis remis dans l'étuve à 37°C pendant 20 minutes.

2.5.Fixation

Elle se déroule en 3 étapes :

- 1^{ère} étape : Une fois que les 20 minutes du choc se sont écoulées, 1 ml de carnoy (1) qui est le fixateur, composé par 3 volumes de méthanol et 1 volume d'acide acétique glacial, est ajouté dans chaque tube puis on centrifuge pendant 5 min.
- 2^{ème} étape : Après l'élimination du surnageant, quelques gouttes de carnoy (1) sont ajoutées, puis le culot est remis en suspension à l'aide d'une pipette pasteur, puis complété à 8 ml par le carnoy (1).
- 3^{ème} étape : Elle est identique à la précédente, seulement l'incubation se fait à température ambiante pendant 40 min.

2.6. Préparation et étalement sur lames

2.6.1. Préparation des lames

On utilise des lames prêtes à l'emploi lavées, dégraissées, on les rince le jour de la technique à l'eau courante et on les met dans un bêcher contenant de l'eau distillée, on les conserve à +4° jusqu'au moment de l'étalement.

2.6.2. Etalement sur lames

Le surnageant est aspiré à 1 cm du culot qui est remis en suspension à l'aide d'une pipette pasteur. Avec la même pipette pasteur, on laisse tomber 3 gouttes de la suspension cellulaire sur des lames froides d'une hauteur de 3 à 4 cm.

Les préparations chromosomiques sont observées au microscope inversé, afin de les trier pour la sélection des lames riches en mitoses.

N.B : Les lames peuvent être congelées à -20°C pour une éventuelle utilisation

2.7. Marquage chromosomique en bande R: RHG (Reverse banding using Heat and Giemsa)

On chauffe la solution d'Earle (100ml), placée dans un bac en porcelaine couvert au bain-marie à 84,4°C. Quand la température est stable, on plonge les lames (déshydratées à l'étuve à 37°C pendant 24 heures) dans la solution d'Earle.

Le temps de dénaturation est variable en fonction de l'âge des lames dans des conditions climatiques et hygrométriques. A la fin de la dénaturation, les lames sont colorées au Giemsa 5%.

2.8. Coloration au Giemsa 5%

La coloration Giemsa seule sans dénaturation au préalable était le moyen le plus utilisé avant la découverte des techniques de bandes. La technique standard garde son intérêt dans l'étude générale de la morphologie des chromosomes et des anomalies de nombre. Actuellement, elle est largement utilisée dans le marquage chromosomique induit par de nombreux traitements préalables. Une fois les lames dénaturées, elles sont plongées dans la solution Giemsa 5 % pendant un temps variable de 5 à 10 minutes, puis on sèche les lames et on les analyse au microscope. On repère d'abord les mitoses à faible grossissement (x10), ensuite on passe au fort grossissement (x100) ce qui nous permet d'analyser la mitose afin de détecter d'éventuelles anomalies de nombres et/ou de structure. Le classement des

chromosomes se fera soit après prise de photo soit par capture au Cytoscan.

2.9.Lecture au Cytoscan

Une fois que l'observation et l'analyse des mitoses sont faites, la prise des photos est réalisée sur un microscope équipé d'une caméra et d'un logiciel d'analyse d'images. Les chromosomes sont alors classés en caryotype manuellement ou automatiquement, puis les photos sont produites par une imprimante Laser. Généralement 11 à 33 mitoses sont interprétées selon la nomenclature Internationale (ISCN, 2016).

3. Méthodes de cytogénétique moléculaire ou analyse sur puces à ADN (ACPA) de la cardiopathie congénitale

3.1. Principe

La technique d'hybridation sur puces à ADN ou CGH-array est dérivée de la technique de CGH. Les préparations métaphasiques sont remplacées par des cibles d'ADN déposées sur lame de verre. Ces cibles peuvent être soit des clones génomiques de grande taille (BACs, PACs, cosmides), soit des produits PCR (exons des gènes par exemple) soit des oligonucléotides dérivés de la séquence de chaque région, soit des clones d'ADN complémentaire.

Après hybridation, la fluorescence est capturée à l'aide d'une caméra ou d'un scanner et enfin un logiciel calcule les rapports de fluorescence entre les deux ADN et représente les résultats sous forme de graphique. Cette analyse est répétée pour l'ensemble des cibles présentes sur la lame, pour chacune d'entre elle. Un ratio égal à 1 correspond à un nombre de copies normal, entre 1,3 et 1,4 à un gain de copies et entre 0,6 et 0,7 à la perte d'une copie. Les rapports d'une telle technique d'analyse portent sur sa résolution ou capacité à détecter la plus petite anomalie quantitative de structure (figure. 16).

Cette résolution est modulable au niveau de la couverture du génome et dépend de la taille des séquences déposées en micro-réseau et de l'espacement régulier des séquences entre elles. Il devient alors possible de priser la taille du déséquilibre et son contenu en gènes. Outre l'approche diagnostique, ces informations participent aussi à mieux cerner au sein du déséquilibre chromosomique d'éventuels gènes candidats responsables du phénotype observé.

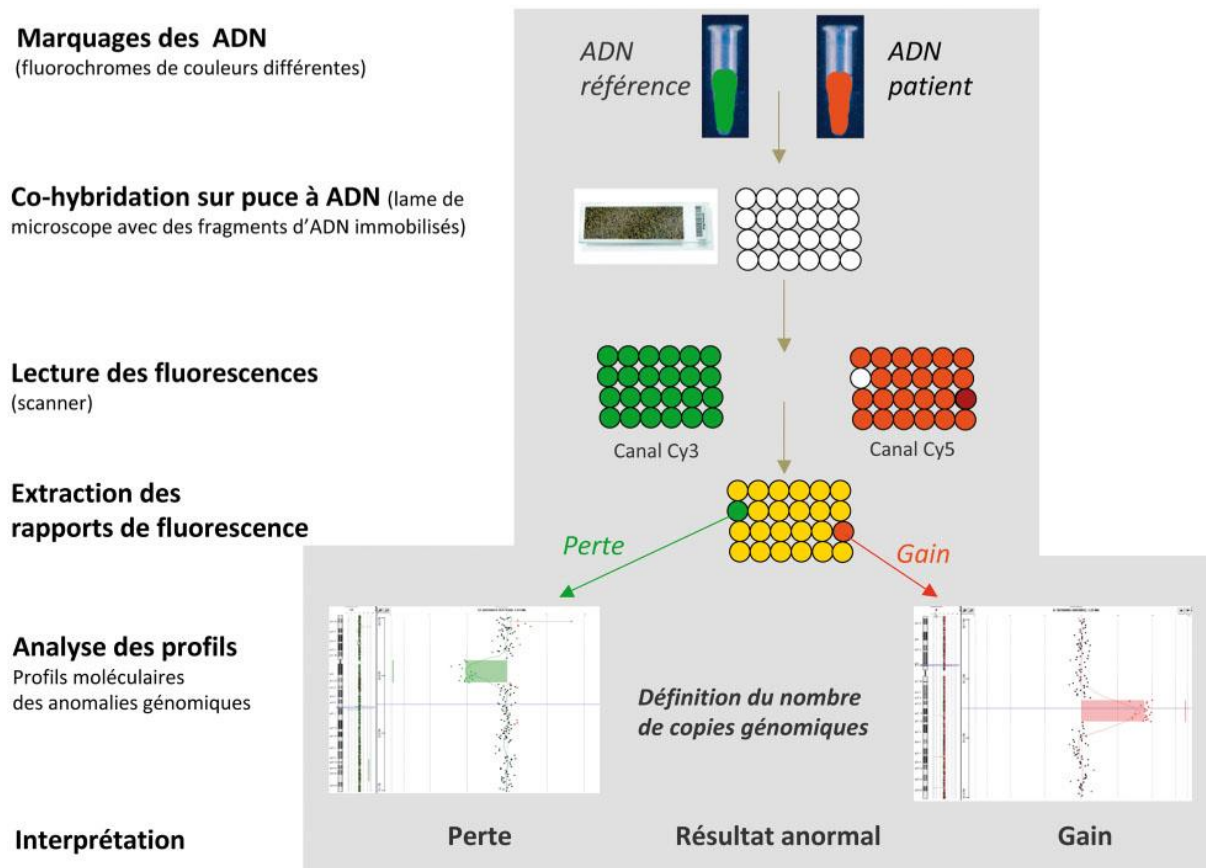


Figure 16 : Principe de la méthodologie par puce à ADN

3.2. Extractions d'ADN

L'extraction d'ADN a été faite à l'aide d'une trousse commerciale commercialisée (QIAmp DNA Mini Kit de Qiagen) (annexe. 3).

3.3. Digestion et purification de l'ADN génomique

- **Digestion de l'ADN génomique**

L'ADN de notre patiente a été ajouté à un mélange de digestion. Le mélange est incubé au bain marie pendant 2 heures à 37°C puis 20 min à 65°C pour arrêter la réaction de digestion. Enfin, les tubes sont microcentrifugés avant l'étape de marquage

- **Marquage fluorescent de l'ADN génomique digéré**

L'ADN a été marqué séparément par fixation sur les cytosines de 2 fluorochromes à spectre d'émission distincts, carbocyanine **Cy3** (couleur verte) **Cy5** (couleur rouge) émettant respectivement à une longueur d'onde de 570 nm (vert) et 670 nm (rouge).

Ce marquage consiste à mélanger 450ng d'ADN dilué à 100ng /µl avec la solution de

Y. BENBOUCHTA **FSR**

Random primer (octamers). Après dénaturation de l'ADN on ajoute un mélange de dinucléotides triphosphates (dATP, dGTP, dTTP) non marqués et à 0,1 mM pour les dCTP non marqués. On ajoute en dernier lieu 1 unité de la polymérase 1 : fragment Klenow et on incube le tout au bain marie à 37°C pendant 2h ou toute la nuit. Pour analyser les résultats, nous calculons le ratio des intensités de fluorescence Cyanine 5 / Cyanine 3. Nous utilisons ensuite le log2 du rapport d'intensité de fluorescence.

3.4. Purification de l'ADN génomique digéré et marqué

Les produits de marquage sont purifiés sur une colonne Purelink Spin, On ajoute 200 µl de Binding Buffer B2 aux échantillons, tampon permettant de fixer l'ADN sur la membrane de la colonne. Le mélange est centrifugé 1 minute à 14 000 tr/mn puis le filtrat est jeté. 650 µl de tampon de lavage Wash Buffer W1 sont ensuite ajoutés, puis l'ensemble est centrifugé pendant une minute à 14000tr/mn.

Le filtrat est à nouveau jeté pour enlever les restes de tampon de lavage. Une centrifugation à une vitesse maximale est réalisée pendant 3 minutes. Les tubes sont ensuite placés sur un tube stérile à l'ombre fourni avec le Kit. Les ADN sont détachés de la colonne par ajout de 55 µl de tampon d'élution E1.

Après une incubation d'une minute à température ambiante, les colonnes sont centrifugées à 14 000 tr/mn pendant 2 minutes. Pour les puces 180K utilisées chez notre patiente, les ADN sont mis dans SpeedVac (système de concentration sous vide) pour obtenir un volume final d'environ 20 µl. Si le volume est trop réduit, du tampon TE 1X pH à 8 est ajouté.

3.5. Puce utilisée

La puce utilisée dans ce travail est une puce 180K d'Agilent, c'est une puce de dernière génération avec une haute résolution. Ce format est utilisé en routine pour le diagnostic au sein de la plateforme CGH du Centre Diagnostic du Génome Nijmegen aux Pays-Bas.

Cette puce est composée d'oligonucléotides longs fabriqués au niveau d'une lame de verre (in situ) par Oligosynthèse en utilisant la méthode chimique des phosphoramidites. Elle est constituée de quatre domaines de 180 880 oligonucléotides. L'espacement moyen entre deux oligonucléotides est 13 kb. Les sondes ciblent les parties codantes et non codantes, en insistant sur les gènes connus, les régions pseudo-autosomiques et télomériques.

3.6. Technique d'hybridation

Les ADN marqués en Cy3 et en Cy5 sont mélangés selon le protocole de dépôt défini préalablement. On additionne de L'ADN Cot-1 (1,0 ng/ml) qui inhibe les séquences répétées, l'agent bloquant 10X et le tampon hybridation 2X. On réalise une dénaturation de l'échantillon pendant 3 mn, une préhybridation pendant 30 mn à 37°C puis une centrifugation à 8000tr/mn pendant 1 minute. Le mélange est mis sur la partie centrale d'une lame (gasket), ensuite on effectue un étalement à gauche et à droite sans provoquer la formation de bulles. La puce 180k ou 244k d'Agilent est déposée au-dessus de la lame (gasket) constituée de zones assurant l'étanchéité. Le compartiment d'hybridation est ensuite fermé sans formation de bulles. On déclenche une hybridation à 65°C dans un four à 20 rpm (rotation per minute) pour une durée de 24 heures concernant les puces 180k.

- **Lavages post hybridation**

La puce est détachée de la lame dans le tampon de lavage 1. La lame doit être complètement recouverte puis déposée dans une cuve remplie de la solution de lavage 1 pour une durée de 5 minutes, en effectuant une agitation à 700rpm. Après, elle est déposée dans un deuxième bac contenant la solution de lavage 2 à 37°C pendant une minute sous agitation. Enfin, on fait sortir et sécher la lame rigoureusement.

- **Scan des lames**

La lame est déposée au niveau du scanner Agilent pour être scannée via le logiciel Agilent Scanner Control.

3.7. Analyse des résultats

Le scanner détecte les signaux des fluorochromes vert et rouge tout en estimant leur puissance. Les données brutes de l'analyse sont visualisées sous forme d'une photo numérisée (TIFF) qui sera traitée par le logiciel Features Extraction 9.5.3.1.

L'analyse des résultats est effectuée par le logiciel DNA Analytics 4.0.85 avec le paramétrage ci-dessous :

- Algorithmes ADM2
- Sondes consécutives déviantes : Sup3
- Résolution théorique moyennes : 25kb
- Cut OFF : 0,25

-Derivative Log Ratio Spread (DLSR) entre 0,15 et 0,30

3.8. Analyse bio-informatique

L'analyse du génome à grande échelle a été réalisée à l'aide de la plateforme Affymetrix CytoScan HD avec une résolution moyenne d'environ 20 ko (Human Genome Build hg19, navigateur de génome UCSC février 2009). Inhérente à la structure du génome humain, cette résolution n'est pas atteinte pour toutes les régions, comme les régions centromériques et les régions hétérochromatiques. Les réarrangements chromosomiques équilibrés ne peuvent pas être détectés avec analyse par matrice (CGH). Les déséquilibres génomiques à faible mosaïque, présents dans moins de 10 à 20 % des cellules dont l'ADN a été isolé, peuvent rester indétectables.

On procède à une étape de normalisation permettant d'ajuster ou de corriger les données brutes afin d'enlever les effets indésirables liés à la qualité du fluorochrome.

Une deuxième phase d'exclusion de données suit cette étape et permet d'exclure les clones de basse qualité (faible intensité, clones vides).

Les moyens informatiques et bio-informatiques sont liés à l'analyse et l'interprétation des données après le traitement de données quantifiées.

En ce qui concerne l'analyse de l'hybridation, plusieurs bases de données bio-informatiques ont été utilisées :

-**UCSC genome browser** (<http://genome.UCSC.edu>) sollicité pour la localisation chromosomique.

-**Database of genome variant** (<http://projects.tcag.ca/variation>) utilisé pour le contrôle de polymorphismes.

-**OMIM** : Une base de données qui dresse un catalogue de toutes les maladies connues ayant une cause génétique et les relie dans la mesure du possible à des gènes.

-**DECIPHER (Database of Chromosome Imbalance and Phenotype in Human using Ensembl Resources)** cette base de données répertorie les patients, leur phénotype et le type d'anomalie chromosomique en cause.

4. Diagnostic moléculaire par Séquençage Haut Débit de la dystrophie cornéenne

4.1. Prélèvements sanguins

Après avoir reçu le consentement de tous les patients participant à cette étude, des échantillons de 5ml de sang périphérique ont été prélevés sur des tubes contenant l'anticoagulant acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) et également un inhibiteur des nucléases. Ensuite, les échantillons sanguins sont enregistrés et conservés à -20 °C, en indiquant au niveau du tube le numéro du dossier patient. Ils peuvent également être conservés sous forme de culots de globules blancs (après lyse des globules rouges) et la décongélation se fait juste avant l'extraction d'ADN.

4.2. Techniques d'extraction de l'ADN à partir d'un prélèvement sanguin

Il existe plusieurs méthodes d'extraction d'ADN génomique à partir du sang périphérique :

- Extraction au sel (NaCl)
- Extraction par trousse commerciale
- Extraction aux phénols

Celles utilisées dans notre étude est l'extraction par trousse commerciale. Quel que soit l'échantillon d'ADN utilisé et la méthode d'extraction, le protocole est toujours constitué de quatre grandes phases : La lyse des globules rouges, des globules blancs, la dénaturation et la précipitation des protéines, l'isolement des acides nucléiques et enfin le lavage et la récupération de l'ADN.

Il s'agit d'une technique facile économique et non chronophage qui est adoptée pour les grandes séries constituées de dizaines d'échantillons, permettant de diminuer la charge de travail.

La trousse commercialisée employée dans notre travail est Invitrogen Kit (Invitrogen™ PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, Catalognumber: K182001). Cette trousse utilise le principe de la technologie des membranes de silice pour la séparation et la purification de l'ADN génomique à partir de prélèvements biologiques divers. Conçu pour réaliser l'extraction de plusieurs prélèvements en parallèle, il permet de recueillir de l'ADN purifié prêt à être analysé. Les procédures sont compatibles avec des échantillons de sang total et de sang frais ou congelé traités à l'EDTA ou au citrate.

La trousse Invitrogen™ PureLink™ Genomic DNA est constituée d'éléments et de procédures avec des méthodes perfectionnées par rapport aux méthodes actuelles de la colonne de spin. Les colonnes ont été conçues récemment afin de capter et récupérer l'ADN d'une manière plus performante. Chaque type de prélèvement emploie un protocole de lyse particulier et un tampon de lyse amélioré pour augmenter l'activité de la protéinase K et éviter la contamination par les protéines. Un tampon salin permet de capter l'ADN par la résine de la colonne et des tampons de lavage très forts suppriment tous les résidus de protéines et de sel. L'ADN est élué dans un tampon faiblement concentré en sel afin d'obtenir le PH optimal de l'ADN.

Ce protocole s'effectue en deux phases afin de séparer et de purifier facilement l'ADN génomique à partir de 200 µL de sang total (la séparation des leucocytes n'est pas requise).

❖ Etape de lyse : Les échantillons sont dégradés par dénaturation thermique. La dégradation cellulaire est réalisée juste après la décongélation (annexe 3).

❖ Etape de purification : On additionne 200 µL d'éthanol absolu et on effectue une centrifugation. Ensuite, on attribue à chaque échantillon une colonne PureLink™ Spin Columnswith Collection Tubes, cette étape permet de capter l'ADN génomique par la membrane de la colonne de centrifugation, on met 620 µL de la solution obtenue, on réalise une centrifugation à 10000Xg pour une durée de 1 min puis on dépose la colonne sur un autre tube collecteur et on jette le tube précédent ainsi que l'éluât.

L'ADN génomique est capté par la membrane de silice et le lysat diffuse à travers la membrane par application d'une pression ou d'une centrifugation. Après, on réalise un lavage de la membrane par les tampons du kit PureLink™ Genomic Wash Buffer 1 et PureLink™ Genomic Wash Buffer 2. On ajoute 500 µL du premier tampon contenu dans la trousse après on recentrifuge à 10000Xg pendant 1 min et on positionne la colonne sur un nouveau tube collecteur. On additionne 500 µL du deuxième tampon puis on centrifuge à 16000Xg pendant 3 min. À ce moment-là, l'ADN est purifié. On met ensuite la colonne sur un tube eppendorf de 1,5 ml, on ajoute 50 µL de tampon d'éluion PureLink™ Genomic Elution Buffer et on effectue une centrifugation à 10000Xg pendant 1 min. A ce niveau, l'ADN est élué. On élimine la colonne et on garde le tube eppendorf qui contient l'ADN extrait à une température de +4 °C si le spécimen est exploité dans les jours suivant l'extraction ou à -20 °C pour un usage différé.

4.3. Dosage et vérification de la qualité de l'échantillon d'ADN

La concentration et la qualité des échantillons d'ADN ont été contrôlées par spectrophotométrie. Ce dosage est réalisé par évaluation de l'absorption A qui est l'unité de densité optique détectée à 260 nm en lumière ultraviolette (UV). Une unité de densité optique peut être définie comme étant l'absorption d'une solution d'ADN double brin concentrée à 50 µg/ml ou à l'absorption d'une solution d'ADN simple brin (ou d'ARN) à une concentration de 25 µg/ml. Si le spécimen ne comporte pas de quantité non négligeable de contaminants comme les protéines, le phénol ou autres, l'estimation spectrophotométrique de la quantité de rayons UV captées par les bases est une opération rapide et efficace. La concentration d'acides nucléiques est en principe désignée par une mesure réalisée à 260 nm en comparaison avec un spécimen nommé « blanc » (Tampon aqueux à faible concentration ionique, dans notre manipulation il s'agit du tampon d'élution employé lors de l'extraction de l'ADN génomique). La contamination se détecte par calcul du rapport entre l'absorption de l'ADN et celles des protéines. Etant donné que les protéines absorbent à 280 nm, le ratio A260/A280 est employé pour évaluer la pureté de l'acide nucléique. L'ADN pur correspond à un ratio d'environ 1,8.

Au niveau de notre structure, l'appareil NANODROP 2000 (Thermo Scientific Nano Drop TM 2000) est employé pour obtenir le dosage des échantillons d'ADN. On se contente de mettre dans l'appareil 1 µl d'ADN extrait après avoir déposé 1 µl du tampon de l'élution (TE) comme « blanc » pour évaluer sa concentration et visualiser la courbe qui nous informe sur la qualité de l'ADN. La totalité des ADNs extraits dans notre travail ont un dosage compris entre 90 ng/µl et 160 ng/µl, avec des rapports d'absorption situés entre 1.8 et 2 ceux, qui favorisent la réalisation de toutes les procédures de biologie moléculaire.

5. Séquençage à haut débit de l'Exome entier (Whole Exome Sequencing-WES)

Le séquençage complet de l'Exome est une méthode qui permet de séquencer toutes les régions codantes du génome humain. En principe, on utilise cette méthode quand le diagnostic clinique n'est pas clair, donc analyser tous les gènes pour avoir un diagnostic précis est obligatoire. Cette approche diagnostique est utilisée lorsqu'il y a une forte suspicion clinique d'une pathologie génétique sans orientation précise vers une maladie particulière, comme c'était le cas pour notre famille. Cette analyse a été faite en partenariat avec le laboratoire français de Biomnis. Tout d'abord, la fragmentation enzymatique a été effectuée grâce au kit KAPA HyperPlus (KapaBiosystems, Inc.). Une quantité de 500ng d'ADN fragmenté a subi une amplification suivie d'un enrichissement par le kit SeqCap EZ Human Exome v3.0 (Roche

NimbleGen, Inc.). Ensuite un séquençage a été réalisé par système Illumina HiSeq 2500 en mode couplé à exécution rapide : 2x 100 paires de bases (pb). Concernant l'étude bio-informatique, le logiciel bcl2fastq v1.8.4 (Illumina) a été sollicité afin de transformer les données brutes (fichiers bcl) en fichiers fastq. Les séquences ont été étudiées en tenant compte des recommandations des meilleures pratiques de la boîte à outils d'analyse du génome (GATK) : la cartographie a été effectuée par BWA-MEM, appel de variants en utilisant GATK (appelant haplotype). Les procédures d'annotation et de filtrage ont été réalisées par Variant Studio (Illumina). Pour interpréter les résultats, les fichiers de variants des parents et du cas index ont été croisés et seuls les variants correspondant à un type d'hérédité autosomique récessif ont été choisis. Tous les variants ayant des fréquences alléliques supérieures à 1% dans la base de données du projet de séquençage d'Exome (ESP) 6500 ou non pathogènes ont été éliminés.

L'analyse des données bioinformatiques a été effectuée au sein du DGM par nos spécialistes de bioinformatique.

6. Analyse bio-informatique des données de l'exome :

A l'issue du « run » de séquençage, les fichiers regroupant l'ensemble des données brutes (ionogrammes) seront traités par le programme serveur. L'algorithme de « base calling » permet la conversion des données sous forme de lettres en séquences (A,T,C,G) formant le « read » (séquence au format FASTA), et un score de qualité pour chaque base incorporée (Score Phred codé en ASCII). Les deux types de données étant associés dans un fichier. FASTQ (FASTA+Qualité). Les scores de qualité Phred sont associés d'une manière logarithmique à la probabilité d'erreur de reconnaissance d'une base (tableau. 6).

Tableau 6 : Score de qualité Phred et probabilité d'identification incorrecte

Score de qualité Phred	Probabilité d'une identification incorrecte	Précision de l'identification d'une base
10	1 pour 10	90%
20	1 pour 100	99%

Un prétraitement est également appliqué sur la base des « reads » générés équivalent au nombre d'ISPs vivantes ou « Live ISPs » (On parle d'ISPs vivantes pour les ISPs associées à la clé) :

- Trimming : Elimination des adaptateurs et/ou portions de read de mauvaise qualité (quality value QV>12).

- Filtres : Elimination des « reads » de petite taille, de mauvaise qualité, des polyclonaux.

L'ensemble de ces informations est repris à travers un « report » généré à l'issue du séquençage et du prétraitement. Y sont également renseignés, le nombre de reads générés ainsi que leur taille moyenne.

Les données ainsi obtenues sont ensuite analysées à l'aide du logiciel en ligne, ce logiciel offre des flux de travail préconfigurés et personnalisables optimisés pour diverses applications, afin de simplifier l'analyse des données et d'obtenir des résultats optimaux.

En effet, beaucoup de logiciels et de bases de données ont été exploités pour l'analyse informatique des données brutes résultant du séquençage afin de les transformer en séquences de nucléotides et leur confrontation clinico-biologique :

- Burrows Wheeler Aligner (BWA) : Pour comparer les séquences (reads) avec le génome de référence humain (Hg19 / GRch38) (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>).

- GenomeAnalysisToolkit (GATK) : Pour l'appel et l'annotation des variants (<https://software.broadinstitute.org/gatk/>).

- SNPeff (<http://snpeff.sourceforge.net/>) : Outil permettant d'annoter les variants

- ANNOVAR (<http://www.openbioinformatics.org/annovar/>) : outil utilisé pour annoter les variants

- Gene Ontology (<http://geneontology.org/>) : Outil servant à annoter les variants

- VariantDB outil spécifique à l'Université d'Antwerp (www.biomina.be \ app \ variantdb) : permettant d'annoter et de filtrer les variants [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25352915>].

- dbSNP (version 137) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>), 1000 Genomes Project (version Avril 2012) (<https://www.internationalgenome.org/>) et ESP6500Exome Project (<https://esp.gs.washington.edu/drupal/>) : outils servant à filtrer les variants communs caractérisés par une fréquence allélique mineure (Minor allele frequency) supérieure à 1%.

- Base de données interne spécifique à la population marocaine constituée de génomes d'individus contrôles marocains au niveau du Département de Génétique Médicale de l'INH. Cette base de données comprend à ce jour 34 exomes de patients marocains : permettant d'effectuer la filtration des variants communs dans la population marocaine.

-dbNSFP6 (Polyphen2 : <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>, SIFT : <http://provean.jcvi.org/index.php>, MutationTaster : <http://www.mutationtaster.org/> : outils permettant de prédire l'impact des variants non synonymes sur la protéine

- Alamut v2.3.2 (Interactive Biosoftware, Rouen) : outil servant à prédire l'impact des variants sur les sites d'épissage et l'effet des variants non-sens sur la protéine.

- Integrative Genomics Viewer (IGV) (<https://software.broadinstitute.org/software/igv/>) : pour la représentation des variants sélectionnés après usage de plusieurs filtres d'analyse.

7. Interprétations des variants

Les données brutes lues à partir d'instruments sont soumises à une série de processus bioinformatiques (également appelés « pipeline ») afin de délivrer un fichier d'appel des variants (VCF) (tableau. 7) (Magi, Benelli et al. 2010, DePristo, Banks et al. 2011). Ces procédures comportent le démultiplexage, le contrôle de la qualité, la comparaison des lectures avec un génome de référence et la sélection / annotation de variants (de Leng, Gadella-van Hooijdonk et al. 2016). Vu le caractère spécialisé de ces techniques, la présence de personnel qualifié en bioinformatique (bioinformaticiens) est indispensable pour la gestion et l'interprétation des données de séquençage haut débit. Au sein de notre laboratoire, nous avons une équipe expérimentée de bioinformatique qui s'occupe particulièrement de l'interprétation des résultats de NGS qu'ils soient faits au sein de notre plateforme ou sous-traités dans d'autres plateformes externes. L'utilisation de codes-barres pour marquer les fragments d'ADN des spécimens facilite le séquençage de plusieurs patients en parallèle, favorisant la diminution des coûts de séquençage (Tu, Ge et al. 2012). Néanmoins, ce procédé fait appel à une étape de démultiplexage qui permet la sélection de toutes les lectures (reads) par un code barre / échantillon avant de commencer l'analyse (Tu, Ge et al. 2012). Le fichier démultiplexé composé de lectures brutes est nommé FASTQ (tableau 7). Après l'étape de démultiplexage, les lectures séparées des échantillons sont cartographiées sur un génome de référence (fichier BAM, tableau 7) et toute différence entre la lecture de référence et celle de séquençage est notée (Van der Auwera, Carneiro et al. 2013). Le fichier de sortie qui définit tous les variants retrouvés chez un patient et leurs fréquences alléliques est nommé VCF (Van der Auwera, Carneiro et al.

2013). Cette liste des variants est analysée. Le variant call file comprend tous les variants identifiés, même les variants en commun chez les patients. Des outils bioinformatiques (précédemment cités dans la partie matériels et méthodes) peuvent être utilisés pour filtrer les variants répondant à certains critères (par exemple, fréquence d'allèle mineur supérieure à un seuil ou variants précédemment identifiés comme bénins ou synonyme au niveau des bases de données) (Yohe and Thyagarajan 2017).

Tableau 7 : Types de fichiers de données brutes de séquençage et leurs caractéristiques

Type de fichier	Non complet	Description	Taille approximative du fichier pour un Exome
FASTQ	Files with consensus assessment of sequence and variation	Données de séquençage brutes après démultiplexage	50 GB
BAM	BinaryAlignmentMap	Séquençage des données après alignement	16 GB
VCF	Variant call file	Fichier de sortie contenant tous les variants retrouvés chez le patient	9.3 GB

L'analyse des variants détectés par le séquençage haut débit est compliqué surtout lorsqu'elle concerne la totalité des gènes (WES ou WGS) ou un grand panel de gènes. Plus la partie du génome qui est séquencée est large, plus la probabilité de retrouver des variants rares ou nouveaux qui doivent faire l'objet d'une interprétation délicate s'élève. L'American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) et l'American College of American Pathologists (CAP) ont formulé des recommandations pour l'interprétation des variants germinaux (Richards, Aziz et al. 2015). Ces recommandations attribuent la valeur de certitude pour les différentes caractéristiques en rapport avec un variant particulier et des règles pour associer tous les critères dans le but de définir ce variant comme pathogène, probablement pathogène, de signification incertaine, probablement bénin (Richards, Aziz et al. 2015). Les critères comportent la fréquence des allèles mineurs retrouvées sur des bases de données de populations et la prévalence d'un variant chez les individus atteints, les données résultant de la ségrégation,

les études fonctionnelles, le type de mutation et son effet prévu, la similarité de la mutation avec les mutations connues, des modèles informatiques d'effet et des facteurs de transmission (Duzkale, Shen et al. 2013, Richards, Aziz et al. 2015).

Les bases de données relatives aux populations (tableau. 8) comportent des informations concernant plus de 120 000 personnes (Amendola, Jarvik et al. 2016, Lek, Karczewski et al. 2016). En dépit des limites, ces références représentent un début et faciliteront la réalisation de comparaisons entre les laboratoires et les travaux de recherche à l'échelle mondiale (Lek, Karczewski et al. 2016). Des critères semblables pour les tests somatiques ont été émis dans le but d'unifier l'interprétation des variants somatiques et favoriser l'échange d'informations entre les laboratoires. Cette démarche reste à évaluer (Ritter, Roychowdhury et al. 2016, Li, Datto et al. 2017). Malgré la disponibilité de certains outils pour faciliter l'application de ces recommandations pour le classement des variants, leur exploitation nécessite beaucoup d'exercice afin d'évaluer ces critères et d'appuyer le processus (Kleinberger, Maloney et al. 2016). En pratique, au niveau de notre laboratoire de génétique, si l'analyse de NGS (WES ou panel de gènes) révèle un nouveau variant et vu le manque de moyens permettant d'effectuer les études fonctionnelles des variants identifiés, nous avons recours aux outils de prédiction, tels que : PolyPhen, MutationTaster ou autres. Pour ce qui est de notre travail, tous les variants identifiés chez les patients de notre famille de dystrophie cornéenne ont été ajoutés au niveau des bases de données (ClinVar, LOVD...)

- **Analyse bioinformatique des données de l'exome**

En fonction des données cliniques, une recherche bibliographique approfondie sur les caractéristiques cliniques et génétiques de la maladie suspectée, dans notre cas la dystrophie cornéenne, a été effectuée en consultant plusieurs sites et bases de données : Orphanet (www.orpha.net), Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM, <https://www.omim.org/>) et Pubmed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). Par rapport à l'analyse informatique des données brutes de séquençage pour les transformer en séquences nucléotidiques et leur confrontation clinico-biologique. Le tableau ci-dessous (tableau. 8) résume les logiciels et bases de données qui ont été utilisés.

Tableau 8 : Bases de données publiques utilisées dans l'interprétation des données de NGS**(Li, Handsaker et al. 2009, Danecek, Auton et al. 2011)**

Type de base de données	Nom de base de données	Site-Web
Bases de données de population	Exome aggregation consortium (Exac)	http://exac.broadinstitute.org/
	gnomAD browser	http://gnomad.broadinstitute.org/
	1000 Genomes	http://www.internationalgenome.org/
	Exome server project	http://evs.gs.washington.edu/EVS/
Bases de données des maladies héréditaires	ClinVar	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/
	dbSNP	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/
	NCBIbgennetictestingregistry	https://www.genetests.org
	Leiden open variant database (links to many locus-specificdatabases)	http://www.lovd.nl/3.0/home
	HGMD (The Human Gene Mutation Database)	http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php
Bases de données d'oncologie	Catalogue of somatic mutations in cancer (COSMIC)	http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic
	The cancer genome atlas (TCGA)	http://cancergenome.nih.gov/
	OncoKB (annotated TCGA data)	http://oncokb.org/#/
	dbSNP	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/
	JAX CKB	https://www.jax.org/clinical-genomics/ckb
	My cancer genome	https://www.mycancergenome.org/

8. Outils bio-informatiques utilisés

En plus des fichiers BAM, Fastq et VCF exploités pour réaliser l'analyse bio-informatique, il existe d'autres bases de données génomiques qui peuvent être utilisées dans le cadre de l'étude des données de séquençage d'exome :

✓ **Ensembl** : (<http://www.ensembl.org/index.html>) base de données génomique impliquée dans la recherche en génomique comparative, évolution des espèces, étude des variants et de la fonction de régulation de la transcription. Ensembl permet de réaliser l'annotation des gènes, effectuer des alignements, étude de régulation et rassembler des données sur les maladies. Les applications proposées par Ensembl incluent BLAST, BLAT, BioMart et le VEP (Variant Effect Predictor) concernant toutes les espèces étudiées.

