Université Sorbonne Paris Cité

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
UNIVERSITÉ HASSAN II DE CASABLANCA

Thèse de doctorat de

L'Université Hassan II Casablanca et de

L'Université Sorbonne Paris Cité

Préparée à l'Université Paris Diderot

Ecole doctorale :

Bio Sorbonne Paris Cité (BioSPC) ED 562 (France) / CEDoc en sciences de la Santé, FMPC (Maroc)

Laboratoire / Equipe de recherche :

INSERM U1141 Hôpital Robert Debré, Paris, France / Laboratoire de Génétique et Pathologies Moléculaires, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Hassan II Casablanca, Maroc

Leucodystrophies : Aspects génétiques et moléculaires au Maroc

Par Adnane KARKAR

Thèse de doctorat en génétique

Présentée et soutenue publiquement à Casablanca le 21 Juin 2018

Président du jury : Pr. EL MOUTAWAKIL Bouchra / PH / Chu Ibn Rochd - Casablanca

Rapporteurs : Pr. BENNIS Faïza / PU / Faculté des Sciences Aïn Chock- Université Hassan II - Casablanca

Rapporteurs : Pr. BELMOUDEN Ahmed / PU / Faculté des Sciences - Université Ibn Zohr - Agadir

Rapporteurs : Pr. LABAUGE Pierre / PU-PH / CHRU de Montpellier - Université de Montpellier

Directeur de thèse France : Pr .BOESPFLUG-TANGUY Odile / PU-PH / INSERM U 1141 - Université Paris Diderot

Directeur de thèse Maroc : Pr. NADIFI Sellama / PU / Faculté de Médecine - Université Hassan II - Casablanca

Membres invités : Dr. DORBOZ Imen / Chercheur / INSERM U 1141 -Université Paris Diderot

Titre

Leucodystrophies : Aspect génétique et moléculaire au Maroc

Résumé

Les leucodystrophies (LD) sont des troubles héréditaires affectant la substance blanche (SB) du système nerveux central (SNC) avec ou sans atteinte du système nerveux périphérique (SNP). Ces troubles ont en commun des anomalies de la cellule gliale ou de la gaine de la myéline. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) représente l'outil majeur pour la détection des anomalies de la SB, ainsi l'IRM accompagnée d'un examen clinique permettent d'orienter le diagnostic étiologique. La confirmation de ce diagnostic est principalement basée sur la biologie moléculaire qui permet la détermination du gène muté. Sachant qu'au Maroc aucune étude sur les leucodystrophies n'avait été réalisée auparavant, nous avons mené une étude prospective afin de déterminer le profil des patients marocains atteints de ces troubles et de mettre en place un diagnostic moléculaire des formes les plus fréquentes. Pour cela nous avons rassemblé des échantillons de familles dont un ou plusieurs membres avaient une suspicion de leucodystrophie. Par la suite nous avons réalisé un séquençage des gènes connu pour leur implication dans les leucodystrophies. Le séquençage s'est déroulé en deux phases. La première, par séquençage Sanger, a concerné les patients présentant un marqueur biochimique positif. La deuxième phase, par séquençage nouvelle génération ou Next-Generation Sequencing (NGS) a concerné les patients sans marqueurs biochimiques apparent. Cette approche nous a permis d'identifier les types de leucodystrophies présentes au sein de la population marocaine, mais aussi de mettre en évidence de nouvelles mutations.

Mots clefs

Leucodystrophies, Myéline, Sanger, NGS, Maroc.

Title

Leukodystrophies: Genetic and molecular aspects in Morocco

Abstract

Leukodystrophies are hereditary disorders affecting central nervous system white matter (WM) with or without damages in peripheral nervous system. These disorders have in common abnormalities of the glial cell and the sheath of the myelin. Magnetic resonance imaging (MRI) is the major tool to detect WM abnormalities, so MRI in association with a good clinical examination can help to provide an accurate medical diagnosis. Moreover, the confirmation of this or that leukodystrophy remains in the field of molecular biology by the detection of mutated gene translating the phenotype of the patient. Knowing that in Morocco no previous study on leukodystrophies had been carried out, we sought to know the characteristics of Moroccan patients carrying these disorders so as to be able to establish a molecular diagnosis of the most frequent forms. We collected samples from families with one or more members had a suspicion of leukodystrophy. Thus, we carried out a sequencing with an approach that consists in analyzing directly by Sanger method the leukodystrophies having a positive biochemical marker and by next generation sequencing or Next-Generation Sequencing (NGS) leukodystrophies without known biochemical markers. This approach allowed us, to identify leukodystrophies in a sample of the Moroccan population but also to identify new mutations.

Keywords

Leukodystrophies, Myelin, Sanger, NGS, Morocco.

Table des matières

INTRODUCTION 10

BIBILIOGRAPHIE 11

I. DEFINITION DES LEUCODYSTROPHIES 12

II. LA SB ET SES PRINCIPAUX CONSTITUANTS 13

1. SB et SG du SNC 13

2. Les cellules du SNC 15

a) Les neurones 15

b) Les cellules gliales 17

III. LA MYELINE 24

1. Structure 24

2. Composition chimique 25

3. Formation dans le SNC 25

4. Rôle 26

5. Remyélinisation 28

IV. CLASSIFICATION DES LEUCODYSTROPHIES 30

1. Classification neuropathologique 30

2. Classification biochimique 31

3. Classification IRM 32

V. LES PRINCIPALES FORMES DE LEUCODYSTROPHIES 33

1. Leucodystrophies hypomyélinisantes ou HLD 33

a) Maladie de Pelizaeus Merzbacher et les leucodystrophies hypomyélinisantes liées à des mutations du gène *PLP1* des protéolipoproteines, (HLD1). 35

b) Maladie de Pelizaeus-Merzbacher-Like ou leucodystrophies hypomyélinisantes par mutation *GJC2* (HLD 2) 36

c) Leucodystrophies hypomyélinisantes par mutation des gènes impliqués dans le fonctionnement de la polymérase 3 (*POLR3A, POLR3B* et *POLR1C*) (HLD 7, HLD8 et HLD11) 37

d) Leucodystrophies hypomyélinisantes avec atrophie des ganglions de la base et du cervelet (H-ABC) liées à des mutations *TUBB4A* (HLD6) 37

e) Hypomyélinisation avec atteinte du tronc cérébral et de la moelle épinière et spasticité des jambes (HBSL) 38

f) Syndrome d'hypomyélinisation-cataracte congénitale (HCC) 38

2. Leucodystrophies démyélinisantes 39

a) Leucodystrophies démyélinisantes identifiées par un marqueur biochimique 41

b) Leucodystrophies démyélinisantes avec un aspect œdémateux avec ou sans cavitation 46

c) Leucodystrophies avec calcifications 48

d) Les autres leucodystrophies avec aspect d'IRM évocateurs 49

e) Les leucodystrophies de l'adulte sans marqueurs d'IRM spécifiques 51

Objectifs 53

Matériels et méthodes 54

Etude expérimentale 56

L'extraction d'ADN 56

Séquençage des gènes impliqués 57

Séquençage par méthode Sanger 57

Séquençage nouvelle génération (NGS) : puce panel de gènes 57

Analyse bio-informatique 62

Résultats 63

PUBLICATIONS 64

Publication 1 : Adrénoleucodystrophie liée à l'X 64

Publication 2 soumise : Leucodystrophie Métachromatique 69

Publication 3 soumise : Syndrome d'Aicardi-Goutières 82

Résultat globale 94

Approche gène candidat 95

1. Adrénoleucodystrophie liée à l'X (ALD-X) 95

2. Leucodystrophie Métachromatique (MLD) 99

3. Hypomyélinisation et Cataracte Congénitale (HCC) 103

Approche par panel de gènes 104

1. Le Syndrome CACH 104

2. Pelizaeus-Merzbacher-Like (PMLD) 105

Approche screening 106

1. Syndrome d'Aicardi Goutières (AGS) 106

Discussion 111

Conclusion et perspectives 116

Bibliographie 118

Annexe 1 124

Annexe 2 128

Index 129

Liste des figures

Figure 1 : Schéma de la SB 14

Figure 2 : Neurone 15

Figure 3 : Développement des NSC 17

Figure 4 : Marquage d'astrocyte 18

Figure 5 : Rôle des astrocytes 20

Figure 6 : Marquage d'oligodendrocyte 21

Figure 7 : Représentation schématique de la maturation oligodendrocytaire 22

Figure 8 : Marquage des cils dans des cellules épendymaires 23

Figure 9 : Gaine de myéline 25

Figure 10 : Formation de la myéline dans le SNC 26

Figure 11 : Conduction dans les fibres nerveuse 27

Figure 12 : Le rôle métabolique de la myéline 28

Figure 13 : Physiopathologie de la SEP 29

Figure 14 : Remyélinisation. 29

Figure 15 : Classification neuropathologique des leucodystrophies 30

Figure 16 :Leucodystrophies hypomyélinisantes et démyélinisantes 33

Figure 17 : IRM leucodystrophies hypomyélinisantes 34

Figure 18 : IRM leucodystrophies démyélinisantes 40

Figure 19 : Préparation de la librairie avec le TruSeq Custom Amplicon. 58

Figure 20 : Préparation des clusters et séquençage par MiSeq Illumina 61

Figure 21 : Schéma globale de l'étude. 94

Figure 22 : IRM cérébrale du patient 1. 96

Figure 23 : Emplacement du codon 559 96

Figure 24 : Mutation c.1877C>A chez le patient 2 et sa mère 97

Figure 25 : IRM cérébrale du patient 3 98

Figure 26 : Mutation c.1992-1G>A chez le patient 3 et sa mère. 99

Figure 27 : IRM cérébrale de la patiente 4 100

Figure 28 : IRM cérébrale du patient 5 101

Figure 29 : Mutation c.1283C>T chez les patients 4 et 5 101

Figure 30 : IRM cérébrale du patient 6 102

Figure 31 : Mutation c. c.877C>T chez la patiente 6 et sa mère. 103

Figure 32: IRM cérébrale de la patiente 7 104

Figure 33 : IRM en FLAIR du patient 9 105

Figure 34 : IRM en coupe axiale sur pondération T2 et FLAIR et sagittale sur pondération T1 106

Figure 35 : Analyse de ségrégation de la mutation A177T chez les patients 11,12 et 13. 109

Liste des tableaux

Tableau 1: Les leucodystrophies 13

Tableau 2 : Fréquences alléliques et génotypiques de la mutation A177T 107

Tableau 3 : Fréquences alléliques de la mutation A177T dans plusieurs bases de données .. 107

Tableau 4 : Récapitulatif des résultats obtenues 110

Tableau 5 : Mutations des leucodystrophies chez des patients d'origine marocaine 113

INTRODUCTION

Cette thèse a été réalisée grâce à une coopération scientifique Franco Marocaine entre le Laboratoire de l'INSERM U1141, Hôpital Robert Debré à Paris et le Laboratoire de Génétique et Pathologies Moléculaires, Faculté de Médecine et de Pharmacie à Casablanca.

Sachant qu'au Maroc il n'existe pas de diagnostic moléculaire pour les leucodystrophies, et que ces maladies sont souvent méconnues des neurologues et des radiologues. Cette collaboration a eu pour but de faire profiter la partie marocaine de l'expertise développée par l'équipe française dans le domaine des leucodystrophies.

Une cotutelle de thèse a donc été convenue entre l'Université Hassan II Casablanca et l'Université Paris Diderot (Paris 7). Cette cotutelle nous a permis de mener un travail prospectif au sein de la population marocaine, et de rassembler un échantillonnage de patients présentant une suspicion de leucodystrophie. Par la suite nous avons étudié les données de ces patients avec les équipes de l'Hôpital Robert Debré à Paris, et nous avons séquencé l'ADN des patients dont le dossier a été validé sur le plan clinique et radiologique.

A terme, ce projet de thèse devait nous permettre d'identifier les leucodystrophies les plus répandus au sein de la population marocaine, mais aussi de mettre en place, à Casablanca, un diagnostic moléculaire de ces leucodystrophies.

Après une bibliographie centrée sur la classification des leucodystrophies, nous présenterons nos résultats avec les 3 publications associées.

BIBILIOGRAPHIE

A partir de la définition récente des leucodystrophies nous allons centrer notre travail bibliographique sur la substance blanche (SB) et son principal constituant la myéline, sur la classification selon l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et enfin sur les outils moléculaires à notre disposition en diagnostic.

I. DEFINITION DES LEUCODYSTROPHIES

La dernière définition en vigueur des leucodystrophies et celle établie par le consortium GLIA (The Global Leukodystrophy Initiative) (Vanderver et al., 2015) et qui définit les leucodystrophies comme étant « des maladies d'origine génétique affectant la SB du système nerveux central (SNC) avec ou sans atteinte du système nerveux périphérique (SNP). Ces troubles ont en commun des anomalies des cellules gliales ou de la gaine de myéline ». Lorsque la neuropathologie est connue, elle est principalement caractérisée par l'implication d'oligodendrocytes, d'astrocytes et d'autres types de cellules non neuronales, bien que dans de nombreux cas, le mécanisme de la maladie demeure inconnu.

À l'IRM, la SB affectée se présente par une hyperintensité de signal en T2 alors que le signal T1 peut être variable. Un signal T1 légèrement hypo-, iso- ou hyperintense par rapport au cortex peut être associé à une leucodystrophie hypomyélinisante. Par contre la leucodystrophie démyélinisante conduit à un signal T1 fortement hypointense.

Les leucodystrophies n'incluent pas les troubles acquis de la myéline dans le SNC, tels que la sclérose en plaques et les processus de démyélinisation associés, les lésions de la SB infectieuses et post-infectieuses, les lésions toxiques et les atteintes vasculaires non génétiques.

Par ailleurs, les maladies du SNC dans lesquelles la neuropathologie montre une implication primaire des neurones ou d'autres structures de la matière grise dans le cortex cérébral, ne doivent pas être qualifiée de leucodystrophies. Aussi les erreurs innées du métabolisme, dans lesquelles prédominent les manifestations cliniques d'une maladie systémique, comme le foie, les muscles ou le cœur, mais dans lesquelles l'IRM cérébrale présente des anomalies significatives de la SB, sont qualifiées de leucoencéphalopathies et non de leucodystrophies.

Finalement le consortium a établi une liste de 30 maladies qui rentrent dans cette définition (Tableau 1). Cependant, cette liste évolue rapidement avec la découverte de nouveaux gènes.

Tableau 1: Les leucodystrophies (Vanderver et al., 2015)

Name of disorder	% of respondents classifying as a leukodystrophy on first surveys
Pol-III related disorders (4H syndrome (hypomyelination, hypodontia and hypogonadotropic hypogonadism))	83.3%
18q minus syndrome	71.4%
X linked Adrenoleukodystrophy (X-ALD)*	100%
Adult onset leukodystrophy with neuroaxonal spheroids and pigmented glia (including hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids, HDLS, and pigmentary type of orthochromatic leukodystrophy with pigmented glia, POLD)	70%
Aicardi–Goutières Syndrome (AGS)	91.7%
Alexander disease (AxD)	91.7%
Autosomal Dominant Leukodystrophy with Autonomic disease (ADLD)*	100%
Canavan disease*	100%
Cerebrotendinous Xanthomatosis (CTX)	72.7%
Chloride Ion Channel 2 (ClC-2) related leukoencephalopathy with intramyelinic oedema	63.6%
eIF2B related disorder (Vanishing White Matter Disease or Childhood ataxia with central nervous system hypomyelination (CACH))	91.7%
Fucosidosis	83.3%
Globoid cell Leukodystrophy (Krabbe)*	100%
Hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum (H-ABC)	91.7%
Hypomyelination with brainstem and spinal cord involvement and leg spasticity (HBSL)*	100%
Hypomyelination with congenital cataract (HCC)	91.7%
Leukoencephalopathy with brainstem and spinal cord involvement and lactate elevation (LBSL)	91.7%
Leukoencephalopathy with thalamus and brainstem involvement and high lactate (LTBL)	81.8%
Megalencephalic Leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC)*	100%
Metachromatic leukodystrophy (MLD) and its biochemical variants*	100%
Oculodentodigital dysplasia	71.4%
Pelizaeus Merzbacher disease (PMD) *	100%
Pelizaeus Merzbacher like-disease (PMLD)*	100%
Peroxisomal Biogenesis disorders (including Zelleweger, neonatal Adrenoleukodystrophy and Infantile Refsum)	70%
Polyglucosan Body Disease (PGBD)	72.7%
RNAse T2 deficient leukoencephalopathy	72.7%
Sialic acid storage disorders (Salla disease, Infantile Sialic Acid Storage Disease and Intermediate form)	83.3%
Single enzyme deficiencies of peroxisomal fatty acid beta oxidation (including only D-Bifunctional Protein Deficiency; Sterol Carrier Protein X (SCPx) deficiency; Peroxisomal acyl-CoA-Oxidase Deficiency)	75%
Sjögren–Larsson syndrome*	100%
SOX10-associated PCWH: peripheral demyelinating neuropathy, central dysmyelinating leukodystrophy, Waardenburg syndrome, and Hirschsprung disease	70%
Total	More than 30 distinct leukodystrophies

II. LA SB ET SES PRINCIPAUX CONSTITUANTS

1. SB et SG du SNC

Le système nerveux comprend deux grandes parties, le SNC et le SNP. Il existe une continuité fonctionnelle entre ces deux compartiments. Le SNC a pour rôle de recevoir, enregistrer, interpréter les signaux qui parviennent de la périphérie et d'organiser la réponse à envoyer, il est formé de substance grise (SG) et de SB (Figure 1).

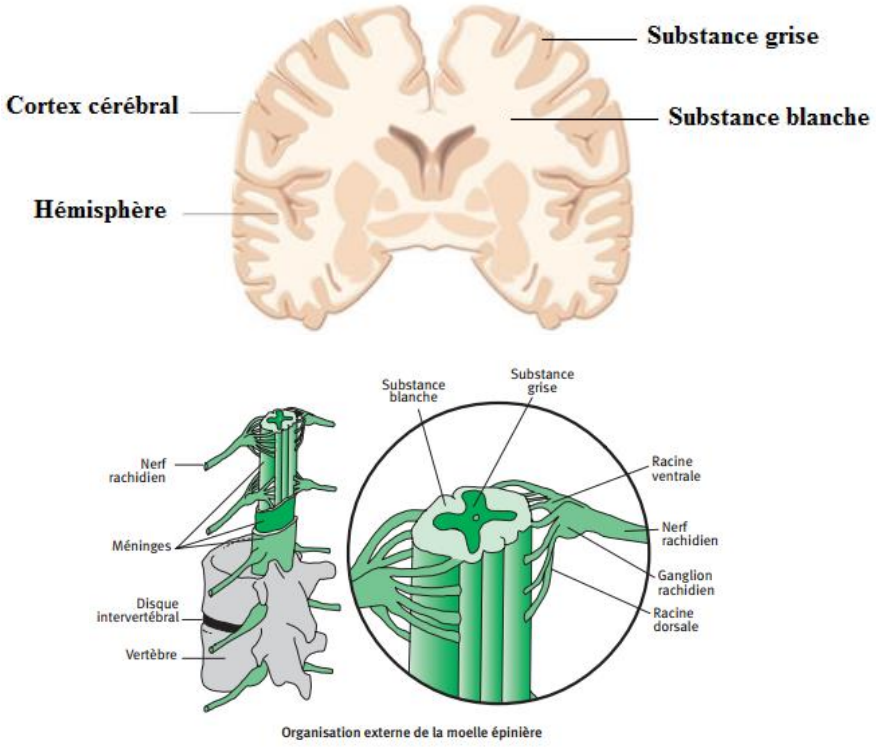


Figure 1 : Schéma de la SB (academie-en-ligne.fr)

Les constituants du SNC sont l'encéphale et la moelle épinière. L'encéphale comprend le cerveau, le tronc cérébral, et le cervelet.

La SG correspond aux régions du SNC où s'établissent les contacts entre les neurones et c'est dans cette zone que siègent toutes les synapses du SNC. C'est donc dans la SG que sont reçues, traitées et intégrées les informations. Elle est constituée par le groupement des corps cellulaires neuronaux et des structures gliales associées.

La SB à l'inverse de la SG ne contient aucun corps cellulaire de neurone et aucune synapse. Le fait dominant est le groupement en faisceaux des axones myélinisés qui se dirigent vers leur destination dans le cerveau, ou le reste du corps. Les cellules gliales se disposent entre ces faisceaux. Les capillaires sanguins sont peu nombreux. La SB est avant tout un organe de conduction de l'influx nerveux et son organisation est très différente de celle de la SG.

2. Les cellules du SNC

a) Les neurones

Le neurone est une cellule anatomiquement et physiologiquement spécialisée dans la réception, l'intégration et la transmission d'informations. Le neurone est composé d'un corps cellulaire, des dendrites, d'un axone, et de synapses (Figure 2).

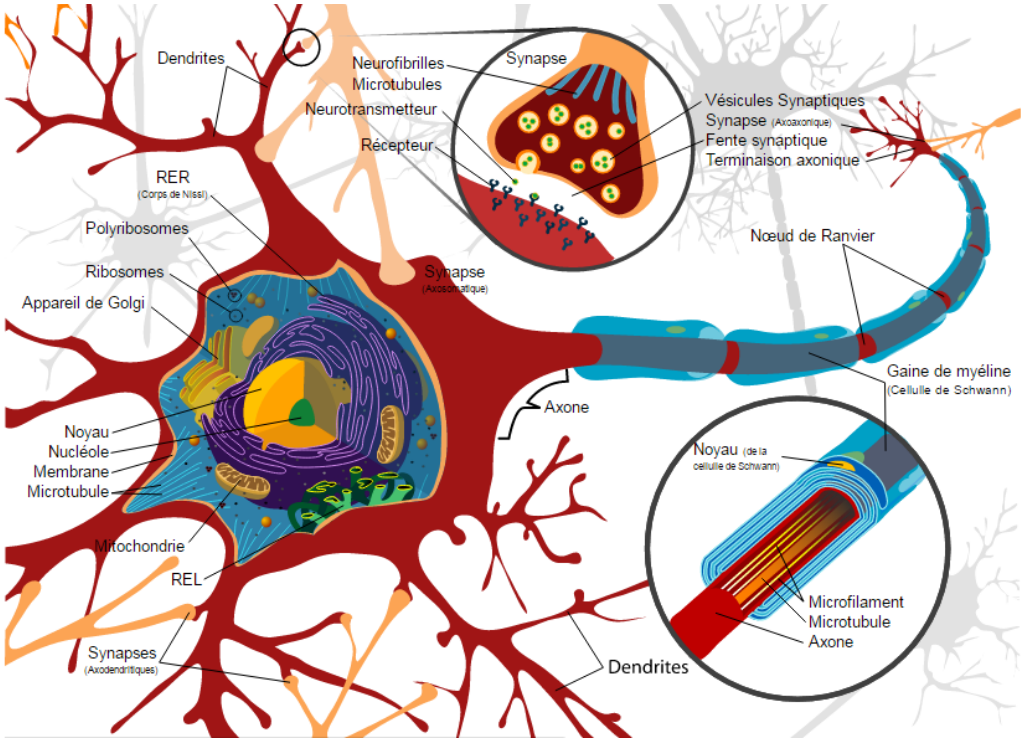


Figure 2 : Neurone (LadyofHats, 2007)

i. Le corps cellulaire

Le corps cellulaire du neurone est de formes et de tailles variées. Arrondi ou ovalaire, parfois triangulaire ou pyramidal, il peut mesurer de 5 à 120 microns de diamètre. Il comporte un noyau unique et un cytoplasme contenant les éléments communs à toutes les cellules. Le cytoplasme est riche en organites, il contient de nombreux corps de Nissl, substance basophile caractéristique témoin de l'activité enzymatique, l'appareil de Golgi, des mitochondries et de nombreux éléments du cytosquelette à savoir des microfilaments, neurofilaments et microtubules.

ii. Les dendrites

Ce sont des prolongements courts, ramifiés, nombreux, qui s'allongent comme des antennes à partir du corps cellulaire. Cette arborisation offre ainsi une plus grande surface de contact entre les cellules nerveuses.

iii. L'axone

L'axone, en général unique, est le prolongement le plus long du neurone. Il se termine par de nombreuses ramifications comparables aux dendrites, les boutons terminaux. Le mode de ramification de l'axone et des dendrites est très divers. La multiplicité de ces terminaisons dendritiques fait qu'un axone peut recevoir jusqu'à 100000 entrées. L'axone est constitué d'une enveloppe, l'axolemne et d'un cytoplasme appelé axoplasme. Prolongement du cytoplasme cellulaire, l'axoplasme en diffère par l'absence de corps de Nissl et d'appareil de Golgi. Les organites et éléments du cytosquelette s'alignent longitudinalement, parallèlement à l'axe de l'axone. L'axoplasme ne peut assurer la synthèse et le renouvellement des macromolécules qui le constituent. Ces macromolécules proviennent du corps cellulaire et sont apportées grâce au transport axonal. L'axolemne est le prolongement de la membrane cellulaire. Il est recouvert d'une gaine. Il existe deux sortes de gaines permettant de différencier les fibres myéliniques des fibres amyéliniques.

Dans les fibres myéliniques, l'axolemne est recouvert d'un enroulement de myéline, et cette gaine présente par place des étranglements appelés nœuds de Ranvier. La myéline donne aux fibres qu'elle recouvre un aspect blanchâtre. Les fibres myéliniques constituent la SB du tissu cérébral. Par contre les fibres amyéliniques ou fibres nues, d'un diamètre plus petit, sont recouvertes directement par les cellules de Schwann.

iv. Les synapses

Les synapses sont des zones de contact spécialisées entre les neurones, ou entre le neurone et son site effecteur. Elles assurent le transfert des signaux entre les cellules. On distingue des synapses électriques, en contact direct les unes avec les autres, et qui permettent une propagation rapide des signaux électriques entre deux cellules. Elles sont rares chez l'homme. Des synapses chimiques qui utilisent un neurotransmetteur pour transmettre l'information. Il existe un espace large de 20 à 30 nanomètres entre les deux éléments cellulaires : c'est la fente synaptique. Elle est traversée par le neurotransmetteur libéré par l'élément pré-synaptique qui

transmet le signal à l'élément post-synaptique, et finalement des synapses mixtes, qui associent une synapse chimique et une synapse électrique.

Le neurone n'est pas la seule cellule présente dans le système nerveux, il existe également un tissu de soutien et des cellules nourricières dites cellules gliales.

b) Les cellules gliales

Les cellules gliales ou névroglie ont longtemps été considérées comme un simple tissu de soutien. Elles jouent en fait des rôles divers et complexes indispensables au fonctionnement des neurones. On distingue plusieurs types de cellules gliales. Les astrocytes, les oligodendrocytes, et les cellules épendymaires sont toutes issues des cellules souches neurales (Neural Stem Cells ou NSC) présentent autour du tube neural puis des cavités ventriculaires au cours du développement du cerveau (Figure 3). Elles constituent la macroglie.

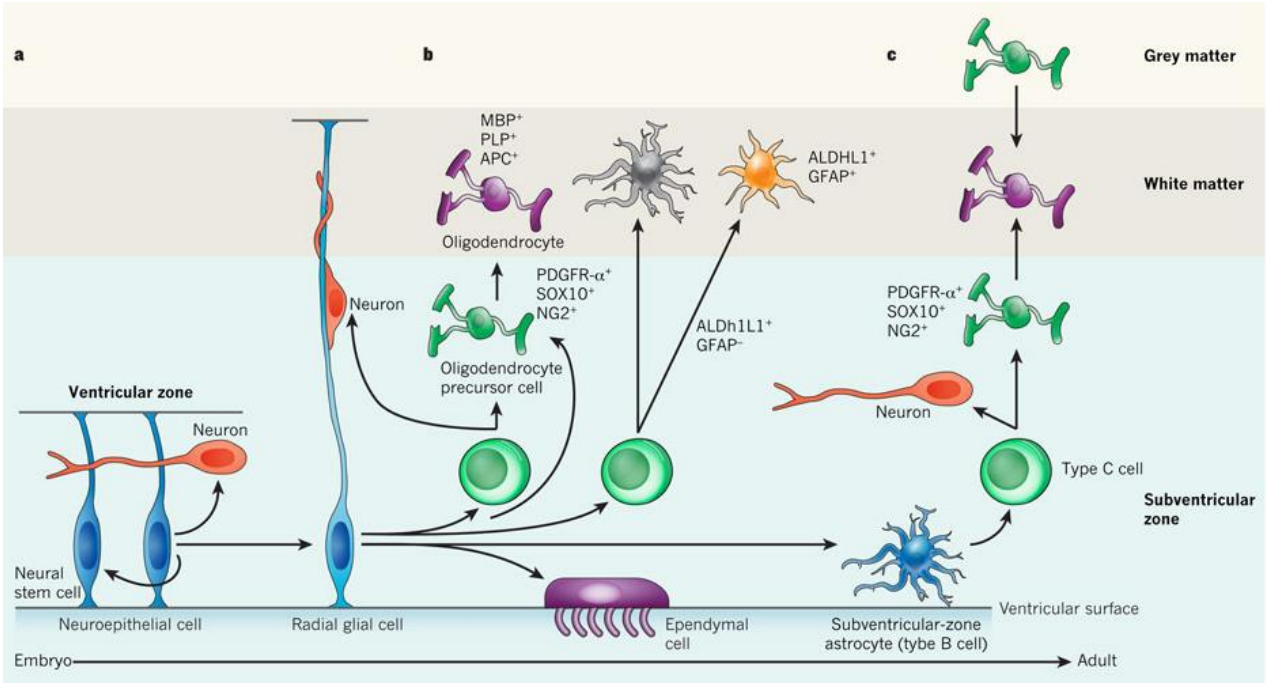


Figure 3 : Développement des NSC.

A l'opposée les cellules microgliales sont produites à l'extérieur du cerveau à partir des cellules souches hématopoïétiques (HSC) de la moelle osseuse, puisqu'il s'agit de monocytes destinés à maturée dans le système nerveux. Elles constituent la microglie.

i. Les astrocytes

Pour revue (Lundgaard et al., 2014).

Les astrocytes représentent le type de cellules gliales le plus abondant et le plus divers dans le SNC (Figure 4). Dans le cerveau les astrocytes proviennent de cellules gliales radiales, alors que dans la moelle épinière ils proviennent de plusieurs types de cellules progénitrices. Elles assurent le support métabolique du SNC à l'interface entre les vaisseaux sanguins et le parenchyme cérébral, ainsi qu'entre la bordure épendymaire des cavités ventriculaires et le parenchyme cérébral.

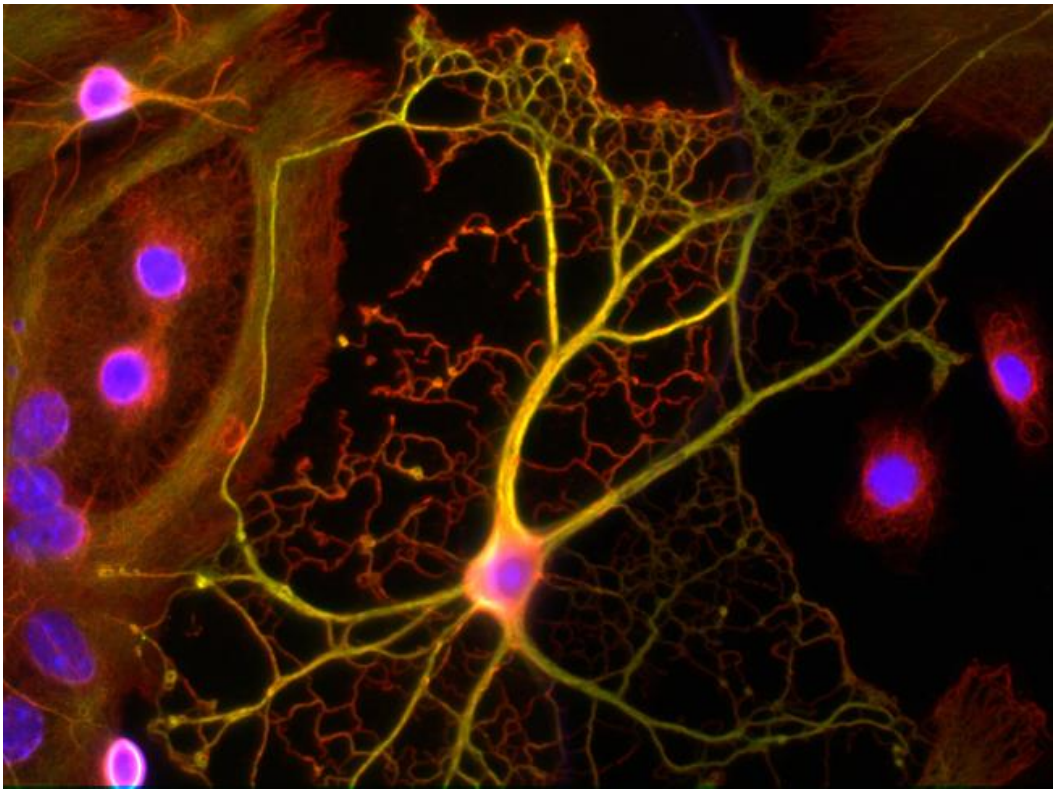


Figure 4 : Marquage d'astrocyte (Inserm).

Une fois arrivés à maturation, les astrocytes contiennent des protéines filamenteuses telles que la vimentine, la nestine, la desmine, la synemine et surtout la GFAP (Glial Fibrillary acidic Protein) qui est une protéine exclusivement exprimée par les astrocytes dans le cerveau.

Les astrocytes sont des cellules hétérogènes associés aux différents constituants des neurones (corps cellulaires, fibres, synapses). Ils ont globalement un aspect étoilé, ramifié, autour d'un corps cellulaire volumineux. La présence ou non de différents marqueurs ont permis de démontrer leurs hétérogénéités et leur plasticité au cours du développement et en situation de stress. La densité de leur ramification a ainsi permis de les classer en 2 principaux types :

- Protoplasmiques : très ramifiés plutôt présents dans la SG, ils présentent une faible expression des vimentine, nestine, GFAP et CD44.
- Fibreux : d'aspect plus allongé peu ramifié, ils sont présents d'avantage dans la SB, et contrairement aux protoplasmiques, les astrocytes fibreux expriment fortement la vimentine, nestine, GFAP et CD44.

Les astrocytes assurent les contacts intercellulaires. Certains de leurs prolongements sont en contact direct avec la membrane basale des vaisseaux qu'ils entourent complètement.

L'espace extracellulaire entre les astrocytes est important, sauf au niveau du pied des astrocytes qui sont en contact avec les vaisseaux sanguins. Les jonctions intercellulaires sont serrées et ne permettant pas la présence ou la circulation d'un liquide extracellulaire extravasculaire. Les astrocytes constituent une barrière anatomique s'opposant à la pénétration des liquides et substrats intravasculaires. Ils sont les constituants de la barrière hémato-encéphalique

Les astrocytes ont plusieurs fonctions clés. Avec la microglie, ils ont un rôle central dans la réaction aux blessures en libérant un certain nombre de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interféron alpha. Ils sont essentiels pour faciliter la myélinisation lors développement du système nerveux, en contrôlant la prolifération et la migration des oligodendrocytes et en produisant le facteur de croissance dérivé des plaquettes-a (PDGFa). Les astrocytes jouent également un rôle crucial dans la formation et le maintien de la barrière hémato-encéphalique.

Ces caractéristiques donnent aux astrocytes un rôle central dans la régulation de l'environnement extracellulaire. Ils contrôlent la dynamique du flux sanguin cérébral afin d'accroître la disponibilité de l'oxygène et du glucose, ils jouent un rôle central dans le maintien du pH physiologique malgré les changements ioniques, ils sont les seules cellules du SNC qui stockent du glycogène.

Il est à noter qu'il n'y a pas seulement des interactions directes avec les oligodendrocytes et les cellules gliales, mais aussi avec les neurones car ils sont capables de détecter et de moduler l'activité neuronale (Figure 5).

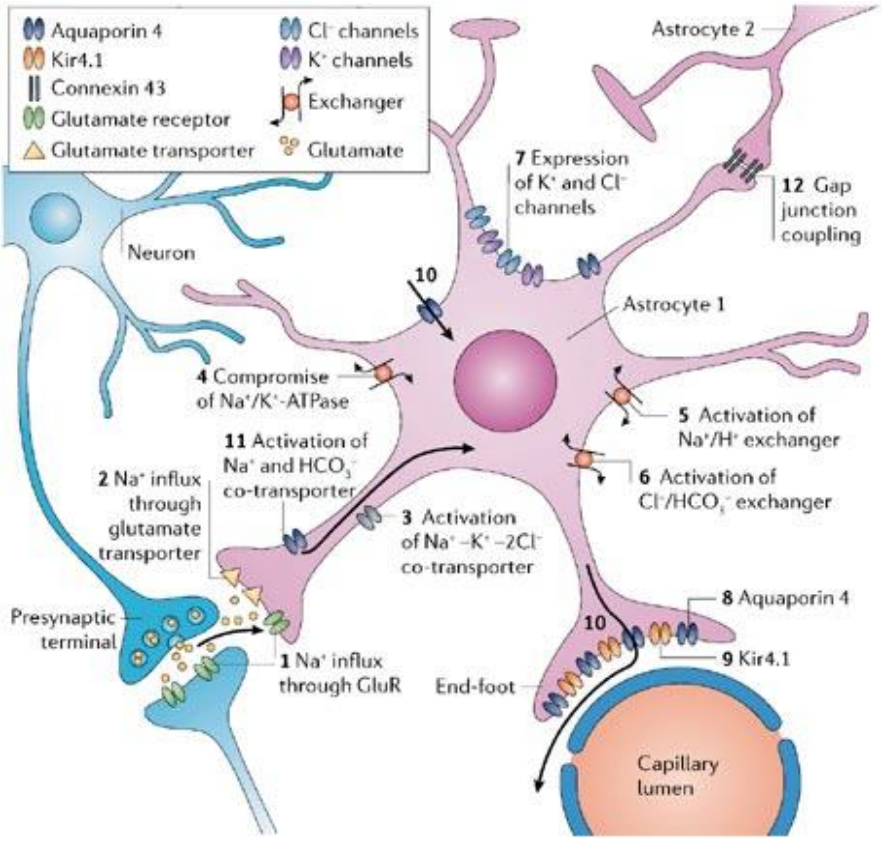


Figure 5 : Rôle des astrocytes

En résumé, les astrocytes sont des cellules fondamentales qui jouent un rôle important dans la myélinisation normale pendant le développement, dans le maintien du bon environnement pour un cerveau sain et dans la modulation de l'activité neuronale normale.

ii. Les oligodendrocytes

Pour revue (Simons and Nave, 2016)

Les oligodendrocytes sont responsables de la formation des gaines de myéline autour des prolongements des neurones (Figure 6). Ce sont des cellules plus petites et moins nombreuses que les astrocytes. Leur rôle principal est l'élaboration de la myéline qui entoure les axones.

