

Université d'Angers
UFR de Sciences Médicales
Ecole de Sage-femme René Rouchy

DIPLOME D'ETAT DE SAGE-FEMME

**IMPACT DU DIAGNOSTIC PRENATAL SUR LES
MALADIES MITOCHONDRIALES.**

Etude de cas réalisée au CHU d'Angers

Présenté par : ORDRONNEAU Anne-Claire

Sous la direction de : Monsieur le Professeur PROCACCIO Vincent

Avril 2012

Engagement de non plagiat



Je soussignée Ordronneau Anne-Claire déclare être pleinement consciente que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire.

Signature :



Remerciements

Je tiens à remercier tout particulièrement le Professeur Vincent PROCACCIO pour avoir cru en ce projet de mémoire sage-femme. Ainsi que pour m'avoir transmis son vif intérêt pour la problématique mitochondriale qui se situe au carrefour de diverses thématiques (biologie, clinique, éthique, droit) tout aussi passionnantes les unes que les autres, pour sa disponibilité permanente et son sens de la pédagogie.

Je remercie également le Docteur Magalie BARTH pour m'avoir acceptée lors de consultations de diagnostic prénatal avec toute la difficulté qui existe lorsque l'annonce d'un résultat à une patiente s'avère mauvais, mais également de m'avoir facilitée l'accès aux dossiers pédiatriques et conseillée dans le choix de mon sujet.

Je remercie également Madame Brigitte GOICHON pour ses explications et éclaircissements quand cela était nécessaire mais aussi sa grande disponibilité.

Je remercie ma famille qui avec patience m'a soutenue, écoutée et aidée dans la rédaction de ce mémoire.

Enfin je remercie l'école de sage-femme René ROUCHY, sa directrice et son directeur technique Monsieur le Professeur Loïc SENTILHES pour m'avoir permis de réaliser ce mémoire.

Sommaire

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT	3
REMERCIEMENTS.....	4
SOMMAIRE	5
GLOSSAIRE.....	6
INTRODUCTION	7
1^{ERE} PARTIE : LA MITOCHONDRIE, LE SYNDROME DE LEIGH ET LE DIAGNOSTIC PRÉNATAL.	9
LA MITOCHONDRIE.....	10
I. Généralités.....	10
II. Génétique mitochondriale	11
III. Physiopathologie	13
LE SYNDROME DE LEIGH	17
I. Diagnostic du syndrome de Leigh	18
II. Traitement	19
III. Prise en charge clinique	20
LE DIAGNOSTIC PRÉNATAL.....	21
I. Définitions.....	21
II. Prise en charge du diagnostic prénatal	22
III. Outils du diagnostic prénatal.....	22
IV. Le diagnostic prénatal en pratique.....	23
2^E PARTIE : SYNDROME DE LEIGH ET DIAGNOSTIC PRÉNATAL : ETUDE DE CAS	25
METHODOLOGIE	26
OBJECTIFS.....	26
ETUDE DE CAS.....	27
I. Famille A	27
I.1. Historique familiale	27
I.2. Fœtus 1 (patient III 2).....	28
I.3. Résultats Fœtus 1 (patient III 2)	29
I.4. Fœtus 2 (patient III 3).....	29
I.5. Résultats fœtus 2 (patient III 3).....	30
I.6. Résultats de la famille A	30
I. Famille B	31
I.1. Historique familiale	31
I.2. Fœtus (patient III 4).....	32
I.3. Résultats fœtus (patient III 4).....	33
I.4. Résultats famille B.....	33
DISCUSSION	34
I. L'étude	34
I.1. Famille A.....	34
I.2. Famille B.....	35
II. Les autres études	36
I.1. La mutation 14459G>A.....	37
II.1. La mutation m.14487C>T	41
III. Aspect éthique	44
IV. Perspectives scientifiques	46
CONCLUSION.....	48
BIBLIOGRAPHIE	49
ANNEXES.....	54

Glossaire

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNmt : ADN mitochondrial

ADNn : ADN nucléaire

ADP : Adénosine diphosphate

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ARNr : ARN ribosomique

ARNt : ARN de transfert

ATP : Adénosine triphosphate

Ca²⁺ : Ion calcium

CFTR : Cystic fibrosis transmembrane receptor

CPDPN : Centre pluridisciplinaire de diagnostic prénatal

CPEO : ophtalmoplégie externe progressive chronique

DPI : diagnostic pré-implantatoire

DPN : diagnostic prénatal

ERO : espèces réactives oxygénées

FADH₂ : Flavine adénine dinucléotide hydrogénée

IMG : Interruption médicale de grossesse

MELAS : myopathie mitochondriale, encéphalopathie, acidose lactique et pseudo-épisodes vasculaires cérébraux

MERRF: épilepsie myoclonique avec fibres rouges déchetées

MILS : Syndrome de Leigh à hérédité maternelle

NADH déshydrogénase : Nicotinamide adénine dinucléotide déshydrogénase

NARP : neuropathie, ataxie, rétinite pigmentaire

NOHL : Neuropathie optique héréditaire de Leber

OXPHOS : Phosphorylation oxydative

PS : Pearson syndrome.

SA : Semaine d'aménorrhée

SL : Syndrome de Leigh

Introduction

La mitochondrie est une des organelles de la cellule. Elle se compose d'une membrane externe et d'une membrane interne séparées par un espace intermembranaire. Au sein de la membrane interne se trouvent les différents complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire mitochondriale, dont le but principal est de fournir l'énergie nécessaire au fonctionnement des cellules et plus généralement les tissus consommateurs d'énergie tels le cerveau, les muscles etc. La mitochondrie a une origine bactérienne, témoin de cette vie autonome, elle possède son propre ADN mitochondrial bicaténaire (ADNmt) codant pour la synthèse de complexes de la chaîne respiratoire de l'organite. L'ADNmt se compose de 16569 paires de base (pb), codant pour 22 ARN de transfert (ARNt), 2 ARN ribosomiques (ARNr) et 13 ARN messagers (ARNm) à l'origine de 13 protéines de la chaîne respiratoire. Cependant l'ADN nucléaire (ADNn) code pour toutes les autres protéines mitochondriales de cette chaîne respiratoire mais aussi pour l'ensemble des protéines nécessaires au bon fonctionnement de la mitochondrie.

Lorsqu'une mutation au sein de l'ADNmt survient, la chaîne respiratoire présente un dysfonctionnement se traduisant par un déficit d'un ou plusieurs complexes de cette chaîne. La transmission de ces mutations présente une particularité puisqu'il s'agit d'une hérédité maternelle. Au niveau clinique, ces déficits donnent des tableaux de maladies mitochondriales diverses comme le syndrome de Leigh, le syndrome MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes), la neuropathie optique héréditaire de Leber (NOHL), le syndrome de MERRF (myoclonic epilepsy and ragged red fibres). Les maladies mitochondriales sont les maladies métaboliques héréditaires les plus fréquentes [1].

Lorsqu'une cytopathie mitochondriale est diagnostiquée chez un nourrisson, des tests biochimiques et enzymatiques sont mis en place et une analyse moléculaire ciblée pour les mutations principales ou analyse totale de l'ADNmt est réalisée afin de détecter toute mutation de l'ADNmt. Si tel est le cas on va quantifier le taux d'hétéroplasmie pour cette mutation, c'est-à-dire la présence de deux types de génomes mitochondriaux au sein d'un même tissu ou cellules. On va également rechercher chez la mère la présence ou non de la mutation (de novo) ainsi que le taux d'hétéroplasmie.

Lorsque la mutation est présente chez la mère, on proposera au couple un diagnostic prénatal (DPN) dans un centre de référence pour les grossesses à venir, consistant en une biopsie de villosité chorale ou ponction de liquide amniotique et après analyse, décision collégiale pluridisciplinaire (obstétriciens, pédiatres, sages-femmes, généticiens...) d'interrompre ou non la grossesse en fonction des résultats.

En tant que futur praticien de la grossesse, nous serons confrontés de plus en plus à ce type de pathologie. Il faut donc devenir apte à suivre ces femmes et ces couples lors de leur parcours de DPN mais aussi lors de leurs interruptions médicales de grossesse (IMG) et dans le suivi à long terme sur le plan physique et psychologique.

Mais existe-t-il des règles, des lois qui régissent le suivi, et jusqu'où la loi peut-elle se prononcer pour l'avenir de ces couples souhaitant des enfants sains ?

Pour tenter de répondre à ces interrogations, nous aborderons dans une première partie l'origine des maladies mitochondriales, avec dans un premier temps une présentation de la mitochondrie, puis une présentation de la physiopathologie à l'origine de ces cytopathies et les conséquences cliniques qu'elles engendrent. Dans une seconde partie nous nous focaliserons sur 2 familles distinctes porteuses de mutation de l'ADNmt. Dans le cadre d'une étude de cas réalisée sur ces 2 familles au CHU d'Angers entre 2000 et 2011. Les résultats seront alors confrontés à la littérature pour ensuite discuter les perspectives concernant le sujet sur le plan biologique et éthique.

1^{ere} Partie : La mitochondrie, le syndrome de Leigh et le diagnostic prénatal.

La mitochondrie

I. Généralités

La mitochondrie est un organite intracellulaire composé de deux membranes organisées en bicouche lipidique et séparée par un espace intermembranaire. La morphologie de la mitochondrie varie suivant les tissus dans lesquels elle se situe. En effet elle peut se présenter sous une forme cylindrique (cellules cortico-surréaliennes) de 0,5 à 1 µm de diamètre, ou sous une forme filamenteuse (cellules hépatocytaires) de 2 à 10 µm de long.

La membrane interne, qui présente de nombreux replis (crêtes) renferme la matrice mitochondriale au sein de laquelle se déroulent de nombreux processus métaboliques comme la β-oxydation des acides gras, la décarboxylation oxydative du pyruvate, le cycle de Krebs. Au niveau de la matrice mitochondriale et plus précisément sur la membrane interne se déroule la chaîne respiratoire dont le rôle est le transfert d'électrons à partir de coenzymes réduits vers l'oxygène. C'est ce que l'on nomme la phosphorylation oxydative (ou OXPHOS) qui permet grâce au transport d'électrons de phosphoryler l'Adénosine diphosphate (ADP) en Adénosine triphosphate (ATP).

La mitochondrie présente donc différents rôles, dont 4 majeurs que sont :

- l'apport de la majorité de l'énergie cellulaire sous forme d'ATP,
- la genèse et la régulation des composés radicalaires toxiques (espèces réactives oxygénées, ERO)
- la séquestration du Ca^{2+}
- la régulation de l'apoptose [2].

L'origine de cet organite subcellulaire se base sur la théorie endosymbiotique. En effet il y a des milliards d'années, des cellules proto-eucaryotes vivant en anaérobie ont incorporé les ancêtres des mitochondries, des bactéries aux propriétés oxydatives ou bactéries aérobies respirantes [3]. Grâce à cette endosymbiose, les cellules proto-eucaryotes anaérobies ont survécu dans leur nouvel environnement riche en oxygène.

II. Génétique mitochondriale

Preuve de son origine bactérienne, la mitochondrie possède son propre génome mitochondrial. L'ADN mitochondrial (ADNmt) se compose de 16569 paires de bases et se présente sous la forme d'un ADN circulaire bicaténaire (un brin lourd H et un brin léger L) codant pour 22 ARNt, 2 ARNr, et pour 13 ARNm qui après traduction donneront 13 protéines de la chaîne respiratoire. Cet ADNmt non associé à des histones et ne possède aucun intron concernant l'ADN nucléaire.

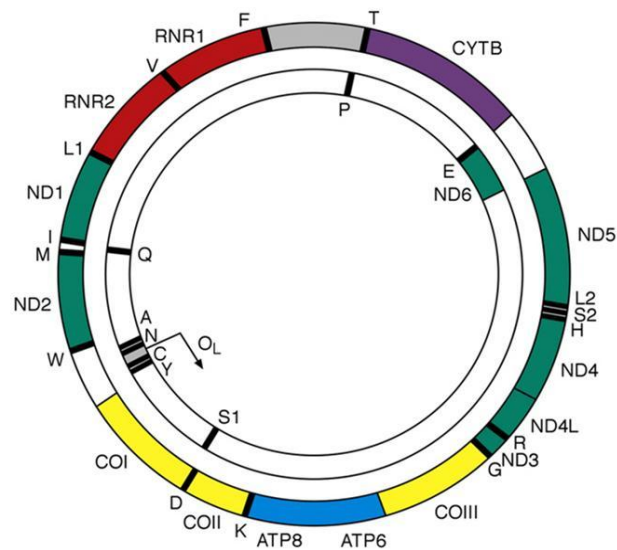


Figure 1 : ADN mitochondrial double brin circulaire. Le cercle externe étant le brin lourd (heavy) et le cercle interne représente le brin léger (light). Chaque région colorée représente une sous-unité d'origine mitochondriale codant pour l'un des complexes de la chaîne respiratoire : Complexe I : 7 sous-unités vertes, Complexe III : 1 sous-unité violette, Complexe IV : 3 sous-unités jaunes, Complexe V : 1 sous-unité bleue. Les 2 ARNr sont en rouge. [4]

Ces 13 protéines mitochondriales sont des sous-unités des différents complexes situés sur la membrane interne. Ces différents complexes ayant un rôle dans la phosphorylation oxydative (OXPHOS) c'est-à-dire la phosphorylation de l'ADP en ATP couplée à la production d'eau. Preuve de cette endosymbiose, toutes les autres protéines de la chaîne respiratoire sont codées par le génome nucléaire. Elles sont donc synthétisées à partir de l'ADN nucléaire dans le noyau puis le cytoplasme cellulaire, et sont importées dans la mitochondrie par un système de transport spécifique. Ce qui démontre la nécessité du noyau pour la mitochondrie et inversement.

Le schéma suivant rappelle les étapes de transcription et de traduction permettant la synthèse de protéines à partir d'un ADN double brin.