✓ **UCSC** : (<https://genome.ucsc.edu>) base de données génomique en ligne et spécifique à l'Université de Californie à Santa Cruz (UCSC). C'est un site Web interactif permettant d'avoir un accès aux données de séquences du génome de plusieurs espèces, avec une grande quantité d'annotations alignées. Le site se présente comme une visionneuse graphique performante permettant une interaction rapide avec l'utilisateur. Il comporte une série d'applications Web, élaborée à partir d'une base de données MySQL, qui offre un accès, évaluation et recherche simples et rapides des données à plusieurs échelles. La base de données, les outils, les fichiers et les documents nécessaires pour l'usage sont disponibles sur le site Web de UCSC Genome Bioinformatics.

✓ **Primer3** : (www.primer3.ut.ee) Logiciel permettant de faire la conception des amorces de la séquence d'intérêt et d'obtenir les informations relatives à leur fabrication.

✓ **SIFT** : (Sorting Intolerant from Tolerant) : Il s'agit d'un outil de prédiction qui permet de réaliser l'alignement des séquences et d'obtenir un score qui qualifie une variation comme étant : pathogène, potentiellement pathogène, limite ou bénigne.

✓ **PolyPhen-2** : (Polymorphism Phenotyping): <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2> outil qui se base sur des données de séquences ainsi que des données structurales, quand la structure expérimentale de la protéine étudiée ou d'une protéine semblable à plus de 50% est exploitable .

9. Séquençage par la méthode Sanger

Tout variant potentiellement pathogène retrouvé par séquençage à haut débit (panel de gènes ou Exome) doit faire l'objet d'une confirmation par séquençage Sanger.

9.1. Détermination de la séquence à amplifier

La détermination de la séquence d'ADN d'intérêt est indispensable pour réaliser une amplification. Plusieurs bases de données génomiques en ligne (NCBI, Ensembl, UCSC, GeneAtlas...) sont exploitées à cet effet. Elles offrent également la possibilité de déterminer les séquences de référence (RefSeq). Cette dernière est une référence stable exploitée pour l'annotation du génome, la détection des gènes et l'étude des mutations et des polymorphismes pour les travaux cliniques et fonctionnels et les études comparatives.

Pour chaque gène, une ou plusieurs RefSeq peuvent lui être attribuées. En fonction des transcrits analysés de ce gène, on lui associe alors une référence NM (pour « Natural mRNA »).

9.2. Conception des amorces

Dans cette étude, nous avons exploité les outils UCSC et Primer3 pour identifier les amorces permettant d'amplifier spécifiquement une séquence d'ADN d'intérêt par PCR. Il est nécessaire d'avoir au moins un couple d'amorces. Il s'agit d'oligonucléotides d'une longueur variant entre 10 et 30 nucléotides. Ils sont fabriqués par méthode chimique et doivent faire preuve d'une complémentarité optimale avec les deux extrémités de la séquence qui doit faire l'objet de l'amplification.

9.3. PCR et contrôle

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est réalisée dans un tube de 200 µl et un volume final de 50 µl. Le mélange réactionnel comporte l'ADN génomique, un mélange constitué d'une solution tampon, de MgCl₂, des dNTP, la Taq polymérase et de l'eau distillée. Ce mix a été introduit dans un thermocycleur ABI 9700 (Applied Biosystems) pour amplifier le gène d'intérêt (annexe. 4).

L'amplification des séquences d'ADN cibles par la technique de PCR (Réaction de Polymérisation en Chaîne) est nécessaire, en exploitant la caractéristique de fonctionnement cyclique d'une ADN polymérase particulière qui est la Taq polymérase. Les exons d'intérêt sont amplifiés par la réalisation de copies successives en utilisant des amorces et une ADN polymérase à caractère thermostable (annexe. 4) en réalisant les cycles de la PCR avec leurs températures adaptées : Dénaturation (95°C), hybridation (la température optimale ou

s'effectue l'hybridation des amorces se situe entre $T_m=52^{\circ}\text{C}$ et $T_m=62^{\circ}\text{C}$) et élongation (72°C) (figure 17). Chaque cycle d'amplification dure entre 15 secondes et 7 minutes. L'exon d'intérêt étant multiplié à chaque cycle, le taux théorique d'amplification est de 2^n . Après 21 cycles de PCR, le nombre de copies de l'exon d'intérêt est estimé à des dizaines de millions de fois supérieur à celui de toute autre séquence présente sur le génome. Cette amplification permet le séquençage facile de l'exon cible.

Après amplification, le produit d'une PCR est composé d'une ou de plusieurs séquences d'ADN qui représentent les séquences d'intérêt. Le contrôle de ces produits, afin de vérifier la réussite de la PCR et d'écarter la présence de toute amplification non souhaitée, est effectuée

Par migration électrophorétique sur gel d'agarose (1%). Les fragments d'ADN sont alors mis en évidence à l'aide d'une coloration au bromure d'éthidium (BET) qui permet de les visualiser, en révélant la présence d'une bande unique par exposition aux ultraviolets

(annexe. 4).

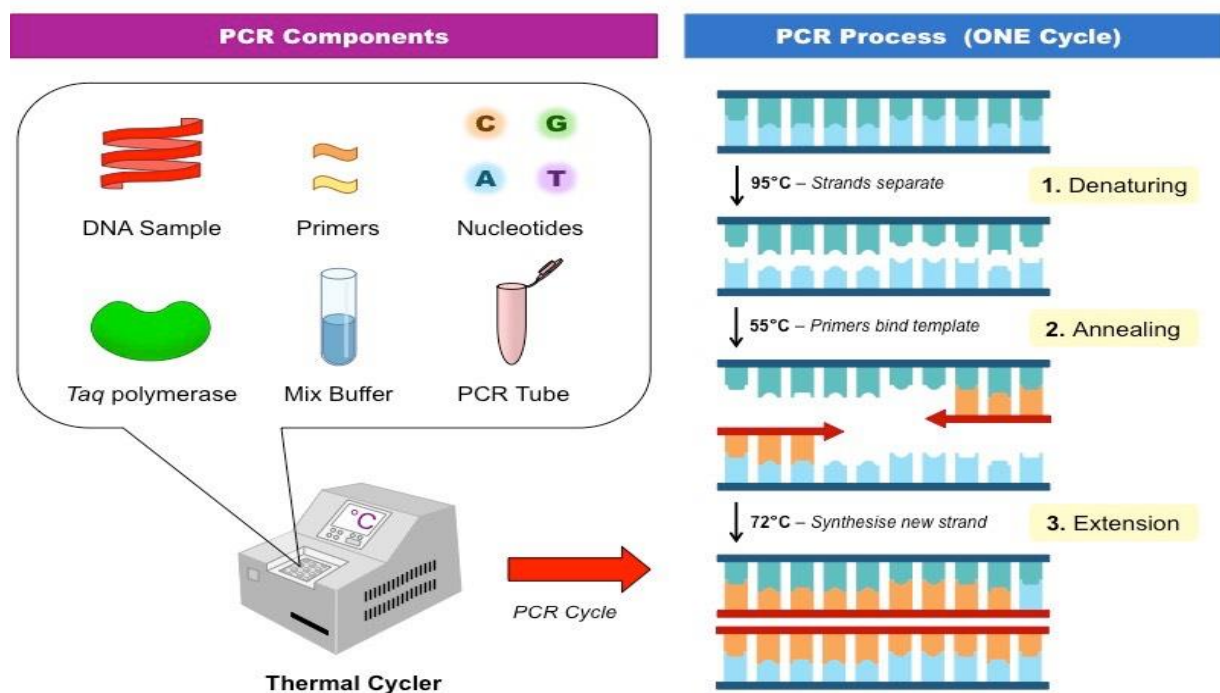


Figure 17 : Mélange réactionnel et différents cycles de la PCR

9.4. Purification du produit de PCR

Suite à la PCR, une étape de purification du produit est nécessaire pour supprimer les amorces et les Dntp restants, non utilisés dans le mix réactionnel. Si cette opération n'est pas réalisée, ces résidus risquent de gêner les réactions ultérieures (séquençage). Dans ce travail, nous avons eu recours la méthode de purification enzymatique par ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (annexe. 5)

Cette technique emploie deux enzymes hydrolytiques : l'exonucléase I et la Shrimp phosphatase alcaline (SAP), toutes les deux associées dans un mix avec un tampon fabriqué pour favoriser leur activité en une seule réaction. L'exonucléase a pour rôle de supprimer l'excédent d'amorces au niveau du produit de PCR, et la SAP a pour effet de déphosphoryler les dNTPs restants dans le but d'éviter leur migration et réinclusion dans les fragments d'ADN. Ces enzymes exercent leur effet par incubation à 37°C pendant 15 min et définitivement inactivées par un chauffage à 80°C pendant 15 min.

9.5. Réaction de Séquence

Concernant la réaction de séquence, nous avons utilisé le kit Big Dye terminator v3.1 cycle sequencing kit (Thermo Fisher Scientific). Ce kit est sous forme d'un mélange composé d'une taq polymérase, des dNTP, des ddNTP marqués par un fluorochrome, du MgCl₂ et une solution tampon. Ce produit est ensuite mis dans un tube de 200 µl avec le produit de PCR purifié, une amorce sens ou anti-sens et de l'eau distillée (figure. 18). Le mix réactionnel va subir après une amplification de 30 cycles dans le thermocycleur à des conditions particulières (annexe. 5).

9.6. Purification de la réaction de séquence par Sephadex G50

La réaction de séquence va faire l'objet d'une purification par méthode de chromatographie d'exclusion, désignée aussi par chromatographie de filtration sur gel ou tamisage moléculaire. Cette technique a été élaborée en 1959 avec un nouveau produit : le Sephadex. Il s'agit d'un gel de dextrane qui, après polymérisation, prend l'aspect de billes poreuses très hydrophiles. Nous disposons de plusieurs types de Sephadex selon la taille des billes et de leur porosité (annexe. 6).

Cette purification est indispensable pour capter les sels et les ddNTP libres, non utilisés dans le produit de la réaction de séquence, car ces ddNTP libres pourraient altérer les signaux de fluorescence caractéristiques au cours du séquençage automatique.

Après purification des produits de réaction de séquence, nous les avons déposés au niveau de l'appareil ABI prism 3130 DNA sequencer à 16 capillaires (life technologies) afin de réaliser le séquençage automatique. Par la suite, nous avons réalisé l'alignement et l'étude des séquences par le logiciel d'analyse des variants d'ADN (Mutation Surveyor® software).

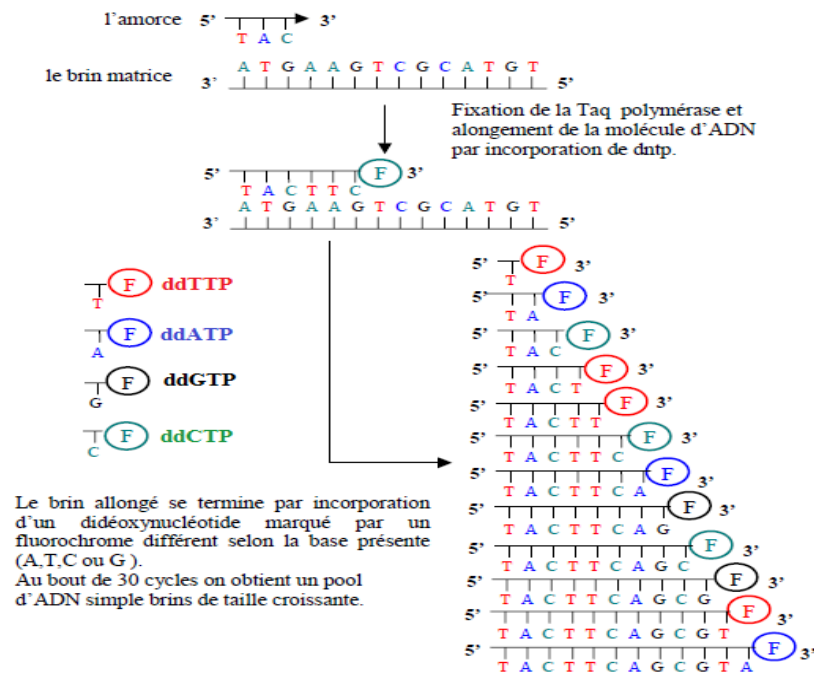


Figure 18 : Principe de la réaction de séquence

Le séquençage Sanger est basé sur la réplification de l'ADN par l'ADN polymérase et des amorces ciblant particulièrement la séquence cible en incluant les dNTPs présents dans le mix réactionnel. En plus de ces dNTPs, les didésoxyribonucléotides interrupteurs de chaîne (ddNTP), seront inclus arbitrairement par l'ADN polymérase lors de la réplification. Les ddNTPs sont distingués des dNTPs par leur extrémité 3'. L'extrémité 3' hydroxyle (OH) des dNTP est substituée par un hydrogène (H) dans les ddNTP. Ce changement s'oppose à la formation de la liaison phospho-diester entre le ddNTP inclus et le nucléotide suivant ce qui inhibe la synthèse du fragment d'ADN (Facio, Sapp et al. 2012).

Au niveau du mix réactionnel les ddNTP sont additionnés de façon à ce qu'ils soient incorporés théoriquement à toutes les niveaux possibles de la séquence d'ADN à analyser.

Par conséquent, nous obtiendrons à la fin de la réaction de séquence, un produit qui comporte des fragments d'ADN de tailles variable selon le niveau d'incorporation du ddNTP

(figure. 19).

Le produit de cette réaction de séquence sera déposé au niveau d'un appareil automatique (le séquenceur) qui va réaliser une migration sur un gel de polyacrylamide qui est très distinctif et va différencier tous les fragments présents selon leur taille.

Les ddNTP (A, C, G et T) sont chacun distingués par un fluorochrome avec un spectre d'émission. Au cours de la migration capillaire des fragments d'ADN au niveau du séquenceur automatique, une stimulation de ces fluorochromes par un rayon laser permet de d'émettre des signaux fluorescents qui seront captés à des niveaux fixes. Au cours de la détection des signaux, la séquence est enregistrée, puis mise en évidence sous forme de pics de quatre couleurs définissant la succession des nucléotides qui forment une séquence d'ADN.

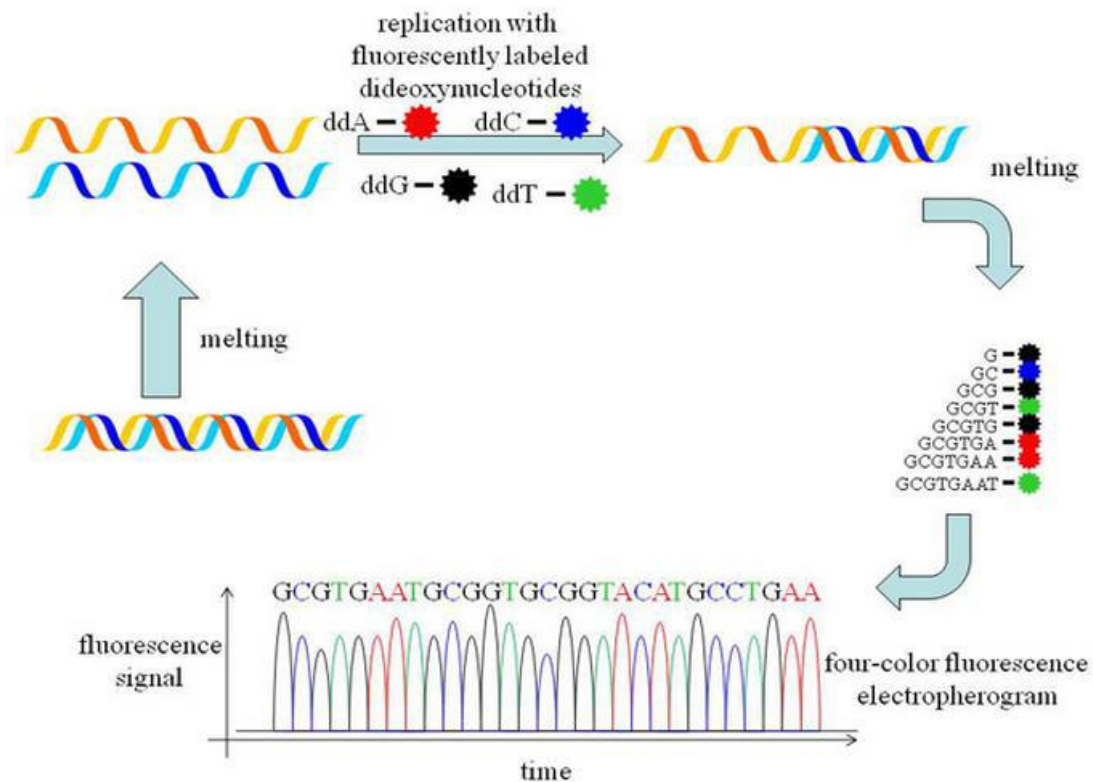


Figure 19 : Principe de séquençage automatisé d'ADN par la méthode de Sanger

E. RESULTATS

E : RESULTATS

Les méthodes d'analyse décrites dans la section précédente permettent d'atteindre les objectifs fixés dans cette thèse de doctorat. Nous présentons ici, les travaux effectués durant ces quatre ans et dont deux résultats sont présentés ci-dessous sous forme de : Deux articles publiés dans l'objectif principal d'établir un diagnostic précis pour les maladies rares et adapter et améliorer leur prise en charge.

Dans ce sens, l'analyse de CGH-array et le séquençage d'exome entier ont permis d'identifier respectivement les anomalies causales dans une forme rare de cardiopathie congénitale et chez une famille atteinte d'une dystrophie cornéenne atypique.

1. Résultat génétique de la patiente atteinte d'une Cardiopathie Congénitale

L'étude cytogénétique classique du propositus a montré un caryotype féminin anormal avec une délétion terminale du bras long d'un chromosome 15 (figure. 20). Le caryotype de la patiente a été désigné par la formule cytogénétique suivante 46,XX?del(15q)dn alors que les deux parents présentaient des caryotypes normaux. Ainsi le caryotype constitutionnel fait partie du bilan de toute cardiopathie quand elle est associée à une dysmorphie faciale et un retard psychomoteur ou quand la cardiopathie s'inscrit dans un tableau de syndrome polymalformatif.



Figure 20 : (a,c) Caryotype du propositus en bandes R à haute résolution (Flèche rouge). (b,c) caryotype partiel (RHG) montrant une délétion du chromosome 15q avec un bras q anormalement court

Dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire clinique du Diagnostic du génome humain-Nijmegen-Pay bas, le résultat de CGH-array nous a été communiqué, par la suite. Cette analyse pangénomique a confirmé le résultat du caryotype et cartographié la délétion terminale à une région de 9,15 Mb englobant 36 gènes annotés avec le point de rupture proximal à 93 275 228 Mb dans la bande q26.1 (figure. 21).

Sur la base de ces résultats, le caryotype final a été désigné par la formule cytogénétique suivante :

46, XX, del(15)(q26.1)dn.arr[GRCh37]15q26.1q26.3 (93,275,228-102,429,113) x1.

En plus de cette perte terminale du chromosome 15, plusieurs régions homozygotes ont été détectées (164 Mb du génome autosomique (~ 5,6%)), ce qui est en accord avec la consanguinité indiquée chez les parents(Benbouchta, De Leeuw et al. 2021).

2. Résultats d'une famille marocaine atteinte de dystrophie cornéenne atypique

FSR

données de bioinformatiques (ClinVar, Zenodo, LOVD (Leiden Open Variation Database) et dans la littérature et suite à cette étude nous l'avons introduite dans ces bases de données. Les trois patientes affectées ont la même mutation avec des aspects phénotypiques différents. Cette mutation est associée à la dystrophie cornéenne de Thiel-Behnke (TBCD).

L'analyse bioinformatique utilisant les outils de prédiction Polyphen-2 et SIFT a suggéré que cette mutation était probablement pathogène. Un degré élevé de conservation de cet acide aminé a été démontré par un score de 5,52 calculé par Genomic Evolutionary Rate Profiling (GERP) <http://mendel.stanford.edu/SidowLab/downloads/gerp/index.html>. L'alignement comparatif des séquences d'acides aminés du *TGFBI* à travers différentes espèces a révélé que cette mutation s'est produite à des positions hautement conservées (figure. 23.B) (https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Tools/Blast).

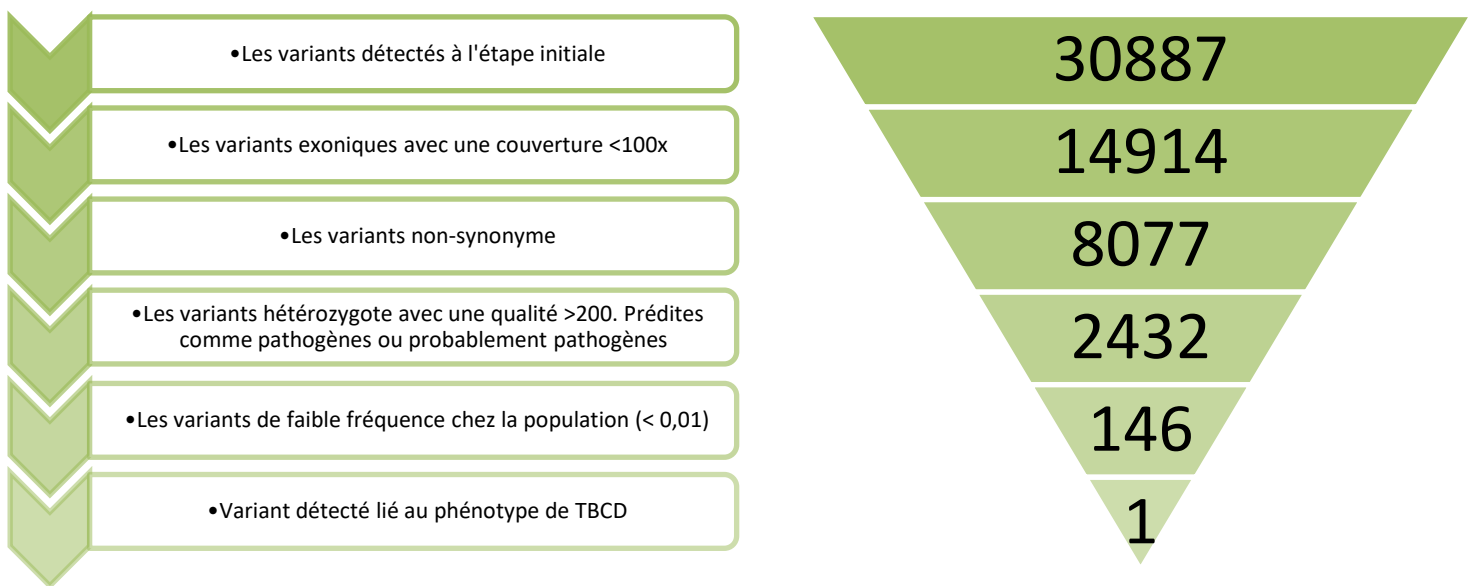


Figure 22 : Analyses bioinformatiques du séquençage de l'exome entier chez trois membres de la famille atteinte de dystrophie cornéenne atypique (IV-7, IV-8 et III-2) (Benbouchta, Cherkaoui Jaouad et al. 2021)

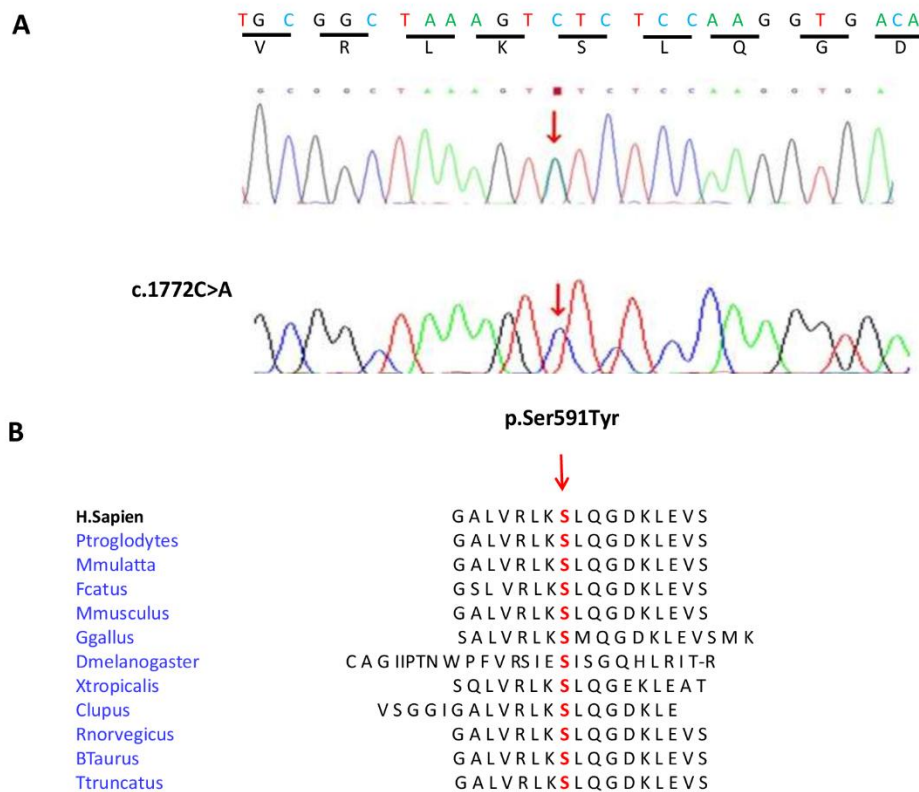


Figure 23 : A. Électrophérogrammes montrant la mutation c.1772C > A hétérozygote chez les patients (IV-7, IV-8 et III-2) et l'absence de la mutation chez les individus non affectés (IV-1, IV-3). B. Alignement de séquences protéiques orthologues de TGFBI provenant de différentes espèces avec mise en évidence de la conservation de l'acide aminé sérine en position 591 (https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Tools/Blast)

Légende



Indique la position de la mutation et Le résidu muté sérine (S)
au niveau du codon 591

Pour démontrer l'impact de la mutation c.1772 C>A;(p.S591Y) identifiée chez la famille de dystrophie cornéenne sur la protéine TGFBI, nous avons utilisé un outil de prédiction protéique en ligne Swiss-Model-Expasy qui est un serveur de modélisation d'homologie de

structure protéique entièrement automatisé qui effectue une comparaison entre la protéine sauvage et la protéine mutée.

A



B

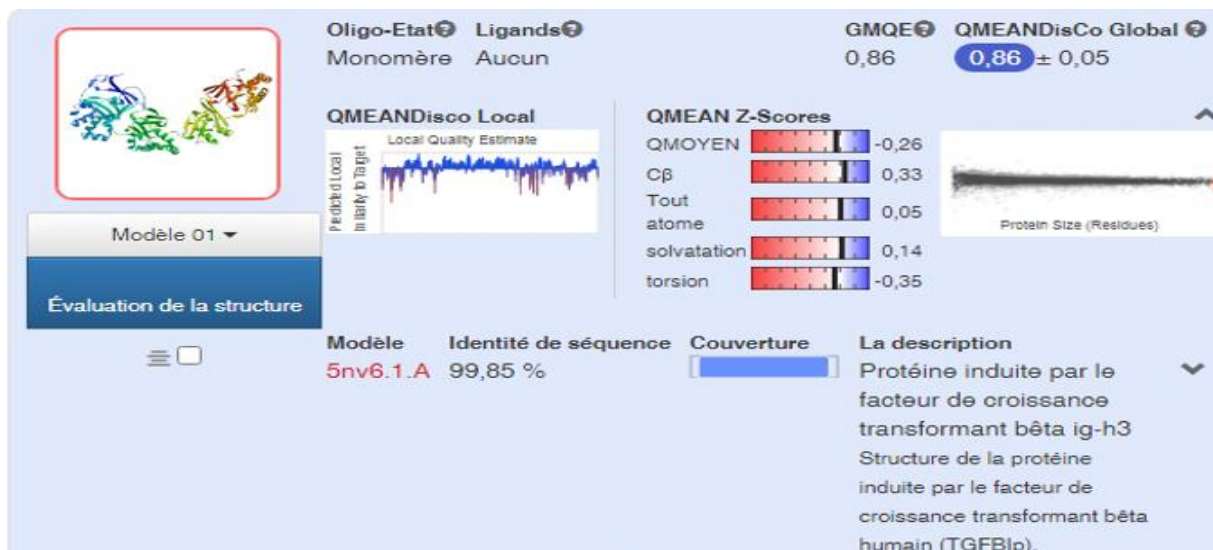


Figure 24 : A. Résultat de la protéine TGFBI normale. B. Résultat de la protéine mutée S591Y par Swiss-Model

On observe que l'identification de la séquence sauvage est de 100% et celle de la protéine mutée est de 99.85% (figure. 25. (A. B)). L'évaluation se fait par les scores de résidu qui sont estimés avec la fonction de notation QMEANDisCo (Studer et al.). QMEANDisCo est un score composite pour l'estimation de la qualité d'un modèle unique qui est de $0,86 \pm 0,05$ pour la protéine mutée et de $0,87 \pm 0,05$ pour la protéine sauvage. Il utilise des scores de modèle unique adaptés à l'évaluation de modèles individuels, étendus avec une composante de consensus en exploitant en outre les informations provenant de structures protéiques déterminées expérimentalement qui sont homologues au modèle évalué. En effet, des méthodes qui estiment la qualité d'un modèle de structure protéique 3D en l'absence d'une structure de référence expérimentale sont cruciales pour déterminer l'utilité d'un modèle et ses applications potentielles. L'estimation globale de la qualité du modèle (GMQE) appliqué à notre mutation est de (0,86) qui est très significatif quant à l'impact de la mutation sur la protéine. Le score de confiance est de 0,79 qui rend les identifications de protéines évaluables. La protéine mutée S591Y est de qualité légèrement médiocre (Qmoyen à -0,26), ainsi, 4 termes du score global de qualité QMEAN ont été utilisés :

- Le potentiel d'interaction entre les atomes ($C\beta$) est de qualité médiocre car inférieur à 0,6 soit 0,33,

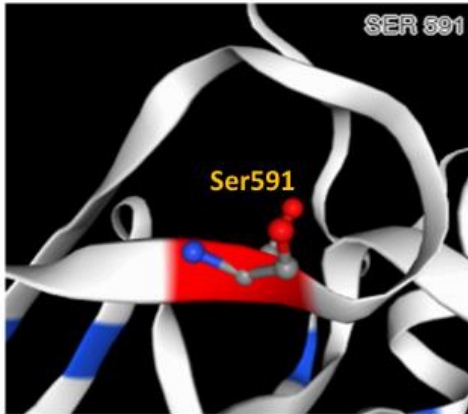
- Le potentiel d'interaction entre tous les atomes à 0,05 pour une valeur normale entre 0 à 0,05

- Le potentiel de solvation à 0,14 pour une valeur normale de 0,19 à 0,15.

- Le potentiel d'angle de torsion à -0.35 pour une valeur normale de -0,05 à -0,35.

Par conséquent, la mutation S591Y entraîne un changement de la configuration tridimensionnelle de la protéine TGFBIp (figure. 26. B)

A. Type sauvage



B. mutant S591Y

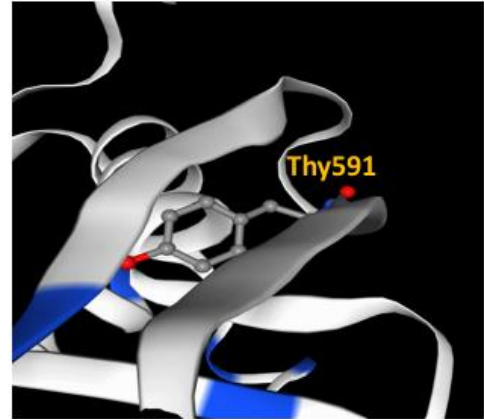


Figure 25 : Structures tridimensionnelles de : A. la protéine sauvage représentée par le résidu serine en position 591 et B. la protéine mutée par la présence du résidu tyrosine qui est dû à la substitution de C en A (c.1772 C>A (p.S591Y)) au niveau de l'exon 13 du gène *TGFBI* (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>)

F. DISCUSSIONS

E. DISCUSSIONS

1. Discussion du cas de la Cardiopathie Congénitale

Les aberrations chromosomiques sont fréquemment rapportées dans les malformations cardiaques. Près de 10% des enfants atteints de cardiopathie congénitale sont porteurs d'un déséquilibre chromosomique, correspondant principalement à des trisomies autosomiques et au syndrome de Turner (monosomie X ou équivalents) (Iselin, Almagbaly et al. 1997, Viot 2002, Hinton Jr, Yutzey et al. 2005). Cependant, toutes les anomalies chromosomiques peuvent être à l'origine d'un défaut d'organisation embryonnaire du cœur. La prévalence des cardiopathies congénitales varie selon les auteurs entre 3 et 12‰ (Gillum 1994, Hoffman 1995, Ferencz 1997, Cloarec, Magontier et al. 1999, Robert-Gnansia, Francannet et al. 2004, Arlettaz and Bauersfeld 2005, Marijon, Tivane et al. 2006), avec une prévalence moyenne de 5 à 8‰ dans les séries les plus anciennes, un taux inférieur à 5‰ semblant être une étude incomplète (Borman, Chapman et al. 1987). Celle-ci varie selon l'âge de la population étudiée et est estimée à 8‰ avant l'âge de 1 an et 12.5‰ avant l'âge de 16 ans (Cloarec, Magontier et al. 1999). En effet, Les grandes variations de la prévalence observées dans la littérature sont la conséquence des différences de moyens de diagnostic et de méthodologie.