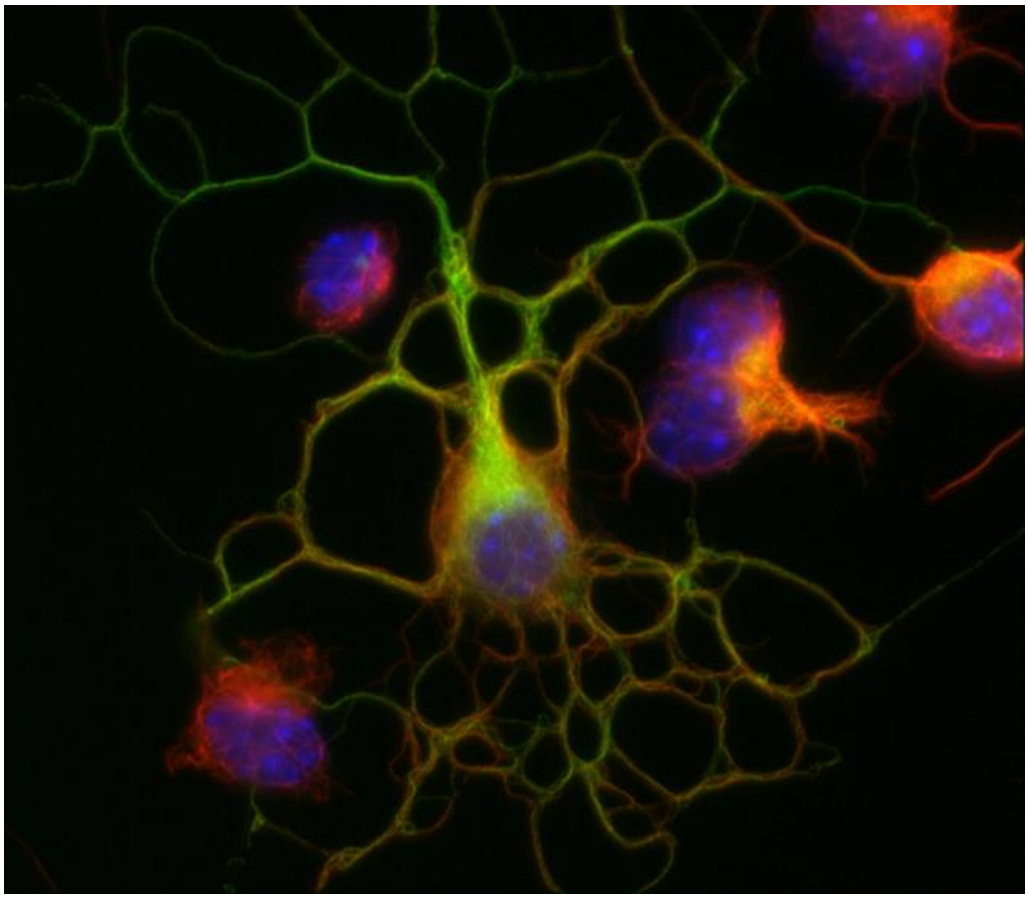


Figure 6 : Marquage d'oligodendrocyte (Inserm).

La maturation des oligodendrocytes se caractérise par quatre étapes principales : cellules progénitrices précoces et tardives, oligodendrocytes immatures et matures. Il s'agit d'un processus complexe finement réglementé par un grand nombre de facteurs et de molécules différents tels que les facteurs de transcription et les protéines de la matrice extracellulaire.

La dernière étape de la maturation est représentée par la production de myéline dans laquelle les prolongements d'oligodendrocytes matures forment une structure qui s'enroule autour des axones neuronaux. Chacune de ces étapes se caractérise par des modifications morphologiques et la synthèse de marqueurs spécifiques (Figure 7).

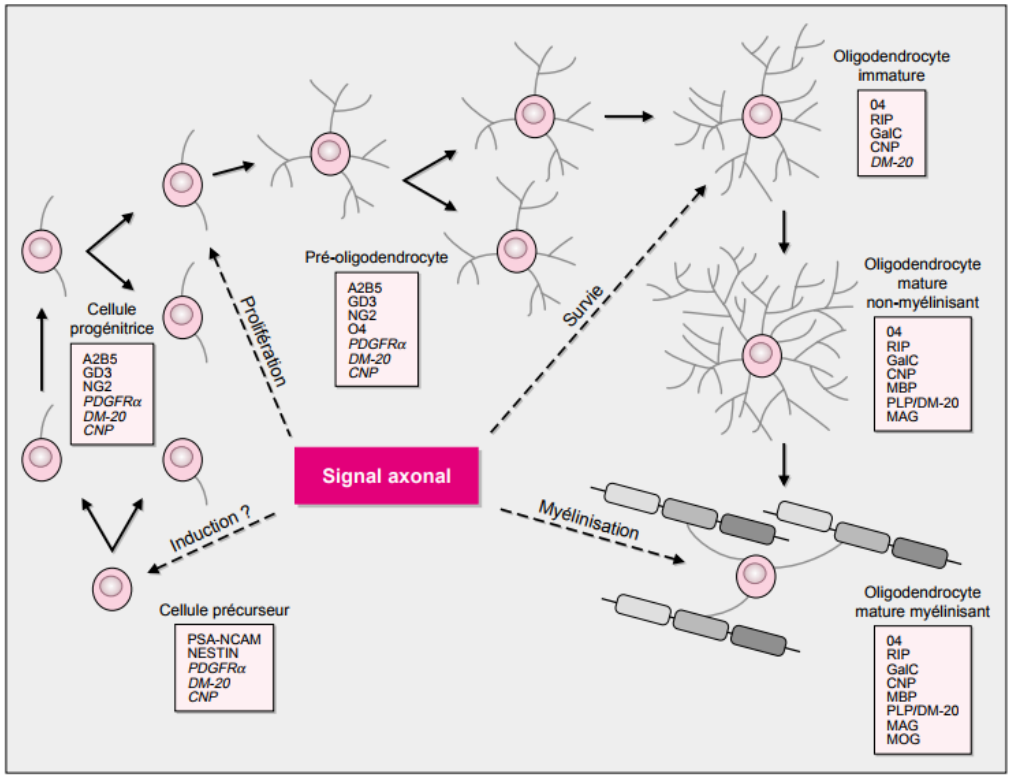


Figure 7 : Représentation schématique de la maturation oligodendrocytaire (Lubetzki et al., 1997).

iii. Les cellules épendymaires ou épendymocytes

Pour revue (Conductier et al., 2013)

Ce sont des cellules cylindriques ou cubiques à noyau volumineux qui recouvrent et tapissent les cavités ventriculaires de l'encéphale et le canal central de la moelle épinière. Elles jouent un rôle important dans les échanges entre le LCR et le parenchyme cérébral.

Chacune de ces cellules possède à sa surface quelques dizaines de cils (Figure 8). Leur battement se fait en rythme à une fréquence très élevée, de l'ordre d'une dizaine de mouvements par seconde permettant ainsi la synchronisation globale du flux en bordure des ventricules cérébraux. Plusieurs cellules voisines sont couplées entre elles par des jonctions communicantes qui permettent la diffusion de différentes molécules, comme les ions calcium, capables de moduler la fréquence de battement des cils.

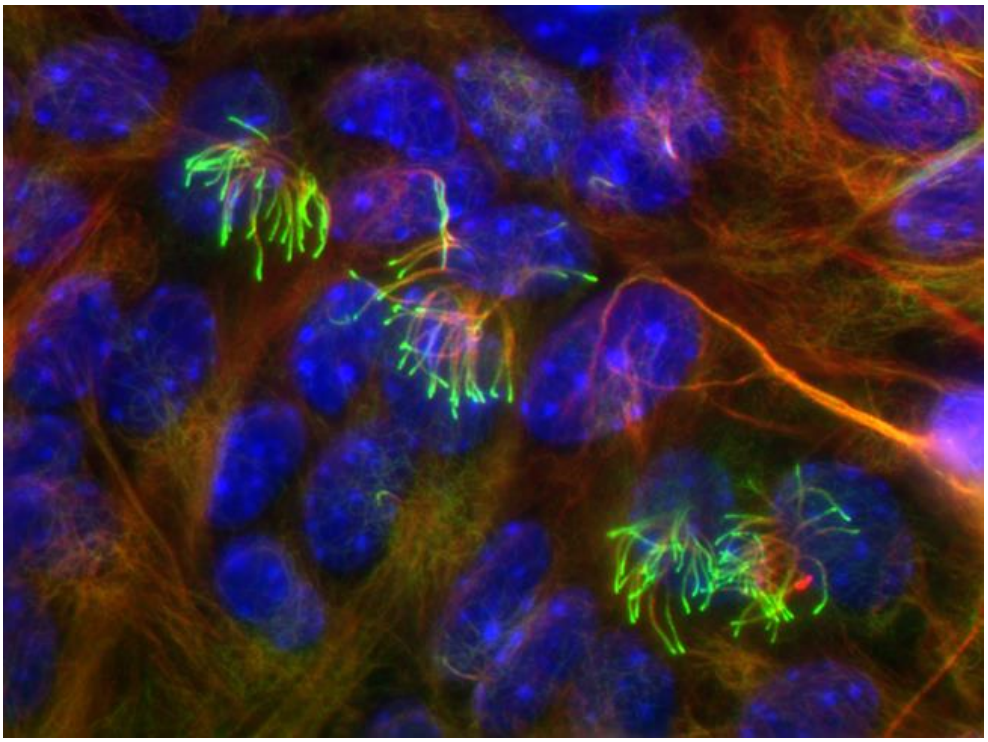


Figure 8 : Marquage des cils dans des cellules épendymaires (Inserm).

iv. La microglie

Pour revue (Bennett et al., 2016)

Les cellules microgliales sont des monocytes qui sont entrés dans le tissu nerveux et se sont transformés en s'adaptant à leur nouveau milieu. Elles se caractérisent donc par la capacité à libérer de nombreuses cytokines. En cas d'agression du tissu nerveux, ces cellules microgliales sont activées et permettent d'attirer en particulier des macrophages.

En raison de la lignée partagée de microglie et de macrophages, de nombreux marqueurs sont communs aux deux types de cellules. Ainsi, les marqueurs cellulaires les plus classiquement utilisées pour identifier leur présence sont :

- TMEM119 : c'est une protéine de surface cellulaire et un marqueur microglial spécifique pour la souris et de l'homme. Contrairement à d'autres marqueurs microgliaux, ce marqueur présente l'avantage d'être spécifique, il n'est pas être exprimé par les macrophages ou par d'autres types de cellules immunitaires ou neuronales.
- CD11b et CD45 : Une combinaison du marquage CD11b et CD45 peut être utilisée pour distinguer la microglie des macrophages.

- Iba1 : c'est une protéine de liaison au calcium spécifique aux microglies et aux macrophages. Elle est impliquée dans le réarrangement membranaire et la phagocytose dans la microglie activée.
- CX3CR1 : c'est le récepteur fractalkine, il est exprimé à la surface de la microglie et des macrophages dans le SNC.
- F4/80 : c'est une glycoprotéine de 160 KDa exprimée à la surface des macrophages et de la microglie au repos.
- CD68 : c'est une protéine lysosomale fortement exprimée par les macrophages et la microglie activée. Par contre cette protéine est faiblement exprimée par la microglie au repos.
- CD40 : c'est une molécule de surface cellulaire nécessaire à la présentation de l'antigène, elle est exprimée par la microglie et les macrophages activés.

III. LA MYELINE

La gaine de myéline est une structure recouvrant les axones du SNC et du SNP. Elle est constituée par une succession d'internodes séparés les uns des autres par de très courts espaces dépourvus de myéline, les nœuds de Ranvier.

1. Structure

En coupe transversale la gaine de myéline se présente comme une structure lamellaire spiralée, régulièrement ordonnée, constituée par l'alternance de lignes denses et de bandes claires. La disposition périodique de la myéline résulte d'un phénomène complexe d'enroulement autour de l'axone et d'accolements de la membrane de la cellule myélinisante (Figure 9).

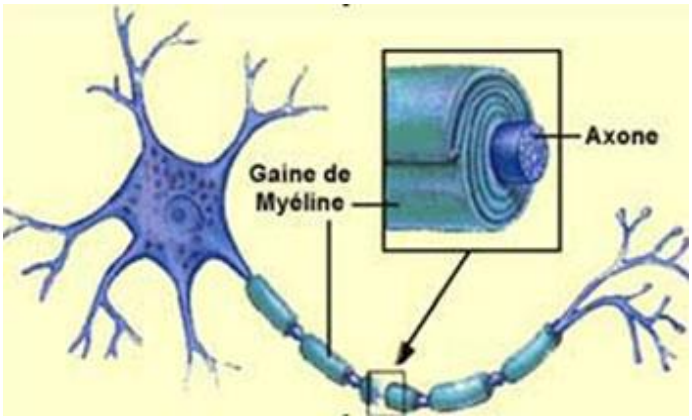


Figure 9 : Gaine de myéline (gsep.fr)

2. Composition chimique

La myéline du SNC contient 70% de graisses et 30% de protéines. Cette richesse en graisses exclut l'eau et les ions qui y sont dissouts, et fait de la myéline un bon isolant électrique. Son architecture moléculaire dans le SNP est différente de celle du SNC. Ces différences importantes dans la nature et la proportion des protéines expliquent que la myéline de SNC et celle du SNP soient l'objet de pathologies différentes.

3. Formation dans le SNC

Les oligodendrocytes disposés entre les fibres nerveuses myélinisées assurent la formation de la myéline du SNC par l'enroulement de leurs prolongements cytoplasmiques autour des axones (Figure 10). Ils envoient un certain nombre de prolongements qui s'enroulent autour des axones adjacents. Ainsi un oligodendrocyte myélinise en moyenne une quarantaine d'internodes situés sur des fibres nerveuses différentes dans le SNC. Ils enroulent leur propre membrane plasmique en couches superposées qui forment une spirale serrée autour de l'axone au niveau d'un internode. Chacun d'eux est séparé des internodes adjacents par les nœuds de Ranvier, zone de l'axone dépourvue de myéline et entourée par des prolongements astrocytaires. La disposition des lamelles myéliniques s'explique par le mode de formation de la myéline.

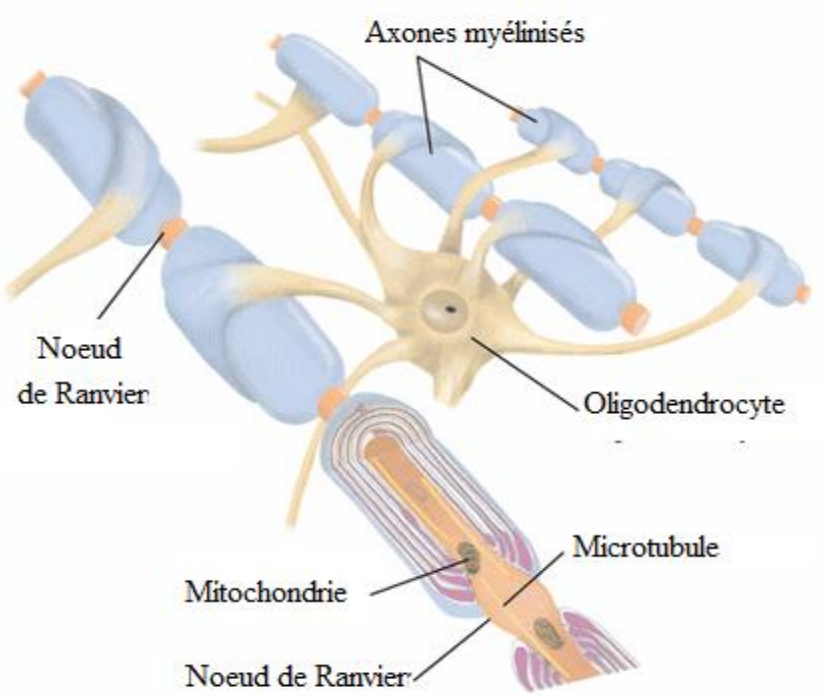


Figure 10 : Formation de la myéline dans le SNC (docplayer.hu)

4. Rôle

Pour revue (Nave, 2010)

La myéline est indispensable pour que l'axone conduise l'influx nerveux. Les nœuds de Ranvier, zones de faible résistance électrique dans lesquelles les canaux sodium sont concentrés, représentent donc la zone privilégiée pour le déclenchement des potentiels d'action (Figure 11). La gaine de myéline, excellent isolant électrique, permet la propagation passive des courants associés au potentiel d'action. La conduction nerveuse le long de l'axone myélinisé s'effectue de façon saltatoire, comme si l'influx nerveux sautait d'un nœud de Ranvier à l'autre. Au niveau des nœuds de Ranvier, la membrane de l'axone présente trois régions successives dont l'organisation moléculaire est différente : la région nodale très riche en canaux-sodium, la région para-nodale où les languettes terminales de la myéline s'attachent fortement à l'axone grâce à des molécules d'adhérence et la région juxta-paranodale très riche en canaux potassium. L'absence de la gaine de myéline engendre la disparition des nœuds de Ranvier provoquant la répartition diffuse des canaux sodium, potassium et autres molécules le long de l'axone dénudé. Pour initier la remyélinisation, ces diverses molécules doivent se concentrer à des endroits précis de l'axone pour former de nouveaux nœuds de Ranvier. Un défaut lors de cette étape pourrait être un des facteurs qui empêche la réparation de la myéline. L'énergie utilisée dans les

fibres myélinisées est minimale puisque la propagation de l'influx nerveux est restreinte aux régions nodales. La vitesse de conduction dépend du diamètre de la fibre, plus le diamètre est important, plus les gaines de myéline sont épaisses et plus la vitesse de conduction est élevée. Ainsi, la myélinisation des axones accélère la conduction de l'influx nerveux, au moindre coût énergétique et dans le minimum d'espace possible.

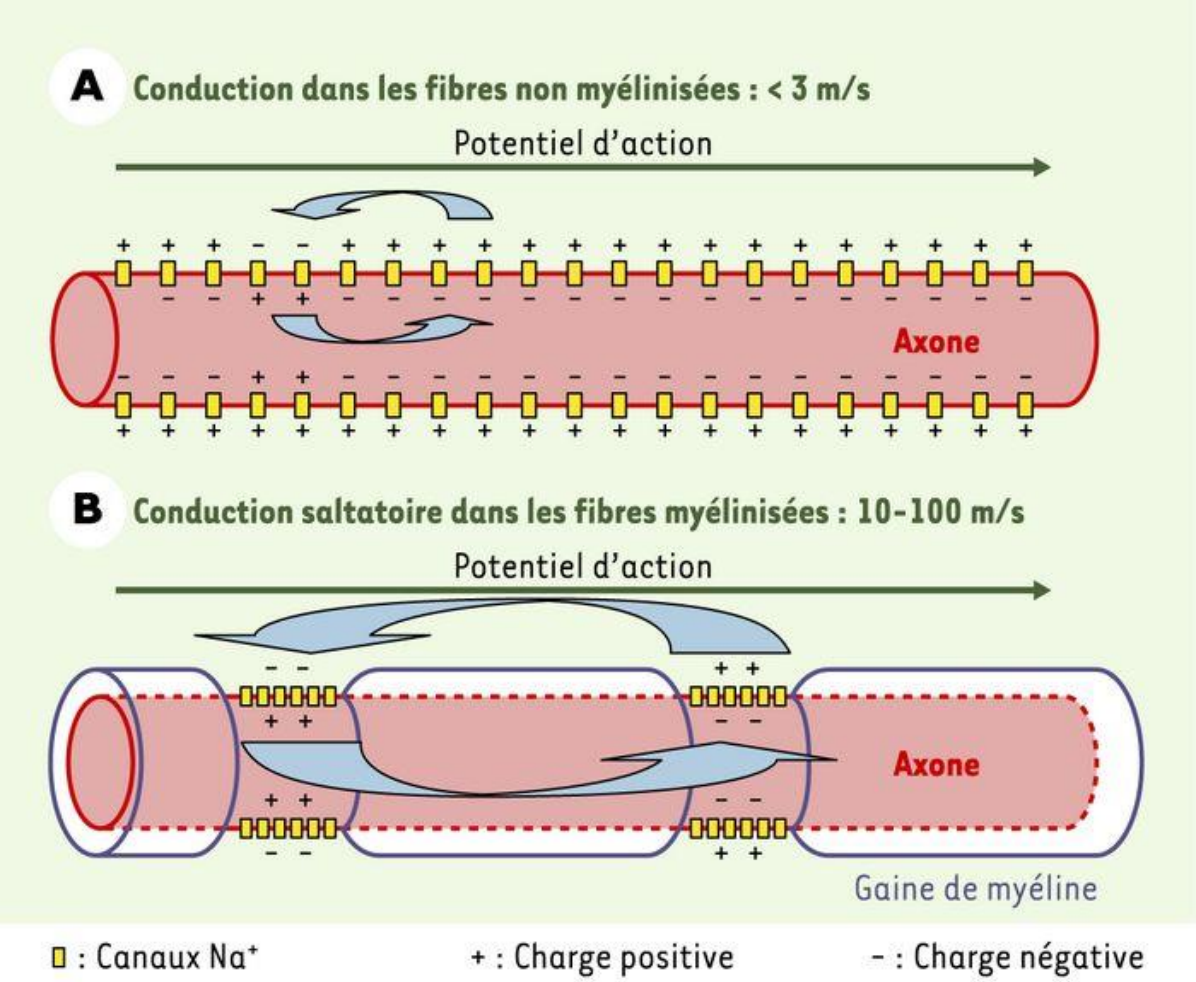


Figure 11 : Conduction dans les fibres nerveuse (Oguievetskaia et al., 2005)

En plus de son rôle dans l'accélération de l'influx nerveux, la myéline jour un rôle trophique important en permettant l'échange de métabolites entre l'axone et les cellules gliales (Figure 12). Les cellules gliales, à savoir les astrocytes, assurent la survie à long terme des axones en permettant le maintien du transport entre les capillaires sanguins et l'axone.

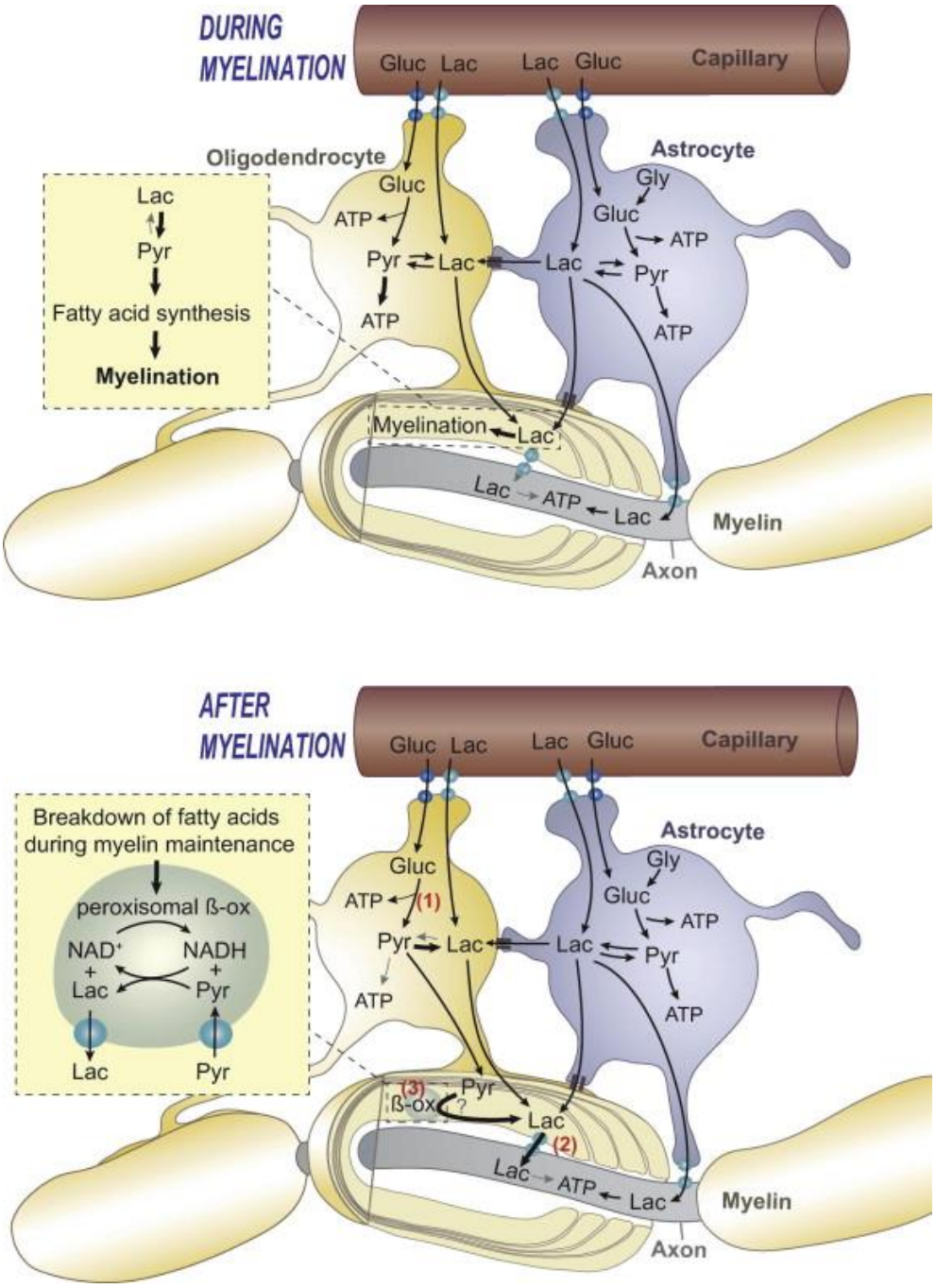


Figure 12 : Le rôle métabolique de la myéline

5. Remyélinisation

De nombreuses maladies acquises ou génétiques peuvent affecter le turn-over de la myéline. Cette dégradation de la myéline est appelée démyélinisation. Elle a pour conséquence directe un ralentissement, voire un arrêt total, de la conduction nerveuse. Les principaux symptômes de la démyélinisation sont les atteintes motrices et les troubles de la vision, de l'audition et d'équilibre. La remyélinisation est le phénomène biologique par lequel, après une perte

pathologique de la myéline, de nouvelles gaines de myéline se reconstituent autour des axones dénudés. Même si ces nouvelles gaines sont moins épaisses avec des internodes plus courts, la remyélinisation des axones permet la restauration de la conduction nerveuse et exerce un rôle protecteur sur ces axones en empêchant leur dégénérescence. Ces phénomènes ont particulièrement bien été étudiés dans une maladie inflammatoire chronique de la myéline, la SEP ou sclérose en plaque (Figure 13).

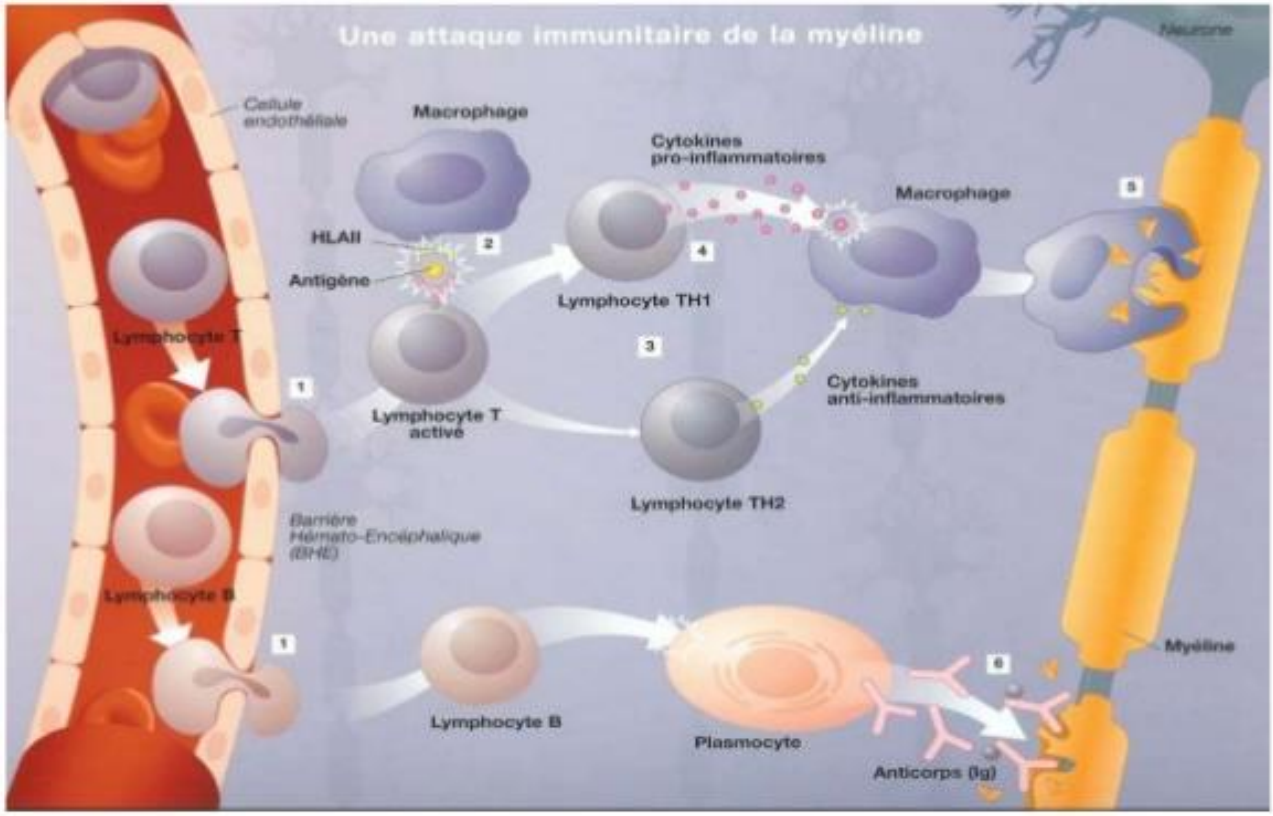


Figure 13 : Physiopathologie de la SEP

Ainsi, le mécanisme d'action aboutissant à la remyélinisation dans le cadre de la SEP a été déterminé (Figure 14).

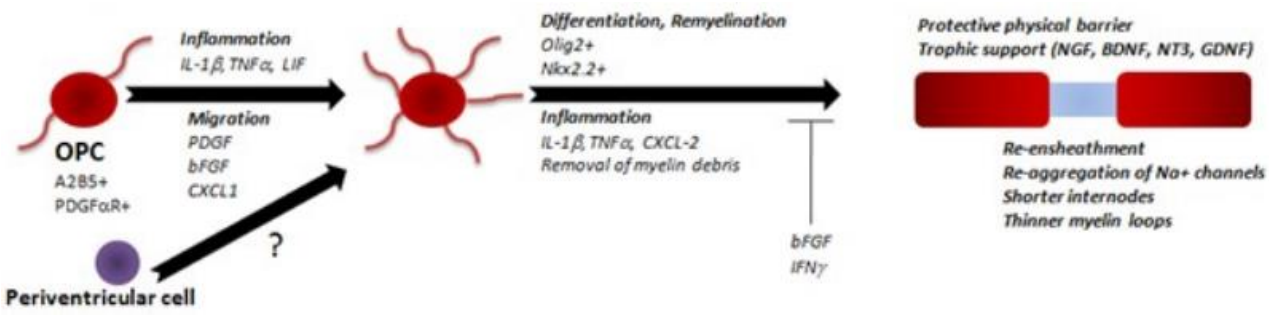


Figure 14 : Remyélinisation.

IV. CLASSIFICATION DES LEUCODYSTROPHIES

La classification des leucodystrophies a beaucoup évolué. Initialement neuropathologique, elle s'est appuyée sur des connaissances issues des analyses biochimiques pour se développer. Plus récemment, cette classification a bénéficié de l'apport de l'IRM pour identifier les anomalies génétiques, et orienter ainsi les analyses de biologie moléculaire.

1. Classification neuropathologique

Une étude basée sur l'observation au microscope des coupes de cerveaux après coloration, avait permis de mettre en place une classification en 6 groupes différents :

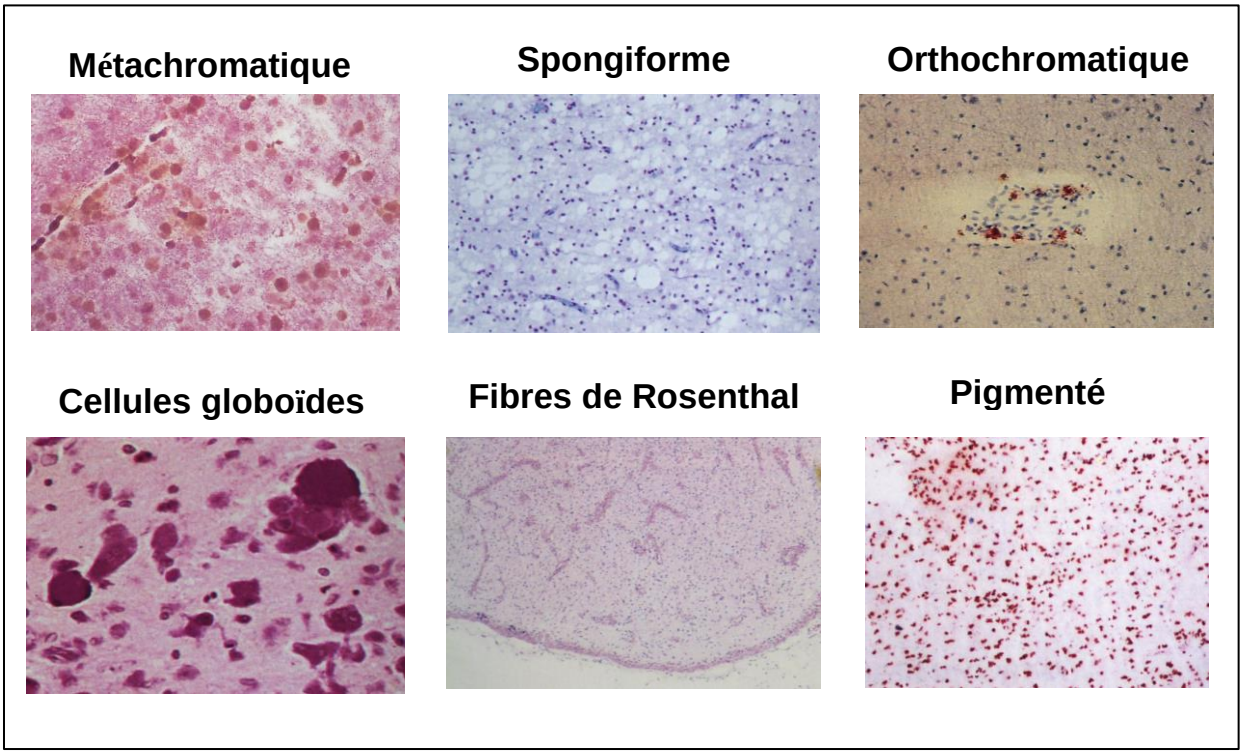


Figure 15 : Classification neuropathologique des leucodystrophies

Certains aspects sont liés à l'accumulation de produits anormaux donnant un trouble de la coloration (métachromasie), la présence de cellules anormale (cellules globoïdes) comme observé dans les maladies du catabolisme des lipides de la myéline (LD Métachromatique, Maladie de Krabbe) ou d'un aspect fibrillaire (fibres de Rosenthal) dans les astrocytes des patients atteints de la maladie d'Alexander.

Dans d'autres cas il existe un aspect particulier moins spécifique comme une spongiose (maladie de Canavan) et la présence de pigments qui est souvent le reflet d'une souffrance cellulaire.
Enfin selon cette classification de nombreuses pathologies étaient regroupées comme orthochromatique, c'est-à-dire sans modification des colorations avec la présence parfois de lipides normaux à la coloration au noir soudan (soudanophile).

2. Classification biochimique

Les leucodystrophies ont ensuite été classées du fait de la présence d'un marqueur biochimique identifié dans les liquides biologiques (serum, urines, LCR). Les cellules périphériques (lymphocytes, fibroblastes) ayant un lien direct avec l'apparition de la maladie. Les premières leucodystrophies identifiées ont été les maladies affectant le catabolisme des lipides de la myéline

- Maladies lysosomales

Le lysosome est une petite structure sphérique dont le rôle est de recycler les matières, ou les métabolites, issues du fonctionnement cellulaire. Le lysosome contient des hydrolases, des enzymes destinées à la dégradation de molécules intracellulaires. Elles ne sont actives qu'à pH acide, d'où l'abaissement du pH dans la vésicule. Parmi les leucodystrophies possédant un marqueur biochimique lysosomale on retrouve la leucodystrophie métachromatique et la maladie de Krabbe.

- Maladies peroxysomales

Les leucodystrophies appartenant au groupe des maladies peroxysomales sont des maladies caractérisées par un dysfonctionnement des enzymes du peroxysome. Le peroxysome est une petite structure sphérique, qui a pour rôle de détoxifier la cellule, en dégradant certaines molécules (les acides gras, l'alcool...) grâce à la β-oxydation. Le mauvais fonctionnement des enzymes du peroxysome conduit à l'accumulation de certaines molécules dans les cellules, induisant l'apparition des maladies comme l'adrénoleucodystrophie, la maladie de Refsum adulte, les maladies du spectre Zellweger…

- Maladies mitochondriales :

Les maladies mitochondriales affectent plus rarement la SB de façon primitive et isolée. Les plus connues sont celles qui se caractérisent par des troubles de la chaîne respiratoire mitochondriale, provoquant un grave déficit énergétique pour l'organisme. Les atteintes de la SB dans les mitochondriopathies sont souvent au second plan par rapport au dysfonctionnement neuronal ou des autres organes. Plus récemment la mise en évidence de gènes strictement mitochondriaux en particulier pour la synthèse des ARNt de la mitochondrie ont été impliqués dans des maladies purement et primitivement de la SB.

