



لجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



التعليم

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine

قسنطينة

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية الطبيعة الحياة

Département : Biologie Animale

: بيولوجيا الحيوان

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Génétique Moléculaire

Intitulé

---

Le diagnostic génétique des amyotrophies spinales

Proximales à Constantine : à propos de 25 cas

---

Présenté et soutenu par :

Le : 04/07/2017

Salem Amira

Lebrima Meriem

Devant le jury :

Présidente du jury : REZGOUNE-CHELLAT Djalila

MCA - UFM Constantine

Rapporteur : Sifi Karima

Dr. CHU. De Constantine

Examinatrice : Bechkri Sara

MCA - UFM Constantine

Année universitaire : 2016/2017

## *Remerciements*

Ma reconnaissance et mes remerciements vont en premier lieu à mon encadreur, *Docteur Sifi. K* du CHU de Constantine, pour son professionnalisme, ses précieux conseils scientifiques, sa générosité, sa disponibilité, et surtout sa patience pendant la rédaction de ce travail sans elle, je n'aurais pu mener à bien mon investigation.

Je tiens à remercier Madame *REZGOUNE-CHILLAL. D*, Maître de conférences A à l'Université des frères Mentouri Constantine, pour avoir accepté de juger ce travail et m'honorer par sa présidence du jury.

Mes remerciements vont également à Madame *Bechkri* Maître de conférences A à l'Université des frères Mentouri Constantine, pour avoir accepté d'examiner mon travail et avoir fait l'honneur de siéger au jury de ma soutenance.

J'adresse mes remerciements à Madame *SATTA. D*, Professeur à l'Université des frères Mentouri Constantine, responsable de la filière de génétique, pour sa générosité, sa bonté, son dévouement et ses encouragements durant mon parcours. Je tiens à remercier également, tous les enseignants de l'équipe de formation, pour la richesse et la qualité de leurs enseignements et leurs grands efforts qui ont été déployés pour assurer à leurs étudiants une formation de qualité et d'actualité. Qu'ils trouvent ici, en mon nom, ma reconnaissance la plus sincère. Je cite particulièrement Monsieur *REZGOUNE. M* pour m'avoir orienté vers la génétique dont je ne vais pas le regretter.

Mes remerciements vont à toutes les personnes qui ont contribué de près et de loin à la réalisation de ce mémoire de Master.

## *Dédicaces*

**Je dédie ce travail à ces personnes qui m'ont aidé**

**Et soutenu durant tout mon parcours universitaire**

### **Mes parents**

Pour votre amour inconditionnel.

Pour tous vos sacrifices, courages et patiences.

Pour tout l'enseignement que vous m'avez transmis.

En témoignage de mon éternelle reconnaissance

### **Mes frères Nazih et Hocine**

Pour leurs appuis et leurs encouragements

Que vous trouvez ici l'expression de mon amour et ma profonde admiration.

Que Dieu vous protèges et vous prête la paix et mille souhaits pour les jours à venir.

### **Ma sœur Lina et mon beau-frère Iskandar**

Pour vos encouragements et motivations.

Vous m'avez inspiré, aidé non seulement pour ce projet mais durant tout mon parcours.

Que Dieu bénisse votre union et vous apporte joie et prospérité

### **Mes amies Amani, Chaima, Hanane, Maissa**

Qui m'ont aidé de près ou de loin.

Qui ont toujours su m'offrir leurs encouragements, compréhension et affection

### **Mes tantes, Oncles, Cousins et Cousines**

Pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire,

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infallible,

Ce travail est dédié à mon amie **Lebrima Meriem**, décédée il y a deux mois, qui a fait ce modeste travail avec moi, et n'a pas pu le continuer J'espère que, du monde qui est sien maintenant, il apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part d'une amie qui a toujours prié pour le salut de son âme. Puisse Dieu, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde

**Tendrement Amira**

## Table des matières

Remerciements et dédicaces

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction .....1

### Partie bibliographique

I- Les amyotrophies spinales proximales ou SMA

I-1-Définition.....3

I-2-Historique.....3

I-3-Epidémiologie.....4

I-4-Aspects cliniques et classification des SMA.....5

I-4-1-Les amyotrophies spinales type I.....5

I-4-2- Les amyotrophies spinales type II.....6

I-4-3-Les amyotrophies spinales type III.....7

I-4-4-Les amyotrophies spinales type IV.....7

II-Les aspects génétiques des amyotrophies spinales proximales.....8

II-1-Découverte du gène responsable des amyotrophies spinales proximales.....8

II-1-1-Cartographie de la région 5q13.....8

II-2-Le gène SMN.....9

II-2-1-Structure et séquence du gène SMN.....9

II-2-2-La différence entre les deux gènes SMN1 et SMN2.....10

II-2-3-Régulation transcriptionnelle du gène SMN.....12

II-3- La protéine SMN.....13

II-3-1- Structure de la protéine SMN.....13

II-3-2- Séquence de la protéine SMN.....13

II-3-3-Les différences entre la protéine codée par le gène SMN1et SMN2.....	14
II-3-4-Localisation de la protéine SMN.....	15
II-3-4-1-Localisation de la protéine dans le noyau.....	16
II-3-4-2-Localisation tissulaire de la protéine.....	17
II-3-5- Rôles de la protéine SMN.....	17
II-3-5-1-Dans la maturation des ARN pré messagers.....	17
II-3-5-2-Role dans le complexe SMN.....	17
II-3-5-3-SMN et apoptose.....	20
II-4-Pathologies moléculaires du gène SMN.....	21
II-4-1- Les différentes mutations retrouvées dans le gène SMN.....	21
II-5-Corrélations phénotype – génotype.....	23
II-6-Les gènes modificateurs dans la SMA.....	23
II-6-1-Le nombre de copies de SMN2.....	23
II-6-2-La régulation transcriptionnelle.....	25
II-6-3-Le gène NAIP.....	25
II-6-4-Le gène P44.....	26
II-6-5-Le gène de la plastine 3 ou PLS3 .....	26
II-7- Le gène SMN dans les autres maladies.....	27
II-8-Le conseil génétique dans le cadre de l’amyotrophie spinale.....	27
II-8-1-Conseil génétique des apparentes d’un patient atteint de SMA.....	27
II-8-2-Le diagnostic prénatal.....	29
II-8-3-Le diagnostic préimplantatoire.....	30
II-9- Modèles animaux dans les amyotrophies spinales.....	31
II-9-1- Les souris transgéniques.....	31
II-9-2- Le poisson zèbre.....	32
II-10- Stratégies thérapeutiques.....	32

## Partie pratique

I-Patients et méthodes.....	35
I-1-Patients.....	35
I-1-1-Description de la population d'étude.....	35
I-1-2-Les prélèvements biologiques.....	37
I-2-Méthodes.....	37
I-2-1-Etude paracliniques.....	37
I-2-1-1-Dosage des CPK et LDH.....	37
I-2-1-2-Etude électromyographique.....	38
I-2-1-3-L'analyse moléculaire.....	38
I-2-1-3-1-Extraction d'ADN.....	38
I-2-1-3-1-1-Méthode d'extraction au NaCl.....	38
I-2-1-3-1-2-La détection de la délétion de l'exon 7 du gène SMN.....	39
II-Résultats.....	44
II-1-Répartition des patients selon le sexe.....	44
II-2-Répartition des patients selon l'âge.....	44
II-3-Répartition des patients selon l'âge de début.....	44
II-4-Répartition des patients selon les antécédents.....	45
II-4-1- La consanguinité.....	45
II-4-2-Répartition des patients selon le type sporadique ou familial et Cas similaires dans la famille.....	45
II-5-Répartition des patients selon les signes de début.....	45
II-6-Répartition des malades selon la forme clinique.....	46
II-7-Taux plasmatiques de CPK et LDH chez les patients.....	46
II-8- Etude électromyographique chez les patients.....	47

II-9-Répartition des patients selon l'analyse génétique.....	47
III-Discussion.....	48
Conclusion et perspectives .....	52

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

## Liste des abréviations :

ADN : Acide désoxyribonucléique

ALS : Sclérose latérale amyotrophique [pour amyotrophic lateral sclerosis].

ARN : Acide ribonucléique

ASF/SF2: alternative Splicing Factor/Splicing Factor 2

Bcl-2 : B cell leukemia oncogene

BET : Bromure d'ethidium

CB : Coiled body

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CPK : Créatine phosphokinase

CREB : cAMP response element-binding protein

DAPI : Diamidino-2-phenylindole

DO : Densité Optique

D.P.I : Diagnostic préimplantatoire

EDTA : Ethylène diamine tétraacétate

EMG : Electromyogramme

ESE : Exonic Splicing Enhancer

ESS: Exonic Splicing Silencer

F.I.V : Fécondation in vitro

Gems: Gemini of coiled bodies

HnRNP : heterogeneous nuclear RiboNucleoProtein

LDH : Lacticodéshydrogénase

NAIP : Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein

PCR : Polymersase chain reaction

PFN : Profiline

PRMT5 : Protein Arginine MethylTransferase 5



ROT : Reflexes ostéotendineux

RHA : helicase ARN

SIP1 : SMN Interacting Protein 1

SIP2 : SMN Interacting Protein 2

Sm : Proteine spécifique du motoneurone

SMA: Spinal Muscular Atrophy

SMN : Survival of Motor Neuron

SMA I: SMA de type I.

SMA II: SMA de type II.

SMA III: SMA de type III.

SMA IV: SMA de type IV

SnoRNP: Small nucléolar Ribonucleoprotein

SnRNA: Small nuclear Ribonucleic Acid

SnRNP: Small nuclear Ribonucleoprotein

TBE: Tris Borate EDTA

TFIIH: Transcription Factor II H

UsnRNA: U rich small nuclear RNA (petit ARN nucléaire riche en U)

UsnRNP : U rich Small Ribonucleoprotein Particle (petite particule ribonucléoprotéique)

UV : Ultra-Violet

VCN : Voies de conduction nerveuses

## Liste des figures :

Figure 1 : Maladie de warding Hoffman

Figure 2 : Perte de tenue de la tête et hypotonie axiale

Figure 3 : Amyotrophie spinale type II

Figure 4 et 5 : Enfant atteint de SMA III

Figure 6 : la région 5q13

Figure 7 : structure du locus q13.3 du bras long du chromosome 5 et du gène SMN

Figure 8 : la différence en séquence nucléotidique entre le gène SMN1 et SMN2

Figure 9 : Diagramme schématique de l'expression des gènes SMN1 et SMN2

Figure 10 : Différents domaines de la protéine SMN

Figure 11 : base génétique des SMA

Figure 12 : Analyse immuno histochimique du nombre de Gems dans des fibroblastes issus de patients sains (A) ; atteint de SMA de type I (B) ou atteint de SMA de type II (C)

Figure 13 : Complexe SMN et ses substrats

Figure 14 : Biogenèse des UsnRNP

Figure 15 : mode de transmission autosomique récessif

Figure 16 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose 1.5% des fragments amplifiés par PCR de l'exon 7 du gène SMN

Figure 17 : Contrôle de la PCR sur gel d'agarose à 3 %

Figure 18 et 19 : Répartition des patients selon le phénotype clinique

Figure 20 : Taux plasmatiques de CPK et LDH chez les patients

## **Liste des tableaux :**

Tableau 1 : liste des mutations de SMN1 entrainant un SMA

Tableau 2 : les composants du milieu réactionnel pour la PCR

Tableau 3 : Répartition des patients selon le sexe

Tableau 4 : Répartition selon l'âge de début

Tableau 5 : Répartition des patients selon la consanguinité

Tableau 6 : Répartition des patients selon le type sporadique ou familial

Tableau 7 : Répartition des patients selon les signes de début

Tableau 8 : Taux plasmatiques de CPK et LDH chez les patients

Tableau 9 : Répartition des différents types de SM selon l'analyse génétique

Tableau 10 : La distribution mondiale des SMA

---

## Introduction

Les amyotrophies spinales proximales ou SMA pour spinal muscular atrophy, dont l'incidence varie de 1/6000 à 1/10 000 naissances et la fréquence des hétérozygotes à environ 1 porteur sur 35 à 50 en fonction des différents groupes ethniques (1,2), sont des affections neuromusculaires de transmission autosomique récessive, caractérisées par une dégénérescence progressive des motoneurons de la corne antérieure de la moelle épinière et souvent des motoneurons du bulbe (3,4) à l'origine d'une atrophie et d'une faiblesse musculaire des muscles proximaux. Cliniquement ce sont des affections très hétérogènes.

Selon l'âge de début et l'évolution de la maladie, on distingue classiquement quatre formes cliniques (5,6) : Le type I ou maladie de Werdnig-Hoffmann avec un âge de début entre [0- 6 mois] et un décès avant 2 ans, le type II ou forme de gravité intermédiaire [6-18 mois], le type III ou maladie de Kugelberg-Welander [> 18 mois] et le type IV ou forme de l'adulte [30-40 ans].

Sur le plan moléculaire, les SMA sont liées dans 98 % des cas à une délétion homozygote des exons 7 et ou 8 du gène SMN1 ou SMN1 (7). Il n'est pas possible à l'heure actuelle d'établir une corrélation entre l'étendue des délétions dans le locus SMN et la sévérité clinique ou de prédire un phénotype plus ou moins grave selon que la mutation soit une délétion ou une conversion génique de SMN1 en SMN2 (7,8).

Le diagnostic moléculaire de l'amyotrophie spinale par analyse de l'ADN génomique des patients SMA a désormais remplacé les méthodes diagnostiques dites invasives, telles les biopsies musculaires (9). Il permet de confirmer la délétion à l'état homozygote d'au moins l'exon 7 du gène SMN1 (10). Par conséquent, tout laboratoire possédant un thermocycler et un équipement d'électrophorèse sur gel peut réaliser un diagnostic moléculaire de SMA en 2 à 3 jours.

La rapidité de cette méthode garantit un temps de traitement de l'échantillon beaucoup plus court et plus attrayant pour les cliniciens référents. Une fois la mutation confirmée avec la même technique, la famille peut prétendre à un conseil génétique et un diagnostic prénatal peut être offert lors de la prochaine grossesse.

Afin permettre une prise en charge correcte des patients présentant une SMA dans un pays où le taux de consanguinité est élevé, la génétique a simplifié cette démarche par la recherche rapide de la délétion de l'exon 7 du gène SMN sur du sang périphérique chez les patients de phénotype SMA.

Dans ce contexte, nous avons réalisé ce travail dont les objectifs étaient de :

- Confirmer le diagnostic des patients présentant un phénotype SMA par la recherche de la délétion de l'exon 7 du gène SMN1.

- Etablir des corrélations phénotype / génotype chez ces patients.

## **I- Les amyotrophies spinales proximales ou SMA**

### **I-1-Définition :**

Les amyotrophies spinales proximales (ASP) ou spinal muscular atrophies (SMA) comme l'appellent les Anglo-Saxons (SMA) forment un groupe de maladies neuromusculaires héréditaires à transmission autosomique récessive. Ces maladies sont également nommées maladies de Werding-Hoffman et maladie de Kugelberg-Welander.

Elles sont caractérisées par une dégénérescence des motoneurons de la corne antérieure de la moelle épinière et souvent des noyaux moteurs du bulbe entraînant une atrophie musculaire et conduisant finalement à la paralysie (3). La plupart des patients souffrant de SMA présentent des signes cliniques de la maladie dès l'enfance.

La SMA est une maladie génétique liée à la mutation du gène SMN, responsable du plus grand nombre de mort d'enfants et nourrissons.

Cliniquement, elle peut toucher tous les muscles mais principalement les muscles proximaux ceux qui sont les plus proches du tronc (ceux des épaules, des hanches et du dos).

Il existe différentes formes de SMA qui se distinguent les unes des autres par l'âge d'apparition des premiers signes (11).

### **I-2 –Historique :**

En 1891, Guido Werding a rapporté les deux premiers cas d'une atrophie musculaire progressive, maladie familiale à laquelle il donna alors son nom. Puis entre 1893 et 1900, Johan Hoffman a décrit quatre autres cas d'atrophies musculaires progressives, a établie l'origine médullaire de la maladie et a rattaché son nom à cette maladie, devenue depuis la maladie de Werding-Hoffman (12).

En 1899, Sevestre a décrit un cas de paralysie flasque chez un nouveau-né. L'existence de formes anténatales a été évoquée pour la première fois avec la description en 1902 par Beevor d'anomalies de la mobilité intra-utérine chez des mères (13).

En 1947, Kugelberg a rapporté quatre observations de formes juvéniles grâce à l'affinement des techniques de l'électromyographie EMG. Et dès 1949, un mode de transmission récessif a été établi par Brandt.

En 1961, la première classification de la maladie basée sur l'âge de début de l'évolution de la maladie a été établie par Byers et Banker.

Pearn en 1973 a établi la responsabilité d'un gène altéré dans tous les cas familiaux de la maladie, et a conclu en 1978 que l'altération d'un seul gène est responsable dans 90% des cas de la maladie (14). L'hétérogénéité clinique intrafamiliale à cette époque n'a retrouvé aucune explication : des formes de type 1 et 2 ou des formes de types 1 et 3 ont été retrouvées au sein d'une même fratrie.

En 1990 : l'homogénéité génétique des trois formes de SMA a été établie, J. Melki, K. Davis et C. Gilliam ont localisé le gène responsable sur le bras long du chromosome 5 (5q11.2-q13.3) grâce aux méthodes de génétique inverse (15,16, 17). En 1991, la mise au point d'une classification clinique de référence par le Consortium international SMA a été réalisée.

En 1995 : Le gène SMN codant une protéine jusque-là inconnue a été identifié en France (7), SMN est le gène déterminant la survenue de la maladie.

Depuis 1996, de nombreux travaux ont permis de mieux connaître la structure et la fonction de la protéine SMN.

Entre les années 2000 et 2002, la création de modèles animaux murins et les premiers essais cliniques issues de la connaissance du gène ont débuté.

### **I-3-Epidémiologie :**

- En Algérie, les études épidémiologiques sur les SMA sont rares. A cause de l'absence des chiffres réels du nombre de malades. La création d'un registre épidémiologique de ces maladies est en cours de réalisation principalement au CHU de Constantine unité de neuromusculaire. Selon le Pr Sifi le nombre de SMA à l'Est Algérien est de 92 patients (18).

L'incidence des SMA est estimée à une naissance sur 6000 à 10000 les plaçant ainsi au deuxième rang des affections autosomiques récessives fatales après la mucoviscidose. Leur prévalence est très variable selon les études : un individu sur 40 à 1 sur 60 est porteur sain toutes formes

confondues et un individu sur 80 est un porteur sain de SMA de type I. Cette fréquence des hétérozygotes est fonction de l'origine ethnique de l'individu.

Les SMA touchent indifféremment filles ou garçons dans toutes les régions du monde. Tous types confondus, le sexe masculin prédomine dans un rapport de 3 hommes pour 2 femmes sans que la sévérité clinique soit corrélée à l'un ou l'autre sexe (19).

Dans les SMA de type III, le sexe masculin prédomine dans un rapport de 7 pour 3 alors que dans les types I et II le sexe féminin est prédominant(20).

La consanguinité est un facteur favorisant, surtout dans les pays méditerranéens et moyen-orientaux où la prévalence est parfois multipliée par 10. Les chiffres vont 2,5 % à 7,7% pour les mariages consanguins à 0,2 % pour une population standard (21).

#### **I-4-Aspects cliniques et classification des SMA**

La classification du Consortium International des SMA (7), définit les critères cliniques (âge d'apparition des premiers symptômes, intensité des troubles moteurs et évolutivité de la maladie) qui permettent de distinguer trois formes de la maladie chez l'enfant :

##### **I-4-1-Les amyotrophies spinales type I ou maladie de Werdnig-Hoffmann ou amyotrophie spinale infantile sévère (OMIM #253300) :**

Ce type représente environ 35% de la totalité des amyotrophies spinales. La forme aiguë de la maladie de Werdnig Hoffmann, est la plus sévère. Le début, à la naissance ou avant l'âge de 6 mois, se manifeste par une hypotonie et un déficit moteur sévères et étendus aux quatre membres et au tronc. La tenue de la tête est impossible pour les formes précoces avant 3 mois et le décès survient généralement dans les deux premières années par insuffisance respiratoire. On peut distinguer deux types :

Amyotrophies spinales de type I vrai : début précoce, avant l'acquisition de tenue de la tête (avant 3 mois).

Amyotrophies spinales de type I bis : débutent entre 3 et 6 mois, entre l'âge de tenue de la tête et celui de la station assise. Environ 80% des enfants atteints de SMA type I meurent au cours de la



première année (7). Les progrès de l'assistance respiratoire ont permis à certains petits patients de survivre plus longtemps (22).



Figure 1 : Maladie de warding Hoffman



Figure 2 : Perte de tenue de la tête et hypotonie axiale

#### **I-4-2- Les amyotrophies spinales type II ou amyotrophies spinales infantiles intermédiaires :**

Ce type représente environ 45% de la totalité des amyotrophies spinales. C'est le plus fréquent. Cette forme intermédiaire apparaît entre 6 et 18 mois. Le tableau clinique est celui d'une paraplégie ou d'une tétraplégie plus ou moins complète. La position assise est possible ; l'enfant est incapable de se mettre debout et de marcher sans aide. Ces enfants ont une espérance de vie de plus de 4 ans et peuvent même atteindre l'adolescence. Ils présentent une faiblesse des muscles distaux, plus importantes dans les jambes que dans les bras.



