

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Année 2005

N°48

THESE

pour le

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Qualification en: Pédiatrie

par

Bertrand ISIDOR
né le 10/05/1976

Présentée et soutenue publiquement le 01/12/2005

Etude Génétique du Syndrôme de Ghosal

Président :Monsieur le Professeur Rozé
Directeur de thèse: Pr V Comier-Daire

I. INTRODUCTION

Le syndrome de Ghosal (OMIM 231095), décrit pour la première fois en 1988 par SP Ghosal [1], est une entité rare, transmise sur un mode autosomique récessif, et caractérisée par l'association d'une dysplasie diaphysaire et d'anomalies hématologiques. Ce syndrome appartient au groupe des maladies osseuses ostéocondensantes (MOC). Celles-ci sont caractérisées par des anomalies de densité osseuse et résultent d'un déséquilibre entre la production osseuse (ostéoblaste) et la résorption osseuse (ostéoclaste). Elles sont classées en fonction de la localisation de l'ostéosclérose : diaphyse, métaphyse ou généralisée. A ce jour, leur physiopathogénie reste encore mal comprise.

Le but de ce travail est la localisation puis l'identification du gène responsable de la dysplasie diaphysaire de Ghosal (DDG). Pour cela, une analyse clinique préalable a permis le recrutement de 4 familles consanguines. La technique de cartographie par homozygotie a été choisie pour localiser le gène puis une stratégie gènes candidats par leur fonction dans la région d'homozygotie a été adoptée.

Présentation du sujet

Le syndrome de Ghosal, appartient au groupe des MOC avec atteinte diaphysaire qui comprend en outre la dysplasie craniodiaphysaire et le syndrome de Camurati Engelmann (CED). Il se distingue de la dysplasie craniodiaphysaire par l'absence d'atteinte du crâne et la présence des anomalies hématologiques et du CED par le mode de transmission, et l'atteinte hématologique.

Les signes cliniques habituels sont une hyperostose accompagnée d'une pâleur ou asthénie liées à l'anémie. Sur le plan biologique, ce syndrome se caractérise par une anémie centrale, et parfois une thrombopénie en rapport avec une fibrose médullaire. Sur le plan radiologique, l'atteinte osseuse comprend essentiellement une dysplasie diaphysaire. Les lésions des os longs sont bilatérales et symétriques, associées une hyperostose corticale et à une cavité médullaire élargie (figure 1).

Sous traitement par corticoïdes, les anomalies hématologiques régressent habituellement en quelques semaines.

Ces dernières années ont été marquées par l'identification de plusieurs gènes à l'origine de MOC. Ces gènes sont impliqués soit dans la fonction ostéoclastique soit dans la différenciation des ostéoclastes (tableau1). Dans le cadre des MOC diaphysaires, les gènes identifiés codent pour des protéines impliquées dans la différenciation des ostéoblastes.

Cependant, un grand nombre de MOC restent sans base moléculaire à ce jour et leur physiopathogénie reste mal comprise.

Figure 1 :Aspects radiologiques du syndrome Ghosal.



Radiographie des membres inférieurs chez trois patients de la même famille
A noter, l'épaississement irrégulier de la corticale au niveau des diaphyses, l'anomalie de modelage des os longs et le respect des épiphyses.

Tableau 1: Liste des gènes identifiés dans les maladies ostéocondensantes.

MOC généralisées	Ostéopétroses malignes	TCIRG1 (ou OC116)	11q12 (AR)	Pompe à protons
		CLCN7	16p13 (AR)	Canal chlore
		OSTM1 (ou Grey lethal)	6q21 (AR)	Facteur de différenciation de l'ostéoclaste
	Ostéopétrose intermédiaires	(OL-EDA-ID) NEMO	Xq28 (lié X)	Facteur de transcription
	Ostéopétrose modérée dominante	CLCN7	16p13 (AD)	Canal chlore
LRP5		11q13 (AD)	Récepteur des lipoprotéines de bas poids moléculaire	
MOC diaphysaire	Camurati-Engelman	TGF β 1	12q13 (AD)	Facteur de croissance
	Hyperostose endostale	SOST (sclerostine)	17q12 (AR)	Facteur de différenciation antagoniste TGF β
	Dysplasie tricho-dento-osseuse	DLX3	17q21 (AD)	Facteur de différenciation antagoniste TGF β
MOC métaphysaire	Dysplasie craniométaphysaire	ANK	5p15 (AD)	Facteur intervenant dans la calcification des tissus
MOC avec dissémination en aires	Ostéopoikilose	LEMD3	12q14 (AD)	Antagoniste TGF β ₃

II. MATÉRIEL ET MÉTHODE

1. FAMILLES

Nous disposons de prélèvement d'ADN issus de 4 familles consanguines, comportant au total 6 sujets atteints (figure 2). Tous ces prélèvements ont été réalisés après signature d'un consentement éclairé par les familles.

Les caractéristiques cliniques et biologiques des patients sont résumées dans les tableaux 2 et 3. Ils répondent tous aux critères diagnostiques du syndrome de Ghosal: atteinte hématologique et ostéosclérose diaphysaire.

La famille 1 est d'origine marocaine (f=1/16 et 5/64), et comprend 3 individus atteints Oussama, Mohammed et Slimane. On dispose des prélèvements des trois sujets atteints, de leurs parents et de la sœur du sujet V1.:

-Zaragan a été initialement adressé dans le service pour le bilan étiologique d'une anémie chronique. Cet enfant était suivi pour une anémie normocytaire sévère associée à une thrombopénie diagnostiquées à l'âge de 16 mois. L'ensemble du bilan étiologique était négatif hormis l'analyse morphologique des plaquettes révélant en microscopie électronique des plaquettes présentant des granulations alpha identiques à celles retrouvées dans le syndrome Paris-Trousseau. Une délétion 11q23, habituellement associée à ce syndrome, n' a pas été retrouvée. Le myélogramme a montré une moelle hypoplasique et la biopsie ostéomédullaire une myélofibrose. Il alors été initialement suivi dans le cadre d'une myélofibrose idiopathique pendant un an, traité par des transfusions régulières de culot globulaires jusqu'à que les radiographies des membres révèlent une dysplasie diaphysaire. Une corticothérapie a alors été débutée à la dose de 1 mg/kg/j permettant une amélioration rapide: apparition d'une forte réticulocytose, résolution de l'anémie et de la thrombocytopénie en 4 semaines.

Un an plus tard, la corticothérapie a été arrêtée mais rapidement reprise à cause de la rechute de l'anémie. A ce jour, il est toujours sous corticothérapie à la dose de 0.1 mg/kg/jour.

-Mohammed A est un homme de 34 ans, oncle de Zaragan. Un bilan effectué pour pneumopathie a permis de révéler une anémie microcytaire normochrome à 6g/dl associée à une leucopénie et à une thrombopénie. Devant l'histoire familiale de syndrome de Ghosal des radiographies des membres ont été réalisées mettant en évidence un épaississement cortical de la diaphyse des tibias et une ostéocondensation généralisée des vertèbres et des métatarses. Ce patient souffre également d'un syndrome inflammatoire chronique compliqué d'une amylose rénale AA. Une corticothérapie à la dose de 0.5 mg/kg/j a entraîné une réponse rapide avec une élévation du taux d'hémoglobine de 6 à 8g/dl en 5 jours, le patient devenu moins asthénique et décroissance du syndrome inflammatoire avec une diminution du taux de CRP de 53mg/l à 13mg/l.

-Oussama, frère de Mohammed. Cet homme présente une atteinte osseuse asymptomatique découverte sur des radiographies réalisées dans le cadre d'un dépistage familial. Aucune atteinte hématologique associée n'a été retrouvée.

La famille 2 est d'origine Tunisienne (f=1/32). On dispose des prélèvements des deux enfants atteints, Naim et Nadim, de l'enfant sain et des parents.

Chez le frère aîné, Naim, le bilan réalisé pour une pâleur à l'âge de 2 ans a conduit à la découverte d'une bicytopénie (anémie et thrombopénie) avec fibrose médullaire. Les radiographies des membres ont révélé une dysplasie diaphysaire des tibias et fémurs. Toutes les anomalies hématologiques ont régressé spontanément en quelques mois. A ce jour son bilan hématologique est normal, mais cet enfant présente toujours une hyperostose corticale des os longs.

Chez son frère, Nadim, l'anémie a été découverte de façon fortuite à l'âge de 18 mois lors d'un bilan systématique pour une intervention chirurgicale. Devant la persistance de l'anémie malgré une supplémentation en fer, un bilan plus complet a été effectué. Celui-ci retrouvait une anémie centrale microcytaire (VGM=69) normochrome (CCMH=32) associée à une thrombopénie, sans carence en fer ou vitaminique, ainsi qu'une hyperlymphocytose. Aucune étiologie infectieuse ou immunologique n'a été retrouvée.

L'anémie s'est ensuite progressivement aggravée et une thrombopénie est secondairement apparue (100 000/mm³).

Le bilan radiologique a révélé un épaississement cortical de la diaphyse des os longs des membres inférieurs et supérieurs permettant le diagnostic de syndrome de Ghosal. Une corticothérapie a alors été débutée permettant une élévation du taux d'hémoglobine en moins de 15 jours. Par contre, à 10 mois du début du traitement il persistait toujours un épaississement de la corticale des os longs.

La Famille 3 est d'origine Tunisienne. L'enfant atteint, Ali, est le sixième enfant d'une fratrie de 6 de parents consanguins (f=1/32) en bonne santé. On dispose des prélèvements de l'enfant atteint, des frères et sœurs, et des parents.

A l'âge de 14 mois, il est hospitalisé en raison d'un tableau clinique associant une pâleur cutanéomuqueuse, des ecchymoses et une splénomégalie. L'hémogramme réalisé révèle une anémie normocytaire normochrome arégénérative (hémoglobine à 3g/dl) associée à une thrombopénie (35 000/mm³), sans leucopénie ni neutropénie associées. Le myélogramme réalisé montre une moelle riche avec un blocage de la maturation granulocytaire au stade myelocyte/métamyelocyte, une maturation érythroblastique normale, de très rares mégacaryocytes, et la présence de nombreux ostéoblastes et ostéoclastes, sans infiltrat blastique. Deux biopsies médullaires réalisées par la suite mettent en évidence une moelle pauvre hypoplasique. L'enfant est alors transfusé à plusieurs reprises en culots globulaires et plaquettes.

Sur le plan osseux, les radiographies des os longs révèlent une dysplasie diaphysaire avec anomalie de remodelage diaphysaire.