- Maladies du métabolisme des acides aminés et des acides organiques :

Il en est de même pour les maladies du métabolisme des acides aminés, des acides organiques ou des neurotransmetteurs. Les maladies du métabolisme des acides aminés (comme la phénylcétonurie) et des acides organiques affectent fréquemment l'ensemble du fonctionnement cérébral et appartiennent à ce titre plus au groupe des leucoencéphalopathies que des leucodystrophies. La maladie de Canavan a cependant très vite été identifiée comme une leucodystrophie spongiforme avec accumulation dans les urines et le LCR du N-acetyl aspartate (NAA), conséquence d'un déficit en aspartoacylase, enzyme uniquement oligodendrocytaire.

3. Classification IRM

L'IRM est une technique d'imagerie, permettant tout à la fois des explorations morphologiques, métaboliques ou fonctionnelles. Les différentes séquences d'acquisition permettent d'obtenir une quantité importante d'informations, ainsi la connaissance des différentes possibilités qu'offre cette technique permet de choisir la séquence adaptée à la pathologie recherchée et d'effectuer une exploration optimisée.

La classification des leucodystrophies est actuellement basée sur l'aspect du signal de la SB aux différentes séquences de l'IRM cérébrale. Par définition, les patients atteints de leucodystrophies ont un aspect en hypersignal T2 de la SB par rapport à la SG souvent bilatéral symétrique et diffuse.

L'aspect en pondération T1 de la SB/SG permet de distinguer les formes dites « hypomyélinisantes » en normohyper-signal ou en iso-signal T1, et des formes dites « démyélinisantes » en hypo-signal T1. (Figure 16)

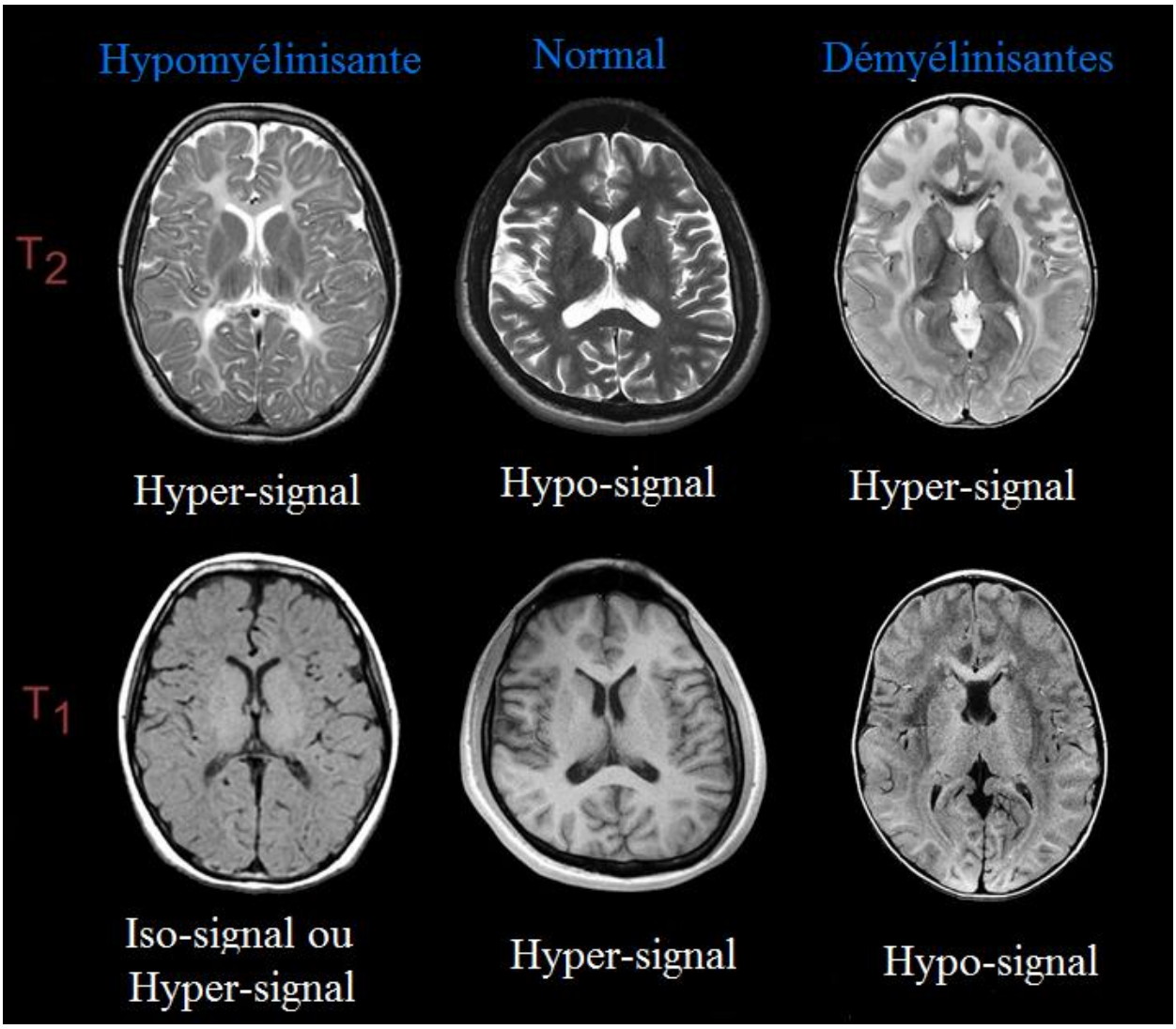


Figure 16 :Leucodystrophies hypomyélinisantes et démyélinisantes (Vanderver et al., 1993)

Par ailleurs, cette classification radiologique en deux groupes a pu être affinée en se basant sur des aspects plus spécifiques comme : (i) les régions touchées ; (ii) la présence ou non de calcifications ; (iii) la présence ou non de cavitation ; (iv) la présence d'un aspect œdémateux.

V. LES PRINCIPALES FORMES DE LEUCODYSTROPHIES

1. Leucodystrophies hypomyélinisantes ou HLD

Les leucodystrophies hypomyélinisantes sont par définition des déficits primitifs, importants et permanents dans le contenu en myéline. Par extension, selon la classification actuelle à partir de l'IRM des leucodystrophies, les leucodystrophies hypomyélinisantes sont identifiées par un signal immature de la SB en T1 par rapport au T2.

Les modèles animaux ont permis de démontrer deux grands groupes physiopathologiques : (i) les formes liées à des troubles de la maturation des oligodendrocytes myélinisant dans lesquelles peu ou pas de myéline est produite ; (ii) les formes pour lesquelles le processus de maturation des oligodendrocytes est normale mais la production de la myéline est anormale en terme de compaction ou de stabilité aboutissant à un déficit plus ou moins important, ainsi lorsque cette myéline est suffisamment importante elle peut être le siège d'une démyélinisation secondaire.

A l'IRM les leucodystrophies hypomyélinisantes présentent les caractéristiques suivantes :

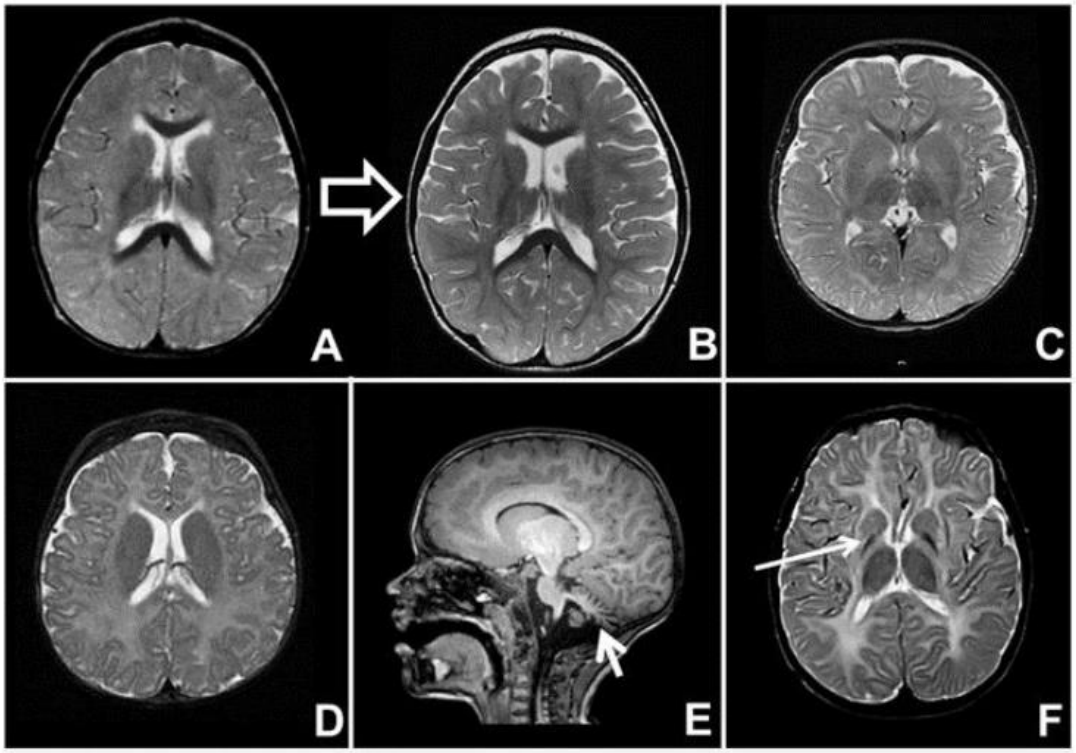


Figure 17 : IRM leucodystrophies hypomyélinisantes

- L'amélioration de la myélinisation au cours du temps (observée par exemple dans le déficit de transporteur de cellules de l'hormone thyroïdienne spécifique de MCT8, à 2 ans et 4 ans et demi Figure 17 A → B)
- L'atrophie sévère de la SG corticale (observée de façon variable dans les désordres neuronaux primaires ainsi qu'un nombre limité de leucodystrophies classiques, Figure 17 C)
- Hypomyélinisation persistante sans atrophie de la SG corticale (par exemple, dans la maladie de Pelizaeus-Merzbacher, Figure 17 D)

- L'atrophie cérébelleuse (par exemple, dans les leucodystrophies liées à la polymérase 3 [syndrome 4H], Figure 17 E)
- L'atteinte des ganglions de la base (Syndrome H-ABC, Figure 17 F)

Ainsi, les leucodystrophies hypomyélinisantes regroupent plusieurs maladies qui sont :

a) Maladie de Pelizaeus Merzbacher et les leucodystrophies hypomyélinisantes liées à des mutations du gène *PLP1* des protéolipoproteines, (HLD1).

Pour revue (Cailloux et al., 2000; Sarret et al., 2016)

La maladie de Pelizaeus-Merzbacher (PMD), est la leucodystrophie par trouble héréditaire de formation de la myéline du SNC la plus étudiée, du fait de son large spectre clinique et moléculaire, ainsi qu'une corrélation génotype phénotype et de nombreux modèles animaux spontanés ou transgéniques existants. Il s'agit d'une forme de transmission dominante liée à l'X.

Le gène des *PLP1* situé en Xq22.2 code pour les principales protéines de la myéline centrale, PLP (277 aa) et son isoforme protéique DM20 (242 aa). DM20 est particulièrement impliquée dans la phase de maturation des oligodendrocytes et PLP dans la compaction de la myéline, le rapport PLP/DM20 augmentant au cours de la maturation du SNC selon le gradient de myélinisation (Dhaunchak and Nave, 2007).

Dans la forme classique de PMD, les enfants atteints présentent un trouble sévère du développement neuromoteur avec une hypotonie présente dès les trois premiers mois de la vie et qui persiste par la suite. En plus de cette hypotonie, des signes neurologiques apparaissent et évoluent avec la maturation : nystagmus (de 2 à 3 ans), puis ataxie avec des mouvements anormaux au niveau des membres supérieurs, choréo-athetose (de 6 mois à 5 ans) ; et enfin une raideur des membres inférieurs (à partir de 3-4 ans) puis des membres supérieurs (après 10 ans), paraplégie puis quadriplégie spastique.

Dans les cas les plus sévères, il n'y aucune acquisition motrice, forme 0 dite congénitale avec décès avant la fin de l'adolescence, ou une acquisition de la tenue de tête (forme 1), de la tenue assise (forme 2) ou d'une marche avec aide (forme 3) avec décès en général entre la 3eme ou 4eme décade.

Les acquis moteurs sont tous perdus à la sortie de l'adolescence de façon plus au moins rapide. Une forme plus modérée de ces maladies a été décrite comme paraplégie spastique de type 2 (SPG2) (Hodes et al., 1999).

Dans ces formes, le développement de la première année de vie est normal mais la paraplégie spastique apparaît entre 2 et 10 ans et s'accentue à l'adolescence avec la nécessité d'utilisation d'un fauteuil électrique dans la deuxième ou troisième décade de vie. Le niveau cognitif est mieux préservé avec parfois une simple dissociation entre les capacités verbales et les performances. Les femmes hétérozygotes peuvent développer une paraplégie spastique avec des troubles vésico-sphinctériens avec un début plus tardif (4eme décade) puis des troubles cognitifs aboutissant à une démence frontale au-delà de 60 ans par dégénérescence axonale ascendante progressive.

L'incidence des leucodystrophies avec mutations du gène *PLP1* a été estimée à 1,45 et 1,9 par 100 000 naissances masculines au Japon et aux États-Unis, respectivement (Hobson and Kamholz, 1993); (Bonkowsky et al., 2010; Numata et al., 2014) et à 0.44 par 100 000 nouveaux nés vivants en France (Leukofrance).

b) Maladie de Pelizaeus-Merzbacher-Like ou leucodystrophies hypomyélinisantes par mutation *GJC2* (HLD 2)

Pour revue (Abrams and Scherer, 2012)

Le terme Pelizaeus-Merzbacher-Like (PMLD) a été utilisé pour définir un groupe de patients présentant des caractéristiques du phénotype de la PMD en particulier l'IRM mais sans mutation du gène *PLP1* identifiée. En 2004, Uhlenberg et ses collègues ont reporté chez certains de leurs patients des mutations dans *GJC2*, le gène codant la connexin spécifique des jonctions entre oligodendrocytes, Cx47, (Uhlenberg et al., 2004). L'atteinte diffuse de la SB à l'IRM est constante avec atteinte des faisceaux postérieurs du tronc cérébral (Bugiani et al., 2006). Le niveau d'acquisition moteur est souvent meilleur (forme 3) mais avec une dégénérescence proche de celle des PMD à l'adolescence. Comme pour les PMD, des formes modérées de paraplégie spastique (SPG44) ont également été rapportées.

c) Leucodystrophies hypomyélinisantes par mutation des gènes impliqués dans le fonctionnement de la polymérase 3 (*POLR3A*, *POLR3B* et *POLR1C*) (HLD 7, HLD8 et HLD11)

Pour revue (Potic et al., 2012; Thiffault et al., 2015)

Les leucodystrophies liées à la polymérase 3 sont des leucodystrophies hypomyélinisantes caractérisés par une atrophie progressive du cervelet visible à l'IRM. Sur le plan clinique, un dysfonctionnement moteur est observé, avec un début très variable mais toujours après l'âge de 1 à 2 ans, se caractérisant par des anomalies progressives de la marche dues à la spasticité, une ataxie cérébelleuse et/ou tremblements, une dentition anormale (dentition retardée, hypodontie, oligodontie) et un trouble du développement pubertaire avec un hypogonadisme hypogonadotrope.

Avant la détermination de la composante moléculaire de la maladie, cinq phénotypes cliniques se sont chevauchés avant d'être regroupés par la suite :

- Hypomyélinisation, hypodontie, hypogonadisme hypogonadotrope (Syndrome 4H) ;
- Ataxie, dentition retardée et hypomyélinisation (ADDH) ;
- Tremblement et ataxie avec hypomyélinisation centrale (TACH) ;
- Leucodystrophie avec oligodontie (LO) ;
- Hypomyélinisation avec atrophie cérébelleuse et hypoplasie du corps calleux (HCAHC).

Les leucodystrophies liées à Pol III sont maintenant diagnostiquées par la combinaison des résultats cliniques, des imageries de l'IRM cérébrale montrant une leucodystrophie hypomyélinisante et la présence de mutations pathogènes dans les gènes *POLR3A*, *POLR3B* ou *POLR1C*.

d) Leucodystrophies hypomyélinisantes avec atrophie des ganglions de la base et du cervelet (H-ABC) liées à des mutations *TUBB4A* (HLD6)

Pour revue (Duncan et al., 2017)

Les hypomyélinisations avec atrophie des ganglions de la base et du cervelet ont été individualisées du fait de l'aspect IRM montrant une atrophie progressive et sévère des ganglions de la base (noyaux caudés, putamen) et du cervelet (H-ABC).

L'atteinte prédominante du système extrapyramidal (rigidité, dystonie, choréathetose, crise oculogyrique et dyskinésie periorale) était présente avant l'apparition de l'atrophie des noyaux gris. Des mutations hétérozygotes « de novo » du gène *TUBB4A* codant pour une tubuline importante pour les oligodendrocytes ont été mise en évidence. Par la suite un spectre phénotypique moins sévère de SPG progressive a été décrit (Tonduti et al., 2016)

e) Hypomyélinisation avec atteinte du tronc cérébral et de la moelle épinière et spasticité des jambes (HBSL)

Pour revue (Fröhlich et al., 2017)

Hypomyélinisation avec atteinte du tronc cérébral et de la moelle épinière et spasticité des jambes (HBSL) est une maladie autosomique récessive qui se caractérise par une spasticité progressive des jambes, une dysfonction cérébelleuse, un nystagmus, une déficience cognitive variable et une épilepsie. L'IRM montre l'hypomyélinisation de l'ensemble de la matière blanche sus-tentorielle, des pédoncules cérébelleux, du tronc cérébral antérieur et des colonnes dorsales de la moelle épinière.

Cette leucodystrophie est liée à des mutations autosomiques récessives du gène *DARS* qui code pour l'enzyme d'ARNt synthétase, permettant la production de l'ARN de transfert cytoplasmique de l'acide aspartique (Asp) indispensable à l'inclusion lors de la traduction au niveau des ribosomes.

f) Syndrome d'hypomyélinisation-cataracte congénitale (HCC)

Pour revue (Biancheri et al., 1993)

L'hypomyélinisation et cataracte congénitale (HCC) est une maladie autosomique récessive, comme son nom l'indique elle se caractérise par une cataracte congénitale bilatérale avec un développement psychomoteur normal au cours de la première année de vie, suivie d'une dégénérescence neurologique progressive, se manifestant par une ataxie, une spasticité et une légère atteinte cognitive et l'apparition de plages de démyélinisation à l'IRM. Des signes cérébelleux et une neuropathie périphérique sont présents chez la majorité des individus atteints. Des crises d'épilepsie peuvent se produire.

Des mutations autosomiques récessives du gène *FAM126A*, ont été associées à cette maladie. *FAM126A* code pour une protéine de 521 aa appelé hyccin, dont l'expression est régulée par la

bêta-caténine. Les résultats de (Zara et al., 2006) avaient indiqués que l'hyccin était essentielle à une myélinisation adéquate dans le SNC et le SNP.

Ainsi, le point commun à l'ensemble de ces leucodystrophies est un aspect IRM « hypomyélinisé » de la substance blanche. Chez l'enfant, cet aspect n'est pas spécifique et pose le diagnostic différentiel avec des troubles acquis (souffrance ante ou néonatale), ou génétiques atteignant aussi bien la SB que la SG (leucoencéphalopathies d'origine génétique). Un spectre clinique allant de formes sévères à des formes plus modérées de type SPG est décrit dans un nombre croissant de gènes. Des formes qui débutent à l'âge adulte sans IRM d'aspect typique d'hypomyélinisation mais avec une atrophie cérébrale progressive, existent également (*PLP1, TUBB4A, POLR3B*) montrant par conséquent les limites de la classification IRM.

2. Leucodystrophies démyélinisantes

Les leucodystrophies démyélinisantes sont un groupe hétérogène de leucodystrophies qui se caractérisent par une dégradation importante de la myéline. A l'IRM les lésions démyélinisantes peuvent apparaitre comme des lésions confluentes de la SB, qui sont de vastes anomalies affectant souvent des régions spécifiques, ou bien comme des lésions multifocales qui sont plus discrètes, souvent asymétriques et impliquant une zone limitée.

Les particularités suivantes permettent de mieux identifier ces leucodystrophies au niveau de l'IRM :

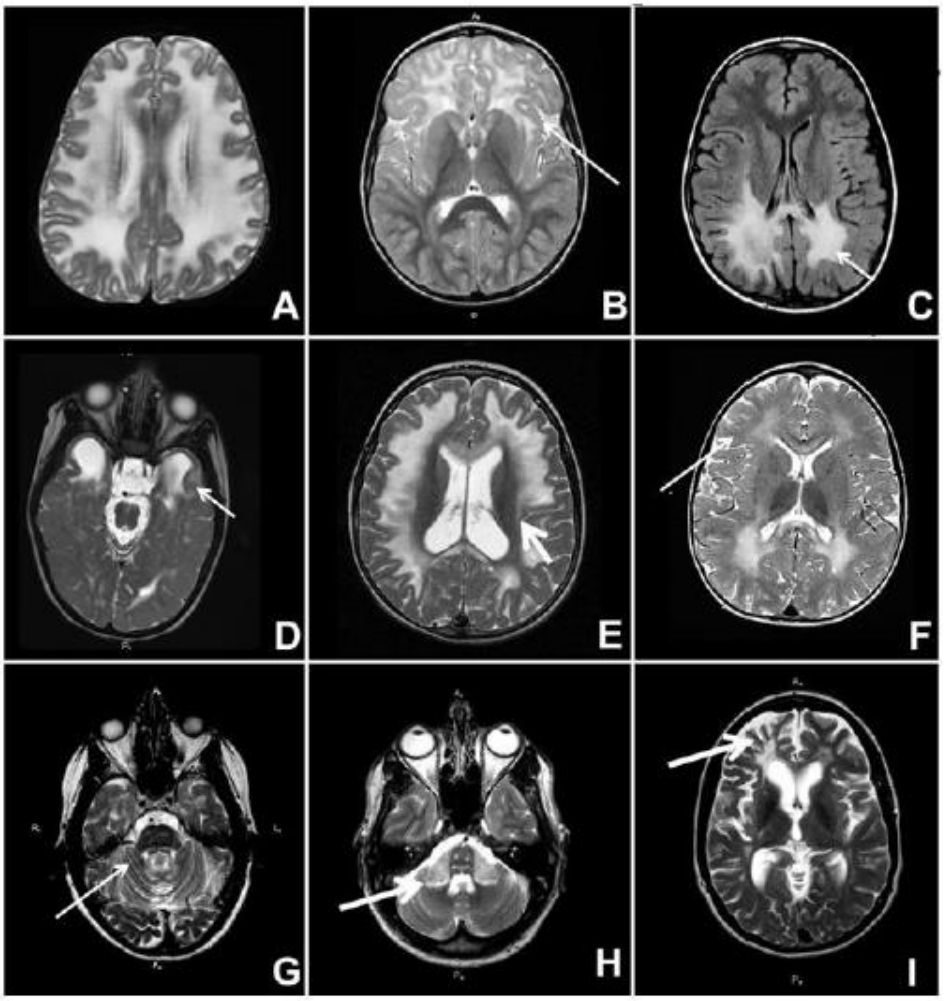


Figure 18 : IRM leucodystrophies démyélinisantes

- Atteinte cérébrale diffuse, observée par exemple dans la leucodystrophie mégalencéphalique avec des kystes sous-corticaux (Figure 18A) ;
- Implication frontale, comme celle observée dans la maladie d'Alexander (Figure 18B) ;
- Atteinte pariéto-occipitale, observée dans l'adrénoleucodystrophie liée à l'X (Figure 18C) ;
- Implication temporelle, comme par exemple dans le syndrome d'Aicardi-Goutières (Figure 18D) ;
- Atteinte sous-corticale, comme pour le syndrome de Kearns-Sayre (Figure 18E) ;
- Atteinte périventriculaire dans la leucodystrophie métachromatique (Figure 18F) ;
- Implication du tronc cérébral, par exemple dans la maladie du corps de polyglucosane adulte avec une implication hétérogène du tronc cérébral (Figure 18G) ;

- Implication du pédoncule cérébelleux, comme dans la leucodystrophie démyélinisante autosomique dominante de l'adulte avec atteinte des pédoncules cérébelleux moyens (Figure 18H) ;
- Grandes lésions asymétriques observées dans la leucoencéphalopathie diffuse héréditaire avec des sphéroïdes (Figure 18I).

Ainsi les leucodystrophies démyélinisantes peuvent être identifiées selon plusieurs critères :

a) Leucodystrophies démyélinisantes identifiées par un marqueur biochimique

Les leucodystrophies démyélinisantes sont les plus fréquentes, ils sont liés à un dysfonctionnement du peroxysome (Adrénoleucodystrophie liée à l'X) ou du lysosome (leucodystrophie métachromatique, maladie de Krabbe), ils sont facilement identifiables par un marqueur biochimique dans les laboratoires spécialisés. Leurs caractéristiques à l'IRM ne sont pas toujours spécifiques voir absentes dans les formes lentes de l'adulte posant là aussi le problème de la définition des leucodystrophies à partir de l'IRM.

L'Adrénoleucodystrophie liée à l'X

Pour revue (Kemp et al., 2001; Steinberg et al., 1993, 2006)

L'adrénoleucodystrophie liée au X (X-ALD) est la maladie peroxysomale la plus fréquente causée par des mutations dans le gène *ABCD1*, le gène codant pour la protéine adrénoleucodystrophie (ALDP). L'ALDP est une protéine de transport à ATP impliquée dans le transport actif des acides gras à très longue chaîne (AGTLC) subissant leur β oxydation dans les peroxysomes. Par conséquent, un léger dysfonctionnement de l'ALDP induit une accumulation des AGTLC dans les urines et les tissus. Ce trouble de l'oxydation des AGTLC plus que son accumulation entraine un processus neurodégénératif dans la SB, le cortex surrénal et les testicules.

X-ALD est divisée en deux phénotypes principaux : (i) l'ALD cérébral (CCALD) se caractérisant par une démyélinisation d'aspect inflammatoire diffus aigue ou subaiguë de la SB cérébrale facilement identifiable sur l'IRM, cette forme est présente le plus souvent chez l'enfant et aboutie à la mort ou à un état grabataire en 2 à 5 ans; (ii) l'adrénomyéloneuropathie (AMN) est caractérisée au contraire par une dégénérescence axonale ascendante progressive

très lente, débutant à la fin de l'adolescence sans atteinte inflammatoire de la SB donc sans anomalies visibles à l'IRM.

Ces deux formes peuvent se produire dans la même famille ; il n'y a donc pas de corrélation entre les mutations du gène *ABCD1* et le phénotype X-ALD. La fréquence totale des porteurs de mutations du gène X-ALD est estimée à 1/16800 (hommes hémizygotes et les femmes hétérozygotes). Des études épidémiologiques ont rapporté que la fréquence relative chez les hommes atteints de X-ALD, est de 31 à 35% pour l'ALD cérébrale et de 40 à 46% pour l'AMN.

Une prise en charge thérapeutique précoce par greffe de HSC normales provenant d'un donneur ou une greffe autologue après thérapie génique, peut prévenir la dégradation des CCALD. De nombreux critères IRM ont été définis afin d'identifier les signes précoces de la maladie chez les patients asymptomatiques (dépistage familial) ou paucisymptomatique (insuffisance surrénale isolée).

Par extension les patients porteurs d'autres maladies de la biogenèse du peroxysome ont été associés au groupe des leucodystrophies mais il s'agit le plus souvent de formes sévères de type leucoencéphalopathies (syndrome de Zellweger (ZS), l'adrénoleucodystrophie néonatale (NALD) et la maladie de Refsum infantile (IRD)). Ces maladies sont causées par des mutations dans au moins 13 gènes de la famille *PEX* codant pour le facteur de la biogénèse du peroxysome, ces maladies sont héréditaires et transmises selon le mode autosomique récessif.

Leucodystrophie Métachromatique

Pour revue (Cesani et al., 2015; Fluharty, 1993)

La leucodystrophie métachromatique ou MLD se caractérise par trois sous-types cliniques : MLD infantile tardif (50% à 60% des cas) ; juvénile (20% à 30% des cas) ou adulte (15% à 20% des cas). L'âge d'apparition dans une famille est habituellement similaire. Le cours de la maladie peut être de 3 à 10 ans ou plus dans la forme infantile tardive et jusqu'à 20 ans ou plus dans les formes juvéniles et adultes.

MLD infantile tardif (la plus fréquente) : L'apparition est entre 1 à 2 ans. Le phénotype inclut initialement des troubles de la marche. L'évolution est rapide en 1 à 2 ans aboutissant à un état grabataire avec perte de la vision, de l'audition et des douleurs neuropathiques (atteinte périphérique démyélinisante).

MLD juvénile : L'apparition est entre l'âge de 4 ans et la maturité sexuelle (12-14 ans). Les manifestations initiales comprennent un déclin de la performance scolaire et l'émergence de problèmes de comportement, suivis d'une maladresse, de problèmes de démarche, de troubles de la parole, d'incontinence et de comportements bizarres. Des crises peuvent survenir. La progression est similaire mais plus lente à la forme infantile tardive.

MLD adulte : L'apparition survient après la maturité sexuelle, parfois pas avant la 4^{ième} ou la 5^{ième} décennie. Les signes initiaux sont des difficultés professionnelles ou familiales et un changement de personnalité, l'abus d'alcool ou de drogue, une gestion de l'argent médiocre et une labilité émotionnelle. Dans d'autres cas, les symptômes neurologiques comme la faiblesse et la perte de coordination évoluant vers la spasticité et l'incontinence. La neuropathie périphérique est fréquente. Le cours de la maladie est variable, avec des périodes de stabilité intercalées avec des périodes de déclin, et peuvent s'étendre sur 2 à 3 décennies. La phase finale est semblable à celle des formes de début antérieur.

La greffe de HSC d'un donneur ou après thérapie génique de cellules autologues, peut avoir une efficacité thérapeutique dans les formes asymptomatiques infantiles, paucisymptomatiques juvéniles ou adultes. Il est donc important de faire un diagnostic le plus précocement possible avant l'apparition de lésions importantes à l'IRM (Penati et al., 2017) .

La MLD est confirmée par la présence d'une excrétion anormale de sulfatides dans les urines (sulfatidurie) et une mesure de l'activité enzymatique de l'arylsulfatase A (ARSA) dans les leucocytes inférieurs à 10% des témoins normaux. Le dosage de l'activité enzymatique ARSA, ne permet pas de faire la distinction entre la pseudo-déficience de l'ARSA et la MLD.

Cette pseudo-déficience est liée à des variants du gène *ARSA* qui entrainent une réduction de l'activité enzymatique jusqu'à 20% par rapport aux contrôles normaux, sur les tests biochimiques mais sans conséquence pathologique sur l'individu.

Ainsi, le diagnostic des MLD doit être confirmé par un ou plusieurs tests supplémentaires, comme le test de génétique moléculaire du gène *ARSA*, l'excrétion urinaire des sulfatides et/ou la découverte des dépôts de lipides métachromatiques dans le tissu du système nerveux.

Aussi il existe d'autres variant biochimique de la maladie qui donnent le même phénotype MLD. Le gène *SUMF1* code pour une enzyme requise pour la modification post-traductionnelle et l'activation catalytique de la famille des enzymes sulfatases (Fraldi et al., 2007), ainsi que le

gène *PSAP* qui code pour la prosaposine, un précurseur de plusieurs petites glycoprotéines non enzymatiques appelées «protéines activatrices de sphingolipides» (SAP) qui aident à l'hydrolyse lysosomale des sphingolipides (Henseler et al., 1996). Dans ce cas il existe une excrétion urinaire des sulfatides mais sans déficit dans l'activité de l'enzyme ARSA.

La maladie de Krabbe

Pour revue (Tappino et al., 2010; Wenger, 1993)

La maladie de Krabbe est une maladie autosomique récessive qui se caractérise par une détérioration neurologique progressive qui apparait pour la forme sévère au stade infantile conduisant généralement à un décès avant l'âge de 2 ans, pour la forme la moins sévère, elle apparait entre l'âge de 1 an et la 5^{ième} décennie avec une progression plus lente de la maladie.

Les enfants avec la forme infantile semblent être normaux durant les premiers mois de vie mais présentent une irritabilité extrême, une spasticité et un retard de développement à l'âge de 6 mois. La régression psychomotrice progresse vers un état végétatif sans mouvement volontaire. L'apparition et la progression des formes tardives peuvent être assez variables. Les individus peuvent être cliniquement normaux jusqu'à ce que la faiblesse, la perte de vision et la régression intellectuelle deviennent évidentes. Le début des symptômes et le cours clinique peuvent être variables même chez les frères et sœurs.

Chez presque tous les individus atteints de la maladie de Krabbe, l'activité enzymatique de la galactocérébrosidase (GALC) est déficitaire (0% à 5% de l'activité normale) dans les leucocytes isolés à partir de sang héparinisé entier ou dans des fibroblastes de peau en culture. Les tests de support par mesure de l'activité de l'enzyme GALC dans les leucocytes ou dans les fibroblastes cutanés cultivés ne sont pas toujours fiables (qualité du substrat). Ainsi il est important de déterminer les mutations responsables de la maladie dans le gène *GALC.*

Maladie de Canavan

Pour revue (Ishiyama et al., 2003; Matalon and Michals-Matalon, 1993)

La maladie de Canavan se caractérise par une macrocéphalie progressive associée à un retard neuromoteur observés entre 3 à 5 mois. La progression est souvent rapide en 4 à 5 ans aboutissant à un état grabataire puis au décès. Les lésions de la SB à l'IRM cérébrale ont souvent

une progression particulière de la périphérie (régions sous corticales) vers le centre (périventriculaire). Des formes plus lentement progressives sont de plus en plus souvent décrites.

La maladie de Canavan est caractérisée par un léger retard de développement qui ne peut être reconnu directement. Le diagnostic de la maladie de Canavan repose sur la démonstration d'une concentration très élevée de NAA dans l'urine ou plus récemment sur la spectroscopie de RMN (souvent couplé à l'IRM). Dans les formes plus modérées, le NAA ne peut être que légèrement élevé, ainsi le diagnostic repose sur la détermination de mutations dans le gène *ASPA*, codant pour l'enzyme aspartoacylase. Cette maladie présente une transmission autosomique récessive.

La xanthomatose cérébrotendineuse

Pour revue (Federico et al., 1993; Moghadasian et al., 2002)

La xanthomatose cérébroutérine (CTX) est une maladie de stockage des lipides caractérisée par une diarrhée chronique et une cataracte à l'enfance, un xanthome de tendons à l'adolescence ou chez le jeune adulte ainsi un dysfonctionnement neurologique progressif chez l'adulte (démence, troubles psychiatriques, atteinte pyramidale et/ou cérébelleuse, dystonie, parkinsonisme atypique, neuropathie périphérique et convulsions).

La diarrhée chronique de l'enfance peut être la première manifestation clinique mais dans environ 75% des personnes touchées, la cataracte est la première à être diagnostiquée, elle apparait souvent dans la première décennie de vie. Les xanthomes apparaissent dans la 2^{ième} ou 3^{ième} décennie, ils se produisent sur le tendon d'Achille, les tendons extenseurs du coude et de la main, le tendon rotulien et les tendons du cou.

Des xanthomes ont été reportés dans les poumons, les os et le SNC. Certains individus présentent une déficience cognitive dès le début de l'enfance, alors que la majorité des patients ont une fonction intellectuelle normale ou légèrement altérée jusqu'à la puberté. La démence avec une détérioration lente des capacités intellectuelles se produit dans les 2^{ièmes} décennies de vie dans plus de 50% des individus. Les symptômes neuropsychiatriques tels que les changements de comportement, les hallucinations, l'agitation, l'agression, la dépression et les tentatives de suicide peuvent être importants.

Ce sont les anomalies biochimiques qui distinguent la CTX, avec une forte concentration de cholestanol plasmatique et tissulaire, une concentration de cholestérol plasmatique normale à faible, une diminution de l'acide chénodésoxycholique, une concentration accrue d'alcools biliaires ainsi que la présence de glyconjugués et de concentrations accrues de cholestanol et d'apolipoprotéine B dans liquide cérébro-spinal.

Le diagnostic des CTX est établi par l'identification de mutations à l'état autosomique récessif dans le gène *CYP27A1*.

b) Leucodystrophies démyélinisantes avec un aspect œdémateux avec ou sans cavitation

Ces leucodystrophies sont en général liées à un dysfonctionnement des astrocytes et souvent caractérisées par des épisodes de dégradation à l'occasion d'un stress (chute, infection, psychoaffectif)

Maladie d'Alexander

Pour revue (Gorospe et al., 2002; Srivastava and Naidu, 1993)

La maladie d'Alexander est un trouble progressif de la SB cérébrale qui affecte principalement les nourrissons avec une espérance de vie variable. Les formes au début plus tardif, juvénile et adulte, présentent une dégradation clinique plus lente.

La forme avant 6 mois entraîne un handicap sévère souvent avec décès dans les deux années après le début de la maladie. Les symptômes comprennent des convulsions, une hydrocéphalie, un handicap moteur et intellectuel sévère. L'IRM associe des anomalies de la SB d'aspect œdémateux avec une progression de l'avant vers l'arrière (gradient antéro postérieur) associée à un aspect œdémateux des noyaux gris qui prennent le contraste. Les formes plus tardives se caractérisent souvent par des troubles isolées de la phonation et ou de la déglutition, suivie par des troubles de la marche. La cognition est souvent préservée. Le décès peut être brutal lié à un stress.

Le diagnostic de la maladie d'Alexandre est confirmé par l'identification d'un variant pathogène à l'état hétérozygote souvent *De Novo* dans le gène *GFAP*, codant pour la protéine d'acide fibrillaire gliale. Par ailleurs, il n'y a pas de corrélation génotype-phénotype puisque la même

mutation peut entrainer des phénotypes variables mais certaines mutations sont plus préférentiellement liées à des formes sévères.

Leucoencéphalopathie mégalencéphalique avec kystes sous-corticaux

Pour revue (López-Hernández et al., 2011; Sirisi et al., 2014)

La leucoencéphalopathie mégalencephalique avec kystes sous-corticaux (MLC) est ou maladie autosomique qui peut être dominante ou récessif avec l'implication de deux gènes *MLC1* et *HEPACAM*, elle se caractérise par une macrocéphalie à début précoce, souvent associée à un léger ralentissement du développement moteur et à des convulsions. L'apparition progressive de l'ataxie, de la spasticité avec parfois des signes extrapyramidaux ainsi que l'apparition tardive d'une détérioration mentale légère. La macrocéphalie, observée chez tous les individus, peut être présente à la naissance mais se développe plus fréquemment au cours de la première année de vie. Le degré de macrocéphalie est variable et peut aller jusqu'à 4 à 6 déviations standard au-dessus de la moyenne chez certains individus.

