

ROYAUME DU MAROC
UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE



**ETUDE MOLECULAIRE DE LA SURDITE DE
PERCEPTION D'ORIGINE GENETIQUE
AU CHU HASSAN II FES (A PROPOS DE 60 CAS)**

MEMOIRE PRESENTE PAR:

Docteur BOUGUENOUCHE LAILA

Née le 02 Septembre 1982 à Meknès

**POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE SPECIALITE EN
MEDECINE**

OPTION : Génétique médicale

Sous la direction de:

Professeur OULDIM KARIM

Dedicaces

Je dédie ce travail à:

Mes parents

Mon Mari

Mes enfants Nora et Ahmed

Mon frère

Ma grande famille

Mes amis en particulier Abbassi Meriame et Sayel Hanane

Je vous aime tous

REMERCIEMENTS

A dieu

Je remercie le bon dieu tout puissant qui m'a donné la force et la volonté d'achever ce travail et je lui rend grâce, et au terme de ce dernier, il m'est particulièrement agréable d'exprimer ma reconnaissance et mes vifs remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à sa réalisation.

Principalement

Pr OULDIM Karim pour la formation que j'ai eu l'honneur de suivre sous sa responsabilité durant ces quatre années de résidanat.

Pr Bennis Sanae, je la remercie de m'avoir encouragé et m'avoir accordé toute sa confiance, sa disponibilité, son aide et ses conseils tout au long de ma formation.

Pr AMARTI Affaf chef de service du laboratoire d'analyses médicales au CHU HASSAN II Fès.

Je remercie toute l'équipe de l'unité de génétique médicale et d'oncogénétique pour leur gentillesse, collaboration, dynamisme, simplicité et bonne humeur qui m'ont beaucoup aidé à surmonter les difficultés

PLAN

I.	Introduction.....	11
II.	Généralités	14
	A. Rappel morphologique et histologique de l'appareil auditif.....	15
	B. Physiologie de l'audition	19
	C. Démarche diagnostique	22
III.	La surdité neurosensorielle d'origine génétique	25
	A. Modes de transmission	26
	1. Transmission autosomique récessive	26
	2. Transmission autosomique dominante	26
	3. Transmission liée à l'X	27
	4. Transmission par le génome mitochondrial	27
	B. Classification	29
	1. Surdités syndromiques	29
	2. Surdités non syndromiques	31
	C. Prise en charge et conseil génétique.....	33
IV.	La surdité liée aux mutations du gène <i>GJB2</i>	37
	A. Gène codant	38
	B. Protéine	39
	1. Définition	39
	2. Rôle.....	40
	C. Physiopathologie	41
	1. Mutations du gène GJB2	41
	2. Théories actuelles sur les mécanismes de surdité liée à la Connexine 26	43
	3. Corrélations génotype-phénotype	45
V.	Matériel et méthodes	47
	A. Critères d'inclusion des patients.....	48
	B. Prélèvements	48
	C. Techniques de préparation et de purification des acides nucléiques..	48
	1. Par sel	49
	2. Par Kit	50
	3. Dosage de L'ADN	54
	D. Amplification des séquences nucléotidiques par PCR	55
	1. Principe	55
	2. Condition de PCR	56

3. Témoins de la réaction PCR	58
4. Contrôle des produits PCR	58
E. Séquençages d'ADN	58
1. Purification par ExoSAP	59
2. Réaction de séquence par BigDye® Terminator v3. 1 Cycle Sequencing	59
3. Purification de la réaction de séquence avec le Kit BigDye- XTerminator	62
4. Détermination de la séquence	63
F. Les outils bioinformatiques	64
VI. Résultats	65
A. Données épidémiologiques	66
B. Données cliniques	67
C. Résultats de l'étude moléculaire	68
VII. Discussion.....	73
A. Analyse phénotypique	74
B. Implication du gène GJB2 dans la surdité non syndromique autosomique chez les patients étudiés	75
VIII. Conclusion	79
IX. Références	81

LISTE DES ABREVIATIONS

AD	Autosomique dominant
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
AR	Autosomique récessif
BDT	Technologie Big Dye Terminator
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CCE	Cellules ciliées externe
CCI	Cellules ciliées internes
CMV	Cytomégalovirus
Cx26	Connexine 26
dB	Décibel
ddNTP	Didéoxynucléotides interrupteurs de chaîne
dNTP	Deoxynucleotid
DFNA	Deafness, autosomique dominant
DFNB	Deafness, autosomique récessif
DFNX	Deafness, liée à l'X.
EDTA	Ethylène Diamine Tétracétique
EX	Exon
Exo	Exonucléase
FO	Fond d'œil
GJB2	Gap junction beta-2 protein
GJB6	Gap junction beta-6 protein
IC	Implant cochléaire
K+	Potassium
KID syndrome	kératodermie- ichthyose-surdité
MgCl ₂	Chlorure de magnésium
NaCl	Chlorure de Sodium
<i>NCBI</i>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OEA	Otoémissions provoquées auditifs
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEA	Potentiels évoqués auditifs
ROS	Reactive oxygen species
SAP	Phosphatase alcaline de crevette
Sec	Seconde
SLC26A4	Solute carrier family 26
TE	Tris EDTA buffer
tRNA	Acide ribonucléique de transfert
UV	Ultraviolet
UMGO	Unité de génétique médicale et d'oncogénétique

LISTE DE FIGURES

Figure n°1	Schéma de l'oreille humaine.	8
Figure n°2	Coupe de la cochlée dans l'axe du modiolus.	9
Figure n°3	Coupe axiale passant par le canal cochléaire avec agrandissement de l'organe de Corti.	10
Figure n°4	Modèle de transmission d'une maladie autosomique dominante monogénique, union d'un sujet malade et d'un sujet sain.	17
Figure n°5	Modèle de transmission d'une maladie autosomique récessive monogénique, union de deux sujets hétérozygotes.	17
Figure n°6	Modèle de transmission d'une maladie autosomique monogénique liée à l'X, union d'un homme sain et d'une femme conductrice.	18
Figure n°7	<i>GJB2</i> structure et localisation.	28
Figure n°8	Schéma d'une jonction communicante entre 2 cellules adjacentes.	29
Figure n°9	Configuration moléculaire des Gap jonctions cochléaires formées par l'union des connexines 26 et 30 au niveau de la membrane cellulaire.	29
Figure n°10	Localisations des mutations de la connexine 26 rapportées dans la littérature et liées à la surdité.	31
Figure n°11	Spectrophotomètre NANODROP	41
Figure n°12	Thermocycleur Applied Biosystem 2700.	44
Figure n°13	Mécanisme de la fluorescence par la technique du transfert d'énergie par résonance.	46
Figure n°14	Analyseur génétique 3500Dx.	48
Figure n°15	Répartition des sujets inclus dans l'étude.	50
Figure n°16	Répartition des sujets inclus dans l'étude en fonction de l'âge.	50
Figure n°17	Répartition des sujets inclus dans l'étude en fonction du sexe.	51
Figure n°18	Données du bilan audiolologique des cas étudiés.	51
Figure n°19	Electrophorèse sur gel d'agarose 2 % des produits d'amplification par PCR.	52
Figure n°20	Electrophérogramme de l'exon 2 du gène <i>GJB2</i> (mutation c. 35delG à l'état homozygote.	54
Figure n°21	Electrophérogramme de l'exon 2 du gène <i>GJB2</i> (mutation c. 35delG à l'état hétérozygote: séquences F et R).	54
Figure n°22	Electrophérogramme de l'exon 2 du gène <i>GJB2</i> (mutation c.598G>A à l'état hétérozygote: séquence F).	55
Figure n°23	Electrophérogramme de l'exon 2 du gène <i>GJB2</i> (mutation c.175G>C à l'état hétérozygote: séquence F).	55

LISTE DES TABLEAUX

Tableau n°1	Surdités syndromiques les plus fréquentes ou nécessitant une prise en charge spécifique AD: autosomique dominant, AR: autosomique récessif, ECG: électrocardiogramme, FO: fond d'œil.	20
Tableau n°2	Risque de récurrence d'une surdité génétique dans la fraterie.	25
Tableau n°3	Amorces utilisées pour les réactions de PCR.	42
Tableau n°4	Mélange réactionnel pour chaque région du gène <i>GJB2</i> pour un volume totale de 20 µl.	43
Tableau n°5	Programme de cycle de température au niveau du thermocycleur (Applied Biosystem).	43
Tableau n°6	Fréquence de la mutation 35delG dans la population étudiée.	53
Tableau n°7	Mutations du gène GJB2 identifiées dans la population étudiée.	55
Tableau n°8	Spectre et fréquence allélique des mutations du gène GJB2 dans la population étudiée	56
Tableau n°9	Génotypes retrouvés dans la population étudiée	56
Tableau n°10	Proportions des surdités liées aux mutations bi alléliques du gène GJB2 dans différentes populations	60

INTRODUCTION

La surdité constitue le déficit sensoriel le plus fréquent. Elle affecte environ 1 enfant sur 1000 et sa prévalence augmente avec l'âge [1]. Actuellement, l'origine génétique est incriminée dans 60–80 % des cas [2].

10 % des surdités génétiques sont syndromiques c'est-à-dire associées à d'autres signes et 90 % sont isolées.

Le mode de transmission autosomique récessif est prédominant (près de 80 %), les formes autosomiques dominantes (20 %), liées à l'X (1 %) et mitochondriales (<1 %) ont également été décrites.

Les surdités génétiques sont, dans la grande majorité des cas, des maladies monogéniques et la déficience auditive est le plus souvent due à une atteinte cochléaire [3].

Les différentes formes de surdité non syndromiques ont, en général, été caractérisées par une analyse de liaison génétique dans de grandes familles, permettant de définir un locus. Le gène a souvent été identifié dans un second temps. Une codification internationale a été établie pour nommer chaque locus de surdité non syndromique. Par convention et à mesure de la découverte des loci, le code commence soit par DFNA (pour deafness, autosomique dominant) soit par DFNB (pour deafness, autosomique récessif), soit par DFNX (pour deafness, liée à l'X). On donne ensuite un numéro par ordre de découverte : DFNB1 à 98, DFNA1 à 64. [3]

Ainsi plus de 67 gènes incriminés dans les surdités non syndromiques ont été identifiés à ce jour en particulier le gène *GJB2* localisé en 13q11, qui code pour la Connexine 26; protéine transmembranaire intervenant dans le transport intercellulaire au niveau de l'oreille interne. Ce gène est muté dans environ 10 % de toutes les surdités de l'enfant et dans plus de 50 % des surdités récessives non syndromiques. [5]

Plus de 100 différentes mutations et de nombreux polymorphismes de *GJB2* ont été décrits. La mutation, 35delG, représente 65 % des anomalies de ce gène dans

les populations caucasiennes. D'autres mutations fréquentes existent dans d'autres ethnies. Le taux de porteurs hétérozygotes sains dans la population caucasienne est estimé entre 1 et 3 %.

Ces mutations sont responsables d'une surdité neurosensorielle de transmission autosomique récessive (DFNB1), d'une surdité neurosensorielle beaucoup plus rare de transmission autosomique dominante (DFNA3), et de différentes surdités associées à des signes cutanés : syndrome de Vohwinkel (surdité associée à une hyperkératose palmoplantaire), syndrome de KID,

L'objectif de ce travail est la mise au point de l'étude moléculaire du gène *GJB2* au sein du service de génétique médicale et d'oncogénétique du CHU HASSAN II Fès afin de déterminer la prévalence et le spectre des mutations de ce gène et en particulier la mutation 35delG dans notre population, d'établir un phénotype clinique et de proposer un conseil génétique adéquat.

GENERALITES

La surdité est un état pathologique caractérisé par une perte partielle ou totale uni ou bilatérale du sens de l'ouïe. Deux grandes variétés de surdité doivent être distinguées :

- Les surdités de transmission qui sont dues soit à une pathologie de l'oreille externe, de l'oreille moyenne ou des deux.
- Les surdités de perception (ou de réception ou neurosensorielle) qui sont liées aux atteintes de l'oreille interne ou à celles des voies nerveuses.

Ces surdités de perception peuvent encore être classées en :

- cochléaire ou endocochléaire lorsque l'affection siège au niveau du limaçon,
- rétrocochléaire lorsque la lésion est située sur le premier neurone,
- centrale lorsque le deuxième et les troisièmes neurones sont en cause.

Une troisième variété peut être représentée par les surdités mixtes correspondant à l'association des surdités de perception et de transmission où l'une peut prédominer sur l'autre. [9]

Notre étude porte sur les surdités de perception.

A. Rappel morphologique et histologique de l'appareil auditif

1. Rappel anatomique de l'appareil auditif

L'oreille est un ensemble de cavités creusées dans le rocher; elle se divise en trois parties: oreille externe, oreille moyenne et oreille interne. (Figure 1)

- **L'oreille externe**

C'est la partie la plus externe de l'appareil auditif. Elle dérive de la première poche branchiale ectoblastique, qui émet d'une part, un cordon en profondeur qui se creuse pour former le conduit auditif externe et la couche externe du tympan, d'autre part six bourgeons aux dépens des deux premiers arcs branchiaux, qui donnent le pavillon.

- **L'oreille moyenne**

Creusée presque entièrement dans l'os temporal, elle présente à décrire la membrane tympanique, la caisse du tympan et son contenu, la cavité mastoïdienne et la trompe d'Eustache.

- **L'oreille interne**

Elle est composée d'une série de cavités creusées dans l'épaisseur du rocher, en dedans de la cavité tympanique, constituant le labyrinthe osseux. A l'intérieur de celui-ci est contenu le labyrinthe membraneux, d'où partent les voies nerveuses du nerf auditif.

Embryologiquement, le labyrinthe membraneux dérive de la placode otique, épaissement de l'ectoblaste qui apparaît au 23^{ème} jour. La placode s'invagine durant la cinquième semaine pour former l'otocyste qui prend une forme bilobée : la partie dorsale donnera le vestibule et la portion ventrale donnera le canal cochléaire. Un groupe de cellules se détache de la placode otique pour former le ganglion statoacoustique, dont la portion ventrale vient s'accoler au canal cochléaire et suit son enroulement, devenant le ganglion spiral. [10]

La cochlée représente l'organe de l'audition. Il s'agit d'un tube recouvert par une paroi osseuse, la capsule otique. Elle est formée de trois rampes enroulées en spirale autour d'un axe osseux portant le nom de modiolus. (Figure 2). Les rampes vestibulaire et tympanique sont remplies de périlymphe et forment le compartiment périlymphatique. Elles communiquent entre elles à la partie la plus apicale de la spirale cochléaire, par un orifice portant le nom d'hélicotrème et sont isolées de l'oreille moyenne à la partie la plus basale de la spirale cochléaire par la fenêtre ovale et la fenêtre ronde. Ces deux rampes entourent le canal cochléaire rempli d'endolymphe. [9]

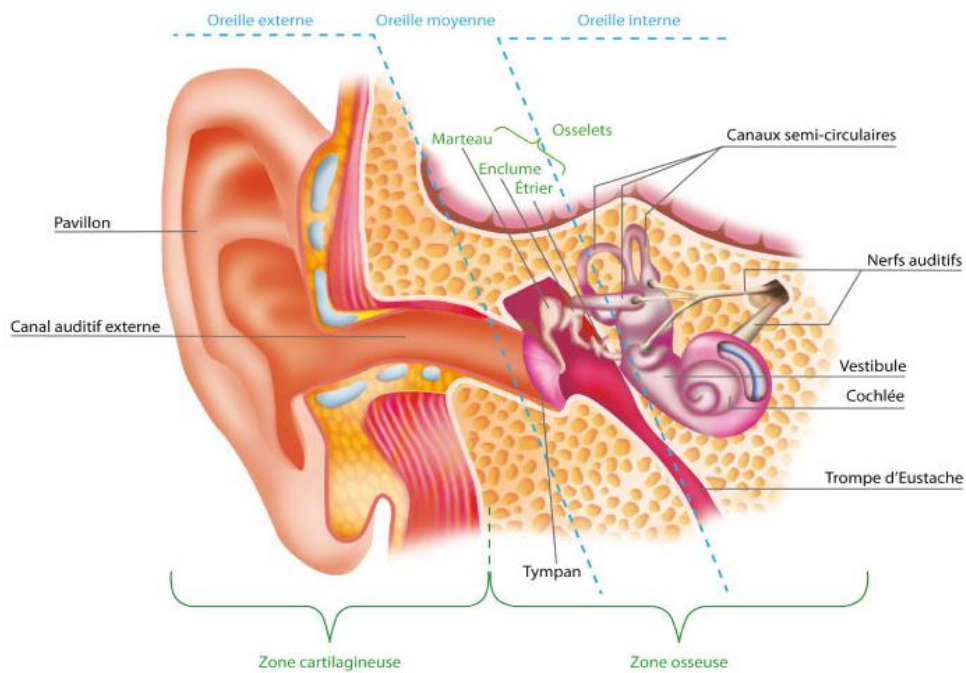


Figure n°1 : Schéma de l'oreille humaine[5]

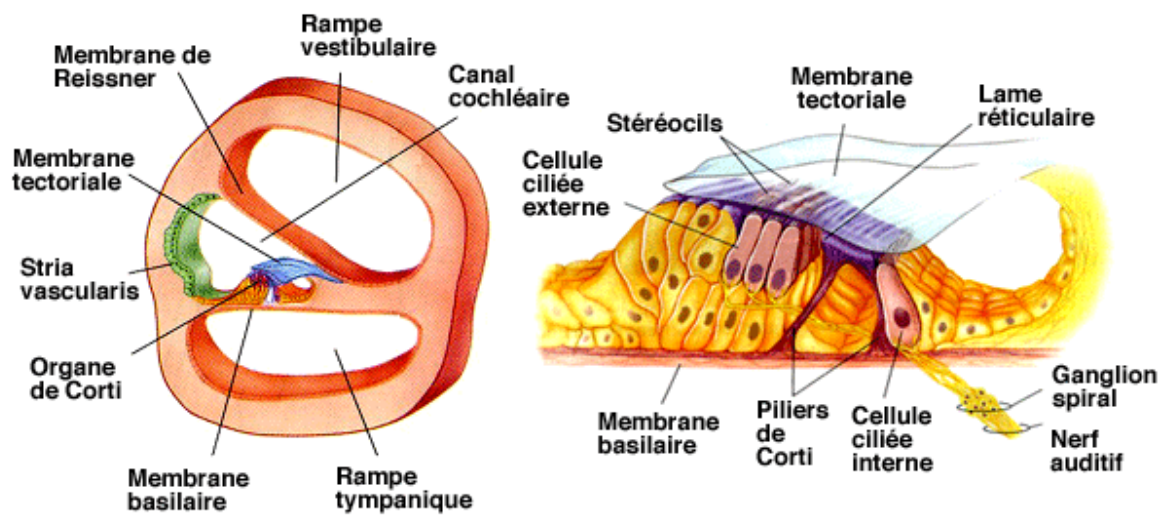


Figure n°2 : Coupe de la cochlée dans l'axe du modiolus[5]

2. Rappel histologique:

L'organe de Corti (figure n°3) est l'élément sensoriel où sont situés les récepteurs de l'audition. Il s'enroule de la base à l'apex de la spirale cochléaire et repose sur la membrane basilaire entre deux sillons: le sillon spiral interne et le sillon spiral externe. Il est composé de cellules sensorielles ciliées, de fibres nerveuses, de cellules de soutien et de cellules annexes non sensorielles [13–14].

