

UNIVERSITE DE NANTES
U.F.R. DE MEDECINE ET DES TECHNIQUES MEDICALES

**ASPECTS MOLECULAIRES DES MALADIES RARES
DU METABOLISME HEPATIQUE :
A PROPOS DE LA MALADIE DE CRIGLER-NAJJAR**

THESE DE DOCTORAT
Ecole doctorale CHIMIE BIOLOGIE
Discipline BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

*présentée
et soutenue publiquement par*

François Mickael PETIT

Le 9 juin 2008, devant le jury ci-dessous

Président

Rapporteurs

Monsieur le professeur Marc DELPECH Université Paris V
Madame le docteur Michelle HADCHOUEL Université Paris XI

Examineurs

Monsieur le professeur Gérard TACHDJIAN Université Paris XI
Monsieur le docteur Nicolas FERRY Université de Nantes
Monsieur le professeur Philippe LABRUNE Université Paris XI

Directeurs de thèse : Nicolas FERRY / Philippe LABRUNE

Ah ! mon cher, physiquement parlant, l'inconnue est la personne la plus adorablement femme que j'aie jamais rencontrée. Elle appartient à cette variété féminine que les Romains nommaient fulva, flava, la femme de feu. Et d'abord, ce qui m'a le plus frappé, ce dont je suis encore épris, ce sont deux yeux jaunes comme ceux des tigres ; un jaune d'or qui brille, de l'or vivant, de l'or qui pense, de l'or qui aime et veut absolument venir dans votre gousset !

La fille aux yeux d'or, Honoré de Balzac, Paris 1834-1835.

I. LE METABOLISME DE LA BILIRUBINE	10
I.1. BIOSYNTHESE DU NOYAU DE L'HEME	10
I.2. DE L'HEME A LA BILIRUBINE	11
I.3. LE TRANSPORT DE LA BILIRUBINE NON CONJUGUEE JUSQU' AU FOIE	13
I.4. LA CONJUGAISON DE LA BILIRUBINE AU NIVEAU HEPATIQUE	14
I.5. DEVENIR DE LA BILIRUBINE CONJUGUEE ET CYCLE ENTERO-HEPATIQUE	16
II. PHYSIOPATHOLOGIE DES ANOMALIES DE LA CONJUGAISON DE LA BILIRUBINE	17
II.1. LES ANOMALIES DE CONJUGAISON DE LA BILIRUBINE	17
II.1.1. Les déficits congénitaux de conjugaison de la bilirubine	17
II.2.3. Les déficits acquis de conjugaison de la bilirubine	24
II.2. LES AUGMENTATIONS DE PRODUCTION DE LA BILIRUBINE NON CONJUGUEE	24
II.3. LES ANOMALIES DES PROTEINES ASSOCIEES AU METABOLISME DE LA BILIRUBINE	24
II.3.1. L'hème-oxygénase	24
II.3.2. La biliverdine réductase	25
II.3.3. Le canal OATP2	25
II.3.4. La ligandine	26
III. LES PATHOLOGIES DE LA CONJUGAISON DE LA BILIRUBINE : LE SYNDROME DE GILBERT ET LA MALADIE DE CRIGLER-NAJJAR	26
III.1. LE SYNDROME DE GILBERT OU CHOLEMIE FAMILIALE	27
III.1.1. Clinique et diagnostic	27
III.1.2. Génétique	27
III.2. LA MALADIE DE CRIGLER-NAJJAR OU ICTERE FAMILIAL CONGENITAL	29
III.2.1. Historique	29
III.2.2. Aspects cliniques	30
III.2.3. Prise en charge et traitement	32
III.2.4. Vivre avec la maladie de Crigler-Najjar	33
III.4. CONSEQUENCES ET RISQUES LIES AUX HYPERBILIRUBINEMIES	34
III.4.1. Toxicité cellulaire de la bilirubine	34
III.4.2. Conséquences dermatologiques et digestives	35
III.4.3. Conséquences neurologiques	35
IV. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES ANOMALIES DE LA CONJUGAISON DE LA BILIRUBINE	37
IV.1. DOSAGE BIOLOGIQUE DES DIFFERENTES FORMES DE BILIRUBINE	37
IV.2. DOSAGE BIOLOGIQUE DE L'ALBUMINE SERIQUE	39
IV.3. DOSAGE BIOLOGIQUE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE UGT1A1	39
V. LES MODES DE TRANSMISSION DES MALADIES GENETIQUES	40
V.1. LES LOIS DE MENDEL	40
V.2. LES MALADIES MENDELIENNES	41
V.3. LES DIFFICULTES LORS DU CONSEIL GENETIQUE	43
V.4. LES MALADIES NON MENDELIENNES	43

I. LES REGLES DE NOMENCLATURE DES ANOMALIES GENETIQUES	48
II. NOTIONS DE GENETIQUE DES POPULATIONS	50
II.1. LA LOI DE HARDY ET WEINBERG	50
II.2. LA THEORIE DE L'EFFET FONDATEUR	51
III. LE DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DE LA MALADIE DE CRIGLER-NAJJAR	52
III.1. LA VALIDITE DE LA DEMANDE DE DIAGNOSTIC MOLECULAIRE	52
III.2. MATERIELS ET METHODES	54
RESULTATS	57
<hr/>	
I. LES ANOMALIES DE SEQUENCE RESPONSABLES DE LA MALADIE DE CRIGLER-NAJJAR NOUVELLEMENT DECRITES	57
I.1. ANOMALIES DE SEQUENCE IDENTIFIEES CHEZ DES PATIENTS AYANT UNE MALADIE DE CRIGLER-NAJJAR DE TYPE I (ARTICLE 1)	59
I.2. ANOMALIES DE SEQUENCE IDENTIFIEES CHEZ DES PATIENTS AYANT UNE MALADIE DE CRIGLER-NAJJAR DE TYPE II (ARTICLE 2)	60
I.3. DIFFICULTES LIEES AU DIAGNOSTIC DES MALADIES RARES (ARTICLE 3)	61
I.4. RELATIONS GENOTYPE-PHENOTYPE	62
I.4.1. Données obtenues par l'étude des patients	62
I.4.2. Répartition des anomalies de séquence dans le gène UGT1A1	63
III. TRANSMISSION ET FORMES PARTICULIERES DE LA MALADIE DE CRIGLER-NAJJAR	69
III.1. ISODISOMIE PATERNELLE DU CHROMOSOME 2 A L'ORIGINE D'UNE MALADIE DE CRIGLER-NAJJAR DE TYPE I (ARTICLE 4)	69
III.2. LARGE DELETION DANS LE GENE UGT1A1 COMPRENANT LE PROMOTEUR ET L'EXON 1 A L'ORIGINE D'UNE MALADIE DE CRIGLER-NAJJAR DE TYPE I (ARTICLE 5)	71
IV. LES EFFETS FONDATEURS DECRITS DANS LA MALADIE DE CRIGLER-NAJJAR	72
IV.1. LES EFFETS FONDATEURS RAPPORTES	72
IV.2. LA MALADIE DE CRIGLER-NAJJAR EN TUNISIE	72
IV.1. L'HISTOIRE DE LA MALADIE DE CRIGLER-NAJJAR EN TUNISIE SUIVANT L'HISTOIRE DU PAYS (ARTICLE 6)	73
DISCUSSION	76
<hr/>	
I. MALADIE DE CRIGLER-NAJJAR ET ANOMALIES MOLECULAIRES	76
II. DIAGNOSTICS PARTICULIERS DE MALADIE DE CRIGLER-NAJJAR	80
III. EVOLUTION DE LA MALADIE DE CRIGLER-NAJJAR AU COURS DES SIECLES	80
CONCLUSION	83
<hr/>	
BIBLIOGRAPHIE	86
<hr/>	
INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX	98
<hr/>	

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La toxicité de la bilirubine reste encore aujourd'hui un problème majeur en néonatalogie et en pédiatrie malgré les progrès importants réalisés ces dernières années dans la prise en charge de l'ictère néonatal. Parmi les nombreuses causes d'hyperbilirubinémie, la gravissime maladie de Crigler-Najjar reste peu fréquente. Cette maladie génétique du métabolisme de la bilirubine à transmission autosomique récessive est à l'origine d'ictères nucléaires intenses apparaissant dès la période néonatale et dont le pronostic reste encore aujourd'hui très réservé.

Après une présentation du métabolisme de la bilirubine dans l'espèce humaine, nous présenterons les deux pathologies de la conjugaison de la bilirubine : la maladie de Crigler-Najjar et le syndrome de Gilbert.

I. Le métabolisme de la bilirubine

La bilirubine fait partie des produits de dégradation que l'organisme ne sait pas métaboliser complètement et qui doivent donc être éliminés pour éviter toute accumulation toxique.

I.1. Biosynthèse du noyau de l'hème

La synthèse du noyau de l'hème est réalisée à partir de composés chimiques simples : la glycine $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$ et l'acide acétique $\text{CH}_3\text{-COOH}$ par l'intermédiaire du succinyl-coenzyme A.

L'acide δ -aminolévulinique se forme par condensation de la glycine avec le succinyl-coenzyme A grâce à l'enzyme clé de la régulation de la biosynthèse des porphyrines, la δ -aminolévulinate-synthétase (enzyme mitochondriale). La déshydratation de deux molécules d'acide δ -aminolévulinique en présence de la δ -aminolévulinate-déshydratase conduit à la formation du porphobilinogène

(figure 1). La combinaison successive de quatre groupements porphobilinogène puis une étape de cyclisation conduisent à l'uroporphyrinogène III. Plusieurs étapes de décarboxylation et de déshydrogénation permettent d'obtenir la protoporphyrine IX. La dernière étape est l'insertion, dans la protoporphyrine IX, d'un atome de fer ferreux grâce à la ferro-chélastase donnant ainsi le protohème ou hème (figure 1).

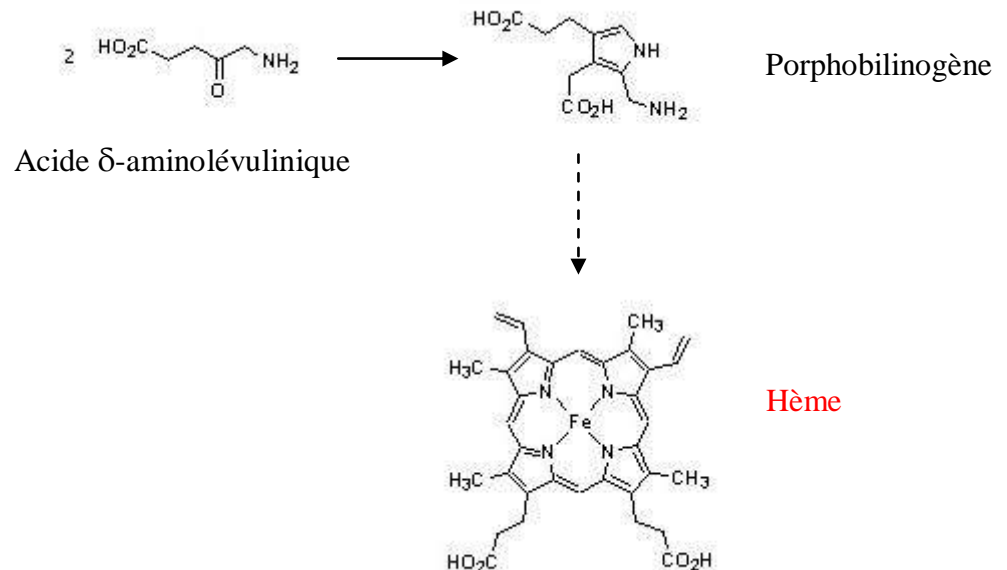


Figure 1. Biosynthèse de l'hème à partir de l'acide δ-aminolévulinique.

L'hème inhibe par rétro-régulation sa propre biosynthèse au niveau de la δ-aminolévulinate-synthétase. Ainsi, la biosynthèse des chaînes peptidiques de globines joue un rôle régulateur sur celle de l'hème en captant celui-ci au fur et à mesure de sa formation.

1.2. De l'hème à la bilirubine

Au cours de l'érythropoïèse, les érythroblastes vont se charger progressivement en hémoglobine jusqu'à une concentration seuil servant de déclencheur à la libération du réticulocyte dans la circulation sanguine (entre 32 et 35 % ; au-delà de 36 %, l'hémoglobine précipite et l'érythroblaste est détruit).

L'hémoglobine est une molécule complexe et de nature mixte :

- le groupement prosthétique avec le noyau de l'hème,
- la protéine ou globine.

La protéine est constituée de quatre chaînes de globine associées chacune à un seul hème. Ces quatre chaînes sont reliées entre elles par des liaisons labiles. Par exemple, l'hémoglobine adulte majoritaire (HbA₁, environ 97%) est constituée de deux chaînes α et deux chaînes β et l'hémoglobine adulte

minoritaire (HbA₂, environ 3%) est constituée de deux chaînes α et de deux chaînes δ .

La durée de vie moyenne des érythrocytes dans la circulation sanguine est de l'ordre de 120 jours pendant lesquels l'hémoglobine ne subit pas de modification. Puis, à la mort de l'érythrocyte, l'hémoglobine est dégradée par le système réticulo-endothélial (rate, foie, moelle osseuse). Une partie de ses constituants est recyclée. Ainsi, une grande proportion du fer héminique est récupérée par le système histio-macrophagique pour être réintroduite dans le cycle du fer. En revanche, les noyaux de l'hème, débarrassés des quatre chaînes de globine, sont dégradés et éliminés.

La transformation de l'hémoglobine en bilirubine, dérivé tétrapyrrolique à chaîne ouverte, a lieu normalement dans le système réticulo-endothélial, surtout au niveau de la rate (figure 2).

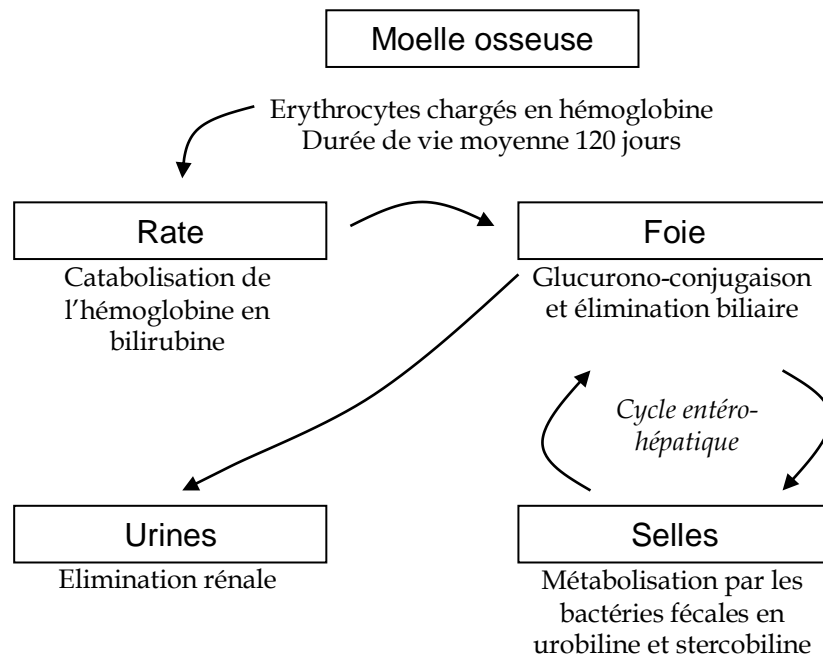


Figure 2. Métabolisme des pigments érythrocytaires.

L'ouverture du cycle tétrapyrrolique de l'hème est consécutive à l'oxydation du carbone α de la chaîne. Cette réaction est catalysée par l'hème-oxygénase microsomale et permet la libération de l'atome de fer (préalablement transformé en Fe^{3+}) qui sera réutilisé et d'une molécule de monoxyde de carbone qui sera éliminée par la respiration. A cette étape, l'hème est devenu de la biliverdine. Cette biliverdine, sous l'action de la biliverdine réductase à NADPH, est réduite en bilirubine non conjuguée (figure 3).

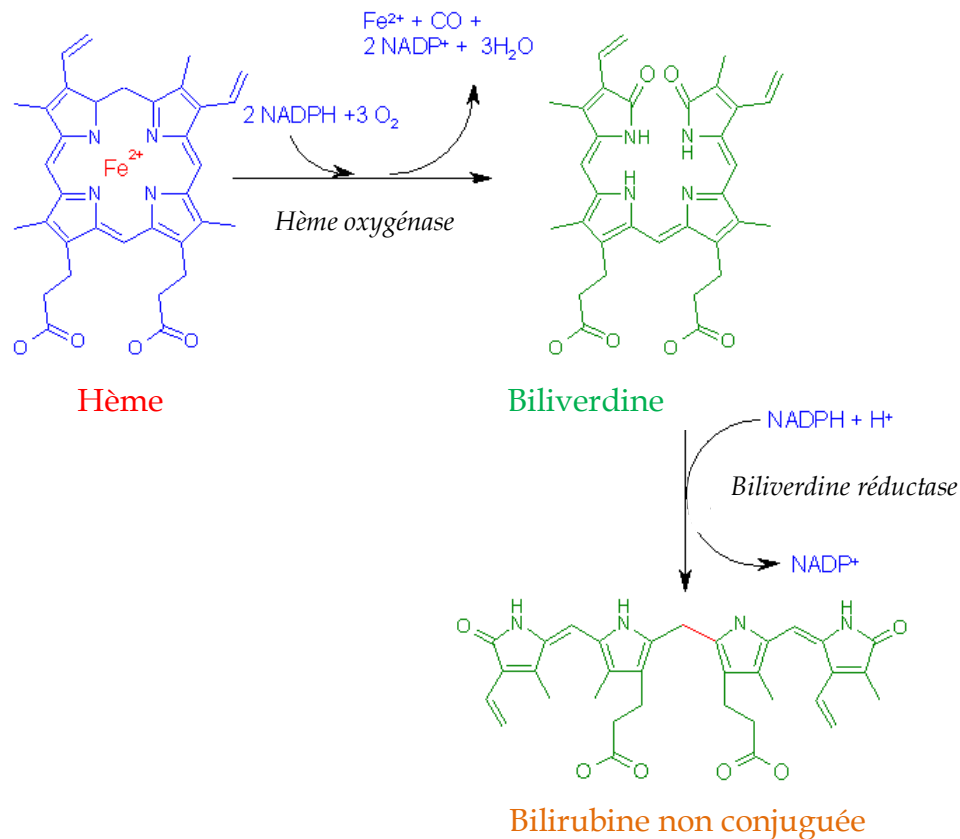


Figure 3. Modifications chimiques menant de l'hème érythrocytaire à la bilirubine non conjuguée.

La production journalière de bilirubine non conjuguée est de l'ordre de 250 à 300 mg (soit 430 à 510 μmol) dont environ 85% proviennent de la dégradation de l'hémoglobine des érythrocytes sénescents et environ 15% proviennent soit de la dégradation de l'hémoglobine des précurseurs médullaires (érythropoïèse inefficace) soit de la dégradation des autres molécules à structure hémique (myoglobine, cytochromes, peroxydases).

La bilirubine non conjuguée est non polaire, insoluble dans l'eau et soluble dans les lipides, ce qui explique sa grande capacité à diffuser dans les tissus à forte composante lipidique comme le cerveau. Cette propriété physico-chimique rend également son transport sérique difficile et son élimination directe impossible.

1.3. Le transport de la bilirubine non conjuguée jusqu'au foie

Après une production périphérique, la bilirubine doit être transportée par le sang jusqu'au foie pour y être éliminée par la bile. Composée hautement lipophile, elle circule très majoritairement liée à l'albumine (K_D de l'ordre de 10^{-8} mol/L). Physiologiquement, les capacités de fixation de la bilirubine sur l'albumine sont limitées de sorte que, lors d'épisodes d'hyperbilirubinémie non conjuguée, celles-ci peuvent être dépassées et de grandes quantités de bilirubine non conjuguée non liée peuvent ainsi se retrouver dans la circulation.

Seule la bilirubine non conjuguée non liée à l'albumine a la capacité de franchir la barrière hémato-céphalique. Ceci explique toute l'importance non seulement des valeurs de bilirubine non conjuguée, mais également des rapports bilirubine non conjuguée sur albumine dans l'évaluation des risques d'ictère nucléaire.

1.4. La conjugaison de la bilirubine au niveau hépatique

Au niveau hépatique, les mécanismes soutenant le passage de la bilirubine non conjuguée de la circulation sanguine vers le cytoplasme de l'hépatocyte ne sont pas clairement définis et il existe probablement plusieurs facteurs impliqués.

L'aspect lipophile de la bilirubine non conjuguée est probablement en soi un facteur favorisant la traversée des membranes cellulaires de par leur nature phospholipidique, ce qui peut expliquer sa très grande capacité de diffusion dans le système nerveux central. Pour les cellules n'intervenant pas dans la métabolisation de la bilirubine non conjuguée, il est nécessaire de pouvoir rejeter la bilirubine entrant passivement dans le cytoplasme. Une étude de transfection a mis en évidence les capacités de transport de la bilirubine non conjuguée du cytoplasme vers le milieu extracellulaire par le canal MRP1 (multidrug-resistance protein 1), suggérant ainsi un rôle protecteur de MRP1 vis-à-vis de la toxicité cellulaire de la bilirubine (Rigato et al., 2004).

D'autre part, le transporteur OATP2 (organic anion transporter polypeptide 2) a été rapporté comme intervenant dans le passage de la bilirubine non conjuguée à travers la membrane sinusoidale (Cui et al., 2001). Cependant, une étude récente vient relativiser le rôle de OATP2 dans le transport de la bilirubine : des cellules exprimant OATP2 et des cellules n'exprimant pas OATP2 semblent avoir les mêmes capacités de transport de la bilirubine (Wang et al., 2003). Il faut cependant noter que la bilirubine tritiée utilisée dans ces expériences était extraite de la bile de rat et était donc conjuguée. Récemment, une étude portant sur deux polymorphismes du gène OATP2 a montré que ces variants étaient des facteurs de risque supplémentaires d'hyperbilirubinémie non conjuguée (Huang et al., 2005).

La bilirubine non conjuguée est ensuite prise en charge par des protéines solubles : ligandine et protéine Z. La ligandine fait partie de la famille des glutathion-S-transférases (GST). De récentes expériences de co-immunoprécipitation ont montré que la GSTA2 se liait directement à l'enzyme de conjugaison de la bilirubine au niveau du réticulum endoplasmique suggérant un transfert direct de la bilirubine entre ligandine et enzyme de conjugaison (Akizawa et al., 2008).

Pour être éliminée par le système hépato-biliaire, la bilirubine doit être conjuguée à l'acide glucuronique. Ce transfert est réalisé par une enzyme à expression hépatique : l'UDP-glucuronosyltransférase (figure 4). Cette enzyme

catalyse le transfert de groupements glucuronosides sur la bilirubine aux dépens d'une molécule d'acide UDP-glucuronique. La bilirubine conjuguée devenue hydrosoluble peut alors être éliminée par les canalicules biliaires. Dans l'espèce humaine, toute la bilirubine est excrétée sous forme d'un conjugué glucidique : 95% sous forme d'un dérivé glucuronide et 5% sous forme d'un dérivé glucoside ou xyloside. Parmi les fractions conjuguées avec un glucuronide, environ 90% le sont sous forme d'un di-glucuronide et environ 10 % sous forme d'un mono-glucuronide.

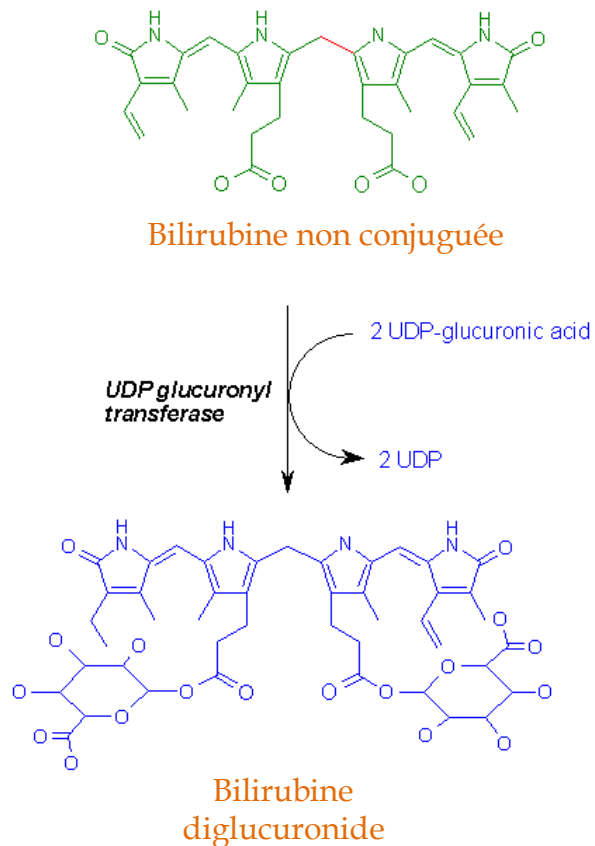


Figure 4. Etape de conjugaison hépatique de la bilirubine.

La bilirubine conjuguée est transférée de l'hépatocyte vers le canalicule biliaire grâce à un canal MRP2 (multidrug-resistance protein 2) transmembranaire ATP-dépendant (Jedlitschky et al., 1997). En cas de dysfonctionnement du système MRP2 ou de réduction de l'excrétion biliaire, la bilirubine conjuguée est prise en charge par le canal MRP3 qui refoule la bilirubine conjuguée de l'hépatocyte vers la circulation sanguine (König et al., 1999 ; Kamisado et al., 2000).

Les différents acteurs du métabolisme de la bilirubine sont schématisés dans la figure 5.

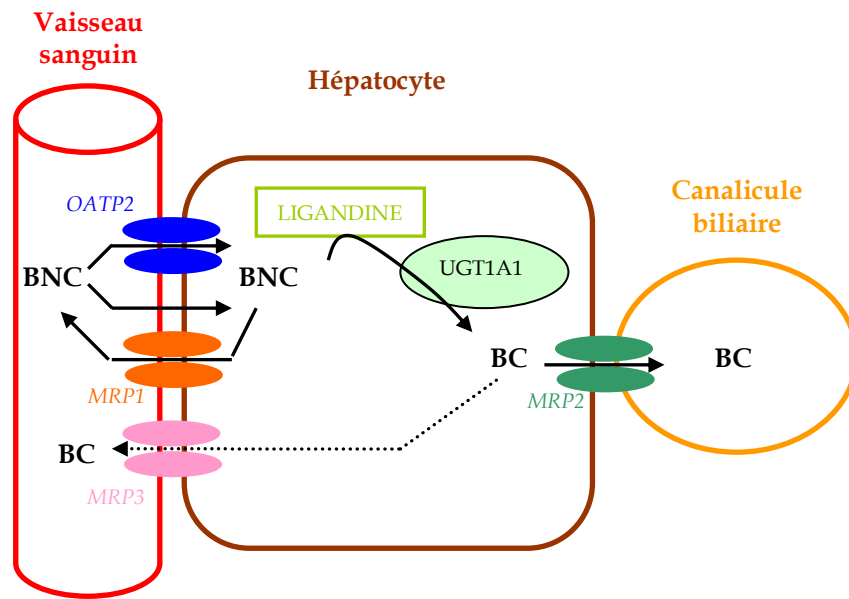


Figure 5. Circulation hépato-biliaire de la bilirubine : en traits pleins voie normale, en pointillé en cas de dysfonction de MRP2 (BNC : bilirubine non conjuguée, BC : bilirubine conjuguée, OATP2 : organic anion transporter polypeptide 2, MRP1 : multidrug-resistance protein 1, MRP2 : multidrug-resistance protein 2, MRP3 : multidrug-resistance protein 3).

1.5. Devenir de la bilirubine conjuguée et cycle entéro-hépatique

La bilirubine est déversée via la bile dans l'intestin où elle va subir l'action enzymatique des bactéries de la flore digestive. On note dans un premier temps l'hydrolyse du radical glucuronique. La bilirubine libérée est hydrogénée pour donner naissance successivement au *d*-urobilinogène (hydrogénation du radical vinyle en radical éthyle sur le noyau pyrrole B et des radicaux méthène en β et δ en radicaux méthène), puis à l'*i*-uribilinogène ou mésobilirubinogène (hydrogénation du second radical vinyle en radical éthyle). Ces dérivés incolores peuvent subir une oxydation du radical méthène en γ en radical méthène, les transformant alors respectivement en *d*-urobiline et *i*-urobiline colorés en jaune orangé. Les deux doubles liaisons pyrroliques terminales de l'urobilinogène peuvent également être réduites pour donner le l-stercobilinogène dont l'oxydation du radical méthène central en radical méthène donne naissance à la l-stercobiline colorée en jaune d'or. Au final, se retrouvent mélangés dans les fèces urobilinogène, urobiline, stercobilinogène et stercobiline, leur donnant leur couleur caractéristique.

Urobilinogène et stercobilinogène peuvent être en partie réabsorbés (jusqu'à 20%) par la muqueuse intestinale et retourner au foie via le système porte entéro-hépatique (cycle entéro-hépatique des pigments biliaires). Une

partie de ces dérivés retourne dans la circulation générale et est excrétée par le rein (2 à 5%).

II. Physiopathologie des anomalies de la conjugaison de la bilirubine

Les anomalies de conjugaison de la bilirubine sont liées à un dysfonctionnement de l'enzyme hépatique de conjugaison de la bilirubine UGT1A1 et sont donc responsables d'ictères à bilirubine non conjuguée.

Ces déficits, notamment dans leurs formes modérées, pourront être aggravés s'ils sont associés à une augmentation de production de la bilirubine non conjuguée ou à des anomalies des protéines associées au métabolisme de la bilirubine.