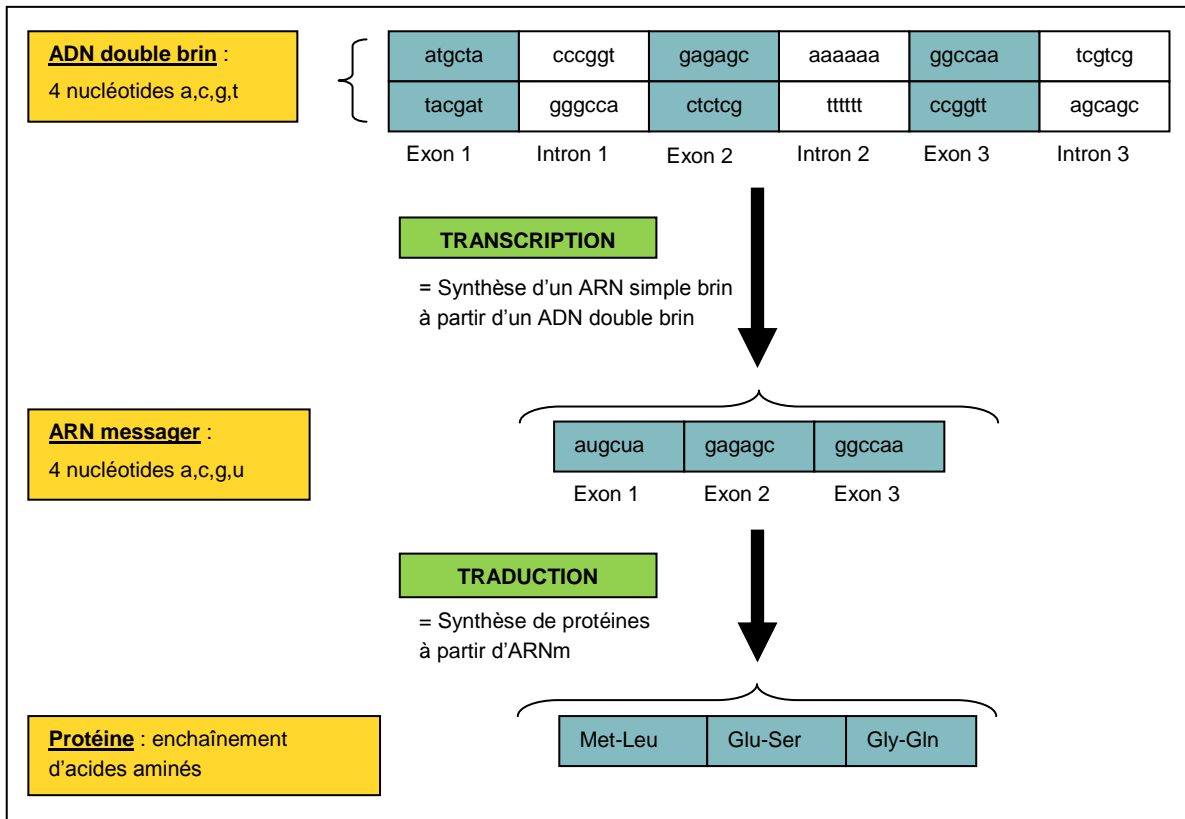


Schéma explicatif de la transcription et la traduction d'une séquence génomique.

Ces mécanismes de transcription et de traduction s'effectuent au sein même de la matrice de la mitochondrie pour les 13 protéines d'origine mitochondriales. En effet la mitochondrie possède son propre matériel de transcription et traduction (enzymes, ribosomes...).

Il existe plusieurs particularités relatives au génome mitochondrial, d'une part son mode de transmission. En effet il s'agit d'une transmission maternelle exclusive, un ovocyte mature compte 400 000 copies d'ADNmt tandis qu'un spermatozoïde n'en compte qu'une dizaine [5]. De plus il a été mis en évidence par une étude franco-américaine récente l'existence d'un processus d'autophagie fait par l'ovocyte fécondé, qui a pour but la dégradation du matériel mitochondrial porté par le spermatozoïde [6]. Ainsi le zygote ne présente que des copies maternelles de l'ADNmt et par conséquent les mutations qu'elles comportent.

D'autre part le génome mitochondrial présente une très grande variabilité. Ceci s'explique tout d'abord en raison de la fréquence des erreurs provoquant des mutations qui sont plus importantes que celles du génome nucléaire [7].

Il faut préciser que le système de réparation de l'ADN mitochondrial est également très peu développé et favorise donc la présence de mutations de l'ADNmt. Ensuite la phosphorylation oxydative est responsable de la production d'espèces réactives oxygénées (ERO) qui créent également des dommages irréversibles sur l'ADNmt.

Les cellules humaines possèdent plusieurs centaines à plusieurs milliers de mitochondries et chaque mitochondrie présente 2 à 10 copies d'ADNmt. Lors des divisions cellulaires, la répartition du capital mitochondrial s'effectue de manière aléatoire. Au sein d'une même cellule, plusieurs ADNmt différents peuvent coexister (phénomène d'hétéroplasmie). L'expression phénotypique au niveau cellulaire va dépendre en grande partie des proportions d'ADN normal et d'ADN muté. En effet, en fonction du pourcentage d'ADN muté, il y aura une diminution variable des capacités de la chaîne respiratoire à générer de l'ATP mais aussi une augmentation du stress oxydatif mitochondrial entraînant secondairement des phénomènes d'apoptose mitochondriale.

De ce fait le génome mitochondrial acquiert des mutations qui peuvent être présentes sur toutes les copies d'ADN mitochondrial, (homoplasmie). Mais les mutations peuvent être présentes sur une fraction de copies (hétéroplasmie). En effet lorsqu'il apparaît une mutation sur l'ADNmt, il y a un mélange de population normale et mutée de l'ADNmt [2]. Cette propriété connue sous le nom d'hétéroplasmie de l'ADNmt joue un rôle important dans l'expression des mutations mitochondriales [2]. Ce taux n'est pas nécessairement le même d'une cellule à l'autre, et encore moins d'un tissu à l'autre ou entre les membres d'une même famille.

Les maladies mitochondriales ont été associées avec un large spectre de symptômes appartenant aux maladies neurodégénératives incluant désordres du mouvement, cécité, surdité, épilepsie, accidents vasculaires, diabète et autres pathologies. De plus, un dysfonctionnement mitochondrial représente un élément clé dans les phénomènes dus au vieillissement ou pour les maladies liées à l'âge.

III. Physiopathologie

La mitochondrie permet l'apport de la grande majorité de l'énergie cellulaire sous forme d'ATP. Pour mieux comprendre les mécanismes pathologiques il faut introduire la physiologie de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette chaîne est intra mitochondriale et plus précisément au niveau de la membrane interne.

Elle comporte 5 complexes enzymatiques :

- Complexe I ou NADH déshydrogénase
- Complexe II ou Succinate déshydrogénase
- Complexe III ou ubiquinol-cytochrome C oxidoreductase
- Complexe IV ou cytochrome C oxidase
- Complexe V ou ATP synthase

Ces 5 complexes protéiques entraînent des réactions enzymatiques. Les complexes I et II récupèrent des électrons provenant du NADH et du succinate (FADH_2). Ces électrons vont s'associer à un transporteur d'électrons (coenzyme Q) mobiles au sein de la membrane interne. Ce transporteur va céder ces deux électrons à un autre transporteur mobile (cytochrome C) grâce au complexe III. Le complexe IV va reprendre ces 2 électrons pour les transférer à l'oxygène afin d'obtenir de l'eau. Les complexes enzymatiques I, III et IV intermembranaires sont responsables de l'expulsion de protons (H^+) vers l'espace intermembranaire. Il y a donc dans cet espace une accumulation de protons (gradient). Ce gradient de proton de l'espace intermembranaire est utilisé par le complexe V de la chaîne respiratoire pour permettre la phosphorylation de l'Adénosine diphosphate (ADP) en ATP qui est la principale source d'énergie chez l'homme.

Le transfert d'électrons au sein de la membrane interne, le transfert de protons vers l'espace intermembranaire, la production d'eau et la synthèse d'ATP sont les éléments responsables de la phosphorylation oxydative.

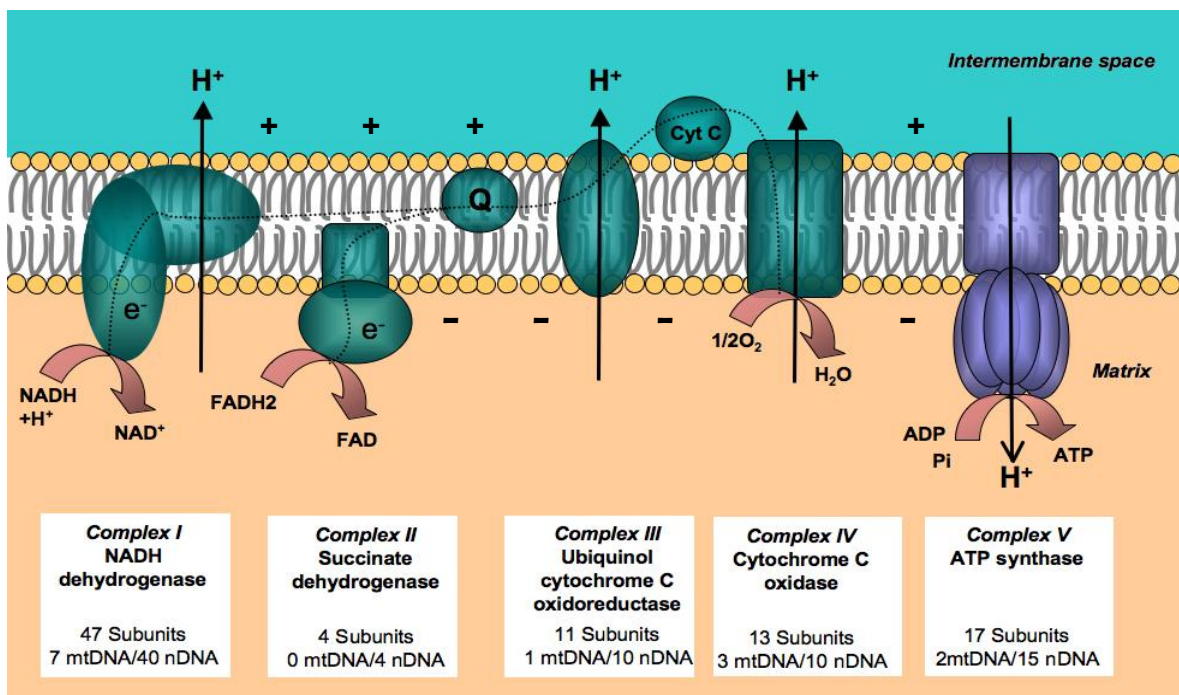


Figure 2 : Schéma de la chaîne respiratoire mitochondriale représentant les différents complexes, le transport d'électrons et la synthèse d'ATP qui en résulte [8].

Chaque complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale dépend à la fois du génome mitochondrial et du génome nucléaire. La complexité de la physiopathologie des maladies mitochondriales s'explique au travers du génome mitochondrial et de ses mutations, mais aussi par le génome nucléaire et ses mutations et enfin par l'implication des mutations des deux génomes simultanément. En effet, des mutations sur des gènes différents peuvent engendrer des phénotypes similaires, comme sur la figure 3 (les mutations 3460 : gène ND1 et 14484 : gène ND6 donnent une neuropathie optique héréditaire de Leber : NOHL). De la même manière, des mutations sur le même gène peuvent également engendrer des phénotypes différents (gène ND6 : mutations 14487 : syndrome de Leigh et 14459 : NOHL). Enfin une même mutation de l'ADNmt, suivant les différents taux d'hétéroplasmie, entraîne des phénotypes différents [2].

Lorsque le taux d'hétéroplasmie mitochondriale atteint un niveau important avec les premières manifestations cliniques, on parle d'effet-seuil, cela signifie que le métabolisme énergétique de la cellule et notamment la phosphorylation oxydative n'est plus efficace et entraîne un déficit énergétique responsable de pathologies tissulaires et de maladies multi-systémiques.

Une personne sur 200 est porteuse d'une mutation pathogène connue de l'ADN mitochondrial [9]. Les maladies mitochondriales toucheraient quant à elles, 1 personne sur 5000 [2].

Bien que les mécanismes et les phénotypes soient différents, cela se traduit très souvent par un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire au niveau d'un ou plusieurs de ces complexes avec une diminution de la production d'énergie sous forme d'ATP. Ce déficit en énergie va souvent affecter les organes dont les besoins énergétiques sont élevés tels le système nerveux central, le cœur, les muscles, le foie et les reins [10].