En décembre 2002, une corticothérapie est débutée à la dose de 1mg/kg/j permettant la correction de l'anémie et de la thrombopénie en moins de 4 semaines avec disparition des besoins transfusionnels et une régression quasi complète de

l'hépatosplénomégalie. Sur le plan osseux on note une discrète amélioration avec diminution de l'épaisseur de la corticale.

La Famille 4 est d'origine Pakistanaise (f=1/16). L'enfant atteint, Amin, est la dernière fille d'une famille de 5 enfants nés de parents cousins germains. On dispose des prélèvements de l'enfant atteint, des frères et sœurs, et des parents.

A l'occasion d'une bronchiolite, à l'âge de 14 mois, une anémie sévère à 6 g/dl (VGML=61.5, réticulocytes=70 000/mm³), associée à une thrombopénie (100 000/mm³) sont découvertes. Conjointement à ces anomalies hématologiques, on constate une hypertrophie osseuse prédominant aux niveaux des fémurs, des tibiae et des avant bras.

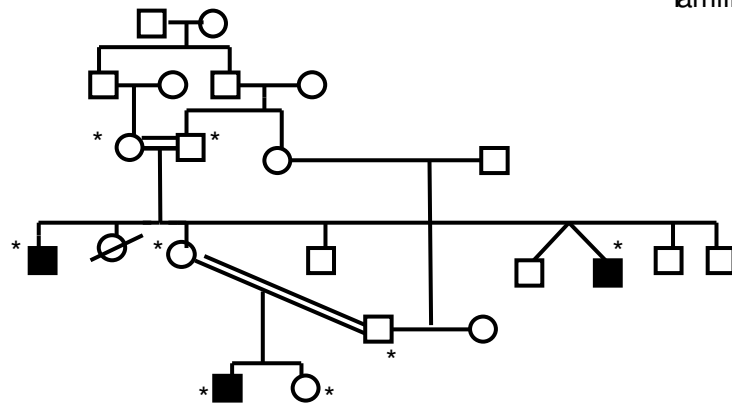
Les radiographies de squelette réalisées retrouvent un épaississement des arcs costaux, un épaississement cortical de la base du sphénoïde, des diaphyses des os longs des membres supérieurs et inférieurs avec une cavité médullaire élargie. Le myélogramme retrouve une richesse cellulaire globalement très diminuée prédominant au niveau de la lignée mégacaryocytaire sans dystrophie cellulaire majeure, ni infiltrat blastique.

Devant ce tableau, le diagnostic de syndrome de Ghosal est évoqué et une corticothérapie est débutée à l'âge de 1 an et 5 mois à la dose de 2mg/kg/j de prednisolone. Sous traitement, l'anémie et la thrombopénie se sont améliorées en moins de 15 jours permettant par la suite une décroissance progressive de la corticothérapie. A l'âge de 3 ans, soit après 1 an et demi de traitement, les diaphyses des os longs restent très remaniées avec une incurvation et un élargissement métaphysaire important. Une ostéodensitométrie effectuée à l'âge de 3 ans après 2 ans de traitement montre une DMO très largement augmentée à 0.7 g/cm² (normale à 0.5) correspondant à un Zscore de +3.9 DS.

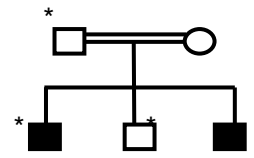
Actuellement, à l'âge de 3ans et demi, toujours sous corticothérapie à la dose de 0.15 mg/kg/j de prednisolone l'enfant a une hémoglobine stabilisée aux alentours de 10g/dl et un taux de plaquettes d'environ 125 000/mm³.

Figure 2: Généalogie des familles de notre échantillon

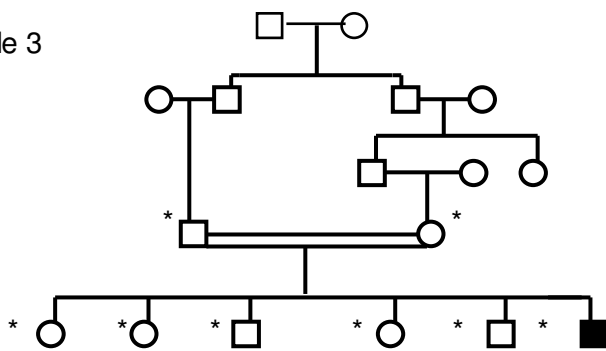
Famille 1



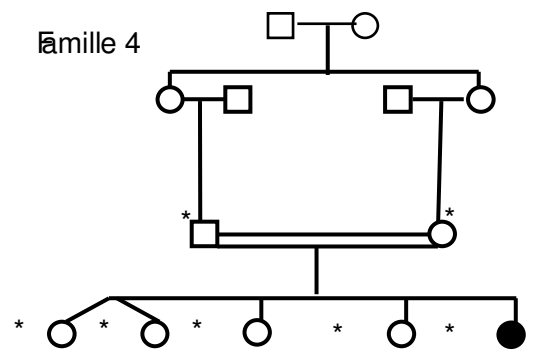
Famille 2



Famille 3



Famille 4



*:prélèvement disponible

Tableau 2 : Renseignements cliniques et radiographiques sur les patients de notre

	Famille 1			Famille 2		Famille 3	Famille 4
Patients	Mohammed	Oussama	Slimane	Nadim	Naim	Ali	Amin
Origine	Maroc	Maroc	Maroc	Tunisie	Tunisie	Tunisie	Pakistan
Coefficient de consanguinité (f)	1/16	5/64	1/16	1/32	1 /32	1/32	1 /16
Age au diagnostic	34 ans	1 mois	24 ans	18 mois	2 ans	14 mois	14 mois
Sexe	M	M	M	M	M	M	F
Retard saturopondéral	non	non	non	non	non	non	non
Développement psychomoteur	normal	normal	normal	normal	normal	Retard à la marche	normal
Anémie	+	+	+	+	+	+	+
Thrombopénie	+	-	-	+	+	+	+
Leucopénie	-	-	-	-	-	-	-
Dysplasie diaphysaire	+	+	+	+	+	+	+
Corticothérapie	+	+	-	+	-	+	+

échantillon.

Tableau 3 : Renseignements biologiques sur les patients de notre échantillon.

	Famille 1	Famille 2	Famille 3	Famille 4
Patients	Mohammed	Nadim	Ali	Amin
Hb (g/dl)	6.0	7.2	3.0	6.3
réticulocytes	57 500	31 000	35 000	23 000
VGM	71	65	80	63
Plaquettes /mm ³	155 000	172 000	10 000	93 000
Leucocytes/mm ³	7 300	12 600	8 500	9 300
IgG (g/l)	?	?	7.8	17.3 (N<9.1)
IgA (g/l)	4.7	?	0.56	1.95 (n<1.0)
IgM (g/l)	?	?	0.6	1.47 (n<1.45)
Ferritine (ng/ml)	342	179	880	51
Iono/P/Ca	normal	normal	normal	normal
Myélogramme/biopsie médullaire	Non fait	myélofibrose	moelle hypoplasique/ myélofibrose	Moelle hypoplasique

2. MÉTHODES

A/ Extraction d'ADN

Après obtention des consentements des familles, les prélèvements sanguins des patients et de différents membres des 4 familles ont été obtenus. L'ADN est obtenu par hémolyse des leucocytes, digestion des protéines membranaires par la protéinase K, extraction d'ADN au phénol saturé, puis lavage avec un mélange chloroforme-alcool isoamylique. L'ADN ainsi obtenu est alors repris dans l'eau.

B/ PCR (polymerase chain reaction)

Les conditions d'amplification des marqueurs microsatellites ou des exons sont les suivantes : 100ng ADN, 0.2mM dNTP, 1.5mM MgCl₂, 0.8 mM amorces sens et antisens, 2.5µl tampon 10X, 0.15 uTaq Invitrogen(Ul.ul-1), dans un volume total de 25 µl. Les PCR sont réalisées dans un thermocycler Perkin Elmer 2400 par une dénaturation de 5 minutes à 94 °C suivie de 35 cycles d'amplification (30 secondes à 94 °C : dénaturation, 30 secondes à la température moyenne d'hybridation des 2 amorces, et 30 secondes à 72 °C : élongation), puis une extension finale à 72 °C pendant 7 minutes. Les amorces choisies et utilisées pour amplifier les exons sont répertoriées en annexe.

C/ Cartographie primaire

La technique de cartographie par homozygotie a été adoptée afin de localiser le(s) gène(s) candidat responsable du syndrome de Ghosal. Elle repose sur le recrutement de familles consanguines pour localiser des maladies récessives rares. Les sujets atteints héritent de deux copies identiques par leur ancêtre commun et sont homozygotes par descendance pour le locus morbide mais aussi pour les marqueurs flanquants. Elle a été décrite pour la première fois en 1987 par Lander et Bostein.

Dans un premier temps un tour de génome complet a été réalisé en collaboration avec le centre National de Génotypage d'Evry (CNG) pour tous les membres des familles 1 et 2. Il a consisté en l'étude de 382 marqueurs microsatellites répartis tout au long du génome et espacés de 10 cM environ. Les microsatellites sont caractérisés par un nombre variable de répétition di ou tri nucléotidique. Cette grande variabilité de nombre de répétitions au sein de la population donne un caractère informatif à ces marqueurs physiques du génome. Les microsatellites les plus nombreux sont des répétitions de (CA)_n.

L'analyse de cette étude nous a conduit à étudier finement les régions d'homozygotie à l'aide d'autres marqueurs microsatellites. Les amorces de ces marqueurs sont couplées à un photophore de type 6-FAM (fluorescence bleue), ou HEX (verte), ou NED (jaune). Les produits de PCR sont mélangés avec un marqueur de taille: le 400 HD ROX (applied biosystems) permettant la détermination de la taille des fragments. Le mélange est déposé sur un séquenceur automatique (ABI PRISMtm 3100). Les données sont ensuite analysées avec le logiciel Genescan 3.1(Applied Biosystems) puis exploitées dans l'application GENOTYPER 2.5 (Applied Biosystems).