II.1. Les anomalies de conjugaison de la bilirubine

Il existe deux types de déficits de l'activité hépatique de conjugaison de la bilirubine :

- un déficit congénital de conjugaison de la bilirubine (anomalie autosomique récessive liée à une anomalie du gène *UGT1A1*),
- un déficit acquis de conjugaison de la bilirubine.

Ces déficits se manifestent par un ictère nu à bilirubine libre plus ou moins intense.

II.1.1. Les déficits congénitaux de conjugaison de la bilirubine

L'enzyme uridine di-phosphate glucuronosyltransférase catalyse le transfert d'un ou deux groupements glucuronosyle sur la bilirubine non conjuguée aux dépens de l'acide UDP-glucuronique. Son expression est très majoritairement hépatique de sorte que la mise en évidence du déficit enzymatique ne peut se faire que sur ponction-biopsie hépatique.

On distingue deux maladies héréditaires de la conjugaison de la bilirubine intéressant le gène *UGT1A1* :

- le syndrome de Gilbert ou cholémie familiale,
- la maladie de Crigler-Najjar ou ictère familial congénital.

Nous reviendrons en détail sur ces deux pathologies dans les chapitres suivants.

Il est à noter que l'enzyme UGT1A1 est immature à la naissance, ce qui peut être à l'origine, en période néonatale, d'un ictère à bilirubine non conjuguée.

Le gène *UGT1A1* a été identifié en 1992 par Ritter et collaborateurs (Ritter et al., 1992a). Il est localisé à l'extrémité terminale du bras long du chromosome 2 dans l'espèce humaine (en 2q37.1). Il fait partie d'un complexe moléculaire

codant plusieurs protéines à activité uridine diphosphate glucuronosyltransférase. Actuellement, le cluster *UGT1A* contient neuf gènes (codant neuf protéines à activité glucuronosyltransférase : *UGT1A1*, *UGT1A3*, *UGT1A4*, *UGT1A5*, *UGT1A6*, *UGT1A7*, *UGT1A8*, *UGT1A9* et *UGT1A10*) et quatre pseudo-gènes (figure 6). Tous ces gènes ont en commun les quatre derniers exons codant la partie C-terminale de chaque protéine. La spécificité enzymatique est conférée par chaque premier exon spécifique codant la partie N-terminale de chaque protéine.

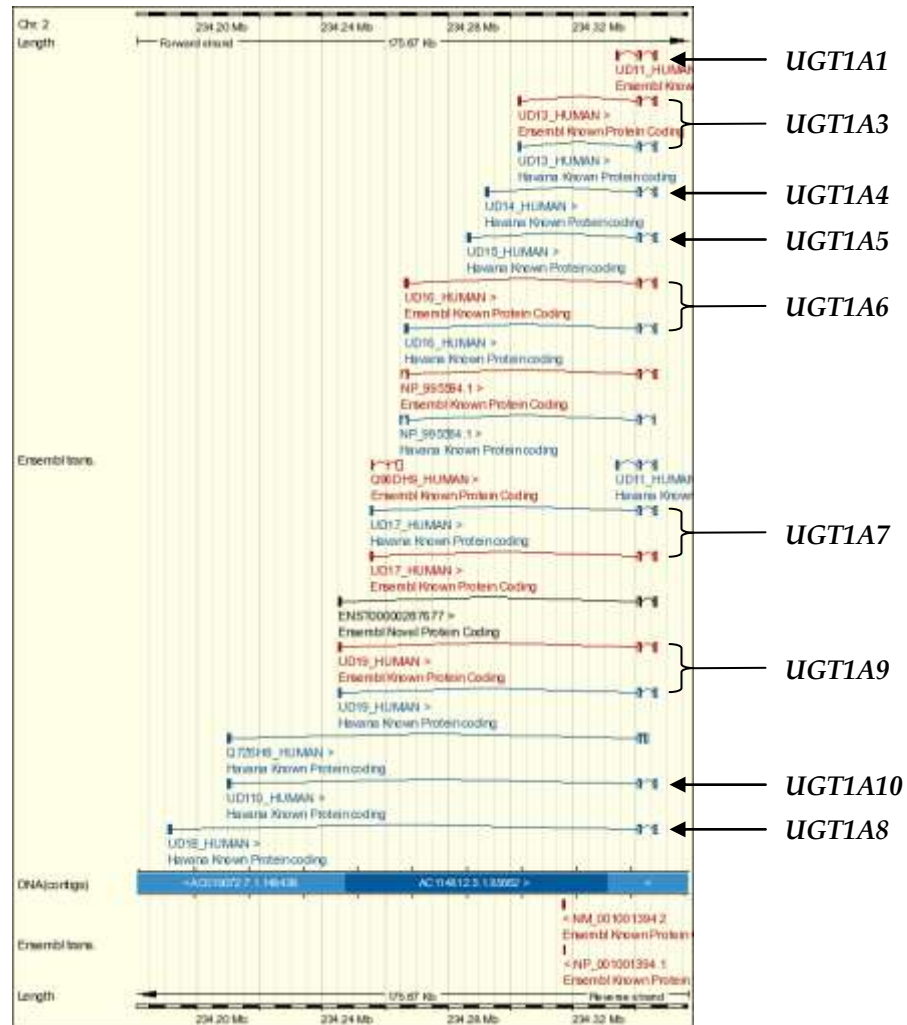


Figure 6. Organisation du cluster de la famille de gènes *UGT1A*.

Pour chaque gène du complexe, il existe un promoteur spécifique. Ainsi, par le jeu de l'épissage alternatif, chaque protéine peut être exprimée de manière différentielle.

Le gène *UGT1A1* code la protéine *UGT1A1* ayant l'activité bilirubine glucuronosyltransférase. Le gène comporte 5 exons et contient 2357 nucléotides dont 1602 pour la partie codante (figure 7). Il s'étend sur environ 13.1 kb.

Ce gène est placé sous le contrôle d'un promoteur spécifique en amont de l'exon 1. La TATAbox comporte 6 répétitions du dinucléotide TA dans sa forme normale (le variant à 5 répétitions est considéré comme normal) et 7 répétitions dans sa forme mutée (le variant à 8 répétitions est considéré comme muté). L'étude de ce promoteur se révélera importante dans la génétique de la maladie de Crigler-Najjar et du syndrome de Gilbert.

```

Séquence en 5'
Exon 1 (879 pb)
.....tgggtttttgccatatatatataagtaggagaggggcgaacctctggc
AGGAGCAAAGGCCCATGGCTGTGGAGTCCCAGGGCGGACGCCCACTTGTCTGGGCCTG
CTGCTGTGTGCTGGGCCAGTGGTGTCCCATGCTGGGAAGATACTGTTGATCCAGTG
GATGGCAGCCACTGGCTGAGCATGCTTGGGGCCATCCAGCAGCTGCAGCAGAGGGGACAT
GAAATAGTTGTCCTAGCAGCTGACGCCTCGTTGTACATCAGAGACGGAGCATTTTACACC
TTGAAGACGTACCCTGTGCCATTCCAAAGGGAGGATGTGAAAGAGTCTTTTGTAGTCTC
GGGCATAATGTTTTTGAAGAATGATCTTTCTGCAGCGTGTATCAAAACATACAAGAAA
ATAAAAAGGACTCTGCTATGCTTTTGTCTGGCTGTTCCTACTGACACAACAAGGAG
CTCATGGCCCTCCCTGGCAGAAAGCAGCTTGTATGTCATGCTGACGGACCCCTTTCCTCCT
TGCAGCCCCATCGTGGCCAGTACCTGTCTCTGCCACTGTATTCTTCTGCATGCACCTG
CCATGCAGCTGGAAATTTGAGGCTACCCAGTGCCCCAACCCATTCTCCTACGTGCCAGG
CCTCTCTCTCTCATTACAGATCACATGACCTTCTGCAGCGGGTGAAGAACATGCTCATT
GCCTTTTACAGAACTTTCTGTGCGACGTGGTTTATTCCTCGTATGCAACCCCTTGCCTCA
GAATTCCTCAGAGAGAGGTGACTGTCCAGGACCTATTGAGCTCTGCATCTGTCTGGCTG
TTTAGAAGTGACTTTGTGAAGGATTACCCTAGGCCCATCATGCCCAATATGTTTTTGT
GGTGAATCAACTGCCTTACCAAATCCACTATCCAG
Intron 1-2 (5882 pb)
Exon 2 (132 pb)
gtgtgtattggagtgaggacttttac.....ctgaaaatttttcttctggctctag
GAATTTGAAGCCTACATTAATGCTTCTGGAGAACATGGAATTTGTGGTTTTCTCTTTGGGA
TCAATGGTCTCAGAAATTCAGAGAAGAAAGCTATGGCAATTCGTGATGCTTTGGGCAAA
ATCCCTCAGACA
Intron 2-3 (683 pb)
Exon 3 (88 pb)
gtaagaagattctataccatggcct.....gttctgctcttttggccctcccag
GTCCTGTGGCCGTACACTGGAACCCGACCATCGAATCTTGCGAACAACACGATACTTGT
AAGTGGCTACCCCAAACGATCTGCTTG
Intron 3-4 (283 pb)
Exon 4 (220 pb)
gtatggtgggggattggatgtata.....acatcctccctatatttgcacctcag
GTCACCCGATGACCCGTGCTTTTATCACCCATGCTGGTCCCATGGTGTATGAAAGCA
TATGCAATGGCGTTCCATGGTGTATGATGCCCTTGTGGTGTATGATGGAACAATGCAA
AGCGCATGGAGACTAAGGGAGCTGGAGTGACCCGAAATGTTCTGGAATGACTTCTGAAG
ATTTAGAAAATGCTCTAAAAGCAGTCATCAATGACAAAAG
Intron 4-5 (3822 pb)
Exon 5 (1038 pb)
gtaagaaagaagatacagaagaata.....ataacgaaactgtctttgtgttttag
TTACAAGGAGAACATCATGCGCCTTCCAGCCTTCAACAAGGACCCCGGTGGAGCCGCT
GGACCTGGCCGTGTTCTGGGTGGAGTTTGTGATGAGGCACAAGGGCGCGCCACACCTGGC
CCCCGAGCCACGACCTCACCTGGTACCAGTACCATTCTTGGACGTGATTGGTTTCCT
CTTGGCCGTGCTGCTGACAGTGGCCTTATCACCTTTAAATGTTGTGCTTATGGTACCG
GAAATGCTTGGGGAAAAAAGGGCGAGTTAAGAAAGCCCAAAATCCAAGACCCATTGAGA
AGTGGGTGGGAAATAAGGTAAAAATTTGAACCATCCCTAGTCATTTCCAAACTTGAAAA
CAGAATCAGTGTTAAATTCATTTTATTCTTATTAAGGAAATACCTTGCATAAAATTAATCA
GCCCCAGAGTGCTTTAAAAAATCTCTTAAATAAAAAATAATAGACTCGCTAGTCAGTAAA
GATATTTGAATATGTATCGTGCCCCCTCTGGTGTCTTTGATCAGGATGACATGTGCCATT
TTTCAGAGGACGTGCAGACAGGCTGGCATTCTAGATTACTTTTCTACTCTGAAACATGG
CCTGTTTGGGAGTGGGGATTCAAAGGTGGTCCCACGGCTGCCCTACTGCAAAATGGCAG
TTTTAATCTTATCTTTTGGCTTCTGCAGATGGTTGCAATTGATCCTTAACCAATATGGT
CAGTCCTCATCTCTGTCGTGCTTATAGGTGCCACCTTGTGTGTTTAAAGAAGGGAGCT
TTGTACCTTTAGAGTGTAGGTGAAATGAATGAATGGCTTGGAGTGCATGAGAACAGCAT
ATGATTTCTTGTCTTGGGAAAAAGAATGATGCTATGAAATGGTGGGTGGTGTATTGGA
GAAGATAATCATTGCTTATGTCAAATGGAGCTGAATTTGATAAAAACCCAAAATACAGCT
ATGAAGTGCTGGGCAAGTTTACTTTTTTCTGATGTTTCTACAACATAAAATAAATTA
TAAATTTATATAAATCT
Séquence en 3'
atttaagtgttttctactggtgctgcatttatttctgttaagtgtgattt.....

```

Figure 7. Séquence du gène *UGT1A1* humain (séquences 5' et 3' UTR en vert, exons codants en noir, exons non codants en violet, introns en bleu), d'après Ensembl Genome Browser (Ensembl transcript ID ENST00000305208).

Des études de population ont mis en évidence plusieurs polymorphismes (SNP pour single nucleotide polymorphism) au sein du gène *UGT1A1* (tableau 1). Parmi ces SNP, plusieurs ont cependant été rapportés chez des patients présentant une hyperbilirubinémie non conjuguée à type de syndrome de

Gilbert. La présence de ces SNP à la fois chez des témoins et chez des patients présentant une hyperbilirubinémie non conjuguée souligne la difficulté du diagnostic moléculaire de syndrome de Gilbert et renforce soit l'hypothèse d'une pénétrance variable soit celle d'un syndrome polyfactoriel voire polygénique.

Tableau 1. Polymorphismes synonymes et non-synonymes rapportés dans le gène UGT1A1

Dénomination	Variation nucléotidique	Variation peptidique	Remarques
rs4148323	c.211G>A	p.Gly71Arg	Décrit chez des patients présentant un syndrome de Gilbert
rs35003977	c.674T>G	p.Val225Gly	Décrit chez des patients présentant une maladie de Crigler-Najjar de type II
rs17851756	c.965T>C	p.Ile322Thr	Pas de fréquence allélique déterminée
rs34946978	c.1091C>T	p.Pro364Leu	Décrit chez un patient présentant un syndrome de Gilbert
rs28934877	c.1198A>G	p.Asn400Asp	Décrit chez un patient présentant une maladie de Crigler-Najjar de type II
rs36076514	c.1231G>T	p.Val411Leu	Uniquement identifié dans la population hispanique (fréquence de 2.3 %)
rs11682453	c.1279C>T	synonyme	Allèle C retrouvé systématiquement
ENSSNP1741123	c.1419C>A	p.Leu474Met	Pas de fréquence allélique déterminée
rs28900406	c.1428C>T	synonyme	Identifié dans la population africaine sub-saharienne (4.2 %) et dans la population américaine d'origine africaine (6.7 %)
rs1042709	c.1531G>C	p.Ala511Pro	Allèle G retrouvé systématiquement

La protéine UGT1A1 comporte 533 acides aminés et est caractérisée en électrophorèse bi-dimensionnelle par une masse relative de 59591 Da et un point isoélectrique à 8,0885 (figure 8).

```

MAVESQGGRLVGLLLCVLGPVSHAGKILLIPVDGSHWLSMLGAIQQLQQRGHEIVVL
APDASLYIRDGAFYTLKTYVPPFQREDVKESFVSLGHNVFENDSFLQRVIKTYKKIKKDS
AMLLSGCSHLLHNKELMASLAESSFDVMLTDPFLPCSPIVAQYLSLPTVFFLHALPCSLE
FEATQCPNPFYSVPRPLSSHSDHMTFLQRVKNMLIAFSQNFCLCDVVYSPYATLASEFLQR
EVTVQDLLSSASVWLFVRSDFVKDYPRPIMPNMVVFVGGINCLHQNPLSQEFAYINASGEH
GIVVFSLGSVMSEIPEKKAMAIADALGKI PQTVLWRYTGTRPSNLANNTILVKWLPQNDL
LGHPMTRAFITHAGSHGVYESICNGVPMVMMPLFGDQMDNAKRMETKGAGVTLNVLEMTS
EDLENALKAVINDKSYKENIMRLSSLHKDRPVEPLDLAVFWVEFVMRHKGAPHLRPAAH
LTWYQYHSLDVIGFLLAVLTVAFITFKCCAYGYRKCLGKKGRVKKAHKSKTH
    
```

Figure 8. Séquence de la protéine UGT1A1 humaine, d'après Ensembl Genome Browser (Ensembl peptid ID ENSP00000304845).

Des études de structure visant à déterminer l'organisation de la protéine ont montré (d'après SwissProt, ID P22309) :

- un potentiel peptide signal (acides aminés 1 à 25),
- la protéine (acides aminés 26 à 533),
- un potentiel fragment transmembranaire (acides aminés 491 à 507),
- trois sites potentiels de N-glycosylation (acides aminés 102, 295 et 347).

En dehors du fragment C-terminal qui est cytosolique et d'un segment transmembranaire, la protéine UGT1A1 est compartimentalisée dans le réticulum endoplasmique (Ghosh et al., 2005) (figure 9).

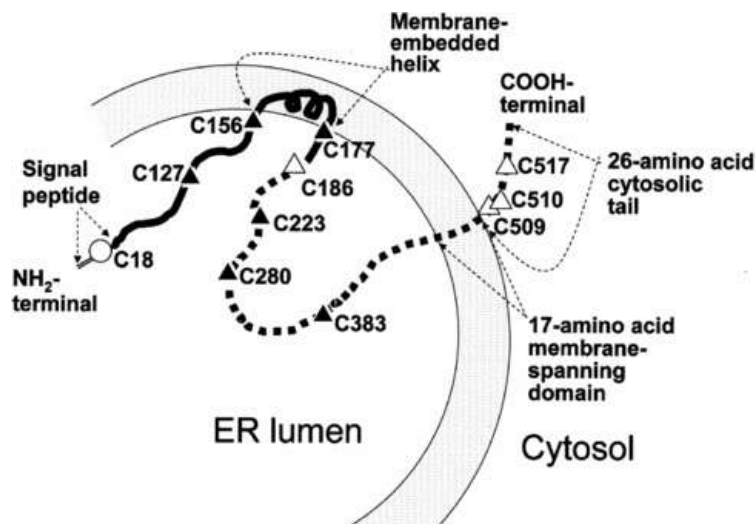


Figure 9. Orientation de la protéine UGT1A1 dans le réticulum endoplasmique déduite de la séquence peptidique. En dehors des 26 acides aminés de la partie C-terminale et des 17 acides aminés transmembranaires, l'ensemble de la molécule UGT1A1 est compartimentalisée dans le réticulum endoplasmique. La partie N-terminale de la molécule (en traits pleins) contient un peptide signal de 20 acides aminés qui est clivé après maturation de la protéine. Ce domaine confère à l'enzyme une spécificité pour les substrats aglycone. Il contient également une hélice membranaire. La partie C-terminale intraluminaire de UGT1A1 contient un domaine de liaison à l'acide UDP-glucuronique. Les triangles représentent les résidus cystéines. D'après Ghosh et al., 2005.

Il existe peu d'études sur les relations structure/activité. Le plus souvent, seules les descriptions des anomalies moléculaires observées chez les patients présentant une maladie de Crigler-Najjar de type I ou II permettent d'approcher cette problématique. A titre d'exemple, il a été montré, en étudiant les conséquences de la délétion d'une phénylalanine du doublet situé en 170-171, l'importance de cette région hydrophobe dans l'activité enzymatique (Ritter et al., 1993).

Cependant, des études de modélisation de conformation de la protéine ont déterminé trois régions fonctionnelles (Li and Wu, 2007) :

- le site donneur ou site de liaison de l'acide UDP-glucuronique codé par les exons 3 (Ser309, Arg336, Trp354, Leu355, Gln357) et 4 (Asn358, His372, Ser375, His376, Gly377, Glu380, Asp396 et Gln397),
- le site accepteur ou site de liaison de la bilirubine codé par l'exon 1 (Gly37, Ser38),
- deux sites catalytiques codés par l'exon 1 (His39 et Asp151).

La modification de ces acides aminés ou de leur environnement proche pourrait être à l'origine d'une diminution voire d'une abolition de l'activité enzymatique.

L'expression de la protéine UGT1A1 est majoritairement hépatique. Cependant, Lévesque et collaborateurs ont mis en évidence par RT-PCR la présence d'ARNm contenant un fragment de l'exon 1 de *UGT1A1* dans le colon et l'intestin grêle (Lévesque et al., 2007).

Cette même équipe a mis en évidence un système de régulation particulier de l'activité de UGT1A1 mettant en jeu un exon alternatif dans l'intron 4-5 (Lévesque et al., 2007). Cet exon cryptique alternatif permet la production d'une protéine dont les 99 derniers acides aminés de la protéine UGT1A1 ont été remplacés par un décapeptide modifiant radicalement l'activité enzymatique (figure 10a). Cette protéine alternative appelée UGT1A1_i2 ne présente seule aucune activité bilirubine glucuronosyltransférase. En revanche, en association avec UGT1A1, ce variant d'épissage diminue l'activité enzymatique de 78%, jouant ainsi probablement un rôle de régulateur via une interaction protéine-protéine directe (figure 10b).

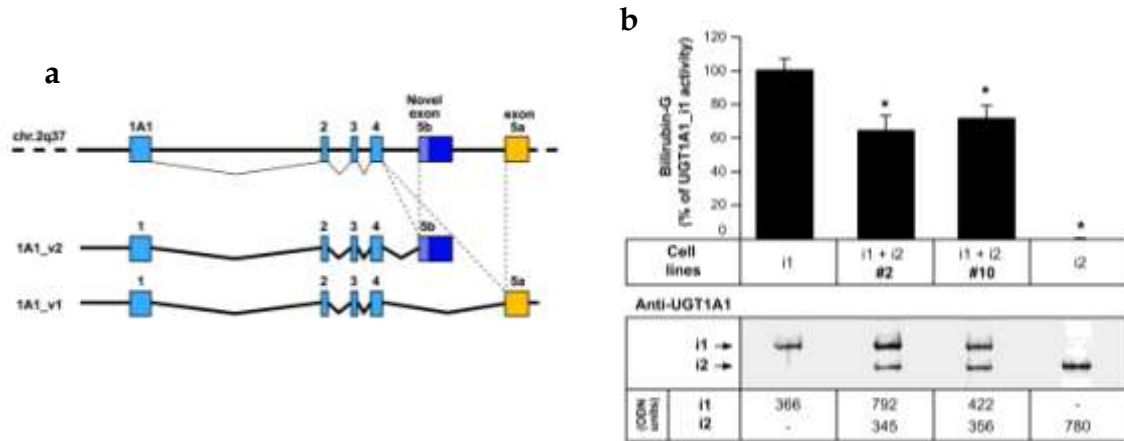


Figure 10. a : représentation schématique du gène *UGT1A1* et des deux ARNm alternatifs *UGT1A1_v1* et *UGT1A1_v2*; b : taux de glucuronisation de la bilirubine dans des cellules HEK-293 exprimant *UGT1A1_i1*, *UGT1A1_i2* séparément ou en association. D'après Levesque et al., 2007.

L'expression du gène *UGT1A1* peut également être régulée par des xénobiotiques comme le phénobarbital. Cette propriété est d'ailleurs mise à profit pour traiter les déficits partiels dans la maladie de Crigler-Najjar de type II. Il existe, en amont du promoteur, une séquence enhancer répondant au phénobarbital appelée PBREM (Sugatani et al., 2001). Cette séquence, située entre -3483 et -3194 pb en amont du gène contient trois sites putatifs de liaison de récepteurs nucléaires. La mutation c.-3262T>G dans cette séquence a été décrite comme réduisant l'activité transcriptionnelle du gène *UGT1A1* (Sugatani et al., 2002). Ainsi, l'association de cette anomalie de séquence avec la présence à l'état hétérozygote de l'anomalie du promoteur (anomalie responsable du syndrome de Gilbert à l'état homozygote la plus fréquente dans la population caucasienne) ou de la mutation c.211G>A (anomalie responsable du syndrome de Gilbert à l'état homozygote la plus fréquente dans la population asiatique) pourrait expliquer une part non négligeable des syndromes de Gilbert non génétiquement élucidés (figure 11).

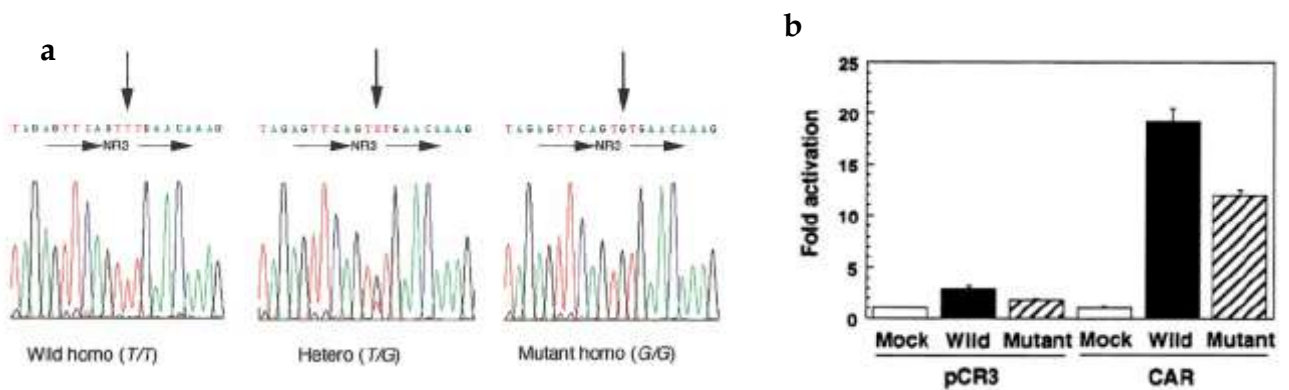


Figure 11. a : séquence nucléotidique de la région PBREM encadrant la mutation c.-3262T>G; b : effet de la mutation c.-3262T>G sur l'activité transcriptionnelle de *UGT1A1* (luciférase utilisée comme gène rapporteur). D'après Sugatani et al., 2002.

II.2.3. Les déficits acquis de conjugaison de la bilirubine

Certains laits maternels contiennent une lipase qui hydrolyse les triglycérides. Les acides gras libérés sont des inhibiteurs compétitifs de UGT1A1 responsables d'une diminution des capacités de conjugaison de la bilirubine. L'ictère observé est alors modéré et réversible à l'arrêt de l'allaitement. Il ne constitue pas en lui-même une contre-indication à l'allaitement maternel.

Plusieurs molécules d'usage thérapeutique ont également montré un effet inhibiteur de l'activité glucuronosyl-transférase de UGT1A1 : indinavir (Zhang et al., 2005), kétoconazole (Yong et al., 2005).

II.2. Les augmentations de production de la bilirubine non conjuguée

Toutes les situations d'augmentation de la production de bilirubine pourront être à l'origine d'une aggravation ou d'une révélation du déficit de conjugaison de la bilirubine.

Les causes d'augmentation de la production de la bilirubine sont très nombreuses :

- les hyper-hémolyses extra-corporelles d'origine immunologique, mécanique ou toxique,
- les hyper-hémolyses corporelles liées à une anomalie congénitale ou acquise de la membrane du globule rouge, à une anomalie congénitale de l'hémoglobine ou à un déficit enzymatique,
- la résorption d'une hémorragie interne ou d'un hématome.

II.3. Les anomalies des protéines associées au métabolisme de la bilirubine

Comme nous l'avons vu précédemment, plusieurs protéines interviennent dans le métabolisme de la bilirubine : hème-oxygénase, biliverdine réductase, canal OATP2, ligandine. Plusieurs anomalies de ces protéines ont été rapportées comme pouvant majorer la symptomatologie liée au déficit en UGT1A1. En association avec l'étude du gène *UGT1A1*, l'étude moléculaire de plusieurs de ces partenaires pourrait être intéressante, notamment dans le diagnostic des hyperbilirubinémies néonatales et les syndromes de Gilbert « inexplicables ».

II.3.1. L'hème-oxygénase

L'activité enzymatique de l'hème-oxygénase constitue le facteur limitant de la synthèse de la bilirubine.

Dans l'espèce humaine, il existe deux gènes codant l'hème-oxygénase : *HMOX1* situé en 22q12.3 et *HMOX2* situé en 16p13.3.

Le gène *HMOX1* code la protéine hème-oxygénase 1 à activité inductible. Il comporte 6 exons et contient 1836 nucléotides dont 867 pour la partie codante. Il s'étend sur environ 13.8 kb. La protéine HMOX1 comporte 288 acides aminés et est caractérisée en électrophorèse bi-dimensionnelle par une masse relative de 32818 Da et un point isoélectrique à 8.6825.

Le gène *HMOX2* code la protéine hème-oxygénase 2 à activité constitutive. Il comporte 6 exons et contient 2534 nucléotides dont 951 pour la partie codante. Il s'étend sur environ 34.8 kb. La protéine HMOX2 comporte 316 acides aminés et est caractérisée en électrophorèse bi-dimensionnelle par une masse relative de 36032 Da et un point isoélectrique à 5.0895.

Le gène *HMOX1* est exprimé non seulement sous l'influence de l'hème mais également au cours d'agressions cellulaires telles que le stress oxydatif et est ainsi considéré comme jouant un rôle protecteur de la cellule (Choi et al., 1996). Il existe, en amont du gène, une séquence hautement polymorphe de répétition guanine - thymine ayant une influence sur la transcription. En effet, l'allongement des structures alternant base purique et base pyrimidique peut entraîner la modification de la conformation de l'ADN de B-DNA en Z-DNA thermodynamiquement défavorable. La longueur de cette séquence varie entre 12 et 40 répétitions avec une répartition bimodale (maxima à 23 et 30 répétitions) selon la population étudiée (Exner et al., 2004). Le seuil au-delà duquel il existe une diminution de l'activité hème-oxygénase n'est pas clairement établi. Cependant, plusieurs études ont montré une activité du promoteur de *HMOX1* supérieure (Chen et al., 2004) et une meilleure réponse au stress induit (Yamada et al., 2000) si le nombre de répétitions est inférieur à 25. Récemment, la présence d'un polymorphisme court associé à une anémie hémolytique auto-immune a été décrit comme responsable d'une hyperbilirubinémie marquée chez un enfant de 14 ans hétérozygote pour l'anomalie du promoteur de *UGT1A1* (Immenschuh et al., 2007).