Les cellules sensorielles sont représentées par trois rangées de cellules ciliées externes et une seule rangée de cellules ciliées internes. Les stéréocils, principalement constitués d'actine, surmontent les cellules ciliées et sont disposés sur trois rangées. Ils sont reliés entre eux par de nombreux liens constitués par l'association de plusieurs cadhérines 23. [9,10] Les plus longs stéréocils des CCE sont ancrés dans une structure amorphe recouvrant l'organe de Corti: la membrane tectoriale. Cette dernière est composée de fibres de collagène et par des protéines telles que l'A et B tectorine et l'otogeline.

L'organe de Corti reçoit une double innervation à la fois afférente et efférente.

L'innervation afférente provient des neurones de type I et II du ganglion spiral, dont les axones projettent vers les noyaux cochléaires. L'innervation efférente provient de neurones appartenant à deux systèmes distincts dont les corps cellulaires se situent dans les noyaux du tronc cérébral. Le prolongement axonal de l'ensemble de ces neurones constitue le nerf cochléaire.

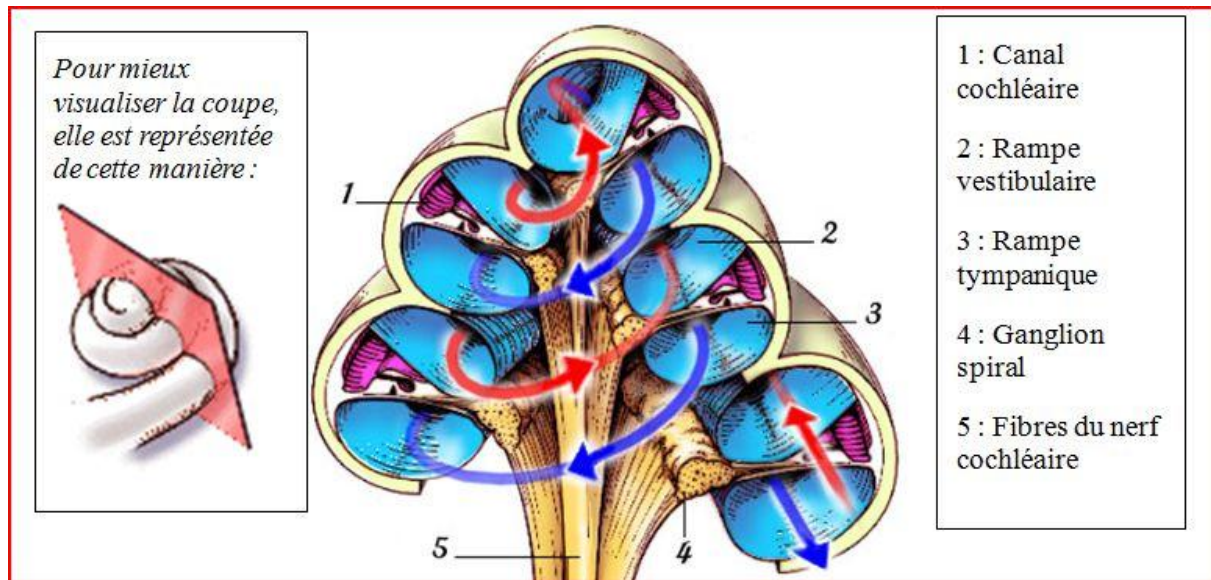


Figure n°3: Coupe axiale passant par le canal cochléaire avec agrandissement de l'organe de Corti[5]

B. Physiologie de l'audition

L'audition est la fonction sensorielle permettant de capter les sons grâce à l'oreille et de transmettre ces sons par l'intermédiaire du nerf cochléaire au cerveau qui les reçoit et les analyse [15]

L'oreille externe et l'oreille moyenne jouent un rôle mécanique qui est la transmission du message sonore, alors que l'oreille interne se charge d'un mécanisme mixte: mécanique et neuro-sensoriel.

- **L'oreille externe**

L'oreille externe par le conduit auditif externe et le pavillon amplifie la pression sonore et favorise la localisation des sources sonores par le pavillon.

- **L'oreille moyenne**

L'oreille moyenne est le siège des phénomènes mécaniques. L'onde mécanique transmise par l'oreille externe est récupérée par la membrane tympanique. Les mouvements de cette membrane sont transmis à la chaîne ossiculaire puis aux

liquides labyrinthiques. Les osselets de l'oreille moyenne sont indispensables à la transmission sans déperdition du stimulus sonore.

L'oreille moyenne est un adaptateur mécanique d'impédance qui lui-même est soumis à un système musculaire de régulation. [15]

Le muscle du marteau tire sur la chaîne ossiculaire tandis que celui de l'étrier tire sur la tête de ce dernier. Leurs actions mécaniques antagonistes permettent de protéger l'oreille interne contre les sons intenses (supérieure à 85–90 dB).

- **L'oreille interne**

Au niveau de l'oreille interne, la transmission de l'onde sonore est d'abord mécanique : c'est le rôle de la membrane basilaire et des liquides labyrinthiques.

Au sein de la périlymphe, le mouvement du piston de l'étrier provoque une onde liquidienne mettant la membrane basilaire en mouvement, c'est l'onde propagée. Cette membrane est alors animée d'un mouvement de déplacement de haut en bas, ce qui provoque au niveau des cils un phénomène de déplacement de haut en bas, ce qui provoque au niveau des cils un phénomène de torsion et de cisaillement. Ces mouvements ciliaires (cisaillement et torsion) vont engendrer le potentiel récepteur qui donne naissance au potentiel d'action lorsqu'un seuil de stimulus est atteint. L'organe de Corti est donc un transformateur d'énergie mécanique en énergie électrique. [15–16]

Les potentiels récepteurs provoquent à l'intérieur de la cellule ciliée, la libération d'un médiateur chimique. Ce médiateur chimique va donner naissance à des impulsions au niveau des synapses nerveuses d'où le potentiel d'action.

L'influx nerveux à partir de l'organe de Corti va parcourir les trois voies nerveuses de l'audition avant de parvenir au cortex temporal.

- **Transduction**

La transduction de l'information mécanique en signal électrochimique peut se résumer en cinq étapes :

a– Propagation de l'onde mécanique dans les fluides cochléaires:

La vibration sonore transmise à la périlymphe par la chaîne des osselets fait onduler la membrane basilaire. L'onde mécanique se propage le long de la membrane basilaire avec un maximum d'amplitude situé d'autant plus près de la base que la fréquence est aiguë (tonotopie passive).

b– Stimulation des CCE:

Le mouvement de cisaillement de la membrane tectoriale provoque la déflexion des stéréocils des CCE, implantés dans la membrane tectoriale puis la déflexion de l'ensemble des stéréocils grâce aux « tip-links » et aux liens transversaux. Le mouvement des stéréocils favorise l'ouverture des canaux cationiques non spécifiques, situés à chaque extrémité des stéréocils, laissant entrer le potassium de l'endolymphe dans les CCE. [14–15] C'est une transduction mécano électrique.

c– Mise en jeu des mécanismes actifs :

Les CCE, dépolarisées par l'entrée de potassium se contractent. Cette contraction modifie le couplage entre la membrane basilaire et la membrane tectoriale et amplifie localement les vibrations de la membrane basilaire grâce aux mécanismes actifs, permettant l'acquisition d'une tonotopie très fine; c'est une transduction électromécanique. Le fonctionnement de la CCE est donc basé sur une double transduction mécano électrique puis électromécanique.

d– Stimulation des CCI :

De la même façon que pour la CCE, la CCI correspondant à la fréquence de stimulation est activée en réponse à la déflexion de ses stéréocils. À la différence des CCE, les plus grands stéréocils des CCI ne sont pas ancrés à la membrane tectoriale. La déflexion des stéréocils des CCI est favorisée par le contact direct avec la bande de Hensen de la membrane tectoriale. L'ouverture des canaux mécanosensibles entraîne

l'entrée de potassium et par conséquent dépolarise la CCI, avec création d'un potentiel d'action. [23]

e– Libération du neurotransmetteur:

La dépolarisation de la CCI provoque l'ouverture de canaux calciques. L'influx de calcium entraîne la fusion des vésicules synaptiques à la membrane plasmique. La sécrétion synaptique mobilise en partie les vésicules situées sur la face inférieure des corps synaptiques et résulte d'une libération multivésiculaire. Le neurotransmetteur des CCI, le glutamate, libéré dans la fente synaptique active alors les récepteurs AMPA présents sur les fibres du nerf auditif. Les cinétiques d'activation et de désensibilisation de ces récepteurs sont très rapides, ce qui permet une réponse des fibres du nerf auditif appropriée au stimulus acoustique. Un message nerveux va alors être véhiculé par les neurones auditifs de type I et envoyé vers le système nerveux central. [23]

C. Démarche diagnostique

La démarche diagnostique s'attache à remplir 3 objectifs. Les deux objectifs prioritaires sont de confirmer le diagnostic de surdité et d'en définir le degré; le troisième est d'identifier la cause.

1. Diagnostic audiolologique

- **Les potentiels évoqués auditifs (PEA) et electrocochleographie**

Ils permettent l'étude objective par sommation et moyennage des réponses à un stimulus, grâce à des électrodes placées au niveau du vertex, au niveau des mastoïdes ou au niveau du labyrinthe. En dehors de quelques cas d'intérêt médico-légal pour certaines expertises, cet examen a essentiellement deux grands ordres d'intérêt : d'une part dans la recherche du seuil auditif chez un très jeune enfant,

d'autre part pour détecter des anomalies morphologiques, des réponses aux fortes intensités lorsqu'on suspecte une affection du nerf auditif (neurinome de l'acoustique) ou du tronc cérébral. La PEA permet d'apporter des arguments de poids pour localiser l'atteinte rétro-labyrinthique. [30]

- **La tympanométrie**

Elle donne de façon objective de très utiles renseignements sur la valeur de la trompe d'Eustache et du système tympano-ossiculaire, l'existence éventuelle de liquide dans la caisse, la présence de recrutement (signant une atteinte endocochléaire) ou d'une atteinte rétro-labyrinthique. Elle étudie les modifications de la compliance du système tympano-ossiculaire en fonction des variations de pression acoustique dans le conduit auditif externe, hermétiquement obstrué par un embout à type de bouchon.

- **Otoémissions provoquées(OEA)**

Non seulement l'oreille entend, mais elle émet des sons en réponse à une stimulation sonore. La présence d'otoémissions permet d'affirmer que s'il y a surdité, elle ne dépasse pas 30 à 40 dB. Cette recherche est d'un très grand intérêt pour l'étude de l'audition des nourrissons.

2. Diagnostic étiologique

Une fois le diagnostic de surdité est confirmé, on organise un bilan étiologique. Il n'existe pas de consensus officiel. Le bilan habituellement demandé chez l'enfant est le suivant [11]:

- Une consultation en ophtalmologie (bilan étiologique et recherche d'un deuxième déficit associé à compenser).
- Une consultation en cardiopédiatrie en cas de surdité sévère et profonde à la recherche du syndrome de Jervell et Lange Nielsen.
- Sérologie CMV.

- Scanner des rochers.
- Consultation génétique.
- Bandelettes urinaires.
- La recherche de mutations de la connexine 26 est demandée systématiquement sauf en cas de surdité syndromique ou d'une étiologie confirmée.
- Un caryotype est effectué en cas de surdité syndromique ou d'anomalies morphogéniques associées.

LA SURDITE NEUROSENSORIELLE D'ORIGINE GENETIQUE

A. Modes de transmission

La transmission familiale des surdités répond :

- dans 80–85 % des cas à un mode autosomique récessif,
- dans 10–15 % des cas à un mode autosomique dominant,
- dans 1 à 3 % des cas à la transmission récessive liée au sexe,
- dans un pourcentage non encore déterminé à une transmission mitochondriale (l'anomalie est transmise uniquement par les mères).

1. Le mode autosomique récessif(AR): Figure 5

Dans ce mode de transmission, les deux allèles du gène doivent être mutés pour que le sujet soit sourd. Les deux parents porteurs de l'allèle muté du gène en cause (porteurs hétérozygotes) sont normoentendants et, statistiquement, un quart des enfants (garçon ou fille) sont sourds, porteurs de mutations sur les deux allèles du gène (homozygotes). Le mode de transmission autosomique récessif est favorisé par la consanguinité. [19]

On estime qu'environ trois quarts des surdités non syndromiques se transmettent sur le mode AR et ce mode est le deuxième en fréquence dans les surdités syndromiques.

2. Le mode autosomique dominant (AD): Figure 4

Dans ce mode de transmission, les sujets ayant un seul allèle muté (hétérozygotes) sont sourds.

Dans les familles atteintes de surdité autosomique dominante, l'un des parents est sourd et porte sur un seul allèle du gène la mutation pathogène, mutation qu'il va transmettre à la moitié de ses enfants qui seront alors sourds. L'expressivité est très souvent variable dans ce mode de transmission, plusieurs sujets atteints dans la

famille pouvant présenter des surdités de sévérité très différente. Lorsque la surdité est syndromique, les signes associés au syndrome peuvent être absents ou discrets chez certains sourds de la famille, chez qui la surdité paraît alors isolée et certains membres porteurs de l'anomalie génétique peuvent être entendants.

3. Le mode de transmission lié à l'X : Figure 6

Le gène en cause est situé sur le chromosome X. Chez les garçons qui n'ont qu'un X, la maladie s'exprime et ils sont donc atteints de surdité, alors que les filles sont porteuses de la mutation mais entendantes. Chez les femmes, lorsque l'X porteur de la mutation génétique est en général « compensé » par le deuxième X normal, la surdité est récessive liée à l'X. Rarement, comme dans le syndrome d'Alport, la surdité est dite dominante liée à l'X, et les femmes ne sont alors pas seulement en mesure de transmettre la surdité, elles en sont aussi atteintes, de façon moins sévère que les garçons.

4. Le mode de transmission mitochondrial :

Le génome mitochondrial est un petit fragment d'acide désoxyribonucléique (ADN) situé hors du noyau de la cellule, dans la mitochondrie. Il est transmis uniquement par la mère. Lorsqu'un gène de surdité est situé sur l'ADN mitochondrial, l'arbre est caractéristique car hommes et femmes peuvent être sourds, mais seules les femmes pourront transmettre la surdité à leurs enfants qui sont en théorie tous sourds dans la fratrie.

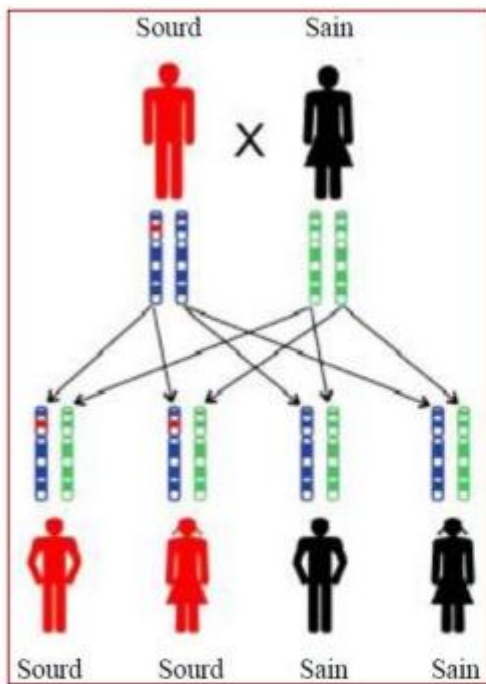


Figure n° 4 modèle de transmission d'une maladie autosomique dominante monogénique. Union d'un sujet malade et d'un sujet sain.

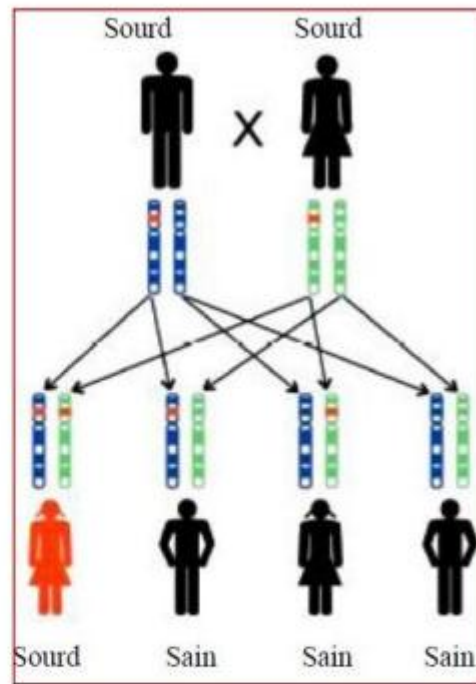


Figure n° 5 Modèle de transmission d'une maladie autosomique récessive monogénique. Union de deux sujets hétérozygotes

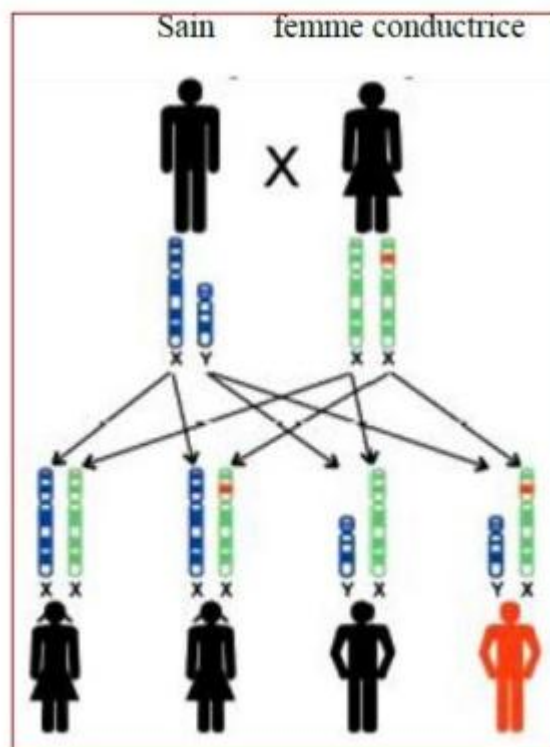


Figure n° 6 Modèle de transmission d'une maladie monogénique liée à l'X. Union d'un homme sain et d'une femme conductrice.

B. Classification

1. Surdités syndromiques

Les surdités syndromiques associent une surdité à des signes cliniques impliquant d'autres organes. Elles ne rendent compte que d'une faible proportion des surdités de l'enfant (10 à 15 % environ) et une part mal connue, probablement inférieure, des surdités de l'adulte.

Ces surdités peuvent être neurosensorielles ou transitionnelles (leur mode de transmission dans les familles est variable d'un syndrome à l'autre). [41]

Environ 400 syndromes avec surdité ont été décrits, et plus d'une centaine de gènes sont identifiés à ce jour. Il est cependant important de connaître et de rechercher les principaux syndromes car la prise en charge et le bilan étiologique seront différents d'une surdité non syndromique.

Cependant, la surdité est le plus souvent patente et le reste des éléments cliniques du syndrome sont plus difficilement décelables ou surviennent plus tardivement. Par conséquent, certains enfants sont, à tort, initialement étiquetés comme atteints de surdité non syndromique.

