



BU bibliothèque Lyon 1

<http://portaildoc.univ-lyon1.fr>

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD – LYON I
INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES
FACULTÉ DE PHARMACIE DE LYON
8, avenue Rockefeller – 69373 LYON Cedex 08

Année 2013

THÈSE n° 07-2013

**MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE
BIOLOGIE MÉDICALE**

**Travail effectué dans le Service des Maladies Héréditaires du Métabolisme
et Dépistage Néonatal
Sous la direction du Dr David CHEILLAN**

SOUTENU DEVANT LE JURY INTERRÉGIONAL LE MARDI 4 JUIN 2013
PAR **M. Fabien LEJARRE**
NÉ LE 8 Mai 1984 À ORLÉANS (45)

CONFORMÉMENT AUX DISPOSITIONS DU DÉCRET N° 90-810 DU 10 SEPTEMBRE 1990,
TIENT LIEU DE THÈSE

**THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Étude du gène *PEX7* dans la Chondrodysplasie Rhizomélique
Ponctuée peroxysonale de type 1**

JURY

PRÉSIDENT : Mme GOUDABLE, Professeur des Universités - Praticien hospitalier

MEMBRES : M. LEVADE, Professeur des Universités – Praticien hospitalier
M. ROSSI, Docteur en Médecine – Praticien hospitalier
M. CHEILLAN, Docteur en Pharmacie – Praticien hospitalier

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD – LYON I
INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES
FACULTÉ DE PHARMACIE DE LYON
8, avenue Rockefeller – 69373 LYON Cedex 08

Année 2013

THÈSE n° 07-2013

**MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE
BIOLOGIE MÉDICALE**

**Travail effectué dans le Service des Maladies Héréditaires du Métabolisme
et Dépistage Néonatal
Sous la direction du Dr David CHEILLAN**

SOUTENU DEVANT LE JURY INTERRÉGIONAL LE MARDI 4 JUIN 2013
PAR **M. Fabien LEJARRE**
NÉ LE 8 Mai 1984 À ORLÉANS (45)

CONFORMÉMENT AUX DISPOSITIONS DU DÉCRET N° 90-810 DU 10 SEPTEMBRE 1990,
TIENT LIEU DE THÈSE

**THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Étude du gène *PEX7* dans la Chondrodysplasie Rhizomélique
Ponctuée peroxysonale de type 1**

JURY

PRÉSIDENT : Mme GOUDABLE, Professeur des Universités - Praticien hospitalier

MEMBRES : M. LEVADE, Professeur des Universités – Praticien hospitalier
M. ROSSI, Docteur en Médecine – Praticien hospitalier
M. CHEILLAN, Docteur en Pharmacie – Praticien hospitalier

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1

Président de l'Université
Vice-Président d'Administration
Vice-Président du Conseil Scientifique
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. François-Noël GILLY
M. Hamda BEN HADID
M. Germain GILLET
M. Philippe LALLE

Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon 1

SANTÉ

UFR de Médecine Lyon Est	Directeur : M. Jérôme ÉTIENNE
UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux	Directeur : M. François-Noël GILLY
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme Christine VINCIGUERRA
UFR d'Odontologie	Directeur : M. Denis BOURGEOIS
Institut des Techniques de Réadaptation	Directeur : M. Yves MATILLON
Département de formation et centre de recherche en Biologie Humaine	Directeur : M. Pierre FARGE

SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. Fabien DE MARCHI
UFR de Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Claude COLLIGNON
Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon (ex ISTL)	Directeur : M. Pascal FOURNIER
I.U.T. LYON 1	Directeur : M. Christian COULET
Institut des Sciences Financières et d'Assurance (ISFA)	Directeur : M. Mme Véronique MAUME-DESCHAMPS
I.U.F.M.	Directeur : M. Régis BERNARD

Mai 2012

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1
ISPB - Faculté de Pharmacie Lyon
Directrice : Madame la Professeure Christine VINCIGUERRA
Directeurs Adjoints : Madame S. BRIANÇON, Monsieur P. LAWTON, Monsieur P. NÉBOIS
Madame S. SENTIS, Monsieur M. TOD

Directrice Administrative : Madame P. SILVEIRA

LISTE DES DÉPARTEMENTS PÉDAGOGIQUES

DÉPARTEMENT PÉDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUE ET PHARMACIE GALÉNIQUE

• **CHIMIE ANALYTIQUE, GÉNÉRALE, PHYSIQUE ET MINÉRALE**

Monsieur Jean-François SABOT (Pr)
Monsieur Alain BANNIER (MCU)
Monsieur Philippe BERNARD (MCU)
Mademoiselle Julie-Anne CHEMELLE (MCU)
Monsieur Raphaël TERREUX (MCU – HDR)
Monsieur Pierre TOULHOAT (PAST)

• **PHARMACIE GALÉNIQUE – COSMÉTOLOGIE**

Madame Stéphanie BRIANÇON (Pr)
Madame Françoise FALSON (Pr)
Monsieur Hatem FESSI (Pr)
Madame Joëlle BARDON (MCU – HDR)
Madame Valérie BERTHOLLE (MCU)
Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (MCU – HDR)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Ghania HAMDİ-DEGOBERT (MCU)
Monsieur Fabrice PIROT (MCU – HDR)
Madame Karine PORET-PADOIS (MCU)
Monsieur Patrice SEBERT (MCU – HDR)

• **BIOPHYSIQUE**

Monsieur Richard COHEN (PU-PH)
Monsieur Henri DECHAUD (MCU –PH –HDR)
Madame Laurence HEINRICH (MCU)
Monsieur David KRYZA (MCU–PH)
Madame Sophie LANCELOT (MCU–PH)
Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (MCU)

DÉPARTEMENT PÉDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTÉ PUBLIQUE

• **DROIT DE LA SANTÉ**

Monsieur François LOCHER (PU–PH)
Mademoiselle Valérie SIRANYAN (MCU)

• **ÉCONOMIE DE LA SANTÉ**

Madame Nora FERDJAOUİ MOUMJID (MCU)
Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU)
Madame Carole SIANI (MCU – HDR)

• **INFORMATION ET DOCUMENTATION**

Monsieur Pascal BADOR (MCU – HDR)

Septembre 2011

- **HYGIÈNE, NUTRITION, HYDROLOGIE ET ENVIRONNEMENT**

Madame Joëlle GOUDABLE (PU-PH)

- **HYGIÈNE, ENVIRONNEMENT ET BIOSÉCURITÉ**

Monsieur Dominique TRÉPO (MCU –PH– HDR)

- **DISPOSITIFS MÉDICAUX**

Monsieur Gilles AULAGNER (PU – PH)

Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)

- **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITÉ**

Madame Alexandra CLAYER-MONTEBAULT (MCU)

Monsieur François COMET (MCU)

Monsieur Vincent GROS (MCU PAST)

Madame Pascale PREYNAT (MCU PAST)

- **MATHÉMATIQUES – STATISTIQUES**

Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU)

Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)

Madame Marie-Paule PAULTRE (MCU – HDR)

DÉPARTEMENT PÉDAGOGIQUE SCIENCES DU MÉDICAMENT

- **CHIMIE ORGANIQUE**

Monsieur Pascal NEBOIS (Pr)

Madame Nadia WALCHSHOFER (Pr)

Monsieur Zouhair BOUAZIZ (MCU – HDR)

Madame Christelle MARMINON (MCU)

Madame Sylvie RADIX (MCU-HRD)

Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU)

- **CHIMIE THÉRAPEUTIQUE**

Monsieur Roland BARRET (Pr)

Monsieur Marc LEBORGNE (Pr)

Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU – HDR)

Monsieur Thierry LOMBERGET (MCU-HDR)

Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)

- **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**

Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (Pr)

Madame Anne-Emmanuelle DE BETTIGNIES (MCU)

Madame Isabelle KERZAON (MCU)

Monsieur Serge MICHALET (MCU)

- **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINÉTIQUE ET ÉVALUATION DU MÉDICAMENT**

Madame Roselyne BOULIEU (PU – PH)

Madame Magali BOLON-LARGER (MCU – PH)

Madame Céline PRUNET-SPANO (MCU)

Madame Catherine RIOUFOL (MCU – PH)

Septembre 2011

DÉPARTEMENT PÉDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

- **TOXICOLOGIE**

Monsieur Jérôme GUITTON (PU – PH)
Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)
Madame Léa PAYEN (MCU – HDR)
Monsieur Sylvain GOUTELLE (AHU)

- **PHYSIOLOGIE**

Monsieur Christian BARRES (Pr)
Monsieur Daniel BENZONI (Pr)
Monsieur Alain BATAILLARD (MCU – HDR)
Madame Kiao Ling LIU (MCU)
Monsieur Ming LO (MCU – HDR)

- **PHARMACOLOGIE**

Monsieur Bernard RENAUD (Pr)
Monsieur Michel TOD (PU – PH)
Monsieur Jean-Marie VAUGEOIS (Pr)
Monsieur Luc ZIMMER (PU – PH)
Madame Bernadette ASTIER (MCU – HDR)
Monsieur Roger BESANCON (MCU)
Madame Evelyne CHANUT (MCU)
Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)
Madame Dominique MARCEL-CHATELAIN (MCU – HDR)
Monsieur Olivier CATALA (Pr PAST)
Monsieur Pascal THOLLOT (MCU PAST)

DÉPARTEMENT PÉDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMÉDICALES A

- **IMMUNOLOGIE**

Monsieur Jacques BIENVENU (PU – PH)
Madame Cécile BALTER-VEYSSEYRE (MCU – HDR)
Monsieur Paul ROUZAIRE (AHU)

- **HÉMATOLOGIE ET CYTOLOGIE**

Madame Christine TROUILLOT-VINCIGUERRA (PU – PH)
Madame Brigitte DURAND (MCU – PH)
Monsieur Olivier ROUALDES (AHU)

- **MICROBIOLOGIE et MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUÉE AUX BIOTECHNOLOGIES INDUSTRIELLES**

Monsieur Patrick BOIRON (Pr)
Monsieur Jean FRENEY (PU – PH)
Madame Florence MORFIN (PU – PH)
Monsieur Didier BLAHA (MCU)
Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU)
Madame Emilie FROBERT (AHU)
Madame Marie-Andrée MAZOYER (MCU – HDR)
Mme Véronica RODRIGUEZ-NAVA (MCU)

- **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MÉDICALE**

Madame Anne-Françoise PETAVY (Pr)
Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)
Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU)
Monsieur Philippe LAWTON (MCU – HDR)

Septembre 2011

DÉPARTEMENT PÉDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMÉDICALES B

- **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLÉCULAIRE – BIOTECHNOLOGIE**

Madame Pascale COHEN (Pr)
Monsieur Alain PUISIEUX (Pr)
Monsieur Karim CHIKH (MCU – PH)
Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU)
Monsieur Bruno MATHIAN (MCU – PH – HDR)
Madame Caroline MOYRET-LALLE (MCU – HDR)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Stéphanie SENTIS (MCU)
Madame Marie VILLEDIEU (MCU)

- **BIOLOGIE CELLULAIRE**

Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU)

INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON

Monsieur Philippe LAWTON (MCU – HDR)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Monsieur Patrice SEBERT (MCU – HDR)
Madame Valérie VOIRON (PAST)

Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)

Mademoiselle Nathalie CARTISIER	85 ^{ème} section
Monsieur Wael ZEINYEH	86 ^{ème} section
Monsieur Antony ZOROPOGUI	87 ^{ème} section

Pr : Professeur

PU – PH : Professeur Universitaire, Praticien Hospitalier

MCU : Maître de Conférences Universitaire

MCU– PH : Maître de Conférences Universitaire, Praticien Hospitalier

HDR : Habilitation à Diriger des Recherches

AHU : Assistant Hospitalier Universitaire

PAST : Personnel Associé Temps Partiel

Septembre 2011

Remerciements

Au président du jury, Madame le Professeur Joëlle GOUDABLE

Nous tenons à vous remercier sincèrement de nous avoir fait l'honneur de présider ce jury et de nous avoir accordé un peu de votre temps.

À Monsieur le Professeur Thierry LEVADE

Je vous suis très reconnaissant de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mes sentiments respectueux.

À Monsieur le Docteur Massimiliano ROSSI

Merci d'avoir accepté de juger ce travail. Soyez certain de mes sincères remerciements.

À Monsieur le Docteur David CHEILLAN,

Merci de m'avoir confié ce travail et de m'avoir guidé dans sa réalisation. J'ai apprécié votre disponibilité, vos conseils et la confiance que vous m'avez donnée. Trouvez dans cette thèse l'expression de ma profonde considération.

À Madame le Docteur Christine SABAN,

Merci de m'avoir accueilli dans votre service et de m'avoir donné la possibilité de toucher au domaine des Maladies Héréditaires du Métabolisme. J'ai passé un excellent semestre au sein de votre équipe. Veuillez trouver ici l'expression de tout mon respect.

À Monsieur le Professeur Michel GUICHARDANT, À M^{elle} Patricia DAIRA,

Je vous suis reconnaissant de m'avoir accueilli au sein de votre équipe et de m'avoir transmis un peu de votre savoir.

À l'ensemble du laboratoire des Maladies Métaboliques,

Aux biologistes Cécile, Monique, Pascale et Roseline.

À l'équipe de biologie moléculaire : Un grand merci à Adeline, Geneviève, Maïté, Muriel et Rémy pour votre accueil et votre bonne humeur quotidienne. Ce fut un réel plaisir de travailler avec vous.

À Élodie et Marion, il est certain que nos rencontres sont trop rares mais chacune d'entre elles me donne une vraie joie.

Un mot particulier à Marc, qui m'a guidé pas à pas dans mes manips et qui a su répondre à mes questions. Je te remercie vraiment pour ton aide.

À l'équipe du screening des acides organiques, Agnès, Alex, Catherine, Chantal, Florine et Luc ; pour ne pas perdre la main ! Un dernier plasma à ré-extraire ?

Une pensée spéciale,

À mes co-internes et amis ; Aristide, Vecheak, Choupinette, Céline, Anne-Gaëlle, Yoann et Élodie.

À mes co-locs clermontois ; Pascaline et feu Maurice†.

À mes amis ; Zozoy (Au Traquenard du dimanche soir 🍷 & C'est beau la nature !), Carole, François, Roger, Pierre.

Pour tous ces bons moments passés ensemble.

À mes collègues et amis artificiers, à Fred et à Dany ; une passion nous réunit chaque année et je suis vraiment heureux de partager ces moments avec vous.

À mes amis parachutistes ; on nous enlèvera pas l'idée que rien n'est meilleur que de s'envoyer en l'air.

À Patrice ACHARD,

Veillez trouver dans ce travail, toute ma reconnaissance à votre attention si particulière à mon début de scolarité et à l'intérêt avec lequel vous l'avez suivie.

À mes parents,

Pour m'avoir inculqué le goût du travail, avec labeur et minutie « raisonnée ». Pour m'avoir toujours soutenu, quelques soient mes choix et mes besoins. Et enfin, pour m'avoir toujours donné votre entière confiance, sans jamais aucune exigence de résultats. Je vous fais part de ma profonde reconnaissance.

Aujourd'hui arrive le jour de ma soutenance de thèse que vous attendiez tant. J'espère que vous serez fier de moi. Je vous embrasse et je vous aime.

À ma sœur,

Je te m'aime beaucoup très fort ! Et toi, tu me t'aimes ? Hein ?!

À mes grands-parents,

Mes vacances d'enfance, le recensement des cerfs et des sangliers, la découverte de l'âge de la pierre par la recherche de bifaces, de feuilles de laurier et autres pointes de flèches, ainsi que nos parties de billard, resteront des souvenirs impérissables. Merci de m'avoir transmis ces connaissances. Je vous embrasse et je vous aime.

À Didier, Isabelle, Rémy et Mathilde,

Merci pour tous les bons moments passés ensemble. J'ai hâte de revenir avec vous sur les pistes de ski. Avec toute mon affection.

À la famille NGUYEN,

Merci de m'avoir accepté au sein de votre famille. Je resterai friand de vos plats typiques et du verre de cognac du vendredi soir. Quand est-ce que l'on fait du « Tré » ?

À Khanh, *Mon petit Play mobile personnel, version Radar hyperperformant !*

Ma plus belle rencontre. J'essaie de prendre exemple sur ta sagesse ainsi que sur ta vision de la vie. Merci d'avoir suivi mon travail avec tant de rigueur et merci d'absorber au quotidien toujours un peu plus de mon anxiété.

Avec tout mon Amour. Je t'aime.

Table des matières

INTRODUCTION	15
PREMIÈRE PARTIE : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	16
1. Structure et fonctionnement du peroxysome	16
1.1. Structure	16
1.2. Principales fonctions métaboliques	16
2. Biogenèse des peroxysomes	23
2.1. Formation de la membrane peroxysomale	23
2.2. Importation des protéines membranaires	24
2.3. Importation des protéines matricielles	25
2.4. Régulation peroxysomale	27
3. Principales pathologies peroxysomales	27
3.1. Anomalies de la biogenèse	27
3.2. Déficits isolés d'une enzyme ou d'un transporteur peroxysomal	29
4. La Chondrodysplasie rhizomélique ponctuée de type 1 (MIM 215100)	32
4.1. La CDRP-1 parmi les pathologies osseuses constitutionnelles	32
4.2. Historique	33
4.3. La peroxine 7	34
4.4. Diagnostic	37
4.5. Physiopathologie	51
4.6. Traitements et prise en charge	52
DEUXIÈME PARTIE : TRAVAIL EXPÉRIMENTAL	54
1. Objectif du travail	54
2. Matériels et méthodes	55
2.1. Inclusion des patients, étude clinique et biologique	55
2.2. Matériels biologiques	55
2.3. Biologie moléculaire	56
2.4. Essai de dosage des plasmalogènes sur cellules	63
3. Résultats	67
3.1. Résultats généraux de l'analyse du gène <i>PEX7</i>	67
3.2. Résultats du groupe 1 : patients avec suspicion de CDRP-1	67
3.3. Résultats du groupe 2 : fœtus avec signes d'appel échographiques	84
3.4. Dosage des plasmalogènes	90
TROISIÈME PARTIE : DISCUSSION	91
1. Mise en place de l'analyse du gène <i>PEX7</i>	91
2. Analyse des mutations identifiées	93
3. Conséquences des mutations identifiées	94
4. Corrélation génotype – phénotype	96
5. Patients sans anomalie détectée	99
6. Mise en place du dosage des plasmalogènes	101
7. Difficulté d'observation de l'atteinte du squelette et de la dysmorphie à l'échographie de dépistage	103
8. Proposition de conduite à tenir dans le cas de fœtus présentant des signes d'appel échographiques de CDRP	104
CONCLUSIONS	107
Annexes	109

Liste des figures

Figure 1 : Peroxysomes dans des cellules de Leydig de sanglier.	16
Figure 2 : Transporteurs ABC et enzymes impliquées dans la β -oxydation peroxysomale des AGTLC et des acides gras ramifiés, d'après Kemp et al. ^[20]	19
Figure 3 : Structure chimique du 1- <i>O</i> -hexadéc-1'-ényl-2-éicosa-5,8,11,14-tétraényl- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphoéthanolamine.....	20
Figure 4 : Biosynthèse des 1- <i>O</i> -alkényl-2-acyl-phosphatidyléthanolamine, adaptée de S.Bacot ^[31]	21
Figure 5 : Modèle de biogenèse des peroxysomes, adapté de Tabak et al. ^[52]	24
Figure 6 : Modèle d'insertion des PMPs de classe I, d'après Rucktäschel et al. ^[60]	25
Figure 7 : Les deux voies d'import des protéines peroxysomales matricielles, d'après Nagotu et al. ^[70]	26
Figure 8 : Modèle montrant l'agencement structurel des répétitions WD de Pex7p vu du dessus ^[104]	35
Figure 9 : Vu de profil de la protéine Pex7p, d'après Kunze et al. ^[105]	35
Figure 10 : CDRP-1 sévère chez une patiente âgée de 2 ans ^[111]	38
Figure 11 : CDRP-1 intermédiaire chez une patiente âgée de 4 ans ^[111]	40
Figure 12 : Arbre décisionnel d'exploration des maladies peroxysomales au sein du service des maladies héréditaires du métabolisme et dépistage néonatal.	44
Figure 13 : Trans-étherification d'une molécule de plasmalogène.....	65
Figure 14 : Allèles pathogènes retrouvés chez la patiente LAU	68
Figure 15 : Allèles pathogènes retrouvés chez la patiente RAM	69
Figure 16 : Allèles pathogènes retrouvés chez le patient SIM	70
Figure 17 : Allèles pathogènes retrouvés chez le patient VIE	71
Figure 18 : Radiographie à la naissance du patient BOU , partie supérieure du corps.	72
Figure 19 : Radiographie à la naissance du patient BOU , partie inférieure du corps.	73
Figure 20 : Résultats de l'étude familiale du patient BOU	74
Figure 21 : Résultats de l'étude familiale de la patiente EZZ	76
Figure 22 : Arbre génétique de la famille de la patiente EZZ	76
Figure 23 : Allèles pathogènes retrouvés chez le patient MOS	78
Figure 24 : Allèles pathogènes retrouvés chez le patient MAI	79
Figure 25 : Allèles pathogènes retrouvés chez la patiente CHE	80
Figure 26 : Photographie et Radiographie du patient MEY	82
Figure 27 : Seul allèle pathogène retrouvé chez le patient MEY	82
Figure 28 : Arbre génétique de la famille de la patiente BON	84
Figure 29 : Allèles pathogènes retrouvés chez GUI	85
Figure 30 : Arbre génétique de la famille du fœtus MAN	86
Figure 31 : Arbre génétique de la famille du fœtus DIA	87
Figure 32 : Arbre génétique de la famille du fœtus GIO	88
Figure 33 : Arbre décisionnel à partir des signes d'appel échographiques.....	106

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales protéines de la matrice peroxysomale et leur signal PTS ^[19] .	26
Tableau 2 : Caractéristiques biochimiques des principales maladies peroxysomales, d'après Wanders et Weller ^[78,82,129] .	43
Tableau 3 : Mutations identifiées dans le gène <i>PEX7</i> et phénotypes associés.	46
Tableau 4 : Amorces utilisées pour l'amplification des dix exons du gène <i>PEX7</i> .	58
Tableau 5 : Étapes de la réaction de PCR Touch Down.	59
Tableau 6 : Amorces des réactions de séquences des dix exons du gène <i>PEX7</i> .	61
Tableau 7 : Étapes de la réaction de PCR de séquences.	62
Tableau 8 : Temps de rétention des dérivés méthylés d'intérêts.	66
Tableau 9 : Résultats de l'étude du gène <i>PEX7</i> pour l'ensemble des patients étudiés.	89
Tableau 10 : Résultats du dosage des plasmalogènes chez les patients MAI & GUI .	90
Tableau 11 : Allèles identifiés lors de notre étude du gène <i>PEX7</i> .	93
Tableau 12 : Corrélation génotype – phénotype.	98
Tableau 13 : Comparaison de valeurs normales du taux de plasmalogènes.	102
Tableau 14 : Résultats du dosage des acides gras polyinsaturés chez MAI & GUI .	102

Liste des annexes

Annexe 1 : Bilan peroxysomal des patients étudiés.	110
Annexe 2 : Données cliniques et paracliniques des patients étudiés.	111
Annexe 3 : Bilan peroxysomal, données cliniques et paracliniques des foetus étudiés.	112
Annexe 4 : Composition du Mix pour la réaction de PCR de l'exon 1.	113
Annexe 5 : Composition du Mix pour la réaction de PCR des exons 2 à 10.	113
Annexe 6 : Composition du Mix pour la réaction de séquence.	113

Liste des abréviations

ABC	" ATP-Binding Cassette "
ACOX	Acyl-CoA oxydase
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGTLC	Acide gras à très longue chaîne
alkyl-DHAP-S	alkyldihydroxyacétonephosphate synthase
AMACR	α -méthylacyl-CoA racémase
ARD	" Adult Refsum Disease " / Maladie de Refsum Adulte
ARN	Acide ribonucléique
BHT	3,5-di-tert-butyl-4-hydroxytoluène
CBPE	Centre de Biologie et de Pathologie Est
CDRP	Chondrodysplasie Rhizomélique Ponctuée
D/THCA	Acide di/trihydroxycholestanoïque
DBP	Protéine D bi-fonctionnelle
ddNTPs	didésoxynucléotides
DHAP-AT	Dihydroxyacétone phosphate acyltransférase
DMA	Diméthylacétal
dNTPs	désoxynucléotides
DPN	diagnostic prénatal
DS	déviations standards
GC-FID	Chromatographie gazeuse – Détecteur à ionisation de flamme
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
IMG	Interruption médicale de grossesse
IRD	" Infantile Refsum Disease " / Maladie de Refsum infantile
IRM	Imagerie par résonance magnétique nucléaire
IVG	Interruption volontaire de grossesse
ME	Méthyl-ester
NALD	Adrénoleucodystrophie néonatale
nt	nucléotides
pb	paire de bases
PCR	" Polymerase chain reaction "
PBD	" Peroxisome biogenesis disorders "/Anomalie de biogenèse des peroxysomes
PEX7	Gène codant le Facteur 7 de biogenèse du peroxysome ou Peroxine 7
Pex7p	Facteur 7 de biogenèse du peroxysome, Peroxine 7 ou Récepteur PTS2
PMPs	" Peroxisomal membrane proteins "
pTH1	3-cétoacyl-CoA thiolase
PTS	" Peroxisomal targeting signal "
RE	Réticulum endoplasmique
RT-PCR	" Reverse transcriptase - Polymerase chain reaction "
RXR	Récepteur aux rétinoïdes X
SA	Semaine(s) d'aménorrhée
SCP_x	" sterol carrier protein x "
SDS	Sodium dodécyl-sulfate
SNP	" Single nucleotide polymorphism "
UI	Unité Internationale
X-ALD	Adrénoleucodystrophie liée à l'X
ZS	Syndrome de Zellweger

INTRODUCTION

En 1954, J.Rhodin est le premier à décrire des microparticules cytoplasmiques ne correspondant à aucun organite connu jusque-là^[1]. Ce n'est qu'en 1966 que de Duve & Baudhuin^[2], ont pu les isoler à partir de reins de rats, et étudier leurs propriétés biochimiques. Ces microparticules sont capables, grâce à leur contenu en oxydases et en catalases, de produire et de dégrader le peroxyde d'hydrogène. Elles ont ainsi été dénommées : peroxysomes. Ces peroxysomes sont des organites intracellulaires ubiquitaires chez les eucaryotes^[3]. Ce sont des structures dynamiques, douées d'une remarquable plasticité et qui, en réponse aux changements physiologiques de leur environnement adaptent leur morphologie, leur nombre et leur contenu enzymatique. Les fonctions essentielles des peroxysomes sont la détoxification du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et la β-oxydation des acides gras. Chez les mammifères, d'autres fonctions plus spécialisées et indispensables ont été acquises. Il s'agit de la synthèse des plasmalogènes et des acides biliaires, du métabolisme de certains acides aminés et de médiateurs de l'inflammation (leucotriènes) ainsi que de l'α-oxydation de l'acide phytanique et d'une étape de la synthèse du cholestérol.

La biogenèse des peroxysomes nécessite un ensemble de protéines appelées peroxines, qui sont codées par les gènes *PEX*. Un défaut dans un de ces gènes conduit à des troubles de la biogenèse, dans lesquels plusieurs ou toutes les fonctions peroxysomales peuvent être affectées. Ce phénomène est observé, entre autre, avec la peroxine 7 dans la Chondrodysplasie Rhizomélique Ponctuée de type 1 (CDRP-1). La CDRP-1 est une maladie rare à transmission autosomique récessive, caractérisée par un raccourcissement des os longs proximaux, une atteinte du système nerveux et un déficit en plasmalogènes. Le décès est précoce et survient souvent pendant la première année de vie. Le diagnostic repose essentiellement sur des arguments cliniques et radiologiques. Cependant, les autres formes de chondrodysplasies sont difficiles à différencier. La biologie, où seuls les taux de plasmalogènes sont fortement perturbés, est donc utilisée afin de confirmer le diagnostic de CDRP-1.

Notre objectif a été de mettre en place, pour le diagnostic biochimique et moléculaire de la CDRP-1, le dosage des plasmalogènes et l'étude du gène en cause; le gène *PEX7*. Nous pourrons ainsi établir un diagnostic de certitude. De plus, cette analyse sera très utile pour le diagnostic prénatal.

PREMIÈRE PARTIE : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

1. Structure et fonctionnement du peroxysome

1.1. Structure

Les peroxysomes sont de petits organites généralement ovoïdes, de 0,1 à 1 μm de diamètre^[4] (**Figure 1**). Contrairement aux mitochondries, ils n'ont qu'une simple membrane (bicouche lipidique) délimitant une matrice finement granuleuse et contenant des inclusions enzymatiques cristallines denses aux électrons. Ils sont dépourvus d'ADN^[5], et leurs protéines, traduites par les ribosomes cytoplasmiques, possèdent dans leur séquence des signaux de ciblage indispensables à leur importation^[6]. Les peroxysomes sont ubiquitaires. Ils sont abondants dans les hépatocytes et les cellules rénales, de 100 à 1000 par cellules^[7], mais absents des érythrocytes. Leur synthèse commence dans le réticulum endoplasmique^[8] et leur durée de vie est de trois jours et demi. Ils sont par la suite détruits par un mécanisme d'autophagie ou encore nommé pexophagie^[9].

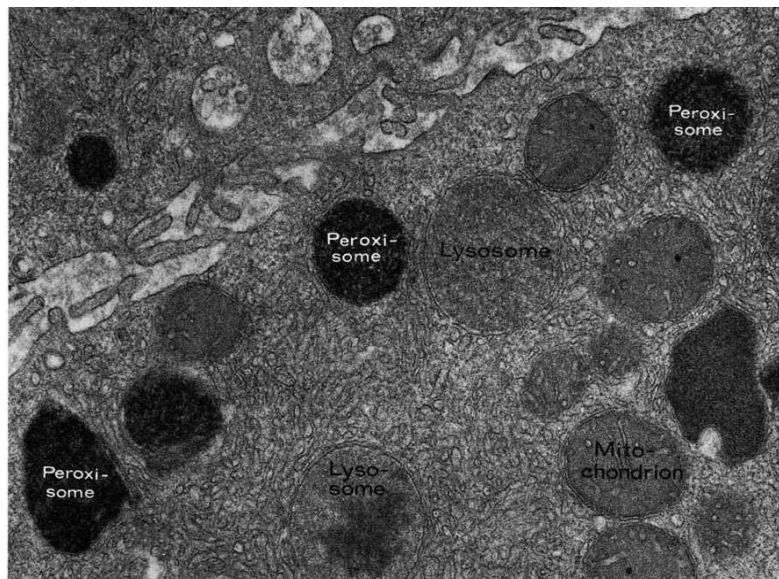


Figure 1 : Peroxysomes dans des cellules de Leydig de sanglier. Marquage cytochimique par de la diaminobenzidine réagissant avec la catalase. Les lysosomes et les mitochondries apparaissent plus clairs^[10].

1.2. Principales fonctions métaboliques

Plus d'une cinquantaine de protéines^[11], membranaires ou matricielles, sont impliquées dans les multiples voies métaboliques des peroxysomes. Les protéines enzymatiques ne sont actives qu'en présence de leurs substrats. Ceux de faible poids moléculaire traversent la

membrane par simple perméabilité. Les autres utilisent des transporteurs métaboliques transmembranaires particuliers tels que les transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette) pour les acides gras (**Figure 2**).

Les fonctions peroxysomales ayant une importance clefs en pathologie sont les suivantes: la β -oxydation et l' α -oxydation des acides gras, la détoxification du glyoxylate et la biosynthèse des éther-phospholipides.

1.2.1. Fonctions cataboliques

1.2.1.1. α -oxydation de l'acide phytanique

L'acide phytanique (acide 3,7,11,15-tétraméthylhexadécanoïque) est issu d'un constituant de la chlorophylle ; le phytol^[12]. L'acide phytanique ainsi que certains acides gras ramifiés possèdent un groupement méthyl en position 3 (ou β) empêchant leurs dégradation par β -oxydation. Le mécanisme de dégradation alors mis en œuvre est l' α -oxydation, au cours de laquelle l'acide phytanique sera décarboxylé pour produire un dérivé 2-méthylé : l'acide pristanique (acide 2,6,10,14-tétraméthylpentadécanoïque). Ce dernier sera par la suite dégradé par la β -oxydation. L' α -oxydation des acides gras a été décrite récemment et nécessite l'action de 3 enzymes: la phytanoyl-CoA-2-hydroxylase (PhyH), la 2-hydroxyphytanoyl-CoA lyase et la pristanal déshydrogénase^[13].

Chez l'homme, les peroxysomes correspondent au seul site d' α -oxydation. Une défaillance dans ce mécanisme peut provoquer l'accumulation d'acide phytanique tel que le déficit en phytanoyl-CoA hydroxylase responsable de la maladie de Refsum. Ce déficit peut également être retrouvé dans d'autres anomalies de la biogenèse des peroxysomes comme la CDRP-1^[14].

1.2.1.2. β -oxydation des acides gras à très longue chaîne et des acides gras ramifiés

La β -oxydation des acides gras non ramifiés et contenant moins de 22 atomes de carbone se produit dans la mitochondrie. Par contre, pour les acides gras à très longue chaîne ou AGTLC (≥ 24 atomes de carbones), cette β -oxydation a lieu dans le peroxysome^[15]. Elle est constituée de quatre étapes faisant intervenir des enzymes différentes selon que l'acide gras soit à longue chaîne ou ramifié, tel que les acides pristanique, phytanique, di et

trihydroxycholestanoïque (D/THCA) et dicarboxylique^[11] (**Figure 2**). Une étape préliminaire est nécessaire afin d'activer l'acide gras en acyl-CoA par une acyl-CoA synthétase.

1. **Déshydrogénation** : au cours de cette première étape, l'acyl-CoA va subir une déshydrogénation en α - β créant une double liaison avec production simultanée d' H_2O_2 . Cette réaction utilise la Flavine Adénine Dinucléotide (FAD) comme co-facteur, l'acyl-CoA oxydase (ACOX-1) pour les AGTLC et l'ACOX-2 pour les acides gras ramifiés.
2. **Hydratation** : lors de cette étape, la double liaison α - β va subir une hydratation aboutissant à une fonction alcool de stéréospécificité particulière.
3. **Oxydation** : cette troisième étape utilise le coenzyme NAD^+ (nicotinamide adénine dinucléotide) afin d'oxyder la fonction hydroxyl en céto pour former du 3-cétoacyl-CoA.

Ces deux étapes sont prises en charge par la protéine D bi-fonctionnelle (DBP).

4. **Coupage thiolitique** : dans cette dernière étape, la liaison α - β est scindée pour aboutir à deux composés : un acétyl-CoA et un acyl-CoA correspondant à l'AGTLC de départ raccourci de deux carbones. Cette réaction est réalisée par deux enzymes différentes : la 3-cétoacyl-CoA thiolase (pTH1 ou ACAA1) spécifique des AGTLC et la « sterol carrier protein x » (SCPx). La SCPx possède une fonction thiolase (pTH2) et un domaine SCP, qui lui permet de prendre en charge les acides gras ramifiés et les dérivés d'acides biliaires.

À la fin d'un cycle, un autre commence jusqu'à l'obtention d'un acyl-CoA pouvant être pris en charge par une mitochondrie^[16].

1.2.1.3. Autres fonctions cataboliques

Le glyoxylate, qui est un métabolite toxique, est converti en glycine par l'alanine glyoxylate-aminotransférase (AGT). Un déficit en cette enzyme est responsable de l'hyperoxalurie de type 1^[17].

Les peroxysomes catabolisent de nombreux autres métabolites. Dans ce rôle de détoxification, ce catabolisme fait intervenir des oxydases et des molécules d'oxygène (O_2). Le déchet principal est l' H_2O_2 . Les oxydases peroxysomales ont pour substrats : les polyamines (spermines), les purines, les acides aminés D (D-proline, D-aspartate). Les leucotriènes et prostaglandines sont pris en charge par les enzymes de la β -oxydation^[18].

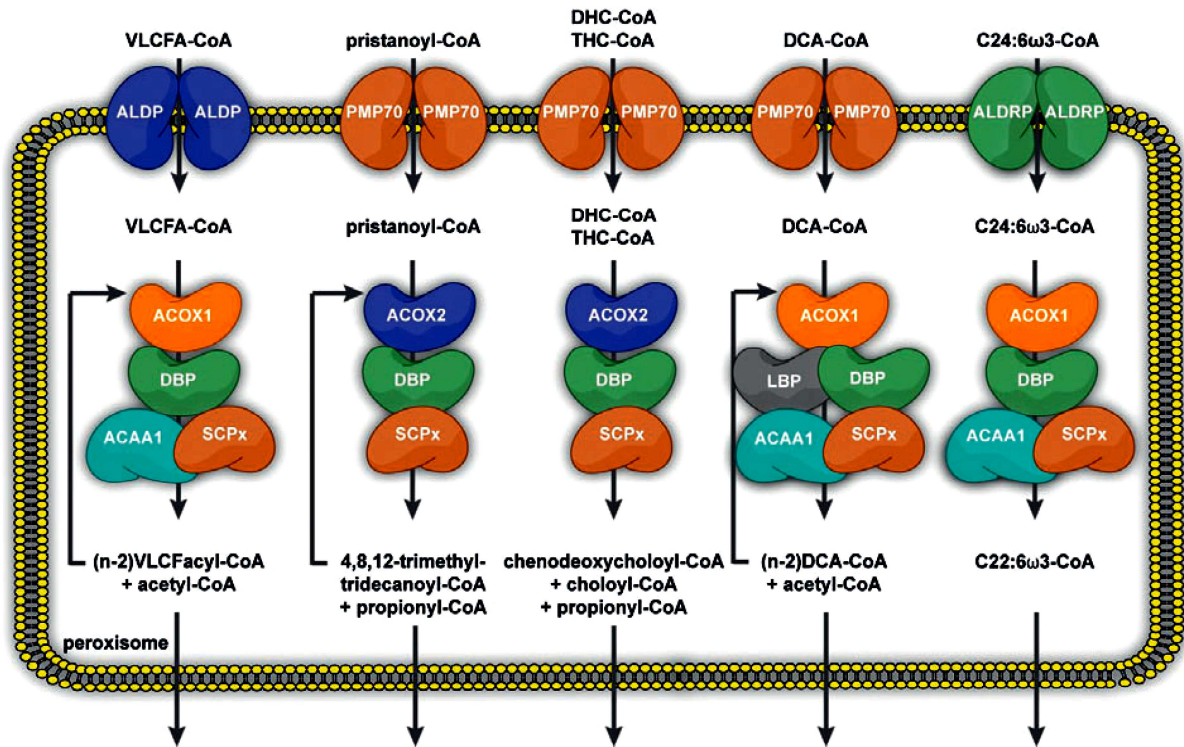


Figure 2 : Transporteurs ABC et enzymes impliquées dans la β -oxydation peroxysomale des AGTLC et des acides gras ramifiés, d'après Kemp et al.^[19].

ALDP : protéine de l'Adréneleucodystrophie ; **PMP70** : protéine 70 de la membrane peroxysomale ; **ALDRP** : protéine associée à l'Adréneleucodystrophie ; **ACOX1**: acyl-CoA oxidase 1 ; **ACOX2**: acyl-CoA oxidase 2 ; **DBP**: protéine D bi-fonctionnelle ; **ACAA1** (pTH1): 3-cétoacyl-CoA thiolase ; **SCPx** (pTH2): sterol carrier protein x.

1.2.1.4. Métabolisme des espèces activées de l'oxygène

Le peroxysome produit de l' H_2O_2 , mais il est également capable de décomposer ce déchet toxique pour l'organisme. Différentes enzymes participent à cette décomposition : la catalase, la glutathion peroxydase et la peroxiredoxine V ou PMP20^[20]. Par exemple, la catalase permet la dégradation de l' H_2O_2 soit par catalyse : $2 H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2 H_2O$, soit par oxydation d'un donneur d'hydrogène (éthanol, méthanol, acide formique, formaldéhyde): $H_2O_2 + AH_2 \rightarrow A + 2 H_2O$. L' H_2O_2 peut également être converti en radical hydroxyl ($\cdot OH$). D'autres oxydases, telles que la xanthine oxydase, produisent des anions superoxydes ($O_2^{\cdot -}$). Ces derniers seront inactivés par l'intermédiaire d'une métallo-enzyme: la superoxyde dismutase à cuivre/zinc ou à manganèse^[21].

Enfin, les groupements époxydes, hautement réactifs avec les molécules nucléophiles (acides gras, ADN, ARN), seront réduits en diol par une époxyde hydrolase.

1.2.2. Fonctions anaboliques

1.2.2.1. Synthèse des intermédiaires des acides biliaries

Les acides biliaries primaires, l'acide cholique et l'acide chénodésoxycholique, sont les principaux produits du catabolisme du cholestérol qui fait appel à plusieurs enzymes peroxysomales^[22]. L' α -méthylacyl-CoA racémase (AMACR) intervient sur les acides di- et trihydroxycholestanoïque-CoA (ADHC-CoA et ATHC-CoA) pour les convertir de la conformation R en S. Cette étape est indispensable à la poursuite de cette biosynthèse qui passe par la β -oxydation peroxysomale^[23]. Les acides biliaries nouvellement synthétisés, à 24 atomes de carbone sont alors conjugués soit à la glycine soit à la taurine puis excrétés dans la bile^[24].