II.3.2. La biliverdine réductase

La biliverdine réductase est une enzyme intervenant dans trois voies distinctes : une activité kinase en relation avec la voie métabolique récepteur de l'insuline/MAPK, une activité de facteur de transcription pour les gènes *ATF-2/CREB* et *HMOX-1* et une activité enzymatique de réduction de la biliverdine en bilirubine (Maines, 2005).

Actuellement, il n'a pas été décrit d'anomalie du gène de la biliverdine réductase (gène *BLVRA* localisé en 7p13 et comportant 8 exons dont 1 non traduit) responsable d'une altération du métabolisme de la bilirubine.

II.3.3. Le canal OATP2

Le gène *OATP2* code la protéine transmembranaire organic anion transporter polypeptide 2 et est localisé en 12p12.1. Il comporte 15 exons et

contient 2777 nucléotides dont 2077 pour la partie codante. Il s'étend sur environ 108.6 kb. La protéine OATP2 comporte 691 acides aminés et est caractérisée en électrophorèse bi-dimensionnelle par une masse relative de 76448 Da et un point isoélectrique à 8.6833.

Plusieurs études ont montré une corrélation entre la présence de variants dans la séquence du gène *OATP2* et des anomalies de transports de molécules vers le cytoplasme de l'hépatocyte : la pravastatine (Niemi et al., 2004), le 17 β -œstradiol 17 β -D-glucuronide (Iwai et al., 2004), la bilirubine non conjuguée (Huang et al., 2005). Actuellement, 12 variants de la séquence peptidique ont été mis en évidence : p.Phe73Leu, p.Val82Ala, p.Asn130Asp, p.Pro155Thr, p.Glu156Gly, p.Val174Ala, p.Ile353Thr, p.Asn432Asp, p.Asp462Gly, p.Gly488Ala, p.Asp655Gly, p.Glu667Gly (Tirona et al., 2001). Mais les conséquences de la présence de ces variants ne sont pas toutes identiques. En effet, il a été rapporté que les variants p.Asn130Asp (c.388A>C) et p.Val174Ala (c.521T>C) étaient notamment les plus susceptibles d'entraîner une hyperbilirubinémie (Huang et al., 2005 ; Huang, 2005).

II.3.4. La ligandine

La ligandine appartient à la famille des gluathion S-transférases (GST), un des groupes majeurs d'enzymes intervenant dans la phase II de détoxification. Il existe de nombreuses classes de GST. Parmi celles-ci, la GSTM1 est une des plus représentatives dans le foie. Dans une étude récente, l'impact de polymorphismes de deux gènes codant des GST (*GSTM1* et *GSTT1*) a été évalué en termes de facteur de risque d'ictère néonatal (Muslu et al., 2008). Le groupe patient et le groupe contrôle n'ont montré aucune différence significative de répartition des génotypes pour ces deux enzymes. En revanche, dans le groupe des patients porteurs de polymorphismes de *GSTM1*, les concentrations de bilirubine étaient significativement supérieures à ceux du groupe génotype sauvage, suggérant alors un effet du polymorphisme du gène *GSTM1* sur la fonction de la ligandine hépatique. Il est cependant à noter que la significativité reste modérée (p=0.042) et que donc ce résultat doit encore être vérifié par d'autres études.

III. Les pathologies de la conjugaison de la bilirubine : le syndrome de Gilbert et la maladie de Crigler-Najjar

Comme nous l'avons vu précédemment, il existe deux pathologies constitutionnelles de la conjugaison de la bilirubine : le bénin syndrome de Gilbert et la gravissime maladie de Crigler-Najjar.

III.1. Le syndrome de Gilbert ou cholémie familiale

Le syndrome de Gilbert ou cholémie familiale (MIM #143500) a été décrit par les gastro-entérologues Augustin Gilbert et Pierre Lereboullet en 1901 (Gilbert and Lereboullet., 1901).

III.1.1. Clinique et diagnostic

Sur le plan clinique, le syndrome de Gilbert est caractérisé par une élévation modérée de la bilirubinémie, majoritairement dans sa fraction non conjuguée. Les concentrations de bilirubine totale sont généralement comprises entre 20 et 50 $\mu\text{mol/L}$ et ne provoquent le plus souvent aucun signe en dehors d'un discret ictère ou d'un subictère au décours de périodes de jeûne, d'épisodes infectieux ou de fatigue physique. Dans de rares cas, les signes peuvent être plus marqués avec un ictère plus intense et des troubles digestifs notamment. Le syndrome de Gilbert est toujours bénin.

L'examen biologique est marqué par une hyperbilirubinémie non conjuguée modérée, à urines claires et sans signes d'hémolyse. L'histologie et les marqueurs hépatiques sont normaux.

Le diagnostic de syndrome de Gilbert est le plus souvent un diagnostic d'exclusion après avoir éliminé les autres causes évidentes d'hyperbilirubinémie non conjuguée. La biologie moléculaire permet aujourd'hui non seulement de conforter et de rassurer le clinicien dans son diagnostic mais également d'adapter les thérapeutiques médicamenteuses (dont le métabolisme utilise la même voie d'élimination que la bilirubine) et ainsi réduire leurs effets secondaires (comme par exemple les traitements à l'irinotécan).

III.1.2. Génétique

En 1962, Arias et collaborateurs ont montré l'implication du déficit en glucuronosyltransférase dans la physiopathologie du syndrome de Gilbert tout en le distinguant de la maladie de Crigler-Najjar (Arias et al., 1962 ; Arias et al., 1969).

Le syndrome de Gilbert est considéré comme une affection génétique à transmission autosomique récessive impliquant le gène *UGT1A1*. Cependant, plusieurs études de population ont montré non seulement une pénétrance variable mais ont également évoqué une transmission dominante du trait (Foulk et al., 1959 ; Le Bihan-Levaufre et al., 2001), ce qui peut faire évoquer un syndrome de type polygénique.

Au niveau moléculaire, plusieurs anomalies de séquence dans le gène *UGT1A1* ont été rapportées chez des patients présentant un syndrome de Gilbert. Dans les populations caucasienne et africaine, c'est une anomalie du promoteur qui est la plus fréquemment retrouvée. L'insertion d'un ou deux

dinucléotides TA dans la TATAbox (génotype A(TA)₇TAA ou A(TA)₈TAA) entraîne une diminution des capacités de liaison de la machinerie de transcription (Bosma et al., 1995). Plusieurs études de population ont montré la grande fréquence de cette anomalie de séquence dans la population générale (tableau 2).

Tableau 2. Fréquence des anomalies de séquence du promoteur du gène *UGT1A1* dans la population générale en France, Grèce, Tunisie et Inde.

Population étudiée	A(TA) ₆ TAA/ A(TA) ₆ TAA	A(TA) ₇ TAA/ A(TA) ₆ TAA	A(TA) ₇ TAA/ A(TA) ₇ TAA	Référence
France	0.445	0.385	0.170	Le Bihan-Levaufre et al., 2001
Grèce	0.486	0.328	0.186	Kavazarakis et al., 2000
Tunisie	0.429	0.393	0.178	Petit et al., 2008
Inde	0.337	0.558	0.105	Farheen et al., 2006

D'autres anomalies de séquence touchant directement la séquence codante du gène *UGT1A1* ont été retrouvées chez des patients présentant un syndrome de Gilbert, le plus souvent dans la population asiatique :

- la substitution de la guanine par une adénine en position 211 dans l'exon 1 résultant en la modification de séquence peptidique p.Gly71Arg (Koiwai et al., 1995a),
- la substitution de la thymine par une cytosine en position 247 dans l'exon 1 résultant en la modification de séquence peptidique p.Phe83Leu (Sutomo et al., 2002),
- la substitution de la thymine par une cytosine en position 392 dans l'exon 1 résultant en la modification de séquence peptidique p.Leu131Pro (Aono et al., 1995),
- la substitution de la cytosine par une adénine en position 686 dans l'exon 1 résultant en la modification de séquence peptidique p.Pro229Gln (Koiwai et al., 1995a),
- la substitution de la thymine par une cytosine en position 881 dans l'exon 2 résultant en la modification de séquence peptidique p.Ile294Glu (Ciotti et al., 1998),
- la substitution de la cytosine par une thymine en position 1091 dans l'exon 4 résultant en la modification de séquence peptidique p.Pro364Leu (Aono et al., 1995),

- la substitution de la thymine par une guanine en position 1456 dans l'exon 5 résultant en la modification de séquence peptidique p.Tyr486Asp (Aono et al., 1993).

D'autres études moléculaires ont également montré une possible implication d'une séquence en amont du gène *UGT1A1* intervenant dans la régulation de l'expression génique dans le syndrome de Gilbert. En effet, la substitution d'une thymine en une guanine en -3263, dans une région appelée phenobarbital-responsive enhancer module NR3 (PBREM-NR3), semble prédisposer, en association avec une autre anomalie de séquence pathologique, au syndrome de Gilbert (Sugatani et al., 2002).

Dans un même ordre d'idée, l'implication d'autres gènes du métabolisme de la bilirubine comme celui de l'hème-oxygénase ou *OATP2* pourrait expliquer la pénétrance variable et les cas de « transmission dominante » apparente du syndrome de Gilbert.

III.2. La maladie de Crigler-Najjar ou ictère familial congénital

La maladie de Crigler-Najjar ou ictère familial congénital existe sous deux formes : le type I (MIM #218800) dans lequel le déficit enzymatique est complet et le type II (MIM #606785) dans lequel le déficit enzymatique est partiel.

III.2.1. Historique

En 1952, John F. Crigler et Victor A. Najjar ont rapporté, dans la revue *Pediatrics*, l'étude d'un groupe d'enfants - tous apparentés à des degrés divers - présentant une hyperbilirubinémie néonatale avec ictère nucléaire (Crigler and Najjar, 1952). Les auteurs, devant la présentation clinique et les données familiales, ont suggéré que cette hyperbilirubinémie exclusivement non conjuguée était d'origine génétique. Pour chaque enfant, les causes communes d'hyperbilirubinémie infantile avaient pu être éliminées :

- pathologies hémolytiques extra-corporelles comme les incompatibilités materno-fœtales pour le groupe sanguin ou le facteur rhésus,
- pathologies hémolytiques corporelles comme les déficits en pyruvate kinase ou en glucose-6-phosphate déshydrogénase,
- obstruction biliaire primitive,
- infections,
- cirrhose biliaire primitive.

Chez le seul enfant chez qui une autopsie a été réalisée, il n'a pas été retrouvé d'anomalies histologiques hépato-biliaires notables. En colligeant ces observations, les auteurs ont conclu à la présence d'une anomalie génétique à l'origine de l'hyperbilirubinémie non conjuguée persistante et élevée. Les anomalies des structures nerveuses centrales n'ont pu, au moment de la publication, être rattachées de façon formelle à l'anomalie du métabolisme de la bilirubine observée.

De part leurs aspects biologiques, les auteurs ont rapproché cette affection gravissime du bénin syndrome de Gilbert (tableau 3).

Tableau 3. Comparaison des données clinico-biologiques entre l'ictère non-hémolytique familial (syndrome de Gilbert) et l'ictère non-hémolytique congénital avec ictère nucléaire (maladie de Crigler-Najjar). D'après Crigler and Najjar, 1952.

	Ictère non-hémolytique congénital avec ictère nucléaire (maladie de Crigler-Najjar)	Ictère non-hémolytique familial (syndrome de Gilbert)
1. Généalogie	Récessif	Probablement dominant
2. Découverte	A la naissance	Probablement dès la naissance mais habituellement chez les adultes jeunes
3. Lésions neurologiques associées	Toujours	Aucune
4. Pronostic	Très mauvais	Bon
5. Ictère	Marqué	Classiquement peu présent
6. Bilirubinémie	10 à 44 mg/dL soit 170 à 750 $\mu\text{mol/L}$	2 à 15 mg/dL soit 34 à 250 $\mu\text{mol/L}$
7. Test fonctionnel	Diminution de l'excrétion de la bilirubine	Diminution de l'excrétion de la bilirubine
8. Autres tests hépatiques	Normaux	Normaux
9. Signes d'hémolyse	Aucun	Aucun
10. Histologie hépatique	Calculs biliaires intra-canaliculaires	Aucun

Depuis 1952, de nouvelles données sont venues compléter cette description princeps de la maladie de Crigler-Najjar, avec notamment des données biologiques et génétiques sur lesquelles nous reviendrons par la suite.

III.2.2. Aspects cliniques

La maladie de Crigler-Najjar est une affection rare du métabolisme hépatique liée à un déficit permanent d'origine génétique en uridine diphosphate glucuronosyltransférase (EC 2.4.1.17) (Ritter et al., 1992b).

Ainsi, le diagnostic de maladie de Crigler-Najjar exclut toutes les affections touchant la voie métabolique de la bilirubine en aval de la conjugaison hépatique telle que la maladie de Rotor (ictère à bilirubines conjuguée et non

conjuguée dont le substratum moléculaire est encore inconnu) ou la maladie de Dubin-Johnson (ictère chronique familial permanent à bilirubine conjuguée lié à un défaut d'excrétion de la bilirubine par la cellule hépatique). Sont également exclues les autres causes d'ictère à bilirubine non conjuguée telles que les hémolyses corpusculaires (déficit enzymatique en G6PD, déficit en pyruvate kinase, anomalies de l'hémoglobine, maladie de Marchiafava-Micheli, maladie de Blackfan-Diamond) ou extra-corpusculaires (toxiques, mécaniques, immunologiques).

La fréquence de la maladie de Crigler-Najjar est estimée à une naissance sur un million. Il existe cependant des communautés de par le monde où la fréquence de cette maladie est largement supérieure à la fréquence attendue, principalement en raison d'un fort taux de consanguinité.

Sur le plan clinique, il convient de distinguer deux formes de la maladie :

- la maladie de Crigler-Najjar de type I (MIM #218800) correspondant à un déficit enzymatique en UGT1A1 complet et non inductible,
- la maladie de Crigler-Najjar de type II ou syndrome de Arias (MIM #606785) correspondant à un déficit enzymatique en UGT1A1 incomplet et inductible (Arias et al., 1969).

Cliniquement, la maladie se manifeste dès les premières heures de vie par un ictère cutanéomuqueux franc et persistant à bilirubine non-conjuguée. L'absence de manifestations au cours de la grossesse (la bilirubine pendant les périodes embryonnaire et fœtale étant éliminée par le système hépatique maternel via le placenta) contraste fortement avec la précocité de l'ictère en *post partum*. La prise en charge en urgence est identique dans un premier temps pour le type I et pour le type II : réalisation en urgence d'une ou plusieurs exsanguino-transfusions puis photothérapie de 12 heures par jour.

Le caractère inducteur enzymatique du phénobarbital est mis à profit pour distinguer cliniquement le type I du type II. En effet, le phénobarbital permet, chez les enfants atteints de la maladie de Crigler-Najjar de type II, une diminution rapide des concentrations plasmatiques des bilirubines totale et non-conjuguée. Le traitement inducteur enzymatique par le phénobarbital est considéré comme efficace si la bilirubinémie plasmatique décroît des 2/3 en 2 à 3 semaines de traitement. Ainsi, dans le type II, le phénobarbital, traitement relativement simple, permet de maintenir les concentrations de bilirubine plasmatiques au-dessous du seuil de neuro-toxicité. En revanche, ce traitement s'avère totalement inefficace chez les enfants atteints de maladie de Crigler-Najjar de type I.

La principale complication de la maladie de Crigler-Najjar reste l'atteinte neurologique pouvant intervenir à tout âge, aussi bien chez le nouveau-né que chez l'adolescent ou l'adulte, notamment au décours d'une situation favorisant la majoration de l'hyperbilirubinémie telle que les infections, la fatigue les épisodes de jeûne ou le stress ou au décours d'arrêt de la photothérapie. L'ictère nucléaire est caractérisé anatomiquement par des altérations des noyaux gris centraux avec des dépôts de bilirubine (figure 12).

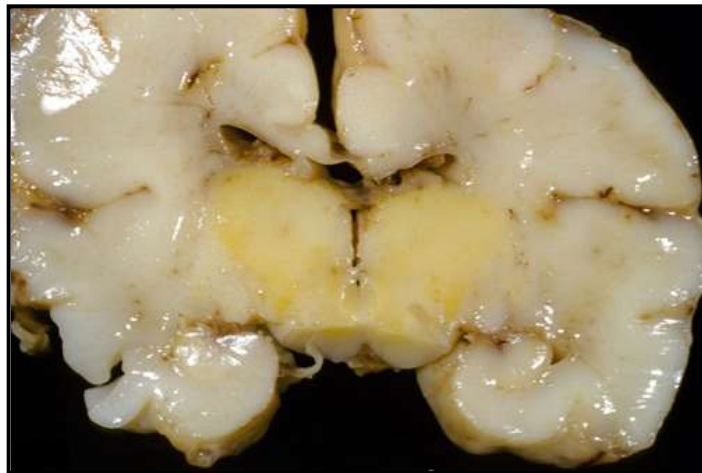


Figure 12. Coupe coronale du cerveau d'un enfant décédé d'un ictère nucléaire.

Cliniquement, outre l'ictère cutanéomuqueux, sont observés une dyspnée, une inappétence, une apathie générale, une hypertonie musculaire avec hyperextension de la nuque (signes extra-pyramidaux), des mouvements athétosiques et un coma. Le décès peut alors survenir en quelques jours. La résolution est possible mais elle est souvent suivie d'une arriération psychomotrice avec un état spastique des membres.

III.2.3. Prise en charge et traitement

La prise en charge médicale et le traitement de la maladie de Crigler-Najjar sont fonction du type d'atteinte. Des recommandations ont été établies dans de nombreux centres de péri-natalité. La prise en charge clinique de l'hyperbilirubinémie non conjuguée doit être la plus précoce possible de manière à réduire les risques de lésions cérébrales :

- photothérapie,
- exsanguino-transfusion.

Les indications sont fonction de l'origine d'hyperbilirubinémie.

La photothérapie s'adresse aux ictères à bilirubine non conjuguée. L'exposition à une lumière bleue (430 à 490 nm) permet de convertir la bilirubine en produits de dégradation hydrosolubles (Mc Donagh et al., 1980). L'efficacité de la photothérapie va dépendre du type de lumière utilisée (longueur d'onde), de la surface cutanée exposée, de la puissance énergétique de la lumière et de la distance entre la source lumineuse et la peau. On distingue trois types de photothérapie :

- la photothérapie maternisée : la peau de l'enfant est soumise à un éclairage faiblement énergétique par le dessous permettant un maintien dans la chambre maternelle et n'imposant pas de protection oculaire,

- la photothérapie conventionnelle : la surface cutanée est soumise à un éclairage énergétique imposant une protection oculaire et du bassin,
- la photothérapie intensive : l'ensemble du corps (éclairage à 360°) est soumis à une lumière intense de forte énergie.

Plusieurs précautions sont à prendre pour éviter les complications telles que lésions oculaires, atteintes gonadiques, arrêt respiratoire ou cardiaque, déshydratation et hyperthermie (surtout chez le nouveau-né).

De récentes données semblent montrer une efficacité supérieure de la lumière fluorescente turquoise sur la lumière bleue pour la réduction de la bilirubinémie (Ebbesen et al., 2003).

L'exsanguino-transfusion est une technique lourde sur le plan transfusionnel, ce qui en réduit fortement les indications.

Dans les hyperbilirubinémies chroniques, des perfusions d'albumine humaine pour maintenir un rapport bilirubine / albumine au-dessous de 0,5 peuvent également être réalisées en complément.

Sur le plan pharmacologique, il existe très peu de possibilités. Dans le type II, le phénobarbital reste une thérapeutique fiable et efficace. Le traitement au long cours, bien toléré, pose peu de problèmes. Dans le type I, il n'existe pas d'agent pharmacologique actif.

A l'heure actuelle, le seul traitement curatif est la transplantation hépatique.

III.2.4. Vivre avec la maladie de Crigler-Najjar

Depuis la description princeps de la maladie en 1952, les progrès dans les connaissances de la maladie de Crigler-Najjar ont été lents mais réguliers. La photothérapie est préconisée depuis 1958 en Grande Bretagne (Cremer et al., 1958) mais il a fallu attendre 1968 pour que les Etats-Unis en reconnaissent les bénéfices (Lucey et al., 1968). La première greffe hépatique thérapeutique a été réalisée en 1986 à l'université du Nebraska aux Etats-Unis (Kaufman et al., 1986). Le gène responsable a été identifié et cloné en 1992 (Ritter et al., 1992a). Les premiers essais de transplantation de cellules hépatiques ont été réalisés en 1998 (Fox et al., 1998). L'avenir de la thérapeutique de la maladie repose sur la thérapie génique dont les essais chez le rat Gunn sont très encourageants pour une application future à l'Homme (Nguyen et al., 2005 ; Nguyen et al., 2007).

La rareté de la maladie de Crigler-Najjar fait que la majorité des pédiatres, des généticiens et des hépatologues ne rencontrera jamais de patients atteints par cette affection. L'annonce de cette maladie n'en sera alors que plus difficile pour les parents. La mise en place en France des Centres de Référence des Maladies Rares permet d'apporter, non seulement aux cliniciens mais

également aux familles, des réponses à leurs questionnements. Ces équipes pluridisciplinaires offrent des compétences cliniques, biologiques, éducatives psychologiques et sociales (centre de Référence des Maladies Héréditaires du Métabolisme Hépatique, Pr Philippe Labrune, hôpital Antoine Béclère). Les associations de malades apportent un soutien essentiel aux familles touchées par la maladie (Association française de Crigler-Najjar, <http://crigler-najjar.9online.fr>).

En dehors de toute thérapeutique, l'espérance de vie des enfants atteints de maladie de Crigler-Najjar ne dépasse pas 5 ans. Si la greffe hépatique a permis de guérir des patients, certains d'entre eux n'ont pu en bénéficier soit par absence de donneur compatible, soit par choix face aux risques de la greffe. Ainsi, il existe très peu de grossesses rapportées : trois chez des patientes présentant une maladie de type II (Smith et al., 1994 ; Ito et al., 2001 ; Holstein et al., 2005) et deux chez des patientes présentant une maladie de type I (Taylor et al., 1991 ; Gajdos et al., 2006). Bien que dans les cas rapportés les grossesses se soient déroulées sans problèmes majeurs et que les enfants aillent bien, le faible nombre de publications ne permet pas de conclure à une totale innocuité de la maladie de Crigler-Najjar maternelle pour l'enfant au cours de la grossesse. De telles situations doivent donc toujours être très suivies sur le plan obstétrical pour la mère et sur le plan néonatalogique pour l'enfant.

III.4. Conséquences et risques liés aux hyperbilirubinémies

Si la bilirubine à faible concentration peut exercer un effet protecteur cellulaire par ses propriétés anti-oxydantes, elle constitue à forte concentration un toxique, notamment pour le système nerveux central.

III.4.1. Toxicité cellulaire de la bilirubine

Lorsque la bilirubine n'est pas en concentration saturante des sites de fixation sur l'albumine, plus de 99.9 % de la bilirubine non conjuguée sont liés à l'albumine. Lorsque ces capacités sont dépassés, de la bilirubine non conjuguée libre se retrouve dans le plasma, pouvant alors endommager le système nerveux central.

La bilirubine non conjuguée a des effets inhibiteurs sur le système nerveux et même de courtes expositions peuvent perturber à long terme la transmission synaptique dans l'hippocampe. Par ailleurs, elle augmente la libération du glutamate par les astrocytes dans l'espace synaptique, ce qui est à l'origine d'une hyperstimulation des récepteurs NMDA-1. Cette hyperstimulation toxique induit des influx cellulaires de Na⁺, de Ca²⁺, de Cl⁻ et d'eau à l'origine d'un gonflement cellulaire responsable d'apoptose et de nécrose. Ces troubles de l'homéostasie cellulaire sont également probablement à relier à l'action directe de la bilirubine sur les membranes cellulaires (perméabilité

membranaire, déperdition de lipides, réorganisation des protéines) (Ostrow et al., 2004).

Ces altérations membranaires sont également observées au niveau mitochondrial. La perméabilisation des membranes mitochondriales entraîne un gonflement cellulaire et une libération dans le cytosol du cytochrome c aboutissant, via l'activation de la caspase-3, à la mort cellulaire par apoptose (Ostrow et al., 2004).

Il existe plusieurs mécanismes de protection des cellules du système nerveux face à la bilirubine :

- la barrière hémato-céphalique et les plexus choroïdes constituent deux blocages au passage des petites molécules,
- plusieurs canaux de la famille OATP interviendraient dans le transport de la bilirubine (non clairement élucidé),
- MRP1 pourrait intervenir dans l'élimination active de la bilirubine non conjuguée du système nerveux central vers la circulation sanguine.

Les différences d'expression et/ou de fonction de MRP1 pourraient expliquer les différences de sensibilité des différentes structures cérébrales à l'hyperbilirubinémie.

III.4.2. Conséquences dermatologiques et digestives

L'hyperbilirubinémie est suspectée sur le plan clinique chez un patient présentant une coloration jaune plus ou moins intense de la peau et des muqueuses. Classiquement, un subictère (ictère modéré se manifestant par une coloration jaune des conjonctives) est observé pour des concentrations de bilirubine plasmatique comprises entre 25 et 50 $\mu\text{mol/L}$ alors qu'un ictère franc est observé pour des concentrations de bilirubine plasmatique supérieures à 50 $\mu\text{mol/L}$. Contrairement à l'ictère à bilirubine conjuguée, l'ictère à bilirubine non conjuguée n'entraîne pas de prurit. Les selles sont normalement colorées.

III.4.3. Conséquences neurologiques

Dans les ictères intenses à bilirubine non conjuguée, la bilirubine libre va atteindre électivement certaines structures centrales. Classiquement, les séquelles de l'hyperbilirubinémie néonatale regroupent 4 signes :

- une paralysie athétoïde,
- une surdité ou d'une perte de l'audition,
- une diminution de la vision droite,
- une dysplasie de l'émail des premières dents.

Ces signes sont les conséquences directes des lésions induites par la bilirubine sur les noyaux subthalamiques du globus pallidus, sur les noyaux cellulaires des nerfs auditifs et occulo-moteurs (figure 13). D'autres régions cérébrales sont classiquement affectées par l'hyperbilirubinémie comme le cervelet (en particulier les cellules de Purkinje) et l'hippocampe (Shapiro, 2003).

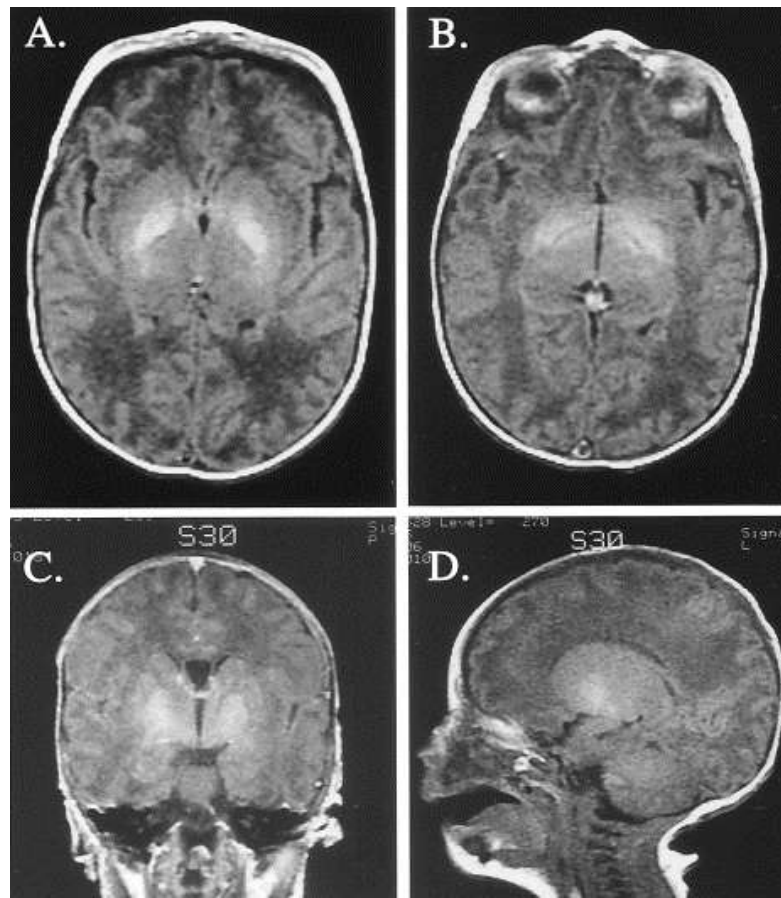


Figure 13. Imagerie par résonance magnétique d'un enfant mâle de 6 jours né à 37 SA et présentant une hyperbilirubinémie totale à $610 \mu\text{mol/L}$. Images A et B en coupe axiale (T1, TR 500, TE 12). Image C en coupe coronale (TR600, TE 34). Image D en coupe sagittale (TR 450, TE 12). On note un hypersignal bilatéral du globus pallidus (actuellement âgé de 7 ans, cet enfant présente un développement intellectuel normal, un handicap modéré avec dystonie et athétosie ; il marche avec un déambulateur). D'après Shapiro, 2003.

Les manifestations neurologiques sont fonction de l'intensité de l'hyperbilirubinémie et de la rapidité de sa prise en charge médicale.

Risques à court terme de l'encéphalopathie bilirubinémique aiguë

Elle se rencontre principalement chez les nouveau-nés mais peut survenir à tout âge dans les pathologies de conjugaison de la bilirubine. Les premiers signes sont peu spécifiques avec une léthargie et une diminution de l'appétit. Puis les signes neurologiques progressent vers l'hypertonie, une hyperextension du cou et l'opisthotonos avec fièvre et contractures aboutissant au décès.