En raison du très grand nombre de syndromes rares avec surdité, toute pathologie malformative chez l'enfant doit faire pratiquer un bilan auditif systématique. De plus, pour les surdités syndromiques comprenant une atteinte malformative cranio-faciale, la surdité est très souvent majorée par une otite chronique, et une surveillance otologique régulière s'impose.

Les anomalies du génome mitochondrial provoquent principalement des problèmes neuromusculaires (encéphalopathies, myopathies.) et métaboliques (diabète) auxquels s'associe fréquemment une surdité de perception congénitale ou évolutive. Il n'y a pas une mutation spécifique de cette maladie mais plusieurs mutations possibles du génome mitochondrial (mutations des gènes de tRNA). [42]

Le Tableau 1 résume les sept surdités syndromiques les plus importantes et qui doivent être connues des différents spécialistes prenant en charge des surdités en raison de leur fréquence et/ou de leur gravité potentielle.

Tableau n°1 : Surdités syndromiques les plus fréquentes ou nécessitant une prise en charge spécifique AD : autosomique dominant, AR : autosomique récessif, ECG : électrocardiogramme, FO : fond d'œil [41]

Nom du syndrome	Mode de transmission	Gènes en cause	Principaux signes cliniques	Examens nécessaires
Waardenburg type I	AD (expressivité variable)	PAX3	Mèches blanches Yeux vairons ou très bleus Dépigmentation rétinienne au FO	FO
Waardenburg type II	AD (expressivité variable)	MTIF SLUG		FO
Waardenburg type III	AD (expressivité variable)	PAX3	+/- malformations des extrémités Dystopie canthale	FO
Waardenburg type IV	AR	EDNRB EDN3 SOW10	+/- maladie de Hirschprung	FO
Branchio-oto-rénal	AD (expressivité variable)	EYA1AUTRE G7NE SUR 1q31	Anomalies de l'oreille externe et/ou moyenne Fistules ou kystes branchiaux Malformations rénales	Echographie rénale
Stickler	AD (expressivité variable)	STL1 STL2 STL3	Fente palatine Association de Robin Anomalies squelettiques	Examen ophtalmologique
Usher	AR	MYOVI CDH23 PCDH15 USH1C SANS USH2A USH3	Rétinite pigmentaire progressive aboutissant à la cécité	Examen ophtalmologique + FO électrorétinogramme
Pendred	AR	PDS	Goitre Malformation de l'oreille interne	Scanner des rochers scintigraphie thyroïdienne avec test au perchlorate
Jervell et Lange-Nielsen	AR	KVLQT1 KCNE1	Malaises, mort subite	ECG
Alport	Dominant lié à l'X AR AR	COL4A3 COL4A4 COL4A5	Hématurie puis protéinurie => insuffisance rénale	Bandelettes urinaires

2. Surdités non syndromiques

Les surdités isolées représentent les 2/3 des surdités d'origine génétique ; le déficit auditif est le seul signe présenté par l'enfant ou l'adulte. On estime à près de 120 le nombre de gènes impliqués. Ces loci se répartissent de la façon suivante : DFNA1 à 64, DFNB1 à 95, DFNX1 à 5, DFNY. [8]

Au sein de ces loci, 67 gènes sont identifiés, auxquels on peut ajouter sept mutations du génome mitochondrial. Ces surdités sont classées selon leur mode de transmission.

Les formes autosomiques récessives sont les plus fréquentes et la surdité est en général congénitale. Dans les formes dominantes, la surdité est le plus souvent progressive ou d'apparition retardée, au cours de l'enfance ou à l'âge adulte.

a- Les formes autosomiques récessives ou DFNB :

Ce sont les formes les plus fréquentes. Elles représentent 80 % des cas de surdité non syndromique. Actuellement, plus de 95 locis sont décrits (DFNB1 à 95) [45]

- La DFNB1, liée à la mutation du gène de la Connexine 26 (CX26 ou *GJB2*), rend compte de près de 50 % des surdités héréditaires ou familiales de l'enfant et 40 % des cas de surdités sporadiques en France. Une mutation particulière 35delG est largement prédominante (70 % des mutations détectées).

La déficience auditive est congénitale, peu ou pas progressive, légère à profonde. Les courbes audiométriques sont plates ou descendantes. TDM et épreuves vestibulaires sont normales.

Les porteurs hétérozygotes sont fréquents en France : 1 % population et le diagnostic positif se fait par biologie moléculaire.

- D'autres gènes de connexine : 43, 30(*GJB6*), 31 peuvent être en responsable à moindre fréquence du même phénotype. Des grandes délétions du gène

GJB6 ont été identifiées comme pouvant causer une surdité DFNB1. Ces délétions dont *del(GJB6-D13S1830)* et *del(GJB6-D18S1854)* peuvent être soit homozygotes soit associées en trans à une mutation de *GJB2*.

- La surdité DFNB4, deuxième en fréquence (5 à 6 % des enfants sourds), est liée à une mutation du gène de la pendrine (*SLC26A4*). Elle ressemble en tous points à celle du syndrome de Pendred dû au même gène mais reste isolée ; sans atteinte thyroïdienne. La surdité prédomine sur les fréquences aiguës, moyenne à profonde, progressive et évolutive associant des troubles vestibulaires.

L'imagerie des rochers est l'élément fondamental pour rattacher une surdité isolée à une anomalie du gène de la pendrine (malformation de l'oreille interne type dilatation de l'aqueduc du vestibule et/ou dilatation cochléovestibulaire).

- DFNB9, liée au gène de l'otoferline qui code pour une protéine exprimée dans les CCI.

La surdité est sévère à profonde. Une des causes de faux négatifs : otoémissions normales dans les premières années, mais les PEA sont altérés (neuropathie auditive). Il s'agit d'une atteinte cochléaire avec bon résultat de l'implant cochléaire. [45]

b- Les formes autosomiques dominantes ou DFNA :

Elles représentent 12 à 15 % des cas de surdité isolée. [48]

- DFNA2 semble être une forme fréquente de surdité autosomique dominante. Il s'agit d'une surdité de perception débutant sur les fréquences aiguës, progressive, d'environ 1 dB par an.
- DFNA3 liée au gène *GJB2*.
- DFNA9 liée au gène *COCH*, est responsable d'une atteinte des fréquences aiguës chez l'adulte jeune puis évolue rapidement pour atteindre toutes les fréquences.

c- Les formes liées à l'X ou DFN :

Elles représentent 1 à 3 % des cas de surdité isolée. La forme la plus fréquente (DFN3) est due à des mutations du gène *POU3F4*. Elles représenteraient 0,5 % des surdités de l'enfant. [25] Il s'agit, chez un garçon, d'une surdité mixte, sévère à profonde, rapidement progressive, débutant dans l'enfance, associée à une dysfonction vestibulaire.

La TDM montre souvent une dilatation majeure du CAI et cochléovestibulaire. Elle présente une contre-indication chirurgicale vue le risque de cophose lors de la platinectomie.

d- Surdité mitochondriale :

Plusieurs mutations de l'ADN mitochondrial sont impliquées dans des surdités isolées. Il s'agit essentiellement de mutations ponctuelles spéciales (mutation spécifique du gène *12S rRNA* (1555 A>G), mutations des tRNA (Ser) et tRNA (Leu). Ces mutations ne vont engendrer la surdité que si elles entrent en contact avec des aminoglycosides contenu par exemple dans les antibiotiques comme la gentamicine ou la streptomycine. C'est un exemple type de maladie multifactorielle. [19]

C. Prise en charge et conseil génétique

Lorsque le diagnostic est posé, la prise en charge doit être pluridisciplinaire. 2 moyens importants vont permettre à l'enfant l'apprentissage des modes de communication : il s'agit de l'appareillage auditif et de la rééducation orthophonique. [30]

1. L'appareillage auditif

➤ Les prothèses auditives

Les aides auditives permettent de capter l'information sonore puis de l'amplifier de façon adaptée au déficit auditif de l'enfant. Les réglages pour l'audioprothésiste seront différents qu'il s'agisse d'un enfant ou d'un adulte. Une réhabilitation prothétique est recommandée systématiquement chez tous les enfants dont le seuil auditif est supérieur à 40 dB pour les deux oreilles.

➤ L'implant cochléaire

L'implant cochléaire (IC) est une prothèse auditive implantable qui permet la transduction du signal acoustique en un signal électrique, rôle effectué normalement par les cellules ciliées internes. En cas de surdité ces cellules sont absentes ou en nombre insuffisant, l'IC va alors assurer cette transduction.

L'implant cochléaire représente alors l'appareil prothétique le plus adapté pour rétablir, du moins en partie, les fonctions d'élaboration auditive puisqu'il stimule directement le nerf acoustique, contournant la cochlée abîmée.

Les indications classiques d'implantation cochléaire sont les suivantes :

- Âge à l'implantation : elle doit être la plus précoce possible, après la réalisation d'un bilan de surdité, d'un bilan orthophonique et d'un essai prothétique. En ce qui concerne les surdités congénitales, l'âge d'implantation se situe en général entre 18 mois et cinq ans car il est à présent prouvé qu'une intervention précoce donne un meilleur pronostic sur le développement de la communication orale, certains auteurs proposant même une implantation avant l'âge de 18 mois. [30–32]
- Audiométrie : en cas de surdité profonde, l'IC est indiquée lorsque le gain prothétique ne permet pas le développement du langage oral. Par contre en cas de surdité sévère, l'IC est indiquée lorsque le seuil d'intelligibilité de mots en liste ouverte est inférieur à 50 %.

- Absence de contre-indication médicale (absence de pathologie de l'oreille moyenne) ou radiologique (anomalie de la cochlée).

2. La rééducation orthophonique

Elle est mise en place après une évaluation des capacités de communication et permet un accompagnement parental dans la stimulation verbale et non verbale. La prise en charge orthophonique s'étale sur de nombreuses années.

Lorsque les enfants sont sourds congénitaux, l'orthophonie a pour but de stimuler l'éveil auditif, de mettre en place des aides à la communication et de favoriser le langage oral.

3. Quelques thérapies géniques

Il existe actuellement quelques avancées dues aux progrès scientifiques et qui pourront très bien s'appliquer au traitement de la connexine 26. Il existe un projet européen depuis 2005 qui permet de grandes études sur les surdités génétiques. Ce projet dit EuroHear représente au total pas moins de vingt-deux laboratoires soit deux cent cinquante scientifiques d'une dizaine de pays. Un regroupement d'experts pour décrypter à la fois la physiopathologie des surdités comme les mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent le fonctionnement normal de la cochlée. Le programme s'affiche sous la forme d'un slogan : "Bringing the Genetic Basis of Deafness to Light" ("Mettre en lumière les bases génétiques de la surdité").

L'application thérapeutique a une place importante dans ce projet. Elle en est même l'objectif ultime et laisse la possibilité, à terme en fonction du succès de ce projet, de prévenir l'apparition de la presbyacousie. Le conseil génétique dépend du mode de transmission. Le diagnostic pré natal et pré implantatoire reste possible si la mutation est connue. (Tableau 2)

Tableau 2 : Risque de récurrence d'une surdité génétique dans la fraterie.			
Mode de transmission	Le sujet sourd	Les parents	Le risque de surdité dans la fraterie
Autosomique récessif	Homozygote	Hétérozygotes sains ou sourds	25 %
Autosomique dominant	Hétérozygote	Hétérozygotes et un des parents est sourd	50 %
Lie à l X	Homozygote si féminin	Mère	50 % de frères atteints
	Hétérozygote si masculin	hétérozygote conductrice et père hétérozygote sain	· 50 % de sœurs
Lie à l X		Mère saine et père hétérozygote sourd	conductrices 100 % de fils sains · 100 % de filles conductrices
Mitochondrial	Mutation mitochondriale	Mère sourde et père sain ou sourd	100 %. L'expression dépend du pourcentage des cellules mitochondriales mutées

LA SURDITE LIEE A DES MUTATIONS DU GENE *GJB2*

A. Gène codant

Quatre gènes de connexine, exprimés dans l'oreille interne, peuvent être impliqués dans des surdités isolées ou syndromiques :

- *GJB2* (connexine 26, en 13q11. q12)
- *GJB6* (connexine 30, en 13q11. q12)
- *GJB3* (connexine 32, en Xq13. 1)
- *GJB1* (connexine 31, en 1p34)

Le gène *GJB2* MIM121011 (Gap Junction protein Beta 2, 26 kDa) codant pour la connexine 26 est un petit gène constitué de deux exons, le premier exon n'est pas transcrit, le deuxième constitue la partie codante du gène. (Figure 7)[28–34]

Le gène *GJB2* est situé avec le gène *GJB6* sur le locus DFNB1 qui est localisé sur le bras court du chromosome 13 (13q12. 11) (chr13 :19659609–19665037). Ce locus est le premier locus responsable de surdité neurosensorielle autosomique récessive à être identifié par Guilford et al en 1994 chez une famille tunisienne. *GJB6* se trouve sur le même chromosome, en position télomérique (chr13 :19694102–19703067)

Près de 150 variations nucléotidiques de ce gène ont été rapportées incluant 25 polymorphismes. Le caractère délétère de certains allèles est encore controversé tel que les mutations M34T, V37I et R127H.

La mutation 35delG secondaire à une délétion d'un nucléotide (guanine) en position 35 est la plus fréquente dans les pays occidentaux et méditerranéens. [9–34]

Elle entraîne un décalage du cadre de lecture et aboutit donc à l'apparition d'un codon stop prématuré au codon 13 et par conséquent à la formation d'une protéine tronquée non fonctionnelle. D'autres mutations majoritaires sont retrouvées dans certaines populations : 167delT dans la population juive ashkénaze, 235delC au Japon, en Chine et en Corée ...

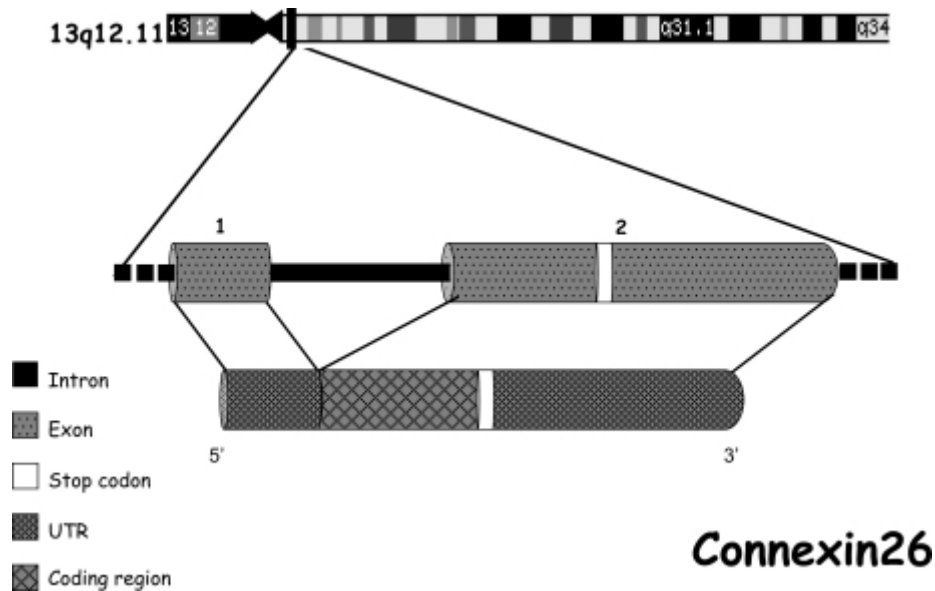


Figure 7: *GJB2* structure et localisation [34]

B. Protéine

1. Définition

Les connexines sont de petites protéines transmembranaires, impliquées dans la formation de jonctions communicantes (GAP junctions) entre cellules adjacentes, pour la majorité des cellules de l'organisme. (Figure n°8) La jonction communicante est formée de deux connexons, un par membrane. Chaque connexon est un hexamère formé de 6 connexines ménageant entre elles un canal hydrophile de 2 nm de diamètre. Les connexines possèdent quatre domaines transmembranaires (M1 à M4), dont le troisième, le plus hydrophile, constitue l'intérieur du canal. Les extrémités amino- et carboxy-terminales sont cytoplasmiques et les deux boucles extracellulaires sont responsables de l'interaction entre deux connexons. Les connexines diffèrent principalement par la longueur et la composition de leur extrémité carboxy-terminale. Quinze connexines différentes sont actuellement connues chez les mammifères. Elles sont désignées en fonction de leur poids moléculaire ; par exemple, la connexine 26 a un poids moléculaire de 26,000 daltons. [38-39]

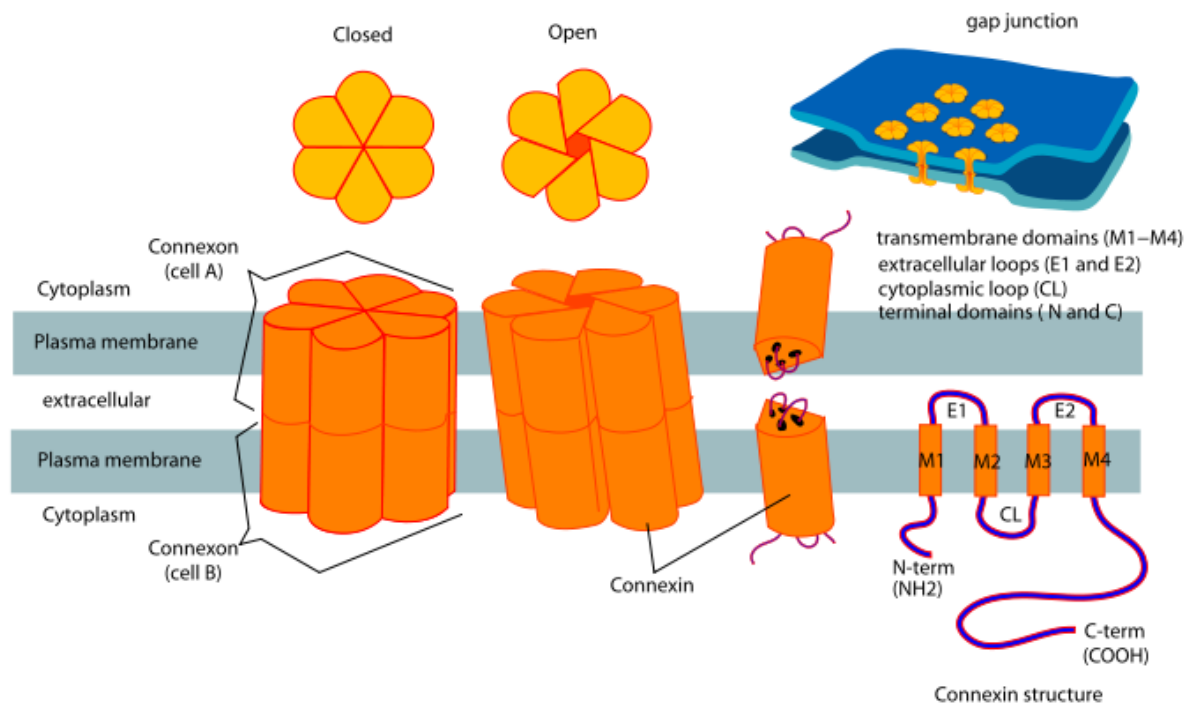


Figure n°8: Schéma d'une jonction communicante entre 2 cellules adjacentes [38]

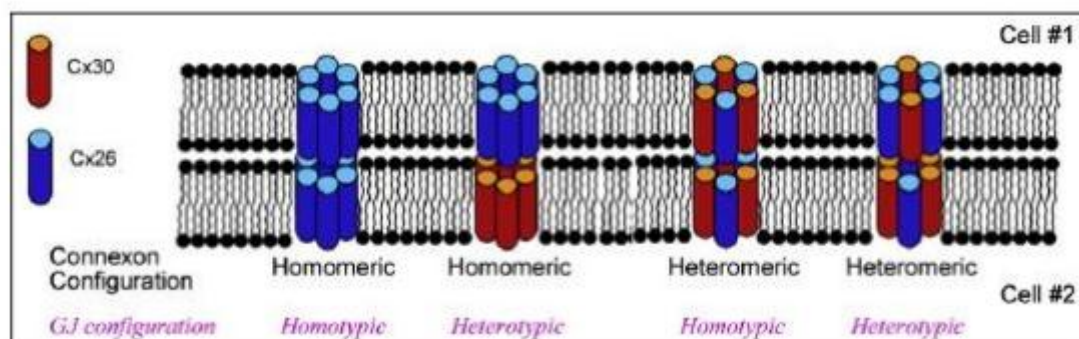


Figure n°9: Configuration moléculaire des Gap junctions cochléaires formées par l'union des connexines 26 et 30 au niveau de la membrane cellulaire [38]

2. Rôle :

Durant le développement embryonnaire l'expression de la connexine 26 ainsi que la connexine 30 a été détectée dès 11 semaines de gestation. Le taux adulte est atteint à 20 semaines de gestation.