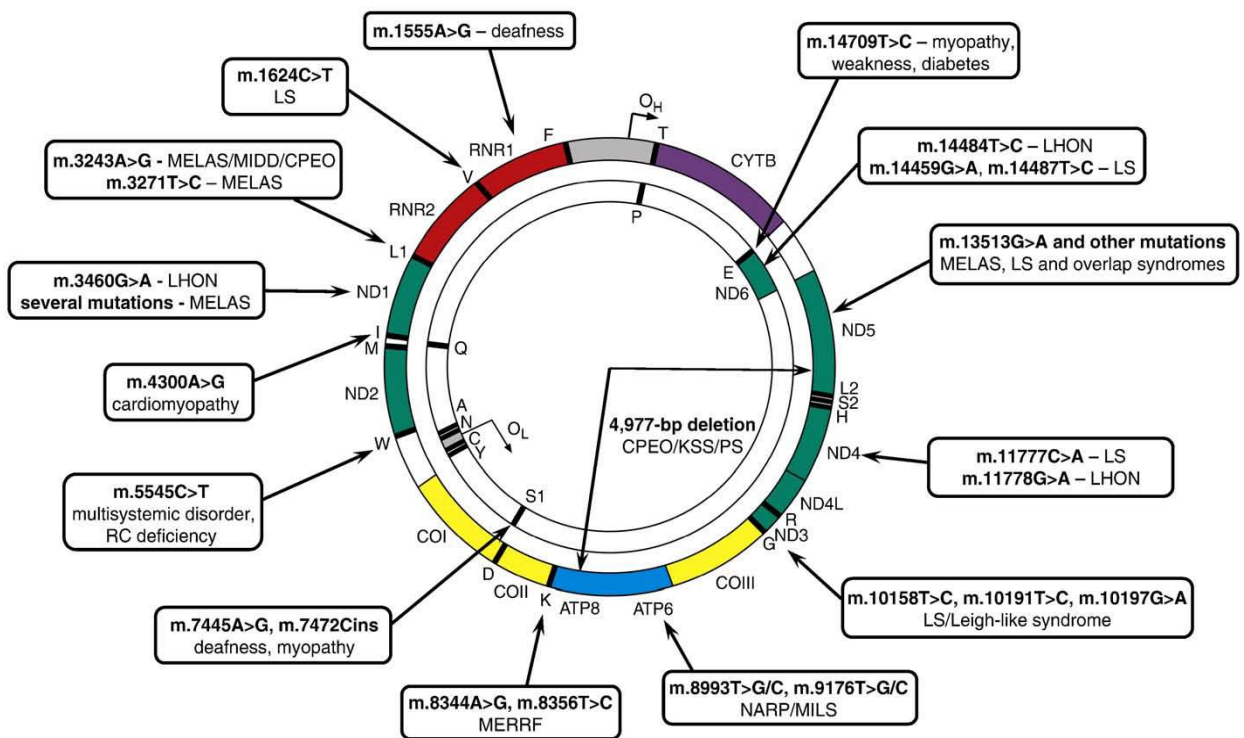


Figure 3 : Corrélation génotype phénotype dans les maladies mitochondriales chez l'homme. Exemple de mutations de l'ADNmt identifiées et responsables de maladies mitochondriales. CPEO, chronic progressive external ophthalmoplegia; LHON, Leber hereditary optic neuropathy; LS, Leigh syndrome; MELAS, mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes; MERRF, myoclonic epilepsy and ragged red fibres; MILS, maternally inherited Leigh syndrome; NARP, neurogenic weakness, ataxia, and retinitis pigmentosa; PS, Pearson syndrome [4]

Le syndrome de Leigh

Certaines mutations de l'ADNmt comme indiquées sur la figure 3 entraînent un syndrome de Leigh (SL). Le syndrome de Leigh est considéré comme la pathologie mitochondriale la plus fréquente chez les jeunes enfants [11]. Ce syndrome peut être du :

- soit à une mutation de l'ADNmt
- soit à une mutation de l'ADN nucléaire

entraînant dans les deux cas une dysfonction des sous-unités de la chaîne respiratoire mitochondriale et en particulier les complexes I, II, IV ou V et d'un déficit du coenzyme Q [12]. La transmission via l'ADN nucléaire est une transmission autosomique récessive ou liée à l'X, et la transmission via l'ADNmt suit une transmission maternelle [13].

Ce syndrome se caractérise sur le plan clinique par des signes neurologiques majeurs affectant le système nerveux central avec hypotonie, retard de développement, désordres du mouvement (ataxie, dystonie), épilepsie ou atteintes oculomotrices, nystagmus [14].

Cette cytopathie mitochondriale correspond à une encéphalopathie nécrosante subaiguë caractérisée par des lésions nécrotiques bilatérales symétriques au niveau des noyaux gris, des ganglions basaux, du diencephale et du tronc cérébral, révélées par l'imagerie cérébrale. Ce syndrome apparaît dans la toute petite enfance. Le pronostic est mauvais et dans de nombreux cas il en résulte un décès avant l'âge de 5 ans [15].

L'incidence du syndrome de Leigh est estimée suivant les études entre 1/30000-1/40000 naissances par an appartenant ainsi à la catégorie des maladies rares [16-17]. Environ 30% des syndromes de Leigh sont dus à des mutations portées par l'ADNmt. La maladie provoquée est souvent appelée syndrome de Leigh à hérédité maternelle (MILS) [18].

I. Diagnostic du syndrome de Leigh

Le diagnostic repose sur l'évaluation clinique associée à l'imagerie cérébrale [14-16]. Cette évaluation est aussi couplée à une analyse biochimique et moléculaire [17-19]. L'imagerie médicale et notamment l'imagerie par résonance magnétique (IRM) traduisent les lésions nécrotiques caractéristiques du syndrome de Leigh par des hypersignaux des ganglions de la base (autrement appelés noyaux gris centraux et comprenant : le putamen, le noyau caudé, le globus pallidus, le corps de Luys, le locus Niger) atteints comme le présente la figure 4.

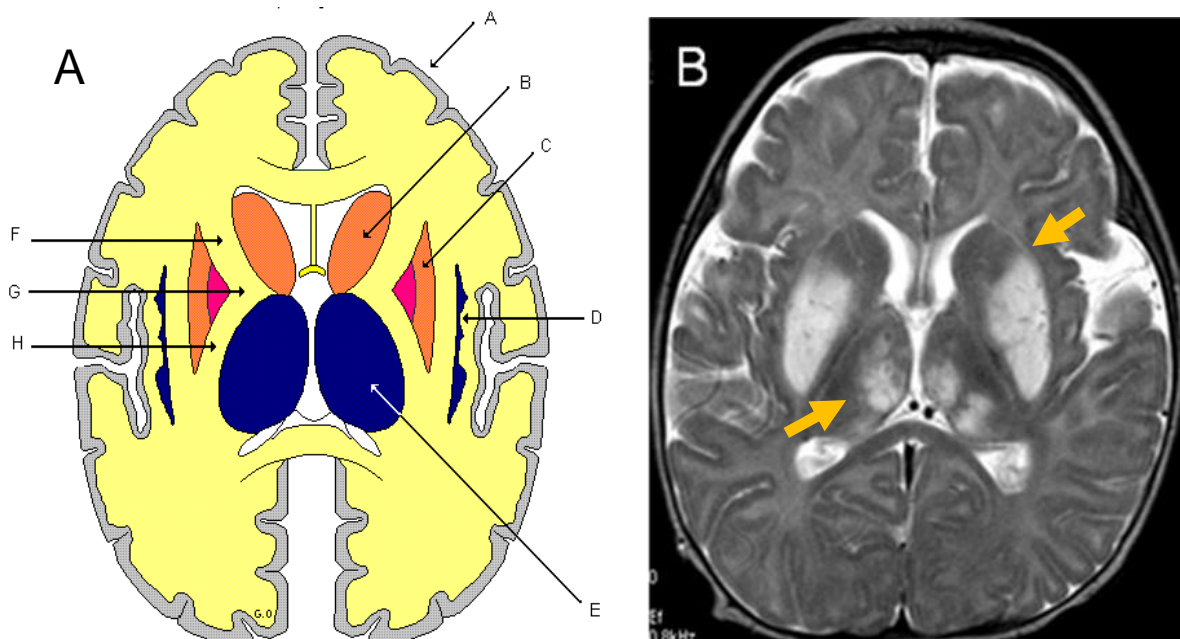


Figure 4 : **A)** schéma du cerveau en coupe horizontale : A=cortex, B=noyau caudé, C=noyau lenticulaire (putamen + globus pallidus) D=Claustrum, E=thalamus, F=capsule interne, G=genou de la capsule interne, H=bras postérieur de la capsule interne. **B)** IRM cérébrale caractéristique chez un patient avec syndrome de Leigh (coupes axiales en séquence T2). Images avec hypersignaux bilatéraux dans les ganglions de la base (putamen et thalamus) [20]

L'analyse biochimique peut révéler un certain nombre de signes de dysfonctionnements de la chaîne respiratoire mitochondriale. Une acidose lactique peut être retrouvée dans le sang ou le liquide céphalorachidien chez un patient porteur d'un SL. Les tests de dépistage des déficits de la chaîne respiratoire comprennent donc la mesure du taux de métabolites comme les lactates, le pyruvate et les corps cétoniques ainsi que la mesure de l'activité enzymatique des différents complexes.

L'élévation du rapport lactate/pyruvate et du rapport β -hydroxybutyrate/acetoacetate témoignent d'un trouble de l'état d'oxydoréduction cellulaire [1].

Le diagnostic biochimique d'un SL repose souvent sur l'analyse mitochondriale (histologique, enzymologique et moléculaire) d'une biopsie musculaire qui représente l'examen clé devant toute suspicion de SL [1-17]. L'activité des enzymes mitochondriales peut aussi être déterminée à partir d'autres tissus, comme les fibroblastes de la peau [21].

Le diagnostic moléculaire quant à lui consiste en la mise en évidence de l'anomalie de l'ADNn ou de l'ADNmt. Lorsque l'anomalie est d'origine mitochondriale, il peut s'agir d'une :

- anomalie qualitative de l'ADNmt (mutations ponctuelles)
- anomalie quantitative de l'ADNmt (déplétions correspondant à une diminution du nombre de copies d'ADNmt) [1]

Lorsqu'il s'agit de mutations ponctuelles, une recherche des mutations les plus fréquentes associées à un tableau clinique est réalisée puis si cela s'avère négatif, un séquençage de l'ADNmt est nécessaire. Le séquençage est une technique biochimique permettant d'identifier l'enchaînement de nucléotide sur un fragment d'ADNmt donné, afin de diagnostiquer d'éventuelles mutations. Pour les anomalies quantitatives entraînant un nombre de copie de l'ADNmt diminué, une déplétion est validée lorsque la quantité d'ADNmt retrouvée est inférieure à 30% des valeurs normales [1].

II. Traitement

Actuellement, il n'existe pas de traitement curatif pour les cytopathies mitochondriales comme le syndrome de Leigh [2-22-23]. Pour aider les patients, des thérapeutiques métaboliques sont possibles pour notamment améliorer le fonctionnement du complexe I et plus généralement la fonction mitochondriale, c'est le cas pour des agents comme la thiamine (vitamine B1), la riboflavine (vitamine B2) et le coenzyme Q10 par exemple [2-24]. Un régime cétogène et pauvre en hydrates de carbone peut également contribuer à court terme à des améliorations des maladies mitochondriales [2]. Bien que ces thérapeutiques ne suffisent pas, elles ouvrent une possibilité et un potentiel pour des thérapeutiques métaboliques encore plus efficaces.

III. Prise en charge clinique

Lorsqu'une mutation au niveau de l'ADNmt est détectée, une analyse génétique familiale est effectuée. La transmission maternelle étant la caractéristique majeure de ce type de pathologie, l'analyse de l'ADNmt de la mère est réalisée. Ces recherches consistent en un séquençage du génome mitochondrial maternel mais aussi à une quantification précise afin d'y déterminer le taux d'hétéroplasmie de la mutation de l'ADNmt. Si la mère ne présente pas la mutation, la mutation est considérée comme nouvelle ou de novo c'est-à-dire apparue au cours de l'embryogénèse.

Un couple dont la femme est porteuse d'une mutation de l'ADNmt peut avoir recours pour une grossesse ultérieure au diagnostic prénatal. Celui-ci permettra de déterminer grâce à des analyses moléculaires, le taux d'hétéroplasmie fœtal. Ainsi en l'état actuel des connaissances de la science, et en fonction de ce taux de mutation cela permet de prédire l'évolution clinique et ainsi la poursuite ou non de la grossesse.

Le diagnostic prénatal

I. Définitions

Le diagnostic prénatal (DPN) est régi par le code de la santé publique et plus exactement par la loi du 29 juillet 1994 ou loi de bioéthique relative au don et à l'utilisation des éléments et produits du corps humain, à l'assistance médicale à la procréation et au diagnostic prénatal [25]. La définition du DPN exposé dans l'article R. 2131-1 issu de la loi du 7 juillet 2011 [26] est la suivante : « le diagnostic prénatal s'entend des pratiques médicales y compris l'échographie obstétricale et fœtale, ayant pour but de détecter in utero chez l'embryon ou le fœtus une affection d'une particulière gravité »

Ce DPN dépend des centres pluridisciplinaires de diagnostic prénatal (CPDPN). Ces centres sont actuellement au nombre de 48 répartis sur toute la France et fonctionnent depuis 1999, date de parution du décret d'application de la loi de 1994 [25]. Le décret du 22 décembre 2006 [27] modifiant le code de santé publique définit les missions de ces CPDPN (Art R. 2131-10-1) qui sont les suivantes : « favoriser l'accès à l'ensemble des activités de diagnostic prénatal et d'assurer leur mise en œuvre en constituant un pôle de compétences cliniques et biologiques au service des patients et des praticiens ; donner des avis et conseils, en matière de diagnostic, de thérapeutique et de pronostic, aux cliniciens et aux biologistes qui s'adressent à eux lorsqu'ils suspectent une affection de l'embryon ou du fœtus, poser l'indication de recourir au diagnostic biologique effectué à partir des cellules prélevées sur l'embryon in vitro et enfin organiser des actions de formation théorique et pratique destinées aux praticiens concernés par le diagnostic prénatal des diverses affections de l'embryon et du fœtus. »

Les CPDPN sont soumis à un agrément sous certaines conditions définies par l'article R. 2131-11 : « Le centre doit fonctionner au sein d'un organisme ou établissement de santé public ou privé à but non lucratif, disposant d'une unité d'obstétrique ; Il doit assurer l'ensemble des missions et Il doit constituer l'équipe pluridisciplinaire » dont la composition définie à l'article R. 2131-12 est la suivante : « des praticiens exerçant une activité dans l'organisme ou l'établissement de santé au sein duquel le centre est créé, dont au moins :

- un médecin titulaire du diplôme d'études spécialisées de gynécologie-obstétrique,

- un praticien exerçant sur ce site, ayant une formation et une expérience en échographie du fœtus,
- Un médecin exerçant sur ce site, titulaire du diplôme d'études spécialisées de pédiatrie ou d'un diplôme équivalent et d'un diplôme d'études spécialisées complémentaires de néonatalogie
- un médecin titulaire du diplôme d'études spécialisées de génétique médicale

Des personnes pouvant ne pas avoir d'activité dans l'organisme ou l'établissement de santé, dont au moins :

- Un médecin titulaire du diplôme d'études spécialisées de psychiatrie ou d'un diplôme équivalent ou un psychologue
- Un médecin titulaire du diplôme d'études spécialisées complémentaires de fœtopathologie.