Après la première année de vie, le taux de croissance de la tête se normalise et la croissance suit une ligne parallèle habituellement plusieurs centimètres au-dessus. Le développement mental et moteur initial est normal dans la plupart des cas. La marche est souvent instable. La détérioration mentale est tardive et légère souvent favorisée par des épisodes de stress (chute sur la tête, fièvre). La sévérité varie de la marche indépendante pendant quelques années seulement à la marche indépendante dans la 5^{ième} décennie.

La macrocéphalie persiste habituellement, mais certains enfants deviennent normocephaliques. L'hypotonie et la maladresse peuvent persister dans certains cas ou l'examen neurologique peut devenir normal. Certains cas ont une déficience intellectuelle qui est stable avec ou sans autisme. Le diagnostic de MLC est établi chez les individus présentant des résultats cliniques typiques et des anomalies caractéristiques observées sur l'IRM, y compris la SB hémisphérique cérébrale anormale et gonflée et la présence de kystes sous-corticaux dans la région temporelle antérieure et souvent dans la région front pariétale.

Lorsqu'il est associé à des mutations récessives de *MLC1*, le phénotype classique est connu sous le nom de MLC1. Par ailleurs, lorsqu'il est causé par une mutation hétérozygote d'*HEPACAM*, il est connu sous le nom de MLC2A. Des variants pathogènes dans MLC1 sont observés chez environ 75% des personnes atteintes de MLC. Les variants pathogènes dans *HEPACAM* chez

environ 20%. La protéine MLC1 et son partenaire GLIALCAM sont exprimés à la surface des astrocytes en particulier dans les zones d'échanges (vaisseaux, épendymes). Elles semblent jouer un rôle dans l'homéostasie des échanges d'eau.

Le Syndrome CACH et les leucodystrophies par mutations du gène *EIF2B*

Pour revue (van der Knaap et al., 2003a; Labauge et al., 2009)

Le Syndrome CACH (Childhood Ataxia with Central nervous system Hypomyelination) a été décrit dans sa forme classique comme une maladie chronique progressive de type, troubles de la marche (cérébello-spastique) débutant entre 2 et 4 ans avec des épisodes d'aggravation neurologique rapide et majeure causée par le stress (fièvre, traumatisme crânien mineur, peur aiguë) et une récupération incomplète. Le décès survient dans les 2 à 4 ans qui suivent.

Les caractéristiques IRM de ce syndrome ont été regroupées sous le terme VWMD (Vanishing White Matter Disease). La SB a en effet un aspect œdémateux diffus sur lequel apparaît une cavitation progressive bilatérale et symétrique devenant diffuse.

Le CACH est un syndrome autosomique récessif, il est causé par des mutations dans l'un des cinq gènes *EIF2B1* à *EIF2B5*. Ces gènes codent pour les cinq sous-unités du facteur d'initiation de la traduction eucaryote 2B (EIF2B) qui est essentiel pour l'initiation de la traduction des protéines. Il est régulé par le stress cellulaire (inhibition de son activité). L'identification des gènes en cause a permis de décrire des formes infantiles sévères (<2 ans) voir congénitales et des formes juvéniles-adultes. Ces dernières peuvent débuter à un âge très tardif alors que l'atteinte diffuse de la SB est présente chez les patients asymptomatiques. Cette dissociation entre la clinique et l'IRM est un bon argument pour orienter le diagnostic vers un CACH dans les formes tardives plus lentes.

Par ailleurs, la maladie serait liée à un trouble de la maturation des cellules gliales avec un nombre limité d'astrocytes et la présence d'un grand nombre d'oligodendrocytes bloqués à un stade non myélinisant.

c) Leucodystrophies avec calcifications

Syndrome d'Aicardi-Goutières et les interferonopathies

Pour revue (Crow et al., 2014; Rice et al., 2009)

Le syndrome d'Aicardi-Goutières (AGS) se manifeste comme une encéphalopathie à début précoce qui, habituellement, mais pas toujours, entraîne un handicap intellectuel et physique grave. Un sous-groupe de nouveaux nés atteints d'AGS présente à la naissance des atteintes neurologiques, l'hépatosplénomégalie, des enzymes hépatiques élevées et une thrombocytopénie, une symptomatologie très suggestive d'infection congénitale. Les nourrissons les plus touchés se présentent fréquemment après une période de développement apparemment normal. Typiquement, ils présentent une encéphalopathie sévère caractérisée par une irritabilité extrême, des pyréxies intermittentes stériles, un ralentissement de la croissance de la tête. L'évolution est marquée par le développent des lésions cutanées sur les doigts, les orteils et les oreilles dans 40% des cas. Il existe des cas atypiques, parfois plus légers, d'AGS.

Le diagnostic d'AGS est généralement établi sur des critères cliniques typiques, sur l'imagerie IRM et la tomodensitométrie (TDM) crânienne qui montre la calcification des ganglions de base et de la matière blanche, Mais aussi sur l'identification de mutations dans les gènes à transmission autosomique récessif (*ADAR, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1, TREX1)* ou dans les gènes à transmission autosomique dominante (*TREX1, ADAR, IFIH1).*

Leucoencéphalopathie kystique sans mégalencephalie

Pour revue (Henneke et al., 2005)

La leucoencéphalopathie kystique sans mégalencephalie est une maladie autosomique récessive lié aux mutations du gène *RNASET2* qui code pour la RNase de la famille T2. Cette maladie est caractérisée par des kystes temporaux sous-corticaux antérieurs bilatérales, des lésions de la SB sans l'atteinte des structures centrales, et une calcification intracrânienne avec des anomalies gyrales. Ce phénotype chevauche de manière significative avec les symptômes de l'infection à l'*in-utero* du cytomégalovirus (CMV).

d) Les autres leucodystrophies avec aspect d'IRM évocateurs

Syndrome de leucoencéphalopathie avec atteinte du tronc cérébral et de la moelle épinière avec élévation des lactates

Pour revue (van der Knaap et al., 2003b)

Le syndrome de leucoencéphalopathie avec atteinte du tronc cérébral et de la moelle épinière avec élévation des lactates (LBSL) est une maladie autosomique récessive caractérisée par une atteinte pyramidale, cérébelleuse et dorsale progressive impliquant plus les membres inférieures que supérieures.

Les manifestations cliniques sont variables, y compris un retard de développement, une déficience cognitive, une épilepsie et une neuropathie périphérique. Le spectre clinique varie selon l'âge de l'apparition de la maladie, pour la forme infantile la maladie est plus sévère contrairement à la forme adulte dans laquelle la maladie est plus légère et est lentement progressive.

La LBSL est causée par des mutations dans le gène *DARS2*, qui code pour l'aspartyl-tRNA synthétase mitochondriale. L'IRM montre généralement des anomalies du signal dans la SB cérébrale et cérébelleuse ainsi que dans la moelle épinière. Par ailleurs la spectroscopie montre une élévation du lactate dans la SB anormale.

Syndrome de leucoencéphalopathie-anomalies du thalamus et du tronc cérébral-hyperlactatémie

Pour revue (Steenweg et al., 2012)

Syndrome de leucoencéphalopathie-anomalies du thalamus et du tronc cérébral-hyperlactatémie aussi appelé déficience combinée de la phosphorylation oxydative 12 (COXPD12), est un trouble neurologique mitochondrial autosomique récessif dont le gène impliqué est *EARS2*.

Ce syndrome est caractérisé par l'apparition à l'enfance de l'hypotonie avec un retard de développement psychomoteur, ou une régression du développement précoce associée aux hyperintensités pondérées en T2 dans la SB cérébrale profonde, le tronc cérébral et la matière blanche cérébelleuse. Ainsi qu'une élévation du lactate en raison d'un défaut de respiration mitochondriale. Il existe 2 groupes phénotypiques principaux, ceux qui ont un développement de la maladie plus léger et un certain rétablissement des compétences après l'âge de 2 ans, et ceux qui ont un développement de la maladie plus grave entraînant un handicap marqué.

e) Les leucodystrophies de l'adulte sans marqueurs d'IRM spécifiques

Leucodystrophie démyélinisante autosomique dominante de l'adulte

Pour revue (Giorgio et al., 2015)

La leucodystrophie démyélinisante autosomique dominante de l'adulte (ADLD) est un trouble progressif de la SB du SNC caractérisée par l'apparition d'une perte de l'autonomie chez les personnes dans la 4^{ième} à la 5^{ième} décennie de vie se caractérisant par une atteinte pyramidale et cérébelleuse. Un dysfonctionnement de la vessie, une constipation, une hypotension posturale, des difficultés d'alimentation, une dysfonction érectile et une transpiration.

Les signes pyramidaux sont souvent plus importants dans les extrémités inférieures (par exemple, faiblesse spastique, hypertonie, clonus, réflexes tendineux intenses et signes bilatéraux de Babinski). Les signes cérébelleux apparaissent généralement en même temps que les signes pyramidaux et peuvent inclure l'ataxie, l'adiadococinésie, le tremblement, la dysmétrie et le nystagmus. Bien que la fonction cognitive soit généralement préservée ou seulement légèrement altérée au début de l'apparition de la maladie, la démence et les manifestations psychiatriques peuvent se produire comme des manifestations tardives.

Les personnes touchées peuvent survivre pendant des décennies. Le diagnostic d'ADLD est établi soit par la mise en évidence d'une duplication dans le gène *LMNB1*, soit plus rarement, par une grande suppression en amont du promoteur de *LMNB1* avec une transmission autosomique dominante.

Leucoencéphalopathie héréditaire diffuse à sphéroïdes axonaux et cellules gliales pigmentées

Pour revue (Rademakers et al., 2011)

La leucoencéphalopathie héréditaire diffuse à sphéroïdes axonaux et cellules gliales pigmentées (ALSP), qui comprend à la fois la leucoencéphalopathie héréditaire diffuse avec les sphéroïdes (HDLS) et la leucodystrophie orthochromatique pigmentaire (POLD), se caractérise par un trouble moteur et des convulsions.

Un syndrome du lobe frontal (par exemple, perte de jugement, manque d'inhibiteurs sociaux, manque de perspicacité et persistance motrice) apparait habituellement au début de la maladie. L'âge moyen d'apparition est habituellement dans la 4^{ième} décennie. Les individus affectés développent une spasticité et une rigidité. Le cours de la maladie varie de 2 à 30 ans ou plus avec une moyenne de 8 ans. Le diagnostic est confirmé par l'identification d'une mutation dans le gène *CSF1R* avec une transmission autosomique dominante.

Maladie des corps de polyglucosans

Pour revue (Klein, 1993)

La maladie des corps de polyglucosans se caractérise par une vessie neurogène progressive à début adulte, des difficultés de démarche avec une spasticité et une faiblesse musculaire, une atteinte motrice supérieure et inférieure, des pertes sensorielles prédominantes dans les extrémités distales inférieures et des difficultés cognitives légères.

Le diagnostic est basé sur l'examen clinique, l'IRM cérébrale et de la moelle épinière, la biopsie du nerf sural présentant des polyglucosans caractéristiques dans les tubes nerveux, l'analyse de l'activité de l'enzyme de branchement du glycogène dans les fibroblastes de la peau ou le tissu musculaire. Cette maladie est autosomique récessif et le gène impliqué est celui codant pour l'enzyme de branchement du glycogène *GBE1*.

Objectifs

Cette thèse a eu pour objectif primaire d'identifier les leucodystrophies présentes au sein de la population marocaine, et de rechercher les mutations responsables de l'apparition du phénotype malade grâce à des techniques de biologie moléculaire, notamment le séquençage Sanger et le NGS.

L'objectif secondaire était la mise en place au sein du laboratoire de génétique et de pathologie moléculaire à Casablanca d'un diagnostic moléculaire des leucodystrophies les plus fréquentes, retrouvées au niveau de la population marocaine.

Matériels et méthodes

Matériel : Recrutement des patients

Le recrutement des patients pour cette étude a été réalisé en collaboration avec trois services de neurologies :

- Le service de neuropédiatrie à l'Hôpital d'Enfants CHU Ibn Rochd de Casablanca ;
- Le service de neuropédiatrie à l'Hôpital d'Enfants CHU Ibn Sina-Souissi de Rabat ;
- Le service de neurologie au CHU Ibn Rochd de Casablanca.

Pour les trois services nous avons pu avoir accès aux registres des patients qui ont été admis à l'hôpital du jour et ce durant les 3 années passées. Ainsi nous avons pu recruter les patients qui ont été considérés comme des leucodystrophies sur le plan clinique. Les patients dont le dossier clinique contenait assez d'informations ont été contactés en présence d'un médecin du service, afin de réaliser un examen clinique et remplir les fiches d'exploitation (Annexe 1) ainsi qu'un consentement éclairé (Annexe 2).

Pour chaque patient nous avons essayé de rassembler un dossier clinique avec une IRM et une fiche d'exploitation contenant les résultats de l'examen clinique ainsi que l'historique médicale du patient. Des prélèvements sanguins ont été réalisés pour les patients ainsi que leurs parents dans 2 tubes EDTA afin de réaliser l'extraction de l'ADN.

Chaque dossier a été présenté lors d'un staff médical de l'équipe marocaine à Casablanca puis de l'équipe française à l'Hôpital Robert Debré Paris. Une fois que les dossiers ont été validés par les staffs, nous avions procédé à l'extraction d'ADN puis à l'étude moléculaire.

Etude expérimentale

Le matériel biologique utilisé lors de cette étude est l'ADN des patients ainsi que celui des deux parents.

L'extraction d'ADN

L'extraction de l'ADN génomique à partir des tubes de sang totale prélevé précédemment a été réalisée par méthode Phénol/Chloroforme selon le protocole suivant :

- 700 µl de Tris-EDTA (TE) avec un rapport de (20/5) est mélangé à 700 µl de sang.
- Centrifugation à 2500 G pendant 15 minutes.
- Récupération du surnageant et mélange avec 800 µl de TE (20/5).
- Centrifugation à 2500 G pendant 15 minutes.
- Le lavage est répété jusqu'à l'obtention d'un culot blanc.
- 400 µl de TE (10/5), 100 µl de SDS à 20% et 5 µl de Protéinase K (20mg/ml) sont ajoutés au culot.
- Incubation à 56°C pendant 12 heures.
- Ajout de 500 µl de phénol.
- Centrifugation à 2500 G pendant 15 minutes.
- Récupération de la phase supérieure.
- Ajout de 500 µl de chloroforme/ alcool isoamylique (24/1).
- Centrifugation à 2500 G pendant 15 minutes.
- Récupération de la phase supérieure.
- Ajout de 1 ml d'éthanol absolu froid.
- Mélange jusqu'à l'apparition de la méduse.
- Centrifugation à 2500 G pendant 15 minutes.
- Récupération du culot.
- Séchage
- Suspension dans du TE (10/1)

Les ADN ont été dosés par spectrophotomètre NanoDrop afin de déterminer la concentration et la pureté de chaque échantillon.

Séquençage des gènes impliqués

L'approche suivie pour la détermination des mutations a consisté en deux techniques différentes de séquençage, à savoir le séquençage pas méthode Sanger et le séquençage nouvelle génération (NGS) sur un panel de gènes. Selon les disponibilités des laboratoires nous avons réalisé une partie du séquençage au Maroc notamment par la méthode Sanger et le séquençage par NGS en France.

Séquençage par méthode Sanger

Le séquençage par méthode Sanger a été réalisé pour les patients dont la leucodystrophie est caractérisée par un marqueur particulier et dont les résultats d'analyse démontrent son implication dans la maladie.

Le design des amorces utilisées pour le séquençage a été réalisé à partir de la base de donné d'Ensembl d'après la version GRCh38 du Genome Reference Consortium (Aken et al., 2016). Le logiciel utilisé pour le design est Primer3 (Untergasser et al., 2012) et la vérification des séquences et de leurs spécificité a été réalisé par SNPCheck (Yu and Zhang, 2011).

Le protocole suivi pour le séquençage Sanger est le protocole conventionnel, qui consiste en une amplification des échantillons d'ADN par une PCR dont le volume final est de 25 µl contenant : 1× volume réactionnel du tampon, 1× Solution Q, 200 µM de chaque dNTP, 2 mM MgCl2, 1 µM d'amorces, 2.5 U Taq polymérase et 50 ng d'ADN génomique (Qiagen GmBH, Hilden, Allemagne). Après la vérification des amplicons par électrophorèse sur gel d'agarose, ces derniers sont purifiés par l'exonucléase I et la phosphatase alcaline de crevette (SAP, Shrimp Alcaline Phosphatase). La réaction de séquençage a été effectuée sur les produits purifiés en utilisant le BigDye Terminator v 1.1 Standard Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). L'électrophorèse des échantillons a été réalisée sur le séquenceur 3100 ABI Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Séquençage nouvelle génération (NGS) : puce panel de gènes

Pour les patients dont le dossier clinique ne comportait aucun marqueur particulier pouvant nous orienter vers une leucodystrophie spécifique, nous avons réalisé au sein de l'unité fonctionnelle de génétique moléculaire à l'hôpital Robert-Debré, un séquençage nouvelle génération d'un panel de 26 gènes (*PLP1, GJC2, DARS, EARS2, EIF2B1, EIF2B2, EIF2B3,*

EIF2B4, EIF2B5, ALDH3A2, DARS2, FAM126A, POLR3A, POLR3B, POLR3K, MLC1, GFAP, SLC16A2, ADAR, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, TREX1, SAMHD1, HEPACAM).

La réalisation du NGS s'est faite en utilisant un séquenceur MiSeq Illumina avec un kit TruSeq Custom Amplicon (Illumina, San Diego, CA, USA).

Le design du kit pour les 26 gènes s'est fait par le logiciel DesignStudio permettant de sélectionner les amplicons pour la réalisation de la librairie.

Pour chaque patient un échantillon d'ADN de 50ng est utilisé selon le principe suivant :

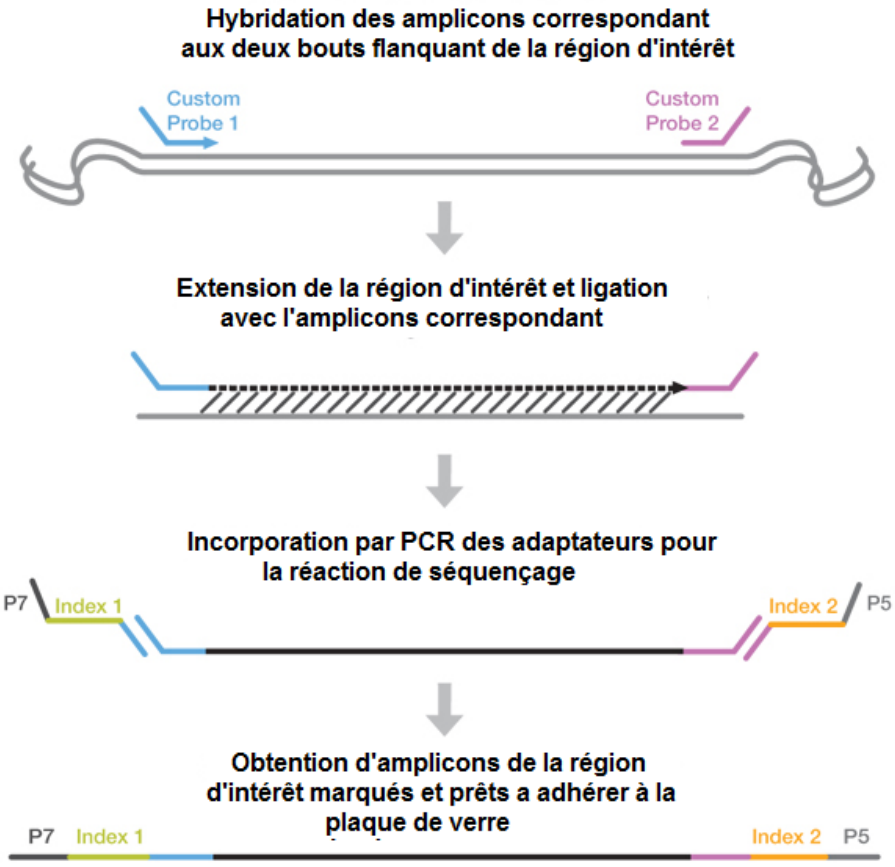
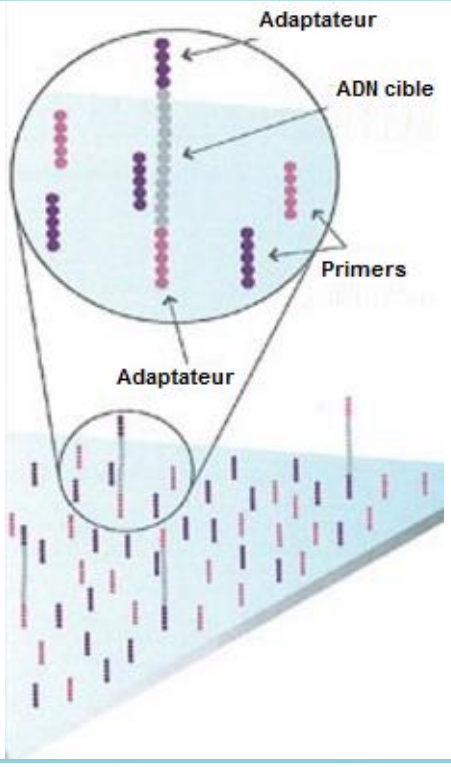
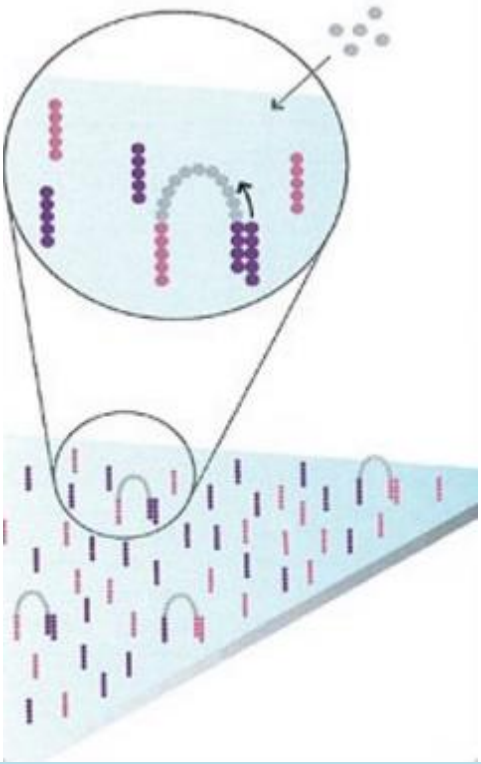
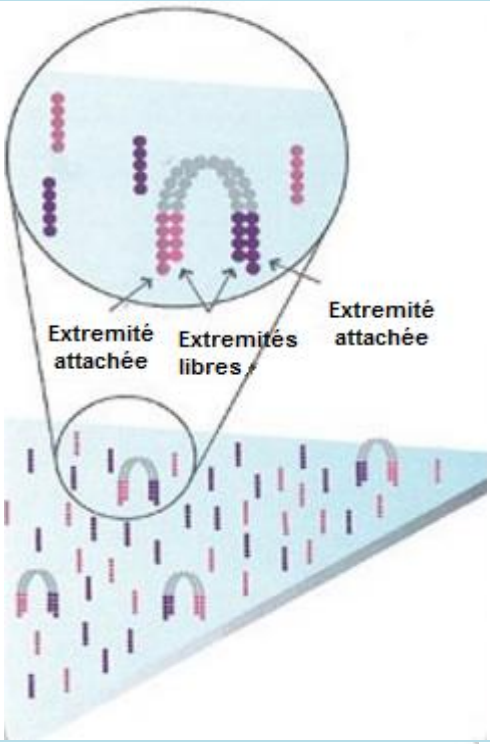
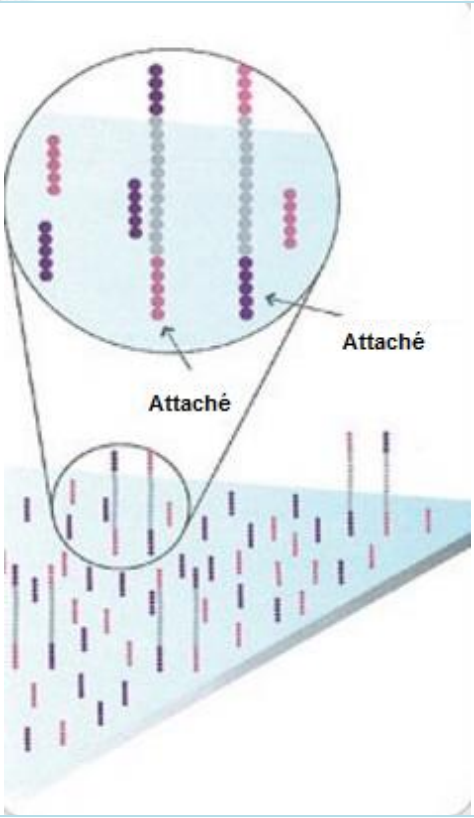


Figure 19 : Préparation de la librairie avec le TruSeq Custom Amplicon.

Les amplicons obtenus sont suspendus sur une plaque de verre du séquenceur MiSeq afin de Générer les Regroupements (Clusters) et de réaliser le séquençage :

L'amplicon obtenue est rattaché par liens covalents, à la plaque de verre	
Hybridation de l'adaptateur libre avec un primer complémentaire présent dans la plaque et formation d'un pont. Ajout des nucléotides et de l'ADN polymérase pour l'amplification du brin.	

La séquence double brin formée possède deux bouts attachés à la plaque et deux autres libres	
La dénaturation de la séquence double brin va rompre la structure en pont pour donner lieu deux séquences simple brin rattachées à la plaque	

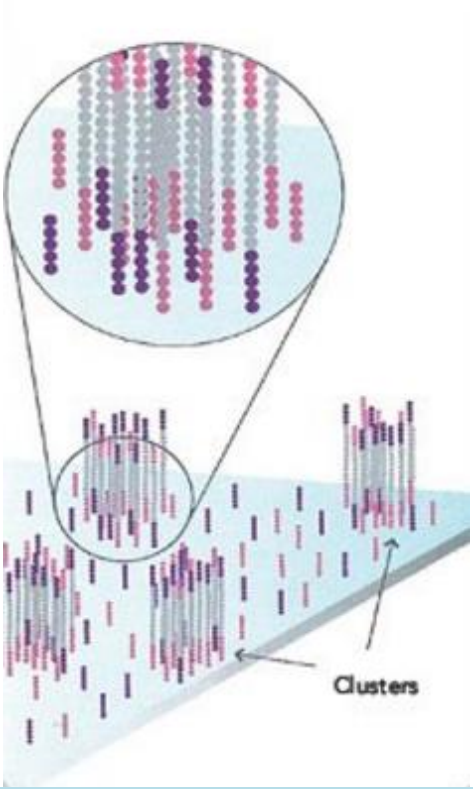
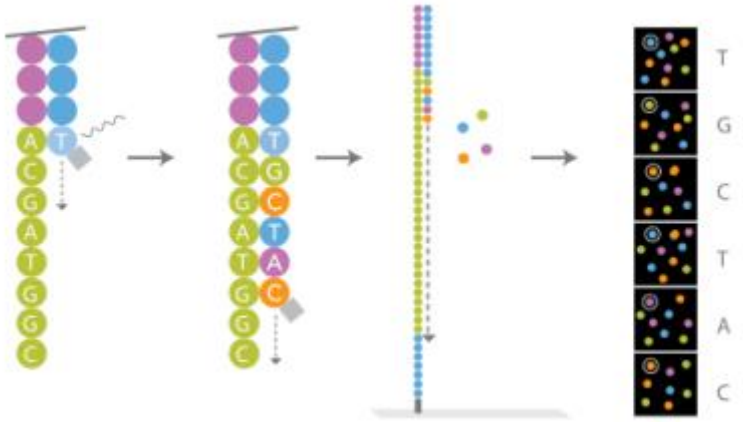
Les cycles d'amplifications des ponts sont répétés jusqu'à ce qu'il y ait la formation d'un regroupement ou Cluster.	
Les séquences double-brins sont dénaturées et les brins antisens sont coupés et on rince pour les éliminer, ne laissant que des brins sens.	
On ajoute des amorces libres en solution qui vont s'hybrider avec les fragments de DNA pour la partie séquençage proprement dite.	

Figure 20 : Préparation des clusters et séquençage par MiSeq Illumina

Les résultats ont été analysés par le logiciel BaseSpace TruSeq Amplicon et les mutations retrouvées ont été confirmées par un séquençage Sanger, incluant les ADN des deux parents afin de déterminer la ségrégation de la mutation identifiée.

Analyse bio-informatique

Les variations retrouvées par séquençage Sanger ou NGS, ont été analysés *in silico* grâce à des outils et algorithmes de prédiction de la pathogénicité des variations, tels que SIFT, PolyPhen, AlignGVGD ou MutationTaster. Ces logiciels permettent de calculer la probabilité selon laquelle une variation peut être pathogène, en prenant en considération la nature de la variation ainsi que la localisation de l'acide aminé concerné et son rôle par rapport à la protéine.

Les variations ont aussi été comparées par rapport aux bases de données NCBI, ExAC, ClinVar et HGMD afin de vérifier si elles ont été précédemment décrites chez d'autres patients, ou bien qu'il s'agisse de nouvelles mutations.

Résultats

PUBLICATIONS

Publication 1 : Adrénoleucodystrophie liée à l'X

Article 1 : Karkar, A., Barakat, A., Bakhchane, A., Fettah, H., Slassi, I., Dorboz, I., Boespflug-Tanguy, O., and Nadifi, S. (2015). A novel mutation in the ABCD1 gene of a Moroccan patient with X-linked adrenoleukodystrophy : case report. BMC Neurol. *15*.

Karkar et al. BMC Neurology (2015) 15:244
DOI 10.1186/s12883-015-0503-1

BMC Neurology

CASE REPORT Open Access

A novel mutation in the *ABCD1* gene of a Moroccan patient with X-linked adrenoleukodystrophy: case report

Adnane Karkar[1,2], Abdelhamid Barakat[3], Amina Bakhchane[3], Houda Fettah[4], Ilham Slassi[5], Imen Dorboz[6], Odile Boespflug-Tanguy[6,7] and Sellama Nadifi[2*]

Abstract

Background: X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD; OMIM: 300100) is the most common peroxisomal disease caused by mutations in the ATP-binding cassette, sub-family D member 1 gene or *ABCD1* (geneID: 215), the coding gene for the adrenoleukodystrophy protein (ALDP), which is an ATP-binding transport protein associated to an active transport of very long chain fatty acids (VLCFAs). Dysfunction of ALDP induces an accumulation of VLCFAs in all tissues leading to a neurodegenerative disorder that involves the nervous system white matter.

Case presentation: In our case report, magnetic resonance imaging (MRI) as well as the high levels of VLCFAs prompted the diagnosis the X-ALD. Molecular analysis of *ABCD1* gene have shown a pathogenic homozygous nonsense mutation (c.1677C > G; p.(Tyr559*)) in exon 7.

Conclusion: Thus, we identified here a novel mutation in the *ABCD1* gene in a Moroccan patient causing X-linked adrenoleukodystrophy.

Keywords: Nonsense mutation, *ABCD1*, ALDP, VLCFAs, X-linked Adrenoleukodystrophy

Background

X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD; OMIM: 300100) is the most common peroxisomal disease caused by mutations in the *ABCD1* (OMIM: 300371), the coding gene for the adrenoleukodystrophy protein (ALDP) [1]. ALDP is an ATP-binding transport protein involved in active transport of enzymes or cofactors implicated in very long chain fatty acids (VLCFAs) β-oxidation in peroxisomes. Therefore, a slight dysfunction of ALDP induces an accumulation of VLCFAs in all tissues [2]. This accumulation often leads to a neurodegenerative disorder in the nervous system's white matter, axons, adrenal cortex, and testes [3] . X-ALD is divided into two main phenotypes: The Child Cerebral ALD (CCALD) and the adrenomyeloneuropathy (AMN). Both of these forms may occur in the same family. However, there is no correlation between mutations in the gene *ABCD1* and the X-ALD phenotype [4]. Epidemiological studies reported that the estimated relative frequency in males with X-ALD is 31–35 % for childhood cerebral ALD and 40–46 % for AMN [5]. Moreover, the total frequency of X-ALD gene carriers is estimated to be 1/16800 for both hemizygous males and heterozygous women [6]. In the present study, a candidate gene approach was used to determine X-ALD related mutation in a Moroccan patient by analyzing the entire coding region of the *ABCD1* gene by direct Sanger sequencing.

Case presentation

The patient is a 7 years and 5 months old boy who has been adopted at birth with no information about the biological parents, therefore we were unable to realize an adequate family investigation with a pedigree and a molecular analysis for the biological mother. The patient had a normal development until he reached 6 years and 11 months old when he suddenly showed hearing difficulties, a decline in visual acuity and a hyperactivity. He also became violent and failed in school.

* Correspondence: nadifisel@yahoo.fr
[2]Genetics and Molecular Pathology Laboratory, Medical school of Casablanca, Hassan II University, Casablanca, Morocco
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2015 Karkar et al. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

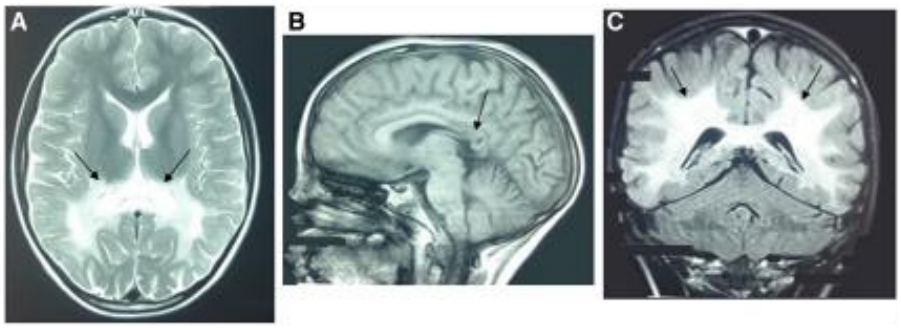


Fig. 1 Brain MRI of the patient with high signal intensity of the white matter in axial T2, the arrows show high signal in the corpus callosum (**a**), low signal intensity of the white matter in sagittal T1 (**b**), low signal in the splenium of corpus callosum (arrow B) and diffuse high signal intensity of the white matter in coronal Flair (arrows **c**)

The neurological examination revealed pyramidal syndrome of the lower limbs, walking difficulties and cerebellar ataxia. Besides, MRI images were consistent with active demyelination as usually observed in childhood cerebral ALD. A high bilateral symmetrical signal intensity was detected in T2 and Flair within the pons and midbrain. Furthermore, a low signal intensity was found in T1 and a diffuse high signal intensity of the white matter in T2 and Flair within the parietal-occipital area and the splenium of corpus callosum (Fig. 1).

Visual evoked potential (VEP) and brainstem auditory evoked potential (BAEP) tests have shown that both visual and auditory pathways evoked potential damage. Serum cortisol level reveals that the adrenal glands were not affected. VLCFAs analysis (Table *1*) by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) revealed high levels of C24/C22 and C26/C22 ratio in plasma.

Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples using standard phenol–chloroform extraction method. The DNA concentration and purity were determined using a nanodrop spectrophotometer (NanoVue™-NV - General Eletrics Healthcare Limited, UK). Polymerase chain reaction (PCR) primer pairs of the *ABCD1* coding regions were designed following the NCBI Reference Sequence: NM_000033.3 (Table *2*).

Table 1 VLCFAs analysis

VLCFAs	Patient	Normal control
C22 mg/L	40.6	1.827 to 22.161
C22 μmol/L	119.364	5.371 to 65.153
C24 mg/L	72.8	1.228 to 18.837
C24 μmol/L	197.288	3.328 to 51.048
C26 mg/L	4.68	<1.03
C26 μmol/L	11.747	<2.585
C24/C22 ratio	1.793	0.665 to 1.008
C26/C22 ratio	0.115	0.009 to 0.069

DNA sequence analysis of the ten coding exons of *ABCD1* gene, including the flanking region of each exon (exon-intron boundaries) was performed using conventional Sanger sequencing. DNA samples were first amplified in a final volume of 25 μl containing: 1× reaction buffer, 1× Q-Solution, 200 μM of each dNTP, 2 mM MgCl2, 1 μM of primers, 2.5 U Hotstar Taq polymerase and 50 ng of genomic DNA (Qiagen GmBH, Hilden, Germany). PCR conditions were as follows: denaturation at 95 °C for 15 min; 94 °C for 1 min; 60 °C- for 1 min; and 72 °C for 1 min for 35 cycles followed by a 10 minute final extension at 72 °C. PCR products were electrophoresed on a 1 % agarose gel and visualized with ethidium bromide staining under ultraviolet light to verify their size and quantity. All the PCR products were treated with exonuclease I and shrimp alkaline phosphatase enzymes prior to sequencing according to the following protocol: 37 °C for 40 min and 80 °C for 15 min. The sequencing reaction was performed on the purified products using the BigDye Terminator v 1.1 Standard Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Electrophoresis of samples was performed on the 3100 ABI Applied Biosystems sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

A mutation was identified in the exon 7 of the *ABCD1* gene, with C substituted by G at nucleotide 1677, corresponding to the stop codon at the residue 559.

The ALDP potentially generated by the appearance of the stop codon exclude a part of exon 7, 8, 9 and 10 coding for the ATP binding domain (Fig. 2).

Conclusion

The first clinical case of X-linked adrenoleukodystrophy was described by Haberfeld and Spieler in 1910 [7]. Sixty years later, Blaw introduced the name adrenoleukodystrophy relative to adrenal insufficiency correlated with leukodystrophy [8]. In 1981, adrenoleukodystrophy locus was identified at the long arm of the X chromosome [9]. Afterwards, the gene related to the X-ALD (*ABCD1*) was identified using positional cloning strategies in 1993[1].