Des études d'immunomarquage sur des cochlées de souris ont montré que la connexine 26 est présente au niveau du limbe spiral, du ligament spiral, des cellules de soutien de l'organe de Corti, des cellules ciliées internes et externes et au niveau de la strie vasculaire ainsi que sur la plupart (> 85 %) des GAP jonctions de la cochlée. [50–56]. Il a été démontré par co-immunoprécipitation que la connexine 26 est présente seule ou associée à la connexine 30 sur une même GAP jonction.

Ces études laissent suggérer que la connexine 26 ainsi que la connexine 30 sont impliquées dans le recyclage du potassium (K⁺) en facilitant son transport rapide à travers le réseau des cellules de soutien vers la strie vasculaire, où il est activement attiré vers l'endolymph. Une théorie plus récente, envisage une possible contribution du réseau de Gap jonctions cochléaire à l'homéostasie de l'épithélium sensoriel avasculaire de l'organe de Corti.

C. Physiopathologie

1. Mutations du gène de la connexine26 : Figure 10

a– Mutations empêchant la formation de Gap junctions :

Le cycle de vie de la connexine 26 comporte la synthèse de la protéine, son transport vers la membrane plasmique, son insertion membranaire et la formation de connexons puis sa dégradation. Ce type de mutations peut créer un dysfonctionnement ou une dégradation prématurée de la connexine avant son arrivée au niveau de la membrane cellulaire ou encore affecter les liaisons avec d'autres protéines intracellulaires. [62]

b– Mutations entraînant la formation de Gap junctions non fonctionnelles :

Le couplage ionique intercellulaire est affecté, à l'origine d'un dysfonctionnement de la jonction intercellulaire ou encore d'une anomalie d'alignement de deux connexons.

c– Mutations entraînant une perte spécifique dans le couplage biochimique intercellulaire :

Ce type de mutations modifie la perméabilité des Gap jonctions pour certaines molécules. Chang et al. [43] a mis en évidence, chez des souris présentant ce type de mutations de la Cx30, une réduction dramatique du transport du glucose par les Gap jonctions avec des taux élevés de radicaux libres dans les cellules de soutien de la cochlée.

Cette étude laisse suggérer l'hypothèse que le transport du glucose au niveau des Gap jonctions pourrait également être perturbé en cas de mutation de la Cx26. Le glucose étant la source majeure d'énergie pour l'activité métabolique des cellules, un déficit chronique au niveau de l'organe de Corti où la microcirculation est généralement pauvre, peut avoir des effets néfastes sur la survie et les fonctions cellulaires. [62–64]

d– Mutations causant un gain de fonction : hémi canal anormal s'ouvrant à l'état de repos :

Une mutation particulière de la Cx26 (G45E) est responsable d'un changement de charge de la chaîne d'acide aminé du neutre au négatif. Il est donc probable qu'elle affecte la fixation du Ca^{2+} aux hémi canaux. Les essais de marquage par colorant montrent, qu'en présence de concentrations extra cellulaires normales en Ca^{2+} , survient une fuite à travers les canaux des Gap jonctions, ce qui crée une surcharge et finalement une mort cellulaire. Stong et al. [45] rapportent la survenue d'une apoptose puis d'une mort cellulaire dans les 24 h.

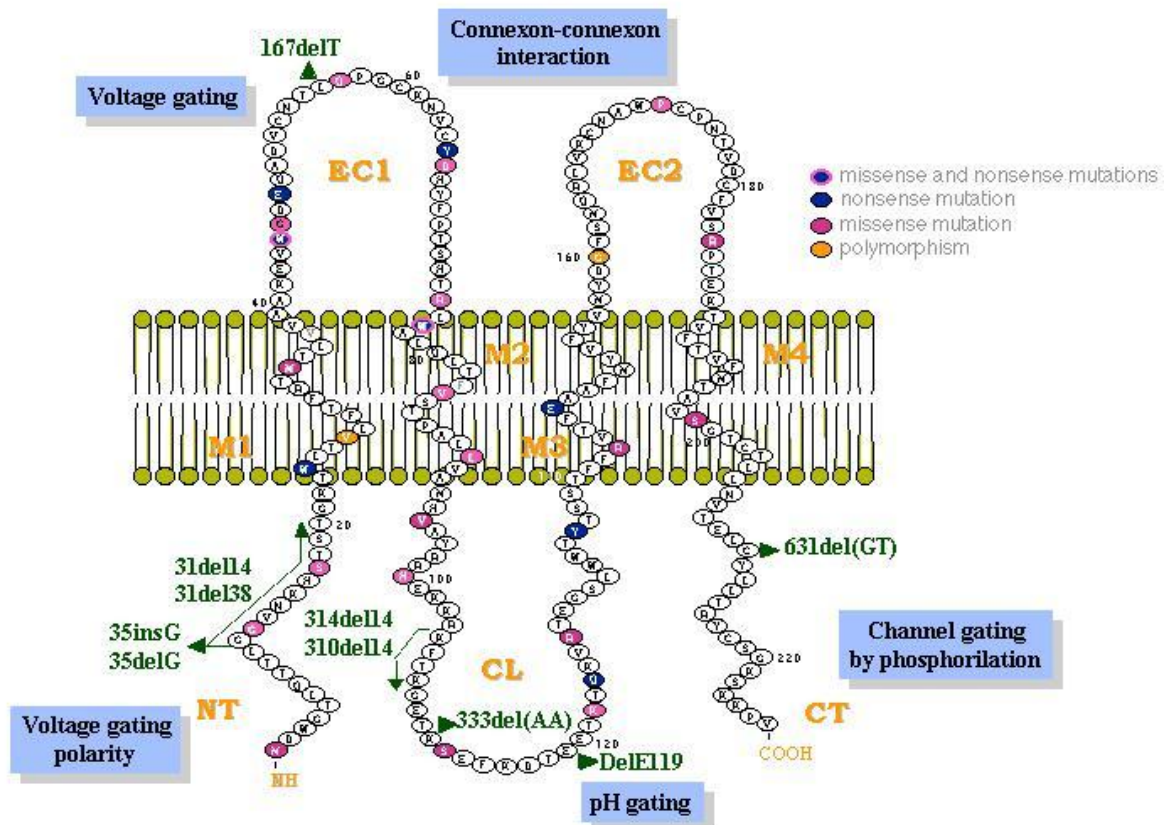


Figure n°10: Localisations des mutations de la connexine 26 rapportées dans la littérature et liées à la surdité[45]

2. Théories actuelles sur les mécanismes de surdités liées à la connexine 26

a- Perturbation du recyclage endo-cochléaire du K^+ :

La notion d'implication des mutations des Gap junctions cochléaires dans le recyclage du K^+ est remise en cause. En effet, de nouvelles données indiquent que le canal intercellulaire formé par les Gap junctions n'est pas significativement perturbé par l'absence de la Cx26 ou la Cx30 seules. Les données de l'immunomarquage obtenues à partir de modèles de cochlees de souris avec délétion totale ou partielle de la Cx26, confirment la présence de Gap junctions monomériques dans les cochlees de souris mutées. [46]

Les mutations de la connexine 26 qui affectent spécifiquement le couplage biochimique sont suffisantes pour être responsables de surdité chez l'homme. [47,48] Ceci indique que les anomalies du transfert des grosses molécules à travers les Gap junctions peuvent être à la base des mécanismes de surdité.

b– Rupture de la barrière endothéliale:

Il est bien connu que la perte du potentiel endolymphatique (+80mV) est directement responsable de surdité. Les cellules endothéliales endommagées tapissant les micro vaisseaux de la strie vasculaire pourraient engendrer une fuite avec surcharge du mécanisme générateur du potentiel endolymphatique. Pourtant, la connexine 26 n'est pas exprimée au niveau des cellules endothéliales de la strie vasculaire. La relation entre dysfonctionnement des Gap junctions et les dégâts sur la barrière endothéliale reste donc non encore expliquée.

Ainsi de nouvelles études doivent être réalisées pour tester la nouvelle théorie qui lie la surdité à une rupture de la barrière endothéliale au niveau de la strie vasculaire.

c– Déficit dans le transport facilité des métabolites à travers les Gap junctions :

Des études récentes montrent que le glucose de la circulation sanguine, pourrait atteindre les cellules de soutien de la cochlée [43], les fibrocytes de la paroi latérale du canal cochléaire [49] et le limbe spiral [50] grâce aux Gap junctions. Chang et al. [43] montrent qu'il existe un déficit chronique en glucose et non un blocage de la voie de recyclage du K^+ chez les souris avec Cx30 non fonctionnelle. Ils ont également prouvé une réduction du transport du glucose à travers les Gap junctions et l'augmentation de la production de ROS (reactive oxygen species: générés par l'épuisement d'ATP en cas de déficit en glucose) au niveau des cellules de soutien.

En se basant sur ces résultats, Chang et al. [43] suggèrent que la surdité liée à des mutations responsables d'une perte de fonction des connexines, est due à une réduction de l'efficacité du transfert des métabolites énergétiques (ex. glucose) à

travers le réseau intercellulaire des Gap junctions, particulièrement au niveau des régions de la cochlée où la circulation est pauvre (ex. organe de Corti). L'effet néfaste accumulé sur l'homéostasie cellulaire devient destructeur quand des quantités importantes de ROS sont produites, conduisant à une mort cellulaire et un dysfonctionnement cochléaire.

3. Corrélations génotype-phénotype clinique :

Le gène *GJB2* est en cause d'une part dans la forme majoritaire de surdité de l'enfant, la surdité autosomique récessive DFNB1, et d'autre part dans une forme rare de surdité autosomique dominante, DFNA3 [63,52]. Des mutations particulières de ce gène rendent compte également de trois syndromes rares.

a. La surdité autosomique récessive DFNB1 :

Soixante mutations du gène *GJB2* ont été décrites dans le monde. Au Maroc, comme dans les pays occidentaux et méditerranéens, une mutation prédomine largement : 35delG. Elle est due à la délétion d'une base d'ADN, une guanine, en position 35 dans la partie codante du gène. Cette mutation entraîne un décalage du cadre de lecture et aboutit à la formation d'une protéine tronquée. La déficience auditive est congénitale et stable dans la majorité des cas (une évolutivité est observée dans moins de 20 % des cas, le plus souvent faible). Aucun épisode d'aggravation brutale de surdité n'a été décrit dans cette forme de surdité. La surdité est de tous degrés mais est le plus souvent sévère à profonde. Les courbes audiométriques sont dans la grande majorité des cas, plates (atteinte similaire de toutes les fréquences) ou descendantes (atteinte préférentielle des fréquences aiguës). La tomodensitométrie des rochers et les épreuves vestibulaires caloriques sont normales.

b. La surdité autosomique dominante DFNA3 :

L'implication du gène de la connexine 26 dans la forme de surdité DFNA3 a fait longtemps l'objet de controverses. Les caractéristiques de la surdité, transmise dans

tous les cas sur un mode autosomique dominant, sont très différentes en fonction des mutations : par exemple pour la mutation W44C, la surdité est prélinguale, bilatérale et symétrique, modérée à profonde et atteint toutes les fréquences alors que pour la mutation C202F, la surdité apparaît entre 10 et 20 ans atteint initialement les hautes fréquences et évolue lentement pour devenir légère à moyenne à 50 ans [53,54].

c. La surdité syndromique :

La surdité liée à la connexine 26 est le plus souvent isolée. Néanmoins, l'association à des signes cutanés a été décrite dans la littérature. Il s'agit de l'hyperkératose palmo plantaire associée à la mutation dominante G59A [55], la kératodermie mutilante ou syndrome de Vohwinkel associée à la mutation D66H [56] et enfin le KID syndrome (kératodermie– ichthyose–surdité [57].

MATERIEL ET METHODES

A– Critères d'inclusion des patients

Nous avons recensé 60 sujets présentant une surdité isolée durant les années 2013 et 2014. La majorité des patients ont bénéficié d'un interrogatoire détaillé, d'un examen ORL et général systématiques associés à une exploration fonctionnelle de l'audition et une imagerie du rocher, ainsi qu'une consultation génétique.

On a exclue de l'étude les patients présentant une surdité syndromique ou de cause environnementale, telle un ictère néonatal, une méningite bactérienne, une prématurité ou encore une infection virale prénatale.

B– Prélèvement

Avant tout prélèvement, une fiche qui porte les renseignements, l'accord et le consentement de l'intéressé est obligatoire. On prélève deux tubes EDTA de sang, pour l'extraction d'ADN par kit ou par sel. Les tubes peuvent être conservés à +4°C ou -20°C pour utilisation ultérieure.

C– Techniques de préparation et de purification des acides nucléiques

L'extraction de l'ADN (acide désoxyribonucléique) est une technique qui isole de l'ADN à partir d'une cellule en quantité et en qualité suffisante pour permettre son analyse. Au niveau du laboratoire de Génétique médicale et d'oncogénétique, l'extraction se fait selon deux méthodes : soit par SEL ou par KIT commercialisé (invitrogèn). Nous avons utilisé l'extraction par Kit pour les sangs anciens pour obtenir une meilleure qualité de l'ADN.

1. Par sel :

- **Principe**

Le sang doit être initialement et vigoureusement mélangé à une solution hypotonique pour faire éclater les globules rouges. Le lysat est centrifugé et après élimination du surnageant, le culot cellulaire, contenant les leucocytes, est traité par une solution de lyse des Globules blancs (SLB) contenant la protéinase K. (enzyme qui digère les protéines cellulaires). Les protéines seront par la suite éliminées par l'intermédiaire d'une force ionique du NaCl (5 M) et la précipitation de l'ADN génomique est effectuée en utilisant une solution d'éthanol absolu à froid (−20 °C).

- **Réactifs nécessaires**

- ◆ Tris-EDTA 20 mM / 5 mM
- ◆ Tris-EDTA 10 mM / 1 mM
- ◆ SLB à +42°C
- ◆ Protéinase K 10 mg/ml
- ◆ Na Cl 5 M
- ◆ Ethanol 75 % à +4°C
- ◆ Eau Distillé stérile

- **Protocole expérimental**

L'extraction d'ADN est réalisée à partir du sang total, conservé dans un tube EDTA et stocké à −20°C. Une décongélation de l'échantillon est donc nécessaire.

- i. **Lyse des globules rouges**

Une fois décongelé, le sang est récupéré dans un tube de 15 ml, traité avec deux volumes du tampon d'extraction TE 20/5 (V/V), puis incubé dans la glace pendant 20 mn. Ces étapes permettent la lyse des globules rouges. Après incubation, une centrifugation à 2500 tr/mn pendant 5 mn est réalisée, et le surnageant est ensuite éliminé.

Les étapes précédentes sont répétées (ajout de deux volumes de TE 20/5, incubation....) jusqu'à l'obtention d'un culot blanc ne renfermant que les globules blancs.

ii. Lyse des globules blancs

Le culot est suspendu dans 3 ml de SLB (Solution de lyse des globules blancs), puis 100 µl de protéinase K (10mg/ml) sont additionnés. L'incubation dure une nuit sous agitation douce à 42°C.

iii. Dénaturation et précipitation des protéines et impuretés

Après l'incubation, 4 ml d'eau distillée stérile et 4 ml de NaCl 5 M sont ajoutés, le tube est par la suite homogénéisé, puis centrifugé à 3000 tr/mn pendant 30 mn.

iv. Précipitation et lavage de l'ADN

Le surnageant est récupéré dans un nouveau tube de 50 ml, auquel deux volumes d'éthanol absolu froid sont ajoutés. Après homogénéisation, "la méduse" d'ADN se forme dans le tube. Cette dernière sera récupérée dans un tube eppendorff de 1.5 ml, puis lavée à l'éthanol 75 %.

Après évaporation pour éliminer toute trace de l'éthanol, l'ADN est dilué dans 200 µl de TE (Tris-EDTA) puis stocké à +4°C pour toute utilisation ultérieure (pour un stockage prolongé il est préférable de conserver l'ADN à -20°C).

2. Par Kit :

• Principe

Après digestion enzymatique et solubilisation des lipides dans une solution spécifique, l'ADN chargé négativement est mis en contact avec des billes magnétiques chargées positivement afin qu'il s'accroche à celles-ci. La solution est éliminée alors que les billes sont maintenues à l'aide d'un aimant. Une autre solution de composition différente est ensuite ajoutée aux billes afin de neutraliser leur charge. L'ADN est alors libéré dans cette seconde solution.

- **Protocole expérimental**

Notez : Pour 2 ml des échantillons de sang, employez les volumes de réactif indiqués pour 3 ml des échantillons de sang.

1. Vortexer le tube contenant les billes Magnétiques GeneCatcher™ pour resuspendre et distribuer les billes dans le tampon de stockage.
2. Ajouter les billes Magnétiques resuspendu et le tampon de Lysis (L13) à un tube 50 ml stérile. Mélangez les billes en tourbillonnant doucement le tube jusqu'à ce que les billes soient distribuées.