D/ Etude des régions chromosomiques et des gènes candidats par les banques de données

La méthode de Lod score permet de tester l'hypothèse de liaison génétique entre 2 loci, pouvant être 2 marqueurs anonymes, deux gènes ou bien un marqueur de localisation connue et un gène dont la localisation chromosomique est inconnue. On étudie ainsi dans un ou plusieurs pedigrees la ségrégation du gène et du marqueur polymorphe. On calcule ensuite le rapport entre la probabilité que le gène et le marqueur soient liés et la probabilité qu'ils soient indépendants. Il est exprimé en logarithme décimal par le Lod-score Z dont la valeur est maximisée par une valeur θ dite fraction de recombinaison qui équivaut au rapport de gamètes réarrangés sur les gamètes totaux. On admet que deux loci sont liés si $Z \geq 3$ pour un θ donné, signifiant que l'hypothèse de liaison est 1000 fois plus probable que l'hypothèse d'indépendance. On exclut la liaison si Z est inférieur à -2 signifiant que l'hypothèse de liaison est 100 fois moins probable que l'hypothèse d'indépendance. La fraction est corrélée à la distance génétique entre le marqueur et le gène. La formule de Haldane permet de convertir la fraction de recombinaison θ en distance génétique exprimée en cM. Elle n'est pas égale à la distance génétique exprimée en bases ou kb mais la distance génétique sera d'autant plus grande que les loci seront éloignés l'un de l'autre. Les données (nombre et fréquence des allèles) des microsatellite sont rentrées dans un logiciel dbase III afin d'utiliser le programme M-Link (analyse en bi-point) de la version 5.41 du logiciel LINKAGE. L'analyse en liaison bipoint permet d'évaluer l'écart de la liaison génétique et de la valeur de la fraction de recombinaison qui estime la distance entre le marqueur et le gène. En utilisant la méthode de cartographie par homozygotie, 2 familles consanguines avec un malade par famille si les parents sont cousins germains peuvent suffire pour obtenir un Lod-score supérieur à 3. Nous avons pu utiliser cette méthode dans cette étude.

E/ Séquençage des gènes candidats

Il s'agit par cette technique de synthétiser, à partir du produit de PCR du fragment étudié, le brin à séquencer à partir de son amorce spécifique. Elle dérive de la technique décrite par Sanger en 1981.

Le produit d'amplification est purifié grâce à une enzyme digérant les dNTP, les amorces et autres réactifs (EXOSAP IT). 2 μ l sont additionnés à 6 μ l de produit d'amplification et placées 15 minutes à 37 °C puis 15 minutes à 80 °C. A 4 μ l de ce produit est ajouté 2 μ l d'amorces sens ou anti sens (2 μ M), 2 μ l de BIG DYE (Kit de séquençage ABI PRISM Big Dye Terminator V2) et 2 μ l d'eau. Le BIG DYE est un mix comprenant la Taq, le tampon, le MgCl₂, les dNTP et les ddNTP marqués par des fluorophores (T:rouge, A:vert, C:bleu, G:noir).

La réaction de séquence s'effectue dans un thermocycler Perkin Elmer 2400 : dénaturation 3 minutes à 96°C, suivie de 30 cycles d'amplification (20 secondes de dénaturation à 96°C, 20 secondes à la température d'hybridation de la PCR, 1 minute d'élongation à 60°C). Les réactions de séquence ainsi obtenues sont purifiées sur colonne de sephadex selon le protocole fourni (SIGMA), puis déposées dans un séquenceur automatique (ABI PRISM 3100).

F/ Etude des régions chromosomiques et des gènes par les banques de données.

Les sites utilisés en ligne pour vérifier l'ordre des marqueurs et leurs caractéristiques, la présence et l'organisation des gènes sont indiqués ici :

<http://www.ensembl.org/>

<http://www.infobiogen.fr/services/deambulium/fr/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

<http://www.genome.ucsc.edu/>

III. RÉSULTATS

1- GÉNOTYPAGE

L'analyse des marqueurs microsatellites répartis sur tout le génome a permis de mettre en évidence différentes régions d'homozygotie communes aux familles 1 et 2. L'étude plus détaillée de ces différentes régions, à l'aide de microsatellites proches, nous a permis d'identifier une région d'homozygotie commune à ces deux familles en 7q33-34. La taille de la région d'homozygotie est de 8.7 Mb pour la famille 1, et de 3.4 Mb pour la famille 2 (figure 4). La taille de la région d'homozygotie commune aux deux familles est de 3.4 Mb, comprise entre AC091742 et D7S2560 (figure 4).

Pour les familles 3 et 4, cette région a été exclue : aucune région d'homozygotie n'été mise en évidence pour l'enfant atteint de la famille 3 et, celui de la famille 4 est génoidentique aux enfants sains pour les marqueurs de cette région (figure 3).

Le Lod score a été calculé à partir des haplotypes des familles 1 et 2. Le Lod score maximal en analyse bipoint est obtenu avec le marqueur D7S2513: $Z_{max}=4.21$ pour $\theta = 0$ (tableau 4).

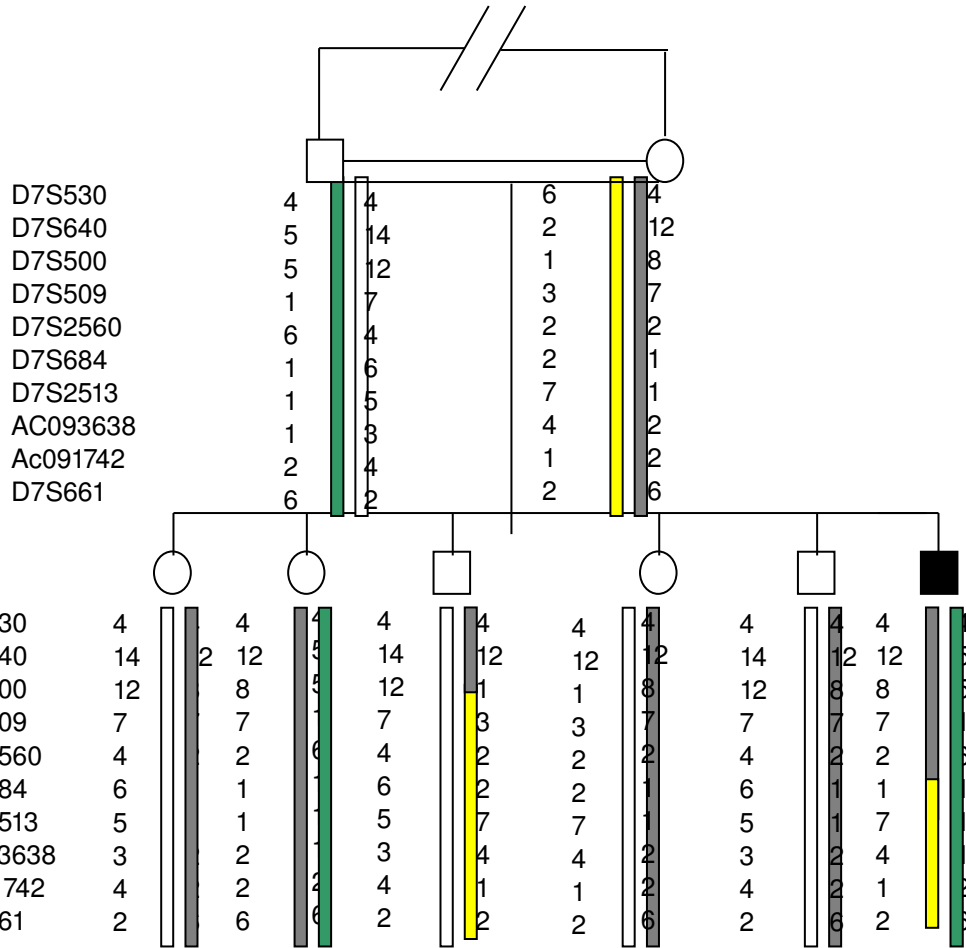
Par la suite, une deuxième région d'homozygotie située sur le chromosome 19 en 19q13 a été identifiée pour la famille 3. Cette région de 6.94 Mb est bornée du côté centromérique par le marqueur D19S223 et du côté télomérique par un marqueur microsatellite intragénique à CRX (figure 5). Les marqueurs de cette région ont alors été testés pour la famille 4. Nous avons pu déterminer une région d'homozygotie de 4.3 Mb, comprise entre les marqueurs D19S417 et D19S420, pour l'enfant atteint, ainsi que pour une sœur dont le statut est inconnu (figure 5).

2-RECHERCHE D'UN DÉSÉQUILIBRE DE LIAISON

Les familles 1 et 2 liées au chromosome 7, originaires d'Afrique du Nord, partagent pour le microsatellite D7S2513 le même allèle 6 dont la fréquence est faible dans la population générale (3.6%). Nous avons donc recherché un déséquilibre de liaison dans l'hypothèse d'un effet fondateur. L'analyse détaillée des marqueurs de la région (DL1, DL2, DL3, DL7) nous a permis d'identifier un haplotype commun de 0.8Mb situé entre le gène BRAF et AC0933638 (figure 6).