1.2.2.2. Synthèse des plasmalogènes (éther-phospholipides)

Les plasmalogènes ont été découverts en 1924 par Feulgen et Voit^[25]. Ce sont des analogues de phospholipides membranaires dont un des acides gras est remplacé par un alcool gras insaturé, lié au glycérol par une liaison éther-vinylique. Leur tête hydrophile est constituée le plus souvent d'une molécule d'éthanolamine et plus rarement de choline. Ce sont des éther-phospholipides dont le nom chimique est 1-*O*-alk-1'-ényl-2-acyl-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine. La position *sn*-1 est occupée par les alcools gras C16:0, C18:0 ou C18:1. Alors qu'en position *sn*-2, on retrouve des acides gras polyinsaturés de type C22:6 ω 3 (DHA) ou C20:4 ω 6.

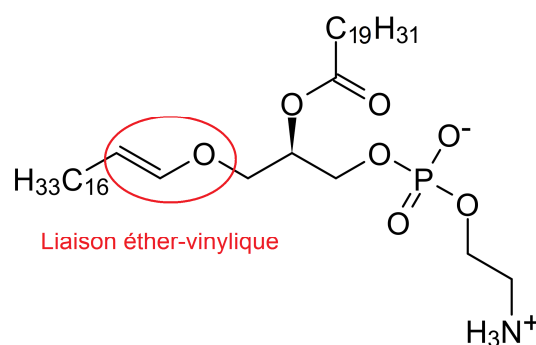


Figure 3 : Structure chimique du 1-*O*-hexadéc-1'-ényl-2-éicoso-5,8,11,14-tétraényl-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine.

La biosynthèse des plasmalogènes suit un mécanisme enzymatique dont les deux premières étapes se déroulent au niveau de la face interne de la membrane peroxysomale^[26] et les cinq suivantes au niveau du RE^[27] (**Figure 4**). La première étape consiste en l'estérification du dihydroxyacétone phosphate (DHAP) avec un acyl-CoA à longue chaîne. Cette réaction est catalysée par la dihydroxyacétone phosphate acyltransférase (DHAP-AT)^[28] et produit un

acyl-DHAP. La liaison éther en position *sn*-1 est introduite par la substitution de l'acide gras par un alcool gras. Cette étape est catalysée par l'alkyl-dihydroxyacétone phosphate synthase (Alkyl-DHAP-S)^[26,29] et elle aboutit à l'alkyl-DHAP.

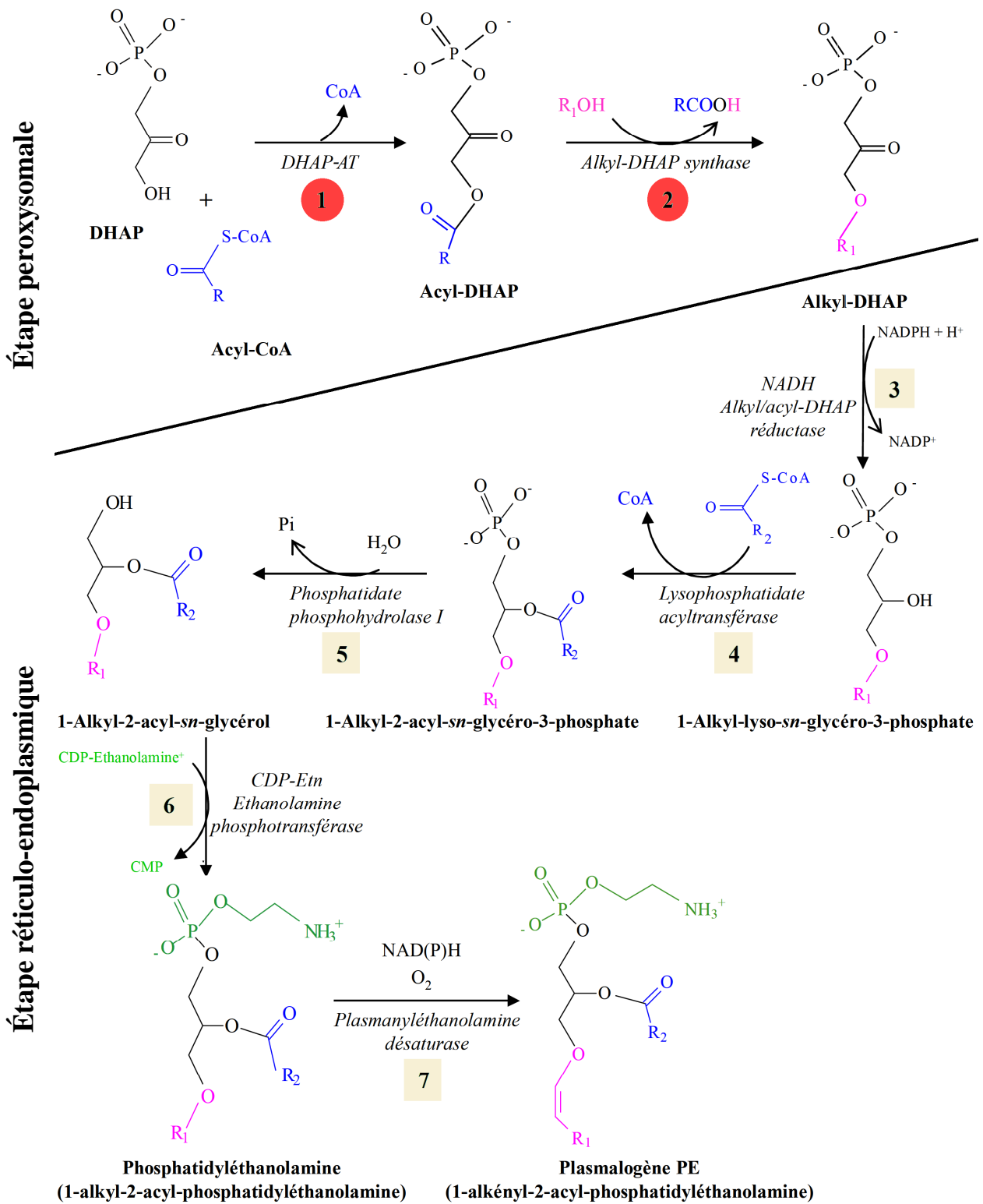


Figure 4 : Biosynthèse des 1-*O*-alkényl-2-acyl-phosphatidyléthanolamine, adaptée de S.Bacot^[30].

L'alcool gras incorporé provient soit de l'alimentation^[31] soit de la réduction d'un acyl-CoA à longue chaîne par une acyl-CoA réductase^[32]. L'alcool gras peut dans une moindre mesure, être synthétisé *de novo* au cours de la β -oxydation peroxysomale^[33].

Les autres étapes consistent en la fixation d'un acide gras polyinsaturé en position *sn-2*^[34,35], à l'incorporation de la tête polaire^[36] et de la liaison éther-vinylique.

La régulation de la synthèse des plasmalogènes se fait par rétrocontrôle négatif au niveau de l'étape limitante qui est la génération d'alcool gras par l'acyl-CoA réductase^[37]. Les plasmalogènes ont une courte demi-vie. Ceci est expliqué par la présence de la liaison éther-vinylique qui les rend très sensibles aux attaques radicalaires. D'autre part, ils subissent l'action d'une phospholipase A₂ spécifique (psPLA₂) afin de libérer les molécules bioactives en position *sn-2* telles que l'acide arachidonique.

Chez l'homme, les plasmalogènes représentent plus de 18 % de la masse totale en phospholipides. Ils ont une distribution tissulaire particulière. Les plasményl-éthanolamines sont présents dans les poumons, les reins, la rate, les muscles squelettiques et les testicules. Ils sont retrouvés en plus forte concentration dans le cœur^[27] et le cerveau dont ils représentent plus de 50 % des phospholipides. Ils sont présents en forte proportion dans la gaine de myéline, et la substance blanche du cortex pariétal en est exclusivement composée^[37]. Les plasményl-cholines sont essentiellement distribués dans le cœur et les muscles squelettiques^[38]. Un défaut de synthèse de plasmalogènes est délétère pour l'organisme et provoque d'importantes défaillances neurologiques. Le déficit en DHAP-AT provoque la CDRP-2 alors que le déficit en Alkyl-DHAP-S est responsable de la CDRP-3. Dans la CDRP-1, les deux déficits sont retrouvés mais de façon non totale.

1.2.2.3. Autres fonctions anaboliques

Les peroxysomes jouent un rôle important dans la synthèse des AGTLC tels que l'acide docosahénoïque ou DHA (C22:6 ω 3). Ce dernier est un dérivé d'acides gras essentiels d'origine alimentaire comme l'acide linoléique (C18:3 ω 3). Dans la dernière étape de synthèse, le C22:5 ω 3 est converti en DHA. Pour cela le C22:5 ω 3 est allongé de deux carbones puis il entre dans le cycle de la β -oxydation peroxysomale. Le dérivé C24:5 ω 3 est alors déshydrogéné afin d'obtenir une double liaison supplémentaire. Enfin, le C24:6 ω 3 est rétroconverti en C22:6 ω 3^[39].

Les peroxysomes interviennent également dans la synthèse du cholestérol, mais dans un moindre degré par rapport aux mitochondries et au RE. La première étape de synthèse peroxysomale est la conversion de l'acétyl-CoA en 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) par l'HMG-CoA synthase. Puis, l'HMG-CoA est réduit en mévalonate. C'est l'étape limitante de la voie de biosynthèse du cholestérol et elle s'effectue essentiellement dans le RE^[40]. Dans la troisième étape qui est exclusivement peroxysomale, la phospho-mévalonate kinase (PMVK), la pyrophospho-mévalonate décarboxylase (MPPD), l'isopentenyl diphosphate (IPP) isomérase et la farnesyl diphosphate (FPP) synthase convertissent le mévalonate en FPP^[41,42]. Ce dernier donnera dans le RE le squalène. L'étape finale est la cyclisation du squalène en lanostérol puis en cholestérol. Cette réaction a lieu dans le RE mais peut également être localisée dans les peroxysomes.

2. Biogenèse des peroxysomes

La biogenèse des peroxysomes est très étudiée, mais reste encore incomplètement connue. Elle est souvent source de débats, notamment sur l'origine de leur membrane. Cette biogenèse implique plusieurs protéines appelées peroxines. 32 peroxines ont déjà été identifiées. Elles sont codées par la famille des gènes *PEX*^[43-45]. Parmi ces peroxines, il a été décrit des protéines membranaires peroxysomales (PMPs), ainsi que des récepteurs d'import peroxysomaux. Le mécanisme de biogenèse des peroxysomes peut être divisé en trois parties :

- La formation de la membrane ;
- L'import des protéines membranaires ;
- L'import des protéines matricielles ;

Chez l'homme, un déficit en peroxine est associé à de graves pathologies appelées défaut de biogenèse des peroxysomes (PBD). La CDRP-1 fait partie des PBD, elle est due à des mutations dans le gène *PEX7* entraînant une anomalie de la peroxine 7 (Pex7p).

2.1. Formation de la membrane peroxysomale

La formation des peroxysomes et plus particulièrement l'origine de leur membrane est expliquée par deux modèles différents mais qui peuvent coexister. D'après le modèle de Lazarow et Fujiki, les peroxysomes, à l'image des mitochondries, sont des organelles autonomes qui se multiplient par des mécanismes successifs de « croissance et division ». Les

peroxysomes étant dépourvus d'ADN, leurs protéines sont synthétisées par des ribosomes libres^[46]. D'autres études indiquent que le RE est impliqué dans la biogenèse *de novo* des peroxysomes, notamment en absence de peroxysomes préexistants^[47]. En effet, les phospholipides membranaires dérivent du RE^[8,48], qui est le passage obligatoire de certaines peroxines pour y être glycosilées^[49,50] (**Figure 5**).

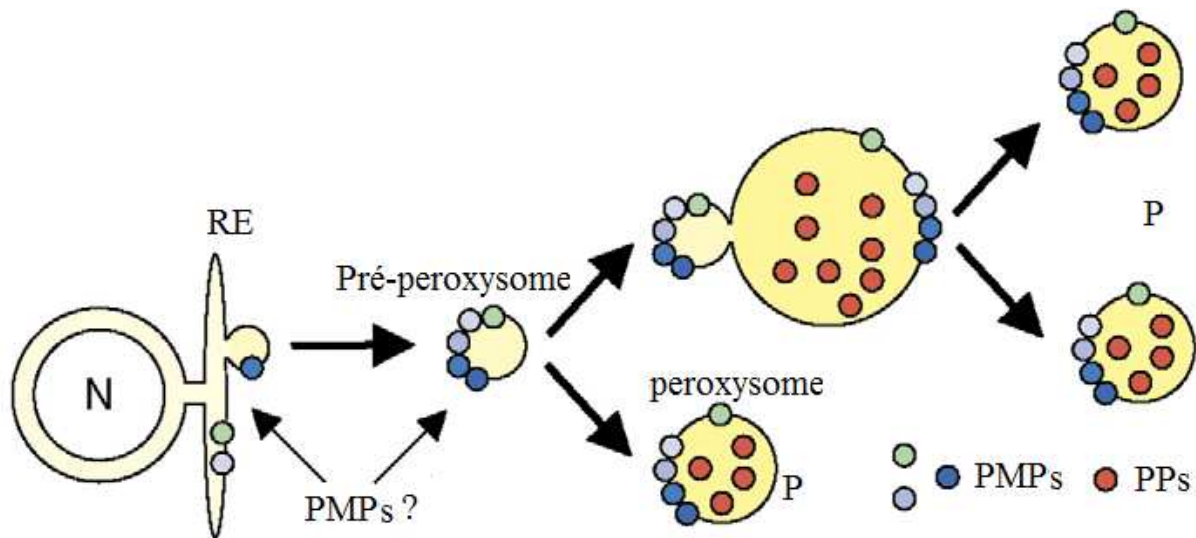


Figure 5 : Modèle de biogenèse des peroxysomes, adapté de Tabak et al.^[51].

Les PMPs sont importées *via* le RE ou directement dans le pré-peroxysome. Ensuite, les PPs sont importées dans la matrice. Les peroxysomes ainsi formés peuvent ensuite proliférer.

PMPs : Protéines membranaires peroxysomales, **PPs** : Protéines peroxysomales, **N** : Noyau, **P** : peroxysome mature.

2.2. Importation des protéines membranaires

Les PMPs sont importées soit directement dans la membrane peroxysomale, soit après avoir transité par le RE. Deux types de PMPs sont alors différenciés :

- Les PMPs de classe I portent un signal de ciblage membranaire (mPTS) reconnue par Pex19p et elles sont directement importées dans la membrane peroxysomale ;
- Les PMPs de classe II, telles que Pex3p, Pex16p et Pex19p portent un signal différent de mPTS et elles transitent *via* le RE^[52].

Pex16p est probablement la première peroxine impliquée dans la formation des peroxysomes. Elle en régle la formation *de novo* et recrute d'autres peroxines comme par exemple Pex3p^[53,54]. Une dizaine de PMPs de classe II ont été décrites^[55]. Leur mécanisme d'import dans le RE est mal connu, et considéré comme une voie mineure.

L'import direct des PMPs de classe I nécessite deux peroxines : Pex3p et Pex19p^[56,57] (**Figure 6**). Pex19p joue le rôle de protéine chaperonne reconnaissant le signal mPTS^[58]. Grâce

au groupement farnesyl de Pex19p, le complexe Pex19p-PMP formé dans le cytosol entre en contact avec la membrane puis se fixe au récepteur d'ancrage membranaire Pex3p^[57]. Ensuite, les PMPs sont insérées dans la membrane selon un mécanisme encore inconnu. Enfin, Pex19p est recyclée vers le cytosol où un nouveau cycle d'importation pourra commencer.

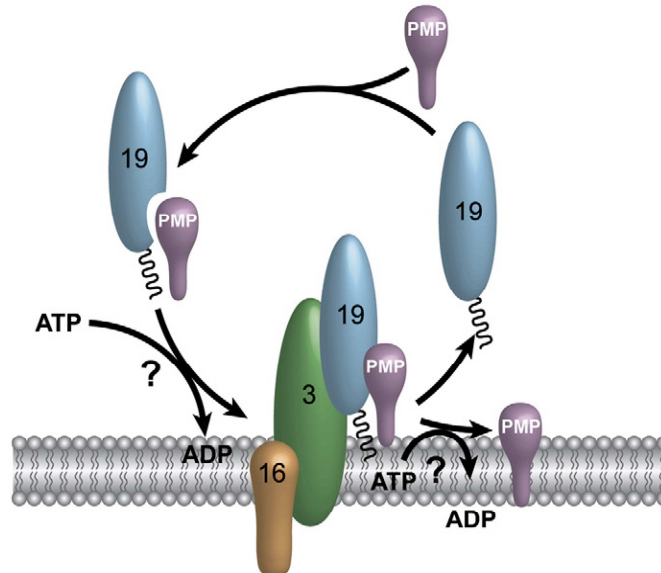


Figure 6 : Modèle d'insertion des PMPs de classe I, d'après Rucktäschel et al.^[59].

2.3.Importation des protéines matricielles

Les protéines de la matrice peroxysomale sont importées dans le peroxysome après leur traduction dans le cytosol, grâce à un récepteur spécifique reconnaissant une séquence signal peptidique particulière la « Peroxisomal Targeting Signal » (PTS) différente de la mPTS. Il existe deux types de séquence PTS.

La majorité des protéines matricielles (PPs) portent la séquence PTS1, qui correspond à la succession en C-terminal de trois acides aminés Sérine-Lysine-Leucine-COOH (SKL) ou à l'un de ses variants (S/A/C)-(K/R/H)-(L/M) et sont reconnues par le récepteur cytosolique Pex5p^[60].

Les autres protéines importées portent une séquence de ciblage dégénérée PTS2, de neuf acides aminés vers leur extrémité N-terminale : (R/K)-(L/I/V)-X₅-(H/Q)-(L/A)^[61]. C'est la peroxine 7 qui joue le rôle de récepteur de PTS2^[62] (**Tableau 1**). Dans un premier temps, l'isoforme long du récepteur Pex5p (Pex5pL) doit interagir avec Pex7p pour l'orienter vers le peroxysome^[63]. Ensuite, le complexe PTS2-Pex5pL/7p s'associe à la membrane du peroxysome *via* le complexe d'accueil composé de Pex13p et Pex14p^[64]. La translocation du complexe se

Tableau 1 : Principales protéines de la matrice peroxysomale et leur signal PTS^[18].

Voie métabolique	Protéine peroxysomale	Signal PTS
β-oxydation peroxysomale	Acyl-CoA oxydase 1 (ACOX1)	PTS1
	Acyl-CoA oxydase 2 (ACOX2)	PTS1
	Protéine D bi-fonctionnelle	PTS1
	Thiolase peroxysomale 1 (pTH1)	PTS2
	Thiolase peroxysomale 2 (pTH2)	PTS1
	α-méthylacyl-CoA racémase	PTS1
α-oxydation peroxysomale	Phytanoyl-CoA hydroxylase	PTS2
	2-hydroxyphytanoyl-CoA lyase	PTS1
Biosynthèse des plasmalogènes	DHAP-AT	PTS1
	Alkyl-DHAP-S	PTS2
Détoxification du glyoxylate	Alanine glyoxylate aminotransférase	PTS1
Décomposition de l'H ₂ O ₂	Catalase	PTS1
	Peroxi-redoxine V (PMP20)	PTS1
	Époxyde hydrolase	PTS1
	D-aspartate oxydase	PTS1

produit à travers un canal formé de Pex14p^[65]. Pex5pL/7p se sépare de la protéine matricielle puis il est ubiquitinylé par le complexe Pex4p, Pex2p, Pex10p et Pex12p^[66]. Enfin, le complexe Pex5pL/7p est exporté vers le cytosol par les ATPases Pex1p et Pex6p^[67]. L'ubiquitine du complexe Pex5pL/7p est clivée afin de permettre le prochain cycle d'importation. Si Pex5pL/7p reste bloqué au niveau de la membrane du peroxysome, il sera poly-ubiquitinylé puis extrait de la membrane et dégradé par le protéasome^[68] (**Figure 7**).

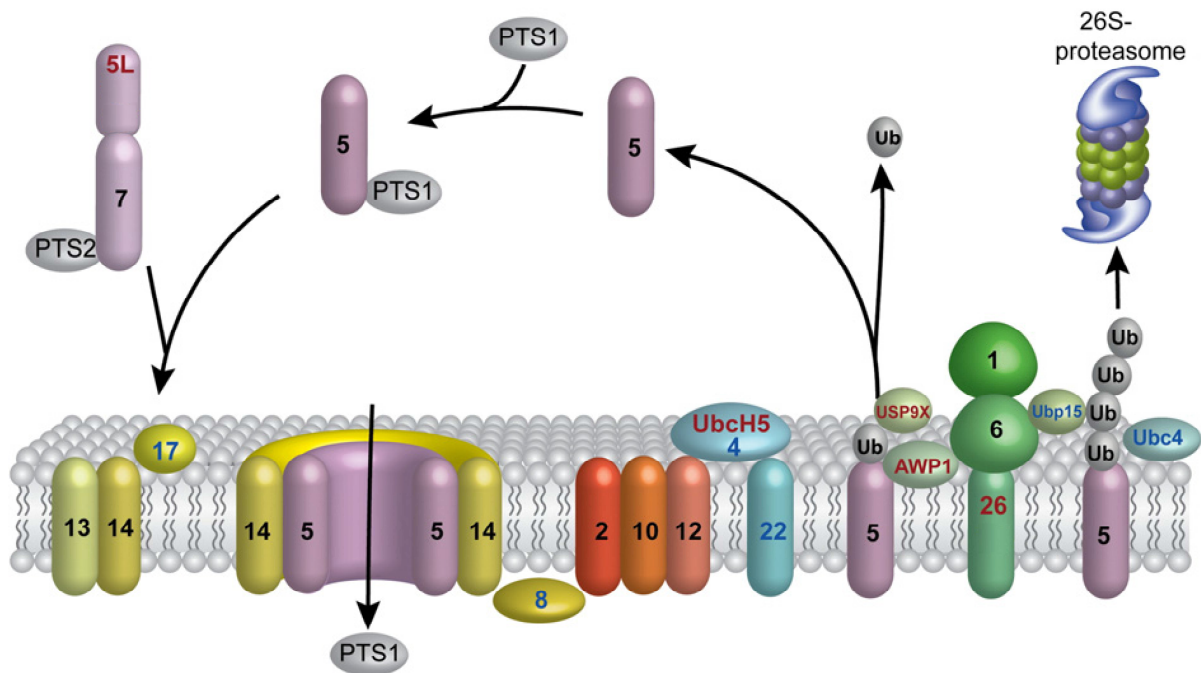


Figure 7 : Les deux voies d'import des protéines peroxysomales matricielles, d'après Nagotu et al.^[69].

2.4. Régulation peroxysomale

Le nombre de peroxysome et leur contenu enzymatique sont variables en fonction de l'état et de l'environnement de la cellule. Certains lipides et xénobiotiques induisent l'expression de gènes codant des protéines matricielles ainsi que membranaires, et font augmenter le nombre de peroxysomes. Cette régulation s'effectue par l'expression de deux classes de protéines : les protéines prolifératrices des peroxysomes (PPs) telles que Pex11p et les protéines apparentées aux dynamines (DRPs)^[70].

Les PPs permettent l'activation d'un récepteur nucléaire, le « peroxisome proliferator-activated receptor α » (PPAR α)^[71]. Une fois activé, le PPAR α se dimérise avec le récepteur aux rétinoïdes X (RXR) puis se fixe sur une séquence consensus de l'ADN (-AGGA/TCA-) appelé « Peroxisome proliferator responsive elements » (PPRE) localisé dans les promoteurs des gènes cibles afin d'en moduler la transcription^[72]. Ainsi, Pex11p α participe à la régulation de l'abondance des peroxysomes en fonction de l'alimentation et Pex11p β au contrôle de leur prolifération et de leur élongation^[73].

Les DRPs sont des GTPase recrutées par Pex11p. Elles sont impliquées dans la formation d'un anneau de constriction et vont ainsi permettre la fission des membranes peroxysomales^[74].

3. Principales pathologies peroxysomales

Les dysfonctionnements des peroxysomes sont un groupe de maladies génétiques rares, touchant une ou plusieurs voies métaboliques simultanément. Elles se transmettent selon un mode autosomique récessif, à l'exception de l'adrénoleucodystrophie liée à l'X (X-ALD) et sont divisées en deux groupes: les anomalies de la biogenèse (PBD) et les déficits enzymatiques isolés, rassemblant une vingtaine de maladies.

3.1. Anomalies de la biogenèse

Les PBD se rassemblent en quatre entités cliniques: le syndrome de Zellweger (ZS), l'adrénoleucodystrophie néonatale (NALD), la maladie de Refsum infantile (IRD) et la CDRP-1. Ces PBD sont caractérisées par une absence totale ou partielle des peroxysomes (sauf pour la CDRP-1) et sont dues à des anomalies sur les gènes *PEX*. Selon le gène muté, les anomalies perturbent soit : la synthèse des membranes peroxysomales (*PEX3*, *PEX16*,

PEX19), l'adressage des protéines peroxysomales néosynthétisées (*PEX5*, *PEX7*), la translocation des protéines matricielles (*PEX2*, *PEX10*, *PEX12*), l'ancrage des PMPs (*PEX13*, *PEX14*) ou le recyclage des récepteurs (*PEX1*, *PEX6*, *PEX26*)^[75].

3.1.1. Le spectre Zellweger

Ce spectre rassemble trois entités : ZS, NALD et IRD. Elles représentent 80 % des PBD et diffèrent cliniquement de la CDRP-1. Ces trois maladies ont toutes la même symptomatologie mais se distinguent par la sévérité de leurs atteintes^[75].

Le syndrome cérébro-hépto-rénal de Zellweger (MIM 214100) est le plus grave. Il se caractérise par un début anténatal et une espérance de vie souvent inférieure à trois mois. Il associe des anomalies morphologiques (dysmorphie crânio-faciale, petite taille), des troubles neurosensoriels (cataracte, rétinopathie pigmentaire, glaucome et surdité), une hypotonie néonatale sévère avec une aréflexie, des épilepsies et un retard de développement psychomoteur^[76]. L'examen radiologique révèle des calcifications ponctuées épiphysaires et l'échographie abdominale montre une fibrose ou une cirrhose hépatique ainsi que des kystes rénaux. L'imagerie par résonance magnétique peut identifier une hypomyélinisation et des anomalies corticales. L'ensemble des fonctions biologiques peroxysomales sont déficitaires, provoquant une accumulation d'AGTLC, de précurseurs des acides biliaires, d'acide pipécolique, d'acide phytanique, un déficit des protéines de la β -oxydation et un déficit de synthèse des plasmalogènes^[77].

Des débuts plus tardifs et de meilleures espérances de vie sont observés dans les formes moins sévères que sont la NALD (MIM 202370) et surtout l'IRD (MIM 266510). Les enfants atteints peuvent présenter un certain degré de développement. La communication et l'acquisition d'un langage sont rares, mais parfois normales pour l'âge. Les kystes rénaux, la ponctuation des os et les anomalies hépatiques ne sont pas régulièrement observés. Enfin, une surdité de perception et une rétinite pigmentaire allant jusqu'à la cécité sont observées chez les patients présentant une survie plus importante^[76].

3.1.2. La Chondrodysplasie rhizomélique ponctuée de type 1 (MIM 215100)

La CDRP-1 est caractérisée par un raccourcissement des os longs proximaux (la rhizomélie), des calcifications punctiformes dans le cartilage épiphysaire (la chondrodysplasie ponctuée) et une cataracte. Les patients atteints présentent un retard de croissance staturo-

pondéral profond, un dysmorphisme facial ainsi qu'un déficit intellectuel sévère. Le décès intervient fréquemment pendant la première année de vie. Toutefois, des phénotypes moins sévères sont décrits. Cette anomalie sera détaillée ultérieurement (cf page 32).

3.2. Déficiences isolées d'une enzyme ou d'un transporteur peroxysomal

Ces déficiences affectent une voie métabolique spécifique. Les peroxysomes sont présents et leur structure est normale, mais la clinique reste sévère. Les principales voies métaboliques affectées sont la β -oxydation, l' α -oxydation de l'acide phytanique et la synthèse des plasmalogènes.

3.2.1. Déficiences de la β -oxydation

3.2.1.1. Adrénoleucodystrophie liée à l'X (MIM 300100)

L'X-ALD est le plus fréquent des déficiences isolées peroxysomales avec une incidence pour l'homme de 1/20000^[78]. Elle est causée par des mutations sur le gène *ABCD1*, codant la protéine ALDP responsable de l'importation des AGTLC dans le peroxysome. Le déficit en ALDP qui en résulte provoque une accumulation d'AGTLC dans les tissus^[79]. La maladie est caractérisée par une expression phénotypique très variable. Il existe des formes cérébrales démyélinisantes (35 %), infantiles ou adolescentes, provoquant une détérioration comportementale, cognitive et neurologique. Une forme adulte intermédiaire (50 %) ou adréno-myélo-neuropathie (AMN) ainsi qu'une variante avec insuffisance surrénalienne et sans atteinte neurologique (15 %) sont également décrites^[80]. Enfin, il est important de rappeler que chez les femmes hétérozygotes, 40 à 50 % d'entre elles développent une AMN et 15 à 20 % ne présenteront pas d'accumulation d'AGTLC^[78].

3.2.1.2. Déficit en acyl-CoA oxydase (MIM 264470)

Ce déficit est dû à des mutations sur le gène *ACOX1* codant l'acyl-CoA oxydase. Cette enzyme est impliquée dans la première étape de la β -oxydation des AGTLC mais pas des acides gras ramifiés^[23]. Les patients atteints présentent une hypotonie néonatale sévère accompagnée de convulsions. Le développement psychomoteur est lent puis régresse progressivement. Il existe un retard de croissance et une surdité. La plupart des patients ne présentent pas de dysmorphie crânio-faciale, de calcifications ponctuées ou d'h patom galie^[81]. L'âge moyen de décès est plus tardif que chez les patients présentant un déficit en protéine D bi-fonctionnelle.

3.2.1.3. Déficit en protéine D bi-fonctionnelle (MIM 261515)

Le déficit en protéine D bi-fonctionnelle est l'anomalie peroxysomale la plus fréquente après l'X-ALD. La clinique est sévère et le décès intervient dans les deux premières années de vie. Il s'agit d'un pseudo-syndrome de Zellweger dans lequel les calcifications ponctuelles ne sont pas retrouvées et où la synthèse des plasmalogènes est normale^[82].

3.2.1.4. Déficit en « sterol carrier protein x » (MIM 184755)

Le déficit en « sterol carrier protein x » (SCPx) a été décrit chez un seul patient. Dans cette anomalie, la β -oxydation de l'acide pristanique et des intermédiaires des acides biliaires (D/THCA) est déficiente. En revanche, celle des AGTLC est normale. Le tableau clinique se compose d'une leuco-encéphalopathie et d'une neuropathie motrice associées à un trouble endocrinien de type hypogonadisme^[83].

3.2.1.5. Déficit en α -méthylacyl-CoA racémase (MIM 604489)

Les patients atteints d'un déficit en α -méthylacyl-CoA racémase peuvent présenter deux phénotypes différents : soit une neuropathie sensitivomotrice démyélinisante, soit une atteinte hépatique^[83,84]. Une rétinite pigmentaire peut également être observée. Au niveau biologique, les mêmes anomalies que pour le déficit en SCPx sont retrouvées, mais seuls les composés de configuration (*R*) s'accumulent.

3.2.2. Déficiences de l' α -oxydation de l'acide phytanique (MIM 266500)

La forme adulte de la maladie de Refsum est due soit à un déficit en phytanoyl-CoA-2-hydroxylase (90 % des cas) soit à un déficit en son récepteur, la peroxine 7 (10 % des cas)^[85]. La première anomalie est la conséquence de mutations sur le gène *PHYH* induisant un déficit de l' α -oxydation et donc, une accumulation de l'acide phytanique dont les taux plasmatiques peuvent dépasser 200 $\mu\text{mol/L}$. Il s'agit d'un toxique qui modifie le métabolisme et les voies de signalisation cellulaire^[86]. Le bilan clinique retrouve dans l'enfance une anosmie et une rétinite pigmentaire. Puis, en fonction de l'accumulation de l'acide phytanique, il peut s'associer à une polyneuropathie, une surdité, une ataxie cérébelleuse et une ichtyose. Une cardiomyopathie et des anomalies du rythme cardiaque sont quelques fois présentes. La protéinorachie est élevée mais il n'y a pas de pléiocytose. Le développement mental est normal et les anomalies osseuses sont peu marquées^[87].

3.2.3. Déficit de la synthèse des plasmalogènes (MIM 222765, MIM 600121)

En plus de la CDRP-1, ce type de déficit regroupe deux autres pathologies : la CDRP-2 et la CDRP-3. Leur mode de transmission est autosomique récessif. Elles sont cliniquement et radiologiquement indiscernables de la CDRP-1 et c'est la mise en évidence de l'anomalie génétique responsable qui permet de faire le diagnostic différentiel^[37]. Ces similitudes sont expliquées par une incapacité pratiquement complète à synthétiser les plasmalogènes. Pour la CDRP-2, cette incapacité est due à un déficit en DHAP-AT qui est l'enzyme impliquée dans la première étape de synthèse des plasmalogènes^[88]. Alors que pour la CDRP-3, elle est due à un déficit en alkyl-DHAP synthase qui est l'enzyme impliquée dans la deuxième étape de cette même synthèse^[89]. Pour les patients atteints, les taux de plasmalogènes érythrocytaires sont très abaissés. Toutefois, ceux de l'acide phytanique plasmatique sont normaux et la 3-cétoacyl-CoA thiolase est présente dans les peroxyosomes sous sa forme fonctionnelle. La clinique est sévère et la plupart des fœtus atteints meurent *in utero* ou peu de temps après la naissance. Ceux qui survivent décèdent généralement dans les 10 premières années de vie^[37].

3.2.4. Autres déficits enzymatiques

L'hyperoxalurie de type I est due à un défaut de détoxification du glyoxylate et résulte d'un déficit en alanine glyoxylate aminotransférase.

L'acatalasémie est due à un défaut du métabolisme de l'H₂O₂ et résulte d'un déficit en catalase.

4. La Chondrodysplasie rhizomélique ponctuée de type 1 (MIM 215100)

4.1. La CDRP-1 parmi les pathologies osseuses constitutionnelles

Les pathologies osseuses constitutionnelles sont des maladies très hétérogènes se divisant en trois grands groupes^[90] :

- Les malformations d'un ou de plusieurs os apparaissant pendant la morphogenèse ou dysostoses ;
- Les modifications de la densité et de la minéralisation osseuse ou ostéodysplasies ;
- Les affections congénitales rares affectant la formation de l'os et/ou du cartilage ou chondrodysplasies.

La classification de ces pathologies est très difficile à établir clairement. La première a été établie en 1972. Elle est fondée sur des descriptions cliniques et radiologiques. Les critères cliniques les plus importants sont la létalité, un aspect harmonieux bien proportionné et l'association à d'autres anomalies (neurologiques ou viscérales).

L'atteinte du squelette appendiculaire est caractérisée :

- de micromélique lorsque tous les segments sont concernés ;
- d'acromélique pour les segments distaux ;
- de mésomélique pour les segments moyens ;
- et de rhizomélique pour les proximaux.

Au niveau radiologique, ce sont les anomalies de taille et de forme des os et/ou du cartilage qui sont identifiées. L'homogénéité de la minéralisation est également importante ainsi que la localisation des anomalies : épiphysaire, métaphysaire ou diaphysaire^[91]. Cette classification a ensuite été actualisée grâce à l'avènement de la biologie moléculaire^[92]. Le groupe d'experts « International Skeletal Dysplasia Group » propose une classification réunissant ces trois critères. En 2010, il recense 456 dysplasies squelettiques différentes regroupées en 40 classes et dont l'incidence estimée varie de 1 naissance sur 10 000 à moins de 1/1 000 000^[93].

En parallèle, une deuxième classification a été établie et propose 7 groupes basés sur trois critères : génétiques, moléculaires et biochimiques^[94]. Par exemple, les anomalies de

protéines structurelles extracellulaires sont distinguées des anomalies hormonales, des anomalies de voies de signalisation intracellulaire ou encore de voies métaboliques particulières. Ce dernier groupe inclut notamment les chondrodysplasies ponctuées (CDP) d'origine peroxysomale, celles liées à un défaut de synthèse du cholestérol et celles dépendantes du métabolisme de la vitamine K^[94].

Dans leur ensemble, les chondrodysplasies sont responsables de retard de croissance et de déformations osseuses entraînant souvent une petite taille disproportionnée. Leur mode de transmission est variable et certaines formes sont létales (atélostéogenèse, les type Moerman et Seller). Les autres chondrodysplasies sont soit associées à une insuffisance staturale globale (collagénopathies, dysplasies épiphysaires, dysplasies métaphysaires) soit à une atteinte plus marquée du squelette appendiculaire (achondroplasie, dysplasie diastrophique, dysplasie métatrophique, dysplasies mésoméliques et chondrodysplasies ponctuées)^[95].

Selon la classification internationale, les chondrodysplasies ponctuées (CDP) constituent un groupe particulier caractérisé par la présence de calcifications au niveau des épiphyses. Ces calcifications sont identifiables à la radiographie osseuse sous la forme de pointillés ou de ponctuations. Ce sont elles qui perturbent la croissance du squelette et altèrent sa structure et sa morphologie. L'ichtyose, la cataracte et le retard mental font partie des anomalies communes. Les CDP peuvent être détectées par un suivi échographique, habituellement en fin de grossesse. Toutefois, l'identification de la forme exacte nécessite des analyses biochimiques (recherche de stérols anormaux et dosage des plasmalogènes) des cellules du trophoblaste ou du liquide amniotique. Une analyse en biologie moléculaire peut être nécessaire.

Il existe trois variantes principales de CDP:

- Les CDP rhizoméliques ;
- Les CDP non rhizoméliques ;
- Les autres CDP.

Outre ces formes héréditaires, il existe aussi des CDP iatrogènes (coumariniques) et secondaires (maladies auto-immunes maternelles) qu'il est impératif de prendre compte dans les diagnostics différentiels.

4.2. Historique

Les premières descriptions des chondrodysplasies dites « calcifiantes » datent du milieu du 20^{ème} siècle, mais ce n'est qu'en 1971 que le pédiatre allemand J.Spanger en a décrit la

forme rhizomérique^[96]. L'origine peroxysomale des CDRP a été attribuée en 1985 par Heymans et al.^[97]. En 1992 et 1994, l'équipe de Wanders et al. a découvert, respectivement chez deux patients qui ne présentaient pas d'élévation plasmatique de l'acide phytanique, les deux enzymes responsables des variantes 2 et 3 des CDRP^[88,89]. En 1997, trois équipes ont identifié simultanément le gène impliqué dans la forme principale (CDRP-1). Il s'agit du gène *PEX7* codant la peroxine 7 et dont les mutations dans la séquence sont responsables de 90 % des cas de CDRP^[62,98,99]. Ces mutations provoquent essentiellement un déficit profond en plasmalogènes.

4.3. La peroxine 7

La peroxine 7 (Pex7p) correspond au facteur 7 de biogenèse des peroxysomes. Elle est également retrouvée sous le nom de « récepteur à la deuxième séquence de ciblage peroxysomale » (PTS2R). Pex7p est un récepteur mobile essentiellement cytosolique mais il est également retrouvé en petite quantité à l'intérieur des peroxysomes^[62].

4.3.1. Structure

Pex7p est une protéine hydrophile, soluble et ne possédant pas de domaine transmembranaire. Elle est constituée de 323 acides aminés et appartient à la famille des protéines à domaines WD répétés. Cette famille contient de nombreuses protéines, souvent impliquées dans des interactions protéine/protéine et dont les fonctions sont très variées (signal de transduction, transport vésiculaire, apoptose)^[101].

Pex7p est constituée dans sa partie N-terminale de 56 résidus aminés dont le motif structural n'est pas connu. Six domaines WD succèdent à cette partie N-terminale et confèrent à Pex7p une structure symétrique (**Figure 8**). Chaque domaine WD est constitué de 40 à 60 acides aminés repliés en quatre bandes β antiparallèles (a, b, c et d) leur donnant une forme d'hélice. Ils sont initiés dans leur partie N-terminale, entre les bandes β « d » et « a », par un dipeptide glycine-histidine (GH) et comporte un aspartate invariant dans la boucle « b-c ». De même, à l'extrémité C-terminale de la bande β « c », le dipeptide tryptophane-acide aspartique (WD) est très conservé^[102].

La structure primaire de Pex7p est donc : Nter-X₅₆(GH-X_X-H-X_X-WD-X_X)₆-Cter.