Blood (ml)	3	4	5	6	7	8	9	10
Beads (µl)	45	60	75	90	105	120	135	150
L13 (ml)	9	12	15	18	21	24	27	30

3. Ajouter 2–10 ml du sang bien mélangé au tube contenant les billes et inversez doucement le tube étonné 3 fois pour mélanger les billes.
4. Incuber à la température ambiante pendant 5 minutes pour permettre à l'ADN de se lier aux billes. Pendant l'incubation, agiter doucement le tube de temps en temps.
5. Placer le tube de 50 ml sur le Support de Séparateur Magnétique pendant 3 minutes.
6. Sans enlever le tube du Séparateur Magnétique, éliminer soigneusement le surnageant en utilisation une pipette de 5 ml sans toucher les billes.
7. Enlever le tube du Séparateur Magnétique.
8. Ajouter 5 ml du tampon de Lysis (L13) au tube sans tenir compte du volume du sang et inversez doucement le tube 3 fois pour mélanger les billes et enlever les contaminations résiduelles par lavage.
9. Incuber à la température ambiante pendant 30 secondes.
10. Placer le tube sur le Séparateur Magnétique pendant 20 secondes.

11. Sans enlever le tube du Séparateur Magnétique, éliminer le surnageant en utilisation une pipette de 5 ml sans toucher les billes.

12. Passer immédiatement à la Digestion Protéase.

Protéase Digestion

1. Mettre le bain marie à 65°C.
2. Enlever le tube contenant les billes magnétiques du Séparateur Magnétique
3. Ajouter le tampon de Protéase et la Protéase au tube et vortexer le tube pour disperser les billes (30 secondes).

Notez : Pour 2 ml des échantillons de sang, employez les volumes de réactif indiqués pour 3 ml des échantillons de sang.

Blood (ml)	3	4	5	6	7	8	9	10
Protease Buffer (ml)	3	3	3	3	3.5	4	4.5	5
Protease (µl)	40	40	40	40	40	40	40	40

4. Incuber le tube à 65°C pendant 10 minutes et incuber ensuite à température ambiante (10–20 minutes).
5. Inversez doucement le tube deux fois pour resuspendre billes.
6. Passer immédiatement au lavage d'ADN.

Lavage d'ADN

1. Ajouter l'isopropanol (IPA) 100 % au tube et mélanger en inversant doucement le tube jusqu'à l'apparition d'une forme d'agrégation visible.

Note: L'absence d'agrégation après 2–3 minutes indique un très faible taux d'ADN dans l'échantillon.

2. Placer l'échantillon sur le Séparateur Magnétique pendant 30 secondes à 1 minute.

3. Sans enlever le tube du Séparateur Magnétique, éliminer le surnageant en utilisant une pipette de 5 ml sans toucher les billes.
4. Enlever le tube du Séparateur Magnétique.
5. Ajouter 3 ml 50 % (v/v) d'isopropanol sans tenir compte du volume de sang au tube et le mélanger en inversant doucement le tube 5 fois.
6. Placer l'échantillon sur le Séparateur Magnétique pendant 30 secondes.
7. Sans enlever le tube du Séparateur Magnétique, éliminer le surnageant en utilisant une pipette de 5 ml sans toucher les billes.
8. Garder le tube sur le Séparateur Magnétique pendant une minute pour permettre au reste du liquide d'arranger au fond du tube. Eliminer le surnageant en utilisant une pipette de 1 ml.
9. Sans enlever le tube du Séparateur Magnétique, ajoutez 250 µl du tampon Lavant (W12, sans tenir compte du volume de sang) en face de la boulette de billes.
10. Incuber pendant 1 minute à température ambiante.
11. Sans enlever le tube du Séparateur Magnétique, éliminer le surnageant en utilisant une pipette de 1 ml sans toucher les billes.
12. Répéter des étapes 9–11.
13. Passer immédiatement à l'élution d'ADN.

L'élution d'ADN

1. Mettre le bain marie à 65°C.
2. Enlever le tube contenant les billes magnétiques du Séparateur Magnétique (étapes 12).
3. Ajouter 1 ml du tampon d'Elution (E5), sans tenir compte du volume de sang, au tube et agitent doucement l'échantillon en tourbillonnant le tube pour sortir la boulette de bille.

Pour les échantillons avec haut contenu d'ADN

4. Incuber à 65°C pendant 1 heure.
5. Enlever le tube du bain marie et mixer par une pipette de 800 µ l, pour disperser la boulette complètement.

Notez : Pour le haut contenu d'ADN, incubez les échantillons pendant 20 minutes complémentaires et répéter l'étape 5.

6. Placer le tube sur le Séparateur Magnétique avant que le surnageant ne soit clair et sans couleur (d'habitude 15 minutes à 1 heure, les échantillons visqueux exigent plus de temps).
7. Sans enlever le tube du Séparateur Magnétique, enlever soigneusement le surnageant contenant l'ADN en employant la pipette 1 ml sans toucher la boulette de billes et transférer le surnageant à un tube stérile.
8. éliminer les billes magnétiques employées.

Le stockage de l'ADN

9. Stocker l'ADN épuré à -20°C ou employer l'ADN pour les applications désirable en aval.
10. Pour éviter la congélation répétée d'ADN, stockez l'ADN épuré à 4°C pour l'utilisation immédiate ou l'aliquoter et le stocker à -20°C.

3. Dosage de l'ADN :

La concentration en ADN de l'échantillon est estimée par spectrophotométrie. En effet, les acides nucléiques présentent un pic d'absorption dans l'ultraviolet. Le maximum de cette absorption se situe à 260nm. L'interférence par des contaminants se reconnaît par calcul d'un « ratio ». Les protéines absorbant à 280 nm, le ratio A260/A280 est utilisé pour estimer la pureté de l'acide nucléique. L'ADN pur devrait avoir un ratio d'environ 1,8, tandis que l'ARN pur devrait avoir une valeur d'environ 2,0. L'absorption à 230 nm reflète la contamination de l'échantillon par des

substances telles que les hydrates de carbone, les peptides, les phénols ou les composés aromatiques. Dans le cas d'échantillons purs, le ratio A260/A230 devrait être d'environ 2,2.

Au laboratoire, le « NANODROP» (figure 11) est utilisé pour réaliser le dosage. Il suffit de déposer dans l'appareil 2µl d'ADN extrait pour déterminer sa concentration et obtenir la courbe qui renseigne sur sa pureté.



Figure 11 : Spectrophotomètre NANODROP (UGMO)

D. Amplification des séquences nucléotidiques par PCR

1. Principe

La réaction PCR (Polymerase Chain Reaction) permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier. Pour se faire, une série de réactions permettant la réplication d'une matrice d'ADN double brin est répétée en boucle. Ainsi, au cours de la réaction PCR, les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant, l'amplification est donc exponentielle.

Pour avoir la réplication d'un ADN double brin, il faut agir en trois étapes. (1) dénaturation de l'ADN pour obtenir des matrices simple brin; (2) hybridation des

amorces spécifiques; (3) réaliser la réaction de polymérisation du brin complémentaire par l'enzyme polymérase. A la fin de chaque cycle, les produits sont sous forme d'ADN double brin.

2. Condition de PCR

On a procédé à l'amplification de l'exon 1 ainsi que toute la région codante de l'exon 2. Les PCR ont été effectuées et optimisées sur l'ADN génomique préalablement dilué à 100 ng/μl en utilisant des amorces spécifiques pour chaque région étudiée. (Voir tableau 3)

Les réactions PCR ont été effectuées et optimisées pour chaque exon dans un volume final de 20μl (voir tableau 4) pour le mélange réactionnel. Et enfin, le mélange est déposé au niveau d'un thermocycleur (*Applied Biosystem*) selon un programme déterminé (voir tableau 5).

Tableau 3 : Amorces utilisées pour les réactions de PCR

gène	Amorce séquence F :	Amorce séquence R :	Taille de l'amplicon (pb)
Exon 1	TCC GTA ACT TTC CCA GTC	CCC AAG GAC GTG TGT TGG	230
Exon 2. 1	TCT TTT CCA GAG CAA ACC GC	GAC ACG AAG ATC AGC TGC AG	266
Exon 2. 2	CCA GGC TGC AAG AAC GTG TG	GGGCAA TGC GTT AAA CTG GC	480

Pour chaque région cible, les amorces sens et antisens sont indiquées, ainsi que la taille attendue pour chaque produit amplifié.

Tableau 4 : Mélange réactionnel pour chaque région du gène *G/B2* pour un volume totale de 20 µl

Composition Gène	Exon 1	Exon 2. 1	Exon 2. 2
Mgcl2	2. 5	2	2
Tampon	4	2	2
dNTP	2	2	2
Amorce F	2	1	1
Amorce R	2	1	1
ADN polymérase (<i>AmpliTaq Gold</i>)	0. 2	0. 2	0. 2
ADN (100ng/µl)	1	1	1
Eau (qsp 40 µl)	6. 3	10. 8	10. 8

**Tableau 5 : Programme de cycle de température au niveau du termocycleur
(Applied Biosystem)**

Etapes	Activation d'ADN polymérase		Dénaturation		Hybridation		Elongation		Poursuivis de cycle		Nombre de Cycles
gènes	C°	Tmp (min)	C°	Tmp (sec)	C°	Tmp (sec)	C°	Tmp (sec)	C°	Tmp (min)	
EX 1	95	9	94	30	60	30	72	60	72	9	36
EX2. 1	95	9	94	30	63	30	72	60	72	9	40
EX2. 2	95	9	94	30	65	30	72	60	72	9	40



Figure 12 : Thermocycleur Applied Biosystem 2700 (UGMO)

3. Témoins de la réaction PCR

Les témoins inclus pour chaque réaction PCR comprennent :

- Témoins positif qui a pour fonction de s'assurer des bonnes conditions de la PCR, ce témoin est représenté par l'ADN d'un sujet normal sain.
- Témoin négatif qui permet de s'assurer de l'absence de contamination, auquel il n'y a pas d'ADN.

4. Contrôle des produits PCR

Les produits PCR sont contrôlés sur gel d'agarose 2 % en présence d'un marqueur de taille, qui permet de vérifier la taille et la spécificité du produit amplifié.

E. Séquençages d'ADN

Notre objectif est d'appliquer le séquençage pour détecter les différentes mutations du gène *GJB2*. Avant de séquencer nos produits PCR, il faudra les purifier pour éliminer l'excès d'amorces, dNTP et d'ADN polymérase, pour cela il 3 réactions essentielles comme suit :

1. Purification par ExoSAP®

ExoSAP-IT est conçu pour une purification rapide et efficace des produits de PCR. Il comporte deux enzymes hydrolytiques, l'exonucléase I(Exo) qui dégrade les ADN simples brins et la phosphatase alcaline de crevette (SAP) qui hydrolyse les dNTPs libres, et en excès sans interférence avec les applications en aval. L'enzyme est active à 37°C et inactive à 80°C. Les fragments simples brins inférieurs à 100 pb sont ainsi dégradés.

- On utilise 8 µl de l'enzyme ExoSAP avec 10 µl du produit PCR
- On le place au niveau du thermocycleur suivant le cycle suivant :

Température	Durée
37°C	3 mn
80 °C	15 min
10°C	∞

2. Reaction de sequence par BigDye® Terminator v 3. 1 Cycle Sequencing :

Selon la réaction de Sanger qui repose sur l'incorporation alléatoire de didéoxynucléotides interrupteurs de chaîne (ddNTP) eux aussi présents dans le milieu réactionnel dont chacun est marqué par un fluorophore dont le spectre d'émission est spécifique. Une analyse spectrale va différencier les différents fluorochromes, associer la base correspondante et donc définir la séquence nucléotidique du brin d'ADN initial. Les fragments d'ADN synthétisés portent ce fluorophore terminal. On les appelle des terminateurs d'élongation ou "*BigDye Terminators*" ou "*Dye-labeled terminator*".

Nous utilisons la technologie Big Dye Terminator_version 2 (Applied Biosystems : ABI).

La technologie Big Dye Terminator (BDT) utilise un système de transfert d'énergie par résonance (FRET) entre deux fluorochromes fixés sur le même ddNTP et reliés entre eux par un linker. Le premier est une fluorescéine (6 carboxyfluorescéine) appelé fluorochrome donneur, commun aux quatre ddNTP. Le second est une dichlororhodamine (dRhodamine) qui joue le rôle de fluorochrome accepteur.

Le fluorochrome donneur est excité par un rayon laser à argon émettant à 488 nm et 514,5 nm. Son énergie de fluorescence émise (515–520 nm) est captée intégralement par le fluorochrome accepteur qui est excité à son tour. Le fluorochrome accepteur ou dichloroRhodamine est différent pour chaque type de ddNTP.

ddNTP	dichloroRhodamines utilisées	Spectre d'émission maximum
A	dR6G	560-565nm
T	dROX	615-620nm
C	dR110	530-535nm
G	dTAMRA	590-595nm

Le spectre de la fluorescence réémise sera ainsi spécifique de chaque type de ddNTP. Le transfert du signal de la fluorescéine vers la dRhodamine permet une amplification du signal et par conséquent, une augmentation de la sensibilité de la technique (figure n°13).

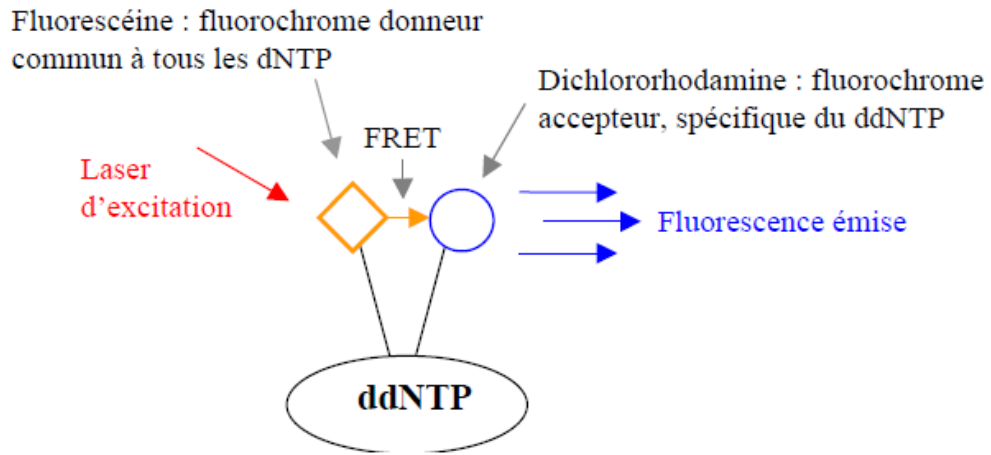


Figure n°13 : Mécanisme de la fluorescence par la technique du transfert d'énergie par résonance.

On effectue 30 cycles d'amplification sur le thermocycleur dans des conditions spécifiques à la réaction de séquence. Un cycle correspond à :

Une étape de dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 10 sec pour obtenir l'ADN sous forme simple brin.

Une étape d'hybridation à 50°C pendant 5 sec (température moyenne d'hybridation pour la majorité des amorces utilisées).

Une étape d'élongation de l'ADN par la Taq polymérase à 60°C pendant 4 min. Cette température faible ralentit la Taq et va déplacer l'équilibre pour permettre une meilleure incorporation des ddNTP. Une fois l'étape de thermocyclage effectuée, il est nécessaire de purifier la réaction de séquence.

3. Purification de la réaction de séquence avec le Kit BigDye-XTerminator :

Le kit BigDye® Xterminator™ permet la purification des produits de réaction de séquence en capturant les dyes non incorporés dans la réaction, les sels et autres molécules chargées qui pourraient interférer lors de la détection des bases par électrophorèse capillaire.

Le kit contient : – un flacon “SAM Solution” (stockage à T°ambiante)

– un flacon: « XTerminator Solution (stockage à 4°C, ne pas congeler)

1. Déposer 10µl de produits de réaction de séquence dans la plaque Applied.

2. Centrifuger la plaque.

3. Préparer un mix contenant :

45 µl de solution SAM par puits

10 µl de XTerminator Solution par puits à l'aide des cônes spécifiques.

– Vortexer 10 sec le flacon XTerminator Solution et prélever immédiatement la quantité nécessaire.

4. Vortexer le mélange et ajouter 55µl dans chaque puits à l'aide de la pipette distritips ou de la pipette monocanal.

5. Sceller la plaque correctement avec un film adhésif

6. Mettre la plaque sur l'agitateur Eppendorf Mix Mate.

7. Lancer l'agitateur sur la position 1 800 rpm pendant 30secondes et vérifiez que tout se mélange bien et que la plaque reste bien attachée.

8. Agiter à 1 800 rpm pendant 30 minutes.

9. Centrifuger la plaque 2 minutes à 1 000 g (Centrifugeuse Heraus Multifuge 3S-R).

Les plaques peuvent être conservées 7 jours à 4°C (pas congelées) avant d'être analysées par le séquenceur.

4. Détermination de la séquence :

La plaque est placée dans le séquenceur (figure 14) qui est un automate d'électrophorèse capillaire. Ce dernier lance un flux électrique d'ions à travers un capillaire, ce qui entraîne la migration des fragments d'ADN. Une fois arrivés au site de détection, les quatre fluorochromes des ddNTP terminaux seront excités. Suite à cette excitation, chaque fluorochrome émettra une lumière à une longueur d'onde différente qui sera détectée puis convertie en séquence par le logiciel d'analyse des séquences.

Les séquences d'ADN sont déterminées par séquençage automatique (séquenceur à 8 capillaires applied biosystem 3500 DX)



Figure 14 : Analyseur génétique 3500Dx (UGMO)

F. Les outils de bioinformatique

✓ Logiciel BLAST (nucléotide BLAST)

Le logiciel blast permet de comparer une séquence nucléique dite requête à une banque de séquences nucléiques sur les 2 brins, c'est-à-dire la séquence étudiée (brin +) et son complémentaire inversé (brin -).

✓ Logiciel NCBI (CCDS database)

Ce logiciel permet de localiser la mutation au niveau de la partie codante du gène étudié et éventuellement de connaître l'acide aminé touché par la mutation sur la séquence protéique correspondante.

✓ Logiciel NCBI (CCDS variation viewer)

Dès qu'on arrive à localiser la mutation, ce logiciel nous permet d'évaluer l'impact clinique de celle-ci (pathogénique ou pas), son origine (germinale ou somatique), son positionnement sur le génome entier et si elle a déjà été rapportée par autres auteurs.

RESULTATS

A. Données épidémiologiques

Nous avons recensé 60 cas de surdité non syndromique dont 34 cas familiaux et 26 cas sporadiques.

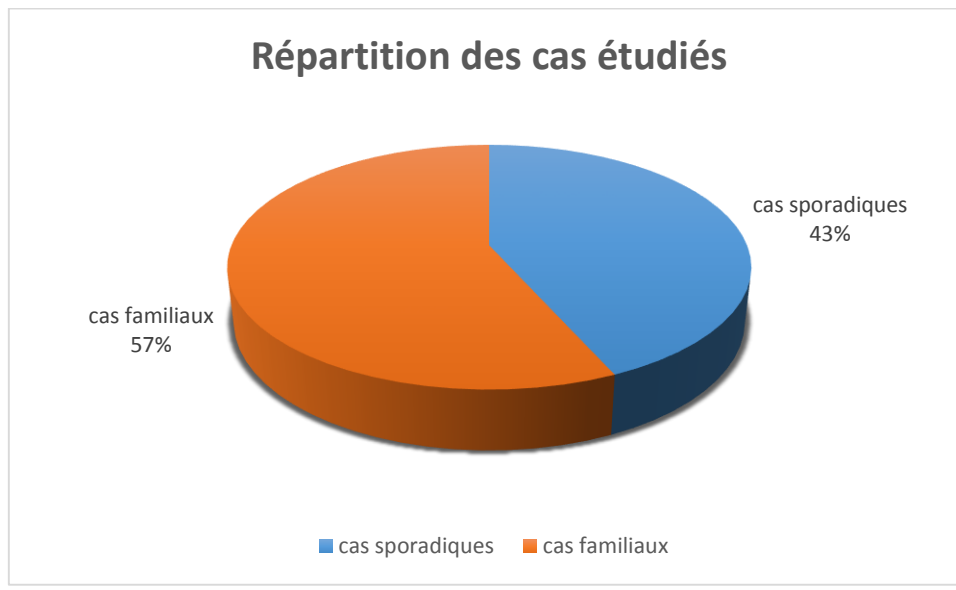


Figure n°15 : Répartition des sujets inclus dans l'étude.