La délétion 15q26 est un désordre chromosomique très rare décrit dans la littérature chez quelques cas seulement. Les patients porteurs de cette aberration présentent de nombreux symptômes en particulier, un retard de croissance pré et postnatal, une microcéphalie, une déficience intellectuelle et diverses malformations congénitales. Quatre gènes candidats ont été impliqués chez notre proband à savoir *IGF1R*, *NR2F2*, *MEF2A* et *CHD2*. Jusqu'à présent, 58 cas de délétion pure ont été documentés dans la littérature (Midro, Lurie et al. 2008, Poot, Stuart et al. 2013). Les sous-bandes impliquées dans ce réarrangement comprennent de nombreux gènes candidats responsables de symptômes communs, notamment le retard de croissance pré et postnatal (Abuzzahab, Schneider et al. 2003), le retard de développement et la microcéphalie. D'autres gènes étaient impliqués dans des anomalies plus particulières comme la cardiopathie congénitale (CHD) (Nakamura, Makita et al. 2011), les anomalies squelettiques (Veenma, Eussen et al. 2010), la hernie diaphragmatique (Slavotinek, Moshrefi et al. 2006), les anomalies rénales (IW 2008) et l'épilepsie (Capelli, Krepischi et al. 2012). Cette variabilité pourrait être attribuée à la différence de l'emplacement du point de rupture et à la taille du fragment délété (Figure. 26).

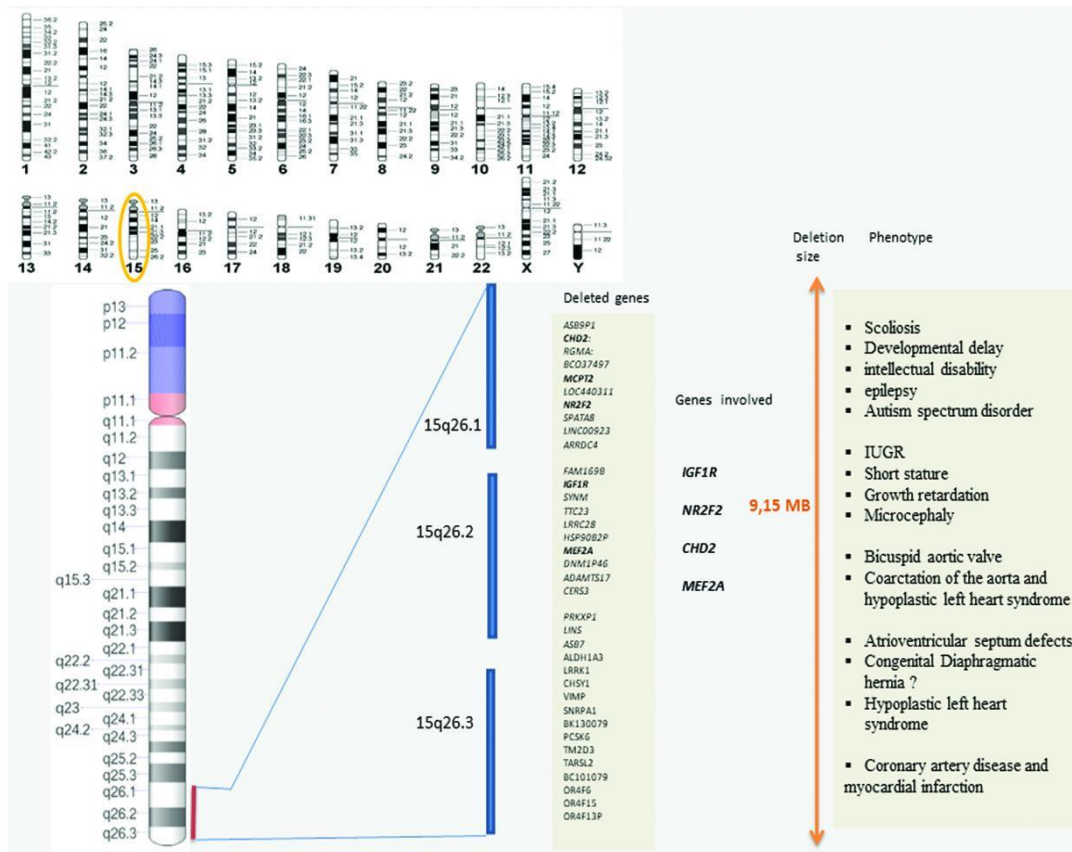


Figure 26 : Diagramme de la délétion 15q26.1-q26.3 montrant les trente-six gènes absents ainsi que les quatre gènes impliqués dans le phénotype de notre patiente

Parmi les principales anomalies cardiaques figurent les TSA / VSD et l'anomalie de l'arc aortique. La valvulopathie, la persistance du canal artériel, le shunt cardiaque et le cœur hypoplasique ont été décrits de manière irrégulière. Notre patiente partageait certaines de ces anomalies, à savoir les TSA et le shunt cardiaque, mais elle ne présentait pas de VSD, d'AAA et de défaut valvulaire. La cardiomégalie était une caractéristique inhabituelle rapportée exclusivement chez notre patiente. En effet, la communication interauriculaire a entraîné la formation de shunts importants, ce qui a conduit à une surcharge volumique de l'oreillette droite et du ventricule et par conséquent notre patiente a développé une cardiomégalie.

A notre connaissance et selon la base de données DECIPHER, la suppression d'un intervalle de 9,15MB au niveau du chromosome 15q26 n'a jamais été décrite auparavant. Le travail de cette première partie s'est concentré sur les principaux gènes qui pourraient être potentiellement impliqués dans le développement des maladies cardiaques chez les

patients ayant une monosomie 15q26, à savoir le gène *NR2F2* impliqué respectivement dans les AVSD et les AAA / cœur gauche hypoplasique. La scoliose et le retard mental chez notre patiente s'expliqueraient tous deux par la délétion du gène *CHD2*. Le phénotype de notre patient pourrait également être attribué au taux élevé de régions homozygotes décrites par la technique CGH-array, sans exclure également la contribution possible de facteurs épigénétiques et environnementaux. La monosomie 15q26 doit être envisagée lorsque le retard de croissance est associé à une clinodactylie et / ou une anomalie du gros orteil, une anomalie cardiaque principalement TSA / VSD et / ou AAA. La prise en charge des patients avec délétion 15q26 doit être multidisciplinaire avec un suivi endocrinologique et une éventuelle thérapie par l'hormone de croissance (Ho, Clayton et al. 2015), cure de chirurgie cardiovasculaire, bilan cardiaque régulier, traitement neurochirurgical de la scoliose, soins orthopédiques, suivi psychomoteur, orthophonie, thérapie éducative et comportementale. Par ailleurs, sur le plan chronologique, les résultats fournis par le caryotype standard manquent de sensibilité pour détecter des anomalies inférieures à 5-10 Mb, la résolution peut être significativement augmentée par la technique de CGH-array. Les microdélétions et les microduplications, sont responsables d'un nombre important de malformations et de retard mentaux. L'une des découvertes majeures fut la mise en évidence de délétions du gène *IKAROS* à l'origine de l'acutisation des leucémies myéloïdes chroniques (Georgopoulos, Bigby et al. 1994, Mullighan, Miller et al. 2008, Iacobucci, Storlazzi et al. 2009, Mullighan 2012). La CGH-array permet un processus inverse où l'indentification de l'anomalie chromosomique précède la description phénotypique. Ainsi, la CGH-array permet d'aller du génotype au phénotype. De nombreux syndromes ont été ainsi décrits cliniquement comme la délétion 17q21.31(Koolen, Vissers et al. 2006). Ces résultats montrent que l'analyse chromosomique par CGH-array au-delà de son intérêt diagnostique et pour le conseil génétique, permet d'établir de nouvelles corrélations génotype-phénotype et d'identifier de nouvelles régions potentiellement impliquées dans des pathologies rares. Cette partie souligne aussi les difficultés et les limites de la stratégie d'identification de nouveaux gènes par CGH-array. La CGH-array a donc des Limites, à l'inverse du caryotype, la CGH-array ne détecte pas les anomalies chromosomiques équilibrées. Une étude récente a montré qu'une translocation ou inversion *de novo* équilibrée ne serait pas détectée dans environ 0.23% des cas (Hochstenbach, van Binsbergen et al. 2009). Les anomalies équilibrées sont le plus souvent retrouvées chez des individus sains. Leur découverte se

fait dans le cadre d'un bilan de fausses couches à répétition (liées à la transmission du remaniement sous forme déséquilibrée à la descendance), d'hypofertilité ou de manière fortuite. Le caryotype conserve donc sa place dans ces indications. Dans les rares cas où un remaniement équilibré de novo est retrouvé chez un patient avec une déficience intellectuelle et/ou aux malformations congénitales (DI et/ou MC), il est très difficile d'affirmer qu'il est à l'origine des signes cliniques observés. Enfin, la CGH-array ne détecte pas les remaniements déséquilibrés présents en mosaïque dans moins de 10-20% des cellules, ce qui peut être le cas pour les marqueurs chromosomiques. Par ailleurs, sur le plan de la recherche, il existe une très grande variabilité phénotypique intra et interfamiliale et une pénétrance incomplète. C'est ainsi que dans la littérature, les délétions du gène *CHRNA7* par la technique CGH-array peuvent être responsables d'une déficience intellectuelle (Sharp, Mefford et al. 2008, Gillentine and Schaaf 2015). De même, on observe des délétions en 16p11.2 qui sont associées à une obésité alors que des duplications de cette même région sont associées à des retards de croissance et à des formes d'anorexie, car elles impliquent le gène *SHB2* qui joue un rôle clé dans le contrôle cérébral des signaux qui régissent le stockage des graisses, l'utilisation de sucre, le bilan énergétique et le poids (Walters, Jacquemont et al. 2010, Jacquemont, Reymond et al. 2011). La CGH-array est un outil précieux pour l'identification de gènes impliqués dans des pathologies constitutionnelles et acquises.

Tableau 9 : Données cliniques et cytogénétiques chez les patients atteints d’une délétion « pure » 15q26

Découverte Clinique	Our case	Dateki 2011 (Dateki, Fukami et al. 2011)	Poot 2007 (Poot, Eleveld et al. 2007)	Tönnes 2001 (Tonnes, Schulze et al. 2001)	Nakamura 2011 (Nakamura, Makita et al. 2011)	Slavotinek 2006 (Slavotinek, Moshrefi et al. 2006)		Hengstschlager 2004 (Hengstschlager, Mittermayer et al. 2004)	Bhakta 2005 (Bhakta, Marlin et al. 2005)	Rump 2008 (Rump, Dijkhuizen et al. 2008)	Choi 2011 (Choi, Kang et al. 2011)	Chui 2015 (Ho, Clayton et al. 2015)	Biggio 2004 (Biggio, Descartes et al. 2004)	Okubo 2003 (Okubo, Siddle et al. 2003)	O'Riordan 2016 (O'Riordan, McGrath et al. 2017)	Lopez 2006 (Lopez, Bafalliu et al. 2006)
Age	4y	13y 9m	8y 6m	19 m	33 weeks	newborn	newborn	newborn	newborn	6 m	2 y	3 y	newborn	10 y	newborn	fetus/19 wg
Genre	F	F	F	F	F	F	F	F	F	M	M	F	F	F	M	F
Position de la délétion15q26	15q26.1qter	15q26.2qter	15q26.2qter	15q26.1	15q26.2	15q26.2	15q26.2	15q26.1qter	15q26.1qter	15q26.2qter	15q26.2qter	15q26.2qter	15q26.1qter	15q26.1qter	15q26.2qter	15q26.1qter
Taille de la Délétion	9,15 Mb	5 Mb	6,87Mb	NA	5,78 Mb	NA	NA	NA	NA	5.8 Mb	8.58 Mb	NA	NA	NA	6.554 Mb	NA
Origine	De novo	De novo	De novo	De novo	NA	De novo	NA	De novo	NA	De novo	NA	NA	NA	De novo	De novo	De novo
IUGR	+	-	+	+	+	NA	NA	+	+	-	+	NA	-	+	NA	+
Microcéphalie	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	NA	+	+	NA
Retard de croissance	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NA	+	+	NA
Retard Psychomoteur	+	NA	+	+	+	NA	NA	NA	+	+	NA	+	NA	+	+	NA
Déficiences Intellectuelle	+	+	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Caractéristique dysmorphique faciale	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NA
Pont nasal large	+	-	-	+	NA	NA	+	NA	+	+	-	-	+	-	NA	NA
Micrognathie	+	-	+	+	+	NA	+	NA	NA	-	-	+	+	-	NA	NA
Anomalie de l'oreille	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	NA
Anomalie oculaire	+	-	+	-	NA	NA	NA	NA	NA	+	+	+	NA	+	NA	NA
Anomalie cardiaque	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+
Cœur Hypoplasique	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Hypertrophie du cœur	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SunthCardiaque	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Anomalie de la crosse aortique	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-

Communication ventriculaire	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
Persistance du canal artériel	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Communication interauriculaire	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
Défaut valvulaire	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Hypoplasie pulmonaire	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Hernie diaphragmatique	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+
Anomalie renale	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
Anomalie squelettiques	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Clinodactylie	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-
Déformation du pied	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-

Enfin, dans cette première partie, le diagnostic des cardiopathies congénitales au cours de la période néonatale s'avère nécessaire pour améliorer le pronostic. Par ailleurs, la coopération multidisciplinaire est un élément crucial de la prise en charge de l'enfant cardiaque. L'absence de couverture sociale chez la majorité des patients contribue au vieillissement des cardiopathies congénitales et à l'apparition de complications secondaires.

2. Etude génétique d'un cas familial atteint de la dystrophie cornéenne

Les dystrophies cornéennes sont un groupe hétérogène de maladies cornéennes bilatérales non inflammatoires, génétiquement déterminées, généralement limitées à la cornée. La CD se caractérise par une grande variabilité de l'âge d'apparition, de l'évolution et de l'impact visuel et par l'accumulation de dépôts insolubles à différentes profondeurs dans la cornée. L'examen clinique révèle de multiples opacités granulaires antérieures superficielles, épithéliales et stromales bilatérales à différents stades de gravité. Au total, 107 gènes sont impliqués dans les CD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Le but de cette étude était d'identifier des variants pathogènes à l'origine d'une dystrophie cornéenne atypique dans une grande famille marocaine et de décrire le phénotype clinique à des stades d'évolution très différents.

La cornée périphérique n'est généralement pas impliquée mais peut être affectée avec le temps chez les patients plus âgés. Alors que le RBCD a un phénotype de type géographique, sur le plan histopathologique, le TBCD est caractérisé par une alternance d'épaississements et d'amincissements irréguliers et d'une absence focale de la membrane basale épithéliale.

La couche de Bowman est remplacée par une cicatrice fibrocellulaire superficielle avec un motif en dents de scie ondulé pathognomonique ou des fibres « frisées ». La prévalence de la TBCD est inconnue. Seuls quelques cas ont été signalés dans les populations européennes, aux États-Unis, au Japon et dans d'autres ethnies, mais aucun n'a été signalé dans les populations d'Afrique du Nord (Mashima, Nakamura et al. 1999, Hammar, Lagali et al. 2010). A notre connaissance, des mutations (p.Arg555Gln; p.Arg555Trp) dans le gène *TGFBI* et dans la même position ont également été rapportées par Xiang Yuan (Yu, Qiu et al. 2015, Xiang, Yuan et al. 2019) et étaient corrélées au TBCD (Munier, Frueh et al. 2002, Zhao, Nakamura et al. 2007, Kheir, Cortés-González et al. 2019). Dans cette étude, nous avons identifié une nouvelle mutation dans le gène *TGFBI* (c.1772C>A;p.Ser591Tyr). À notre connaissance, l'association de la mutation p.Ser591Tyr

avec le TBCD n'a pas été rapportée précédemment et n'est pas répertoriée dans LOVD v.3.0 (base de données ouverte de variations de Leiden). Le gène *TGFBI* est localisé sur le chromosome 5q31.1 et code pour une protéine de 17 exons composée de 683 acides aminés (Gruenauer-Kloevekorn, Clausen et al. 2009, Han, Sim et al. 2012). Cette protéine est impliquée à la fois dans l'adhésion cellulaire et la séquence de reconnaissance d'intégrine. Cependant, la protéine de matrice extracellulaire (TGFBIP) contient un domaine de type EMILIN riche en cystéine N-terminale, quatre domaines consécutifs et hautement homologues de la fascicline 1 (FAS1) et un motif C-terminal arginine-glycine-acide aspartique (Lakshminarayanan, Chaurasia et al. 2014, Courtney, Poulsen et al. 2015). Tous les variants pathogènes ont provoqué l'accumulation de matière extracellulaire insoluble dans la cornée (Kannabiran and Klintworth 2006). L'accumulation de fragments de TGFBIP aberrante a été démontrée dans les dépôts cornéens (Korvatska, Munier et al. 1999). Il apparaît que les mutations sont également susceptibles de modifier les voies de dégradation des protéines et d'avoir un impact sur la structure et la stabilité des protéines agrégées (Han, Sim et al. 2012). La plupart des mutations du gène *TGFBI* associées à la CD sont hétérozygotes et certains patients porteurs de mutations homozygotes ont un phénotype plus sévère, indiquant que l'effet toxique potentiel a un effet dose-effet (Paliwal, Sharma et al. 2010). La mutation p.Ser591Tyr devrait être délétère et est située dans le quatrième domaine (domaine Fasc 4). Sur tout le gène *TGFBI*, les mutations décrites, à l'exception de p.Arg124Cys, sont situées exactement à la frontière ou dans ce domaine. Ce domaine est suspecté d'avoir une action directe et spécifique par interaction avec d'autres protéines inconnues (Runager, Basaiaawmoit et al. 2011).

Il a été rapporté que les deux points chauds du gène *TGFBI* sont associés aux dystrophies cornéennes les plus courantes : La mutation p.Arg555Trp dans GCD1 et la mutation p.Arg124His dans GCD2. La mutation p.Arg124Cys a été rapportée dans LCD1, alors que la mutation p.Arg124Leu a été rapportée dans la CD stromale antérieure et la mutation p.Arg555Gln a été rapportée dans la RBCD (Evans, Davidson et al. 2016).

Concernant le modèle murin, la dystrophie cornéenne *TGFBI*-R124C nous aide à délimiter les mécanismes pathogènes de la dystrophie cornéenne humaine reproduisant le facteur de croissance transformant (TGFBIP). Cette mutation survient le plus fréquemment en Asie de l'Est (Kitamoto, Taketani et al. 2020).

Pour notre cas familial, l'évolution chronologique de cette dystrophie cornéenne nécessite un traitement précoce par photokératectomie à un stade précoce, avec un résultat

postopératoire prometteur. La particularité de cette famille est l'évolution et la préservation de la couche postérieure, ce qui conduira à une chirurgie adaptée.

Nous rapportons ici une nouvelle mutation pathogène dans le gène *TGFBI* qui pourrait être à l'origine d'une nouvelle corrélation génotype-phénotype. Les résultats cliniques et génétiques de notre étude peuvent élargir davantage le spectre mutationnel des CD liées au gène *TGFBI* et peuvent être d'une grande aide dans le conseil génétique pour cette famille.

Tableau 10 : Variants pathogènes détectés dans le gène *TGFBI*
(Mohammadi, Ahmadi Shadmehri et al. 2020)

	Coding Position	Protein alteration	Exon	Phenotype	Countries	Ref
1	c.337G>A	p.V113I	4	GCD	Mexico	(Ha, Chau et al. 2003)
2	c.367G>C	p.D123H	4	Atypical GCD, lowpenetrance,	Vietnam	(Dighiero, Drunat et al. 2000)
3	c.370C>T	p.R124C	4	LCD1,TB CD,RBCD ,GCD2	China, Korea, Japan	(Munier, Korvatska et al. 1997)
4	c.371G>A	p.R124H	4	GCD, GCD2	Japan, Korea, China, UK, Iran, Germany ,India, Hong Kong, ...	(Munier, Korvatska et al. 1997)
5	c.371G>A; c.1631A>G	p.R124H;N544S	4;12	LCD1	Japan	(Lakshminarayanan, Chaurasia et al. 2014)
6	c.371G>A; c.del307-308delCT	p.R124H; NM	4	GCD	Hong Kong	(Lakshminarayanan, Chaurasia et al. 2014)
7	c.371G>T	p.R124L	4	CDRB; Atypical GCD	India, Brazil, USA, Czech, China, France	(Foja, Hoffmann et al. 2016)
8	c. 371 G > T ;ΔACGGAG	p.R124L ; ΔT125-ΔE126	4	FVGCD(Atypical GCD)	France	(Foja, Hoffmann et al. 2016)
9	c.370C>T	p.R124S	4	GCD1	UK	(Munier, Frueh et al. 2002)

10	c.393G>T	p.Glu131D	4	Schnyder Crystalline like CD phenotype (no mutation in UBIAD gene)	Germany	(Yamamoto, Okada et al. 1998)
11		p.A179*, p.R124H	4	GCD2	Korea	(Zenteno, Correa-Gomez et al. 2009)
12	c.895G>A	p.D299N	7	Polymorphic LCD	USA	(Lakshminarayanan, Chaurasia et al. 2014)
13	c.1486C>T	p.R496W	11	LCD IV	Japan	(Lakshminarayanan, Chaurasia et al. 2014)
14	c.1501 C > A	p.P501T	11	LCDIIIA	China, Japan	(Tian, Fujiki et al. 2005)
15	c.1504 A > G	p.M502V	11	Unknown	Mexico	(Zhong, Chen et al. 2010)
16	c.1504 A > G; c.1664 G>A	p.M502V;p. R555Q	11,12	Atypical TBCD	France	(Lakshminarayanan, Chaurasia et al. 2014)
17	c.1514T>A	p.V505D	11	LCD I	China	(Paliwal, Sharma et al. 2010)
18	c.1526 T>C	p.L509P	11	GCD2, LCD1	Germany, France	(Lakshminarayanan, Chaurasia et al. 2014)
19	c.1526T>G	p.L509R	11	LCD1,EB MD	France	(Lakshminarayanan, Chaurasia et al. 2014)
20	c.1541G>C	p.R514P	11	LCD	China	(Endo, Nguyen et al. 1999)
21	c. 1545T>A	p.F515L	11	LCD1	China	(Endo, Nguyen et al. 1999)
22	c.1548C>G	p.S516R	11	GCDI Like	India	(Zhang, Zeng et al. 2009)
23	c.1553T>C	p.L518P	12	LCD1 (early LCD)	Japan	(Fujiki, Hotta et al. 1998)
24	c.1553T > G	p.L518R	12	LCD1/III A	Italy	(Munier, Frueh et al. 2002)

25	c.1565 T > A	p.I522N	12	LCD I	China	(Karolak, Polakowski et al. 2016)
26	c.1580T>G	p.L527R	12	LCDIIIA	Japan, Korea	(Rozzo, Fossarello et al. 1998)
27	c.1603G 4 T	G535T	12			(Stix, Leber et al. 2005)
28	c.1613 C > G	p.T538R	12	LCD1/III A	Ukraine, USA	(Munier, Frueh et al. 2002)
29	c.1612A>C	p.T538P	12	LCD1	China, India	(Lakshminarayan, Chaurasia et al. 2014)
30	c.1616T>A	p.V539D	12	LCD	India	(Chakravarthi, Kannabiran et al. 2005)
31	c.1618-1620delTTG	p.ΔF540	12	CDLI/IIIA first reported as RBCD	Sardinia,	(Mashima, Yamamoto et al. 2000, Munier, Frueh et al. 2002)
32	c.1619T>C	p.F540S	12	LCDIII/A	Germany	(Klintworth, Bao et al. 2004)
33	c.1625C>G	p.P542R	12	LCD	Korea	(Lakshminarayan, Chaurasia et al. 2014)
34	c.1631A>G	p.N544S	12	LCD	Japan	(Dighiero, Drunat et al. 2000)
35	c.1637 C > A	p.A546D	12	LCD,GCD , Polymorphic LCD	China, Mexico, India, USA, Germany	(Takács, Losonczy et al. 2007)
36	c.1637 C > A; c.1652 C > A	p.A546D;P551Q	12,12	LCD1	USA	(Lakshminarayan, Chaurasia et al. 2014)
37	c.1636G>A	p.A546T	12	LDCIIIA	Brazil ,China, France	(Pampukha, Kravchenko et al. 2009)
38	c.1640 T> C	p.F547 S	12	Atypical LCD	Hungary	(Dudakova, Palos et al. 2016)
39	c.1645G>A;c.1663 C>T	p.A549T;R555W	12	GCD1	Germany	(Lakshminarayan, Chaurasia et

						al. 2014)
40	c.1649 C > T	p.L550P	12	GCDII	Mexico, Singapore	(Zhong, Chen et al. 2010)
41	c.1649C>T;c.1877A>G	p.L550P;p.H626R	12,	Atypical GCD	Mexico	(Lakshminarayanan, Chaurasia et al. 2014)
42	c.1652 C > A	p.P551Q	12	LCD	USA	[48]
43	c.1664 G>A	p.R555Q	12	CDTB, RBCD	Brazil, China, Czech, France, Japan, Singapore, Switzerland, Ukraine, USA	(Munier, Korvatska et al. 1997)
44	c.1663 C>T	p.R555W	12	GCD1, GCD2,RB CD	Brazil, China, Czech, Mexico, France, Japan, Singapore, Switzerland, Ukraine, USA, Taiwan, Turkey, Vietnam, New Zealand, India, Hong Kong, Spain, UK, Germany, Hungary	(Munier, Korvatska et al. 1997, Lakshminarayanan, Chaurasia et al. 2014)
45	c.1673T> C	p.L558P	12	LCDIII	Ukraine	(Ołdak, Szaflik et al. 2014)
46	c.1673T>G	p.L558R	12	LCD	CzechRepublic	(Warren, Abbott et al. 2003)
47	c.1675T>G	p.L559V	12	Atypical GCD	India	(Zhang, Zeng et al. 2009)
48	c.1694T> C	p.l565p	12	LCD	Poland	(Atchaneeyasakul, Appukuttan et al. 2006)
49	c.1706T>A	p.L569Q	13	LCD1	Korea	(Zenteno,

						Correa-Gomez et al. 2009)
50	c.1753 T > G	p.L569R	13	LCD similar to distinct forms of type I	USA, Korea	(Aldave, Rayner et al. 2006)
51	c.1762 A > C	p.H572R	13	LCD1,LC DIIIA	Thailand, Singapore, Chile, China, Korea	(Yang, Han et al. 2010)
52	c.1761_1763del	p.His572del	13	unilateral, late-onset variant of LCD	USA	(Aldave, Yellore et al. 2008)
53	c.1681G>T	p.G594V	13	late onset, deep stromal LCD	India	(Chakravarthi, Kannabiran et al. 2005)
54	c.1838T>G	p.V613G	14	LCDIII	France	(Lakshminarayanan, Chaurasia et al. 2014)
55	c.1837-1848del12bp GTTGCCGAGC CT	p.del613-616VAEP	14	LCD variant	China	(Evans, Davidson et al. 2016)
56	c.1903 T> A	p.M619K	14	CGLCD	USA	(Jung, Kim et al. 2014)
57	c.1859G>A	p.A620D	14	Classic LCD	Singapore	(Lee, Ji et al. 2016)
58	c.1858C>G	p.A620P	14	LCDIIIA	Korea	(Gruenauer-Kloevekorn, Clausen et al. 2009)
59	c.1861C>A	p.T621P	14	LCDIIIA	Korea	(Klintworth, Bao et al. 2004, Zenteno, Correa-Gomez et al. 2009)
60	c.1866 T>G	p.N622K	14	CDLI/IIIA	Italy, South America	(Munier, Frueh et al. 2002)
61	c.1864A>C	p.N622H	14	CDLI/IIIA	USA	(Lakshminarayanan, Chaurasia et al. 2014)
62	c.1868 G > A	p.G623D	14	LCD, RBCD	Switzerland, China, USA, Germany	(Munier, Frueh et al. 2002)

63	c.1867C>G	p.G623R	14	LCDI, LCDIIA	Germany	(Tian, Fujiki et al. 2005)
64	c.1870 G > A	p.V624M	14	Unilateral LCD		(Schmitt-Bernard, Guittard et al. 2000)
65	c.1874T>A	p.V625 D	14	Earlyonset of LCD	China	(Boutboul, Black et al. 2006)
66	c.1870-1874del GTGGTC	p.del624-625VV	14	Atypical LCD	India	(Chakravarthi, Kannabiran et al. 2005)
67	c.1877A>G; c.1618-1620delTTG	p.H626R; ΔF540	14	CDLI/IIIA	N M	(Munier, Frueh et al. 2002)
68	c.1924 A > C	p.H626P	14	CDLI/IIIA , RBCD, TBCD	New Zealand, Czech	(Munier, Frueh et al. 2002)
69	c.1877 A>G	p.H626R	14	Asymmetric LCD I/III	China, Mexico, France, Singapore, Ukraine, Vietnam, India, UK, Germany,	(Lee, Ji et al. 2016)
70	[1885 1886ins9(CCAATGTTC)]	p.(NVP629 –630ins)	14	LCD III/A	France	(Ann, Abbouda et al. 2017)
71	c.1939 T > A	p.V631D	14	LCD III/A	Italy	(Munier, Frueh et al. 2002)
72	c.1998G>C	p.R666S	16	EBMD	Ireland	(Van Dooren, Sloot et al. 2018)
73	c.1926 del G	premature truncation at amino acid 669	14	CDLI/IIIA	NM	(Munier, Frueh et al. 2002)
74	c.598A>T	p.I200F	5	NM	NM	(Lakshminarayanan, Chaurasia et al. 2014)
75	c.805C>T	p.L269F	7	NM	NM	(Lakshminarayanan, Chaurasia et al. 2014)
76	c.1486C>G	p.R496G	11	NM	NM	(Lakshminarayanan, Chaurasia et

						al. 2014)
77	c.337G>A c.1673T>C	p.V113I;p.L 558P	4;12	LCD Variant	USA	(Ann, Abbouda et al. 2017)
78	c.370C>T; c.1408C>T	R124C;G47 0X*	4	LCD	Japan	(Mohammadi, Ahmadi Shadmehri et al. 2020)
79	c.1772C>A	Ser591Tyr	13	Atypical TBCD	Morocco	(Benbouchta, Jaouad et al. 2021)

GCD: Granular Corneal Dystrophy; LCD: Lattice Corneal Dystrophy; TBCD: Thiel-Behnke Corneal Dystrophy; RBCD: Reis Bukler Corneal Dystrophy; FVGCD: France Variant Corneal Dystrophy; CGLCD: combined granular-lattice corneal dystrophy; NM: Not Mentioned

*** Presented data are arranged based on RefSeq NM_000358; NP_000349**

Nous rapportons donc un variant causant la maladie de dystrophie cornéenne, (c.1772C>A;(p.S591Y)), au niveau de l'exon 13 du gène *TGFBI*, chez des patients d'une famille marocaine consanguine. Cette position est considérée comme un point chaud mutationnel dans le gène *TGFBI* (Thiel 1967). Le variant affecte le premier domaine FAS1 de la protéine, probablement en modifiant la solubilité et la stabilité de la protéine (Consortium 2012). Bien que les mutations du gène *TGFBI* soient réparties sur tout le gène, il existe quatre exons avec le taux le plus élevé de mutations faux-sens, à savoir les exons 12, 14, 4 et 11, par ordre décroissant de fréquence (tableau. 10). En effet, les DC liées au gène *TGFBI* représentent un modèle important de corrélations génotype-phénotype. Une mutation spécifique conduit à un phénotype spécifique, en effet, des mutations particulières dans les DC liées au *TGFBI* sont liées à la gravité de la maladie, quel que soit le statut homozygote ou hétérozygote (Mashima, Nakamura et al. 1999). Il semble que les mutations dans les premiers exons, en particulier au sein de l'exon 4, contribuent davantage à créer des types granulaires de dystrophies cornéennes tandis que les exons moyens, en particulier l'exon 12 sont plus responsables des types de dystrophies en réseau (tableau. 10). La mutation R124H a le plus de contribution parmi les cas de GCD2. Mashima et al ont rapporté des patients atteints de GCD2 avec une mutation p.R124H (Hammar, Lagali et al. 2010, Xiang, Yuan et al. 2019). Dans la littérature, il semble que le type GCD2 soit le type de maladie le plus fréquent dans la population iranienne, et la mutation p.R124H est considérée comme la cause la plus fréquente de la maladie (Yu, Qiu et al. 2015, Xiang, Yuan et al. 2019). D'autres investigations sont nécessaires pour évaluer la prévalence des mutations du gène *TGFBI* chez les patients iraniens atteints de DC. Le phénotype des patients homozygotes était plus sévère que celui des individus hétérozygotes, comme un âge d'apparition plus précoce, une progression rapide de la maladie ou davantage de dépôts dans la

cornée, conformément aux études précédentes (Munier, Frueh et al. 2002). La variabilité clinique observée chez les individus hétérozygotes est en concordance avec les investigations précédentes (Zhao, Nakamura et al. 2007, Han, Sim et al. 2012). Cependant, les raisons de ce phénomène ne sont pas complètement comprises. Nous avons émis l'hypothèse que cela résulte de l'effet des gènes modificateurs et d'autres loci sur l'expression du gène *TGFBI*. La pénétrance réduite, la complexité des traits monogéniques, les interactions épistatiques et les facteurs environnementaux peuvent être d'autres explications (Gruenauer-Kloevekorn, Clausen et al. 2009, Lakshminarayanan, Chaurasia et al. 2014). Malgré d'énormes progrès en génétique, en médecine et en technologie, il existe de rares traitements efficaces pour les troubles monogéniques comme les DC. En fait, la réalisation de procédures telles que la kératomileusie in situ assistée par laser (LASIK) pour les patients GCD2 peut précipiter l'évolution de la maladie (Kannabiran and Klintworth 2006). La gestion des DC varie selon la présentation clinique. Pour le traitement de cette pathologie, la transplantation cornéenne est le traitement recommandé. Une limite majeure est la récurrence des dépôts cornéens post-transplantation ; cependant, certains patients sont traités avec des médicaments et d'autres utilisent des méthodes qui suggèrent l'ablation de la couche anormale, comme la kératectomie phototherapeutique ou la kératoplastie lamellaire antérieure profonde (DALK)(Lakshminarayanan, Chaurasia et al. 2014).

3. Place des gènes identifiés dans la prédisposition génétique au cancer

Les quatre gènes candidats identifié par CGH-array chez la patiente atteinte de cardiopathie congénitale ainsi que le gène *TGFB1* en cause dans la dystrophie cornéenne atypique, en plus de leur implication dans la pathogénie de maladies génétiques rares représentent un intérêt en matière de prédisposition génétique au cancer.

Au niveau de la région 15q, quatre gènes sont connus comme étant impliqués dans des cardiopathies congénitales et potentiellement associés à sur risque de développer le cancer au futur.

- Le gène ***IGF1R*** (Insulin-like Growth Factor 1 Receptor) (MIM 147370) se trouve au locus 15q26.3. Ce récepteur se lie au facteur de croissance analogue à l'insuline avec une affinité élevée. Il a une activité tyrosine kinase. Le récepteur du facteur de croissance analogue à l'insuline I joue un rôle essentiel dans les événements de transformation. Le clivage du précurseur génère des sous-unités alpha et bêta. Il est fortement surexprimé dans la plupart des tissus malins où il agit comme un agent anti-apoptotique en améliorant la survie cellulaire. Des

variantes issues d'un épissage alternatif codant pour des isoformes distinctes ont été trouvées pour ce gène (fourni par RefSeq, mai 2014).