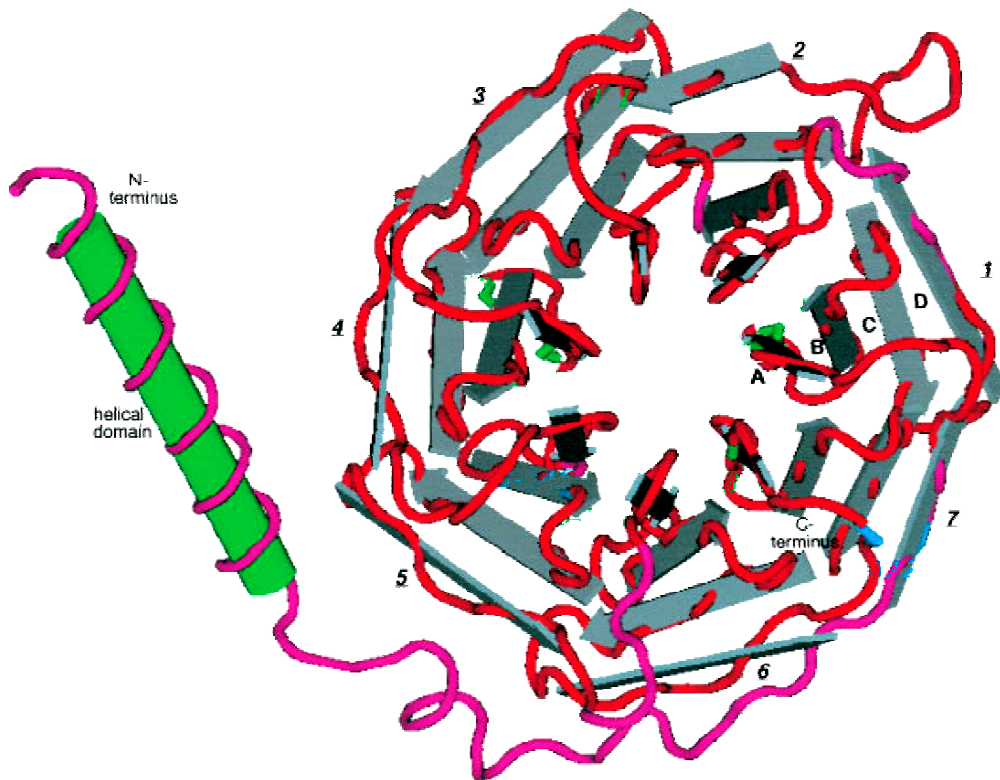


Figure 8 : Modèle montrant l'agencement structural des répétitions WD de Pex7p vu du dessus^[103]. Les bandes rouges correspondent à une structure en hélice α , les bandes grises représentent les feuillets β . La protéine est assimilée à une hélice composée de sept pâles. Quatre feuillets β constituent une pâle: le feuillet « d » d'une première répétition WD et les feuillets « a, b et c » de la répétition WD suivante.

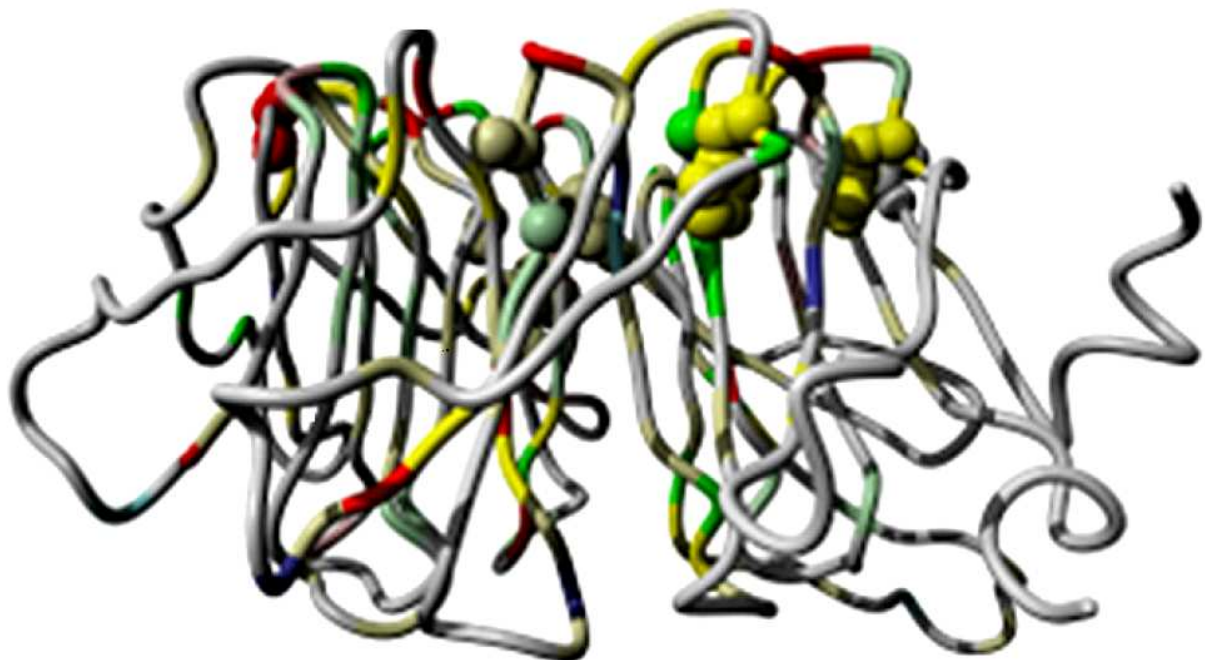


Figure 9 : Vu de profil de la protéine Pex7p, d'après Kunze et *al.*^[104].

Les mutations faux-sens retrouvées dans la CDRP-1 sont matérialisées par des sphères. Elles sont rassemblées sur le dessus de Pex7p proche de l'interaction avec le signal PTS2. Les acides aminés conservés dans l'évolution sont présentés colorés, les régions grises correspondent aux acides aminés moins conservés.

Les domaines WD sont situés à la surface de la protéine. Leur répétition confère une forme symétrique à la protéine et constitue un « sillon » rigide, nécessaire pour l'interaction avec d'autres protéines^[101]. La structure idéale de Pex7p pour la reconnaissance du signal PTS2 n'apparaît qu'après liaison à Pex5pL. Ceci rappelle le fonctionnement d'autres protéines à domaines WD répétés, telles que les protéines G hétérotrimériques^[102]. La séquence PTS2 est une structure en hélice α amphipathique dont la distribution des charges est bien définie et elle est complémentaire du « sillon » de Pex7p^[104]. Par exemple, les résidus glutamates en position 113 et 200 de Pex7p interagissent avec le premier et l'avant dernier résidu de PTS2. Toutes les mutations entraînant un changement structurel du « sillon », modifie sa capacité de reconnaissance du signal PTS2. Elles sont donc pathogènes. D'ailleurs, ce sillon est constitué de résidus aminés très conservés dans l'évolution et la majorité des mutations faux-sens se situent à son niveau^[105] (**Figure 9**).

4.3.2. Fonction

Pex7p participe à l'importation dans la matrice peroxysomale de protéines porteuses dans leur partie N-terminale de la deuxième séquence de ciblage peroxysomale (PTS2)^[62,100].

À ce jour, trois enzymes portant le signal PTS2 ont été identifiées^[18]:

- 3-cétoacyl-CoA thiolase peroxysomale (pTH1)
- Phytanoyl-CoA hydroxylase (PhyH)
- Alkyl-dihydroxyacétone phosphate synthase (Alkyl-DHAP-S)

Pex7p est donc essentielle aux fonctions d' α -oxydation de l'acide phytanique et de synthèse des plasmalogènes. Les thiolases étant redondantes dans les peroxysomes, Pex7p participe aux fonctions de β -oxydation des AGTLC, mais n'est pas indispensable.

La mévalonate kinase possède une séquence signal apparentée à PTS2 mais elle n'interagirait pas avec Pex7p^[106].

4.3.3. Génétique

La peroxine 7 est codée par le gène *PEX7*.

Ce gène a été caractérisé chez une vingtaine d'espèces aussi bien animales que végétales. Il est bien conservé et la séquence humaine présente 91 % d'homologie avec la séquence murine^[62]. Braverman et *al.* ont localisé le gène sur le bras long du chromosome 6 en

position 6q21-22.2^[107] sur un intervalle de 102 000 paires de bases (pb). Il est constitué de 10 exons répartis sur 92 543 pb d'ADN génomique. L'ADNc mesure 1 520 pb et contient une région 5'UTR de 130 pb, une région ORF de 969 pb et se termine par une région 3'UTR de 413 pb^[103].

Le début du gène, exon 1 compris, a une forte teneur en base guanine (G) et cytosine (C); 66 %. Il n'existe pas de séquence TATA box dans la partie promotrice du gène. Il n'y a pas non plus de séquences consensus de type « peroxisome proliferator hormone response elements » (PPRE) qui auraient permis de le réguler^[107].

Les peroxysomes étant présents dans l'ensemble des cellules de l'organisme, le gène *PEX7* s'exprime dans tous les tissus. Cependant, pour ceux exprimant fortement la protéine Pex7p (le pancréas, le squelette, les muscles et en particulier le cœur) un transcrit plus court est retrouvé en faible quantité^[62]. Au total, neuf variants d'ARN messager ont été identifiés. Ils sont générés par des épissages alternatifs délétant un ou plusieurs exons^[107].

4.4. Diagnostic

La CDRP-1 est une maladie très souvent létale. Elle se transmet selon un mode autosomique récessif et elle atteint environ 1 nouveau-né sur 100 000^[108]. Elle est classée parmi les troubles de biogenèse des peroxysomes dont elle représente 18 % des cas, à côté du syndrome de Zellweger. Toutefois, la biochimie et la clinique sont distinctes. La pénétrance est complète et la maladie est retrouvée dans toutes les ethnies.

Le diagnostic de CDRP-1 est basé sur des examens cliniques et radiologiques qui doivent être confirmés par des tests biochimiques et de biologie moléculaire.

4.4.1. Diagnostic clinique

4.4.1.1. Phénotype sévère

De façon caractéristique, les patients souffrent d'un retard de croissance associé à un retard mental.

Au niveau du squelette, ils présentent un raccourcissement bilatéral de l'humérus et à un moindre degré du fémur (la rhizomélie). Des foyers de calcification ponctuelle se développent dans le cartilage épiphysaire et parfois métaphysaire (la chondrodysplasie ponctuelle) au niveau des genoux, des hanches, des coudes, des chevilles et des épaules. Ces calcifications ponctuelles

disparaissent après l'âge de un à trois ans, laissant place à des épiphyses anormales, élargies et irrégulières. Les articulations des hanches et des genoux sont raides et douloureuses expliquant l'hypertonie et l'irritabilité des enfants. La radiographie montre une cage thoracique très étroite et une ossification aberrante et progressive de structures normalement cartilagineuses telles que le larynx, la trachée, l'os hyoïde, les jonctions costo-chondrales et les disques intervertébraux. À l'inverse, à cause d'une calcification tardive, les corps vertébraux apparaissent avec des fentes coronales. Les structures cartilagineuses du visage sont également touchées et la dysmorphie faciale provoquée évoque un syndrome de Binder ou malformation maxillo-nasale. Il est notamment observé une hypoplasie médio-faciale, un nez anormalement court à la racine aplatie, un philtrum long, un maxillaire supérieur peu développé, une implantation basse des oreilles, un grand front et des bosses frontales (**Figure 10**)^[109].



Figure 10 : CDRP-1 sévère chez une patiente âgée de 2 ans^[110].

Il est observé une rhizomélie des bras et des jambes, une cavité thoracique déformée, une contracture des articulations (A) et un aspect dysmorphique du visage, comprenant un front proéminent, une hypoplasie de l'étage moyen du visage, un philtrum long et une implantation basse des oreilles (B).

Le retard de croissance se manifeste à la naissance par un poids, une longueur crânio-caudale, une longueur des membres et une circonférence du crâne très inférieurs aux valeurs normales (inférieurs au 10^{ème} percentile). Ce retard s'accroît souvent dans la période post-

natale et il est amplifié par une alimentation difficile qui nécessite alors une supplémentation par sonde naso-gastrique ou une gastrostomie^[111].

Les patients souffrent souvent de problèmes auditifs et visuels. Une cataracte bilatérale est présente à la naissance dans 75 % des cas. Sans quoi, elle apparaît dans les premiers mois de vie et s'aggrave progressivement^[109].

Le déficit intellectuel est sévère. Les premières compétences de développement telles que le sourire et la reconnaissance des voix familières sont acquises par la plupart des enfants, mais à des âges tardifs et ensuite régressent. La communication verbale est quasiment inexistante^[111]. La majorité des enfants souffrent de crises d'épilepsie. Les anomalies du système nerveux central sont communes mais non spécifiques. L'IRM cérébrale (imagerie par résonance magnétique nucléaire) montre un retard de myélinisation et des anomalies de la substance blanche ainsi qu'une atrophie cérébrale et cérébelleuse progressive^[112]. Une dilatation ventriculaire et une augmentation des espaces sous-arachnoïdiens sont présents et s'aggravent également avec le temps^[110]. Il existe une dysplasie du cortex cérébral avec des zones de pachygyrie (circonvolutions rares et trop larges) et de polymicrogyrie (épaississement anormal du cortex avec un excès de circonvolutions et des sillons peu profonds)^[113]. Des signes de sténose rachidienne et cervicale avec ou sans compression de la moelle épinière sont observés et compliquent le tableau neurologique^[114].

À la naissance, 66 % des enfants sont en détresse respiratoire. Par la suite, ils présentent des infections récurrentes des voies respiratoires dont la fréquence s'accroît avec l'atteinte neurologique, l'immobilisation et surtout l'hypoplasie pulmonaire^[115]. Un tiers des patients ont une peau ichtyosique ou eczémateuse et 10 % une fente palatine. Plus rarement, il existe une maladie cardiaque congénitale, des malformations gastro-intestinales, une obstruction de la jonction pyélo-urétérale, un hypospadias.

La première décennie de vie est très fréquemment fatale. Selon les sources, 10 à 40 % des enfants décèdent pendant la première année de vie et 20 % supplémentaire dans la deuxième. Les décès les plus précoces sont principalement la conséquence de complications respiratoires^[103,111].

4.4.1.2. Phénotypes intermédiaires

L'expression des mutations du gène *PEX7* est variable et fait émerger au sein des CDRP-1 une continuité phénotypique. Dans ces phénotypes appelés « intermédiaires », les



sujets atteints ont une chondrodysplasie et une cataracte congénitale de sévérité variable. La rhizomélie est absente^[116] et les calcifications ponctuelles ne sont pas systématiquement observées (**Figure 11**). La raideur des articulations est présente. Le déficit intellectuel et le retard de croissance sont toujours importants mais moins prononcés^[103]. À l'IRM, les anomalies du phénotype sévère ne sont pas retrouvées. Quelque fois, comme l'ont décrit Brams-Mengerink et *al.*, l'enfant peut être capable de se déplacer sans aide. Il peut avoir une certaine communication avec son environnement^[110] et même prononcer quelques mots^[117]. L'espérance de vie est bien plus importante que les formes sévères et atteint quelques fois 20 ans^[103,110]. La fréquence de ces phénotypes correspond à environ 7 % des cas de CDRP-1^[118].

Figure 11 : CDRP-1 intermédiaire chez une patiente âgée de 4 ans^[110]. Il n'est pas observé de rhizomélie des bras et des jambes. Le visage a un aspect dysmorphique avec un front proéminent et un nez court à la racine aplatie. La dysplasie des hanches provoque une posture particulière.

Certaines anomalies du gène *PEX7* sont responsables de formes cliniques distinctes et encore moins sévères. Le phénotype le plus décrit est proche de la forme adulte de la maladie de Refsum (ARD-like)^[119]. À la naissance, ces patients ARD-like ne présentent aucun signe de maladie métabolique. Leur développement mental et staturo-pondéral est convenable. Par la suite, ils peuvent développer une rétinite pigmentaire et une neuropathie périphérique, évoquant la forme adulte de la maladie de Refsum. La rétinopathie est bilatérale, isolée et progressive. Elle se manifeste par une perte de la vision nocturne et un rétrécissement du champ visuel. Les pupilles sont de petite taille et répondent mal aux stimulations lumineuses. Les patients ne souffrent pas de cataracte. Une surdité neurogène nécessitant un appareillage et une anosmie profonde apparaissent ensuite. La polyneuropathie est chronique et de type sensori-motrice. Les anomalies squelettiques sont rares. Les autres anomalies de l'ARD sont retrouvées. L'espérance de vie est nettement meilleure que les phénotypes CDRP et peut même dépasser 55 ans^[85,119,120].

Enfin, un cas présentant uniquement une cataracte congénitale isolée a été décrit^[118]. Toutefois,^[118] au vu de la faible symptomatologie, le lien de causalité entre les anomalies du gène *PEX7* et une cataracte congénitale isolée est difficile à établir. Ce phénotype n'est donc que très peu décrit.

4.4.2. Diagnostic biologique

4.4.2.1. Investigations biochimiques plasmatiques, urinaires et érythrocytaires

Lorsqu'une CDRP est suspectée, le bilan de première intention du diagnostic des maladies peroxysomales doit être prescrit. Il s'effectue par l'exploration des principales voies métaboliques :

- la biosynthèse des plasmalogènes ;
- l' α -oxydation de l'acide phytanique ;
- la β -oxydation des AGTLC, de l'acide pristanique et des intermédiaires des acides biliaires (D/THCA).

Un point important oppose la CDRP-1 aux autres PBD : il s'agit de la β -oxydation. Cette dernière n'est pas déficiente dans la CDRP-1 et les AGTLC ne s'accumulent donc pas dans le plasma. Au contraire, un taux d'acide hexacosanoïque (C26:0) élevé, associé à une augmentation des rapports C26:0/C22:0 (Acide docosanoïque) et C24:0 (Acide tétracosanoïque)/C22:0 oriente vers d'autres pathologies peroxysomales. Il existe toutefois des faux-postifs : cholestase néonatale sévère, régime cétogène, prélèvement hémolysé. Le dosage plasmatique de ces analytes, en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) ou en chromatographie liquide couplée à deux spectromètres de masse en tandem (LC-MS/MS)^[121], constitue un bon outil de dépistage différentiel entre les PBD et les CDRP. Au laboratoire des maladies héréditaires du métabolisme de Lyon, la technique utilisée est la GC/MS sur des plasmas héparinés.

En parallèle du dosage des AGTLC, la mesure de l'acide phytanique et de l'acide pristanique plasmatique par la même technique, permet de préciser le diagnostic. Dans la CDRP-1, les taux d'acide phytanique sont modérément élevés et ils sont variables en fonction des phénotypes. Les formes moins sévères présentent souvent des taux plus importants^[117]. Néanmoins, l'acide phytanique provenant exclusivement de sources exogènes, sa concentration plasmatique varie en fonction des apports alimentaires. Elle peut donc être normale chez le nouveau-né, en dépit du blocage de l' α -oxydation. Dans les sous-types 2 et 3 des CDRP, l' α -oxydation n'est jamais touchée et les taux d'acide phytanique sont normaux.

Les plasmalogènes érythrocytaires et plasmatiques sont les paramètres essentiels pour documenter une CDRP. En effet, dans les trois sous-types, il existe un défaut de leur synthèse.

Cependant, dans la CDRP-1, les taux résiduels sont variables et sont corrélés aux phénotypes. Ils sont indétectables dans les formes sévères alors que des taux résiduels sont observés dans les formes modérées^[117]. Une diminution est également constatée dans les PBD. Un taux normal de plasmalogènes peut être dû à un déficit isolé d'une protéine peroxysomale, à une forme modérée de PBD (NALD, IRD), voire même à un phénotype particulier de déficit en Pex7p: l'ARD-like. Le dosage des plasmalogènes est effectué, après dérivation en diméthylacétal, par GC-MS^[122]. Un détecteur à ionisation de flamme (FID) peut remplacer la spectrométrie de masse.

Enfin, il existe deux autres paramètres dans le bilan peroxysomal : l'acide pipécolique et les intermédiaires des acides biliaires. Leur dosage peut être utile dans certaines situations où les autres paramètres sont peu discriminants. L'acide pipécolique plasmatique et urinaire, ainsi que les intermédiaires des acides biliaires plasmatiques ne sont pas perturbés dans les CDRP.

4.4.2.2. Investigations biochimiques des fonctions peroxysomales sur cellules

Les tests sur fibroblastes cultivés permettent une caractérisation plus complète des fonctions des peroxysomes et orientent ainsi le diagnostic vers une PBD ou vers un déficit enzymatique isolé. Ils sont indispensables devant des dosages plasmatiques normaux associés à une forte présomption clinique de pathologie peroxysomale. Ces investigations sont également réalisables sur amniocytes, lesquels constituent les cellules d'origine fœtale les plus facilement accessibles.

Chez les patients CDRP-1, l'exploration des fonctions métaboliques montre :

- une biosynthèse des plasmalogènes déficiente ;
 - un déficit marqué de l'alkyl-DHAP-S ;
 - un déficit partiel en DHAP-AT^[123].
- une α -oxydation de l'acide phytanique déficiente^[124] ;
- une β -oxydation des AGTLC normale ;
- l'absence de la forme mature (41 kDa) de la thiolase pTH1, associée à la présence de la forme précurseur (44 kDa)^[125].

À l'exception de la DHAP-AT, les déficits enzymatiques constatés sont dus à l'incapacité des peroxysomes à importer les protéines portant le signal de ciblage peroxysomal

PTS2 (cf **Tableau 1**, p. 26). La DHAP-AT porte le signal PTS1, ainsi elle est importée dans le peroxyosome *via* le récepteur Pex5p. La diminution de son activité est expliquée par le déficit en alkyl-DHAP-S, car elle forme avec cette dernière un complexe nécessaire à sa stabilité^[123]. Dans les autres PBD, cette diminution est due à l'absence de peroxyosome. Au laboratoire, la mesure de l'activité de la DHAP-AT repose sur la mesure de la radioactivité du DHAP-palmitoyl formé à partir de DHAP marqué et de palmitoyl-CoA^[126].

Enfin, les fibroblastes et les amniocytes peuvent également être le support de dosage direct d'analytes et de tests génétiques.

Tableau 2 : Caractéristiques biochimiques des principales maladies peroxyosomales, d'après Wanders et Weller^[77,81,127].

Pathologie	Gènes	Métabolites peroxyosomales						Enzymes	
		AGTLC	Acide pipécolique	Acide pristanique	Acide phytanique	D/THCA	PL	DHAP-AT	Thiolase pTH1
Anomalie de la biogenèse des peroxyosomes									
ZS NALD IRD	<i>PEX1,2,3,5,6,10,12,13,14,16,19,26</i>	↑↑	↑	N - ↑	N - ↑	↑	↓	↓	A
CDRP-1 sévère	<i>PEX7</i>	N	N	N - ↓	N - ↑	N	↓↓	↓↓	A
CDRP-1 intermédiaire		N	N	N - ↓	N - ↑	N	↓	↓	A
ARD-like		N	N	N - ↓	↑	N	N - ↓	N - ↓	A
Déficit isolé d'une enzyme peroxyosomale									
X-ALD	<i>ABCD1</i>	↑	N	N	N	N	N	N	N
Déficit en ACOX1	<i>ACOX1</i>	↑	N	N	N	N	N	N	N
Déficit en DBP	<i>HSD17B4</i>	↑	N - ↑	N - ↑	N - ↑	↑	N	N	N
Déficit en SCPx	<i>SCP2</i>	N	N	N - ↑	N - ↑	↑	N	N	N
Déficit en AMACR	<i>AMACR</i>	N	N	N - ↑	N - ↑	↑	N	N	N
ARD	<i>PHYH</i>	N	N - ↑	N - ↓	↑↑	N	N	N	N
CDRP-2	<i>GNPAT</i>	N	N	N	N	N	↓↓	↓↓	N
CDRP-3	<i>AGSP</i>	N	N	N	N	N	↓↓	N - ↓	N

ZS : Syndrome de Zellweger
NALD : Adrénoleucodystrophie néonatale
IRD : Maladie de Refsum infantile
ACOX1 : Acyl-CoA oxydase
SCPx : Sterol carrier protein x
AMACR : α-méthylacyl-CoA racémase
ARD : Maladie de Refsum adulte
DBP : Protéine D bi-fonctionnelle

AGTLC : Acide gras à très longue chaîne
PL : Plasmalogènes
D/THCA : Intermédiaires des acides biliaires
DHAP-AT : Dihydroxyacétone phosphate acyl-transférase
N : Normal
A : Anormale
↑ : Élevé
↓ : Diminué

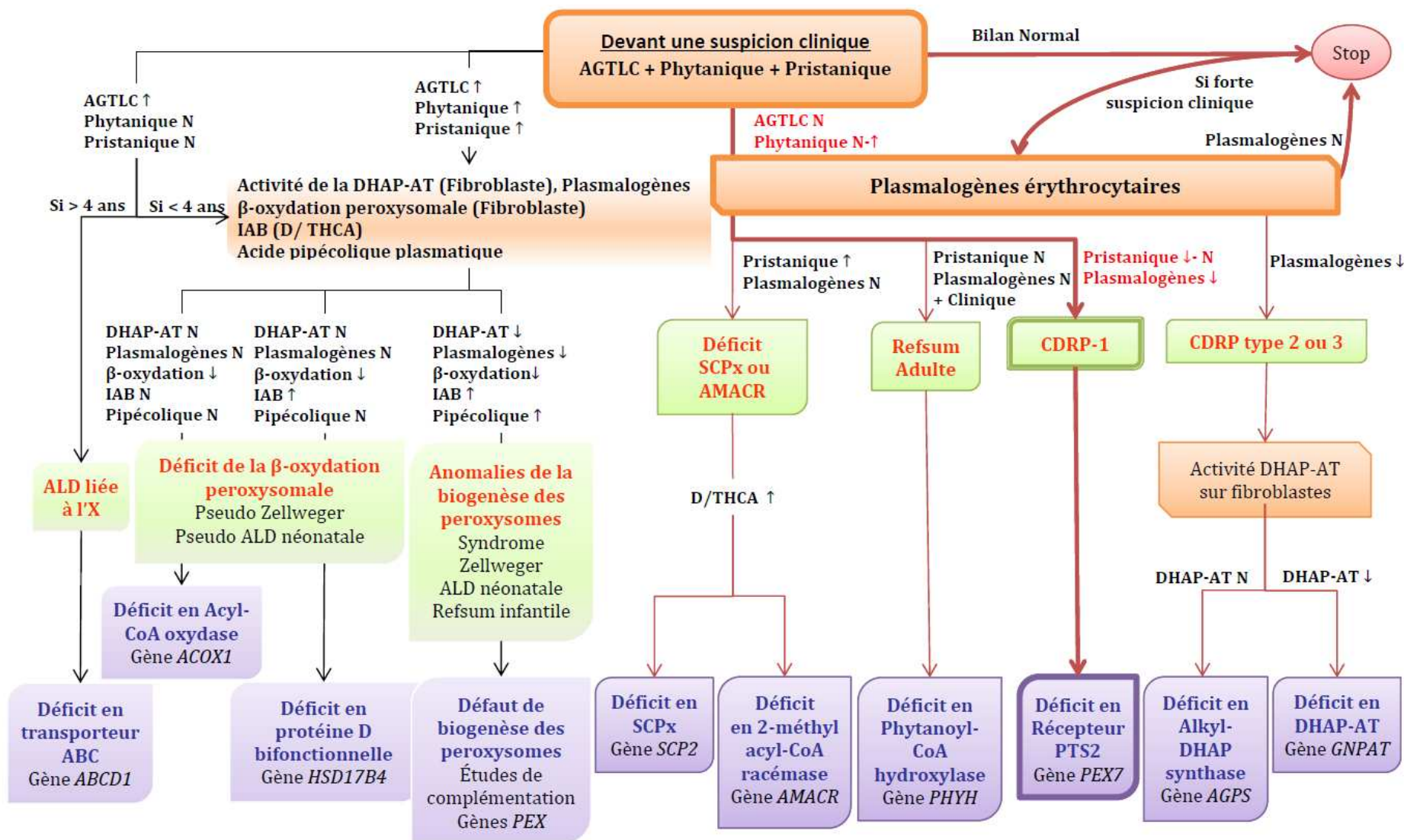


Figure 12 : Arbre décisionnel d’exploration des maladies peroxysomales au sein du service des maladies héréditaires du métabolisme et dépistage néonatal.

IAB : Intermédiaires des acides biliaires.

4.4.2.3. Génétique du déficit en Pex7p

L'identification des allèles pathogènes des cas index, par l'étude en biologie moléculaire du gène *PEX7*, est l'ultime étape du diagnostic de la CDRP-1. Elle permettra par la suite d'établir une corrélation génotype – phénotype. Ce test génétique permet également de dépister dans les familles, les porteurs d'un allèle muté. En effet, ces derniers sont totalement asymptomatiques et ne peuvent pas être identifiés par les méthodes biochimiques. Ces données complèteront le diagnostic prénatal.

Dans le gène *PEX7*, 41 mutations différentes ont été décrites (**Tableau 3**): 15 faux-sens, 9 non-sens, 7 délétions, 2 insertions, 2 duplications et 6 mutations de sites d'épissages^[62,98,99,103,105,120,128]. Les mutations sont réparties sur l'ensemble du gène, bien que les exons 9, 1 et 7 soient les plus fréquemment touchés^[103,105]. Dans 59 % des cas, il s'agit d'une mutation non-sens et dans 15 % des cas d'une substitution. Dans la première étude de Braverman et *al.* rassemblant 72 patients, la mutation de loin la plus fréquente est une mutation non-sens c.875T>A (p.Leu292X) avec une fréquence allélique d'environ 50 %. Cette mutation n'est retrouvée que dans les populations caucasiennes^[107]. Ensuite, viennent par ordre décroissant de fréquence, les deux substitutions p.Ala218Val (6-12 %)^[62,105,107] et p.Gly217Arg (7 %), puis la modification du site d'épissage c.903+1G>C (5 %) et enfin la mutation non-sens c.120C>G (p.Tyr40X).

Au fur et à mesure de la découverte de ces mutations et de la description des cas cliniques associés, les relations entre les génotypes et les phénotypes biochimiques, ainsi que cliniques se sont précisées. Nous savons alors que la sévérité phénotypique est directement corrélée avec le degré du déficit en plasmalogènes, qui est lui-même dépendant de l'activité de l'alkyl-DHAP-S et de la DHAP-AT. La fonctionnalité de ces deux enzymes étant conditionnée par leur localisation peroxysomale, le phénotype dépend donc des anomalies dans le gène *PEX7* et de la capacité résiduelle de Pex7p à importer dans le peroxysome les protéines porteuses du signal PTS2. Les protéines mal-localisées peuvent cependant conserver une certaine activité.

Cliniquement, il existe deux groupes de variants phénotypiques, les variants de type CDRP à la clinique semblable mais moins sévère que les formes classiques de CDRP et les variants de type ARD. Du point de vue génétique, la différence entre les deux variants s'explique par des mutations plus graves pour la CDRP-1 que celles provoquant la maladie de Refsum. D'autre part, l'alkyl-DHAP-S et la phytanoyl-CoA hydroxylase possédant des séquences PTS2 différentes^[129], les anomalies de Pex7p n'ont probablement pas le même

impact sur son affinité pour chacune des ces deux enzymes. L'importation dans les peroxysomes peut ainsi être plus efficace pour l'alkyl-DHAP-S que pour la phytanoyl-CoA hydroxylase. Dans ce cas, c'est l'activité de cette enzyme qui sera majoritairement responsable de la clinique.

Tableau 3 : Mutations identifiées dans le gène *PEX7* et phénotypes associés.

Exon	Allèle	Protéine	Phénotype
1	-45C>T	Met1extMet-17fs54X ^[103]	ARD-like
1	c.9insGTGCGGT	p.A3fsX ^[120]	<i>Non renseigné</i>
1	c.12_18dupGTGCGGT	p.Gly7ValfsX51 ^[120]	ARD-like
1	c.40A>C	p.Thr14Pro ^[120]	ARD-like
1	c.45_52delGGGACGCC	p.Pro15fsX ^[103]	CDRP
1	c.45_52dupGGGACGCC	p.His18ArgfsX35 ^[105]	Intermédiaire
1	c.60 C>A	p.Tyr20X ^[105]	<i>Non renseigné</i>
1	c.74C>T	p.Ser25Phe ^[103]	Cataracte
1	c.116A>C	p.His39Pro ^[103]	CDRP
1	c.120C>G	p.Tyr40X ^[105]	CDRP
1	c.122G>T	p.Gly41Val ^[103]	CDRP
1	c.130+1 G>A	IVS 1+1 G>A ^[103]	CDRP
1	c.130+1 G>C	IVS 1+1 G>C ^[105]	<i>Non renseigné</i>
1	c.130+3 G>C	IVS 1+3 G>C ^[105]	<i>Non renseigné</i>
2	c.188+1 G>C	IVS 2+1 G>C ^[103]	CDRP
3	c.209 T>G	p.Leu70Trp ^[105]	<i>Non renseigné</i>
3	c.257 G>A	p.Cys86Tyr ^[105]	<i>Non renseigné</i>
3	c.283 T>G	p.Trp95Gly ^[105]	<i>Non renseigné</i>
3	c.334C>T	p.Gln112X ^[103]	CDRP
3	c.340-10 A>G	IVS 3-10 A>G ^[103]	ARD-like
4	c.345T>G	p.Tyr115X ^[105]	ARD-like
4	c.370_396del27nt	p.Gly124_Ser132del ^[105]	CDRP
4	c.376 C>T	p.Gln126X ^[105]	<i>Non renseigné</i>
4	c.395C>A	p.Ser132X ^[103]	CDRP
4	c.400 G>A	p.Asp134Asn ^[105]	<i>Non renseigné</i>
5	c.426delA	p.Pro142fsX38 ^[103]	CDRP
5	c.429delT	p.Thr143fsX37 ^[103]	CDRP
5	c.490T>C	p.Ser164Pro ^[103]	CDRP
5	c.509_511delTGT	p.Cys170del ^[103]	CDRP
6	c.618G>A	p.Tryp206X ^[103]	CDRP
7	c.649G>A	p.Gly217Arg ^[103]	CDRP
7	c.653C>T	p.Ala218Val ^[62]	Intermédiaire
7	c.694 C>T	p.Arg232X ^[128]	Intermédiaire
7	c.722 A>T	p.His241Leu ^[105]	<i>Non renseigné</i>
8	c.785C>T	p.Ser262leu ^[105]	CDRP
9	c.804 del 100pb	p.Arg268fsX ^[98]	CDRP
9	c.842 del C	p.Thr281fsX ^[105]	<i>Non renseigné</i>
9	c.854A>G	p.His285Arg ^[103]	Intermédiaire
9	c.871_873insCAA	p.Cys290_Glu291insGln ^[103]	CDRP
9	c.875T>A	p.Leu292X ^[103]	CDRP
9	c.903+1 G>C	IVS 9+1 G>C ^[105]	CDRP

4.4.3. Diagnostic prénatal du déficit en Pex7p

La CDRP-1 est une pathologie grave qui doit être diagnostiquée le plus précocement possible. Le diagnostic prénatal (DPN) intervient idéalement après une étude précise de l'histoire familiale et après l'analyse du statut génétique des deux parents. La CDRP-1 étant transmise selon le mode autosomique récessif, si les deux parents sont porteurs d'une anomalie génétique, chaque enfant a un risque de 25 % d'être affecté, de 50 % d'être porteur d'un seul allèle mutant et de 25 % d'être totalement sain.

Le diagnostic prénatal des maladies peroxysomales repose sur le dosage des analytes et la mesure des activités enzymatiques peroxysomales^[130]. Les tests s'effectuent, en l'absence de contamination par du tissu maternel, sur les villosités chorales ou sur les amniocytes cultivés réciproquement dès la 11^{ème} et la 15^{ème} semaine d'aménorrhée (SA)^[131]. Toutefois, le rendu des résultats est long car la culture cellulaire nécessite un délai de 3 semaines. Lorsque la mutation pathogène est identifiée dans la famille et notamment chez les deux parents, la biologie moléculaire permet de rechercher les mutations sur l'ADN fœtal et de rendre une réponse rapide et définitive.

Concernant les familles non informatives, c'est l'échographie systématique, au 2^{ème} trimestre de grossesse, qui donne l'alerte^[132]. Le premier signe d'appel est le retard de croissance *in utero*. Le raccourcissement de l'humérus est rarement visible avant la 16^{ème} SA. Une à deux semaines après, l'échographie est également capable de détecter la chondrodysplasie ponctuée. En effet, les épiphyses s'ossifient prématurément et deviennent hyperéchogènes. La rhizomélie peut être observée à la 18^{ème} SA^[133]. Il est ensuite nécessaire de rechercher des malformations associées telles que : les punctuations épiphysaires vers la 19^{ème} SA^[132], le syndrome de binder par échographie en 2 ou 3 dimensions vers la 20^{ème} SA^[133], une cataracte bilatérale visible un peu plus tardivement dans le 2^{ème} trimestre mais qui n'est pas systématiquement présente^[134].

Les paramètres biométriques sont souvent en-dessous du 10^{ème} percentile pour les longueurs humérales et fémurales. Le périmètre crânien, le diamètre bipariétal et le diamètre abdominal transverse se situent généralement entre le 10^{ème} et le 50^{ème} percentile. Le périmètre abdominal est également réduit mais de façon moins importante.

L'ensemble de ces signes échographiques sont présents pour les formes classiques de CDRP-1. Toutefois, pour les formes intermédiaires, les signes échographiques peuvent être

rares et peu marqués. Il est donc primordial d'effectuer un suivi plus soutenu des fœtus, dès la découverte d'un retard de croissance *in utero*.

4.4.4. Diagnostic différentiel avec les chondrodysplasies ponctuées

4.4.4.1. Autres chondrodysplasies rhizoméliques ponctuées

Les CDRP de type 2 et de type 3 sont cliniquement indiscernable de la CDRP-1. En l'absence d'anomalies dans le gène *PEX7* et de forte suspicion d'origine peroxysomale par déficit en plasmalogènes, le diagnostic différentiel sera réalisé par l'étude des gènes *GNPAT* et *AGPS* en biologie moléculaire.

La dysplasie de Greenberg est une dysplasie squelettique très rare et létale *in utero*. Elle se caractérise par un *hydrops fetalis* et un nanisme micromélique sévère. Les calcifications ponctuées sont bien visibles aux épiphyses mais elles touchent aussi les diaphyses. De nombreuses atteintes viscérales et un dysmorphisme facial sont également observés. La dysplasie de Greenberg est associée à des anomalies de la biosynthèse du cholestérol. Elle est transmise sur le mode autosomique récessif et elle est due à une mutation du gène *LBR* codant pour le récepteur de la lamine B qui appartient à la famille des stéroïdes réductases^[135].

Trois autres chondrodysplasies autosomiques récessives sont causées par des anomalies de la biosynthèse du cholestérol. Il s'agit notamment :

- du syndrome de Smith-Lemli-Opitz qui est causé par un déficit en 3 β -hydroxystérol- Δ 7-réductase ;
- de la desmostérolose due à un déficit en 3 β -hydroxystérol- Δ 24-réductase ;
- de la lathostérolose causée par un déficit en 3 β -hydroxystérol- Δ 5-désaturase^[136].

Dans ces chondrodysplasies, l'atteinte rhizomélique des membres est fréquemment retrouvée mais les calcifications ponctuées sont plus rares.

La dysplasie de type Astley-Kendall est une dysplasie squelettique létale caractérisée par un nanisme micromélique, une ostéogenèse imparfaite, et des calcifications ponctuées dans le cartilage. Elle se transmet selon le mode autosomique récessif^[137].

4.4.4.2. Chondrodysplasies ponctuées non rhizoméliques

La chondrodysplasie ponctuée brachytéléphalangique ou chondrodysplasie ponctuée de type 1 (CDPX-1) est associée une dysmorphie faciale très marquée (dysostose maxillo-nasale de Binder), des calcifications prédominantes aux tarses et aux membres inférieurs, et une hypoplasie des phalanges distales. La taille et l'intelligence sont peu touchées. Le pronostic est plus favorable que les autres formes de CDP. La maladie se transmet selon un mode récessif lié à l'X et n'atteint donc que les garçons. Elle est due à des mutations sur le gène *ARSE* (chromosome Xp22.3) codant une enzyme, l'Arylsulfatase E, capable de fixer des groupements sulfates sur d'autres protéines. L'activité *in vitro* de cette enzyme est inhibée en présence de warfarine. Sa fonction est inconnue mais il semblerait qu'elle aurait un rôle important dans la croissance et le maintien de la densité osseuse^[138].

La chondrodysplasie ponctuée de type 2 (CDPX-2) ou syndrome de Conradi-Hünnerman-Happle est une dysplasie squelettique caractérisée par un nanisme, une asymétrie de la longueur des membres, une scoliose, une érythrodermie ichtyosiforme et une cataracte parfois unilatérale. L'intelligence est normale. La maladie touche de préférence les filles dont l'espérance de vie est quasiment normale. Pour le fœtus masculin, elle est sévère voire létale^[139]. Le mode de transmission est dominant lié à l'X et sa prévalence est inconnue. La maladie est due à des mutations du gène *EBP* (*Emopamil binding protein*) situé sur le chromosome Xp11.22-23 et codant une enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse du cholestérol, la 3 β -hydroxystéroïde- Δ 8, Δ 7-isomérase. Il en résulte une diminution du taux de cholestérol et une accumulation de précurseurs ou de sous-produits potentiellement toxiques^[140]. Un traitement dermatologique est recommandé tel que l'application de crème émolliente pour améliorer la structure en écaille de la peau. La scoliose et l'asymétrie des membres sont responsables d'une arthrose prématurée, nécessitant parfois le recours à la chirurgie orthopédique.

La CDP de type tibio-métacarpienne et le syndrome de Toriello-Higgins-Miller sont d'autres formes de CDP non rhizoméliques. La CDP de type Sheffield est une forme moins sévère.

4.4.4.3. Chondrodysplasies acquises

Ces formes de chondrodysplasie ne sont pas la conséquence d'une anomalie génétique.

- **Formes iatrogènes**

La vitamine K est impliquée dans la maturation de certaines protéines de l'os telle que l'ostéocalcine. Afin de pouvoir fixer le calcium, les résidus glutamates de ces protéines sont transformés en acide γ -carboxyglutamique par une carboxylase ayant comme cofacteur la vitamine K^[141]. Une exposition aux anti-vitamines K (AVK) entre la 6^{ème} et la 9^{ème} SA provoque une fœtopathie dans plus de 6 % des cas. Elle associe à des degrés variables une chondrodysplasie ponctuée brachytéléphalangique, une hypoplasie nasale et des anomalies oculaires allant jusqu'à la cécité. Les calcifications ponctuées sont observées au niveau des régions épiphysaires mais elles disparaissent souvent spontanément après la naissance. Il existe également, et ce quelle que soit la période d'exposition anténatale aux AVK, des anomalies cérébrales pouvant entraîner un retard mental^[142]. Le même phénotype est décrit chez des enfants issus de mères carencées en vitamine K pendant la grossesse^[143]. Le déficit en vitamine K époxyde-réductase, décrit en 1987 par Pauli *et al.* en représente également une phénocopie^[141]. L'exposition du fœtus à un autre tératogène, la phénytoïne, peut provoquer une CDP de type tibio-métacarpienne. Certains auteurs supposent que cette molécule induirait un déficit en vitamine K^[144].