Risques à long terme de l'encéphalopathie bilirubinémique aiguë et des hyperbilirubinémies modérées

Les conséquences à long terme de l'encéphalopathie bilirubinémique aiguë vont de la surdité avec paralysie athétoïde sévère au retard mental modéré avec troubles cognitifs légers et troubles de l'audition.

IV. Diagnostic biologique des anomalies de la conjugaison de la bilirubine

Le diagnostic biologique des hyperbilirubinémies non conjuguées repose sur différentes techniques de dosage de la bilirubine qui devront, le cas échéant, être complétées par le dosage de l'albumine pour évaluer les risques d'hyperbilirubinémie toxique. Dans des cas particuliers, le dosage de l'activité enzymatique de UGT1A1 pourra apporter une réponse supplémentaire.

IV.1. Dosage biologique des différentes formes de bilirubine

Le diagnostic de l'hyperbilirubinémie est purement biologique. Les méthodes de dosage de la bilirubine devront tenir compte des différentes formes de bilirubine et être capables au minimum de doser la bilirubine totale et la bilirubine conjuguée. Plusieurs méthodes de dosage des différentes formes de bilirubine sont actuellement disponibles. La mesure des dérivés mono- et di-conjugués peut présenter un intérêt supplémentaire même si l'interprétation reste difficile chez le nouveau-né présentant une immaturité physiologique de l'activité bilirubine-glucuronosyltransférase.

Dosage en chimie liquide : exemple de l'analyseur multiparamétrique AU640© (Olympus™)

Le dosage de la bilirubine repose sur une réaction de conjugaison et sur une lecture spectrophotométrique. La bilirubine directe (c'est-à-dire pouvant être dosée directement par réaction de diazotation) se lie à un sel de diazonium en milieu acide (3,5-dichlorophényl-tétrafluoroborate de diazonium) pour former l'azobilirubine. L'absorbance à 570 nm est proportionnelle à la concentration en bilirubine directe. Pour le dosage de la bilirubine totale, il est nécessaire de réaliser l'étape de conjugaison en présence d'un accélérateur (caféine et surfactant). La bilirubine indirecte est alors calculée par différence entre la bilirubine totale et la bilirubine directe. Dans cette technique, la bilirubine conjuguée est assimilée à la bilirubine directe et la bilirubine non-conjuguée à la bilirubine indirecte (approximation valable dans la plupart des cas).

Dosage en chimie sèche : exemple de l'analyseur multiparamétrique Vitros 950© (OrthoClinical Diagnostics™)

Le système de chimie sèche Vitros© est capable de mesurer directement plusieurs formes de bilirubine (bilirubines totale, conjuguée et non-conjuguée) permettant ainsi le calcul de la bilirubine delta correspondant à la bilirubine liée par covalence à l'albumine (Lauff et al., 1982). Le dosage est donc réalisé en deux temps : une première plaque (appelée TBIL) va mesurer la bilirubine totale puis une seconde plaque va mesurer la bilirubine conjuguée (Bc) et la bilirubine non-conjuguée (Bu). En théorie, $TBIL=Bc+Bu$; la présence de bilirubine delta étant improbable chez l'adulte ou le nouveau-né en bonne santé. En pratique, il est fréquent de trouver une différence entre TBIL et Bc+Bu. En l'absence d'atteinte hépatique et si les valeurs mesurées se situent dans les valeurs de référence, cette différence ne doit pas être interprétée comme de la bilirubine delta mais est à relier soit à l'addition des variabilités individuelles de chaque dosage soit à la présence d'interférences comme l'hémolyse et/ou à la photodégradation de la bilirubine. Pour obtenir une certaine cohérence entre les différentes méthodes de dosage chez l'adulte et l'enfant (sauf le nouveau-né), la bilirubine totale et la bilirubine non-conjuguée sont mesurées (respectivement) par les plaques TBIL et Bu et la bilirubine directe est calculée ($DBIL=TBIL-Bu$). Chez le nouveau-né de moins de 15 jours, pour éviter toute interférence avec la bilirubine delta, le fabricant recommande une approche différente où ne sont mesurées que la bilirubine conjuguée (Bc) et la bilirubine non-conjuguée (Bu), la bilirubine néonatale étant alors calculée ($NBIL=Bc+Bu$). La valeur clinique d'une telle distinction ne semble cependant pas clairement établie (Langbaum et al., 1992).

Dosage spectrophotométrique : exemple de l'analyseur des gaz du sang ABL850© (Radiometer™)

Le dosage de la bilirubine totale est réalisé par mesure optique et corrigé selon la relation suivante :

$$ctBil(P)=ctBil(B)/(1-Hct(calc)) \text{ où}$$

ctBil(P) représente la concentration en bilirubine totale,

ctBil(B) représente la concentration en bilirubine mesurée après hémolyse de l'échantillon,

Hct(calc) représente l'hématocrite calculé.

Cette technique de dosage ne permettant de mesurer que la bilirubine totale, elle n'est pas utilisée en pratique quotidienne dans le suivi et le diagnostic des hyperbilirubinémies néonatales.

Dosage par chromatographie liquide haute performance

Les premières séparations de la bilirubine sur colonne chromatographique ouverte sans étape de déprotéinisation ont été réalisées dès 1966 par Kuenzle et collaborateurs (Kuenzle et al., 1966). Quatre fractions de bilirubine ont été obtenues et caractérisées : la bilirubine non-conjuguée (α), la bilirubine mono-conjuguée (β), la bilirubine di-conjuguée (γ) et la bilirubine liée de façon covalente à l'albumine (δ). Par la suite, la chromatographie liquide haute performance a permis de dépasser les problèmes posés par l'instabilité de la

bilirubine et de ses métabolites. Plusieurs méthodes de purification des fractions ont été mises au point pour des dosages chromatographiques. La méthode utilisant des standards de bilirubines non-conjuguée, mono- et di-conjuguée mise au point par Lauff et collaborateurs reste la technique de dosage de référence, bien qu'elle ne puisse pas, pour des raisons pratiques, être utilisée en pratique quotidienne (Lauff et al., 1981).

IV.2. Dosage biologique de l'albumine sérique

Dans l'évaluation des risques d'ictère nucléaire au cours des épisodes d'hyperbilirubinémie, le dosage de l'albumine sérique permet de calculer le rapport bilirubine/albumine et donc de déterminer la fraction de bilirubine non-conjuguée libre.

$$\begin{aligned} & \text{Facteurs de conversion :} \\ & \text{bilirubine : mg/dL} * 17.1 = \mu\text{mol/L,} \\ & \text{albumine : g/L} * 14.49 = \mu\text{mol/L.} \end{aligned}$$

Dosage par néphélométrie : exemple de l'analyseur BNII© (Dade Behring™)

L'albumine forme, avec des anticorps spécifiques, des immuno-complexes. L'absorption lumineuse du mélange réactionnel qui se trouve ainsi augmentée est mesurée par photométrie. La vitesse maximale de réaction et le temps nécessaire à l'obtenir sont fonction de la concentration en albumine. Ces paramètres mesurés sont comparés à une courbe de référence, ce qui permet de calculer la concentration en albumine. Le rapport bilirubine sur albumine est obtenu avec la relation bilirubinémie en $\mu\text{mol/L}$ / albuminémie en $\mu\text{mol/L}$. La prévention de l'ictère nucléaire passe par le maintien de ce rapport au-dessous du seuil de 0,5.

IV.3. Dosage biologique de l'activité enzymatique de UGT1A1

Si le dosage de la bilirubine est utile dans l'orientation et le suivi, le diagnostic de certitude ne pourra être réalisé que sur l'étude de l'activité enzymatique bilirubine glucuronosyltransférase.

Mesure de l'activité hépatique bilirubine glucuronosyltransférase (Ritter et al., 1990 ; Ritter et al., 1993)

La mesure de l'activité bilirubine glucuronosyltransférase est réalisée à partir de microsomes d'hépatocytes ou à partir d'homogénats de cellules transfectées avec un plasmide contenant le gène *UGT1A1*. Dans le milieu réactionnel sont ajoutés de l'acide UDP-glucuronique marqué au carbone 14 et de la bilirubine. Après une incubation sans exposition à la lumière et arrêt de la réaction par addition d'éthanol, les différentes formes de bilirubine sont purifiées puis séparées par chromatographie en couche mince. La détermination

des différentes fractions de bilirubine obtenues au cours de l'expérience se fait par mesure de la radioactivité émise par le carbone 14 incorporé.

- La réalisation de la mesure de cette activité pose deux problèmes majeurs :
- étant donné la spécificité tissulaire de cette enzyme, la mesure de cette activité ne peut être réalisée qu'à partir d'une ponction-biopsie hépatique,
 - la maladie de Crigler-Najjar va se manifester dans les premières heures ou les premiers jours de vie or, à la naissance, l'activité bilirubine glucuronosyltransférase est immature et n'atteindra son activité complète que vers trois mois.

Il en résulte donc que, si cette mesure reste la seule permettant d'évaluer l'importance du déficit enzymatique, elle est assez difficilement applicable en pratique quotidienne pédiatrique. La pratique du diagnostic de la maladie de Crigler-Najjar a été totalement modifiée grâce aux développements des techniques de biologie moléculaire.

V. Les modes de transmission des maladies génétiques

Depuis les travaux de Gregor Mendel, la connaissance des maladies génétiques a beaucoup évolué, apportant ainsi des réponses à des maladies dont la transmission ne pouvait répondre aux lois mendéliennes.

Le syndrome de Gilbert et la maladie de Crigler-Najjar sont des maladies mendéliennes autosomiques récessives.

V.1. Les lois de Mendel

Les travaux du moine Johann Gregor Mendel sont à l'origine de la génétique moderne. Ces travaux sur les caractères des petits pois sont d'une approche révolutionnaire. Son sens méthodologique aigu lui a permis, plus de cent ans avant la description du support chimique de l'hérédité, de déterminer trois lois de transmission des caractères génétiques.

1^{ère} loi de Mendel

Homogénéité et réciprocité : chaque parent contribue à part égale et pour moitié au génotype de la génération suivante.

Ainsi, en croisant deux individus homozygotes pour un caractère mais présentant chacun une version différente au locus d'intérêt, la deuxième génération comporte 100 % d'individus hétérozygotes.

[AA] x [aa] donne 100 % de [Aa]

2^{ème} loi de Mendel

Ségrégation et pureté des gamètes : chaque gamète ne contient qu'un seul facteur héréditaire pour un caractère donné soit une seule version de chaque locus d'intérêt.

Ainsi, en croisant deux individus hétérozygotes pour un caractère donné, la deuxième génération comporte 25 % d'individus homozygotes pour chacune des deux versions différentes du locus d'intérêt et 50 % d'individus hétérozygotes.

$[Aa] \times [Aa]$ donne 25 % de $[AA]$, 25% de $[aa]$ et 50 % de $[Aa]$

3^{ème} loi de Mendel

Libre combinaison des gènes : deux caractères placés sous le contrôle de deux gènes vont ségréger indépendamment.

Cette loi a été remise en question et suit en fait une loi statistique : plus deux loci sont proches et plus la probabilité qu'ils ségrégent ensemble est élevée. Ainsi, deux loci doivent être suffisamment éloignés et non liés pour être considérés comme indépendants.

Les lois de Mendel sont toutes des conséquences de la méiose. Des individus diploïdes produisent des gamètes haploïdes qui, en fusionnant, donnent un nouvel individu original diploïde. Les individus diploïdes produisent en quantité égale des gamètes haploïdes portant soit un allèle d'origine paternelle soit un allèle d'origine maternelle. La méiose est toujours accompagnée d'une étape de recombinaison entre les chromosomes appariés au cours de la prophase de 1^{ère} division de méiose.

V.2. Les maladies mendéliennes

Les maladies dont le mode de transmission suit les lois de Mendel sont des maladies à retentissement phénotypique important et à mode de transmission simple. Les caractéristiques sont déduites de l'étude de l'arbre généalogique, d'où l'intérêt de disposer de familles de malades pour ce type d'études.

Ces maladies peuvent être :

- transmises par un autosome (hérédité autosomique) : un chromosome d'une des paires 1 à 22 (tableau 4),
- transmises par le chromosome X (hérédité liée à l'X) : expression variable selon la maladie et le sexe de l'individu porteur (tableau 5),
- transmises par le chromosome Y (hérédité holandrique) : expression uniquement chez les garçons.

Tableau 4. Caractéristiques des maladies autosomiques dominantes ou récessives.

	Dominant	Récessif
Transmission	verticale	horizontale
Génération	pas de saut	sauts de génération
Sexe atteint	même probabilité pour les deux	
Sexe transmetteur	même probabilité pour les deux	
Descendance	sains => enfants sains	atteints => enfants atteints
Ascendance	atteint => 1 parent atteint	atteint => parents sains ou atteints

Tableau 5. Caractéristiques des maladies liées à l'X dominantes ou récessives.

	Dominant	Récessif
Transmission	jamais de père à fils	
Sexe atteint	filles et garçons	garçons >>>> filles
Sexe transmetteur	les deux	la mère
Descendance	sains => sains	variable
Ascendance	père : toutes les filles mère : un enfant sur deux	père : fille si mère hétérozygote mère : tous les garçons

La maladie peut prendre plusieurs formes d'expression possibles :

- caractère dominant : la maladie s'exprime même si l'individu ne possède qu'un allèle muté au locus morbide, soit par effet délétère de la protéine mutée sur la protéine normale soit par haplo-insuffisance,
- caractère récessif : la maladie ne s'exprime que s'il n'existe aucune version normale du gène au locus morbide (d'où le cas particulier des maladies liées à l'X chez les garçons),
- pénétrance variable : le déficit protéique induit par la ou les mutations peut être plus ou moins compensé par d'autres gènes ou par des phénomènes adaptatifs.

Il existe environ 4500 maladies génétiques mendéliennes dont > 60 % sont autosomiques dominantes, ~ 30 % sont autosomiques récessives et < 10 % sont liées au chromosome X. Beaucoup sont létales (touchant des voies métaboliques) ou responsables de fausses couches.

Sur un plan évolutionniste, les maladies génétiques graves et fréquentes à expression précoce devraient ou auraient dû disparaître ou *a minima* atteindre un niveau d'équilibre entre disparition et néomutation. Cependant, certaines de ces maladies se sont maintenues dans l'espèce humaine à un taux élevé par un rééquilibrage entre pressions de sélection positive et négative. Ainsi une maladie génétique pourtant délétère peut apporter un facteur de résistance face à un autre fléau (par exemple infectieux) et donc sélectionner les patients

porteurs de l'anomalie génétique dans une population réduite (goulot d'étranglement). Un des principaux exemples reste la compétition entre drépanocytose et malaria (Allison, 1954).

V.3. Les difficultés lors du conseil génétique

La fréquence des maladies mendéliennes suit une loi statistique :

- pour une maladie dominante, si un des parents est atteint, la probabilité pour qu'un enfant soit atteint est de 50 %,
- pour une maladie récessive, si les deux parents sont hétérozygotes, la probabilité pour qu'un enfant soit atteint est de 25 %.

Ces risques chiffrés sont applicables pour chaque enfant. Ainsi, dans le cas d'une maladie dominante, le risque est de 50 % à chaque grossesse et non pour l'ensemble de la fratrie. Ce point est extrêmement important à expliquer aux parents lors d'un conseil génétique.

En l'absence d'analyse génétique donnant une estimation précise du risque de transmission d'une maladie génétique, le conseil génétique doit tenir compte des notions de consanguinité pouvant augmenter de manière significative le risque.

Lorsqu'une maladie génétique, notamment dominante, est diagnostiquée chez un enfant mais qu'aucune anomalie génétique n'est retrouvée chez les parents biologiques, il faut envisager deux situations pour lesquelles le conseil génétique sera radicalement différent :

- une néomutation survenue au cours de la gamétogenèse ou dans les premiers stades du développement embryonnaire : le risque de récurrence est alors très faible,
- la présence d'une mosaïque germinale chez l'un des parents : l'estimation du risque de récurrence est alors très difficile chez l'homme voire impossible chez la femme.

V.4. Les maladies non mendéliennes

L'évolution des connaissances médicales a permis de lier de nombreuses maladies à des caractéristiques génétiques dont la transmission ne répondait pas aux lois de Mendel.

Les maladies polygéniques ont une expression phénotypique liée au nombre de gènes atteints. Ces gènes peuvent ségréger ensemble ou séparément. L'exemple typique de ces maladies est la thalassémie α . La synthèse protéique des chaînes de globine α de l'hémoglobine est placée sous la dépendance de deux gènes placés en tandem soit quatre allèles. L'expression phénotypique de la maladie sera donc fonction du nombre d'allèles atteints (de 1 à 4), de la nature *cis* ou *trans* des anomalies génétiques observées et de la nature même des

anomalies (absence totale de synthèse protéique ou synthèse d'une protéine à activité réduite) (Bernini and Harteveld, 1998).

Les maladies polyfactorielles sont observées chez des individus ayant une susceptibilité génétique à développer la maladie lorsqu'ils sont placés dans un environnement à risque. De nombreuses maladies comme par exemple le diabète (Bartsocas and Gerasimidi-Vazeou, 2006) ou les maladies auto-immunes (Jacobson and Tomer, 2007) sont liées à la fois à une susceptibilité individuelle d'ordre génétique et à un environnement défavorable (qu'il soit social, alimentaire, écologique ...).

Les maladies mitochondriales représentent un champ particulier de la génétique. En effet, l'ADN mitochondrial code des protéines majoritairement de la chaîne respiratoire dont les déficits sont responsables de maladies métaboliques importantes (Zeviani and Carelli, 2007). La transmission des maladies mitochondriales se fait de la mère à tous ses enfants, les mitochondries provenant uniquement de l'ovocyte.

Bien que rares sur l'ensemble du génome, les gènes peuvent se trouver au niveau de points de cassure de remaniements chromosomiques (translocations, inversions, cassures, remaniements inter ou intrachromosomiques). Ainsi, plusieurs maladies dues à des remaniements chromosomiques cassant des gènes ont été rapportés et ont permis, bien avant le séquençage du génome humain, de localiser ces gènes dans le génome.

L'expressivité des pathologies liées à l'empreinte parentale n'est pas fonction de la présence d'une anomalie de la séquence mais est due à une modification chimique et héritable de la molécule d'ADN ou des protéines de son environnement. La notion d'empreinte parentale a été élaborée à partir des observations d'embryons de souris avec deux noyaux mâles (androgénotes) ou avec deux noyaux femelles (gynogénotes) (figure 14).

La transmission des anomalies liées à l'empreinte parentale sera fonction du sexe du parent transmetteur et de celui de l'enfant.

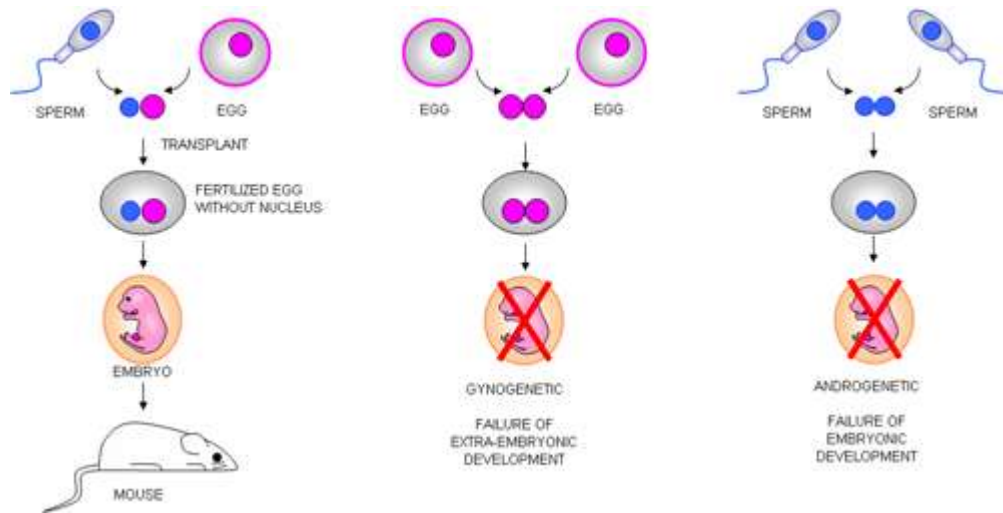


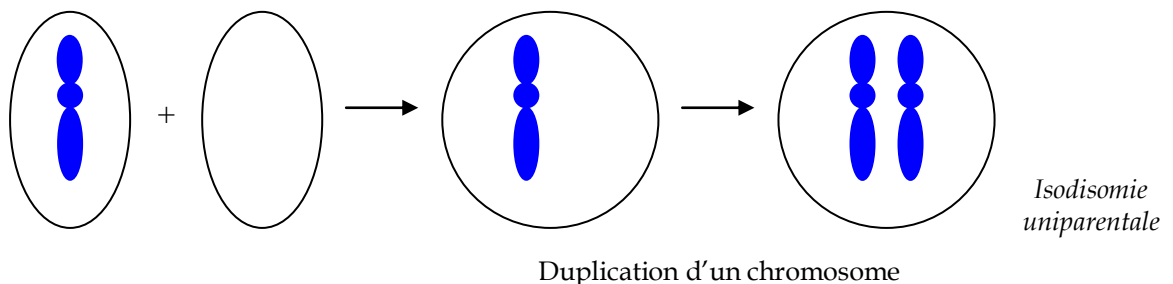
Figure 14. Conséquences phénotypiques des embryons gynogénètes (au milieu) et androgénètes (à droite).

Ces observations ont conduit à la conclusion que les deux demi-génomés n'étaient pas équivalents en termes d'implication dans le développement de l'embryon et des annexes. Ce mécanisme suppose donc qu'il y ait une modification chimique de l'ADN dépendante du sexe du parent et que cette modification soit héritable au fur et à mesure des divisions cellulaires mais réversible lors de la gamétogenèse (Wrzeska and Rejduch, 2004).

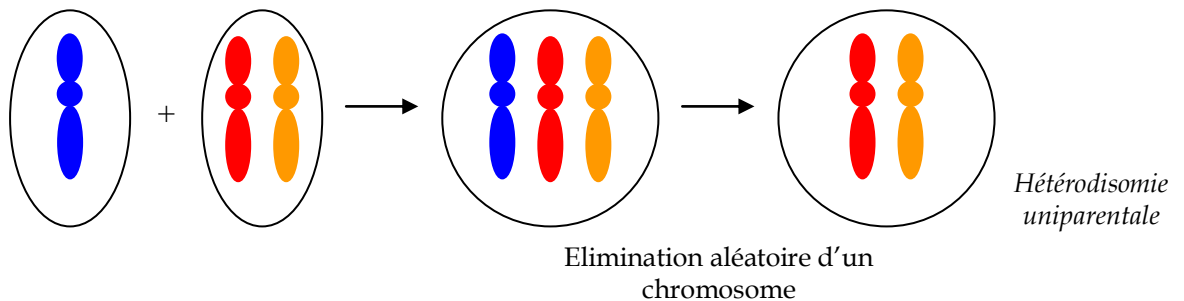
Les syndromes de Prader-Willi et Angelman représentent un exemple caractéristique des maladies liées à l'empreinte parentale (Nicholls, 1993).

Parmi les anomalies génétiques responsables de maladies liées à l'empreinte parentale, la plus fréquente est la disomie uniparentale (hétérodisomie ou isodisomie). Trois mécanismes associant toujours deux phénomènes méiotiques et/ou mitotiques sont responsables de la présence de deux chromosomes d'une même paire ayant la même origine parentale chez un individu :

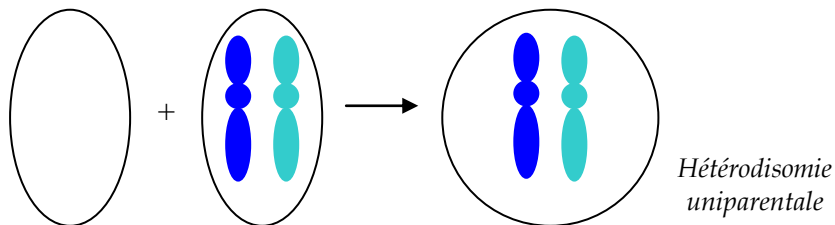
- correction de monosomie : un gamète monosomique est fécondé par un gamète nullisomique puis l'œuf corrige la monosomie en dupliquant le chromosome présent (isodisomie),



- correction de trisomie : un gamète monosomique est fécondé par un gamète disomique puis l'œuf corrige la trisomie en éliminant un des chromosomes surnuméraires (isodisomie ou hétérodisomie),



- complémentation gamétique : un gamète nullisomique est fécondé par un gamète disomique (isodisomie ou hétérodisomie).



La présence chez un même individu de deux chromosomes ayant la même origine parentale pourra également être révélée par une maladie récessive chez un enfant dont un seul de parents est porteur (à l'état hétérozygote ou homozygote) d'une anomalie de séquence.

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

Depuis la découverte du gène *UGT1A1* en 1992 par Ritter et collaborateurs, plus de 90 anomalies de séquence ont été rapportées chez des patients présentant une maladie de Crigler-Najjar de type I ou II.

Après le rappel des règles de nomenclature des anomalies génétiques et des notions de génétique de population, nous présenterons l'organisation du diagnostic moléculaire de la maladie de Crigler-Najjar utilisée dans ce travail et la méthodologie employée.

I. Les règles de nomenclature des anomalies génétiques

Pour faciliter la communication scientifique en matière de génétique moléculaire, Antonarakis et le groupe de travail sur la nomenclature ont établi des recommandations sur la désignation des anomalies génétiques (Antonarakis, 1998 ; den Dunnen and Antonarakis, 2000 ; den Dunnen and Antonarakis, 2001).

Le terme « mutation » doit être exclusivement réservé à la désignation de la substitution d'un acide nucléique par un autre. Le terme générique désignant toute modification de la séquence nucléique par rapport à la séquence de référence est « anomalie génétique ». Les différents types d'anomalies génétiques observés sont :

- la mutation : remplacement d'un nucléotide par un autre,
- la délétion : disparition d'un ou plusieurs nucléotides (avec ou sans décalage du cadre de lecture),
- l'insertion : ajout d'un ou plusieurs nucléotides (avec ou sans décalage du cadre de lecture),
- la délétion-insertion : disparition d'un ou plusieurs nucléotides et ajout d'un ou plusieurs acides nucléiques (avec ou sans décalage du cadre de lecture),
- l'inversion : retournement de la séquence sans perte ni ajout de nucléotides,

- la duplication (la répétition d'une même séquence ne doit pas être désignée comme une insertion mais comme une duplication).

Concernant les anomalies de séquence de l'ADN, les acides nucléiques sont désignés selon le code à une lettre : A (adénine), T (thymine), G (guanine), C (cytosine). La numérotation des acides nucléiques est fonction de la séquence de référence. Pour les séquences établies à partir de l'ARN messager et retro-transcrit en ADNc :

- toutes les anomalies de séquence sont précédées de la lettre clé c.,
- l'adénine du codon méthionine de départ est numérotée 1,
- le nucléotide en 5' du codon de départ est numéroté -1 (pas de nucléotide 0),
- le nucléotide en 3' du codon stop est numéroté *1,
- les nucléotides introniques sont numérotés à partir du dernier nucléotide de l'exon précédent puis +1, +2 etc. ou à partir du premier nucléotide de l'exon suivant puis -1, -2 etc.

Pour les séquences établies à partir de l'ADN génomique :

- toutes les anomalies de séquences sont précédées de la lettre clé g.,
- la numérotation se fait de manière arbitraire avec 1, 2, 3 etc. en 3' et -1, -2, -3 etc. en 5',
- tous les nucléotides sont numérotés à la suite, y compris les nucléotides introniques et non géniques (tableau 6).

Concernant les anomalies de séquence de la protéine, les acides aminés sont désignés selon le code à trois lettres et le stop par un X. La méthionine de départ est numérotée 1. Pour les anomalies de séquence avec décalage du cadre de lecture, le premier acide aminé modifié est noté puis la position relative du nouveau stop par rapport au premier acide aminé modifié est notée avec « fsX » (tableau 6).

Tableau 6. Nomenclature pour la désignation des anomalies génétiques et peptidiques selon Antonarakis.

Anomalie	Au niveau de l'ADN	Au niveau protéique
Mutation faux-sens	c.1070A>G	p.Gln357Arg
Mutation non-sens	c.576C>G	p.Tyr192X
Délétion	c.397_402delCAACAA	p.Asn133_Lys134del
Insertion	c.470_471insT	p.Lys125_Asp126insLeu
Délétion-insertion	c.1160_1161delCCinsGT	p.Gly85delinsLeuTyr
Duplication	c.-41_-40dupTA	p.179Phedup
Mutation frameshift		p.Lys407ArgfsX5
Modification d'épissage	c.864G>C	splicing

II. Notions de génétique des populations

La génétique des populations permet de définir les fréquences des gènes et des génotypes, essentielles pour chiffrer les risques des maladies génétiques et donc pour le conseil génétique.

II.1. La loi de Hardy et Weinberg

La loi de Hardy et Weinberg permet de définir les fréquences des génotypes dans la population à partir des fréquences alléliques. Pour pouvoir appliquer la loi de Hardy et Weinberg, plusieurs conditions doivent être respectées :

- l'effectif de la population doit être illimité ou de très grande taille,
- les mariages doivent se faire au hasard, sans tenir compte du génotype,
- il ne doit pas y avoir de migration de population brutale,
- il ne doit pas y avoir de sélection naturelle : tous les génotypes doivent être également viables et féconds,
- il ne doit pas y avoir de néomutation,
- la méiose doit pouvoir se faire normalement avec une ségrégation indépendante des allèles.

Si ces conditions sont respectées, les fréquences des allèles et des génotypes sont stables et la population est en équilibre.