- Le gène *NR2F2* intervient dans la prédisposition aux tumeurs de Wilms qui est le type le plus courant de cancer du rein chez l'enfant. On la diagnostique habituellement chez des enfants âgés entre 2 et 4 ans (Palculict 2015). La sous-famille 2 des récepteurs nucléaires (*NR2F2*, également connue sous le nom de COUP-TFII) est impliquée dans le développement de nombreux types de cancers, mais son rôle dans le cancer gastrique reste inconnu (Xia, Hou et al. 2020). *NR2F2* est un indicateur pronostique dans une variété de cancers, en particulier ceux qui sont sensibles aux hormones sexuelles (Qin, Tsai et al. 2014, Safe, Jin et al. 2014). *NR2F2* est impliqué dans la progression de l'adénocarcinome de la prostate (Qin, Tsai et al. 2014).
- Le gène *MEF2A* : Certains types de cancer sont marqués par une expression altérée de *MEF2A* et sa contribution aux réponses adaptatives clés qui sont déterminantes pour le processus de transformation telles que l'invasion, la résistance à l'apoptose, la prolifération, l'angiogenèse, le métabolisme et l'inflammation, qui sont déterminantes pour le processus de transformation, suggère un rôle tumorigène pour ce membre de la famille. Les premières observations ont noté l'implication de *MEF2A* dans la transduction des signaux induits par les facteurs de croissance des fibroblastes dans les cellules cancéreuses de la prostate (Mehta, Robson et al. 2001). Un SNP *MEF2A* (Y105C) est fréquent dans le cancer du pancréas et ce SNP peut être considéré comme un marqueur pronostique négatif fort (Pan, Yan et al. 2017).
- Le gène *CHD2* : La protéine *CHD2* semble jouer un rôle critique dans le développement, l'hématopoïèse et la suppression tumorale. Les souris mutantes hétérozygotes *CHD2* présentent une hématopoïèse extra médullaire accrue et une susceptibilité aux lymphomes. Au niveau cellulaire, les mutants *CHD2* sont défectueux dans la différenciation des cellules souches hématopoïétiques, accumulent des niveaux plus élevés du médiateur de réponse aux dommages à l'ADN associé à la chromatine (Nagarajan, Onami et al. 2009).

Compte tenu de l'utilisation accrue et de la diversité des procédures de diagnostic, il est important de comprendre la susceptibilité génétique au cancer de la thyroïde radio-induit, en effet, des études ont montré des associations significatives entre le risque de cancer de la thyroïde différencié (DTC) et le rs7164173 dans *CHD2* (Zidane, Truong et al. 2021), ainsi, les données génomiques pour la prévalence des lésions *CHD2* dans le cancer humain sont actuellement limitées (Li and Mills 2014).

La voie de signalisation TGF- β régit les processus cellulaires clés dans des conditions physiologiques et est dérégulée dans de nombreuses pathologies, dont le cancer. Le TGF- β est une cytokine multifonctionnelle qui agit de manière dépendante de la cellule et du contexte en tant que promoteur ou suppresseur de tumeur. En tant que promoteur tumoral, la voie TGF- β améliore la prolifération cellulaire, l'invasion migratoire, la propagation métastatique dans le microenvironnement tumoral et supprime l'immuno-surveillance. Collectivement, la nature pléiotrope de la signalisation TGF- β contribue à la résistance aux médicaments, à l'échappement tumoral et compromet la réponse clinique au traitement. Sur la base d'une multitude d'études précliniques, la voie du TGF- β a été pharmacologiquement ciblée à l'aide d'inhibiteurs à petites molécules, d'anticorps monoclonaux chimériques dirigés contre le TGF- β , de pièges à ligands, d'oligonucléotides antisens et de vaccins qui ont maintenant été évalués dans des essais cliniques. L'innocuité et l'efficacité des antagonistes de la voie TGF- β a été évaluée dans des essais terminés et en cours. Par exemple, le Vactosertib est un puissant inhibiteur de la kinase du récepteur TGF- β de type 1 à petite molécule qui est bien toléré avec un profil d'innocuité acceptable qui a montré son efficacité contre plusieurs types de cancer. Le ligand du TGF- β piège le Bintrafusp alfa (un conjugué bifonctionnel qui lie le TGF- β et le PD-L1), l'AVID200 (un piège conçu par ordinateur des ectodomains du récepteur du TGF- β fusionné à un domaine Fc) et le Luspatercept (une fusion recombinante qui relie le récepteur de l'activine IIb aux IgG) offrent de nouvelles façons de lutter contre les cancers difficiles à traiter. Alors que les antagonistes de la voie TGF- β apparaissent rapidement comme des agents anticancéreux très prometteurs, sûrs et efficaces, des défis importants subsistent. La minimisation de l'inhibition non intentionnelle de l'activité de suppression des tumeurs et des effets inflammatoires avec la restriction souhaitée des activités de promotion des tumeurs a entravé le développement clinique des antagonistes de la voie TGF- β . Une meilleure compréhension des détails mécanistiques de la voie du TGF- β devrait conduire à des antagonistes du TGF- β plus efficaces et découvrir des biomarqueurs qui stratifient mieux la sélection des patients, améliorent les réponses des patients et favorisent le développement clinique des antagonistes du TGF- β . (Kim, Malek et al. 2021).

Une étude récente a effectué une analyse pan-cancer de l'expression de l'ARNm et des protéines du gène *TGFBI* et des pronostics de divers types de cancer à l'aide de bases de données publiques. L'étude a également porté sur les associations de l'expression du gène *TGFBI* avec les composants du microenvironnement tumoral (TME), l'infiltration des cellules immunitaires, la charge mutationnelle tumorale (TMB) et l'instabilité des microsatellites (MSI), ainsi que les

types d'altération génétique du gène *TGFBI*. Les résultats ont montré que l'expression du gène *TGFBI* variait selon les différents types de cancer et qu'elle était positivement ou négativement liée au pronostic de divers cancers. L'expression de ce gène était également significativement corrélée avec les composants de TME, le TMB, le MSI, l'infiltration de cellules immunitaires et les sous-groupes de gènes immunoinhibiteurs et immunstimulateurs. Ces découvertes indiquent que le gène *TGFBI* participe à diverses réponses immunitaires et qu'il peut fonctionner comme marqueur pronostique dans divers cancers. Ces données peuvent être utiles également pour développer des immunothérapies ciblant le *TGFBI* (Chen, Zhao et al. 2021).

Comme exemple de l'intérêt pronostique dans le cancer, une analyse génétique a montré que Le génotype CA du SNP rs4803455 du gène *TGFβ1* est associé à un mauvais pronostic chez les patients avec cancer du poumon à petites cellules et pourrait être considéré comme un biomarqueur potentiel (Ayala de Miguel, Enguix-Riego et al. 2021).

Le gène *TGFβ1* pourrait jouer un rôle également dans la prédisposition au cancer. En effet, une étude a suggéré que certains polymorphismes du gène *TGFβ1* au niveau du promoteur et la région peptide signal peuvent être associés à une susceptibilité à développer la tumeur de Wilms ainsi que sa présentation clinique (Ishibashi, de Oliveira et al. 2021).

La reprogrammation métabolique est une caractéristique émergente du cancer. Outre le compartiment malin, le microenvironnement tumoral subit également un biais métabolique, contribuant à la progression néoplasique et au processus de métastase. De plus en plus de preuves ont souligné le rôle central du facteur de croissance transformant bêta (TGF-β) en tant que moteur de ces changements métaboliques dans de multiples cibles cellulaires du cancer. Des découvertes très récentes ont été exposées sur la reprogrammation métabolique médiée par le TGF-β de la population de cellules stromales et immunitaires dans le microenvironnement tumoral. En particulier, nous avons examiné la littérature actuelle pour mettre en évidence les points de contrôle métaboliques pertinents dans la cascade TGF-β qui soutiennent les programmes tolérogènes dans les tumeurs.

Vaincre l'immunosuppression tumorale représente toujours une réalisation ambitieuse pour l'immunothérapie du cancer. Il convient de noter que la cytokine TGF-β contribue à l'évasion immunitaire dans plusieurs types de cancer, en alimentant l'établissement d'un environnement tolérogène chez l'hôte. En effet, il favorise l'expansion et l'accumulation de populations de cellules régulatrices immunosuppressives dans le microenvironnement tumoral (TME), où il active également les cellules stromales résidentes et améliore les programmes

d'angiogenèse. Plus récemment, le TGF- β s'est également avéré être un facteur d'ajustement métabolique clé dans les tumeurs orchestrant les voies métaboliques dans le TME (Angioni, Sánchez-Rodríguez et al. 2021).

Au final, nous déduisons le double intérêt des gènes identifiés lors de cette étude aussi bien dans l'étiologie de certaines maladies rares comme la cardiopathie congénitale et la dystrophie cornéenne que dans la prédisposition génétique au cancer, en plus d'un impact pronostique et thérapeutique considérable.

G. CONCLUSION

1. CONCLUSION

La rareté de la monosomie 15q et de la dystrophie cornéenne est l'une des causes de l'existence de grandes difficultés dans la réalisation de travaux de recherche sur ces maladies. Notre étude met en évidence l'intérêt de la recherche en génétique médicale et ce à travers l'étude de deux syndromes rares diagnostiqués par deux approches différentes afin d'établir un diagnostic précis permettant d'identifier l'anomalie moléculaire responsable de la maladie et d'estimer le risque de récurrence.

Dans une famille, l'obtention d'un diagnostic précis permet de proposer un conseil génétique adéquat, d'adapter la prise en charge, connaître le pronostic et d'avoir accès plus facilement à des aides (comme la prise en charge du handicap). En effet, des patients présentant une délétion 15q26 ont besoin d'une prise en charge multidisciplinaire incluant une évaluation endocrinologique pour une éventuelle thérapie par hormone de croissance, un suivi cardiologique, orthopédique et psychomoteur. Le conseil génétique dans notre famille était délicat car les parents ont refusé de faire l'analyse par CGH-array qui est importante pour la détection des microremaniements chromosomiques non détectés par cytogénétique classique afin de vérifier l'absence de l'anomalie détectée chez leur fille. L'étude de la cardiopathie congénitale souligne aussi les difficultés et les limites de la stratégie d'identification de nouveaux gènes par CGH-array. Ces résultats montrent que l'analyse chromosomique par CGH-array au-delà de son intérêt diagnostique, permet d'établir de nouvelles corrélations génotype-phénotype et d'identifier de nouvelles régions potentiellement impliquées dans des pathologies rares.

En ce qui concerne la dystrophie cornéenne, nous rapportons une nouvelle mutation pathogène dans le gène *TGFBI* qui pourrait être à l'origine d'une nouvelle corrélation génotype/phénotype. Les résultats cliniques et génétiques de notre étude pourraient élargir davantage le spectre des DC liées au gène *TGFBI* et pourraient être d'une grande aide dans le conseil génétique pour cette famille. Dans cette partie, on a réalisé le séquençage de l'Exome entier permettant l'analyse de toutes les parties codantes du génome humain. Généralement, on utilise cette technique quand le diagnostic clinique n'est pas tranchant, donc étudier tous les gènes pour avoir un diagnostic précis est indispensable. Cette approche diagnostique est utilisée lorsqu'il y a une forte suspicion clinique d'une pathologie génétique sans orientation précise vers une maladie particulière, comme c'était le cas pour notre famille. Cela permettra au clinicien de bâtir une stratégie thérapeutique précise, adaptée et économe.

Parallèlement, on note que les gènes identifiés dans les deux maladies qui ont fait l'objet de notre étude et qui ont été révélés par les explorations moléculaires sont également impliqués dans la prédisposition génétique au cancer (notamment les gènes *NR2F2*, *MEF2A* et *CHD2*). Pour ce qui est du gène *TGFB1*, celui-ci représente un facteur pronostique important dans plusieurs types de cancer et une cible thérapeutique privilégiée pour l'immunothérapie anticancéreuse et représente également un facteur de susceptibilité à la tumeur de Wilms.

Bien que le nombre de cas présenté dans cette thèse soit encore limité pour nous permettre d'évaluer précisément le rendement diagnostique, il serait extrêmement utile de procéder à une étude étendue dans le but de résoudre les questions relatives au potentiel diagnostique de cette approche dans le domaine des maladies rares et pour évaluer le rapport coût/bénéfice pour le patient en santé publique. De même, l'objectif à long terme est de mettre en œuvre un parcours de soins génétiques avec un accès privilégié et commun à tous les patients atteints par un cancer, une maladie rare ou commune.

2. PERSPECTIVES ET RECOMMANDATIONS

2.1. PERSPECTIVES

- Développer des projets innovants en matière de diagnostic des maladies rares.
- Améliorer l'accès des patients atteints de maladies rares avec retard mental et dysmorphie faciale au diagnostic par la technique CGH-array.
- Etude fonctionnelle de la protéine mutée S591Y impliquée dans la dystrophie cornéenne.
- Elargir l'étude clinique et moléculaire à tous les membres de la famille de dystrophie coréenne.
- Recherche du variant trouvé S591Y chez la population générale dans le but d'évaluer sa fréquence.
- Diagnostic histologique fortement souhaitable pour compléter l'étude du cas de dystrophie cornéenne.
- Encourager la recherche scientifique marocaine au plus haut niveau d'excellence et d'expertise.
- Développer une médecine personnalisée, avec de nouvelles stratégies thérapeutiques et améliorer la qualité de la prise en charge des patients.

2.2. RECOMMANDATIONS

- Des directives consensuelles nationales ou internationales à jour sont de la plus haute importance pour harmoniser les conseils et les stratégies de surveillance proposée pour les porteurs sains de maladies rares.
- La greffe de la cornée est intéressante pour la dystrophie cornéenne pour tous les patients atteints. Une prise en charge sera accordée par une association dans les jours à venir.
- Diagnostic précoce du cancer, sensibiliser le clinicien sur le risque de développer le cancer chez nos patients atteints de ces pathologies rares.
- Les avantages possibles des stratégies de dépistage et de réduction des risques doivent toujours être discutés en combinaison avec les risques et les limites possibles de ces stratégies de surveillance.
- Un conseil génétique avec des options d'évaluation et de gestion du risque doit être fourni aux patients et aux familles des porteurs de la mutation à surrisque de développer le cancer.

REFERENCES

- A, H. T. and M. Tajvidi (2019). "Sustainable Barrier System via Self-Assembly of Colloidal Montmorillonite and Cross-linking Resins on Nanocellulose Interfaces." ACS Appl Mater Interfaces **11**(1): 1604-1615.
- Abuzzahab, M. J., A. Schneider, A. Goddard, F. Grigorescu, C. Lautier, E. Keller, W. Kiess, J. Klammt, J. Kratzsch and D. Osgood (2003). "IGF-I receptor mutations resulting in intrauterine and postnatal growth retardation." New England Journal of Medicine **349**(23): 2211-2222.
- Adams, E., J. Deutsche, E. Okoroh, S. Owens-McAlister, S. Majumdar, M. Ullman, M. L. Damiano, M. Recht and H. W. W. Group (2014). "An inventory of healthy weight practices in federally funded haemophilia treatment centres in the United States." Haemophilia **20**(5): 639-643.
- Aldave, A. J., S. A. Rayner, B. T. Kim, A. Prechanond and V. S. Yellore (2006). "Unilateral lattice corneal dystrophy associated with the novel His572del mutation in the TGFBI gene." Mol Vis **12**: 142-146.
- Aldave, A. J., V. S. Yellore, B. Sonmez, N. Bourla, A. K. Salem, M. A. Khan, S. A. Rayner and B. J. Glasgow (2008). "A novel variant of combined granular-lattice corneal dystrophy associated with the Met619Lys mutation in the TGFBI gene." Archives of ophthalmology **126**(3): 371-377.
- Allanson, J. E. and A. E. Roberts (2021). "Noonan syndrome." Cassidy and Allanson's Management of Genetic Syndromes: 651-669.
- Amendola, L. M., G. P. Jarvik, M. C. Leo, H. M. McLaughlin, Y. Akkari, M. D. Amaral, J. S. Berg, S. Biswas, K. M. Bowling and L. K. Conlin (2016). "Performance of ACMG-AMP variant-interpretation guidelines among nine laboratories in the Clinical Sequencing Exploratory Research Consortium." The American Journal of Human Genetics **98**(6): 1067-1076.
- Angioni, R., R. Sánchez-Rodríguez, A. Viola and B. Molon (2021). "TGF- β in Cancer: Metabolic Driver of the Tolerogenic Crosstalk in the Tumor Microenvironment." Cancers **13**(3): 401.

Ann, L. B., A. Abbouda, R. F. Frausto, S. Huseynli, K. Gupta, J. L. Alió and A. J. Aldave (2017). "Variant lattice corneal dystrophy associated with compound heterozygous mutations in the TGFBI gene." Br J Ophthalmol **101**(4): 509-513.

Arlettaz, R. and U. Bauersfeld (2005). "Recommandations concernant le screening néonatal des cardiopathies congénitales." Paediatrica **16**: 38-41.

Atchaneeyasakul, L. O., B. Appukuttan, S. Pingsuthiwong, P. T. Yenchitsomanus, A. Trinavarat and C. Srisawat (2006). "A novel H572R mutation in the transforming growth factor-beta-induced gene in a Thai family with lattice corneal dystrophy type I." Jpn J Ophthalmol **50**(5): 403-408.

Ayala de Miguel, P., M. V. Enguix-Riego, J. Cacicedo, B. D. Delgado, M. Perez, J. M. Praena-Fernández, L. Quintana Cortes, P. Borrega Garcia, E. R. Del Campo and J. L. Lopez Guerra (2021). "Prognostic value of the TGFβ1 rs4803455 single nucleotide polymorphism in small cell lung cancer." Tumori Journal **107**(3): 209-215.

Aymé, S. and J. Schmidtke (2007). "Networking for rare diseases: a necessity for Europe." Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz **50**(12): 1477-1483.

Bai, X., J. Edwards and J. Ju (2005). "Molecular engineering approaches for DNA sequencing and analysis." Expert review of molecular diagnostics **5**(5): 797-808.

Bardi, G., C. Fenger, N. Pandis, F. Mitelman and S. Heim (1995). "Karyotypic aberrations in an anal-canal malignant-melanoma and its local metastasis." Int J Oncol **6**(3): 555-557.

Benbouchta, Y., I. Cherkaoui Jaouad, H. Tazi, H. Elorch, M. Ouhenach, A. Zrhidri, K. Sadki, A. Sefiani, J. Lyahyai and A. Berraho (2021). "Novel mutation in the TGFBI gene in a Moroccan family with atypical corneal dystrophy: a case report." BMC Medical Genomics **14**(1): 9.

Benbouchta, Y., N. De Leeuw, S. Amasdl, A. Sbiti, D. Smeets, K. Sadki and A. Sefiani (2021). "15q26 deletion in a patient with congenital heart defect, growth restriction and intellectual disability: case report and literature review." Italian Journal of Pediatrics **47**(1): 188.

Benbouchta, Y., I. C. Jaouad, H. Tazi, H. Elorch, M. Ouhenach, A. Zrhidri, K. Sadki, A. Sefiani, J. Lyahyai and A. Berraho (2021). "Novel mutation in the TGFBI gene in a Moroccan family with atypical corneal dystrophy: a case report." BMC Medical Genomics **14**(1): 1-8.

Bhakta, K. Y., S. J. Marlin, J. J. Shen and C. J. Fernandes (2005). "Terminal deletion of chromosome 15q26.1: case report and brief literature review." J Perinatol **25**(6): 429-432.

Biggio, J. R., Jr., M. D. Descartes, A. J. Carroll and R. L. Holt (2004). "Congenital diaphragmatic hernia: is 15q26.1-26.2 a candidate locus?" Am J Med Genet A **126A**(2): 183-185.

Biswas, S., F. L. Munier, J. Yardley, N. Hart-Holden, R. Perveen, P. Cousin, J. E. Sutphin, B. Noble, M. Batterbury and C. Kielty (2001). "Missense mutations in COL8A2, the gene encoding the $\alpha 2$ chain of type VIII collagen, cause two forms of corneal endothelial dystrophy." Human molecular genetics **10**(21): 2415-2423.

Blue, G. M., E. P. Kirk, G. F. Sholler, R. P. Harvey and D. S. Winlaw (2012). "Congenital heart disease: current knowledge about causes and inheritance." The Medical Journal of Australia **197**(3): 155-159.

Bonnet, D. (2017). "Genetics of congenital heart diseases." Presse Medicale (Paris, France: 1983) **46**(6 Pt 1): 612-619.

Bonnet, D., J.-M. Rauzier, P. Bouvagnet and D. Sidi (1998). "Génétique des cardiopathies congénitales et des cardiopathies héréditaires non myocardiques."

Borman, B., C. Chapman, K. Howard, P. Buckfield and J. Findlay (1987). "Using a national register for the epidemiological study of congenital heart defects." The New Zealand Medical Journal **100**(827): 404-406.

Bossi, L. and J. R. Roth (1980). "The influence of codon context on genetic code translation." nature **286**(5769): 123-127.

Bourdial, H., K. Jamal-Bey, A. Edmar, D. Caillet, F. Wuillai, C. Bernede-Bauduin, B. Boumahni, P.-Y. Robillard, E. Kauffmann and A. Laffitte (2012). "Congenital heart defects in La Reunion Island: a 6-year survey within a EUROCAT-affiliated congenital anomalies registry." Cardiology in the Young **22**(5): 547-557.

Bourges, J.-L. (2017). "Les dystrophies de cornée." Journal Français d'Ophthalmologie **40**(7): 606-621.

Boutboul, S., G. C. Black, J. E. Moore, J. Sinton, M. Menasche, F. L. Munier, L. Laroche, M. Abitbol and D. F. Schorderet (2006). "A subset of patients with epithelial basement membrane corneal dystrophy have mutations in TGFBI/BIGH3." Hum Mutat **27**(6): 553-557.

Boycott, K. M., M. R. Vanstone, D. E. Bulman and A. E. MacKenzie (2013). "Rare-disease genetics in the era of next-generation sequencing: discovery to translation." Nature Reviews Genetics **14**(10): 681-691.

Brenner, B. M., J. L. Troy and B. J. Ballermann (1989). "Endothelium-dependent vascular responses. Mediators and mechanisms." The Journal of clinical investigation **84**(5): 1373-1378.

Brini, A., G. Offret, P. Dhermy and P. Bec (1974). Anatomie Pathologique de l'Oeil et de ses Annexes, Paris, Masson.

Capelli, L. P., A. C. Krepischi, J. Gurgel-Giannetti, M. F. S. Mendes, T. Rodrigues, M. C. Varela, C. P. Koiffmann and C. Rosenberg (2012). "Deletion of the RMGA and CHD2 genes in a child with epilepsy and mental deficiency." European journal of medical genetics **55**(2): 132-134.

Castilla, E. E., R. Lugarinho, M. d. G. Dutra and L. J. Salgado (1998). "Associated anomalies in individuals with polydactyly." American journal of medical genetics **80**(5): 459-465.

Chakravarthi, S. K., C. Kannabiran, M. S. Sridhar and G. K. Vemuganti (2005). "TGFB1 gene mutations causing lattice and granular corneal dystrophies in Indian patients." Investigative ophthalmology & visual science **46**(1): 121-125.

Chen, J. L., B. R. Lin, K. M. Gee, J. A. Gee, D.-W. D. Chung, R. F. Frausto, S. X. Deng and A. J. Aldave (2015). "Identification of presumed pathogenic KRT3 and KRT12 gene mutations associated with Meesmann corneal dystrophy." Molecular vision **21**: 1378.

Chen, Y., H. Zhao, Y. Feng, Q. Ye, J. Hu, Y. Guo and Y. Feng (2021). "Pan-cancer analysis of the associations of TGFB1 expression with prognosis and immune characteristics." Frontiers in molecular biosciences **8**.

Choi, J. H., M. Kang, G. H. Kim, M. Hong, H. Y. Jin, B. H. Lee, J. Y. Park, S. M. Lee, E. J. Seo and H. W. Yoo (2011). "Clinical and functional characteristics of a novel heterozygous mutation of the IGF1R gene and IGF1R haploinsufficiency due to terminal 15q26.2->qter deletion in patients with intrauterine growth retardation and postnatal catch-up growth failure." J Clin Endocrinol Metab **96**(1): E130-134.

Cloarec, S., N. Magontier, M. Vaillant, C. Paillet and A. Chantepie (1999). "Prévalence et répartition des cardiopathies congénitales en Indre-et-Loire. Évaluation du diagnostic anténatal (1991–1994)." Archives de pédiatrie **6**(10): 1059-1065.

Consortium, G. P. (2012). "An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes." Nature **491**(7422): 56-65.

Courtney, D. G., E. T. Poulsen, S. Kennedy, J. E. Moore, S. D. Atkinson, E. Maurizi, M. A. Nesbit, C. T. Moore and J. J. Enghild (2015). "Protein composition of TGFB1-R124C-and

TGFBI-R555W-associated aggregates suggests multiple mechanisms leading to lattice and granular corneal dystrophy." Investigative ophthalmology & visual science **56**(8): 4653-4661.

Daliri, A. A. K., H. Haghparast and J. Mamikhani (2009). "Cost-effectiveness of prophylaxis against on-demand treatment in boys with severe hemophilia A in Iran." International journal of technology assessment in health care **25**(4): 584-587.

Danecek, P., A. Auton, G. Abecasis, C. A. Albers, E. Banks, M. A. DePristo, R. E. Handsaker, G. Lunter, G. T. Marth, S. T. Sherry, G. McVean and R. Durbin (2011). "The variant call format and VCFtools." Bioinformatics **27**(15): 2156-2158.

Dateki, S., M. Fukami, Y. Tanaka, G. Sasaki, H. Moriuchi and T. Ogata (2011). "Identification of chromosome 15q26 terminal deletion with telomere sequences and its bearing on genotype-phenotype analysis." Endocr J **58**(3): 155-159.

Davidson, A. E., P. Liskova, C. J. Evans, L. Dudakova, L. Nosková, N. Pontikos, H. Hartmannová, K. Hodaňová, V. Stránecký and Z. Kozmík (2016). "Autosomal-dominant corneal endothelial dystrophies CHED1 and PPCD1 are allelic disorders caused by non-coding mutations in the promoter of OVOL2." The American Journal of Human Genetics **98**(1): 75-89.

de Leng, W. W., C. G. Gadellaa-van Hooijdonk, F. A. Barendregt-Smouter, M. J. Koudijs, I. Nijman, J. W. Hinrichs, E. Cuppen, S. van Lieshout, R. D. Loberg and M. de Jonge (2016). "Targeted next generation sequencing as a reliable diagnostic assay for the detection of somatic mutations in tumours using minimal DNA amounts from formalin fixed paraffin embedded material." PloS one **11**(2): e0149405.

DePristo, M. A., E. Banks, R. Poplin, K. V. Garimella, J. R. Maguire, C. Hartl, A. A. Philippakis, G. Del Angel, M. A. Rivas and M. Hanna (2011). "A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data." Nature genetics **43**(5): 491-498.

Dietrich, C. U., N. Pandis, M. R. Teixeira, G. Bardi, A. M. Gerdes, J. A. Andersen and S. Heim (1995). "Chromosome abnormalities in benign hyperproliferative disorders of epithelial and stromal breast tissue." Int J Cancer **60**(1): 49-53.

Dighiero, P., S. Drunat, F. D'Hermies, G. Renard, M. Delpech and S. Valleix (2000). "A novel variant of granular corneal dystrophy caused by association of 2 mutations in the TGFBI gene—R124L and Δ T125- Δ E126." Archives of ophthalmology **118**(6): 814-818.

Dighiero, P., S. Drunat, P. Ellies, F. D'Hermies, M. Savoldelli, J. M. Legeais, G. Renard, M. Delpech, G. Grateau and S. Valleix (2000). "A new mutation (A546T) of the betaig-h3 gene responsible for a French lattice corneal dystrophy type IIIA." Am J Ophthalmol **129**(2): 248-251.

Dighiero, P., S. Valleix, F. D'Hermies, S. Drunat, P. Ellies, M. Savoldelli, Y. Pouliquen, M. Delpech, J.-M. Legeais and G. Renard (2000). "Clinical, histologic, and ultrastructural features of the corneal dystrophy caused by the R124L mutation of the BIGH3 gene." Ophthalmology **107**(7): 1353-1357.

Donnart, A., V. Viollet and M. Roinet-Tournay (2013). "Rare diseases, definitions and epidemiology." Soins. Pédiatrie, Puericulture(274): 14-16.

Dudakova, L., M. Palos, K. Jirsova, P. Skalicka, P. Dundr and P. Liskova (2016). "Novel TGFBI mutation p.(Leu558Arg) in a lattice corneal dystrophy patient." Ophthalmic Genet **37**(4): 473-474.

Dunham, C. M., M. Fabian, J. H. Siegel and L. Gettings (1991). "Relationship of plasma amino acids to oxygen debt during hemorrhagic shock." Circ Shock **35**(2): 87-95.

Duzkale, H., J. Shen, H. McLaughlin, A. Alfares, M. Kelly, T. Pugh, B. Funke, H. Rehm and M. Lebo (2013). "A systematic approach to assessing the clinical significance of genetic variants." Clinical genetics **84**(5): 453-463.

Ehlers, N. and J. Andersen (1987). "Treatment of central corneal ulcers by à chaud transplantation of organ culture preserved donor tissue." Acta ophthalmologica **65**(5): 516-520.

Ei, A., G. H, A. E, T. H, V. Gf and I. C (2018). "Prenatal Diagnosis of a New Case: De Novo Balanced Non-Robertsonian Translocation Involving t(15;22)(p11.2;q11.2)." Balkan J Med Genet **21**(2): 69-72.

Emmanuel, Y. and S. Thorne (2015). "Heart disease in pregnancy." Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology **29**(5): 579-597.

Endo, S., T. H. Nguyen, K. Fujiki, Y. Hotta, K. Nakayasu, T. Yamaguchi, N. Ishida and A. Kanai (1999). "Leu518Pro mutation of the beta ig-h3 gene causes lattice corneal dystrophy type I." Am J Ophthalmol **128**(1): 104-106.

Ericson A, K. B. (2001). "

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in early pregnancy.

." Reproductive Toxicology **15**:371–375.

Evans, C. J., A. E. Davidson, N. Carnt, K. E. R. López, N. Veli, C. M. Thaung, S. J. Tuft and A. J. Hardcastle (2016). "Genotype-phenotype correlation for TGFBI corneal dystrophies identifies p.(G623D) as a novel cause of epithelial basement membrane dystrophy." Investigative ophthalmology & visual science **57**(13): 5407-5414.

Eygelaar, D., E. J. van Rensburg and F. Joubert (2022). "Germline sequence variants contributing to cancer susceptibility in South African breast cancer patients of African ancestry." Scientific reports **12**(1): 1-10.

Facio, F. M., J. C. Sapp, A. Linn and L. G. Biesecker (2012). "Approaches to informed consent for hypothesis-testing and hypothesis-generating clinical genomics research." BMC medical genomics **5**(1): 1-8.

Ferencz, C. (1997). "Genetic and environmental risk factors of major cardiovascular malformations: the Baltimore-Washington infant study 1981-1989." Perspectives in pediatric cardiology **5**: 346-347.

Foja, S., K. Hoffmann, C. Auw-Haedrich, T. Reinhard, A. Rupprecht and C. Gruenauer-Kloevekorn (2016). "Identification of two novel mutations in the cornea-specific TGFBI gene causing unique phenotypes in patients with corneal dystrophies." Int Ophthalmol **36**(6): 867-873.

Frid, C., P. Drott, B. Lundell, F. Rasmussen and G. Annerén (1999). "Mortality in Down's syndrome in relation to congenital malformations." Journal of Intellectual Disability Research **43**(3): 234-241.

Fujiki, K., Y. Hotta, K. Nakayasu, T. Yokoyama, T. Takano, T. Yamaguchi and A. Kanai (1998). "A new L527R mutation of the betaIGH3 gene in patients with lattice corneal dystrophy with deep stromal opacities." Hum Genet **103**(3): 286-289.

Georgopoulos, K., M. Bigby, J.-H. Wang, A. Molnar, P. Wu, S. Winandy and A. Sharpe (1994). "The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages." Cell **79**(1): 143-156.

Gilissen, C., A. Hoischen, H. G. Brunner and J. A. Veltman (2012). "Disease gene identification strategies for exome sequencing." European Journal of Human Genetics **20**(5): 490-497.

Gillentine, M. A. and C. P. Schaaf (2015). "The human clinical phenotypes of altered CHRNA7 copy number." Biochemical pharmacology **97**(4): 352-362.

Gillum, R. F. (1994). "Epidemiology of congenital heart disease in the United States." American heart journal **127**(4): 919-927.

Glick, B. N. and W. C. Roberts (1994). "Congenitally bicuspid aortic valve in multiple family members." The American journal of cardiology **73**(5): 400-404.

Greiner, J. V., M. E. Lindsay, K. R. Kenyon, J. P. Herman and C. V. Reddy (2017). "Meesmann epithelial corneal dystrophy: recurrence following photorefractive keratectomy." Canadian Journal of Ophthalmology **52**(6): e211-e213.

Gruenauer-Kloevekorn, C., I. Clausen, E. Weidle, M. Wolter-Roessler, F. Tost, H. Völcker, D. P. Schulze, W. Heinritz, T. Reinhard and U. Froster (2009). "TGFB1 (BIGH3) gene mutations in German families: two novel mutations associated with unique clinical and histopathological findings." British journal of ophthalmology **93**(7): 932-937.

Gruenauer-Kloevekorn, C., I. Clausen, E. Weidle, M. Wolter-Roessler, F. Tost, H. E. Völcker, D. P. Schulze, W. Heinritz, T. Reinhard, U. Froster, G. Duncker, D. Schorderet and C. Auw-Haedrich (2009). "TGFB1 (BIGH3) gene mutations in German families: two novel mutations associated with unique clinical and histopathological findings." Br J Ophthalmol **93**(7): 932-937.

Ha, N. T., H. M. Chau, T. K. Thanh, K. Fujiki, A. Murakami and A. Kanai (2003). "A novel mutation of the TGFB1 gene found in a Vietnamese family with atypical granular corneal dystrophy." Japanese journal of ophthalmology **47**(3): 246-248.

Hamerton, J., S. Briggs, F. Giannelli and C. Carter (1961). "Chromosome studies in detection of parents with high risk of second child with Down's syndrome." The Lancet **278**(7206): 788-791.

Hammar, B., N. Lagali, S. Ek, S. Seregard, A. Dellby and P. Fagerholm (2010). "Dystrophia Smolandensis: a novel morphological picture of recurrent corneal erosions." Acta ophthalmologica **88**(4): 394-400.

Hampton, T. (2006). "Rare disease research gets boost." Jama **295**(24): 2836-2838.