Des praticiens responsables, dans l'organisme ou l'établissement de santé, d'analyses de cytogénétique et de biologie.

Un conseiller en génétique. »

II. Prise en charge du diagnostic prénatal

Lorsque les démarches d'un diagnostic prénatal sont mises en œuvre, elles respectent certains critères définis par la loi modifiée du 7 juillet 2011 [26] issue du code de la santé publique qui précise que la patiente doit avoir une consultation médicale préalable où elle recevra « une information loyale, claire et adaptée à sa situation », qu'il y a possibilité de « recourir à des examens biologiques et d'imagerie permettant d'évaluer le risque pour l'embryon ou le fœtus ». Pour effectuer ces examens, « le consentement [...] est recueilli par écrit auprès de la femme enceinte par le médecin ou la sage-femme » qui les prescrit. Une fois les examens réalisés, « Le prescripteur, médecin ou sage-femme, communique les résultats de ces examens à la femme enceinte et lui donne toute l'information nécessaire à leur compréhension ». Dans certaines situations et au vu des résultats d'examens : « L'interruption de grossesse est envisagée au motif qu'il existe une forte probabilité que l'enfant à naître soit atteint d'une affection d'une particulière gravité reconnue comme incurable au moment du diagnostic »

III. Outils du diagnostic prénatal

Le diagnostic prénatal doit utiliser des outils pour mettre en évidence ou non, et de façon certaine des anomalies. Ces outils peuvent être non invasifs comme l'échographie pour diagnostiquer des anomalies morphologiques, ou les prélèvements de sang maternel pour doser les marqueurs sériques. Ils peuvent être invasifs.

C'est le cas de la choriocentèse et de l'amniocentèse. La choriocentèse est la technique consistant à réaliser une biopsie de villosités choriales (trophoblaste), la période optimale se situant après 12 SA. L'amniocentèse est la méthode la plus répandue et consiste en une ponction de liquide amniotique par voie trans-abdominale et sous guidage échographique. La période optimale se situant entre 15 et 20 SA.

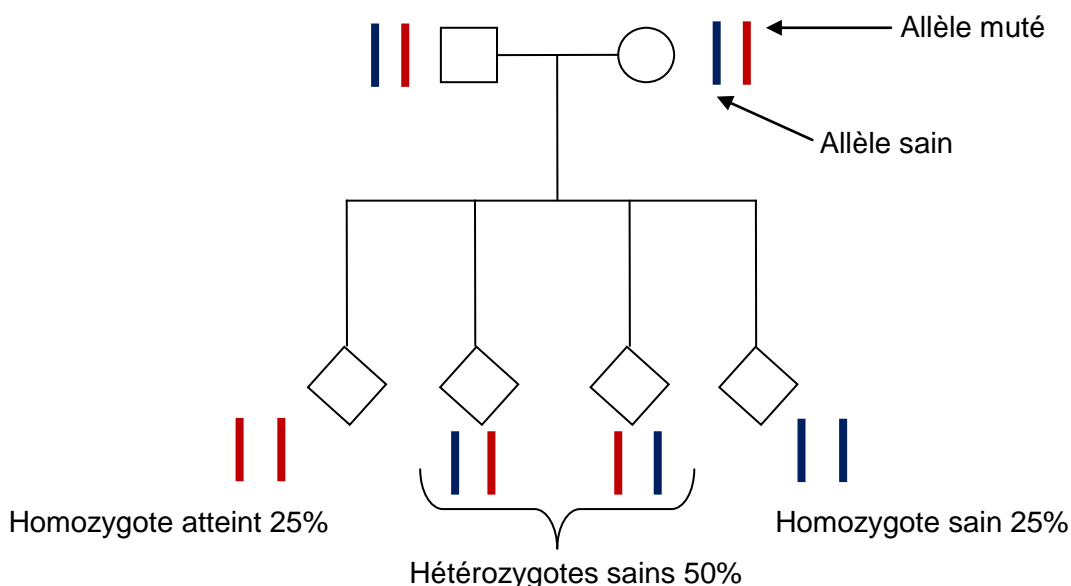
IV. Le diagnostic prénatal en pratique

Pour illustrer les propos précédents, un exemple clinique est important pour comprendre et comparer la complexité existante d'une maladie mitochondriale par rapport à une affection de type autosomique récessive comme la mucoviscidose par exemple [28].

La mucoviscidose est une maladie génétique autosomique récessive. Cela signifie la présence d'une mutation sur gène (CFTR) de l'ADNn (autosomique). Les deux allèles de ce gène sont mutés pour que la maladie se déclare (récessive). Chez le sujet atteint, les deux allèles mutés sont identiques (homozygote) ou ce sont deux allèles mutés différents mais pathologiques (hétérozygote composite). Les parents de l'enfant malade sont hétérozygotes (un allèle muté, un allèle sain).

L'exemple d'un couple ayant un enfant atteint de cette maladie est étudié. Dans un premier temps l'ADNn des deux parents est analysé afin de déterminer les deux mutations présentes chez chacun d'eux.

Ce type de pathologie suit les lois de transmission mendélienne [28]. Le schéma suivant résume cette loi statistique concernant la transmission autosomique récessive.



Le risque pour le couple d'avoir un nouvel enfant atteint est de 25%. La femme est à nouveau enceinte, un DPN lui est proposé.

Une amniocentèse est réalisée vers la 17^e SA, et le liquide amniotique est analysé dans le laboratoire de cytogénétique. Le caryotype est réalisé ainsi que la recherche de la mutation du gène CFTR sur l'ADNn et de son statut hétérozygote ou homozygote. Dans ce dernier cas, la proposition d'un IMG est faite au couple qui décide avec l'accord d'un CPDPN d'interrompre la grossesse.

Cette situation claire illustre les objectifs, les indications et le but du DPN.

Cependant pour les maladies mitochondriales et notamment le syndrome de Leigh, cela devient plus complexe. En effet il faut dans un premier temps identifier la mutation chez un cas index dans une famille mais la recherche doit se faire à la fois sur l'ADNn et sur l'ADNmt. Dans le cadre d'une mutation sur l'ADNn, il peut s'agir d'une mutation autosomique récessive qui va entraîner la même conduite à tenir que précédemment avec l'identification des allèles mutés et la recherche du statut homozygote chez le fœtus par une amniocentèse ou choriocentèse dans le cadre du DPN. Il peut ensuite s'agir d'une maladie récessive liée à l'X (sur le chromosome sexuel X et donc transmis par la mère). Seuls les garçons sont atteints et les filles sont porteuses saines, donc là encore la réalisation d'une amniocentèse ou choriocentèse dans le cadre du DPN pour connaître le caryotype de l'enfant et son statut face à la mutation peut être réalisée et aboutir ou non à une IMG.

Mais ensuite vient la mutation d'origine mitochondriale. Il faut de la même façon identifier la mutation sur l'ADNmt du cas index mais aussi sur celui de la mère. De manière générale, des prélèvements sanguins et urinaires sont effectués. Puis pour chaque échantillon provenant de la mère et du cas index il doit être déterminé le taux d'hétéroplasmie pour la mutation identifiée par une technique de quantification. Suivant les mutations, le taux d'hétéroplasmie est différent dans les tissus du à la très grande variabilité. De ce fait lorsqu'une ponction dans le cadre d'un DPN est réalisée pour une mutation d'origine mitochondriale, il existe une réelle difficulté d'interprétation de la part des généticiens.

2^e partie : Syndrome de Leigh et diagnostic prénatal : Etude de cas

Méthodologie

Il s'agit d'une étude de cas s'appuyant sur 2 familles distinctes porteuses d'une mutation de l'ADNmt suivi au CHU d'Angers entre 2000 et 2011.

Cette étude se réfère aux dossiers obstétricaux, et pédiatriques des 2 familles, mais aussi à toutes les analyses biologiques réalisées sur les fœtus des 2 familles dans le cadre de la réalisation d'un DPN.

Ces deux familles présentent une mutation différente de l'ADNmt mais affectant le même gène ND6 hautement conservée. Le phénotype clinique des cas index chez ces deux familles est commun puisque les mutations sont responsables du syndrome de Leigh.

Objectifs

Les objectifs de cette étude sont multiples. Tout d'abord faire connaître ce genre de pathologies rares que sont les maladies mitochondriales et plus particulièrement le syndrome de Leigh. En effet leur prévalence est en augmentation.

Ensuite évoquer toute la complexité diagnostique des maladies mitochondriales lors du DPN pour comprendre les difficultés rencontrées par les professionnels.

Enfin montrer les difficultés éthiques rencontrées lors du DPN et aborder les angoisses et les attentes psychologiques des couples en demande de DPN ou lors de leur parcours de DPN.

Etude de cas

I. Famille A

La famille A présente une mutation située sur le codon 72 en position 14459 dans une séquence du gène ND6. Cette mutation s'explique par le remplacement d'un nucléotide guanine par un nucléotide adénine. Celle-ci est responsable d'une substitution d'un acide aminé : alanine par un autre acide aminé : valine qui se manifeste par la modification de la sous-unité ND6 du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette modification entraîne un déficit sévère du complexe I responsable dans ce cas d'un syndrome de Leigh déjà défini précédemment.

I.1. Historique familiale

Mme D est asymptomatique et présente comme antécédent médical : une hypothyroïdie consécutive à une thyroïdectomie totale. Mme D. (II2) est âgée de 39 ans lorsqu'elle donne naissance en Juillet 2009 à un petit garçon (cas index III1) de 2700g. L'accouchement à 40 SA s'est passé sans difficulté notable.

A 4 mois de vie, le nourrisson présente un retard psychomoteur associé à un nystagmus, une hypotonie axiale, des malaises et des reflux gastro-œsophagiens. Une imagerie par résonance magnétique (IRM) est réalisée et met en évidence des anomalies au niveau des noyaux gris centraux évoquant un syndrome de Leigh.

L'enfant est hospitalisé pour réaliser des examens métaboliques et génétiques complémentaires et quitte l'hôpital avec un traitement anti-reflux. S'en suivent d'autres hospitalisations pour difficultés alimentaires puis un épisode de malaise grave nécessitant une intubation et une ventilation pour maintenir les fonctions vitales. Des examens biologiques montrent fin 2009 une augmentation des lactates sanguins. Une biopsie musculaire est également réalisée.

Au niveau clinique, début 2010, il y a aggravation de l'hypotonie, disparition du contact oculaire. Les troubles alimentaires nécessitent la pose d'une gastrostomie et d'un dispositif Nissen. L'enfant décède le 12 Mars 2010. Il est évoqué pour les causes du décès des troubles du rythme entraînant un œdème aigu pulmonaire mais aussi une atteinte ischémique du tronc cérébral ayant entraîné une bradycardie et une poussée d'acidose lactique.

Le bilan biochimique mitochondrial effectué met en évidence une faible masse mitochondriale accompagnée d'une activité du complexe I à la limite de la normale (normales : 100-270 nmol/minute/mg protéines).

La biopsie musculaire montre un taux d'hétéroplasmie de 95% pour la mutation 14459. Le même taux est retrouvé au niveau d'un prélèvement sanguin du cas index.

Des prélèvements sanguins et urinaires sont réalisés chez la mère montrant un taux d'hétéroplasmie beaucoup plus faible de 20% dans le sang et de 60% dans les urines. La mère va par la suite avoir deux grossesses. Mais avant d'aborder les deux grossesses ultérieures il est nécessaire de présenter l'arbre généalogique de la famille.

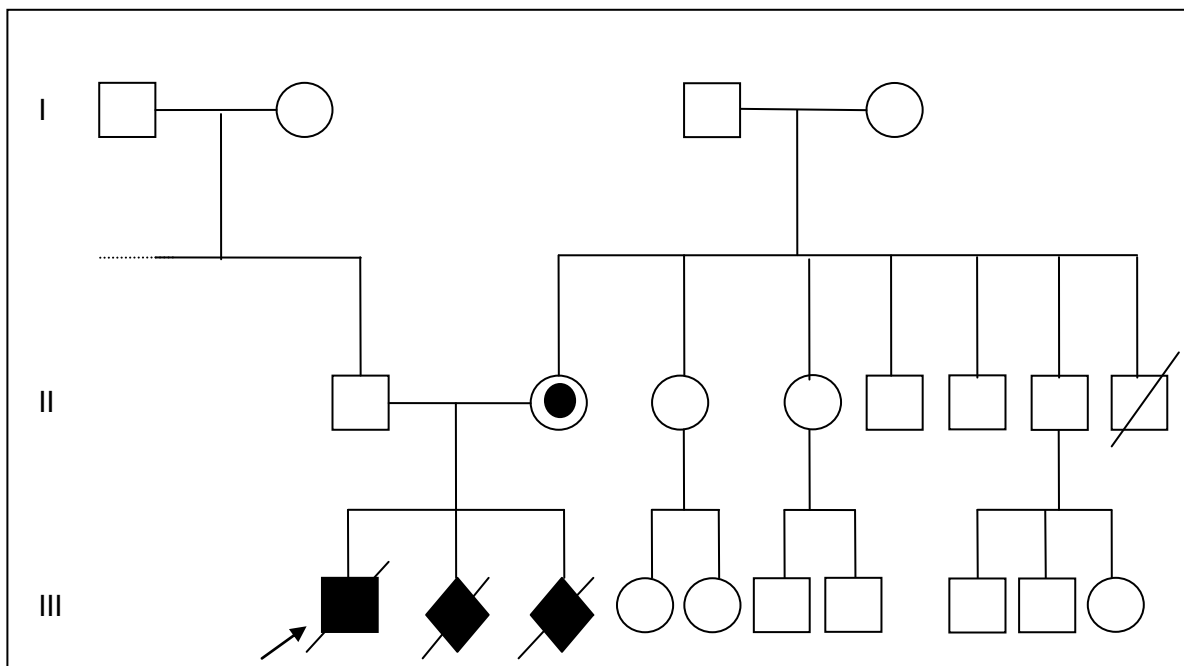


Figure 4 : Arbre généalogique de la famille A

I.2. Foetus 1 (patient III 2)

Mme D débute une nouvelle grossesse courant 2010. Etant donné les circonstances précédentes, la mise en place d'un diagnostic prénatal est souhaitée par les parents et mis en place par le corps médical. A 13 SA une biopsie de villosité chorale est réalisée. Les résultats sont les suivants : 50% d'hétéroplasmie pour la mutation 14459 de l'ADNmt. Mme D et son conjoint ont appris les résultats ainsi que le fait que leur responsabilité est engagée dans la décision prise d'interrompre ou non la grossesse. Il leur est clairement expliqué qu'en l'état des connaissances scientifiques actuelles, un taux < 30% indiquerait un pronostic plutôt favorable sans exclure tout risque de pathologie avec la possibilité de poursuivre la grossesse.