L'âge moyen des patients était de 8 ans avec des extrêmes d'âge allant de 2 à 20 ans.

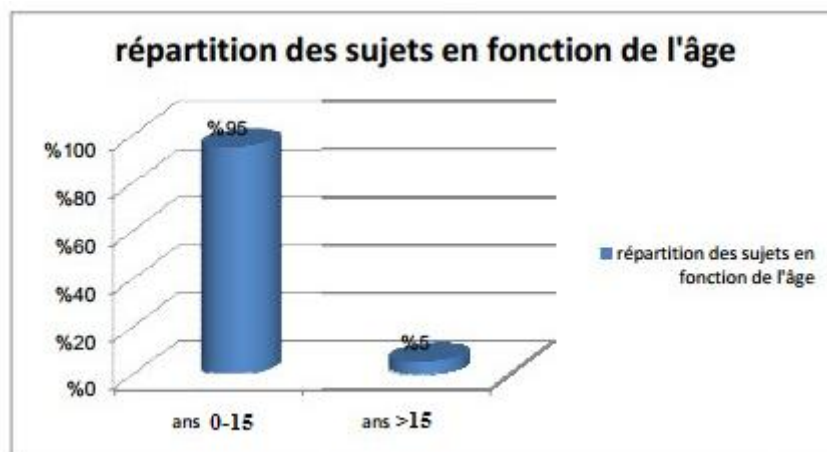


Figure n°16 : Répartition des sujets inclus dans l'étude en fonction de l'âge.

Le sexe ratio était de 1,5 en faveur des hommes.

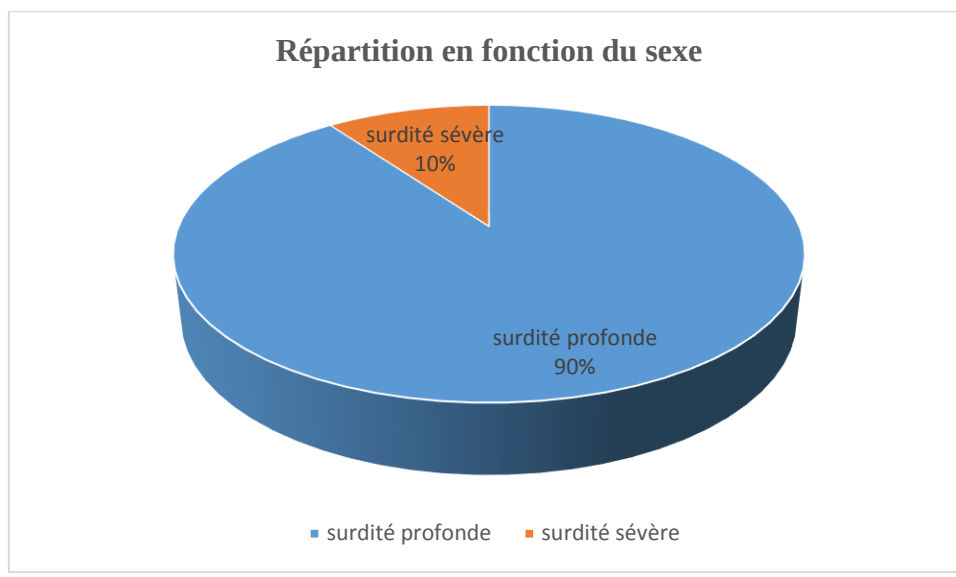


Figure n 17 : Répartition des sujets inclus dans l tude en fonction du sexe.

La notion de consanguinité a été retrouvée dans 30 % des cas. Le nombre de sujets atteints par famille était très variable allant jusqu'à 5 sujets sourds par famille.

B. Données cliniques

Tous nos patients présentaient une surdité prélinguale bilatérale non évolutive, intéressant toutes les fréquences.

Le degré de surdité était variable. Il s'agissait le plus souvent d'une surdité profonde.

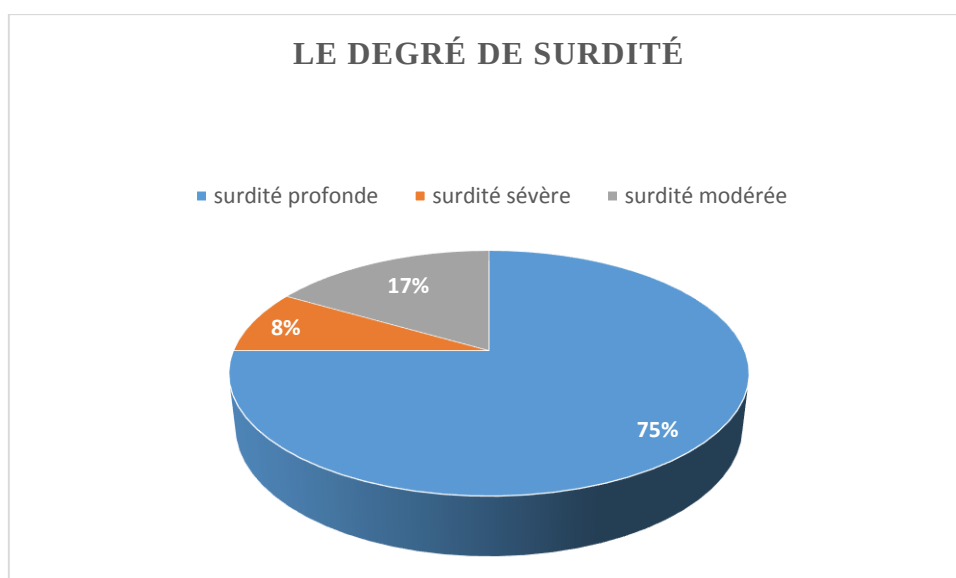


Figure n 18 : Données du bilan audiolgique des cas étudiés.

C. Résultats de l'étude moléculaire

1. Résultats de l'extraction d'ADN

L'extraction d'ADN a été réalisée par la méthode classique de « Salting- Out » à partir du sang total des patients étudiés et par kit pour les sangs anciens.

Le rapport de l'absorbance DO260/DO280, est compris pour la plupart des échantillons entre les valeurs 1,8 et 2, ce qui laisse conclure que ces extraits ne sont pas contaminés par les protéines et peuvent être qualifiés de purs.

2. Résultats de l'amplification du gène *GJB2* par réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

La PCR du gène GJB2 a été réalisée pour l'exon 1 et l'ensemble de la région codante de l'exon 2 qu'on a divisé en 2 fragments chevauchés.

Dans un premier temps on a testé le protocole expérimental standard pour les 3 régions du gène et après optimisation de la réaction PCR les résultats obtenus après migration électrophorétique sur gel d'agarose 2 % sont les suivants :

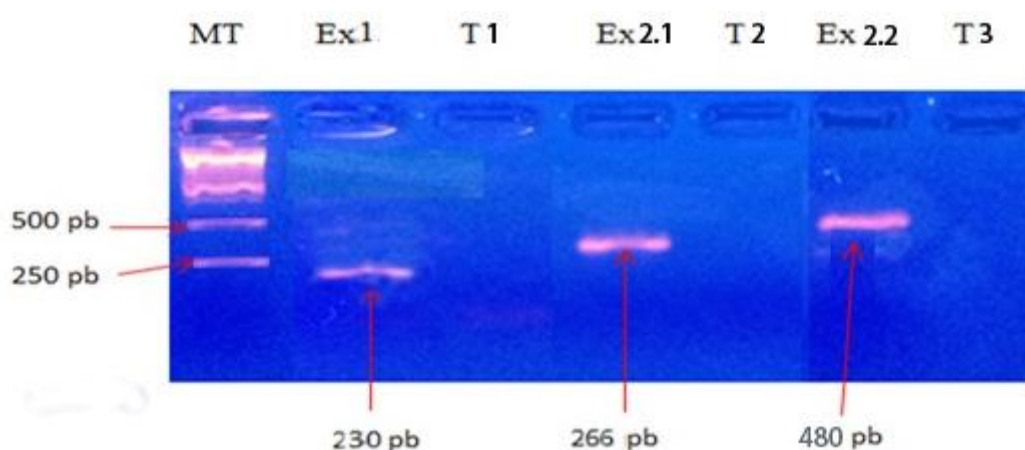


Figure 19 : Electrophorèse sur gel d'agarose 2 % des produits d'amplification par PCR

MT : marqueur de taille; T1, T2 et T3 : les témoins négatifs; 230pb : la bande amplifiée pour l'exon 1 ;

266pb : la bande amplifiée pour l'exon 2. 1; 480pb : la bande amplifiée pour l'exon 2. 2.

Le résultat illustré dans le profil électrophorétique montre que le produit amplifié, dans le but d'être séquencé, ne contient pas de contaminants, et que la taille des bandes recherchées pour chaque exon est obtenue.

Dans un 2^{ème} temps, on a appliqué le protocole testé au reste des patients. Les produits d'amplification ont été visualisés sous UV après électrophorèse sur gel d'agarose et la spécificité des produits amplifiés a été confirmée par comparaison au marqueur de taille.

Le produit d'amplification par PCR étant de bonne qualité et ne contenant pas de contaminants, le séquençage peut alors être réalisé.

3. Résultats du séquençage

- **Génotype et fréquence de la mutation 35delG (tableau n°6):**

Parmi les 34 cas de surdité familiale, 7 patients étaient porteurs de la mutation 35delG à l'état homozygote avec une fréquence de 20,58 %. Cette même mutation a été retrouvée à l'état hétérozygote chez 2 patients soit avec une fréquence de 5,88 %.

La fréquence dans les cas sporadiques était de 15,4 % autant à l'état homozygote qu'à l'état hétérozygote.

Tableau n°6: Fréquence de la mutation 35delG dans la population étudiée.

Génotype	Cas familiaux n (%)	Cas sporadiques n (%)
Homozygote 35delG+/35delG+	7 (20,58 %)	2 (5,88 %)
Hétérozygote 35delG+/35delG	2 (7,7 %)	2 (7,7 %)

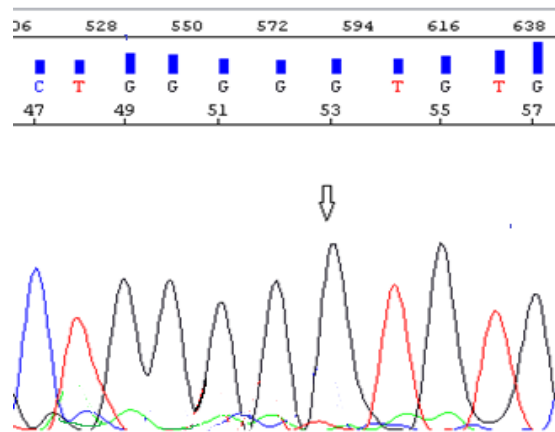


Figure 20 : Electrophérogramme de l'exon 2 du gène *GJB2* (mutation c. 35delG à l'état homozygote).

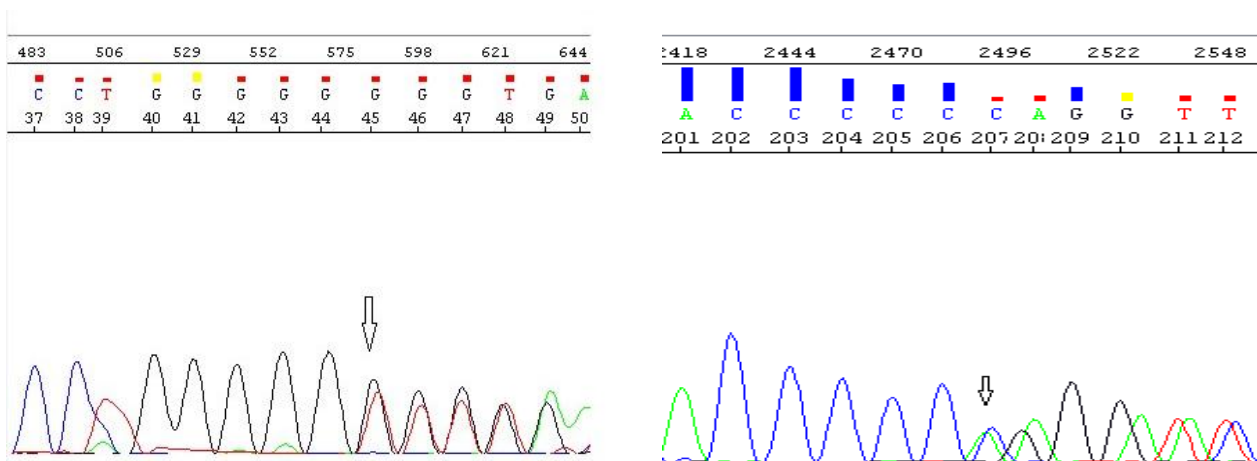


Figure 21 : Electrophérogramme de l'exon 2 du gène *GJB2* (mutation c. 35delG à l'état hétérozygote: séquences F et R).

- **Autres mutations identifiées du gène de la connexine26:**

L'étude du gène *GJB2* a pu identifier, en plus de la mutation 35delG, deux autres mutations (tableau n°7) : une mutation c. 598G>A associée à la mutation 35delG, et une mutation c. 175G>C q l'état hétérozygote.

Génotype	Cas familiaux n (%)	Cas sporadiques n (%)
598G>A+/+	-	1
175G>C+/-	1	-

Tableau n°7: mutations du gène *GJB2* identifiées dans la population étudiée

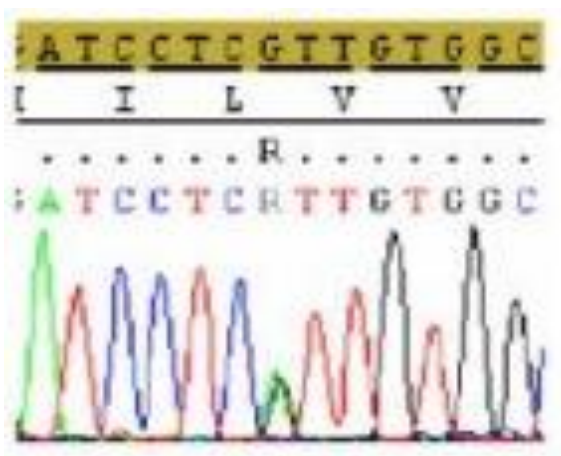


Figure 22 : Electrophérogramme de l'exon 2 du gène *GJB2* (mutation c.598G>A à l'état hétérozygote: séquence F).

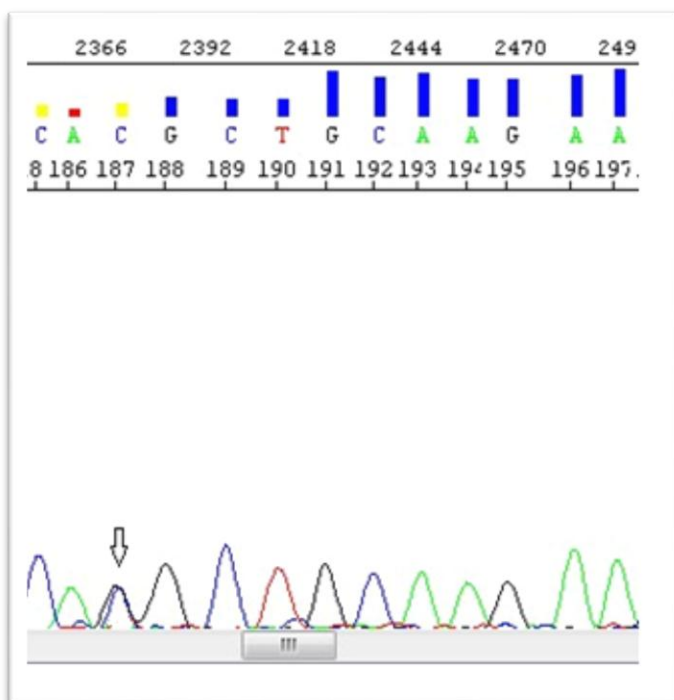


Figure 23 : Electrophérogramme de l'exon 2 du gène *GJB2* (mutation c.175G>C à l'état hétérozygote: séquence F).

La fréquence des mutations de gène *GJB2* dans la population étudiée était de 25 %. La mutation 35delG était la plus fréquente avec une proportion de 88 % par rapport aux autres mutations du même gène. Ces fréquences sont résumées dans le tableau 8.

Tableau n°8 : Spectre et fréquence allélique des mutations du gène *GJB2* dans la population étudiée.

Changement du nucléotide	Changement de l'acide aminé	Fréquence allélique	Proportions de la mutation (n=allèle)
35delG	V12G (codon stop)	18,33 %	88 % (22/ 25)
598G>A	G200R	1,66 %	82 % (2/ 25)
175G>C	G59R	0,83 %	4 % (1/ 25)
Total		20. 82 %	100 %

Environ 25 % (15/60 patients sourds) des patients présentaient une mutation du gène *GJB2* sur au moins un chromosome. 16,66 % de ces patients présentaient une mutation du gène *GJB2* à l'état homozygote.

Quatre génotypes ont été retrouvés dans la population étudiés. (Tableau n°9)

Tableau n°9: Génotypes retrouvés dans la population étudiée.

Génotype	Nombre de patients	Pourcentage (%)
35delG +/+	9	15 %
35delG +/-	4	6,66 %
G200R/35delG	1	1,66 %
G59R+/-	1	1,66 %
Total	15	25 %
Mutation -/-	45	78,34 %

Chez 45 patients nous n'avons pas pu retrouver une mutation du gène *GJB2*. Aucune mutation n'a été retrouvée au niveau de l'exon 1.

DISCUSSION

La surdité, toutes origines confondues, touche 1,3 à 2,3 enfants sur 1000 dans les pays industrialisés. Sur une population française, des anomalies homozygotes de la connexine 26 ont été retrouvées dans 51 % des cas de surdités prélinguales récessives et dans 31 % des cas sporadiques. Cette proportion était de 55 % lorsque la surdité était profonde, de 48 % si l'atteinte était sévère, de 42 % si elle était de sévérité moyenne et de 14 % parmi les surdités prélinguales légères. La surdité est le déficit neurosensoriel le plus fréquent chez l'enfant. La prévalence des surdités bilatérales sévères et profondes est estimée entre 0.5 à deux enfants pour 1000 naissances [60]. Au Maroc on compte environ 640000 naissances par an ce qui correspondrait à 640 nouveau-nés qui naissent avec une surdité bilatérale sévère ou profonde par an sans énumérer les surdités acquises. Un autre enfant sur mille devient sourd profond avant l'âge adulte [60]. Ces chiffres démontrent bien que la surdité de l'enfant doit être considérée comme un problème de santé publique au Maroc.