Table 2 *ABCD1* gene primers sequences

Exons	Forward 5′ to 3′	Reverse 3′ to 5′	Size
1(first part)	AGCAACAATCCTTCCAGCCA	CACCACGTCCTCCGTCAGA	689
1(second part)	CTGCTACCTTCGTCAACAG	CCCACACCTTTGGCATCAG	593
2	GTGACTAGAGAGGGAGTGG	GGCTTGTCTGAGTGGTAAC	657
3	CATCAGCCTGTGATGTGCTC	TGGGCCTCTTGAAGTGACAG	531
4	GTGAAGAAGGCAGCCTTGG	CCAGAAGCACATGGAGGTC	509
5	AGACTCCCCAGAATGCAGAG	GGCTGAGGCTTGCATATGTG	216
6	CTCTCAAGGCTGGTCAGGAG	CTTCACCACTTCCTGGGCCT	312
7	CGATGTGAGCGTGTGGATG	GGCACCTGGCACTTTAGAC	372
8 and 9	GGAACTGAGCCAAGACCATT	CTGCTGATGACAGCCGCCT	493
10	TGACCCTGTCCCTCTCCTG	GCTGCTGTCTCCTTCATGTG	322

To date, 1605 mutations have been reported, 703 of them are non-recurrent mutations while 162 others are nonsense and 132 are located in exon 7 (http://www.x-ald.nl). In our study, we identified a novel nonsense mutation in exon 7 (c.1677C > G; p.(Tyr559*)) of a Moroccan patient, there is also another mutation found in the same residue by J. Haasjes & P.A.W. Mooijer in The Netherlands and S.J.S. Steinberg in USA but the nucleotide change is in one position behind our mutation (c.1676A > G; p.(Tyr559Cys)), this mutation is one of the unpublished data in the X-ALD database (http://www.x-ald.nl). No previous studies has investigated the *ABCD1* gene in the Moroccan population. Indeed, only one study reported the same single mutation (c.659 T > C) in three families of Moroccan Jewish descent, probably due to a founder effect [10]. In the North African population, only two other mutations (c.284C > A; p.(Ala95Asp)) and (c.1780 + 2 T > G) of *ABCD1* gene were described in Tunisian patients [11, 12] . All these data lead us to think that the mutations in the *ABCD1* gene are very heterogeneous and their identification in the North African population are very scarce.

Nowadays, Moroccan population has better access to MRI and dosage of VLCFA is requested as soon as the

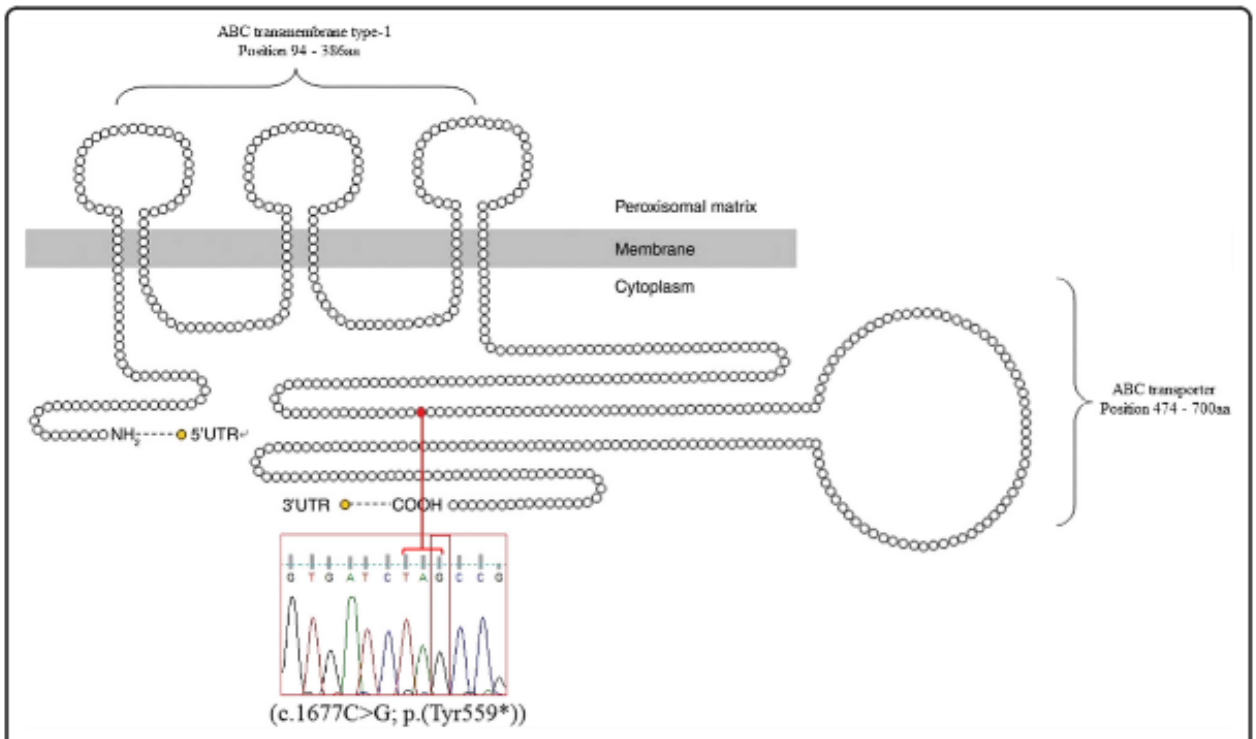


Fig. 2 Location of codon 559 in a schematic of ALDP molecular structure [13], and the sequence of the mutation (c.1677C > G; p.(Tyr559*)) in exon 7 of the *ABDC1* gene

clinical picture is suggestive of X-linked adrenoleukodystrophy. Thus, we expect to have more information about the incidence of the mutations and the frequency of X-ALD within the Moroccan population in the near future.

Consent

Patient was seen at the Memory Consultation group at the CHU IBN ROCHD Neurology Department in Casablanca, Morocco. The protocol was approved by the human ethics committee of the CHU IBN ROCHD in accordance with the declaration of Helsinki for experiments involving humans and written consent was obtained the guardians prior to the study.

Abbreviations

X-ALD: X-linked adrenoleukodystrophy; ABCD1: ATP-binding cassette, sub-family D member 1; ALDP: Adrenoleukodystrophy Protein; VLCFAs: Very Long Chain Fatty Acids; MRI: Magnetic Resonance Imaging; CCALD: Child Cerebral ALD; AMN: Adrenomyeloneuropathy; VEP: Visual Evoked Potential; BAEP: Brainstem Auditory Evoked Potential; PCR: Polymerase Chain Reaction.

Competing interests

The authors declare that no competing interests exist.

Authors' contributions

IS had the neurological patient contacts and acquired the data and drafted the manuscript. IS conceived the case report. All authors critically performed the protocol, discussed the data and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We are indebted to the proband's family for their invaluable cooperation and for providing blood samples.

Author details

[1]Inserm U1141, Paris Diderot University, Sorbonne Paris Cité, Robert Debré Hospital, Paris, France. [2]Genetics and Molecular Pathology Laboratory, Medical school of Casablanca, Hassan II University, Casablanca, Morocco. [3]Laboratoire de Génétique Moléculaire Humaine, Département de la Recherche Scientifique, Institut Pasteur du Maroc, Casablanca, Morocco. [4]Department of Neuropediatrics, Hassan II University Hospital, 9154 Casablanca, Morocco. [5]Department of Neurology, Hassan II University Hospital, 9154 Casablanca, Morocco. [6]Inserm U1141, Paris Diderot University, Sorbonne Paris Cité, DHU PROTECT, Robert Debré Hospital, Paris, France. [7]Reference Center For Leukodystrophies, Department of Neuropediatrics and Metabolic Diseases, Robert Debré Hospital, AP-HP, Paris, France.

Received: 6 August 2015 Accepted: 21 November 2015
Published online: 25 November 2015

References

1. Mosser J, Douar AM, Sarde CO, Kioschis P, Feil R, Moser H, et al. Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. Nature. 1993;361:726–30.
2. Singh I, Moser HW, Moser AB, Kishimoto Y. Adrenoleukodystrophy: impaired oxidation of long chain fatty acids in cultured skin fibroblasts an adrenal cortex. Biochem Biophys Res Commun. 1981;102:1223–9.
3. Moser HW. Adrenoleukodystrophy: phenotype, genetics, pathogenesis and therapy. Brain. 1997;120:1485–508.
4. Kemp S, Berger J, Aubourg P. X-linked adrenoleukodystrophy: Clinical, metabolic, genetic and pathophysiological aspects. Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis. 1822;2012:1465–74.
5. Kemp S, Pujol A, Waterham HR, van Geel BM, Boehm CD, Raymond GV, et al. ABCD1 mutations and the X-linked adrenoleukodystrophy mutation database: role in diagnosis and clinical correlations. Hum Mutat. 2001;18:499–515.
6. Bezman L, Moser AB, Raymond GV, Rinaldo P, Watkins PA, Smith KD, et al. Adrenoleukodystrophy: incidence, new mutation rate, and results of extended family screening. Ann Neurol. 2001;49:512–7.
7. Haberfeld DW, Spieler DF. Zur diffusen Him-Rückenmarksklerose im Kindesalter. Dtsch Z Für Nervenheilkd. 1910;40:436–63.
8. Blaw ME. Melanodermic type leukodystrophy (adrenoleukodystrophy). Handb Clin Neurol. 1970;10:128–33.
9. Migeon BR, Moser HW, Moser AB, Axelman J, Sillence D, Norum RA. Adrenoleukodystrophy: evidence for X linkage, inactivation, and selection favoring the mutant allele in heterozygous cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1981;78:5066–70.
10. Neumann S, Topper A, Mandel H, Shapira I, Golan O, Gazit E, et al. Identification of new mutations in Israeli patients with X-linked adrenoleukodystrophy. Genet Test. 2001;5:65–8.
11. Kallabi F, Hadj Salem I, Ben Salah G, Ben Turkia H, Ben Chehida A, Tebib N, et al. Molecular Characterization of X-Linked Adrenoleukodystrophy in a Tunisian Family: Identification of a Novel Missense Mutation in the ABCD1 Gene. Neurodegener Dis. 2013;12:207–11.
12. Kallabi F, Hadj Salem I, Ben Chehida A, Ben Salah G, Ben Turkia H, Tebib N, et al. Splicing defects in ABCD1 gene leading to both exon skipping and partial intron retention in X-linked adrenoleukodystrophy Tunisian patient. Neurosci Res. 2015;97:7–12.
13. Cai Y, Jiang M, Liang C, Peng M, Cheng J, Sheng H, et al. A novel ABCD1 gene mutation in a Chinese patient with X-linked adrenoleukodystrophy. J Pediatr Endocrinol Metab. 2014.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

BioMed Central

Publication 2 soumise : Leucodystrophie Métachromatique

Article 2: Karkar, A., Dorboz, I., Fettah, H., Itri, M., Boespflug-Tanguy, O., and Nadifi, S. Moroccan patients with metachromatic leukodystrophy carrying mutations in ARSA gene including a novel one.

Journal de soumission : BMC Medical Genetics

Moroccan patients with metachromatic leukodystrophy carrying mutations in *ARSA* gene including a novel one.

Adnane Karkar[1], Dorboz Imen[2], Houda Fettah[3], Mohamed Itri[4], Boespflug Tanguy Odile[5] and Sellama Nadifi[6].

[1] Inserm U1141, Paris Diderot University, Sorbonne Paris Cité, Robert Debré Hospital, Paris, France, Genetics and Molecular Pathology Laboratory, Medical school of Casablanca, Casablanca, Morocco. Electronic address: karkar.adnane@gmail.com

[2] Inserm U1141, Paris Diderot University, Sorbonne Paris Cité, DHU PROTECT, Robert Debré Hospital, Paris, France. Electronic address: imen.dorboz@inserm.fr

[3] Department of Neuropediatrics, Hassan II University Hospital, 9154 Casablanca, Morocco Electronic address: h_fettahm@hotmail.com

[4] Department of Neuropediatrics, Hassan II University Hospital, 9154 Casablanca, Morocco Electronic address: meditri54@yahoo.frmailto:meditri54@yahoo.fr

[5] Inserm U1141, Paris Diderot University, Sorbonne Paris Cité, DHU PROTECT, Robert Debré Hospital, Paris, France; Reference Center for Leukodystrophies, Department of Neuropediatrics and Metabolic Diseases, Robert Debré Hospital, AP-HP, Paris, France. Electronic address: odile.boespflug-tanguy@rdb.aphp.frmailto:odile.boespflug-tanguy@rdb.aphp.fr

[6] Genetics and Molecular Pathology Laboratory, Faculty of Medicine and pharmacy of Casablanca, Hassan II University, Casablanca, Morocco. Electronic address: nadifisel@yahoo.fr (corresponding author)

Abstract:

Background: Metachromatic leukodystrophy (MLD; OMIM# 250100) is a neurodegenerative lysosomal storage disease characterized by the accumulation of sulfatides in the nervous system resulting in progressive demyelination. This disorder is caused, in the majority of cases, by a deficiency of the lysosomal enzyme arylsulfatase A (ARSA), encoded by the *ARSA* gene (OMIM: 607574) and involved in the catabolism of sulfatides.

Case presentation: We report three Moroccan patients with MLD, the first one presents an infantile form, while the second and third ones present the juvenile form. Molecular analysis of *ARSA* gene have shown a novel pathogenic homozygous nonsense mutation c.877C>T (p.Arg293*) in exon 5 for the first patient and a pathogenic homozygous missense mutation c.1283 C>T (p.Pro428Leu) in exon 8 for the second and third patients.

Conclusion: In the present study, we have identified a novel mutation in the *ARSA* gene causing metachromatic leukodystrophy in a Moroccan patient.

Keywords: Leukodystrophy, *ARSA*; MLD; Infantile form; Juvenile form.

Background

Metachromatic leukodystrophy (MLD; OMIM# 250100) is a neurodegenerative lysosomal storage disease characterized by the accumulation of cerebroside-3-sulfate (sulfatide) in the nervous system resulting in progressive demyelination. This disorder is caused by defects in the degradation of sulfatides. In vivo, the catabolism of sulfatides requires both the lysosomal enzyme arylsulfatase A (ARSA) and the specific sphingolipid activator protein, saposin B (Sap-B). However, most MLD cases are due to mutations within the ARSA gene (OMIM #607574), but some mutations in the PSAP gene (OMIM #176801), encoding for the Sap-B domain, have also been described in MLD patients with normal ARSA enzyme levels[1].MLD is transmitted as an autosomal recessive trait and is one of the most common lysosomal storage diseases [2]. There are three clinical subtypes of MLD: the most common is late-infantile MLD (50%-60% of cases), which usually manifests between 12 and 18 months of age and is characterized by motor signs of peripheral neuropathy, deterioration in intellect, speech, and coordination. Within 2 years of onset, gait disturbance, quadriplegia and blindness [3]. The second subtype is juvenile MLD (20%-30% of cases) the manifestation of the disorder is usually behavioral problems and increasing difficulties at school. Progression of the disorder is slower than in the late infantile form, affected individuals may survive for about 20 years after diagnosis. The third subtype is adult MLD (15%-20% of cases), first symptoms appear during the teenage years or later, affected individuals may experience psychiatric symptoms such as delusions or hallucinations, and they may survive for 20 to 30 years after diagnosis. Age of onset is usually similar among members of the same family. The disease course may be from three to ten years or more in the late-infantile form, and up to 20 years or more in the juvenile and adult forms [4].

Low ARSA enzymatic activity in leukocytes or fibroblasts is not enough to diagnose the MLD due to the high frequency of the pseudodeficiency allele (ASA-Pd), with the c.*96A>G and c.1055A>G variants. Individuals with two copies of this variants can have a low ARSA activity, same as MLD patients, but they are not affected with the disease. Also, they do not excrete sulfatides in urine [5].

In the present study we report three Moroccan patients with late infantile and juvenile forms of MLD, carrying two *ARSA* mutations including a novel mutation shown by sequencing analysis.

Case presentation

The first patient is a 2 years old girl. Born of first-degree consanguineous parents, native of southern Morocco. She has a healthy older sister, but her family experienced a series of premature death especially on the side of her father (Figure 1). Pregnancy and delivery were normal. She had a good psychomotor development, walking at 12 months. At 16 months she had a progressive psychomotor regression, loss of walking, seat station and language.

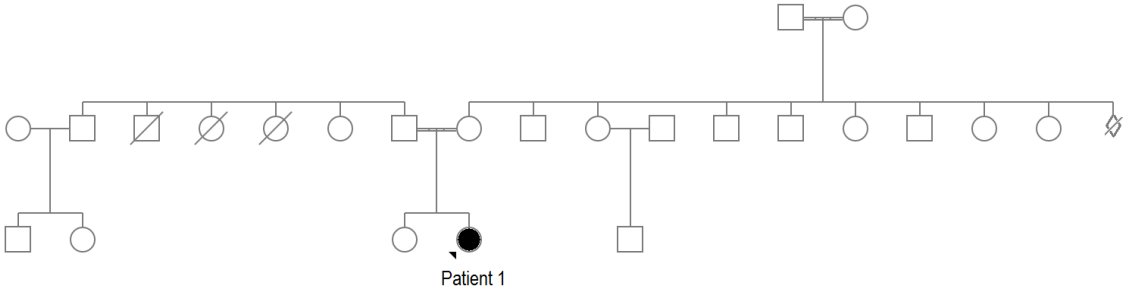


Figure 1 Pedigree of the first patient's family

Examination showed an axial hypotonia, pyramidal syndrome.

Magnetic resonance imaging (MRI) showed hyperintensity signal of the central white matter that was more pronounced in the parieto-occipital area with sparing of subcortical U fiber (Figure 2)

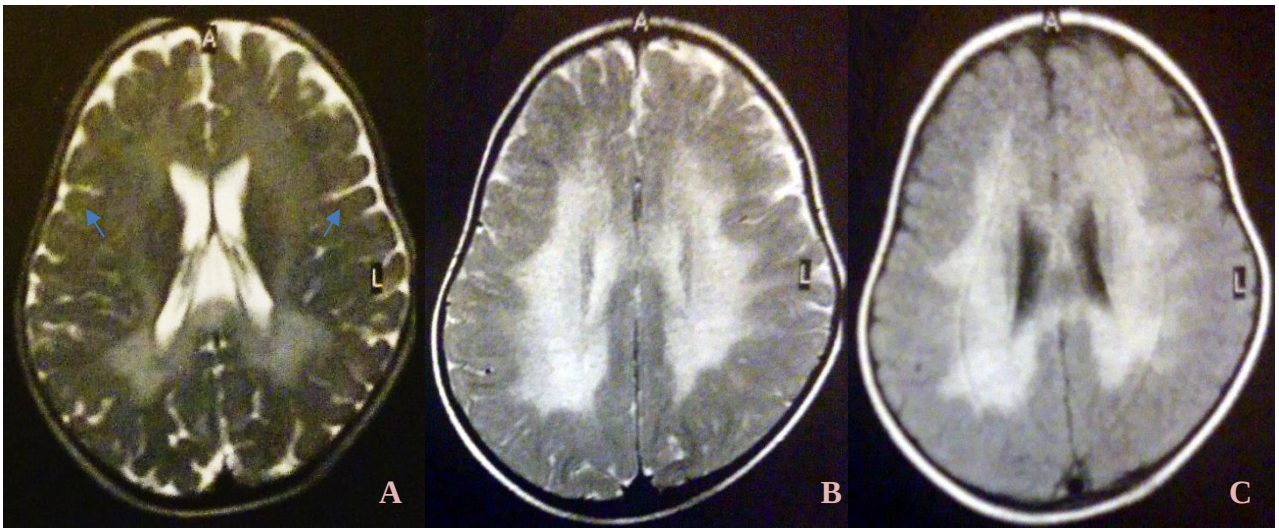


Figure 2: Brain MRI of the first patient with high signal intensity of the white matter in axial T2 (A and B), and axial FLAIR in C. (blue arrows show the subcortical U fiber)

The Second and third patients are brother and sister born from healthy first degree consanguineous parents, native of central Morocco (Figure 3). The sister is 12 years old, pregnancy and delivery were normal. She first presented good psychomotor development, then, at age 7 she had an episode of hepatocellular insufficiency and at 9 years old a progressive psychomotor regression and swallowing disorder.

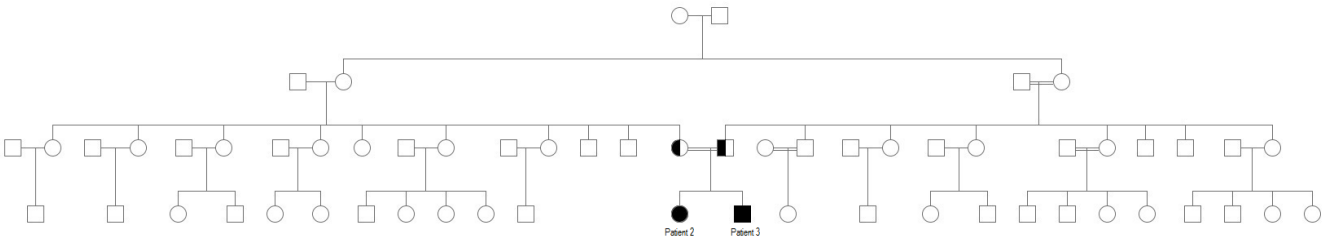


Figure 3: Pedigree of the second and third patients' family

Clinical examination showed static and kinetic ataxia, tremors, dysarthria with hypersialorrhea, spasticity, hyperactive deep tendon reflexes, bilateral clonus, positive Babinski and Rossolimo.

Biochemical analysis showed high urinary sulfatide. Electroneuromyography (ENMG) showed peripheral sensory and motor neuropathy. MRI showed a diffuse white matter hyperintensity with sparing of subcortical U fiber and the tigroid pattern of the supratentorial white matter (Figure 4)

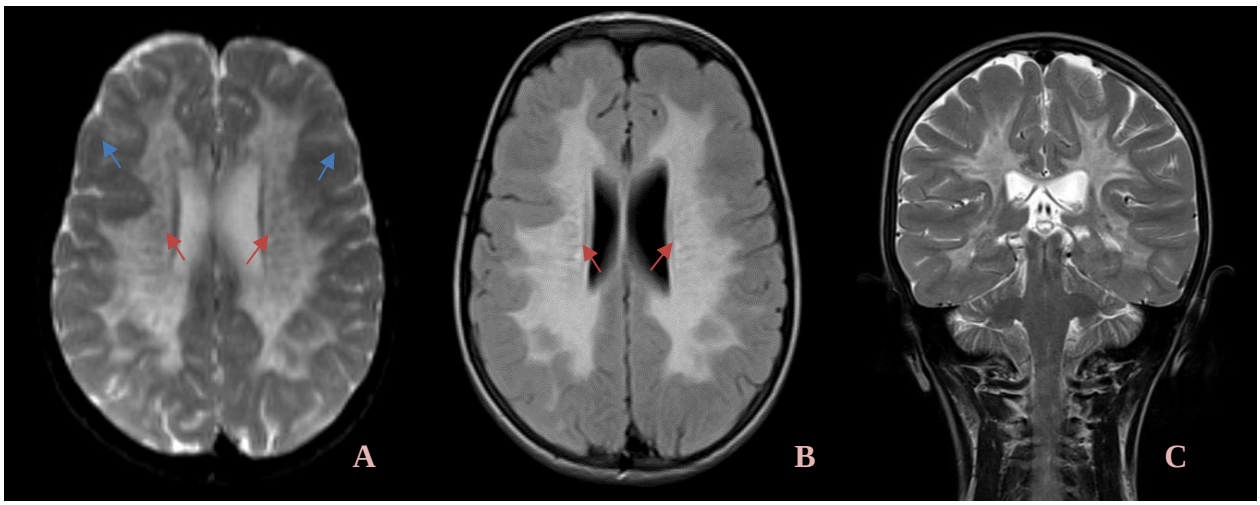


Figure 4: Brain MRI of the second patient with high signal intensity of the white matter in axial T2 (A), axial FLAIR in B and sagital T2 in C. (blue arrows show the subcortical U fiber, and the orange ones show the "tigroid" or "leopard-skin")

The brother is 10 years old who still goes to school. At the age of 8 he started showing some minor motor difficulties. The examination showed a hyperreflexia. MRI showed a diffuse white matter hyperintensity with sparing of subcortical U fiber and the tigroid pattern of the supratentorial white matter (Figure 5)

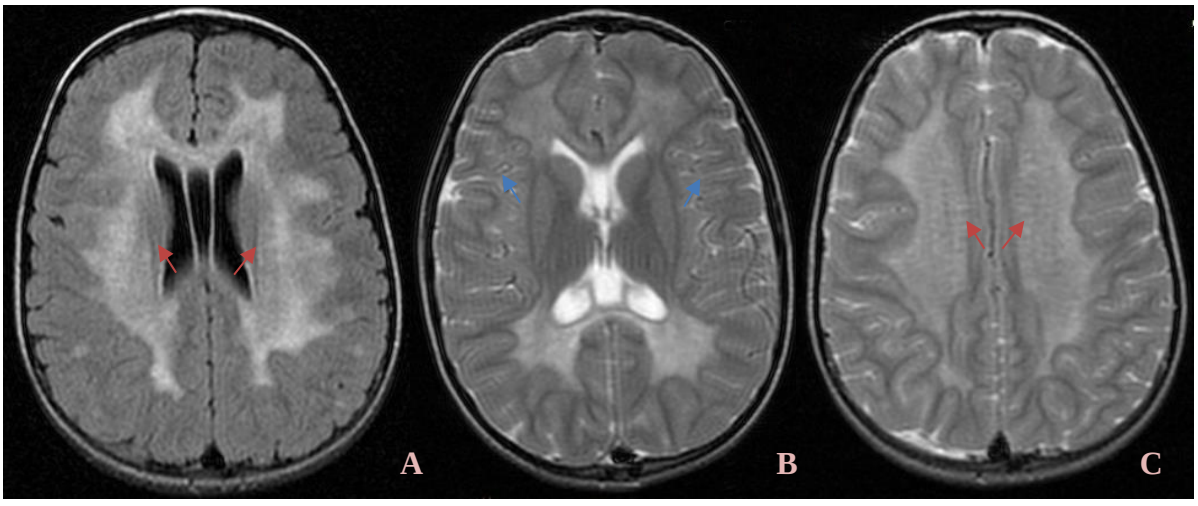


Figure 5: Brain MRI of the third patient with high signal intensity of the white matter in axial FLAIR (A), and axial T2 in B and C. (blue arrows show the subcortical U fiber, and the orange ones show the "tigroid" or "leopard-skin"))

Genetic study:

Polymerase chain reaction (PCR) primer pairs of the 8 *ARSA* gene exons, were designed following the NCBI Reference Sequence (NM_000487; GRCh38), using Primer3 software. DNA sequence analysis of the 8 *ARSA* gene exons was performed using conventional Sanger sequencing. The DNA samples were first amplified in a final volume of 25 µl containing: 1× reaction buffer, 1× Q-Solution, 200 µM of each dNTP, 2 mM MgCl2, 1 µM of primers, 2.5 U Taq DNA polymerase and 50 ng of genomic DNA (Qiagen GmBH, Hilden, Germany).The PCR conditions were as follows: denaturation at 94 °C for 3 min; 94 °C for 1 min; 60 °C- for 1 min; and 72 °C for 1 min for 35 cycles followed by a 10 minute final extension at 72 °C. The PCR products were electrophoresed on a 2% agarose gel and visualized with GelRed™ (Biotium, Hayward, CA, USA) staining under ultraviolet light to verify their size and quality. All the PCR products were treated with exonuclease I and shrimp alkaline phosphatase enzymes prior to sequencing according to the following protocol: 37°C for 15 min and 80°C for 15 min. Then, the obtained PCR products were sequenced using the BigDye Terminator v 1.1Standard Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and the 3100 ABI Applied Biosystems sequencer.

Results and discussion:

The Sanger sequencing analysis identified a homozygous mutation [c.877C>T (p.Arg293*)] in the first patient (Figure 6). A transition of C to T in exon 5 leading to a nonsense substitution creating a premature stop codon. This mutation has been described in heterozygous form, associated with another mutation, [c.526C>T (p.Gln176*)], in a Taiwanese patient [6], but it has never been described in a homozygous form before, according to the Human Gene Mutation Database [7]. The segregation analysis showed that the mother carried the same mutation in the heterozygous state, but on the other hand we could not have the father's sample in order to carry out the sequencing.

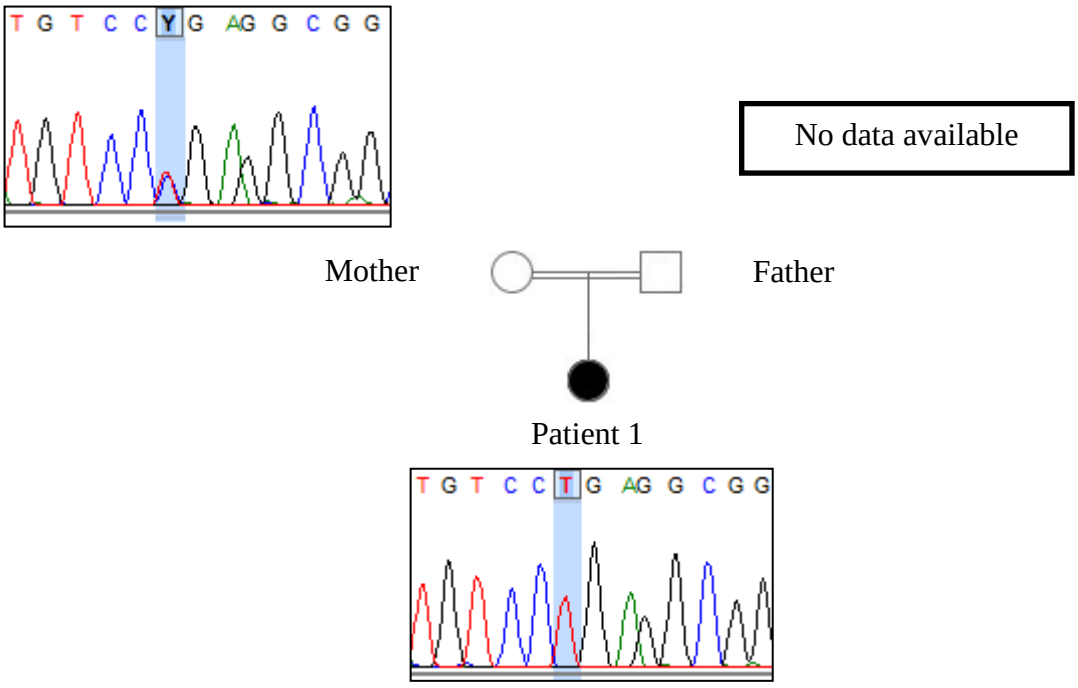


Figure 6: Pedigree with the Sanger sequences showing the segregation of the c.877C>T (p.Arg293) mutation*

For the second and third patients, the Sanger sequencing analysis identified the same homozygous mutation [c.1283 C>T (p.Pro428Leu)]. A transition of C to T in exon 8 leading to a missense substitution (Figure 7). This mutation is well known in the literature, it was described as pathogenic in Clinvar (RCV 000020314.4), dbSNP (rs28940893). This mutation is considered the second most described mutation with 12.2% of all the ARSA-MLD alleles reported [1].

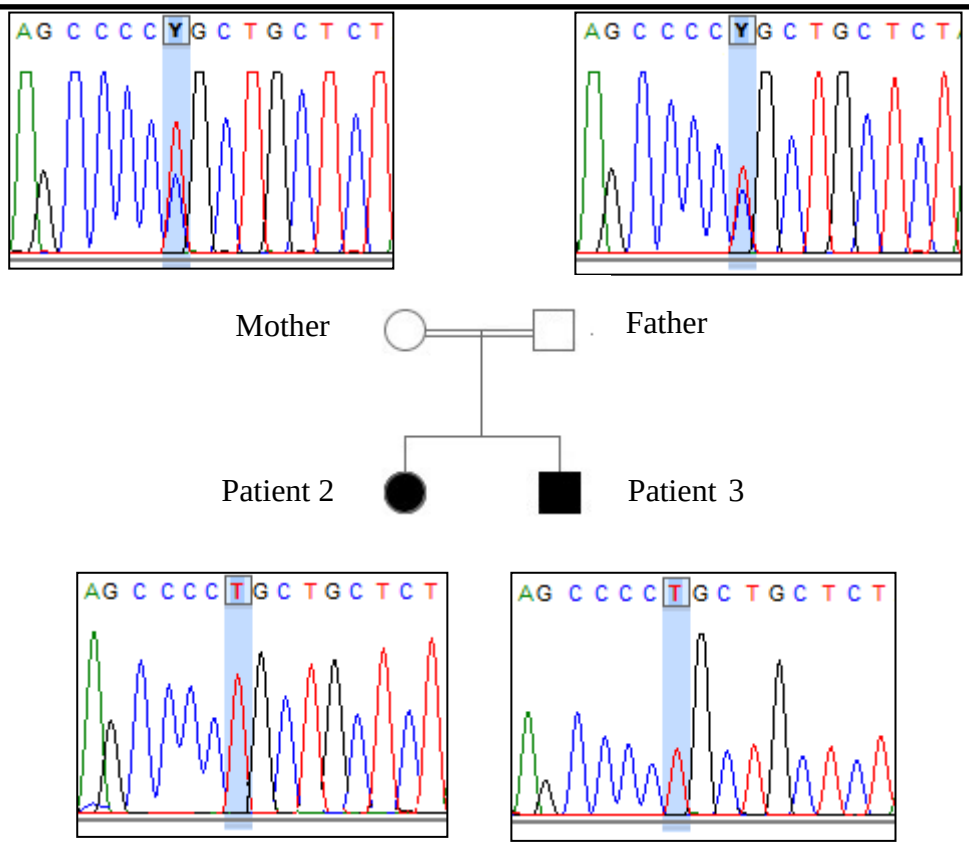


Figure 7: Pedigree with the Sanger sequences showing the segregation of the c.1283 C>T (p. Pro428Leu) mutation

In Moroccan population there is no genetic study describing mutations in ARSA gene, however there is only one publication about clinical cases with MLD phenotype [8], and another one with mutation in PSAP gene causing MLD in two Moroccan brothers [9].

ASA-Pd allele has been studied in the Tunisian population which is another Maghreb population sharing the same characteristics of the Moroccan one. This former study showed a relatively high allele frequency of the c.*96A>G variant corresponding to 17.4% and 25.6 % for the c.1055A>G variant [10], compared with the European population with 8.2% for the c.*96A>G variant and 13.9% for the c.1055A>G variant [11].

In Morocco the MLD diagnostic approach is based on biochemical analyzes, namely the assay of ARSA enzymatic activity and the urinary excretion of sulfatides. This approach which consists of the combination of the two biochemical analysis results may prevent the misdiagnosis of MLD due to the ASA-PD alleles, but doesn't allows us to diagnose the MLD cases with PSAP mutations.

It is for this reason that the molecular diagnosis of the ARSA and PSAP genes by sequencing must be carried out in order to improve our knowledge of the mutations spectrum in this population and also to allow a complete diagnosis of the disease. Knowing the high degree of consanguinity in Moroccan population, 22.79% [12], the incidence of autosomal recessive disorders such as MLD should be more important than that described in the literature so far, in the same way the number of mutations described in Moroccan patients should be more important than the one reported until today. Adding the results of the present study to a previously reported new mutation in ABCD1 gene for a Moroccan X-linked adrenoleukodystrophy patient [13], the bulk of the work still remains to be accomplished as we think that the leukodystrophies are under diagnosed in Morocco.

Consent

Patients were seen at the Memory Consultation group of the CHU IBN ROCHD Neurology Department in Casablanca, Morocco. The protocol was approved by the human ethics committee of the CHU IBN ROCHD in accordance with the declaration of Helsinki for experiments involving humans and written informed consent was obtained from the guardians prior to the study.

Competing Interests

The authors declare that no competing interests exist.

List of abbreviations:

MLD: Metachromatic leukodystrophy

ARSA: Arylsulfatase A

ASA-Pd: Pseudodeficiency allele

MRI: Magnetic Resonance Imaging

ENMG: Electroneuromyography

PCR: Polymerase chain reaction

Acknowledgements

We are indebted to the patients and their parents for their invaluable cooperation and for providing blood samples.

Figures legends

Figure 1: Pedigree of the patient #1's family.

Figure 2: Brain MRI of the patient #1 with high signal intensity of the white matter in axial T2 (A and B), and axial FLAIR in C. (blue arrows show the subcortical U fiber)

Figure 3: Pedigree of the patients #2 and #3's family.

Figure 4: Brain MRI of the patient #2 with high signal intensity of the white matter in axial T2 (A), axial FLAIR in B and sagital T2 in C. (blue arrows show the subcortical U fiber, and the orange ones show the "tigroid" or "leopard-skin")

Figure 5: Brain MRI of the patient #3 with high signal intensity of the white matter in axial FLAIR (A), and axial T2 in B and C. (blue arrows show the subcortical U fiber, and the orange ones show the "tigroid" or "leopard-skin"))

Figure 6: Pedigree with the Sanger sequences showing the segregation of the c.877C>T (p.Arg293*) mutation. *: no data available for the father.

Figure 7: Pedigree with the Sanger sequences showing the segregation of the c.1283 C>T (p.Pro428Leu) mutation

References

1. Cesani M, Lorioli L, Grossi S, Amico G, Fumagalli F, Spiga I, et al. Mutation Update of ARSA and PSAP Genes Causing Metachromatic Leukodystrophy. Hum. Mutat. 2016;37:16–27.

2. Giugliani R. Newborn screening for lysosomal diseases: current status and potential interface with population medical genetics in Latin America. J Inherit Metab Dis. 2012;35:871–7.

3. Wolpert SM, Anderson ML, Kaye EM. Metabolic and degenerative disorders. In: Wolpert SM, Barnes PD, eds.MRI in pediatric neuroradiology. St Louis. Mo: Mosby.1992;121-150;

4. Fluharty AL, Fluharty CB, Bohne W, Von Figura K, Gieselmann V. Two new arylsulfatase A (ARSA) mutations in a juvenile metachromatic leukodystrophy (MLD) patient. Am J Hum Genet. 1991;49:1340.

5. Gieselmann V, Zlotogora J, Harris A, Wenger DA, Morris CP. Molecular genetics of metachromatic leukodystrophy. Hum Mutat. 1994;4:233–42.

6. Liaw H-R, Lee H-F, Chi C-S, Tsai C-R. Late infantile metachromatic leukodystrophy: Clinical manifestations of five Taiwanese patients and Genetic features in Asia. Orphanet J Rare Dis. 2015;10:144.

7. Stenson PD, Ball EV, Mort M, Phillips AD, Shiel JA, Thomas NST, et al. Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. Hum Mutat. 2003;21:577–81.