Un taux > 70% indiquerait un pronostic très défavorable et un taux compris entre 30% et 70% représente une zone grise.

La décision d'une IMG a été discutée avec les parents dans le cadre du conseil génétique. Le CPDPN quant à lui a exprimé un avis favorable pour l'IMG. Celle-ci a donc été réalisée à 19 SA.

Un examen anatomique du fœtus de sexe masculin est effectué cinq jours après l'IMG selon un protocole d'étude fœtopathologique des fœtus atteints de maladies mitochondriales (cf. document annexe). Cet examen montre la présence d'une brachymésophalangie bilatérale des 5^e doigts avec des phalanges ponctiformes. L'examen du placenta quant à lui présente une hypotrophie modérée sans anomalie histologique notable. Des échantillons de tissus fœtaux sont prélevés tels que : thyroïde, foie, rein, surrénales, cœur, pancréas, poumon, thymus, rétine, nerf optique, quadriceps, hémisphère cérébral, cervelet, tronc cérébral, thalamus ainsi que des tissus annexes comme du liquide amniotique et du placenta.

I.3. Résultats Fœtus 1 (patient III 2)

Parmi les échantillons obtenus certains d'entre eux ont été étudiés à Angers [29] et donnent des taux d'hétéroplasmie interprétables qui sont récapitulés dans le tableau ci-dessous.

Tissus étudiés	Taux d'hétéroplasmie
Cœur	35%
Hémisphère cérébral	33%
Liquide amniotique	35%
Muscle	36%
Nerf optique	37%
Placenta	35%
Rétine	37%
Tronc cérébral	36%

I.4. Fœtus 2 (patient III 3)

Mme D, 40 ans débute une nouvelle grossesse en 2011. De la même manière que pour la grossesse précédente, un diagnostic prénatal est proposé et réalisé. Une biopsie de villosité chorale est également réalisée à 12 SA au CHU d'Angers.

Le taux d'hétéroplasmie déterminé par l'analyse moléculaire est de 98% de mutant. Après informations claires et concertation avec les parents via le conseil génétique et après accord du CPDPN, une IMG est réalisée à 17 SA. Un examen anatomique du fœtus de sexe féminin est réalisé sans anomalie macroscopique décelée. Des prélèvements de tissus fœtaux sont également effectués : thymus, cœur, poumon, foie, rate, rein, surrénales, gonades, muscle.

I.5. Résultats fœtus 2 (patient III 3)

Les prélèvements ont été analysés par l'hôpital Necker. Les résultats ne sont pas communiqués pour l'instant.

I.6. Résultats de la famille A

Patient	Sexe	Age d'apparition de la maladie	Age au moment de l'étude	Phénotype	Clinique	Imagerie/ Biochimie	Hétéroplasmie % (tissu)
Cas index (III 1)	Masculin (M)	2 mois	8 mois (décédé)	Leigh	> 4 mois : retard psychomoteur, malaises, œsophagite >5 mois : hypotonie axiale > 8 mois : décès	IRM cérébrale : hypersignaux des noyaux gris centraux Lactates sanguins élevés	95% (sang et muscle)
Mère (II 2)	Féminin (F)		40	Asymptomatique	Aucun signe	Non déterminé	60% (urines), 20% (sang)
Fœtus 1 (III 2)	M		0			Radiographie : Brachyméso-phalangie bilatérale des 5e doigts	13 SA : 50% (villosités choriales) 19 SA : 33% (hémisphère cérébral), 35% (cœur, placenta, LA), 36% (muscle tronc cérébral), 37% (rétine, nerf optique)
Fœtus 2 (III 3)	F		0				12 SA : 98% (villosité choriales)

I. Famille B

La famille B présente une mutation sur le codon 63 en position 14487 pour le gène ND6. La mutation se traduit par le changement d'un nucléotide cytosine à la place d'un nucléotide thymine. Cette mutation entraîne la substitution d'un acide aminé méthionine par un acide aminé valine responsable d'un déficit du complexe I en terme d'assemblage [30]. Cette mutation entraîne également un déficit du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale.

I.1. Historique familiale

Mme L. asymptotique ne présente aucun antécédent médical particulier. Mme L. donne naissance en Février 2000 à son deuxième enfant : un petit garçon (cas index III 2) de 3280g. L'accouchement est réalisé à 39 SA sans particularité notable.

A l'âge de 5 mois le nourrisson est hospitalisé pour vomissements importants consécutifs à la tétée suivis de malaises associant hypotonie et pâleur. L'examen clinique d'entrée fait état d'un contact oculaire inconstant. Les examens complémentaires montrent une lactacidémie augmentée 5,59 mmol/l (norme 2,2 mmol/l) et également une lactacidorachie élevée 3,62 mmol/l (norme < 2,2 mmol/l). Lors de cette hospitalisation et au vu des résultats de la lactacidorachie, le diagnostic s'oriente vers une cytopathie mitochondriale.

En Août 2000, une IRM est faite et met en évidence des aires de nécroses bilatérales et symétriques des thalamus et Locus Niger évoquant un syndrome de Leigh. Des analyses biochimiques montrent un déficit en complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale. S'en suivent plusieurs hospitalisations pour mise en place d'une gastrostomie et d'un dispositif Nissen en janvier 2001. L'enfant est décédé en Mai 2001 à l'âge de 15 mois.

En 2000, les techniques d'analyses n'étaient pas celles d'aujourd'hui. En conséquence, aucune recherche de mutation de l'ADNmt n'a été effectuée à cette époque. Mme L. donne naissance cinq ans plus tard avec un autre conjoint à une fille, en bonne santé actuellement avec un léger retard d'acquisition de la parole.

En 2011, Mme L. est de nouveau enceinte et son médecin traitant l'encourage à se faire suivre au centre de référence des maladies mitochondriales du CHU d'Angers pour un conseil génétique et bilan suite aux décès du premier enfant sur le diagnostic de cytopathie mitochondriale. Des prélèvements de sang et de muscle du cas index avaient été conservés au laboratoire. L'analyse complète du génome mitochondrial par séquençage révèle ainsi la présence de la mutation 14487.

Les résultats de la quantification de la mutation montrent un taux d'hétéroplasmie de 93% dans le muscle pour la mutation 14487 du gène ND6 et de 94% pour cette même mutation dans le sang. Des prélèvements de sang et d'urines sont effectués chez Mme L. et analysés. Les résultats sont les suivants : un taux d'hétéroplasmie de 40% dans le sang pour la mutation 14487 et un taux de 75% dans les urines également pour la même mutation.

Avant d'aborder cette grossesse, il convient de présenter l'arbre génétique de la famille en question.

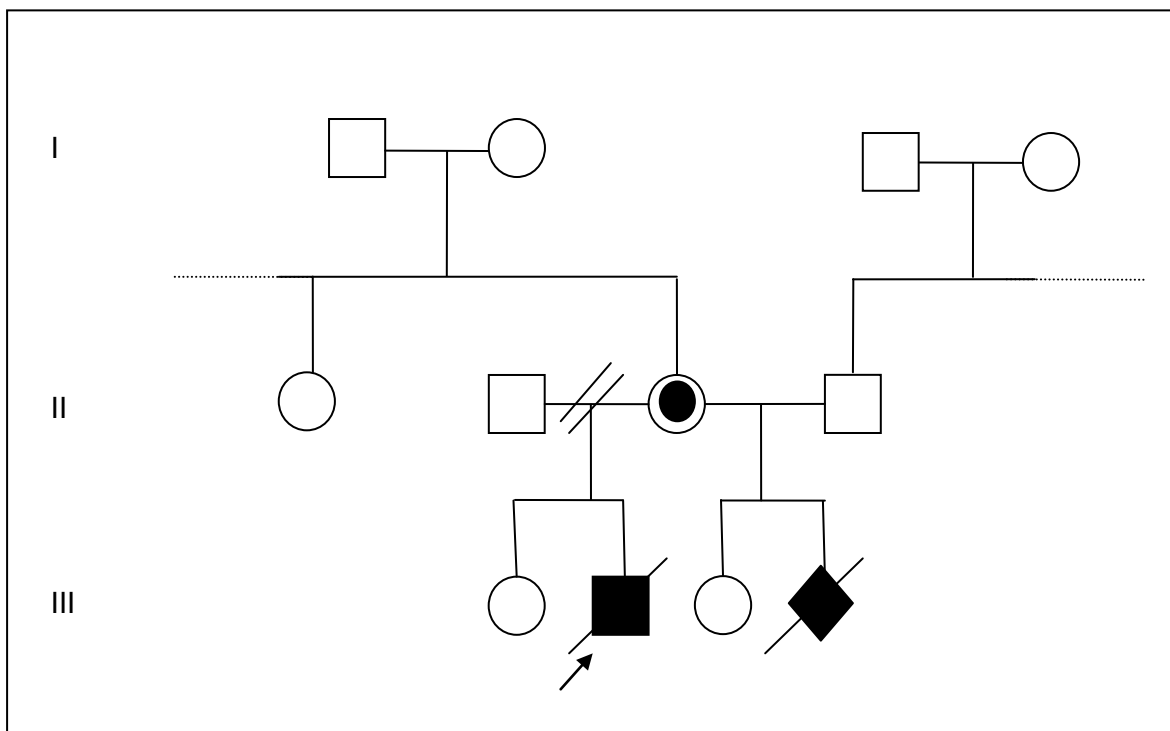


Figure 5 : Arbre généalogique de la famille B

I.2. Foetus (patient III 4)

Mme L. est donc âgée de 37 ans lorsqu'elle porte sa quatrième grossesse. Etant donné les antécédents de cytopathie mitochondriale connus pour le premier enfant ainsi que la détection de la mutation 14487 de l'ADNmt chez la patiente, un diagnostic prénatal est proposé à la famille et accepté. Une amniocentèse est réalisée dans ce cadre au CHU d'Angers à 18 SA. Le résultat analysé à l'hôpital Necker met en évidence un taux d'hétéroplasmie de 98% pour ce fœtus, ce résultat est également confirmé par le laboratoire de génétique du CHU travaillant de concert avec le CHU de Necker. Lors de la consultation de conseil génétique sous la direction du Dr Barth, à laquelle j'ai pu participer, une information claire et précise est donnée à Mme L. et son conjoint précisant comme pour la famille A différents risques associés en fonction du taux de mutation.

Compte tenu du taux d'hétéroplasmie de 98% pour ce fœtus, la probabilité que le fœtus soit atteint est très élevée. Il est également précisé que le cas index (1^{er} enfant) ayant présenté un taux à 94%, la symptomatologie manifestée chez ce dernier sera sensiblement similaire à celle du fœtus à naître. Après concertation et accord du CPDPN d'Angers, une IMG a été convenue et réalisée à 22 SA. Un examen anatomique du fœtus a été réalisé et des échantillons de tissus fœtaux et extra-fœtaux ont été recueillis : cœur, cerveau, cervelet, foie, poumon, placenta, muscle et rein.

I.3. Résultats fœtus (patient III 4)

Parmi ces échantillons, 5 ont été analysés dans le laboratoire d'Angers [31] et donnent des résultats interprétables dans le tableau suivant :

Tissus étudiés	Taux d'hétéroplasmie
Cerveau	98%
Cervelet	98%
Muscle	98%
Placenta	97%
Poumon	98%

I.4. Résultats famille B

Patient	Sexe	Age d'apparition de la maladie	Age au moment de l'étude	Phénotype	Clinique	Imagerie	Hétéroplasmie % (tissu)
Cas index (III 2)	Masculin (M)	5 mois	15 mois (décédé)	Leigh	>5 mois vomissements, contact oculaire inconstant,	IRM cérébrale: nécrose bilatérale et symétrique du thalamus et locus Niger	93% (muscle), 94% (sang)
Mère (II 3)	Féminin (F)			Asymptomatique	Aucun signe		75% (urines), 40% (sang)
Fœtus (III 4)	M		0				18 SA : 98% (liquide amniotique) 22 SA : 97% (placenta), 98% (cerveau, cervelet, muscle, poumon)

Discussion

I. L'étude

I.1. Famille A

Concernant la famille A, il est tout d'abord intéressant de constater que malgré un taux d'hétéroplasmie dans les urines de la mère de 60%, celle-ci est asymptomatique.

Ensuite le fœtus 1 présente un taux d'hétéroplasmie de 50% à 13 SA et un taux d'en moyenne 35,5% à 19 SA. Dans ces deux résultats il s'agit de valeurs comprises entre 30% et 70% correspondant à la zone grise qui actuellement ne permettent pas de définir l'évolution de l'hétéroplasmie au cours de la grossesse et donc de la gravité de l'atteinte si atteinte il y a. Il y a donc une réflexion éthique qui sera développée ultérieurement concernant la décision d'interrompre ou non la grossesse.

Bien que les résultats aient été obtenus par deux laboratoires différents utilisant des techniques distinctes et pouvant constituer un biais d'analyse, ils mettent néanmoins en évidence la question de l'évolution in utéro de ces taux d'hétéroplasmie. En effet s'il existe une évolution in utéro du taux d'hétéroplasmie est-il croissant, décroissant ou aléatoire et dans ce dernier cas il n'est donc pas possible de définir un consensus.