- **Formes secondaires**

Les formes secondaires de CDP peuvent également faire suite à une maladie auto-immune présente chez la mère. Il s'agit d'une complication très rare dont la cause la plus fréquente est le lupus érythémateux disséminé. Les caractéristiques cliniques des CDP sont retrouvées à l'exception de la cataracte et du retard mental. Les ponctuations épiphysaires disparaissent dans les premières années de vie. Une surdité modérée de conduction et un bloc cardiaque congénital peuvent être présents^[145]. La physiopathologie est encore mal connue. Elle serait due au passage transplacentaire des auto-anticorps maternels (anticorps anti-ribonucléoprotéines ou anti-nucléaires par exemple). Ces anticorps interagiraient avec des protéines comme la calréticuline et empêcheraient leur liaison au calcium^[146]. Les CDP des enfants nés de mères lupiques ont généralement un bon pronostic vital et une absence de déficit mental. Toutefois, à l'exception de leur pronostic, aucune particularité clinique ne les différencie des autres CDP en période anténatale. L'élimination des autres causes est donc primordiale et doit amener à réaliser une enquête génétique et familiale.

4.5. Physiopathologie

La physiopathologie de la CDRP-1 est la conséquence directe des déficits enzymatiques provoqués par les anomalies du récepteur Pex7p. La perturbation physiopathologique prédominante dans la CRDP-1 est le défaut de biosynthèse de plasmalogènes. En effet, les mêmes symptômes sont retrouvés dans les deux autres types de CDRP. De plus, la capacité résiduelle de cette synthèse est clairement liée à la sévérité du phénotype clinique et à la gravité des anomalies observées à l'IRM. En effet, les patients ayant des taux de plasmalogènes moyennement diminués présentent une forme atténuée de CDRP et peu d'anomalies à l'IRM^[68].

Les mécanismes physiopathologiques reliant les plasmalogènes aux anomalies de calcification et aux anomalies neurologiques ne sont pas connus. Néanmoins, en 2003, Brites et *al.* ont créé un modèle de souris *PEX7 KO*. Ces souris présentent une diminution de migration des neurones pendant le développement de leur cerveau^[147]. Ensuite, leurs tissus nerveux se démyélinisent progressivement. Cette démyélinisation s'accompagne d'une perte axonale et de gliose^[148]. Dans le système nerveux périphérique, la quantité de myéline autour des axones est réduite, ce qui affecte la conduction nerveuse et favorise le développement de neuropathie.

Dans la CDRP-1, le développement du système oculaire est également perturbé. En effet, tous les modèles animaux présentent des anomalies de ce système quelque soit la sévérité du déficit en plasmalogènes. Plusieurs structures sont atteintes, notamment le nombre et l'architecture des cellules épithéliales du cristallin. La différenciation et la maturation des fibres optiques est anormales et celles-ci apparaissent gonflées et désorganisées. Le cristallin s'opacifie et ses pôles se déforment, ce qui laisse apparaître une cataracte nucléaire et un lenticône. Par contre, la rétine reste indemne^[38].

L'étude du squelette des souris *PEX7 KO* montre une absence ou un retard profond d'ossification endochondrale avec respect de l'ossification périostique^[147]. Cette anomalie est expliquée par l'arrêt de la maturation des chondrocytes primaires. Il existe également des foyers de dégénérescence de chondrocytes et la présence de chondrocytes hypertrophiques et désorganisés. D'autre part, les ostéoclastes présentent un nombre augmenté de vacuoles, ce qui suggère également une anomalie du remodelage osseux^[149].

Au niveau pulmonaire, un déficit en plasmalogène, comme observé dans les PBD et chez les grands prématurés, provoque une dysplasie broncho-pulmonaire^[150]. Les plasmalogènes sont sécrétés par les pneumocytes de type II dans le surfactant alvéolaire. La viscosité de ce dernier est ainsi diminuée et la tension de surface réduite, permettant une bonne

ventilation^[151]. Outre ce rôle de tensio-actif, les plasmalogènes agissent comme antioxydant et préviennent de la toxicité de l'oxygène. Enfin, au niveau pulmonaire, ils sont particulièrement enrichis en acide arachidonique, ce qui suggère un rôle dans les défenses immunitaires.

Au niveau des organes de la reproduction, le déficit en plasmalogènes provoque une désorganisation de l'épithélium des tubes séminifères et il augmente l'apoptose des spermatozoïdes^[148]. Les cellules de Sertoli se vacuolisent progressivement puis dégèrent. L'expression de protéines impliquées dans les jonctions cellulaires est modifiée, ce qui altère l'intégrité de la barrière hémato-testiculaire. Enfin, dans les déficits sévères, l'arrêt de la spermatogénèse intervient dès la seconde division de la méiose et provoque une infertilité^[152].

Les processus physiopathologiques des formes intermédiaires de CDRP-1 sont également liés à l'accumulation d'acide phytanique dans l'organisme. En excès, cet acide augmente la fluidité des membranes et perturbe le fonctionnement de leurs protéines^[153]. C'est un ligand endogène des récepteurs RXR et du facteur de transcription PPAR α ^[154]. Il peut alors jouer un rôle dans la régulation de l'expression des protéines, notamment celles impliquées dans la régulation du métabolisme lipidique et glucidique. Il agirait sur la carcinogenèse, l'athérosclérose et l'obésité. D'ailleurs, les souris supplémentées en acide phytanique perdent 20 à 30 % de leur poids en 1 mois^[147]. Chez ces mêmes souris, il existe des dépôts lipidiques dans le foie, le cœur et les glandes surrénales provoquant une inflammation et au niveau des nerfs périphériques une démyélinisation^[155]. Des études récentes ont montrés que l'activité toxique de l'acide phytanique implique des dysfonctionnements mitochondriaux, la génération de radicaux libres et la dérégulation du calcium dans les cellules nerveuses. L'acide phytanique conduit à la mort de ces cellules, à une ataxie cérébelleuse, une rétinite pigmentaire et une neuropathie périphérique chronique^[112].

4.6. Traitements et prise en charge

L'apparition précoce de la maladie, les atteintes multiples et le taux de létalité en cas de formes sévères de CDRP-1 limitent les possibilités de traitement.

Aucun traitement curatif n'existe aujourd'hui et les traitements symptomatiques n'améliorent que très sensiblement la qualité de vie. Une médication anti-convulsivante est souvent nécessaire. La kinésithérapie est recommandée pour améliorer les raideurs articulaires. Les atteintes visuelles peuvent être corrigées par chirurgie de la cataracte et les atteintes auditives par un appareillage adéquat.

Toutefois, d'après Brites P. et Wood P.L., pour les rares patients atteints de formes plus légères et ayant un taux de survie plus grand, il serait possible de corriger ou au moins de réduire le développement et la progression des atteintes tissulaires. En effet, chez la souris *PEX7 KO*, la supplémentation en dérivés d'alkyl-glycérols tels que le 1-*O*-octadécyl-rac-glycérol ou le 1-*O*-hexadécyl-rac-glycérol permet de contourner l'étape peroxysomale de synthèse des plasmalogènes et d'en restaurer les taux. Il n'y aurait cependant pas d'effet sur le cerveau^[156,157]. Le phénylbutirate de sodium peut lui aussi être utile pour les phénotypes intermédiaires avec une activité de Pex7p résiduelle, en stimulant la prolifération peroxysomale *via* le PPAR α ^[158]. De plus, un régime diététique limitant l'apport de métabolites qui tendent à s'accumuler tels que l'acide phytanique peut être mis en place. Il limitera les aliments marins et ceux issus des ruminants (lait). En cas d'inefficacité, une plasmaphérèse peut être réalisée^[159].

Afin d'éviter toutes aggravations trop rapides, il est nécessaire de préserver les fonctions respiratoires de l'infection grippale par vaccination et du virus respiratoire syncytial par des anticorps monoclonaux (palivizumab). Une sonde de gastrostomie peut être mise en place, mais une meilleure alimentation n'a pas montré de bénéfices sur la croissance.

Enfin, certains travaux récents, ont montré que de nouveaux médicaments pouvaient récupérer ou améliorer l'importation de protéines peroxysomales. Par exemple, de petites molécules permettent, en se fixant sur les peroxines mutées, de restaurer leur stabilité ou leur conformation^[160]. De même, en 2011, Dranchak et *al.* ont évalué si des molécules suppressives de mutation non-sens (ataluren) favorisaient la traduction à travers les codons « STOP » et si elles pouvaient rétablir l'expression d'une peroxine active. Ces molécules sont restées totalement inactives sur les gènes *PEX7* mutés. Néanmoins, les patients déficitaires en Pex2p et Pex12p ont bien répondu avec une amélioration du métabolisme des AGTLC et de la biosynthèse des plasmalogènes. Ces molécules restent donc une piste intéressante pour des traitements futurs^[161] puisque les mutations non-sens du gène *PEX7* sont observées chez près de 60 % des patients atteints de CDRP-1^[105].

DEUXIÈME PARTIE : TRAVAIL EXPÉRIMENTAL

1. Objectif du travail

La CRDP-1 est une affection héréditaire grave et souvent fatale pour laquelle il n'existe aucun traitement curatif. Comme le syndrome de Zellweger (ZS), elle fait partie des anomalies de la biogenèse des peroxysomes. Les phénotypes sont variés (sévères à frustes)^[162] et parfois proche de la maladie de Refsum Adulte (ARD)^[120]. Son diagnostic repose sur un ensemble d'arguments cliniques et radiologiques : rhizomélie, anomalies de calcification, cataracte. Toutefois, la CDRP-1 est une maladie à révélation anténatale dont les signes d'appel échographiques sont peu discriminants. Le diagnostic différentiel avec d'autres types de chondrodysplasies ponctuées ou le ZS est donc particulièrement difficile. Au niveau biochimique, la fonction peroxysomale présente peu d'anomalies. Le déficit de la biosynthèse des plasmalogènes est souvent la seule anomalie observée puisque l'accumulation de l'acide phytanique, dépendante du régime alimentaire, ne se produit pas chez les nouveau-nés. La distinction des trois formes de CDRP (forme 1, 2 et 3) est également difficile. La mesure d'activité enzymatique, dihydroxyacétone phosphate acyltransférase (DHAP-AT) et alkyldihydroxyacétonephosphate synthase (alkyl-DHAP-S) aide à poser ce diagnostic. Enfin, l'étude des apparentés n'est pas informative puisque leur bilan biochimique est normal quelque soit leur génotype.

Le recours à l'analyse du gène *PEX7* se révèle par conséquent indispensable. L'objectif de ce travail a donc été de mettre au point l'étude de ce gène par une technique de biologie moléculaire (amplification / séquençage). L'étude mutationnelle des cas index permettra ensuite d'établir un diagnostic de certitude et facilitera le conseil génétique tant pour l'étude familiale que lors du diagnostic prénatal. Au total, vingt-trois patients suspects ont été étudiés lors de cette étude et le lien entre l'expression phénotypique et le génotype pourra probablement être approfondi.

D'autre part, dans le cadre de l'unité INSERM UMR 1060 CarMeN (Cardiovasculaire, Métabolisme, Diabétologie & Nutrition) et en collaboration avec l'équipe d'Ingénierie et Fonctions des Lipides et des Lipoprotéines appartenant à la même unité INSERM à l'INSA de Lyon, nous avons réalisé un essai de dosage des plasmalogènes pour deux de nos patients (nommés **MAI** et **GUI**). Cet essai a été réalisé à partir de fibroblastes et d'amniocytes par une

technique de chromatographie gazeuse (GC) décrite par l'équipe de Brosche^[122]. Avec l'analyse du gène *PEX7*, il enrichira les outils diagnostics pour les maladies peroxysomales au sein du service des Maladies Héréditaires du Métabolisme et Dépistage Néonatal des Hospices Civils de Lyon.

2. Matériels et méthodes

2.1. Inclusion des patients, étude clinique et biologique

Nous avons inclus au total 23 patients répartis en deux groupes.

Le premier groupe est constitué de 13 patients qui ont été étudiés au laboratoire sur la période de 1988 à 2012. Ces patients ont un tableau clinique de type CDRP et/ou un profil métabolique orientant vers cette pathologie peroxysomale. Cette pathologie se manifeste par l'absence d'accumulation en AGTLC plasmatiques, une activité de la DHAP-AT non totalement déficitaire dans les fibroblastes, une biosynthèse des plasmalogènes diminuée, une β -oxydation du lignocérate non déficitaire et éventuellement une accumulation de l'acide phytanique plasmatique. Les données cliniques et biologiques de ces patients sont détaillées en annexe (**Annexe 1** et **Annexe 2**). Deux de nos patients étant pris en charge récemment, nous avons pu obtenir l'ADN de leurs parents, nous permettant ainsi de réaliser une étude familiale.

Le deuxième groupe est constitué de 6 femmes enceintes présentant des signes d'appel échographiques et dont le fœtus est suspecté d'être atteint de CDRP (humérus et fémurs courts, retard de croissance *in utero*, microcéphalies, calcifications ponctuelles). Les données cliniques et biologiques de ces patients sont détaillées en annexe (**Annexe 3**).

2.2. Matériels biologiques

Conformément à la réglementation, un consentement éclairé a été signé par chacun des patients (ou de leur parent) au cours d'une consultation médicale antérieure aux prélèvements et autorisant la réalisation d'une étude génétique sur chacun d'eux. Une exception a cependant été faite pour trois patients dont les prélèvements sont antérieurs au 1^{er} décret d'application (1995).

Une culture de fibroblastes a donc été réalisée pour chaque patient. Lorsqu'il s'agissait de femmes enceintes, le prélèvement était soit du liquide amniotique soit des cellules trophoblastiques. Afin d'être conservés congelés puis cultivés, les fibroblastes, les cellules trophoblastiques et les amniocytes ont été transmis au service de Biotechnologie Cellulaire du

Centre de Biologie et Pathologie Est des Hospices Civils de Lyon. Les conditions de culture sont les suivantes : Ham F10 + 12 % de sérum de veau foetal + antibiotiques (pénicilline, streptomycine) + antifongique (amphotéricine B) et pour le liquide amniotique : + 1 % Ultrosor G + Chang D. Après trois à quatre semaines de culture, les cellules sont récoltées sous forme de culot sec à la quantité de 1T75 soit 6.10^6 cellules. Pour les cas apparentés, un simple prélèvement sanguin de 5 mL sur tube EDTA a été effectué.

Le dosage des plasmalogènes a été réalisé sur fibroblastes chez le patient « **MAI** » et sur cellules amniotiques pour la patiente « **GUI** ».

2.3. Biologie moléculaire

2.3.1. Extraction de l'ADN génomique

Nous avons utilisé le kit NucleoSpin[®] Tissue de Macherey-Nagel[®] qui permet l'extraction et la purification de l'ADN génomique à partir des culots de cultures cellulaires de trophoblastes, de fibroblastes ou d'amniocytes. Brièvement, les cellules sont lysées par une solution contenant du sodium dodécyl-sulfate (SDS) et de la protéinase K à 56 °C pendant au moins trois heures. L'ADN est ensuite adsorbé sur une membrane de silice à l'intérieur de petites colonnes adaptées à des tubes de 2 mL, en présence d'agents chaotropiques (chlorhydrate de guanidinium) et d'éthanol absolu froid. Après élimination des contaminants (protéines, acides ribonucléiques) par lavage de la membrane par deux tampons différents, l'ADN génomique pur est élué à 70 °C par 120 µL de tampon de faible force ionique à pH légèrement alcalin (5 mM Tris/HCl; pH=8,5).

Le kit Illustra Nucleon BACC3[®] de GE Healthcare[®], utilisé selon les recommandations du fabricant, permet quant à lui, une extraction rapide à partir de sang total. Ce protocole comprend quatre étapes, dont la première correspond à la lyse des hématies dans de l'eau distillée stérile et un tampon Tris/HCl 10 mM à pH=8 en présence de chlorure de magnésium (MgCl₂), de sucrose et de Triton[®] X-100 comme détergent. Après centrifugation, la lyse cellulaire est obtenue par suspension du culot dans une solution détergente à 37 °C pendant 10 minutes. La déprotéinisation est effectuée par ajout de perchlorate de sodium. La troisième étape permet la séparation de l'ADN et des impuretés en milieu chloroformé par centrifugation avec la résine Nucleon[®]. L'ajout d'éthanol froid provoque ensuite la précipitation de l'ADN sous forme d'une pelote, laquelle sera rincée par 1 mL d'éthanol à 75 % froid puis séchée et enfin reprise par 25 µL de tampon Tris/EDTA.

2.3.2. Mesure de la concentration et contrôle de la qualité de l'ADN extrait

Le dosage de l'ADN se fait par spectrophotométrie UV-visible. Le Nanodrop 1000[®] (Thermo Fisher Scientific) mesure l'absorbance (A) d'une solution à 280 nm (protéines, enzymes ou histones liés à l'ADN) et à 260 nm (bases puriques et pyrimidiques) où 1 unité A = 50 ng/μL. Un microlitre de solution suffit pour calculer le rapport $A_{260/280}$, qui reflète la pureté de la solution en ADN. Une valeur comprise entre 1,7 et 2,0 témoigne d'un ADN suffisamment pur. En-dessous de 1,7 on estime qu'il y a une contamination protéique et au-delà de 2 la quantité d'ARN résiduelle est trop importante. L'ADN est conservé tel quel à +4 °C et sera utilisé dilué à 20 ng/μL dans de l'eau ultra pure Milli-Q (Millipore Corporation).

2.3.3. La séquence ADN du gène *PEX7*

La séquence de référence du gène *PEX7* (NC_000006.11) a été obtenue par l'intermédiaire du site PubMed NCBI (The National Center for Biotechnology Information) le 15 Novembre 2011. Ce gène est composé de 10 exons répartis sur 92 543 paires de bases sur le chromosome 6q21-q22.2^[107]. Notre étude se limitera à ces 10 exons et à leurs régions introniques flanquantes à ± 100 paires de bases. Les différents polymorphismes ou SNP, c'est-à-dire les mutations dans la séquence ne modifiant pas la fonctionnalité de la protéine ont été collectés sur le site e!Ensembl[®] (mise à jour : Septembre 2011). Les sites internet: e!Ensembl[®], HGMD[®] (The Human Gene Mutation Database) et *PEX* Gene Database ont permis de rassembler les différentes anomalies génétiques du gène codant la protéine Pex7p (mise à jour : 20 Février 2012).

2.3.4. Amplification de l'ADN génomique par PCR (Polymerase chain Reaction)

La réaction de PCR permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique de l'acide nucléique cible afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier. Cette amplification est possible grâce à la présence d'une enzyme remarquable : la *Taq* polymérase, qui n'opère que dans des conditions bien particulières.

Nous avons donc défini ces conditions pour les 10 exons du gène étudié. Plusieurs couples d'amorces ont été dessinés pour chacun d'entre eux. Puis, nous avons sélectionné les couples donnant les meilleurs rendements tout en ayant une grande spécificité. Enfin, pour permettre une analyse en routine de ce gène, nous avons essayé d'optimiser ces conditions, afin d'obtenir une condition unique de PCR pour l'ensemble des exons.

2.3.4.1. Les amorces : Design et Sélection

Afin d'obtenir une réaction de PCR efficace, les amorces doivent respecter un certain nombre de paramètres. Ainsi, elles ont toutes été dessinées à l'aide du logiciel Primer3 0.4.0, puis testées par les logiciels OligoAnalyser 3.1 (Integrated DNA Technologies) et Primer-Blast (NCBI Blast®). Nos amorces présentent une longueur de 18 à 25 nucléotides avec une composition en guanine et cytosine d'environ 50 %. Elles possèdent une bonne spécificité, c'est-à-dire que leur séquence respecte une complémentarité parfaite à la séquence matrice cible et la région où elles se fixeront, ne contient pas de séquences répétées dans le génome. Leur température d'hybridation (T_m) est de 60 °C en moyenne et la différence ΔT_m pour un même couple d'amorces ne dépasse pas 4 °C. Nos amorces ne possèdent pas de structures secondaires (pas de repliements sur elles-mêmes), ne sont pas auto-complémentaires et ne s'apparient pas entre elles dans un même couple.

La synthèse par voie chimique de nos amorces a été confiée à l'entreprise allemande Eurofins MWG Synthesis GMBH. Elles sont présentées dans le **Tableau 4**.

Tableau 4 : Amorces utilisées pour l'amplification des dix exons du gène *PEX7*.

Exons	Nom des amorces	Taille (pb*)	Séquence 5' → 3'	Sens	Taille amplicon	T_m	Taux de GC
1	1F-164	18	GGAGTCAACGCCCTTTCC	+	481pb	58.2	61.1 %
	1R+187	18	CAGACCAACTCCTCGCAC	-		58.2	61.1 %
2	2F-340	22	GTGTCTCTGGTGCCTTGTCTGG	+	606pb	64.0	59.1 %
	2R+208	21	CTCAAGTGATCCTTCTGCCTC	-		59.8	52.4 %
3	3F-319	23	CTGAAGCCTGTCTCTTAGTGTCC	+	711pb	62.4	52.2 %
	3R+241	20	GCTGGAGGTGTTCTTTCTGC	-		59.4	55.0 %
4 & 5	4F-147	23	GACACCTTGTTGAGATGGATAGG	+	807pb	60.6	47.8 %
	5R+93	22	CTCTGAAGCTAAGGTACACAGC	-		60.3	50.0 %
6	6F-403	21	GTAGACTTTGCCCGCCTTTAG	+	981pb	59.8	52.4 %
	6R+471	25	CACATGGACACTTATCTTACAGAGG	-		61.3	44.0 %
7	7F-245	22	CTGTCTGTAGTGTCCATCGTG	+	454pb	60.3	50.0 %
	7R+95	22	CCAATCCCTAAACCCAGAACAC	-		60.3	50.0 %
8	8F-239	25	GCTTGAGGGATAATTTCTTTGGAG	+	822pb	59.7	40.0 %
	8R+527	25	CTCTGTGGTATGGAAGTGTAACTGG	-		63.0	48.0 %
9	9F-332	25	TACTATCATCTCAATGTCCTTGTGC	+	713pb	59.7	40.0 %
	9R+281	24	CTTGTCACCTTTCTGTTGGGAGAG	-		61.0	45.8 %
10	10F-346	24	CACAGTCTGGAACGTATCTTTTCG	+	566pb	61.0	45.8 %
	10R+151	22	CTCCCTCAAACTGATTCCAGG	-		60.3	50.0 %

* pb : paire de bases

Le nom de nos amorces indique leur position par rapport à la séquence codante, par exemple l'amorce 4F-147 se situe 147 nucléotides avant l'exon 4 et l'amorce 5R+93, 93 nucléotides après l'exon 5.

Au total, nous avons réalisé neuf PCR pour amplifier les 10 exons. Comme les exons 4 et 5 sont petits (environ 100 paires de bases (pb)) et proches (moins de 400 pb), une seule PCR a été nécessaire.

2.3.4.2. Condition d'amplification

Les matrices d'ADN ont été amplifiées dans un mélange réactionnel (Mix) contenant : la *Taq* polymérase et du chlorure de magnésium comme cofacteur, un tampon de PCR, chacun des quatre désoxynucléotides (dNTPs) avec chacune des amorces d'un même couple. Pour l'exon 1, nous avons employé la *Taq* polymérase de Qbiogen® et pour les autres exons, la HotStar *Taq* polymérase de Qiagen®. Le tampon de PCR sert à maintenir le pH du milieu réactionnel à un niveau optimal pour l'enzyme (20 mM de TrisHCl à pH=8,7). La présence dans le milieu de cations bivalents Mg^{2+} et de cations monovalents (KCl à 100 mM et $(NH_4)_2SO_4$ à 50 mM) vont neutraliser les charges négatives des groupements phosphates de l'ADN et ainsi stabiliser les hybrides ADN/ADN. L'exon 1 a nécessité l'ajout d'agents augmentant la stringence du milieu (solution-Q, Qbiogen®) afin de diminuer les hybridations non spécifiques et augmenter le rendement. Les deux Mix réactionnels sont détaillés en annexe (Annexe 4 et Annexe 5).

Les réactions d'amplification ont été réalisées dans les thermocycleurs Mastercycler® pro, personal et ep gradient S d'Eppendorf avec un programme Touch Down détaillé dans le **Tableau 5**.

Nous avons associé à chaque réaction un témoin négatif (eau ultra pure Milli-Q) et un témoin positif (Pool d'ADN).

Tableau 5 : Étapes de la réaction de PCR Touch Down.

Étapes	Température (°C)	Temps (secondes)	Nombre de cycles
Dénaturation initiale de l'ADN Activation de l'ADN polymérase	95	15 minutes	
Dénaturation	95	45	16
Hybridation	$68 - N_x(0.5)^*$	45	
Élongation	72	45	
Dénaturation	95	45	24
Hybridation	60	45	
Élongation	72	45	
Élongation finale	72	5 minutes	

*N : nombre de cycles

2.3.4.3. Purification des amplicons

Afin d'être étudiés dans de bonnes conditions, les produits d'amplification doivent être débarrassés de tous les résidus de la réaction de PCR (dNTPs, amorces, *Taq* polymérase et sels). Cette purification a été opérée manuellement par ultrafiltration sur plaque Nucleofast[®] 96 (Macherey-Nagel) à l'aide du système de pompe à vide MultiScreen^{HTS} Vacuum Manifold (Merck Millipore). Les amplicons ont été ensuite repris par agitation sur shaker dans 60 µL d'eau Milli-Q.

2.3.4.4. Contrôle de l'amplification

La qualité de l'amplification a été contrôlée par électrophorèse capillaire micro fluidique sur un LabChip[®] GX (Caliper LifeSciences). Ce système utilise seulement 150 nL d'échantillon, lesquels sont aspirés au travers d'une puce de quartz. Les fragments d'ADN sont séparés par taille croissante et détectés par fluorescence. La taille et la concentration de chaque bande sont déterminées à la fois par un double étalon interne et par un marqueur de taille. Cette technologie remplace la migration sur gel d'agarose qui est chronophage et l'utilisation d'un réactif mutagène, le bromure d'éthidium. Le logiciel LabChip[®] HT Software permet une visualisation, soit sous forme d'électrophorégrammes, soit de gels *via* lesquels nous pouvons vérifier que la taille de l'amplicon soit bien celle attendue, à la fois pour le contrôle positif et pour les patients. De la même manière, nous vérifions l'absence de contamination grâce au témoin négatif. Le logiciel Data Viewer[®] Caliper permet d'extraire la concentration et la pureté de chaque amplicon.

2.3.5. Séquençage des amplicons

Le séquençage direct a été réalisé de façon automatisée selon la méthode de SANGER (méthode de référence) avec des marqueurs fluorescents^[163].

2.3.5.1. Réactions de séquences

Les réactions de séquences sont de simples PCR dont le milieu réactionnel comporte une faible concentration de quatre didésoxynucléotides fluoro-marqués (ddATP*, ddCTP*, ddGTP* ou ddTTP*) de la technologie BigDye Terminator[®] v3.1 (Applied Biosystems). Après incorporation, ces didésoxynucléotides empêchent la poursuite de l'élongation. Un pool

d'amplicons de tailles différentes sera alors présent dans le milieu réactionnel à l'issue de la réaction de séquence.

Cette réaction est effectuée à partir des produits de PCR purifiés et normalisés. La normalisation permet ainsi d'obtenir quelque soit l'exon étudié, la même quantité de produit amplifié, en fonction de sa taille et de sa concentration. Les réactions de séquences sont quantitativement homogènes pour chaque amplicon.

Tableau 6 : Amorces des réactions de séquences des dix exons du gène *PEX7*.

Exons	Nom des amorces	Taille (pb*)	Séquences 5' → 3'	Sens
1	1F-164 ^Q	18	GGAGTCAACGCCCTTTCC	+
	1R+187 ^Q	18	CAGACCAACTCCTCGCAC	-
2	2F-340	22	GTGTCTCTGGTGCCTTGTCTGG	+
	2R+194 †	22	CTGCCTCAGACTTGGGAATAGC	-
3	3F-60 †	24	GTTGTGTAGCTGCCTATGTAAGTG	+
	3R+241	20	GCTGGAGGTGTTCTTTCTGC	-
4	4F-147	23	GACACCTTGTTGAGATGGATAGG	+
	4R-106 †	24	TGTCGAATCATAGAGCTACAGAAG	-
5	5F-196 †	23	AGTTAGCTCAGCATTAGTTTGGC	+
	5R+93	22	CTCTGAAGCTAAGGTACACAGC	-
6	6F-403	21	GTAGACTTTGCCCGCCTTTAG	+
	6R+352	25	CACATGGACACTTATCTTACAGAGG	-
7	7F-245	22	CTGTCTGTAGTGTTCATCGTG	+
	7R+95	22	CCAATCCCTAAACCCAGAACAC	-
8	8R+274 †	25	TGTAGGAAAGTGTTACCATAGGAAC	+
	8R+527	25	CTCTGTGGTATGGAACTGTAAGTGG	+
9	9F-148 †	22	GTAGGGCTTAATAGTGGGGTTC	+
	9R+281 ^Q	24	CTTGTCACCTTTTCTGTTGGGAGAG	-
10	10F-346	24	CACAGTCTGGAACGTATCTTTTCG	+
	10R+151	22	CTCCCTCAAACCTGATTCCAGG	-

*pb : paires de bases - †: amorces remplacées ^Q : amorces nécessitant de la solution Q[®]

Par ailleurs, afin de prévenir d'éventuelles erreurs de la *Taq* polymérase, chaque amplicon a été séquencé deux fois ; une fois avec l'amorce sens et une fois avec l'amorce anti-sens (**Tableau 6**). Certaines amorces ont dû être, soit remplacées soit utilisées avec de la solution-Q[®] car elles donnaient de mauvais résultats au séquençage.

Le milieu réactionnel (**Annexe 6**) est constitué du Mix de réaction Big Dye Terminator[®] v3.1 (2 mM MgCl₂, dNTP, ddNTP marqués par un fluorophore, ADN polymérase *AmpliTaq* FS[®] (Applied Biosystems)), du tampon sequencing 5 X, de l'eau Milli-Q[®], de l'une des deux amorces sens ou anti-sens avec le produit de PCR purifié et normalisé correspondant.

Les PCR de séquençage sont réalisées sur les mêmes thermocycleurs que les PCR d'amplification selon un programme standard à une température de 60 °C (**Tableau 7**).

Tableau 7 : Étapes de la réaction de PCR de séquences.

Étapes	Température (°C)	Temps (secondes)	Nombre de cycles
Dénaturation initiale de l'ADN Activation de l'ADN polymérase	96	2 minutes	
Dénaturation	96	10	36
Hybridation	60	5	
Élongation	60	4 minutes	
Fin de PCR	14	-	

2.3.5.2. Purification des produits de séquences

Les produits de séquences ainsi obtenus, ont été purifiés à l'aide du kit BigDye[®] XTerminator[™] Purification (Applied Biosystems). Ce système utilise conjointement deux solutions, le XTerminator[™] et la solution SAM[™], qui sont dispensées dans chaque puits par le robot Microlab[®] Starlet IVD (Hamilton). La première solution permet grâce à de petites billes poreuses d'isoler les réactifs de la PCR de séquences tels que les ions, les dNTPs et ddNTPs non incorporés et de prévenir leur injection en même temps que les simples brins marqués. La deuxième solution favorise l'activité du BigDye[®] XTerminator[™] et stabilise les échantillons après purification.

2.3.5.3. Séquençage

Les produits purifiés de la réaction de séquences ont été séparés grâce à un séquenceur 48 capillaires 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems-Hitachi). Après séparation en ordre de taille croissante par électrophorèse capillaire, les brins d'ADN seront excités par le laser. Les données de fluorescence sont récupérées au niveau d'une cellule de détection et transmises vers une caméra CCD (Charge Coupled Device) pour être analysées. La fluorescence étant de longueur d'onde distincte pour chaque ddNTP marqué, le traitement informatisé des signaux transmis, pourra déduire facilement la séquence correspondante. Elle est représentée par un fluorogramme, sous forme d'une succession de pics de couleurs différentes, chaque couleur correspondant à un nucléotide donné.

2.3.5.4. Lecture des chromatogrammes

La lecture des électrophorégrammes se fait grâce au logiciel SepScape v2.5 (AppliedBiosystems). Ce dernier permet d'importer, à partir de diverses bases de données (NCBI Gene dans notre cas), la séquence de référence du gène d'intérêt. Il effectue un prétraitement des données issues du séquenceur, sélectionne notamment les séquences exploitables selon les normes de qualité fixées par le laboratoire et les aligne par rapport à la séquence de référence. La qualité des séquences est appréciée par diverses valeurs : intensité du signal, évaluation du bruit de fond, efficacité de la réaction de séquences. Par comparaison à la séquence de référence, ce logiciel participe à la détection des polymorphismes et des éventuelles mutations que comporte la séquence à étudier. Il peut également éditer un « rapport de variation de séquences ».

2.3.6. Analyse des allèles mutés

Une mutation est retenue uniquement si elle est présente à la fois sur les séquences sens et anti-sens. Elle est ensuite confrontée aux polymorphismes et mutations répertoriés dans les bases de données préalablement citées (HGMD, *PEX* Gene Database et e!Ensembl[®]) ainsi qu'à ceux décrits dans la littérature : Motley et *al.* ^[105] et Braverman et *al.* ^[103]. Le logiciel Alamut v2.1-2 (Interactive Biosoftware) et le site internet Polyphen-2 ont permis d'évaluer l'impact des mutations non décrites sur la fonctionnalité de la protéine engendrée.

Lorsque cela a été possible, nous avons recherché la mutation chez les parents du patient et nous avons comparé chaque phénotype au génotype identifié.

2.4. Essai de dosage des plasmalogènes sur cellules

La chromatographie gazeuse (GC) est une méthode d'analyse séparative qui s'applique aux composés gazeux ou volatiles. Le mélange gazeux, contenant les composés à séparer, est entraîné par un gaz vecteur (phase mobile), à l'intérieur d'une colonne dans laquelle est contenu un support séparateur (la phase stationnaire). La différence de rétention de ces composés, va permettre leur séparation à la sortie de la colonne. Un système de détection est nécessaire pour l'enregistrement d'un signal et l'établissement d'un chromatogramme. L'interprétation de ce dernier permet d'identifier et de quantifier les différents composés de l'échantillon étudié.

2.4.1. Produits utilisés

- Chlorure de sodium ;
- Eau distillée ;
- 1,2-diheptadécanyol-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine (Sigma) ;
- 1,2-diheptadécanyol-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (Sigma) ;
- 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxytoluène ou BHT (Tokyo Chemical Industry) ;
- Azote gazeux (Air Liquide) ;
- Trifluorure de bore ou BF₃ 10 % dans du méthanol (Fluka) ;
- Carbonate de potassium ou K₂CO₃ (Merck);
- Éthanol absolu, méthanol, chloroforme, toluène, isooctane (SDS);
- Hélium.

2.4.2. Appareils

Le système de chromatographie, que nous avons utilisé, est un chromatographe en phase gazeuse (Hewlett Packard Series 6080, USA) couplé à un détecteur d'ionisation de flamme (FID) (Agilent Technologies, USA). Il est muni d'une colonne capillaire BPX70 silice-greffée à 70 % en cyanopropyl polysilène-siloxane (SGE Analytical Science, Australie). Cette colonne dont les dimensions sont : 0,22 mm x 60 m x 0,25 µm, a spécialement été conçue pour la séparation d'acides gras méthyl-estérifiés. L'appareil est relié à un système informatique qui permet son pilotage ainsi que l'acquisition et le traitement des données.

2.4.3. Méthodes

Afin de prévenir tous types de contamination, la vaisselle a été soigneusement lavée, rincée à l'éthanol puis à l'acétone et enfin séchée sous un flux d'air. De plus, les plasmalogènes étant très sensibles à l'oxydation, l'ensemble des étapes a été réalisé sous une atmosphère protectrice, exclusivement constituée d'azote. L'utilisation d'un additif antioxydant comme le BHT permet de prévenir l'oxydation des plasmalogènes.

2.4.3.1. Méthodes d'extraction des lipides totaux

Les lipides totaux ont été extraits selon une méthode dérivée de celle de Folch^[164]. Les culots cellulaires ont ainsi été repris par 500 µL d'une solution de chlorure de sodium à 9 g/L.

L'ajout d'1 µg de deux étalons internes (1,2-diheptadécanoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine et 1,2-diheptadécanoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine) permet de s'affranchir du rendement de l'extraction. Chaque échantillon subit ensuite deux cycles d'extraction par 9 mL d'un mélange chloroforme/éthanol dans un rapport volumique 2:1. Après cinq minutes de centrifugation à 2000 tours par minute, la phase organique est évaporée sous azote. Cette évaporation ne doit pas être totale. Enfin, pour solubiliser les lipides, les échantillons sont repris par 500 µL d'un mélange volume à volume de toluène/méthanol.

2.4.3.2. Trans-éthérification des plasmalogènes

La trans-éthérification est une étape primordiale dans l'analyse des plasmalogènes (**Figure 13**). Elle va rendre possible leur séparation par chromatographie en phase gazeuse, d'une part en les détachant de leur « squelette » glycérol et d'autre part, en masquant leur tête hydrophile par des groupements méthyls. Cette trans-éthérification a été réalisée selon la technique décrite par Morrison et Smith^[165].

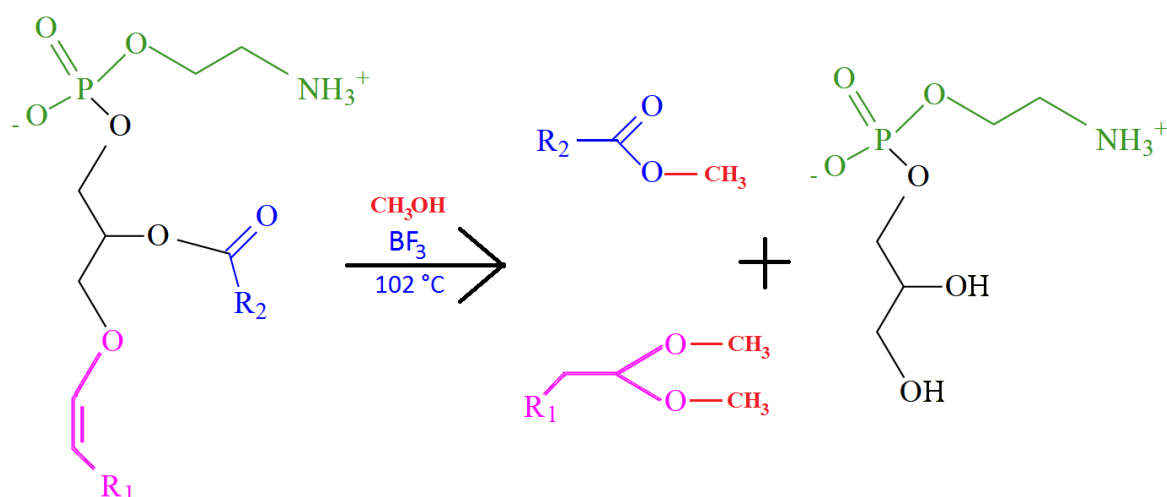


Figure 13 : Trans-éthérification d'une molécule de plasmalogène.

(Noir : glycérol, Vert : Phosphoéthanolamine, Bleu : Acide gras/ME, Rose : Alcool vinylique gras/DMA).

À l'extrait obtenu précédemment, est additionné 500 µL de trifluorure de bore (BF₃) à 14 % dans du méthanol. Ce BF₃ est un acide de Lewis qui nécessite une température supérieure à 100 °C pour être actif. Après 90 minutes, les acides gras des glycérophospholipides sont convertis en esters méthyliques (ME) alors que les plasmalogènes (alcools gras vinyliques) sont dérivés en diméthylacétals (DMA). La réaction est ensuite bloquée en plongeant les tubes dans de la glace puis l'acide de Lewis est neutralisé avec 1,5 mL d'une solution à 10 % de carbonate de potassium (K₂CO₃). La dernière étape avant l'analyse en GC-FID, consiste à extraire les

dérivés méthylés par 2 mL d'isooctane et de les concentrer par évaporation sous azote pour obtenir un volume final de 100 μ L.

2.4.3.3. Analyse et quantification

L'analyse et la quantification des plasmalogènes ont été réalisées par chromatographie gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID).

Un microlitre d'extrait est injecté dans la colonne capillaire du chromatographe. Il est entraîné par un gaz vecteur : de l'hélium à 0,794 bars de pression et avec un débit de 1,1 mL par minute. Les dérivés méthylés seront séparés en fonction de leur taille et de leur polarité respective. La température du four où se situe la colonne varie de façon séquentielle : elle est maintenue à 50 °C pendant 2 minutes puis augmente jusqu'à 140 °C à raison de 20 °C par minute puis jusqu'à 240 °C à raison de 2 °C par minute. Les différents composés élués sont reconnus en sortie de colonne grâce à un détecteur à ionisation de flamme dont la température est fixée à 250 °C. Les esters méthyliques des acides gras et les DMA sont identifiés par leur temps de rétention et quantifiés grâce aux deux standards internes additionnés avant l'extraction des lipides totaux. Les temps de rétention des analytes d'intérêts sont indiqués dans le tableau ci-dessous.

Tableau 8 : Temps de rétention des dérivés méthylés d'intérêts.