8. Safi M, Asmama Y, Talbaoui H, Chabraoui L, Kriouile Y. Leucodystrophie métachromatique : à propos de quatre cas et revue de littérature. Research fr. 2014;1:886.

9. Siri L, Rossi A, Lanza F, Mazzotti R, Costa A, Stroppiano M, et al. A novel homozygous splicing mutation in PSAP gene causes metachromatic leukodystrophy in two Moroccan brothers. neurogenetics. 2014;15:101–6.

10. Ben Halim N, Dorboz I, Kefi R, Kharrat N, Eymard-Pierre E, Nagara M, et al. Determination of arylsulfatase A pseudodeficiency allele and haplotype frequency in the Tunisian population. Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol. 2016;37:403–9.

11. The 1000 Genomes Project Consortium. A global reference for human genetic variation. Nature. 2015;526:68–74.

12. Talbi J, Khadmaoui E, Soulaymani A, Chafik A. Etude de la consanguinité dans la population marocaine. Impact sur le profil de la santé. Antropo. 2007;1–11.

13. Karkar A, Barakat A, Bakhchane A, Fettah H, Slassi I, Dorboz I, et al. A novel mutation in the ABCD1 gene of a Moroccan patient with X-linked adrenoleukodystrophy: case report. BMC Neurol. 2015;15:244

Publication 3 soumise : Syndrome d'Aicardi-Goutières

Article 3: Karkar, A., Dorboz, I., Nadifi, S., and Boespflug-Tanguy, O. *RNASEH2B* A177T mutation in the Moroccan population.

Journal : Archives of Disease in Childhood

RNASEH2B A177T mutation in Moroccan population

Adnane Karkar[1], Dorboz Imen[2], Sellama Nadifi[3] and Odile Boespflug Tanguy[4]

[1] Inserm U1141, Paris Diderot University, Sorbonne Paris Cité, Robert Debré Hospital, Paris, France, Genetics and Genetics and Molecular Pathology Laboratory, Faculty of Medicine and pharmacy of Casablanca, Hassan II University, Casablanca, Morocco. Electronic address: karkar.adnane@gmail.com

[2] Inserm U1141, Paris Diderot University, Sorbonne Paris Cité, DHU PROTECT, Robert Debré Hospital, Paris, France. Electronic address: imen.dorboz@inserm.fr

[3] Genetics and Molecular Pathology Laboratory, Faculty of Medicine and pharmacy of Casablanca, Hassan II University, Casablanca, Morocco. Electronic address: Nadifisel@gmail.com (corresponding author)

[4] Inserm U1141, Paris Diderot University, Sorbonne Paris Cité, DHU PROTECT, Robert Debré Hospital, Paris, France; Reference Center For Leukodystrophies, Department of Neuropediatrics and Metabolic Diseases, Robert Debré Hospital, AP-HP, Paris, France. Electronic address: odile.boespflug-tanguy@rdb.aphp.fr

Background

Ribonuclease H2B (RNASEH2B) is one of the three Ribonuclease H2 subunits, which is the major nuclear enzyme involved in the degradation of RNA/DNA hybrids and removal of ribonucleotides misincorporated in genomic DNA. Mutations in *RNASEH2B* have been implicated in an autosomal recessive disorder, Aicardi-Goutières Syndrome (AGS; MIM 225750) [1]. Besides *RNASEH2B*, 6 other genes have been described in AGS (*TREX1, RNASEH2C, RNASEH2A, SAMHD1, ADAR1 and IFIH1*)[2]. AGS is a severe encephalopathy characterized in its most severe form by cerebral atrophy, leukodystrophy, calcification of the basal ganglia and white matter, chronic cerebrospinal fluid (CSF) lymphocytosis, increased CSF alpha-interferon (IFNA1), and negative serologic investigations for common prenatal infections [3–5]. AGS is sometimes mistaken for the sequelae of congenital infection, due to an important mimic of acquired in utero viral infection [6]. Severe neurologic dysfunction becomes clinically apparent in infancy, and manifests as progressive microcephaly, spasticity, dystonic posturing, profound psychomotor retardation, and often death in early childhood. Outside the nervous system, thrombocytopenia, hepatosplenomegaly, and elevated hepatic transaminases along with intermittent fever may also erroneously suggest an infective process[7]. In 2006 Crow et al. identified a homozygous 529 G-A transition in exon 7 of *RNASEH2B*, resulting in an Ala177-to-Thr substitution (c.529G>A (p.Ala177Thr)). The families were of distinct nationality including Moroccan and North African. In total, 20 of the 36 mutant alleles in 18 AGS families were A177T [8]. Also in 2014 Crow et al. identified this same mutation in 3 North African patients with a phenotype of nonsyndromic spastic paraplegia and normal neuroimaging, this results emphasized the phenotypic variability associated with AGS[9]. Knowing that the A177T mutation is mainly described in the North African population, we sought to identify it by sequencing 104 healthy Moroccan individuals and

calculating the prevalence. We also sequenced Moroccan patients with an AGS phenotype who did not have a molecular diagnosis yet.

Patients:

The first patient is a two years old boy born from healthy first degree consanguineous parents natives of central Morocco. Pregnancy, delivery and first months of psychomotor development were normal. He acquired holding head and sitting position at 3 and 6 months respectively but he never walked. At 12 months he had a progressive psychomotor regression. Examination showed a pyramidal syndrome, dysmetria and tremor. Magnetic resonance imaging (MRI) showed abnormality in the periventricular white matter. Brain computed tomography (CT) scan reveal the presence of bilateral and symmetrical basal ganglia calcification (Figure 1).

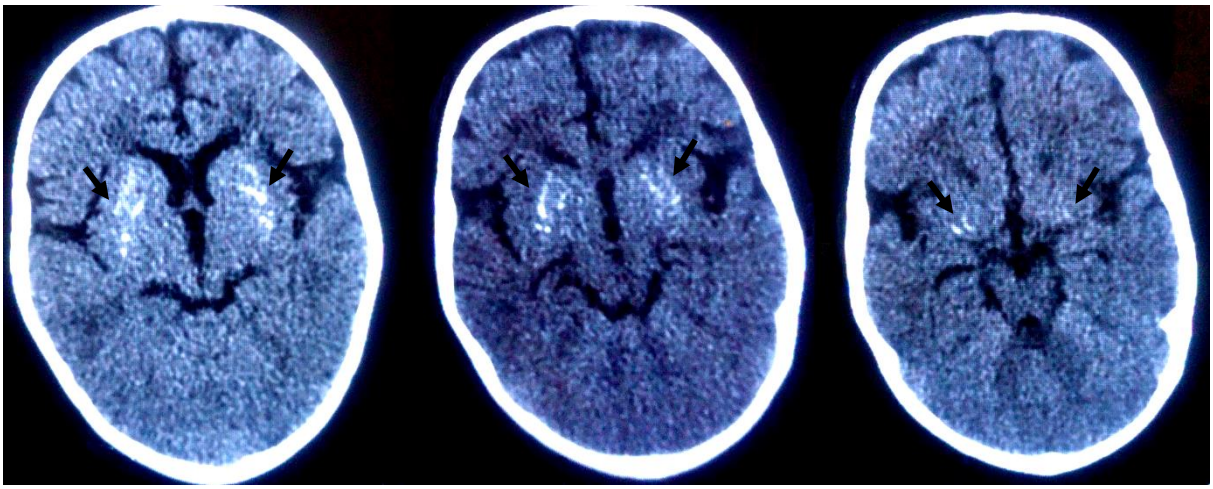


Figure 1: CT scan with black arrows showing basal ganglia calcification

The second patient is a seven years old boy born from healthy first degree consanguineous parents natives of central Morocco. Pregnancy, delivery and first months of psychomotor development were normal but he never acquired sitting position and never walked. Examination showed a pyramidal syndrome. Magnetic resonance imaging (MRI) showed bilaterally symmetric abnormality in the white matter signal in the periventricular and temporo-parieto-occipital areas and a low signal of the thalami.

The third patient is a six years old girl born from healthy first degree consanguineous parents natives of north Morocco. Pregnancy, delivery and first months of psychomotor development were normal but she never walked. Examination showed a pyramidal syndrome. Brain CT scan showed calcification

Methods:

Blood samples were collected from 104 Moroccan healthy individuals showing no evidence of any disease and from 3 patients with clinical suspicion of AGS and their parents, this individuals volunteered for the genetic study and all of them signed an informed consent.

DNA extraction was performed using standard phenol-chloroform extraction method, concentration and purity were determined using a NanoVue Plus spectrophotometer (NanoVue™-NV - General Eletrics Healthcare Limited, UK).

Polymerase chain reaction (PCR) primer pair of the c.529G>A (p.Ala177Thr) mutation, was designed following the NCBI Reference Sequence (NM_001142279; GRCh38), using Primer3 software. DNA sequence analysis was performed using conventional Sanger sequencing. The DNA samples were first amplified in a final volume of 25 µl containing: 1× reaction buffer, 1× Q-Solution, 200 µM of each dNTP, 2 mM MgCl2, 1 µM of primers, 2.5 U Taq DNA polymerase and 50 ng of genomic DNA (Qiagen GmBH, Hilden, Germany).The PCR conditions were as follows: denaturation at 94°C for 3 min; 94°C for 1 min; 58°C- for 1 min; and 72°C for 1 min for 35 cycles followed by a 10 minute final extension at 72 °C. The PCR products were electrophoresed on a 2% agarose gel and visualized with GelRed™ (Biotium, Hayward, CA, USA) staining under ultraviolet light to verify their size and quality. All the PCR products were treated with exonuclease I and shrimp alkaline phosphatase enzymes prior to sequencing according to the following protocol: 37°C for 15 min and 80°C for 15 min. Then, the obtained

PCR products were sequenced using the BigDye Terminator v 1.1 Standard Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and the 3100 ABI Applied Biosystems sequencer.

SNPAnalyzer 2.0 was used to determine the allelic and genotypic frequencies as well as for the Hardy–Weinberg equilibrium test, p value less than 0.05 was considered as significant [10].

Results and discussion:

Sequencing analysis identified a homozygous mutation c.529G>A (p.Ala177Thr) in the three patients. The segregation analysis showed that all the parents carried the same mutation in the heterozygous state (Figure 2, 3 and 4).

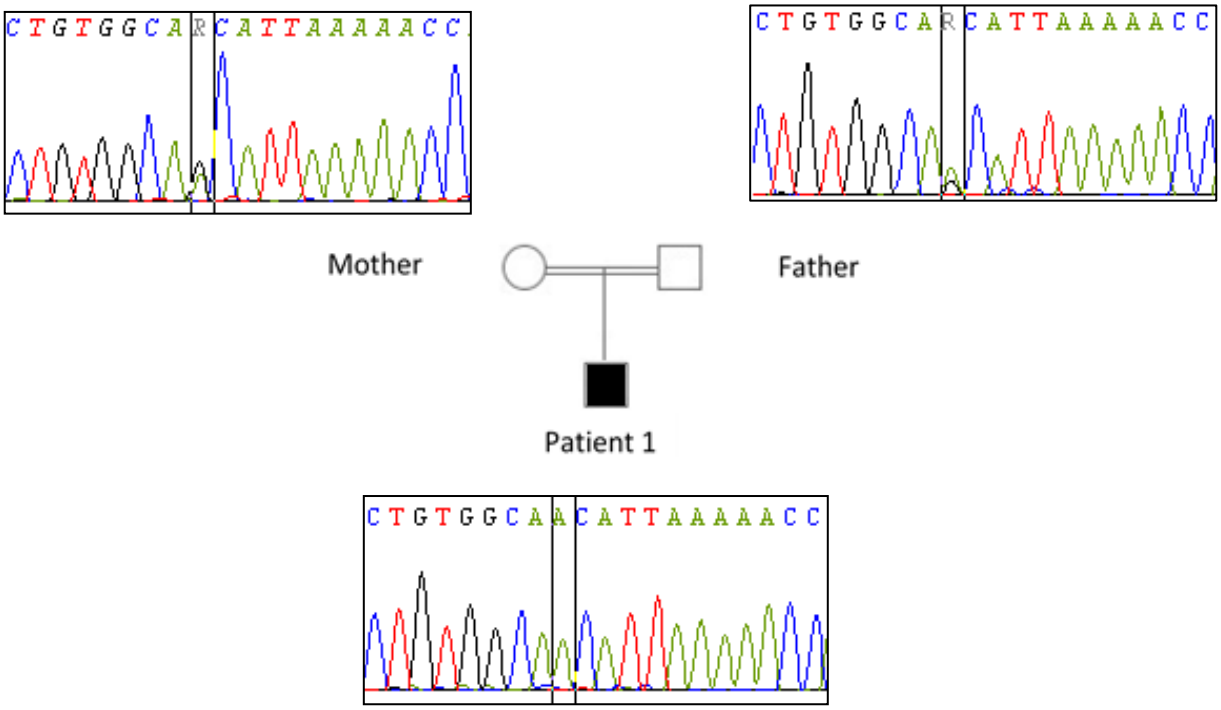


Figure 2: Pedigree with the Sanger sequences showing the segregation of the A177T mutation in patient 1

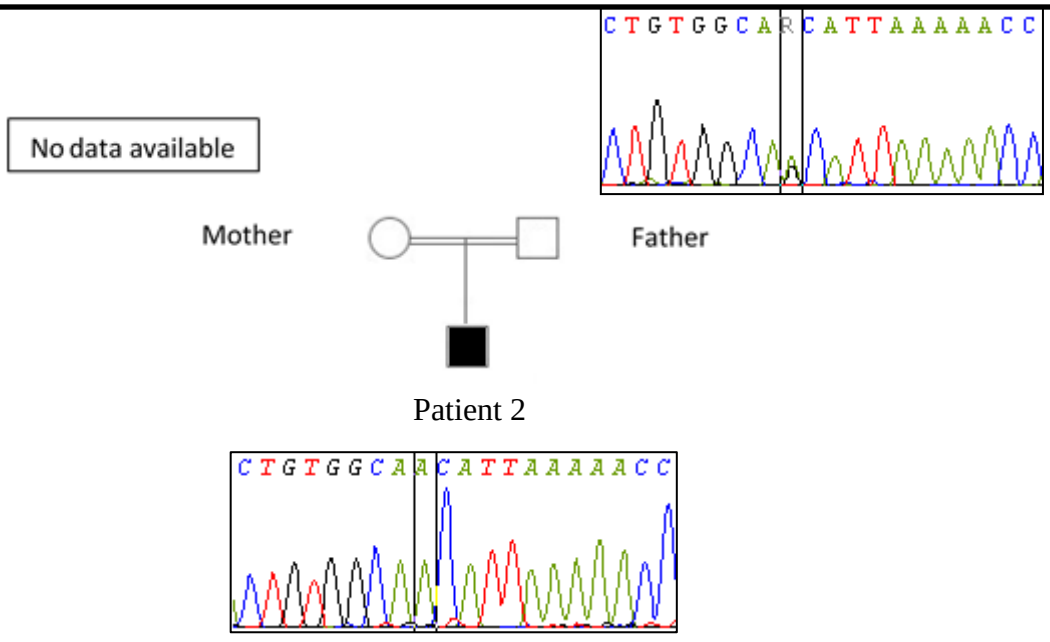


Figure 3: Pedigree with the Sanger sequences showing the segregation of the A177T mutation in patient 2

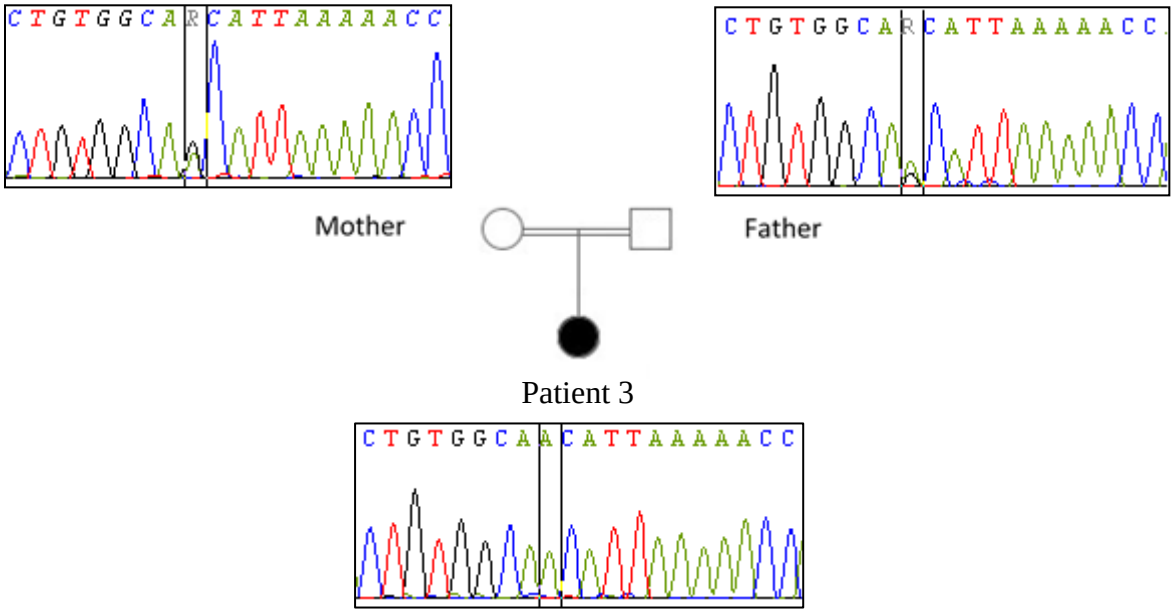


Figure 4: Pedigree with the Sanger sequences showing the segregation of the A177T mutation in patient 3

Sanger sequencing analysis of the 104 individuals, showed that 101 of them had the wild genotype (G/G) and 3 were heterozygous (G/A) for the mutation A177T. Therefore the allelic frequency is 0.014 for the mutant (A) (Table1).

Table 1: Allelic frequency of RNASEH2B A177T

Allele (%)		Genotype						
G	A	G/G	G/A	A/A	Chi Square	DOF	P-value	Call rate
0.986	**0.014**	101	3	0	10.650	1	0.001101	104

DOF, degree of freedom

This mutation was cited in several databases with a very heterogeneous allelic frequency from one database to another (Table 2) [11–14], however the frequencies found are always lower than the one found in our study.

Table 2:Allelic frequency of RNASEH2B in several databases [11–14]

Databases	Allelic frequency (A)
ExAC	0.001306
1000 Genomes Project	0.000199
NHLBI-ESP: African_American	0.000226
NHLBI-ESP: European_American	0.003000
NHLBI-ESP: ESP_Cohort_Populations	0.002000
CLINSEQ_SNP: CSAgilent	0.003000

This contrast between the results could be explained by an underrepresentation of the North African population in the databases, moreover our results suggest that the Moroccan population is clearly affected by this mutation despite the number of samples studied. Taking account these results as well as the heterogeneous aspect of this mutation, the investigation for a mutation in *RNASEH2B* and more precisely the A177T mutation, should be considered more often for Moroccan patients with an AGS phenotype but also with a nonsyndromic spastic paraplegia.

List of abbreviations:

RNASEH2B: Ribonuclease H2B

AGS: Aicardi-Goutières Syndrome

CSF: Cerebrospinal fluid

IFNA1: Interferon alpha

CT: Computed tomography

PCR: Polymerase chain reaction

DOF: Degree of freedom

Figures and Tables:

Figure 1: CT scan with black arrows showing basal ganglia calcification

Figure 2: Pedigree with the Sanger sequences showing the segregation of the A177T mutation in patient 1

Figure 3: Pedigree with the Sanger sequences showing the segregation of the A177T mutation in patient 2

Figure 4: Pedigree with the Sanger sequences showing the segregation of the A177T mutation in patient 3

Table 1: Allelic and genotypic frequencies of *RNASEH2B* A177T

Table 2: Allelic frequencies of *RNASEH2B* in several databases

Declarations:

Ethics approval and consent to participate

Patients were seen at the CHU IBN ROCHD Pediatric Neurology Department in Casablanca, Morocco. The protocol was approved by the human ethics committee of the CHU IBN ROCHD in accordance with the declaration of Helsinki for experiments involving humans and written informed consent was obtained from the guardians prior to the study.

Consent for publication

All patients and healthy individuals consent for publication of this case report and an accompanying images.

Availability of data and material

The relevant data supporting the conclusions of this article are included within the article.

Competing Interests

The authors declare that no competing interests exist.

Authors' contributions

AK carried out the molecular genetic studies, the sequence alignment and drafted the manuscript. ID supervised the study of molecular genetics and participated in the sequence alignment. OBT and SN had conduct the entire study. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We are indebted to the patients and their parents for their invaluable cooperation and for providing blood samples, and very thankful to Dr. Nezha SENHAJI for her assistance.

References

1. Reijns MAM, Bubeck D, Gibson LCD, Graham SC, Baillie GS, Jones EY, et al. The Structure of the Human RNase H2 Complex Defines Key Interaction Interfaces Relevant to Enzyme Function and Human Disease. J. Biol. Chem. 2011;286:10530–9.

2. Livingston JH, Crow YJ. Neurologic Phenotypes Associated with Mutations in TREX1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1, ADAR1, and IFIH1: Aicardi-Goutières Syndrome and Beyond. Neuropediatrics. 2016;47:355–60.

3. Ali M, Highet LJ, Lacombe D, Goizet C, King MD, Tacke U, et al. A second locus for Aicardi-Goutieres syndrome at chromosome 13q14-21. J. Med. Genet. 2006;43:444–50.

4. Aicardi J, Goutières F. A progressive familial encephalopathy in infancy with calcifications of the basal ganglia and chronic cerebrospinal fluid lymphocytosis. Ann. Neurol. 1984;15:49–54.

5. Goutières F, Aicardi J, Barth PG, Lebon P. Aicardi-Goutières syndrome: an update and results of interferon-alpha studies. Ann. Neurol. 1998;44:900–7.

6. Crow YJ, Livingston JH. Aicardi-Goutières syndrome: an important Mendelian mimic of congenital infection. Dev. Med. Child Neurol. 2008;50:410–6.

7. Crow YJ, Hayward BE, Parmar R, Robins P, Leitch A, Ali M, et al. Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 cause Aicardi-Goutières syndrome at the AGS1 locus. Nat. Genet. 2006;38:917–20.

8. Crow YJ, Leitch A, Hayward BE, Garner A, Parmar R, Griffith E, et al. Mutations in genes encoding ribonuclease H2 subunits cause Aicardi-Goutières syndrome and mimic congenital viral brain infection. Nat. Genet. 2006;38:910–6.

9. Crow Y, Zaki M, Abdel-Hamid M, Abdel-Salam G, Boespflug-Tanguy O, Cordeiro N, et al. Mutations in ADAR1, IFIH1, and RNASEH2B Presenting As Spastic Paraplegia. Neuropediatrics. 2014;45:386–91.

10. Yoo J, Lee Y, Kim Y, Rha SY, Kim Y. SNPAnalyzer 2.0: a web-based integrated workbench for linkage disequilibrium analysis and association analysis. BMC Bioinformatics. 2008;9:290.

11. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. Nature. 2016;536:285–91.

12. The 1000 Genomes Project Consortium. A global reference for human genetic variation. Nature. 2015;526:68–74.

13. Exome Variant Server, NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA (URL: http://evs.gs.washington.edu/EVS/).

14. Biesecker LG, Mullikin JC, Facio FM, Turner C, Cherukuri PF, Blakesley RW, et al. The ClinSeq Project: Piloting large-scale genome sequencing for research in genomic medicine. Genome Res. 2009;19:1665–74.

Résultat globale

Ce travail a permis de rassembler 41 patients marocains susceptibles d'avoir une leucodystrophie. A partir de ces patients nous avons pu confirmer 13 cas de 6 leucodystrophies différentes (Figure 21). Aussi nous avons pu identifier 3 nouvelles mutations.

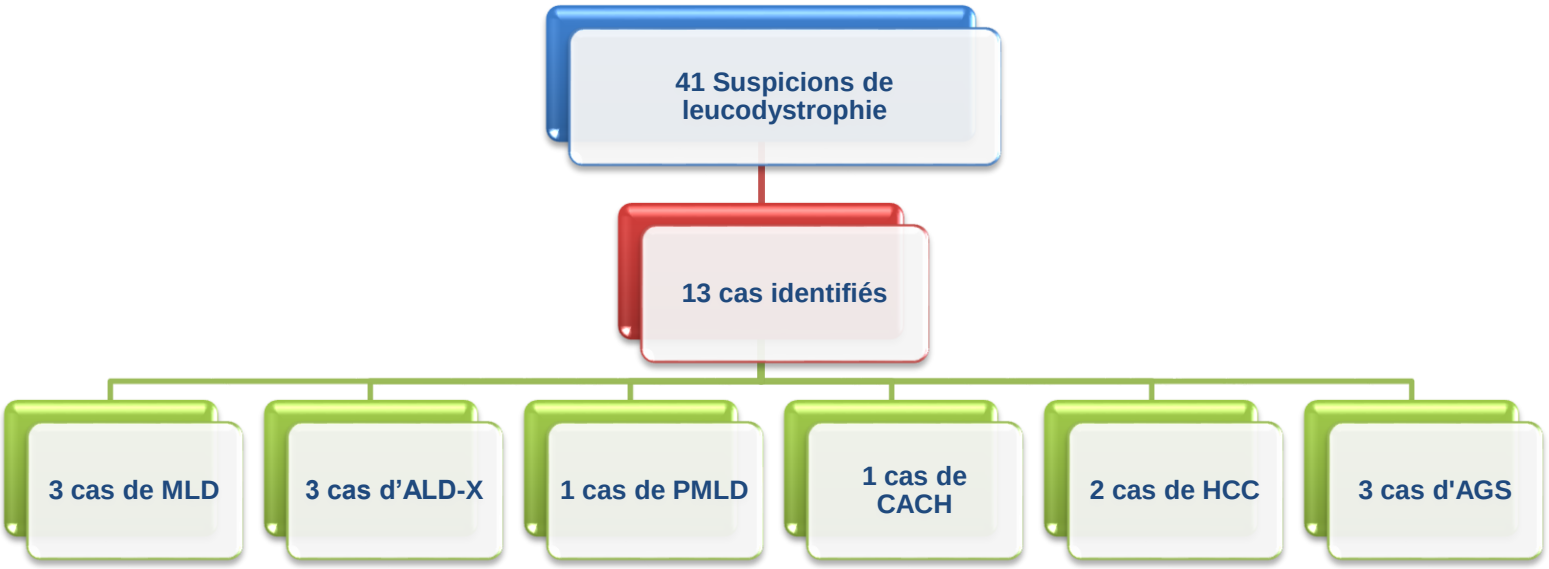


Figure 21 : Schéma globale de l'étude.

Au cours de notre étude nous avons cherché, dans un premier temps, à identifier les leucodystrophies présentant un marqueur spécifique, qu'il soit biochimique ou phénotypique, et pouvant nous orienter vers un diagnostic particulier. Parmi les 41 patients que nous avons rassemblés, 8 d'entre eux présentaient des marqueurs spécifiques, avec 3 patients ayants un taux élevée d'AGTLC, 3 autres ayant un déficit de l'activité de l'enzyme ARSA et 2 patients ayants une cataracte congénitale.

Pour ces patients nous avons suivi une approche gène candidat en séquençant par méthode Sanger les gènes *ABCD1*, *ARSA* et *FAM126A*, dans le but de déterminer les mutations génétiques pouvant entrainer une ALD-X, une MLD et une HCC.

Dans un deuxième temps nous avons réalisé un séquençage NGS par panel de gènes, pour les patients dans les dossiers cliniques était les plus complets possibles. 6 patients des 33 restants ont été sélectionnés et nous avons réussi a identifié une mutation pour 2 d'entre eux.

Finalement, une troisième approche a été réalisée à la suite d'une constatation de la fréquence d'une mutation particulière dans la littérature mais aussi chez les échantillons de patients d'origine marocaine analysés à l'Hôpital Robert Debré, cette approche a consisté en un screening de la mutation c.529G>A (p. Ala177Thr) du gène *RNASEH2B* parmi l'ensemble des échantillons rassemblé. Cette approche s'est révélée fructueuse, vu que nous avons retrouvé cette mutation à l'état homozygote chez 3 patients confirmant ainsi un diagnostic d'AGS.

Approche gène candidat

1. Adrénoleucodystrophie liée à l'X (ALD-X)

Parmi les cas leucodystrophies identifiés, 3 présentaient un taux élevé d'AGTLC avec une IRM et un tableau clinique en faveur d'une ALD-X.

Nous avons donc réalisé un séquençage Sanger des 10 exons du gène *ABCD1* (NM_000033) pour ces 3 patients et nous avons déterminé 3 mutations différentes.

Le patient 1

Garçon de 7 ans et 5 mois, adopté à la naissance sans information sur les parents biologiques. Par conséquent, nous n'avons pas pu réaliser une enquête familiale adéquate avec un pedigree et une analyse moléculaire pour la mère biologique. Sur le plan clinique le patient a eu un développement normal jusqu'à l'âge 6 ans et 11 mois, avec l'apparition de troubles auditifs, un déclin de l'acuité visuelle et une hyperactivité. Un changement de comportement a aussi été observé entrainant un échec scolaire.

L'examen neurologique a révélé un syndrome pyramidal des membres inférieurs, des difficultés de marche et une ataxie cérébelleuse. En outre, les images d'IRM étaient cohérentes avec la démyélinisation active comme on l'observe habituellement dans l'ALD cérébrale chez l'enfant. Une forte intensité de signal symétrique bilatérale a été détectée en pondération T2 et Flair dans la zone pariéto-occipitale et le splénium du corps calleux. Une faible intensité de signal a été retrouvée en T1 (Figure 22).

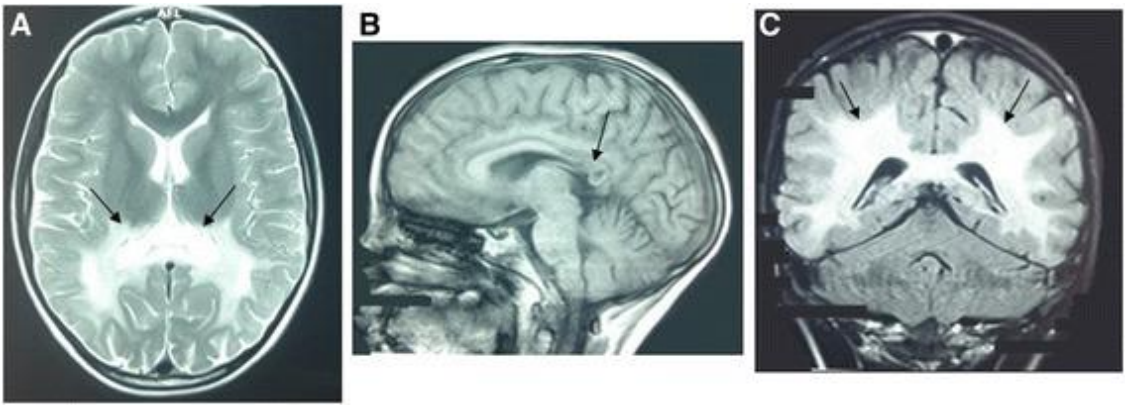


Figure 22 : IRM cérébrale du patient 1.

Le séquençage du gène *ABCD1* a révélé une nouvelle mutation non-sens au niveau de l'exon 7 (c.1677C>G (p. Tyr559*)), cette mutation induit l'apparition d'un codant stop entrainant la perte de la séquence protéique du transporteur ABC (Figure 23).

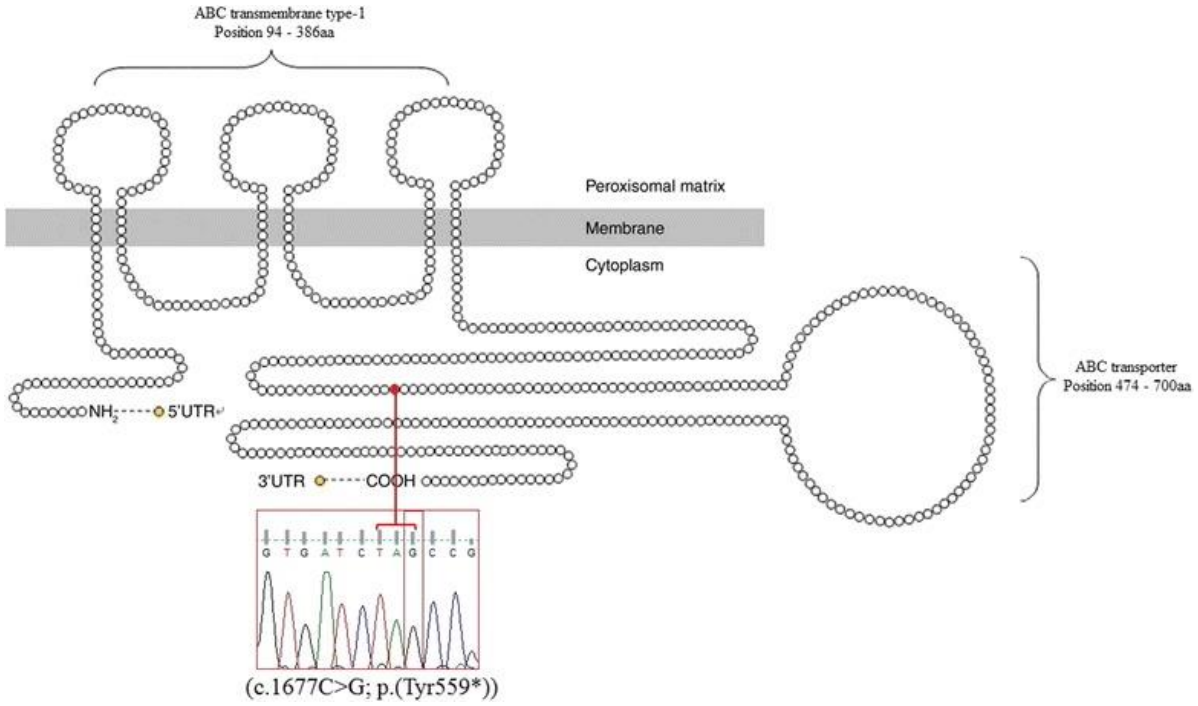


Figure 23 : Emplacement du codon 559 dans un schéma de structure moléculaire de l'ALDP

Le patient 2

Garçon de 16 ans, 8ieme d'une fratrie de 5 sœurs et de 2 frères avec un troisième décédé à l'âge de 19 mois et présentant un retard psychomoteur, deux de ces sœurs présentent des troubles

cognitifs. Sur le plan clinique le patient a eu un développement normal jusqu'à l'âge 8 ans, avec l'apparition de troubles auditifs et de la marche, ainsi qu'un déclin important de l'acuité visuelle.

L'examen neurologique a révélé un syndrome pyramidal des membres inférieurs, des difficultés de marche et une ataxie cérébelleuse. En outre, les images d'IRM étaient cohérentes avec la démyélinisation active comme on l'observe habituellement dans l'ALD cérébrale chez l'enfant. Une forte intensité de signal symétrique bilatérale a été détectée en pondération T2 et Flair dans la zone pariéto-occipitale et le splénium du corps calleux. Une faible intensité de signal a été retrouvée en T1

Le séquençage du gène *ABCD1* a révélé une mutation faux sens au niveau de l'exon 9 (c.1877C>A (p. Ala626Asp)), cette mutation a été retrouvée à l'état hétérozygote chez la mère (Figure 24). La mutation c.1877C>A est répertorié au niveau de la base de données des mutations du gène *ABCD1* (http://www.x-ald.nl).

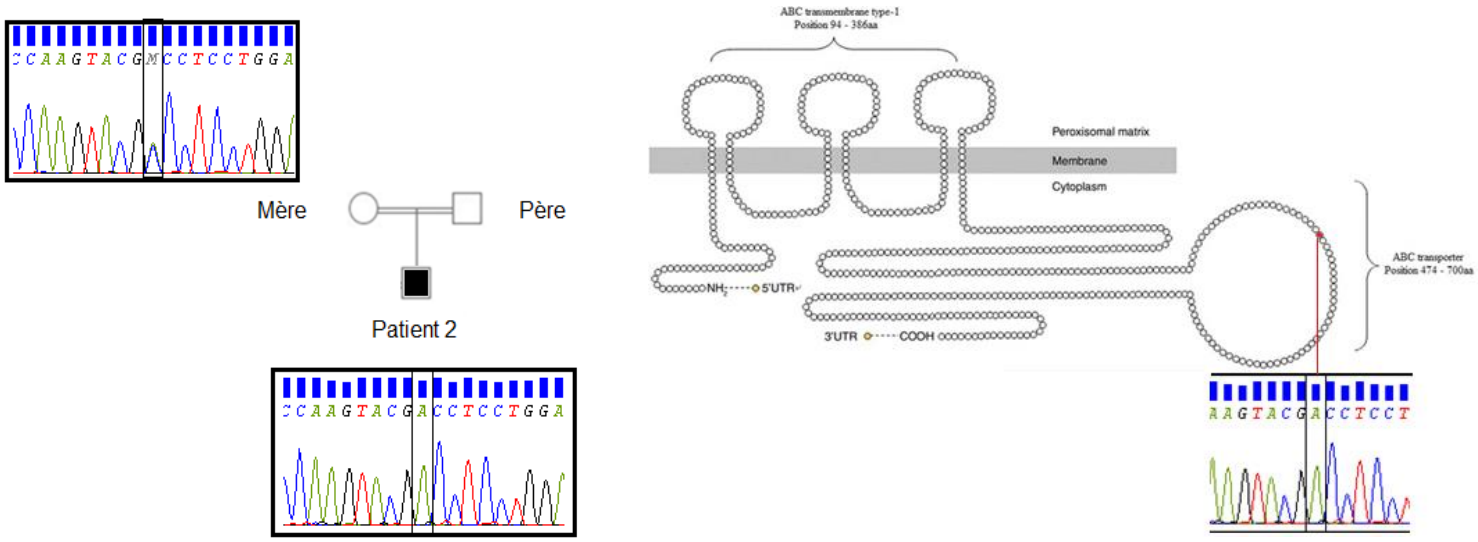


Figure 24 : Mutation c.1877C>A chez le patient 2 et sa mère et localisation au niveau de la protéine.

Le patient 3

Garçon de 13 ans, il a 2 sœurs jumelles sans antécédent clinique et un frère décédé après 1 mois de vie. Le patient a eu un développement normal jusqu'à l'âge 7 ans, quand il a commencé à développer des troubles de la marche ainsi qu'une agressivité et un retard scolaire, à 8 ans il perd la marche.