Pour évaluer cette évolution il est nécessaire d'effectuer des recherches complémentaires avec un nombre de cas plus important pour établir un consensus. De plus il ne peut être exclu que cette évolution du taux d'hétéroplasmie soit également dépendante du type de mutation de l'ADNmt.

Dans ce cas il est intéressant de constater que la transmission maternelle représente un mode particulier puisque les deux sexes peuvent être atteints comme le montre les fœtus 1 et 2. Il ne peut cependant pas être affirmé avec ces deux cas uniquement, que l'effet-seuil de la mutation soit identique dans les deux sexes.

Au-delà de l'aspect technique, il convient d'ajouter que Mme D. a aujourd'hui 41 ans et n'a pas d'enfant vivant. A cet âge elle peut à nouveau porter une grossesse mais pas sans risque, de plus un diagnostic prénatal lui sera fortement conseillé, si celui-ci est défavorable cela signifie réitérer une 3^e IMG. Quelles éventualités peuvent avoir Mme D. et son conjoint quant à la naissance d'un enfant ?

Le don d'ovocyte ou l'adoption sont évidemment des possibilités pour ce couple mais cela signifie que ce couple fertile doit renoncer à la parentalité biologique.

Le diagnostic préimplantatoire (DPI) peut être abordé également. Celui-ci évoqué par la loi de bioéthique du 7 juillet 2011 [26] est défini comme « un diagnostic biologique réalisé à partir de cellules prélevées sur l'embryon in vitro.

Cependant quels sont les délais pour obtenir un DPI et dans le cadre d'une mutation de l'ADN mitochondrial, qu'est-il possible de faire ?

Mme D. a deux sœurs qui ont chacune deux enfants vivants (cf arbre généalogique), ces enfants sont peut-être comme Mme D., porteurs de la mutation et pourront la transmettre à leur descendance. Cependant il n'est pas possible de réaliser leur diagnostic aujourd'hui sur des individus mineurs car aucun bénéfice direct n'existe. En effet il n'y a pas à ce jour de traitement qui puisse actuellement palier un syndrome de Leigh causé par une mutation de l'ADNmt.

I.2. Famille B

Concernant la famille B et de la même manière que précédemment, Mme L. présente un taux d'hétéroplasmie de 75% dans les urines et est asymptomatique. Pourtant si on se réfère aux valeurs pronostiques, un taux > 70% indiquerait un pronostic défavorable. Cela met en évidence la difficulté du diagnostic prénatal avec une seule valeur qui peut être discutable au vu de l'exemple de Mme L, bien qu'il soit pertinent de définir des valeurs seuils pour ces pathologies.

Pour le fœtus 1, il est intéressant de constater que le taux retrouvé à 18 SA dans le liquide amniotique de 98% est très proche du taux retrouvé dans les organes du fœtus à 22 SA qui est en moyenne de 97,8%. Contrairement à la famille A, il n'y a pas de présence de variation in utéro du taux d'hétéroplasmie. Existe-t-il une variation in utéro dans ce type de mutation ? L'exemple à lui seul ne suffit pas, davantage d'investigations sont nécessaires pour pouvoir conclure.

Mme L. a deux filles (cf arbre généalogique), l'aînée sera dans quelques années apte à procréer, il est possible qu'elle soit porteuse asymptomatique comme sa mère et seul un diagnostic moléculaire afin d'éviter l'expérience d'un enfant atteint pourra être proposé si la patiente le souhaite.

L'autre fille âgée de quelques années présente un retard d'acquisition du langage, Mme L. a souhaité que l'analyse moléculaire soit faite pour connaître le statut de la mutation pour sa fille.

Cependant est ce que la loi autorise à rechercher chez cette mineure la mutation ? La définition du bénéfice direct est à évaluer pour le suivi de la patiente. Effectivement à l'époque du cas index, la mutation n'étant pas connue, aucune surveillance particulière ni DPN n'a été réalisée pour cette 3^e grossesse. Quels taux d'hétéroplasmie auraient été obtenus ? Quelles décisions ? Cette enfant qui peut être porteuse ne le saura qu'au cours de sa vie et de sa descendance.

II. Les autres études

Pour appuyer cette étude, une recherche quasi-exhaustive de la littérature, concernant ces deux mutations de l'ADNmt, a été effectuée et est résumée dans les deux tableaux suivants.

I.1. La mutation 14459G>A

Source	mutation	sexe	Age d'apparition de la maladie	Age au moment de l'étude	Phénotype	Clinique	Imagerie	Biochimie	Hétéroplasmie	déficit enzymatique de la CR
Jun et al 1994 [32]	144559G>A	F	2 ans	10 ans	Syndrome neuro-dégénératif	>2 ans début des manifestations cliniques >5ans Dystonie >8ans dysarthrie	IRM cérébrale : hypersignaux bilatérales du putamen et du noyau caudé	ND	99% (sang)	ND
Jun et al 1994 [32]	144559G>A	M (frère)		13 ans	Syndrome neuro-dégénératif	>dystonie légère et retard intellectuel		ND	99% (sang)	ND
Jun et al 1994 [32]	144559G>A	F (mère)	32 ans		LHON			ND	73% (sang)	ND
Jun et al 1994 [32]	144559G>A	M (cousin)			LHON			ND	99% (sang)	ND
Jun et al 1994 [32]	144559G>A	M (neveu)	5ans		Syndrome neuro-dégénératif	>dystonie	>TDM cérébrale: hypodensité des ganglions basaux	ND	99% (sang)	ND
Kirby DM et al 2000 [33]	144559G>A	M	9 mois	6 ans et 11 mois (décédé)	Leigh syndrome	> 9 mois : retard moteur et hypotonie >4ans et 5 mois : convulsions et spasticité >6ans et 11 mois : décès d'un arrêt respiratoire	>9 mois : TDM montre des lésions bilatérales de faible densité des ganglions basaux	Lactacidémie élevée (3,4mM), lactacidorachie élevée (3,6mM)	97% (fibroblastes)	Déficit du complexe I

Kirby DM et al 2000 [33]	144559G>A	M (frère)	3 mois	10 mois (décédé)	Leigh syndrome	>3 mois : hypotonie, régression neurologique >7 mois: convulsions >10 mois: acidose métabolique profonde et décès	non réalisée	lactacidémie élevée (4mM), lactacido-rachie élevée (4,2mM)	97% (muscle, foie)	Déficit du complexe I
Kirby DM et al 2000 [33]	144559G>A	F	6 mois	8 mois (décédée)	Leigh syndrome	>6 mois : mouvements anormaux des yeux, retard de développement, hypotonie >8 mois : régression, hypoventilation et décès	>8 mois : IRM cérébrale: une atrophie cérébrale des ganglions basaux, des noyaux thalamiques et la partie antérieure du pont	lactacidémie élevée (5,4mM), lactacido-rachie élevée (4,4mM)	99% (fibro-blaste), 95% (muscle), 97% (foie)	Déficit du complexe I
Funalot et al 2002 [34]	144559G>A	M	18ans	30-32ans		>18ans : perte d'acuité visuelle bilatérale irréversible >29ans : ataxie cérébelleuse modérée, signe de Babinski bilatéral	IRM cérébrale : hypersignaux des noyaux rouges droits, et hypersignaux bilatéraux du troisième ventricule	ND	40% (sang)	ND
Gropman et al 2004 [35]	144559G>A	F	3ans	3ans	ND	>tremblements >dystonie >retard de taille	IRM cérébrale : Hypersignaux bilatéraux des putamen	lactacido-rachie élevée	100% (muscle)	Déficit du complexe I

Gropman et al 2004 [35]	144559G>A	M (frère)	2ans	7ans	ND	>hémiparésie >Symptômes de neurofibromatose de type 1 (NF1) >Retard psychomoteur >Spasticité et dystonie du membre supérieur droit	IRM cérébrale : hypersignaux du putamen droit	Lactacidémie élevée	100% (sang)	ND
Gropman et al 2004 [35]	144559G>A	F (mère)	35ans		Asymptomatique	>Symptômes de neurofibromatose de type 1 (NF1)	IRM cérébrale : Hypersignaux bilatéraux des putamen	ND	100% (sang)	ND
Gropman et al 2004 [35]	144559G>A	F (cousine maternelle)	5ans	5ans		>hémiparésie	IRM cérébrale : Hypersignaux bilatéraux des putamen	ND	100% (sang)	ND
Gropman et al 2004 [35]	144559G>A	F (grand-mère)	ND	48ans (décédée)	ND	>cause du décès : détérioration neurologique	ND	ND	ND	ND
Tarnopolsky et al 2004 [36]	144559G>A	F	8 ans	45ans	Dystonie		IRM cérébrale : Hypersignaux bilatéraux des putamen	Lactacidémie élevée	ND	ND
Tarnopolsky et al 2004 [36]	144559G>A	M (frère)	19 ans	49ans	LHON		ND	ND	ND	ND
Tarnopolsky et al 2004 [36]	144559G>A	M (frère)		56ans	asymptomatique		ND	ND	80% (fibroblaste)	ND

Tarnopolsky et al 2004 [36]	144559G>A	M	16ans	17ans	LHON	>Perte d'acuité visuelle >atteinte papillaire > atteinte du nerf optique > scotome bilatéral	ND	ND	72% (fibro-blaste)	ND
-----------------------------	-----------	---	-------	-------	------	---	----	----	--------------------	----

II.1. La mutation m.14487C>T

Source	mutation	sexe	Age d'apparition de la maladie	Age au moment de l'étude	Phénotype	Clinique	Imagerie	Biochimie	Hétéroplasmie	déficit enzymatique de la CR
Ugalde et al 2003 [30]	14487T>C	masculin	4 mois	7 mois (décédé)	Leigh syndrome	Retard moteur hypotonie surdité signes pyramidaux et extra-pyramidaux apnées	TDM c�erebral : lésions des ganglions basaux aires hypodenses des noyaux putamens	lactacidémie élevée	86% (fibroblastes) 65% (muscle et foie)	Déficit du complexe I
Solano et al 2003 [37]	14487T>C	masculin	4 ans	15 ans	Syndrome neuro-d�eg�eneratif	>4 ans : trouble de la marche hypotonie avec signe de babinski >13 ans lésions nécrotiques des ganglions basaux >15 ans dysarthrie sévère et retard mental mod�er�e	Nécrose bilatérale du striatum	ND	93% (muscle) 67% (sang en 2001) 77% (sang en 1995)	désordre de la chaine respiratoire
Solano et al 2003 [37]	14487T>C	masculin	6 ans	15 ans	Syndrome neuro-d�eg�eneratif	>6 ans rotation externe du pied gauche à la marche. >9 ans dystonie du membre supérieur gauche. >15ans tétraplégie dystonique	>10 ans Nécrose bilatérale du striatum	ND	94% (sang)	ND

Lebon et al 2003 [38]	14487T>C	masculin	15 mois		Leigh syndrome	>15mois ataxie sévère vomissements >32mois dystonie et dysarthrie spasticité sévère dyskinésie faciale	>2ans connexions entre ganglions basaux et noyaux caudés	ND	80% (muscle)	Déficit du complexe I
Bugiani et al 2004 [39]	14487T>C	ND	ND	ND	Leigh syndrome	désordres neurologiques progressifs avec détérioration motrice et cognitive	Neuro-imagerie implication du tronc cérébral et des ganglions basaux	lactacidémie et lactacidorachie augmentées	>95% (muscle et fibroblaste)	déficit du complexe I dans le muscle
Esteitie et al 2005 [40]	14487T>C	féminin	3ans	ND	Leigh syndrome	retard de développement >3ans : ataxie, difficultés à la marche, vomissements >4ans athétose, >7 ans épilepsie partielle >9ans : spasticité	IRM cérébrale : lésions des ganglions basaux avec signaux anormaux du putamen, du noyau caudé, de la substance noire et du globus pallidus	ND	>95% (muscle) 76% (fibroblastes)	ND
Malfatti et al 2007 [41]	14487T>C	masculin	5 mois	3 ans	Leigh syndrome	>5mois retard de développement hypotonie crise épileptique incoordination des mouvements oculaires	>9mois: signaux anormaux des ganglions basaux, et noyaux sous-thalamiques	lactacidémie et lactacidorachie augmentées	>95% (muscle) 85% (fibroblastes)	Déficit du complexe I

Wang et al 2008 [42]	14487T>C et 12297T>C	féminin	5 mois	11 mois (décédée)	Leigh syndrome	>4mois maintien de tête difficile >5mois retard de développement hypotonie	IRM cérébrale : hypersignaux bilatérales symétriques des aires en T2 des ganglions basaux et du tronc cérébral	lactacidémie élevée, lactacidorachie non réalisée	>99% (muscle pour les 2 mutations)	Déficit du complexe I
Wang et al 2008 [42]	14487T>C et 12297T>C	féminin (tante)	6mois	13 mois (décédée)	Leigh syndrome	>6mois arrêt de développement, nystagmus, léthargie, crise épileptique et hypotonie >13 mois arrêt respiratoire et décès	TDM cérébral : hypointensités bilatérale de la capsule externe et de la partie supérieure du tronc cérébral	lactacidurie élevée	ND	ND
Wang et al 2008 [42]	14487T>C et 12297T>C	masculin (oncle)	10 mois	15 ans (décédé)	Leigh syndrome	>10mois retard de développement, hypotonie puis léthargie, crise épileptique, perte de la vue	ND	ND	ND	ND
Naess et al 2009 [43]	14487T>C	masculin	5 mois	5 mois (décédé)	Leigh syndrome	Hypertonie, spasticité, dystonie, crise épileptique, irritabilité, hypoventilation	ND	lactacidémie et lactacidorachie augmentées	100% (muscle)	Déficit du complexe I

Comme on peut le constater dans les tableaux précédents, la mutation 14459G>A présente différents phénotypes tel le syndrome de Leigh mais aussi la neuropathie optique héréditaire de Leber et également des syndromes neurodégénératifs. Les âges d'apparitions diffèrent également suivant le phénotype. Les signes cliniques, les valeurs biologiques et l'imagerie sont de la même façon, variables suivant le phénotype.