Au Maroc, 34,8 % des surdités neurosensorielles de l'enfant sont d'origine génétique [61].

Le gène GJB2 étant le premier en cause de surdité d'origine génétique chez notre population [36,62].

A. Analyse phénotypique

Nous avons essayé, à travers ce travail, de recruter un échantillon représentatif de la population marocaine qui soit diversifié de point de vue de l'origine géographique. Les études anthropogénétiques, ont démontré le caractère hétérogène de la population marocaine qui se présente comme un mélange de composante africaine, caucasoïde, asiatique et arabe. [57]

La population marocaine est également une population à haut degré de consanguinité, pour des raisons principalement culturelles, socio-économiques et

linguistiques. En effet, nous avons soulevé la notion de consanguinité chez 30 % des sujets étudiés.

Ce haut degré de consanguinité est responsable de l'apparition plus fréquente de maladies génétiques à transmission récessive et concentre certaines caractéristiques génétiques y compris celles considérées comme défavorables. Ainsi certaines mutations se propagent mieux en raison d'un stock de gènes initialement plus faible.

La consanguinité et l'hétérogénéité sont deux caractéristiques essentielles qui font de notre population un bon modèle d'étude des maladies génétiques surtout celles à caractère récessif et favorisent l'apparition des isolats géographiques.

Les mutations du gène de la connexine 26 sont connues pour être responsables d'une surdité prélinguale légère à profonde non progressive [3,18]. C'est le cas de tous nos patients qui présentaient une surdité modérée à profonde pré linguale.

B. Implication du gène GJB2 dans la surdité d'origine génétique chez les patients étudiés

La mutation d'un gène occupant le locus DFNB1 est responsable de plus 50 % des surdités autosomiques récessives [62] le GJB2 codant la connexine 26. Cette dernière joue un rôle important dans la genèse du potentiel endocochléaire. La proportion de la mutation 35delG, par rapport à d'autres, du gène GJB2 prédomine largement dans les pays méditerranéens et représente 80 % des cas [61]. Une étude anthropologique a montré que la mutation 35delG serait originaire de l'ancienne Grèce, puis s'est propagée progressivement dans le pourtour méditerranéen. [11]

Néanmoins, le spectre et la fréquence des mutations de ce gène peuvent varier d'un pays à l'autre voire d'une région d'un même pays à l'autre.

Le tableau n°10 montre que le pourcentage des patients avec surdité autosomique récessive non syndromique qui présentent une mutation bi allélique du gène *GJB2*, est très variable entre les différents pays. Il varie entre 0 % dans la population omani [63] et 45,6 % dans la population slovaque [64].

Cette grande variabilité pourrait être due à l'origine ethnique des populations étudiées, aux méthodes moléculaires utilisées pour le séquençage des mutations, aux critères de sélection des patients ou encore au nombre réduit de certaines études.

Tableau n°10 : Proportions des surdités liées aux mutations bi alléliques du gène *GJB2* dans différentes populations.

Pays	Patients (n)	GJB2 (%)	35delG/35delG (%)	Références
France	88	39,8	28,4	[66]
Italie/ Espagne	136	36,8	32,4	[67]
Grèce	210	33,3	30	[68]
Liban	48	33,3	31,3	[69]
Turquie	60	31,1	20,4	[70]
Chine	118	16,1	0	[71]
Egypte	111	14,4	9	[72]
République Tchèque	156	37,8	28,8	[73]
Oman	51	0	0	[63]
Slovaquie	90	45,6	40	[64]
Maroc	81	40,12	35,8	[62]
Maroc	116	-	24	[65]
Maroc	60		15	Notre série

Notre étude menée sur 60 sujets présentant une surdité congénitale isolée montre que la prévalence des mutations du gène *GJB2* était de 25 %. Ces résultats sont proches de ceux retrouvés dans les pays du pourtour méditerranéen.

Ainsi, nos résultats confirment les résultats de la littérature [62,65], qui affirment le rôle majeur du gène *GJB2* dans la surdité génétique au Maroc.

1. Place de la mutation 35delG dans la surdité liée au gène *GJB2* :

Les résultats de notre étude affirment que la mutation 35delG est de loin la mutation la plus fréquente en cause de surdité au Maroc avec une proportion de 88 % par rapport aux autres mutations retrouvées du gène *GJB2*. Cette haute fréquence pourrait refléter la présence d'un point mutationnel chaud (mutational hot spot) sur le gène *GJB2* [20, 74, 75, 76,77].

Nous constatons à travers notre étude que 6,66 % des patients étaient porteurs de la mutation 35delG à l'état hétérozygote, sans autre mutation sur la partie codante du gène *GJB2*. Ce qui laisse suggérer que le *GJB2* n'est pas responsable de la surdité chez ces patients. Une analyse additionnelle du gène *GJB6* doit être réalisée.

Ces résultats suggèrent l'implication d'autres facteurs génétiques ou environnementaux ayant un rôle dans la manifestation de la surdité chez ces patients.

Les bases génétiques de ces variations restent inconnues à ce jour. Des explications peuvent être proposées, telles des mutations sur des gènes codant pour d'autres connexines en relation ou en interaction avec les gènes *GJB2* et/ou *GJB6* sur la région promotrice au niveau de l'oreille interne [81,82], ou encore l'existence de gènes appelés "modifiants". [83]

En conséquent, ces patients et familles ont besoin d'une étude moléculaire plus poussée afin d'identifier des mutations sur d'autres gènes ou loci sur le chromosome 13 ou ailleurs.

2. Autres mutations du gène *GJB2* :

La mutation 35delG a longtemps été considérée comme la seule mutation du gène *GJB2* identifiée chez les patients présentant une surdité non syndromique autosomique récessive au Maroc. [64,74]

A travers notre étude, nous avons identifié 2 autres mutations faux sens, présentes à l'état homozygote ou hétérozygote. G200R et G59R. Ces génotypes ont été décrits dans plusieurs publications de surdités sévères et profondes. La mutation G59R est décrite dans les surdités syndromiques associées à la kératose palmoplantaire ce qui est le cas chez notre patient.

CONCLUSION

A travers notre étude, nous confirmons l'implication incontestable et fréquente des mutations du gène *GJB2* dans la surdité autosomique récessive non syndromique au Maroc, comme c'est le cas dans d'autres pays du pourtour méditerranéen.

Ainsi, ce type de surdité constitue un véritable problème de santé publique, vue sa grande fréquence au sein de la population marocaine.

La forte prévalence des mutations du gène *GJB2* et surtout de la mutation 35delG peut être expliquée par :

- La longue tradition de mariage consanguin (25–35 % selon les régions), responsable de la concentration de certaines caractéristiques génétiques et mutations, mais aussi l'apparition plus fréquente de maladies congénitales à transmission autosomique récessive.
- La prévalence élevée des porteurs hétérozygotes dans la population marocaine

Nous avons également pu à travers notre étude identifier deux autres mutations du gène de la connexine G200R et G59R.

La recherche systématique de la mutation 35delG, chez un sujet atteint d'une surdité, est aujourd'hui un outil important pour la santé publique. Elle permet d'améliorer considérablement la qualité du conseil génétique sollicité par les parents et de répondre avec précision à de nombreuses questions sur le caractère héréditaire de la surdité, les risques pour les enfants à venir et l'évolution de la surdité. Un séquençage de toute la partie codante du gène *GJB2* doit être entrepris en l'absence de cette mutation.

L'absence d'altérations génétiques dans notre population (78,34 %) suggère clairement l'implication d'autres gènes nécessitant une analyse génétique plus poussée.

Actuellement, les méthodes de séquençage à haut débit sont porteuses de grands espoirs en terme d'innovations médicales notamment dans le diagnostic moléculaire des surdités d'origine génétique. Un panel de 100 gènes possiblement impliqués dans les surdités syndromiques et non syndromiques pourrait être testé.

REFERENCES

- [1] Vincent C. Les surdités génétiques. *Archives de Pédiatrie* (2003); 10S 1:150
- [2] Vincent C. Surdités génétiques: mise au point. *La Revue de médecine interne* 32S (2011); S2–S4
- [3] F. Denoyelle, S. Marlin. Surdités de perception d'origine génétique. *EMC oto-rhino laryngologie* 2 (2005); 343-364
- [4] Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, et al. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature*. (1997);387:80–83.
- [5] Denoyelle F, Lina-Granade G, Plauchu H et al. Connexin 26 gene linked to a dominant deafness. *Nature* (1998); 393:319–20.
- [6] Perrot X, Fischer C. Functional assessment of cochlear nerve and hearing. *Neurochirurgie*. (2009); Apr;55(2):142-51.
- [7] Marcolla A, Bouchetembale P, Lerozey Y et al. Surdités d'origine génétique. *Annales Françaises d'Oto-Rhino-Laryngologie et de pathologie cervico-faciale*. (2003);123(3):143-7.
- [8] R. Rabionet, L. Zelante, N. Lopez-Bigas et al. , Molecular basis of childhood deafness resulting from mutations in the GJB2 (connexin 26) gene, *Hum. Genet.* 106 (2000); 40 44.
- [9] Cohen-Salmon M, El-Amraoui A, Leibovici M, Petit C. Otogelin: a glycoprotein specific to the acellular membranes of the inner ear. *Proc Natl Acad Sci USA* (1997); 94:14450-5.
- [10] Delas B, Dehesdin D. Anatomie de l'oreille externe. *Encycl Med Chir (Elsevier, Paris), Oto-rhinolaryngologie*, 20-010-A-10, 2008:10p.
- [11] Thomassin JM, Dessi P, Danvin JB et al. Anatomie de l'oreille moyenne. *Encycl Med Chir (Elsevier, Paris), Oto-rhino-laryngologie*, 20-015-A-10, 2008:21p.
- [12] Sauvage JP, Puyraud S, Roche O et al. Anatomie de l'oreille interne. *Encycl Med Chir (Elsevier, Paris), Oto-rhino-laryngologie*, 20-020-A-10, 1999:16p.
- [13] Nouvian R, Malinvaud D, Van den Abbeele T et al. Physiologie de l'audition. *Encycl Med Chir (Elsevier, Paris), Oto-rhino-laryngologie*, 20-030-A-10, 2006:15p.
- [14] Simon E, Perrot X, Mertens P. Functional anatomy of the cochlear nerve and the central auditory system. *Neurochirurgie*. (2009); Apr;55(2):120-6.
- [15] Sidi S, Friedrich RW, Nicolson T. NompC TRP channel required for vertebrate sensory hair cell mechanotransduction. *Science* (2003);301: 96-9.
- [16]] Marsot-Dupuch K, Gayet-Delacroix M. Imaging of the cochleo-vestibular system. *J Radiol*. (1999); Apr;80(4):351-62.
- [17] Legan PK, Rau A, Keen JN, Richardson GP. The mouse tectorins: modular matrix proteins of the inner ear homologous to components of the spermegg adhesion system. *J Biol Chem* (1997); 272:8791-801.
- [18] Denoyelle F, Marlin S, Petit C, Garabedian EN. Hereditary sensorineural deafness. *Rev Prat* (2000); 15:146-9
- [19] Denoyelle F et al. Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, DFNB1, due to connexin 26 gene defect: implication for genetic counselling. *Lancet* (1999); 353 :1298-303.

- [20] Denoyelle F, Weil D, Maw MA et al. Prelingual deafness: high prevalence of a 35delG mutation in the connexin 26 gene. *Hum Mol Genet* (1997); Nov;6 (12): 2173-7
- [21] Ohtsuka A, Yuge I, Kimura S, et al. GJB2 deafness gene shows a specific spectrum of mutations in Japan, including a frequent founder mutation. *Hum Genet.* (2003);112:329-333.
- [22] G. Lucotte, F. Dieterlen The 35delG mutation in the connexin 26 gene (*GJB2*) associated with congenital deafness: European carrier frequencies and evidence of its origin in ancient Greece. *Genet. Test.* 9 (2005); pp. 20–25.
- [23] Stern RE, Lalwani AK. Audiologic evidence for further genetic heterogeneity at DFNA2. *Acta Otolaryngol* (2002); 122:730-5.
- [24] OH N, Kupka S, Mirghmizadeh F et al. Clinical and molecular genetic analysis of monozygotic twins displaying stapes gusher syndrome (DFN3). *HNO* (2003); 51:629-33.
- [25] Melchionda s, Bicego M, Marciano E, Franze A, Morgutti M, Bortone G, Zelante L, Carella M, D' Andrea P. Functional characterization of novel CX26 (T55N) mutation associated to non-syndromic hearing loss. *Biochem Biophys Res Commun.* (2005); 337:799–805.
- [26] LenchN et al. Connexin-26 mutations in sporadic non-syndromal sensorineural deafness. *Lancet*, (1998); 351: 415.
- [27] Jonard L, Niasme-Grare M, Bonnet C, et al. Screening of SLC26A4, FOXI1 and KCNJ10 genes in unilateral hearing impairment with ipsilateral enlarged vestibular aqueduct. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* (2010);74(9):1049–53.
- [28] Maeda S, Nakagawa S, Suga M, Yamashita E, Oshima A, Fujiyoshi Y, Tsukihara T. Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 Å resolution. *Nature.* (2009);458(7238):597–602.
- [29] Marziano NK, Casalotti SO, Portelli AE, Becker DL, Forge A. Mutations in the gene for connexin 26 (*GJB2*) that cause hearing loss have a dominant negative effect on connexin 30. *Hum Mol Genet.* (2003);12:805–812.
- [30] Vincent M, Estève-Fraysse MJ, Fraysse B. Diagnosis of perceptive deafness in adults. *Rev Prat.* (1990) Sep 1;40(19):1751-61.
- [31] Schneider JM, Gopinath B, McMahon CM et al. Role of general practitioners in managing age-related hearing loss. *Med J Aust.* 2010 Jan 4;192(1):20-3.
- [32] Bouccara D, Mosnier I, Bozorg-Grayeli A et al. Réhabilitation auditive : les possibilités actuelles. *NPG.* (2005); Dec ;5(30):28-33.
- [33] Bonfils P, Van Den Abbeele T, Ané P et al. Exploration fonctionnelle auditive. *Encycl Med Chir* (Elsevier, Paris), Oto-rhino-laryngologie, 20-175-A-10, 1998:10p.
- [34] Martin PEM, Evans HW. Incorporation of connexins into plasma membranes and gap junctions. *Cardiovasc Res.* (2004);62:378–387.
- [35] Wallner M, Meera P, Toro L. Molecular basis of fast inactivation in voltage and Ca^{2+} -activated K^{+} channels: a transmembrane betasubunit homolog. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:4137-42.
- [36] H Nahili, M Ridal, R Boulouiz et al. Absence of GJB3 and GJB6 mutations in Moroccan familial and sporadic patients with autosomal recessive nonsyndromic deafness. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* (2008); 72, 1633-1636.

- [37] M. Blanchard, B. Thierry, S. Marlin, F. Denoyelle. Aspects génétiques de la surdité. *Archives de pédiatrie* 19 (2012); 886-889.
- [38] S. Abe, S. Usami, H. Shinkawa, P. M. Kelley, W. J. Kimberling. Prevalent connexin 26 gene (GJB2) mutations in Japanese, *J. Med. Genet.* 37 (2000); 41-43.
- [39] Y. C. Wang, C. Y. Kung, M. C. Su et al. , Mutations of Cx26 gene (GJB2) for prelingual deafness in Taiwan, *Eur. J. Hum. Genet.* 10 (2002), 495-498.
- [40] Carrasquillo MM, Zlotogora J, Barges S, Chakravarti A. Two different connexin 26 mutations in an inbred kindred segregating non-syndromic recessive deafness: implications for genetic studies in isolated populations. *Hum Mol Genet.* 1997 Nov;6(12):2163–2172.
- [41] Billings KR, Kenna MA. Causes of pediatric sensorineural hearing loss. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* (1999); 125 : 517-21.
- [42] Petit C, Levilliers J, Hardelin JP. Molecular genetics of hearing loss. *Annu Rev Genet* (2001); 35:589-646
- [43] Chang, Q., Tang, W., Ahmad et al. Gap junction mediated intercellular metabolite transfer in the cochlea is compromised in connexin 30 null mice. (2008) *PLoS ONE* 3, e4088.
- [44] Bruzzone R, White TW, Paul DL. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem.* (1996); May 15;238(1):1–27.
- [45] Stong, B. C. , Chang, Q. , Ahmad, S. A novel mechanism for connexin 26 mutation linked deafness: cell death caused by leaky gap junction hemichannels. *Laryngoscope.* (2006), 116, 2205–2210.
- [46] Cohen-Salmon, M. , Ott, T. , Michel, V et al. Targeted ablation of connexin26 in the inner ear epithelial gap junction network causes hearing impairment and cell death. *Curr. Biol.* (2002); 12,1106–1111.
- [47] Beltramello, M. , Piazza, V. , Bukauskas, F. F et al. Impaired permeability to Ins(1,4,5)P3 in a mutant connexin underlies recessive hereditary deafness. *Nat. Cell. Biol.* (2005); 7, 63–69.
- [48] Zhang, Y. , Tang, W. , Ahmad S et al. Gap junction-mediated intercellular biochemical coupling in cochlear supporting cells is required for normal cochlear functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2005); 102, 15201–15206.
- [49] Tekin M, Arnos KS, Xia XJ, Oelrich MK, Liu XZ, Nance WE, Pandya A. W44C mutation in the connexin 26 gene associated with dominant non-syndromic deafness. *Clin Genet.* (2001);59:269–273.
- [50] Akiyama M, Sakai K, Arita K, Nomura Y, Ito K, Kodama K, McMillan JR, Kobayashi K, Sawamura D, Shimizu H. A novel GJB2 mutation p. Asn54His in a patient with palmoplantar keratoderma, sensorineural hearing loss and knuckle pads. *J Invest Dermatol.* (2007);127:1540–1543.
- [51] Bruzzone R, Gomes D, Denoyelle E, Duval N, Perea J, Veronesi V, Weil D, Petit C, Gabellec MM, D'Andrea P, White TW. Functional analysis of a dominant mutation of human connexin26 associated with nonsyndromic deafness. *Cell Commun Adhes.* (2001);8:425–431
- [52] Green GE, Scott DA, McDonald JM, Woodworth GG, Sheffield VC, Smith RJH. Carrier rates in the midwestern United States for GJB2 mutations causing inherited deafness. *JAMA.* (1999);281:2211–2216.