Analyte	Temps de rétention (minutes, secondes)
C16:0 DMA	17'70''
C16:0 ME	19'40''
C18:0 DMA	22'40''
C18:0 ME	24'40''
C17:0 ME	21'80''

Les valeurs de plasmalogènes sont exprimées en quantité relative de dérivés DMA par rapport aux dérivés ME (C16:0DMA / C16:0ME). Ces rapports sont calculés à la fois pour les plasmalogènes à 16 et à 18 carbones. Par ailleurs, l'expression sous forme de rapports permet de normaliser les résultats ainsi que de nous affranchir et/ou d'éviter de contrôler certains biais (par exemple la quantité de cellules présente dans chaque culot cellulaire).

3. Résultats

Les données cliniques et biologiques de nos patients sont détaillées en annexe. (**Annexe 1** à **Annexe 3**).

3.1. Résultats généraux de l'analyse du gène *PEX7*

Sur les treize patients du premier groupe, nous avons identifié le génotype complet de neuf patients, nous permettant ainsi de diagnostiquer le déficit en Pex7p. Six patients sont homozygotes (nommés **LAU**, **RAM**, **SIM**, **VIE**, **BOU**, **EZZ**) et trois sont hétérozygotes composites (nommés **MOS**, **MAI**, **CHE**). Nous n'avons pas trouvé de mutations chez trois de nos patients (nommés **KUR**, **VER**, **BON**) et un seul allèle muté a été identifié chez le patient **MEY**. Enfin, les deux couples de parents étudiés sont porteurs à l'état hétérozygote de l'anomalie génétique retrouvée chez leur enfant respectif (**BOU** et **EZZ**).

Dans le groupe rassemblant les six fœtus suspectés d'être atteints de CDRP, nous avons identifié chez un seul fœtus (nommé **GUI**) une anomalie dans le gène *PEX7*. Celle-ci a été retrouvée à l'état homozygote. Nous n'avons pas trouvé d'anomalie chez les cinq autres fœtus (**KLE**, **MAN**, **DIA**, **GUE**, **GIO**).

Les résultats pour l'ensemble des patients sont résumés dans le **Tableau 9** (page 89).

3.2. Résultats du groupe 1 : patients avec suspicion de CDRP-1

3.2.1. Identification de deux allèles pathogènes pour les neuf patients suivants: **LAU, RAM, SIM, VIE, BOU, EZZ et MOS, MAI, CHE**

- **Patiente LAU**

La patiente **LAU** est le deuxième enfant d'un couple non consanguin. Elle est née à 38 semaines d'aménorrhée et elle présente un retard de croissance majeur. En effet, sa taille et son périmètre crânien sont inférieurs au premier percentile, et son poids au vingtième. Le bilan morphologique met en évidence une dysmorphie faciale avec une racine du nez aplatie, des sourcils marqués et une limitation de l'ouverture mandibulaire. Le cou et le thorax sont petits. Les membres sont raccourcis, essentiellement au niveau des fémurs et humérus. Il existe par ailleurs, une raideur articulaire avec limitation des flexions et impossibilité d'extension complète des membres. Les radiographies dévoilent la présence de multiples

calcifications intra- et extra-articulaires du bassin, des épiphyses et des grosses articulations. Ce bilan montre également la présence d'anomalies du modelage des métaphyses des os longs, une luxation bilatérale des hanches, un *genu valgum* bilatéral ainsi que la présence de fentes coronales intéressant l'ensemble des vertèbres thoraciques. À l'examen neurologique, l'enfant est geignarde et son regard n'accroche pas. L'échographie trans-fontanelle retrouve une dilatation globale du système ventriculaire. Par ailleurs, l'échographie abdominale met en évidence une atrésie incomplète de l'intestin grêle. Il n'y a pas de détresse respiratoire ni d'atteinte cardiaque particulière. Enfin, l'examen du fond d'œil a découvert une cataracte totale et bilatérale.

Le bilan peroxysomal initié est peu informatif. L'acide phytanique est indétectable dans le plasma et la mesure de l'activité résiduelle de la DHAP-AT sur fibroblastes indique une diminution d'environ 80 %.

Par la suite, l'état de l'enfant va rapidement se dégrader et le décès interviendra à 3,5 mois de vie, dans un contexte de détresse neurologique accompagnée de pauses respiratoires itératives.

L'étude en biologie moléculaire a mis en évidence une mutation à l'état homozygote sur le site d'épissage donneur de l'exon 9 (**c.903+1G>C / IVS9+1G>C**) (**Figure 14**).

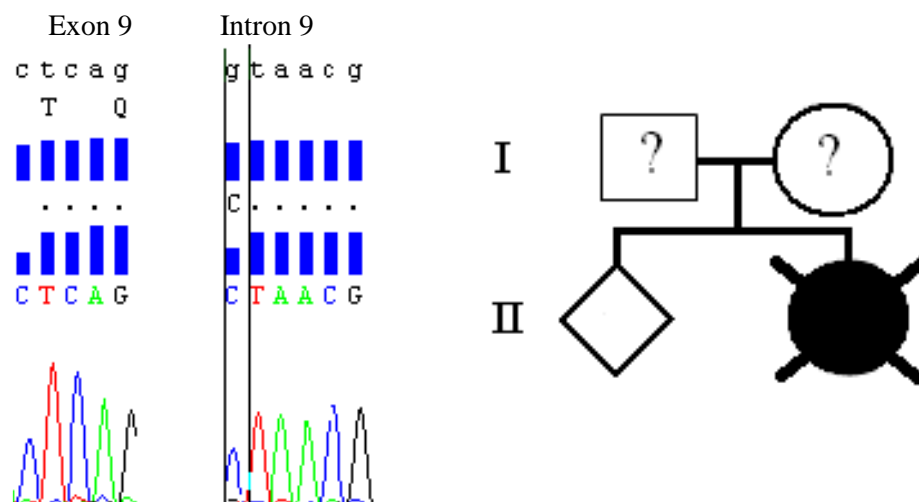


Figure 14 : Allèles pathogènes retrouvés chez la patiente LAU.

- **Patiente RAM**

RAM est un nouveau-né de sexe féminin. Elle a été hospitalisée à l'hôpital de NECKER à Paris. Elle serait atteinte d'une chondrodysplasie ponctuée apparemment de type non rhizomélique.

Dans le bilan biochimique, la recherche de pathologies peroxysomales a été réalisée uniquement sur fibroblastes en culture. Le profil des AGTLC ne montre pas d'anomalie. L'activité résiduelle de la DHAP-AT, mesurée à 40 %, est partiellement déficiente. La biosynthèse *de novo* des plasmalogènes est très réduite. La recherche de thiolase pTH1 par technique d'immunoblot montre l'absence de protéines matures.

Lors de notre étude du gène *PEX7*, une duplication de huit nucléotides dans l'exon 1 a été retrouvée à l'état homozygote chez cette patiente (**c.45_52dup8GGGACGCC**, **Figure 15**). Elle se situe à 19 nucléotides en aval de deux potentiels codons d'initiation « start » et entraîne un décalage du cadre de lecture avec apparition d'un codon stop au 35^{ème} nucléotide suivant (**p.His18ArgfsX35**).

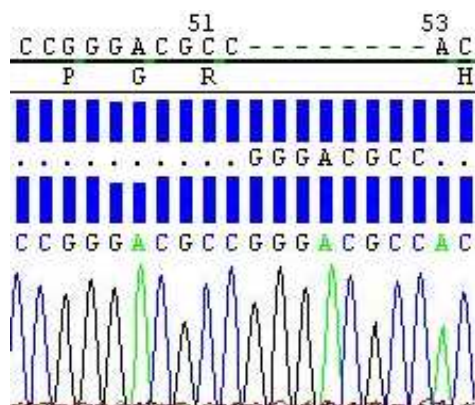


Figure 15 : Allèles pathogènes retrouvés chez la patiente **RAM**.

- **Patient SIM**

SIM est un nouveau-né âgé de 15 jours. Ses deux parents sont cousins germains et d'origine turque. Il a un frère de 2 ans en parfaite santé. **SIM** est un bébé de petite taille qui présente une dysmorphie faciale assez nette. Les fentes palpébrales sont étroites, les oreilles basses, le *philtrum* long et la fontanelle est petite. L'enfant n'a pas de contact visuel à cause d'une cataracte bilatérale mais il répond aux *stimuli* auditifs. Il est très algique et présente des lésions articulaires multiples atteignant principalement les genoux et les hanches. Les membres supérieurs, les épaules et les coudes sont de bonne mobilité. Cependant, les poignets et les inter-phalangiennes proximales des doigts longs sont extrêmement enraidies. Ce patient est atteint d'une forme sévère d'arthrogrypose. La radiographie osseuse retrouve des fémurs et des humérus courts avec des épiphyses ponctuées. Le pronostic fonctionnel et vital est très sombre. En effet, cet enfant décèdera à 13 mois de vie avec un tableau d'encéphalopathie.

Le bilan biochimique du patient **SIM** indique une activité de la DHAP-AT équivalente à 64 % du témoin. Le dosage des plasmalogènes sur fibroblastes indique un déficit important.

L'étude en biologie moléculaire a révélé chez ce patient la mutation **c.922G>T** à l'état homozygote dans l'exon 10 (**Figure 16**). Elle correspond à l'allèle **p.Asp308Tyr** qui n'a jamais été décrit auparavant.

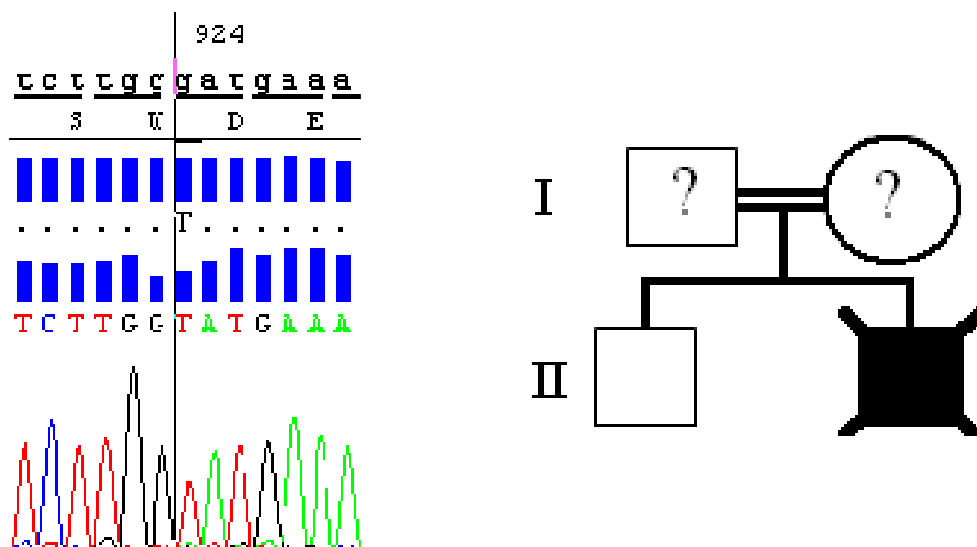


Figure 16 : Allèles pathogènes retrouvés chez le patient **SIM**.

- **Patient VIE**

VIE est le petit garçon de parents consanguins et originaires de l'île de la Réunion. Âgé de trois ans, il est porteur d'un syndrome poly-malformatif associant microcéphalie, nanisme prédominant au niveau des membres proximaux, anomalies épiphysaires avec calcifications et raideurs articulaires. Les médecins ont noté la présence d'un syndrome pyramidal avec des convulsions et un retard psychomoteur sévère. Ce patient présente également une cataracte bilatérale.

Le bilan biochimique montre sur lymphoblastes en culture, un profil d'AGTLC subnormal avec un taux de C26:0 et des rapports C26:0/C22:0 et C24:0/C22:0 très légèrement élevés. La biosynthèse *de novo* des plasmalogènes est abaissée. Ce résultat est en accord avec les faibles taux mesurés dans le plasma, les érythrocytes et les fibroblastes. L'activité résiduelle de la DHAP-AT mesurée sur fibroblastes est partiellement déficiente, environ 40 % par rapport au témoin. L'activité de la phytanate oxydase est nulle. Nous retrouvons en effet, un taux plasmatique d'acide phytanique élevé. La β -oxydation du lignocérate est normale. Enfin, l'immunoblot met en évidence uniquement la forme précurseur de la thiolase pTH1.

Ce petit garçon est décédé il y a quelques années des suites de sa maladie. Nous n'avons pas d'autres précisions.

Nous avons identifié une mutation faux-sens homozygote dans l'exon 7 (**c.653C>T**). L'acide aminé valine vient remplacer l'alanine (**p.Ala218Val**).

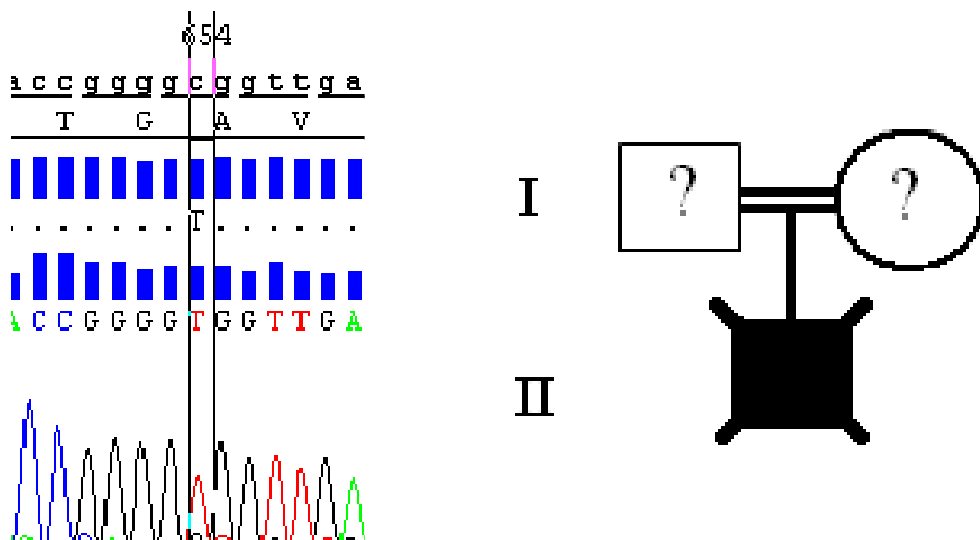


Figure 17 : Allèles pathogènes retrouvés chez le patient **VIE**.

- **Patient BOU**

BOU est un petit garçon nord-africain. Il est né à terme dans un contexte de détresse respiratoire. Il est le premier enfant de parents d'origine tunisienne et qui sont cousins germains. Nous notons comme antécédents familiaux, une sœur maternelle porteuse d'un syndrome malformatif touchant essentiellement les membres. L'étiologie de ce syndrome n'a pas été identifiée.

La grossesse était suivie en diagnostic anténatal pour suspicion d'ostéo-chondrodysplasie sur les arguments d'anomalies des os longs. À la naissance, les radiographies présentées en **Figure 18** et **Figure 19**, ont confirmé une ostéo-chondrodysplasie ponctuée, prédominante aux ceintures et associée à une déformation très importante des extrémités (doigts en coup de vent et pieds en piolets).

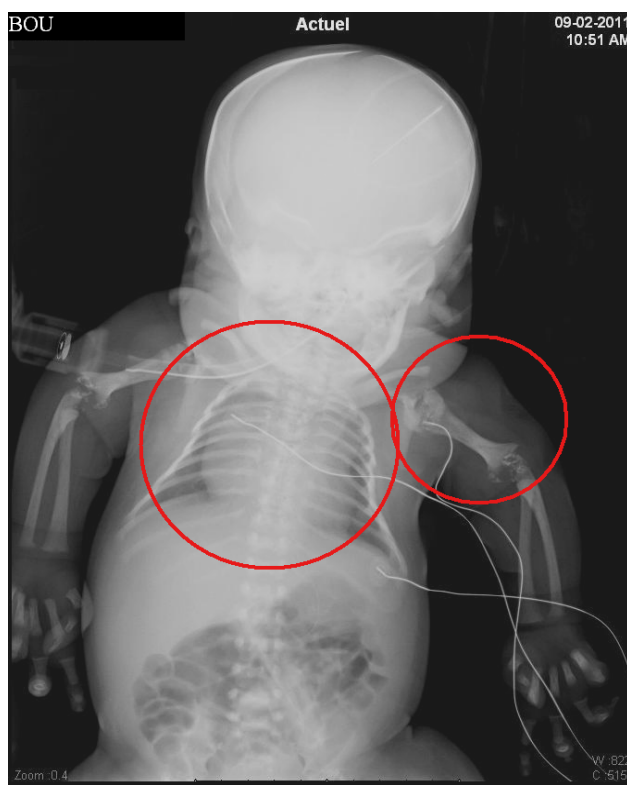


Figure 18 : Radiographie à la naissance du patient **BOU**, partie supérieure du corps.
Petite cage thoracique, humérus court et atteinte de la ceinture scapulaire.

Il y a également un raccourcissement des membres supérieurs, essentiellement au niveau proximal. Cette déformation est majeure et bilatérale. Les membres inférieurs sont affectés avec un raccourcissement des cuisses et un aspect ponctué des têtes fémorales. Cet aspect ponctué, correspondant à des calcifications, est retrouvé au niveau des épaules, des coudes, des genoux, des fémurs et des humérus, du rachis et des hanches, lesquelles se présentent luxées bilatéralement. Par ailleurs, bien que symétrique, le thorax apparaît très petit et étroit

provoquant une hypoplasie pulmonaire. Le dos ne montre pas de déformations particulières et il n'y a pas de malformations cardiaques. Il existe de volumineuses hernies inguinales bilatérales, enfouissant une verge hypospade limitée au prépuce. L'aspect cutané est normal. Le retard de croissance est important, la taille étant inférieure à 7 déviations standards.

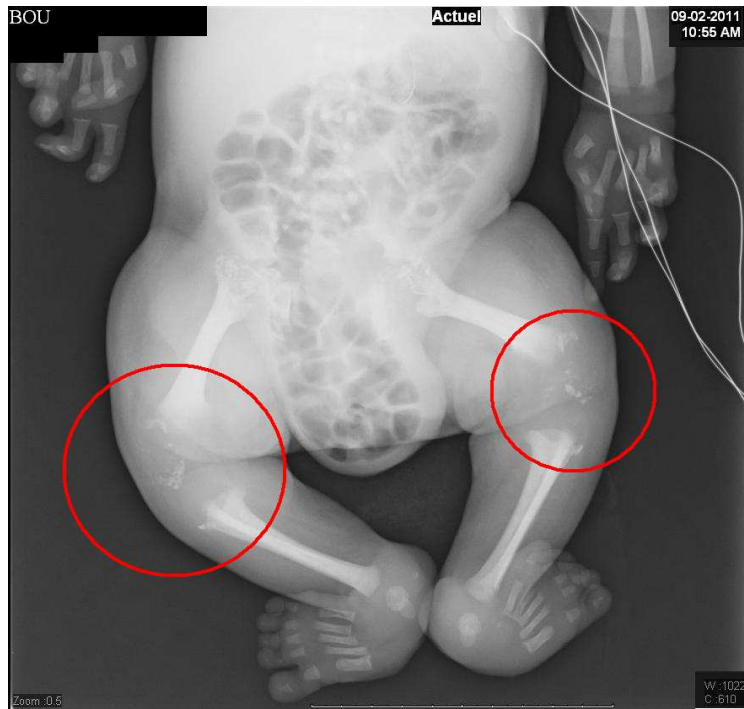


Figure 19 : Radiographie à la naissance du patient **BOU**, partie inférieure du corps. Hernie inguinal, pieds piolets, calcifications épiphysaires et atteinte de la ceinture pelvienne.

Après l'accouchement, l'enfant était hypo-réactif, sans ouverture spontanée des yeux. Il ne présentait pas d'activités respiratoires efficaces, ce qui engageait le pronostic vital. L'état très algique a nécessité l'instauration d'un traitement par chlorhydrate de morphine et paracétamol dès le premier jour de vie. L'électroencéphalogramme pathologique indiquait une mauvaise organisation des rythmes cérébraux. Les médecins ont souligné par ailleurs, la présence d'une importante cataracte blanche, totale et bilatérale.

Devant ce tableau très sévère, une recherche de maladies peroxysomales a été prescrite. Sur le bilan plasmatique, le profil des AGTLC était normal, ainsi que les acides phytanique, pristanique et pipécolique. Le dosage des plasmalogènes érythrocytaires montrait un taux très abaissé. L'activité de la DHAP-AT dans les fibroblastes était réduite de près de 75 % par rapport au témoin. La recherche d'anomalies du métabolisme du cholestérol n'a rien retrouvé.

Cet enfant décèdera à 28 jours de vie suite à une défaillance respiratoire aigue sur fond d'insuffisance respiratoire chronique.

L'étude du gène *PEX7* a révélé la présence de deux allèles mutés à l'état homozygote dans l'exon 1 (**Figure 20**). Il s'agit de la duplication d'une base thymidine en position 100 (**c.100dupT**). Cette anomalie génétique n'a jamais été décrite auparavant. D'après le logiciel Alamut, elle est rapportée comme étant pathogène. En effet, elle crée un décalage du cadre de lecture à partir du codon 34 codant pour une cystéine. Ce nouveau cadre de lecture se termine par un codon stop, 21 acides aminés en aval (**p.Cys34LeufsX22**).

Le cas de ce patient étant récent et afin de pouvoir délivrer un conseil génétique, nous avons effectué une étude de ségrégation de cette mutation chez ses parents.

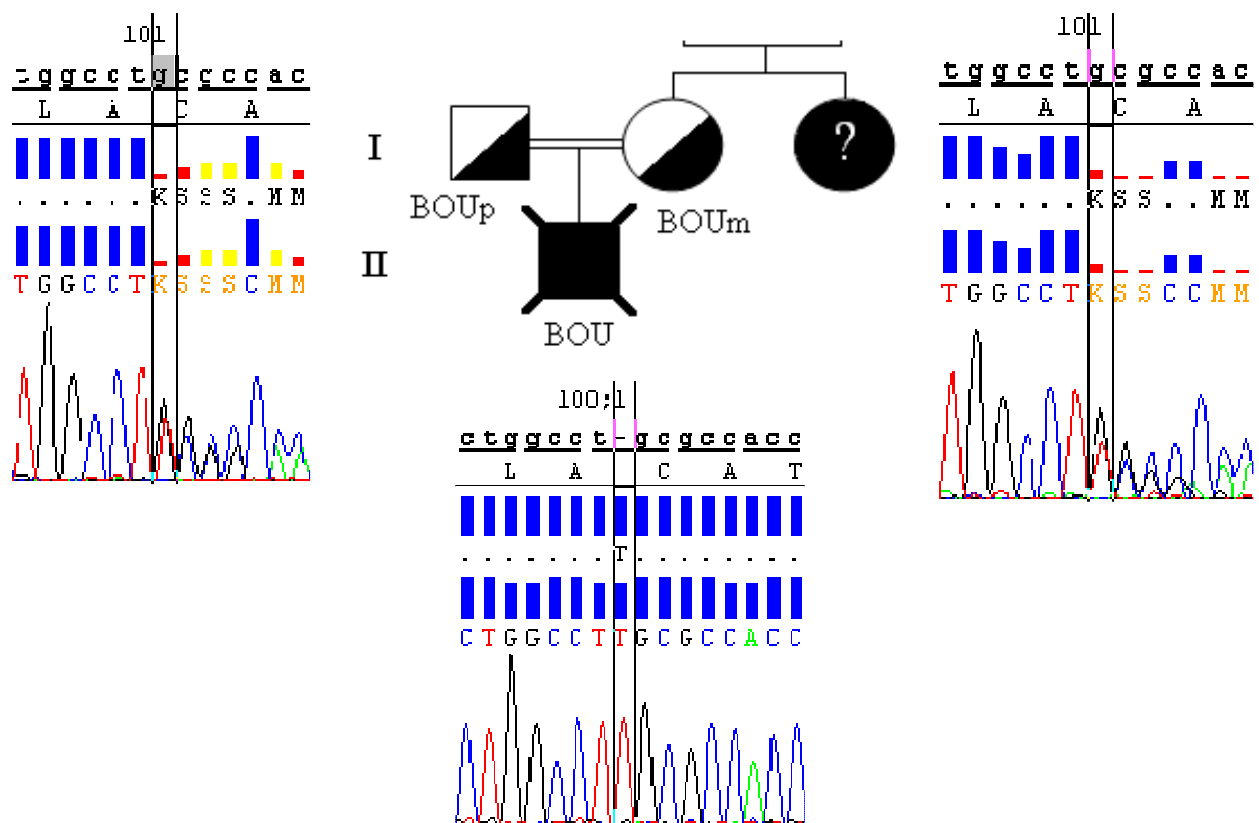


Figure 20 : Résultats de l'étude familiale du patient **BOU**.
BOUp et **BOUm** sont respectivement le père et la mère du patient **BOU**.

Les parents de ce patient sont tous les deux hétérozygotes pour la mutation **c.100dupT**. L'analyse en biologie moléculaire du gène *PEX7* chez la sœur de **BOUm** pourrait probablement poser le diagnostic de sa maladie.

- **Patiente EZZ**

EZZ est une petite fille née d'un couple de cousins germains d'origine marocaine. Elle a subi pendant la grossesse une amnio-infusion, du fait de l'existence d'un retard de croissance intra-utérin entraînant un oligoamnios. Elle est née après une césarienne en urgence suite à une bradycardie fœtale, huit semaines avant le terme de la grossesse. Cette enfant a présenté de suite, une détresse respiratoire pour laquelle elle a été intubée et ventilée. Le retard de croissance est marqué à la naissance par une taille inférieure à 4 déviations standards et un poids à moins 2 déviations standards par rapport au terme. Le profil est dysharmonieux avec un raccourcissement rhizomélique prédominant aux membres supérieurs et un pied droit en *varus* équin. Nous notons également la présence de contractures articulaires, prédominantes aux grosses articulations et aux membres inférieurs ainsi qu'un important syndrome algique. Le syndrome dysmorphique est marqué par un hypertélorisme, c'est-à-dire une malformation crânio-faciale avec agrandissement de la petite aile du sphénoïde, entraînant un élargissement de la distance inter-orbitaire et de la racine du nez. Cette patiente a également une fontanelle antérieure large, un *philtrum* long avec une lèvre supérieure très fine, une petite bouche et une ensellure nasale déprimée. Radiologiquement, nous retrouvons des calcifications articulaires au niveau fémoral supérieur, du bassin et des rotules. Les humérus et fémurs sont très déformés. Enfin, le bilan de naissance a mis en évidence une cataracte bilatérale.

Devant ce tableau clinique, un bilan peroxysomal a été effectué. Le profil plasmatique des AGTLC est normal. La mesure du taux de plasmalogènes dans des cellules amniotiques conservées en culture indique un important déficit, de même que dans les érythrocytes. La mesure de l'activité de la DHAP-AT sur amniocytes cultivés n'a pas montré de déficit particulier.

L'évolution s'est faite vers une dégradation de l'état respiratoire suivi du décès de l'enfant deux mois après sa naissance.

L'étude du gène *PEX7* a révélé la présence de deux allèles mutés à l'état homozygote dans l'exon 1. L'anomalie est présentée dans la **Figure 21** et elle est identique à celle du patient **BOU**, soit, une duplication d'une base thymidine en position 100 (**c.100dupT**). Un nouveau cadre de lecture apparaît. Il se termine par un codon stop, 21 acides aminés en aval (**p.Cys34LeufsX22**).

Le cas de cette patiente étant récent, nous avons effectué l'étude du gène *PEX7* chez ses parents, afin de pouvoir leur délivrer un conseil génétique.

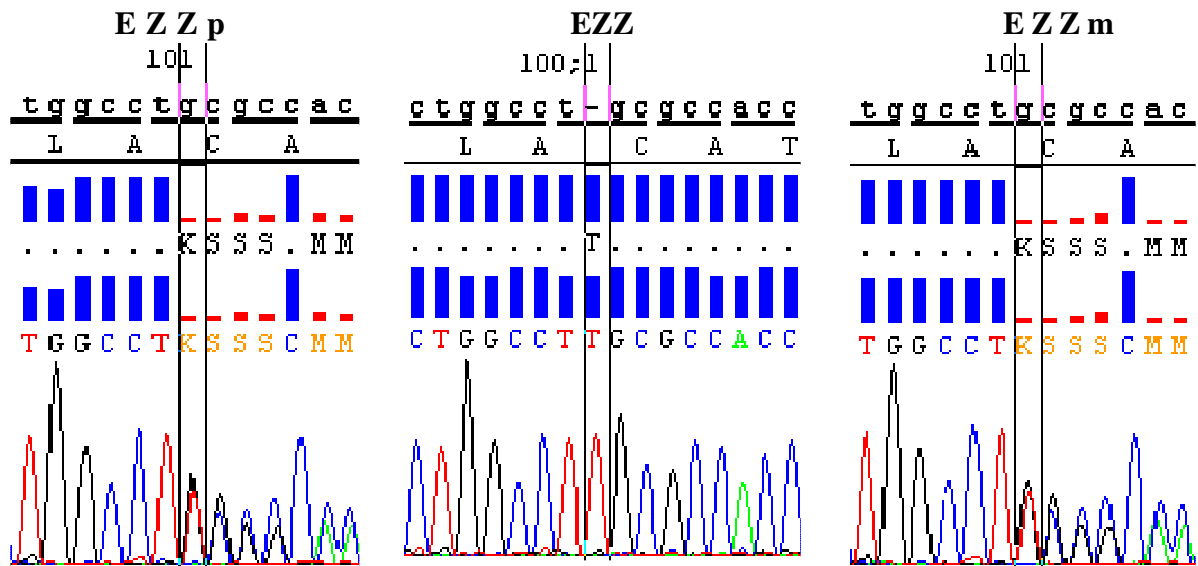


Figure 21 : Résultats de l'étude familiale de la patiente **EZZ**.
EZZp et **EZZm** sont respectivement le père et la mère de la patiente **EZZ**.

Les parents de cette patiente sont tous les deux hétérozygotes pour la mutation **c.100dupT**. En terme de conseil génétique, il serait très intéressant d'étendre l'étude du gène *PEX7* à l'ensemble de cette famille. En effet, il existe une même boucle de consanguinité (**Figure 22**) dans laquelle le frère de madame **EZZm** et la sœur de monsieur **EZZp** ont ensemble cinq enfants bien-portants.

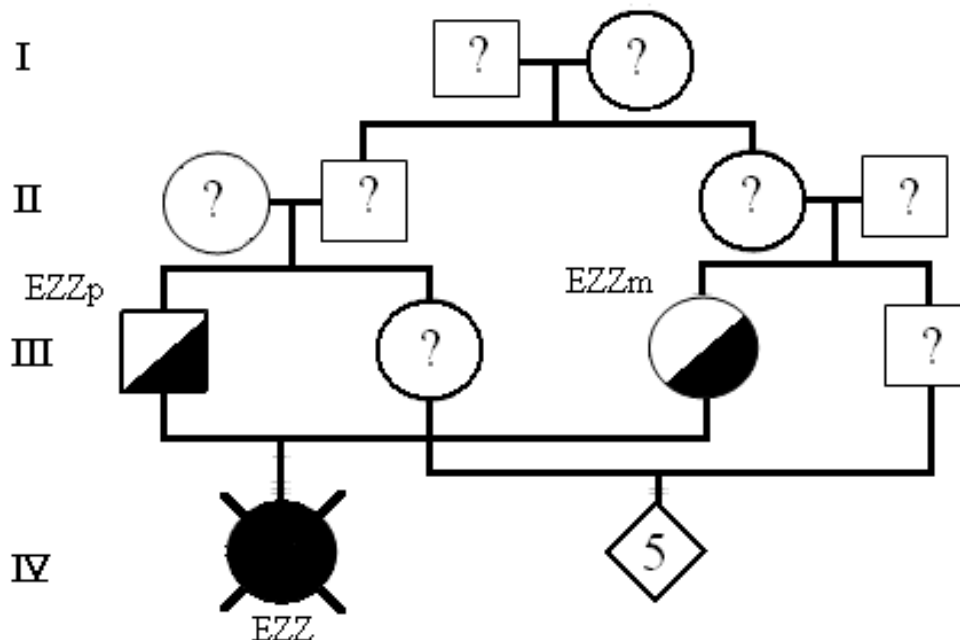


Figure 22 : Arbre génétique de la famille de la patiente **EZZ**.

- **Patient MOS**

MOS est un petit garçon originaire de l'île de la Réunion. Ces deux parents ne présentent pas de liens de parenté et ont deux autres enfants en bonne santé. Le bilan morphologique retrouve une dysmorphie faciale avec une ensellure nasale effondrée, un petit nez, des oreilles larges et dysplasiques et un front extrêmement bombant. Sur les radios, les ponctuations épiphysaires sont nombreuses et localisées principalement au voisinage des épiphyses supérieures humérales et fémorales, mais également au niveau de la rotule et le long du rachis. Les humérus et fémurs sont courts et massifs. Par ailleurs, il existe des anomalies vertébrales avec présence de fentes et des corps vertébraux remaniés. De plus, ce garçon présente une cataracte bilatérale.

Devant ce tableau clinique typique de CDRP, une exploration biochimique de maladies peroxysomales a été prescrite. Une élévation du taux plasmatique de l'acide phytanique et un dosage nul en plasmalogènes érythrocytaires ont été retrouvés. Ce taux de plasmalogènes a été confirmé sur fibroblastes en culture. L'activité résiduelle de la DHAP-AT est de 44 %.

Quatre mois après sa naissance, cet enfant a été hospitalisé pour une bronchio-alvéolite à virus respiratoire syncytial avec surinfection à *Haemophilus* spp. Pour le soulager, une ventilation assistée a dû être mise en place. Ce garçon est décédé quelques semaines plus tard. Trois ans après, sa mère a donné naissance à un enfant présentant la même symptomatologie peroxysomale. Il décédera à quelques mois de vie.

Chez ce patient, l'étude en biologie moléculaire a permis d'identifier deux mutations différentes se succédant dans le même exon : exon 7. Il s'agit d'abord d'une duplication de la base thymidine en position 683 (**c.683dupT**) provoquant un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop, neuf acides aminés en aval (**p.Leu228PhefsX10**). Cette anomalie est suivie après 61 nucléotides d'une délétion de la base adénosine en position 745 (**c.745delA**) et provoquant elle aussi un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop, 18 acides aminés en aval (**p.Lys249Asnfs19**). Ce patient est donc un hétérozygote composite (**Figure 23**).

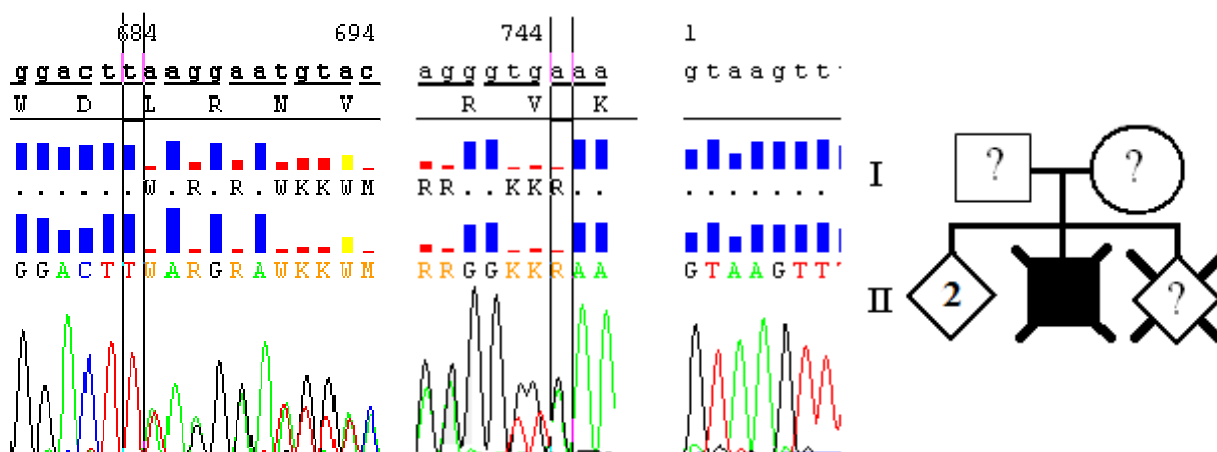


Figure 23 : Allèles pathogènes retrouvés chez le patient MOS.

- **Patient MAI**

MAI est le premier enfant de parents non consanguins et sans antécédents familiaux particuliers. C'est un petit garçon dont l'histoire clinique commence au troisième trimestre de grossesse de sa mère par des métrorragies et une sensation de diminution de mouvements actifs fœtaux. Ce bébé présente une chondrodysplasie calcifiante ponctuée de type rhizomélique. Cliniquement, il est atteint d'arthrogrypose et d'une cataracte totale bilatérale. Il présente des signes neurologiques objectivés à l'IRM cérébrale par des troubles de la myélinisation. Il est algique et n'a pas de troubles viscéraux, ni cardiaques ou rénaux.

Un premier bilan biochimique a été réalisé au CHU de Toulouse. Il montre que le profil plasmatique des AGTLC est normal. Les taux plasmatiques des acides phytanique et pristanique sont également normaux. Par contre, le taux érythrocytaire de plasmalogènes est très fortement abaissé.

Actuellement ce garçon a 12 ans, il pèse 9,9 kg pour une taille de 100 cm. Il développe une scoliose avec majoration rapide. Il a des otites à répétition et des troubles du transit à type de constipations et de vomissements redondants. Il est grabataire et vit dans un institut médico-éducatif. Un bilan de suivi a été réalisé aux Hospices Civils de Lyon. Il montre un taux plasmatique d'acide phytanique élevé à 34,1 μM (Valeurs usuelles : 0,1 – 10,0 μM) et un taux d'acide pristanique normal. Une étude sur fibroblastes a permis de montrer un profil d'AGTLC normal et une activité de la DHAP-AT non totalement déficitaire (40 % par rapport au témoin). La β -oxydation du lignocérate est normale, ce qui confirme l'absence de pathologie affectant la β -oxydation peroxysomale. La biosynthèse *de novo* de plasmalogènes a été étudiée lors de notre essai de dosage des plasmalogènes. Elle est apparue déficiente (**Tableau 10**).

L'étude en biologie moléculaire a dévoilé une première mutation sur le site d'épissage donneur de l'exon 9 (**c.903+1G>C / IVS9+1G>C**). La mutation **c.653C>T (p.Ala218Val)** est la deuxième identifiée chez ce patient, qui est donc un hétérozygote composite (**Figure 24**). Elle se situe dans l'exon 7.

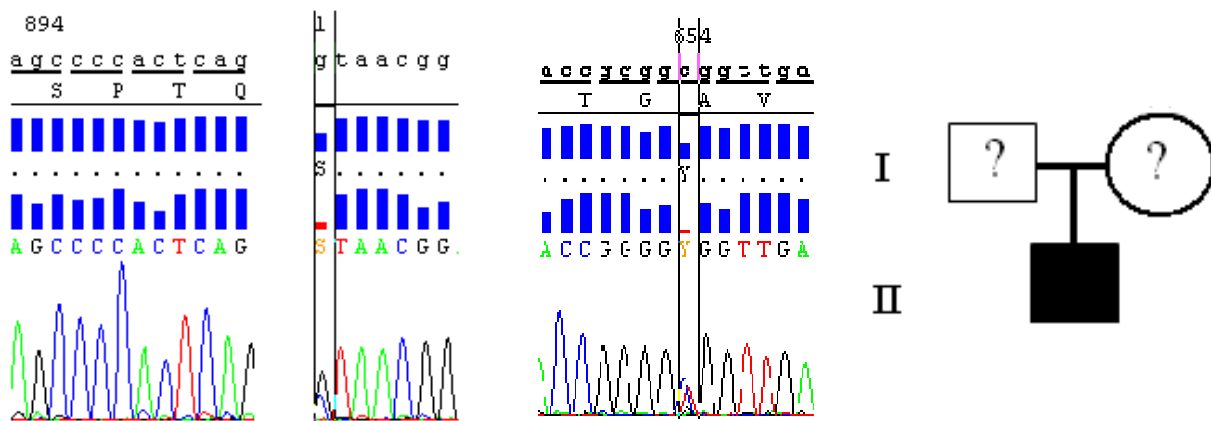


Figure 24 : Allèles pathogènes retrouvés chez le patient **MAI**.

- **Patiente CHE**

La patiente **CHE** est une enfant née à terme et qui ne présentait aucun retard de croissance. Son frère est en parfaite santé. Leur parent ne présente pas de consanguinité. Toutefois, leur mère a fait une fausse couche entre ces deux grossesses et un des oncles présente une surdité unilatérale.

À l'âge de 4 mois, une cataracte congénitale bilatérale a été diagnostiquée puis a ensuite été opérée. À 2 ans, cette patiente a été vue en consultation de neuro-pédiatrie pour un retard de développement psychomoteur évalué à 9 mois. Elle se déplace sur les fesses et a un langage monosyllabique. Elle ne paraît pas avoir de perturbation psychoaffective. Ses mensurations le jour de la consultation sont dans des valeurs tout à fait normales. Son examen neuro-moteur fait apparaître une hypertonie des abducteurs de hanches et à degré moindre, une hypertonie des chevilles. Le bilan morphologique montre des oreilles décollées dans la partie supérieure avec un ourlage un peu particulier. Par ailleurs, il n'y a pas de signes cardiaques particuliers et le rachis est normal. Une radiographie osseuse est réalisée un an après la consultation de neuro-pédiatrie. Elle fait découvrir une importante dysplasie des têtes fémorales qui pourrait être la conséquence de calcifications ponctuelles du cartilage hyalin. Une atteinte rhizomélique n'a pas été retrouvée.