Pour ce qui est de la mutation 14487T>C les phénotypes retrouvés dans ces publications sont le syndrome de Leigh et un syndrome neurodégénératif. De la même façon les signes cliniques varient suivant le phénotype, on constate simplement que pour le syndrome de Leigh le pronostic est mauvais puisque la majorité des cas étudiés dans la littérature comme dans la présente étude aboutissent au décès de l'individu.

III. Aspect éthique

Les deux familles étudiées mettent en évidence un certain nombre d'interrogations concernant l'éthique autour des maladies mitochondriales et des conséquences qu'elles entraînent. Des scientifiques se sont interrogés sur le sujet, en effet le diagnostic prénatal et préimplantatoire pour ce genre de pathologie sont rendus complexes par l'interprétation même des résultats obtenus [44]. En effet la difficulté de l'interprétation d'un taux d'hétéroplasmie intermédiaire c'est-à-dire entre 30 et 70% mutation pose question. Qu'est-il éthiquement justifié de faire ?

La loi de bioéthique parle d'une information loyale, claire et adaptée à la situation cependant il ne faut pas oublier l'objectivité car au final la décision revient au couple et non pas au praticien même si celui-ci les informe. Pourtant à la vue des connaissances du praticien il y a peut-être une influence sous-jacente à la décision du couple. La clarté évoquée par la loi peut sembler difficile à appliquer dans certains cas comme celui du syndrome de Leigh et plus généralement des maladies mitochondriales puisqu'en effet les professionnels de santé sont eux même face à des incertitudes par rapport au DPN. Le consentement éclairé des patients est donc quelque peu biaisé par les incertitudes existantes.

Un autre auteur évoque la possibilité qu'un seul échantillon notamment lors d'une ponction de villosités chorales ne reflète pas systématiquement l'organisme entier [45]. Cela signifie qu'un fœtus peut être avorté alors qu'il s'agit en réalité d'un enfant sain. Dans ce cas doit on effectuer deux tests séparés par un intervalle de plusieurs semaines, ce qui signifie augmenter le risque de fausses couches liées au geste mais aussi prolonger l'investissement psychique de la future mère et du couple pour pratiquer malgré cela, une IMG quelques semaines après.

La question se pose de ne faire qu'un test mais avec des incertitudes ou deux tests comportant plus de risques mais avec une incertitude moindre mais pas nulle du fait du taux d'hétéroplasmie intermédiaire. Suite à toutes les interrogations soulevées par le DPN, une alternative pour les maladies mitochondriales est le DPI. Le DPI défini par la loi du 7 juillet 2011 consiste en un diagnostic biologique réalisé à partir de cellules prélevées sur l'embryon in vitro. Actuellement un seul DPI pour mutation de l'ADNmt a rencontré une issue positive [46]. Cependant le DPI fait lui aussi face à des interrogations, car pour ce qui est des maladies mitochondriales, l'issue n'est pas forcément un enfant sain mais un enfant dont le risque d'être atteint est diminué ce qui signifie éviter pour le couple un enfant avec un très fort risque de taux de mutation élevé [44]. Est ce que les futurs parents pourront entendre et comprendre la nuance. Est ce éthiquement acceptable que le DPI dans ces situations ne donne pas d'enfants sains ?

Le thème qui peut en surgir est celui de l'eugénisme qui postulerait que seuls des enfants sains vivent et dont certains individus pensent que le DPN et le DPI en sont les instruments. Or le positionnement doit se faire non pas du côté des généralités mais bien au cas par cas. En effet comme nos deux familles est-il souhaitable pour une famille de donner la vie à des enfants qui vont mourir dans leurs premiers mois de vie ? Trois concepts sont évoqués [44] :

- Le principe de seuil minimum
- Le principe de bien-être maximum
- Le principe de bien-être raisonnable.

Le premier concept évoque le cas où l'aide à la procréation via le DPI est acceptable à partir du moment où la vie de cet enfant à venir est considérée comme « en valant la peine (worthwhile life) » par la population générale [44-47]

Le second concept quant à lui rend acceptable le DPI si la meilleure qualité de vie (physique et psychique) peut être donnée à l'enfant à naître. Or pour les maladies mitochondriales il ne faut pas oublier de mentionner que certaines pathologies peuvent se manifester à l'âge adulte (syndrome de Leigh-like ou NOHL) et par conséquent la mère de l'enfant à naître peut être atteinte et développer une perte d'acuité visuelle ou des troubles neurologiques. Que signifie dans ce cas la meilleure qualité de vie ? Il existe des familles avec un parent malade qui ont cependant une vie acceptable, de même aujourd'hui des familles monoparentales vivent de manière tout à fait acceptable.

Enfin le troisième et dernier concept correspondant à une alternative des deux précédents expose le principe de bien-être raisonnable.

Ce bien-être raisonnable consiste après un DPI en la naissance d'un enfant ayant une qualité de vie acceptable [44]. Ce dernier concept permet d'équilibrer le souhait d'un couple d'avoir leur propre enfant et le bien-être de ce même enfant.

Cependant ces principes font face, une fois de plus à l'obstacle de la « zone grise » où en effet ce que l'on peut supposer comme acceptable lors d'un DPI peut pour la famille ayant un enfant malade devenir inacceptable et il n'y a pas de prédiction possible. Une autre alternative se présente également, celle de l'adoption mais qu'en pensent les familles, qui comme nos deux cas sont fertiles et capables d'engendrer la vie.

Ces couples ont dans leurs familles respectives des membres non diagnostiqués ou susceptibles d'être porteurs de la mutation de l'ADNmt. Si ces mêmes sœurs donnent naissance à des enfants, qu'en est-il de leur devenir, que peut-on faire les concernant et a-t-on le droit de faire quelque chose ? Certains auteurs mesurent le taux de mutation au niveau du sang de cordon [48] Tandis que d'autres ne préfèrent pas évaluer le taux de mutation de l'ADNmt pour des « raisons éthiques » [49] Le fait est que lorsque cela est réalisé, il s'agit d'une méthode pour prouver l'absence de la mutation mais cela peut mettre en évidence un taux élevé.

Que faire dans ce cas là ? L'enfant est vivant et son avenir peut être incertain mais il peut aussi être asymptomatique. La prédiction dans ce cas peut porter préjudice. Il y a pourtant un avantage certain à tester des mineurs, c'est en effet améliorer les connaissances actuelles sur le sujet [44-50] avec une quantité importante de dépistage permettant d'affirmer plus aisément l'interprétation de résultats de taux mais aussi de découvrir de nouvelles mutations. Cela bien sûr pose question sur la primauté de la recherche sur l'état de santé du patient.

Pour étoffer ces interrogations, les progrès de la recherche sur le sujet sont nécessaires, mais probablement le vécu de ces couples aussi nombreux soient-ils, serait pertinent quant à la prise en charge en DPN et DPI.

IV. Perspectives scientifiques

Certaines équipes travaillent actuellement pour prévenir et éviter les maladies mitochondriales. La première technique consiste en l'analyse des globules polaires pour le diagnostic de pathologies de l'ADNmt [51-52]. En effet lors de la maturation ovocytaire et précédent l'ovulation, il y a expulsion d'un premier globule polaire contenant la même information génétique que l'ovocyte et donc le même type de mutations de l'ADNmt maternel. De plus pour affirmer le résultat il peut être réitéré avec le deuxième globule polaire expulsé après fécondation in vitro.

Cependant la biopsie de blastomère semble plus efficace actuellement en terme de diagnostic [51-52]. L'avantage de cette technique c'est qu'elle ne touche pas l'embryon directement. De plus dans certains pays comme l'Allemagne où le DPI ne peut se pratiquer, l'analyse du globule polaire représente une alternative non négligeable [10].

Une seconde technique consiste en un transfert de noyau. En effet le processus consiste à énucléer un ovocyte d'une donneuse saine, d'y introduire le noyau d'un ovocyte de la future mère [10-53]. Ainsi l'enfant portera l'information génétique de sa mère et possèdera les mitochondries saines de la donneuse. L'éventualité émise est même d'utiliser un ovocyte d'une sœur paternelle, pour que l'information génétique mitochondriale provienne du côté paternel plutôt que d'une inconnue [10]. Bien que cette possibilité soit intéressante, elle soulève des interrogations quant au clonage humain.

Conclusion

Les maladies mitochondriales et plus particulièrement le syndrome de Leigh représentent des pathologies rares mais en augmentation du fait du nombre toujours croissant de mutations pathogènes mais également de notre capacité à mieux diagnostiquer ces maladies.

Cette étude ne peut se suffire à elle-même et l'importance de la recherche est primordiale aujourd'hui pour pouvoir dans un avenir proche permettre à des familles d'avoir des enfants. Davantage d'investigations sont indispensables afin d'avoir plus de recul sur les différentes mutations existantes et pouvoir conclure de manière plus avérée face à l'interprétation des résultats d'hétéroplasmie pour des mutations touchant l'ADNmt. De plus le diagnostic prénatal sera de plus en plus sollicité dans le cadre de familles portant ce type de mutations.

Il semble donc pertinent pour des professionnels de la naissance de mieux connaître ce type de pathologies et de comprendre ses mécanismes pour finalement appréhender au mieux les attentes et difficultés des couples rencontrés dans leurs parcours de DPN mais aussi comprendre la législation et ses limites.

Il est intéressant de constater que la recherche progresse notamment avec des processus innovants (transferts de noyau) qui font aujourd'hui face à des obstacles éthiques tout aussi admissibles (patrimoine génétique, clonage).

Bibliographie

- [1] **Lebre AS** (2010) Stratégie diagnostique dans les maladies mitochondriales *Pathologie Biologie* Volume 58, Issue 5, October 2010, Pages 353–356.
- [2] **Wallace DC**, Fan W and Proccacio V. (2010) Mitochondrial Energetics and Therapeutics. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of disease* 5, 297-348.
- [3] **Wallace DC**. (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283, 1482-1488.
- [4] **Tuppen H**, Blakely E, Turnbull D, Taylor R (2010) Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1797, 113-28.
- [5] **May-Panloup P**, Chrétien MF, Malthiery Y, Reynier P (2004) Mitochondries et reproduction. *Med Sci (Paris)* 2004 ; 20 : 779–783.
- [6] **Al Rawi S**, Louvet-Vallée S, Djeddi A, Sachse M, Culetto E, Hajjar C et al. (2011). Post-fertilization autophagy of sperm organelles prevents paternal mitochondrial DNA transmission. *Science*, 28 octobre 2011, 334 (6059): 1144-1147.
- [7] **Brown WM**, George M Jr and Wilson AC.(1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(4):1967-71.
- [8] **Bellance N**, Lestienne P, Rossignol R (2009) Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis. *Frontiers in Bioscience* 14, 4015-4034, January 1, 2009.
- [9] **Elliott HR**, Samuels DC, Eden JA, Relton CL, Chinnery PF. (2008) Pathogenic mitochondrial DNA mutations are common in the general population. *Am J Hum. Genet.* 83: 254-60.
- [10] **Bredenoord AL**, Pennings G and De Wert G (2008) Ooplasmic and nuclear transfer to prevent mitochondrial Dna disorders: conceptual and normative issues. *Human Reproduction Update* 14 669-678.
- [11] **Munaro M**, Tiranti V, Sandonà D, Lamantea E, Uziel G, Bisson R et al. (1997). A single cell complementation class is common to several cases of cytochrome c oxidase-defective Leigh's syndrome. *Hum Mol Genet.* 1997 Feb;6(2):221-8.

- [12] **Fruhman G**, Landsverk M, Lotze T, Hunter J, Wangler M, Adesina A et al. (2011) Atypical presentation of Leigh syndrome associated with a Leber hereditary optic neuropathy primary mitochondrial DNA mutation (2011) *Molecular Genetics and Metabolism* Volume 103, Issue 2, June 2011, Pages 153–160.
- [13] **Procaccio V**, Wallace DC.(2004) Late-onset Leigh syndrome in a patient with mitochondrial complex I NDUFS8 mutations. *Neurology*. 2004 May 25;62(10):1899-901.
- [14] **Finsterer J** (2008) Leigh and Leigh-like syndrome in children and adults. *Pediatr Neurol*. 2008 Oct;39(4):223-35.
- [15] **Ronchi D**, Cosi A, Tonduti D, Orcesi S, Bordoni A, Fortunato F et al. (2011) Clinical and molecular features of an infant patient affected by Leigh Disease associated to m.14459G> A mitochondrial DNA mutation: a case report *BMC Neurol*. 2011; 11: 85.
- [16] **Rahman S**, Blok RB, Dahl HH, Danks DM, Kirby DM, Chow CW et al. (1996) Leigh syndrome: clinical features and biochemical and DNA abnormalities. *Ann Neurol*. 1996 Mar;39(3):343-51.
- [17] **Wallace DC**, Lott MT and Procaccio V (2007) "Mitochondrial Genes in Degenerative Diseases, Cancer and Aging", in Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics, 5th Edition, D. L. Rimoin, J. M. Connor, R. E. Pyeritz and B. R. Korf, Editors. 2007, Churchill Livingstone Elsevier: Philadelphia, PA. p. 194-298.
- [18] **Ciafaloni E**, Santorelli F, Shanske S, Deonna T, Roulet E, Janzer C et al. (1993) Maternally inherited Leigh syndrome., *J Pediatr* 122 (1993) 419-422.
- [19] **Lebre AS** (2010) Strategy in diagnosis of mitochondrial diseases. *Pathol Biol (Paris)*. 2010 Oct;58(5):353-6. Epub 2009 Nov 25.
- [20] **Dr Bertrand Boutillier, Pr Gérard Outrequin**, Coupe horizontale du cerveau (consulté le 25 Janvier 2012) disponible à partir de l'URL : <http://www.anatomie-humaine.com/IMG/gif/S.23_Cerveau_Coupe_horizontale.gif >
- [21] **Rustin P**, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rötig A, Saudubray JM et al. (1994). Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta*. 1994 Jul;228(1):35-51.
- [22] **Taylor RW**, Turnbull DM (2005). Mitochondrial DNA mutations in human diseases. *Nat Rev Genet* 2005; 6:389-402.