Han, Y.-P., A. J. Sim, S. C. Vora and A. J. Huang (2012). "A unique TGFB1 protein in granular corneal dystrophy types 1 and 2." Current eye research **37**(11): 990-996.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.

Heitz (1998). "Cardiopathies congénitales." EMC AkOS Encyclopédie pratique de médecine **8:1-14**.

Heitz, F. (1998). "cardiopathies congénitales " Arch pédiatr **2:68-81**.

Hengstschlager, M., C. Mittermayer, C. Repa, R. Drahonsky, J. Deutinger and G. Bernaschek (2004). "Association of deletions of the chromosomal region 15q24-ter and diaphragmatic hernia: a new case and discussion of the literature." Fetal Diagn Ther **19**(6): 510-512.

Herinirina, N. F., L. H. N. O. N. Rajaonarison, A. R. Herijoelison and A. Ahmad (2015). "Epaisseur de l'intima-média carotidienne et facteurs de risque cardio-vasculaires." Pan African Medical Journal **21**(1).

HGMD (2021). The Human Gene Mutation Database
at the Institute of Medical Genetics in Cardiff.
<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=TGFBI>.

Hinton Jr, R. B., K. E. Yutzey and D. W. Benson (2005). "Congenital heart disease: genetic causes and developmental insights." Progress in Pediatric cardiology **20**(2): 101-111.

Ho, S. C., P. Clayton, P. Vasudevan, J. Greening, B. Wardhaugh, N. Shaw, C. Kelnar, J. Kirk and W. Hogler (2015). "Recombinant Human Growth Hormone Therapy in Children with Chromosome 15q26 Deletion." Horm Res Paediatr.

Hochstenbach, R., E. van Binsbergen, J. Engelen, A. Nieuwint, A. Polstra, P. Poddighe, C. Ruivenkamp, B. Sikkema-Raddatz, D. Smeets and M. Poot (2009). "Array analysis and karyotyping: workflow consequences based on a retrospective study of 36,325 patients with idiopathic developmental delay in the Netherlands." European journal of medical genetics **52**(4): 161-169.

Hoffman, J. (1995). "Incidence of congenital heart disease: I. Postnatal incidence." Pediatric cardiology **16**(3): 103-113.

Holly, F. (1985). "Physical chemistry of the normal and disordered tear film." Transactions of the ophthalmological societies of the United Kingdom **104**: 374-380.

Iacobucci, I., C. T. Storlazzi, D. Cilloni, A. Lonetti, E. Ottaviani, S. Soverini, A. Astolfi, S. Chiaretti, A. Vitale and F. Messa (2009). "Identification and molecular characterization of recurrent genomic deletions on 7p12 in the IKZF1 gene in a large cohort of BCR-ABL1–positive acute lymphoblastic leukemia patients: on behalf of Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto Acute Leukemia Working Party (GIMEMA AL WP)." Blood, The Journal of the American Society of Hematology **114**(10): 2159-2167.

Iselin (1999). "Cardiopathies congénitales." Encyclopédie Médico-Chirurgicale (Elsevier Paris), Radiodiagnostic-C(ur-Poumon 32-015-A-12. Pédiatrie. 4-070-A-05:6.

Iselin, C., U. Almagbaly, F. Borst, S. Rohner, F. Schmidlin, A. Campana and P. Graber (1997). "Safety and efficiency of laparoscopic varicocelectomy in one hundred consecutive cases." Urologia internationalis **58**(4): 213-217.

Ishibashi, C. M., C. E. C. de Oliveira, R. L. Guembarovski, B. K. B. Hirata, G. A. F. Vitiello, A. L. Guembarovski, M. K. Amarante, K. B. de Oliveira, M. O. Kishima and C. B. Ariza (2021). "Genetic Polymorphisms of the TGFB1 Signal Peptide and Promoter Region: Role in Wilms Tumor Susceptibility?" Journal of Kidney Cancer and VHL **8**(4): 22.

Ivanov, S. V., A. V. Ivanova, K. Salnikow, O. Timofeeva, M. Subramaniam and M. I. Lerman (2008). "Two novel VHL targets, TGFBI (BIGH3) and its transactivator KLF10, are up-regulated in renal clear cell carcinoma and other tumors." Biochemical and biophysical research communications **370**(4): 536-540.

IW, L. (2008). "Kidney abnormalities in persons with monosomy 15q26." Am J Med Genet A **146A**(13):1761-4.

Jacob, R., A. Tremblay, V. Drapeau, V. Provencher and L. Pérusse (2017). "Susceptibilité à l'obésité: rôle des déterminants génétiques des comportements alimentaires." Canadian Journal of Dietetic Practice and Research **78**(4): 197-203.

Jacquemont, S., A. Reymond, F. Zufferey, L. Harewood, R. G. Walters, Z. Kutalik, D. Martinet, Y. Shen, A. Valsesia and N. D. Beckmann (2011). "Mirror extreme BMI phenotypes associated with gene dosage at the chromosome 16p11. 2 locus." Nature **478**(7367): 97-102.

Jean-Louis DUFIER et Josseline K APLAN (2005). Oeil et Génétique: Chapitre 10: DYSTROPHIE HEREDITAIRE DE LA CORNEE(F.MUNIER,D,SCHORDERET,SUFFER). MASSON.SAS,21,rue Camille Desmoulins,92789,Issy, les moulineaux Cedex 9.

Jonsson, F., B. Byström, A. E. Davidson, L. J. Backman, T. G. Kellgren, S. J. Tuft, T. Koskela, P. Rydén, O. Sandgren and P. Danielson (2015). "Mutations in collagen, type XVII, alpha 1 (COL17A1) cause epithelial recurrent erosion dystrophy (ERED)." Human mutation **36**(4): 463-473.

Jung, J. W., S. A. Kim, E. M. Kang, T. I. Kim, H. S. Cho and E. K. Kim (2014). "Lattice corneal dystrophy type IIIA with hyaline component from a novel A620P mutation and distinct surgical treatments." Cornea **33**(12): 1324-1331.

Källén, K. (1999). "Maternal smoking and congenital heart defects." European journal of epidemiology **15**(8): 731-737.

Kannabiran, C. and G. K. Klintworth (2006). "TGFB1 gene mutations in corneal dystrophies." Human mutation **27**(7): 615-625.

Karolak, J. A., P. Polakowski, J. Szaflik, J. P. Szaflik and M. Gajecka (2016). "Molecular Screening of Keratoconus Susceptibility Sequence Variants in VSX1, TGFB1, DOCK9, STK24, and IPO5 Genes in Polish Patients and Novel TGFB1 Variant Identification." Ophthalmic Genet **37**(1): 37-43.

Kheir, V., V. Cortés-González, J. C. Zenteno and D. F. Schorderet (2019). "Mutation update: TGFB1 pathogenic and likely pathogenic variants in corneal dystrophies." Human mutation **40**(6): 675-693.

Khoshnood, B., N. Lelong, L. Houyel, A.-C. Thieulin, J.-M. Jouannic, S. Magnier, A.-L. Delezoide, J.-F. Magny, C. Rambaud and D. Bonnet (2012). "Prevalence, timing of diagnosis and mortality of newborns with congenital heart defects: a population-based study." Heart **98**(22): 1667-1673.

Kim, B.-G., E. Malek, S. H. Choi, J. J. Ignatz-Hoover and J. J. Driscoll (2021). "Novel therapies emerging in oncology to target the TGF- β pathway." Journal of Hematology & Oncology **14**(1): 1-20.

Kim, M.-A., Y. S. Lee, N. H. Yee, J. S. Choi, J. Y. Choi and K. Seo (2014). "Prevalence of congenital heart defects associated with Down syndrome in Korea." Journal of Korean medical science **29**(11): 1544-1549.

Kitamoto, K., Y. Taketani, W. Fujii, A. Inamochi, T. Toyono, T. Miyai, S. Yamagami, M. Kuroda, T. Usui and Y. Ouchi (2020). "Generation of mouse model of TGFB1-R124C corneal

dystrophy using CRISPR/Cas9-mediated homology-directed repair." Scientific reports **10**(1): 1-10.

Kleinberger, J., K. A. Maloney, T. I. Pollin and L. J. Jeng (2016). "An openly available online tool for implementing the ACMG/AMP standards and guidelines for the interpretation of sequence variants." Genet Med **18**(11): 1165.

Klintworth, G. K. (2009). "Corneal dystrophies." Orphanet journal of rare diseases **4**(1): 1-38.

Klintworth, G. K., W. Bao and N. A. Afshari (2004). "Two mutations in the TGFBI (BIGH3) gene associated with lattice corneal dystrophy in an extensively studied family." Investigative ophthalmology & visual science **45**(5): 1382-1388.

Kocaba, V., K. R. Katikireddy, I. Gipson, M. O. Price, F. W. Price and U. V. Jurkunas (2018). "Association of the gutta-induced microenvironment with corneal endothelial cell behavior and demise in Fuchs endothelial corneal dystrophy." JAMA ophthalmology **136**(8): 886-892.

Koolen, D. A., L. E. Vissers, R. Pfundt, N. De Leeuw, S. J. Knight, R. Regan, R. F. Kooy, E. Reyniers, C. Romano and M. Fichera (2006). "A new chromosome 17q21. 31 microdeletion syndrome associated with a common inversion polymorphism." Nature genetics **38**(9): 999-1001.

Korvatska, E., F. L. Munier, P. Chaubert, M. X. Wang, Y. Mashima, M. Yamada, S. Uffer, L. Zografos and D. F. Schorderet (1999). "On the role of kerato-epithelin in the pathogenesis of 5q31-linked corneal dystrophies." Investigative ophthalmology & visual science **40**(10): 2213-2219.

Kurien, V. A. and M. Duke (1968). "Trisomy 17–18 syndrome Report of a case with diffuse myocardial fibrosis and review of cardiovascular abnormalities." The American journal of cardiology **21**(3): 431-435.

Lakshminarayanan, R., S. S. Chaurasia, V. Anandalakshmi, S.-M. Chai, E. Murugan, E. N. Vithana, R. W. Beuerman and J. S. Mehta (2014). "Clinical and genetic aspects of the TGFBI-associated corneal dystrophies." The ocular surface **12**(4): 234-251.

Lakshminarayanan, R., S. S. Chaurasia, V. Anandalakshmi, S. M. Chai, E. Murugan, E. N. Vithana, R. W. Beuerman and J. S. Mehta (2014). "Clinical and genetic aspects of the TGFBI-associated corneal dystrophies." Ocul Surf **12**(4): 234-251.

Lee, J., Y. W. Ji, S. Y. Park, K. Y. Seo, T. I. Kim and E. K. Kim (2016). "Delayed Onset of Lattice Corneal Dystrophy Type IIIA Due to a Novel T621P Mutation in TGFBI." J Refract Surg **32**(5): 356.

Lek, M., K. J. Karczewski, E. V. Minikel, K. E. Samocha, E. Banks, T. Fennell, A. H. O'Donnell-Luria, J. S. Ware, A. J. Hill and B. B. Cummings (2016). "Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans." Nature **536**(7616): 285-291.

Li, H., B. Handsaker, A. Wysoker, T. Fennell, J. Ruan, N. Homer, G. Marth, G. Abecasis, R. Durbin and G. P. D. P. Subgroup (2009). "The Sequence Alignment/Map format and SAMtools." Bioinformatics **25**(16): 2078-2079.

Li, M. M., M. Datto, E. J. Duncavage, S. Kulkarni, N. I. Lindeman, S. Roy, A. M. Tsimberidou, C. L. Vnencak-Jones, D. J. Wolff and A. Younes (2017). "Standards and guidelines for the interpretation and reporting of sequence variants in cancer: a joint consensus recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists." The Journal of molecular diagnostics **19**(1): 4-23.

Li, W. and A. A. Mills (2014). "Architects of the genome: CHD dysfunction in cancer, developmental disorders and neurological syndromes." Epigenomics **6**(4): 381-395.

Lin, A. E. and H. H. Ardinger (2005). "Genetic epidemiology of cardiovascular malformations." Progress in Pediatric cardiology **20**(2): 113-126.

Lopez, I., J. A. Bafalliu, M. C. Bernabe, F. Garcia, M. Costa and E. Guillen-Navarro (2006). "Prenatal diagnosis of de novo deletions of 8p23.1 or 15q26.1 in two fetuses with diaphragmatic hernia and congenital heart defects." Prenat Diagn **26**(6): 577-580.

Luxenberg, M. N., B. R. Friedland and J. M. Holder (1975). "Superficial microcystic corneal dystrophy." Archives of Ophthalmology **93**(2): 107-110.

M., I. (2010). "Cardiopathies congénitales." EMC Radiodiagnostic **32**:12-15.

Magi, A., M. Benelli, A. Gozzini, F. Girolami, F. Torricelli and M. L. Brandi (2010). "Bioinformatics for next generation sequencing data." Genes **1**(2): 294-307.

Maiella, S., A. Rath, C. Angin, F. Mousson and O. Kremp (2013). "Orphanet and its consortium: where to find expert-validated information on rare diseases." Revue neurologique **169**: S3-8.

Marijon, E., A. Tivane, S. Voicu, A. Vilanculos, D. Jani, B. Ferreira and P. Ou (2006). "Prevalence of congenital heart disease in schoolchildren of sub-Saharan Africa, Mozambique." International journal of cardiology **113**(3): 440-441.

Mashima, Y., Y. Nakamura, K. Noda, M. Konishi, M. Yamada, J. Kudoh and N. Shimizu (1999). "A novel mutation at codon 124 (R124L) in the BIGH3 gene is associated with a superficial variant of granular corneal dystrophy." Archives of Ophthalmology **117**(1): 90-93.

Mashima, Y., S. Yamamoto, Y. Inoue, M. Yamada, M. Konishi, H. Watanabe, N. Maeda, Y. Shimomura and S. Kinoshita (2000). "Association of autosomal dominantly inherited corneal dystrophies with BIGH3 gene mutations in Japan." Am J Ophthalmol **130**(4): 516-517.

Mehta, P. B., C. N. Robson, D. E. Neal and H. Y. Leung (2001). "Keratinocyte growth factor activates p38 MAPK to induce stress fibre formation in human prostate DU145 cells." Oncogene **20**(38): 5359-5365.

Midro, A. T., I. W. Lurie, B. Stasiewicz-Jarocka, W. K. Dawidowska and B. Panasiuk (2008). "Probability rates for different pregnancy outcomes in carriers of reciprocal chromosomal translocations involving chromosome 13." Ginekologia polska **79**(7).

Mohammadi, A., A. Ahmadi Shadmehri, M. Taghavi, G. Yaghoobi, M. R. Pourreza and M. A. Tabatabaiefar (2020). "A pathogenic variant in the transforming growth factor beta I (TGFB1) in four Iranian extended families segregating granular corneal dystrophy type II: A literature review." Iran J Basic Med Sci **23**(8): 1020-1027.

Moussayer, K. (2017). "Journée Internationale des Maladies rares le 28 Février : Des patients entre espoir et incertitude au Maroc." LA GAZETTE DU LABORATOIRE AFRIQUE **117**: 4-5.

Mulligan, L. M., C. Eng, T. Attlé, S. Lyonnet, D. J. Marsh, V. J. Hyland, B. G. Robinson, A. Frilling, C. Verellen-Dumoulin, A. Safar, D. J. Venter, A. Munnich and B. A. J. Ponder (1994). "Diverse phenotypes associated with exon 10 mutations of the RET proto-oncogene." Human Molecular Genetics **3**(12): 2163-2168.

Mullighan, C. G. (2012). "Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia." The Journal of clinical investigation **122**(10): 3407-3415.

Mullighan, C. G., C. B. Miller, I. Radtke, L. A. Phillips, J. Dalton, J. Ma, D. White, T. P. Hughes, M. M. Le Beau and C.-H. Pui (2008). "BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros." Nature **453**(7191): 110-114.

Munier, F. L., B. E. Frueh, P. Othenin-Girard, S. Uffer, P. Cousin, M. X. Wang, E. Héon, G. C. Black, M. A. Blasi and E. Balestrazzi (2002). "BIGH3 mutation spectrum in corneal dystrophies." Investigative ophthalmology & visual science **43**(4): 949-954.

Munier, F. L., B. E. Frueh, P. Othenin-Girard, S. Uffer, P. Cousin, M. X. Wang, E. Héon, G. C. Black, M. A. Blasi, E. Balestrazzi, B. Lorenz, R. Escoto, R. Barraquer, M. Hoeltzenbein, B. Gloor, M. Fossarello, A. D. Singh, Y. Arsenijevic, L. Zografos and D. F. Schorderet (2002). "BIGH3 mutation spectrum in corneal dystrophies." Invest Ophthalmol Vis Sci **43**(4): 949-954.

Munier, F. L., E. Korvatska, A. Djemaï, D. Le Paslier, L. Zografos, G. Pescia and D. F. Schorderet (1997). "Kerato-epithelin mutations in four 5q31-linked corneal dystrophies." Nature genetics **15**(3): 247-251.

Musante, L., H. G. Kehl, F. Majewski, P. Meinecke, S. Schweiger, G. Gillessen-Kaesbach, D. Wieczorek, G. K. Hinkel, S. Tinschert and M. Hoeltzenbein (2003). "Spectrum of mutations in PTPN11 and genotype–phenotype correlation in 96 patients with Noonan syndrome and five patients with cardio-facio-cutaneous syndrome." European journal of human genetics **11**(2): 201-206.

Nagarajan, P., T. M. Onami, S. Rajagopalan, S. Kania, R. Donnell and S. Venkatachalam (2009). "Role of chromodomain helicase DNA-binding protein 2 in DNA damage response signaling and tumorigenesis." Oncogene **28**(8): 1053-1062.

Nakamura, E., Y. Makita, T. Okamoto, K. Nagaya, T. Hayashi, M. Sugimoto, H. Manabe, G. Taketazu, H. Kajino and K. Fujieda (2011). "5.78 Mb terminal deletion of chromosome 15q in a girl, evaluation of NR2F2 as candidate gene for congenital heart defects." Eur J Med Genet **54**(3): 354-356.

Nakamura, E., Y. Makita, T. Okamoto, K. Nagaya, T. Hayashi, M. Sugimoto, H. Manabe, G. Taketazu, H. Kajino and K. Fujieda (2011). "5.78 Mb terminal deletion of chromosome 15q in a girl, evaluation of NR2F2 as candidate gene for congenital heart defects." European journal of medical genetics **54**(3): 354-356.

O'Riordan, A. M., N. McGrath, F. Sharif, N. P. Murphy, O. Franklin, S. A. Lynch and M. J. O'Grady (2017). "Expanding the clinical spectrum of chromosome 15q26 terminal deletions associated with IGF-1 resistance." Eur J Pediatr **176**(1): 137-142.

Okubo, Y., K. Siddle, H. Firth, S. O'Rahilly, L. C. Wilson, L. Willatt, T. Fukushima, S. Takahashi, C. J. Petry, T. Saukkonen, R. Stanhope and D. B. Dunger (2003). "Cell proliferation

activities on skin fibroblasts from a short child with absence of one copy of the type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF1R) gene and a tall child with three copies of the IGF1R gene." J Clin Endocrinol Metab **88**(12): 5981-5988.

Ołdak, M., J. P. Szaflik, A. Ścieżyńska, M. Udziela, R. B. Maksym, B. Rymgayło-Jankowska, C. Hofmann-Rummelt, J. Menzel-Severing, R. Płoski, T. Żarnowski, F. E. Kruse and J. Szaflik (2014). "Late-onset lattice corneal dystrophy without typical lattice lines caused by a novel mutation in the TGFBI gene." Cornea **33**(3): 294-299.

Oliver, V. F., K. A. van Bysterveldt, M. Cadzow, B. Steger, V. Romano, D. Markie, A. W. Hewitt, D. A. Mackey, C. E. Willoughby and T. Sherwin (2016). "A COL17A1 splice-altering mutation is prevalent in inherited recurrent corneal erosions." Ophthalmology **123**(4): 709-722.

Øyen, N., L. J. Diaz, E. Leirgul, H. A. Boyd, J. Priest, E. R. Mathiesen, T. Quertermous, J. Wohlfahrt and M. Melbye (2016). "Pregpregnancy diabetes and offspring risk of congenital heart disease: a nationwide cohort study." Circulation **133**(23): 2243-2253.

Palculict, T. B. (2015). "IDENTIFICATION OF FAMILIAL WILMS TUMOR PREDISPOSITION GENES USING WHOLE GENOME SEQUENCING."

Paliwal, P., A. Sharma, R. Tandon, N. Sharma, J. S. Titiyal, S. Sen, P. Kaur, D. Dube and R. B. Vajpayee (2010). "TGFBI mutation screening and genotype-phenotype correlation in north Indian patients with corneal dystrophies." Molecular vision **16**: 1429.

Pampukha, V. M., S. A. Kravchenko, F. A. Tereshchenko, L. A. Livshits and G. I. Drozhyna (2009). "Novel L558P mutation of the TGFBI gene found in Ukrainian families with atypical corneal dystrophy." Ophthalmologica **223**(3): 207-214.

Pan, Y., C. Yan, Y. Hu, Y. Fan, Q. Pan, Q. Wan, J. Torcivia-Rodriguez and R. Mazumder (2017). "Distribution bias analysis of germline and somatic single-nucleotide variations that impact protein functional site and neighboring amino acids." Scientific reports **7**(1): 1-16.

Peterson, J. K., L. K. Kochilas, K. G. Catton, J. H. Moller and S. P. Setty (2017). "Long-term outcomes of children with trisomy 13 and 18 after congenital heart disease interventions." The Annals of thoracic surgery **103**(6): 1941-1949.

Poot, M., M. J. Eleveld, R. van 't Slot, M. M. van Genderen, A. A. Verrijn Stuart, R. Hochstenbach and F. A. Beemer (2007). "Proportional growth failure and oculocutaneous albinism in a girl with a 6.87 Mb deletion of region 15q26.2-->qter." Eur J Med Genet **50**(6): 432-440.

Poot, M., A. A. V. Stuart, E. van Daalen, A. van Iperen, E. van Binsbergen and R. Hochstenbach (2013). "Variable behavioural phenotypes of patients with monosomies of 15q26 and a review of 16 cases." European journal of medical genetics **56**(7): 346-350.

Qin, J., S. Y. Tsai and M.-J. Tsai (2014). "The critical roles of COUP-TFII in tumor progression and metastasis." Cell & bioscience **4**(1): 1-7.

Reinhart, W. J., D. C. Musch, D. S. Jacobs, W. B. Lee, S. C. Kaufman and R. M. Shtein (2011). "Deep anterior lamellar keratoplasty as an alternative to penetrating keratoplasty: a report by the American Academy of Ophthalmology." Ophthalmology **118**(1): 209-218.

Richards, S., N. Aziz, S. Bale, D. Bick, S. Das, J. Gastier-Foster, W. W. Grody, M. Hegde, E. Lyon and E. Spector (2015). "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." Genetics in medicine **17**(5): 405-423.

Ritter, D. I., S. Roychowdhury, A. Roy, S. Rao, M. J. Landrum, D. Sonkin, M. Shekar, C. F. Davis, R. K. Hart, C. Micheel, M. Weaver, E. M. Van Allen, D. W. Parsons, H. L. McLeod, M. S. Watson, S. E. Plon, S. Kulkarni, S. Madhavan and G. on behalf of the ClinGen Somatic Cancer Working (2016). "Somatic cancer variant curation and harmonization through consensus minimum variant level data." Genome Medicine **8**(1): 117.

Robert-Gnansia, E., C. Francannet, A. Bozio and P. Bouvagnet (2004). "Épidémiologie, étiologie et génétique des cardiopathies congénitales." EMC-Cardiologie-Angéiologie **1**(2): 140-160.

Robida, A., G. M. Folger and H. A. Hajar (1997). "Incidence of congenital heart disease in Qatari children." International Journal of cardiology **60**(1): 19-22.

Rozzo, C., M. Fossarello, G. Galleri, G. Sole, A. Serru, N. Orzalesi, A. Serra and M. Pirastu (1998). "A common beta ig-h3 gene mutation (delta f540) in a large cohort of Sardinian Reis Bücklers corneal dystrophy patients. Mutations in brief no. 180. Online." Hum Mutat **12**(3): 215-216.

Rump, P., T. Dijkhuizen, B. Sikkema-Raddatz, H. H. Lemmink, Y. J. Vos, J. B. Verheij and C. M. van Ravenswaaij (2008). "Drayer's syndrome of mental retardation, microcephaly, short stature and absent phalanges is caused by a recurrent deletion of chromosome 15(q26.2-->qter)." Clin Genet **74**(5): 455-462.

Runager, K., R. V. Basaiawmoit, T. Deva, M. Andreasen, Z. Valnickova, C. S. Sørensen, H. Karring, I. B. Thøgersen, G. Christiansen and J. Underhaug (2011). "Human phenotypically distinct TGFBI corneal dystrophies are linked to the stability of the fourth FAS1 domain of TGFBIp." Journal of Biological Chemistry **286**(7): 4951-4958.

Safe, S., U.-H. Jin, E. Hedrick, A. Reeder and S.-O. Lee (2014). "Minireview: role of orphan nuclear receptors in cancer and potential as drug targets." Molecular endocrinology **28**(2): 157-172.

Santillán-Garzón, S., D. Diego Álvarez, C. Buades, A. Romera-López, L. Pérez-Cabornero, D. Valero-Hervás, D. Catalanpiedra, V. Felipe-Ponce, G. Hernández-Poveda and M. J. Roca (2015). "Diagnóstico molecular de enfermedades genéticas: del diagnóstico genético al diagnóstico genómico con la secuenciación masiva." Rev. Méd. Clín. Condes: 458-469.

Schmitt-Bernard, C. F., C. Guittard, B. Arnaud, J. Demaille, A. Argiles, M. Claustres and S. Tuffery-Giraud (2000). "BIGH3 exon 14 mutations lead to intermediate type I/IIIA of lattice corneal dystrophies." Invest Ophthalmol Vis Sci **41**(6): 1302-1308.

Sharp, A. J., H. C. Mefford, K. Li, C. Baker, C. Skinner, R. E. Stevenson, R. J. Schroer, F. Novara, M. De Gregori and R. Ciccone (2008). "A recurrent 15q13. 3 microdeletion syndrome associated with mental retardation and seizures." Nature genetics **40**(3): 322-328.

Sieber, O. M., L. Lipton, M. Crabtree, K. Heinimann, P. Fidalgo, R. K. Phillips, M.-L. Bisgaard, T. F. Orntoft, L. A. Aaltonen and S. V. Hodgson (2003). "Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH." New England Journal of Medicine **348**(9): 791-799.

Simone Baldovino, M., M. Domenica Taruscio and M. Dario Roccattello (2016). "Rare diseases in Europe: from a wide to a local perspective." Sat **12**: 20.

Slavotinek, A. M., A. Moshrefi, R. Davis, E. Leeth, G. B. Schaeffer, G. E. Burchard, G. M. Shaw, B. James, L. Ptacek and L. A. Pennacchio (2006). "Array comparative genomic hybridization in patients with congenital diaphragmatic hernia: mapping of four CDH-critical regions and sequencing of candidate genes at 15q26.1-15q26.2." Eur J Hum Genet **14**(9): 999-1008.

Slavotinek, A. M., A. Moshrefi, R. Davis, E. Leeth, G. B. Schaeffer, G. E. Burchard, G. M. Shaw, B. James, L. Ptacek and L. A. Pennacchio (2006). "Array comparative genomic hybridization in patients with congenital diaphragmatic hernia: mapping of four CDH-critical

regions and sequencing of candidate genes at 15q26. 1–15q26. 2." European journal of human genetics **14**(9): 999-1008.

Stix, B., M. Leber, P. Bingemer, C. Gross, J. Rüschoff, M. Fändrich, D. F. Schorderet, C. K. Vorwerk, M. Zacharias, A. Roessner and C. Röcken (2005). "Hereditary lattice corneal dystrophy is associated with corneal amyloid deposits enclosing C-terminal fragments of keratoepithelin." Invest Ophthalmol Vis Sci **46**(4): 1133-1139.

Takács, L., G. Losonczy, K. Matesz, I. Balogh, Z. Sohajda, K. Tóth, F. Fazakas, G. Vereb and A. Berta (2007). "TGFB1 (BIGH3) gene mutations in Hungary--report of the novel F547S mutation associated with polymorphic corneal amyloidosis." Mol Vis **13**: 1976-1983.

Thiel, H. (1967). "Eine bisher unbekannte subepitheliale hereditäre Hornhautdystrophie.[A hitherto unknown subepithelial hereditary corneal dystrophy]." Klin Monatsbl Augenheilkd **150**: 862-874.

Tian, X., K. Fujiki, W. Wang, A. Murakami, P. Xie, A. Kanai and Z. Liu (2005). "Novel mutation (V505D) of the TGFB1 gene found in a Chinese family with lattice corneal dystrophy, type I." Jpn J Ophthalmol **49**(2): 84-88.

Tonnies, H., I. Schulze, H. Hennies, L. M. Neumann, R. Keitzer and H. Neitzel (2001). "De novo terminal deletion of chromosome 15q26.1 characterised by comparative genomic hybridisation and FISH with locus specific probes." J Med Genet **38**(9): 617-621.

Tu, J., Q. Ge, S. Wang, L. Wang, B. Sun, Q. Yang, Y. Bai and Z. Lu (2012). "Pair-barcode high-throughput sequencing for large-scale multiplexed sample analysis." BMC genomics **13**(1): 1-9.

Van der Auwera, G. A., M. O. Carneiro, C. Hartl, R. Poplin, G. Del Angel, A. Levy-Moonshine, T. Jordan, K. Shakir, D. Roazen and J. Thibault (2013). "From FastQ data to high-confidence variant calls: the genome analysis toolkit best practices pipeline." Current protocols in bioinformatics **43**(1): 11.10. 11-11.10. 33.

Van Dijk, E. L., H. Auger, Y. Jaszczyszyn and C. Thermes (2014). "Ten years of next-generation sequencing technology." Trends in genetics **30**(9): 418-426.

Van Dooren, B., F. Sloot, C. C. Klaver and A. A. Thiadens (2018). "A New TGFB1-Corneal Dystrophy? Combination with Adult-Onset-Vitelliform Macular Dystrophy." Investigative Ophthalmology & Visual Science **59**(9): 2927-2927.

Veenma, D., H. Eussen, L. Govaerts, S. de Kort, R. Odink, C. Wouters, A. Hokken-Koelega and A. de Klein (2010). "Phenotype–genotype correlation in a familial IGF1R microdeletion case." Journal of medical genetics **47**(7): 492-498.

Viot, G. (2002). "cardiopathies congenitales: quel risque pour la fratrie?" Journal de pediatrie et de puericulture **5**(15): 259-264.

Walters, R. G., S. Jacquemont, A. Valsesia, A. De Smith, D. Martinet, J. Andersson, M. Falchi, F. Chen, J. Andrieux and S. Lobbens (2010). "A new highly penetrant form of obesity due to deletions on chromosome 16p11. 2." Nature **463**(7281): 671-675.

Warren, J. F., R. L. Abbott, M. K. Yoon, J. B. Crawford, W. H. Spencer and T. P. Margolis (2003). "A new mutation (Leu569Arg) within exon 13 of the TGFBI (BIGH3) gene causes lattice corneal dystrophy type I." Am J Ophthalmol **136**(5): 872-878.

Weiss, J. S., H. Møller, W. Lisch, S. Kinoshita, A. J. Aldave, M. W. Belin, T. Kivelä, M. Busin, F. L. Munier and B. Seitz (2008). "The IC3D classification of the corneal dystrophies." Cornea **27**(Suppl 2): S1.

Weiss, J. S., H. U. Møller, A. J. Aldave, B. Seitz, C. Bredrup, T. Kivelä, F. L. Munier, C. J. Rapuano, K. K. Nischal and E. K. Kim (2015). "IC3D classification of corneal dystrophies—edition 2." Cornea **34**(2): 117-159.

Wilson, S. E. (2002). "Analysis of the keratocyte apoptosis, keratocyte proliferation, and myofibroblast transformation responses after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis." Transactions of the American Ophthalmological Society **100**: 411.

Xia, B., L. Hou, H. Kang, W. Chang, Y. Liu, Y. Zhang and Y. Ding (2020). "NR2F2 plays a major role in insulin-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells." BMC cancer **20**(1): 1-12.

Xiang, Q., L. Yuan, Y. Cao, H. Xu, Y. Li and H. Deng (2019). "Identification of a heterozygous mutation in the TGFBI gene in a hui-chinese family with corneal dystrophy." Journal of ophthalmology **2019**.

Yamamoto, S., M. Okada, M. Tsujikawa, Y. Shimomura, K. Nishida, Y. Inoue, H. Watanabe, N. Maeda, H. Kurahashi and S. Kinoshita (1998). "A kerato-epithelin (betaig-h3) mutation in lattice corneal dystrophy type IIIA." American journal of human genetics **62**(3): 719.

Yang, J., X. Han, D. Huang, L. Yu, Y. Zhu, Y. Tong, B. Zhu, C. Li, M. Weng and X. Ma (2010). "Analysis of TGFBI gene mutations in Chinese patients with corneal dystrophies and review of the literature." Mol Vis **16**: 1186-1193.

Yang, Y., D. M. Muzny, J. G. Reid, M. N. Bainbridge, A. Willis, P. A. Ward, A. Braxton, J. Beuten, F. Xia and Z. Niu (2013). "Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders." New England Journal of Medicine **369**(16): 1502-1511.

Yohe, S. and B. Thyagarajan (2017). "Review of clinical next-generation sequencing." Archives of pathology & laboratory medicine **141**(11): 1544-1557.

Yu, Y., P. Qiu, Y. Zhu, J. Li, M. Wu, B. Zhang and K. Yao (2015). "A novel phenotype-genotype correlation with an Arg555Trp mutation of TGFBI gene in Thiel-Behnke corneal dystrophy in a Chinese pedigree." BMC ophthalmology **15**(1): 1-6.

Zenteno, J. C., V. Correa-Gomez, C. Santacruz-Valdez, R. Suarez-Sanchez and C. Villanueva-Mendoza (2009). "Clinical and genetic features of TGFBI-linked corneal dystrophies in Mexican population: description of novel mutations and novel genotype-phenotype correlations." Exp Eye Res **89**(2): 172-177.

Zhang, C., G. Zeng, H. Lin, D. Li, L. Zhao, N. Zhou and Y. Qi (2009). "A novel mutation I522N within the TGFBI gene caused lattice corneal dystrophy I." Mol Vis **15**: 2498-2502.

Zhao, X. C., H. Nakamura, S. Subramanyam, L. E. Stock, T. E. Gillette, S. Yoshikawa, X. Ma and R. W. Yee (2007). "Spontaneous and inheritable R555Q mutation in the TGFBI/BIGH3 gene in two unrelated families exhibiting Bowman's layer corneal dystrophy." Ophthalmology **114**(11): e39-e46.