Pouvons-nous appliquer la loi de Hardy et Weinberg à la maladie de Crigler-Najjar au niveau de la population mondiale ? En s'intéressant à la population mondiale, il paraît légitime de considérer la population comme illimitée (1^{ère} condition). A l'échelle de l'humanité, il est possible de considérer que les mariages se font au hasard (la présence à l'état hétérozygote d'allèles responsables de la maladie de Crigler-Najjar ne modifie pas le phénotype et n'entraîne pas de « sélection négative » au mariage ; 2^{ème} condition) et qu'il n'y a pas de migration de population brutale (3^{ème} condition). A priori, tous les génotypes hétérozygotes sont également viables et féconds (4^{ème} condition) et la méiose doit pouvoir se faire sans sélection d'allèles (6^{ème} condition).

Nous allons pouvoir appliquer la loi de Hardy et Weinberg à la maladie de Crigler-Najjar et ainsi calculer la fréquence des hétérozygotes.

La fréquence de la maladie est estimée à 1 naissance sur un million.

Soit p la fréquence du génotype sauvage et q la fréquence du génotype muté, on détermine q^2 comme étant la fréquence des homozygotes mutés, p^2 la fréquence des homozygotes sauvages et $2pq$ la fréquence des hétérozygotes.

Donc $q^2 = 1 / 1000000$ d'où $q = 1 / 1000$

Sachant que $p + q = 1$, $p = 999 / 1000$

Donc la fréquence de l'allèle sauvage est de $999/1000$ et celle de l'allèle muté est de $1/1000$

La fréquence des génotypes est alors :

Homozygotes malades : $q^2 = 1 / 1000000$

Homozygotes sauvages : $p^2 = 998001 / 1000000$ soit environ 998 / 1000

Hétérozygotes : $2pq = 1998 / 1000000$ soit environ 2 / 1000

Si on considère que la maladie de Crigler-Najjar est à l'équilibre, on peut estimer que les pertes liées à la sélection naturelle sont compensées par les néomutations. Dans la maladie de Crigler-Najjar, l'espérance de vie en dehors de tout traitement est limitée à la petite enfance, donc avant l'âge reproductif. On peut donc considérer que le coefficient d'adaptation est très proche de 0 d'où une sélection s proche de 1. Ainsi, la variation de la fréquence de l'allèle muté peut être estimé avec la relation $\Delta q = -sq^2$ soit $\Delta q = -1 / 1000000$. Ainsi, le taux de néomutation peut être estimé à 10^{-6} . Ce premier élément permet de conclure que ni la sélection naturelle ni le dépistage anténatal ne pourront faire disparaître la maladie. De même, les traitements apportés aux patients atteints de la maladie de Crigler-Najjar ne modifieront pas la fréquence de la maladie.

II.2. La théorie de l'effet fondateur

Avec la reproduction sexuée et la méiose, un individu ne transmet que la moitié de ses gènes à chaque descendance. Ainsi, pour qu'il transmette la totalité de ses gènes, il faut que la descendance tende statistiquement vers l'infini. En conséquence, des variants alléliques vont systématiquement se perdre au fur et à mesure des générations (d'autant plus s'il n'y a pas de descendance) alors que d'autres vont voir leur fréquence augmenter. Cette observation sera d'autant plus vraie que la population sera réduite (d'où l'importance de la taille infinie de la population dans la validation de la loi de Hardy et Weinberg).

Lorsqu'il y a un isolement reproducteur (parce qu'un groupe d'individus se sépare de la population générale pour coloniser de nouveaux territoires ou parce qu'il s'isole culturellement dans des communautés restreintes), une fraction de la variété allélique de la population d'origine va acquérir une indépendance d'évolution. Ainsi, dans une population donnée vont apparaître des effets fondateurs qui, si l'isolement reproducteur est total, pourront conduire à un phénomène de spéciation.

Dans la théorie de l'effet fondateur, la présence à un taux élevé d'un variant allélique particulier dans une population limitée par rapport à la population générale (ou mondiale) est liée à l'introduction ou à la sélection de cet allèle dans une population prenant une autonomie reproductive. Cette théorie a permis d'expliquer la forte prévalence de certaines maladies génétiques dans des populations isolées (physiquement ou culturellement) par rapport au reste de la population.

III. Le diagnostic moléculaire de la maladie de Crigler-Najjar

Bien que la description des anomalies de séquence identifiées chez des patients présentant une maladie de Crigler-Najjar ne puisse pas *a priori* permettre une orientation vers le type I ou le type II, la génétique moléculaire a complètement modifié l'organisation du diagnostic de cette maladie.

Le laboratoire de génétique moléculaire de l'hôpital Antoine Béclère de Clamart fait partie du Centre de Référence des Maladies Héréditaires du Métabolisme Hépatique. A ce titre, il est en mesure de réaliser le diagnostic de la maladie de Crigler-Najjar et du syndrome de Gilbert et d'identifier toute nouvelle anomalie de séquence.

III.1. La validité de la demande de diagnostic moléculaire

De manière à réduire les délais de rendu des résultats et les coûts de réalisation des analyses, une méthodologie de diagnostic précise a été établie.

Etant donné la rareté de la maladie de Crigler-Najjar, ce diagnostic ne doit être évoqué qu'après avoir éliminé les autres causes d'hyperbilirubinémie non-conjuguée :

- hyper-hémolyse corpusculaire due à un déficit enzymatique, à une anomalie de l'hémoglobine ou de la membrane de l'érythroblaste (baisse de l'hémoglobine, baisse de l'haptoglobine, mise en évidence du déficit enzymatique, de l'anomalie de l'hémoglobine ou de l'anomalie membranaire),
- hyper-hémolyse extra-corpusculaire mécanique, immunologique ou toxique (baisse de l'hémoglobine, baisse de l'haptoglobine, recherche d'une allo- ou d'une auto-immunisation, recherche de toxiques, de médicaments, d'infections notamment par le parvovirus B19),
- déficit partiel en activité bilirubine glucuronosyltransférase du syndrome de Gilbert.

De plus, plusieurs situations favorisant l'ictère néonatal ont été rapportées comme la prématurité et l'allaitement maternel.

Dans un premier temps et en dehors d'un contexte familial particulier avec des antécédents de maladie de Crigler-Najjar, l'analyse moléculaire sera limitée à la recherche du syndrome de Gilbert chez les enfants de moins de 2 mois présentant un ictère. En cas de persistance de l'ictère au-delà de 2 mois à des concentrations supérieures à 150 $\mu\text{mol/L}$ de bilirubine totale (totalement ou très majoritairement non-conjuguée), l'analyse moléculaire sera poursuivie sur la recherche de la maladie de Crigler-Najjar.

Pour le diagnostic du syndrome de Gilbert, la nature de l'analyse moléculaire est fonction de l'origine ethnique du patient. Pour les patients d'origine caucasienne ou africaine, seule l'anomalie du promoteur du gène

UGT1A1 est recherchée. Pour les patients d'origine asiatique, la mutation c.211G>A est en plus recherchée.

Pour le diagnostic de la maladie de Crigler-Najjar, la mise en évidence de plusieurs effets fondateurs permet dans un premier temps une recherche ciblée pour certains groupes de patients. Chez les patients originaires de Tunisie (et d'une manière plus générale d'Afrique du Nord), la mutation c.1070A>G est systématiquement recherchée (Francoual et al., 2002a). De même, chez les patients originaires de Turquie, la présence de la mutation c.1489delC est recherchée en premier. Si ces anomalies de séquence spécifiques sont identifiées à l'état homozygote, l'analyse est arrêtée. Dans le cas contraire, l'étude est poursuivie avec l'analyse de l'ensemble des 5 exons (et des jonctions intron-exon) du gène *UGT1A1*. Pour tous les autres patients, l'analyse moléculaire est d'emblée élargie à l'ensemble des 5 exons. Dans tous les cas, une recherche du syndrome de Gilbert (anomalie du promoteur) est réalisée en parallèle (figure 15).

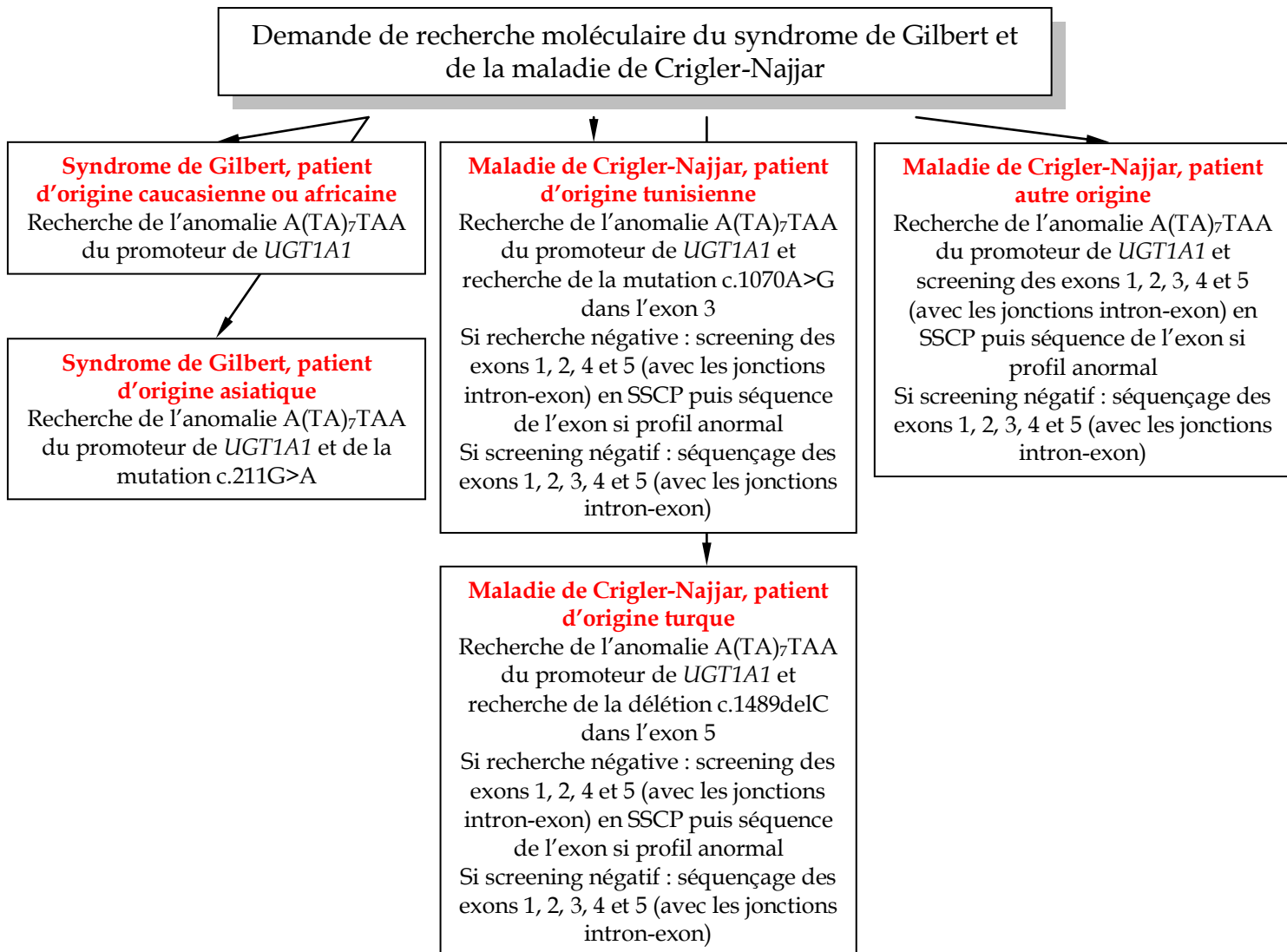


Figure 15. Arbre décisionnel pour le diagnostic moléculaire du syndrome de Gilbert et de la maladie de Crigler-Najjar.

La gravité de la maladie de Crigler-Najjar de type I et le risque élevé de récurrence dans une famille touchée (risque théorique de 25% de récurrence s'il y a déjà un enfant atteint) justifient la mise en place d'un diagnostic anténatal (Moghrabi et al., 1993b ; Ciotti et al., 1997 ; Francoual et al., 2002b). L'activité enzymatique bilirubine glucuronosyltransférase n'étant pas mesurable sur les prélèvements anténatals (villosités trophoblastiques, liquide amniotique, ponction de sang fœtal) du fait de l'immaturité enzymatique et de la spécificité d'organe, l'analyse moléculaire du gène *UGT1A1* reste la seule alternative possible. Cependant, la grande diversité des anomalies de séquence décrites et la lourdeur de l'analyse systématique des 5 exons imposent une analyse moléculaire préalable des parents (identification des allèles parentaux pathogènes). L'analyse moléculaire peut alors être réalisée directement sur l'ADN extrait des cellules trophoblastiques après prélèvement de villosités chorales ou des amniocytes prélevés par ponction de liquide amniotique après culture.

L'avenir du diagnostic anténatal de la maladie de Crigler-Najjar de type I passera probablement par le développement d'un diagnostic préimplantatoire.

III.2. Matériels et méthodes

Pour un diagnostic moléculaire de maladie de Crigler-Najjar chez un nouveau-né, un enfant ou un adulte, l'ADN est extrait à partir des lymphocytes circulants périphériques. Après lecture et signature du consentement éclairé du patient ou de ses représentants légaux pour les mineurs et les adultes sous tutelle, un échantillon de sang est recueilli sur anticoagulant (de préférence de l'EDTA, mais le recueil est également possible sur héparinate de lithium). Cet échantillon peut être conservé plusieurs jours non centrifugé à +4°C sans que l'ADN ne soit dégradé. Cependant, pour une conservation à plus long terme, l'échantillon doit être centrifugé pendant 10 minutes à 4000g puis, après avoir éliminé le plasma, la couche leucocytaire est prélevée et congelée à -20°C.

A partir de cet échantillon préparé, l'ADN est extrait grâce au kit d'extraction QIAamp DNA Blood Mini Kit (QiaGen, Courtaboeuf, France) et conservé à +4°C ou congelé à -20°C.

Les séquences des primers et les conditions des réactions de PCR sont présentées respectivement dans les tableaux 7 et 8.

Du fait de sa grande taille (produit d'amplification de 904 pb), l'exon 1 n'était pas analysable en SSCP et le séquençage était souvent difficile dans les extrémités terminales aussi bien en forward qu'en reverse. Ainsi, de nouvelles amorces ont été dessinées pour une analyse de l'exon 1 en deux fragments chevauchants appelés exon 1A et exon 1B.

Tableau 7. Amorces utilisées pour l'amplification des séquences d'intérêt dans l'étude moléculaire du gène UGT1A1.

Amplicon	Amorce OFL	Séquence	Amorce OLR	Séquence
Promoteur	UGT1PROOLF	5'GTCACGTGACACAGTCAAAC 3'	UGT1PROOLR	5'TTIGCTCCTGCCAGAGGTT 3'
Exon 1A	UGT1EX1OLF	5'AGGAGCAAAGGCGCC 3'	UGT1EX1A	5'AGTGGGCAGAGACAGGTA 3'
Exon 1B	UGT1EX1B	5'ACTTACTGCACAACAAGGAG 3'	UGT1EX1OLR	5'GCTTGCTCAGCATATATCTGGG 3'
Exon 2	UGT1EX2OLF	5'CTATCTCAAACACGCATGCC 3'	UGT1EX2OLR	5'GGATTAGCGTCTCTGTGAA 3'
Exon 3	UGT1EX3OLF	5'GCTTTCTTTACGTTCTGCTC 3'	UGT1EX3OLR	5'GACCCTGGTTTGACCTATAC 3'
Exon 4	UGT1EX4OLF	5'CTCAGAGATGTAAGTCTGAC 3'	UGT1EX4OLR	5'CATGAATGCCATGACCAAAG 3'
Exon 5	UGT1EX5OLF	5'GTCATACCACAGGTGTTCCA 3'	UGT1EX5OLR	5'GGAAATGACTAGGGAATGGTTC 3'

Tableau 8. Conditions de PCR pour l'amplification des séquences d'intérêt dans l'étude moléculaire du gène UGT1A1.

Amplicon	Nombre de cycles	Dénaturation	Hybridation	Elongation	Elongation finale
Promoteur	32	45 sec à 95°C	40 sec à 56°C	40 sec à 72°C	7 min à 72°C puis 4°C
Exon 1A	32	50 sec à 95°C	50 sec à 59°C	60 sec à 72°C	7 min à 72°C puis 4°C
Exon 1B	32	45 sec à 95°C	50 sec à 56°C	50 sec à 72°C	7 min à 72°C puis 4°C
Exon 2	32	45 sec à 95°C	50 sec à 56°C	50 sec à 72°C	7 min à 72°C puis 4°C
Exon 3	32	45 sec à 95°C	50 sec à 56°C	50 sec à 72°C	7 min à 72°C puis 4°C
Exon 4	32	45 sec à 95°C	50 sec à 56°C	50 sec à 72°C	7 min à 72°C puis 4°C
Exon 5	32	45 sec à 95°C	50 sec à 56°C	50 sec à 72°C	7 min à 72°C puis 4°C

De même, confrontés à des difficultés lors des réactions de PCR (amplification faible) ou lors des réactions de séquençage (séquence forward illisible), les couples d'amorce pour l'amplification du promoteur et de l'exon 2 ont été redessinés par rapport à la description princeps (Bosma et al., 1992a).

Les analyses par SSCP ont été réalisées sur l'unité d'électrophorèse GenePhor© (GE Healthcare™, Saclay, France).

Les réactions de séquençage ont été réalisées à l'aide du kit BigDye Terminator V3© (Applied Biosystems™, Courtaboeuf, France), purifiées en éthanol et EDTA et analysées par électrophorèse capillaire à l'aide de l'analyseur d'acides nucléiques ABI Prism 3130© (Applied Biosystems™). L'analyse des données de séquence a été réalisée grâce au logiciel SeqScape 2.5© (Applied Biosystems™).

RESULTATS

RESULTATS

Dans une première partie, nous présenterons les différentes anomalies de séquences identifiées dans le gène *UGT1A1* au cours de ce travail. A partir de ces résultats, nous présenterons les relations entre génotype et phénotype.

Dans une deuxième partie, nous présenterons deux cas de maladie de Crigler-Najjar pour lesquels la transmission et la réalisation du diagnostic se sont révélés « non classiques ».

Enfin, bien que la maladie de Crigler-Najjar soit caractérisée d'une manière générale par une grande variété allélique, nous présenterons plusieurs pays où des effets fondateurs ont été suspectés et plus particulièrement la Tunisie où un effet fondateur pour la mutation c.1070A>G a pu être démontré sur le plan moléculaire.

I. Les anomalies de séquence responsables de la maladie de Crigler-Najjar nouvellement décrites

Dans notre laboratoire, nous avons réalisé l'analyse moléculaire du gène *UGT1A1* et de son promoteur chez 118 patients adressés pour ictère à bilirubine non conjugué intense. Quarante et une anomalies de séquence ont ainsi été mises en évidence (tableau 9).

Ces résultats confirment la grande hétérogénéité allélique de la maladie de Crigler-Najjar. Cependant, quelques rares anomalies ont été retrouvées de manière récurrente dans certaines populations comme la mutation c.1070A>G dans la population tunisienne ou la délétion c.1489delC dans la population turque (voir chapitre suivant).

Relier une anomalie de séquence à un phénotype de maladie de Crigler-Najjar de type I ou de type II reste relativement difficile. En effet, il existe très peu d'études ayant vérifié, par expression *in vitro* et mesure de l'activité *UGT1A1*, l'impact des anomalies de séquence identifiées (Seppen et al., 1994). De plus, l'expression phénotypique de la maladie semble modulée par

l'environnement génétique. En effet, la présence ou non de l'anomalie du promoteur, la présence ou non du polymorphisme de la séquence de liaison du phénobarbital ou PBREM (Sugatani et al., 2002) semblent moduler la gravité de la maladie, notamment dans le type II. Enfin, les patients porteurs d'une maladie de Crigler-Najjar sont souvent des hétérozygotes composites : l'implication de chaque mutation dans le phénotype étant alors impossible à déterminer avec précision.

Tableau 9. Anomalies de séquence du gène UGT1A1 mises en évidence au laboratoire

Type de modification	Exon	Modification de la séquence nucléotidique	Protéine prédite	Référence
Variation de répétition		c.1-41_1-40insTATA		
Variation de répétition		c.1-41_1-40insTA		
Grosse délétion		Délétion promoteur et exon 1		
Mutation ponctuelle	1	c.1A>G	p.Met1?	Petit et al., 2006
Mutation ponctuelle	1	c.118T>C	p.Trp40Arg	Petit et al., 2006
Mutation ponctuelle	1	c.182C>G	p.Ala61Gly	
Mutation ponctuelle	1	c.211G>A	p.Gly71Arg	Aono et al., 1993
Petite délétion	1	c.300delT	p.Phe100LeufsX10	Petit et al., 2004
Petite délétion	1	c.396_401delCAACAA	p.His132Gln;Asn133_Lys134del	Petit et al., 2006
Petite délétion	1	c.470delG	p.Ser157ThrfsX47	
Petite délétion	1	c.513_515delCTT	p.Phe171del	Ritter et al., 1993
Mutation ponctuelle	1	c.554A>C	p.Gln185Pro	Petit et al., 2006
Mutation ponctuelle	1	c.583A>G	p.Arg195Gly	
Petite insertion	1	c.652_653insT	p.Ser218PhefsX40	Petit et al., 2004
Mutation ponctuelle	1	c.674T>G	p.Val225Gly	Iolascon et al., 2000
Mutation ponctuelle	1	c.838T>G	p.Cys280Gly	
Mutation ponctuelle	1	c.847C>T	p.Gln283X	D'Apolito et al., 2007
Mutation splicing		c.865-1G>A		Servedio et al., 2005
Insertion-délétion	2	c.878_891del14insA	p.Tyr293MetfsX69	Sappal et al., 2002
Mutation ponctuelle	2	c.907G>A	p.Val303Met	
Mutation ponctuelle	2	c.923G>A	p.Gly308Glu	Erps et al., 1994
Mutation ponctuelle	2	c.992A>G	p.Gln331Arg	Moghrabi et al., 1993a
Petite délétion	2	c.994_996+1delACAG		
Mutation ponctuelle	3	c.1060T>C	p.Trp354Arg	Servedio et al., 2005
Mutation ponctuelle	3	c.1070A>G	p.Gln357Arg	Labrune et al., 1994
Mutation splicing		c.1084+6T>G		
Mutation ponctuelle	4	c.1100G>C	p.Arg367Pro	Petit et al., 2004
Mutation ponctuelle	4	c.1130G>T	p.Gly377Val	Kadakol et al., 2000
Mutation ponctuelle	4	c.1156G>T	p.Val386Phe	Petit et al., 2004
Mutation ponctuelle	4	c.1174C>T	p.Pro392Ser	
Petite délétion	4	c.1176delC	p.Leu393CysfsX19	Petit et al., 2004
Mutation ponctuelle	4	c.1184G>T	p.Gly395Val	Servedio et al., 2005
Mutation ponctuelle	4	c.1198A>G	p.Asn400Asp	Labrune et al., 2002
Mutation ponctuelle	4	c.1205A>T	p.Lys402Thr	Petit et al., 2004
Petite délétion	4	c.1220delA	p.Lys407ArgfsX5	Kadakol et al., 2000
Petite insertion	4	c.1223_1224insG	p.Ala429SerfsX13	Labrune et al., 1994
Mutation splicing		c.1304+1G>T		Servedio et al., 2005
Petite délétion	5	c.1354delG	p.Val453TrpfsX14	
Mutation ponctuelle	5	c.1381T>C	p.Trp461Arg	Maruo et al., 2003
Mutation ponctuelle	5	c.1456T>G	p.Tyr486Asp	Aono et al., 1993
Petite délétion	5	c.1489delG	p.Ala497ProfsX4	

I.1. Anomalies de séquence identifiées chez des patients ayant une maladie de Crigler-Najjar de type I (article 1)

Allelic heterogeneity of Crigler-Najjar type I syndrome: a study of 24 cases.

Petit FM, Gajdos V, Francoual J, Capel L, Parisot F, Poüs C, Labrune P.

Clin Genet. 2004 66:571-2.

Au cours de ce travail, nous avons recherché les anomalies de séquence du gène *UGT1A1* chez 24 patients atteints de la maladie de Crigler-Najjar de type I. Ces patients étaient originaires de plusieurs pays : Tunisie, Italie, Turquie, France, Liban, Algérie et Pologne.

Après extraction de l'ADN génomique, les 5 exons de *UGT1A1* ont été amplifiés par PCR. Les produits d'amplification ont été séparés par SSCP et séquencés en cas d'anomalie de profil. La recherche de l'anomalie du promoteur a été systématiquement réalisée chez chaque patient.

Nous avons mis en évidence 11 anomalies de séquence dont 6 étaient nouvellement décrites :

- c.300delT (incorrectement dénommée 295delT) responsable de la modification de séquence peptidique p.Phe100LeufsX10,
- c.652_653insT responsable de la modification de séquence peptidique p.Ser218PhefsX40,
- c.1100G>C responsable de la modification de séquence peptidique p.Arg367Pro,
- c.1156G>T responsable de la modification de séquence peptidique p.Val386Phe,
- c.1176delC responsable de la modification de séquence peptidique p.Leu393Cysfsx19,
- c.1205A>T responsable de la modification de séquence peptidique p.Lys402Thr,

L'erreur sur la mutation 513_515delCTT résulte d'une impossibilité de déterminer les points précis de la délétion dans cette région répétitive (Petit et al., 2005 ; Petit et al., 2007).

Le diagnostic moléculaire de la maladie de Crigler-Najjar permet d'apporter une réponse rapide en évitant au patient une biopsie hépatique avec mesure de l'activité enzymatique. De plus, il est la seule technique permettant un diagnostic anténatal.

I.2. Anomalies de séquence identifiées chez des patients ayant une maladie de Crigler-Najjar de type II (article 2)

Crigler-Najjar type II syndrome may result from several types and combinations of mutations in the UGT1A1 gene.

Petit F, Gajdos V, Capel L, Parisot F, Myara A, Francoual J, Labrune P.

Clin Genet. 2006 69:525-7.

Au cours de ce travail, nous avons recherché les anomalies de séquence du gène *UGT1A1* chez 13 patients présentant une maladie de Crigler-Najjar de type II et originaires de plusieurs pays (France, Portugal, Tunisie, Turquie et Maroc). Le diagnostic avait été porté par la détermination des concentrations de bilirubine (ictère à bilirubine non conjuguée) et par une réponse partielle au traitement inducteur par le phénobarbital.

La méthodologie de l'analyse moléculaire était identique à celle de l'article précédent. Pour 4 des patients, une mesure des fractions non conjuguée, mono et di conjuguée de la bilirubine a pu être réalisée par HPLC montrant une diminution importante des fractions conjuguées par rapport au témoin.

Parmi les 15 anomalies de séquence identifiées chez les patients, 4 étaient nouvelles :

- c.1A>G responsable d'une modification du site initiateur de la transcription,
- c.118C>T responsable de la modification de séquence peptidique p.Trp40Arg,
- c.396_401delCAACAA responsable de la modification de séquence peptidique p.His132Gln;Asn133_Lys134del,
- c.554A>C responsable de la modification de séquence peptidique p.Gln185Pro.

Ces résultats confirment l'hétérogénéité dans l'expression phénotypique des anomalies de séquence du gène *UGT1A1* puisque parmi les anomalies retrouvées ici chez des patients présentant une maladie de type II, certaines avaient été retrouvées chez des patients présentant une maladie de type I. L'environnement génétique semble donc jouer un rôle important dans l'expression phénotypique.

I.3. Difficultés liées au diagnostic des maladies rares (article 3)

Comments on seven novel mutations of the UGT1A1 gene in patients with unconjugated hyperbilirubinemia by D'Apolito et al.

Petit FM, Hébert M, Gajdos V, Mollet-Boudjemline A, Labrune P.

Haematologica. 2007 92(7):e80.

Dans cette lettre à l'éditeur de la revue *Haematologica*, nous avons apporté quelques précisions sur un article publié dans cette revue par D'Apolito et collaborateurs (D'Apolito et al., 2007).

Les auteurs ont rapporté 7 nouvelles mutations dans le gène *UGT1A1* identifiées chez des patients présentant une maladie de Crigler-Najjar de type I ou de type II. Cependant, nous avons constaté que :

- la délétion c.513_515delCTT rapportée ici avait déjà été décrite par Ritter et collaborateurs (Ritter et al., 1993),
- l'insertion c.652_653insT rapportée ici avait déjà été décrite dans notre laboratoire en 2004,
- il existait une erreur dans la numérotation des nucléotides dans la description de la délétion c.717_718del,
- il existait une erreur dans la description de la protéine prédite induite par la dernière anomalie de séquence rapportée.

Ces observations confirment les difficultés dans la réalisation des diagnostics moléculaires de maladies rares telles que la maladie de Crigler-Najjar.

1.4. Relations génotype-phénotype

L'évolution des connaissances en génétique a clairement montré que les relations entre le génotype et le phénotype dépendaient de deux éléments :

- la séquence génétique et donc peptidique,
- l'environnement cellulaire.

Concernant la séquence génétique elle-même, il est quasiment impossible de déterminer la fonction et l'importance de chaque acide aminé parce, d'une part, les protéines comportent souvent un nombre important d'acides aminés et, d'autre part, pour chaque acide aminé, il existe 19 autres acides aminés pouvant se substituer à lui.

1.4.1. Données obtenues par l'étude des patients

La détermination de relations génotype-phénotype passe par plusieurs étapes de réalisation délicate : la mutagenèse dirigée contre un ou plusieurs nucléotides, la transfection dans des cellules humaines n'exprimant pas normalement *UGT1A1*, la mesure de l'activité enzymatique de la forme de *UGT1A1* produite.