Figure 3: Haplotypes des familles 3 et 4 en 7q33-34

Famille 3



Famille 4

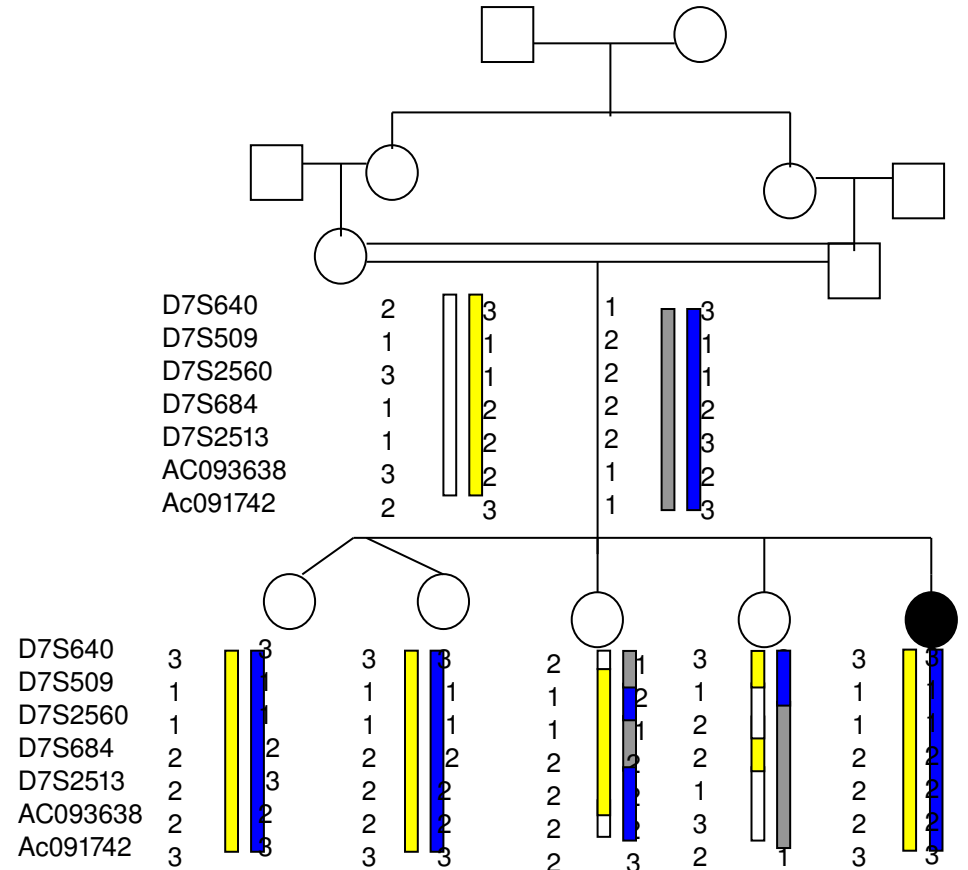


Figure 4: Région commune d'homozygotie en 7q33-34

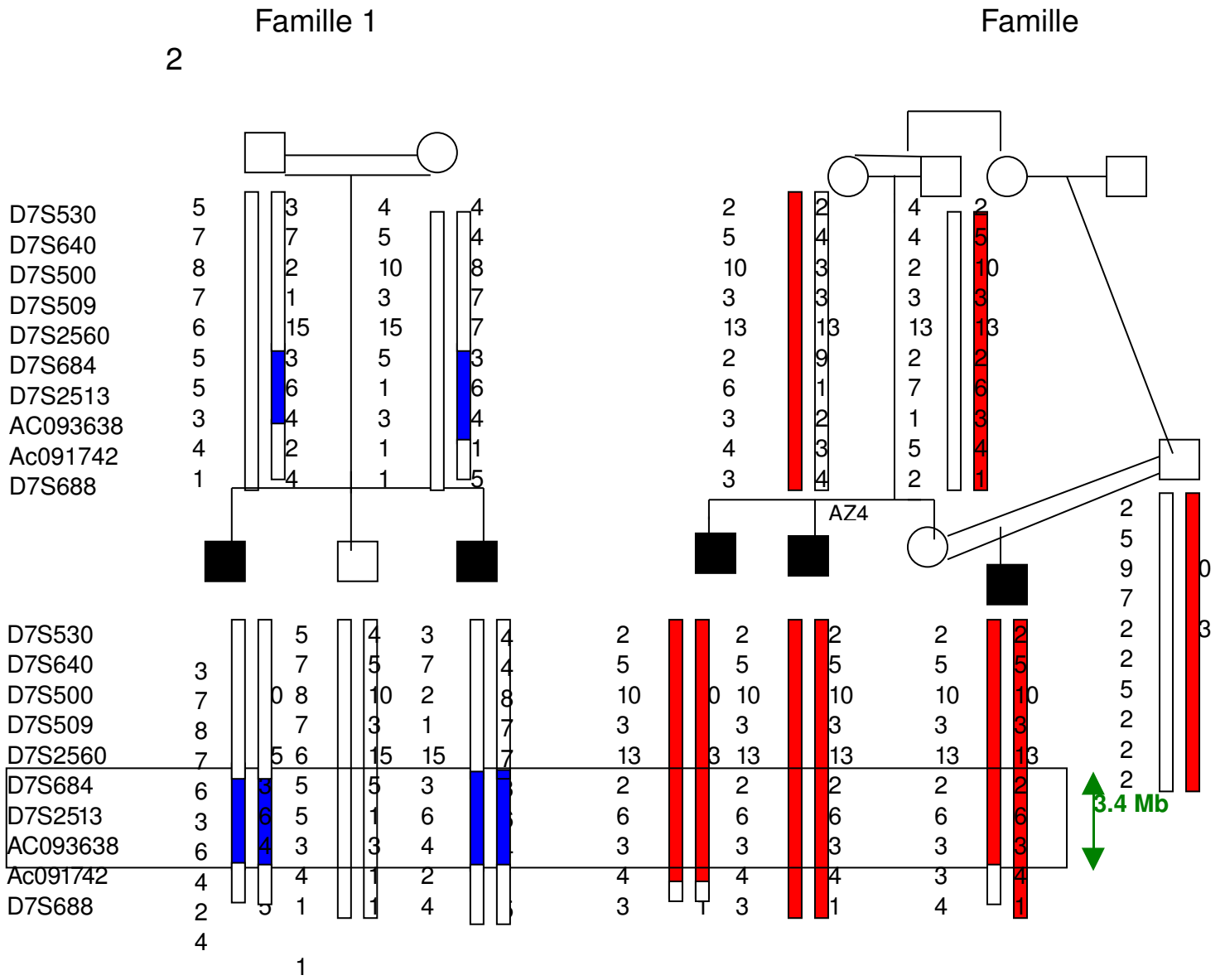
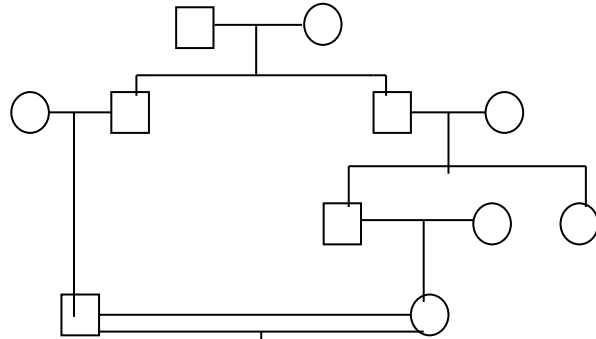


Figure 5 :Haplotypes des familles 3 et 4 en 19q13.

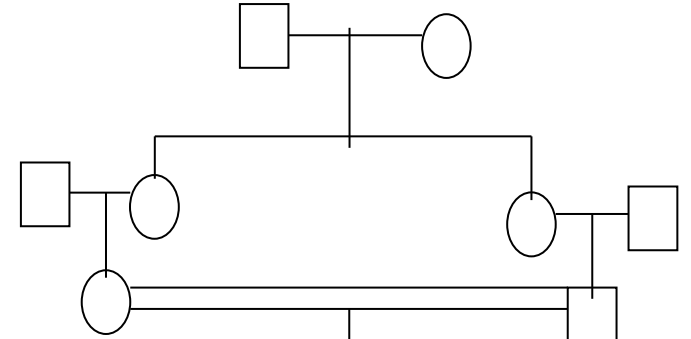
Famille 3



D19S223	3	2	1
D19S197	2	1	1
D19S423	2	1	3
D19S420	2	3	1
D19S913	1	3	3
D19S412	2	3	3
CRX	1	2	1

D19S223	2	3	3	3	2	3
D19S197	2	1	2	1	2	1
D19S423	2	1	2	1	3	3
D19S420	2	3	3	3	3	3
D19S913	1	3	12	3	1	3
D19S412	2	3	1	3	2	3
CRX	1	1	1	2	1	2

Famille 4



D19S417	2	1	1	1	2	3
D19S223	1	2	1	2	2	1
D19S197	2	1	1	2	2	3
D19S198	1	2	1	1	2	3
D19S423	2	2	2	2	3	3
D19S420	2	2	2	2	3	3

D19S417	1	2	2	2	2	2
D19S223	1	1	1	1	1	1
D19S197	1	2	2	2	2	2
D19S198	2	1	1	1	1	1
D19S423	1	2	2	2	2	2
D19S420	2	1	1	1	2	2

6.9Mb

Tableau 4: Méthode de Lod-Scores: total des LOD-SCORES pour les quatre marqueurs de la région d'intérêt

Marqueurs	Distance génétique (cM)	Fraction de recombinaison					Zmax
		0.0	0.05	0.1	0.20	0.30	
D7S2560	-	-3.57	-0.88	-0.26	0.13	0.12	0.13
D7S684	0.035	2.24	1.93	1.62	1.03	0.51	2.24
D7S2513	0.28	4.21	3.7	3.2	2.27	1.41	4.21
D7S688	0.71	-∞	-0.81	0.97	0.76	0.44	0.97