Figure 3 : Amyotrophie spinale type II

#### **I-4-3-Les amyotrophies spinales type III maladie de Kugelberg-Welander ou amyotrophie spinale juvénile (OMIM #253400) :**

Ce type représente environ 8% de la totalité des amyotrophies spinales. La maladie de Kugelberg Welander apparaît après l'acquisition de la marche et se manifeste par une atrophie et une faiblesse musculaires symétriques et lentement progressive prédominant aux racines des membres inférieurs. L'âge de début se situe entre 2 et 17 ans. La maladie survient dans l'enfance ou l'adolescence ou l'âge adulte et plus précocement chez la fille que chez le garçon (23).



Figure 4 et 5 : Enfant atteint de SMA III

#### **I-4-4-Les amyotrophies spinales type IV (OMIM #271150) :**

Représentent la forme de l'adulte après l'âge de 20 ans. Les manifestations cliniques sont dominées par le déficit moteur, l'amyotrophie et l'abolition des réflexes prédominant aux membres inférieurs et en proximal. Les autres symptômes observés sont le tremblement d'attitude des mains qui est

fréquent et garde une valeur d'orientation diagnostique. Les fasciculations et les crampes peuvent être présentes.

## II-Les aspects génétiques des amyotrophies spinales proximales :

### II-1-Découverte du gène responsable des amyotrophies spinales proximales :

#### II-1-1- Cartographie de la région 5q13 :

En 1990, des expériences de clonage positionnel du gène impliqué dans les SMA ont permis d'identifier une région chromosomique associée aux 3 formes connues de cette maladie. Cette région est située sur le bras long du chromosome 5, dans la région q11.2-13.3 (24).



Figure 6 : la région 5q13 (24)

Les gènes responsables de la SMA sont localisés dans une région instable et très complexe du chromosome 5. En effet, cette région contient des pseudogènes, des séquences multiples de copies répétitives et des séquences analogues à des transposons (25, 26,27).

Une telle configuration de la région peut conférer une instabilité à l'origine de remaniements génomiques telles des délétions (27). Par la suite une autre étude a montré l'existence de délétions de la région 5q13 chez un nombre élevé de sujets atteints de la forme sévère de la maladie (SMA) (27).

En 1995, Lefebvre et al (28) ont décrit le locus SMA comme une région chromosomique particulière constituée d'une duplication inversée ou en miroir d'environ 500 kb dont chaque élément contient

4 gènes. Le gène SMN (Survival of Motor Neuron) (7), le gène codant la protéine NAIP (Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein), le gène codant la protéine p44, qui est une sous-unité du facteur de transcription TFIIH, et enfin le gène H4F5, dont la fonction est inconnue (28).

Le gène SMN est dupliqué, comme les autres marqueurs de la région, mais l'analyse comparative des séquences exoniques et introniques ont permis de détecter cinq différences nucléotidiques entre les deux versions du gène, et donc de reconnaître le gène centromérique du gène télomérique.

Les deux gènes NAIP et P44 ne semblaient pas jouer de rôle déterminant dans la genèse de la maladie.

L'analyse génétique d'une grande série d'individus sains (n = 246) ou de parents de malades (n =127) a montré que le gène télomérique (SMN1) était toujours présent et que 95 % des sujets possédaient aussi le gène centromérique (SMN2). Les plus petites délétions caractérisées chez les patients présentant une SMA ont permis d'identifier le gène SMN comme le gène dont la mutation entraîne la SMA (7).

Le gène SMN2 est présent chez tous les patients, alors qu'il est absent chez 5 % des individus non atteints (7), sans aucune conséquence clinique, ce qui indique qu'il n'est pas indispensable à la survie des motoneurones. C'est à partir de ces observations que le gène SMN1 a été reconnu comme le gène lié à la maladie (7).

## **II-2-Le gène SMN :**

### **II-2-1-Structure et séquence du gène SMN**

Chez l'homme, il existe donc deux gènes codant la protéine SMN : SMN1 (OMIM #600354) et SMN2 (OMIM #601627). La duplication de ce gène est également observée chez les primates, cependant la copie SMN2 est propre à l'homme. Par contre, chez toutes les autres espèces, un seul gène code la protéine SMN (29).

En 1995, Lefebvre et al. (7) ont déclaré que le gène SMN humain était constitué de 8 exons ; cependant ce n'est qu'en 1996 que Burglen et al. (30) ont mieux caractérisé le gène SMN en 9 exons. Afin de ne pas confondre les données de mutation précédemment publiées, à cette époque, l'exon 2 a été dénommé par Burglen et al. (30) exons 2a et 2b.

SMN est un gène de 27kb composé de 9 exons. Trois exons sont alternatifs, les exons 3, 5 et 7. L'exon 8 contient le codon stop. Plusieurs motifs sont codés par ces exons, notamment une région basique riche en lysine codée par l'exon 2, un motif Tudor codé par l'exon 3, une région polyproline codée par les exons 4 et 5 et une région avec différentes paires tyrosine-glycine (Y-G) codée par l'exon 6. Les transcrits SMN font 1,7kb et codent pour une protéine d'une masse de 32kDa et 294 acides aminés (7,30 ,31). Le gène ancestral SMN appelé SMN1 (ou SMNt) se situe dans la partie télomérique de la région 5q13 et sa copie inversée SMN2 (ou SMNc) dans la partie centromérique.

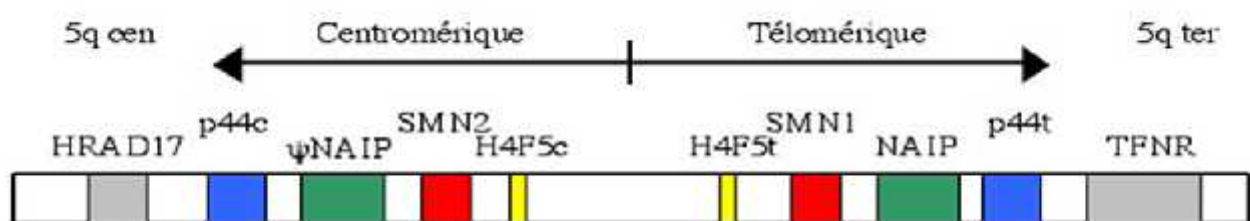


Figure 7 : structure du locus q13.3 du bras long du chromosome 5 et du gène SMN (7)

## II-2-2-La différence entre les deux gènes SMN1 et SMN2

Le gène SMN1 se distingue du gène SMN2 uniquement par 5 paires de bases, 1 dans l'intron 6, 1 dans l'exon 7, 2 dans l'intron 7 et 1 dans l'exon 8. Ces différences n'ont aucun effet sur la séquence en acides aminés de la protéine car elles sont silencieuses (7, 30,32).

Les ARNm obtenus à partir de ces deux gènes sont identiques à l'exception de 2 nucléotides situés dans les exons 7 et 8. Plus précisément, une transition en position +6 de l'exon 7 est responsable de l'épissage alternatif de l'ARN pré-messager du gène SMN2 (fig.08).

Quand le nucléotide est une cytosine (C) comme dans le gène SMN1, l'exon 7 est reconnu et inclus dans la protéine. S'il s'agit d'une thymine (T), comme dans le gène SMN2, l'exon 7 est exclu de la majorité des ARNm (fig.08).

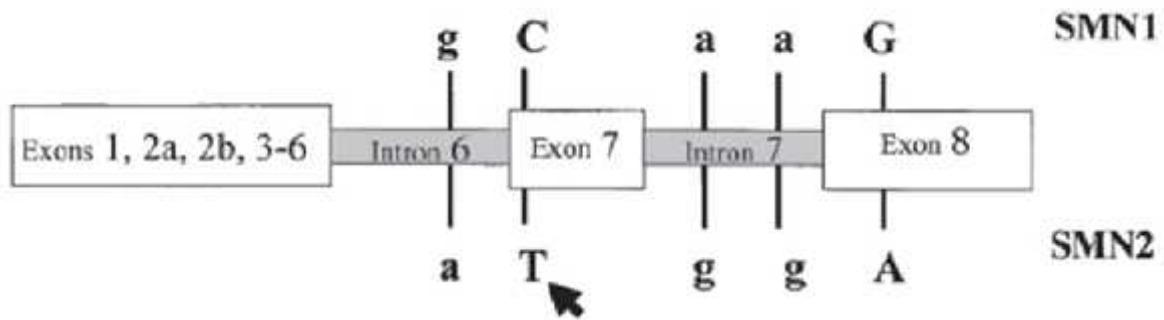


Figure 08 : la différence en séquence nucléotidique entre le gène SMN1 et SMN2 (31)

Ce polymorphisme induit un épissage alternatif où l'exon 7 est excisé. De ce fait, SMN2 produit environ 90% de protéine SMN $\Delta$ 7 (la protéine tronquée) sans l'exon 7(33). Ainsi les mutations du gène SMN1 déclenchent une SMA et les altérations du gène SMN2 n'induisent aucune maladie. De plus, le gène SMN2, n'étant pas pleinement fonctionnel, ne peut compenser le défaut d'expression lié à la mutation du gène SMN1 chez les patients atteints de SMA. Par ailleurs, il a été constaté récemment qu'une faible expression de la protéine SMN induit une diminution de l'inclusion de l'exon 7 (34).

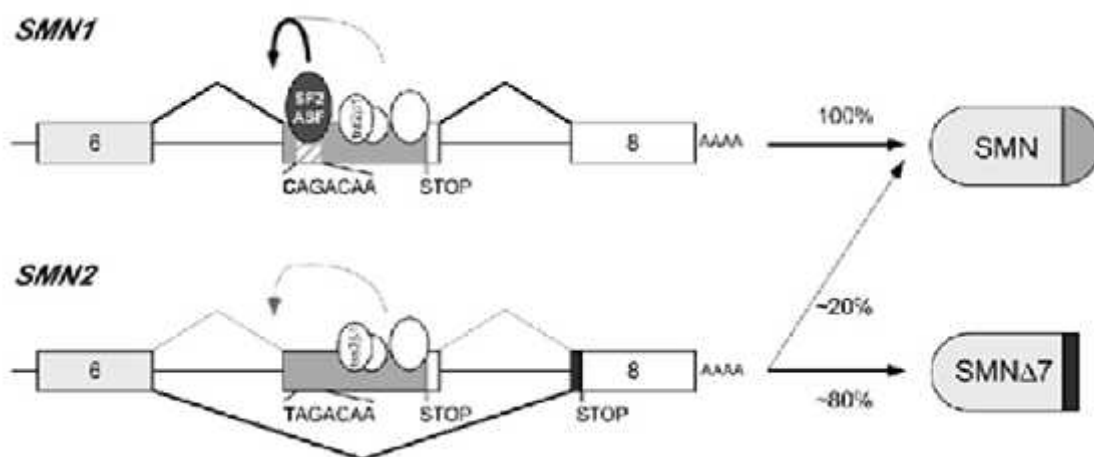


Figure 09 : Diagramme schématique de l'expression des gènes SMN1 et SMN2 (34)

Deux phénomènes expliquent la modification du profil d'épissage du gène SMN2 par rapport au gène SMN1. D'une part, la substitution de la cytosine en thymine dans l'exon 7 induit la création d'un élément d'épissage de type silencieux (ESS). Des facteurs de répression d'épissage, tel hnRNP A1, se fixent sur ce site et induisent l'exclusion de l'exon 7 dans les transcrits SMN (35, 36,37). Ainsi,

il a été démontré récemment que cette substitution nucléotidique créait un site de liaison de type TTTTA pour la protéine Sam68. Celle-ci interagissait avec hnRNP A1 via sa partie C-terminale et déclenchait l'excision de l'exon 7. D'autre part cette même substitution modifie un élément activateur de l'épissage (ESE). Les facteurs d'épissage ASF/SF2 ne peuvent plus détecter le site d'épissage en 3' (33, 38, 39,40).

### **II-2-3-Régulation transcriptionnelle du gène SMN**

Les gènes SMN1 et SMN2 sont régulés par des promoteurs ayant des séquences et des activités quasi-identiques (41,42). Une région de 150pb en amont du site d'initiation de la transcription contient des séquences nécessaires pour une activité minimale du promoteur (43). Le promoteur de SMN contient des sites de liaisons pour CREB, les protéines de la famille Sp et le facteur de régulation de l'interféron. Toutes ces molécules sont capables de moduler l'activité du promoteur (44,45).

Plusieurs études ont conclu qu'un segment de 750pb, s'étendant entre -450 et +300 pb par rapport au site d'initiation de la transcription, permettait l'activité transcriptionnelle maximale pour les gènes humains SMN1 et SMN2(41). L'analyse de cette même séquence a révélé de nombreux éléments en cis pour différents facteurs de transcription, notamment deux sites de fixation pour CREB : CRE-I (-443 [...]TGACGACA-[...] -332) et CRE-II (+210 [...]TGACGACT [...] +283). Il s'avère que le site CRE-II est essentiel pour l'expression du gène SMN (45). En effet, une mutation sur ce site entraîne une diminution drastique de l'activité du promoteur de SMN.

Il a également été démontré que les facteurs de transcription capables de se lier au promoteur de SMN varient en nombre et en nature selon les types cellulaires considérés. En effet, la régulation transcriptionnelle à laquelle sont soumis les promoteurs des gènes SMN est telle que leur activité diminue au fur et à mesure de la différenciation cellulaire.

Un autre élément actif en cis, appelé élément 1 et localisé dans l'intron 6, semble responsable de l'épissage de l'exon 7 de SMN. Quand cet élément 1 est muté, on observe une augmentation de l'inclusion de l'exon 7 (46) (Annexe I).

## II-3- La protéine SMN:

### II-3-1- Structure de la protéine SMN :

La protéine SMN est une protéine ubiquitaire nécessaire à la survie cellulaire. Elle est présente chez tous les eucaryotes supérieurs. Elle a également été caractérisée chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, mais elle est absente chez *Saccharomyces cerevisiae* (30).

La protéine SMN est une protéine de 294 acides aminés. Elle présente une masse moléculaire de 36 kD. Sa séquence n'est homologue à aucune des protéines répertoriées dans les banques de données actuelles (7), mais la protéine SMN possède plusieurs séquences conservées.

### II-3-2- Séquence de la protéine SMN :

La protéine SMN est composée de plusieurs domaines distincts : une région de liaison aux acides nucléiques (47), un domaine Tudor, une région riche en prolines (7,48) et des domaines d'oligomérisation (49). La région codée par l'exon 2b, le domaine Tudor et la boîte Y/G sont les régions les plus conservées de la protéine (30).

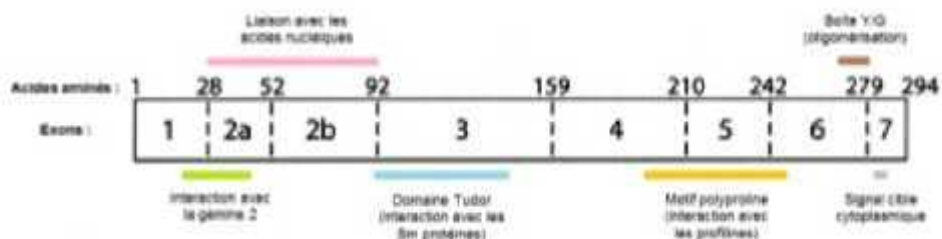


Figure 10 : Différents domaines de la protéine SMN (50)

Le domaine de liaison aux acides nucléiques de la protéine SMN est codé par l'exon 2b (47). Il est nécessaire et suffisant pour permettre une liaison non-spécifique de la protéine SMN à l'ARN ou à l'ADN. Par ailleurs, la protéine SMN interagit préférentiellement avec des séquences poly(G), par rapport aux séquences poly(A), poly(C) et poly(U) (51). Dans sa région centrale se trouve un domaine Tudor, rencontré dans de nombreuses protéines eucaryotes, en particulier dans les protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine. Cette séquence a été initialement



décrite pour la protéine Tudor de la drosophile (52). Le domaine Tudor est codé par l'exon 3 de la protéine SMN et serait important pour l'interaction de la protéine SMN avec des protéines contenant des motifs riches en arginines-glycines (RG) (53, 54). Plusieurs mutations ponctuelles, dont la mutation E134K fréquemment trouvée chez les patients atteints de SMA, se situent à l'intérieur de ce domaine.

De nombreux polypeptides possédant un domaine riche en proline jouent un rôle dans la polymérisation de l'actine (ligands de profilines) ou sont des ligands des profilines [PFN] (46). Le domaine polyproline de la protéine SMN normale interagit avec le site de liaison correspondant des PFN (55). Il se pourrait que l'oligomérisation de SMN serait nécessaire non seulement à l'expression de sa fonction mais aussi à son transport entre le cytoplasme et le noyau et qu'elle serait modulée par les PFN, et plus particulièrement par la PFN II neuronale. Ce fait permettrait d'expliquer au moins en partie pourquoi le défaut d'une protéine ubiquitaire comme l'est SMN, provoque une dégénérescence spécifique des motoneurons alors que les autres cellules restent intactes, en cas de SMA (Annexe II).

La région C-terminale de SMN est la plus hautement conservée au cours de l'évolution et est requise pour son homo-oligomérisation (56). Sa liaison efficace aux protéines Sm (57) et sa propre translocation dans le noyau (58) ont démontré qu'une protéine en doigt de zinc essentielle, appelée ZPR1, est également importante pour la localisation nucléaire de la protéine SMN.

### **II-3-3-Les différences entre la protéine codée par le gène SMN1 et SMN2:**

Plusieurs isoformes de la protéine SMN sont générées suite aux événements d'épissages des exons alternatifs. La forme complète, principalement issue du gène SMN1, est majoritaire. A noter, que le gène SMN1 code aussi pour l'isoforme axonale, appelée aSMN. Cette isoforme qui résulte de la rétention de l'intron 3, fait environ 18 kDa et s'exprime dans les axones des motoneurons (59, 60,61). La surexpression de cette isoforme est capable de stimuler la genèse et la croissance des axones.

La présence de l'exon 7 est essentielle à la production d'une protéine SMN stable et pleinement fonctionnelle. En raison de l'absence de l'exon 7 dans l'ARNm du gène SMN2, il manque à la protéine fabriquée par SMN2 un bout de la protéine normale. À lui seul, le gène SMN2 ne peut pas

produire en quantité suffisante la protéine SMN pleinement fonctionnelle (de pleine longueur, contenant l'exon 7) qui est nécessaire à la survie des motoneurones.

Les transcrits complets sont presque produits par SMN1 alors que le transcrit tronqué sans exon 7, code une protéine du côté carboxyterminal qui est instable et incapable de compenser le défaut d'expression du gène SMN1 chez les patients SMA (38).

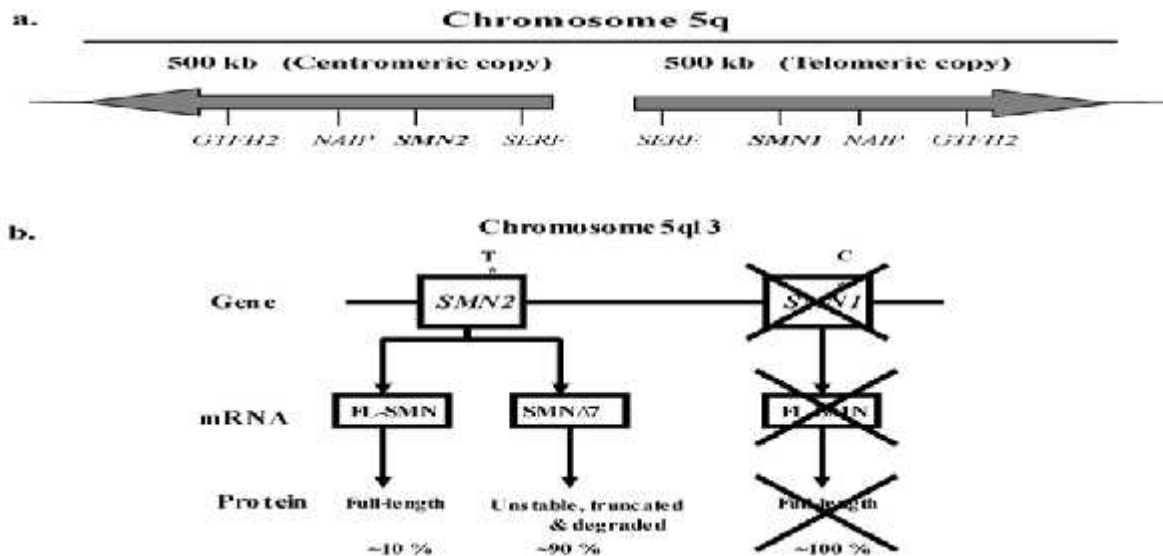


Figure 11 : Les bases génétiques des SMA (38)

### II-3-4-Localisation de la protéine SMN :

La protéine SMN a une localisation ubiquitaire : elle est retrouvée dans les reins, le foie, le cœur, le tissu musculaire, l'os, les lymphocytes. Elle est présente en grande quantité dans le cerveau (néocortex, hippocampe et cervelet) et la moelle épinière des mammifères (62). Parmi les cellules du système nerveux central, il a été constaté que SMN est fortement exprimée dans les larges motoneurones spinaux, les neurones du bulbe rachidien, les cellules pyramidales du cortex et les cellules de Purkinje du cervelet (63).