Zhong, X., S. Chen, W. Huang, J. Yang, X. Chen, Y. Zhou, Q. Zhou and Y. Wang (2010). "Novel and known mutations of TGFBI, their genotype-phenotype correlation and structural modeling in 3 Chinese families with lattice corneal dystrophy." Mol Vis **16**: 224-230.

Zidane, M., T. Truong, F. Lesueur, C. Xhaard, E. Cordina-Duverger, A. Boland, H. Blanché, C. Ory, S. Chevillard and J.-F. Deleuze (2021). "Role of DNA Repair Variants and Diagnostic Radiology Exams in Differentiated Thyroid Cancer Risk: A Pooled Analysis of Two Case–Control Studies." Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers **30**(6): 1208-1217.

WEBOGRAPHIE

Héritage mendélien en ligne chez l'homme (OMIM): 122100 [Encyclopédie site:fr.wikiquibe.net](http://fr.wikiquibe.net).

Institut National Du Cancer-France. Oncogénétique en 2018 - Laboratoires et consultations. www.e-cancer.fr/

Localisation moléculaire du gène *TGFBI* <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/TGFBI#location>.
www.gatinel.com.

"www.omim.org."

ANNEXES

Annexe 1 : Fiche d'exploitation clinique au sein du laboratoire de Génétique Médicale

Identité du patient :	
Date et lieu de naissance :	
Sexe :	
Origine Ethnique :	
Origine :	
Père :	
Mère :	
Consanguinité :	
Cas similaires dans la famille :	
Antécédents personnels :	
Age du début de la maladie :	
Motifs de consultation :	
Examen clinique :	
Examens paracliniques :	
Biologiques :	
Radiologiques :	

Identité du patient :	
Date et lieu de naissance :	

Annexe 2 : Fiches de consentement

Consentement pour une personne adulte

Je soussignécertifie avoir reçu du Docteurune information compréhensible concernant le test génétique.....qui m'a été proposé pour la recherche des anomalies génétiques qui pourraient être la cause de ma maladie.

Fait à Rabat..... le

Signature de l'intéressé :

Signature du médecin :

Consentement pour une personne mineur

Je soussignécertifie avoir reçu du Docteurune information compréhensible concernant le test génétique.....proposé à mon enfant né(e) le.....à

Cette analyse a pour but de déterminer les anomalies génétiques qui pourraient être en rapport avec la maladie de mon enfant.

Fait à Rabat le

Signature du parent :

Signature du médecin :

Annexe 3 : Milieu de culture

Chaque tube contient

-Milieu préparé ou (RPMI 1640 : 5ml)

-Sérum de veau foetal (S.V.F: 0.1ml)

-Héparine : 0,05ml

Annexe 4 : Lyse des globules rouges

Dans un tube Eppendorf de 1,5 ml, 200 µl du sang total est soumis à une lyse complète des globules rouges par incubation à 56°C pendant 10 minutes après addition de 200 µl de tampon et 20 µl de protéinase K.

Annexe 5 : Méthode SANGER

Le principe de cette méthode consiste à initier la polymérisation de l'ADN à l'aide d'un petit oligonucléotide (amorce) complémentaire à une partie du fragment d'ADN à séquencer. L'élongation de l'amorce est réalisée par le fragment de Klenow (une ADN polymérase I dépourvue d'activité exonucléase 5'→3') et maintenue par des ADN polymérases thermostables, celles qui sont utilisées pour la PCR. Les quatre désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) sont ajoutés, ainsi qu'une faible concentration de l'un des quatre didésoxyribonucléotides (ddATP, ddCTP, ddGTP ou ddTTP). Ces didésoxyribonucléotides agissent comme des « poisons » terminateurs de chaîne : une fois incorporés dans le nouveau brin synthétisé, ils empêchent la poursuite de l'élongation. Cette terminaison se fait spécifiquement au niveau des nucléotides correspondant au didésoxyribonucléotide incorporé dans la réaction. Pour le séquençage complet d'un même fragment d'ADN, on répète cette réaction quatre fois en parallèle, avec les quatre didésoxyribonucléotides différents. Par exemple, dans la réaction où on a ajouté du ddGTP, la synthèse s'arrête au niveau des G. Le mélange réactionnel contenant, à la fois du dGTP et un peu de ddGTP, la terminaison se fait de manière statistique suivant que l'ADN polymérase utilise l'un ou l'autre de ces nucléotides. Il en résulte un mélange de fragments d'ADN de tailles croissantes, qui se terminent tous au niveau d'un des G dans la séquence. Ces fragments sont ensuite séparés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide, ce qui permet ainsi de repérer la position des G dans la séquence. La détection des fragments ainsi synthétisés se fait en incorporant un traceur dans l'ADN synthétisé. Initialement ce traceur était radioactif ; aujourd'hui, on utilise des traceurs fluorescents, attachés soit à l'oligonucléotide, soit au didésoxyribonucléotide.

Annexe 6 : Exosap

-Produit de nettoyage enzymatique des produits de PCR en 1 étapeRapide et simple : réaction enzymatique en une étape de 30 minutes.

-Meilleure performance : séquençage sans « miscalls » contrairement aux méthodes de nettoyage utilisant : des colonnes.

-des billes des méthodes n'utilisant pas la Shrimp phosphatase originale100% des produits de PCR récupérés : quelle que soit leur taille.

-Flexibilité en fonction du volume de l'échantillon : entre 5 µl à 5 litresStabilité : ExoSAP-IT® est stable8 heures à 25°Cou une semaine à 4°C.

-Version haut débit : moins visqueux, compatible avec les automates. Existe en barrette de 8-tubes ou en plaque de 96-puits.

Annexe 7 : Séphadex

Le Sephadex est un gel de dextrane (polymère de glucose α -1-6 produit par *Leuconostocmesenteroides*), auquel on fait subir une réticulation. Il se présente sous forme de billes poreuses, dont la porosité dépend du degré de réticulation. Ces billes sont très hydrophiles et gonflent dans l'eau. Il en existe différents types en fonction de la taille des billes et de leur porosité.

CASE REPORT

Open Access

Novel mutation in the *TGFBI* gene in a Moroccan family with atypical corneal dystrophy: a case report



Yahya Benbouchta^{1,2*}, Imane Cherkaoui Jaouad¹, Habiba Tazi⁴, Hamza Elorch⁴, Mouna Ouhenach³, Abdelali Zrhidri³, Khalid Sadki², Abdelaziz Sefiani^{1,3}, Jaber Lyahyai³ and Amina Berraho⁴

Abstract

Background: Corneal dystrophies (CDs) are a heterogeneous group of bilateral, genetically determined, noninflammatory bilateral corneal diseases that are usually limited to the cornea. CD is characterized by a large variability in the age of onset, evolution and visual impact and the accumulation of insoluble deposits at different depths in the cornea. Clinical symptoms revealed bilateral multiple superficial, epithelial, and stromal anterior granular opacities in different stages of severity among three patients of this family. A total of 99 genes are involved in CDs. The aim of this study was to identify pathogenic variants causing atypical corneal dystrophy in a large Moroccan family and to describe the clinical phenotype with severely different stages of evolution.

Case presentation: In this study, we report a large Moroccan family with CD. Whole-exome sequencing (WES) was performed in the three affected members who shared a phenotype of corneal dystrophy in different stages of severity. Variant validation and familial segregation were performed by Sanger sequencing in affected sisters and mothers and in two unaffected brothers. Whole-exome sequencing showed a novel heterozygous mutation (c.1772C > A; p.Ser591Tyr) in the *TGFBI* gene. Clinical examinations demonstrated bilaterally multiple superficial, epithelial and stromal anterior granular opacities in different stages of severity among three patients in this family.

Conclusions: This report describes a novel mutation in the *TGFBI* gene found in three family members affected by different phenotypic aspects. This mutation is associated with Thiel-Behnke corneal dystrophy; therefore, it could be considered a novel phenotype genotype correlation, which will help in genetic counselling for this family.

Keywords: Corneal dystrophy, Thiel-behnke corneal dystrophy, *TGFBI* gene, Whole-exome sequencing, Case report

Background

Corneal dystrophies (CDs) are hereditary bilateral primary alterations of the cornea that are not related to prior inflammation or systemic diseases; they mostly appear in the late second decade of progressive evolution [1]. These alterations have no systemic manifestations, and they present with variable shaped corneal

opacities that impair visual acuity to varying degrees and often result in varying degrees of damage to corneal transparency and serious visual impairment [2]. Most corneal dystrophies tend to be autosomal dominant in inheritance, with a high degree of penetrance; few forms are inherited as autosomal recessive traits [3], such as macular corneal dystrophy, which is a corneal stromal dystrophy that leads to loss of corneal transparency and decreased vision [4]. The most commonly used classification (The IC3D: International Committee for Classification of Corneal Dystrophy) divides CDs into epithelial and subepithelial dystrophy, epithelial-stromal *TGFBI*

*Correspondence: benbouchtayahya@yahoo.fr

¹ Department of Medical Genetics, National Institute of Health, 27, Avenue Ibn, BP 769 Agdal, 10 090 Rabat, Morocco
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2021. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

dystrophy, stromal dystrophy, and endothelial dystrophy with new genetic, clinical and pathologic information [5, 6]. Various genes have been involved in CDs. To our knowledge, 69 disease-associated variants in the transforming growth factor beta-induced gene (*TGFBI*, OMIM 601,692) have been described as being involved in different CD subtypes in patients. The IC3D classification describes *TGFBI*-linked dystrophies by the recognizing that they affect multiple layers rather than being confined to one corneal layer [7–14].

Several phenotypes have been described according to corneal layer alterations and the investigation of pathogenic mutations in the *TGFBI* gene, with the exception of metabolic effects. Pathogenic mutations in the *TGFBI* gene have been implicated in various phenotypes depending on the degree of damage to the corneal layer, such as Thiel-Behnke corneal dystrophy (TBCD, OMIM 602,082), Reis-Bücklers corneal dystrophy (RBCD, OMIM 608,470), Groenouw granular corneal dystrophy type I (CDGG1), lattice corneal dystrophy I and IIIA (LCD1, OMIM 122,200 and LCD3A, OMIM 608,471) and corneal dystrophy with epithelial basement membrane (EBMD, OMIM 121,820) [15, 16]. Such dystrophy is called variant LCD by IC3D conventions [5]. Here, we present a novel heterozygous mutation (c.1772C>A; p.Ser591Tyr) in the *TGFBI* gene using whole-exome sequencing within a Moroccan family with CD.

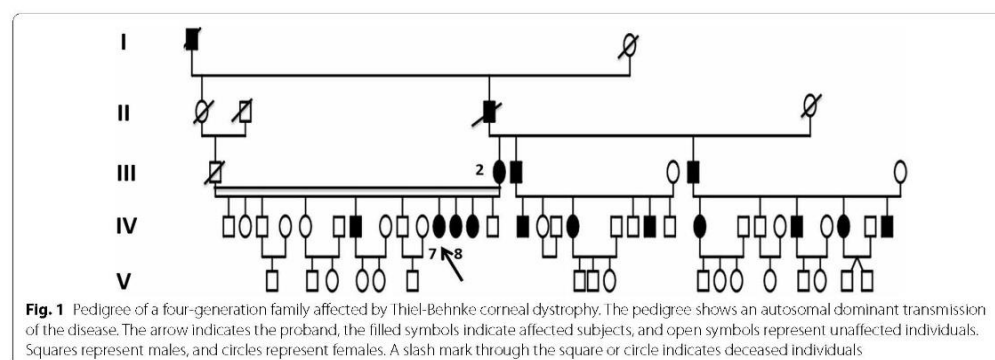
Case presentation

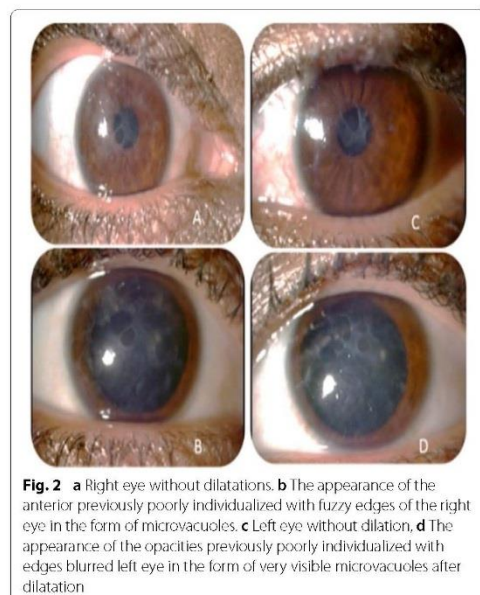
Three patients in a consanguineous family from southern Morocco were referred to our Department of Medical Genetics at the National Health in Rabat for Corneal Dystrophy. A five-generational pedigree was constructed after a thorough interview of the affected mother (III-2). The available three family members were affected (IV-7, IV-8 and III-2), including two phenotypically unaffected

individuals (IV-1, IV-3). An autosomal dominant mode of inheritance was determined (Fig. 1). Clinical features of the patients are given below.

Patient 1 (IV-7) was a 34-year-old woman who complained of recurrent episodes of corneal pain since the age of 18 associated with a decrease in visual acuity. Her vision was 4/10 OD and 6/10 OS. Slit lamp examinations revealed anterior epithelial and stromal corneal dystrophy in the two eyes in the form of spaced microvacuoles by heterogeneous thickening of the epithelium due to thickening of an abnormal subepithelial fibrous layer and poorly individualized anterior opacities, with fuzzy edges (Fig. 2). The rest of the examination of the anterior segment was normal, including a normal iris, a clear lens, and an intraocular pressure of 17 mmHg in the ODG. The optical coherence tomography (OCT) scan showed an unevenness of the epithelial layers by a homogeneous confluent layer of hyperreflected deposits with a serrated anterior border taking the sawtooth appearance, replacing the Bowman layer and reaching the anterior stroma (Fig. 3a–d). It is thicker and becomes thinner on the periphery and disappears towards the limb. The pachymetry is 512 μ m in OD and 523 μ m in OS.

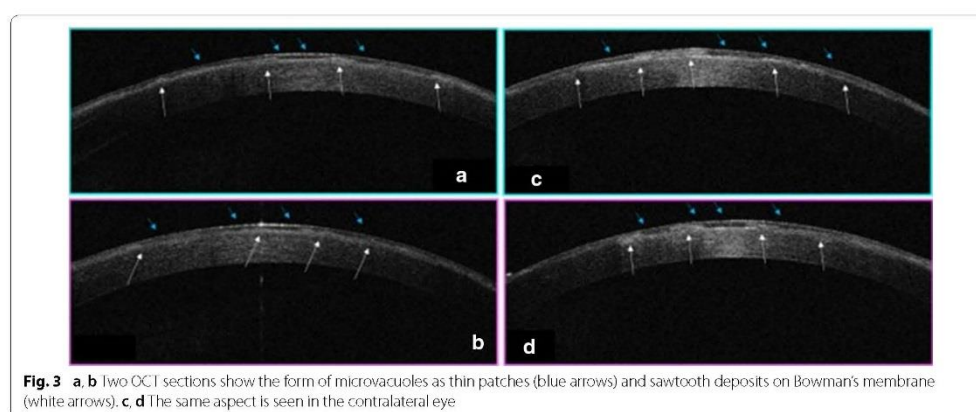
Patient 2 (IV-8) is a 44-year-old woman who presents episodes of recurrent keratitis with a progressive decrease in visual acuity since 20 years of age. Visual acuity in OD shows that she counts the fingers at 3 m/OS at 2/10 (irremovable). Examination with the slit lamp showed anterior epithelial and stromal corneal dystrophy in the form of microvacuoles in the OD and OS groups, especially in the periphery, with heterogeneous thickening of the epithelium, which was more pronounced in the cen-

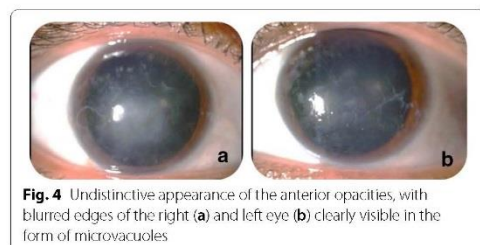




tre, giving a large central opacity with fuzzy edges in both eyes (Fig. 4a, b). She had a clear lens; ocular tone at 15 mmHg in OD 14 mmHg in OS, and a normal fundus. OCT of the cornea showed unevenness of the anterior epithelial and stromal layers with thicker hyperreflective deposits and a clear central opacity in both eyes (Fig. 5a-d), as well as pachymetry at 538 μm in OD and 543 μm in OS.

Patient 3 (III-2) is a 72-year-old woman with bilateral osteoarthritis, and she reports episodes of recurrent corneal pain. For her visual acuity, in far vision OD, she could barely see the movement of the fingers/OS (she counted the fingers at 3 m). The slit lamp examination showed central and paracentric yellowish and gelatinous central and paracentric deposition in the right eye associated with a corneal opacity deeper than the previous one and affecting the epithelial layers of Bowman's membrane and the anterior stroma in the form of an epithelial fibrous layer, which covered almost the entire corneal surface (Fig. 6). The rest of the examination is hampered by the very important dystrophy of the right eye (i.e., ineluctable fundus). In the left eye, slit lamp examination showed CD involving the epithelial layers of Bowman's membrane and the anterior stroma in the form of heterogeneous thickening at the centre, associated with opacity with fuzzy boundaries and a corticonuclear cataract (Fig. 6). In the fundus, pupillary glow with flattened retina was noted. OCT of the cornea showed thin patches (blue arrows) of microvacuoles in the right eye associated with a significant loss of epithelial cells with disorganization of the epithelial layers, the absence of Bowman's membrane, and an anterior intrastromal bubble (white arrows). The pachymetry is at 586 μm (Fig. 7). In the left eye, OCT showed irregularity of the corneal surface with disorganization of the epithelial layers, discontinuous Bowman's membrane, and anterior stromal reshaping, especially in the centre (Fig. 7). The process of corneal transplantation in this patient is ongoing.





After obtaining written consent from all participants involved in the study, we collected blood samples from family members. Blood samples were collected from five members of the family. Genomic DNA was extracted from whole peripheral blood by using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen Valencia, CA) strictly following the manufacturer's protocol. Whole-exome sequencing (WES) was performed for the three patients; 500 ng of fragmented DNA was obtained by enzymatic fragmentation with the Kapa Hyper Plus Kit (KapaBiosystems Inc. Wilmington, MA, USA) and was amplified according to the manufacturer instructions and subjected to enrichment with SeqCap EZ Human Exome v3.0 Roche Nimblegen (Roche, Basel, Switzerland).

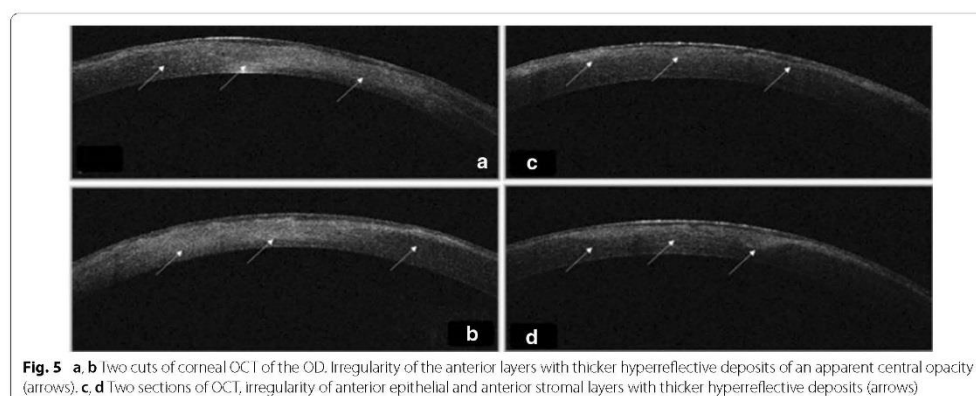
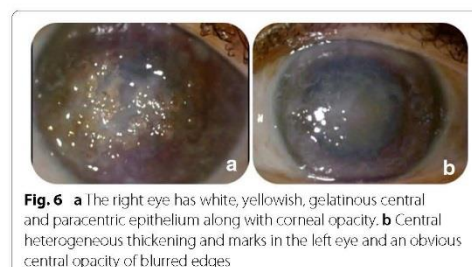
The Illumina HiSeq 2500 system was used to sequence 64 enriched megabases in fast-running double-ended mode (2×100 bp). bcl2fastq v1.8.4 (Illumina) was used to convert the original data (bcl file) into a fastq file. The sequence was analysed according to GATK best practice recommendations; BWA-MEM was used for mapping, and GATK (haplotype calling program) was used

for variant calling. Variant Studio (Illumina) was used for annotation and filtering steps.

Candidate variants were selected using an autosomal dominant mode of inheritance according to the following criteria: i) heterozygous variants, ii) nonsynonymous variants, iii) variants predicted as pathogenic or likely pathogenic, iv) variants with a minor allele frequency (MAF) of <0.01 were selected from the 1000 Genomes Project (<http://www.1000genomes.org/>) and ESP6500 exome project (<https://evs.gs.washington.edu/EVS/>) and v) segregation analysis. Candidate variants in favour of clinical manifestations and passing the criteria were validated by Sanger sequencing.

The established variants were cross-checked with the 1000 Genomes database (<http://www.1000genomes.org/>) with the Exome Variant Server (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), HGMD (<http://www.biobase-international.com/product/hgmd>) and with the ClinVar database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>).

To confirm the mutation detected by exome sequencing, standard PCR was carried out to amplify exon 10



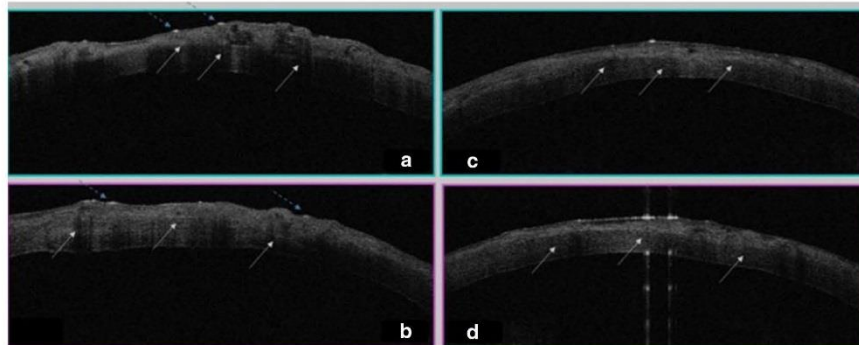


Fig. 7 **a, b** Two sections of corneal OCT of OD. Deposits (white arrows); a significant reshaping of the cornea. Disorganization of the epithelial layer, absence of Bowman's membrane and blebs in the anterior intrastromal cornea (white arrows). **c, d** Two sections of corneal OCT of the left eye, irregularity of the corneal surface and disorganization of the epithelial layer, absence of Bowman's membrane in different sites and the presence of a thick deposit layer of intrastromal to the centre (arrows)

of the *TGFBI* gene by using the *TGFBI*_F:5'-GACCAG GCTAATTACCATTCTTG-3' and *TGFBI*_R:5'-TGA GATATGTCCTGGAGCCC-3' primer pair. Amplification products were electrophoresed on a 1% agarose gel. Sanger sequencing was performed with dye terminator chemistry (ABI Prism BigDye v3.1) and run on an automated sequencer using the 3130 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific). The results obtained were aligned with the reference genome (GRCh37/hg19) and then analysed by DNA variant analysis software (Mutation Surveyor® software).

The transmission form of this family was consistent with autosomal dominant inheritance (Fig. 1). Clinical examinations demonstrated bilaterally multiple superficial, epithelial and stromal anterior granular opacities in different stages of severity among three patients of this family. The three patients with the same mutation shared a mixed phenotype with a superficial form of granular corneal dystrophy (GCD) type 1 and TBCD patterns.

Whole-Exome Sequencing and Variant Validation: WES was performed on three family members (IV-7, IV-8 and III-2). The analysis of the data of the three patients shows 30,887 variants in 19,712 genes. After filtering, this number was reduced to a single allelic variant in the *TGFBI* gene. The filtering of variants is illustrated in Fig. 8. Only a heterozygous mutation (c.1772C>A; p.Ser591Tyr) in the *TGFBI* gene, identified in these three patients, was proposed as the potential pathogenic mutation within this family (Fig. 9a).

Bioinformatics analysis using Polyphen-2 and SIFT suggested that this mutation was probably damaging.

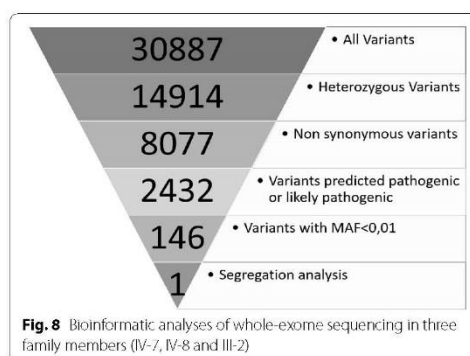
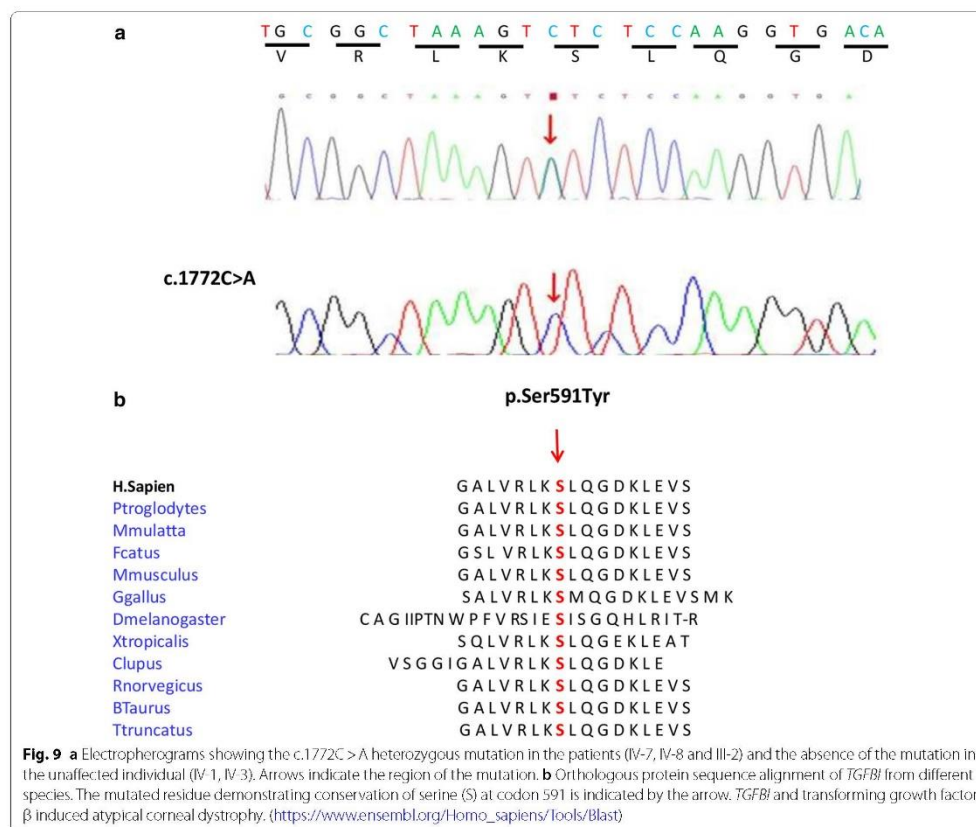


Fig. 8 Bioinformatic analyses of whole-exome sequencing in three family members (IV-7, IV-8 and III-2)

A high degree of conservation of this amino acid was demonstrated by a score of 5.52 calculated by Genomic Evolutionary Rate Profiling (GERP) <http://mendel.stanford.edu/SidowLab/downloads/gerp/index.html>. Comparative amino acid sequence alignment of *TGFBI* across different species revealed that this mutation occurred at highly conserved positions (Fig. 9b) (https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Tools/Blast). The mutation was confirmed by Sanger sequencing in the affected sister and mother and two unaffected brothers.

Furthermore, the variant was not present in the GnomAD browser (accessed July 2020) or in our in-house WES database of 100 unrelated individuals of Moroccan ethnicity who had undergone WES for diseases other than corneal dystrophy.



The genomic and clinical data both supported a diagnosis of Thiel-Behnke corneal dystrophy in this family.

Discussion and conclusions

Thiel-Behnke corneal dystrophy was first described in 1967 and is characterized by subepithelial honeycomb-shaped corneal opacities in the superficial cornea, progressive visual impairment and autosomal dominant inheritance [17]. Symptoms begin with recurrent corneal erosion during childhood (first and second decade of life), and visual acuity is affected later in life. TBCD can be particularly confused with RBCD during the first two decades of life.

TBCD presents as bilaterally cross-linked epithelial opacities in honeycombs with remarkable symmetry with the accumulation of reticular flecks at the level of the Bowman membrane.

The peripheral cornea is typically not involved but can be affected with time in older patients. While RBCD has a geographic-like phenotype, TBCD has a honeycomb-like phenotype. Histopathologically, TBCD is characterized by alternating irregular thickening and thinning and a focal absence of the epithelial basement membrane.

The Bowman layer is replaced by a superficial fibrocellular scar with a pathognomonic wavy sawtoothed pattern or "curly" fibres. The prevalence of TBCD is unknown. Only a few cases have been reported in European populations, the United States, Japanese populations and other ethnicities, but none have been reported in North African populations [18, 19]. To our knowledge, mutations (p.Arg555Gln; p.Arg555Trp) in the *TGFBI* gene and in the same position have also been reported by Xiang et al. and Yu Y et al. [20, 21] and were correlated with TBCD [7, 22, 23]. In this study, we identified a novel mutation in the *TGFBI* gene (c.1772C > A; p.Ser591Tyr).

To our knowledge, the association of the p.Ser591Tyr mutation in TBCD has not been reported previously and is not listed in LOVD v.3.0 (Leiden open variation database). The *TGFBI* gene is located on chromosome 5q31.1 and encodes a protein of 17 exons composed of 683 amino acids [24, 25]. This protein is used for both cell adhesion and the integrin recognition sequence. However, extracellular matrix protein (TGFBIp) contains an EMILIN-like domain rich in N-terminal cysteine, four consecutive and highly homologous domains of fasciclin 1 (FAS1), and a C-terminal arginine-glycine-aspartic acid motif [26, 27]. All pathogenic variants caused the accumulation of insoluble extracellular material in the cornea [28]. The accumulation of full length and fragments of aberrant TGFBIp has been demonstrated in corneal deposits [29]. It appears that mutations are also likely to change protein degradation pathways and impact the structure and stability of aggregated proteins [24]. Most gene *TGFBI* mutations associated with CD are heterozygous, and some patients with homozygous mutations have a more severe phenotype, indicating that the potential toxic effect has a dose response effect [30]. The p.Ser591Tyr mutation is predicted to be damaging and is located in the fourth domain (domain Fasc 4). All the *TGFBI* mutations described, except p.Arg124Cys, are located exactly at the boundary or in this domain. This domain is suspected to have a specific action directly or by interaction with an unknown protein [31].

The two hotspots in the *TGFBI* gene have been reported to be associated with the most common corneal dystrophies; the p.Arg555Trp mutation in GCD1 and the p.Arg124His mutation in GCD2. The p.Arg124Cys mutation was reported in LCD1, whereas the p.Arg124Leu mutation was reported in anterior stromal CD, and the p.Arg555Gln mutation was reported in RBCD [32].

The management of CDs varies with the specific disease. For the treatment of this pathology, corneal transplantation is the recommended treatment, a major limitation being the recurrence of posttransplant corneal deposits; however, some patients are treated with drugs, and others use methods that suggest removal of the abnormal layer, such as phototherapeutic keratectomy or deep anterior lamellar keratoplasty (DALK) [27].

Regarding our family case, the chronological evolution of this new dystrophy indicates early treatment by photokeratectomy in an earlier stage with a promising post-operative result. The particularity in this family is the evolution and preservation of the posterior layer, which will lead to adapted surgery.

In summary, in this paper, we report a novel pathogenic mutation in the *TGFBI* gene that could be a

novel phenotype genotype correlation. The clinical and genetic results of our study may further expand the spectrum of TGFBI-linked CDs and may be of great help in genetic counselling for this family.

Abbreviations

CD: Corneal dystrophy; WES: Whole-exome sequencing; IC3D: The international committee for classification of corneal dystrophies; TGFBI: Transforming growth factor beta induced; TBCD: Thiel-Behnke corneal dystrophy; RBCD: Reis-Bücklers corneal dystrophies; CDGG1: Groenouw granular corneal dystrophy type I; LCD: Lattice corneal dystrophies; EBMD: Corneal dystrophy with epithelial basement membrane; GCD: Granular corneal dystrophy; OCT: Optical coherence tomography; FAS1: Fasciclin 1; DALK: Deep anterior lamellar keratoplasty.

Acknowledgements

We thank the patient's parents for their gracious participation and support.

Authors' contributions

YB and IC drafted the manuscript and carried out the Sanger study. HT, HE and AB carried out diagnostic studies and critically revised the work for important intellectual content clinics. MO drafted the manuscript. AZ and JL participated in the design of the study and the exome analysis and revised the manuscript. KS and AS participated in the design of the study and in the draft of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This study has no funding source.

Availability of data and materials

The datasets analyzed during the current study are available in the zenodo; number: 4288687; direct link: <https://zenodo.org/record/4288687#X70HP3BK1t> Repository. The novel variant has been submitted to the specific gene variant database Leiden Open Variation Database (LOVD; individual number: 00319928) <https://databases.lovd.nl/shared/variants/0000703906> and ClinVar database (accession number: SCV001442510.1) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/submit/505877>. The download links of public data used in this study are listed below: ftp://ftp.ensembl.org/pub/grch37/current/fasta/homo_sapiens/dna and then analyzed by DNA variant analysis software (Mutation Surveyor[®] software). The established variants were cross-checked with the 1000 genomes database (<http://www.1000genomes.org/>), with the Exome Variant Server (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), HGMD (<http://www.biobase-international.com/product/hgmd>) and with the «clinvar» database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>).

Ethics approval and consent to participate

Ethical approval is considered unnecessary according to national provisions. This report was not presented as a research study, as all family members were seen in a medical consultation for diagnostic purposes, and they gave their written consent to participate and benefit from the molecular analysis.

Consent for publication

This family provided written consent for clinical data to be published.

Competing interests

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Author details

¹ Department of Medical Genetics, National Institute of Health, 27, Avenue Ibn, BP 769 Agdal, 10 090 Rabat, Morocco. ² Laboratory of Human Pathology, Faculty of Sciences, Mohammed V University, Rabat, Morocco. ³ Research Team in Genomics and Molecular Epidemiology of Genetic Diseases, Genomic Center of Human Pathologies, Medical School and Pharmacy, University Mohammed V, Rabat, Morocco. ⁴ Ophthalmology Department, Hôpital Des Spécialités, Rabat, Morocco.