L'examen neurologique a révélé une tétraparésie spastique irréductible douloureuse avec des réflexes ostéotendineux vifs. Le dosage des AGTLC a montré un taux élevé de C22, C24 et C26. Les images d'IRM étaient cohérentes avec la démyélinisation active comme on l'observe habituellement dans l'ALD cérébrale chez l'enfant. Une forte intensité de signal symétrique bilatérale a été détectée en pondération T2 (Figure 25-A) et Flair (Figure 25-C) dans la zone pariéto-occipitale et le splénium du corps calleux. Une faible intensité de signal a été retrouvée en T1 (Figure 25-B).

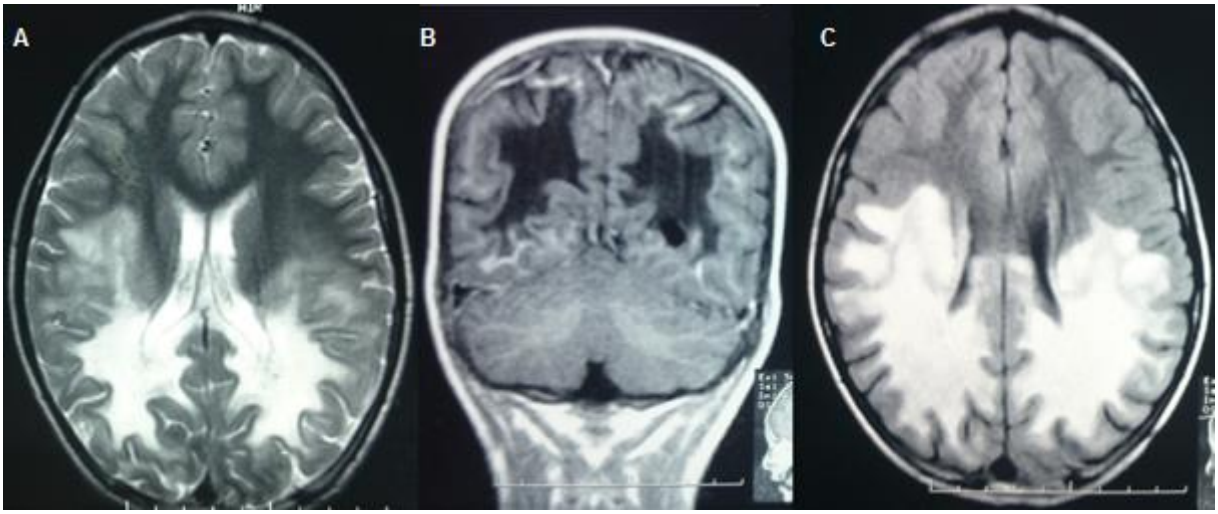


Figure 25 : IRM cérébrale du patient 3

Le séquençage du gène *ABCD1* a révélé une mutation splice au niveau de l'intron 9 (c.1992-1G>A), cette mutation est répertoriée au niveau de la base de données des mutations du gène *ABCD1* (http://www.x-ald.nl). L'analyse de ségrégation a montré que cette mutation été présente à l'état hétérozygote chez la mère (Figure 26).

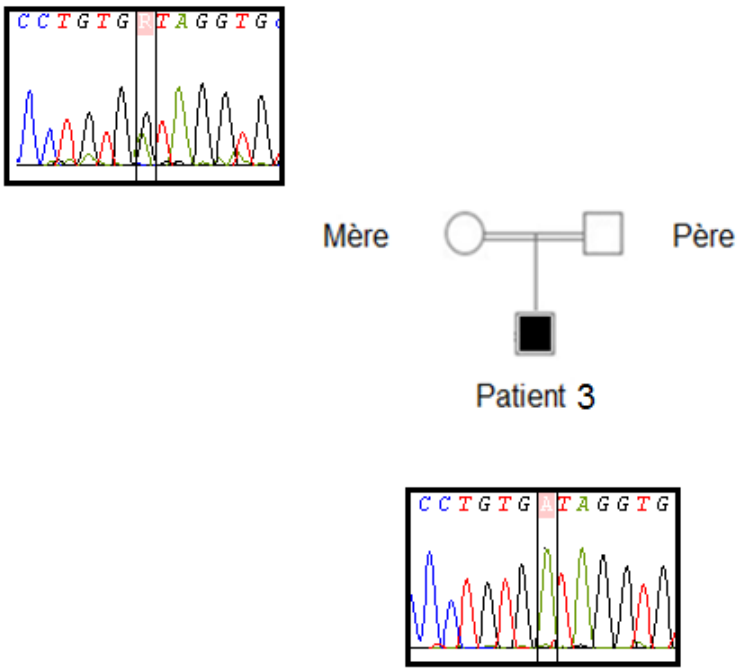


Figure 26 : Mutation c.1992-1G>A chez le patient 3 et sa mère.

2. Leucodystrophie Métachromatique (MLD)

La MLD est une maladie lysosomale causée par des mutations du gène *ARSA* codant l'arylsulfatase A. Ces mutations entraînent une incapacité à cataboliser le cérébroside sulfate. Ainsi, le marqueur biochimique permettant le diagnostic de cette maladie est le taux élevé des sulfatides ainsi que l'activité enzymatique de l'arylsulfatase A inférieure à 10% dans les leucocytes.

Parmi les cas leucodystrophies identifiés, 3 présentaient un taux élevé de sulfatides urinaires ainsi qu'une faible voire une absence, de l'activité enzymatique de l'arylsulfatase A. L'IRM de ces patients présentait un aspect tigroide de la SB typique d'une MLD.

Nous avons donc réalisé un séquençage Sanger des 8 exons du gène *ARSA* pour ces patients et nous avons déterminé 2 mutations différentes.

Les patients 4 et 5

Il s'agit de deux frères et sœurs issus de parents consanguins en bonne santé, originaire du centre du Maroc. La sœur a 12 ans (patiente 4), la grossesse et l'accouchement étaient normaux. Elle a d'abord présenté un bon développement psychomoteur, puis à l'âge de 7 ans elle a eu un

épisode d'insuffisance hépatocellulaire et à 9 ans une régression psychomotrice progressive et un trouble de la déglutition

L'examen clinique a montré une ataxie statique et cinétique, des tremblements, une dysarthrie, une spasticité, des réflexes tendineux hyperactifs, un clonus bilatéral, Babinski et Rossolimo positifs. L'analyse biochimique a montré un taux élevé de sulfatides urinaire. L'électroneuromyographie (ENMG) a montré une neuropathie périphérique sensorielle et motrice. L'IRM a révélé une hyperintensité diffuse de la SB, épargnant les fibres U, ainsi qu'un aspect tigroide de la SB supratentorielle (Figure 27).

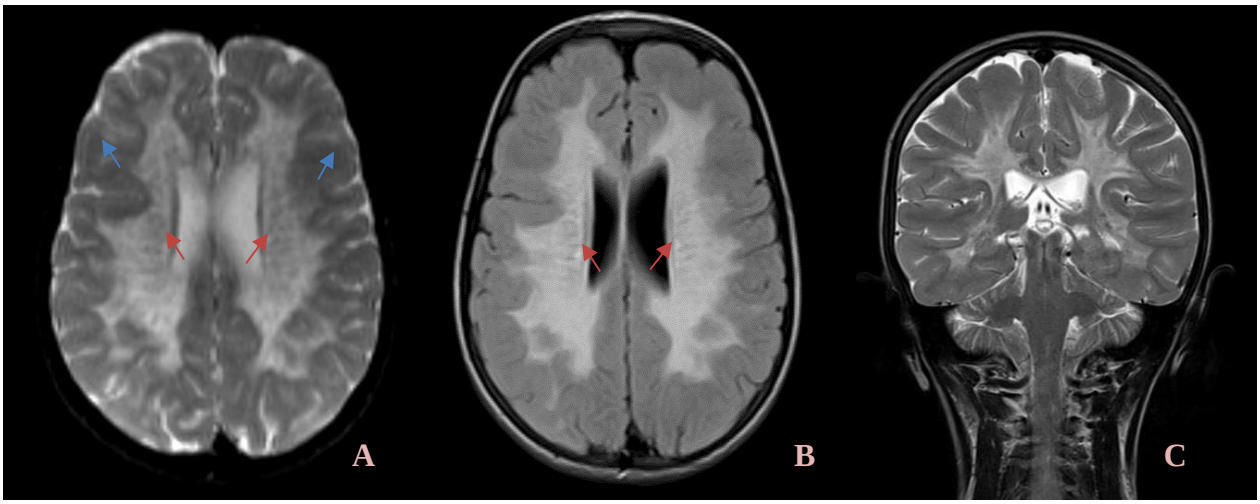


Figure 27 : IRM cérébrale de la patiente 4

Le frère 10 ans (patient 5), il est toujours scolarisé. À l'âge de 8 ans, il a commencé à montrer quelques difficultés motrices mineures. L'examen a montré une hyperreflexie. L'IRM a montré une hyperintensité de la matière blanche diffuse épargnant les fibres en U, ainsi qu'un aspect tigroide de la SB supratentorielle (Figure 28).

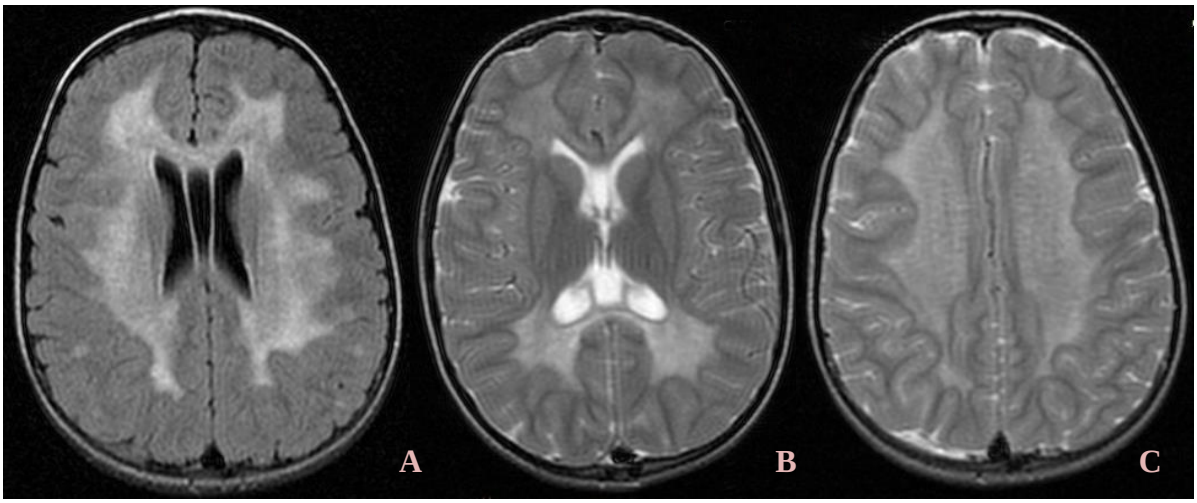


Figure 28 : IRM cérébrale du patient 5

Le séquençage du gène *ARSA* a révélé une mutation faux sens dans l'exon 8 (c.1283C>T (p. Pro428Leu)). Cette mutation est bien connue dans la littérature. Elle est considérée comme la deuxième mutation la plus décrite du gène *ARSA*, avec 12,2% par rapport à tous les allèles *ARSA*-MLD rapportés L'analyse de la ségrégation a montré la présence de la mutation à l'état hétérozygote chez la mère et le père (Figure 29).

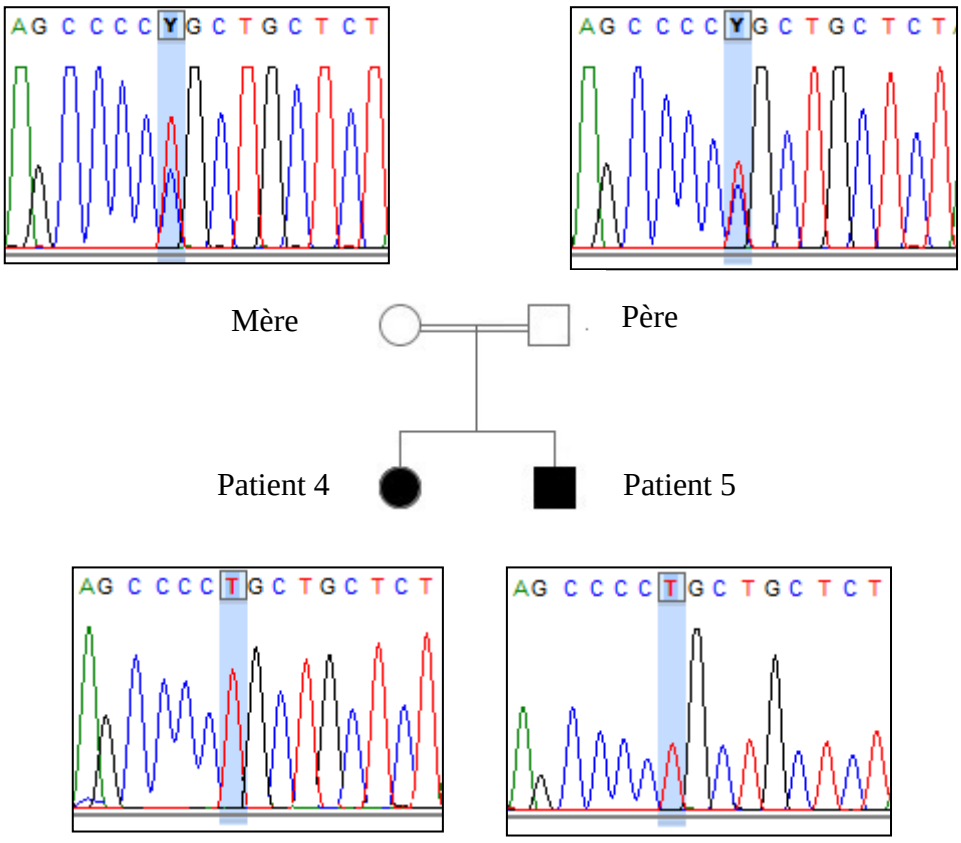


Figure 29 : Mutation c.1283C>T chez les patients 4 et 5 ainsi que la ségrégation dans la famille.

La patiente 6

Une fille de 2 ans née de parents consanguins de premier degré, originaire du sud du Maroc. Elle a une sœur aînée en bonne santé, mais sa famille a connu une série de décès prématuré surtout du côté de son père. La grossesse et l'accouchement étaient normaux. Elle a eu un bon développement psychomoteur, elle a marché à 12 mois. À 16 mois, elle a eu une régression psychomotrice progressive avec perte de la marche, de la position assise et du langage.

L'examen clinique a montré une hypotonie axiale et un syndrome pyramidal. L'IRM a montré un hypersignal de la SB centrale, plus prononcé dans la zone pariéto-occipitale épargnant les fibres en U (Figure 30).

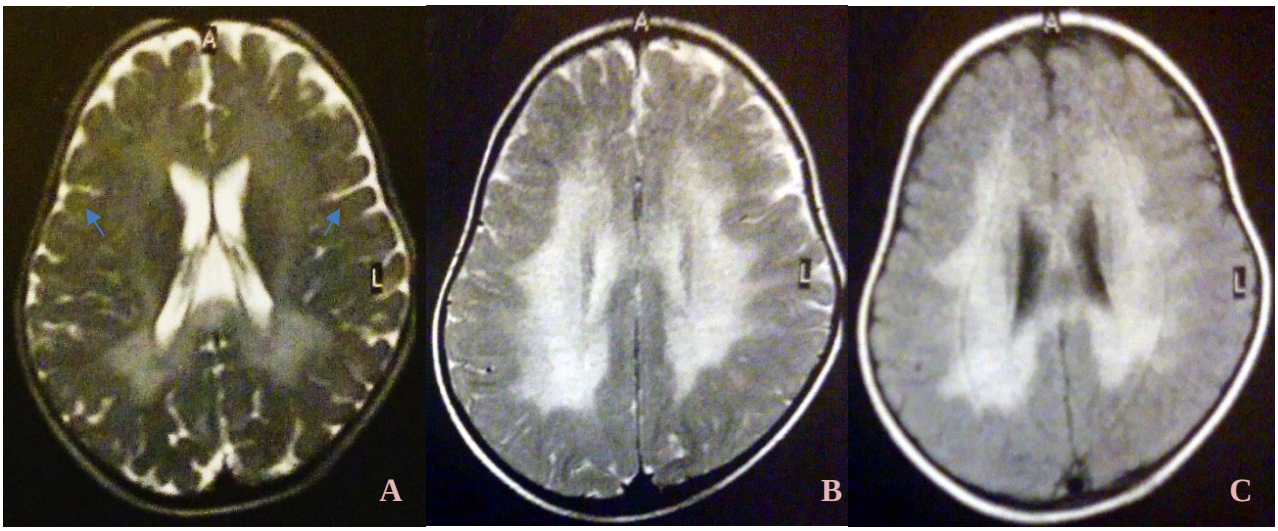


Figure 30 : IRM cérébrale du patient 6

Le séquençage du gène *ARSA* a révélé une nouvelle mutation non-sens dans l'exon 5 (c.877C>T (p. Arg293*)). L'analyse de la ségrégation a montré la présence de la mutation à l'état hétérozygote chez la mère, concernant le père nous n'avons pas obtenue d'échantillon pour l'analyse (Figure 31).

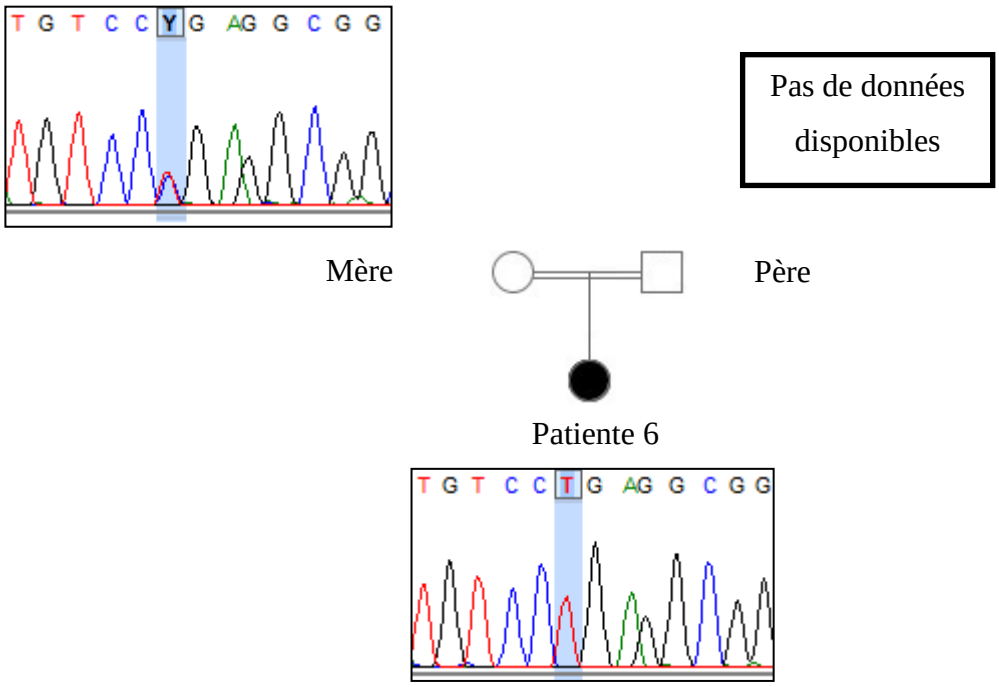


Figure 31 : Mutation c. c.877C>T chez la patiente 6 et sa mère.

3. Hypomyélinisation et Cataracte Congénitale (HCC)

Pour les patients présentant une cataracte congénitale et une hypomyélinisation à l'IRM, la suspicion a été portée vers l'HCC avec le gène *FAM126A*, ainsi ces patients nous avons réalisé un séquençage Sanger des 11 exons du gène.

La patiente 7

Une fille de 7 ans née de parents non consanguins, mais originaires de la même région. Elle est fille unique, mais des cas de cataracte bilatérale ont été diagnostiqués dans sa famille, surtout du côté de sa mère. La grossesse et l'accouchement étaient normaux. A 4 mois, elle a été opérée d'une cataracte congénitale bilatérale.

L'examen clinique a montré des signes neuropathies périphériques, un syndrome cérébelleux (élargissement du polygone de sustentation sans ataxie de la tête ni du tronc, dysarthrie, dysmétrie et tremblements intentionnel), un syndrome pyramidal (spasticité sur les muscles ischio-jambiers avec flexum, Babinski et Rossolimo positifs) et un Nystagmus horizontal intermittent. L'IRM a montré un hypersignal de la SB en T1, T2 et Flair, synonyme d'une hypomyélinisation (Figure 32).

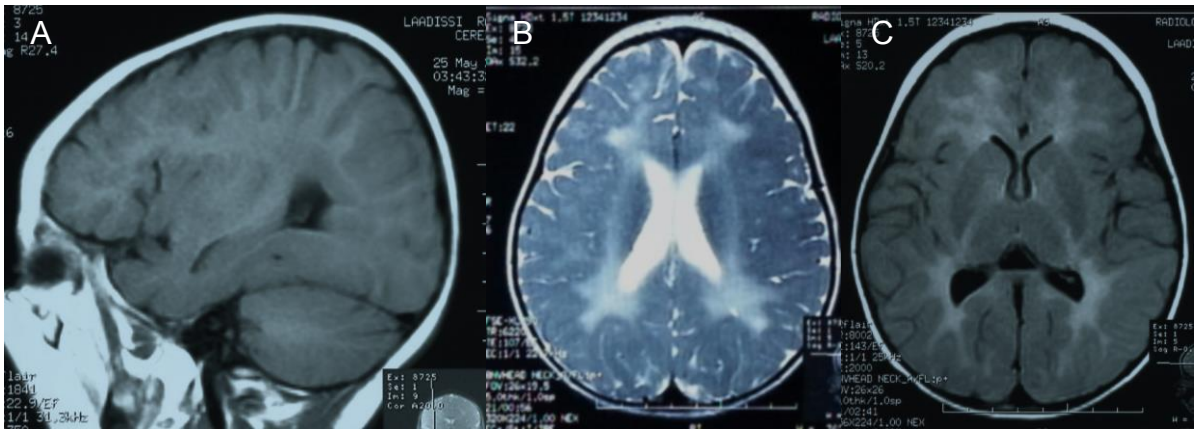


Figure 32: IRM cérébrale de la patiente 7

Le séquençage Sanger nous a permis de déterminer une même mutation IVS5+1 G>T pour les deux patients 7 et 8. L'analyse de ségrégation a montré la présence de la mutation à l'état hétérozygote chez les deux parents.

Approche par panel de gènes

1. Le Syndrome CACH

Le patient 9 est un garçon de 18 ans issu d'un mariage consanguin. Deuxième d'une fratrie de 3 sœurs et de frères. Il a eu un développement normal jusqu'à l'âge de 7 ans où son état a commencé à se détériorer avec l'apparition de troubles de l'équilibre et des tremblements de la tête et des jambes. L'examen clinique a montré une ataxie et un syndrome pyramidal. L'IRM montrait une anomalie de la SB sus et sous tentorielle, ainsi qu'une présence de cavitations (Figure 33).

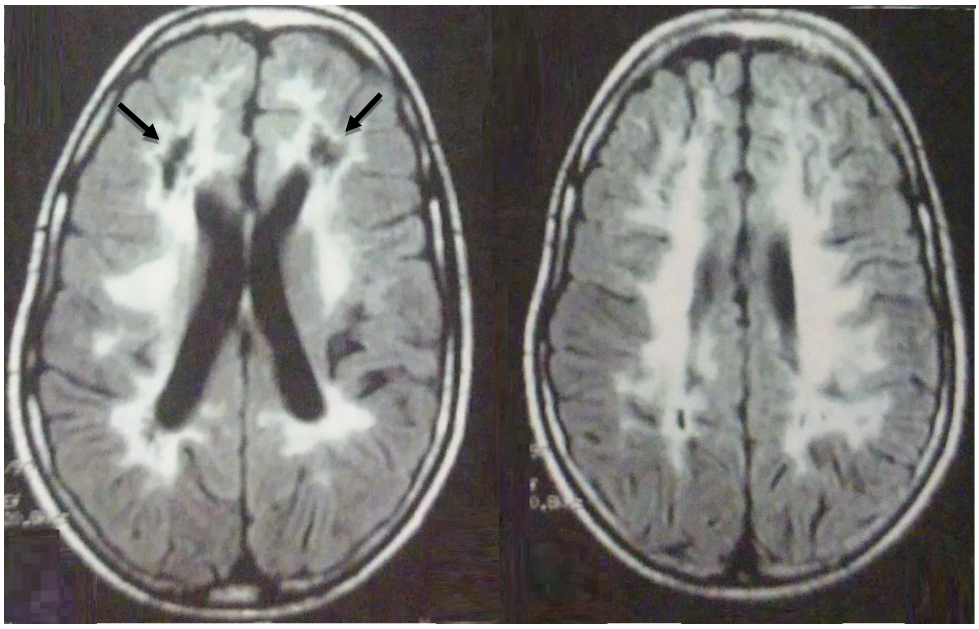


Figure 33 : IRM en FLAIR du patient 9 (flèches noires montrant les cavitations)

L'analyse par NGS a montré une mutation c.338G>A (p. Arg113His) dans le gène *EIF2B5*. Cette mutation est souvent rapportée chez des patients avec un phénotype plus atténué qui apparait à l'adolescence ou à l'âge adulte (Imam et al., 2011).

2. Pelizaeus-Merzbacher-Like (PMLD)

Le patient 10 est un garçon issu d'un mariage consanguin avec un développement normal, à 6 ans apparition de troubles moteur avec tremblement, l'examen clinique a montré une spasticité, syndrome pyramidal, une ataxie de la tête avec tremblement qui ne s'exagère pas avec la fermeture des yeux, une dysmétrie, un syndrome cérébello- spastique, une gibbosité dorsale droite et une hémarthrose du genou gauche. L'IRM a révélé une SB en hypersignal T2 et FLAIR et en iso-signal T1 en faveur d'une leucodystrophie hypomyélinisante.

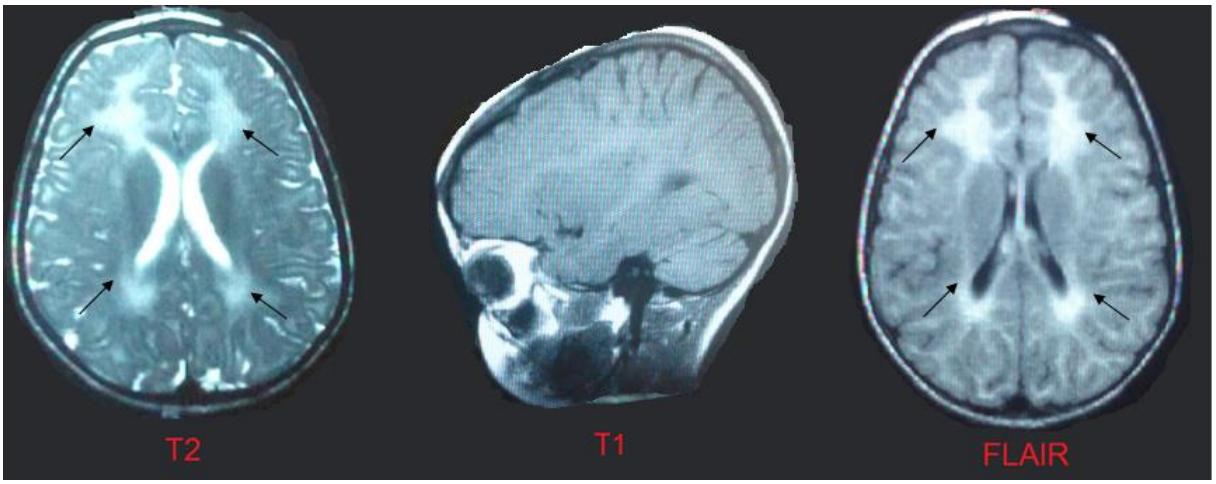


Figure 34 : IRM en coupe axiale sur pondération T2 et FLAIR et sagittale sur pondération T1 (flèches noires montrant l'hypersignal de la SB)

L'analyse NGS a révélé une nouvelle mutation c.739C>T (p. Arg247Cys) dans le gène *GJC2* confirmant un cas de Pelizaeus-Merzbacher-Like.

Approche screening

1. Syndrome d'Aicardi Goutières (AGS)

La mutation c.529G>A (p. Ala177Thr) du gène *RNASEH2B* est une mutation fréquemment retrouvée chez les patients AGS. Elle a été décrite en 2006 par Crow et al chez des familles de nationalités distinctes, y compris marocaines et nord-africaines. Au total, 20 des 36 allèles mutants dans 18 familles AGS étaient A177T (Crow et al., 2006). En 2014, Crow et al a également identifié cette même mutation chez 3 patients nord-africains avec un phénotype de paraplégie spastique non syndromique et une neuro-imagerie normale, ce qui a mis en évidence la variabilité phénotypique associée à l'AGS (Crow et al., 2014).

Sachant que la mutation A177T est principalement décrite dans la population nord-africaine, nous avons cherché à évaluer cette mutation au sein de la population en séquençant 104 personnes marocaines saines et en calculant la prévalence ainsi que la fréquence allélique.

Le séquençage Sanger des 104 individus a montré que 101 d'entre eux avaient le génotype sauvage (G/G) et 3 étaient hétérozygotes (G/A) pour la mutation A177T. Par conséquent, la fréquence allélique est de 0,014 pour l'allèle muté (A) (Tableau 2). On peut ainsi déduire la prévalence qui correspond à la fréquence allélique au carré soit 2/10000.

Tableau 2 : Fréquences alléliques et génotypiques de la mutation A177T

Allèle (%)		Génotype			Chi deux	DDL	P-value	Echantillons
G	A	G/G	G/A	A/A				
98.6	**1.4**	101	3	0	10.65	1	0.0011	104

DDL, degré de liberté

Cette mutation a été citée dans plusieurs bases de données avec une fréquence allélique très hétérogène d'une base de données à une autre (Tableau 3), mais les fréquences retrouvées sont toujours inférieures à celle obtenue dans notre étude.

Tableau 3 : Fréquences alléliques de la mutation A177T dans plusieurs bases de données(Biesecker et al., 2009; Lek et al., 2016; The 1000 Genomes Project Consortium, 2015)

Bases de données	**Fréquence allélique(A)**	**Prévalence(AA)**
ExAC	0.0013	2/1000000
1000 Genomes Project	0.0002	<1/1000000
NHLBI-ESP : African_American	0.0002	<1/1000000
NHLBI-ESP : European_American	0.0030	9/1000000
NHLBI-ESP : ESP_Cohort_Populations	0.0020	4/1000000
CLINSEQ_SNP : CSAgilent	0.0030	9/1000000
Notre résultat : Population marocaine	0.0140	2/10000

Ce contraste entre les résultats s'explique par une sous-représentation de la population nord-africaine dans ces bases de données, de plus nos résultats suggèrent que la fréquence de cette mutation est très élevée dans la population marocaine, rendant ainsi cette population particulièrement susceptible au syndrome d'Aicardi-Goutières.

Par la suite nous avons réalisé un séquençage de cette mutation chez l'un des deux parents de notre cohorte, soit 41 individus, et ce dans le but d'augmenter notre échantillonnage. Les résultats avaient permis de retrouver cette mutation à l'état hétérozygote chez 3 individus. Cependant, les patients dont ces individus sont les parents, sont des patients dont nous n'avions pas un dossier clinique complet et qui n'avaient pas bénéficiés d'une analyse par gène candidat ni d'une analyse par panel de gènes. Ainsi avant d'inclure les résultats de ces 41 parents aux précédents résultats des 104 individus testés, nous avons séquencé les 3 patients en question. Les résultats du séquençage ont révélé que ces patients étaient porteurs de la mutation à l'état

homozygote permettant ainsi de confirmer un diagnostic d'AGS pour les 3 patients. Par conséquent, les données concernant les 41 parents n'ont pas été pris en considération.

Une analyse de ségrégation a donc été réalisée, en séquençant le deuxième parent restant, pour les 3 patients (11,12 et 13), les résultats ont montré que cette mutation été bien présente à l'état hétérozygote chez les deux parents. Par contre pour le patient 13, nous n'avons pas réussi à obtenir les échantillons de la mère, par conséquent uniquement l'ADN du père a été analysée (Figure 35).

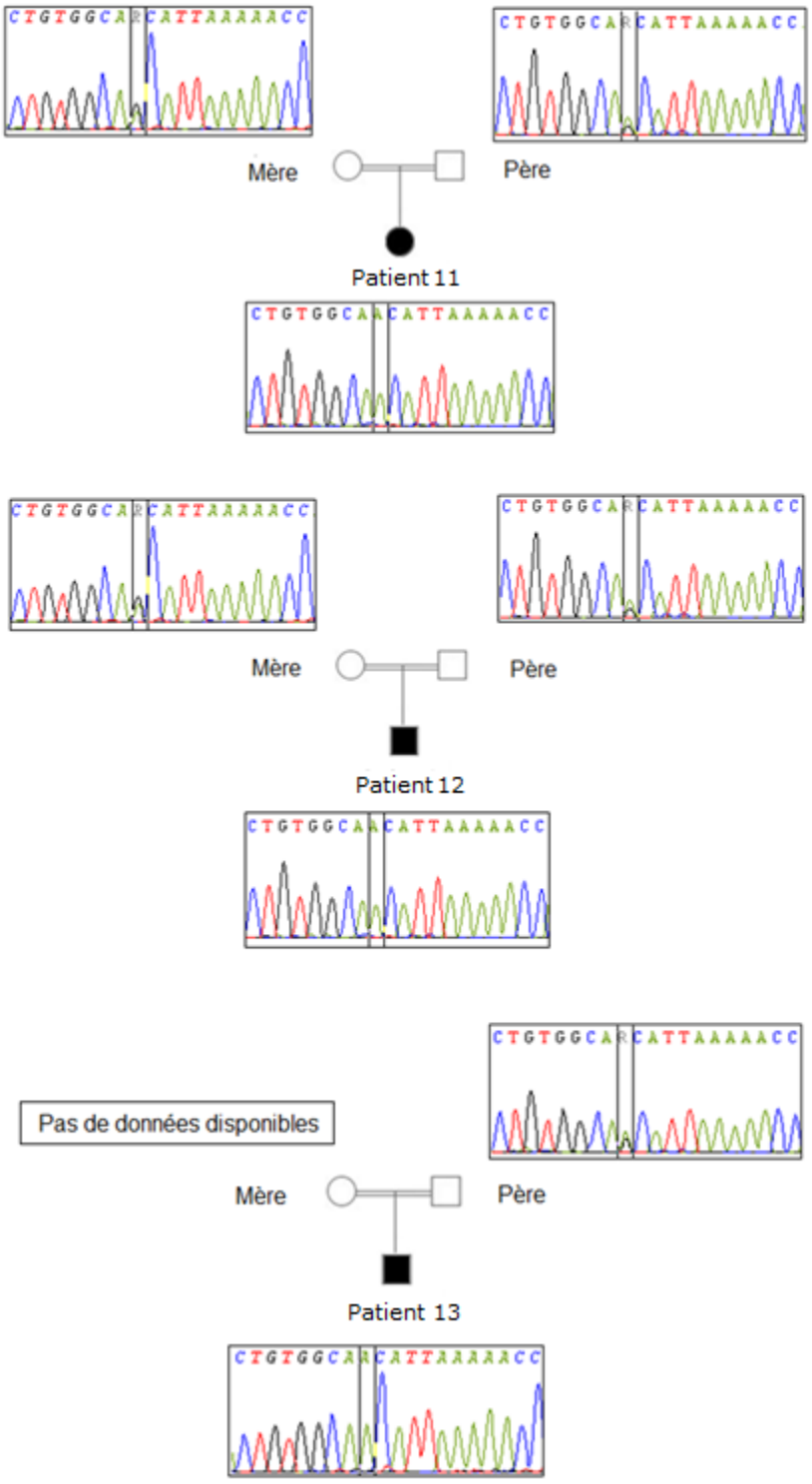


Figure 35 : Analyse de ségrégation de la mutation A177T chez les patients 11,12 et 13.

Finalement, cette étude a permis de confirmer un diagnostic moléculaire de leucodystrophie chez 13 patients avec 6 leucodystrophies différentes et 3 nouvelles mutations jamais décrites dans la littérature (Tableau 4).

Tableau 4 : Récapitulatif des résultats obtenues (en bleu clair les nouvelles mutations retrouvées)

Patients	Maladies	Gènes	Mutations
1	Adrénoleucodystrophie liée à l'X	*ABCD1*	c.1677C > G p. (Tyr559*)
2			c.1877C>A p. (Ala626Asp)
3			c.1992-1G>A
4	Leucodystrophie Métachromatique (MLD)	*ARSA*	c.877C>T p. (Arg293*)
5			c.1283C>T p. (Pro428Leu)
6			
7	Syndrome d'hypomyélinisation-cataracte congénitale (HCC)	*FAM126A*	IVS5+1G>T
8			
9	Syndrome CACH (Childhood Ataxia with Central nervous system Hypomyelination)	*EIF2B5*	c.338G>A p.(Arg113His)
10	Maladie de Pelizaeus Merzbacher like (PMLD)	*GJC2*	c.739C>T p. (Arg247Cys)
11	Le syndrome d'Aicardi–Goutières (AGS)	*RNASEH2B*	c.529G>A p.(Ala177Thr)
12			
13			

Discussion

Les leucodystrophies constituent un groupe de maladies héréditaires, individuellement rare avec des prévalences variables et une hétérogénéité clinique et génétique. Le diagnostic de ces maladies a toujours été compliqué. Cependant avec le développement de l'imagerie IRM ainsi que l'amélioration des techniques de séquençage, il est aujourd'hui plus simple d'identifier des cas de leucodystrophie et de localiser les mutations responsables de la maladie.

Par ailleurs, cette démarche diagnostic dépend de la mise en place d'une collaboration, basée sur une bonne expertise en imagerie, en neurologie et en biologie moléculaire des leucodystrophies.

Au Maroc, et à l'heure actuelle, cette expertise nous fait énormément défaut et c'est un constat que nous avons pu établir dès le début de ce projet. Les radiologues marocains ne sont pas souvent confrontés à ce genre de cas et les neurologues s'arrêtent généralement au stade de suspicion de leucodystrophie et n'arrivent pas à aller plus loin.