Figure 7: Région commune d'homozygotie initiale localisée en 7q33-34

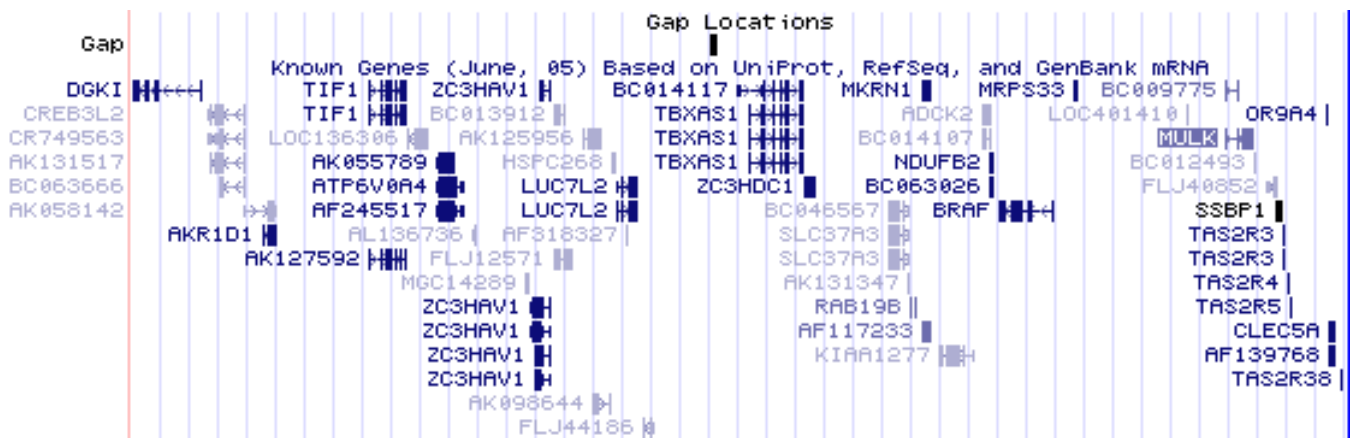
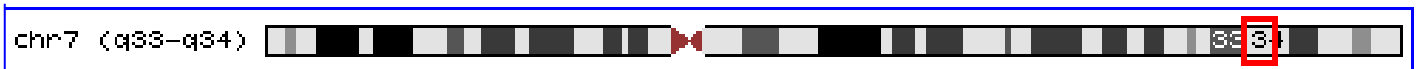
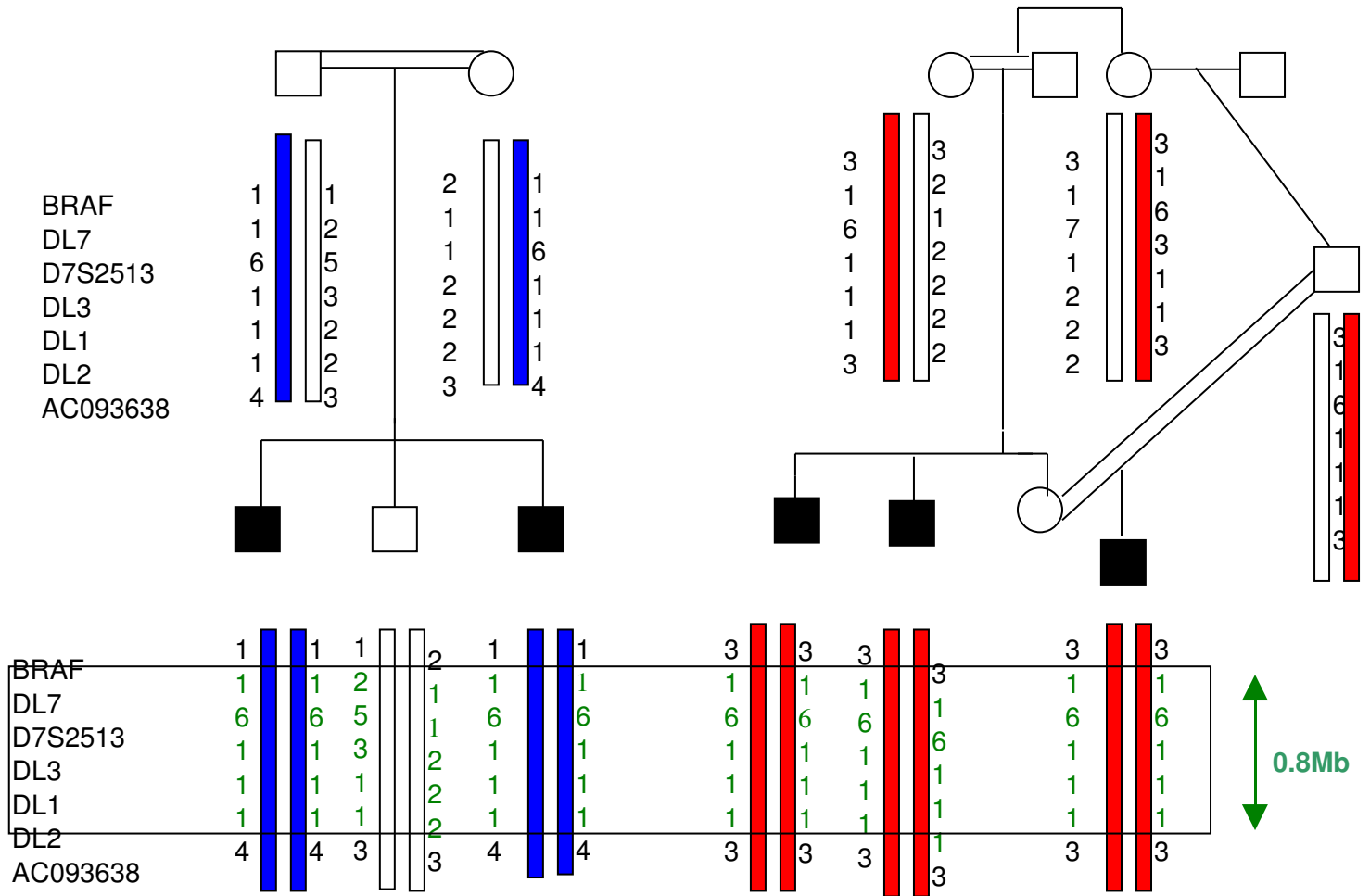


Figure 6: Déséquilibre de liaison en 7q34



3. GÈNES CANDIDATS DANS LA RÉGION 7Q33-34

La région située en 7q33-34 comporte 25 gènes et 18 prédictions de gènes. Parmi eux, nous nous sommes intéressés aux gènes candidats par leur fonction car jouant un rôle dans la différenciation des ostéoclastes et/ou ostéoblastes ou dans le fonctionnement des ostéoclastes. Si la fonction du gène est inconnue, nous avons recherché une expression dans l'os (ostéoblastes, ostéoclastes), soit par RT-PCR, soit à partir de l'analyse de banques de données (unigen). Ainsi, 11 gènes ont été considérés comme candidats :

-ATPase, H⁺ TRANSPORTING, LYSOSOMAL, V0 SUBUNIT A, ISOFORM 4;ATP6V0A4 (NM 130841)

ATP6V0A4 est une pompe à protons, particulièrement exprimée au niveau des cellules corticales rénales où elle participe à l'acidification des urines [2]. La protéine ATP6V0A4 partage 47% d'identité avec une autre pompe à protons OC116 responsable d'ostéopétrose maligne (MOC généralisée avec pancytopenie). Jusqu'ici, aucune expression de ce gène n'avait été retrouvée dans l'os [3]. Nous avons tout d'abord vérifié son expression dans l'os, et en particulier au niveau des ostéoclastes, par RT-PCR (figure 9).

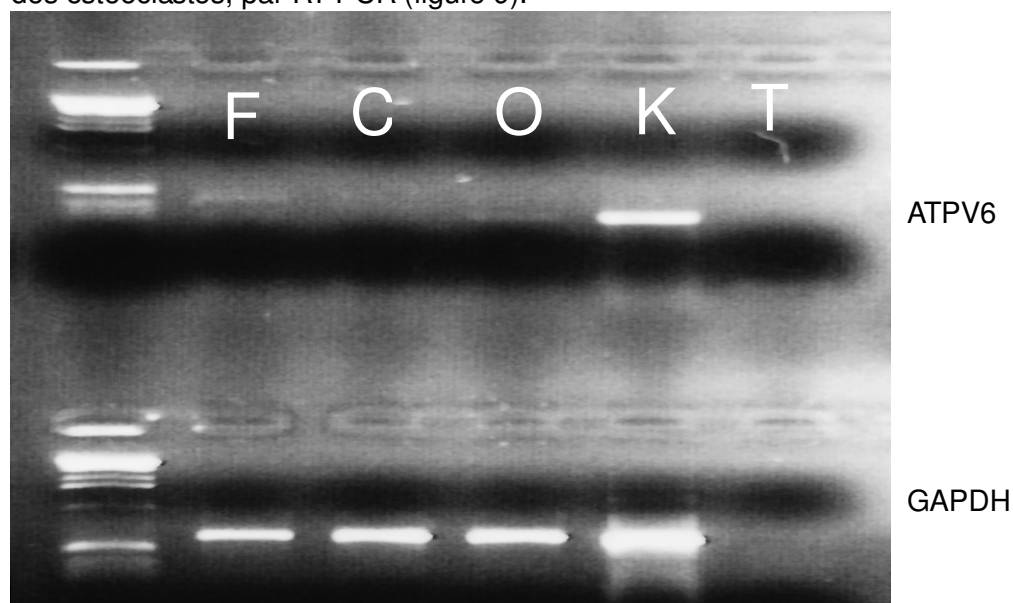


Figure 9: Profil d'expression d'ATPV6 par RT-PCR F :Fibroblastes,

C :Chondrocytes, O :Ostéoclaste, K :rein, T :témoin négatif.

Ce gène étant exprimé par les ostéoclastes, il est apparu comme étant un excellent candidat. Le gène ATP6V0A4 est constitué de 22 exons et couvre approximativement une région de 92 kb.

- HOMEODOMAIN-INTERACTING PROTEIN KINASE 2;HIPK2 (AF 208291)

HIPK2 est une sérine/thréonine kinase nucléaire qui interagit avec l'homéodomaine de facteurs de transcriptions. Hofmann et al. [4] ont montré que HIPK2 intervient dans la voie du TGF β par l'intermédiaire de c-Jun: une surexpression d'HPIK2 active la voie c-Jun alors qu'un KO par RNAi inhibe la c-Jun NH2-terminal kinase (JNK). Le gène

HIPK2 est constitué de 15 exons et couvre approximativement une région de 59 kb. Son expression n'ayant pas été étudiée dans l'os [5], nous avons montré son expression dans deux lignées d'ostéoclastes par RT-PCR (figure 10).

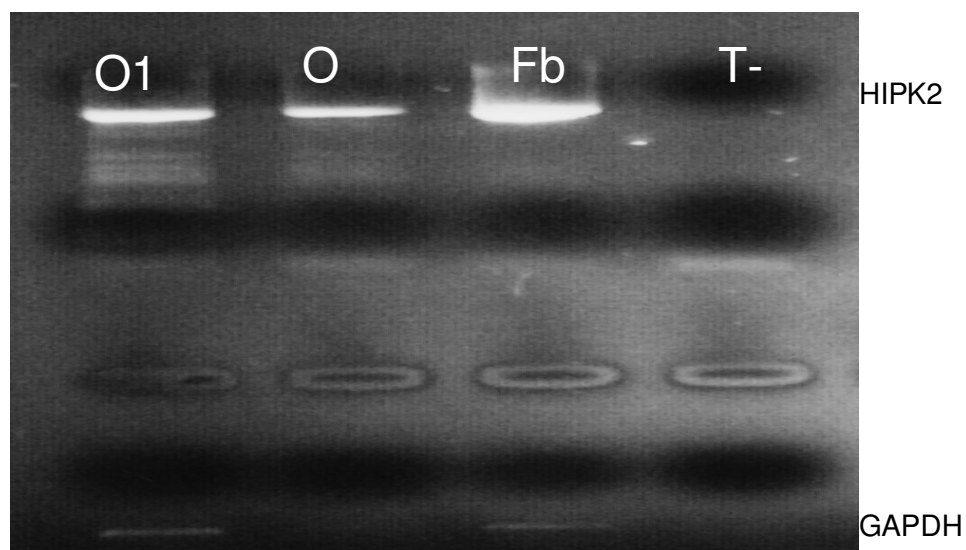


Figure 10: Profil d'expression d'HIPK2 par RTPCR. O 1 et O2: Ostéoclaste, Fb :fibroblastes, T: témoin négatif

- MYELOID DAP12-ASSOCIATING LECTIN;MLD1/CLECSF5 (AF139768)

La protéine Clecsf5 est une protéine constituée d'un domaine transmembranaire capable de se lier avec DAP12. Des souris déficientes pour DAP12 présentent une ostéopétrose sévère secondaire à un défaut de différenciation des ostéoclastes [6]. L'association de MDL-1 avec DAP12 en fait un bon candidat. Le gène MDL-1 est constitué de 7 exons et couvre approximativement une région de 20 kb.