Partant des données moléculaires obtenues chez un patient présentant une maladie de Crigler-Najjar de type I, Ritter et collaborateurs ont pu déterminer l'importance du dimère de phénylalanine en position 170-171 dans l'activité enzymatique (Ritter et al., 1993). En effet, la suppression d'une des deux phénylalanines entraîne, à pH 6.4, la disparition complète de l'activité enzymatique. Cette étude souligne de plus une difficulté technique supplémentaire dans la réalisation de ce type d'analyse. En effet, les auteurs ont montré que cette différence d'activité enzymatique observée à pH 6.4 (pH optimum) n'était plus visible à pH 7.6 (pH utilisé en routine dans les études de glucuronidation de la bilirubine). Deux conclusions émergent donc de ces données :

- le dimère de phénylalanine hydrophobe jouerait un rôle critique dans la liaison de l'enzyme aux substrats lipophiles,
- les conditions optimales de fonctionnement de l'enzyme suggèrent une localisation permettant d'assurer un pH bas et une faible charge ionique (comme dans le réticulum endoplasmique).

En 2000, Kadakol et collaborateurs ont colligé les données de plusieurs études sur les mutations responsables de maladie de Crigler-Najjar de type I ou de type II (Kadakol et al., 2000).

Toutes les mutations non-sens et toutes les variations de séquence frameshift observées entraînent une abolition complète de l'activité enzymatique et sont donc retrouvées chez les patients présentant une maladie de Crigler-Najjar de type I. De même, les modifications des sites accepteurs ou

donneurs d'épissage sont responsables d'une désorganisation complète de l'enzyme.

Pour les mutations ponctuelles, l'orientation vers une maladie de Crigler-Najjar de type I ou de type II est fonction de la localisation dans la protéine (il semble exister des micro-régions critiques comme la diphénylalanine 170-171) et de la nature chimique de la substitution. Dans la maladie de Crigler-Najjar de type II, la réduction de l'activité enzymatique peut être imputée à plusieurs mécanismes :

- une modification de l'affinité de l'enzyme pour son substrat (modification du Km),
- une réduction de la vitesse enzymatique (réduction de Vmax),
- une diminution de la concentration en enzyme dans le réticulum endoplasmique.

Dans de nombreux cas, le mécanisme de la réduction de l'activité enzymatique n'est pas élucidé.

I.4.2. Répartition des anomalies de séquence dans le gène UGT1A1

Le tableau 10 regroupe toutes les anomalies de séquence du gène *UGT1A1* décrites dans la littérature et les dernières mises en évidence dans notre laboratoire.

Actuellement, il existe dans le gène *UGT1A1* 103 anomalies de séquence identifiées chez des patients présentant un syndrome de Gilbert ou une maladie de Crigler-Najjar de type I ou II dont 60 mutations faux-sens, 13 mutations non-sens, 18 petites délétions, 3 petites insertions, 2 insertions-délétions, 1 duplication, 6 mutations de splicing.

Tableau 10. Anomalies de séquence du gène *UGT1A1*.

Type de modification	Exon	Modification de la séquence nucléotidique	Protéine prédite	Référence
Variation de répétition		c.1-41_1-40insTATA		
Variation de répétition		c.1-41_1-40insTA		
Grosse délétion		Délétion promoteur et exon 1		
Mutation ponctuelle	1	c.1A>G	p.Met1?	Petit et al., 2006
Mutation ponctuelle	1	c.44T>C	p.Leu15Arg	Seppen et al., 1996
Mutation ponctuelle	1	c.101C>A	p.Pro34Gln	Servedio et al., 2005
Mutation ponctuelle	1	c.115C>G	p.His39Asp	Kadacol et al., 2000
Mutation ponctuelle	1	c.118T>C	p.Trp40Arg	Petit et al., 2006
Mutation ponctuelle	1	c.145C>T	p.Gln49X	Gantla et al., 1998
Mutation ponctuelle	1	c.182C>G	p.Ala61Gly	
Petite délétion	1	c.210delC	p.Asp70GlufsX7	D'Apolito et al., 2007
Mutation ponctuelle	1	c.211G>A	p.Gly71Arg	Aono et al., 1993
Mutation ponctuelle	1	c.222C>A	p.Tyr74X	Kadacol et al., 2000
Mutation ponctuelle	1	c.247T>C	p.Phe83Leu	Sutomo et al., 2002
Petite délétion	1	c.300delT	p.Phe100LeufsX10	Petit et al., 2004
Mutation ponctuelle	1	c.337T>G	p.Tyr113Asp	
Petite délétion	1	c.357_358delCT	p.Ser120CysfsX26	Ciotti et al., 1997
Mutation ponctuelle	1	c.392T>C	p.Leu131Pro	Aono et al., 1995
Petite délétion	1	c.396_401delCAACAA	p.His132Gln;Asn133_Lys134del	Petit et al., 2006
Mutation ponctuelle	1	c.466T>C	p.Cys156Arg	Ghosh et al., 2005
Petite délétion	1	c.470delG	p.Ser157ThrfsX47	
Petite insertion	1	c.470_471insT	p.Ile159HisfsX24	Rosatelli et al., 1997
Mutation ponctuelle	1	c.479T>A	p.Val160Glu	Huang et al., 2006

Duplication	1	c.488_491dupACCT	p.Ser165ProfsX18	Costa et al., 2006
Petite délétion	1	c.513_515delCTT	p.Phe171del	Ritter et al., 1993
Petite délétion	1	c.517delC	p.His173MetfsX32	Kadakol et al., 2000
Mutation ponctuelle	1	c.524T>A	p.Leu175Gln	Seppen et al., 1994
Mutation ponctuelle	1	c.529T>C	p.Cys177Arg	Seppen et al., 1994
Mutation ponctuelle	1	c.530G>A	p.Cys177Tyr	Ghosh et al., 2005
Mutation ponctuelle	1	c.554A>C	p.Gln185Pro	Petit et al., 2006
Mutation ponctuelle	1	c.576C>G	p.Tyr192X	Servedio et al., 2005
Mutation ponctuelle	1	c.583A>G	p.Arg195Gly	
Mutation ponctuelle	1	c.610A>G	p.Met204Val	Huang et al., 2006
Mutation ponctuelle	1	c.625C>T	p.Arg209Trp	Bosma et al., 1993
Petite insertion	1	c.652_653insT	p.Ser218PhefsX40	Petit et al., 2004
Mutation ponctuelle	1	c.674T>G	p.Val225Gly	Iolascon et al., 2000
Mutation ponctuelle	1	c.686C>A	p.Pro229Gln	Koiwai et al., 1995a
Petite délétion	1	c.722_723delAG	p.Glu241GlyfsX16	Iolascon et al., 2000
Petite délétion	1	c.801delC	p.Ile268SerfsX98	Servedio et al., 2005
Mutation ponctuelle	1	c.826G>C	p.Gly276Arg	Ciotti et al., 1995
Mutation ponctuelle	1	c.835A>T	p.Asn279Tyr	Seppen et al., 1994
Mutation ponctuelle	1	c.838T>G	p.Cys280Gly	
Mutation ponctuelle	1	c.840C>A	p.Cys280X	Aono et al., 1994
Mutation ponctuelle	1	c.847C>T	p.Gln283X	D'Apolito et al., 2007
Mutation splicing		c.864+1G>C		Gantla et al., 1998
Mutation splicing		c.865-1G>A		Servedio et al., 2005
Mutation ponctuelle	2	c.875C>T	p.Ala292Val	Labrune et al., 1994
Petite délétion	2	c.878_891del14	p.Tyr293TrpfsX27	Ritter et al., 1992b
Insertion-délétion	2	c.878_891del14insA	p.Tyr293MetfsX69	Sappal et al., 2002
Mutation ponctuelle	2	c.881T>C	p.Ile294Thr	Ciotti et al., 1998
Mutation ponctuelle	2	c.907G>A	p.Val303Met	
Mutation ponctuelle	2	c.923G>A	p.Gly308Glu	Erps et al., 1994
Mutation ponctuelle	2	c.928A>G	p.Met310Val	Ciotti et al., 1999
Petite délétion	2	c.973delG	p.Ala325LeufsX41	Seppen et al., 1994
Mutation ponctuelle	2	c.991C>T	p.Gln331X	Bosma et al., 1992b
Mutation ponctuelle	2	c.992A>G	p.Gln331Arg	Moghrabi et al., 1993a
Petite délétion	2	c.994_996+1delACAG		
Mutation ponctuelle	3	c.1005G>A	p.Trp335X	Labrune et al., 1994
Mutation ponctuelle	3	c.1006C>T	p.Arg336Trp	Ciotti et al., 1998
Mutation ponctuelle	3	c.1007G>A	p.Arg336Gln	Servedio et al., 2005
Mutation ponctuelle	3	c.1007G>T	p.Arg336Leu	Servedio et al., 2005
Mutation ponctuelle	3	c.1021C>T	p.Arg341X	Moghrabi et al., 1993b
Petite délétion	3	c.1043delA	p.Asn348ThrfsX18	Kadakol et al., 2000
Mutation ponctuelle	3	c.1060T>C	p.Trp354Arg	Servedio et al., 2005
Mutation ponctuelle	3	c.1060T>A	p.Trp354Arg	D'Apolito et al., 2007
Mutation ponctuelle	3	c.1069C>T	p.Gln357X	Labrune et al., 1994
Mutation ponctuelle	3	c.1070A>G	p.Gln357Arg	Labrune et al., 1994
Mutation splicing		c.1084+6T>G		
Mutation splicing		c.1085-2A>G		Gantla et al., 1998
Mutation ponctuelle	4	c.1091C>T	p.Pro364Leu	Aono et al., 1995
Mutation ponctuelle	4	c.1099C>G	p.Arg367Gly	Koiwai et al., 1995b
Mutation ponctuelle	4	c.1100G>C	p.Arg367Pro	Petit et al., 2004
Mutation ponctuelle	4	c.1102G>A	p.Ala368Thr	Labrune et al., 1994
Mutation ponctuelle	4	c.1108A>G	p.Ile370Val	D'Apolito et al., 2007
Mutation ponctuelle	4	c.1124C>T	p.Ser375Phe	Erps et al., 1994
Mutation ponctuelle	4	c.1127A>G	p.His376Arg	Kadakol et al., 2000
Mutation ponctuelle	4	c.1130G>T	p.Gly377Val	Kadakol et al., 2000
Mutation ponctuelle	4	c.1143C>G	p.Ser381Arg	Labrune et al., 1994
Mutation ponctuelle	4	c.1156G>T	p.Val386Phe	Petit et al., 2004
Mutation ponctuelle	4	c.1159C>T	p.Pro387Ser	Servedio et al., 2005
Insertion-délétion	4	c.1160_1161delCCinsGT	p.Pro387Arg	Ciotti et al., 1997
Mutation ponctuelle	4	c.1174C>T	p.Pro392Ser	
Petite délétion	4	c.1176delC	p.Leu393CysfsX19	Petit et al., 2004
Mutation ponctuelle	4	c.1184G>T	p.Gly395Val	Servedio et al., 2005
Petite délétion	4	c.1186delG	p.Asp396IlefsX16	Huang et al., 2001
Mutation ponctuelle	4	c.1198A>G	p.Asn400Asp	Labrune et al., 2002
Mutation ponctuelle	4	c.1201G>C	p.Ala401Pro	Labrune et al., 1994
Mutation ponctuelle	4	c.1205A>T	p.Lys402Thr	Petit et al., 2004
Mutation ponctuelle	4	c.1207C>T	p.Arg403Cys	Servedio et al., 2005
Petite délétion	4	c.1220delA	p.Lys407ArgfsX5	Kadakol et al., 2000
Petite insertion	4	c.1223_1224insG	p.Ala429SerfsX13	Labrune et al., 1994
Mutation ponctuelle	4	c.1282A>G	p.Lys428Glu	Labrune et al., 1994
Mutation splicing		c.1304+1G>T		Servedio et al., 2005

Mutation splicing		c.1305-1G>A		Sappal et al., 2002
Mutation ponctuelle	5	c.1309A>T	p.Lys437X	Labrune et al., 1994
Mutation ponctuelle	5	c.1328T>C	p.Leu443Pro	D'Apolito et al., 2007
Petite délétion	5	c.1354delG	p.Val453TrpfsX14	
Mutation ponctuelle	5	c.1381T>C	p.Trp461Arg	Maruo et al., 2003
Mutation ponctuelle	5	c.1388A>G	p.Glu463Ala	Chalasanani et al., 1997
Mutation ponctuelle	5	c.1433C>A	p.ala478Asp	Servedio et al., 2005
Mutation ponctuelle	5	c.1448G>A	p.Trp483X	Kadakol et al., 2000
Mutation ponctuelle	5	c.1449G>A	p.Trp483X	Kadakol et al., 2000
Mutation ponctuelle	5	c.1456T>G	p.Tyr486Asp	Aono et al., 1993
Mutation ponctuelle	5	c.1463C>T	p.Ser488Phe	Bosma et al., 1992b
Mutation ponctuelle	5	c.1487T>A	p.Leu496X	Kadakol et al., 2000
Petite délétion	5	c.1489delG	p.Ala497ProfsX4	

La répartition des anomalies de séquence observée n'est pas homogène pour tous les exons. En effet, le gène *UGT1A1* comporte 1602 pb et il existe 97 modifications de séquence décrites sur l'ensemble des 5 exons, ce qui représente statistiquement une anomalie de séquence toutes les 16,5 pb. Or, si l'on rapporte cette valeur aux différents exons, il apparaît plusieurs déséquilibres (figure 16) :

- la première partie de l'exon 4 est surreprésentée avec 22 anomalies de séquence sur 138 pb (en moyenne une toutes les 6,3 pb),
- la partie terminale de l'exon 5 est sous-représentée avec aucune anomalie décrite sur les 113 dernières paires de bases.

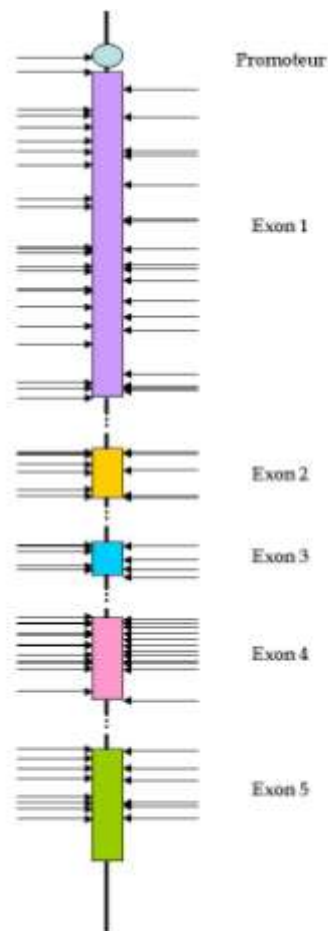


Figure 16. Répartition des anomalies de séquence observées dans le gène *UGT1A1*.

Concernant l'exon 4, deux hypothèses peuvent expliquer cette observation : soit cette région génomique est particulièrement propice aux anomalies de séquence par instabilité génétique, soit cette région est particulièrement importante dans la fonction de la protéine de sorte que toute modification de la séquence nucléotidique et par la même peptidique va perturber l'activité enzymatique ou le site de liaison au substrat. La forte prédominance des mutations faux-sens (19) par rapport aux mutations non-sens (0) et aux anomalies de séquence entraînant une modification du cadre de lecture (4) renforce l'hypothèse d'une région fonctionnellement importante.

En revanche, concernant la partie terminale de l'exon 5, l'absence d'anomalies de séquence responsable de la maladie de Crigler-Najjar suggère une importance relativement faible de cette région dans l'activité enzymatique. Le séquençage systématique de la partie terminale de l'exon 5 chez 64 témoins français ne montre cependant la présence d'aucun polymorphisme de séquence dans cette région.

Pour compléter ces observations, les séquences peptidiques de UGT1A1 ont été comparées dans différentes espèces de mammifères : humain (*Homo sapiens*), macaque rhésus (*Macaca mulata*), babouin (*Papio anubis*), taureau (*Bos taurus*), chat (*Felis silvestris catus*), souris (*Mus musculus*), rat (*Rattus norvegicus*).

Sur un plan évolutif, il semble y avoir une forte pression de sélection exercée pour le maintien de la séquence peptidique. En effet, UGT1A1 est globalement assez conservée entre ces espèces de mammifères. Cependant, comme nous l'avons observé précédemment avec la répartition des anomalies de séquence, il existe des différences entre les parties de la protéine. En effet, la partie N-terminale codée par l'exon 1 et la partie C-terminale codée par la fin de l'exon 5 sont de loin les plus polymorphes. En revanche, le reste de la protéine est plus conservé (tableau 11).

Tableau 11. Homologies de séquence de la protéine UGT1A1 entre l'homme et différentes espèces de mammifères.

Comparaison à la séquence de <i>Homo sapiens</i>	UGT1A1	Exon 1	Exon 2	Exon 3	Exon 4	Exon 5
<i>Macaca mulata</i>	95.5%	94.4%	97.7%	96.7%	97.3%	95.9%
<i>Papio anubis</i>	95.7%	94.8%	97.7%	96.7%	97.3%	95.9%
<i>Bos taurus</i>	79.0%	70.8%	93.2%	86.7%	87.7%	87.8%
<i>Felis silvestris catus</i>	79.2%	70.8%	90.9%	90.0%	87.7%	88.8%
<i>Mus musculus</i>	79.8%	70.1%	90.9%	96.7%	87.7%	90.8%
<i>Rattus norvegicus</i>	80.2%	71.9%	90.9%	96.7%	86.3%	88.8%

Un autre argument vient renforcer l'hypothèse d'une grande conservation de la protéine au fur et à mesure de l'évolution. La très grande majorité des mutations faux-sens pathologiques observées dans l'espèce humaine intéresse

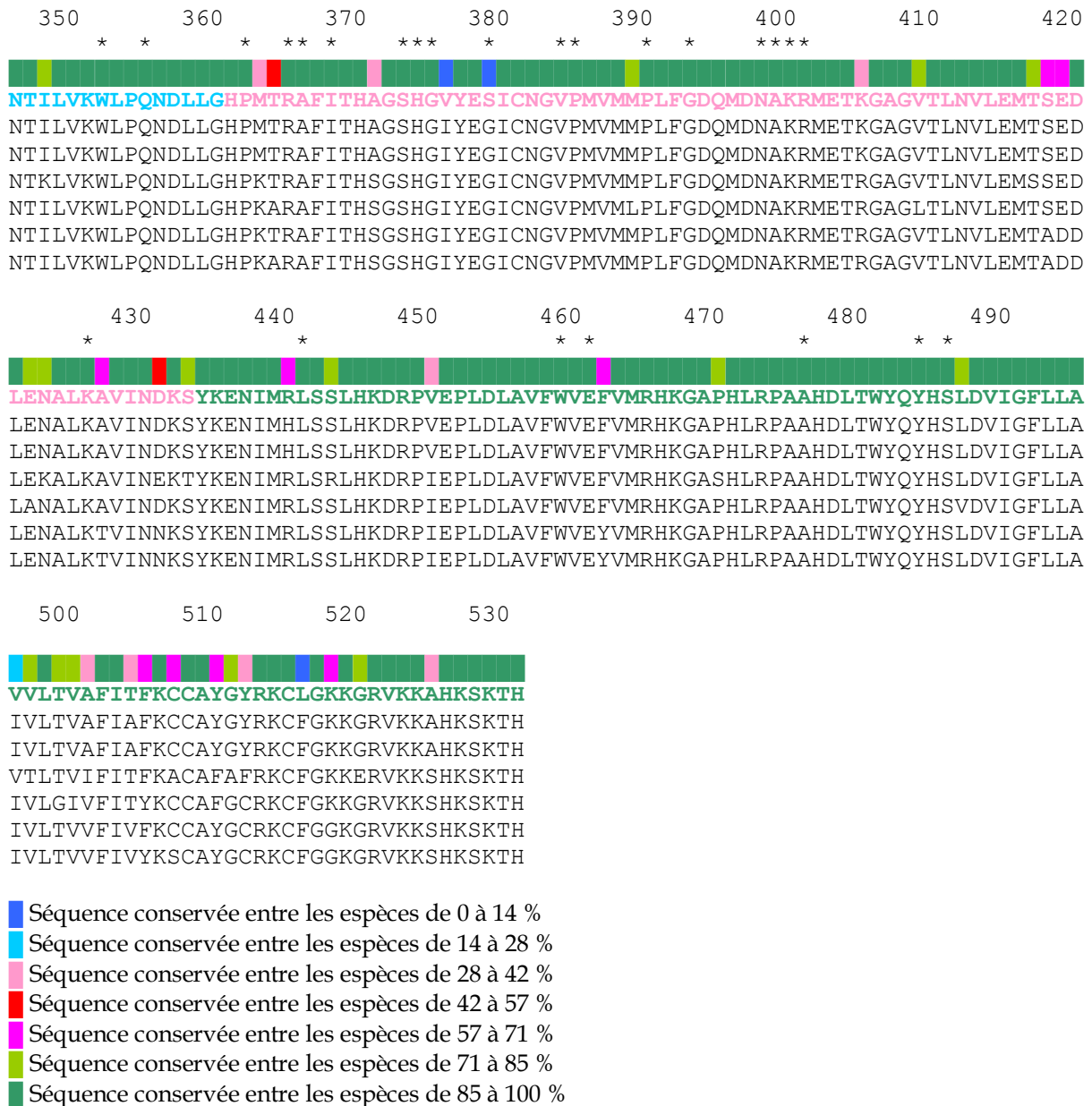


Figure 17. Séquence comparée de UGT1A1 entre l'homme et 6 espèces de mammifères (* : position des mutations faux-sens observées dans l'espèce humaine).

Ces études devront être poursuivies avec la description de nouvelles anomalies de séquence retrouvées chez des patients présentant un syndrome de Gilbert ou une maladie de Crigler-Najjar.

III. Transmission et formes particulières de la maladie de Crigler-Najjar

La maladie de Crigler-Najjar est une pathologie autosomique récessive. Selon les lois de Mendel, les deux parents doivent être chacun porteurs à l'état hétérozygote d'une anomalie de séquence dans le gène *UGT1A1* et que celles-ci soient transmises à l'enfant. Ainsi, lorsque deux parents sont hétérozygotes, le risque pour la descendance est de 25 %.

Si l'étude moléculaire du cas index apporte le diagnostic, il est important pour le conseil génétique de pouvoir réaliser cette même recherche chez les parents. Nous allons présenter deux exemples soulignant la nécessité de l'enquête familiale dans le diagnostic moléculaire de la maladie de Crigler-Najjar.

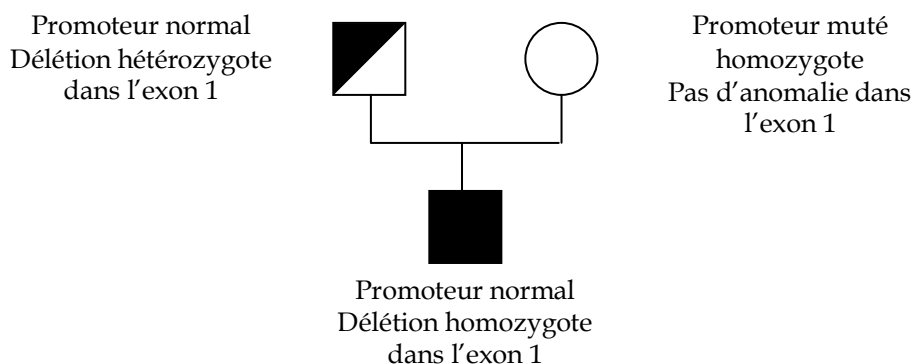
III.1. Isodisomie paternelle du chromosome 2 à l'origine d'une maladie de Crigler-Najjar de type I (article 4)

Paternal isodisomy for chromosome 2 as the cause of Crigler-Najjar type I syndrome.

Petit FM, Gajdos V, Parisot F, Capel L, Aboura A, Lachaux A, Tachdjian G, Poüs C, Labrune P.

Eur J Hum Genet. 2005 13:278-82.

Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence le premier cas d'isodisomie uniparentale paternelle du chromosome 2 chez un enfant présentant une maladie de Crigler-Najjar de type I. La délétion c.513_515delCTT a été mise en évidence à l'état homozygote chez l'enfant, associée à un promoteur de *UGT1A1* de type sauvage. Chez le père, la délétion a été mise en évidence à l'état hétérozygote, associée à un promoteur de type sauvage. Chez la mère, aucune anomalie de séquence n'a été mise en évidence dans l'ensemble des 5 exons du gène *UGT1A1* alors que le promoteur présentait la forme A(TA)₇TAA à l'état homozygote.



Chez cet enfant, le caryotype était masculin normal et l'absence de duplication homogène ou en mosaïque de la partie terminale du chromosome 2

a été vérifiée par FISH. L'isodisomie uniparentale paternelle a été confirmée par l'analyse de 9 marqueurs répartis sur l'ensemble du chromosome 2.

Cette observation souligne l'importance de l'étude des parents dans le diagnostic des maladies rares. En effet, dans le cas présent, le conseil génétique a pu être rassurant pour une nouvelle grossesse, le risque de récurrence étant en effet très faible. Cependant, il persistait un risque de 50 % que l'enfant soit porteur à l'état hétérozygote à la fois de l'anomalie du promoteur et de la mutation. Bien que ce génotype n'ait jamais été rapporté, il est fort probable qu'il soit responsable d'un phénotype de type syndrome de Gilbert pouvant être à l'origine d'un ictère modéré à intense à la naissance.

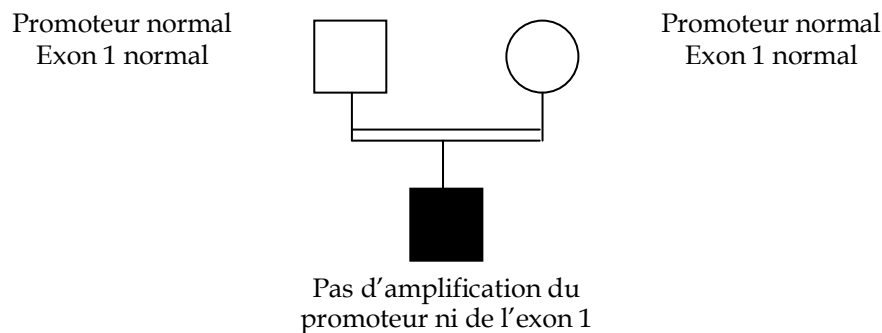
III.2. Large délétion dans le gène UGT1A1 comprenant le promoteur et l'exon 1 à l'origine d'une maladie de Crigler-Najjar de type I (article 5)

Large deletion in UGT1A1 gene encompassing the promoter and the exon 1 responsible for Crigler-Najjar type I syndrome.

Petit FM, Hébert M, Gajdos V, Capel L, Parisot F, M'Rad R, Mollet-Boudjemline A, Francoual J, Labrune P.

Haematologica. 2008 Oct 93 (10) : 1590-91

Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence, chez un enfant présentant une maladie de Crigler-Najjar de type I, une large délétion ayant emporté le promoteur et l'exon 1 du gène *UGT1A1*. Lors de l'analyse moléculaire par PCR, aucun produit d'amplification n'a été obtenu ni pour le promoteur ni pour l'exon 1 chez l'enfant alors qu'aucune anomalie n'a été observée chez les parents (parents consanguins). Par la suite, le séquençage de ces fragments chez les parents n'a montré aucune anomalie de séquence. Par ailleurs, aucune anomalie de séquence n'avait été mise en évidence chez l'enfant et chez les parents dans les exons 2, 3, 4 et 5.



De manière à confirmer l'hypothèse d'une délétion présente à l'état hétérozygote chez les parents et retrouvée à l'état homozygote chez l'enfant, quatre couples d'amorces en amont du promoteur et quatre couples d'amorces en aval de l'exon 1 ont été dessinés. En fonction de la présence ou non des fragments considérés, une délétion de 4591 pb a pu être mise en évidence. Le séquençage de la région entourant la délétion a également permis de mettre en évidence de nombreux remaniements de la séquence avec 10 mutations, 2 insertion-délétions, une duplication et l'insertion d'un fragment de 23 pb au niveau de la délétion.

Cette observation confirme l'importance, dans les études familiales, de pouvoir étudier un cas index. En effet, en l'absence d'analyse moléculaire du cas index et dans l'évaluation du risque de récurrence lors d'une nouvelle grossesse, l'analyse moléculaire des parents aurait été faussement rassurante, cette large délétion à l'état hétérozygote ne pouvant être mise en évidence par les techniques de PCR classiques.

IV. Les effets fondateurs décrits dans la maladie de Crigler-Najjar

L'élargissement des techniques d'analyse moléculaire a permis de mettre en évidence (ou du moins de les suspecter) plusieurs effets fondateurs.

IV.1. Les effets fondateurs rapportés

Plusieurs effets fondateurs ont été rapportés dans la maladie de Crigler-Najjar :

- en France : dans une étude portant sur 7 patients originaires de France, la mutation c.1201G>C (p.Ala401Pro) a été retrouvée dans 6 allèles sur 14 (Labrune et al., 1994),
- au Portugal : dans une étude portant sur 2 patients originaires du Portugal, la mutation c.923G>A (p.Gly308Glu) a été retrouvée dans 4 allèles sur 4 (Labrune et al., 1994),
- en Italie : dans une étude portant sur 4 patients originaires de Sardaigne, la délétion c.513_515delCTT (p.Phe171del) a été retrouvée dans 7 allèles sur 8 (Rosatelli et al., 1997),
- en Tunisie : dans une étude portant sur 6 patients originaires de Tunisie, la mutation c.1070A>G (p.Gln357Arg) a été retrouvée dans 12 allèles sur 12 (Francoual et al., 2002a).