Le bilan peroxysomal montre au niveau plasmatique, des taux d'AGTLC élevés de façon très modérée, d'acide pristanique normal et d'acide phytanique très élevé. Au niveau

érythrocytaire, le taux de plasmalogènes est subnormal. L'étude de la β -oxydation peroxysomale du lignocérate sur fibroblastes rend compte d'une activité normale. L'activité de la DHAP-AT est abaissée à 34 % par rapport au témoin.

À l'heure actuelle cette enfant à 12 ans et 6 mois. Elle ne présente aucunes évolutions neuropsychologiques et reste très fixée. L'évolution staturo-pondérale est marquée par un poids à moins 2,5 déviations standards (DS) et une taille à moins 1 DS. Une échocardiographie de contrôle a montré l'apparition d'un anévrisme du septum membraneux.

Notre étude du gène *PEX7*, a mis en évidence chez cette patiente, deux mutations différentes. Elle est donc hétérozygote composite. La première mutation (**Figure 25**) est une grande duplication de 42 nucléotides dans l'exon 7 (**c.646_687dup42nt / p.Thr216_Arg229dup14**) sans décalage du cadre de lecture.

La deuxième mutation (**c.854A>G**) provoque la substitution d'une histidine par une arginine (**p.His285Arg**) dans l'exon 9 (**Figure 25**).

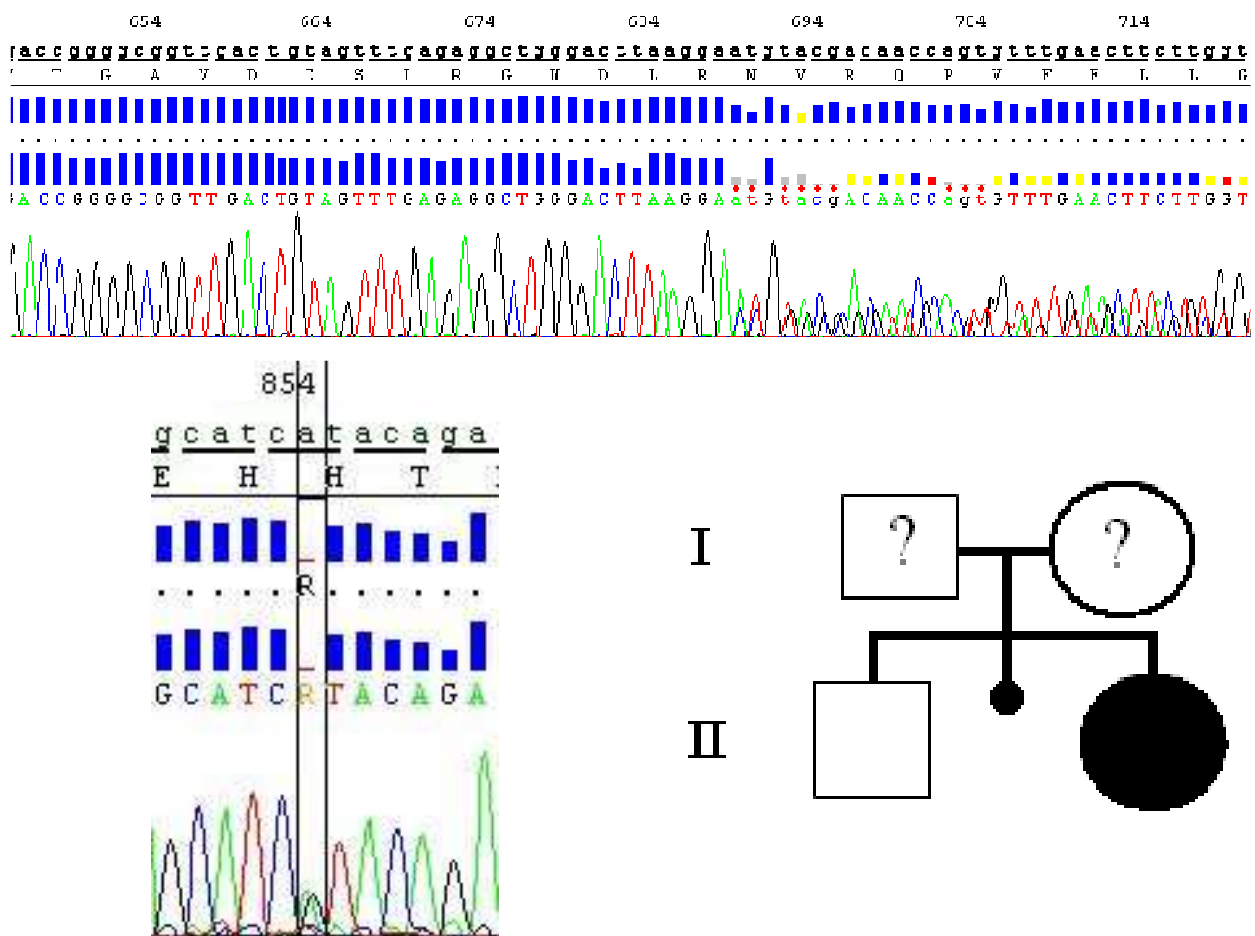


Figure 25 : Allèles pathogènes retrouvés chez la patiente **CHE**.

3.2.2. Identification d'un seul allèle pathogène chez le patient MEY

- **Patient MEY**

Le patient **MEY** est né à 36 SA (semaines d'aménorrhée) dans un contexte de détresse respiratoire. Il est de sexe masculin et il est le deuxième enfant d'un couple non apparenté. À sa naissance, il présentait une clinique de type CDRP. Les principales anomalies morphologiques retrouvées sont un raccourcissement des os des bras et des jambes, essentiellement au niveau proximal. Il y a aussi un dysmorphisme facial marqué par un front proéminent, une microcéphalie, un hypertélorisme avec des yeux enfoncés et une microphthalmie. L'ensellure nasale est prononcée et l'ouverture de la bouche difficile. À la radiographie, nous retrouvons une irrégularité des corps vertébraux cervicaux associée à des calcifications ponctiformes. Au niveau du squelette périphérique, les fémurs et humérus sont courts, leurs épiphyses supérieures et inférieures sont ponctuées et les régions métaphysaires adjacentes sont remaniées. Les hanches sont luxées de façon bilatérale, le thorax est rétréci, l'implantation des pouces est basse et les orteils sont en « coups de vent » (**Figure 26**). Les résultats de l'IRM évoquent des lésions de leuco-malacie péri-ventriculaire frontale gauche et une hypoplasie du vermis inférieur. L'enfant présente un retard de croissance et il est atteint d'une cataracte bilatérale. Il décèdera à l'âge de quatre mois.

Le bilan peroxysomal est typique d'une CDRP-1. Le profil plasmatique des AGTLC est normal ainsi que le taux d'acide pristanique. Cependant, le taux d'acide phytanique est élevé. Le taux de plasmalogènes érythrocytaires est bas et l'essai de biosynthèse *de novo* dans les fibroblastes évalue un taux à 10 % par rapport au témoin. L'activité de la DHAP-AT est diminuée de 50 % par rapport au témoin. L'activité de la phytanate oxydase est elle aussi déficiente.

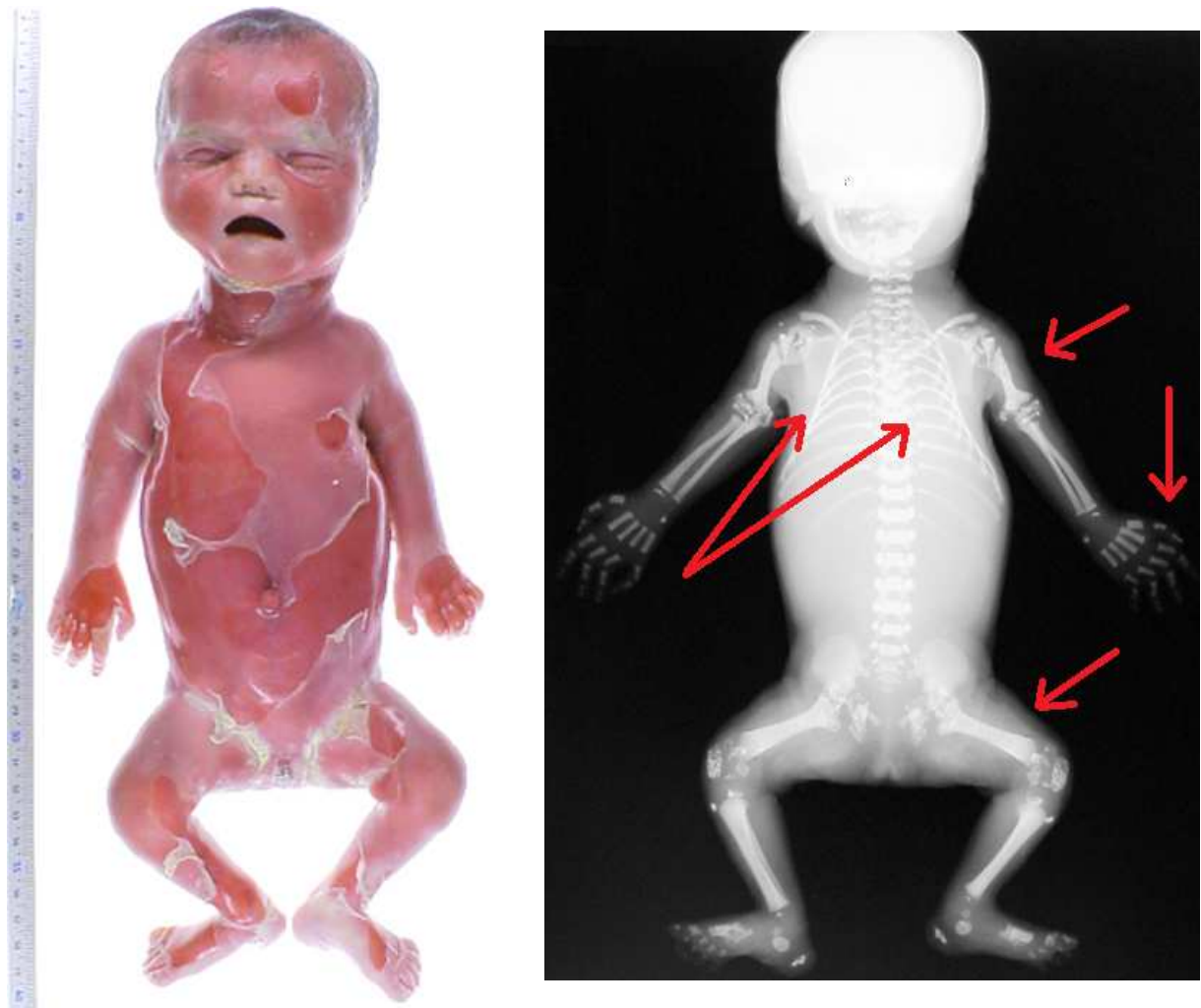


Figure 26 : Photographie et Radiographie du patient MEY.

L'étude en biologie moléculaire n'a pu mettre en évidence qu'une seule anomalie chez ce patient. Elle est présentée en **Figure 27**. Il s'agit d'une mutation non-sens, intervertissant la base thymidine en position 875 par une base adénosine (**c.875T>A**). Le codon TTA est ainsi remplacé par le codon stop TAA (**p.Leu292X**).

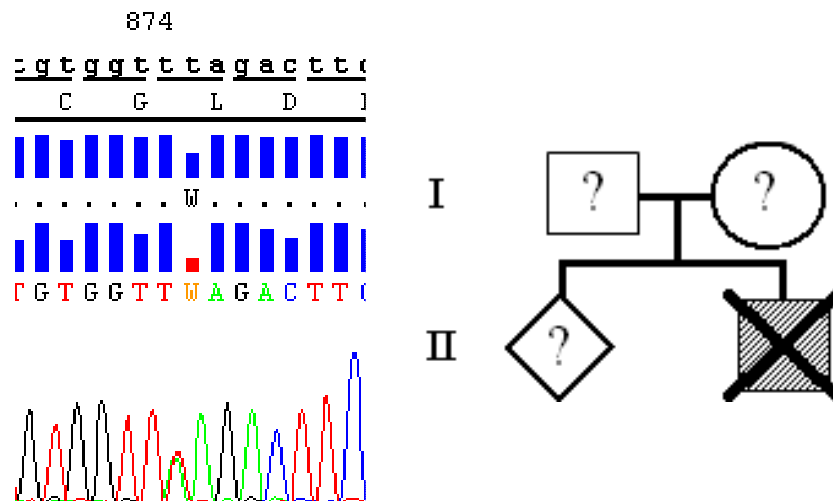


Figure 27 : Seul allèle pathogène retrouvé chez le patient MEY.

3.2.3. Patients sans anomalie détectée dans le gène *PEX7*: KUR, VER et BON

Le profil biochimique ou clinique de ces trois patients est atypique. L'atteinte osseuse est soit absente soit peu caractéristique d'une CDRP et le bilan biochimique ne permet pas d'orienter précisément le diagnostic. L'inclusion de ces patients a été réalisée dans le but d'établir un diagnostic d'exclusion.

- **Patient KUR**

Le patient **KUR** est un petit garçon de deux ans. Il a été hospitalisé afin d'établir le bilan d'un retard psychomoteur modéré, associé à une atteinte sensorielle de type surdité de perception. L'IRM cérébrale présente une atrophie cérébelleuse modérée. L'échographie hépatorénale montre des reins de taille asymétrique et une absence d'anomalie hépatique. Une ataxie statique à la marche, une rétinopathie ainsi que quelques épisodes de convulsions fébriles ont également été mis en évidence. Aucune anomalie osseuse n'a été rapportée.

Le bilan de maladie peroxysomale montre un profil plasmatique des AGTLC normal. Les taux d'acide phytanique et pristanique sont augmentés dans le plasma et le taux de plasmalogènes érythrocytaires est diminué. La mesure sur fibroblastes de l'activité de la DHAP-AT montre une activité normale, à 99 % par rapport au témoin. Celle de l'alkyl-DHAP-S n'a pas encore été réalisée.

- **Patiente VER**

VER est une petite fille de 3 ans issue de parents non consanguins. Elle pèse 11,4 kg pour une taille de 93 cm et un périmètre crânien de 46 cm soit à -2 DS de la normale. Elle présente une encéphalopathie marquée par un retard modéré à sévère des acquisitions. Ce retard s'accompagne de bruxisme, de bavages et d'une spasticité modérée asymétrique. Il y a également une hypotonie axiale contrastant avec une hypertonie des membres. Cette petite fille n'a pas acquis de langage et elle s'exprime par onomatopées et cris. Elle est atteinte d'une hypermétropie et d'un strabisme. L'IRM cérébrale indique un retard de la myélinisation. L'examen radiologique ne donne pas d'argument en faveur d'une dysplasie squelettique, toutefois il existe un léger retard de maturation osseuse.

De nombreuses investigations biologiques ont été menées sans succès. Une étude en Western blot de glycoprotéines sériques a été réalisée et n'est pas en faveur d'un CDG syndrome (Congenital Disorders of Glycosylation) de type I ou IIa. Cette analyse a été complétée par une électrophorèse des glycoprotéines sériques (Apolipoprotéine CIII) qui

n'évoquait pas de trouble de l'O-glycosylation. La recherche d'anomalies des purines et pyrimidines urinaires est négative. Par ailleurs, un bilan peroxysomal a été prescrit afin d'éliminer une adrénoleucodystrophie néonatale. Le profil plasmatique des AGTLC était normal ainsi que le taux d'acide phytanique. Un bilan peroxysomal normal ou modérément perturbé ne pouvant exclure à 100 % une anomalie de biogenèse des peroxysomes, un screening des exons les plus fréquemment mutés des gènes *PEX* a également été effectué. Aucune mutation dans les séquences étudiées n'a été identifiée.

- **Patiente BON**

La patiente **BON** est une petite fille de 3 ans et 6 mois. Le tableau clinique associe un retard psychomoteur global, une microcéphalie, un retard staturo-pondéral avec une atrophie cérébelleuse à l'IRM cérébrale. Sa sœur de 8 ans présente le même retard de développement psychomoteur.

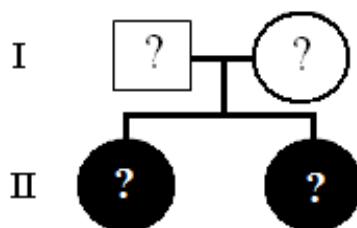


Figure 28 : Arbre génétique de la famille de la patiente **BON**.

Le bilan biologique des maladies peroxysomales fait évoquer un déficit de la biogenèse des peroxysomes. En effet, les taux plasmatiques des acides pipécolique, phytanique et pristanique sont légèrement élevés. Le profil des AGTLC est toutefois normal. La même étude sur fibroblastes a donné des résultats normaux. Le screening des exons les plus fréquemment mutés des gènes *PEX* a donc été réalisé mais il n'a rien mis en évidence.

3.3. Résultats du groupe 2 : fœtus avec signes d'appel échographiques

3.3.1. Identification de deux allèles pathogènes seulement chez le fœtus GUI

- **Fœtus GUI**

GUI est un fœtus féminin originaire de la région rhénane. Ses parents ne sont pas consanguins et ont deux autres enfants bien portants. Le premier examen échographique a découvert un nanisme rhizomélique avec calcification des épiphyses proximales et distales, motivant la réalisation d'un scanner fœtal. À la 26^{ème} SA, ce scanner montre un crâne de volume normal et un faciès aplati. Le rachis est complet avec une fente vertébrale verticale sur l'ensemble des corps vertébraux. Le gril costal est de morphologie normale avec

néanmoins une hypoplasie d'une 12^{ème} côte unilatérale et une agénésie de la 12^{ème} côte controlatérale. Le bassin est normal. Les membres sont symétriques mais présentent un raccourcissement rhizomélique. Au niveau des extrémités humérales et fémorales, nous observons des calcifications, de même au niveau des coudes et de la *patella*, de façon bilatérale. Sur les mains, les doigts sont en flexion et le premier os métacarpien est court. Nous notons enfin, un aspect de *métatarsus adductus* au niveau du premier orteil. Enfin, il existe une calcification anormale du cartilage thyroïdien et de l'os hyoïde.

À l'échographie de la 29^{ème} SA, les paramètres biométriques montrent une longueur fémorale inférieure au 5^{ème} percentile. Le périmètre crânien, le diamètre bipariétal et le diamètre abdominal transverse se situent entre le 10^{ème} et le 50^{ème} percentile. Le périmètre abdominal se situe entre le 50^{ème} et le 95^{ème} percentile. Au niveau viscéral, aucune anomalie n'a été observée.

Un prélèvement de liquide amniotique a permis de montrer un important déficit de l'activité de la DHAP-AT et une biosynthèse des plasmalogènes effondrée. Ce déficit en biosynthèse a été confirmé par nos soins sur amniocytes en culture (**Tableau 10**).

La petite fille est née au terme prévu, dans un contexte de souffrance néonatale aigue et en état de mort apparente, nécessitant un massage cardiaque et une ventilation au masque. Le bilan plasmatique a été réalisé par la suite et ne montre aucune anomalie du profil des AGTLC, ni des acides phytanique et pristanique.

L'étude en biologie moléculaire a montré une mutation à l'état homozygote sur le site d'épissage donneur au niveau de l'exon 9 (**c.903+1G>C / IVS9+1G>C**) (**Figure 29**).

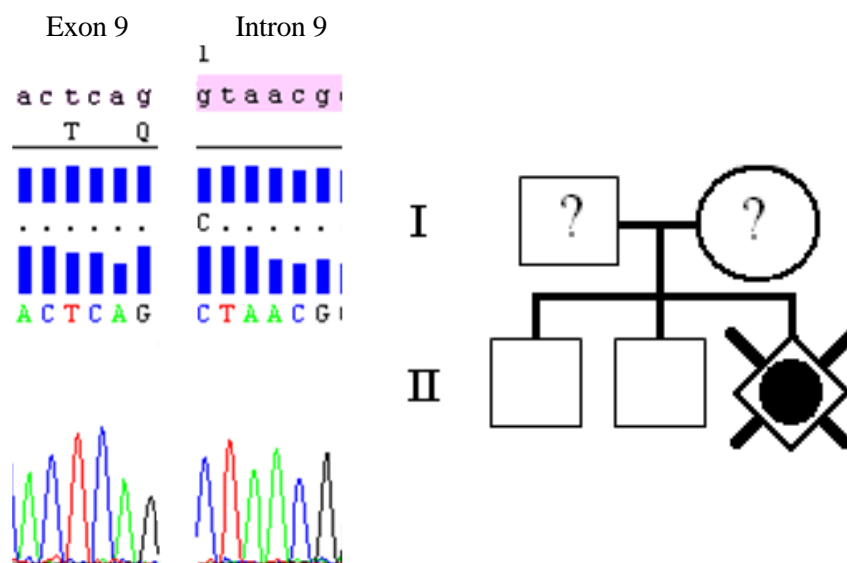


Figure 29 : Allèles pathogènes retrouvés chez GUI.

3.3.2. Fœtus sans anomalie détectée dans le gène *PEX7*: KLE, MAN, DIA, GUE et GIO.

- **Fœtus KLE**

KLE est un fœtus féminin atteint de nanisme sévère semblant létal, prédominant sur les segments proximaux et détecté pendant la période anténatale. Les radios de contenu utérin évoquent éventuellement un nanisme dyssegmentaire (vertèbres sous forme de blocs osseux mal différenciées). Une interruption médicale de grossesse (IMG) a été discutée puis acceptée. Les radiographies réalisées en post-IMG retrouvent d'importantes calcifications épiphysaires suggérant fortement une anomalie des peroxysomes. Le diagnostic a ensuite été confirmé sur le plan enzymatique. En effet, sur des fibroblastes du fœtus, l'activité de la DHAP-AT est effondrée : 2 % d'activité résiduelle. Le taux de plasmalogènes est nettement abaissé mais pas totalement déficitaire. L'analyse du gène *PEX7* n'a rien retrouvé.

- **Fœtus MAN**

Il s'agit d'un fœtus de sexe féminin dont l'histoire commence par la découverte échographique d'un syndrome de Binder à la 25^{ème} SA d'une grossesse gémellaire bi-choriale bi-amniotique obtenue sous CLOMID[®]. Le bilan morphologique indiquait seulement une hypoplasie de l'étage moyen de la face. Des anomalies squelettiques, telles que des calcifications épiphysaires n'ont pas été retrouvées, ni à la 25^{ème} SA à l'échographie, ni à la 34^{ème} SA au scanner. Il n'y avait pas non plus de retard de croissance *in utero* et le terme était prévu à 31 SA. Le deuxième fœtus, de sexe masculin, ne présentait pas d'anomalies.

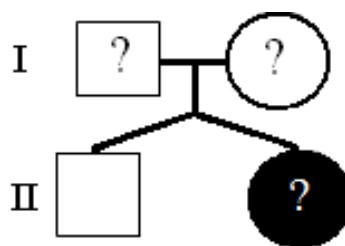


Figure 30 : Arbre génétique de la famille du fœtus **MAN**.

Le bilan biochimique montre que l'activité de la DHAP-AT, mesurée sur amniocytes cultivés, est normale.

Aujourd'hui les deux enfants sont âgés de 7 mois. La croissance staturo-pondérale de la petite fille est régulière et correspond bien à son âge. Par ailleurs, aucun retard psychomoteur n'est présent et l'aspect malformatif est de moins en moins prononcé avec la croissance.

Enfin, nous avons remarqué lors de l'analyse du gène *PEX7* que l'ensemble des polymorphismes mis en évidence chez cette patiente sont homozygotes.

- **Fœtus DIA**

DIA est un fœtus de 17 SA. Il s'agit de la deuxième grossesse d'une femme qui a auparavant déjà fait le choix d'une interruption volontaire de grossesse (IVG). Il n'y a pas de notions de consanguinité dans le couple et pas d'autres antécédents. Un avis médical d'IMG a été posé suite à des signes d'appels à l'échographie. Le fœtus présente notamment un profil plat avec des os du nez angulés et un important raccourcissement fémoral et huméral. Les fémurs et humérus sont réciproquement inférieurs au premier et au cinquième percentile. Ces deux os sont par ailleurs incurvés mais il n'y a ni déminéralisation ni calcification épiphysaire. Les tibias et cubitus sont atteints dans un moindre degré. Ils se situent entre le 5^{ème} et 50^{ème} percentile. Enfin, les reins sont hyper-échogènes.

Un bilan de maladie peroxysomale a été initié et montre que l'activité de la DHAP-AT mesurée sur amniocytes cultivés est normale.

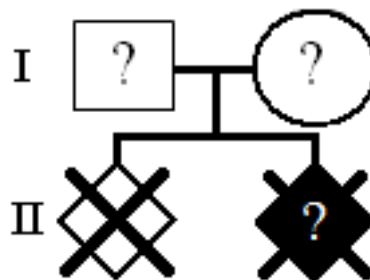


Figure 31 : Arbre génétique de la famille du fœtus **DIA**.

- **Fœtus GUE**

L'échographie à la 22^{ème} SA du fœtus **GUE** rapporte un effacement complet de la racine du nez. Les mensurations sont à la limite inférieure de la normale et sont associées à des ponctuations au niveau d'une épiphyse fémorale supérieure faisant évoquer un diagnostic de chondrodysplasie ponctuée. Il n'y avait pas de cataracte visible.

Au niveau du bilan biochimique, seule la mesure de l'activité de la DHAP-AT a été effectuée sur cellules amniotiques. Cette activité est équivalente au témoin.

L'évolution de ce patient a été favorable.

- **Fœtus GIO**

Le fœtus **GIO** est issu d'une grossesse obtenue par fécondation *in vitro*. Il s'agit d'une première grossesse pour un couple non consanguin et sans antécédents familiaux. L'échographie du premier trimestre ainsi que les marqueurs sériques n'ont décelé aucune anomalie. Cependant, l'échographie de la 22^{ème} SA montre un profil fœtal anormal. L'étage moyen de la face évoque une dysplasie maxillo-nasale de type Binder (visage aplati, nez court à la racine aplatie, maxillaire supérieur peu développé, mandibule proéminente), les os longs sont courts (la taille du fémur est inférieure au 5^{ème} percentile) et des calcifications épiphysaires ponctuelles sont présentes. Le scanner réalisé à la 23^{ème} SA a confirmé l'ensemble de ces anomalies et a motivé une IMG.

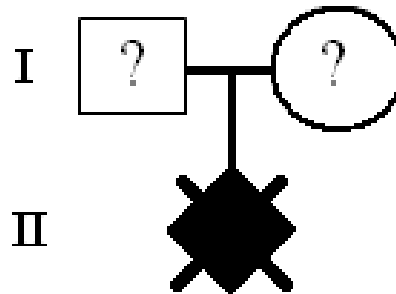


Figure 32 : Arbre génétique de la famille du fœtus **GIO**.

Le bilan étiologique met en évidence un caryotype 46, XY sans anomalie. Il n'y a pas de lupus maternel et le profil des AGTLC est normal. Le taux de 7-déshydro-cholestérol se situe dans les valeurs de référence. De plus, l'étude de l'incorporation du lignocérate dans les cellules amniotiques cultivées n'est pas en faveur d'un déficit de la β -oxydation peroxysomale.

Tableau 9 : Résultats de l'étude du gène *PEX7* pour l'ensemble des patients étudiés.

Groupe	Patients	Exons	Allèle 1		Allèle 2	
Cas index	LAU	9,9 ?	c.903+1G>C	IVS 9+1G>C	c.903+1G>C	IVS 9+1G>C
	RAM	1,1 ?	c.45_52dup8GGGACGCC	p.H18RfsX35	c.45_52dup8GGGACGC C	p.His18ArgfsX35
	SIM	10,10 ?	<u>c.922G>T</u>	<u>p.Asp308Tyr</u>	<u>c.922G>T</u>	<u>p.Asp308Tyr</u>
	VIE	7,7 ?	c.653C>T	p.Ala218Val	c.653C>T	p.Ala218Val
	BOU	1,1	<u>c.100dupT</u>	<u>p.Cys34LeufsX22</u>	<u>c.100dupT</u>	<u>p.Cys34LeufsX22</u>
	EZZ	1,1	<u>c.100dupT</u>	<u>p.Cys34LeufsX22</u>	<u>c.100dupT</u>	<u>p.Cys34euLfsX22</u>
	MOS	7,7 ?	<u>c.745delA</u>	<u>p.Lys249AsnfsX19</u>	<u>c.683dupT</u>	<u>p.Leu228PhefsX10</u>
	MAI	9,7 ?	c.903+1G>C	IVS 9+1G>C	c.653C>T	p.Ala218Val
	CHE	9,7 ?	c.854 A>G	p.His285Arg	<u>c.646 687dup42nt</u>	<u>p.Tyr216Arg229dup14</u>
	MEY	9, / ?	c.875T>A	p.Leu292X	neg	/
	KUR	/	neg	/	neg	/
	VER	/	neg	/	neg	/
BON	/	neg	/	neg	/	
Appel écho	GUI	9,9 ?	c.903+1G>C	IVS 9+1G>C	c.903+1G>C	IVS 9+1G>C
	KLE	/	neg	/	neg	/
	MAN	/	neg	/	neg	/
	DIA	/	neg	/	neg	/
	GUE	/	neg	/	neg	/
	GIO	/	neg	/	neg	/

/ : Sans objet

? : À confirmer par une étude de ségrégation

En rouge : Allèles non décrits dans la littérature

neg : Pas de mutation identifiée

3.4. Dosage des plasmalogènes

Les résultats du dosage des plasmalogènes des témoins et de nos deux patients suspectés d'être atteints de CDRP sont résumés dans le **Tableau 10**.

Tableau 10 : Résultats du dosage des plasmalogènes chez les patients **MAI** & **GUI**.

	Trophoblastes		Amniocytes	
	Témoins	MAI	Témoins	GUI
C16 DMA (nmol)	5,9	0,9	2,8	1,6
C16 ME (nmol)	140,3	48,4	25,2	59,7
C18 DMA (nmol)	5,9	0,8	3,1	0,7
C18 ME (nmol)	66,8	38,1	20,8	58,6
C16:0 DMA/C16:0 ME	4,2 %	1,9 %	11,2 %	2,7 %
C18:0 DMA/C18:0 ME	8,8 %	2,0 %	14,7 %	1,2 %

Les deux patients présentent des valeurs de plasmalogènes bien en dessous des valeurs témoins. Le patient **MAI** présente un important déficit. En effet, les taux mesurés correspondent à 45,2 et 22,7 % des taux témoins, respectivement pour les dérivés à 16 et à 18 atomes de carbones. Le déficit présenté par la patiente **GUI** est encore plus marqué. Les taux de plasmalogènes sont équivalents à 24,1 et 8,2 % des valeurs témoins pour chacun des composés à 16 et 18 atomes de carbones.

Les taux de plasmalogènes sont exprimés en quantité relative de dérivés DMA par rapport aux dérivés ME. Ces rapports sont calculés à la fois pour les plasmalogènes à 16 et à 18 carbones. Par ailleurs, ils nous permettent de nous affranchir et/ou d'éviter de contrôler certains biais. Par exemple, la quantité de cellules produites peut être sensiblement différente d'un échantillon à l'autre. Habituellement, afin de normaliser les résultats en fonction de la quantité cellulaire, nous devons mesurer le taux de protéines présent dans chaque culot cellulaire.

TROISIÈME PARTIE : DISCUSSION

La CDRP-1 est une pathologie peroxysomale appartenant au groupe des anomalies de la biogenèse des peroxysomes. Il s'agit d'une maladie rare à transmission autosomique récessive caractérisée par un raccourcissement des os longs proximaux, une atteinte du système nerveux et un déficit en plasmalogènes. Le décès est précoce et survient souvent pendant la première année de vie. Le diagnostic repose essentiellement sur des arguments cliniques et sur de l'imagerie. Cependant, les signes échographiques n'apparaissent pas avant le 2^{ème} trimestre de grossesse et les autres formes de chondrodysplasies sont difficiles à différencier. Les outils biochimiques pouvant aider à confirmer le diagnostic sont rares et complexes. De plus, seuls les taux de plasmalogènes sont fortement perturbés. C'est pourquoi la biologie moléculaire a toute sa place dans le diagnostic de certitude du déficit en Pex7p, en particulier dans le diagnostic prénatal.

Nous avons donc mis en place le dosage des plasmalogènes et pour la première fois en France, l'étude du gène *PEX7*.

Notre travail a permis l'identification de neuf génotypes complets sur les treize patients inclus. Chez un patient, un seul allèle muté a été identifié. Nous avons également identifié le génotype chez un des six fœtus inclus dans l'étude sur signes d'appel à l'échographie.

1. Mise en place de l'analyse du gène *PEX7*

L'inclusion de nos patients a été réalisée à partir de données cliniques et biochimiques, de cas où l'étiologie n'était pas identifiée. Le spectre clinique des anomalies du gène *PEX7* étant assez large, il est probable que l'inclusion de nos patients comporte un biais favorisant la sélection de formes cliniques franches au dépend des formes frustres. Il serait donc intéressant d'étudier le gène *PEX7* des patients au phénotype de type ARD ne faisant pas partie de notre étude et dont la recherche de mutation dans le gène *PHYH* est restée négative. Nous avons toutefois inclus la patiente **VER**, car elle présente un tableau clinique pouvant être compatible avec une pathologie peroxysomale et dont le dépistage de NALD et le screening des gènes *PEX* sont négatifs. La patiente **BON** a également été incluse car le manque de données biochimiques associé aux signes cliniques ne nous permettait pas d'exclure une anomalie dans le gène *PEX7*.

1.1. Difficultés de mise au point de l'amplification et du séquençage

Comme de nombreux autres gènes, le début de la séquence du gène *PEX7* comporte des séquences dont la fonction principale est d'en réguler l'expression. Ces séquences sont riches en guanosine et cytidine (GC) et possèdent souvent une structure particulière rendant plus difficile les réactions d'amplification. L'exon 1 se situe dans cette région et un Mix réactionnel différent des autres exons a dû être développé^[103]. Ainsi, l'exon 1 a nécessité l'utilisation de la *Taq* polymérase de Qbiogen[®] qui est capable d'amplifier des matrices difficiles mais qui est un peu moins fidèle que la HotStar *Taq* polymérase de Qiagen[®].

Due à la forte teneur en GC en début de séquence nous avons également été obligés de dessiner des amorces plus courtes en début de gène afin de respecter pour tous les couples d'amorces une température d'hybridation de 60 ± 4 °C.

D'autre part, dans un but d'optimisation et afin de réaliser l'analyse du gène *PEX7* dans les meilleures conditions de routine possibles, il a été nécessaire d'utiliser un programme « Touch Down » pour l'étape d'amplification. En effet, due à la variabilité de longueur et de pourcentage en guanine et cytosine de nos couples d'amorces, celles-ci possèdent des températures d'hybridation différentes. L'écart de température maximum atteint est de 5,8 °C, ce qui empêche la réalisation simultanée de l'ensemble des PCR à une température d'hybridation fixe. D'autre part, ce programme présente l'avantage d'obtenir une PCR de très grande sélectivité ainsi qu'un important rendement.

Enfin, la réaction de séquence de l'exon 8 avec son amorce sens n'a jamais fonctionné correctement. Ce problème est probablement dû à l'existence d'une double séquence polyT (dix et onze thymidines séparées par une cytidine) quatre paires de bases en aval de l'exon. Ce polyT perturbant le fonctionnement de la *Taq* polymérase, deux amorces anti-sens ont par conséquent été utilisées pour le séquençage de cet exon.

1.2. Limites de l'analyse moléculaire par séquençage

Les types de mutations détectées par notre analyse de séquence du gène *PEX7* incluent les délétions, les insertions, les mutations faux-sens, les mutations non-sens et les mutations de sites d'épissage. Cependant, l'analyse de la séquence du gène *PEX7* et des régions introniques flanquantes n'est pas capable d'identifier tous les allèles mutants. En effet, d'après Braverman et Motley, ces allèles ne sont identifiés que dans 97 % des cas^[103,105]. Néanmoins, chez

l'ensemble des patients étudiés dans la littérature et ayant une confirmation biochimique de CDRP-1, au moins un allèle *PEX7* muté a été identifié.

Notre méthode d'amplification n'étant pas quantitative, les grandes délétions et les grands réarrangements peuvent ne pas être mises en évidence. En effet, dans ces cas, seule la séquence de l'allèle sauvage sera visible et les polymorphismes ou mutations apparaîtront comme étant homozygotes. L'utilisation d'autres techniques, telles que la MLPA (Multiplex Ligation Dependant PCR Amplification) ou la QMPSF (Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescent Fragments), permettent de rechercher ce type d'anomalie.

D'autre part, notre approche ne permet pas d'éliminer les mutations introniques cryptiques. De telles mutations, peuvent être responsables de l'apparition d'un site d'épissage au niveau intronique et expliquerait l'identification d'une unique mutation chez certains patients. Ces mutations cryptiques peuvent également modifier le taux de transcription du gène, ce qui expliquerait le tableau clinique de certaine forme intermédiaire.

Enfin, il est nécessaire de compléter notre étude par une analyse de transmission familiale (étude de ségrégations) des génotypes identifiés. Cette analyse permettra de détecter les néo-mutations et de réaliser un DPN dans de bonnes conditions.

2. Analyse des mutations identifiées

Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence dix mutations différentes dont cinq non décrites dans la littérature (**Tableau 11**). Elles se répartissent en quatre décalages du cadre de lecture, une grande duplication, trois mutations faux-sens, une non-sens et une modification de site d'épissage.

Tableau 11 : Allèles identifiés lors de notre étude du gène *PEX7*.

Exons	Nucléotides modifiés	Allèles	Références	Effet sur la séquence
1	c.45_52dup8GGGACGCC	p.His18ArgfsX35	Braverman et al. ^[103]	Cadre de lecture
1	c.100dupT	p.Cys34LeufsX22	Non décrite	Cadre de lecture
7	c.646_687dup42nt	p.Thr216_Arg229dup14	Non décrite	Duplication
7	c.653C>T	p.Ala218Val	Braverman et al. ^[62]	Faux-sens
7	c.683dupT	p.Leu228PhefsX10	Non décrite	Cadre de lecture
7	c.745delA	p.Lys249AsnfsX19	Non décrite	Cadre de lecture
9	c.854 A>G	p.His285Arg	Braverman et al. ^[103]	Faux-sens
9	c.875T>A	p.Leu292X	Braverman et al. ^[103]	Non-sens
9	c.903+1G>C	IVS 9+1G>C	Motley et al. ^[105]	Epissage
10	c.922G>T	p.Asp308Tyr	Non décrite	Faux-sens

La plus grande diversité des anomalies génétiques identifiées se situent dans les exons 7 et 9 avec réciproquement, quatre et trois mutations différentes qui représentent 60 % des

anomalies retrouvées dans notre étude. Nous avons mis en évidence deux mutations différentes dans le premier exon et une seule dans l'exon 10.

La mutation **c.875T>A (p.Leu292X)** a été décrite la première fois en 1999^[128]. Elle est la plus fréquemment rapportée et elle représente environ 50 % des allèles pathogènes. Braverman et *al.* ont justifié cette fréquence par une transmission ancestrale de l'allèle avec une origine caucasienne, plus que par une haute récurrence mutationnelle^[107]. Toutefois, dans notre étude, nous ne l'avons mise en évidence qu'une seule fois (patient **MEY**). Ceci peut s'expliquer par l'origine ethnique de l'ensemble de nos patients.

Les mutations **c.653C>T (p.Ala218Val)** et **c.903+1G>C (IVS 9+1G>C)** font parties des anomalies les plus fréquentes de notre étude. Elles ont été retrouvées réciproquement à 3 et 5 reprises, ce qui correspond aux données de la littérature^[105]. Nous avons également pu cibler une mutation rare, avec une fréquence allélique de 0,7 % selon Motley et *al.*^[105]. Il s'agit de la mutation faux-sens **c.854 A>G (p.His285Arg)** identifiée à l'état hétérozygote chez la patiente **CHE**.

Parmi les cinq mutations jamais décrites, deux ont été retrouvées à l'état hétérozygote chez un même patient et deux autres à l'état homozygote. L'exon 7 est principalement touché. En revanche, pour la mutation faux-sens **c.922G>T (p.Asp308Tyr)**, il s'agit de la première description d'anomalie dans le dernier exon du gène. La mutation **c.100dupT (p.Cys34LeufsX22)** a été mise en évidence chez deux patients ainsi que chez leurs parents. Ces derniers sont tous d'origine nord-africaine mais de pays différents. Il ne s'agit donc pas d'une néo-mutation et il est probable qu'elle ne soit retrouvée que dans cette ethnique.

3. Conséquences des mutations identifiées

3.1. Conséquences des délétions, duplications et mutations non-sens

La délétion **c.745delA (p.Lys249AsnfsX19)** et la duplication **c.683dupT (p.Leu228PhefsX10)** identifiées chez **MOS**, la duplication **c.100dupT (p.Cys34LeufsX22)** identifiée chez **BOU** et **EZZ**, la duplication **c.45_52dup8GGGACGCC (p.His18ArgfsX35)** identifiée chez **RAM** ainsi que la mutation ponctuelle non-sens **c.875T>A (p.Leu292X)** retrouvée à l'état hétérozygote chez **MEY** sont toutes à l'origine de l'apparition prématurée d'un codon « stop ». Les ARN messagers contenant ce codon « Stop » prématuré codent une protéine incomplète. Ils seront alors pris en charge par le système NMD (Non-sens Mediated

Decay). Ce système correspond à un contrôle qualité de la transcription. Il va réprimer la traduction de ces ARN messagers et provoquer leur dégradation par les endonucléases^[166]. Les phénotypes prédits sont donc sévères et chez les individus hétérozygotes composites, c'est le deuxième allèle qui déterminera le phénotype^[62].

La grande duplication de 42 nucléotides **c.646_687dup42 (p.Thr216_Arg229dup14)** identifiée chez **CHE**, n'entraîne pas de décalage du cadre de lecture. Cependant, la protéine traduite est allongée de 14 acides aminés correspondant entièrement au feuillet β « c » de la 5^{ème} région WD40. Nous supposons alors que la protéine qui en résulte, peut ne pas être déstructurée de façon trop importante et conserver ainsi une certaine fonctionnalité.