### II-3-4-1-Localisation de la protéine dans le noyau

SMN est trouvée à la fois dans le noyau et le cytoplasme. Il semble que la localisation correcte de la protéine SMN soit dépendante de sa partie aminoterminal (64).

La forme nucléaire est localisée dans des structures protéiques complexes appelées Gems qui ont été identifiés pour la première fois dans des cellules HeLa (souche PV). Ce sont des structures nucléaires qui contiennent des concentrations élevées et localisées de protéine SMN (65). Les Gems sont souvent associés aux Corps de Cajal, des structures similaires en taille et en nombre, et qui sont impliquées dans l'assemblage et la maturation de particules ribonucléoprotéiques (RNP). Ces CB sont connus pour la première fois comme des structures qui contiennent une quantité élevée des facteurs impliqués dans la transcription et la production de RNAs nucléaires (snRNAPs), (snoRNAPs) et les ARN polymérases eucaryotiques.

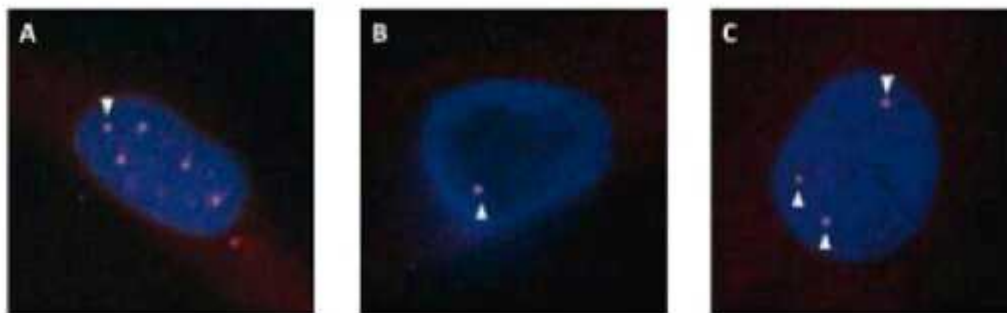


Figure 12 : Analyse immuno histochimique du nombre de Gems dans des fibroblastes issus de patients sains (A) ; atteint de SMA de type I (B) ou atteint de SMA de type II (C) ; les noyaux sont marqués au bleu avec du DAPI et les gems en rouge avec un anticorps monoclonal anti-SMN (66)

Dans le cytoplasme, la protéine SMN fait partie d'un complexe macromoléculaire composé des protéines SIP1 et SIP2 (65) et d'autres protéines spécifiques du motoneurone, qui ne sont pas encore toutes identifiées. Elle intervient dans la biogenèse des spliceosomes, ensembles ribonucléiques impliqués dans le cycle complexe de maturation des ARNm dont probablement, ceux qui sont indispensables à la survie du motoneurone.

### **II-3-4-2-Localisation tissulaire de la protéine :**

Le rôle de la protéine SMN est important pendant la vie fœtale dans le muscle squelettique, dans le cœur, le cerveau et le rein ; de plus l'expression de la protéine SMN dans le tissu musculaire de patients atteints de SMA de type I, II, III est très faible. La protéine SMN est exprimée dans le système nerveux central des mammifères.

### **II-3-5- Rôles de la protéine SMN**

#### **II-3-5-1-Dans la maturation des ARN pré messagers**

La protéine SMN peut s'associer à des protéines de liaison de l'ARN ou directement lier l'ARN (65). Elle est indispensable pour l'assemblage des composants du spliceosome, aussi bien dans son étape de maturation cytoplasmique que nucléaire. De plus, SMN est capable de s'associer avec les protéines hnRNP-Q et hnRNP-R, qui se lient à certains pré-ARNm et ARNm. Ces deux groupes de snRNP sont impliqués dans la maturation, la stabilisation et le transport dans la cellule des ARNm et interviennent dans le recyclage d'autres snRNP (67).

De plus, SMN interagit avec la fibrillarine et GAR1, modulant ainsi la biogenèse des petites ribonucléoprotéines nucléolaires (snoRNP). Ces dernières sont impliquées dans la maturation des ARN ribosomiaux (68).

Il a été démontré que l'hélicase ARN A (RHA) formait un complexe avec SMN et se liait avec les ARN polymérases de type II (68). En effet, la partie carboxyterminale de l'ARN polymérase de type II, impliquée dans la transcription (69), se lie physiquement dans le noyau à la protéine SMN, entre autre via la RHA. A noter que cette fonction est altérée chez les patients atteints de SMA. La protéine SMN $\Delta$ 7 entraîne une accumulation anormale de la forme hypophosphorylée de l'ARN polymérase de type II et de la RHA dans les gems et les corps de Cajal. Les auteurs ont conclu que ces résultats suggéraient un rôle du complexe SMN dans l'assemblage de la machinerie de transcription avant son association avec les gènes (68).

#### **II-3-5-2-Role dans le complexe SMN**

L'épissage des ARN pré-messagers est réalisé dans les noyaux, par des structures appelées (snRNP). Ces dernières sont formées d'au moins une séquence simple brin riche en uridine, (snRNA), de protéines SM et de polypeptides spécifiques (70). Il a été dénombré 5 snRNA : U1, U2, U4, U5 et U6,

ainsi que 7 protéines SM : B/B', D1, D2, D3, E, F et G(71). Ces protéines sont caractérisées par la présence de domaines riches en arginine et en glycine. Les résidus arginine sont diméthylés symétriquement ce qui permet leur interaction avec la protéine SMN. L'ensemble des snRNP forme le splicéosome, le complexe excisant les introns et raboutant les exons des ARN pré-messagers. Par ailleurs, il a été démontré que le splicéosome était généré grâce à la collaboration entre les complexes PRMT5 et SMN (72).

La gémme 2, aussi appelée protéine SIP1, est capable de former un complexe stable, à la fois in vivo et in vitro, avec la protéine SMN. Cette association peut avoir lieu dans le cytoplasme et dans les gems. De plus, il a été démontré par immunoprécipitation que les protéines SM du cœur du splicéosome (B/B', D, E, F, G, U1A) peuvent interagir directement avec SMN ; ce qui semble confirmer le rôle de SMN dans la biogénèse des snRNP et/ou leur fonction (73). Ainsi, la protéine SMN s'associe avec la gémme 2 via sa partie aminotermine et se lie avec les snRNP grâce au domaine YG de sa partie carboxyterminale(56). En outre, une fois oligomérisée, la protéine SMN crée un site de liaison de haute affinité pour les protéines SM B, D1 et D3. De plus, la gémme 2 permet la stabilisation du complexe SMN (74).

La gémme 3, parfois appelée dp 103, est une hélicase à ARN avec une boîte DEAD/DEAH. Elle est capable d'assembler et de séparer les éléments composant le splicéosome. Elle est capable d'interagir directement avec SMN grâce à sa partie carboxyterminale ainsi qu'avec les protéines Sm, telles B/B', D2 et D3.

La gémme 4, bien qu'étant localisée au niveau des gems, n'interagit pas avec SMN. Elle semble jouer un rôle de cofacteur de l'activité ATPasique et/ou hélicase de la gémme 3.

La gémme 5, ou p175, peut se lier à SMN et interagir avec les protéines SMB, SMD1, SMD2, SMD3, and SME (75). Elle forme avec la gémme 2 et SMN un complexe multiprotéique qui s'assemble dans le cytoplasme puis qui est transloqué dans les gems dans le noyau. Ce complexe est impliqué dans la formation cytoplasmique, l'import dans le noyau et la régénération des snRNP.

La gémme 6 peut s'associer de façon spécifique avec les protéines B/B', D2, D3 et E, cependant sa fonction n'est pas encore élucidée. Elle est capable d'interagir également avec la gémme 7 liée à SMN (76).

La gémme 8, quant à elle, est la clef de voûte du complexe SMN. Elle maintient la stabilité de l'édifice en interagissant avec SMN et les hétérodimères gémme 6/7, ce qui permet la liaison efficace des protéines SM et l'activité d'assemblage des snRNP (77) (Annexe III).

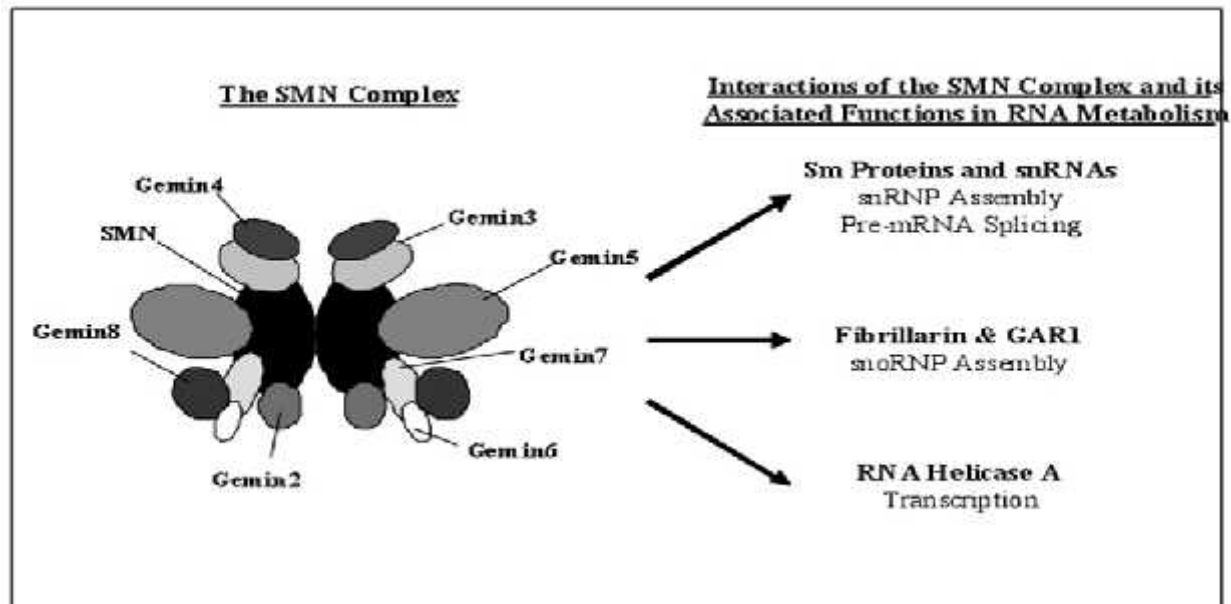


Figure 13 : Complexe SMN et ses substrats (77)

Toutes ces données suggèrent que SMN joue un rôle dans la biogenèse des snRNPs et du splicéosome, le complexe qui catalyse l'épissage des pré-ARNm. Il a été démontré que les snRNA riches en Uridine sont transcrits dans le noyau et, par la suite, transportés vers le cytoplasme où ils se rassemblent avec des protéines SM pour former les particules snRNP. Ainsi, après modification du m7 Gcap en m3 G-cap, ces particules matures sont transportées, de nouveau, au noyau. Afin de catalyser ce processus, les protéines SMN sont ensuite diméthylées. Dans un deuxième temps, les protéines SM méthylées sont transférées sur le complexe SMN, qui favorise leur transfert sur les snRNA (73).

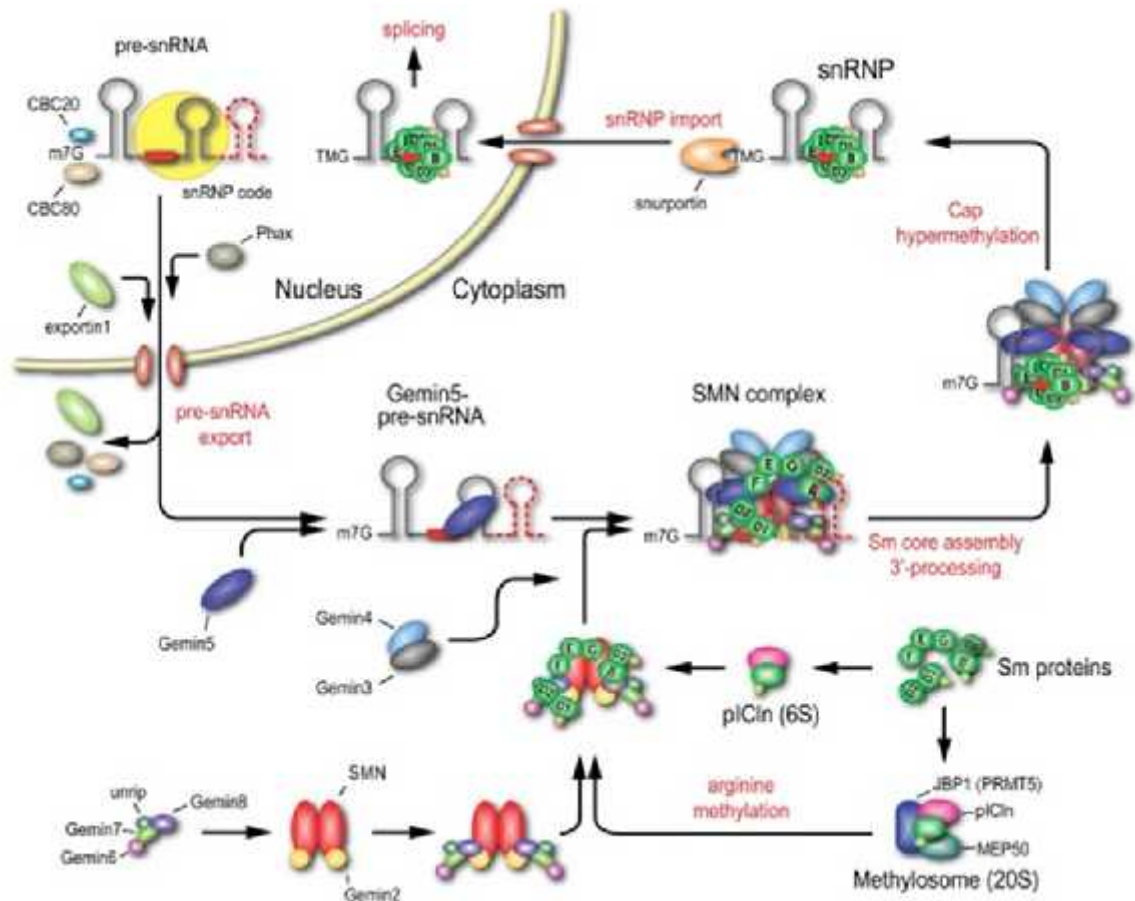


Figure 14 : Biogenèse des UsnRNP (77)

### II-3-5-3-SMN et apoptose :

Un dérèglement des voies apoptotiques est incriminé dans la physiopathologie de nombreuses maladies humaines. L'apparition de cellules tumorales ou la persistance de clones lymphocytaires auto-réactifs peuvent être la conséquence, au moins en partie, d'un défaut dans le processus conduisant à la mort cellulaire. Au contraire, une mort excessive des cellules neuronales est observée dans certaines maladies neurodégénératives comme l'amyotrophie spinale.

La protéine SMN est exprimée dans les motoneurones. Elle fait partie de complexes multimoléculaires dans le cytoplasme et dans le noyau. Dans le cytoplasme, elle interagit avec Bcl-2 dont elle renforce l'activité anti-apoptotique, propriété qui est perdue chez les sujets malades. Lorsque SMN et Bcl-2 sont coexprimées dans les cellules HeLa, elles agissent en synergie pour contre balancer les effets pro apoptotiques des protéines Bax et Fas. La protéine SMN se lie également à p53. Il est donc supposé qu'elle a un rôle anti-apoptotique(50). C'est son extrémité

carboxyterminale qui semble indispensable à la fonction anti-apoptotique, celle qui est absente dans la forme tronquée SMN $\Delta$ 7.

Des études ont montrées que SMN, Bcl-2 et Bax sont localisées dans la région post-synaptique des jonctions neuromusculaires normales. Chez un individu normal la protéine SMN pourrait maintenir des interactions entre le nerf et le muscle. En cas de SMA, la protéine SMN mutée post-synaptique est quantitativement déficiente et ne peut pas jouer son rôle (78).

La perte d'expression de SMN, pourrait par la disparition d'une activité anti-apoptotique dans les cellules neuronales, être responsable de la mort par apoptose de certains neurones. L'obtention d'un modèle animal dans lequel SMN1 serait délété, permettrait de clarifier la responsabilité de ce gène et le rôle de l'apoptose dans la maladie.

#### **II-4-Pathologies moléculaires du gène SMN**

##### **II-4-1- Les différentes mutations retrouvées dans le gène SMN**

La région chromosomique 5 q11.2-13.3 est d'une très grande instabilité et elle est propice à l'apparition de mutations surtout à type de délétions. L'importante fréquence de néo-mutations chez 2 % des patients atteints de SMA est secondaire à des crossing-over inégaux survenant entre unités répétitives au cours des méioses paternelles à l'origine de délétions et de duplications de tailles variables.

Une grande majorité (90-98%) des patients SMA ont des délétions homozygotes des exons 7 et 8 de SMN1, les 2 à 10 % restants portent des mutations intragéniques de SMN1 (7, 79,80), avec une fréquence plus élevée dans le type I que dans des types II et III.

De nombreux travaux ont montré que les délétions emportant tout ou une grande partie du gène et même des gènes avoisinant sont plus fréquentes dans les formes sévères (81). La plupart des mutations faux-sens sont localisées dans une région très conservée des exons 6 et 7. Il a été démontré que ces mutations réduisent la capacité d'oligomérisation de la protéine SMN (46,82).

Les mutations intragéniques de petite taille de SMN1 sont beaucoup moins fréquentes que des délétions complètes de SMN1 et les conversions géniques de SMN1 en SMN2 (83).



Plus de 40 mutations ont déjà été identifiées, parmi lesquelles des mutations non-sens et faux-sens, des décalages du cadre de lecture, des délétions, des inversions et des mutations dans un site d'épissage. La plupart des mutations faux-sens sont localisées dans une région très conservée des exons 6 et 7 (Y272C, T274I, G275S et G279C/V). Ces mutations perturbent les fonctions de la protéine SMN. La mutation E134K est une autre mutation fréquemment retrouvée. Il semble qu'elle abolirait l'interaction de la protéine SMN avec certains de ses partenaires protéiques telle que les protéines Sm (56).

Ogino et Wilson ont souligné la persistance du problème de la nomenclature des petites mutations intragéniques de SMN1, notant que les appellations publiées pour de nombreuses mutations étaient en contradiction avec les directives de la nomenclature standard. A titre d'illustration de cette variance (91), il a été souligné que la mutation 439delGAAGT (600.354,0009), qui a été signalée comme 425del5 par Sossi et al. (84) l'a été comme 472del5 par Brahé et al. (85).

Tableau 1 : liste des mutations de SMN1 entraînant un SMA (86)

Type de mutation	Mutation de SMN1	Type de SMA
Délétions	Exon 8 : Intron 4 à Intron 6	I ; II et III
Mutations non-sens	Exon 1 : Q15X ; Exon 3 : W102X	I ; II et III
Décalage de cadre de lecture	Exon1 : 27insG ; Exon 2a : 124insT	II ; I
	Exon 2b : 241-242ins4 ; Exon 3 : 425del5	III ; III I ; II et III, I
	Exon 3 : 430 del4 ; Exon 3 : 472del5	I, II et III, II
	Exon 4 : 542delGT ; Exon 4 : 591delA	I, III
	Exon 4 : 618insT ; Exon 6 : 773insC	I et II, I
	Exon 6 : 813ins/dup11 ; Intron 6 : c.867+2T→G	
Mutation d'un site	Intron 6 : c.868-11del7 ; Intron 7 :	I ; II ; III

d'épissage	c.922+3del4 ; Intron 7 : c922+6T→G	
Mutation faux-sens	Exon 1 : A2G ; Exon 3 : E134K Exon 6 : P245L ; Exon 6 : S261I Exon 6 : Y272C ; Exon 6 : T274I Exon 6 : G275S ; Exon 7 : G279C ; Exon 7 : G279V	II et III, I III, III I, II et III ; II et III III ; II et III ; I

## II-5-Corrélations phénotype – génotype

Les différentes formes cliniques de la SMA sont associées à une sévérité très variable. Cette sévérité est corrélée au taux de la protéine SMN. C'est ainsi que les formes les plus sévères sont associées à des faibles taux de protéine (35). En effet, les patients présentant une forme sévère ont un taux de protéine SMN compris entre 5 et 20% par rapport à une population normale et pour environ 50% des patients atteints de SMA de type II, ce taux est compris entre 30 et 80%. Par ailleurs, ces réductions du niveau d'expression de la protéine SMN sont corrélées avec le nombre de copies de SMN2, l'étendue des altérations des gènes NAIP et p44 (87).

## II-6-Les gènes modificateurs dans la SMA :

### II-6-1-Le nombre de copies de SMN2

Le nombre de copies de SMN2 influence la sévérité du phénotype. Plus ce nombre est bas, plus le phénotype est sévère pour un individu présentant une délétion homozygote du gène SMN1. En effet, en raison de la nature instable de la région contenant le locus SMA, les patients qui présentent, majoritairement, une délétion du gène SMN1 peuvent porter un nombre variable de copies du gène SMN2 influençant la sévérité de la maladie.