Received: 14 December 2020 Accepted: 21 December 2020
Published online: 06 January 2021

References

- Musch DC, Niziol LM, Stein JD, Kamyar RM, Sugar A. Prevalence of corneal dystrophies in the United States: estimates from claims data. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(9):6959–63.
- Stone EM, Mathers WD, Rosenwasser GO, Holland EJ, Folberg R, Krachmer JH, et al. Three autosomal dominant corneal dystrophies map to chromosome 5q. *Nat Genet*. 1994;6(1):47–51.
- Afshari NA, Bahadur RP, Eifrig DE Jr, Thogersen IB, Enghild JJ, Klintworth GK. Atypical asymmetric lattice corneal dystrophy associated with a novel homozygous mutation (Val624Met) in the TGFB1 gene. *Mol Vis*. 2008;14:495–9.
- Aggarwal S, Peck T, Golen J, Karcioğlu ZA. Macular corneal dystrophy: a review. *Surv Ophthalmol*. 2018;63(5):609–17.
- Weiss JS, Moller HU, Aldave AJ, Seitz B, Bredrup C, Kivela T, et al. IC3D classification of corneal dystrophies—edition 2. *Cornea*. 2015;34(2):117–59.
- Bourges JL. Corneal dystrophies. *J Fr Ophtalmol*. 2017;40(7):606–21.
- Khouri V, Cortes-Gonzalez V, Zenteno JC, Schorderet DF. Mutation update: TGFB1 pathogenic and likely pathogenic variants in corneal dystrophies. *Hum Mutat*. 2019;40(6):675–93.
- Bouyacoub Y, Falfoul Y, Ouederni M, Sayeb M, Chedli A, Chargui M, et al. Granular type 1 corneal dystrophy in a large consanguineous Tunisian family with homozygous p.R124S mutation in the TGFB1 gene. *Ophthalmic Genet*. 2019;40(4):329–37.
- Kattan JM, Serna-Ojeda JC, Sharma A, Kim EK, Ramirez-Miranda A, Cruz-Aguilar M, et al. Vortex pattern of corneal deposits in granular corneal dystrophy associated with the p.(Arg555Trp) mutation in TGFB1. *Cornea*. 2017;36(2):210–6.
- Oldak M, Szaflik JP, Scieczynska A, Udziela M, Maksym RB, Rymgaylo-Jankowska B, et al. Late-onset lattice corneal dystrophy without typical lattice lines caused by a novel mutation in the TGFB1 gene. *Cornea*. 2014;33(3):294–9.
- Zhang T, Yan N, Yu W, Liu Y, Liu G, Wu X, et al. Molecular genetics of Chinese families with TGFB1 corneal dystrophies. *Mol Vis*. 2011;17:380–7.
- Vithana EN, Morgan P, Sundaresan P, Ebenezer ND, Tan DT, Mohamed MD, et al. Mutations in sodium-borate cotransporter SLC4A11 cause recessive congenital hereditary endothelial dystrophy (CHED2). *Nat Genet*. 2006;38(7):755–7.
- Biswas S, Munier FL, Yardley J, Hart-Holden N, Perveen R, Cousin P, et al. Missense mutations in COL8A2, the gene encoding the alpha2 chain of type VIII collagen, cause two forms of corneal endothelial dystrophy. *Hum Mol Genet*. 2001;10(21):2415–23.
- Aldave AJ, Gutmark JG, Yellone VS, Affeldt JA, Meallet MA, Udar N, et al. Lattice corneal dystrophy associated with the Ala546Asp and Pro551Gln missense changes in the TGFB1 gene. *Am J Ophthalmol*. 2004;138(5):772–81.
- Song JS, Lim DH, Chung ES, Chung TY, Ki CS. Mutation analysis of the TGFB1 gene in consecutive Korean patients with corneal dystrophies. *Ann Lab Med*. 2015;35(3):336–40.
- Hao XD, Zhang YY, Chen P, Li SX, Wang Y. Uncovering the profile of mutations of transforming growth factor beta-induced gene in Chinese corneal dystrophy patients. *Int J Ophthalmol*. 2016;9(2):198–203.
- Thiel HJ, Behnke H. A hitherto unknown subepithelial hereditary corneal dystrophy. *Klin Monbl Augenheilkd*. 1967;150(6):862–74.
- Mashima Y, Nakamura Y, Noda K, Konishi M, Yamada M, Kudoh J, et al. A novel mutation at codon 124 (R124L) in the BIGH3 gene is associated with a superficial variant of granular corneal dystrophy. *Arch Ophthalmol*. 1999;117(1):90–3.
- Hammar B, Lagali N, Ek S, Seregard S, Dellby A, Fagerholm P. Dystrophia Smolandensis: a novel morphological picture of recurrent corneal erosions. *Acta Ophthalmol*. 2010;88(4):394–400.
- Xiang Q, Yuan L, Cao Y, Xu H, Li Y, Deng H. Identification of a heterozygous mutation in the TGFB1 gene in a hui-chinese family with corneal dystrophy. *J Ophthalmol*. 2019;2019:2824179.
- Yu Y, Qiu P, Zhu Y, Li J, Wu M, Zhang B, et al. A novel phenotype-genotype correlation with an Arg555Trp mutation of TGFB1 gene in Thiel-Behnke corneal dystrophy in a Chinese pedigree. *BMC Ophthalmol*. 2015;15:131.
- Munier FL, Frueh BE, Othenin-Girard P, Uffer S, Cousin P, Wang MX, et al. BIGH3 mutation spectrum in corneal dystrophies. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43(4):949–54.
- Zhao XC, Nakamura H, Subramanyam S, Stock LE, Gillette TE, Yoshikawa S, et al. Spontaneous and inheritable R555Q mutation in the TGFB1/BIGH3 gene in two unrelated families exhibiting Bowman's layer corneal dystrophy. *Ophthalmology*. 2007;114(11):e39–46.
- Han YP, Sim AJ, Vora SC, Huang AJ. A unique TGFB1 protein in granular corneal dystrophy types 1 and 2. *Curr Eye Res*. 2012;37(11):990–6.
- Gruenauer-Kloevekorn C, Clausen I, Weidle E, Wolter-Roessler M, Tost F, Volcker HE, et al. TGFB1 (BIGH3) gene mutations in German families: two novel mutations associated with unique clinical and histopathological findings. *Br J Ophthalmol*. 2009;93(7):932–7.
- Courtney DG, Poulsen ET, Kennedy S, Moore JE, Atkinson SD, Maurizi E, et al. Protein composition of TGFB1-R124C- and TGFB1-R555W-associated aggregates suggests multiple mechanisms leading to lattice and granular corneal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56(8):4653–61.
- Lakshminarayanan R, Chaurasia SS, Anandalakshmi V, Chai SM, Murugan E, Vithana EN, et al. Clinical and genetic aspects of the TGFB1-associated corneal dystrophies. *Ocul Surf*. 2014;12(4):234–51.
- Kannabiran C, Klintworth GK. TGFB1 gene mutations in corneal dystrophies. *Hum Mutat*. 2006;27(7):615–25.
- Korvatska E, Munier FL, Chabert P, Wang MX, Mashima Y, Yamada M, et al. On the role of kerato-epithelin in the pathogenesis of 5q31-linked corneal dystrophies. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40(10):2213–9.
- Paliwal P, Sharma A, Tandon R, Sharma N, Titiyal JS, Sen S, et al. TGFB1 mutation screening and genotype-phenotype correlation in north Indian patients with corneal dystrophies. *Mol Vis*. 2010;16:1429–38.
- Runager K, Basaiawmolt RV, Deva T, Andreassen M, Valnickova Z, Sorensen CS, et al. Human phenotypically distinct TGFB1 corneal dystrophies are linked to the stability of the fourth FAS1 domain of TGFB1p. *J Biol Chem*. 2011;286(7):4951–8.
- Evans CJ, Davidson AE, Carnt N, Rojas Lopez KE, Veli N, Thauung CM, et al. Genotype-phenotype correlation for TGFB1 corneal dystrophies identifies p.(G623D) as a novel cause of epithelial basement membrane dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57(13):5407–14.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



CASE REPORT

Open Access

15q26 deletion in a patient with congenital heart defect, growth restriction and intellectual disability: case report and literature review



Yahya Benbouchta^{1,2*}, Nicole De Leeuw^{3†}, Saadia Amasdl¹, Aziza Sbiti¹, Dominique Smeets⁴, Khalid Sadki² and Abdelaziz Sefiani^{1,4}

Abstract

Background: 15q26 deletion is a relatively rare chromosomal disorder, and it is described only in few cases. Patients with this aberration show many signs and symptoms, particularly pre- and postnatal growth restriction, developmental delay, microcephaly, intellectual disability and various congenital malformations.

Case presentation: We report on a girl, 4 years old, of consanguineous parents, with a 15q26 deletion. Clinical manifestations included failure to thrive, developmental delay, microcephaly, dysmorphic facies with broad forehead, hypertelorism, narrowed eyelid slits and protruding columella. The patient also showed skeletal abnormalities, especially clinodactyly of the 5th finger, varus equine right foot and left club foot. Additionally, she had teething delay and divergent strabismus. Heart ultrasound displayed two atrial septal defects with left-to-right shunt, enlarging the right cavities. Routine cytogenetic analysis revealed a shortened 15q chromosome. Subsequent array analysis disclosed a terminal 9.15 Mb deletion at subband 15q26.1-q26.3. Four candidate genes associated with 15q26 deletion phenotype were within the deleted region, i.e. *IGF1R*, *NR2F2*, *CHD2* and *MEF2A*.

Conclusion: We report on an additional case of 15q26 monosomy, characterized by array-CGH. Molecular cytogenetic analysis allowed us to identify the exact size of the deletion, and four candidate genes for genotype-phenotype correlation. 15q26 monosomy should be considered when growth retardation is associated with hearing anomalies and congenital heart defect, especially atrioventricular septal defects (AVSDs) and/or aortic arch anomaly (AAA).

Keywords: 15q26 deletion, CHD, Array-CGH, Case report

* Correspondence: benbouchtayahya@yahoo.fr

[†]Yahya Benbouchta and Nicole De Leeuw contributed equally to this work.

¹Department of Medical Genetics, National Institute of Health, Rabat, Morocco

²Laboratory of Human Pathology, Faculty of Sciences, Mohammed V University, Rabat, Morocco

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2021 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Introduction

15q26 monosomy can occur either as a de novo event leading to a pure deletion or as a consequence of ring chromosome 15 formation and unbalanced translocation. Up to now, 58 cases of pure deletion have been documented in the literature [1, 2]. The sub-bands involved in this rearrangement include many candidate genes responsible for common symptoms, especially pre and postnatal growth retardation [3], developmental delay, microcephaly. Other genes were involved in more particular features like congenital heart disease (CHD) [4], skeletal anomalies [5], diaphragmatic hernia [6], kidney anomalies [1] and seizures [7]. This variability could be assigned to the difference in breakpoint location and the size of the deleted fragment. Recently, several authors focused on some particular regions especially the report of Klasseens et al., which restricted the critical region for congenital diaphragmatic hernia (CDH) to 4 Mb at 15q26.1-q26.3 band. Thus, two annotated genes, namely *NR2F2* (MIM 107773) and *CDH2* (MIM 602119), were considered relevant for CDH [8]. Other genes have been reported as playing crucial role in pathogenesis of 15q26 deletions, particularly *IGF1R*, *CHD2*, *NR2F2*, involved respectively in growth restriction [3], neurodevelopmental disorders [9], and CHD [4].

Herein, we report a further patient with CHD, intellectual disability and failure to thrive. Array-CGH displayed a terminal 9.15 Mb deletion spanning 15q26.1-q26.3, four relevant disease genes, i.e. *IGF1R*, *NR2F2*, *MEF2A*, and *CHD2* were involved and are directly related to the clinical presentation of our case.

Until now, no patient had a deletion of this exact size, without similar works in the literature that already focused on the types of CHD assigned to the 15q26 deletion, or on other possible genotype-phenotype correlations.

Case report

The proband, a four-year-old girl, came to our attention because of dysmorphic face and heart malformation. She was the only child of healthy, consanguineous parents. There were no health problems in the family or a history of miscarriages. She was born at term by cesarean section because of intrauterine growth restriction (IUGR) associated with oligoamnios. IUGR was noted since the fourth month of pregnancy without that maternal or placental causes have been identified. Her birth weight was 950 g (< 3rd centile). Clinical history was suggestive of and congenital hypotonia. Upon clinical examination, her weight was 8 kg (< 3rd centile), height 81 cm (< 3rd centile) and head circumference 43 cm (< 3rd centile). She had dysmorphic features including broad forehead, hypertelorism, narrowed eyelid slits, low set ears, protruding columella, and short neck. She also presented with skeletal abnormalities, especially clinodactyly of the

5th finger, right foot varus equine, left club foot, biphalangeal fifth finger, and widely-spaced toes. Additionally, she had teething delay and divergent strabismus. Chest X-ray showed dorsal scoliosis and enlarged cardiac silhouette with a cardiothoracic ratio of 70%. An echocardiogram displayed a left-to-right shunt with significant flow, presence of two atrial septal defects (ASD) of 10 mm and 7 mm in width, dilating the right heart cavities and the pulmonary artery trunk with normal right pressures no aortic arch anomalies were evidenced. Her bone age was 2 years at a chronological age of 4 years. Hematologic investigations at the age of 4 and half years old showed normal serum concentrations of calcium, T4, TSH, GH and IGF1. Ocular assessment and brainstem acoustic potential evaluation revealed divergent strabismus and sensorineural hearing loss, respectively. Further investigations including brain MRI, computed tomography of the brain and abdominal ultrasound were normal.

Methods and results

Cytogenetics

Chromosome slides were prepared from cultured peripheral blood lymphocytes of the proband and her parents after obtaining informed consent. RHG-banding and high resolution R-banded chromosome analysis was performed on the three samples according to standard procedures. Both parents displayed normal karyotypes. Cytogenetic studies of the child showed an abnormal female karyotype with an apparently terminal deletion of the long arm of one chromosome 15 (Fig. 1). The patient's karyotype was designated as 46,XX,?del (15q)dn.

Array analysis

After disclosing the chromosomal aberration in the child, a genome wide array analysis was performed using the CytoScan HD SNP-based array platform (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA) with an average resolution of approximately 20 kb following the manufacturer's protocols. Inherent to the structure of the human genome, this resolution is not achieved for all regions such as the centromeric regions and heterochromatic parts.

Genome wide array analysis confirmed the cytogenetic results and mapped the terminal deletion to a 9.15 Mb region encompassing 36 annotated genes with the proximal breakpoint at 93,275,228 Mb in band q26.1. (Fig. 2).

Based on these results, the final karyotype was designated as 46,XX,del [10](q26.1) dn.arr [GRCh37] 15q26.1q26.3(93,275,228-102,429,113) × 1.

In addition to this terminal loss of chromosome 15, several homozygous regions (ROH) were detected (164 Mb of the autosomal genome (~ 5.6%)), which is in agreement with the indicated consanguinity of the parents. The analysis of ROH using Genomic Oligoarray

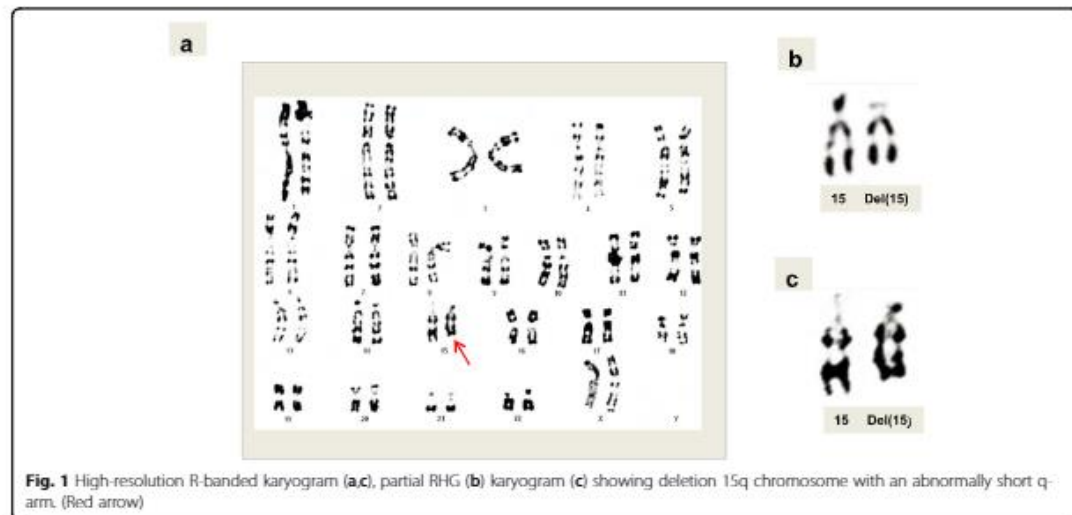


Fig. 1 High-resolution R-banded karyogram (a,c), partial RHG (b) karyogram (c) showing deletion 15q chromosome with an abnormally short q-arm. (Red arrow)

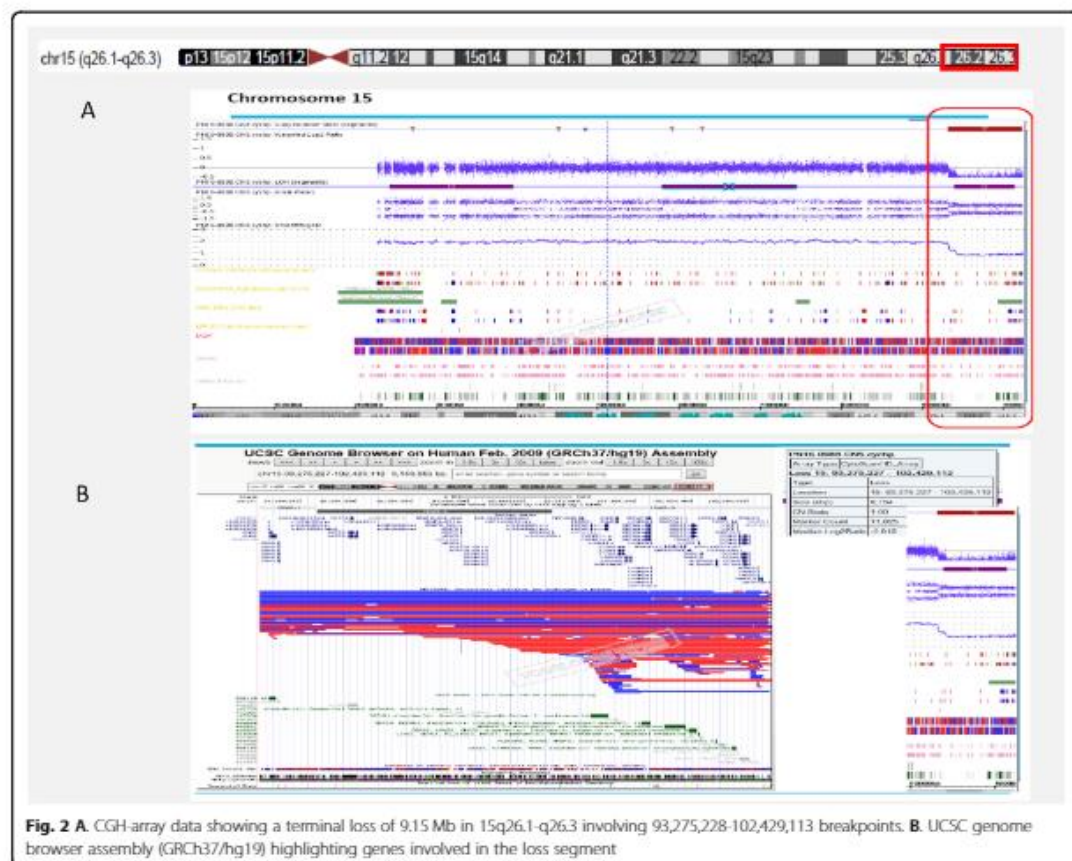


Fig. 2 A. CGH-array data showing a terminal loss of 9.15 Mb in 15q26.1-q26.3 involving 93,275,228-102,429,113 breakpoints. B. UCSC genome browser assembly (GRCh37/hg19) highlighting genes involved in the loss segment

and SNP array evaluation tool (http://firefly.ccs.miami.edu/cgi-bin/ROH/ROH_analysis_tool_for_trial.cgi) did not reveal any candidate gene with recessive inheritance pattern.

Discussion and conclusion

Here we report a further case of “pure” terminal deletion 15q26 associated with complex CHD. Fifteen other cases with such aberration and CHD were previously described. Table 1 summarizes clinical and cytogenetic data in these patients and ours.

Our proband shares many relevant signs and symptoms with other patients, especially pre- and postnatal growth retardation, developmental delay, skeletal anomalies, microcephaly, and hearing defects. In the other patients eye anomalies were observed less frequently. Less common features were found in some cases including kidney anomaly, CDH and lung hypoplasia; however, these are lacking in our patient. Through this table, we also note that the CHD was most often described as complex, with several concomitant abnormalities like in our patient. Among the major cardiac defect there are ASD/VSD and aortic arch anomaly. Valvulopathy, patent ductus arteriosus, cardiac shunt and hypoplastic heart were rarely described. Our patient shared some of these anomalies, namely ASD and cardiac shunt. However, she lacked VSD, AAA and valvular defect. Cardiomegaly was an unusual feature reported exclusively in our patient. Indeed, the atrial septal defect resulted in the formation of significant shunts, which led to volume overload of the right atrium and ventricle and consequently our patient developed cardiomegaly.

Array analysis allowed us to characterize a 9.15 Mb deletion within the 15q26.1-q26.3 region. Comparable aberrations are often reported as de novo. Most often, terminal 15q deletions are found in combination with a terminal duplication of another chromosome due to an unbalanced translocation. To the best of our knowledge and according to the DECIPHER database, a deletion of this specific size has not been reported previously. Based on the Genome Data viewer (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/>), the deleted segment encompasses 36 HGNC genes, 19 of them are referenced in the OMIM database, among which only *IGF1R*, *NR2F2*, *CHD2* and *MEF2A* are consistent with the phenotype described in our proband (Fig. 3).

IGF1R (insulin like growth factor 1 receptor) (MIM 147370) lies on the 15q26.3 locus. It is bound to the growth factor ligands IGF1 and IGF2 to play a key role in pre- and post-natal development [20, 21]. The crucial impact of *IGF1R* on growth processes was underlined by the growth restriction found in individuals with pathogenic variants in the *IGF1R* gene [3, 22], in addition to patients with a 15q26 deletion leading to

haploinsufficiency [23]. To the best of our knowledge, no heart anomalies have ever been seen in patients carrying *IGF1* or *IGF1R* mutations nor in knockout mice lacking these genes. Therefore, it is unlikely that the onset of CHD is only caused by haploinsufficiency of the *IGF1R* gene [4].

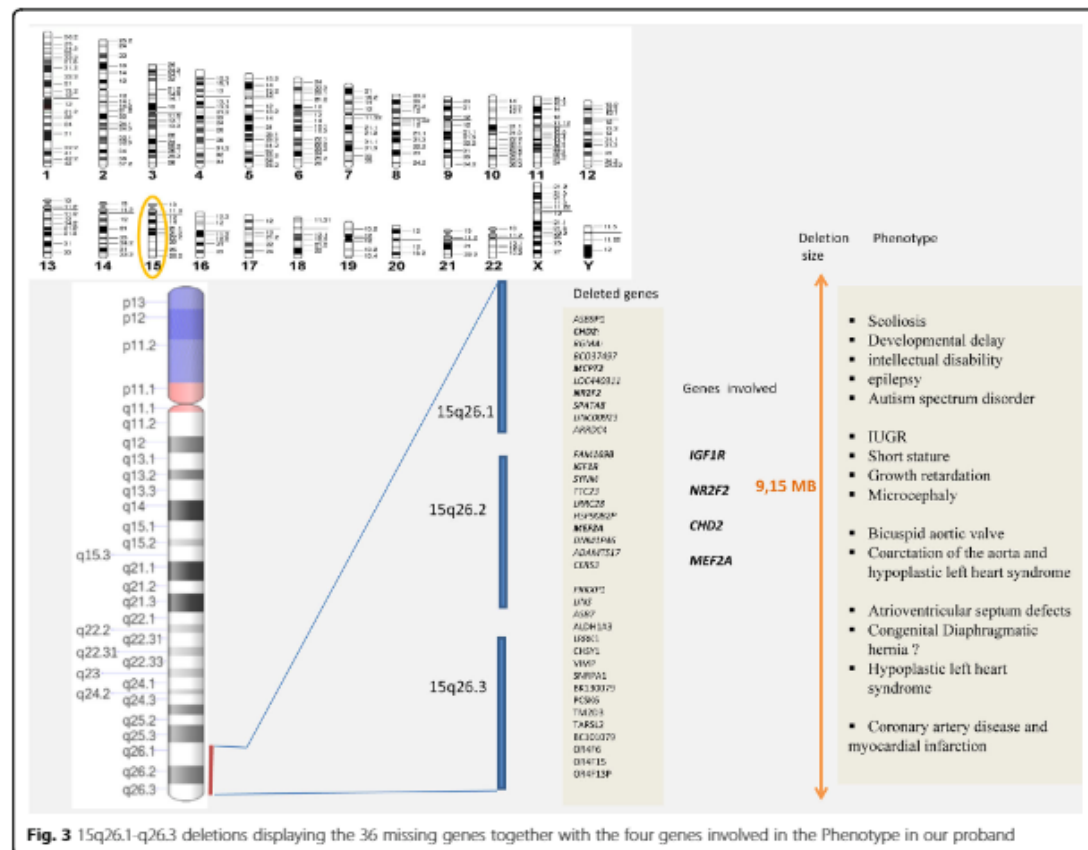
NR2F2 (Nuclear *NR2F2* (Nuclear Receptor Subfamily 2, Group F, Member 2) (MIM 107773), located at 15q26.2 locus, is involved in angiogenesis and heart development [24]. Indeed, *NR2F2* haploinsufficiency in patients with a 15q26 deletion appears to be associated with heart malformations [25]. In addition, variants within the *NR2F2* gene were found to cause non-syndromic atrioventricular septal defects (AVSDs) and other heart defects as well [26]. Moreover, this gene has been implicated to be involved in some patients with diaphragmatic hernia [6, 27], but this was not reported in others [28, 29] nor present in our patient.

CHD2 (Chromodomain helicase DNA-binding protein) belongs to a family of ATP-dependant chromatin remodeling proteins involved in chromatin regulation [12]. Mutations in this gene were associated with severe non-syndromic intellectual disability [13], as well as epileptic encephalopathy [14]. Additionally, disruption of *CHD2* was associated with scoliosis in murine models [15]. Interestingly, this anomaly was observed in our patient as well as a few in the literature [9, 16, 28]. These findings together highlight the involvement of *CHD2* dysfunction in neurodevelopmental disorders and scoliosis. This gene has previously been proposed as a candidate gene for the CDH [8], but this was not evident in our case or elsewhere [7, 9]. *MEF2A* (MADS Box Transcription Enhancer Factor 2, Polypeptide A) (MIM 600660), mapped to the human chromosome 15q26.3 region, is member of the myocyte enhancer family of transcription factors (MEF2) [17]. The subunit *MEF2A* is expressed in endothelial and smooth muscle cells of coronary arteries. Subsequently, *MEF2A* mutations can disturb the growth or differentiation of these cells, increasing the risk of developing coronary artery disease (CAD)/ myocardial infarction (MI) [18, 19]. CAD/MI was not evident in patients with 15q26 deletion involving *MEF2A*. This could be explained by the relatively young age of these patients compared to others described by Wang and Bhagavatula whose age of diagnosis was between 36 and 80 years [18, 19]. Therefore, regular checking up would be useful from the third decade onwards in these patients.

To sum up, this work focused on the main genes whose haploinsufficiency could explain heart disease in patients with 15q26 monosomy, i.e. the *NR2F2* gene involved respectively in AVSDs and AAA/hypoplastic left heart. Scoliosis and psychomotor delay in our patient would be explained by the *CHD2* gene disruption. The

Table 1 Clinical and cytogenetic data in patients with "pure" 15c26 deletion CHD

Clinical findings	Our case	Datekl 2011 [11]	Poot 2007 [10]	Tonniekl 2001 [12]	Nakamuel 2011 [4]	Slavotnick 2006 [6]	Hengittschlagr 2004 [13]	Shakla 2005 [14]	Rump 2008 [15]	Choi 2011 [16]	Chul 2015 [17]	Biggio 2004 [18]	Okubo 2003 [19]	O'Jordan 2016 (38)	Iopez 2006 (39)
	4y	13y 9 m	8y 6 m	19 m	33 weeks	newborn	newborn	newborn	6 m	2 y	3 y	newborn	10 y	newborn	Feus/19 wg
Gender	F	F	F	F	F	F	F	F	M	M	F	F	F	M	F
Position of 15q26 Deletion	15q26.1qter	15q26.2qter	15q26.2qter	15q26.1	15q26.2	15q26.2	15q26.2	15q26.1qter	15q26.1qter	15q26.2qter	15q26.2qter	15q26.1qter	15q26.1qter	15q26.2qter	15q26.1qter
Deletion size	9.15 Mb	5 Mb	6.87 Mb	NA	5.78 Mb	NA	NA	NA	5.8 Mb	8.58 Mb	NA	NA	NA	6.554 Mb	NA
Origin	De novo	De novo	De novo	De novo	NA	De novo	De novo	NA	De novo	NA	NA	NA	De novo	De novo	De novo
UGR	+	-	+	+	+	NA	+	+	-	+	NA	-	+	NA	+
Microcephaly	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	NA	+	+	NA
Failure to thrive	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NA	+	+	NA
Psychomotor delay	+	NA	+	+	+	NA	NA	+	+	NA	+	NA	+	+	NA
Intellectual disability	+	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Facial dysmorphic features	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	NA
Broad nasal bridge	+	-	+	+	NA	NA	NA	+	+	-	-	+	-	NA	NA
Micrognathia	+	+	+	+	NA	+	NA	NA	-	-	+	+	-	NA	NA
Ear anomaly	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	NA	NA
Eye anomaly	+	+	+	-	NA	NA	NA	NA	+	+	+	NA	+	NA	NA
Cardiac defect	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hypoplastic heart	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Enlarged heart	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cardiac shunt	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Aortic arch anomaly	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-
Ventricular septal defect	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
Patent ductus arteriosus	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Atrial septal defect	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
Valvular defect	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
Lung hypoplasia	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
Diaphragmatic hernia	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+
Kidney anomalies	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
Skeletal anomalies	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Limbodactyl	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
Foot deformity	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-



phenotype in our patient could also be ascribed to the high rate of homozygous regions outlined by the CGH array, without excluding the possible contribution of epigenetic and environmental factors as well. 15q26 monosomy should be considered when growth retardation is associated with congenital heart defect (mainly AVSDs and/or AAA).

Patients with 15q26 deletion need a multidisciplinary management, which includes endocrinological assessment evaluating also possible GH therapy [30], as well as cardiologic, orthopedic and psychomotor follow-up. The genetic counseling in our family was delicate since the parents refused to undergo the array CGH analysis that is important for a complete familiar counseling.

Abbreviations

CHD: Congenital Heart disease; CNV: Copy number variations; *NR2F2*: Nuclear Receptor Subfamily 2, Group F, Member 2; AVSDs: Atrioventricular septal defects; *MEF2A*: Mads Box Transcription Enhancer Factor 2, Polypeptide A; CAD/MI: Coronary artery disease/ myocardial infarction; CoA: Coarctation of the aorta; *IGF1R*: Insulin like growth factor 1 receptor; ASD: Atrial Septal Defects; VSD: Atrioventricular Septal Defects; AAA: Aortic Arch Anomaly; IUGR: intrauterine growth restriction; CDH: congenital diaphragmatic hernia

Acknowledgements

We thank the patients parents for their gracious participation and support.

Authors' contributions

YB and SA carried out the cytogenetic study and drafted the manuscript. NL and DS carried out the molecular cytogenetic study and revising the work critically for important intellectual content. AS participated in the cytogenetic study and revised the manuscript. KS and AS participated in the design of the study and in the draft of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

Study has no funding source.

Availability of data and materials

All data is contained in the manuscript.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Ethical approval is considered unnecessary according to national provisions. This report was not presented as a research study as all family members were seen in a medical consultation for diagnostic purposes and they gave their written consent to participate and benefit from this analysis.

Consent for publication

This family gave written consent for clinical data to be published.

Competing interests

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Author details

¹Department of Medical Genetics, National Institute of Health, Rabat, Morocco. ²Laboratory of Human Pathology, Faculty of Sciences, Mohammed V University, Rabat, Morocco. ³Department of Human Genetics, Radboud University Medical Center, Nijmegen, Netherlands. ⁴Research Team in Genomics and Molecular Epidemiology of Genetic Diseases, Genomic Center of Human Pathologies, Medical School and Pharmacy, University Mohammed V, Rabat, Morocco.