3.2. Conséquences des mutations faux-sens

En fonction de leur localisation et de l'acide aminé substitué, les mutations faux-sens peuvent provoquer l'ensemble du spectre des CDRP-1. Si elle modifie un acide aminé très conservé ou situé dans une partie rigide (feuillet β), alors la protéine pourra être mal repliée voire même instable et donc non fonctionnelle. De même, une modification au niveau des sites d'interaction de la protéine Pex7p avec le signal PTS2 ou la protéine Pex5pL, diminuera son affinité et produira une protéine non efficace. En revanche, si l'acide aminé modifié est peu conservé, s'il est situé dans une partie flexible de la protéine ou s'il est biochimiquement proche de l'acide aminé initial, alors la pathologie sera moins sévère.

Alors que la mutation **c.653C>G (p.Ala218Gly)** n'a aucune conséquence sur la structure de la protéine Pex7p^[62], la mutation **c.653C>T (p.Ala218Val)** interfère avec sa structure secondaire. En effet, bien que la valine soit assez proche de l'alanine remplacée, en terme d'hydrophobie et d'encombrement stérique, cette mutation se situe dans une région importante pour la conformation de la protéine : le brin β de la 5^{ème} région WD40. Elle est associée dans plusieurs publications à un phénotype « non » sévère, avec une survie généralement au-delà de cinq ans^[62,103,167]. Cette mutation a été identifiée chez les patients **VIE** et **MAI**.

La mutation **c.854A>G (p.His285Arg)** identifiée chez **CHE**, affecte un acide aminé conservé dans les peroxines 7 orthologues. De plus, cette histidine est le 2^{ème} acide aminé commun à toutes les séquences WD40. Nous lui supposons donc un rôle important dans la conformation et dans la fonctionnalité de la protéine. L'utilisation du logiciel « PolyPhen-2 » a pu prédire une mutation très délétère. Toutefois, la mutation se situe au tout début de la dernière

répétition WD, qui n'est donc pas affectée. De plus l'arginine et l'histidine sont deux acides aminés assez proches. Ils possèdent tous les deux une chaîne latérale importante constituée de plusieurs atomes d'azote. Nous supposons donc que la protéine possédant cette inversion d'acide aminé conserve une activité résiduelle. D'ailleurs, Motley et *al.* indiquent que cette mutation ne serait pas responsable d'un phénotype sévère^[105].

La mutation **c.922G>T (p.Asp308Tyr)** retrouvée à l'état homozygote chez **SIM**, affecte directement le dernier motif WD. La tyrosine remplaçant l'acide aspartique possède un caractère physico-chimique très différent de ce dernier. Son noyau aromatique crée un encombrement stérique plus important et il modifie fortement la conformation d'un des deux derniers feuilletts β de la peroxine 7.

3.3. Conséquences d'une anomalie de site d'épissage

La mutation **c.903+1G>C (IVS9+1G>C)** modifie le site d'épissage donneur de l'exon 9 et il empêche le spliceosome de le lier à l'exon 10. Braverman et *al.* ont confirmé en 2002, par une technique de Northernblot suivi d'une RT-PCR et d'un séquençage, l'absence de l'exon 9 dans tous les transcrits générés à partir de cet allèle^[103].

4. Corrélation génotype – phénotype

Dans leurs études, Braverman et *al.*^[103] ainsi que Motley et *al.*^[105] ont montré l'existence d'une corrélation génotype – phénotype (clinique et biochimique) pour le déficit en Pex7p. Le spectre clinique de ce déficit s'étend de la forme classique de la CDRP à une maladie de type Refsum relativement frustre. Les allèles associés aux phénotypes classiques correspondent aux délétions, aux insertions, aux anomalies de site d'épissage et aux mutations non-sens. Ces patients présentent l'ensemble des signes cliniques spécifiques de la CDRP-1 et décèdent avant l'âge d'un an. Les patients au phénotype moins sévère et/ou intermédiaire présentent une mutation faux-sens altérant la structure de la protéine ou diminuant son affinité aux autres protéines. La clinique est moins sévère et certains signes, tels que la rhizomélie, peuvent être absents. En générale, les taux de plasmalogènes sont moins effondrés et une accumulation d'acide phytanique est possible. L'espérance de vie dépasse rarement les 10 ans. D'autres mutations sont encore moins délétères et elles permettent de générer une protéine Pex7p quasiment normale. Les phénotypes associés sont de type ARD. L'acide phytanique s'accumule fortement et l'espérance de vie peut atteindre 55 ans^[119,120].

Les résultats de notre étude ainsi que les tableaux cliniques des patients pour lesquels nous avons identifié une mutation sont en accord avec ces faits (**Tableau 12**).

Les patients **LAU**, **GUI**, **BOU**, **EZZ** et **MOS** pour lesquels nous avons mis en évidence soit une anomalie d'épissage soit une mutation non-sens sont tous décédés avant l'âge de 4 mois. Leur taux de plasmalogènes était par ailleurs effondré. Pour le patient **MEY** une seule mutation, à l'état hétérozygote, a été identifiée (**c.875T>A / p.Leu292X**). Ce profil, a déjà été mis en évidence par l'équipe de Motley et *al.* en 2002^[105], où deux patients étaient hétérozygotes pour cette même mutation au niveau génomique mais homozygote au niveau de l'ADNc, sans seconde mutation identifiée. Le phénotype de ce patient est sévère et les taux de plasmalogènes sont très bas. Nous supposons alors l'existence d'une seconde mutation sévère, modifiant soit la stabilité de l'ARNm (expliquant une absence du deuxième transcrit), soit son expression, avec une mutation localisée dans la partie promotrice du gène. Une mutation cryptique dans un intron, induisant un nouveau site d'épissage est également possible.

Le patient **RAM** présente le même type de mutation (non-sens). Toutefois, le phénotype observé est de type intermédiaire et la rhizomélie est absente. Sa mutation (**c.45_52dup8GGGACGCC / p.His18ArgfsX35**) est probablement provoquée par une erreur de l'ADN polymérase lors de la réplication de l'ADN. En effet, dans la séquence sauvage, le domaine ici dupliqué est précédé du même domaine moins un nucléotide, soit GGACGCC puis **GGGACGCC**. L'enzyme a dû par erreur répéter une troisième fois cette séquence. Cette anomalie est retrouvée chez près de 3 % des patients atteints de CDRP-1^[105]. Bien que cette mutation introduise un décalage du cadre de lecture, Poll-The BT^[63] et Nuoffer JM^[117] rapportent également que ce génotype est responsable d'une expression phénotypique non sévère. D'ailleurs, en 2002, Motley et *al.* ont montré que la protéine Pex7p associée à cet allèle possédait une activité non négligeable^[105]. Il est donc probable qu'une restauration du cadre de lecture avec production de protéine Pex7p fonctionnelle se produise.

Le phénotype du patient **SIM** est classique des CDRP-1. Ce patient est décédé à l'âge de 13 mois et son taux plasmatique d'acide phytanique est légèrement augmenté. Ceci correspond bien à sa mutation ponctuelle homozygote perturbant fortement la structure de la protéine Pex7p.

Tableau 12 : Corrélation génotype – phénotype.

Groupe	Patients	PL	DHAP-AT	Acide phytanique	Clinique					Évolution	Allèle 1	Allèle 2	Phénotype
					R	CP	C	R de C	R M				
Cas index	LAU	np	22 %	N	+	+	-	np	np	DCD (3,5 m)	IVS 9+1G>C	IVS 9+1G>C ?	Sévère
	RAM	np	40 %	np	-	np	np	np	np	np	p.His18ArgfsX35	p.His18ArgfsX35 ?	Intermédiaire
	SIM	↓	64 %	↑	+	+	+	+	np	DCD (13 m)	p.Asn308Tyr	p.Asp308Tyr ?	Sévère
	VIE	↓	39 %	↑	+	+	+	+	+	DCD (> 3 a)	p.Ala218Val	p.Ala218Val ?	Intermédiaire
	BOU	↓↓	26 %	N	+	+	+	+	np	DCD (28 j)	p.Cys34LeufsX22	p.Cys34LeufsX22	Sévère
	EZZ	↓↓	86 %	np	+	+	+	+	np	DCD (2 m)	p.Cys34LeufsX22	p.Cys34LeufsX22	Sévère
	MOS	↓↓	44 %	↑	+	+	+	np	np	DCD	p.Lys249AsnfsX19	p.Leu228PhefsX10	Sévère
	MAI	↓↓	40 %	N	+	+	+	np	np	En vie (12 a)	IVS 9+1G>C	p.Ala218Val	Intermédiaire
	CHE	subN	34 %	↑↑	+	+	+	+	+	En vie (12 a)	p.His285Arg	p.Thr216_Arg229dup14	ARD-like
	MEY	↓↓	50 %	↑	np	np	np	np	np	DCD (4 m)	p.Leu292X	/	Sévère
Appel écho	GUI	↓↓	21 %	N	+	+	np	+	np	DCD	IVS 9+1G>C	IVS 9+1G>C ?	Sévère

PL : Plasmalogènes érythrocytaires
 DHAP-AT : activité résiduelle en DHAP-AT
 R de C : Retard de croissance
 R M : Retard mental

R : Rhizomélie
 CP : Chondrodysplasie
 C : Cataracte

- : Absence
 + : Présence
 np : Non précisé
 / : Sans objet

↓↓ : Très diminués
 ↓ : Diminués
 N : Normal
 ? : À confirmer par une étude de ségrégation.

En rouge : Allèles non décrits dans la littérature

Les patients **VIE** et **MAI** présentent la même mutation et un phénotype intermédiaire. Toutefois, **MAI** à un taux de plasmalogènes plus bas. Ceci s'explique par la présence à l'état homozygote de la mutation chez le patient **VIE** alors qu'elle est associée à une mutation plus délétère chez **MAI**. L'absence d'information sur l'évolution du patient **VIE** ne nous permet pas de faire plus de comparaisons.

La patiente **CHE** a aujourd'hui 12 ans et demi. Elle ne présente pas de nanisme rhizomélique mais une importante neuropathie. Son taux de plasmalogènes érythrocytaire est subnormal et celui de l'acide phytanique plasmatique est très augmenté. L'association de ces signes ne correspond pas à une CDRP-1 classique mais plutôt à un phénotype proche de la maladie de Refsum. L'allèle responsable de ce phénotype n'est donc pas **p.His285Arg** (phénotype intermédiaire) mais plutôt **p.Thr216_Arg229dup14**. L'augmentation très légère des AGTLC peut être expliquée par une cholestase ou une insuffisance hépatique, mais nous n'avons pas d'informations sur ce point.

Enfin, pour l'ensemble de nos patients, la corrélation génotype – phénotype biochimique est retrouvée à l'exception de la mesure de l'activité de la DHAP-AT. Les trois patients **EZZ**, **SIM** et **MEY** ont une mutation sévère et ils présentent une activité de la DHAP-AT supérieure ou égale à 50 % par rapport au témoin. En revanche, les trois patients (**RAM**, **VIE** et **MAI**) avec une mutation moins sévères, possèdent une activité de la DHAP-AT inférieure à 50 % par rapport au témoin. Une discordance est également observée entre les patients **BOU** et **EZZ** qui présentent le même génotype mais dont l'activité de la DHAP-AT est mesurée réciproquement à 26 et 86 % par rapport au témoin. Un contrôle doit donc être réalisé chez ces deux patients. En dépit de cette variabilité, la DHAP-AT est un marqueur secondaire important dont l'activité est assez simple à mesurer. Elle permet d'orienter le diagnostic vers une pathologie peroxysomale. En effet, à l'exception de rares cas de CDRP, une activité normale de DHAP-AT permet d'exclure une origine peroxysomale.

5. Patients sans anomalie détectée

Aucune mutation n'a été retrouvée sur le gène *PEX7*, ni chez les patients **KUR**, **VER** et **BON**, ni chez les fœtus **KLE**, **GUE**, **GIO**, **DIA**, et **MAN**.

Chez le patient **KUR**, les signes cliniques et biologiques peuvent évoquer un ZS par défaut de biogenèse des peroxysomes, voire peut-être un diagnostic de CDRP, probablement de type 3 par déficit en alkyl-DHAP-S. Un screening des gènes *PEX*, un dosage de l'acide pipécolique et la mesure de l'activité de l'alkyl-DHAP-S sont donc à envisager. Par ailleurs,

chez ce patient, l'activité de la DHAP-AT correspond à 99 % par rapport au témoin, or nous savons que la DHAP-AT nécessite la présence de l'alkyl-DHAP-S pour conserver son activité. Dans le cas où l'activité de l'alkyl-DHAP-S serait trouvée déficitaire chez ce patient (CDRP-3), l'anomalie génétique touchant le gène codant pour cette enzyme respecterait sa présence en permettant la stabilisation de la DHAP-AT et une bonne fonctionnalité^[168]. Toutefois, compte tenu de la clinique ne décrivant pas de chondrodysplasie ponctuée mais une atteinte neurosensorielle avec atrophie cérébelleuse et de la biochimie montrant une augmentation du taux plasmatique de l'acide pristanique et une diminution du taux érythrocytaire de plasmalogènes, il est possible que ce patient soit atteint d'un défaut de biogenèse des peroxysomes.

Le profil clinique de la patiente **VER** oriente vers une forme atypique de maladie peroxysomale (anomalie neurologique sans dysplasie osseuse). Toutefois, les investigations biochimiques de premières intentions ne sont pas informatives. Elles devraient être complétées par un dosage de plasmalogènes et par la mesure de l'activité de la DHAP-AT. Ceci nous aiderait à confirmer ou à exclure l'atteinte peroxysomale chez cette patiente.

Le bilan biochimique de la patiente **BON** est atypique et incomplet. En effet, le dosage des plasmalogènes et des intermédiaires des acides biliaires n'a pas encore été réalisé. Ce bilan, associé aux signes cliniques et à un taux diminué de plasmalogènes, serait favorable à une anomalie de la biogenèse des peroxysomes. Le résultat du dosage des intermédiaires des acides biliaires permettra d'orienter le diagnostic vers un syndrome de Zellweger (ZS, NAL, IRD). Toutefois, l'augmentation de l'acide pipécolique pouvant être due à une atteinte hépatique, et un taux normal de plasmalogènes, orienterait vers un déficit en AMACR, voire en SCPx.

Le fœtus **KLE** présente toutes les caractéristiques cliniques d'une forme sévère de chondrodysplasie rhizomélique ponctuée. L'origine peroxysomale a été confirmée par la mesure de l'activité de la DHAP-AT, laquelle est effondrée. L'absence de mutation dans le gène *PEX7* suggère une CDRP de type 2. Une étude du gène codant la DHAP-AT (*GNPAT*) est donc à envisager.

Le retard de croissance *in utero* du fœtus **GUE** est peu marqué. Malgré la présence de calcifications ponctuées au niveau des épiphyses, ce fœtus ne présente ni rhizomélie ni cataracte. Il s'est révélé par la suite, que la mère de ce fœtus était suivie pour un lupus ce qui expliquerait le phénotype et l'évolution favorable.

Le fœtus **GIO** présente une dysplasie maxillo-nasale de type Binder. Ce syndrome est retrouvé dans les chondrodysplasies ponctuées notamment de type brachytéléphalangique (CDPX-1). Ce fœtus étant de sexe masculin, un bilan de CDPX-1 a été prescrit et il est en cours. Toutefois, le syndrome de Binder qui peut s'observer dans les CDRP-1 ainsi que la présence d'un important raccourcissement des os longs (fémur inférieur au 5^{ème} percentile) ne nous permettent pas d'exclure une CDRP. Le dosage des plasmalogènes et la mesure de l'activité de la DHAP-AT, nous permettraient d'orienter plus précisément le diagnostic.

Pour le fœtus **DIA**, le raccourcissement fémoral et huméral nous avait orientés vers une chondrodysplasie rhizomélique. Toutefois, l'absence d'anomalie dans le gène *PEX7*, une activité de la DHAP-AT normale et à une absence de calcifications ponctuées associées à une incurvation des os longs ne sont pas en faveur d'une CDRP. Cette dysplasie osseuse avec incurvation des membres longs n'est pas associée à une anomalie de la minéralisation osseuse. Une ostéogénèse imparfaite et l'hypophosphatasie peuvent donc être écartées. L'absence d'anomalie viscérale exclu également le syndrome de Stive-Wiedemann. Enfin, l'atteinte majeure des fémurs et à un moindre degré des humérus, des tibias et cubitus nous orientent vers une dysplasie cyphomélique plus que vers une dysplasie campomélique^[169].

Le seul point d'appel échographique du fœtus **MAN** est un syndrome de Binder découvert à la 25^{ème} SA. Aucun autre signe orientant vers une anomalie des peroxysomes n'est présent. Le bilan biochimique est normal. Après la naissance, le dysmorphisme s'est progressivement résolu et aucun retard psychomoteur n'a été remarqué. Le diagnostic de pathologie d'origine peroxysomale est donc à éliminer chez cette patiente.

6. Mise en place du dosage des plasmalogènes

La technique de dosage des plasmalogènes est longue et délicate. De l'extraction des lipides totaux à l'interprétation des résultats, elle nécessite un jour complet et un personnel expérimenté. La principale difficulté réside en la recherche d'une diminution et même parfois d'une absence de l'analyte. Les points critiques sont donc les étapes d'extraction dont les rendements doivent être bons et impérativement contrôlés par des étalons internes. Une étape de concentration est d'ailleurs nécessaire pour le passage en chromatographie. De plus, les plasmalogènes étant facilement dégradés par oxydation, les conditions d'analyse doivent parfaitement les préserver.

Notre choix de milieu d'étude pour cet essai de dosage de plasmalogènes s'est porté sur les cellules amniotiques et sur les fibroblastes. Les cellules amniotiques constituent le

prélèvement réalisable le plus précocément après la détection des premiers signes échographiques. En effet, ceux-ci ne sont pas visibles avant le 2^{ème} trimestre de grossesse^[132]. Comme les amniocytes, les fibroblastes peuvent être mis en culture et être le support d'analyse tant biochimique que moléculaire. Ils permettent de s'affranchir des échantillons de type érythrocytaire pour lesquelles le dosage des plasmalogènes est plus délicat. En effet, *in vitro*, le fer contenu dans l'hémoglobine des globules rouges participe à l'attaque radicalaire *via* les espèces activées de l'oxygène et dégrade rapidement les composés antioxydants que sont les plasmalogènes^[170].

Les cellules témoins utilisées proviennent de patients atteints d'une maladie hématologique ou d'une infection materno-fœtale. Les valeurs des taux de plasmalogènes dans les amniocytes témoins sont très proches des données de la littérature en comparaison aux valeurs érythrocytaires et fibroblastiques^[171,172] (**Tableau 13**). Par contre, les valeurs dans les fibroblastes témoins sont légèrement inférieures à ces mêmes données. Nos essais ayant été effectués sur un nombre de témoins restreints, il serait alors primordial d'évaluer les valeurs normales sur au moins trente témoins afin d'établir des seuils décisionnels qui nous permettront d'identifier les cas pathologiques des cas non pathologiques.

Tableau 13 : Comparaison de valeurs normales du taux de plasmalogènes.

		C16:0 DMA/C16:0 ME	C18:0 DMA/C18:0 ME
		%	%
Essai	Fibroblastes	4,2	8,8
	Amniocytes	11,2	14,7
Littérature	Fibroblastes ^[172]	10,9 – 13,3	11,8 – 17,4
	Érythrocytes ^[171]	6,9 – 11,9	10,6 – 24,9

Lors de nos essais de dosage de plasmalogènes, nous avons remarqué que lorsque les taux de cet analyte étaient diminués, les taux d'acides gras polyinsaturés (acide eicosatriénoïque, acide arachidonique, acide docosatétraénoïque et acide docosahexaénoïque ou DHA) étaient augmentés dans les amniocytes (fœtus) et diminués dans les fibroblastes (patient né). (**Tableau 14**).

Tableau 14 : Résultats du dosage des acides gras polyinsaturés chez MAI & GUI.

	Fibroblastes*		Amniocytes*	
	Témoins	MAI	Témoins	GUI
Acide eicosatriénoïque	2,9	2,3	2,4	7,8
Acide arachidonique	18,0	13,1	11,1	22,0
Acide docosatétraénoïque	5,0	2,2	1,9	3,5
Acide docosahexaénoïque	10,3	4,1	4,1	7,3

*Nanomoles / culot cellulaire

Notre hypothèse est que cette augmentation est liée directement aux taux de plasmalogènes afin de pallier au manque de composés antioxydants dans l'organisme et que la diminution est due à la consommation de ce potentiel antioxydant.

D'autre part, le dosage des plasmalogènes après la naissance peut également être réalisé sur thrombocytes ou sur plasma par une technique de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse, et permet d'éviter une mise en culture de fibroblastes^[173].

Une diminution des taux de plasmalogènes est également observée dans les pathologies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson, Niemann Pick type C) et dans certaines pathologies chroniques (maladie inflammatoire, maladie respiratoire, diabète)^[38].

7. Difficulté d'observation de l'atteinte du squelette et de la dysmorphie à l'échographie de dépistage

Les os des membres se forment à partir de la 5^{ème} SA et leur ossification primaire débute vers la 8^{ème} SA^[174]. À l'échographie, l'ensemble du squelette n'est bien visible qu'à partir de la 14^{ème} SA. Lors de la grossesse, la première échographie obligatoire se déroule entre la 9^{ème} et la 14^{ème} SA. Il est donc extrêmement difficile de diagnostiquer une dysplasie squelettique avant cette date. D'ailleurs, dans l'étude de Schramm et *al.* regroupant 178 fœtus atteints de dysplasie squelettique, aucun n'a été diagnostiqué avant la 14^{ème} SA^[175]. Ainsi, les premières anomalies échographiques sont observées tardivement, entre la 20^{ème} et la 22^{ème} SA, c'est-à-dire au cours de la 2^{ème} échographie de grossesse. De plus, ces signes se manifestent dans des délais différents en fonction de la sévérité clinique. Au 2^{ème} trimestre, les données de l'imagerie sont donc fréquemment insuffisantes ou imprécises pour évoquer un diagnostic franc et évaluer le pronostic^[132]. Tous ces éléments laissent peu de temps de réaction pour décider de l'avenir de la grossesse et entraînent donc souvent une interruption médicale de grossesse.

Les signes pathognomoniques des fœtus atteints de CDRP-1 consistent en l'association d'une rhizomélie et d'une calcification ponctuée des épiphyses. Si une cataracte est observée, elle sera bilatérale.

Les fœtus, atteints d'une maladie du spectre Zellweger, se différencieront des fœtus atteints de CDRP-1 par la présence de kystes rénaux sous-corticaux et d'anomalies hépatiques^[176]. Un dosage d'AGTLC et un screening des gènes *PEX* permettent le plus souvent de confirmer un syndrome de Zellweger.

Les fœtus atteints d'une chondrodysplasie ponctuée brachytéléphalangique (CDPX-1), se différencient à l'échographie de la CDRP-1 par une hypoplasie des phalanges distales, une calcification prédominante aux tarse et aux membres inférieurs. La taille est peu touchée et la cataracte jamais observée. Pour le syndrome de Conradi-Hünnerman-Happle (CDPX-2), c'est essentiellement l'asymétrie de la longueur des membres puis la scoliose qui sont discriminantes. Une cataracte unilatérale est observée dans 2 cas sur 3^[177].

En seconde intention et en confirmation des données en 2 dimensions, une imagerie en 3 dimensions (3D) peut être pratiquée. Elle pourrait permettre une reconstruction osseuse et surfacique améliorant l'observation du dysmorphisme faciale, des anomalies distales et des anomalies de calcifications (articulaires, larynx). Il y a peu d'avantages pour l'observation du thorax, des côtes et des anomalies des corps vertébraux. Les données en 3D pourraient ainsi donner des arguments en faveur d'une chondrodysplasie compatible ou non avec la vie et elles pourraient compléter le conseil génétique. L'inconvénient principal de l'imagerie 3D, est que la mère et le fœtus doivent rester parfaitement immobile pendant l'acquisition d'images^[133].

Enfin, les signes d'appel échographiques doivent toujours être confirmés par des arguments radiologique, clinique et biologique.

8. Proposition de conduite à tenir dans le cas de fœtus présentant des signes d'appel échographiques de CDRP

Pour les patients nés avec une suspicion clinique de maladie peroxysomale, un arbre décisionnel est présenté page 44.

D'autre part, dans le cas des familles informatives, la mesure du taux de plasmalogènes ou de l'activité de la DHAP-AT directement sur amniocytes permettra de statuer sur l'atteinte peroxysomale du fœtus. L'étude du gène *PEX7* permettra un diagnostic de certitude rapide.

Enfin, le diagnostic prénatal chez un fœtus n'ayant pas d'antécédents familiaux est difficile et ce sont les signes d'appel échographiques qui constituent la première alerte. Devant toutes suspicions échographiques, la recherche d'étiologies secondaires (Allo-immunisation, déficit en vitamine K, iatrogénie) doit être envisagée en premier lieu. Dans un second temps, nous orienterons le bilan biochimique en fonction des signes associés :

- En présence d'une polydactilie et pour les formes à tendance micromélique, le métabolisme du cholestérol doit être étudié ;
- En présence de formes rhizoméliques et symétriques, éventuellement associées à une cataracte bilatérale, un dosage des plasmalogènes sur amniocytes et la mesure de

l'activité de la DHAP-AT confirmera une origine peroxysomale. L'analyse directe du gène *PEX7* peut également être effectuée. Toutefois, en cas d'analyse négative, elle ne peut pas se substituer complètement aux analyses biochimiques nécessaires au dépistage des CDRP-2 et -3 et éventuellement du syndrome de Zellweger ;

- Les formes non rhizoméliques ou disymétriques nous orienterons vers les CDP liées à l'X.

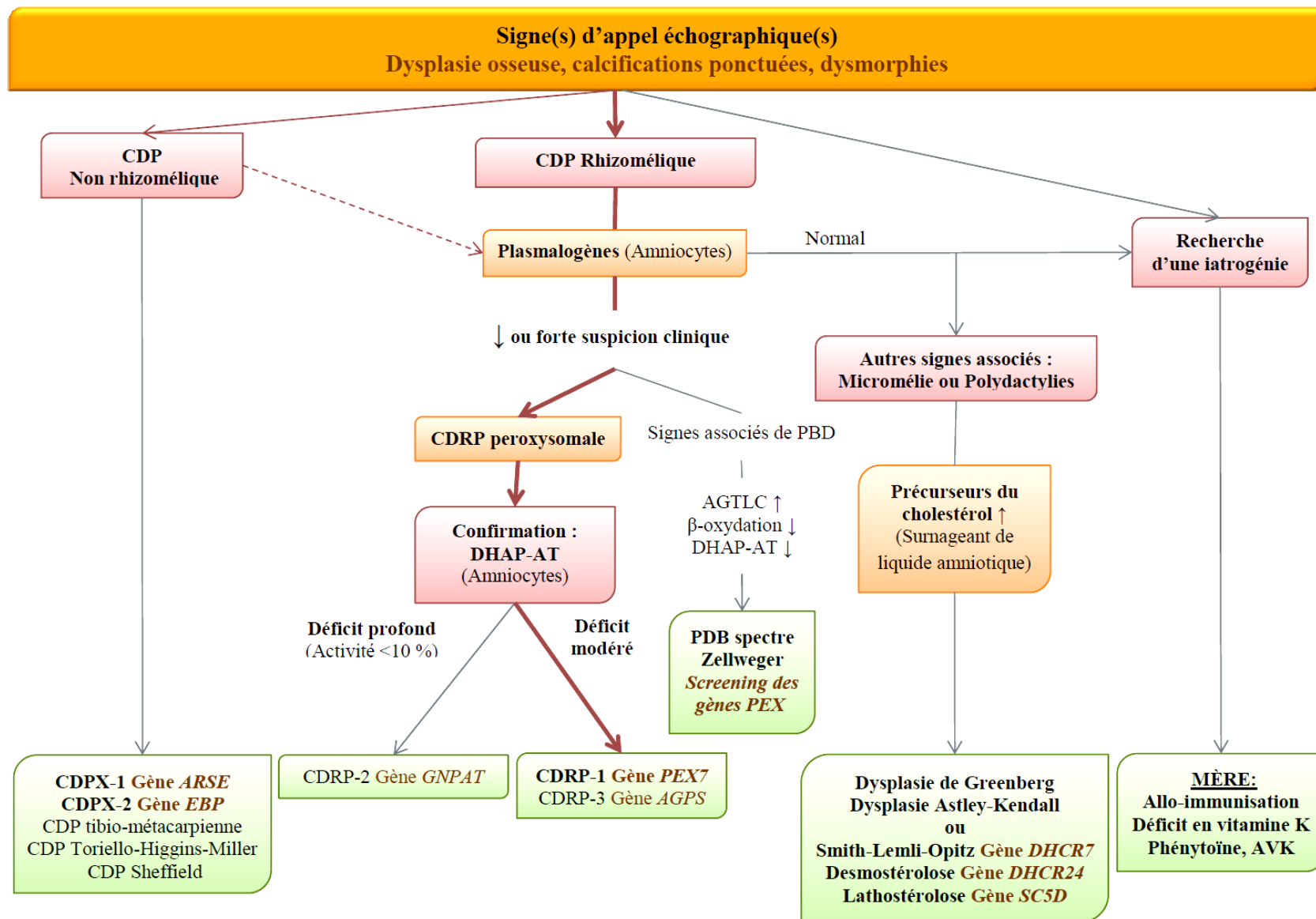


Figure 33 : Arbre décisionnel à partir des signes d'appel échographiques

CONCLUSIONS

MÉMOIRE SOUTENU PAR M. LEJARRE Fabien

La Chondrodysplasie Rhizomélique Ponctuée de type 1 (CDRP-1) est une pathologie peroxysomale appartenant au groupe des anomalies de la biogenèse des peroxysomes. C'est une maladie rare à transmission autosomique récessive. Elle recouvre un spectre d'expression clinique dont la forme classique est caractérisée par un raccourcissement des os longs proximaux, une calcification ponctuée des articulations, une atteinte du système nerveux et au niveau biochimique, par un déficit en plasmalogènes. Le décès survient souvent pendant la première année de vie. Cependant, certains phénotypes atypiques peuvent entraîner une survie jusqu'à l'âge adulte. Cette variabilité phénotypique est la conséquence d'une hétérogénéité allélique dans le gène *PEX7*. Le diagnostic repose à la fois sur des arguments cliniques, sur l'imagerie et sur l'exploration des fonctions peroxysomales. *In utero*, il est possible d'observer des signes d'appel échographiques, mais ils n'apparaissent pas avant le 2^{ème} trimestre de grossesse. Les autres formes de chondrodysplasies sont souvent difficiles à différencier. Une confirmation par des méthodes biochimiques complexes sur cellules est donc indispensable. Le diagnostic prénatal est par conséquent difficile car il nécessite un délai de trois semaines, nécessaires à la culture cellulaire et l'interprétation est parfois difficile. De plus, un résultat négatif ne permet pas d'exclure formellement une CDRP d'origine peroxysomale.

L'objectif de notre travail a consisté en la mise en place du dosage des plasmalogènes afin de confirmer l'origine peroxysomale de la chondrodysplasie. Puis, par la mise au point de l'étude du gène *PEX7*, nous avons établi le diagnostic moléculaire de la plus fréquente des CDRP peroxysomale : la CDRP-1.

Ce travail nous a permis de confirmer le déficit en Pex7p chez 11 patients parmi les 19 étudiés et de décrire cinq nouvelles mutations : c.100dupT (p.Cys34LeufsX22), c.646_687dup42nt (p.Thr216_Arg229dup14), c.683dupT (p.Leu228PhefsX10), c.745delA (p.Lys249AsnfsX19) et c.922G>T (p.Asp308Tyr).

Le diagnostic de certitude de la CDRP-1 chez les cas index par une étude moléculaire est ainsi disponible en France. Il s'agit d'un outil précieux qui permet de proposer aux familles un conseil génétique et un diagnostic prénatal rapide.

Dans les années futures, l'avènement du séquençage haut débit associé au diagnostic prénatal non invasif sur sang maternel permettra probablement de faire le dépistage de l'ensemble des chondrodysplasies héréditaires dès la 5^{ème} semaine d'aménorrhée. En parallèle, de nouvelles thérapeutiques médicamenteuses corrigeant certaines anomalies génétiques émergent et semblent prometteuses.

Le Président de Jury,

Professeur Joëlle GOUDABLE

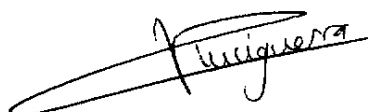


VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Lyon, le 23 Avril 2013 -

**Vu, le Directeur de l'ISPB – Faculté de Pharmacie de Lyon
Pour le Président de l'Université Claude Bernard**

Professeur Christine VINCIGUERRA



Annexes

Annexe 1 : Bilan peroxysomal des patients étudiés.

Patient		LAU	RAM	SIM	VIE	BOU	EZZ	MOS	MAI	CHE	MEY	KUR	VER	BON
Dosages plasmatiques														
AGTLC	valeurs usuelles													
C26:0	0,43-1,06 µmol/L	nr	nr	N	subN	N	N*	nr	N*	subN*	N	N*	N	N
C24:0/C22:0	0,69-0,99	nr	nr	N	subN	N	N*	nr	N*	subN*	N	N*	N	N
C26:0/C22:0	0,006-0,019	nr	nr	N	subN	N	N*	nr	N*	↑*	N	N*	N	N
Acide phytanique	1,0-10 µmol/L	N*	nr	↑	↑	N	nr	↑*	N	↑↑	↑*	↑	N	↑
Acide pristanique	0,1-3,0 µmol/L	nr	nr	nr	nr	N	nr	N*	N	N	N*	↑	nr	↑
Plasmalogènes érythrocytaires														
C16:0 DMA/C16:0 ME	6,9-11,9 % ^[171]	nr	nr	↓*	↓*	↓↓*	↓↓*	↓↓*	↓↓*	subN*	↓↓*	↓*	nr	nr
C18:0 DMA/C18:0 ME	10,6-24,9 % ^[171]	nr	nr	↓↓*	↓↓*	↓↓*	↓↓*	↓↓*	↓↓*	N*	↓↓*	↓*	nr	nr
Études sur fibroblastes														
β-oxydation du C24:0	(% activité résiduelle)	nr	nr	nr	N	nr	nr	nr	N	N	N	nr	nr	nr
Activité de la DHAP-AT	(% activité résiduelle)	22 %	40 %	64 %	39 %	26 %	86 %	44 %	40 %	34 %	50 %	99 %*	nr	nr
AGTLC (nmol/mg prot)		nr	N*	nr	nr	nr	nr	nr	N	nr	N*	nr	nr	N
Biosynthèse des plasmalogènes		nr	def*	def*	def*	nr	def*α	def*	def	nr	def*	nr	nr	nr
Autres														
Acyl-CoA oxidase immunoblot		nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	N	nr	nr	nr
Thiolase immunoblot		nr	An	nr	An	nr	nr	nr	nr	nr	An	nr	nr	nr
Activité de la phytanate oxydase		nr	def*	nr	def*	nr	nr	nr	nr	nr	def	nr	nr	nr

N : Normaux / Normale ↓↓ : très diminué(e)s def : défient(e) * : non effectué au laboratoire
 An : Anormal(e) ↓ : diminué(e)s ↑ : élevé(e)s nr : non réalisé

Annexe 2 : Données cliniques et paracliniques des patients étudiés.

Patient	LAU	RAM	SIM	VIE	BOU	EZZ	MOS	MAI	CHE	MEY	KUR	VER	BON
Sexe	F	F	M	M	M	F	M	M	F	M	M	F	F
Âge au diagnostic	np	np	np	np	np	32 SA	Np	28 SA	np	np	np	3 a	3,5 a
Évolution	DCD (3,5 m)	np	DCD (13 m)	DCD (> 3 a)	DCD (28 j)	DCD (2 m)	DCD (5 m)	En vie 12 a	En vie 12 a	DCD (4 m)	np	np	np
Origine ethnique	np	np	Turquie	Réunion	Tunisie	Maroc	Réunion	np	np	np	np	np	np
Consanguinité	np	np	+	+	+	+	np	np	np	np	np	np	np
Grossesse/naissance	2/2	np	3/3	np	1/1	1/1	4/4	1/1	3/2	2/2	np	np	2/2
<i>Dysmorphie</i>	+	np	+	+	+	+	+	np	+	np	+	np	np
<i>Atteinte neurologique</i>			+								Ataxie	+	
Algie	+	np	++	np	+	+	np	+	np	+	np	np	np
Hypertonie	np	np	np	np	np	+	np	np	+	+	np	np	np
Convulsions	np	np	np	+	np	np	np	np	np	np	+	np	np
Retard psychomoteur	np	np	np	+	np	np	np	+	+	np	+	+	+
Anomalies à l'IRM	+	np	+	+	-	np	np	+	np	+	+	+	+
<i>Atteinte oculaire</i>													
Cataracte	+	np	+	+	+	+	+	+	+	+	np	np	np
Rétinopathie	-	np	np	np	np	np	np	np	np	np	+	+	np
<i>Atteinte osseuse</i>													
Calcifications ponctuéés	+	np	+	+	+	+	+	+	+	+	np	np	np
Raideur articulaire	+	np	++	+	np	+	np	+	+	np	np	np	np
Brièveté Fémur/Humérus	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	np	np	np
Malformation thoracique	+	np	np	np	+	np	np	np	np	np	np	np	np
Retard de croissance	+	np	+	+	+	+	np	np	+	+	np	-	+
Atteintes des hanches	+	np	+	np	+	np	np	+	np	+	np	np	np
Anomalies vertébrales	+	np	np	np	np	np	+	np	np	+	np	np	np
<i>Atteintes pulmonaires</i>	-	np	np	np	+	+	+	np	np	np	np	np	np

M : Masculin

+ : Présence

m : mois

IMG : Interruption médicale de grossesse

DCD : Décédé(e)

F : Féminin

- : Absence

a : ans

j : jours

SA : Semaine d'aménorrhée

np : Non précisé

Annexe 4 : Composition du Mix pour la réaction de PCR de l'exon 1.

Mix	Concentration initiale	Concentration finale	Volume pour un tube (µL)
<i>Taq Q Biogene</i> [®]	5 UI/µL	3 UI	0,6
Tampon PCR sans MgCl ₂	10 X	1,25 X	2,5
MgCl ₂ Qbiogen	50 mM	0,8 mM	0,4
dNTP (10 nM)	10 mM	0,2 mM	0,5
Solution Q	5 X	1 X	6,25
Amorce sens	5 µM	0,4 µM	4
Amorce anti-sens	5 µM	0,4 µM	4
ADN	20 ng/µL	5,4 ng/µL	6,75
Eau Milli-Q qsp 25 µL			0
Volume final			25 µL

Annexe 5 : Composition du Mix pour la réaction de PCR des exons 2 à 10.

Mix	Concentration initiale	Concentration finale	Volume pour un tube (µL)
<i>Taq HotStart Qiagen</i> [®]	5 UI/µL	1 UI	0,2
Tampon PCR	10 X	1 X	2,5
dNTP (10 nM)	10 mM	0,2 mM	0,5
Amorce sens	5 µM	0,4 µM	2
Amorce anti-sens	5 µM	0,4 µM	2
ADN	20 ng/µL	2 ng/µL	2,5
Eau Milli-Q qsp 25 µL			15,3
Volume final			25 µL

Annexe 6 : Composition du Mix pour la réaction de séquence.

Mix	Concentration Initiale	Concentration finale	Volume pour un tube (µL)
Mix bigDye	2,5 X	0,13 X	0,75
Tampon sequencing	5 X	1 X	1,5
± Solution Q	5 X	1 X	2
Amorce sens ou anti-sens	5 µM	1 µM	2
Amplicon purifié normalisé			2
Eau Milli-Q qsp 10 µL			1,75 – 3,75
Volume final			10 µL

Sites Internet consultés

PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

PubMed Gene: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>

PubMed Nucleotide: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>

Primer-BLAST: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

Primer3 0.4.0: <http://frodo.wi.mit.edu/>

Science direct: <http://www.sciencedirect.com/>

Ensembl: <http://www.ensembl.org/index.html>

OligoAnalyser 3.1: <http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/Default.aspx>

Peroxisome db 2.0: <http://www.peroxisomedb.org/>

PEX Gene Database: <http://www.dbpex.org/home.php>

HGMD: <http://www.hgmd.org>

OMIM: <http://omim.org>

HPRD: http://www.hprd.org/links?hprd_id=03454&isoform_id=03454_1&isoform_name=

PolyPhen-2: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml>

Genetics Home Reference: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/PEX7>

Logiciels utilisés

LabChip[®] HT Software

Data Viewer[®] Caliper

SeqScape Software v2.5 d' Applied Biosystems

Alamut v2.1-2 d' Interactive Biosoftware

Data Viewer[®] Caliper

Bibliographies

1. Rhodin J. Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney. Stockholm;Ph.D. Thesis. Karolinska Inst.:1954.
2. Duve CD, Baudhuin P. Peroxisomes (microbodies and Related Particles). *Physiol Rev* 1966;46(2):323-357.
3. Hruban Z, Vigil EL, Slesers A, Hopkins E. Microbodies: constituent organelles of animal cells. *Lab. Invest.* 1972;27(2):184-191.
4. Antonenkov VD, Hiltunen JK. Transfer of metabolites across the peroxisomal membrane. *Biochimica Et Biophysica Acta* [Internet] 2011 [cité 2012 juin 27];Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22206997>
5. Schrader M, Fahimi HD. The peroxisome: still a mysterious organelle. *Histochem Cell Biol* 2008;129(4):421-440.
6. Girzalsky W, Platta HW, Erdmann R. Protein transport across the peroxisomal membrane. *Biol. Chem.* 2009;390(8):745-751.
7. Chang CC, South S, Warren D, Jones J, Moser AB, Moser HW, et al. Metabolic control of peroxisome abundance. *J. Cell. Sci.* 1999;112 (Pt 10):1579-1590.
8. Geuze HJ, Murk JL, Stroobants AK, Griffith JM, Kleijmeer MJ, Koster AJ, et al. Involvement of the Endoplasmic Reticulum in Peroxisome Formation. *Mol. Biol. Cell* 2003;14(7):2900-2907.
9. Sakai Y, Oku M, van der Klei IJ, Kiel JAKW. Pexophagy: Autophagic degradation of peroxisomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 2006;1763(12):1767-1775.
10. Fawcett DW. *The cell*, Chapter 9: Peroxisomes. Boston, Massachusetts. 1981; 515-528:
11. Fidaleo M. Peroxisomes and peroxisomal disorders: the main facts. *Exp. Toxicol. Pathol.* 2010;62(6):615-625.
12. Patton S, Benson AA. Phytol metabolism in the bovine. *Biochim. Biophys. Acta* 1966;125(1):22-32.
13. Wierzbicki AS. Peroxisomal disorders affecting phytanic acid alpha-oxidation: a review. *Biochem. Soc. Trans.* 2007;35(Pt 5):881-886.
14. Hoefler G, Hoefler S, Watkins PA, Chen WW, Moser A, Baldwin V, et al. Biochemical abnormalities in rhizomelic chondrodysplasia punctata. *J. Pediatr.* 1988;112(5):726-733.
15. Lazarow PB, De Duve C. A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1976;73(6):2043-2046.
16. Wanders RJA. Peroxisomes, lipid metabolism, and peroxisomal disorders. *Mol. Genet. Metab.* 2004;83(1-2):16-27.
17. Salido E, Pey AL, Rodriguez R, Lorenzo V. Primary hyperoxalurias: Disorders of glyoxylate detoxification. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 2012;1822(9):1453-1464.