Le nombre de copies de SMN2 dans le génome varie entre 0 et 8. De nombreuses études ont démontré une relation inverse entre le nombre de copies de SMN2 et la gravité de la maladie (7, 35, 88,89).

Les patients présentant une forme modérée de SMA ont un nombre de copies SMN2 plus élevé que les patients ayant une forme grave de SMA.

Les patients atteints de SMA de type I et II (96 % et 94 % respectivement) présentent une délétion homozygote du gène SMN1 plus fréquemment que chez les patients atteints de SMA III (86 %). Alors que la majorité des patients SMA de type I sont porteurs de réelles délétions de SMN1, la majorité des patients de type SMA II et III présentent une absence du gène SMN1 à l'état homozygote en raison de la conversion de SMN1 en SMN2. Il y a donc augmentation du nombre de copies du gène SMN2 (87,90). Les patients SMA de type II ont une délétion de SMN1 sur un chromosome et une conversion de SMN1 en SMN2 sur l'autre chromosome (trois copies de SMN2). Chez les patients de Type III, il existe une conversion de SMN1 en SMN2 sur les deux chromosomes homologues (quatre copies).

Cette conversion intéresse soit le gène entier, soit sur une partie de celui-ci. Dans ce dernier cas, des gènes SMN hybrides possèdent en général l'exon 7 du gène SMN2 et l'exon 8 du gène SMN1.

Une étude du nombre de copies de SMN1 et SMN2 exprimé par la population générale et par les patients atteints de SMA a prouvé qu'il peut y avoir conversion de SMN2 en SMN1 et que, dans la population générale, un haut nombre de copies de SMN1 est associé à un faible nombre de copies de SMN2 (91).

Alors que la relation inverse entre le nombre de copies de SMN2 et la gravité de la maladie est généralement vraie dans les SMA, quelques exemples d'exceptions à la règle ont été repérés dans certaines familles. Par exemple, certains patients présentant une SMA de TYPE II et III possèdent seulement deux copies de SMN2 au lieu des prévisibles trois ou quatre copies. Le séquençage de SMN2 dans ces cas a révélé la présence d'une mutation rare (SMN2 c.859G> C) dans l'exon 7 (92,93).

## **II-6-2-La régulation transcriptionnelle**

La régulation transcriptionnelle est un autre mécanisme proposé pour expliquer les différentes sévérités observées chez les patients atteints de SMA. En effet, il a été démontré que les copies du gène SMN2 ne sont pas équivalentes d'un patient à l'autre du point de vue fonctionnel. En effet, les quantités de protéine complètes issues du gène SMN2 sont très variables. Par exemple, la substitution de la base c.859G>C dans le gène SMN2 a été identifiée chez différents patients. Ce simple changement crée une nouvelle séquence ESE qui augmente le nombre de transcrits complets, diminuant ainsi la sévérité du phénotype.

Cette variante peut soit créer un site supplémentaire de liaison des protéines SF2 / ASF pour promouvoir l'inclusion de l'exon7 (94) ou perturber un élément silencieux d'épissage dépendant de hnRNPA1.

De plus, les copies du gène SMN2 diffèrent d'un patient à l'autre par leur méthylation. Ainsi les porteurs de groupements méthyles sur les îlots CpG -290 et -296 sont plus atteints par la maladie que les autres (94).

## **II-6-3-Le gène NAIP**

Le gène NAIP (Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein) voisin de SMN, est également dupliqué en miroir, code pour une protéine intervenant (94) dans la différenciation et la survie des cellules (95). En effet, la protéine NAIP protège les neurones de la mort induite par le calcium en interagissant avec l'hippocalcine et peut aussi inhiber directement les caspases 3 et 7 (96).

45-50% des patients présentant une SMA de type I et 18% des SMA de type II (94,97) présentent une délétion du gène NAIP. L'absence de la protéine NAIP entraîne la survenue précoce de la mort motoneuronale et contribue donc à l'augmentation de la sévérité clinique de la maladie (98).

Il a été rapporté que le nombre de copies du gène NAIP est corrélé avec la sévérité clinique de la SMA. Les patients SMA ayant un faible nombre de copies de NAIP ont des phénotypes plus sévères que les patients ayant un plus grand nombre de copies (99,100). De plus, le nombre de copies de SMN2 et NAIP ont été associés à l'âge d'apparition de la maladie et au risque de décès et de survie des patients SMA (101) montrant par conséquent que le nombre de copies et la structure de SMN1, SMN2 et NAIP est important pour l'analyse du mécanisme moléculaire des SMA (83).

De nombreuses études ont cependant démontré que le gène NAIP est plus fréquemment muté chez les patients affectés par la SMA que dans la population générale, avec des délétions homozygotes dans 45-67% des cas de SMA de type I et dans 20 à 42% chez les patients de type II / SMA type III (18).

#### **II-6-4-Le gène P44**

Le gène p44 situé à proximité de la région critique SMA (10) est voisin du gène NAIP en position télomérique. Il code pour l'une des sous-unités du complexe de transcription TFIIH (30). Il est impliqué dans la transcription, le contrôle du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN (102). Le gène p44 pourrait être à l'origine des grands réarrangements génomiques présents chez les patients présentant une SMA de type I (103).

Des délétions homozygotes de P44 ont été observées chez des témoins. De plus, près de 27% des patients atteints de forme sévère présentent des délétions de petite taille emportant uniquement le gène SMN, ou bien encore uniquement des mutations intragéniques. Ce qui suggère que les délétions de NAIP et de p44 seules ne sont pas impliquées dans la survenue d'une SMA, mais que leur association avec une mutation du gène SMN pourrait aggraver la maladie (103).

#### **II-6-5-Le gène de la plastine 3 ou PLS3**

En 2008, Oprea et al. (104) ont étudié six familles de SMA dans lesquelles était observée une variabilité phénotypique. Ces familles possédaient des femmes asymptomatiques porteuses d'une délétion homozygote du gène SMN1. Ces femmes étaient porteuses du même nombre de copies (3 ou 4 copies) du gène SMN2 que leurs frères ou sœurs malades. Cela suggère qu'il existe d'autres modificateurs de la sévérité de la maladie indépendants de SMN2. À partir d'analyses de transcriptomes, les auteurs ont mis en évidence, chez ces femmes, une surexpression du gène PLS3 en comparaison avec leurs apparentés malades.

Le gène PLS3 est localisé sur le chromosome X et code pour la plastine 3. Une protéine se liant à l'actine impliquée dans la dynamique du cytosquelette. Elle joue un rôle important dans l'axonogenèse. L'équipe d'Oprea a montré qu'une surexpression de PLS3 dans des modèles animaux (souris et zebrafish) corrigeait le défaut de croissance des axones associé à la dégénérescence des neurones moteurs dans la SMA (105).

Il est cependant possible que la propriété de modulation du phénotype par la PLS3 est âge et sexe-dépendante; alternativement, la PLS3 ne peut pas en fait être un modificateur majeur du phénotype de la SMA. D'autres facteurs moléculaires modificateurs de gravité de la maladie dans le SMA indépendant de SMN2 doivent exister. Il est important d'identifier et de caractériser ces nouveaux facteurs modificateurs pour le développement de nouveaux biomarqueurs de la SMA et des cibles pour le développement de stratégies thérapeutiques pour le SMA (105).

## **II-7- Le gène SMN dans les autres maladies :**

Pour certains auteurs, il existe un lien entre les délétions centromériques du gène SMN et les formes sporadiques adultes des maladies des motoneurones

Plus récemment, il est montré que le nombre anormal de copies du gène SMN1 est un facteur de susceptibilité pour l'ALS (106). Il semble bien, en effet, que les délétions homozygotes de SMN2 soit un facteur de risque pour l'ALS. A l'opposé, d'autres auteurs ne détectent aucune prédisposition à l'ALS chez des patients présentant des délétions de SMN. Il est bien difficile de répondre à cette question en raison de la variabilité naturelle du nombre de copies du gène SMN1 et plus encore de SMN2

## **II-8-Le conseil génétique dans le cadre de l'amyotrophie spinale :**

### **II-8-1-Conseil génétique des apparentes d'un patient atteint de SMA :**

La consultation de conseil génétique permet d'évaluer et de présenter au couple le risque de récurrence de l'amyotrophie spinale dans la famille. La transmission de l'amyotrophie spinale obéissant aux règles de l'hérédité mendélienne, ce risque génétique est de 25% pour les germains (frères ou sœurs) d'un enfant atteint d'amyotrophie spinale. Il est beaucoup plus faible pour les enfants, neveux ou cousins germains de sujets atteints de la maladie.

### **-Mode de transmission :**

L'analyse des 4 formes de SMA a révélé un mode de transmission autosomique récessif. Dans la plupart des cas (95,5% des cas), les parents des enfants atteints sont tous hétérozygotes pour une mutation du gène SMN1. Ils possèdent un allèle sain et un deuxième allèle altéré du même gène SMN1. L'altération est sans conséquence pour le porteur sain, mais l'enfant qui hérite des deux

copies défectueuses du même gène sera malade. Les résultats de l'analyse génétique montreront alors une délétion homozygote de l'exon 7 du gène SMN1 ou une autre mutation du même gène.

Lorsque les deux parents sont porteurs, ils ont donc 25 % de risque de donner naissance à un enfant atteint de SMA, à chaque grossesse (7,82).

Dans 2% des cas, les enfants sont atteints en raison d'une mutation spontanée sur l'un des deux gènes. Un gène altéré est hérité d'un parent porteur, l'autre gène qui devrait être sain est altéré par une néo mutation spontanée dite "de novo".

Enfin, dans les 2,5 % de cas restants, il s'agit de mutations ponctuelles (héritées) couplées à une délétion. Un des parents est porteur d'une délétion, l'autre est porteur d'une mutation ponctuelle. Et chacun des deux parents a transmis à l'enfant atteint le gène défectueux. Il existe environ 30 mutations répertoriées à ce jour (7,82).

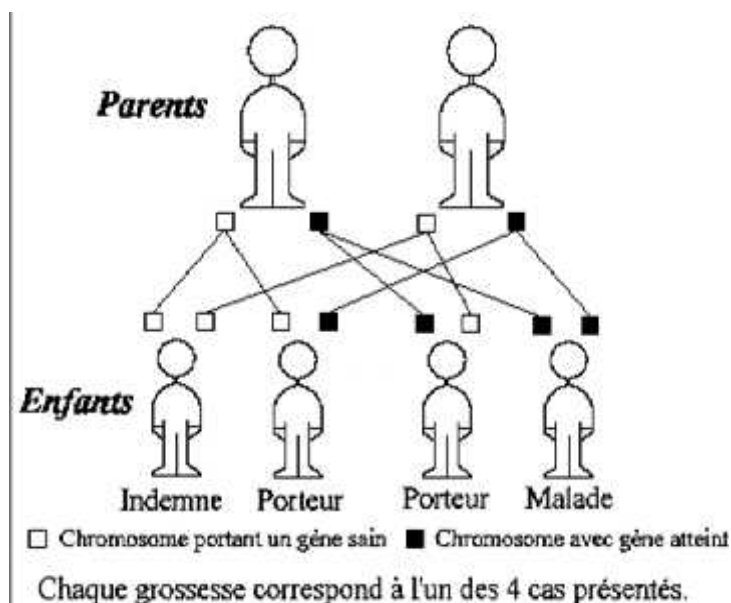


Figure 15 : mode de transmission autosomique récessif

### Le risque résiduel :

Le risque résiduel est relatif à l'existence de petites mutations dans le gène SMN1 qui ne peuvent pas être décelées par les méthodes citées ci-dessus qui ne détectent que les délétions, à une duplication en cis du gène SMN1 masquant une délétion sur l'autre allèle et à la survenue d'une délétion de novo. Plusieurs travaux ont montré que 1,4 à 3,4 % des patients atteints de SMA sont

hétérozygotes composites avec une délétion et une mutation ponctuelle du gène SMN1(7,82). De même, les délétions de novo ont été documentées approximativement, dans 2 % des cas de SMA(87). Enfin, après compilation de l'ensemble des données de la littérature, il apparaît que 3,0 à 4,8 % des sujets hétérozygotes présentent une duplication en cis du gène SMN1 masquant une délétion sur le second allèle (1,82). Enfin, le risque de mosaïque germinale doit être considéré. Au total, le risque résiduel défini comme la somme des allèles morbides non détectés et des délétions de novo sur la somme des allèles morbides peut être estimé globalement à moins de 10 %.

La recherche de délétions hétérozygotes est également particulièrement indiquée dans les familles de SMA avec de multiples unions consanguines qui rendent très aléatoire le calcul de risque a priori. En revanche, il n'y a pas à ce jour de consensus national pour la recherche de délétions hétérozygotes du gène SMN1 dans les familles consanguines sans antécédent de SMA.

La consultation de génétique doit pouvoir répondre à une question bien légitime des apparentés dans le cadre de maladies récessives autosomiques : quel est le risque d'avoir un enfant atteint de cette affection ? De manière à évaluer au mieux le risque de récurrence, le généticien sera amené à calculer le risque a priori d'avoir un enfant atteint qui dépend d'une part de l'incidence de l'affection, et d'autre part du degré de parenté avec le sujet atteint. Si le risque a priori est élevé, des investigations complémentaires pourront être proposées de manière à préciser ce risque lorsque, techniquement, cela est possible. C'est dire l'importance que cette étape de conseil génétique soit entreprise avant toute grossesse. Lorsque les deux conjoints sont hétérozygotes, un diagnostic prénatal pourra être proposé au couple. Si aucune mutation n'est trouvée chez un des conjoints, le généticien définit le risque du couple en fonction de la sensibilité de la technique utilisée pour la recherche de ces mutations. En effet, dans la mesure où, à ce jour, aucune technique n'est capable de déceler la totalité des allèles morbides, il persiste un risque résiduel que le généticien devra évaluer avec le couple. Dans la majorité des cas, ces études permettent d'informer avec précision les couples sur leur statut.

### **II-8-2-Le diagnostic prénatal :**

Le diagnostic anténatal consiste à déterminer le statut génétique de l'enfant à naître par analyse directe de l'ADN du fœtus prélevé soit par choriocentèse (biopsie des villosités choriales à la 10<sup>ème</sup> semaine d'aménorrhée), soit par amniocentèse (ponction de liquide amniotique à la 16ème ou 17ème semaine d'aménorrhée).



La choriocentèse se pratique très tôt, avant la douzième semaine de grossesse, avant même l'amniocentèse (16 semaines). Elle consiste en un prélèvement de cellules chorioniques, qui constituent l'enveloppe placentaire de l'embryon. A partir de l'étude de ces cellules, il est possible de déterminer si les gènes incriminés dans la maladie présentent une altération.

En fonction du résultat des tests, les parents ont la possibilité de choisir si la grossesse sera poursuivie ou non. Ce choix appartient aux parents, comme celui de pratiquer ou non le test. Il faut savoir que le risque de fausse couche lié à la choriocentèse n'est pas négligeable (de l'ordre de 1/100 environ), et que même si les médecins peuvent orienter vers une interruption de grossesse en cas de résultat positif, cela n'a rien d'obligatoire.

### **II-8-3-Le diagnostic préimplantatoire :**

Le diagnostic préimplantatoire permet de vérifier si un embryon est atteint d'une maladie génétique avant même son implantation dans l'utérus, lors d'une procédure de fécondation in-vitro (FIV). En effet, il est maintenant possible de prélever une cellule d'un embryon au stade où il doit être implanté (il est alors composé de 8 à 16 cellules seulement), sans l'abîmer ni remettre en cause l'intégrité de son développement ultérieur. Dans la plupart des maladies génétiques pour lesquelles il a été identifié le gène responsable de la maladie, il est possible alors de pratiquer une recherche de l'état de ce gène sur les chromosomes de cette unique cellule.

Cette technique est au point depuis assez peu de temps (et comporte une marge d'erreur). Elle est pratiquée dans certains pays, comme la Belgique ou la Grande-Bretagne depuis plus longtemps qu'en France.

Le débat sur l'utilisation de cette méthode a été très passionné. En effet, le recours à la fécondation in-vitro et au D.P.I., uniquement dans le but de trier des embryons, peut être considéré comme une démarche proche de l'eugénisme. Certains pensent que la "facilité" de cette méthode permettrait de la généraliser à d'autres critères de tri (et donc d'élimination des naissances) que des critères liés à la recherche d'une maladie génétique aussi grave qu'une myopathie. Il ne s'agirait plus d'évaluer la viabilité d'un embryon, ni d'une certaine façon son confort de vie à venir, mais de l'éliminer en fonction de son sexe, de la couleur de ses yeux, ou de n'importe quelle expression de son patrimoine génétique.

Dans la pratique, il faut savoir que la FIV est une démarche extrêmement contraignante, fortement médicalisée, qui demande beaucoup de patience, de constance et de motivation. Les inconvénients de la méthode, principalement pour la mère, mais aussi pour le couple, font que ce "tri" des embryons n'est pas aussi anodin qu'il y paraît, et il serait étonnant qu'un couple fertile ait recours à la FIV et au DPI associé, uniquement dans le but de faire un garçon ou une fille.

Tout couple inquiet de la transmission probable d'une maladie génétique à ses enfants peut demander conseil à un généticien. Une consultation en conseil génétique permettra une estimation du risque, et donnera des éléments sur l'évolution de la recherche et des techniques d'analyse génétique. D'autre part, c'est aussi un médecin généticien (travaillant en milieu hospitalier ou en relation avec une consultation spécialisée pour les maladies neuromusculaires) qui sera le mieux placé pour constituer le dossier génétique nécessaire à un couple pour avoir recours au DPI. Il pourra alors orienter ce couple vers un centre agréé pour la pratique du DPI.

## **II-9- Modèles animaux dans les amyotrophies spinales**

La protéine SMN joue un rôle crucial dans la survie cellulaire. Cette implication a été démontrée par invalidation des gènes orthologues à SMN chez *Schizosaccharomyces Pombe* (levure à fission), *Caenorhabditis Elegans* (Ver Nématode), *Drosophila Melanogaster* (Drosophile, mouche du vinaigre), *Danio rerio* (poisson-zèbre), *Mus Musculus* (souris commune) et *Sus scrofa domesticus* (cochon domestique).

### **II-9-1- Les souris transgéniques**

L'homologue murin du gène SMN se trouve sur le chromosome 13. Des transcrits codant pour la protéine SMN sont produits dès le 7ème jour de la vie embryonnaire. Cependant, ceux-ci ne subissent jamais d'épissage alternatif. La séquence de ces ARN est relativement semblable à celle décryptée chez l'homme. Ainsi, entre 82 et 83% des acides aminés de la protéine SMN attendue sont communs et sa localisation est conservée (48).

L'invalidation homozygote du gène *Smn* chez la souris induit une mort embryonnaire précoce. Initialement, les embryons portant la mutation homozygote (*Smn*<sup>-/-</sup>) ne sont pas distinguables des embryons portant la mutation hétérozygote (*Smn*<sup>+/-</sup>) ou non-muté (*Smn*<sup>+/+</sup>). Puis, en seulement 80 heures, ces embryons montrent des signes de développement aberrant. Bien que la plupart des embryons *Smn*<sup>-/-</sup> arrivent au stade morula, la forme sphérique générale est perdue et les embryons

apparaissent ratatinés. Contrairement aux embryons contrôles, aucun embryon Smn<sup>-/-</sup> ne forme de blastocœle. Ceci indique qu'il existe une source de protéine SMN d'origine maternelle qui est utilisée durant les premiers stades du développement embryonnaire. Par la suite, cette source s'épuise durant les premiers cycles de division et l'embryon fini par dégénérer. En parallèle, il a été constaté que les souris Smn<sup>+/-</sup>, ayant donc une réduction de 50% du dosage de SMN, se développent correctement et ne présentent pas de dégénérescence motoneuronale (107).

### **II-9-2- Le poisson zèbre**

Le poisson-zèbre est un excellent organisme pour l'étude des maladies humaines. Il constitue le pont entre le matériel génétique de type ver/drosophile et celles de type souris/humain (108). Son développement embryonnaire est bien caractérisé et il est possible de moduler les expressions géniques. La réduction des niveaux de SMN (-75%) avec des oligomorpholinos antisens dans tout l'embryon, déclenche des défauts dans les axones des motoneurones. En effet, leur croissance ainsi que leur guidage vers le muscle est perturbé, ce qui induit, par la suite, une perte des motoneurones(108).

### **II-10- Stratégies thérapeutiques**

L'Amyotrophie Spinale (SMA) est une maladie neuromusculaire génétique progressive qui se manifeste le plus souvent dans la petite enfance. S'il n'existe pas de traitement curatif à l'heure actuelle, plusieurs stratégies thérapeutiques prometteuses sont en cours de développement pour cette pathologie et les premiers résultats d'essais thérapeutiques ont été publiés récemment. Plusieurs grandes firmes pharmaceutiques ont investi des moyens importants dans ces essais.