Cette situation est principalement due à l'absence d'un diagnostic moléculaire de ces maladies au Maroc, et à la difficulté de la réalisation un diagnostic prénatale, vue la confusion juridique et culturelle que soulève le sujet, rendant ainsi très difficile la prise en charge des patients atteints de leucodystrophie au Maroc.

Ainsi durant cette thèse nous avons essayé de mettre la lumière sur cette maladie en organisant dès les premiers jours une journée sur l'aspect clinique et moléculaire des leucodystrophies. Cette journée s'est déroulée au sein de Laboratoire de Génétique et Pathologies Moléculaires à Casablanca, et elle a réuni des médecins et des scientifiques de Casablanca et de Rabat. A l'issue de cette journée nous avons réalisé une collaboration avec le service neuropédiatrie à l'Hôpital d'Enfants CHU Ibn Sina-Souissi de Rabat, et le service de neurologie au CHU Ibn Rochd de Casablanca, ainsi que le Laboratoire Central de Biochimie du CHU Ibn Sina-Souissi de Rabat qui fait le diagnostic biochimique des X-ALD, MLD et KRABBE avec le dosage des AGTLC, ARSA et GALC.

Fort de cette collaboration et de l'expertise de l'équipe française à l'Hôpital Robert Debré de Paris, nous avons pu mener à bien ce projet sans précédent pour la population Marocaine et nous avons réussi à identifier des mutations chez 13 patients marocains souffrant de 6 leucodystrophies différentes. Aussi nous avons découvert 3 nouvelles mutations jamais décrites auparavant dans la littérature.

Par ailleurs il faut noter que la population marocaine et une population qui connaît un taux de consanguinité important 22,79% (Talbi et al., 2007). Ce qui augmenterait le risque de leucodystrophies dans leurs formes autosomiques récessives. Au niveau de la littérature on trouve souvent des mutations chez des patients d'origine marocaine comme énuméré dans le tableau ci-dessous (Tableau 5).

Tableau 5 : Mutations des leucodystrophies chez des patients d'origine marocaine (en rouge les mutations retrouvé lors de notre étude)

Maladies	Gènes	Mutations	Références
Adrénoleucodystrophie liée à l'X	*ABCD1*	c.686T>C p.(Leu229Pro)	(Neumann et al., 2001)
		c.1677C > G p.(Tyr559*)	(Karkar et al., 2015)
		c.1877C>A p.(Ala626Asp)	
		c.1992-1G>A	
Le syndrome d'Aicardi–Goutières (AGS)	*RNASEH2B*	c.485A>C p.(Lys162Thr)	(Crow et al., 2006)
		c.529G>A p.(Ala177Thr)	
	RNASEH2A	c.556C>T p.(Arg186Trp)	(Ramantani et al., 2010)
	SAMHD1	c.1153A>G p.(Met385Val)	(Rice et al., 2009)
		c.428G>A p.(Arg143His)	

Xanthomatose cérébrotendineuse (CTX)	*CYP27A1*	IVS4-1G>A	(Leitersdorf et al., 1993)
		c.819delT p.(Asp273GlufsX13)	
		c.1016C>T p.(Thr339Met)	(Reshef et al., 1994)
Syndrome CACH (Childhood Ataxia with Central nervous system Hypomyelination)	*EIF2B5*	c.338G>A p.(Arg113His)	
Maladie de Krabbe	*GALC*	c.860G>A p.(Cys287Tyr)	(Zerkaoui et al., 2015)
		c.1622G>A p.(Trp541*)	
Syndrome d'hypomyélinisation-cataracte congénitale (HCC)	*FAM126A*	IVS5+1G>T	(Zara et al., 2006)
		c.215_224dup	(Biancheri et al., 2011)
Leucodystrophie Métachromatique (MLD) et ses variants biochimique	*ARSA*	c.1283C>T p.(Pro428Leu)	
		c.877C>T p.(Arg293*)	
	PSAP	IVS8 + 1G > A	(Siri et al., 2014)
Maladie de Pelizaeus Merzbacher like(PMLD)	*GJC2*	c.739C>T p.(Arg247Cys)	
Maladies de la biogenèse du peroxysome (incluant le syndrome de Zellweger, Adrénoleucodystrophie néonatal et La maladie de Refsum)	*PEX1*	c.3750G>A p.(Trp1250*)	(Ratbi et al., 2015)
Déficiences enzymatiques de la bêta oxydation des acides gras peroxysomaux (Déficit en enzyme D-bifonctionnelle ; Syndrome de leucoencéphalopathie-dystonie-neuropathie motrice ; Déficit en acyl-CoA oxydase)	*HSD17B4*	c.1531T>C p.(Trp511Arg)	(van Grunsven et al., 1999)
Syndrome de Sjögren-Larsson (SSL)	*ALDH3A2*	c.325G>A p.(Gly109Arg)	(Rafai et al., 2008)

Ainsi à ce jour 17 mutations chez des patients d'origine marocaine toutes leucodystrophies confondues ont été rapportées dans la littérature et notre travail nous a permis d'identifier 9 mutations, 7 d'entre elles retrouvées pour la première fois chez la population marocaine dont 3 nouvelles mutations jamais décrites pour les leucodystrophies toutes populations confondues.

Parmi les mutations identifiées, deux d'entre elles sortent du lot : IVS5+1G>T du gène *FAM126A* et c.529G>A (p. Ala177Thr) du gène *RNASEH2B.* Ces mutations ont la particularité d'être retrouvées chez plusieurs patients d'origines marocaines en plus des cas identifiés dans notre étude, mettant ainsi en place la possibilité d'un effet fondateur au sein de la population marocaine, aussi il pourrait être judicieux à l'avenir de rechercher en priorité ces mutations dans le cas d'une suspicion du syndrome d'Aicardi–Goutières (AGS) et dans la suspicion d'un syndrome d'Hypomyélinisation-Cataracte Congénitale (HCC).

En outre, il faut dire que ce résultat pourrait être bien plus important si on arrivait à étendre cette collaboration entre radiologue, neurologues et biologistes moléculaires sur tout le royaume du Maroc, car les leucodystrophies sont des maladies sous diagnostiqués et seul une collaboration à l'échelle national pourrait améliorer l'état actuelle des choses et permettre une meilleure prise en charge des patients marocains.

Conclusion et perspectives

Les leucodystrophies représentent un groupe de maladies héréditaires, individuellement rare, affectant la SB du SNC avec ou sans atteinte du SNP.

Le Maroc est un pays où la population connaît un taux de consanguinité important (22,79%) (Talbi et al., 2007). Augmentant le risque de leucodystrophies dans leurs formes autosomiques récessives. Sachant qu'aucune étude n'avait été réalisée sur cette population, nous avons été les premiers à rechercher des mutations pour ces maladies au Maroc.

Durant cette étude nous avons rassemblé 41 patients marocains susceptibles d'avoir une leucodystrophie. Sur la base du dossier clinique et de l'IRM et nous avons réalisé des analyses de biologie moléculaire, principalement du séquençage Sanger et NGS et nous avons pu confirmer 13 cas de leucodystrophies avec 6 phénotypes différents. Aussi nous avons réussi à identifier 3 nouvelles mutations jamais décrites auparavant dans la littérature.

Des études étrangères incluant des patients d'origine marocaines avaient permis d'identifier 17 mutations différentes au niveau de cette population. Aussi, parmi les 13 mutations retrouvés 7 d'entre elles n'ont jamais été décrites chez des patients marocains, montrant ainsi l'hétérogénéité génétique au sein de cette population. Ceci dit, nous pensons que les résultats obtenus ne représentent qu'une petite partie des différents phénotypes de leucodystrophies présents au niveau de la population marocaine, et que d'autres études permettraient de mieux caractériser le profil génétique de cette population.

Ainsi, il est primordial de mettre en place une collaboration étroite entre les neurologues, les radiologues et les biologistes moléculaires marocains, afin de pouvoir instaurer un protocole diagnostic fiable et fluide pouvant répondre aux besoins de cette population.

Bibliographie

1. Abrams, C.K., and Scherer, S.S. (2012). Gap junctions in inherited human disorders of the central nervous system. Biochim. Biophys. Acta *1818*, 2030–2047.
2. Aken, B.L., Ayling, S., Barrell, D., Clarke, L., Curwen, V., Fairley, S., Fernandez Banet, J., Billis, K., García Girón, C., Hourlier, T., et al. (2016). The Ensembl gene annotation system. Database *2016*.
3. Bennett, M.L., Bennett, F.C., Liddelow, S.A., Ajami, B., Zamanian, J.L., Fernhoff, N.B., Mulinyawe, S.B., Bohlen, C.J., Adil, A., Tucker, A., et al. (2016). New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. Proc. Natl. Acad. Sci. *113*, E1738–E1746.
4. Biancheri, R., Zara, F., Bruno, C., Gazzerro, E., Rossi, A., van der Knaap, M.S., and Minetti, C. (1993). Hypomyelination and Congenital Cataract. In GeneReviews(®), R.A. Pagon, M.P. Adam, H.H. Ardinger, S.E. Wallace, A. Amemiya, L.J. Bean, T.D. Bird, N. Ledbetter, H.C. Mefford, R.J. Smith, et al., eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle), p.
5. Biancheri, R., Zara, F., Rossi, A., Mathot, M., Nassogne, M.C., Yalcinkaya, C., Erturk, O., Tuysuz, B., Di Rocco, M., Gazzerro, E., et al. (2011). Hypomyelination and congenital cataract: broadening the clinical phenotype. Arch. Neurol. *68*, 1191–1194.
6. Biesecker, L.G., Mullikin, J.C., Facio, F.M., Turner, C., Cherukuri, P.F., Blakesley, R.W., Bouffard, G.G., Chines, P.S., Cruz, P., Hansen, N.F., et al. (2009). The ClinSeq Project: piloting large-scale genome sequencing for research in genomic medicine. Genome Res. *19*, 1665–1674.
7. Bonkowsky, J.L., Nelson, C., Kingston, J.L., Filloux, F.M., Mundorff, M.B., and Srivastava, R. (2010). The burden of inherited leukodystrophies in children(e–Pub ahead of print)(CME). Neurology *75*, 718–725.
8. Bugiani, M., Al Shahwan, S., Lamantea, E., Bizzi, A., Bakhsh, E., Moroni, I., Balestrini, M.R., Uziel, G., and Zeviani, M. (2006). GJA12 mutations in children with recessive hypomyelinating leukoencephalopathy. Neurology *67*, 273–279.
9. Cailloux, F., Gauthier-Barichard, F., Mimault, C., Isabelle, V., Courtois, V., Giraud, G., Dastugue, B., and Boespflug-Tanguy, O. (2000). Genotype-phenotype correlation in inherited brain myelination defects due to proteolipid protein gene mutations. Clinical European Network on Brain Dysmyelinating Disease. Eur. J. Hum. Genet. EJHG *8*, 837–845.
10. Cesani, M., Lorioli, L., Grossi, S., Amico, G., Fumagalli, F., Spiga, I., Filocamo, M., and Biffi, A. (2015). Mutation Update of *ARSA* and *PSAP* genes causing Metachromatic Leukodystrophy. Hum. Mutat. n/a-n/a.
11. Conductier, G., Viola, A., Troter, A. le, Nahon, J.-L., and Guyon, A. (2013). Des cils battent dans le cerveau à un tempo finement régulé. médecine/sciences *29*, 943–945.
12. Crow, Y., Zaki, M., Abdel-Hamid, M., Abdel-Salam, G., Boespflug-Tanguy, O., Cordeiro, N., Gleeson, J., Gowrinathan, N., Laugel, V., Renaldo, F., et al. (2014). Mutations in ADAR1, IFIH1, and RNASEH2B Presenting As Spastic Paraplegia. Neuropediatrics *45*, 386–391.
13. Crow, Y.J., Leitch, A., Hayward, B.E., Garner, A., Parmar, R., Griffith, E., Ali, M., Semple, C., Aicardi, J., Babul-Hirji, R., et al. (2006). Mutations in genes encoding ribonuclease H2 subunits cause Aicardi-Goutières syndrome and mimic congenital viral brain infection. Nat. Genet. *38*, 910–916.
14. Dhaunchak, A.-S., and Nave, K.-A. (2007). A common mechanism of PLP/DM20 misfolding causes cysteine-mediated endoplasmic reticulum retention in

oligodendrocytes and Pelizaeus-Merzbacher disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 17813–17818.
15. Duncan, I.D., Bugiani, M., Radcliff, A.B., Moran, J.J., Lopez-Anido, C., Duong, P., August, B.K., Wolf, N.I., van der Knaap, M.S., and Svaren, J. (2017). A mutation in the Tubb4a gene leads to microtubule accumulation with hypomyelination and demyelination. Ann. Neurol. *81*, 690–702.
16. Federico, A., Dotti, M.T., and Gallus, G.N. (1993). Cerebrotendinous Xanthomatosis. In GeneReviews(®), R.A. Pagon, M.P. Adam, H.H. Ardinger, S.E. Wallace, A. Amemiya, L.J. Bean, T.D. Bird, N. Ledbetter, H.C. Mefford, R.J. Smith, et al., eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle), p.
17. Fluharty, A.L. (1993). Arylsulfatase A Deficiency. In GeneReviews(®), R.A. Pagon, M.P. Adam, H.H. Ardinger, S.E. Wallace, A. Amemiya, L.J. Bean, T.D. Bird, C.-T. Fong, H.C. Mefford, R.J. Smith, et al., eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle), p.
18. Fraldi, A., Biffi, A., Lombardi, A., Visigalli, I., Pepe, S., Settembre, C., Nusco, E., Auricchio, A., Naldini, L., Ballabio, A., et al. (2007). SUMF1 enhances sulfatase activities in vivo in five sulfatase deficiencies. Biochem. J. *403*, 305–312.
19. Fröhlich, D., Suchowerska, A.K., Spencer, Z.H.T., von Jonquieres, G., Klugmann, C.B., Bongers, A., Delerue, F., Stefen, H., Ittner, L.M., Fath, T., et al. (2017). In vivo characterization of the aspartyl-tRNA synthetase DARS: Homing in on the leukodystrophy HBSL. Neurobiol. Dis. *97, Part A*, 24–35.
20. Giorgio, E., Robyr, D., Spielmann, M., Ferrero, E., Di Gregorio, E., Imperiale, D., Vaula, G., Stamoulis, G., Santoni, F., Atzori, C., et al. (2015). A large genomic deletion leads to enhancer adoption by the lamin B1 gene: a second path to autosomal dominant adult-onset demyelinating leukodystrophy (ADLD). Hum. Mol. Genet. *24*, 3143–3154.
21. Gorospe, J.R., Naidu, S., Johnson, A.B., Puri, V., Raymond, G.V., Jenkins, S.D., Pedersen, R.C., Lewis, D., Knowles, P., Fernandez, R., et al. (2002). Molecular findings in symptomatic and pre-symptomatic Alexander disease patients. Neurology *58*, 1494–1500.
22. van Grunsven, E.G., Mooijer, P.A., Aubourg, P., and Wanders, R.J. (1999). Enoyl-CoA hydratase deficiency: identification of a new type of D-bifunctional protein deficiency. Hum. Mol. Genet. *8*, 1509–1516.
23. Henneke, M., Preuss, N., Engelbrecht, V., Aksu, F., Bertini, E., Bibat, G., Brockmann, K., Hübner, C., Mayer, M., Mejaski-Bosnjak, V., et al. (2005). Cystic leukoencephalopathy without megalencephaly A distinct disease entity in 15 children. Neurology *64*, 1411–1416.
24. Henseler, M., Klein, A., Reber, M., Vanier, M.T., Landrieu, P., and Sandhoff, K. (1996). Analysis of a splice-site mutation in the sap-precursor gene of a patient with metachromatic leukodystrophy. Am. J. Hum. Genet. *58*, 65–74.
25. Hobson, G.M., and Kamholz, J. (1993). PLP1-Related Disorders. In GeneReviews(®), R.A. Pagon, M.P. Adam, H.H. Ardinger, S.E. Wallace, A. Amemiya, L.J. Bean, T.D. Bird, N. Ledbetter, H.C. Mefford, R.J. Smith, et al., eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle), p.
26. Hodes, M.E., Zimmerman, A.W., Aydanian, A., Naidu, S., Miller, N.R., Garcia Oller, J.L., Barker, B., Aleck, K.A., Hurley, T.D., and Dlouhy, S.R. (1999). Different mutations in the same codon of the proteolipid protein gene, PLP, may help in correlating genotype with phenotype in Pelizaeus-Merzbacher disease/X-linked spastic paraplegia (PMD/SPG2). Am. J. Med. Genet. *82*, 132–139.
27. Imam, I., Brown, J., Lee, P., Thomas, P.K., and Manji, H. (2011). Ovarioleukodystrophy: report of a case with the c.338G>A (p.Arg113His) mutation on

exon 3 and the c.896G>A (p.Arg299His) mutation on exon 7 of the EIF2B5 gene. BMJ Case Rep. 2011.
28. Inserm Cellules gliales et neurones / Tout en images.
29. Ishiyama, G., Lopez, I., Baloh, R.W., and Ishiyama, A. (2003). Canavan's leukodystrophy is associated with defects in cochlear neurodevelopment and deafness. Neurology *60*, 1702–1704.
30. Karkar, A., Barakat, A., Bakhchane, A., Fettah, H., Slassi, I., Dorboz, I., Boespflug-Tanguy, O., and Nadifi, S. (2015). A novel mutation in the ABCD1 gene of a Moroccan patient with X-linked adrenoleukodystrophy: case report. BMC Neurol. *15*.
31. Kemp, S., Pujol, A., Waterham, H.R., van Geel, B.M., Boehm, C.D., Raymond, G.V., Cutting, G.R., Wanders, R.J., and Moser, H.W. (2001). ABCD1 mutations and the X-linked adrenoleukodystrophy mutation database: role in diagnosis and clinical correlations. Hum. Mutat. *18*, 499–515.
32. Klein, C.J. (1993). Adult Polyglucosan Body Disease. In GeneReviews(®), R.A. Pagon, M.P. Adam, H.H. Ardinger, S.E. Wallace, A. Amemiya, L.J. Bean, T.D. Bird, N. Ledbetter, H.C. Mefford, R.J. Smith, et al., eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle), p.
33. van der Knaap, M.S., van Berkel, C.G.M., Herms, J., van Coster, R., Baethmann, M., Naidu, S., Boltshauser, E., Willemsen, M.A.A.P., Plecko, B., Hoffmann, G.F., et al. (2003a). eIF2B-related disorders: antenatal onset and involvement of multiple organs. Am. J. Hum. Genet. *73*, 1199–1207.
34. van der Knaap, M.S., van der Voorn, P., Barkhof, F., Van Coster, R., Krägeloh-Mann, I., Feigenbaum, A., Blaser, S., Vles, J.S.H., Rieckmann, P., and Pouwels, P.J.W. (2003b). A new leukoencephalopathy with brainstem and spinal cord involvement and high lactate. Ann. Neurol. *53*, 252–258.
35. Labauge, P., Horzinski, L., Ayrignac, X., Blanc, P., Vukusic, S., Rodriguez, D., Mauguiere, F., Peter, L., Goizet, C., Bouhour, F., et al. (2009). Natural history of adult-onset eIF2B-related disorders: a multi-centric survey of 16 cases. Brain J. Neurol. *132*, 2161–2169.
36. LadyofHats (2007). Anatomie des neurones. Les neurones sont des cellules traitant et transmettant l'information dans le système nerveux sous la forme d'excitations électriques. Chez les vertébrés, les neurones sont le composant clé du cerveau, de la moelle épinière et des nerfs périphériques.
37. Leitersdorf, E., Reshef, A., Meiner, V., Levitzki, R., Schwartz, S.P., Dann, E.J., Berkman, N., Cali, J.J., Klapholz, L., and Berginer, V.M. (1993). Frameshift and splice-junction mutations in the sterol 27-hydroxylase gene cause cerebrotendinous xanthomatosis in Jews or Moroccan origin. J. Clin. Invest. *91*, 2488–2496.
38. Lek, M., Karczewski, K.J., Minikel, E.V., Samocha, K.E., Banks, E., Fennell, T., O'Donnell-Luria, A.H., Ware, J.S., Hill, A.J., Cummings, B.B., et al. (2016). Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. Nature *536*, 285–291.
39. López-Hernández, T., Sirisi, S., Capdevila-Nortes, X., Montolio, M., Fernández-Dueñas, V., Scheper, G.C., van der Knaap, M.S., Casquero, P., Ciruela, F., Ferrer, I., et al. (2011). Molecular mechanisms of MLC1 and GLIALCAM mutations in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. Hum. Mol. Genet. *20*, 3266–3277.
40. Lubetzki, C., Demerens, C., and Zalc, B. (1997). Signaux axonaux de myélinisation dans le système nerveux central.
41. Lundgaard, I., Osório, M.J., Kress, B.T., Sanggaard, S., and Nedergaard, M. (2014). White matter astrocytes in health and disease. Neuroscience *276*, 161–173.

42. Matalon, R., and Michals-Matalon, K. (1993). Canavan Disease. In GeneReviews(®), R.A. Pagon, M.P. Adam, H.H. Ardinger, S.E. Wallace, A. Amemiya, L.J. Bean, T.D. Bird, N. Ledbetter, H.C. Mefford, R.J. Smith, et al., eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle), p.
43. Moghadasian, M.H., Salen, G., Frohlich, J.J., and Scudamore, C.H. (2002). Cerebrotendinous xanthomatosis: a rare disease with diverse manifestations. Arch. Neurol. *59*, 527–529.
44. Nave, K.-A. (2010). Myelination and the trophic support of long axons. Nat. Rev. Neurosci. *11*, 275–283.
45. Neumann, S., Topper, A., Mandel, H., Shapira, I., Golan, O., Gazit, E., and Loewenthal, R. (2001). Identification of new mutations in Israeli patients with X-linked adrenoleukodystrophy. Genet. Test. *5*, 65–68.
46. Numata, Y., Gotoh, L., Iwaki, A., Kurosawa, K., Takanashi, J.-I., Deguchi, K., Yamamoto, T., Osaka, H., and Inoue, K. (2014). Epidemiological, clinical, and genetic landscapes of hypomyelinating leukodystrophies. J. Neurol. *261*, 752–758.
47. Oguievetskaia, K., Cifuentes-Diaz, C., Girault, J.-A., and Goutebroze, L. (2005). Contacts cellulaires des fibres myélinisées du système nerveux périphérique. MS M233decine Sci. *21*, 162–169.
48. Penati, R., Fumagalli, F., Calbi, V., Bernardo, M.E., and Aiuti, A. (2017). Gene therapy for lysosomal storage disorders: recent advances for metachromatic leukodystrophy and mucopolysaccaridosis I. J. Inherit. Metab. Dis. *40*, 543–554.
49. Potic, A., Brais, B., Choquet, K., Schiffmann, R., and Bernard, G. (2012). 4H syndrome with late-onset growth hormone deficiency caused by POLR3A mutations. Arch. Neurol. *69*, 920–923.
50. Rademakers, R., Baker, M., Nicholson, A.M., Rutherford, N.J., Finch, N., Soto-Ortolaza, A., Lash, J., Wider, C., Wojtas, A., DeJesus-Hernandez, M., et al. (2011). Mutations in the colony stimulating factor 1 receptor (CSF1R) gene cause hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids. Nat. Genet. *44*, 200–205.
51. Rafai, M.A., Boulaajaj, F.Z., Seito, A., Suga, Y., Slassi, I., and Fadel, H. (2008). [Sjögren-Larsson syndrome: a novel mutation in a Moroccan child]. Arch. Pediatr. Organe Off. Soc. Francaise Pediatr. *15*, 1648–1651.
52. Ramantani, G., Kohlhase, J., Hertzberg, C., Innes, A.M., Engel, K., Hunger, S., Borozdin, W., Mah, J.K., Ungerath, K., Walkenhorst, H., et al. (2010). Expanding the phenotypic spectrum of lupus erythematosus in Aicardi-Goutières syndrome. Arthritis Rheum. *62*, 1469–1477.
53. Ratbi, I., Falkenberg, K.D., Sommen, M., Al-Sheqaih, N., Guaoua, S., Vandeweyer, G., Urquhart, J.E., Chandler, K.E., Williams, S.G., Roberts, N.A., et al. (2015). Heimler Syndrome Is Caused by Hypomorphic Mutations in the Peroxisome-Biogenesis Genes PEX1 and PEX6. Am. J. Hum. Genet. *97*, 535–545.
54. Reshef, A., Meiner, V., Berginer, V.M., and Leitersdorf, E. (1994). Molecular genetics of cerebrotendinous xanthomatosis in Jews of north African origin. J. Lipid Res. *35*, 478–483.
55. Rice, G.I., Bond, J., Asipu, A., Brunette, R.L., Manfield, I.W., Carr, I.M., Fuller, J.C., Jackson, R.M., Lamb, T., Briggs, T.A., et al. (2009). Mutations involved in Aicardi-Goutières syndrome implicate SAMHD1 as regulator of the innate immune response. Nat. Genet. *41*, 829–832.
56. Sarret, C., Lemaire, J.-J., Tonduti, D., Sontheimer, A., Coste, J., Pereira, B., Feschet, F., Roche, B., and Boespflug-Tanguy, O. (2016). Time-course of myelination and atrophy on cerebral imaging in 35 patients with PLP1-related disorders. Dev. Med. Child Neurol. *58*, 706–713.

57. Simons, M., and Nave, K.-A. (2016). Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *8*, a020479.
58. Siri, L., Rossi, A., Lanza, F., Mazzotti, R., Costa, A., Stroppiano, M., Gaiero, A., Cohen, A., Biancheri, R., and Filocamo, M. (2014). A novel homozygous splicing mutation in PSAP gene causes metachromatic leukodystrophy in two Moroccan brothers. Neurogenetics *15*, 101–106.
59. Sirisi, S., Folgueira, M., López-Hernández, T., Minieri, L., Pérez-Rius, C., Gaitán-Peñas, H., Zang, J., Martínez, A., Capdevila-Nortes, X., De La Villa, P., et al. (2014). Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts protein 1 regulates glial surface localization of GLIALCAM from fish to humans. Hum. Mol. Genet. *23*, 5069–5086.
60. Srivastava, S., and Naidu, S. (1993). Alexander Disease. In GeneReviews(®), R.A. Pagon, M.P. Adam, H.H. Ardinger, S.E. Wallace, A. Amemiya, L.J. Bean, T.D. Bird, N. Ledbetter, H.C. Mefford, R.J. Smith, et al., eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle), p.
61. Steenweg, M.E., Ghezzi, D., Haack, T., Abbink, T.E.M., Martinelli, D., van Berkel, C.G.M., Bley, A., Diogo, L., Grillo, E., Te Water Naudé, J., et al. (2012). Leukoencephalopathy with thalamus and brainstem involvement and high lactate "LTBL" caused by EARS2 mutations. Brain J. Neurol. *135*, 1387–1394.
62. Steinberg, S.J., Moser, A.B., and Raymond, G.V. (1993). X-Linked Adrenoleukodystrophy. In GeneReviews(®), R.A. Pagon, M.P. Adam, H.H. Ardinger, S.E. Wallace, A. Amemiya, L.J. Bean, T.D. Bird, N. Ledbetter, H.C. Mefford, R.J. Smith, et al., eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle), p.
63. Steinberg, S.J., Dodt, G., Raymond, G.V., Braverman, N.E., Moser, A.B., and Moser, H.W. (2006). Peroxisome biogenesis disorders. Biochim. Biophys. Acta *1763*, 1733–1748.
64. Talbi, J., Khadmaoui, E., Soulaymani, A., and Chafik, A. (2007). Etude de la consanguinité dans la population marocaine. Impact sur le profil de la santé. Antropo 1–11.
65. Tappino, B., Biancheri, R., Mort, M., Regis, S., Corsolini, F., Rossi, A., Stroppiano, M., Lualdi, S., Fiumara, A., Bembi, B., et al. (2010). Identification and characterization of 15 novel GALC gene mutations causing Krabbe disease. Hum. Mutat. *31*, E1894-1914.
66. The 1000 Genomes Project Consortium (2015). A global reference for human genetic variation. Nature *526*, 68–74.
67. Thiffault, I., Wolf, N.I., Forget, D., Guerrero, K., Tran, L.T., Choquet, K., Lavallée-Adam, M., Poitras, C., Brais, B., Yoon, G., et al. (2015). Recessive mutations in POLR1C cause a leukodystrophy by impairing biogenesis of RNA polymerase III. Nat. Commun. *6*, 7623.
68. Tonduti, D., Aiello, C., Renaldo, F., Dorboz, I., Saaman, S., Rodriguez, D., Fettah, H., Elmaleh, M., Biancheri, R., Barresi, S., et al. (2016). TUBB4A-related hypomyelinating leukodystrophy: New insights from a series of 12 patients. Eur. J. Paediatr. Neurol. EJPN Off. J. Eur. Paediatr. Neurol. Soc. *20*, 323–330.
69. Uhlenberg, B., Schuelke, M., Rüschendorf, F., Ruf, N., Kaindl, A.M., Henneke, M., Thiele, H., Stoltenburg-Didinger, G., Aksu, F., Topaloğlu, H., et al. (2004). Mutations in the gene encoding gap junction protein alpha 12 (connexin 46.6) cause Pelizaeus-Merzbacher-like disease. Am. J. Hum. Genet. *75*, 251–260.
70. Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., and Rozen, S.G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Res. *40*, e115.

71. Vanderver, A., Tonduti, D., Schiffmann, R., Schmidt, J., and van der Knaap, M.S. (1993). Leukodystrophy Overview. In GeneReviews(®), R.A. Pagon, M.P. Adam, H.H. Ardinger, S.E. Wallace, A. Amemiya, L.J. Bean, T.D. Bird, N. Ledbetter, H.C. Mefford, R.J. Smith, et al., eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle), p.
72. Vanderver, A., Prust, M., Tonduti, D., Mochel, F., Hussey, H.M., Helman, G., Garbern, J., Eichler, F., Labauge, P., Aubourg, P., et al. (2015). Case Definition and Classification of Leukodystrophies and Leukoencephalopathies. Mol. Genet. Metab. *114*, 494–500.
73. Wenger, D.A. (1993). Krabbe Disease. In GeneReviews(®), R.A. Pagon, M.P. Adam, H.H. Ardinger, S.E. Wallace, A. Amemiya, L.J. Bean, T.D. Bird, N. Ledbetter, H.C. Mefford, R.J. Smith, et al., eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle), p.
74. Yu, B., and Zhang, C. (2011). In silico PCR analysis. Methods Mol. Biol. Clifton NJ *760*, 91–107.
75. Zara, F., Biancheri, R., Bruno, C., Bordo, L., Assereto, S., Gazzerro, E., Sotgia, F., Wang, X.B., Gianotti, S., Stringara, S., et al. (2006). Deficiency of hyccin, a newly identified membrane protein, causes hypomyelination and congenital cataract. Nat. Genet. *38*, 1111–1113.
76. Zerkaoui, M., Ratbi, I., Castellotti, B., Gellera, C., Lyahyai, J., Kriouile, Y., and Sefiani, A. (2015). Clinical and molecular report of novel GALC mutations in Moroccan patient with Krabbe disease: case report. BMC Pediatr. *15*.

Annexe 1

Fiche d'exploitation

Leucodystrophie

Identité

Patient : ……. Date de naissance : ……

Père : ……. Age : ……

Mère :…… Age : ……

Tél : ……. Origine : ……

Motif de consultation

……
……
……

Antécédents personnelles

Grossesse : suivie o non suivie o terme : ……

Mouvement fœtaux : ……

Accouchement: normal o césarienne o état : …… Apgar : ……

Complication Oui o Non o ……

Poids à la naissance : …… Difficulté alimentaire : ……

Diversification alimentaire : ……..

Développement psychomoteur : ……

Tenu de tête à :…… Assis à : …… Marche à :……

Premiers mots à :…… Sourire : ……

Age du début de la maladie : …… RPM : léger o modéré o profond o

Autre : ……

……

Antécédent familiaux

Mariage consanguin : Oui o Non o

Cas familiaux : Oui o Non o

……

……

Examen clinique

Poids : …… Taille : …… Périmètre crânien : …… TA : ……

Signe particulier : ……

Troubles de la motricité volontaire Oui o Non o

……

Hypotonie Oui o Non o

……

Faiblesse musculaire Oui o Nono

……

Aréflexie Oui o Non o

……

Syndrome cérébelleux :

Ataxie Oui o Non o

……

Nystagmus Oui o Non o

……

Dysmetrie Oui o Non o

……

Tremblement Oui o Non o

……

Syndrome pyramidal :

Hypereflexie Oui o Non o

……

Rot membres supérieures Oui o Non o

……

Rot membres inférieures Oui o Non o

……

Spasticité Oui o Non o

……

Clonus Oui o Non o

……

Babinski Oui o Non o

……

Rossolimo Oui o Non o

……

Syndrome extrapyramidal:

Dystonie Oui o Non o

……

Mouvements choréo-athétosiques Oui o Non o

……

Troubles de la sensibilité profonde Oui o Non o

……

Signes de neuropathie périphérique Oui o Non o

……

Troubles alimentaires :

Anorexie Oui o Non o

……

Vomissement Oui o Non o

……

Troubles de déglutition Oui o Non o

……

Troubles de transite Oui o Non o

……

Troubles sphinctériens Oui o Non o

……

Troubles du langage Oui o Non o

……

Troubles d'oculomotricité Oui o Non o

……

Troubles auditives Oui o Non o

……

Instabilité psychomotrice Oui o Non o

……

Troubles psychiatriques Oui o Non o

……

Trouble de la convergence Oui o Non o

……

Troubles de la mémoire Oui o Non o

……

Autres :

……

……

Examens paracliniques :

Résultat d'IRM :

……

……

……

Analyses enzymatiques :

……

……

EMG :

……

……

Autres résultats :

……

……

Le Pedigree :

Annexe 2

UNIVERSITE HASSAN II AIN CHOCK
FACULTE DE MEDECINE ET PHARMACIE

LABOIRATOIRE DE GENETIQUE ET PATHOLOGIE MOLECULAIRE

CONSENTEMENT ECLAIRE POUR ETUDE GENETIQUE

Après avoir reçu des explications détaillées sur l'étude génétique envisagé par le Dr ... ..., et ayant toutes les réponses à mes questions sur la présente étude, je ... ..., soussigné, donne mon consentement et je participe à cette étude qui comporte des analyses génétiques.
En signant ce document, j'atteste avoir pleine connaissance et la compréhension de ce qui suit:

L'étude dont je suis invité à participer s'intitule:

Je participe à cette recherche parce que je suis :

□ Sujet malade

□ Membre de la famille d'un sujet malade

□ Témoin

Ma participation exige :

□ Un prélèvement sanguin

□ Un questionnaire à remplir

Ma participation est entièrement volontaire :

- Je peux refuser de participer sans préjudice de la part de mon médecin traitant, ma décision n'affectera pas les soins médicaux que je reçois.
- Je peux me retirer de cette étude quand je veux, sans affecter les soins médicaux que j'ai le droit de recevoir.
- Je ne supporterai aucun frais supplémentaire à la suite de ma participation à ce projet.
-Je comprends que les informations produites à partir de ma participation à cette étude seront tenues confidentielle

J'ai étudié avec soin les options ci-dessus et je
signe ce consentement en pleine connaissance.

Malade / Tuteur / Témoin :

Nom _____

Signature: _____ Date: _____

Index

A

AD : *Autosomique Dominant*

ADDH *: Ataxie, dentition retardée et hypomyélinisation*

ADLD *: Leucodystrophie démyélinisante autosomique dominante de l'adulte*

AGS *: Syndrome d'Aicardi-Goutières*

AGTLC *: Acides gras à très longue chaîne*

ALDP *: Protéine adrenoleucodystrophie*

ALSP *: Leucoencéphalopathie héréditaire diffuse à sphéroïdes axonaux et cellules gliales pigmentées*

AMN *: Adrénomyéloneuropathie*

AR *: Autosomique Récessive*

ARSA : *Arylsulfatase A*

C

CCALD *: ALD cérébral des enfants*

CMV *: Cytomégalovirus*

COXPD12 *: Déficience combiné de la phosphorylation oxydative 12*

CTX *: Xanthomatose cérébroutérine*

D

DODD *: Syndrome de la dysplasie oculodentodigital*

G

GALC *: Galactocérébrosidase*

H

H-ABC *: Hypomyélinisation avec atrophvie des ganglions de la base et du cervelet*

HBSL *: Hypomyélinisation avec atteinte du tronc cérébral et de la moelle épinière et spasticité des jambes*

HCAHC *: Hypomyélinisation avec atrophie cérébelleuse et hypoplasie du corps calleux*

HCC *: Hypomyélinisation et cataracte congénitale*

HDLS *: Leucoencéphalopathie héréditaire diffuse avec les sphéroïdes*

I

IRD *: Maladie infantile de Refsum*

IRM : *Imagerie par Résonance Magnétique, Imagerie par Résonance Magnétique*

ISSD *: Surcharge en acide sialique libre*

L

LBSL *: Syndrome de leucoencéphalopathie avec atteinte du tronc cérébral et de la moelle épinière avec élévation des lactates*

LCR *: Liquide Céphalo Rachidien*

LD : *Leucodystrophies*

LO *: Leucodystrophie avec oligodontie*

M

MLC *: Leucoencéphalopathie mégalencephalique avec les kystes sous-corticaux*

MLD *: Leucodystrophie métachromatique*

N

NAA *: Acide N-acétylaspartique*

NALD *: Adrenoleucodystrophie néonatale*

NGS *: Next Generation Sequencing*

P

PMD : *Pelizaeus-Merzbacher*

PMLD *: Pelizaeus-Merzbacher-Like*

POLD *: Leucodystrophie orthochromatique pigmentaire*

S

SAP *: Protéines activatrices de sphingolipides*

SB *: Substance Blanche*

SG *: Substance Grise*

SNC *: Système Nerveux Central*

SNP : *Système Nerveux Périphérique*

SPG2 *: Spastique de type 2*

Syndrome 4H *: Hypomyélinisation, hypodontie, hypogonadisme hypogonadotrope*

Syndrome CACH *: Childhood Ataxia with Central nervous system Hypomyelination*

T

TACH *: Tremblement et ataxie avec hypomyélinisation centrale*

TDM *: Tomodensitométrie*

TE *: Tris-EDTA*

V

VWMD *: Vanishing White Matter Disease*

X

X-ALD *: Adrenoleucodystrophie liée au X*

Z

ZS *: Syndrome de Zellweger*