D'autres effets fondateurs sont également suspectés, notamment en Turquie (mutation c.1143C>G et délétion c.1489delG).

IV.2. La maladie de Crigler-Najjar en Tunisie

Concernant la maladie de Crigler-Najjar, la situation de la Tunisie est tout à fait particulière, notamment vis-à-vis de ses pays proches l'Algérie et le Maroc. En effet, sa fréquence y semble largement supérieure à celle des autres pays. De plus, un nombre très restreint d'anomalies de séquence a été mis en évidence :

- la mutation c.1070A>G, toujours associée à l'anomalie du promoteur A(TA)₇TAA et responsable à l'état homozygote d'une maladie de Crigler-Najjar de type I (familles originaires de toute la Tunisie),
- la délétion c.396_401delCAACAA, toujours associée à l'anomalie du promoteur A(TA)₇TAA et responsable à l'état homozygote d'une maladie de Crigler-Najjar de type II ou d'un syndrome de Gilbert (familles originaires de la région de Tunis),
- une large délétion emportant le promoteur et l'exon 1 de *UGT1A1* (retrouvée dans une seule famille).

Cette forte restriction dans l'hétérogénéité allélique couramment observée dans la maladie de Crigler-Najjar peut être liée à trois phénomènes :

- soit il existe un point chaud de mutation (« hot spot »), ce qui est peu probable étant donné que la mutation c.1070A>G n'a été retrouvée que deux fois en dehors de la Tunisie et que la délétion c.396_401delCAACAA n'a jamais été décrite ailleurs,
- soit la maladie de Crigler-Najjar ou au minimum la présence à l'état hétérozygote de l'allèle morbide confère une résistance à une pression de sélection externe, ce qui semble difficilement concevable étant donné la toxicité de la bilirubine et les résultats controversés sur les bénéfices possibles de son effet antioxydant (Bosma et al., 2003 ; Gajdos et al., 2006 ; Vitek et al., 2006),
- soit ces anomalies de séquence sont apparues et se sont maintenues dans des communautés restreintes, probablement du fait de mariages consanguins.

Une étude de population nous a permis de vérifier l'hypothèse de l'effet fondateur pour l'anomalie de séquence c.1070A>G.

IV.1. L'histoire de la maladie de Crigler-Najjar en Tunisie suit l'histoire du pays (article 6)

The Tunisian population history through the Crigler-Najjar type I syndrome.
Petit FM, Bézieau S, Gajdos V, Parisot F, Scoul C, Capel L, Stozinic V, Khrouf N, M'rad R, Koshy A, Mollet-Boudjemline A, Francoual J, Labrune P.
Eur J Hum Genet. 2008 Jan 16 [Epub ahead of print]

La mutation c.1070A>G associée à la maladie de Crigler-Najjar de type I a été retrouvée depuis plusieurs années en Tunisie et plus récemment au Koweït. Le but de cette étude était de vérifier l'hypothèse de l'effet fondateur et de rechercher un lien entre les patients de Tunisie et les patients du Koweït.

Pour cela, nous avons étudié neuf marqueurs moléculaires de type microsatellite en amont et en aval de la mutation c.1070A>G chez les patients porteurs et chez des témoins tunisiens.

L'analyse des haplotypes nous a permis de confirmer l'hypothèse de l'effet fondateur avec l'introduction de la mutation environ 32 générations avant dans la population autochtone de Tunisie (environ 800 ans). Cette même analyse réalisée dans les familles de Bédouins du Koweït nous a permis de mettre en évidence chez ces patients l'haplotype ancestral identifié chez les tunisiens.

En reprenant l'histoire de la Tunisie, il est intéressant de constater que la population actuelle est le fruit de plusieurs migrations de population, notamment de Bédouins venant du Golfe Arabo-persique vers le XI^{ème} siècle. Ainsi, la mutation c.1070A>G est probablement apparue dans une communauté de Bédouins dont une partie a migré et s'est sédentarisée en Tunisie. Par la suite, la persistance de la mutation à un taux élevé est probablement à relier à

un taux élevé de mariages consanguins ou d'unions dans des communautés restreintes.

Dernièrement, nous avons mis en évidence cette même mutation chez un patient originaire de Syrie, laissant supposer une plus large diffusion de cette communauté dans les pays du bassin méditerranéen.

DISCUSSION

DISCUSSION

Les anomalies de conjugaison de la bilirubine au niveau hépatique constituent un champ particulier des maladies de la bilirubine à l'origine d'ictères pouvant avoir des conséquences très importantes, notamment au niveau nerveux central.

Il existe deux affections touchant le complexe de conjugaison de la bilirubine : le bénin syndrome de Gilbert dans lequel le déficit de conjugaison est relativement modéré et très souvent bien toléré chez l'enfant et l'adulte et la maladie de Crigler-Najjar dans laquelle le déficit est complet ou majeur (respectivement type I et II). Sur le plan physiopathologique, le déficit de conjugaison est lié à une anomalie de l'enzyme hépatique de conjugaison de la bilirubine appelée UGT1A1 (uridine diphosphate glucuronosyltransférase). L'anomalie phénotypique de l'enzyme est elle-même liée à une anomalie moléculaire du gène *UGT1A1*. Plusieurs types d'anomalies moléculaires ont été rapportés modifiant :

- soit l'activité enzymatique de la protéine produite (modifications de séquence peptidique de la protéine),
- soit la stabilité de l'ARN messager (dégradation précoce de l'ARNm dans les mutations non-sens),
- soit l'activité de transcription (modification de la séquence promotrice, mutations dans les séquences enhancer).

La maladie de Crigler-Najjar et le syndrome de Gilbert sont des affections génétiques autosomiques récessives. Le gène *UGT1A1* est situé à l'extrémité du bras long du chromosome 2 (en 2q37.1), comporte 5 exons codants et est placé sous le contrôle transcriptionnel d'une TATAbox.

I. Maladie de Crigler-Najjar et anomalies moléculaires

Dans la première partie de notre travail, nous avons étudié une cohorte de patients présentant un phénotype compatible avec celui d'une maladie de Crigler-Najjar (le diagnostic biochimique sur biopsie hépatique étant

actuellement quasiment abandonné). L'étude systématique du promoteur et des 5 exons du gène *UGT1A1* nous a permis de mettre en évidence une grande hétérogénéité allélique, à quelques exceptions près sur lesquelles nous reviendrons par la suite (Petit et al., 2004 ; Petit et al., 2006).

L'analyse des données de la littérature et des données obtenues au cours de ce travail met en évidence plus de cent anomalies de séquence dans ce gène responsables d'une maladie de Crigler-Najjar de type I ou II ou d'un syndrome de Gilbert. L'abondance des anomalies de séquence décrite dans le gène *UGT1A1* associée souvent à leur forte restriction de diffusion (ce sont souvent des mutations privées ou quasi privées) illustre la difficulté de ces études moléculaires (Petit et al., 2007).

Dans une étude publiée en 2000, Kadakol et collaborateurs ont séparé les différents types d'anomalies de séquences observés à cette date dans le gène *UGT1A1* en fonction du type d'anomalie phénotypique (type I ou II) (Kadakol et al., 2000). Toutes les anomalies de séquence entraînant un codon stop prématuré ou une modification de la séquence peptidique par décalage du cadre de lecture ont été retrouvées chez des patients présentant une maladie de Crigler-Najjar de type I. Chez les patients présentant une maladie de type II, seules des substitutions ponctuelles d'acides aminés ont été retrouvées. Dans notre étude, nous avons retrouvé des résultats tout à fait superposables. En effet, tous les patients présentant à l'état homozygote ou hétérozygote composite des anomalies génétiques majeures (mutation non-sens, frameshift, modification de l'épissage) avaient un phénotype de maladie de Crigler-Najjar de type I. En revanche, chez aucun patient présentant une maladie de Crigler-Najjar de type II, il n'a été retrouvé de telles associations. Concernant les mutations faux-sens, elles ont été retrouvées dans les deux populations.

Bien évidemment, si ces observations sont valables dans ce sens, nul ne peut affirmer que la présence, chez un individu, d'anomalies de séquence préalablement identifiées chez des patients présentant une maladie de type II sera nécessairement responsable du même type d'affection.

Plusieurs arguments viennent renforcer cette observation. D'abord, les anomalies de séquence sont rarement observées à l'état homozygote, les patients étant le plus souvent des hétérozygotes composites. Dans de telles situations, il est difficile de distinguer l'influence de chaque anomalie observée sur le phénotype. Deuxièmement, les anomalies de séquence observées dans les exons de *UGT1A1* peuvent être associées à une anomalie du promoteur (forme $A(TA)_7TAA$ ou $A(TA)_8TAA$) hétérozygote ou homozygote. La présence de cette seule anomalie (responsable d'un syndrome de Gilbert) réduit déjà l'activité transcriptionnelle du gène de manière proportionnelle au nombre de répétition du dinucléotide TA (Beutler et al., 1998). Ainsi, il est difficile de déterminer l'implication de chacune des anomalies associées dans le phénotype. Troisièmement, la distinction clinique entre le type I et le type II se fait par la

capacité à respectivement ne pas répondre ou répondre à l'influence d'un inducteur enzymatique tel que le phénobarbital. L'effet médié par le phénobarbital est lié à une séquence promotrice en amont de la TATAbox appelée PBREM (Sugatani et al., 2002). Sugatani et collaborateurs ont décrit un polymorphisme dans cette séquence responsable d'une diminution de l'activité transcriptionnelle (Sugatani et al., 2002). Cette donnée suggère donc que la distinction entre type I et type II doit être modulée par la recherche de ce polymorphisme dans la région PBREM. Quatrièmement, le métabolisme de la bilirubine ne se résume pas au seul gène *UGT1A1*. En effet, l'hème-oxygénase, en tant que facteur limitant de la production de bilirubine, intervient directement dans la régulation des concentrations de bilirubine. Récemment, il a été démontré que la longueur d'une séquence promotrice du gène *HMOX1* jouait un rôle dans la régulation de l'activité transcriptionnelle (Chen et al., 2002). De la même manière, le transporteur de la bilirubine de la circulation générale vers le cytoplasme de l'hépatocyte pourrait jouer un rôle régulateur. En effet, deux polymorphismes du gène *OATP2* ont été identifiés chez des patients présentant une hyperbilirubinémie non conjuguée (Huang et al., 2005 ; Huang, 2005).

Une anomalie de séquence identifiée dans ce travail est particulièrement représentative de la grande difficulté dans l'établissement de ce type de classement. La délétion c.396_401delCAACAA responsable de la modification peptidique p.His132Gln;Asn133_Lys134del n'a été retrouvée que dans la population tunisienne, illustrant l'hétérogénéité allélique de cette maladie. Cependant, elle a été identifiée dans plusieurs familles ayant une présentation variable :

- une famille dont l'enfant a présenté un ictère à bilirubine non-conjuguée à la naissance (ayant nécessité une photothérapie) mais qui a, par la suite, régressé et chez qui aucun autre épisode d'ictère n'a été noté par les parents,
- une famille dont l'enfant, après avoir présenté un ictère à la naissance qui a régressé, a présenté quelques épisodes d'hyperbilirubinémie modérée à type de syndrome de Gilbert,
- deux familles apparentées dont les mères ont été diagnostiquées pour une maladie de Crigler-Najjar de type II.

Cette observation illustre la notion de pénétrance variable des anomalies de séquence du gène *UGT1A1*, probablement en relation avec la présence ou non d'anomalies dans d'autres gènes impliqués dans le métabolisme de la bilirubine.

Ainsi, pour nous affranchir non seulement des effets des polymorphismes des séquences promotrices mais également des autres gènes impliqués dans le métabolisme (*HMOX1* et *OATP2*), nous allons développer une activité de biologie cellulaire avec l'expression des différentes formes mutées du gène *UGT1A1* dans des cellules HeLa et la mesure de l'activité enzymatique résultante. Grâce à ce type d'étude, nous pourrions déterminer précisément les implications des anomalies génétiques observées chez les patients sur l'activité

enzymatique de UGT1A1 et par la même développer les connaissances en matière de relation structure/activité.

Au vue des données exposées précédemment, nous avons choisi de ne pas présenter les anomalies de séquence observées au cours de ce travail comme systématiquement à l'origine d'une maladie de Crigler-Najjar de type I ou de type II et de rester prudent dans les relations génotype-phénotype.

Cependant, une analyse de la répartition des ces anomalies de séquence tout au long du gène *UGT1A1* amène plusieurs remarques.

Tout d'abord cette répartition n'est pas homogène avec des régions très riches en anomalies de séquence décrites comme les 140 premières bases de l'exon 4 ou au contraire des régions très pauvres comme les 110 dernières bases de l'exon 5. Ces observations sont à rapprochées de l'orientation fonctionnelle de la protéine UGT1A1 dans le réticulum endoplasmique établie par Ghosh et collaborateurs (Ghosh et al., 2005). En effet, les 37 derniers acides aminés codés par l'extrémité 3' de l'exon 5 dans laquelle aucune anomalie de séquence n'a été rapportée sont localisés soit dans la membrane du réticulum endoplasmique soit dans le cytosol. Il paraît donc probable que cette région soit peu importante dans l'activité enzymatique de UGT1A1. En revanche, les acides aminés 362 à 408 codés par la partie 5' de l'exon 4 sont situés dans une boucle intra-luminale contenant le domaine de liaison de l'acide UDP-glucuronique, région que l'on peut supposer structurellement importante dans l'activité enzymatique (Ghosh et al., 2005).

Comme nous l'avons vu précédemment, plusieurs autres protéines sont impliquées dans la conjugaison de la bilirubine. De récentes études ont établi des corrélations entre la présence d'anomalies moléculaires dans plusieurs de ces gènes (*HMOX1*, *OATP2*) ou dans des séquences régulatrices du gène *UGT1A1* (séquence PBREM) et la présence d'une hyperbilirubinémie non-conjuguée. Au cours de ce travail, nous avons été confronté à plusieurs cas dont l'étude moléculaire restreinte au gène *UGT1A1* n'a pas permis d'apporter une réponse complète (un seul allèle muté au locus morbide, phénotype de syndrome de Gilbert marqué en l'absence d'anomalie homozygote du promoteur et/ou du gène *UGT1A1*). Nous allons donc poursuivre l'exploration de ces patients par le développement du diagnostic moléculaire des polymorphismes du PBREM, de *OATP2* et du promoteur de *HMOX1*, ce qui devrait nous permettre d'avoir une vision plus « globale » du métabolisme de la bilirubine.

II. Diagnostics particuliers de maladie de Crigler-Najjar

L'étude d'un grand nombre de familles dont un ou plusieurs membres présentaient une maladie de Crigler-Najjar nous a permis de mettre en évidence plusieurs cas particuliers au cours de ce travail.

Dans un premier temps, nous avons mis en évidence le cas d'un enfant présentant une maladie de Crigler-Najjar liée à une isodisomie uniparentale paternelle du chromosome 2 (Petit et al., 2005). Le diagnostic moléculaire et le conseil génétique ont pu être rassurants pour une grossesse suivante, en dehors du risque de 50% d'une hétérozygotie composite [c.1-41_1-40insTA]+[c.513_515delCTT] pouvant être à l'origine d'une hyperbilirubinémie prolongée en période néonatale.

L'absence d'autres signes particuliers chez cet enfant suggère l'absence de gènes soumis à empreinte parentale paternelle sur ce chromosome, comme il avait déjà été rapporté dans la littérature (Chavez et al., 2000 ; Thompson et al., 2000).

Cette observation illustre l'importance de la recherche des anomalies de séquence chez les parents dans les maladies récessives pour le conseil génétique et avant la réalisation d'un diagnostic anténatal (Spiekerkoetter et al., 2002).

La deuxième famille nous a permis de mettre en évidence et de caractériser précisément pour la première fois une large délétion ayant emporté le promoteur et l'exon 1 du gène *UGT1A1*. Comme pour la famille précédente, cette observation confirme l'importance de l'étude familiale complète. En effet, l'étude des parents seuls aurait été faussement rassurante puisque de telles délétions ne peuvent pas être mises en évidence avec les techniques classiques de PCR. Dans plusieurs publications rapportant de nouvelles mutations dans le gène *UGT1A1*, les auteurs ont été confrontés, comme nous d'ailleurs, à des patients pour lesquels seule une anomalie hétérozygote a été mise en évidence dans l'ensemble des 5 exons, laissant alors planer le doute sur la possible présence de larges délétions (emportant au moins un des primers) dans la séquence de *UGT1A1*. En effet, comme il a été observé pour d'autres gènes (notamment le gène *CFTR*, Férec et al., 2006), la fréquence de tel remaniements génomiques est probablement sous estimée, principalement du fait de l'incapacité des techniques classiques de PCR à les mettre en évidence. Le développement de techniques comme la PCR quantitative fluorescente permettrait d'apporter une réponse plus complète dans de telles situations.

III. Evolution de la maladie de Crigler-Najjar au cours des siècles

Bien que la prévalence de la maladie de Crigler-Najjar soit très faible (de l'ordre de 1 naissance sur 1000000), il existe des groupes de population où la

fréquence est plus élevée et où l'hétérogénéité allélique est très réduite. L'hypothèse de l'effet fondateur semble être la plus probable : les anomalies de séquence sont apparues ou ont été introduites dans de petites communautés et s'y sont perpétuées de part l'isolement géographique et/ou culturel (ce qui contribue d'une part à la diminution de l'hétérogénéité allélique et d'autre part à l'augmentation du risque d'homozygotie par consanguinité). En effet, les autres mécanismes à l'origine de telles situations ont pu être écartés : absence de « hot spot » de mutation (pas d'îlots CpG, anomalies de séquence spécifiques d'une région du globe), effet protecteur de la présence à l'état hétérozygote d'anomalie de séquence du gène *UGT1A1* non démontrée.

Plusieurs cas d'effet fondateur pour une anomalie de séquence particulière ont ainsi pu être mis en évidence dans la maladie de Crigler-Najjar, en France et en Sardaigne notamment.

Au cours de ce travail nous avons pu, pour la première fois, caractériser sur le plan moléculaire un effet fondateur pour la mutation c.1070A>G dans la population tunisienne et montrer la liaison génétique entre ces patients tunisiens et le groupe de Bédouins du Koweït dans lequel cette même anomalie de séquence a été mise en évidence (Koshy et al., 2004 ; Petit et al., 2008). Nous avons ainsi pu relier des observations moléculaires (apparition de la mutation c.1070A>G dans la population tunisienne il y a environ 800 ans) avec l'histoire du pays (migration de Bédouins du Moyen Orient vers l'ouest au XI^{ème} siècle). La mise en évidence récente dans notre laboratoire de cette même anomalie de séquence chez un patient originaire de Syrie renforce l'hypothèse de l'apparition de cette anomalie de séquence dans un groupe de Bédouins originaire du Golfe Arabe à une date antérieure à celle de son introduction dans la population tunisienne, conformément aux données historiques puisque les premières extensions du peuple Bédouin vers l'Egypte et la Syrie remontent au VII^{ème} siècle. L'étude d'autres patients originaires de cette même région serait bien entendue nécessaire pour confirmer cette hypothèse.

Au cours de ce travail, nous avons également identifiée une nouvelle délétion dans l'exon 5 (c.1489delC responsable de la modification de séquence peptidique p.Ala497ProfsX4). De manière intéressante, cette délétion a été mise en évidence dans 4 familles différentes, toutes originaires de Turquie. A partir de ces observations, nous allons reprendre notre méthodologie pour l'appliquer à la population turque, ce qui devrait nous permettre de mettre en évidence un autre effet fondateur.

CONCLUSION

CONCLUSION

Au cours de ce travail, nous avons rapporté 21 nouvelles anomalies de séquence dans le gène *UGT1A1* chez des patients présentant une maladie de Crigler-Najjar de type I ou II, contribuant au développement des connaissances génétiques de cette maladie. Nous avons également décrit deux familles particulières, renforçant ainsi l'importance du diagnostic familial dans les maladies rares en général et dans cette maladie en particulier. Enfin, nous avons, par la mise en évidence d'effets fondateurs, contribué à une meilleure connaissance de l'histoire naturelle de la maladie et par la même permis un diagnostic plus ciblé en première intention dans certaines populations.

La découverte du gène responsable en 1992 a complètement modifié le diagnostic biologique, passant de la ponction-biopsie hépatique avec dosage de l'activité enzymatique bilirubine glucuronosyltransférase à un simple prélèvement sanguin avec analyse par des méthodes classiques des 5 exons et du promoteur du gène *UGT1A1*. Plus de 100 anomalies de séquence ont été rapportées chez des patients présentant une maladie de Crigler-Najjar de type I ou II et sont, pour la plupart, des mutations privées.

L'établissement de corrélation génotype-phénotype simples entre anomalie observée et type I ou II reste assez difficile voire hasardeuse. L'amélioration des connaissances dans les protéines et les gènes impliqués dans le métabolisme de la bilirubine a fait émerger de nouveaux partenaires comme l'hème-oxygénase (gène *HMOX1*) ou le canal de transfert hépatique de la bilirubine non conjuguée (gène *OATP2*) dont l'étude moléculaire pourrait expliquer la variabilité dans l'expression phénotypique d'une même anomalie de séquence chez deux individus différents.

Ces données moléculaires remettent un peu en question la classification clinique syndrome de Gilbert, maladie de Crigler-Najjar de type II et maladie de Crigler-Najjar de type I. En effet, la variabilité des concentrations de bilirubine non conjuguée entre les patients et chez un même patient ne permet pas

toujours une distinction clinique facile. De plus, le déficit enzymatique en UGT1A1 est modulé non seulement par d'autres gènes (hyperactivité de l'hème-oxygénase, diminution des capacités de transfert de la bilirubine non conjuguée de la circulation vers le cytoplasme de l'hépatocyte) mais également par l'environnement (situation d'hyperhémolyse, administration d'inducteurs ou d'inhibiteurs enzymatiques). L'élargissement des analyses moléculaires à d'autres gènes que *UGT1A1* apportera des réponses plus précises mais rendra également l'interprétation des analyses moléculaires plus difficiles.

Sur le plan thérapeutique, les possibilités restent limitées. Actuellement, la seule possibilité curative est la greffe hépatique avec donneur compatible. Cependant, pour des raisons de manque de donneurs ou de non volonté des malades face aux risques à court et long terme de la greffe, plusieurs ne peuvent en bénéficier. De plus, il est important que les personnes greffées soient bien conscientes que si elles sont phénotypiquement guéries, elles n'en restent pas moins transmetteurs de la maladie.

L'avenir thérapeutique de la maladie de Crigler-Najjar repose incontestablement sur la thérapie génique. Plusieurs formes sont envisageables comme les oligonucléotides chimériques ou le transfert *in vivo* du gène sain. Des résultats très prometteurs ont été obtenus chez le rat Gunn et devront encore être vérifiés chez le singe avant un passage dans un avenir que l'on espère proche à l'Homme.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Akizawa E, Koiwai K, Hayano T, Maezawa S, Matsushita T, Koiwai O. Direct binding of ligandin to uridine 5'-diphosphate glucuronosyltransferase 1A1. *Hepato Res.* 2008 38:402-9.

Allison AC. The distribution of the sickle-cell trait in East Africa and elsewhere, and its apparent relationship to the incidence of subtertian malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1954 48:312-8.

Antonarakis SE. Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. Nomenclature Working Group. *Hum Mutat.* 1998 11:1-3.

Aono S, Yamada Y, Keino H, Hanada N, Nakagawa T, Sasaoka Y, Yazawa T, Sato H, Koiwai O. Identification of defect in the genes for bilirubin UDP-glucuronosyl-transferase in a patient with Crigler-Najjar syndrome type II. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993 197:1239-44.

Aono S, Yamada Y, Keino H, Sasaoka Y, Nakagawa T, Onishi S, Mimura S, Koiwai O, Sato H. A new type of defect in the gene for bilirubin uridine 5'-diphosphate-glucuronosyltransferase in a patient with Crigler-Najjar syndrome type I. *Pediatr Res.* 1994 35:629-32.

Aono S, Adachi Y, Uyama E, Yamada Y, Keino H, Nanno T, Koiwai O, Sato H. Analysis of genes for bilirubin UDP-glucuronosyltransferase in Gilbert's syndrome. *Lancet.* 1995 345:958-9.

Arias IM. Chronic unconjugated hyperbilirubinemia without overt signs of hemolysis in adolescents and adults. *J Clin Invest.* 1962 41:2233-45.

Arias IM, Gartner LM, Cohen M, Ezzer JB, Levi AJ. Chronic nonhemolytic unconjugated hyperbilirubinemia with glucuronyl transferase deficiency. Clinical, biochemical, pharmacologic and genetic evidence for heterogeneity. *Am J Med.* 1969 47:395-409.

Bartsocas CS and Gerasimidi-Vazeou A. Genetics of type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2006 3 Suppl 3:508-13.

Beutler E, Gelbart T, Demina A. Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter: a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 95:8170-4.

Bernini LF and Hartevelde CL. Alpha-thalassaemia. *Baillieres Clin Haematol.* 1998 11:53-90.

Bosma PJ, Chowdhury NR, Goldhoorn BG, Hofker MH, Oude Elferink RP, Jansen PL, Chowdhury JR. Sequence of exons and the flanking regions of human bilirubin-UDP-glucuronosyltransferase gene complex and identification of a genetic mutation in a patient with Crigler-Najjar syndrome, type I. *Hepatology.* 1992a 15:941-7.

Bosma PJ, Chowdhury JR, Huang TJ, Lahiri P, Elferink RP, Van Es HH, Lederstein M, Whittington PF, Jansen PL, Chowdhury NR. Mechanisms of inherited deficiencies of multiple UDP-glucuronosyltransferase isoforms in two patients with Crigler-Najjar syndrome, type I. *FASEB J.* 1992b 6:2859-63.

Bosma PJ, Goldhoorn B, Oude Elferink RP, Sinaasappel M, Oostra BA, Jansen PL. A mutation in bilirubin uridine 5'-diphosphate-glucuronosyltransferase isoform 1 causing Crigler-Najjar syndrome type II. *Gastroenterology.* 1993 105:216-20.

Bosma PJ, Chowdhury JR, Bakker C, Gantla S, de Boer A, Oostra BA, Lindhout D, Tytgat GN, Jansen PL, Oude Elferink RP, Chowdhury NR. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. *N Engl J Med.* 1995 333:1171-5.

Bosma PJ, van der Meer IM, Bakker CT, Hofman A, Paul-Abrahamse M, Witteman JC. UGT1A1*28 allele and coronary heart disease: the Rotterdam Study. *Clin Chem.* 2003 49:1180-1.

Chalasani N, Chowdhury NR, Chowdhury JR, Boyer TD. Kernicterus in an adult who is heterozygous for Crigler-Najjar syndrome and homozygous for Gilbert-type genetic defect. *Gastroenterology.* 1997 112:2099-103.

Chávez B, Valdez E, Vilchis F. Uniparental disomy in steroid 5alpha-reductase 2 deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 85:3147-50.

Chen YH, Chau LY, Lin MW, Chen LC, Yo MH, Chen JW, Lin SJ. Heme oxygenase-1 gene promoter microsatellite polymorphism is associated with angiographic restenosis after coronary stenting. *Eur Heart J.* 2004 25:39-47.

Choi AM, Alam J. Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1996 15:9-19.

Ciotti M, Yeatman MT, Sokol RJ, Owens IS. Altered coding for a strictly conserved di-glycine in the major bilirubin UDP-glucuronosyltransferase of a Crigler-Najjar type I patient. *J Biol Chem.* 1995 Feb 270:3284-91.

Ciotti M, Obaray R, Martín MG, Owens IS. Genetic defects at the UGT1 locus associated with Crigler-Najjar type I disease, including a prenatal diagnosis. *Am J Med Genet.* 1997 68:173-8.

Ciotti M, Chen F, Rubaltelli FF, Owens IS. Coding defect and a TATA box mutation at the bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene cause Crigler-Najjar type I disease. *Biochim Biophys Acta.* 1998 1407:40-50.

Ciotti M, Werlin SL, Owens IS. Delayed response to phenobarbital treatment of a Crigler-Najjar type II patient with partially inactivating missense mutations in the bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1999 28:210-3.

Costa E, Vieira E, Martins M, Saraiva J, Cancela E, Costa M, Bauerle R, Freitas T, Carvalho JR, Santos-Silva E, Barbot J, Dos Santos R. Analysis of the UDP-glucuronosyltransferase gene in Portuguese patients with a clinical diagnosis of Gilbert and Crigler-Najjar syndromes. *Blood Cells Mol Dis.* 2006 36:91-7.

Cremer RJ, Perryman PW, Richards DH. Influence of light on the hyperbilirubinaemia of infants. *Lancet.* 1958 24:1094-7.

Crigler JF and Najjar VA. Congenital familial nonhemolytic jaundice with kernicterus. *Pediatrics.* 1952 10:169-80.

Cui Y, König J, Leier I, Buchholz U, Keppler D. Hepatic uptake of bilirubin and its conjugates by the human organic anion transporter SLC21A6. *J Biol Chem.* 2001 276:9626-30.

D'Apolito M, Marrone A, Servedio V, Vajro P, De Falco L, Iolascon A. Seven novel mutations of the UGT1A1 gene in patients with unconjugated hyperbilirubinemia. *Haematologica.* 2007 92:133-4.

den Dunnen JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat.* 2000;15(1):7-12. Erratum in: *Hum Mutat* 2002 20:403.

den Dunnen JT, Antonarakis SE. Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet.* 2001 109:121-4.

Ebbesen F, Agati G, Pratesi R. Phototherapy with turquoise versus blue light. *Arch Dis Child Fetal Neonatal.* 2003 88:430-1.