Bien qu'une prise en charge optimale permette d'améliorer considérablement la qualité et l'espérance de vie de ces patients, la SMA reste incurable à l'heure actuelle. Une des approches thérapeutiques les plus prometteuse vise à modifier l'épissage de l'ARN messager du gène SMN2, ceci afin qu'il intègre à nouveau l'exon 7 manquant et produise une protéine complète. Il ne s'agit pas là de parler de thérapie génique, mais plutôt de «chirurgie de l'ARN». Après plusieurs essais concluant sur le modèle murin, les résultats d'un essai de phase I chez l'être humain viennent d'être communiqués. Une dose intrathécale unique à posologie variable (1 à 9 mg) a été administrée à 28 patients âgés de 2 à 14 ans atteints d'une SMA de type II ou III. Ces injections ont

été bien tolérées à toutes les posologies et une amélioration de la fonction motrice a pu être observée dans le groupe recevant la posologie la plus importante (109).

Des essais de phase Ib/IIa et de phase II sont actuellement en cours et une étude d'efficacité de phase III est prévue pour 2014.

Une des stratégies thérapeutiques dans les amyotrophies spinales consiste à augmenter l'expression du gène SMN2 pour augmenter en conséquence la quantité de la protéine SMN à l'aide de nombreux agents pharmacologiques, mais aucun d'entre eux n'a démontré d'efficacité dans des essais randomisés contrôlés (créatine, phénylbutyrate, gabapentine, hormone thyroïdienne, hydroxyurée, valproate/acétyl-L-carnitine, salbutamol). Plusieurs essais thérapeutiques sont toutefois encore en essai (110, 111,112).

Ainsi, les résultats d'un essai de phase III sur l'olesoxime, un agent neuroprotecteur, sont attendus pour 2014.

Des avancées importantes ont également été effectuées dans la thérapie génique qui vise à remplacer à l'aide d'un vecteur viral du type AAV, le gène SMN1 défectueux par un gène thérapeutique. Après la validation de ce procédé sur le modèle murin, le début d'un essai de phase I vient d'être annoncé pour début 2014 par le Nationwide Children's Hospital de Columbus (USA). Cet essai évaluera la sécurité et la tolérance de l'administration en intraveineux de différentes doses d'un virus AAV transportant le gène SMN1 chez des enfants atteints d'une SMA de type I (107).

# Partie PRATIQUE

I-Patients et méthodes :

L'étude que nous avons entreprise est du type descriptive et prospective ayant comme principale visée la recherche de la délétion de l'exon 7 du gène SMN1. Elle a été réalisée au laboratoire de biologie et de génétique moléculaire de la faculté de médecine université Salah Bounider de Constantine et au laboratoire de biochimie et au service de neurologie du CHU de Constantine durant la période février-Juin 2017.

## **I-1-Patients :**

### **I-1-1-Description de la population d'étude :**

Notre étude a porté sur 25 malades appartenant à 17 familles de l'Est algérien. L'âge moyen de notre échantillonnage est  $13,56 \pm 11$  ans.

Ont été inclus dans cette étude tous les patients ayant répondu aux critères établis par le Consortium International des SMA (5) et selon Zerres et al. (113) Tous nos patients ont été diagnostiqués et suivis par des neurologues.

### **Critères d'inclusion :**

Etaient inclus dans l'étude les patients qui avaient présentés :

- une faiblesse musculaire des membres et du tronc, symétrique proximale que distale prédominant aux membres Inférieurs.
- une amyotrophie bilatérale des muscles proximaux.
- une hypotonie généralisée surtout dans le (type I).
- des fasciculations dans les groupes musculaires atteints et parfois de la langue + ROT abolis ou faibles.
- un EMG en faveur d'une atteinte de la CA ou mixte
- des CPK normales ou modérément élevées

### **Critères d'exclusion :**

Etaient exclus de l'étude les patients qui avaient :

- une atteinte pyramidale.
- des troubles de la sensibilité superficielle et profonde.
- une paralysie des muscles oculomoteurs et de la face.
- des enzymes musculaires dépassant 10 fois la normale.
- une diminution des VCN (voies de conduction nerveuses) l'EMG.

Deux types de malades ont été distingués :

Les cas familiaux : Lorsque nous sommes en présence d'un contexte familial de SMA.

Les cas sporadiques : Lorsque l'enquête familiale ne retrouve qu'un seul cas de SMA.

L'ensemble des échantillons de tous ces patients a bénéficié d'une analyse moléculaire de l'exon 7 du gène SMN.

Nous avons procédé :

au prélèvement des patients ayant présenté un phénotype SMA.

À l'établissement d'un arbre généalogique le plus complet possible pour chaque famille des patients ayant présenté une SMA.

Le consentement éclairé du patient (Annexe IV) a été obtenu de tous les adultes ou de leurs tuteurs quand l'âge du patient est inférieur à 18 ans.

#### **Le questionnaire :**

Le recueil systématique des informations cliniques et biologiques a été réalisé grâce à un questionnaire approprié (Annexe V) comportant :

L'état civil, les circonstances de découverte de la SMA, les antécédents du malade et de sa famille, l'âge de début, les signes de début, les résultats de l'examen neurologique, biologique (CPK, LDH), électromyographique (EMG : Corne antérieure).

Les phénotypes cliniques des patients : SMA de type I, SMA de type II, SMA de type III, basé sur l'âge de début, la gravité de la maladie, et la capacité fonctionnelle.

### **I-1-2-Les prélèvements biologiques**

En plus de l'étude génétique, un certain nombre d'investigations complémentaires a été réalisé tel que :

-le dosage des CPK et LDH pour tous les patients.

#### **Mode de prélèvement :**

Les prélèvements de sang total pour l'étude génétique et le dosage des CPK et LDH sérique ont été réalisés au niveau du pli du coude après pose d'un garrot.

Nous avons recueilli pour chaque patient :

- Un prélèvement sur tube contenant de l'héparinate de lithium (5 cc) pour le dosage des CPK et LDH.
- Un prélèvement sur deux tubes stériles de 5 ml contenant de l'EDTA comme anticoagulant, qui de plus est un inhibiteur des nucléase, pour l'analyse moléculaire.

#### **Conservation :**

L'extraction d'ADN a été réalisée sur du sang frais. Dans certains cas d'impossibilité technique, l'extraction a été différée puis réalisée sur du sang stocké 1 à 2 jour à 25°C ou pendant 7 jours à + 4°C. Nous n'avons pas été contraints à congeler nos échantillons.

Le prélèvement sanguin destiné au dosage des CPK et LDH a été analysé le jour même du prélèvement.

### **I-2-Méthodes :**

#### **I-2-1-Etude paraclinique**

##### **I-2-1-1-Dosage des CPK et LDH**

-Nous avons dosé chez tous les patients les enzymes musculaires (CPK et LDH) par une technique colorimétrique enzymatique (Annexe VI).



-Les valeurs normales sont comprises entre 25 et 170 UI/l

### **I-2-1-2-Etude électromyographique :**

Cette étude permet d'évaluer l'origine de l'atteinte pour chaque malade : neurogène ou myogène. Le patient présente une SMA si le tracé soit neurogène.

### **I-2-1-3-L'analyse moléculaire :**

#### **I-2-1-3-1-Extraction d'ADN :**

Dans la plupart des études, les leucocytes sanguins représentent la source majeure d'ADN. Les autres sources cellulaires peuvent être des biopsies (biopsie de villosités chorales...).

L'extraction de l'ADN consiste en l'isolation de l'ADN pur des leucocytes sanguins de chaque individu. Il existe plusieurs méthodes d'extraction et de purification de l'ADN utilisant :

Au cours de cette étude, nous avons utilisé la méthode d'extraction d'ADN au NaCl selon Millet et al (114).

#### **I-2-1-3-1-1-Méthode d'extraction au NaCl :**

Les étapes d'extraction de l'ADN leucocytaire se résument en cinq étapes :

- lyse des globules rouges du sang et préparation du culot leucocytaire
- lyse des leucocytes, digestion du complexe nucléoprotéique et libération de l'ADN,
- extraction et purification de l'ADN,
- précipitation de l'ADN,
- solubilisation de l'ADN purifié.

Le protocole détaillé est fourni en (Annexe VII)

Détermination de la pureté et de la concentration de l'ADN :

La concentration de l'ADN est estimée par spectrophotométrie à 260 nm ; celle-ci peut être faussée en cas de contamination de l'ADN par les protéines et l'éthanol restants. Une mesure de la densité optique (DO) ou de l'absorbance de l'ADN à 260 nm et à 280 nm est effectuée, car les protéines absorbent à 280 nm, le phénol à 270 nm et les bases puriques et pyrimidiques fortement dans l'ultraviolet à 260 nm.

La pureté de l'ADN extrait est déterminée en calculant le rapport  $R = DO\ 260\text{ nm} / DO\ 280\text{ nm}$ .

Si ce rapport :

- $1,6 < R < 2$  : l'ADN est pur,
- $R < 1,6$  : l'ADN est contaminé par les protéines,
- $R > 2$  : l'ADN est contaminé par des ARN.

La pureté de l'ADN est essentielle pour une action efficace des enzymes de restriction utilisées par la suite. Dans le cas où l'ADN est contaminé, on n'aboutira pas à des résultats fiables dans les étapes suivantes de son analyse par PCR. Il est donc indispensable de procéder à la réextraction de la pelote afin d'obtenir la pureté souhaitée.

N.B : les ADN purs sont conservés à + 4 ° C jusqu'à leur utilisation.

Après avoir mesuré l'absorbance de l'ADN à 260nm des solutions diluées au 1/100 ou 1/50, la concentration de l'ADN extrait ([ADN]) est déterminée par la formule suivante :

$$[\text{ADN}] \text{ } \mu\text{g/ ml} = \text{DO } 260 \times 50 \times \text{facteur de dilution}$$

N.B : sachant que 1 unité de DO = 50 mg/ml d'ADN double brin.

**I-2-1-3-1-2-La détection de la délétion de l'exon 7 du gène SMN:**

Elle consiste à amplifier une partie de l'ADN contenant le gène SMN, puis de digérer le produit de PCR par l'enzyme de restriction spécifique DraI selon l'algorithme de travail suivant (7) :

- PCR d'une partie du gène SMN1 et contrôle de PCR sur gel d'agarose,
- digestion du produit de PCR par l'enzyme de restriction DraI,
- séparation des produits de digestion par migration électrophorétique sur gel d'agarose,
- Visualisation des produits de digestion par transillumination sous UV.

### La PCR :

La technique PCR permet l'amplification exponentielle ( $2^n$ ) ( $n$ = le nombre de cycles) d'une partie du gène d'intérêt en utilisant un mélange réactionnel (mix) contenant tous les réactifs nécessaires. L'ensemble est soumis à une série de cycles de température afin d'obtenir une quantité suffisante de la séquence d'ADN désirée.

Préparation du milieu réactionnel (Mix) de PCR :

Pour préparer le milieu réactionnel, multiplier la quantité de chaque composant par le nombre de tube voulu +1.

Un tube témoin négatif est réalisé dans lequel on met uniquement le mélange réactionnel sans ADN.

Tableau 2 : les composants du milieu réactionnel pour la PCR

Mix de PCR	Quantité en $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	37,7 $\mu$ l
dNTP	2,5 $\mu$ l
Tampon 10 x	5 $\mu$ l
Mgcl <sub>2</sub>	2,5 $\mu$ l
16 SMN	1 $\mu$ l

X Dra	1 $\mu$ l
Taq	0.3 $\mu$ l

(Mix) 49  $\mu$ l + 1  $\mu$ l (ADN)

### Déroulement des cycles de la PCR :

Chaque cycle de la PCR repose sur trois étapes indispensables : Dénaturation, hybridation et élongation.

Dénaturation à 94°C (7 min).

Hybridation à 56°C (2 min).

{Elongation à 72°C (3 min), Dénaturation à 92°C (1 min), Hybridation à 56°C (2 min)} 35 cycles

Extension finale à 72°C (10 min).

Contrôle des produits de la PCR :

Le contrôle de la taille des fragments amplifiés a été effectué par une électrophorèse sur un gel d'agarose à 1.5% additionné de 10  $\mu$ l de BET et coulé sur plaque de la cuve horizontale.

Dans chaque puits du gel, il est déposé :

-15  $\mu$ l de produit d'amplification + 2  $\mu$ l BBP

-3  $\mu$ l de marqueur de taille (PM 100pb) + 10  $\mu$ l H<sub>2</sub>O + 2  $\mu$ l BBP

Les dépôts se font du côté cathodique (-). Le système est soumis à une migration sous un courant de 90 à 120 volts pendant 1h.

Cette analyse permet de vérifier la taille du fragment d'ADN à l'aide d'un marqueur de taille moléculaire et d'observer si une contamination de l'ADN est survenue au cours de la PCR.

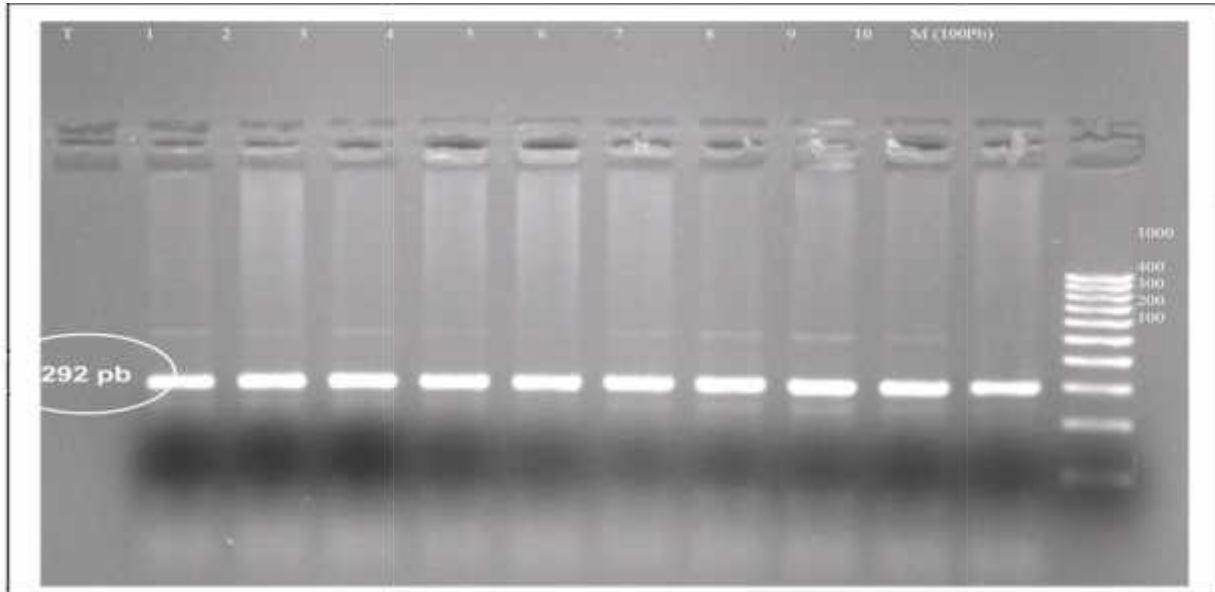


Figure 16 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose 1.5% des fragments amplifiés par PCR de l'exon 7 du gène SMN

#### **Digestion des produits de PCR :**

Préparer le milieu de digestion de l'enzyme *Dra 1* pour le nombre de tube voulu + 1 (Annexe VIII).

Digestion par l'enzyme de restriction *Dra 1* :

*Dra1* est une enzyme de restriction produite par *Deinococcus radiophilus*, elle reconnaît et clive la séquence :

5'...TTT ↓ AAA...3'

3'...AAA ↓ TTT...3'

#### **Condition de migration :**

Préparation d'un gel d'agarose 3% (Annexe IX) :

Après préparation du gel d'agarose dans un bécher.

- Mettre le BET et couler immédiatement le gel dans la plaque de verre (risque de polymérisation dans le bécher).

- Placer le peigne plat afin de former les puits et laisser polymériser à température ambiante pendant 30 min à une heure.

**\*Dépôt des échantillons :**

Quand le gel est polymérisé, plonger le dans la cuve horizontale contenant un volume du tampon Tris Borate EDTA (TBE 1X) :

-Oter le peigne.

-Mélange l'échantillon avec le bleu de Bromophénol qui va migrer très rapidement avant les fragments de l'ADN.

**\*Migration :**

- Mettre sous tension le générateur à un voltage élevé soit 50 volts durant 60 mn puis pendant 1h 30 min à 2h à 150 volts.

La migration est terminée, quand le bleu atteint la limite du gel

**\*Révélation du profil électrophorétique :**

Le BET fluorescent aux UV se fixe sur l'ADN (s'intercale entre les bases de la molécule d'ADN) et va permettre de visualiser les fragments de restriction dans le gel placé sur la table à UV.

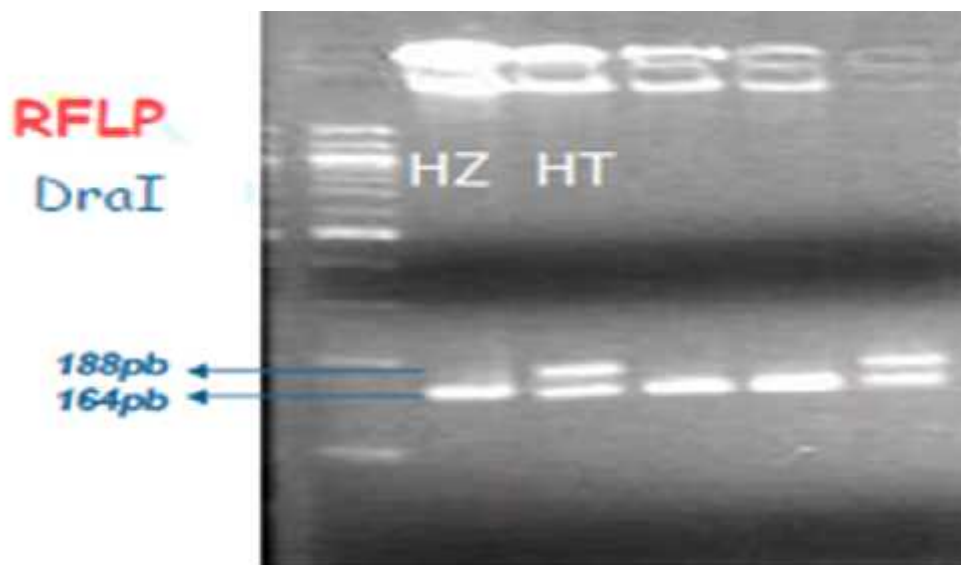


Figure 17 : Contrôle de la PCR sur gel d'agarose à 3 %

## II-Résultats :

Nos résultats sont les suivants :

Nous avons recruté 25 patients présentant le phénotype SMA appartenant à 17 familles, tous de l'Est Algérien colligés du service de neurologie du CHU Constantine.

### II-1-Répartition des patients selon le sexe :

Nos patients ont été répartis en 17 garçons et 8 filles avec une prédominance masculine et un sexe ratio de deux garçons pour une fille atteinte 0,47.

Tableau 3 : Répartition des patients selon le sexe

Total des patients	Nombre de filles	Nombre de garçons
25	8 (32%)	17 (68%)

### II-2-Répartition des patients selon l'âge :

L'âge moyen de nos patients est de  $13.56 \pm 11$  ans.

### II-3-Répartition des patients selon l'âge de début

Répartition selon l'âge de début : Age moyen de début : 48 mois (4 ans)

Tableau 4 : Répartition des patients selon l'âge de début

Age (mois)	0-6	7-18	18-168
Nombre de patients	2	5	18
%	8%	20%	72%

Huit pourcent de nos patients ont présenté un âge de début entre 0 et 6 ans, 20% entre 7 et 18 mois et 72% entre 18 et 168 mois.

#### **II-4-Répartition des patients selon les antécédents**

##### **II-4-1- La consanguinité :**

Tableau 5 : Répartition des patients selon la consanguinité

Nombre total de patients	Nombre de patients consanguins	Non consanguins
25 (100%)	11 (44%)	14 (66%)

11 cas soit 44% de nos patients sont issus de mariages consanguins.

##### **II-4-2-Répartition des patients selon le type sporadique ou familial et Cas similaires dans la famille :**

Tableau 6 : Répartition des patients selon le type sporadique ou familial

Patients	Cas familiaux	Cas sporadiques
25(100%)	53%	47%

53% de nos patients sont des cas familiaux et 47% des cas sporadiques.