Received: 12 June 2020 Accepted: 7 July 2021

Published online: 16 September 2021

References

- Lurie IW. Kidney abnormalities in persons with monosomy 15q26. *Am J Med Genet A*. 2008;146A(13):1761–4. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.32333>.
- Poot M, Verrijn Stuart AA, van Daalen E, van Iperen A, van Binsbergen E, Hochstenbach R. Variable behavioural phenotypes of patients with monosomy of 15q26 and a review of 16 cases. *Eur J Med Genet*. 2013;56(7):346–50. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2013.04.001>.
- Abuzzahab MJ, Schneider A, Goddard A, Gligorescu F, Lautier C, Keller E, et al. IGF-1 receptor mutations resulting in intrauterine and postnatal growth retardation. *N Engl J Med*. 2003;349(23):2211–22. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa010107>.
- Nakamura E, Makita Y, Okamoto T, Nagaya K, Hayashi T, Sugimoto M, et al. 5.78 Mb terminal deletion of chromosome 15q in a girl, evaluation of NIGF2 as candidate gene for congenital heart defects. *Eur J Med Genet*. 2011;54(3):354–6. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2010.12.004>.
- Veenma DC, Eussen HJ, Govaerts LC, de Kort SW, Odink RJ, Wouters CH, et al. Phenotype-genotype correlation in a familial IGF1R microdeletion case. *J Med Genet*. 2010;47(7):492–8. <https://doi.org/10.1136/jmg.2009.07.030>.
- Slavotinek AM, Moshrefi A, Davis R, Leeth E, Schaeffer GB, Burchard GE, et al. Array comparative genomic hybridization in patients with congenital diaphragmatic hernia: mapping of four CDH-critical regions and sequencing of candidate genes at 15q26.1–15q26.2. *Eur J Hum Genet*. 2006;14(9):999–1008. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201652>.
- Capelli LP, Krepischki AC, Guergel-Grannetti J, Mendes MF, Rodrigues T, Varela MC, et al. Deletion of the RMGA and CHD2 genes in a child with epilepsy and mental deficiency. *Eur J Med Genet*. 2012;55(2):132–4. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2011.10.004>.
- Klaassens M, van Dooren M, Eussen HJ, Drouin H, den Dekker AT, Lee C, et al. Congenital diaphragmatic hernia and chromosome 15q26: determination of a candidate region by use of fluorescent in situ hybridization and array-based comparative genomic hybridization. *Am J Hum Genet*. 2005;76(5):877–82. <https://doi.org/10.1086/429842>.
- Chenier S, Yoon G, Argiropoulos B, Lauzon J, Laframboise R, Ahn JW, et al. CHD2 haploinsufficiency is associated with developmental delay, intellectual disability, epilepsy and neurobehavioural problems. *J Neurodev Disord*. 2014;6(1):9. <https://doi.org/10.1186/1866-1955-6-9>.
- Rump P, Dijkhuizen T, Sikkema-Raddatz B, Lemmink HH, Vos YJ, Verheij JB, et al. Drayer's syndrome of mental retardation, microcephaly, short stature and absent phalanges is caused by a recurrent deletion of chromosome 15(q26.2–qter). *Clin Genet*. 2008;74(5):455–62. <https://doi.org/10.1111/j.1369-0004.2008.01064.x>.
- Hengstschlager M, Mittermayer C, Repa C, Drahonsky R, Deutinger J, Bernaschek G. Association of deletions of the chromosomal region 15q24-ter and diaphragmatic hernia: a new case and discussion of the literature. *Fetal Diagn Ther*. 2004;19(6):510–2. <https://doi.org/10.1159/000080164>.
- Lamar KJ, Carvill GL. Chromatin remodeling proteins in epilepsy: lessons from CHD2-associated epilepsy. *Front Mol Neurosci*. 2018;11:208. <https://doi.org/10.3389/fnmo.2018.00208>.
- Rauch A, Wieczorek D, Graf E, Wieland T, Ende S, Schwarzmayr T, et al. Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study. *Lancet*. 2012;380(9854):1674–82. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61480-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61480-9).
- Carvill GL, Heavin SB, Yendle SC, McMahon JM, O'Riordan BJ, Cook J, et al. Targeted resequencing in epileptic encephalopathies identifies de novo mutations in CHD2 and SYNGAP1. *Nat Genet*. 2013;45(7):825–30. <https://doi.org/10.1038/ng.2646>.
- Kulkarni S, Nagarajan P, Wall J, Donovan DJ, Donnell RL, Ligon AH, et al. Disruption of chromodomain helicase DNA binding protein 2 (CHD2) causes scoliosis. *Am J Med Genet A*. 2008;146A(9):1117–27. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.32178>.
- Courage C, Houge G, Gallati S, Schjelderup J, Rieubland C. 15q26.1 microdeletion encompassing only CHD2 and RGM1A in two adults with moderate intellectual disability, epilepsy and truncal obesity. *Eur J Med Genet*. 2014;57(9):520–3. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2014.06.003>.
- Black BL, Olson EN. Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1998;14(1):167–96. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.14.1.167>.
- Wang L, Fan C, Topol SE, Topol EJ, Wang Q. Mutation of MEF2A in an inherited disorder with features of coronary artery disease. *Science*. 2003;302(5650):1578–81. <https://doi.org/10.1126/science.1088477>.
- Bhagavatula MR, Fan C, Shen GQ, Cassano J, Plow EF, Topol EJ, et al. Transcription factor MEF2A mutations in patients with coronary artery disease. *Hum Mol Genet*. 2004;13(24):3181–8. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh329>.
- Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell*. 1993;75(1):3–82. [https://doi.org/10.1016/S0092-8654\(05\)80085-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8654(05)80085-6).
- Li J, Choi E, Yu H, Bai XC. Structural basis of the activation of type 1 insulin-like growth factor receptor. *Nat Commun*. 2019;10(1):4567. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12564-0>.
- Forbes BE, Blyth AJ, Wirt JM. Disorders of IGFs and IGF-1R signaling pathways. *Mol Cell Endocrinol*. 2020;511:1035.
- Roback EW, Barakat AJ, Dev VG, Mbilay M, Chretien M, Butler MG. An infant with deletion of the distal long arm of chromosome 15 (q26.1–qter) and loss of insulin-like growth factor 1 receptor gene. *Am J Med Genet*. 1991;38(1):4–9. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320380117>.
- Al Turki S, Manickaraj AK, Mercer CL, Gerety SS, Hitz MP, Lindsay S, et al. Rare variants in NIGF2 cause congenital heart defects in humans. *Am J Hum Genet*. 2014;94(4):574–85. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.03.007>.
- Turner Z, Harboe TL, Blennow E, Kalscheuer VM, Tommerup N, Brondum-Nielsen K. Molecular cytogenetic characterization of ring chromosome 15 in three unrelated patients. *Am J Med Genet A*. 2004;130A(4):340–4. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.30035>.
- Upadja J, Phillips JB 3rd, Robin NH, Lose EJ, Mikhail FM. A case report of chromosome 17q22-qter trisomy with distinct clinical presentation and review of the literature. *Clin Case Rep*. 2018;6(4):612–6. <https://doi.org/10.1002/ccr3.1298>.
- Dateki S, Fukami M, Tanaka Y, Sasaki G, Moriuchi H, Ogata T. Identification of chromosome 15q26 terminal deletion with telomere sequences and its bearing on genotype-phenotype analysis. *Endocr J*. 2011;58(3):155–9. <https://doi.org/10.1507/endocrj.K10E-251>.
- Poot M, Eleveld MJ, Van 't slot R, van Genderen MM, Verrijn Stuart AA, Hochstenbach R, et al. Proportional growth failure and oculocutaneous albinism in a girl with a 6.87 Mb deletion of region 15q26.2–qter. *Eur J Med Genet*. 2007;50(6):432–440. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2007.08.003>.
- Davidsson J, Collin A, Björkhem G, Soller M. Array based characterization of a terminal deletion involving chromosome subband 15q26.2: an emerging syndrome associated with growth retardation, cardiac defects and developmental delay. *BMC Med Genet*. 2008;9:2.
- Ho SC, Clayton P, Vasudevan P, Greening J, Wardhaugh B, Shaw N, et al. Recombinant human growth hormone therapy in children with chromosome 15q26 deletion. *Hormone Res Paediatrics*. 2015;83(6):424–30. <https://doi.org/10.1159/000380949>.
- Tonnes H, Schulze I, Hennies H, Neumann LM, Keitzer R, Neitzel H. De novo terminal deletion of chromosome 15q26.1 characterised by comparative genomic hybridisation and FISH with locus specific probes. *J Med Genet*. 2001;38(9):617–21. <https://doi.org/10.1136/jmg.38.9.617>.
- Bhakta KY, Marlin SJ, Shen JJ, Fernandes CJ. Terminal deletion of chromosome 15q26.1: case report and brief literature review. *J Perinatol: official journal of the California Perinatal Association*. 2005;25(6):429–32. <https://doi.org/10.1038/sj.jp.7211301>.
- Choi JH, Kang M, Kim GH, Hong M, Jin HY, Lee BH, et al. Clinical and functional characteristics of a novel heterozygous mutation of the IGF1R gene and IGF1R haploinsufficiency due to terminal 15q26.2–qter deletion in patients with intrauterine growth retardation and postnatal catch-up

- growth failure. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(1):E130–4. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-1789>.
34. Biggio JR Jr, Descartes MD, Carroll AJ, Holt RL. Congenital diaphragmatic hernia: is 15q26.1-26.2 a candidate locus? *Am J Med Genet A.* 2004;126A(2):183–5. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.20464>.
 35. Okubo Y, Siddle K, Firth H, O'Rahilly S, Wilson LC, Willatt L, et al. Cell proliferation activities on skin fibroblasts from a short child with absence of one copy of the type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF1R) gene and a tall child with three copies of the IGF1R gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(12):5981–8. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-021080>.
 36. O'Riordan AM, McGrath N, Sharif F, Murphy NP, Franklin O, Lynch SA, et al. Expanding the clinical spectrum of chromosome 15q26 terminal deletions associated with IGF-1 resistance. *Eur J Pediatr.* 2011;186(1):137–42. <https://doi.org/10.1007/s00431-016-2802-y>.
 37. Lopez I, Bafalliu JA, Bernabe MC, Garcia F, Costa M, Guillen-Navarro E. Prenatal diagnosis of de novo deletions of 8p23.1 or 15q26.1 in two fetuses with diaphragmatic hernia and congenital heart defects. *Prenat Diagn.* 2006;26(6):577–80. <https://doi.org/10.1002/pd.1468>.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Chapter

Research of the Philadelphia Chromosome in Chronic Myeloid Leukemia: Diagnostic and Prognostic Interests

Yahya Benbouchta, Ahmed Afailal Tribak and Khalid Sadki

Abstract

Myeloproliferative syndromes are cell proliferation involving one or more medullary lines without blocking maturation. Chronic myeloid leukemia (CML) is the most common of these syndromes, it corresponds to the monoclonal proliferation of a multipotent stem cell; the myeloblastic or lymphoblastic transformation of CM. has a poor prognosis. The Philadelphia chromosome t(9;22)(q34;q11) is the first cytogenetic abnormality that has been associated with a malignant process. It is found in 89 to 95% of CML. The search for the Philadelphia chromosome (Ph1) has multiple interests: Diagnostic, prognostic and in therapeutic monitoring. The search for the Philadelphia chromosome by molecular cytogenetics makes it possible to remedy the poverty of cell suspensions in metaphase to take up the inconclusive results of classic cytogenetics on nuclei in interphase and to detect residual disease during therapeutic monitoring. Through the literature review, we highlight the importance of the identification of the Philadelphia chromosome in Myeloproliferative Syndromes for the improvement of the quality healthcare of the affected patients.

Keywords: Philadelphia chromosome, myeloproliferative syndromes, karyotype, diagnostic and prognostic interest

1. Introduction

Leukemias are clonal and acquired diseases of the hematopoietic stem cell or a precursor already committed to lymphoid and /or myeloid lineages [1]. hyperplasia produced a tissue that results from cell proliferation as myeloid pathology. Chronic myeloid leukemia (CML) is a monoclonal pathology of the pluripotent stem cell characterized by neoplastic granulocytic overproduction. This myeloproliferative syndrome has two particular characteristics:

- Its evolutionary mode consists of a chronic chemosensitive phase, followed by an acceleration phase, then an acute (or blast) transformation, ineluctable and chemoresistant.
- A quasi-constant clonal cytogenetic marker which is the Philadelphia Ph1 chromosome or derived from chromosome 22. This chromosome abnormality

is generated from the reciprocal translocation involving the q34 band of chromosome 9 and the q11 band of chromosome 22.

The recent development of therapeutics targeted at the activity or stability of an oncogenic protein has recently been illustrated by the therapeutic successes obtained in the treatment of chronic myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia [1]. Until now cytogenetics has been the reference for structural abnormalities, in particular translocations, tools for precise diagnosis in certain disputed cases and the detection of residual diseases or possible relapses. However molecular cytogenetics can detect chromosomal abnormalities of small sizes not visible on metaphasic chromosomes (semi-cryptic). It is of particular interest in the analysis of acquired abnormalities and is involved in monitoring the persistence of an abnormal clone in order to detect predicted recurrent translocations and may also help characterize genes in the evolutionary process of carcinogenesis. The current recommendations are based on high-quality evidence reported in peer-reviewed journals, supplemented by expert group consensus. These recommendations apply to healthcare professionals who treat CML patients and CML patients to better understand their conditions and treatments [2].

2. Interest of chromosome Philadelphia in chronic myeloid leukemia

- The usual form or standard translocation.

It is the translocation of a distal fragment of the long arm of chromosome 22 (fragment 22q11.2) to the distal part of the long arm of chromosome 9 with recovery of a deleted part of the long arm of chromosome 9 on the long arm of chromosome 22. It is therefore a reciprocal translocation, without loss of chromosomal material (Figure 1(a,b)).

Since this date, we defined the standard Philadelphia chromosome as: $t(9;22)(q34;q11)$ or $t(9;22)(q34.1;q11.21)$.



Figure 1.
(a) Result of a metaphase karyotype not classified in the R-band. (the circle indicates the Ph1 chromosome).
(b) Partial RHG band karyotype of one of our patients: $t(9;22)(q34;q11)$.

3. Diagnostic interest of chromosome Philadelphia in chronic myeloid leukemia

3.1 The chronic phase

The Philadelphia chromosome is the only element allowing a diagnosis in hyperleukocytosis. It is found in 89 to 95% of CML cells: In the granulomonocytic,

erythroblastic and B lymphocytic lines [3]. In most cases, CML is diagnosed on clinical and hematologic data alone. The differential diagnosis arises with all the pathologies that are accompanied by hyperleukocytosis with mild myeloma.

- The Ph1 chromosome: Diagnostic key

The almost constant presence of this translocation in CML offers clinicians an additional diagnostic tool especially in myeloproliferative syndromes (MPS), chromosome 22 can be translocated to a chromosome other than chromosome 9 or else participates in a complex translocation of most interest, often three chromosomes of which the 22 and 9 one speaks then of Ph1 variant as opposed to the standard Ph1 chromosome. This same translocation $t(9;22)(q34;q11)$ is found in a non-negligible percentage in ALL and AML.

3.2 Differential diagnosis in the acute phase

In acute leukemia, there is an accumulation of immature precursors of the hematopoietic lineage involved in the bone marrow, blood, or other tissue pathologies. The acute phase CML disease there is a significant hyperleukocytosis with the presence of the Philadelphia chromosome on all mitoses. This acute phase is preceded by the appearance of secondary anomalies: Trisomy 8, duplication of Ph1, and isochromosome 17, which conditions a poor prognosis.

We also find the Philadelphia chromosome:

- In 5% of acute lymphoblastic leukemia (ALL) in children and 20–30% of ALL in adults and also found in acute myeloid leukemia, In acute myeloid leukemia type 1 (LAM1) and LAL1 [4].

3.3 Other myeloproliferative syndromes

Essential thrombocythemia, myeloid splenomegaly, polycythemia vera or vague disease and chronic myelomonocyte leukemia (CMML) have the same phenotype as show in certain forms of CM. For this reason, it is important to confirm the diagnosis of chronic myelogenous leukemia by cytogenetic study or molecular biology [5]. Sometimes to give a right diagnosis is complicated so only the karyotype or molecular biology tests can help for that. The first test looks for the presence or not of the Ph1 while the other molecular biology tests investigate the *BCR-ABL* rearrangement.

3.4 Chronic myeloid leukemia in children

Chronic myeloid leukemia in children: There are two clinically and genetically distinct forms:

- The adult form occurring beyond the age of two years resembles in all respects a Ph1 + CML with the presence of the cytogenetic marker Ph1 + and break points in *M-BCR* especially in 5' [6, 7].
- The juvenile form before the age of two characterized by a peculiar clinical picture and a normal karyotype in most cases otherwise the most frequent chromosomal aberration is monosomy 7.

In some cases, the Ph1 chromosome may be masked due to the size of the fragment translocated which is submicroscopic, molecular cytogenetics are then used

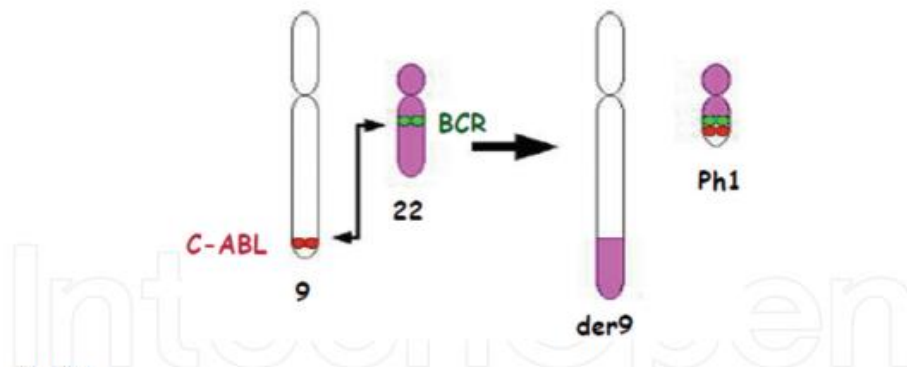


Figure 2.
The Philadelphia chromosome can be masked because of the size of the translocated fragment which is submicroscopic.

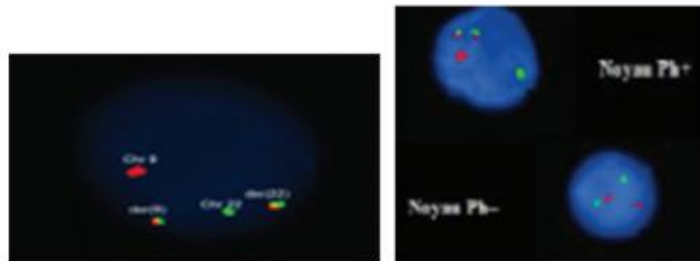


Figure 3.
FISH image of BCR/ABL positive rearranged metaphase.

(in situ hybridization: FISH) or real-time PCR search for the Philadelphia chromosome is necessary to confirm the diagnosis of CML and to monitor progress under certain anti-mitotic drugs (**Figure 2**).

In onco-hematology, FISH provides a decisive complement to the diagnosis, the prognosis and monitoring of targeted therapies. In leukemia chronic myeloid this technique highlights the fusion of genes *BCR* and *ABL* which characterize the Philadelphia chromosome (Ph). FISH is particularly interesting in the cytogenetic monitoring of CML. In due to culture problems (low mitotic index and the quality of the metaphases poor according to European Leukemia Net 2009. This service is currently offered to patients with CML as part of the cytogenetic monitoring of their disease (**Figure 3**).

3.5 Variant translocations

Variant translocations fall into two subgroups: Simple variants and complex variants; their definitions are based on the results of R, G banding and molecular biology. Although it is very common, it is quickly learned that the t(9;22) translocation is not pathognomonic for CML and it has several variants: the Ph1 (+) variants, the masked Ph1 chromosome and the Ph1 (–) variants. All chromosomes except Y are involved in the variant form of Ph1 especially chromosomes 3, 11, 12, 14 and 17 [8]. The variants can all be considered as complex translocations since the molecular genetic investigations of the supposed simple variants show that they involve at least three chromosomes and always the 9 and the 22 [9].

3.6 The blast transformation

In this phase, 65 to 80% of patients develop additional chromosomal aberrations not due to chance which precede clinical and hematological manifestations by several months and which can serve as indicators prognosis [10, 11]. Secondary anomalies appear: Double chromosome Philadelphia, trisomy 8, isochromosome 17 and trisomy 19. These four additional abnormalities are part of the clonal course in 70% of CML. Other, more rarely encountered anomalies seem to be due to chance, thus taking the minor pathways. In more than 50% of cases, they are represented by:

- Monosomies: Y, 7, 17.
- Down's syndrome: 17 and 21.
- And the translocation $t(3;21)(q26;q22)$ which has the characteristic of being accompanied by medullary fibrosis [12].

A quarter of patients [10, 11] will not develop any additional abnormalities and will keep Philadelphia alone for the duration of their survival.

3.7 Chronic myeloid leukemia with secondary abnormalities

The following partial karyotypes show the association of certain additional abnormalities to the Philadelphia chromosome (Ph1) in our patients. However, the therapeutic and prognostic approach is totally different. It is therefore necessary: Make a positive diagnosis for CML.

- Correct the diagnosis of certain contentious cases.
- Specify the evolutionary stage.
- And make a differential diagnosis with myeloproliferative and myelodysplastic syndromes.

During the blast phase of CML at Ph1 (+), analysis determines as a factor of poor prognosis [10]. As for the Philadelphia chromosome alone, it appears to have an independent prognostic value [13].

4. Prognostic interest of chromosome Philadelphia in CML

Evaluating the prognosis of CML using clinical-biological criteria can predict the probable date of onset of blast transformation which amounts to determining the probable duration of the chronic phase. As regards the cytogenetic criterion, it must be defined and homogeneous. The prognoses of Ph1 (+) CML and Ph1 (-) CML should be studied separately because we have seen the current difficulties of including the Ph1 (-) form in the nosological framework of CML.

In our medical genetics' laboratory. The suspected diagnosis was CML in 69 patients, unlabeled SMP in the remaining 22 patients (**Table 1**).

- Culture failure in 6 cases.
- Normal karyotype in 25 cases.
- Philadelphia chromosome or $t(9;22)(q34;q11)$ in 60 cases.

The cytogenetic criterion is requested at two levels:

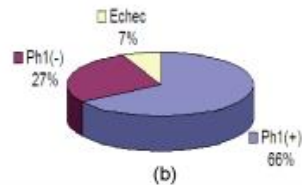
- For the initial assessment of prognosis at the time of diagnosis of CML in combination with baseline clinical and hematologic data.
- Then to assess the prognosis later during the blast transformation.

During the chronic phase of Ph1 (+) CML and without the knowledge of multi-parametric analyzes, it has been shown that the most significant prognostic factors which determine the duration of survival are [14]:

- The presence of additional clonal chromosomal abnormalities (relative risk "RR" = 4.5).
- Circulating blasts greater than 5% "RR = 1.8".
- A hemoglobin rate of less than 10 g / dl "RR = 1.30".

Results \ Indications	Ph(+)	Ph(-)	Culture failure	Total
Chronic myeloid leukemia	54	12	03	69
Myeloproliferative syndrome	06	13	03	22

(a)



(b)

Table 1.

(a) Cytogenetic analysis in myeloproliferative syndromes 91 patients. (b) Frequency of the Philadelphia chromosome (Ph1).

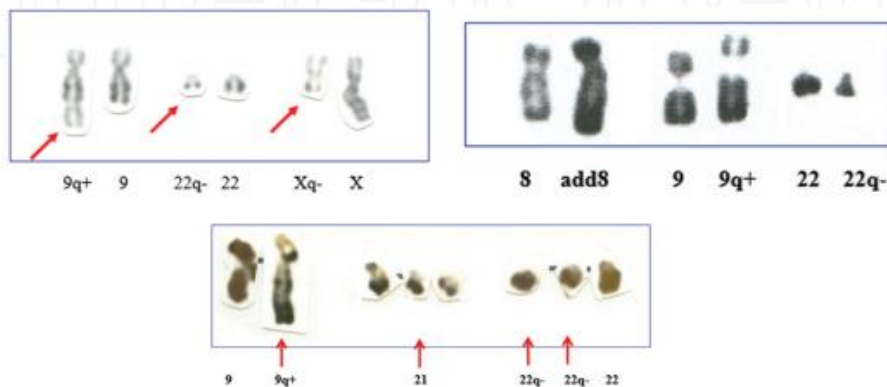


Figure 4.

(a) Presence of an extra Ph1 chromosome and trisomy 21. (b) Partial trisomy 8. (c) Partial band karyotype RHG: T(9;X;22).

- Thrombocytopenia.
- Leukocytosis > 20.109 / l.
- Non-lymphoid blast cells.
- A clonal evolution a \ double chromosome Ph1, a trisomy 8, and typical aberrations of the acute phase (Ph1 (+), i(17q), hypodiploidy or hyperdiploidy).
- Lack of response to treatment.

It is interesting to note that the double chromosome Ph1 or trisomy 8 are more frequent in acute transformations of the AML, ALL type and that they respond poorly to treatment (Figure 4).

5. Surveillance of residual disease

Residual disease is defined as the number of malignant cells persisting after cytotoxic treatment, the eradication of which is intended to be as complete as possible: Chemotherapy, ionizing radiation, bone grafting. The residual malignant cells which escape this treatment can be the cause of a relapse hence the need to quantify them as precisely as possible. Before the introduction of molecular biology, hematologists had at their disposal various means of approach to define the biological remission of a hemopathy: Cytology, cytogenetics, immunology. In the best case, the sensitivity of these techniques did not make it possible to detect less than one residual cell in 100, a very insufficient sensitivity threshold to help clinician to decide for adequate treatment and to evaluate the quality control of the graft. The treatments envisaged must be carried out in order to obtain hematological remission and if possible a complete eradication of the Ph1 (+) cells (cytogenetic remission) with regard to chronic myeloid leukemia, the evolution takes place in two stages: A first chronic or myelocytic phase easily controlled by usual therapies then a second inconstant transition phase called acceleration with resistance to conventional chemotherapy, following which an acute transformation occurs, often of the terminal acute myelogenous leukemia type, constantly fatal, inevitable on average 3 to 4 years after diagnosis.

6. Contribution of oncocytogenetics in chronic myeloid leukemia

The molecular consequence is the formation of a *BCR-ABL* fusion gene, transcribed into 8.5 Kb mRNA and translated into 210 Kd protein with greater tyrosine kinase activity compared to the normal protein of the proto oncogene *c-ABL*. From 145 Kb, this protein is involved in the pathological process of CML [15]. The molecular biology techniques applied to DNA, mRNA (RT-PCR) and encoded

Chromosomes	RNA _m	Protein
9	ARN _m c-abl	P145 ^{c-abl}
22	ARN _m bcr	P160 ^{bcr}
22q-	ARN _m bcr-abl	P210 ^{bcr-abl}

Table 2.
The chromosomes involved and their molecular consequences.

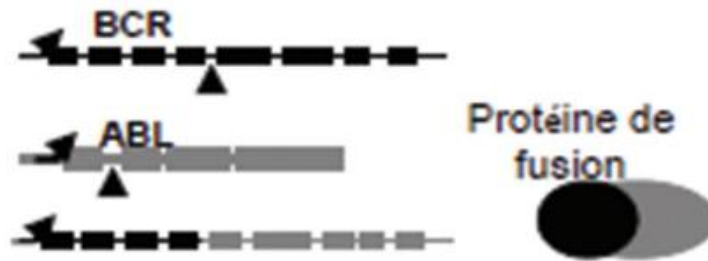


Figure 5. Schema the Philadelphia chromosome $t(9;22)(q34;q11)$ results in the fusion of BCR genes on chromosome 22 and ABL on chromosome 22. The fusion protein has a strong activity tyrosine kinase responsible for tumor development.

proteins have made it possible to specify the nature of the molecular events resulting from the rearrangement of *BCR-ABL* (Table 2).

Fluorescent in situ hybridization (FISH) using specific probes provides a useful tool for the detection of $t(9;22)(q34;q11)$ and *BCR-ABL* rearrangement [16] (Figure 3). The fusion protein has a strong activity tyrosine kinase responsible for tumor development (Figure 5).

7. Conclusion

In summary, Philadelphia chromosome is an abnormal chromosome 22, resulting from a reciprocal translocation between chromosomes 9 and 22, a specific marker in chronic myeloid leukemia. His research in myeloproliferative syndromes has multiple interests: Diagnostic, prognostic and therapeutic follow-up which contributes to better patient care. Its demonstration in myeloproliferative syndromes makes it possible to confirm the nature of the disease and to distinguish between CM and other myeloproliferative syndromes.

Acknowledgements

The authors would like to thank the patients and their family. We are grateful to all of the staff of the Department of Medical Genetics of the National Institute of Health for their continuous support.

List of abbreviations

CML	chronic myeloid leukemia CML
Ph	Philadelphia
ALL	acute lymphoblastic leukemia
LAM	acute myeloid leukemia type 1
LAL1	acute lymphoblastic leukemia type 1
ALL	acute lymphoblastic leukemia
AML	acute myeloid leukemia
CMML	chronic myelomonocyte leukemia
MPS	myeloproliferative syndromes

IntechOpen

Author details

Yahya Benbouchta^{1,2*}, Ahmed Afailal Tribak² and Khalid Sadki²

¹ Department of Medical Genetics, National Institute of Health, Rabat, Morocco

² Laboratory of Human Pathology, Faculty of Sciences, Mohammed V University in Rabat, Morocco

*Address all correspondence to: benbouchtayahya@yahoo.fr

IntechOpen

© 2021 The Author(s). Licensee IntechOpen. This chapter is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. 

References

- [1] Gisselbrecht, S., [*Oncogenes and leukemia: history and perspectives*]. Med Sci (Paris), 2003. **19**(2): p. 201-210.
- [2] Hochhaus, A., et al., *European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia*. Leukemia, 2020. **34**(4): p. 966-984.
- [3] Shepherd, P.C., T.S. Ganesan, and D.A. Galton, *Haematological classification of the chronic myeloid leukaemias*. Baillieres Clin Haematol, 1987. **1**(4): p. 887-906.
- [4] Médicale, G., *formelle, chromosomique, moléculaire, clinique. Par le collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale. Coordonné par: Marc Jeanpierre, Philippe Jonveaux, Didier Lacombe, Nathalie Leporrier, Stanislas Lyonnet, Claude Mauraine*. 2004, Masson, Paris.
- [5] Mahon, F.X. and J. Reiffers, [*Chronic myeloid leukemia. Diagnosis, course, prognosis*]. Rev Prat, 1996. **46**(18): p. 2231-4.
- [6] Arlin, Z.A., R.T. Silver, and J.M. Bennett, *Blastic phase of chronic myeloid leukemia (blCML): a proposal for standardization of diagnostic and response criteria*. Leukemia, 1990. **4**(11): p. 755-7.
- [7] Fioretos, T., et al., *Molecular analysis of Philadelphia-positive childhood chronic myeloid leukemia*. Leukemia, 1992. **6**(7): p. 723-5.
- [8] Fitzgerald, P.H. and C.M. Morris, *Complex chromosomal translocations in the Philadelphia chromosome leukemias. Serial translocations or a concerted genomic rearrangement?* Cancer Genet Cytogenet, 1991. **57**(2): p. 143-51.
- [9] Dobrovic, A., et al., *Molecular diagnosis of Philadelphia negative CML using the polymerase chain reaction and DNA analysis: clinical features and course of M-bcr negative and M-bcr positive CML*. Leukemia, 1991. **5**(3): p. 187-90.
- [10] Griesshammer, M., et al., *Chronic myelogenous leukemia in blast crisis: retrospective analysis of prognostic factors in 90 patients*. Ann Hematol, 1996. **73**(5): p. 225-30.
- [11] Kantarjian, H.M., et al., *Chronic myelogenous leukemia in blast crisis. Analysis of 242 patients*. Am J Med, 1987. **83**(3): p. 445-54.
- [12] Heim, S. and F. Mitelman, *Cancer cytogenetics: chromosomal and molecular genetic aberrations of tumor cells*. 2015: John Wiley & Sons.
- [13] Tanaka, K., et al., *Influence of M-BCR breakpoint sites on the duration of chronic phase in 100 patients with chronic myelocytic leukemia*. Cancer Genet Cytogenet, 1993. **70**(1): p. 39-47.
- [14] Ariad, S., et al., *Prognostic factors in chronic myeloid leukaemia--importance of staging or disease biology*. S Afr Med J, 1992. **81**(6): p. 299-303.
- [15] Rowley, J.D., *Chromosome abnormalities in leukemia and lymphoma*. Ann Clin Lab Sci, 1983. **13**(2): p. 87-94.
- [16] Martinet, D., D. Muhlematter, and M. Jotterand Bellomo, [*Fluorescent in-situ hybridization technique (FISH) in the diagnosis of Philadelphia translocation in chronic myeloid leukemia*]. Schweiz Med Wochenschr, 1996. **126**(20): p. 855-63.

RESUME

Les maladies rares se caractérisent par une grande variété de signes cliniques qui varient non seulement d'une maladie à l'autre mais également d'un patient à un autre atteint de la même maladie. Les maladies rares peuvent apparaître à la naissance ou bien à l'âge adulte. A travers ce travail, nous présentons l'étude génétique de deux syndromes rares : La dystrophie cornéenne atypique chez une grande famille et la cardiopathie congénitale en rapport avec la monosomie 15q chez une patiente isolée.

L'objectif de ce travail est d'établir un diagnostic précis pour ces maladies avec deux approches diagnostiques différentes. Pour le premier cas, il s'agit d'une forme sporadique de cardiopathie congénitale mais avec une forte suspicion diagnostique. L'approche diagnostique de cytogénétique moléculaire, qui a consisté en une CGH-array, a été réalisée avec succès et nous a permis de reconnaître les quatre gènes incriminés dans cette pathologie : *IGF1R*, *NR2F2*, *MEF2A* et *CHD2* et d'établir de nouvelles corrélations génotype-phénotype pour un intérêt diagnostique et un conseil génétique adéquat. Pour le deuxième cas, il s'agit d'une dystrophie cornéenne atypique avec une hétérogénéité génétique de faible suspicion diagnostique. Un exome entier a été réalisé pour identifier la mutation causale dans cette famille consanguine et enrichir le spectre mutationnel du gène *TGFBI* chez des patients marocains atteints de cette pathologie, avec mise en évidence d'une nouvelle mutation hétérozygote (**c.1772C>A; p.Ser591Tyr**).

Ces résultats montrent que l'analyse chromosomique par CGH-array, au-delà de son intérêt diagnostique, permet d'établir de nouvelles corrélations génotype-phénotype et d'identifier de nouvelles régions potentiellement impliquées dans cette pathologie. Nous avons montré également par cette étude la caractérisation des mutations causales qui nous a permis d'adapter la prise en charge médicale des patients, de formuler un conseil génétique adéquat et d'offrir un diagnostic présymptomatique et de statut d'hétérozygote aux apparentés à risque qui le souhaitent. Parallèlement on a étudié l'implication de ces gènes en question dans la prédisposition génétique au cancer.

Mots clés : Maladies rares, cardiopathie congénitale, dystrophie cornéenne, Array-CGH, Exome, gènes, prédispositions génétiques, cancers.

ABSTRACT

Rare diseases are characterized by a wide variety of clinical signs that vary not only from one disease to another but also from one patient to another with the same disease. Rare diseases can appear at birth or in adulthood. Through this work, we present the genetic study of two rare syndromes: Atypical corneal dystrophy in a large family and congenital heart disease related to monosomy 15q in an isolated patient. The aim of this work is to establish an accurate diagnosis for these diseases with two different diagnostic approaches. The first case is a sporadic form of congenital heart disease but with a strong diagnostic suspicion. The diagnostic approach of molecular cytogenetics, which consisted of a CGH-array, was successfully performed and allowed us to recognize the four genes incriminated in this pathology: *IGF1R*, *NR2F2*, *MEF2A* and *CHD2* and to establish new genotype-phenotype correlations for diagnostic interest and adequate genetic counselling. The second case is an atypical corneal dystrophy with genetic heterogeneity and low diagnostic suspicion. A whole exome Sequencing was performed to identify the causative mutation in this consanguineous family and to enrich the mutational spectrum of the *TGFBI* gene in Moroccan patients with this condition, with the identification of a new heterozygous mutation (**c.1772C>A; p.Ser591Tyr**). These results show that chromosomal analysis by CGH-array, beyond its diagnostic interest, allows to establish new genotype-phenotype correlations and to identify new regions potentially involved in this pathology. We have also demonstrated through this study the characterization of causal mutations which has allowed us to adapt the medical management of patients, to formulate adequate genetic counselling and to offer presymptomatic diagnosis and heterozygous status to relatives at risk who so wish. In parallel, the involvement of these genes in genetic predisposition to cancer was investigated.

Keywords: Rare diseases, congenital heart disease, corneal dystrophy, Array-CGH, Exome, genes, genetic predispositions, cancers.