18. Wanders RJA, Waterham HR. Biochemistry of Mammalian Peroxisomes Revisited. *Annual Review of Biochemistry* 2006;75(1):295-332.
19. Kemp S, Theodoulou FL, Wanders RJ. Mammalian peroxisomal ABC transporters: from endogenous substrates to pathology and clinical significance. *British Journal of Pharmacology* 2011;164(7):1753-66.
20. Fransen M, Nordgren M, Wang B, Apanasets O. Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: Implications for human disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* [Internet] [cité 2012 juin 30]; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443911002791>
21. Schrader M, Fahimi HD. Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta* 2006;1763(12):1755-1766.
22. Pedersen JJ. Peroxisomal oxidation of the steroid side chain in bile acid formation. *Biochimie* 1993;75(3-4):159-165.
23. Wanders RJ, Vreken P, Ferdinandusse S, Jansen GA, Waterham HR, van Roermund CW, et al. Peroxisomal fatty acid alpha- and beta-oxidation in humans: enzymology, peroxisomal metabolite transporters and peroxisomal diseases. *Biochem. Soc. Trans.* 2001;29(Pt 2):250-267.
24. Ferdinandusse S, Denis S, Faust PL, Wanders RJA. Bile acids: the role of peroxisomes. *J Lipid Res* 2009;50(11):2139-2147.
25. Snyder F. The ether lipid trail: a historical perspective. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1999;1436(3):265-278.
26. Singh H, Beckman K, Poulos A. Exclusive localization in peroxisomes of dihydroxyacetone phosphate acyltransferase and alkyl-dihydroxyacetone phosphate synthase in rat liver. *J. Lipid Res.* 1993;34(3):467-477.
27. Nagan N, Zoeller RA. Plasmalogens: biosynthesis and functions. *Progress in Lipid Research* 2001;40(3):199-229.
28. Hajra AK. Dihydroxyacetone phosphate acyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta* 1997;1348(1-2):27-34.
29. Brown AJ, Snyder F. Alkyldihydroxyacetone-P synthase. Solubilization, partial purification, new assay method, and evidence for a ping-pong mechanism. *J. Biol. Chem.* 1982;257(15):8835-8839.
30. Bacot S. Caractérisation d'un nouvel aldéhyde d'origine plaquettaire (4-hydroxydodécadiénal) et formation d'adduits de Michael avec les phospholipides à éthanolamine. Thèse 2004ISAL0037. 2004;
31. Schrakamp G, Schalkwijk CG, Schutgens RB, Wanders RJ, Tager JM, van den Bosch H. Plasmalogen biosynthesis in peroxisomal disorders: fatty alcohol versus alkylglycerol precursors. *J. Lipid Res.* 1988;29(3):325-334.
32. Burdett K, Larkins LK, Das AK, Hajra AK. Peroxisomal localization of acyl-coenzyme A reductase (long chain alcohol forming) in guinea pig intestine mucosal cells. *J. Biol. Chem.* 1991;266(19):12201-12206.

33. Hayashi H, Hara M. 1-Alkenyl group of ethanolamine plasmalogen derives mainly from de novo-synthesized fatty alcohol within peroxisomes, but not extraperoxisomal fatty alcohol or fatty acid. *J. Biochem.* 1997;121(5):978-983.
34. Ghosh MK, Hajra AK. Subcellular distribution and properties of acyl/alkyl dihydroxyacetone phosphate reductase in rodent livers. *Arch. Biochem. Biophys.* 1986;245(2):523-530.
35. Datta SC, Ghosh MK, Hajra AK. Purification and properties of acyl/alkyl dihydroxyacetone-phosphate reductase from guinea pig liver peroxisomes. *J. Biol. Chem.* 1990;265(14):8268-8274.
36. Mancini A, Del Rosso F, Roberti R, Orvietani P, Coletti L, Binaglia L. Purification of ethanolaminephosphotransferase from bovine liver microsomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1999;1437(1):80-92.
37. Itzkovitz B, Jiralerspong S, Nimmo G, Loscalzo M, Horovitz DDG, Snowden A, et al. Functional characterization of novel mutations in GNPAT and AGPS, causing rhizomelic chondrodysplasia punctata (RCDP) types 2 and 3. *Human Mutation* 2012;33(1):189-197.
38. Braverman NE, Moser AB. Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* [Internet] [cité 2012 juin 16]; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443912001160>
39. Su HM, Moser AB, Moser HW, Watkins PA. Peroxisomal straight-chain Acyl-CoA oxidase and D-bifunctional protein are essential for the retroconversion step in docosahexaenoic acid synthesis. *J. Biol. Chem.* 2001;276(41):38115-38120.
40. Kovacs WJ, Tape KN, Shackelford JE, Duan X, Kasumov T, Kelleher JK, et al. Localization of the pre-squalene segment of the isoprenoid biosynthetic pathway in mammalian peroxisomes. *Histochem. Cell Biol.* 2007;127(3):273-290.
41. Paton VG, Shackelford JE, Krisans SK. Cloning and subcellular localization of hamster and rat isopentenyl diphosphate dimethylallyl diphosphate isomerase. A PTS1 motif targets the enzyme to peroxisomes. *J. Biol. Chem.* 1997;272(30):18945-18950.
42. Olivier LM, Chambliss KL, Gibson KM, Krisans SK. Characterization of phosphomevalonate kinase: chromosomal localization, regulation, and subcellular targeting. *J. Lipid Res.* 1999;40(4):672-679.
43. Distel B, Erdmann R, Gould SJ, Blobel G, Crane DI, Cregg JM, et al. A unified nomenclature for peroxisome biogenesis factors. *J. Cell Biol.* 1996;135(1):1-3.
44. Lazarow PB. Peroxisome biogenesis: advances and conundrums. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2003;15(4):489-497.
45. Heiland I, Erdmann R. Biogenesis of peroxisomes. Topogenesis of the peroxisomal membrane and matrix proteins. *FEBS J.* 2005;272(10):2362-2372.
46. Lazarow PB, Fujiki Y. Biogenesis of peroxisomes. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1985;1:489-530.
47. Hoepfner D, Schildknecht D, Braakman I, Philippsen P, Tabak HF. Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation. *Cell* 2005;122(1):85-95.
48. Titorenko VI, Mullen RT. Peroxisome biogenesis: the peroxisomal endomembrane system and the role of the ER. *J. Cell Biol.* 2006;174(1):11-17.

49. Van der Zand A, Braakman I, Tabak HF. Peroxisomal membrane proteins insert into the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* 2010;21(12):2057-2065.
50. Titorenko VI, Rachubinski RA. The endoplasmic reticulum plays an essential role in peroxisome biogenesis. *Trends in Biochemical Sciences* 1998;23(7):231-233.
51. Tabak HF, van der Zand A, Braakman I. Peroxisomes: minted by the ER. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2008;20(4):393-400.
52. Ma C, Agrawal G, Subramani S. Peroxisome assembly: matrix and membrane protein biogenesis. *J. Cell Biol.* 2011;193(1):7-16.
53. Yonekawa S, Furuno A, Baba T, Fujiki Y, Ogasawara Y, Yamamoto A, et al. Sec16B is involved in the endoplasmic reticulum export of the peroxisomal membrane biogenesis factor peroxin 16 (Pex16) in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011;108(31):12746-12751.
54. Matsuzaki T, Fujiki Y. The peroxisomal membrane protein import receptor Pex3p is directly transported to peroxisomes by a novel Pex19p- and Pex16p-dependent pathway. *J. Cell Biol.* 2008;183(7):1275-1286.
55. Ma C, Subramani S. Peroxisome Matrix and Membrane Protein Biogenesis. *IUBMB Life* 2009;61(7):713-722.
56. Jones JM, Morrell JC, Gould SJ. Multiple Distinct Targeting Signals in Integral Peroxisomal Membrane Proteins. *J Cell Biol* 2001;153(6):1141-1150.
57. Fang Y, Morrell JC, Jones JM, Gould SJ. PEX3 functions as a PEX19 docking factor in the import of class I peroxisomal membrane proteins. *J. Cell Biol.* 2004;164(6):863-875.
58. Jones JM, Morrell JC, Gould SJ. PEX19 is a predominantly cytosolic chaperone and import receptor for class I peroxisomal membrane proteins. *J. Cell Biol.* 2004;164(1):57-67.
59. Rucktäschel R, Girzalsky W, Erdmann R. Protein import machineries of peroxisomes. *Biochim. Biophys. Acta* 2011;1808(3):892-900.
60. Lametschwandtner G, Brocard C, Fransen M, Van Veldhoven P, Berger J, Hartig A. The difference in recognition of terminal tripeptides as peroxisomal targeting signal 1 between yeast and human is due to different affinities of their receptor Pex5p to the cognate signal and to residues adjacent to it. *J. Biol. Chem.* 1998;273(50):33635-33643.
61. Lazarow PB. The import receptor Pex7p and the PTS2 targeting sequence. *Biochim. Biophys. Acta* 2006;1763(12):1599-1604.
62. Braverman N, Steel G, Obie C, Moser A, Moser H, Gould SJ, et al. Human PEX7 encodes the peroxisomal PTS2 receptor and is responsible for rhizomelic chondrodysplasia punctata. *Nat. Genet.* 1997;15(4):369-376.
63. Otera H, Harano T, Honsho M, Ghaedi K, Mukai S, Tanaka A, et al. The mammalian peroxin Pex5pL, the longer isoform of the mobile peroxisome targeting signal (PTS) type 1 transporter, translocates the Pex7p.PTS2 protein complex into peroxisomes via its initial docking site, Pex14p. *J. Biol. Chem.* 2000;275(28):21703-21714.
64. Brown L-A, Baker A. Shuttles and cycles: transport of proteins into the peroxisome matrix (review). *Mol. Membr. Biol.* 2008;25(5):363-375.

65. Meinecke M, Cizmowski C, Schliebs W, Krüger V, Beck S, Wagner R, et al. The peroxisomal importomer constitutes a large and highly dynamic pore. *Nat. Cell Biol.* 2010;12(3):273-277.
66. Thoms S, Erdmann R. Peroxisomal matrix protein receptor ubiquitination and recycling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 2006;1763(12):1620-1628.
67. Platta HW, Grunau S, Rosenkranz K, Girzalsky W, Erdmann R. Functional role of the AAA peroxins in dislocation of the cycling PTS1 receptor back to the cytosol. *Nat. Cell Biol.* 2005;7(8):817-822.
68. Kiel JAKW, Emmrich K, Meyer HE, Kunau W-H. Ubiquitination of the Peroxisomal Targeting Signal Type 1 Receptor, Pex5p, Suggests the Presence of a Quality Control Mechanism during Peroxisomal Matrix Protein Import. *J. Biol. Chem.* 2005;280(3):1921-1930.
69. Nagotu S, Kaler VC, Erdmann R, Platta HW. Molecular basis of peroxisomal biogenesis disorders caused by defects in peroxisomal matrix protein import. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 2012;1822(9):1326-1336.
70. Thoms S, Erdmann R. Dynamamin-related proteins and Pex11 proteins in peroxisome division and proliferation. *FEBS J.* 2005;272(20):5169-5181.
71. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 1990;347(6294):645-650.
72. Berger J, Moller DE. The Mechanisms of Action of PPARs. *Annual Review of Medicine* 2002;53(1):409-435.
73. Schrader M, Reuber BE, Morrell JC, Jimenez-Sanchez G, Obie C, Stroh TA, et al. Expression of PEX11beta mediates peroxisome proliferation in the absence of extracellular stimuli. *J. Biol. Chem.* 1998;273(45):29607-29614.
74. Schrader M, Fahimi HD. Growth and Division of Peroxisomes [Internet]. In: Kwang W. Jeon, éditeur. *International Review of Cytology*. Academic Press; 2006 [cité 2012 nov 24]. p. 237-290. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0074769606550053>
75. Waterham HR, Ebberink MS. Genetics and molecular basis of human peroxisome biogenesis disorders. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 2012;1822(9):1430-1441.
76. Steinberg SJ, Dodt G, Raymond GV, Braverman NE, Moser AB, Moser HW. Peroxisome biogenesis disorders. *Biochim. Biophys. Acta* 2006;1763(12):1733-1748.
77. Weller S, Gould SJ, Valle D. Peroxisome biogenesis disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2003;4:165-211.
78. Moser HW, Mahmood A, Raymond GV. X-linked adrenoleukodystrophy. *Nat Clin Pract Neurol* 2007;3(3):140-151.
79. Berger J, Gärtner J. X-linked adrenoleukodystrophy: Clinical, biochemical and pathogenetic aspects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 2006;1763(12):1721-1732.
80. Kemp S, Berger J, Aubourg P. X-linked adrenoleukodystrophy: Clinical, metabolic, genetic and pathophysiological aspects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of*

Disease [Internet] [cité 2012 juin 30]; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443912000774>

81. Wanders RJA, Waterham HR. Peroxisomal disorders: The single peroxisomal enzyme deficiencies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 2006;1763(12):1707-1720.
82. Ferdinandusse S, Denis S, Mooyer PAW, Dekker C, Duran M, Soorani-Lunsing RJ, et al. Clinical and biochemical spectrum of D-bifunctional protein deficiency. *Ann. Neurol.* 2006;59(1):92-104.
83. Ferdinandusse S, Kostopoulos P, Denis S, Rusch H, Overmars H, Dillmann U, et al. Mutations in the Gene Encoding Peroxisomal Sterol Carrier Protein X (SCPx) Cause Leukencephalopathy with Dystonia and Motor Neuropathy. *Am J Hum Genet* 2006;78(6):1046-1052.
84. Setchell KDR, Heubi JE, Bove KE, O'Connell NC, Brewsaugh T, Steinberg SJ, et al. Liver disease caused by failure to racemize trihydroxycholestanic acid: gene mutation and effect of bile acid therapy. *Gastroenterology* 2003;124(1):217-232.
85. Jansen GA, Waterham HR, Wanders RJA. Molecular basis of Refsum disease: sequence variations in phytanoyl-CoA hydroxylase (PHYH) and the PTS2 receptor (PEX7). *Hum. Mutat.* 2004;23(3):209-218.
86. Van den Brink DM, Wanders RJA. Phytanic acid: production from phytol, its breakdown and role in human disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 2006;63(15):1752-1765.
87. Wierzbicki AS, Lloyd MD, Schofield CJ, Feher MD, Gibberd FB. Refsum's disease: a peroxisomal disorder affecting phytanic acid alpha-oxidation. *J. Neurochem.* 2002;80(5):727-735.
88. Wanders RJ, Schumacher H, Heikoop J, Schutgens RB, Tager JM. Human dihydroxyacetonephosphate acyltransferase deficiency: a new peroxisomal disorder. *J. Inherit. Metab. Dis.* 1992;15(3):389-391.
89. Wanders RJ, Dekker C, Hovarth VA, Schutgens RB, Tager JM, Van Laer P, et al. Human alkyldihydroxyacetonephosphate synthase deficiency: a new peroxisomal disorder. *J. Inherit. Metab. Dis.* 1994;17(3):315-318.
90. Rimoin DL, Cohn D, Krakow D, Wilcox W, Lachman RS, Alanay Y. The skeletal dysplasias: clinical-molecular correlations. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007;1117:302-309.
91. Alanay Y, Lachman RS. A Review of the Principles of Radiological Assessment of Skeletal Dysplasias. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2011;3(4):163-178.
92. Morales Piga A, Alonso Ferreira V, Villaverde-Hueso A. [Implications of the new etiopathogenic approach in the classification of constitutional and genetic bone diseases]. *Reumatol Clin* 2011;7(4):248-254.
93. Warman ML, Cormier-Daire V, Hall C, Krakow D, Lachman R, LeMerrer M, et al. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2010 revision. *Am. J. Med. Genet. A* 2011;155A(5):943-968.
94. Superti-Furga A, Bonafé L, Rimoin DL. Molecular-pathogenetic classification of genetic disorders of the skeleton. *Am. J. Med. Genet.* 2001;106(4):282-293.

95. Le Merrer M, Cormier-Daire V. Chondrodysplasies responsables d'insuffisance staturale. *EMC - Appareil locomoteur* 2007;2(4):1-11.
96. Spranger JW, Bidder U, Voelz C. [Chondrodysplasia punctata (Chondrodystrophia calcificans) II. The rhizomelic type]. *Fortschr Geb Rontgenstr Nuklearmed* 1971;114(3):327-335.
97. Heymans HS, Oorthuys JW, Nelck G, Wanders RJ, Schutgens RB. Rhizomelic chondrodysplasia punctata: another peroxisomal disorder. *N. Engl. J. Med.* 1985;313(3):187-188.
98. Purdue PE, Zhang JW, Skoneczny M, Lazarow PB. Rhizomelic chondrodysplasia punctata is caused by deficiency of human PEX7, a homologue of the yeast PTS2 receptor. *Nat. Genet.* 1997;15(4):381-384.
99. Motley AM, Hetteema EH, Hogenhout EM, Brites P, ten Asbroek AL, Wijburg FA, et al. Rhizomelic chondrodysplasia punctata is a peroxisomal protein targeting disease caused by a non-functional PTS2 receptor. *Nat. Genet.* 1997;15(4):377-380.
100. Mukai S, Ghaedi K, Fujiki Y. Intracellular localization, function, and dysfunction of the peroxisome-targeting signal type 2 receptor, Pex7p, in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 2002;277(11):9548-9561.
101. Li D, Roberts R. WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* 2001;58(14):2085-2097.
102. Stanley WA, Fodor K, Marti-Renom MA, Schliebs W, Wilmanns M. Protein translocation into peroxisomes by ring-shaped import receptors. *FEBS Letters* 2007;581(25):4795-4802.
103. Braverman N, Chen L, Lin P, Obie C, Steel G, Douglas P, et al. Mutation analysis of PEX7 in 60 probands with rhizomelic chondrodysplasia punctata and functional correlations of genotype with phenotype. *Hum. Mutat.* 2002;20(4):284-297.
104. Kunze M, Neuberger G, Maurer-Stroh S, Ma J, Eck T, Braverman N, et al. Structural Requirements for Interaction of Peroxisomal Targeting Signal 2 and Its Receptor PEX7. *J. Biol. Chem.* 2011;286(52):45048-45062.
105. Motley AM, Brites P, Gerez L, Hogenhout E, Haasjes J, Benne R, et al. Mutational spectrum in the PEX7 gene and functional analysis of mutant alleles in 78 patients with rhizomelic chondrodysplasia punctata type 1. *Am. J. Hum. Genet.* 2002;70(3):612-624.
106. Wanders RJ, Romeijn GJ. Cholesterol biosynthesis, peroxisomes and peroxisomal disorders: mevalonate kinase is not only deficient in Zellweger syndrome but also in rhizomelic chondrodysplasia punctata. *J. Inherit. Metab. Dis.* 1998;21(3):309-312.
107. Braverman N, Steel G, Lin P, Moser A, Moser H, Valle D. PEX7 gene structure, alternative transcripts, and evidence for a founder haplotype for the frequent RCDP allele, L292ter. *Genomics* 2000;63(2):181-192.
108. Stoll C, Dott B, Roth MP, Alembik Y. Birth prevalence rates of skeletal dysplasias. *Clin. Genet.* 1989;35(2):88-92.
109. Braverman NE, Moser AB, Steinberg SJ. Rhizomelic Chondrodysplasia Punctata Type 1 [Internet]. 2001 [cité 2013 févr 3]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1270/>

110. Bams-Mengerink AM, Majoie CBLM, Duran M, Wanders RJA, Van Hove J, Scheurer CD, et al. MRI of the brain and cervical spinal cord in rhizomelic chondrodysplasia punctata. *Neurology* 2006;66(6):798-803; discussion 789.
111. White AL, Modaff P, Holland-Morris F, Pauli RM. Natural history of rhizomelic chondrodysplasia punctata. *Am. J. Med. Genet. A* 2003;118A(4):332-342.
112. Powers JM, Kenjarski TP, Moser AB, Moser HW. Cerebellar atrophy in chronic rhizomelic chondrodysplasia punctata: a potential role for phytanic acid and calcium in the death of its Purkinje cells. *Acta Neuropathol.* 1999;98(2):129-134.
113. Goh S. Neuroimaging features in a neonate with rhizomelic chondrodysplasia punctata. *Pediatr. Neurol.* 2007;37(5):382-384.
114. Khanna AJ, Braverman NE, Valle D, Sponseller PD. Cervical stenosis secondary to rhizomelic chondrodysplasia punctata. *American Journal of Medical Genetics* 2001;99(1):63-6.
115. Oswald G, Lawson C, Raymond G, Golden WC, Braverman N. Rhizomelic chondrodysplasia punctata type 1 and fulminant neonatal respiratory failure, a case report and discussion of pathophysiology. *American Journal of Medical Genetics Part A* 2011;155:3160-3163.
116. Motley AM, Tabak HF, Smeitink JA, Poll-The BT, Barth PG, Wanders RJ. Non-rhizomelic and rhizomelic chondrodysplasia punctata within a single complementation group. *Biochim. Biophys. Acta* 1996;1315(3):153-158.
117. Nuoffer JM, Pfammatter JP, Spahr A, Toplak H, Wanders RJ, Schutgens RB, et al. Chondrodysplasia punctata with a mild clinical course. *J. Inherit. Metab. Dis.* 1994;17(1):60-66.
118. Moser AB, Rasmussen M, Naidu S, Watkins PA, McGuinness M, Hajra AK, et al. Phenotype of patients with peroxisomal disorders subdivided into sixteen complementation groups. *J. Pediatr.* 1995;127(1):13-22.
119. Horn MA, van den Brink DM, Wanders RJA, Duran M, Poll-The BT, Tallaksen CME, et al. Phenotype of adult Refsum disease due to a defect in peroxin 7. *Neurology* 2007;68(9):698-700.
120. Van den Brink DM, Brites P, Haasjes J, Wierzbicki AS, Mitchell J, Lambert-Hamill M, et al. Identification of PEX7 as the second gene involved in Refsum disease. *Am. J. Hum. Genet.* 2003;72(2):471-477.
121. Al-Dirbashi OY, Santa T, Rashed MS, Al-Hassnan Z, Shimozawa N, Chedrawi A, et al. Rapid UPLC-MS/MS method for routine analysis of plasma pristanic, phytanic, and very long chain fatty acid markers of peroxisomal disorders. *J. Lipid Res.* 2008;49(8):1855-1862.
122. Brosche T, Platt D, Vostrowsky O. Methyl enol ethers as artefacts in capillary gas chromatographic profiles of aldehyde dimethyl acetals. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1985;345:219-227.
123. Biermann J, Just WW, Wanders RJ, Van Den Bosch H. Alkyl-dihydroxyacetone phosphate synthase and dihydroxyacetone phosphate acyltransferase form a protein complex in peroxisomes. *Eur. J. Biochem.* 1999;261(2):492-499.

124. Jansen GA, Mihalik SJ, Watkins PA, Moser HW, Jakobs C, Heijmans HS, et al. Phytanoyl-CoA hydroxylase is not only deficient in classical Refsum disease but also in rhizomelic chondrodysplasia punctata. *J. Inherit. Metab. Dis.* 1997;20(3):444-446.
125. Heikoop JC, van Roermund CW, Just WW, Ofman R, Schutgens RB, Heymans HS, et al. Rhizomelic chondrodysplasia punctata. Deficiency of 3-oxoacyl-coenzyme A thiolase in peroxisomes and impaired processing of the enzyme. *J. Clin. Invest.* 1990;86(1):126-130.
126. Schutgens RBH, Romeyn GJ, Wanders RJA, van den Bosch H, Schrakamp G, Heymans HSA. Deficiency of acyl-CoA: Dihydroxyacetone phosphate acyltransferase in patients with Zellweger (cerebro-hepato-renal) syndrome. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1984;120(1):179-184.
127. Wanders RJ, Waterham HR, Leroy BP. Refsum Disease [Internet]. 2006 [cité 2013 févr 3]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1353/>
128. Shimozawa N, Suzuki Y, Zhang Z, Miura K, Matsumoto A, Nagaya M, et al. A novel nonsense mutation of the PEX7 gene in a patient with rhizomelic chondrodysplasia punctata. *J. Hum. Genet.* 1999;44(2):123-125.
129. Wanders RJA, Waterham HR. Peroxisomal disorders I: biochemistry and genetics of peroxisome biogenesis disorders. *Clin. Genet.* 2005;67(2):107-133.
130. Hoefler S, Hoefler G, Moser AB, Watkins PA, Chen WW, Moser HW. Prenatal diagnosis of rhizomelic chondrodysplasia punctata. *Prenat. Diagn.* 1988;8(8):571-576.
131. Alfirevic Z, Sundberg K, Brigham S. Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2003;(3):CD003252.
132. Zwijnenburg PJG, Deurloo KL, Waterham HR, Meijers-Heijboer EJ, van Vugt JMG, Tan-Sindhunata MB. Second trimester prenatal diagnosis of rhizomelic chondrodysplasia punctata type 1 on ultrasound findings. *Prenat. Diagn.* 2010;30(2):162-164.
133. Krakow D, Williams J 3rd, Poehl M, Rimoin DL, Platt LD. Use of three-dimensional ultrasound imaging in the diagnosis of prenatal-onset skeletal dysplasias. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2003;21(5):467-472.
134. Happle R. Cataracts as a marker of genetic heterogeneity in chondrodysplasia punctata. *Clinical Genetics* 2008;19(1):64-66.
135. Waterham HR, Koster J, Mooyer P, Noort Gv G van, Kelley RI, Wilcox WR, et al. Autosomal recessive HEM/Greenberg skeletal dysplasia is caused by 3 beta-hydroxysterol delta 14-reductase deficiency due to mutations in the lamin B receptor gene. *Am. J. Hum. Genet.* 2003;72(4):1013-1017.
136. Kelley RI, Wilcox WG, Smith M, Kratz LE, Moser A, Rimoin DS. Abnormal sterol metabolism in patients with Conradi-Hünemann-Happle syndrome and sporadic lethal chondrodysplasia punctata. *Am. J. Med. Genet.* 1999;83(3):213-219.
137. Elçioğlu N, Hall CM. A lethal skeletal dysplasia with features of chondrodysplasia punctata and osteogenesis imperfecta: an example of Astley-Kendall dysplasia. Further delineation of a rare genetic disorder. *J. Med. Genet.* 1998;35(6):505-507.
138. Nino M, Matos-Miranda C, Maeda M, Chen L, Allanson J, Armour C, et al. Clinical and molecular analysis of arylsulfatase E in patients with brachytelephalangi chondrodysplasia punctata. *Am. J. Med. Genet. A* 2008;146A(8):997-1008.

139. Leclerc-Mercier S, Fraitag S, Dufernez F, Chevy F, Lamazière A, Bodemer C, et al. Syndrome de Conradi-Hünemann-Happle : étude clinique, histologique, métabolique et moléculaire chez quatre patientes. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie* 2011;138(12):A70-A71.
140. Steijlen PM, van Geel M, Vreeburg M, Marcus-Soekarman D, Spaapen LJM, Castelijns FCM, et al. Novel EBP gene mutations in Conradi-Hünemann-Happle syndrome. *Br. J. Dermatol.* 2007;157(6):1225-1229.
141. Pauli RM, Lian JB, Mosher DF, Suttie JW. Association of congenital deficiency of multiple vitamin K-dependent coagulation factors and the phenotype of the warfarin embryopathy: clues to the mechanism of teratogenicity of coumarin derivatives. *Am J Hum Genet* 1987;41(4):566-583.
142. Bony C, Zyka F, Tiran-Rajaofera I, Attali T, De Napoli S, Alessandri J. Fœtopathie coumarinique. *Archives de Pédiatrie* 2002;9(7):705-708.
143. Menger H, Lin AE, Toriello HV, Bernert G, Spranger JW. Vitamin K deficiency embryopathy: a phenocopy of the warfarin embryopathy due to a disorder of embryonic vitamin K metabolism. *Am. J. Med. Genet.* 1997;72(2):129-134.
144. Wester U, Brandberg G, Larsson M, Lönnerholm T, Annerén G. Chondrodysplasia punctata (CDP) with features of the tibia-metacarpal type and maternal phenytoin treatment during pregnancy. *Prenat. Diagn.* 2002;22(8):663-668.
145. Chitayat D, Keating S, Zand DJ, Costa T, Zackai EH, Silverman E, et al. Chondrodysplasia punctata associated with maternal autoimmune diseases: Expanding the spectrum from systemic lupus erythematosus (SLE) to mixed connective tissue disease (MCTD) and scleroderma report of eight cases, Chondrodysplasia punctata associated with maternal autoimmune diseases: Expanding the spectrum from systemic lupus erythematosus (SLE) to mixed connective tissue disease (MCTD) and scleroderma report of eight cases. *American Journal of Medical Genetics Part A, American Journal of Medical Genetics Part A* 2008;146A, 146A(23, 23):3038, 3038-3053, 3053.
146. Schulz SW, Bober M, Johnson C, Braverman N, Jimenez SA. Maternal mixed connective tissue disease and offspring with chondrodysplasia punctata. *Semin. Arthritis Rheum.* 2010;39(5):410-416.
147. Brites P, Motley AM, Gressens P, Mooyer PAW, Ploegaert I, Everts V, et al. Impaired neuronal migration and endochondral ossification in Pex7 knockout mice: a model for rhizomelic chondrodysplasia punctata. *Hum. Mol. Genet.* 2003;12(18):2255-2267.
148. Brites P, Mooyer PAW, El Mrabet L, Waterham HR, Wanders RJA. Plasmalogens participate in very-long-chain fatty acid-induced pathology. *Brain* 2009;132(Pt 2):482-492.
149. Da Silva TF, Sousa VF, Malheiro AR, Brites P. The importance of ether-phospholipids: A view from the perspective of mouse models. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 2012;1822(9):1501-1508.
150. Rüdiger M, von Baehr A, Haupt R, Wauer RR, Rüstow B. Preterm infants with high polyunsaturated fatty acid and plasmalogen content in tracheal aspirates develop bronchopulmonary dysplasia less often. *Crit. Care Med.* 2000;28(5):1572-1577.
151. Rüdiger M, Kolleck I, Putz G, Wauer RR, Stevens P, Rüstow B. Plasmalogens effectively reduce the surface tension of surfactant-like phospholipid mixtures. *Am. J. Physiol.* 1998;274(1 Pt 1):L143-148.

152. Komljenovic D, Sandhoff R, Teigler A, Heid H, Just WW, Gorgas K. Disruption of blood-testis barrier dynamics in ether-lipid-deficient mice. *Cell Tissue Res.* 2009;337(2):281-299.
153. Schönfeld P, Struy H. Refsum disease diagnostic marker phytanic acid alters the physical state of membrane proteins of liver mitochondria. *FEBS Lett.* 1999;457(2):179-183.
154. Zomer AW, van Der Burg B, Jansen GA, Wanders RJ, Poll-The BT, van Der Saag PT. Pristanic acid and phytanic acid: naturally occurring ligands for the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J. Lipid Res.* 2000;41(11):1801-1807.
155. Braverman N, Zhang R, Chen L, Nimmo G, Scheper S, Tran T, et al. A Pex7 hypomorphic mouse model for plasmalogen deficiency affecting the lens and skeleton. *Mol. Genet. Metab.* 2010;99(4):408-416.
156. Brites P, Ferreira AS, da Silva TF, Sousa VF, Malheiro AR, Duran M, et al. Alkyl-glycerol rescues plasmalogen levels and pathology of ether-phospholipid deficient mice. *PLoS ONE* 2011;6(12):e28539.
157. Wood PL, Khan MA, Smith T, Ehrmantraut G, Jin W, Cui W, et al. In vitro and in vivo plasmalogen replacement evaluations in rhizomelic chondrodysplasia punctata and Pelizaeus-Merzbacher disease using PPI-1011, an ether lipid plasmalogen precursor. *Lipids Health Dis* 2011;10:182.
158. Wei H, Kemp S, McGuinness MC, Moser AB, Smith KD. Pharmacological induction of peroxisomes in peroxisome biogenesis disorders. *Ann. Neurol.* 2000;47(3):286-296.
159. Smeitink JA, Beemer FA, Espeel M, Donckerwolcke RA, Jakobs C, Wanders RJ, et al. Bone dysplasia associated with phytanic acid accumulation and deficient plasmalogen synthesis: a peroxisomal entity amenable to plasmapheresis. *J. Inherit. Metab. Dis.* 1992;15(3):377-380.
160. Zhang R, Chen L, Jiralerspong S, Snowden A, Steinberg S, Braverman N. Recovery of PEX1-Gly843Asp peroxisome dysfunction by small-molecule compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(12):5569-5574.
161. Dranchak PK, Di Pietro E, Snowden A, Oesch N, Braverman NE, Steinberg SJ, et al. Nonsense suppressor therapies rescue peroxisome lipid metabolism and assembly in cells from patients with specific PEX gene mutations. *Journal of Cellular Biochemistry* 2011;112:1250-1258.
162. Gould SJ, Raymond GV, Valle D. The peroxisome biogenesis disorders. The metabolic and molecular bases of inherited disease 2001;:3181-3217.
163. Lamoril J, Ameziane N, Deybach J-C, Bouizegarène P, Bogard M. Les techniques de séquençage de l'ADN : une révolution en marche. Première partie. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 2008;23(5):260-279.
164. Folch J, Lees M, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957;226(1):497-509.
165. Morrison WR, Smith LM. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J. Lipid Res.* 1964;5(4):600-608.
166. Baker KE, Parker R. Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2004;16(3):293-299.
167. Moser AB, Walton DS, Braverman N, Moser HW. The mis-sense allele (A218V) in the rhizomelic chondrodysplasia punctata gene is associated with a milde phenotype. *Annals of Neurology* 1997;:42:515.

168. De Vet EC, Ijlst L, Oostheim W, Dekker C, Moser HW, van Den Bosch H, et al. Ether lipid biosynthesis: alkyl-dihydroxyacetonephosphate synthase protein deficiency leads to reduced dihydroxyacetonephosphate acyltransferase activities. *J. Lipid Res.* 1999;40(11):1998-2003.
169. Pryde PG, Zelop C, Pauli RM. Prenatal diagnosis of isolated femoral bent bone skeletal dysplasia: problems in differential diagnosis and genetic counseling. *Am. J. Med. Genet. A* 2003;117A(3):203-206.
170. Omodeo Sale MF, Rizzo AM, Masserini M. Effect of ethanol amine plasmalogens on Fe-induced peroxidation of arachidonic acid in dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles. *Biological & pharmaceutical bulletin* 23(12):1410-1413.
171. Labadaridis I, Moraitou M, Theodoraki M, Triantafyllidis G, Sarafidou J, Michelakakis H. Plasmalogen levels in full-term neonates. *Acta Paediatrica* 2009;98(4):640-642.
172. Barth PG, Wanders RJA, Schutgens RBH, Staalman CR. Variant rhizomelic chondrodysplasia punctata (RCDP) with normal plasma phytanic acid: Clinico-biochemical delineation of a subtype and complementation studies. *American Journal of Medical Genetics* 1998;62(2):164-168.
173. Hui S-P, Chiba H, Kurosawa T. Liquid chromatography-mass spectrometric determination of plasmalogens in human plasma. *Anal Bioanal Chem* 2011;400(7):1923-1931.
174. Larsen W. *Embryologie humaine*. De Boeck Supérieur; 2003.
175. Schramm T, Gloning KP, Minderer S, Daumer-Haas C, Hörtnagel K, Nerlich A, et al. Prenatal sonographic diagnosis of skeletal dysplasias. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 2009;34(2):160-70.
176. Léonard A, Bernard P, Hiel A-L, Hubinont C. Prenatal diagnosis of fetal cataract: case report and review of the literature. *Fetal. Diagn. Ther.* 2009;26(2):61-67.
177. Happle R. Cataracts as a marker of genetic heterogeneity in chondrodysplasia punctata. *Clin. Genet.* 1981;19(1):64-66.

SERMENT DE GALIEN



*Je jure, en présence des maîtres de la faculté,
des conseillers de l'ordre des pharmaciens et
de mes condisciples :*

*D'honorer ceux qui m'ont instruit
dans les préceptes de mon art et de leur
témoigner ma reconnaissance en restant
fidèle à leur enseignement ;*

*D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma
profession avec conscience et de respecter non seulement la
législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la
probité et du désintéressement ;*

*De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs
envers le malade et sa dignité humaine.*

*En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes
connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser
des actes criminels.*

*Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à
mes promesses.*

*Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes
confrères si j'y manque.*

L'ISPB – Faculté de Pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon 1 n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

LEJARRE Fabien

Étude du gène *PEX7* dans la Chondrodysplasie Rhizomélique Ponctuée peroxysomale de type 1. Th. D. Pharm., Lyon I, 2013, 127p

La Chondrodysplasie Rhizomélique Ponctuée de type 1 (CDRP-1) est une pathologie peroxysomale appartenant au groupe des anomalies de la biogenèse des peroxysomes. C'est une maladie rare à transmission autosomique récessive. Elle recouvre un spectre d'expression clinique dont la forme classique est caractérisée par un raccourcissement des os longs proximaux, une calcification ponctuée des articulations, une atteinte du système nerveux et au niveau biochimique, par un déficit en plasmalogènes. Le décès survient souvent pendant la première année de vie. Cependant, certains phénotypes atypiques peuvent entraîner une survie jusqu'à l'âge adulte. Cette variabilité phénotypique est la conséquence d'une hétérogénéité allélique dans le gène *PEX7*. Le diagnostic repose à la fois sur des arguments cliniques, sur l'imagerie et sur l'exploration des fonctions peroxysomales. *In utero*, il est possible d'observer des signes d'appel échographiques, mais ils n'apparaissent pas avant le 2^{ème} trimestre de grossesse. Les autres formes de chondrodysplasies sont souvent difficiles à différencier. Une confirmation par des méthodes biochimiques complexes sur cellules est donc indispensable. Le diagnostic prénatal est par conséquent difficile car il nécessite un délai de trois semaines, nécessaires à la culture cellulaire et l'interprétation des résultats est parfois difficile. De plus, un résultat négatif ne permet pas d'exclure formellement une CDRP d'origine peroxysomale.

L'objectif de notre travail a consisté en la mise en place du dosage des plasmalogènes afin de confirmer l'origine peroxysomale de la chondrodysplasie. Puis, par la mise au point de l'étude du gène *PEX7* nous avons établi le diagnostic moléculaire de la plus fréquente des CDRP peroxysomale : la CDRP-1. Ce travail nous a permis de confirmer le déficit en Pex7p chez 11 patients parmi les 19 étudiés et de décrire cinq nouvelles mutations : c.100dupT (p.Cys34LeufsX22), c.646_687dup42nt (p.Thr216_Arg229dup14), c.683dupT (p.Leu228PhefsX10), c.745delA (p.Lys249AsnfsX19) et c.922G>T (p.Asp308Tyr). Pour 8 patients, aucune mutation n'a été trouvée donc une autre étiologie est à rechercher.

Le diagnostic de certitude de la CDRP-1 chez les cas index par une étude moléculaire est ainsi disponible en France. Il s'agit d'un outil précieux qui permet de proposer aux familles un conseil génétique et un diagnostic prénatal rapide.

MOTS CLÉS

Gène *PEX7*
Biogenèse des peroxysomes
Chondrodysplasie Rhizomélique ponctuée
Plasmalogènes
Maladie de Refsum

JURY

Mme GOUDABLE, Professeur des Universités - Praticien hospitalier
M. LEVADE, Professeur des Universités – Praticien hospitalier
M. ROSSI, Docteur en Médecine – Praticien hospitalier
M. CHEILLAN, Docteur en Pharmacie – Praticien hospitalier

DATE DE SOUTENANCE

Mardi 4 Juin 2013

ADRESSE DE L'AUTEUR

62, Route de Fay-Aux-Loges – 45530 Vitry-Aux-Loges