## II-5-Répartition des patients selon les signes de début

Tableau 7 : Répartition des patients selon les signes de début

Hypotonie	Faiblesse musculaire	Amyotrophie	Atteinte des nerfs crâniens	Troubles respiratoires
2	17	0	1	0
11%	94%	0%	5%	0%

## II-6-Répartition des malades selon la forme clinique :

Selon la classification classique du consortium international et selon Zerres et al. (5 ,109) , nos 25 patients étaient répartis comme suit :

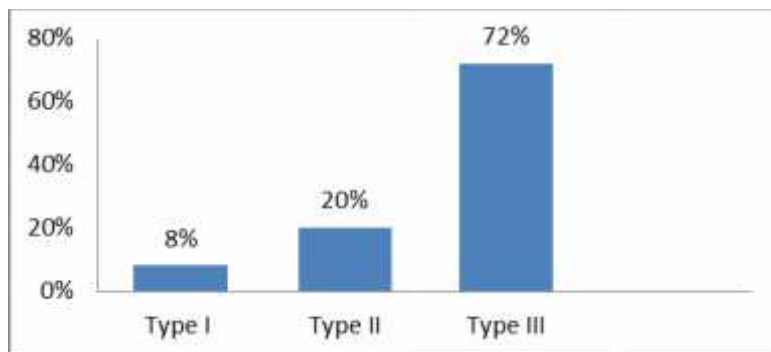
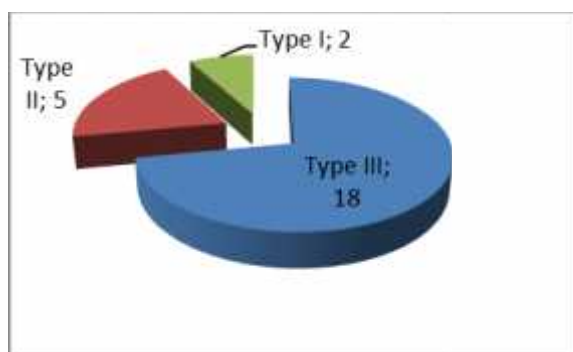


Figure 17 et 18: Répartition des patients selon le phénotype clinique

Dans le groupe de SMA III : le nombre de patients est de 18 (72%), ce nombre est plus élevé par rapport au nombre des patients type I et II.

## II-7-Taux plasmatiques de CPK et LDH chez les patients :

**Tableau 8 : Taux plasmatiques de CPK et LDH chez les patients :**

CDK-LDH	Elevées	Normales
Patients	28%	72%

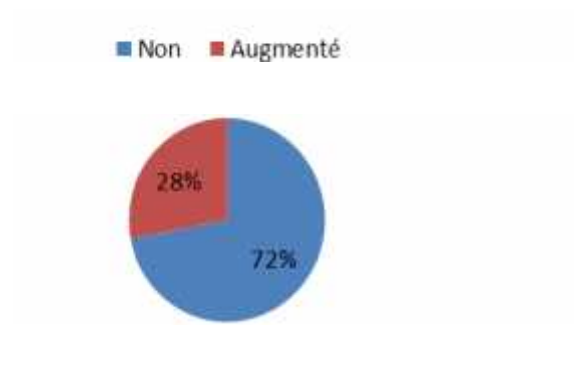


Figure 19 : Taux plasmatiques de CPK et LDH chez les patients

## II-8- Etude électro myologique chez les patients :

L'analyse de l'électromyographie chez les patients montre une atteinte neurogène périphérique de type corne antérieure chez tous les patients.

## II-9-Répartition des patients selon l'analyse génétique :

Soixante-douze pourcents de nos patients (72%) ont présenté une délétion de l'exon 7 du gène SMN1 ou SMNt.

Tableau 9 : Répartition des différents types de SM selon l'analyse génétique

Type de SMA	Délétion de l'exon 7
SMA I	2/2 (100%)
SMA II	2/5 (40%)
SMA III	14/18 (78%)
Total	18/25 (72%)

### **III-Discussion :**

#### **Caractéristiques démographiques de l'ensemble des patients :**

Notre étude a porté sur 25 patients de phénotype SMA issus de 17 familles dont 32% sont de Sexe féminin et 68 % de sexe masculin avec un sex ratio de 0,47. Ce résultat concorde avec celui de nombreuses données de la littérature (115,113,19). Ceci pourrait être expliqué par : a présence d'un facteur par exemple hormonale qui permet d'épargner le sexe féminin (19).

L'Age moyen de nos patients est :  $13,56 \pm 11$ ans.

Nos patients sont dans 53% des cas familiaux et dans 47% des cas sporadiques et issus de mariages consanguins dans 44% des cas. Selon la fondation nationale pour le développement de la recherche (FOREM) (116). Le taux de consanguinité en Algérie est de 38,80 %. Ces chiffres confirment bien le caractère héréditaire de la maladie. La consanguinité, facteur de risque de toutes les maladies à transmission autosomique récessive et qui est plus fréquente dans les pays arabes.

De ces données se dégage : le rôle important de la consanguinité dans la genèse des maladies neurogénétiques de transmission AR dont le taux ne cesse d'augmenter dans notre pays. Et la nécessité de la mise en place de mesures préventives adéquates, tels que le conseil et le DPN.

#### **Caractéristiques cliniques de l'ensemble des patients :**

Nous avons étudié les caractéristiques cliniques des 25 patients SMA.

L'histoire naturelle de nos patients ainsi que leurs tableaux cliniques sont classiques.

La classification clinique des patients en 04 types selon consortium international et selon Zerres et al ZERRES K., RUDNIK-SCHÖNEBORN S (5, 9, 113, 117) était possible chez la majorité de nos patients.

De nombreuses études ont montré que l'amyotrophie spinale de type I seraient plus fréquente, pouvant atteindre un taux de 50%. Nous avons noté dans notre étude un nombre sous-estimé de SMA de type I en raison de leur mortalité précoce. Une large majorité des SMA de type III en raison probablement de leur recrutement précoce et facile dans les services de neurologie. Les patients de type II, moins nombreux du fait probablement du retard de diagnostic constaté dans ce groupe très

hétérogène sur le plan clinique. Nous n'avons pas trouvé de SMA de type IV dans notre recrutement de patients ce qui corrobore avec certaines données de la littérature (118,19).

### **Les caractéristiques paracliniques de l'ensemble des patients :**

L'EMG et le dosage des enzymes musculaires jouent un rôle déterminant dans le diagnostic positif des SMA.

Dans notre étude l'EMG est revenu dans tous les cas, neurogène de type corne antérieure. En faveur d'une SMA.

Les CPK-LDH étaient élevées chez 28% des patients seulement. En effet les enzymes musculaires sont normales dans les SMA de type I ce qui correspond aux données de Dubowitz (119).

Alors qu'elles sont modérément élevées chez 2 patients de type II et chez 5 patients de type III. Ceci pourrait s'expliquer par l'atteinte musculaire secondaire (119).

### **L'Analyse génétique :**

L'étude génétique seule critère de certitude diagnostic des SMA, nous a permis de poser le diagnostic. Elle nous a évité le recours à des investigations moins spécifiques et plus agressives telle que la biopsie musculaire.

L'étude génétique a été réalisée chez 25 patients et a confirmé le diagnostic de SMA chez 18 patients soit 72% en identifiant une délétion de l'exon 7 du gène SMN1

Ce résultat se rapproche de celui retrouvé par le Y Sifi et al Constantine 2009 (18), de ceux du Brésil (120), de l'Inde (121), et de la Turquie (122).

Tableau 10 : de la distribution mondiale des SMA (18)

Auteurs	Pays	N patients	Dél SMN(%)
R.M. Shawky	Egypte 2001	33	55 %
<b>Y.Sifi</b>	<b>Algérie</b>	<b>92</b>	<b>75,43 %</b>
Saad Al Rajeh	Arabie Saoudite 1997	16	82 %
A.Bouhouche	Maroc 2003	54	83,33 %
Ridha M'rad	Tunisie 2006	60	95 %
M.Z. Haider	Koweït 2001	46	97,82 %
Auteurs	Pays	N patients	Délétions SMN(%)
Kyounam	Corée 2000	37	32,43 %
Nguyen Duc Bachi	Vietnam 2003	17	41,17%
R. Labrum	Johannesburg 2007	92	51 %
A. S. Glotov	Russie 2001	57	65 %
C.A. KimI	Brésil 1999	87	69 %
<b>Notre étude</b>	<b>Algérie</b>	<b>25</b>	<b>72 %</b>
Akaunchha Kesari	Inde 2005	45	76 %
Sevtap Savas	Turquie 2000	60	85 %
Wirth	Allemagne 1995	195	90 %
Bussaglia	Espagne 1995	54	91 %
Cobben	Hollande 1995	103	93 %
Tomoko Akutsu	Japan 2002	32	94 %
Yousef Shafeghati	Iran 2004	22	95,4 %
Rodrigues 1995	Angleterre 1995	140	97,8 %
Lefebvre	France 1995	229	98 %

Cette approche simple nous a permis d'identifier tous les porteurs de la mutation la plus fréquente représentée par la délétion de l'exon 7 du gène SMN1 ou SMNt.

Dans 28% des cas nous n'avons pas retrouvé de délétion de l'exon 7 du gène SMN1. Dans ce cas, il faudrait rechercher les délétions des exons 8 et 6 du gène SMN1 ou les mutations ponctuelles de SMN1 ou penser à une hétérogénéité génétique Capon F (123) et qu'un autre gène serait responsable du phénotype SMA et qu'il serait plus fréquent dans la population Algérienne.

#### **Corrélations phénotype/génotype :**

Nous n'avons pas trouvé de corrélation entre le phénotype et le génotype. La délétion de l'exon 7 du gène SMN1 a été retrouvée dans tous les types de SMA particulièrement chez 100% des patients

SMA de type I, 40% des patients SMA de type II et 78% des SMA de type III ce qui est en accord avec de nombreuses études (15, 16,124).

La seule atteinte du gène SMN1 ne peut expliquer la grande hétérogénéité clinique des amyotrophies spinales proximales d'autant que certains patients parviennent à l'âge adulte malgré l'absence totale de ce gène.

La protéine SMN, produit du gène SMN1 est d'expression ubiquitaire. Son rôle exact n'est pas encore connu. Son niveau d'expression est étroitement corrélé au phénotype morbide, les formes sévères allant de pair avec de très faibles quantités de protéine SMN intracellulaire. Les mécanismes moléculaires intimes qui déterminent son mode d'action et son rôle exact ne sont pas entièrement élucidés.

En effet, la fréquence de délétions dans le gène NAIP est large et varie de 0 à 67 % dans les différentes populations d'études (94), Une corrélation probable entre l'étendue des délétions emportant les gènes SMN et NAIP et la sévérité du phénotype dans les SMA de type I (98).

Cependant l'analyse quantitative du nombre de copies SMNc montre que les délétions étendues emportant les gènes SMNt et NAIP étaient dans tous les cas associées à un nombre réduit de copies SMNc.

Alors que la conservation du gène NAIP dans les SMA de type II et III était associée à un nombre de copies SMNc élevé par conversion génique de SMNt en SMNc (125).

Les délétions du gène SMNt emportant SMNc et parfois NAIP seraient ainsi associées à un phénotype plus sévère en comparaison avec les conversions géniques observées surtout dans les SMA de type III (126).

## **Conclusion et perspectives**

L'analyse moléculaire de l'exon 7 du gène SMN1 a permis de confirmer le diagnostic de SMA dans 72 % des cas.

L'analyse de ce gène constitue un test diagnostique fiable permettant d'éliminer d'autres pathologies génétiques pouvant donner un phénotype analogue ou très semblable des SMA et permettrait dans un proche avenir un conseil génétique et un diagnostic prénatal.

De plus la méthode PCR-RFLP permet de confirmer le diagnostic clinique des SMA évitant ainsi des méthodes invasives comme l'électromyogramme et la biopsie musculaire. Toutefois, cette méthode actuellement utilisée pour le diagnostic moléculaire des SMA est d'une contribution limitée à la détermination du pronostic individuel et à l'étude des corrélations phénotype /génotype.

Une analyse du nombre de copies de SMNc ou SMN2 et la recherche de la délétion de l'exon 8 du gène SMN1 est en cours de réalisation dans le laboratoire de biologie et de génétique moléculaire de la faculté de médecine de l'université de Constantine 3 en cours de redémarrage.



## Références

1. Mc Andrew, E, Parsons D W, Simard L R., Rochette C, Ray PN, Mendell JR et al. Identification of proximal spinal muscular atrophy carriers and patients by analysis of SMNT and SMNC gene copy number. *Am.J.Hum. Genet.* 60:1411–1422, 1997.
2. Hendrickson B C, Donohoe C, Akmaev V R, Sugarman E A, Labrousse P, Boguslavskiy L et al.. Differences in SMN1 allele frequencies among ethnic groups within North America. *J.Med.Genet.* 46: 641–644, 2009.
3. Crawford T O and Pardo C.A. The neurobiology of childhood spinal muscular atrophy. *Neurobiol.Dis.* 3: 97–110, 1996.
4. Kolb SJ, Kissel JT . Spinal Muscular Atrophy. *Neurol Clin Nov.*33(4) :831-46, 2015.
5. Munsat TL, Davies KE. International SMA consortium meeting. (26-28) June, Bonn, Germany. *Neuromuscul Disord.* 2(5-6): 423-428, 1992.
6. Russman B S. Spinal muscular atrophy: clinical classification and disease heterogeneity. *J.ChildNeurol.* 22: 946–951, 2007.
7. Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Violette L et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy- determining gene. *Cell.* 80:155–165, 1995.
8. Burghes A H M. and Beattie C.E. Spinal muscular atrophy : why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick? *Nat.Rev. Neurosci.* 10,597–609, 2009.
9. Munsat TL. Workshop report international SMA collaboration. *Neuromusc Disord*; 1: 81, 1991.
10. Roberts DF, Chavez J, Court SDM. The genetic component in child mortality. *Arch Dis Child* ; 45 : 33-8, 1970.
11. Pearn J. Classification of spinal muscular atrophies. *Lancet* 1: 919-22, 1980.
12. Werdnig G. Two early infantile hereditary cases of progressive muscular atrophy simulating dystrophy, but on a neural basis, *Arch psychiatr.* 22:437-481, 1891.
13. Beevor C. A case of congenital spinal muscular atrophy (family type) and a case of hemorrhage into the spinal cord at birth giving similar symptoms, *Brain.* 25:85108, 1902.

14. Pearn J, Bundley S, Carter CO, Wilson J, Gardner-Medwin D, Walton JN .A genetic study of subacute and chronic spinal muscular atrophy in childhood. A nosological analysis of 124 index patients. *J Neurol Sci* 37:227-248,1978.
15. TC Gilliam, L. M. Brzustowicz, L. H. Castilla et al., "Genetic and chronic forms of spinal muscular atrophy," *Nature*, vol. 345, no. 6278, pp. 823–825, 1990
16. Melki J, Abdelhak S, Sheth P, Bachelot M, Burlet P, Marcadet A, Aicardi J, Barois A, Carriere J, Fardeau M .Gene for chronic proximal spinal muscular atrophies maps to chromosome 5q. *Nature* 344:767-768,1990.
17. Davies KE, Thomas NH, Daniels RJ, Dubowitz V. Molecular studies of spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord* 1:83-85,1991.
18. Y. Sifi, K. Sifi, A. Boulefkhad, N. Abadi, Z. Bouderd, R. Cheriet, M. Magen, J. P. Bonnefont, A. Munnich, C. Benlatreche, and A. Hamri. Clinical and Genetic Study of Algerian Patients with Spinal Muscular Atrophy .*Journal of Neurodegenerative Diseases*. Volume 2013 Article ID 903875, 7 pages doi: 10.1155/2013/903875. Epub 2013 Mar 24.
19. S. Rudnik-Scho"neborn, D. Rohrig, G. Morgan, B. Wirth, and K. Zerres, "Autosomal recessive proximal spinal muscular atrophy in 101 sibs out of 48 families: clinical picture, influence of gender, plications," *American Journal of Medical Genetics*,. 51, no. 1, pp. 70–76, 1994.)
20. HAUSMANOWA-PETRUSEWICZ I, ZAREMBA J, BORKOWSKA J. Chronic form of childhood spinal muscular atrophy. Are the problems of its genetics really solved ?. *J. Neurol. Sci.* 43(2) : 317-327,1979.
21. FEINGOLD J, ARTHUIS M, CELERS J.Génétique de l'amyotrophie spinale infantile : existence de deux formes autosomiques récessives. *Ann. Genet.*20(1) : 19-23,1977.
22. Bach J.R, Vega J, Majors j. Et Friedman A. Spinal muscular atrophy type I quality of life .*Am J Phys Med Rehabil* 82 : 137-42,2003.
23. Jerusalem F. Maladies neuromusculaires, clinique, thérapeutique, pathologie .*Medsis (Médecine et Sciences Internationales)*, Paris, 350p, 1981.

- 24- Brzustowicz L.M, Lehner T, Castilla L.H, Penchazadeh G.K, Wilhlemssen K.C, Daniels R. Genetic mapping of chronic childhood – onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q 11.2-13.3. *Nature*, 344 :540-541, 1990.
- 25- Francis MJ, Morrison KE, Campbell L, Grewal PK, Christodoulou Z, Daniels RJ, Monaco AP, Frischauf AM, McPherson J, Wasmuth J, et al. A contig of non-chimaeric YACs containing the spinal muscular atrophy gene in 5q13. *Hum Mol Genet* 2:1161-1167,1993.
- 26- Kleyn PW, Wang CH, Lien LL, Vitale E, Pan J, Ross BM, Grunn A, Palmer DA, Warburton D, Brzustowicz LM, et al. Construction of a yeast artificial chromosome contig spanning the spinal muscular atrophy disease gene region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:6801-6805,1993.
- 27- Melki J, Lefebvre S, Burglen L, Burlet P, Clermont O, Millasseau P, Reboullet S, Benichou B, Zeviani M, Le Paslier D, et al. De novo and inherited deletions of the 5q13 region in spinal muscular atrophies. *Science* 264:1474-1477,1994.
28. Bürglen L, Seroz T, Miniou P, Lefebvre S, Burlet P, Munnich A et al .The gene encoding p44, a subunit of the transcription factor TFIIF, is involved in large-scale deletions associated with Werdnig-Hoffmann disease. *Am.J.Hum.Genet.* 60, 72–79, 1997.
29. Paushkin S, Gubitza AK, Massenet S, Dreyfuss G. The SMN complex, an assembly of ribonucleoproteins. *Curr Opin Cell Biol* .14(3): 305-312, 2002.
- 30- Burglen L, Lefebvre S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Cruaud C, Munnich A, Melki J. Structure and organization of the human survival motor neurone (SMN) gene. *Genomics* 32:479-482 , 1996.
- 31- Chen Q, Baird SD, Mahadevan M, Besner-Johnston A, Farahani R, Xuan J, Kang X, Lefebvre C, Ikeda JE, Korneluk RG, MacKenzie AE .Sequence of a 131-kb region of 5q13.1 containing the spinal muscular atrophy candidate genes SMN and NAIP. *Genomics* 48:121127,1998.
32. Wirth B, Brichta L, Schrank B, Lochmüller H, Blick S, Baasner A et al. Mildly affected patients with spinal muscular atrophy are partially protected by an increased SMN2 copy number. *Hum.Genet.* 119: 422–428, 2006
- 33- Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, Wirth B. A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6307-6311,1999.

- 34- Jodelka FM, Ebert AD, Duelli DM, Hastings ML. A feedback loop regulates splicing of the spinal muscular atrophy-modifying gene, SMN2. *Hum Mol Genet* 19:4906-4917,2010.
- 35- Kashima T, Manley JL .A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nat Genet* 34:460-463,2003.
- 36- Kashima T, Rao N, Manley JL. An intronic element contributes to splicing repression in spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:3426-3431,2007.
- 37- Doktor TK, Schroeder LD, Vested A, Palmfeldt J, Andersen HS, Gregersen N, Andresen BS. SMN2 exon 7 splicing is inhibited by binding of hnRNP A1 to a common ESS motif that spans the 3' splice site. *Hum Mutat* 32:220-230,2011.
- 38- Lorson CL, Androphy EJ. An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA determining gene SMN. *Hum Mol Genet* 9:259-265,2000.
- 39- Cartegni L, Krainer AR. Disruption of an SF2/ASFdependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nat Genet* 30:377-384 ,2002.
- 40- Cartegni L, Hastings ML, Calarco JA, de Stanchina E, Krainer AR. Déterminants of exon 7 splicing in the spinal muscular atrophy genes, SMN1 and SMN2. *Am J Hum Genet* 78:63-77,2006.
- 41- Echaniz-Laguna A, Miniou P, Bartholdi D, Melki J .The promoters of the survival motor neuron gene (SMN) and its copy (SMNc) share common regulatory elements. *Am J Hum Genet* 64:1365-1370,1999.
- 42- Monani UR, McPherson JD, Burghes AH.Promoter analysis of the human centromeric and telomeric survival motor neuron genes (SMNC and SMNT). *Biochim Biophys Acta* 1445:330-336,1999.
- 43- Rouget R, Vigneault F, Codio C, Rochette C, Paradis I, Drouin R, Simard LR. Characterization of the survival motor neuron (SMN) promoter provides evidence for complex combinatorial regulation in undifferentiated and differentiated P19 cells. *Biochem J* 385:433-443,2005.
- 44- Baron-Delage S, Abadie A, Echaniz-Laguna A, Melki J, Beretta L. Interferons and IRF-1 induce expression of the survival motor neuron (SMN) genes. *Mol Med* 6:957-968,2000.