-PLEIOTROPHIN; PTN OSF-1/PTN (D90226)

Ce gène code pour une protéine de 136 acides aminés initialement décrit comme heparine growth factor [7]. Dans l'os, PTN est synthétisée par les ostéoblastes à un degré précoce de différenciation [8]. Des faibles concentrations de PTN in vitro sont capables de stimuler la différenciation ostéoblastique [8]. Il existe également un modèle animal de souris transgéniques surexprimant OSF-1. Ces souris ont un accroissement de masse osseuse (environ 10%) secondaire à une augmentation de l'activité ostéoblastique [9,10]. Le gène PTN est constitué de 5 exons et couvre approximativement une région de 116 kb.

-V-RAF MURINE SARCOMA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG B1; BRAF (NM 002880)

B-raf est une sérine thréonine kinase qui intervient au niveau de la cascade des MAP kinases (Raf/MERK/ERK) en assurant la transduction du signal mitotique de la membrane cellulaire au noyau [11]. Le rôle de ERK dans la survie des ostéoclastes étant connu [12], B-raf pourrait également intervenir dans la différenciation ostéoclastique par l'intermédiaire de cette voie des MAP kinases. Le gène B-raf est constitué de 18 exons et couvre approximativement une région de 190 kb.

-MAKORIN 1; MKRN1 (NM 013446)

Le gène de la Makorin ring finger protein-1 (MKRN1) est un gène exprimé de façon ubiquitaire, appartenant à une nouvelle classe de protéines en doigt de zinc [13]. Les souris avec une mutation dans un pseudogène régulant l'activité de MKRN1 ont un phénotype comportant une augmentation de la densité osseuse [14]. Le gène MKRN1 est constitué de 8 exons et couvre approximativement une région de 28 kb.

-FLJ 10842/MuLK:Multiple substrate lipid Kinase

C'est essentiellement par sa position au sein de la région en déséquilibre de liaison que ce gène est apparu comme candidat. MULK est une lipide kinase, protéine membranaire, exprimée de façon ubiquitaire, capable de phosphoryler de nombreux substrats : diacylglycerol, ceramide, sphingosine et acyl glycérol [15].

Ce gène est constitué de 16 exons et couvre approximativement une région de 103 kb.

-RAB19B

Les protéines Rab appartiennent à la famille des GTPases. Elles sont localisées au niveau de la partie cytosolique des membranes intracellulaires, où elles agissent comme des régulateurs des différentes étapes du trafic vésiculaire intracellulaire. Au niveau des ostéoclastes, ces protéines participent à la résorption osseuse en permettant la résorption des lysosomes [16]. Le gène RAB19B est constitué de 2 exons et couvre approximativement une région de 14 kb.

-FLJ 40852

Cette prédiction de gène est située au niveau de la région en déséquilibre de liaison. Elle partage 100% d'homologie avec le facteur de transcription ATF4 qui intervient dans la différenciation des ostéoblastes [17,18]. La souris KO pour ATF4 a une anémie sévère secondaire à une anomalie de la différenciation érythropoïétique [19]. De plus, des souris transgéniques pour FIAT, un répresseur de ATF4, ont une diminution de la densité et de la minéralisation osseuse secondaire à une diminution de l'activité ostéoblastique[20]. Ce FLJ40852 est constitué de 5 exons et couvre approximativement une région de 4 kb.

4. GÈNES CANDIDATS DANS LA RÉGION 19Q13

- TRANSFORMING GROWTH FACTOR, BETA-1; TGFB1 (BT 007245)

TGFβ1 est une protéine contrôlant la prolifération, la différenciation, et d'autres fonctions dans de nombreux types cellulaires [21]. Des mutations de TGFβ1 ont été identifiées dans le syndrome de Camurati-Engelmann (CED)[22], principal diagnostic différentiel de la dysplasie diaphysaire de Ghosal. Il s'en distingue par le mode de transmission autosomique dominant et l'absence d'atteinte hématologique. Nous avons fait l'hypothèse que des mutations de ce gène, pourraient également être responsable du syndrome de Ghosal. Le gène TGFβ1 est constitué de 7 exons et couvre approximativement une région de 23 kb.

-ETS2 REPRESSOR FACTOR ;ERF (NM 006494)

ERF appartient à la famille des gènes ETS, déjà impliquée dans des leucémies et dans l'érythropoïèse normale [23]. Cette famille de gènes intervient également dans le développement osseux: ERF réprime la transcription d'ETS [24] et est régulé par MAPK, effecteur du récepteur tyrosine kinase de la voie Ras/Erk.

Le gène ERF est constitué de 4 exons et couvre approximativement une région de 8 kb.

Le séquençage direct de ces différents gènes localisés en 7q33-34 et 19q13 a été effectué sur ADN génomique en choisissant des primers permettant l'amplification des jonctions intron-exon chez un patient par famille associé à l'un de ses parents (soit 4 échantillons au total). Aucune mutation dans ces gènes (ATP6V0A4, HIPK2, MLD1, PTN, BRAF, MKRN1, MuLK, RAB19B, FLJ40852, TGFB1, ERF) n'a été identifiée.

Le séquençage du FLJ40852 est en cours.

IV. DISCUSSION

Dans ce travail, nous présentons tout d'abord la localisation d'un gène responsable du syndrome de Ghosal. L'utilisation de la méthode de cartographie par homozygotie nous a permis, à partir de 4 familles consanguines, d'identifier une région commune aux familles 1 et 2 en 7q33-34, ainsi qu'une autre région sur le chromosome 19 en 19q13 pour une troisième famille.

La présentation clinique de tous ces patients est homogène et analogue au cas décrits dans la littérature, puisque tous les patients ont les signes principaux de ce syndrome, la dysplasie diaphysaire et l'anémie. Cette homogénéité clinique contraste avec une hétérogénéité génétique avec au moins au moins 2 loci différents identifiés, un sur le chromosome 7 en 7q33-34 et un sur le chromosome 19 en 19q13.

L'analyse des marqueurs polymorphes situés dans la région en 7q33 et la présence d'éléments de recombinaison distincts dans les familles nous a permis de réduire cette région commune d'homozygotie à 3.4Mb définie en proximal par le marqueur D7S2560 et en distal par AC 091742-GT. Le Lod score maximal est obtenu pour le marqueur D7S2513 ($Z=4.21$ pour $\theta=0$).

L'identification d'une région en déséquilibre de liaison pour les familles 1 et 2, toutes deux originaires d'Afrique du Nord, nous a fait considérer avec une plus particulière attention les gènes situés dans cette région de 0.8Mb. Cette région contient 5 gènes connus et 2 prédits.

Pour la région située en 19q13, nous ne pouvons affirmer avec certitude que la famille 4 soit liée à cette région puisqu'un enfant dont le statut est indéterminé est génodentique à l'enfant atteint. Les données cliniques et radiologiques dans cette famille seront complétées.

La deuxième partie de ce travail a consisté en l'étude moléculaire des gènes présents dans la région d'intérêt.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés aux gènes candidats dont le profil d'expression et la fonction étaient compatibles avec l'association caractéristique de ce syndrome : l'ostéosclérose et l'atteinte hématologique. Nous avons considéré trois approches physiopathologiques différentes :

1) Une première hypothèse est un défaut de l'un des constituants de la matrice extracellulaire. Les protéines (collagène, actine, intégrine...), participant à la composition et la structure de la matrice extracellulaire osseuse interviennent dans la différenciation ostéoclastique [25,26]. Un défaut d'un de ces constituants pourrait expliquer la diminution du nombre d'ostéoclastes observée sur certaines biopsies ostéomédullaires de patients atteints du syndrome de Ghosal. Aucun gène connu situé dans la région en 7q33-34 ne codant pour une protéine de la matrice extracellulaire, nous n'avons pas séquencé de gènes candidats correspondant à cette hypothèse.

2) L'excès de densité osseuse peut être en rapport avec un défaut de résorption osseuse en rapport avec :

- une altération d'une protéine de la bordure en brosse des ostéoclastes : c'est dans cette hypothèse que nous avons exclu, après avoir vérifié son expression dans l'os, la pompe à protons ATP6V0A4 qui appartient à une classe de protéines ayant un rôle majeur dans la résorption osseuse .

- un défaut d'endo et/ou exocytose vésiculaire : nous avons identifié deux GTPases pouvant correspondre à cette hypothèse: Rab19 situé en 7q33 et RABAC1 en 19q13. Les GTPases sont impliquées dans de multiples voies de signalisation intracellulaire, notamment le trafic vésiculaire et l'organisation du cytosquelette des ostéoclastes [16,27,28]. Si Rab19 et RABAC1 n'ont pas encore été étudiées au niveau des ostéoclastes, leur appartenance à cette famille de GTPases en fait de bons candidats. Le gène RAB19B a été exclu.

- un défaut de différenciation ostéoclastique. Hématies et ostéoclastes dérivent de précurseurs myélomonocytaires communs [29]. Un défaut de différenciation de ces précurseurs expliquerait donc les deux versants, osseux et hématopoïétique, de cette pathologie. Trois gènes susceptibles d'intervenir dans la différenciation ostéoclastique HIPK2, BRAF et MKRN1 ont été séquencés et exclus.

3) Une dernière possibilité serait que cette pathologie soit secondaire à une altération de l'activité ou de la différenciation ostéoblastique, responsable d'un excès de formation osseuse. Les ostéoblastes dérivent de cellules souches mésenchymateuses qui entretiennent des rapports étroits avec les cellules souches hématopoïétiques. Ces interactions, médiées par la synthèse de cytokines (G-CSF, M-CSF, IL1, IL6), participent à l'érythropoïèse [30]. Un défaut de différenciation de ces cellules pourraient donc être responsable d'une anomalie du modelage osseux ainsi que d'une anémie. C'est dans cette hypothèse que le gène PTN a été séquencé et exclu.

Dans un deuxième temps, nous avons considéré les gènes candidats présents dans la région de 0.8Mb en déséquilibre de liaison. Cette région comporte 3 récepteurs du goût et 2 protéines mitochondriales qui n'ont pas été considérées comme candidats. La première protéine prédite, MULK, est une lipide kinase. Ce gène a été séquencé et exclu.

La deuxième protéine prédite correspond au FLJ 40852 dont le séquençage est en cours.

V. PERSPECTIVES

A court terme, le séquençage des gènes candidats situés en 19q13 va se poursuivre en espérant que le recrutement de nouvelles familles permettra de définir une région d'intérêt de taille inférieure.