- [53] Feldmann D, Denoyelle F, Loundon N et al. Clinical evidence of the nonpathogenic nature of the M34T variant in the connexin26 gene. *Eur J Hum Genet* (2004);12:279–84.
- [54] Morlé L, Bozon M, Alloisio N et al. A novel C202F mutation in the connexin26 gene (GJB2) associated with autosomal dominant isolated hearing loss. *J Med Genet* (2000);37:368–9.
- [55] Meşe G, Richard G, White TW. Gap junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol.* (2007);127:2516–2524.
- [56] Kikuchi T, Kimura RS, Paul DL, Adams JC. Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Anal Embryol.* (1995);191:101–118.
- [57] Richard G, Rouan F, Willoughby CE, et al. Missense mutations in GJB2 encoding connexin-26 cause the ectodermal dysplasia keratitis- ichthyosisdeafness syndrome. *Am J Hum Genet* (2002) 70:1341–1348.
- [58] Löffler J, Nekahm D, Hirst-Stadlmann A, Günther B, Menzel HJ, Utermann G, Janecke AR. Sensorineural hearing loss and the incidence of Cx26 mutations in Austria. *Eur J Hum Genet.* (2001);9:226–230.
- [59] Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acids Res.* (1988);16:1215.
- [60] Santé en chiffre 2010. Direction de la Planification et des ressources financières, division de la planification et des études, Service des études et de l'information sanitaire. 2010. Ministère de la santé, Royaume du Maroc.
- [61] Ridal M, N Ouattassi, Z Taybi et al. Profil étiologique des surdités neurosensorielles sévères et profondes de l'enfant dans la région du centre nord du Maroc. *Pan African Journal of Medicine* 2014.
- [62] O Abidi, R Boulouiz, H Nahili et al. GJB2 (connexin 26) gene mutations in Moroccan patients with autosomal recessive non-syndromic hearing loss and carrier frequency of the common GJB2—35delG mutation. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*(2007); 71, 1239—1245
- [63] Parry G, et al. Connexin 26 mutations in hereditary nonsyndromic sensorineural deafness. *Nature* (1997);387:80–3.
- [64] G. Minarik, E. Ferakova, A. Ficek, et al. *GJB2* gene mutations in Slovak hearing-impaired patients of Caucasian origin: spectrum, frequencies and SNP analysis, *Clin. Genet.* 68 (2005); 554-557.
- [65] B. Gazzaz, D. Weil, L. Rais et al. Autosomal recessive and sporadic deafness in Morocco: high frequency of the 35delG GJB2 mutation and absence of the 342-kb GJB6 variant, *Heart Res.* 210 (2005); 80-84.
- [66] Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, Lench NJ, Liang JN, Parry G, Mueller RF, Leigh IM. Connexin 26 mutations in hereditary nonsyndromic sensorineural deafness. *Nature* (1997); 387: 80-3.
- [67] M. Simsek, N. Al-Wardy, A. Al-Khayat et al. , Absence of deafness associated connexin-26 (GJB2) gene mutations in the Omani population, *Hum. Mutat.* 18 (2001); 545-546.
- [68] A. Pampanos, J. Economides, V. Iliadou, P. Neou, P. Leotsakos, N. Voyiatzis, et al. , Prevalence of GJB2 mutations in prelingual deafness in the Greek population, *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 65 (2002); 101-108.

- [69] M. Mustapha, N. Salem, V. Delague et al. , Autosomal recessive nonsyndromic hearing loss in the Lebanese population: prevalence of the 30delG mutation and report of two novel mutations in the connexin 26 (GJB2) gene, *J. Med. Genet.* 38 (2001); E36.
- [70] O. Uyguner, M. Emiroglu, A. Uzumcu et al. , Frequencies of gap- and tightjunction mutations in Turkish families with autosomal-recessive nonsyndromic hearing loss, *Clin. Genet.* 64 (2003); 65-69.
- [71] X. Z. Liu, X. J. Xia, X. M. Ke et al. , The prevalence of connexin 26 (GJB2) mutations in the Chinese population, *Hum. Genet.* 111 (2002); 394-397.
- [72] R. L. Snoeckx, D. M. Hassan, N. M. Kamal et al. Mutation analysis of the GJB2 (connexin 26) gene in Egypt, *Hum. Mutat.* 26 (2005); 60-61.
- [73] P. Seeman, M. Malikova, D. Raskova et al. , Spectrum and frequencies of mutations in the GJB2 (Cx26) gene among 156 Czech patients with prelingual deafness, *Clin. Genet.* 66 (2004); 152-157.
- [74] N. J. Lench, A. F. Markham, R. F. Mueller et al. , A Moroccan family with autosomal recessive sensorineural hearing loss caused by a mutation in the gap junction protein gene connexin 26 (GJB2), *J. Med. Genet.* 35 (1998); 151-152.
- [75] P. M. Kelley, D. J. Harris, B. C. Comer et al. , Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss, *Am. J. Hum. Genet.* 62 (1998); 792-799.
- [76] M. M. Carrasquillo, J. Zlotogora, S. Barges, A. Chakravarti, Two different connexin 26 mutations in an inbred kindred segregating non-syndromic 74recessive deafness: implications for genetic studies in isolated populations, *Hum. Mol. Genet.* 6 (1997); 2163-2172.
- [77] R. J. Morell, H. J. Kim, L. J. Hood, L. et al. Mutations in the connexin 26 gene (GJB2) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness, *N. Engl. J. Med.* 339 (1998); 1500-1505.
- [78] Morlé L, Bozon M, Alloisio N, Latour P, Vandenberghe A, Plauchu H, Collet L, Edery P, Godet J, Lina-Granade G. A novel C202F mutation in the connexin26 gene (GJB2) associated with autosomal dominant isolated hearing loss. *J Med Genet.* (2000);37:368–370.
- [79] Rouan F, White TW, Brown N, Taylor AM, Lucke TW, Paul DL, Munro CS, Uitto J, Hodgins MB, Richard G. Trans-dominant inhibition of connexin-43 by mutant connexin-26: implications for dominant connexin disorders affecting epidermal differentiation. *J Cell Sci.* 2001;114(Pt 11):2105–2113.
- [80] Snoeckx RL, Hassan DM, Kamal NM, Van Den Bogaert K, Van Camp G. Mutation analysis of the GJB2 (connexin 26) gene in Egypt. *Hum Mutat.* (2005);26:60–61
- [81] Liu, X. Z , Xia, X. J. , Adams, J. et al. Mutations in GJA1 (Connexin 43) are associated with non syndromic autosomal recessive deafness. *Hum. Mol. Genet.* (2001) 10, 2945–2951.
- [82] Liu, X. Z., Xia, X. J , Xu, L. R et al. Mutations in connexin 31 underlie recessive as well as dominant non syndromic hearing loss. *Hum. Mol. Genet.* (2000) 9, 63–67.
- [83] Ruazidin, S., Castelein, C. M. , Ahmed, Z. M. et al. Dominant modifier DFMN1 suppresses recessivedeafness DFNB26. *Nat. Genet.* (2000); 26,431-434.
- [84] Denoyelle F, Lina-Granade G, Plauchu H et al. Connexin26 gene linked to a dominant deafness. *Nature* (1998); 393:319–20.
- [85] Lipan M, Ouyang X, Yan D, Angeli S, Du LL, et al. (2011) Clinical comparison of hearing-impaired patients with DFNB1 against heterozygote carriers of connexin 26 mutations. *Laryngoscope* 121: 811–814.

ANNEXE 1

Composition des produits utilisés

1) Solution pour extraction d'ADN par sel :

❖ Lyse des hématies TE 20/5 : 1L

- 20 ml Tris-HCl pH 7,6 1 M
- 10 ml EDTA disodique pH 8 0,5 M
- H₂O distillée

▪ Tris HCl 1M pH 7,6

- Tris base 121,1 g
- Eau distillée q.s.p 1 litre
- Le pH est ajusté à 7,6 par du HCl concentré (12N)
- Autoclaver

▪ EDTA-Na₂ 0,5 M à pH 8

- EDTA-Na₂-2H₂O 186,12 g
- Eau distillée q.s.p 1 litre
- Ajuster le pH à 8 par du NaOH en pastilles
- Autoclaver et conserver à +4°C.

❖ Lyse des globules blancs

- 10 ml Tris-HCl pH 7,6 1 M
- 20 ml EDTA disodique pH 8 0,5 M
- 20 ml SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) 10%
- 10 ml NaCl 5 M

▪ SDS à 10%

- 25g de SDS + E.D q.s.p 250 ml
- Conserver à température ambiante

❖ Préparation de la Protéinase K

Pour 100 ml de tampon de stockage

50 ml	CaCl ₂ 50 mM
50 ml	Tris-HCl 250 mM

Pour 10 ml de Protéinase K solution mère

- Ajouter 10 ml du tampon de reconstitution à 100 mg de protéinase K (Promega)
- Mettre 200 µl de la solution mère dans des tubes eppendorf de 1,5 ml
- Stocker à -20°C

- **Préparation du CaCl₂ 50 mM**

Dissoudre 1,375 g de CaCl₂ (PM= 110) dans 250 ml d'eau distillée

- **Préparation du Tris-HCl 250 mM**

- Prendre 25 ml de la solution Tris-HCl 1 M
- Compléter jusqu'à 100 ml

- ❖ **Solution de conservation de la méduse d'ADN (200 ml) TE 10/1 :**

- 2 ml Tris-HCl pH 7,6 1 M
- 400 µl EDTA disodique pH 8 0,5 M

2) Soltution pour :

- ❖ **BET(Bromure d'ethidium) à 10mg/ ml :**

- BET : 0.5g
- Eau distillé : qsp 50ml
- Laisser dissoudre
- Conserver à 4°C et à l'abri de la lumière

- ❖ **Gel d'agarose à 2% :**

- Agarose : 1g
- Tampon TAE 1X : 50ml
- Chauffer à ébullition
- Couler le gel dans la cuve d'électrophorèse

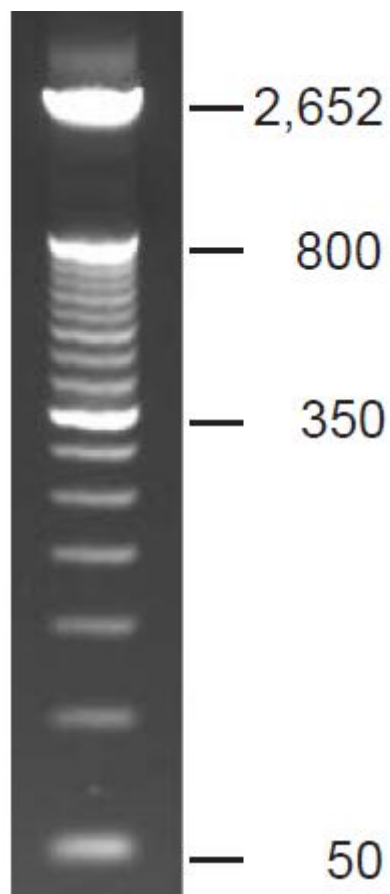
- **Tampon TAE (Tris-Acétate-EDTA) 50X :**

- Tris-base : 242g
- EDTA 0.5M PH 8 : 100ml
- Acide acétique : 57ml
- Eau distillée : qsp 1000ml
- Alliquoter et autoclaver
- Conserver à 4°C

- ❖ **Tampon de charge :**

- bleu de bromophénol : 0.1g
- sucrose : 50g
- eau distillée : q. s .p 100ml
- conserver la solution à 4°C

ANNEXE 2



**Photo du marqueur de taille 2652 DNA Ladder 50pb
Proméga**

ANNEXE 3

Fiches de consentement

Banque d'ADN

Maladie de

Dossier Génétique :

Dossier clinique :

IP :

Nom, Prénom :

Date de naissance :

Consanguinité :

Origine père :

Origine mère :

Adresse :

Tel :

Médecin traitant :

Prélèvement sanguin (2 tubes EDTA de 5 ml) Fait le

Propositus Père Mère

Autres

Réception au laboratoire par : le :

Fait à Fès, le

Signature et cachet du médecin :

موافقة مريض بعد التوعية من اجل الدراسة في الجينات لمرض

الاسم العائلي.....

اقرار المريض

اقرأنا الموقع أدناه..... موافقتي الإرادية على المشاركة من
اجل دراسة الجينات لمرض

حرر في: بتاريخ.....

التوقيع:

اقرار الطبيب

اقر أنا الطبيب بأنني شرحت بالقدر الوافي للمريض طبيعة هذه
الدراسة والهدف منها وانه وافق بمحض إرادته.

.....حرر في: بتاريخ.....

ANNEXE 4

GJB2 Exon 1

4861 ttgggggggtt cggggcctttc gggggcggtc ggggggttcgc ggaccgcgga agctctgagg
4921 acccagaggc cgggcgcgct ccgcccgcgg cggcgcccc tccgtaactt tcccagtcctc
→ 4981 cgaggggaaga ggcgggggtgt **ggggtgcggt taaaaggcgc cacggcggga ggtggt**
5041 ggggccccgc agcgccccgc cgtcctctc cccgactcgg agccccctcg cggcgccccg
5101 cccaggaccc gcctaggagc gcaggagccc cagcgcagag accccaacgc cgagaccccc
5161 gccccggccc cggcgcgctt cctcccgaag caggtgagcc cggcgcccc ggactgcccc
5221 gccaggaacc tggcgcgggg agggaccgcg agaccagag cggttgcccc gccgcgtggg
5281 tctcggggaa ccggggggct ggaccaacac acgtccttgg gccggggggc gggggcgccc
5341 ttctggagcg ggcgtttctg cggccgagct ccggagctgg aatggggcgg ccggggaagt
5401 ggacgcgatg gcaccgcccg ggggtgcgagt ggggccgggc gcgcgcggga ggggaaaaag

GJB2 EXON 2

8281 atttaagcat gcttgcttac ccagactcag agaagtctcc ctgttctgtc ctagctagtg
→ 8341 attcctgtgt tgtgtgcatt cg**tcttttcc** **agagcaaacc** **gccagagta** gaag**atggat**
8401 **tggggcacgc** **tgcagacgat** **cctgggggGt** **gtgaacaaac** **actccaccag** **cattggaaag**
8461 **atctggctca** **ccgtcctctt** **cattttttgc** **attatgatcc** **tcgttgtggc** **tgcaaaggag**

8521 **gtgtggggag** **atgagcaggc** **cgactttgtc** **tgcaacaccc** **tgagccagg** **ctgcaagaac**
CDS → 8581 **gtgtgctacg** **atcactactt** **ccccatctcc** **cacatccggc** **tatgggccct** **gcagctgac**
8641 **ttcgtgtcca** **cgccagcgct** **cctagtggcc** **atgcacgtgg** **cctaccggag** **acatgagaag**
8701 **aagaggaagt** **tcatcaagg** **ggagataaag** **agtgaattta** **agtcga** **ggagatcaaa**
8761 **accagaagg** **tccgcacga** **aggctccctg** **tgttgacac** **acacaagcag** **catcttcttc**
8821 **cggttcacat** **tgaagccgc** **cttcacgtac** **gtttctctatg** **tcatgtacga** **cggcttctcc**
8881 **atgcagcggc** **tggatgaagt** **caacgcctgg** **ccttgtccca** **acactgtgga** **ctgctttgtg**
8941 **tcccggccca** **cggagaagac** **tgtcttcaca** **gtgttcacga** **ttgcagtgtc** **tggaaattgc**
9001 **atcctgctga** **atgtcactga** **attgtgttat** **ttgctaatta** **gatattgttc** **tgggaagtca**
9061 **aaaaagccag** **tttaacgcac** **tgcc** **cagttg** **ttagattaag** **aaatag** **catgagagg**

ANNEXE 4

Conditions de la PCR

<i>Conditions de la réaction de PCR pour l'exon 1</i>						
<i>Conditions expérimentales</i>			<i>Programme PCR</i>			
<i>Reactifs</i>	<i>Concentration</i>	<i>Volume (ul)</i>	<i>Etape</i>	<i>T (°c)</i>	<i>Temps</i>	<i>Cycles</i>
TAMPON	10X	4	Dénaturation initiale	95	9	1
MgCl ₂	50mM	2.5				
DNTP	200ul	2	Dénaturation	94	30	36
Amorces	10mM	2	Hybridation	60	30	36
	10mM	2				
H ₂ O	Qsp	6.3	Elongation	72	60	36
Taq	1u/ul	0.2	Elongation	72	9	1
ADN	100ng/ul	1	finale			

<i>Conditions de la réaction de PCR pour l'exon 2.1</i>						
<i>Conditions expérimentales</i>			<i>Programme PCR</i>			
<i>Reactifs</i>	<i>Concentration</i>	<i>Volume (ul)</i>	<i>Etape</i>	<i>T (°c)</i>	<i>Temps</i>	<i>Cycles</i>
TAMPON	10X	2	Dénaturation initiale	95	9	1
MgCl ₂	50mM	2				
DNTP	200ul	2	Dénaturation	94	30	40
Amorces	10mM	1	Hybridation	63	30	40
	10mM	1				
H ₂ O	Qsp	10.8	Elongation	72	60	40
Taq	1u/ul	0.2	Elongation	72	9	1
ADN	100ng/ul	1	finale			

<i>Conditions de la réaction de PCR pour l'exon 2.2</i>						
<i>Conditions expérimentales</i>			<i>Programme PCR</i>			
<i>Reactifs</i>	<i>Concentration</i>	<i>Volume (ul)</i>	<i>Etape</i>	<i>T (°c)</i>	<i>Temps</i>	<i>Cycles</i>
TAMPON	10X	2	Dénaturation initiale	95	9	1
MgCl ₂	50mM	2				
DNTP	200ul	2	Dénaturation	94	30	40
Amorces	10mM	1	Hybridation	65	30	40
	10mM	1				
H ₂ O	Qsp	10.8	Elongation	72	60	40
Taq	1u/ul	0.2	Elongation	72	9	1
ADN	100ng/ul	1	finale			

RESUME

La surdité constitue le déficit sensoriel le plus fréquent. Elle affecte environ 1 enfant sur 1000 et sa prévalence augmente avec l'âge. Actuellement, l'origine génétique est incriminée dans 60–80 % des cas.

Le mode de transmission autosomique récessif est prédominant (près de 80 %), les formes autosomiques dominantes (20 %), liées à l'X (1 %) et mitochondriales (<1 %) ont également été décrites. Plus de 67 gènes incriminés dans les surdités non syndromiques ont été identifiés à ce jour en particulier le gène *GJB2* localisé en 13q11, qui code pour la Connexine 26; protéine transmembranaire intervenant dans le transport intercellulaire au niveau de l'oreille interne. Ce gène est muté dans environ 10 % de toutes les surdités de l'enfant et dans plus de 50 % des surdités récessives non syndromiques.

L'objectif de ce travail est la mise au point de l'étude moléculaire du gène *GJB2* au sein du service de génétique médicale et d'oncogénétique du CHU HASSAN II Fès afin de déterminer la prévalence et le spectre des mutations de ce gène et en particulier la mutation 35delG dans notre population, d'établir un phénotype clinique et de proposer un conseil génétique adéquat.

A travers notre étude, nous confirmons l'implication incontestable et fréquente des mutations du gène *GJB2* dans la surdité autosomique récessive non syndromique au Maroc, comme c'est le cas dans d'autres pays du pourtour méditerranéen. Nous avons également pu à travers notre étude identifier deux autres mutations du gène de la connexine G200R et G59R.

L'absence d'altérations génétiques dans notre population (78,34 %) suggère clairement l'implication d'autres gènes nécessitant une analyse génétique plus poussée. Actuellement, les méthodes de séquençage à haut débit sont porteuses de grands espoirs en terme d'innovations médicales notamment dans le diagnostic moléculaire des surdités d'origine génétique. Un panel de 100 gènes possiblement impliqués dans les surdités syndromiques et non syndromiques pourrait être testé.