- 45- Majumder S, Varadharaj S, Ghoshal K, Monani U, Burghes AH, Jacob ST. Identification of a novel cyclic AMP response element (CRE-II) and the role of CREB-1 in the cAMP-induced expression of the survival motor neuron (SMN) gene. *J Biol Chem* 279:14803-14811,2004.
- 46- Miyajima H, Miyaso H, Okumura M, Kurisu J et Imaizumi k. Identification of a cis-acting element for the regulation of SMN exon 7 splicing. *J Biol Chem* 277 :23271-7,2002.
47. Lorson CL, Androphy EJ .The domain encoded by exon 2 of the survival motor neuron protein mediates nucleic acid binding. *Hum Mol Genet* 7(8): 1269-1275, 2005.
48. DiDonato CJ, Chen XN, Noya D, Korenberg JR, Nadeau JH, Simard LR Cloning, characterization, and copy number of the murine survival motor neuron gene:homolog of the spinal muscular atrophy-determining gene. *Genome Res* 7:339-352, 1997.
49. Young PJ, Day PM, Zhou J, Androphy EJ, Morris GE, Lorson CL .A direct interaction between the survival motor neuron protein and p53 and its relationship to spinal muscular atrophy. *J Biol Chem* 277(4): 2852-2859 ,2002.
50. Briese M, Esmaili B, Sattelle DB . Is spinal muscular atrophy the result of defects in motor neuron processes? *Bioessays* 27:946-957.
51. Bertrand S, Burlet P, Clermont O, Huber C, Fondrat C, Thierry-Mieg D, Munnich A, Lefebvre S . The RNA-binding properties of SMN: deletion analysis of the zebrafish orthologue defines domains conserved in evolution. *Hum Mol Genet* 8(5): 775-782,1999.
52. Maurer-Stroh S, Dickens NJ, Hughes-Davies L, Kouzarides T, Eisenhaber F, Ponting CP . The Tudor domain 'Royal Family': Tudor, plant Agenet, Chromo, PWWP and MBT domains. *Trends Biochem Sci* 28(2): 69-74,2003.
53. Buhler et al, 1999 ;Buhler D, Raker V, Luhrmann R, Fischer U Essential role for the tudor domain of SMN in spliceosomal U snRNP assembly: implications for spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 8:2351-2357,1999.
54. Sprangers R, Groves MR, Sinning I, Sattler M . High-resolution X-ray and NMR structures of the SMN Tudor domain: conformational variation in the binding site for symmetrically dimethylated arginine residues. *J Mol Biol* 327(2): 507-520 ,2003.

55. Pellizzoni, L. (2007). Chaperoning ribonucleoprotein biogenesis in health and disease. *EMBO Rep.* 8, 340–345. doi:10.1038/sj.embor.7400941 Pellizzoni, 2007.
56. Lorson CL, Strasswimmer J, Yao J-M, Baleja JD, Hahnen E, Wirth B, Thanh L, Burghes AHM, Androphy EJ. SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nat Genet.* 1998;19:63–66, 1998.
57. Young PJ, Le TT, Thi Man N, Burghes AH, Morris GE The relationship between SMN, the spinal muscular atrophy protein, and nuclear coiled bodies in differentiated tissues and cultured cells. *Exp Cell Res* 256:365-374, 2000.
58. Giesemann T, Rathke-Hartlieb S, Rothkegel M, Bartsch JW, Buchmeier S, Jockusch BM, Jockusch H A role for polyproline motifs in the spinal muscular atrophy protein SMN. Profilins bind to and colocalize with smn in nuclear gems. *J Biol Chem* 274:37908-37914, 1999.
59. Setola V, Terao M, Locatelli D, Bassanini S, Garattini E, Battaglia G . Axonal-SMN (a-SMN), a protein isoform of the survival motor neuron gene, is specifically involved in axonogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:1959-1964, 2007.
60. Burghes HM . Other forms of survival motor neuron protein and spinal muscular atrophy: an opinion. *Neuromuscul Disord* 18:82-83, 2008.
61. Gunadi, Sasongko TH, Yusoff S, Lee MJ, Nishioka E, Matsuo M, Nishio H . Hypomutability at the polyadenine tract in SMN intron 3 shows the invariability of the aSMN protein structure. *Ann Hum Genet* 72(Pt 2):288-291, 2008.
62. Battaglia G, Princivalle A, Forti F, Lizier C, Zeviani M . Expression of the SMN gene, the spinal muscular atrophy determining gene, in the mammalian central nervous system. *Hum Mol Genet* 6:1961-1971, 1997
63. Tizzano EF, Cabot C, Baiget M . Cell-specific survival motor neuron gene expression during human development of the central nervous system: implications for the pathogenesis of spinal muscular atrophy. *Am J Pathol* 153:355-361, 1998.
64. Le TT, Covert DD, Monani UR, Morris GE, Burghes AH . The survival motor neuron (SMN) protein: effect of exon loss and mutation on protein localization. *Neurogenetics* 3:7-16, 2000.

65. Liu Q, Dreyfuss G . A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *Embo J* 15(14): 3555-3565 ,1996.
66. Coover DD, Le TT, McAndrew PE, Strasswimmer J, Crawford TO, Mendell JR, Coulson SE, Androphy EJ, Prior TW, Burghes AH . The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 6:1205-1214,1997.
67. Jablonka S, Bandilla M, Wiese S, Buhler D, Wirth B, Sendtner M, Fischer U . Co-regulation of survival of motor neuron (SMN) protein and its interactor SIP1 during development and in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 10:497-505,2001.
68. Pellizzoni L, Baccon J, Charroux B, Dreyfuss G . The survival of motor neurons (SMN) protein interacts with the snRNP proteins fibrillarin and GAR1. *Curr Biol* 11:1079-1088,2001.
69. Steinmetz EJ . Pre-mRNA processing and the CTD of RNA polymerase II: the tail that wags the dog? *Cell* 89:491-494,1997.
70. Mattaj IW, De Robertis EM . Nuclear segregation of U2 snRNA requires binding of specific snRNP proteins. *Cell* 40:111-118,1985.
71. Reddy R . Compilation of small RNA sequences. *Nucleic Acids Res* 16 Suppl:r71-85,1998.
72. Chari A, Golas MM, Klingenhager M, Neuenkirchen N, Sander B, Englbrecht C, Sickmann A, Stark H, Fischer U . An assembly chaperone collaborates with the SMN complex to generate spliceosomal SnRNPs. *Cell* 135:497-509,2008.
73. Friesen WJ, Dreyfuss G. Specific sequences of the Sm and Sm-like (Lsm) proteins mediate their interaction with the spinal muscular atrophy disease gene product (SMN). *J Biol Chem* 275:26370-26375,2000.
74. Ogawa C, Usui K, Aoki M, Ito F, Itoh M, Kai C, KanamoriKatayama M, Hayashizaki Y, Suzuki H .Gemin2 plays an important role in stabilizing the survival of motor neuron complex. *J Biol Chem* 282:1112211134,2007.
75. Gubitza AK, Mourelatos Z, Abel L, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G . Gemin5, a novel WD repeat protein component of the SMN complex that binds Sm proteins. *J Biol Chem* 277:5631-5636,2002.

76. Baccon J, Pellizzoni L, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G . Identification and characterization of Gemin7, a novel component of the survival of motor neuron complex. *J Biol Chem* 277:31957-31962,2002.
77. Carissimi C, Saieva L, Gabanella F, Pellizzoni L . Gemin8 is required for the architecture and function of the survival motor neuron complex. *J Biol Chem* 281:37009-37016,2006.
78. Broccolini A, Engel W.K et Askanas V . Localization of survival moto neuron protein in human apoptotic-like and regenerating muscle fibers , and neuromuscular junctions .*Neuroreport* 10 :1637-41,1990.
79. Thomas W Prior, PhD, FACMG and Barry S Russman, MD Spinal Muscular Atrophy. *GeneReviews* February 24, 2000; Last Update: November 14, 2013.
80. GHJ B. Wirth, “An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA),” *Human Mutation*, vol. 15: pp. 228– 237, 2000.
81. Sugarman E A, Nagan N ,Zhu H ,Akmaev V R., Zhou Z ,Rohlf s A M ,et al. Pan-ethnic carrier screening and prenatal diagnosis for spinal muscular atrophy: clinical laboratory analysis of 72400 specimens.*Eur.J.Hum.Genet.*20,27–32, 2012.
82. Wirth B, Herz M, Wetter A, Moskau S, Hahnen E, Rudnik-Schoneborn S, Wienker T, Zerres K Quantitative analysis of survival motor neuron copies: identification of subtle SMN1 mutations in patients with spinal muscular atrophy, genotype phenotype correlation, and implications for genetic counseling. *Am J Hum Genet* 64:1340-1356. 1999.
83. Ping Fang<sup>1†</sup>, Liang Li<sup>1†</sup>, Jian Zeng<sup>2</sup>, Wan-Jun Zhou<sup>1</sup>, Wei-Qing Wu<sup>3</sup>, Ze-Yan Zhong<sup>1</sup>, Ti-Zhen Yan<sup>4</sup>, Jian-Sheng Xie<sup>3</sup>, Jing Huang<sup>5</sup>, Li Lin<sup>1</sup>, Ying Zhao<sup>6</sup> and Xiang-Min Xu<sup>1</sup>Molecular characterization and copy number of SMN1, SMN2 and NAIP in Chinese patients with spinal muscular atrophy and unrelated healthy controls. *Disorders*. 16:11, 2015.
84. Sossi et al. Sossi V, Giuli A, Vitali T, Tiziano F, Mirabella M, Antonelli A, Neri G, Brahe C. Premature termination mutations in exon 3 of the SMN1 gene are associated with exon skipping and a relatively mild SMA phenotype. *Eur J Hum Genet*. 9:113–120,2001.



85. Brahe C, Bertini E Spinal muscular atrophies: recent insights and impact on molecular diagnosis. *J Mol Med* 74:555-562, 1996
86. Wirth B . An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Mutat* 15:228-237,2000.
87. Wirth B, Schmidt T, Hahnen E, Rudnik-Schoneborn S, Krawczak M, Muller-Myhsok B, Schonling J, Zerres K De novo rearrangement found in 2% of index patient with spinal muscular atrophy: mutational mechanisms, parental origin, mutation rate, and implications for genetic counseling. *Am J Hum Genet.* 61(5): 1102-1111, 1997.
88. Feldkötter M ,Schwarzer V ,Wirth R ,Wienker T F ,and Wirth B. Quantitative analyses ofSMN1andSMN2basedonrealTime Light Cycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am.J.Hum.Genet.* 70,358–368,2002.
89. Gómez-Curet I, Robinson K G , Funanage V L ,Crawford T O ,Scavina M , and Wang W.Robust quantificationoftheSMNgenecopy number byreal-time Taq Man PCR. *Neurogenetics.* 8: 271–278, 2007.
90. Burghes,A.H.MWhenisadeletionnotadeletion?Whenit isconverted. *Am. J.Hum. Genet.* 61: 9–15,1997.
91. Ogino S, Gao S, Leonard DG, Paessler M, Wilson RB Inverse correlation between SMN1 and SMN2 copy numbers: evidence for gene conversion from SMN2 to SMN1. *Eur J Hum Genet.* 11:275-277,2003.
92. Bernal S ,Alías L ,Barceló M.J ,Also-Rallo E ,Martínez-Hernández R.,Gámez J et al. Thec.859G>C Variant in the SMN2 gene is Associated with Types II and III SMA and originates from a common ancestor. *J.Med.Genet.* 47,640 642 , 2010.
93. Vezain,M.,Saukkonen,A.M.,Goina,E.,Touraine,R.,Manel,V.,Toutain,A., et al.A rare SMN2 variant in a previously unrecognized composite splicing regulatory element induces exon7 inclusion and reduces the clinical severity of spinal muscular atrophy. *Hum.Mutat.* 31:E1110–E1125, 2010.

94. Roy N, Mahadevan MS, McLean M, Shutler G, Yaraghi Z, Farahani R, Baird S, Besner- Johnston A, Lefebvre C, Kang X, et al.. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in Individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* 80:167-178, 1995.
95. Liston P, Roy N, Tamai K, Lefebvre C, Baird S, Cherton- Horvat G, Farahani R, McLean M, Ikeda JE, MacKenzie A, Korneluk RG .Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature*. 379:349-353,1996.
96. Maier JK, Lahoua Z, Gendron NH, Fetni R, Johnston A, Davoodi J, Rasper D, Roy S, Slack RS, Nicholson DW, MacKenzie AE. The neuronal apoptosis inhibitory protein is a direct inhibitor of caspases 3 and 7. *J Neurosci* 22:2035-2043,2002.
97. Thompson TG, DiDonato CJ, Simard LR, Ingraham SE, Burghes AH, Crawford TO, Rochette C, Mendell JR, Wasmuth JJ A novel cDNA detects homozygous microdeletions in greater than 50% of type I spinal muscular atrophy patients. *Nat Genet* 9:56-62,1995.
98. Akutsu T, Nishio H, Sumino K, Takeshima Y, Tsuneishi S, Wada H, Takada S, Matsuo M, Nakamura H Molecular genetics of spinal muscular atrophy: contribution of the NAIP gene to clinical severity. *Kobe J Med Sci*. 48:25-31,2002.
99. Watihayati MS, Zabidi-Hussin AM, Tang TH, Matsuo M, Nishio H, Zilfalil BA. Deletion analyses of SMN1 and NAIP genes in Malaysian spinal muscular atrophy patients. *Pediatr Int*. 49:4–11, 2007.
100. Omrani O, Bonyadi M, Barzgar M. Molecular analysis of the SMN and NAIP genes in Iranian spinal muscular atrophy patients. *Pediatr Int*. 51:193–6, 2009.
101. Qu YJ, Ge XS, Bai JL, Wang LW, Cao YY, Lu YY, et al. Association of Copy Numbers of Survival Motor Neuron Gene 2 and Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein Gene With the Natural History in a Chinese Spinal Muscular Atrophy Cohort. *J Child Neurol*, 2014.
102. Matsuno M, Kose H, Okabe M, Hiromi Y TFIID controls developmentally-regulated cell cycle progression as a holocomplex. *Genes Cells*. 12:1289-1300, 2007.
103. Carter TA, Bonnemann CG, Wang CH, Obici S, Parano E, De Fatima Bonaldo M, Ross BM, Penchaszadeh GK, Mackenzie A, Soares MB, Kunkel LM, Gilliam TC A multicopy transcription-repair

gene, BTF2p44, maps to the SMA region and demonstrates SMA associated deletions. Hum Mol Genet 6:229-236, 1997.

104. Oprea G E, Kroeber S , McWhorter M L, Rossoll W, Mueller S , Krawczak M, Bassell G J, Beattie C E, Wirth B. Plastin 3 is a protective modifier of autosomal recessive spinal muscular atrophy. Science. 320: 524-527, 2008.

105. Matthew E R Butchbach<sup>1</sup>. Copy Number Variations in the Survival Motor Neuron Genes : Implications for Spinal Muscular Atrophy and Other Neurodegenerative Diseases Frontiers in Molecular Biosciences. Volume 3 : Article 7 , March 2016.

106. Corcia P, Mayeux-ortas V , Khoris J, de Toffol B , Autret A, Muh J.P , Camu W et Andres C . Abnormal SMN 1 gene copy number is a susceptibility factor for amyotrophic lateral sclerosis .Ann neurol 51 :243-6,2002.

107. Schrank B, Gotz R, Gunnensen JM, Ure JM, Toyka KV, Smith AG, Sendtner M . Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. Proc Natl Acad Sci U S A 94:9920-9925,1997.

108. Dodd A, Curtis PM, Williams LC, Love DR , Zebrafish: bridging the gap between development and disease. Hum Mol Genet 9:2443-2449,2000.

109. Bevan AK, Hutchinson KR, Foust KD, Braun L, McGovern VL, Schmelzer L, Ward JG, Petruska JC, Lucchesi PA, Burghes AH, Kaspar BK Early heart failure in the SMN Delta7 model of spinal muscular atrophy and correction by postnatal scAAV9-SMN delivery. Hum Mol Genet 19:3895-3905, 2010 .

110. Russman BS, Iannaccone ST, Samaha FJ A phase 1 trial of riluzole in spinal muscular atrophy. Arch Neurol 60(11): 1601-1603, 2003.

111. Azzouz M, Le T, Ralph GS, Walmsley L, Monani UR, Lee DC, Wilkes F, Mitrophanous KA, Kingsman SM, Burghes AH, Mazarakis ND Lentivector mediated SMN replacement in a mouse model of spinal muscular atrophy. J Clin Invest 114(12): 1726-1731,2004.

112. Bevan AK, Hutchinson KR, Foust KD, Braun L, McGovern VL, Schmelzer L, Ward JG, Petruska JC, Lucchesi PA, Burghes AH, Kaspar BK Early heart failure in the SMN Delta7 model of spinal muscular atrophy and correction by postnatal scAAV9-SMN delivery. *Hum Mol Genet* 19:3895-3905, 2010
113. ZERRES K., RUDNIK-SCHÖNEBORN S.: « Spinal muscular atrophies ». In: « Emery and Rimoin's *principales and practice of medical genetics* », 3e édition, 1996, 2(113) : 2387- 2403
114. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16: 1215.
115. ( M. Tazir and C. Geronimi, "Chronic childhood spinal muscular atrophies in Algeria. A genetic study," *Jou eurological Sciences*, vol. 96, no. 1, pp. 89–101, 1990).
116. Enquête réalisée sur la consanguinité en Algérie "Fondation nationale pour la promotion de la santé et le developpement de la recherche (FOREM)," Septembre 2007.  
, 1996, 2(113) : 2387- 2403
117. WANG C.H, FINKEL R.S, BERTINI E.S, SCHROTH M, SIMONDS A, WONG B, ALOYSIUS A, MORRISON L, MAIN M, CRAWFORD T.O, TRELA A, and Participants of the International Conference on SMA Standard of Care. Consensus statement for standard of care in spinal muscular atrophy. *JChild Neurol* 2007 22 (8) 1027-49)
118. (K. Zerres and S. Rudnik-Scho"neborn, "Natural history in prox- imal spinal muscular atrophy: clinical analysis of 445 patients and suggestions for a modification of existing classifi ns," *Archives of Neurology*, vol. 52, no. 5, pp. 518–523, 1995.)
- 119 . V. Dubowitz, "Muscle disorders in childhood *Problems in Clinical Pediatrics*, vol. 16, pp. 1–282, 1978.)
120. C. A. Kim, B. Passos, and A. Marie, "Clinical and molecular analysis of spinal muscular atrophy in Brazilian patients," *Genet* vol. 22, no. 4, pp. 1415–4757, 1999.) ,
121. Kesari, U. K. Misra, J. Kalita et al., "Study of survival of motor neuron (SMN) and neuronal apoptosis inhibitory protein letions in SMA patients," *Journal of Neurology*, 252, no. 6, pp. 667–671, 2005.)

122. S. Savas, N. Gokgoz, H. Kayserili, F. Ozkinay, M. Yuksel-Apak, and B. Kirdar, "Screening of deletions in SMN, NAIP and BTF2p44 genes in Turkish spinal muscular atrophy patients," *Heredity*, vol. 50, no. 3, pp. 162–165, 2000.)
123. Capon, C. Levato, S. Semprini et al., "Deletion analysis of SMN and NAIP gene in spinal muscular atrophy families," *Muscle & Nerve*, vol. 19, pp. 378–380, 1996).
124. T. L. Munsat, L. Skerry, B. Korf et al., "Phenotypic heterogeneity mapping to chromosome 5q11.2-13.3 (5q)," *Neurology*, vol. 40, no. 12, pp. 1831–1836, 1990.
125. E. Taylor, N. H. Thomas, C. M. Lewis et al., "Correlation of SMN1 and SMN2 gene copy number with age of onset and survival in spinal muscular atrophy," *European Journal of Human Genetics*, vol. 6, no. 5, pp. 467–474, 1998.
126. Molecular analysis of the SMN1 and NAIP genes in Iranian patients with spinal muscular atrophy Derakhshandeh-Peykar P1, Esmaili M, Ousati-Ashtiani Z, Rahmani M, Babrzadeh F, Farshidi S, Attaran E, Sajedifar MM, Farhud DD. Molecular analysis of the SMN1 and NAIP genes in Iranian patients with spinal muscular atrophy. *Ann Acad Med Singapore* 2007;36:937-41.