Il existe un petit gap de 0.16 kb en 7q33. L'interrogation des bases de données est effectuée régulièrement afin de mettre en évidence de nouveaux gènes à séquencer.

A plus long terme, nous chercherons tout d'abord à déterminer la fonction du gène identifié. Dans l'hypothèse où ce gène jouerait un rôle dans la différenciation des cellules souches mésenchymateuses ou hématopoïétiques, l'obtention de lignées cellulaires ostéoclastiques ou ostéoblastiques à partir de cellules souches des patients nous permettrait de déterminer le profil d'expression de ce gène ainsi que les voies de signalisation dans lesquelles il est impliqué. Ces lignées cellulaires permettrait également d'étudier le mécanisme d'action des corticoïdes dans cette pathologie.

L'effet des corticoïdes sur le métabolisme osseux demeure imparfaitement connu, les résultats des études in vitro apparaissant en contradiction avec leur effet observé en

pratique courante [31]. L'étude de la différenciation d'ostéoblastes et d'ostéoclastes, de témoins et de patients, en présence et absence de corticoïdes permettrait d'analyser leur mécanisme d'action sur la différenciation de ces deux lignées.

Dans une perspective thérapeutique, ces lignées cellulaires nous permettraient de rechercher une molécule capable de réactiver la voie de différenciation et d'envisager une thérapie cellulaire à partir de cellule souches mésenchymateuses ou hématopoïétiques.

VI. CONCLUSION

Ce travail a permis de localiser un gène responsable du syndrome de Ghosal en 7q33-34 dans un intervalle de 3.4 Mb. L'identification d'un déséquilibre de liaison au sein de la région d'homozygotie 7q33-34 nous a permis de définir, une région de 0.8Mb commune aux familles 1 et 2.

Nous avons exclu 11 gènes candidats par leur position et leur fonction. Le séquençage des gènes candidats se poursuit.

Par ailleurs, nous avons mis en évidence une hétérogénéité génétique en identifiant une deuxième région localisée en 19q13.

L'identification des bases génétiques de la dysplasie diaphysaire de Ghosal permettra de contribuer à la compréhension de la physiopathologie des maladies ostéocondensantes en identifiant de nouvelles protéines participant à la différenciation des précurseurs communs aux cellules osseuses et aux cellules hématopoïétiques.

VII. Bibliographie

1. Ghosal SP, Mukherjee AK, Mukherjee D, Ghosh AK. Diaphyseal Dysplasia Associated with Anemia. *J Pediatr.* 1988; 113(1 Pt 1):49-57.
2. Smith AN, Skaug J, Choate KA, et al. Mutations in ATP6N1B, Encoding a New Kidney Vacuolar Proton Pump 116-kD Subunit, Cause Recessive Distal Renal Tubular Acidosis with Preserved Hearing. *Nat Genet.* 2000; 26(1):71-75.
3. Stehberger PA, Schulz N, Finberg KE, et al. Localization and Regulation of the ATP6V0A4 (a4) Vacuolar H⁺-ATPase Subunit Defective in an Inherited Form of Distal Renal Tubular Acidosis. *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14(12):3027-3038.
4. Hofmann TG, Stollberg N, Schmitz ML, Will H. HIPK2 Regulates Transforming Growth Factor-Beta-Induced c-Jun NH(2)-Terminal Kinase Activation and Apoptosis in Human Hepatoma Cells. *Cancer Res.* 2003; 63(23):8271-8277.
5. Pierantoni GM, Bulfone A, Pentimalli F, et al. The Homeodomain-Interacting Protein Kinase 2 Gene is Expressed Late in Embryogenesis and Preferentially in Retina, Muscle, and Neural Tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 290(3):942-947.
6. Koga T, Inui M, Inoue K, et al. Costimulatory Signals Mediated by the ITAM Motif Cooperate with RANKL for Bone Homeostasis. *Nature.* 2004; 428(6984):758-763.
7. Fen Z, Dhady MS, Yoshizumi M, et al. Structural Organization and Chromosomal Assignment of the Gene Encoding the Human Heparin-Binding Epidermal Growth Factor-Like Growth factor/diphtheria Toxin Receptor. *Biochemistry.* 1993; 32(31):7932-7938.
8. Tare RS, Oreffo RO, Clarke NM, Roach HI. Pleiotrophin/Osteoblast-Stimulating Factor 1: Dissecting its Diverse Functions in Bone Formation. *J Bone Miner Res.* 2002; 17(11):2009-2020.
9. Masuda H, Tsujimura A, Yoshioka M, et al. Bone Mass Loss due to Estrogen Deficiency is Compensated in Transgenic Mice Overexpressing Human Osteoblast Stimulating Factor-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 238(2):528-533.
10. Tare RS, Oreffo RO, Sato K, Rauvala H, Clarke NM, Roach HI. Effects of Targeted Overexpression of Pleiotrophin on Postnatal Bone Development. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 298(3):324-332.
11. Eychene A, Dusanter-Fourt I, Barnier JV, et al. Expression and Activation of B-Raf Kinase Isoforms in Human and Murine Leukemia Cell Lines. *Oncogene.* 1995; 10(6):1159-1165.
12. Miyazaki T, Katagiri H, Kanegae Y, et al. Reciprocal Role of ERK and NF-kappaB Pathways in Survival and Activation of Osteoclasts. *J Cell Biol.* 2000; 148(2):333-342.
13. Gray TA, Hernandez L, Carey AH, et al. The Ancient Source of a Distinct Gene Family Encoding Proteins Featuring RING and C(3)H Zinc-Finger Motifs with Abundant Expression in Developing Brain and Nervous System. *Genomics.* 2000; 66(1):76-86.
14. Hirotsune S, Yoshida N, Chen A, et al. An Expressed Pseudogene Regulates the Messenger-RNA Stability of its Homologous Coding Gene. *Nature.* 2003; 423(6935):91-96.
15. Waggoner DW, Johnson LB, Mann PC, Morris V, Guastella J, Bajjalieh SM. MulK, a Eukaryotic Multi-Substrate Lipid Kinase. *J Biol Chem.* 2004; 279(37):38228-38235.
16. Coxon FP, Rogers MJ. The Role of Prenylated Small GTP-Binding Proteins in the Regulation of Osteoclast Function. *Calcif Tissue Int.* 2003; 72(1):80-84.

17. Yang X, Karsenty G. ATF4, the Osteoblast Accumulation of which is Determined Post-Translationally, can Induce Osteoblast-Specific Gene Expression in Non-Osteoblastic Cells. *J Biol Chem.* 2004; 279(45):47109-47114.
18. Elefteriou F, Ahn JD, Takeda S, et al. Leptin Regulation of Bone Resorption by the Sympathetic Nervous System and CART. *Nature.* 2005; 434(7032):514-520.
19. Masuoka HC, Townes TM. Targeted Disruption of the Activating Transcription Factor 4 Gene Results in Severe Fetal Anemia in Mice. *Blood.* 2002; 99(3):736-745.
20. Yu VW, Ambartsoumian G, Verlinden L, et al. FIAT Represses ATF4-Mediated Transcription to Regulate Bone Mass in Transgenic Mice. *J Cell Biol.* 2005; 169(4):591-601.
21. Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, Assoian RK. Transforming Growth Factor-Beta: Biological Function and Chemical Structure. *Science.* 1986; 233(4763):532-534.
22. Janssens K, Gershoni-Baruch R, Guanabens N, et al. Mutations in the Gene Encoding the Latency-Associated Peptide of TGF-Beta 1 Cause Camurati-Engelmann Disease. *Nat Genet.* 2000; 26(3):273-275.
23. Athanasiou M, Blair DG, Mavrothalassitis G. ERF, an ETS-Related Transcriptional Repressor, can Induce Erythroid Differentiation. *Anticancer Res.* 2003; 23(3A):2143-2153.
24. Sgouras DN, Athanasiou MA, Beal GJ, Jr, Fisher RJ, Blair DG, Mavrothalassitis GJ. ERF: An ETS Domain Protein with Strong Transcriptional Repressor Activity, can Suppress Ets-Associated Tumorigenesis and is Regulated by Phosphorylation during Cell Cycle and Mitogenic Stimulation. *EMBO J.* 1995; 14(19):4781-4793.
25. Damsky CH. Extracellular Matrix-Integrin Interactions in Osteoblast Function and Tissue Remodeling. *Bone.* 1999; 25(1):95-96.
26. Nakamura I, Takahashi N, Sasaki T, Jimi E, Kurokawa T, Suda T. Chemical and Physical Properties of the Extracellular Matrix are Required for the Actin Ring Formation in Osteoclasts. *J Bone Miner Res.* 1996; 11(12):1873-1879.
27. Palokangas H, Mulari M, Vaananen HK. Endocytic Pathway from the Basal Plasma Membrane to the Ruffled Border Membrane in Bone-Resorbing Osteoclasts. *J Cell Sci.* 1997; 110 (Pt 15)(Pt 15):1767-1780.
28. Zhao H, Ettala O, Vaananen HK. Intracellular Membrane Trafficking Pathways in Bone-Resorbing Osteoclasts Revealed by Cloning and Subcellular Localization Studies of Small GTP-Binding Rab Proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 293(3):1060-1065.
29. Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic Regulation of Osteoclast Development and Function. *Nat Rev Genet.* 2003; 4(8):638-649.
30. Taichman RS, Reilly MJ, Emerson SG. The Hematopoietic Microenvironment: Osteoblasts and the Hematopoietic Microenvironment. *Hematol.* 2000; 4(5):421-426.
31. Harrison JR, Woitge HW, Kream BE. Genetic Approaches to Determine the Role of Glucocorticoid Signaling in Osteoblasts. *Endocrine.* 2002; 17(1):37-42.