Erps LT, Ritter JK, Hersh JH, Blossom D, Martin NC, Owens IS. Identification of two single base substitutions in the UGT1 gene locus which abolish bilirubin uridine diphosphate glucuronosyltransferase activity in vitro. *J Clin Invest.* 1994 93:564-70.

Exner M, Minar E, Wagner O, Schillinger M. The role of heme oxygenase-1 promoter polymorphisms in human disease. *Free Radic Biol Med.* 2004 37:1097-104.

Farheen S, Sengupta S, Santra A, Pal S, Dhali GK, Chakravorty M, Majumder PP, Chowdhury A. Gilbert's syndrome: High frequency of the (TA)₇ TAA allele in India and its interaction with a novel CAT insertion in promoter of the gene for bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 gene. *World J Gastroenterol.* 2006 12:2269-75.

Férec C, Casals T, Chuzhanova N, Macek M Jr, Bienvenu T, Holubova A, King C, McDevitt T, Castellani C, Farrell PM, Sheridan M, Pantaleo SJ, Loumi O, Messaoud T, Cuppens H, Torricelli F, Cutting GR, Williamson R, Ramos MJ, Pignatti PF, Raguénès O, Cooper DN, Audrézet MP, Chen JM. Gross genomic rearrangements involving deletions in the CFTR gene: characterization of six new events from a large cohort of hitherto unidentified cystic fibrosis chromosomes and meta-analysis of the underlying mechanisms. *Eur J Hum Genet.* 2006 14:567-76.

Foulk WT, Butt HR, Owen CA Jr, Whitecomb FF Jr, Mason HL. Constitutional hepatic dysfunction (Gilbert's disease): its natural history and related syndromes. *Medicine (Baltimore).* 1959 38:25-46.

Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SS, Goertzen TC, Chowdhury NR, Warkentin PI, Dorko K, Sauter BV, Strom SC. Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med.* 1998 338:1422-6.

Francoual J, Rivierre A, Mokrani C, Khrouf N, Gottrand F, Myara A, Le Bihan B, Capel L, Lindenbaum A, Labrune P. Crigler-Najjar syndrome type I in Tunisia may be associated with a founder effect related to the Q357R mutation within the UGT1 gene. *Hum Mutat.* 2002a 19:570-1.

Francoual J, Trioche P, Mokrani C, Seboui H, Khrouf N, Chalas J, Clement M, Capel L, Tachdjian G, Labrune P. Prenatal diagnosis of Crigler-Najjar syndrome type I by single-strand conformation polymorphism (SSCP). *Prenat Diagn.* 2002b 22:914-6.

Gajdos V, Petit F, Trioche P, Mollet-Boudjemline A, Chauveaud A, Myara A, Trivin F, Francoual J, Labrune P. Successful pregnancy in a Crigler-Najjar type I patient treated by phototherapy and semimonthly albumin infusions. *Gastroenterology*. 2006 131:921-4.

Gajdos V, Petit FM, Perret C, Mollet-Boudjemline A, Colin P, Capel L, Nicaud V, Evans A, Arveiler D, Parisot F, Francoual J, Genin E, Cambien F, Labrune P. Further evidence that the UGT1A1*28 allele is not associated with coronary heart disease: The ECTIM Study. *Clin Chem*. 2006 52:2313-4.

Gantla S, Bakker CT, Deocharan B, Thummala NR, Zweiner J, Sinaasappel M, Roy Chowdhury J, Bosma PJ, Roy Chowdhury N. Splice-site mutations: a novel genetic mechanism of Crigler-Najjar syndrome type 1. *Am J Hum Genet*. 1998 62:585-92.

Ghosh SS, Lu Y, Lee SW, Wang X, Guha C, Roy-Chowdhury J, Roy-Chowdhury N. Role of cysteine residues in the function of human UDP glucuronosyltransferase isoform 1A1 (UGT1A1). *Biochem J*. 2005 392:685-92.

Gilbert A, Lereboullet P. La cholémie simple familiale. *Sem Med*. 1901 21:241-3.

Holstein A, Plaschke A, Lohse P, Egberts EH. Successful photo-and phenobarbital therapy during pregnancy in a woman with Crigler-Najjar syndrome type II. *Scand J Gastroenterol*. 2005 40:1124-6.

Huang CS, Luo GA, Huang MJ, Chen ES, Young TH, Chao YC. A novel compound heterozygous variation of the uridine-diphosphoglucuronosyl transferase 1A1 gene that causes Crigler-Najjar syndrome type II. *Pharmacogenetics*. 2001 11:639-42.

Huang CS, Huang MJ, Lin MS, Yang SS, Teng HC, Tang KS. Genetic factors related to unconjugated hyperbilirubinemia amongst adults. *Pharmacogenet Genomics*. 2005 15:43-50.

Huang CS. Molecular genetics of unconjugated hyperbilirubinemia in Taiwanese. *J Biomed Sci*. 2005 12:445-50.

Huang CS, Tan N, Yang SS, Sung YC, Huang MJ. Crigler-Najjar syndrome type 2. *J Formos Med Assoc*. 2006 105:950-3.

Immenschuh S, Shan Y, Kroll H, Santoso S, Wössmann W, Bein G, Bonkovsky HL. Marked hyperbilirubinemia associated with the heme oxygenase-1 gene promoter microsatellite polymorphism in a boy with autoimmune hemolytic anemia. *Pediatrics*. 2007 119:764-7.

Iolascon A, Meloni A, Coppola B, Rosatelli MC. Crigler-Najjar syndrome type II resulting from three different mutations in the bilirubin uridine 5'-diphosphate-glucuronosyltransferase (UGT1A1) gene. *J Med Genet.* 2000 37:712-3.

Ito T, Katagiri C, Ikeno S, Takahashi H, Nagata N, Terakawa N. Phenobarbital following phototherapy for Crigler-Najjar syndrome type II with good fetal outcome: a case report. *J Obstet Gynaecol Res.* 2001 27:33-5.

Iwai M, Suzuki H, Ieiri I, Otsubo K, Sugiyama Y. Functional analysis of single nucleotide polymorphisms of hepatic organic anion transporter OATP1B1 (OATP-C). *Pharmacogenetics.* 2004 14:749-57.

Jacobson EM and Tomer Y. The genetic basis of thyroid autoimmunity. *Thyroid.* 2007 17:949-61.

Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Hummel-Eisenbeiss J, Burchell B, Keppler D. ATP-dependent transport of bilirubin glucuronides by the multidrug resistance protein MRP1 and its hepatocyte canalicular isoform MRP2. *Biochem J.* 1997 327:305-10.

Kadakol A, Ghosh SS, Sappal BS, Sharma G, Chowdhury JR, Chowdhury NR. Genetic lesions of bilirubin uridine-diphosphoglucuronate glucuronosyltransferase (UGT1A1) causing Crigler-Najjar and Gilbert syndromes: correlation of genotype to phenotype. *Hum Mutat.* 2000 16:297-306.

Kamisako T, Kobayashi Y, Takeuchi K, Ishihara T, Higuchi K, Tanaka Y, Gabazza EC, Adachi Y. Recent advances in bilirubin metabolism research: the molecular mechanism of hepatocyte bilirubin transport and its clinical relevance. *J Gastroenterol.* 2000 35:659-64.

Kaufman SS, Wood RP, Shaw BW Jr, Markin RS, Rosenthal P, Gridelli B, Vanderhoof JA. Orthotopic liver transplantation for type I Crigler-Najjar syndrome. *Hepatology.* 1986 6:1259-62.

Kavazarakis E, Tsezou A, Tzetis M, Hadjidimoula A, Kitsiou S, Kanavakis E, Karpathios T. Gilbert syndrome: analysis of the promoter region of the uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1 gene in the Greek population. *Eur J Pediatr.* 2000 159:873-4.

Koiwai O, Nishizawa M, Hasada K, Aono S, Adachi Y, Mamiya N, Sato H. Gilbert's syndrome is caused by a heterozygous missense mutation in the gene for bilirubin UDP-glucuronosyltransferase. *Hum Mol Genet.* 1995a 4:1183-6.

Koiwai O, Yasui Y, Hasada K, Aono S, Sato H, Fujikake M, Aoki T. Three Japanese patients with Crigler-Najjar syndrome type I carry an identical nonsense mutation in the gene for UDP-glucuronosyltransferase. *Jpn J Hum Genet.* 1995b 40:253-7.

König J, Rost D, Cui Y, Keppler D. Characterization of the human multidrug resistance protein isoform MRP3 localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology.* 1999 29:1156-63.

Koshy A, Bosma PJ, Oude-Elferink RP. Crigler-Najjar syndrome type 1 associated with combined 1070A-->G, Q357R and (TA)7 mutation in Kuwaiti Bedouin families indicate a founder effect in Arabs. *J Clin Gastroenterol.* 2004 38:465-7.

Kuenzle CC, Maier C, Ruttner JR. The nature of four bilirubin fractions from serum and of three bilirubin fractions from bile. *J Lab Clin Med.* 1966 67:294-306.

Labrune P, Myara A, Hadchouel M, Ronchi F, Bernard O, Trivin F, Chowdhury NR, Chowdhury JR, Munnich A, Odièvre M. Genetic heterogeneity of Crigler-Najjar syndrome type I: a study of 14 cases. *Hum Genet.* 1994 94:693-7.

Labrune P, Myara A, Chalas J, Le Bihan B, Capel L, Francoual J. Association of a homozygous (TA)8 promoter polymorphism and a N400D mutation of UGT1A1 in a child with Crigler-Najjar type II syndrome. *Hum Mutat.* 2002 20:399-401.

Langbaum ME, Farber SJ, Rosenthal P. Automated total and neonatal bilirubin values in newborns: is a distinction clinically relevant? *Clin Chem.* 1992 38:1690-3.

Lauff JJ, Kasper ME, Ambrose RT. Separation of bilirubin species in serum and bile by high-performance reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr.* 1981 226:391-402.

Lauff JJ, Kasper ME, Wu TW, Ambrose RT. Isolation and preliminary characterization of a fraction of bilirubin in serum that is firmly bound to protein. *Clin Chem.* 1982 28:629-37.

Le Bihan-Levaufre B, Francoual J, Chalas J, Trioche P, Capel L, Lindenbaum A, Labrune P. [Genetic incidence of Gilbert's syndrome in France]. *Gastroenterol Clin Biol.* 2001 25:557-8.

Levesque E, Girard H, Journault K, Lepine J, Guillemette C. Regulation of the UGT1A1 bilirubin-conjugating pathway: role of a new splicing event at the UGT1A locus. *Hepatology.* 2007 45:128-38.

Li C and Wu Q. Adaptative evolution of multiple-variable exons and structural diversity of drug-metabolizing enzymes. *BMC Evol Biol.* 2007 2;7:69.

Lucey J, Ferriero M, Hewitt J. Prevention of hyperbilirubinemia of prematurity by phototherapy. *Pediatrics.* 1968 41:1047-54.

Maines MD. New insights into biliverdin reductase functions: linking heme metabolism to cell signaling. *Physiology (Bethesda).* 2005 20:382-9.

Maruo Y, Serdaroglu E, Iwai M, Takahashi H, Mori A, Bak M, Calkavur S, Sato H, Takeuchi Y. A novel missense mutation of the bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene in a Turkish patient with Crigler-Najjar syndrome type 1. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2003 37:627-30.

Mc Donagh AF, Palma LA, Lightner DA. Blue light and bilirubin excretion. *Science.* 1980 208:145-51.

Moghrabi N, Clarke DJ, Boxer M, Burchell B. Identification of an A-to-G missense mutation in exon 2 of the UGT1 gene complex that causes Crigler-Najjar syndrome type 2. *Genomics.* 1993a 18:171-3.

Moghrabi N, Clarke DJ, Burchell B, Boxer M. Cosegregation of intragenic markers with a novel mutation that causes Crigler-Najjar syndrome type I: implication in carrier detection and prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet.* 1993b 53:722-9.

Muslu N, Dogruer ZN, Eskandari G, Atici A, Kul S, Atik U. Are glutathione S-transferase gene polymorphisms linked to neonatal jaundice? *Eur J Pediatr.* 2008 167:57-61.

Nguyen TH, Bellodi-Privato M, Aubert D, Pichard V, Myara A, Trono D, Ferry N. Therapeutic lentivirus-mediated neonatal in vivo gene therapy in hyperbilirubinemic Gunn rats. *Mol Ther.* 2005 12:852-9.

Nguyen TH, Aubert D, Bellodi-Privato M, Flageul M, Pichard V, Jaidane-Abdelghani Z, Myara A, Ferry N. Critical assessment of lifelong phenotype correction in hyperbilirubinemic Gunn rats after retroviral mediated gene transfer. *Gene Ther.* 2007 14:1270-7.

Nicholls RD. Genomic imprinting and uniparental disomy in Angelman and Prader-Willi syndromes: a review. *Am J Med Genet.* 1993 46:16-25.

Niemi M, Schaeffeler E, Lang T, Fromm MF, Neuvonen M, Kyrklund C, Backman JT, Kerb R, Schwab M, Neuvonen PJ, Eichelbaum M, Kivistö KT. High plasma pravastatin concentrations are associated with single nucleotide polymorphisms and haplotypes of organic anion transporting polypeptide-C (OATP-C, SLCO1B1). *Pharmacogenetics.* 2004 4:429-40.

Ostrow JD, Pascolo L, Brites D, Tiribelli C. Molecular basis of bilirubin-induced neurotoxicity. *Trends Mol Med.* 2004 Feb;10(2):65-70.

Petit FM, Gajdos V, Francoual J, Capel L, Parisot F, Poüs C, Labrune P. Allelic heterogeneity of Crigler-Najjar type I syndrome: a study of 24 cases. *Clin Genet.* 2004 66:571-2.

Petit FM, Gajdos V, Parisot F, Capel L, Aboura A, Lachaux A, Tachdjian G, Poüs C, Labrune P. Paternal isodisomy for chromosome 2 as the cause of Crigler-Najjar type I syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2005 13:278-82.

Petit F, Gajdos V, Capel L, Parisot F, Myara A, Francoual J, Labrune P. Crigler-Najjar type II syndrome may result from several types and combinations of mutations in the UGT1A1 gene. *Clin Genet.* 2006 69:525-7.

Petit FM, Hébert M, Gajdos V, Mollet-Boudjemline A, Labrune P. Comments on seven novel mutations of the UGT1A1 gene in patients with unconjugated hyperbilirubinemia by D'Apolito et al. *Haematologica.* 2007 92:e80.

Petit FM, Bézieau S, Gajdos V, Parisot F, Scoul C, Capel L, Stozinic V, Khrouf N, M'rad R, Koshy A, Mollet-Boudjemline A, Francoual J, Labrune P. The Tunisian population history through the Crigler-Najjar type I syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2008 Jan 16 [Epub ahead of print]

Rigato I, Pascolo L, Ferneti C, Ostrow JD, Tiribelli C. The human multidrug-resistance-associated protein MRP1 mediates ATP-dependent transport of unconjugated bilirubin. *Biochem J.* 2004 15:335-41.

Ritter JK, Sheen YY, Owens IS. Cloning and expression of human liver UDP-glucuronosyltransferase in COS-1 cells. 3,4-catechol estrogens and estriol as primary substrates. *J Biol Chem.* 1990 May 265:7900-6.

Ritter JK, Chen F, Sheen YY, Tran HM, Kimura S, Yeatman MT, Owens IS. A novel complex locus UGT1 encodes human bilirubin, phenol, and other UDP-glucuronosyltransferase isozymes with identical carboxyl termini. *J Biol Chem.* 1992a 267:3257-61.

Ritter JK, Yeatman MT, Ferreira P, Owens IS. Identification of a genetic alteration in the code for bilirubin UDP-glucuronosyltransferase in the UGT1 gene complex of a Crigler-Najjar type I patient. *J Clin Invest.* 1992b 90:150-5.

Ritter JK, Yeatman MT, Kaiser C, Gridelli B, Owens IS. A phenylalanine codon deletion at the UGT1 gene complex locus of a Crigler-Najjar type I patient generates a pH-sensitive bilirubin UDP-glucuronosyltransferase. *J Biol Chem.* 1993 268:23573-9.

Rosatelli MC, Meloni A, Faa V, Saba L, Crisponi G, Clemente MG, Meloni G, Piga MT, Cao A. Molecular analysis of patients of Sardinian descent with Crigler-Najjar syndrome type I. *J Med Genet.* 1997 34:122-5.

Sappal BS, Ghosh SS, Shneider B, Kadakol A, Chowdhury JR, Chowdhury NR. A novel intronic mutation results in the use of a cryptic splice acceptor site within the coding region of UGT1A1, causing Crigler-Najjar syndrome type 1. *Mol Genet Metab.* 2002 75:134-42.

Seppen J, Bosma PJ, Goldhoorn BG, Bakker CT, Chowdhury JR, Chowdhury NR, Jansen PL, Oude Elferink RP. Discrimination between Crigler-Najjar type I and II by expression of mutant bilirubin uridine diphosphate-glucuronosyltransferase. *J Clin Invest.* 1994 94:2385-91.

Seppen J, Steenken E, Lindhout D, Bosma PJ, Elferink RP. A mutation which disrupts the hydrophobic core of the signal peptide of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase, an endoplasmic reticulum membrane protein, causes Crigler-Najjar type II. *FEBS Lett.* 1996 390:294-8.

Servedio V, d'Apolito M, Maiorano N, Minuti B, Torricelli F, Ronchi F, Zancan L, Perrotta S, Vajro P, Boschetto L, Iolascon A. Spectrum of UGT1A1 mutations in Crigler-Najjar (CN) syndrome patients: identification of twelve novel alleles and genotype-phenotype correlation. *Hum Mutat.* 2005 25:325.

Shapiro SM. Bilirubin toxicity in the developing nervous system. *Pediatr Neurol.* 2003 29:410-21.

Smith JF Jr, Baker JM. Crigler-Najjar disease in pregnancy. *Obstet Gynecol.* 1994 84:670-2.

Spiekerkoetter U, Eeds A, Yue Z, Haines J, Strauss AW, Summar M. Uniparental disomy of chromosome 2 resulting in lethal trifunctional protein deficiency due to homozygous alpha-subunit mutations. *Hum Mutat.* 2002 20:447-51.

Sugatani J, Kojima H, Ueda A, Kakizaki S, Yoshinari K, Gong QH, Owens IS, Negishi M, Sueyoshi T. The phenobarbital response enhancer module in the human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 gene and regulation by the nuclear receptor CAR. *Hepatology.* 2001 33:1232-8.

Sugatani J, Yamakawa K, Yoshinari K, Machida T, Takagi H, Mori M, Kakizaki S, Sueyoshi T, Negishi M, Miwa M. Identification of a defect in the UGT1A1 gene promoter and its association with hyperbilirubinemia. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 292:492-7.

Sutomo R, Laosombat V, Sadewa AH, Yokoyama N, Nakamura H, Matsuo M, Nishio H. Novel missense mutation of the UGT1A1 gene in Thai siblings with Gilbert's syndrome. *Pediatr Int.* 2002 44:427-32.

Taylor WG, Walkinshaw SA, Farquharson RG, Fisker RA, Gilmore IT. Pregnancy in Crigler-Najjar syndrome. Case report. *Br J Obstet Gynaecol.* 1991 98:1290-1.

Thompson DA, McHenry CL, Li Y, Richards JE, Othman MI, Schwinger E, Vollrath D, Jacobson SG, Gal A. Retinal dystrophy due to paternal isodisomy for chromosome 1 or chromosome 2, with homoallelism for mutations in RPE65 or MERTK, respectively. *Am J Hum Genet.* 2002 70:224-9.

Tirona RG, Leake BF, Merino G, Kim RB. Polymorphisms in OATP-C: identification of multiple allelic variants associated with altered transport activity among European- and African-Americans. *J Biol Chem.* 2001 276:35669-75.

Vítek L, Novotný L, Sperl M, Holaj R, Spáčil J. The inverse association of elevated serum bilirubin levels with subclinical carotid atherosclerosis. *Cerebrovasc Dis.* 2006 21:408-14.

Wang P, Kim RB, Chowdhury JR, Wolkoff AW. The human organic anion transport protein SLC21A6 is not sufficient for bilirubin transport. *J Biol Chem.* 2003 278:20695-9.

Wrzeska M and Rejdach B. Genomic imprinting in mammals. *J Appl Genet.* 2004 45:427-33.

Yamada N, Yamaya M, Okinaga S, Nakayama K, Sekizawa K, Shibahara S, Sasaki H. Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to emphysema. *Am J Hum Genet.* 2000 66:187-95.

Yong WP, Ramirez J, Innocenti F, Ratain MJ. Effects of ketoconazole on glucuronidation by UDP-glucuronosyltransferase enzymes. *Clin Cancer Res.* 2005 11:6699-704.

Zeviani M and Carelli V. Mitochondrial disorders. *Curr Opin Neurol.* 2007 20:564-71.

Zhang D, Chando TJ, Everett DW, Patten CJ, Dehal SS, Humphreys WG. In vitro inhibition of UDP glucuronosyltransferases by atazanavir and other HIV protease inhibitors and the relationship of this property to in vivo bilirubin glucuronidation. *Drug Metab Dispos.* 2005 33:1729-39.

INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX

INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX

Index des figures

Figure 1. Biosynthèse de l'hème à partir de l'acide δ -aminolévulinique.....	11
Figure 2. Métabolisme des pigments érythrocytaires.....	12
Figure 3. Modifications chimiques menant de l'hème érythrocytaire à la bilirubine non conjuguée. ...	13
Figure 4. Etape de conjugaison hépatique de la bilirubine.	15
Figure 5. Circulation hépato-biliaire de la bilirubine : en traits pleins voie normale, en pointillé en cas de dysfonction de MRP2 (BNC : bilirubine non conjuguée, BC : bilirubine conjuguée, OATP2 : organic anion transporter polypeptide 2, MRP1 : multidrug-resistance protein 1, MRP2 : multidrug-resistance protein 2, MRP3 : multidrug-resistance protein 3).	16
Figure 6. Organisation du cluster de la famille de gènes UGT1A.	18
Figure 7. Séquence du gène UGT1A1 humain (séquences 5' et 3' UTR en vert, exons codants en noir, exons non codants en violet, introns en bleu), d'après Ensembl Genome Browser (Ensembl transcript ID ENST00000305208).....	19
Figure 8. Séquence de la protéine UGT1A1 humaine, d'après Ensembl Genome Browser (Ensembl peptid ID ENSP00000304845).....	21
Figure 9. Orientation de la protéine UGT1A1 dans le réticulum endoplasmique déduite de la séquence peptidique. En dehors des 26 acides aminés de la partie C-terminale et des 17 acides aminés transmembranaires, l'ensemble de la molécule UGT1A1 est compartimentalisée dans le réticulum endoplasmique. La partie N-terminale de la molécule (en traits pleins) contient un peptide signal de 20 acides aminés qui est clivé après maturation de la protéine. Ce domaine confère à l'enzyme une spécificité pour les substrats aglycone. Il contient également une hélice membranaire. La partie C-terminale intra-luminale de UGT1A1 contient un domaine de liaison à l'acide UDP-glucuronique. Les triangles représentent les résidus cystéines. D'après Ghosh et al., 2005.	21
Figure 10. a : représentation schématique du gène UGT1A1 et des deux ARNm alternatifs UGT1A1_v1 et UGT1A1_v2 ; b : taux de glucuronisation de la bilirubine dans des cellules HEK-293 exprimant UGT1A1_i1, UGT1A1_i2 séparément ou en association. D'après Levesque et al., 2007.....	23
Figure 11. a : séquence nucléotidique de la région PBREM encadrant la mutation c.1-3263T>G ; b : effet de la mutation c.1-3263T>G sur l'activité transcriptionnelle de UGT1A1 (luciférase utilisée comme gène rapporteur). D'après Sugatani et al., 2002.	23
Figure 12. Coupe coronale du cerveau d'un enfant décédé d'un ictère nucléaire.	32
Figure 13. Imagerie par résonance magnétique d'un enfant mâle de 6 jours né à 37 SA et présentant une hyperbilirubinémie totale à 610 μ mol/L. Images A et B en coupe axiale (T1, TR 500, TE 12). Image	

C en coupe coronale (TR600, TE 34). Image D en coupe sagittale (TR 450, TE 12). On note un hypersignal bilatéral du globus pallidus (actuellement âgé de 7 ans, cet enfant présente un développement intellectuel normal, un handicap modéré avec dystonie et athétosie ; il marche avec un déambulateur). D'après Shapiro, 2003. 36

Figure 14. Conséquences phénotypiques des embryons gynogénètes (au milieu) et androgénètes (à droite). 45

Figure 15. Arbre décisionnel pour le diagnostic moléculaire du syndrome de Gilbert et de la maladie de Crigler-Najjar. 53

Figure 16. Répartition des anomalies de séquence observées dans le gène UGT1A1. 65

Figure 17. Séquence comparée de UGT1A1 entre l'homme et 6 espèces de mammifères (* : position des mutations faux-sens observées dans l'espèce humaine). 68

Index des tableaux

Tableau 1. Polymorphismes synonymes et non-synonymes rapportés dans le gène UGT1A1..... 20

Tableau 2. Fréquence des anomalies de séquence du promoteur du gène UGT1A1 dans la population générale en France, Grèce, Tunisie et Inde. 28

Tableau 3. Comparaison des données clinico-biologiques entre l'ictère non-hémolytique familial (syndrome de Gilbert) et l'ictère non-hémolytique congénital avec ictère nucléaire (maladie de Crigler-Najjar). D'après Crigler and Najjar, 1952..... 30

Tableau 4. Caractéristiques des maladies autosomiques dominantes ou récessives..... 42

Tableau 5. Caractéristiques des maladies liées à l'X dominantes ou récessives. 42

Tableau 6. Nomenclature pour la désignation des anomalies génétiques et peptidiques selon Antonarakis..... 49

Tableau 7. Amorces utilisées pour l'amplification des séquences d'intérêt dans l'étude moléculaire du gène UGT1A1..... 55

Tableau 8. Conditions de PCR pour l'amplification des séquences d'intérêt dans l'étude moléculaire du gène UGT1A1. 55

Tableau 9. Anomalies de séquence du gène UGT1A1 mises en évidence au laboratoire 58

Tableau 10. Anomalies de séquence du gène UGT1A1..... 63

Tableau 11. Homologies de séquence de la protéine UGT1A1 entre l'homme et différentes espèces de mammifères..... 66

Aspects moléculaires des maladies rares du métabolisme hépatique : à propos de la maladie de Crigler-Najjar

La maladie de Crigler-Najjar est une affection rare du métabolisme hépatique liée à un déficit partiel ou total de l'activité de l'enzyme UGT1A1 conjuguant la bilirubine. La maladie se manifeste dans les premières heures suivant la naissance par un ictère intense et persistant à bilirubine non conjuguée. Sur le plan clinique, les enfants atteints sont à risque élevé de lésions cérébrales irréversibles liées à des dépôts de bilirubine non-conjuguée dans les noyaux gris centraux (ictère nucléaire).

Depuis la description de cette pathologie par Crigler et Najjar en 1952, des études moléculaires ont permis d'identifier le gène responsable. *UGT1A1* est situé à l'extrémité du bras long du chromosome 2 et comporte 5 exons. Il existe deux formes de maladie de Crigler-Najjar : le type I dans lequel le déficit d'activité est complet et l'enzyme non inductible et le type II dans lequel le déficit est partiel et l'enzyme inductible.

Au cours de ce travail, nous avons décrit plusieurs nouvelles anomalies de séquences responsables de maladie de Crigler-Najjar de type I ou de type II, tout en les resituant dans un contexte d'analyse de relations génotype-phénotype. Dans un deuxième temps, nous avons étudié plus particulièrement deux familles de malades ayant une présentation moléculaire particulière (premier cas d'isodisomie uniparentale paternelle du chromosome 2, caractérisation d'une large délétion dans le gène *UGT1A1*), soulignant ainsi l'importance de l'enquête familiale dans cette pathologie. Dans une dernière partie, nous avons caractérisé sur le plan moléculaire un effet fondateur pour la mutation c.1070A>G dans la population tunisienne au sein de laquelle la maladie de Crigler-Najjar est particulièrement fréquente.

Mots clés : maladie de Crigler-Najjar, anomalies de séquence, diagnostic moléculaire, effet fondateur

Molecular aspects of rare metabolic hepatic disorders: about the Crigler-Najjar syndrome

Crigler-Najjar syndrome is a rare hepatic disorder due to partial or total deficiency of enzymatic activity of UGT1A1 involved in bilirubin conjugation. The disease manifests itself during the first hours of life by intense and persistent unconjugated hyperbilirubinaemia. Affected children are at high risk to develop brain non-reversible damages (kernicterus) due to bilirubin encephalopathy.

Since 1952 and the description of this syndrome by Crigler and Najjar, molecular studies allowed to identify the gene. *UGT1A1* gene is located on the terminal part of the chromosome 2 and is composed of 5 exons. Crigler-Najjar syndrome can take two forms: type I with complete and non-inducible enzymatic deficiency and type II with non-complete and inducible enzymatic deficiency.

In this work, we have described new mutations responsible for Crigler-Najjar syndrome type I or II and we have analysed them in terms of phenotype-genotype correlations. Secondly we have studied two families with non-canonical presentation (first description of paternal isodisomy for chromosome 2, molecular characterisation of a large deletion in *UGT1A1* gene), highlighting the importance of familial investigations in this syndrome. In the last part, we have molecularly characterised a founder effect for the mutation c.1070A>G in the Tunisian population, in whom Crigler-Najjar syndrome is particularly frequent.

Key-words: Crigler-Najjar syndrome, mutations, molecular diagnosis, founder effect

François Mickael PETIT
Service de biochimie et hormonologie
Unité de génétique moléculaire
Hôpital Antoine Béclère
157 rue de la Porte de Trivaux
92141 Clamart cedex