## Les annexes

### Annexe I : Séquence du DNA complémentaire du gène SMN

cgg ggc ccc acg ctg cgc atc cgc ggg ttt gct atg gcg atg agc agc	48
ggc ggc agt ggt ggc ggc gtc ccg gag cag gag gat tcc gtg ctg ttc	96
cgg cgc ggc aca ggc cag agc gat gat tct gac att tgg gat gat aca	144
gca ctg ata aaa gca tat gat aaa gct gtg gct tca ttt aag cat gct	192
cta aag aat ggt gac att tgt gaa act tcg ggt aaa cca aaa acc aca	240
cct aaa aga aaa cct gct aag aag aat aaa agc caa aag aag aat act	288
gca gct tcc tta caa cag tgg aaa gtt ggg gac aaa tgt tct gcc att	336
tgg tca gaa gac ggt tgc att tac cca gct acc att gct tca att gat	384
ttt aag aga gaa acc tgt gtt gtg gtt tac act gga tat gga aat aga	432
gag gag caa aat ctg tcc gat cta ctt tcc cca atc tgt gaa gta gct	480
aat aat ata gaa cag aat gct caa gag aat gaa aat gaa agc caa gtt	528
tca aca gat gaa agt gag aac tcc agg tct cct gga aat aaa tca gat	576
aac atc aag ccc aaa tct gct cca tgg aac tct ttt ctc cct cca cca	624
ccc ccc atg cca ggg cca aga ctg gga cca gga aag cca ggt cta aaa	672
ttc aat ggc cca cca ccg cca ccg cca cca cca cca ccc cac tta cta	720
tca tgc tgg ctg cct cca ttt cct tct gga cca cca ata att ccc cca	768
cca cct ccc ata tgt cca gat tct ctt gat gat gct gat gct ttg gga	816
agt atg tta att tca tgg tac atg agt ggc tat cat act ggc tat tat	864
atg ggt ttc aga caa aat caa aaa gaa gga agg tgc tca cat tcc tta	912
aat taa gga gaa atg ctg gca tag agc agc act aaa tga cac cac taa	960
aga aac gat cag aca gat ctg gaa tgt gaa gcg tta tag aag ata act	1008
ggc ctc att tct tca aaa tat caa gtg ttg gga aag aaa aaa gga agt	1056
gga atg ggt aac tct tct tga tta aaa gtt atg taa taa cca aat gca	1104
atg tga aat att tta ctg gac tct ttt gaa aaa cca tct gta aaa gac	1152
tgg ggt ggg ggt ggg agg cca gca cgg tgg tga ggc agt tga gaa aat	1200
ttg aat gtg gat tag att ttg aat gat att gga taa tta ttg gta att	1248
tta tgg cct gtg aga agg gtg ttg tag ttt ata aaa gac tgt ctt aat	1296
ttg cat act taa gca ttt agg aat gaa gtg tta gag tgt ctt aaa atg	1344
ttt caa atg gtt taa caa aat gta tgt gag gcg tat gtg gca aaa tgt	1392
tac aga atc taa ctg gtg gac atg gct gtt cat tgt act gtt ttt ttc	1440
tat ctt cta tat gtt taa aag tat ata ata aaa ata ttt aat ttt ttt	1488
tta	1491

Le symbole  délimite les exons.

## Annexe II : Séquence de la protéine SMN.

MAMSSGGSG	GVPEQEEDSVL	FRRGTQSDD	SDIWDDTALI	40
KAYDKAVASF	KHALKNGDIC	ETSGPKTTP	KRKPAKKNS	80
QKNTAASLQ	QWKVGDKCSA	IWSEDGCIYP	ATIASIDFKR	120
ETCVVVTGY	GNREEQNLSD	LLSPISEVAN	NIEQNAQENE	160
NESQVSTDES	ENSRSPGNKS	DNIKPKSAPW	NSFLPPPPPM	200
PGPRLGPGKP	GLKFNGPPPP	PPPPPHLLS	CWLPPFSPGP	240
PIIPPPPIC	PDSLDDADAL	GSMLISWYMS	GYHTGYMGMF	280
RQNQKEGFCS	HSLN			

## Annexe III : -Composants et substrats du complexe SMN

Complexe SMN

Interaction avec :

---

Composants du complexe

---

SMN	SMN, Gemin2, 3, 5, 7, Sm D1, D3, B/B'
Gemin2 ou SIP1	SMN, Gemin2, Sm B/B', D1, D3, E
Gemin3 ou dp103	SMN, Gemin4, Sm B/B', D2, D3, E
Gemin4 ou GIP1	Gemin3, Sm B, D1, D3, E, snRNAs U1 et U5
Gemin5 ou p175	SMN, Sm B, D1, D3, E
Gemin6	Gemin7, Sm D2, E, B, D3
Gemin7	SMN, Gemin6, Sm E, B, D2, D3

---

Substrats du complexe

Protéines Sm	SMN, autres protéines Sm
SnRNAs U1, U4, U5	SMN, Gemin4
Fibrillarine	SMN
GAR1	SMN
Coiline	SMN
HnRNP Q, R	SMN
Complexe PRMT5	Protéines Sm

#### **Annexe IV : le formulaire de consentement de participation à un projet de recherche**

Je soussigné, Monsieur,.....certifie avoir reçu la note d'information concernant l'étude citée ci-dessus.

Il m'a clairement été précisé que je suis entièrement libre d'accepter ou de refuser de participer à cette recherche.

Je certifie avoir compris l'objectif et les modalités de cette étude. Je donne mon accord pour la participation à cette étude.

Sur les examens à caractéristiques génétiques réalisés à partir du sang qui m'a été prélevé le .....

Enfin, j'ai compris que je ne recevrai aucune indemnité pour ma participation à cette étude.

Signature du patient

En l'absence d'autonomie de lecture et d'écriture de Monsieur....., la tierce personne identifiée ci-dessous, atteste avoir personnellement et fidèlement fait savoir au patient, la notice d'information et le présent formulaire de consentement et ainsi elle recueille son accord pour signer.

Tierce personne

Mme/ Mr .....

Signature

Signature du médecin traitant



## Annexe V : Le questionnaire

Date / /

Service :

Identité

Nom :

Prénom :

Age :

Tél :

Adresse :

Origine :

1/Histoire de la maladie :

Faiblesse musculaire : Oui/Non

Hypotonie précoce : Oui/Non

Amyotrophie : Oui/Non

2/Antécédents familiaux :

Présence de la consanguinité parentale : Oui/Non

Présence de cas similaires dans la fratrie : Oui/Non

Autres :

\*Développement psychomoteur :

Age du maintien de la tête : .....Non acquise

Age de la station assise : .....Non acquise

Age de station debout : .....Non acquise

Age de la marche : .....Non acquise

Age de la perte de la marche : .....

Autres :

Examen neurologique :

Examen somatique (cardio-respiratoire) :

Examens complémentaires :

-EMG :

-Enzymes musculaires :

CPK :

LDH :

-Bilan cardiaque :

-Bilan respiratoire :

-Etude du DNA :

## Annexe VI : Dosage des CPK et LDH

Le dosage de la CPK repose sur une analyse de sang. Le prélèvement de sang veineux se fait en général au pli du coude, avec un laissé le moins longtemps possible. Le tube de prélèvement peut contenir un anticoagulant.

Il est préférable d'être à jeun avant l'examen et si possible au repos (ne pas pratiquer d'exercice musculaire dans les 3 jours précédant le dosage). Il est capital d'indiquer d'éventuels traitements en cours car certains médicaments peuvent modifier les résultats (notamment les traitements neuroleptiques ou hypolipémiants - statines).

Le taux normal dans le sang de CPK est généralement très faible, cette enzyme n'est présente en grande quantité dans le sang qu'en cas d'atteinte musculaire. Pour un dosage effectué à 37°C, les valeurs doivent être (valeurs plus basses si dosage effectué à 30°C) :

Homme : 0 - 195 UI /l

Femme : 0 - 170 UI /l

Le prélèvement ne devra pas être réalisé à moins de 48 heures d'un traumatisme ou d'un effort musculaire important. Dans ce cas, les muscles atteints vont libérer de la CPK en grande quantité sans que cela traduise un problème pathologique.

Une injection intramusculaire ou une biopsie musculaire avant le prélèvement auront les mêmes effets en augmentation le taux de CPK ne manière anormale.

Les niveaux de LDH sont mesurés grâce à un prélèvement sanguin, plus rarement à partir d'un prélèvement d'urine ou de liquide cébrospinal. Chez l'adulte, le prélèvement se fait généralement au pli du coude.

Il convient d'être à jeun le jour du prélèvement. Le prélèvement de sang veineux se fait le plus souvent au niveau du pli du coude. Le tube de prélèvement contient un anticoagulant. Vous devrez indiquer si vous suivez d'éventuels traitements en cours.

### RÉSULTATS NORMAUX

Les valeurs normales oscillent entre 190 – 400 Ui/l. Elles varient en fonction de l'âge et de la méthode de dosage.

Valeurs de référence (en UI/L)

Age	Méthode SFBC à 30°C	Méthode DGKC à 37°C
Adultes	160-320	190-430

4-16 ans	180-420	220-500
1-3 ans	240-640	350-880
1 mois	300-780	420-950

#### VARIATIONS PHYSIOLOGIQUES

On constate une augmentation importante dans la seconde partie de la grossesse (+25 à +100 %). Un exercice physique éprouvant peut également entraîner une augmentation de la LDH.

### **Annexe VII : la méthode d'extraction au NaCl**

#### **1. Hémolysé du sang et préparation du culot leucocytaire**

Le sang fraîchement recueilli dans les tubes EDTA est vigoureusement mélangé à une solution hypotonique pour faire éclater les globules rouges. La lyse est réalisée à +4°C durant 10 à 20 min. Ensuite, le lysat est centrifugé pendant 10 mn à 3900 tours/min. Une fois que le surnageant est éliminé, après deux lavages, on obtient un culot blanc, constitué essentiellement de leucocytes. Les étapes se sont déroulées comme suit :

1er lavage :

- mettre les 10 ml de sang dans un tube Falcon de 50 ml et compléter le volume à 50 ml avec du Tris EDTA (TE) 20 : 5,
- laisser 10 min au congélateur à -18°C,
- centrifuger 10 min à 3900 tours/min,
- éliminer le surnageant en le versant prudemment dans un récipient sans décoller le culot leucocytaire contenu au fond de la paroi du tube.

2ème lavage :

- ajouter au culot le TE 20 : 5 (compléter à 25 ml),
- laisser 10 min au congélateur à -18°C,
- centrifuger dans les mêmes conditions comme précédemment,
- verser délicatement le surnageant et garder le culot leucocytaire formé.

**N.B : on peut s'arrêter à ce stade et mettre le culot obtenu dans un tube conique de 15 ml avec du TE 10 : 1 pour le conserver à -20°C pendant plus d'un an pour une extraction ultérieure.**

## **2. Lyse des leucocytes, digestion du complexe nucléoprotéique et libération de l'ADN**

Pour la libération de l'ADN, la dissolution des membranes des leucocytes et la digestion des protéines associées à cet ADN se déroulent comme suit :

- transvaser le culot de leucocytes dans un tube Falcon de 15 ml,
- ajouter 3 ml de tampon de lyse (NaCl 400mM, EDTA 2mM, Tris 10mM, pH 8,2) en dilacérant le culot avec une pastille stérile,
- ajouter 200 µl du détergent anionique SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) à 10% pour la lyse des leucocytes, l'inhibition des nucléases, la dénaturation des protéines et l'activation de la protéinase K,
- ajouter 100 µl de protéinase K à 10 mg/ml dans le but de digérer toutes les protéines notamment les nucléoprotéines pour libérer l'ADN nucléaire,
- mettre les tubes sous agitation (roue) à 37°C pendant une nuit car la protéinase K (10mg/ml) effectue son travail pendant 3 à 18h à 37°C,
- le lendemain, mettre les tubes dans le congélateur à -18°C afin de refroidir leurs contenus pendant 10 min.

**N.B : le traitement par la protéinase K peut se faire pendant 1 à 2 h à 65 °C ou 2 à 3h à 56°C.**

### **3. Extraction et purification de l'ADN :**

Méthode utilisant le NaCl Dans le but d'éliminer les protéines par précipitation sélectives, le lysat cellulaire doit être traité par une solution saline comme suit :

- ajouter 1 ml de NaCl 4M,
- agiter vigoureusement à la main,
- laisser 5 min dans le congélateur à -18°C pour accélérer la précipitation des protéines,
- centrifuger 15 min à 2500 tours/min.

#### **3.1 Précipitation de l'ADN**

La précipitation est réalisée par de l'éthanol absolu à froid conservé à -80°C et à haute concentration (2.5 le volume de l'échantillon) qui, après une légère agitation, pompe l'eau entourant la molécule d'ADN pour la rendre moins soluble ; sans eau, la molécule d'ADN peut précipiter par formation d'une pelote, visible à l'œil nu sous forme d'une méduse (filaments).

Le précipité est ensuite lavé et redissout dans le tampon TE 10 :1 (2 fois le volume de l'échantillon).

- récupérer la pelote par enroulement sur une pipette Pasteur,

- laver la pelote d'ADN 2 fois dans l'éthanol à 70% pour éliminer les sels,
  - récupérer délicatement la pelote dans des tubes Eppendorf qui doivent rester ouverts durant environ 1h pour le séchage de l'ADN (par évaporation de l'éthanol) (Figure 11),
  - réhydrater l'ADN dans une solution de TE ou de l'eau bidistillée, puis conserver à - 20°C.
- 3.2 Solubilisation de l'ADN purifié La solubilisation est une des propriétés de l'ADN. Ce dernier, devient un sel d'acide en milieux aqueux et est ainsi soluble, pour cela, on procède comme suit :
- ajouter entre 300 à 1000µl d'eau distillée selon la grosseur de la pelote d'ADN et la concentration souhaitée,
  - laisser une nuit sur agitateur rotateur à 37°C, puis à +4°C jusqu'à dissolution complète pendant

#### **Annexe VIII : préparation du milieu de digestion par l'enzyme Dral**

Milieu de digestion	Quantité en µl
Tampon 10X	4
Dral (10U/µl)	2
H2O	4
BSA	0,2

#### **Annexe IX : Préparation d'un gel d'agarose 3%**

Composition du Gel	Quantité
Agarose	3g
TBE 1X	100 ml
Volume total	100 ml

## Résumé

Les amyotrophies spinales proximales ou SMA pour spinal muscular atrophy sont des affections neuromusculaires de transmission autosomique récessive, caractérisées par une dégénérescence progressive des motoneurons de la corne antérieure de la moelle épinière et souvent des motoneurons du bulbe à l'origine d'une atrophie et d'une faiblesse musculaire des muscles proximaux. Cliniquement ce sont des affections très hétérogènes. Selon l'âge de début et l'évolution de la maladie, on distingue classiquement quatre formes cliniques.

Sur le plan moléculaire, les SMA sont liées dans 98 % des cas à une délétion homozygote des exons 7 et ou 8 du gène SMN1 ou SMN 1.

Les objectifs de notre travail dont les objectifs étaient de :

-Confirmer le diagnostic des patients présentant un phénotype SMA par la recherche de la délétion de l'exon 7 du gène SMN1.

-Etablir des corrélations phénotype / génotype chez ces patients.

Nous avons recruté 25 patients présentant le phénotype SMA appartenant à 17 familles, tous de l'Est Algérien colligés du service de neurologie du CHU Constantine.

La recherche de la délétion de l'exon 7 du gène SMN1 a été réalisée par PCR digestion par l'enzyme de restriction DraI.

32% de nos patients sont de Sexe féminin et 68 % de sexe masculin avec un âge moyen de  $13,56 \pm 11$ ans. Nos patients sont dans 53% des cas familiaux et dans 47% des cas sporadiques et issus de mariages consanguins dans 44% des cas.

La classification clinique des patients en 04 types selon consortium international et selon Zerres et al était possible chez la majorité de nos patients. Dans notre étude l'EMG est revenu dans tous les cas, neurogène de type corne antérieur. En faveur d'une SMA. Les CPK-LDH étaient élevées chez 28% des patients seulement.

L'étude génétique a été réalisée chez 25 patients et a confirmé le diagnostic de SMA chez 18 patients soit 72% en identifiant une délétion de l'exon 7 du gène SMN1

Nous n'avons pas trouvé de corrélation entre le phénotype et le génotype. La délétion de l'exon 7 du gène SMN1 a été retrouvé dans tous les types de SMA particulièrement chez 100% des patients SMA de type I, 40% des patients SMA de type II et 78% des SMA de type III ce qui est en accord avec de nombreuses études.

Nos résultats concordent avec es données de la littérature.

**Mots clés : SMA, SMN1, Exon 7, PCR/RFLP**

## Abstract

Spinal proximal amyotrophy or SMA for spinal muscular atrophy are neuromuscular diseases autosomal recessive, characterized by progressive degeneration of motor neurons in the anterior horn of the spinal cord and often motoneurons of the bulb causing atrophy and muscle weakness of the proximal muscles. Clinically these are very heterogeneous affections. Depending on the age of onset and the course of the disease, four clinical forms can be distinguished.

Molecularly, SMAs are in 98% linked to a homozygous deletion of exons 7 and 8 of the SMN1 or SMN 1 gene.

The objectives of our work were to:

-Confirm the diagnosis of patients presenting an SMA phenotype by the search for deletion of exon 7 of the SMN1 gene.

- Establish phenotype / genotype correlations in these patients.

We recruited 25 patients with the SMA phenotype belonging to 17 families, all from Algerian East from the Neurology department of CHU Constantine.

The search for the deletion of the exon 7 of the SMN1 gene was carried out by PCR / digestion with the restriction enzyme DraI.

32% of our patients are female and 68% are male with an average age of  $13.56 \pm 11$  years. Our patients are in 53% familial cases, in 47% sporadic cases and from consanguineous marriages in 44% of the cases.

The clinical classification of patients in 04 types according to international consortium and according to Zerres et al was possible in the majority of our patients. In our study the EMG returned in all cases, neurogenic horn anterior type. In favor of an SMA. CPK-LDH were elevated only in 28% of our patients.

The genetic study was carried out in 25 patients and confirmed the diagnosis of SMA for 18 patients, 72% by identifying a deletion of exon 7 of the SMN1 gene

We found no correlation between the phenotype and the genotype. The deletion of exon 7 of the SMN1 gene was found in all types of SMA particularly in 100% of SMA type I, 40% of SMA type II and 78% of SMA type III patients. Which is in agreement with numerous studies.

Our results are consistent with the data of literature.

**Key words: SMA, SMN1, Exon 7, PCR/RFLP**



التدريجي	مقهور يتميز	العصبية والعضلية	الخلايا العصبية	سريرية
		للغاية. ويحدد تقليديا	غير	القريبة. سريريا وهذه هي
	ظهور			
	الجزئي،	ADMS الجينات	8 7	98 SMN SMNT 1.
	: أهداف			
-	الذين يعانون	جين SMA تشخيص	7	الظاهري SMN1.
-	هؤلاء	الجيني / الظاهري	.	
	بتعيين 25 مريضا	SMA	جمعها	17 الظاهري ينتمون
	كونستانتين			
جين	7	SMN1	PCR	الهضم انزيم التقبيد
32	الأسرية	53	11 ± 13.56	68 لدينا هم
44			47	
		04	التصنيف السريري	Zerres
			العصبية	غالبية
	EMG		جميع	SMA. CPK-LDH
				28
	تشخيص	الوراثية	SMA وأجريت	7
	25 مريضا،			طريق تحديد
	SMN1 جين			72 18 مريضا
جين	7		الظاهري والتركيب	بين
SMA	100	SMA I	40	SMA II
عديدة		سيما		SMN1 جميع
				78 SMA وهو

البيانات

<b>Nom et prénom:</b>	<b>Date de soutenance</b>
<b>Lebrima Meriem Salem Amira</b>	<b>04/07/2017</b>

**Titre : *Le diagnostic génétique des amyotrophies spinales***

***Proximales à Constantine : à propos de 25 cas***

**Résumé :** Les amyotrophies spinales proximales ou SMA pour spinal muscular atrophy sont des affections neuromusculaires de transmission autosomique récessive, caractérisées par une dégénérescence progressive des motoneurons de la corne antérieure de la moelle épinière et souvent des motoneurons du bulbe à l'origine d'une atrophie et d'une faiblesse musculaire des muscles proximaux. Cliniquement ce sont des affections très hétérogènes. Selon l'âge de début et l'évolution de la maladie, on distingue classiquement quatre formes cliniques.

Sur le plan moléculaire, les SMA sont liées dans 98 % des cas à une délétion homozygote des exons 7 et ou 8 du gène SMN1 ou SMN2.

Les objectifs de notre travail dont les objectifs étaient de :

- Confirmer le diagnostic des patients présentant un phénotype SMA par la recherche de la délétion de l'exon 7 du gène SMN1.

- Etablir des corrélations phénotype / génotype chez ces patients.

Nous avons recruté 25 patients présentant le phénotype SMA appartenant à 17 familles, tous de l'Est Algérien colligés du service de neurologie du CHU Constantine. La recherche de la délétion de l'exon 7 du gène SMN1 a été réalisée par PCR digestion par l'enzyme de restriction DraI. 32% de nos patients sont de Sexe féminin et 68 % de sexe masculin avec un âge moyen de  $13,56 \pm 11$ ans. Nos patients sont dans 53% des cas familiaux et dans 47% des cas sporadiques et issus de mariages consanguins dans 44% des cas.

La classification clinique des patients en 04 types selon consortium international et selon Zerres et al était possible chez la majorité de nos patients. Dans notre étude l'EMG est revenu dans tous les cas, neurogène de type corne antérieur. En faveur d'une SMA. Les CPK-LDH étaient élevées chez 28% des patients seulement. L'étude génétique a été réalisée chez 25 patients et a confirmé le diagnostic de SMA chez 18 patients soit 72% en identifiant une délétion de l'exon 7 du gène SMN1

Nous n'avons pas trouvé de corrélation entre le phénotype et le génotype. La délétion de l'exon 7 du gène SMN1 a été retrouvé dans tous les types de SMA particulièrement chez 100% des patients SMA de type I, 40% des patients SMA de type II et 78% des SMA de type III ce qui est en accord avec de nombreuses études. Nos résultats concordent avec es données de la littérature.

**Mots clés : SMA, SMN1, Exon 7, PCR/RFLP**

**Laboratoire de biologie et de génétique moléculaire université 3 Boubnider Constantine**