VIII. Annexe : Liste des amorces

ATP6V0A4
ATP6V0A4-25' cccacagtggtggattatagg
ATP6V0A4-23' ctacagcacagaccacctcatt
ATP6V0A4-35' gtctcctaaatcagaagtg
ATP6V0A4-33' tcgattccagctcagcgctcct'
ATP6V0A4-45' tggcagctgtgtactaacaat
ATP6V0A4-53' cggaaatcgaagtggtctca
ATP6V0A4-65' ctgcaatcatgttatgtct
ATP6V0A4-63' atggcctagccatggaacaga'
ATP6V0A4-75' tctggccaggagcactctgt
ATP6V0A4-73' tgcacatgggaaacagtc'
ATP6V0A4-85' ggtgtgtcttcaogtctaca
ATP6V0A4-83' ggagaacgaagcgtctgtct
ATP6V0A4-95' atggcctgtctcactctgt
ATP6V0A4-93' tctagaagccacagctgtgtg'
ATP6V0A4-105' tctaggataggctggccatct'
ATP6V0A4-103' cagggtctgtatgaaaacagc'
ATP6V0A4-115' cagccacaggtcaagggagcc
ATP6V0A4-113' agccaacacctctgagagccc'
ATP6V0A4-125' aagttcgtcagtgaggac
ATP6V0A4-123' gattccccacagctactccc
ATP6V0A4-135' cgtggagctgtggcagggaaatc
ATP6V0A4-133' acggcaccacacatccaa
ATP6V0A4-145' gctcttctgtctggatgat
ATP6V0A4-143' tagacctaggtgtgactcc
ATP6V0A4-155' ttcgtgactgtgtgtatt
ATP6V0A4-153' tcttctctccagaggtct
ATP6V0A4-165' gtatgcatgagctggactgaa
ATP6V0A4-163' aggtgctgccatttccagccaa
HIPK2
HIPK2-A25' ggatctgtgagtttactgttacc
HIPK2-A23' ctgcccgggtgacagaagtgctgc
HIPK2-25' ggtcacctcagcaagcagca
HIPK2-35' ctgatcatactccgaagctc
HIPK2-45' gccagcagagcatttagtat
HIPK2-43' acggccctcttccaaagcg
HIPK2-55' ccagtgatgaggagcctaagt
HIPK2-53' ctattgcagaagcttctgtc
HIPK2-65' ctgagagatcaggaggaagtt
HIPK2-63' ctggccctttaaagttgcccga
HIPK2-75' catcccacgttaccctctt
HIPK2-73' tcaagtcctgaggctcacactg
HIPK2-85' cccaacatgccacctccctcat
HIPK2-83' ccagaggccgttctgtaagaag
HIPK2-95' ccagctgttccacagcgtctcagcta
HIPK2-93' gaagcacttaactcattactaggg
HIPK2-105' gtgattagcaaacatggtcattgc
HIPK2-103' tgtgtggcagtgagctgctc
BRAFF
BRAFF-15 caatcccctcaggtcggctg
BRAFF-13 aaggtgctgagggcatcaagcc
BRAFF-25 ggcagttactgtgatgtgtg
BRAFF-23 cccacctcctaaataatcaagat
BRAFF-35 gtaatgtcaggacaaggtccg
BRAFF-33 caacaactgatctgtctgaa
BRAFF-45 gtaattgtccccttacct
BRAFF-43 ccttaggttttggtaagatcc
BRAFF-55 catatctcagcatgaggt
BRAFF-53 caactgatttcaactcagg
BRAFF-65 caagagagtagatactcagct
BRAFF-63 gacatcgtacttcaatcaag
BRAFF-75 tggatatgaagcttctgggt
BRAFF-73 gcggttcaagtagcatgtcgc
BRAFF-85 cctttatatgttactctg
BRAFF-83 ggcacttattctgatctaag
BRAFF-95 cagtgattcgtactctctg
BRAFF-93 ctctgtgtctgttactgta

BRAFF-123 ccactgggaaccaggagctaat
BRAFF-135 ccgacagactacttgggtct
BRAFF-133 gaatagcagccaaaacct'
BRAFF-145 caccocccaaatgttctgt
BRAFF-143 cctgtctctctatcatg
BRAFF-155 cctctcataatgtctgtctgatag
BRAFF-153 gtaactcagcagcatctcagggc
BRAFF-165 gcaatgtcttaggaattatag
BRAFF-163 ccttccagcttaccaggag
BRAFF-175 caacttactcaagggtg
BRAFF-173 gtgctcagaatctgtctca
BRAFF-185 gggactctttaaagattataccacc
BRAFF-183 accacacaaggttcttctggt

RAB19

RAB19-15 cccagatctactgggtctga
RAB19-13 tgcccgggtgcatcacttacact
RAB19-25gcatgcatgctattgaagaacta
RAB19-23aacactacogtattctggctacct

MKRN1

MKRN1-15ccggaccggaactatgtgatcc
MKRN1-13 ctcccctccgcccgcaggtct
MKRN1-25 caaggatggttttaaccag
MKRN1-23 cctccaaccaccccctgaacaa
MKRN1-35 tgagccaccagactgcccagc
MKRN1-43 caaatggatgaactgctatcc
MKRN1-55 gttcatgcttacttatttggacc
MKRN1-53 cacacacatctccctaaag
MKRN1-65 caatgactgattccactg
MKRN1-63 ggcacaaagttaacttcttccc
MKRN1-65 gcaatgagcctgttctt
MKRN1-63 gctctgttgggtctctg
MKRN1-75 caactgtgaataaggggtg
MKRN1-73 gcaggactcaactgatacct
MKRN1-85 gacagtgccatccctatcatg
MKRN1-83 aggcactgccaaccaccacag

ERF

ERF-15 gggagaggtctgagaggcga
ERF-13 cccaagttctccgttccgt
ERF-25 acccagagccctggacttggca
ERF-23 caggcaaggggtgtgcaac
ERF-45a agacctgggtcccagctacctga
ERF-43a aagatgaagatgaagagcaggct
ERF-45b caagccctcogaggtgtctg
ERF-43b ccgttctatgtctcaggctg
ERF-45c gagcccagatgtaccaggtggt
ERF-43c tccagctgccttccagatg
ERF-45d cccccccgccaccagatca
ERF-43d ggaagagacaagagagctgcccctcac

MLD1

MLD1-25' gagaggctgggatgtctctagt
MLD1-35' ccctgtgctgatactgttctg
MLD1-33' gaaggtctctaggaattcagc
MLD1-45' cacacagcccatactctgatgt
MLD1-43' ctctaagaattcagtgatgag
MLD1-55' cactgttctgacttattgtcag
MLD1-53' gccagccactctcactcctcac
MLD1-65' ggaatcagataatcatggggc
MLD1-63' ccagggtgaaccagcaatctca
MLD1-75' aggaagaggtggtgaaaatga
MLD1-73' ggaccgctactgttagacagat

PTN

PTN-25' catcaaggttcaatgaatcttcc'
PTN-23' gcaggtaattagactagatggac'
PTN-35' ggttatctggaagttaagg
PTN-33' tgagaattatctcagatgagga
PTN-45' atatacctttattatctcaaaa

TGFB1-3f cgtgacaccatctaccactgct
TGFB1-3r caggacaacaatgggtggacc
TGFB1-6f catgtggctctatgtgtgt
TGFB1-6r caagcgcactcgtagcccc
TGFB1-7f cgaagtgagagggctggcgggta
TGFB1-7r cttaataacagccccatgggcaa

MULK

MULK-15 gcggcggaaaccaggggcggcggca
MULK-13 ggctctcggcccagcggactcca
MULK-25 gaatggaagacagagtaatagg
MULK-23 cctgaggcccttggggctgtt
MULK-35 gagaagaggtgctatatt
MULK-33 gcaagacactgtgcaagt
MULK-45 gatacctatgtgctgcaagtacat
MULK-43 tagctgctctatgtctgtgat
MULK-55 gccctgaagaagattgtaag
MULK-53 ctaagaagccaagagaagag
MULK-65 cttaaccttggctctagg
MULK-63 caacatcaactgtctctagg
MULK-75 ggagtaagttatgttctatg
MULK-73 cgtgtctatgacatgggtagc
MULK-85 ttgtcatatgagacacacc
MULK-83 ttcattcccagctctgctca
MULK-95 ggttgtgcatgagtgcatgtgg
MULK-93 cattataacctcattgcaactgct
MULK-105 gtaggccatgaacattgtctga
MULK-103 ttcccagaagatcactgtgaa
MULK-115 gctgcccataatggtatctat
MULK-113 gcatgccacattcctgtgac
MULK-125 ctcccagagtggaattgtacat
MULK-123 cacttctaaactgaccagggc
MULK-135 cagctagcagctagccgtccg
MULK-133 ttatgtggagagactatagc
MULK-145 tgaacctcaagctgaggat
MULK-143 tcttagacttctgggactctg
MULK-155 gctacattgtgcaactagctg
MULK-153 caggccgatgacgaacgaatca
MULK-165 gagacctcaactccagtaggc
MULK-163 agtccggtttaggaggccaacc

FLJ40852

CDI1-25 gctggcaggtgtgcaatttaagg
CDI1-23 caagctcattcatggaagcgc
CDI1-35 ccaagatggatgactgtatattc
CDI1-33 cctacacatgtggctgtattc
CDI1-45 cattgtgagtgtctcagattc
CDI1-43 ctggtgctaccagatggacaatc
CDI1-55 gaagcagactatcctcttact
CDI1-53 accttagtagtctatgtccacac

BRAF-105 atcccccaaccttctaccc
BRAF-103 ggctgtgacttctaagaaga
BRAF-115 caggcataaggtaatgtacttaggg
BRAF-113 gcgaacagtgaatatttccttg
BRAF-125 ggatggagtagggctatg

Etude Génétique du Syndrôme de Ghosal

La Dysplasie hémato-diaphysaire de Ghosal est une maladie ostéocondensante de transmission autosomique récessive responsable d'une condensation diaphysaire et d'une anémie arégénérative corticosensible. A ce jour, les bases moléculaires de ce syndrome demeurent inconnues.

Le but de cette étude était de localiser le gène responsable du syndrome de Ghosal en utilisant la méthode de cartographie par homozygotie.

Une étude de liaison a été réalisée à partir de L'ADN de 6 patients provenant de 4 familles consanguines.

Les résultats de cette étude montrent que le gène de la dysplasie diaphysaire de Ghosal est localisé sur le chromosome 7 en 7q33-34 avec un lodscore maximal de 4.21 pour $\theta=0$ pour le marqueur microsatellite D7S2513. L'analyse d'évènements de recombinaison a permis de définir un locus de 3.4Mb contenant 25 gènes connus et 18 prédictions de gènes. Une région en déséquilibre de liaison a été identifiée définissant ainsi une région de 0.8Mb contenant 5 gènes connus et 2 prédictions de gènes.

L'exclusion du locus 7q33 dans une famille a permis l'identification d'une autre localisation en 19q13 et la mise en évidence d'une hétérogénéité génétique. Les gènes candidats dans les deux régions, 7q33 et 19q13 ont été séquencés selon leur position et leur fonction. Au total, 12 gènes ont été exclus par séquençage direct. Le séquençage se poursuit pour les autres gènes de la région.

Mots clés: Dysplasie hémato-diaphysaire, anémie, étude de liaison par homozygotie.