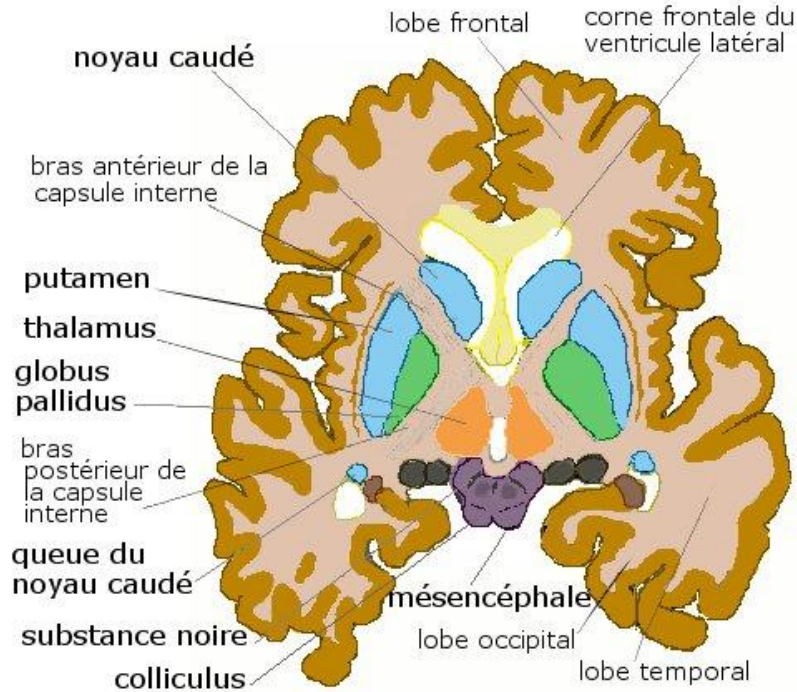
- [23] **Chinnery PF**, Majamaa K, Turnbull D, Thorburn D. (2006) Treatment for mitochondrial disorders. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006 Jan 25;(1):CD004426.
- [24] **Panetta J**, Smith L, Boneh A, (2004) Effect of high-dose vitamins, coenzyme Q and high-fat diet in paediatric patients with mitochondrial diseases., *J Inherit Metab Dis* 27 (2004) 487-498.
- [25] **LOI n° 94-654 du 29 juillet 1994** relative au don et à l'utilisation des éléments et produits du corps humain, à l'assistance médicale à la procréation et au diagnostic prénatal du 30 Juillet 1994 au *Journal Officiel de la République Française*.
- [26] **LOI n° 2011-814 du 7 juillet 2011** relative à la bioéthique paru le 8 Juillet 2011 au *Journal officiel de la République Française n°0157* concernant le diagnostic prénatal, le diagnostic préimplantatoire et l'échographie obstétricale et fœtale.
- [27] **Décret n°2006-1661 du 22 décembre 2006** relatif au diagnostic prénatal et au diagnostic biologique effectué à partir de cellules prélevées sur l'embryon in vitro et modifiant le code de santé publique publié au journal officiel du 23 décembre 2006.
- [28] **Sentilhes L**, D Bonneau coordonné par Descamps P, *Le diagnostic prénatal en pratique*. Issy-les-Moulineaux : Elsevier Masson 2011.
- [29] **Voinchet M** (2010) Diagnostic prénatal de la mutation m.14459G>A de l'ADN mitochondrial. Mémoire de recherche de master I.
- [30] **Ugalde C**, Triepels R, Coenen M, Van den Heuvel L, Smeets R, Uusimaa J et al. (2003) Impaired Complex I Assembly in a Leigh Syndrome Patient with a Novel Missense Mutation in the ND6 Gene. *Ann Neurol* 54:665–669.
- [31] **Ordronneau AC** (2012) Diagnostic prénatal et mutation 14487T>C de l'ADN mitochondrial. Mémoire de recherche de master I
- [32] **Jun AS**, Brown MD, Wallace DC. (1994) A mitochondrial DNA mutation at nucleotide pair 14459 of the NADH dehydrogenase subunit 6 gene associated with maternally inherited Leber hereditary optic neuropathy and dystonia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Jun 21;91(13):6206-10.
- [33] **Kirby DM**, Kahler SG, Freckmann ML, Reddihough D, Thorburn DR.(2000) Leigh disease caused by the mitochondrial DNA G14459A mutation in unrelated families *Annals of Neurology* Volume 48, Issue 1, pages 102–104, July 2000.

- [34] **Funalot B**, Reynier P, Vighetto A, Ranoux D, Bonnefont JP, Godinot C et al. (2002) Leigh-like encephalopathy complicating Leber's hereditary optic neuropathy. *Ann Neurol.* 2002 Sep;52(3):374-7.
- [35] **Gropman A**, Chen TJ, Perng CL, Krasnewich D, Chernoff E, Tiffit C et al. (2004) Variable clinical manifestation of homoplasmic G14459A mitochondrial DNA mutation *Am J Med Genet A.* 2004 Feb 1;124A(4):377-82.
- [36] **Tarnopolsky MA**, Baker SK, Myint T, Maxner CE, Robitaille J, Robinson BH. (2004). Clinical variability in maternally inherited leber hereditary optic neuropathy with the G14459A mutation. *Am J Med Genet A.* 2004 Feb 1;124A(4):372-6.
- [37] **Solano A**, Roig M, Vives-Bauza C, Hernandez-Peña J, Garcia-Arumi E, Playan A et al. (2003) Bilateral striatal necrosis associated with a novel mutation in the mitochondrial ND6 gene. *Ann Neurol.* 2003 Oct;54(4):527-30.
- [38] **Lebon S**, Chol M, Benit P, Mugnier C, Chretien D, Giurgea I et al. (2003) Recurrent de novo mitochondrial DNA mutations in respiratory chain deficiency *J Med Genet* 2003;40:896–899.
- [39] **Bugiani M.**, Invernizzi F., Alberio S., Briem E., Lamantea E., Carrara F et al. (2004) Clinical and molecular findings in children with complex I deficiency *Biochimica et Biophysica Acta .* 1659 (40577): 136-147.
- [40] **Esteitie N.**, Hinttala R., Wibom R., Nilsson H., Hance N., Naess K et al. (2005) Secondary metabolic effects in complex I deficiency *Annals of Neurology .* 58 (4): 544-552.
- [41] **Malfatti E**, Bugiani M, Invernizzi F, Fischinger-Moura de Souza C, Farina L, Carrara F et al. (2007) Novel mutations of ND genes in complex I deficiency associated with mitochondrial encephalopathy *Brain Volume*130, Issue7 Pp. 1894-1904.
- [42] **Wang J.**, Brautbar A., Chan A. K., Dzwiniel T., Li F.Y., Waters P.J et al. (2009) Two mtDNA mutations 14487T>C (M63V, ND6) and 12297T>C (tRNA Leu) in a Leigh syndrome family *Molecular Genetics and Metabolism .* 96 (2): 59-65.
- [43] **Naess, K.**, Freyer, C., Bruhn, H., Wibom, R., Malm, G., Nennesmo, I et al. (2009) MtDNA mutations are a common cause of severe disease phenotypes in children with Leigh syndrome *Biochimica et Biophysica Acta .* 1787 (5): 484-490.

- [44] **Bredenoord AL**, Pennings G, Smeets HJ, de Wert G.(2008) Dealing with uncertainties: ethics of prenatal diagnosis and preimplantation genetic diagnosis to prevent mitochondrial disorders. *Hum Reprod Update*. 2008 Jan-Feb;14(1):83-94.
- [45] **Marchington DR**, Scott-Brown M, Barlow DH, Poulton J. (2006) Mosaicism for mitochondrial DNA polymorphic variants in placenta has implications for the feasibility of prenatal diagnosis in mtDNA diseases. *Eur J Hum Genet*. 2006 Jul;14(7):816-23.
- [46] **Steffann J**, Frydman N, Gigarel N, Burlet P, Ray PF, Fanchin R et al. (2006) Analysis of mtDNA variant segregation during early human embryonic development: a tool for successful NARP preimplantation diagnosis. *J Med Genet*. 2006 Mar;43(3):244-7.
- [47] **Harris J** (2000) The welfare of the child. *Health care Anal* 2000;8:27-34.
- [48] **Graff C**, Wredenberg A, Silva JP, Bui TH, Borg K, Larsson NG (2000). Complex genetic counseling and prenatal analysis in a woman with external ophthalmoplegia and deleted mtDNA. *Prenat Diagn*. 2000 May;20(5):426-31.
- [49] **Bouchet C**, Steffann J, Corcos J, Monnot S, Paquis V, Rötig A et al. (2006). Prenatal diagnosis of myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like syndrome: contribution to understanding mitochondrial DNA segregation during human embryofetal development. *J Med Genet*. 2006 Oct;43(10):788-92.
- [50] **Bredenoord AL**, Dondorp W, Pennings G, De Die-Smulders CE, De Wert G. (2008) PGD to reduce reproductive risk: the case of mitochondrial DNA disorders. *Hum Reprod*. 2008 Nov;23(11):2392-401.
- [51] **Briggs DA**, Power NJ, Lamb V, Rutherford AJ, Gosden RG. (2000) Amplification of DNA sequences in polar bodies from human oocytes for diagnosis of mitochondrial disease. *Lancet*. 2000 Apr 29;355(9214):1520-1.
- [52] **Dean NL**, Battersby BJ, Ao A, Gosden RG, Tan SL, Shoubridge EA, Molnar MJ. (2003) Prospect of preimplantation genetic diagnosis for heritable mitochondrial DNA diseases. *Mol Hum Reprod*. 2003 Oct;9(10):631-8.
- [53] **Craven L**, Tuppen HA, Greggains GD, Harbottle SJ, Murphy JL, Cree LM et al (2010). Pronuclear transfer in human embryos to prevent transmission of mitochondrial DNA disease. *Nature*. 2010 May 6;465(7294):82-5. Epub 2010 Apr 14.

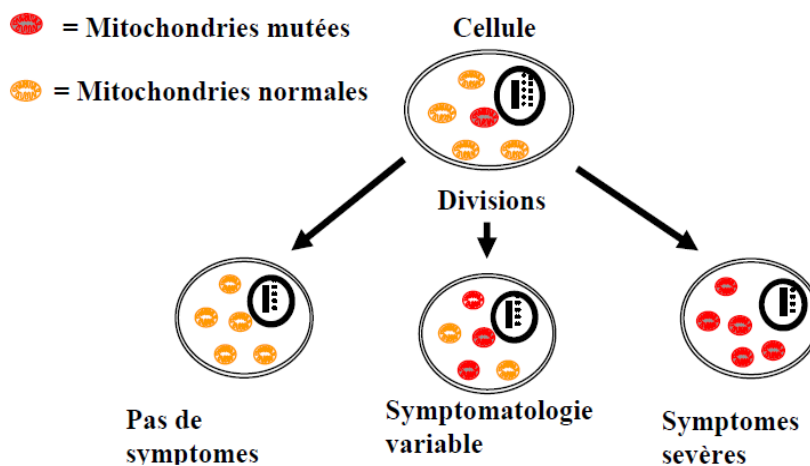
Annexes

Annexe 1 : Schéma des ganglions de la base du cerveau.



(SOURCE : http://commons.wikimedia.org/wiki/Category:Basal_ganglia consulté le 17Fevrier 2012)

Annexe 2 : Schéma présentant la ségrégation mitochondriale lors des divisions cellulaires



(SOURCE : diplôme d'état de docteur en pharmacie de Lucie WILHELM sur l'hétéroplasmie mitochondriale : impact sur les fonctions mitochondriales lors de la différenciation neuronale soutenue en 2009. Université René Poincaré Nancy I)

Figure : Ségrégation mitochondriale stochastique lors de la division cellulaire. La symptomatologie et les effets cellulaires vont dépendre du taux d'hétéroplasmie mitochondriale.

Annexe 2: Protocole pour l'étude fœtopathologique des fœtus atteints de maladies mitochondriales.

1. Préalablement à toute étude, il faut recueillir le consentement des parents à une recherche en génétique sur le produit d'interruption de la grossesse.
2. Le transfert du corps devra être réalisé le plus rapidement possible vers le service de fœtopathologie. Le prélèvement des tissus devra se faire le plus rapidement possible.
3. Si possible, effectuer un prélèvement de liquide amniotique avant l'interruption de la grossesse pour mise en culture.
4. Préciser le mode d'interruption de la grossesse, avec en particulier le ou les fœticides utilisés (chlorure de potassium ...)
5. Des prélèvements de foie, muscle strié périphérique (quadriceps par exemple), myocarde, peau, cerveau, sang de cordon, trophoblaste (si possible après rinçage), rein, ovaire (en cas de fœtus féminin) seront réalisés puis mis en cryotube dans la carboglace ou l'azote liquide.
Le placenta sera récupéré et congelé en totalité à – 20°C.
6. En ce qui concerne le trophoblaste, plusieurs prélèvements seront réalisés.
7. Une feuille type congélation sera remplie et accompagnera ces prélèvements. Prévenir le service de génétique afin qu'un des membres de l'équipe organise le rapatriement des échantillons. En attendant le transfert de prélèvement, ces derniers peuvent être conservés dans l'azote liquide ou dans un congélateur à – 80°C.

RESUME

Introduction : La mitochondrie, organite subcellulaire, fournisseur de l'énergie cellulaire possède son propre ADN mitochondrial. Celui-ci suit une transmission maternelle et lorsqu'il est muté, il peut entraîner de nombreuses maladies rares dont le syndrome de Leigh. Cette pathologie apparaissant dans la petite enfance se traduit par une encéphalopathie nécrosante et est de mauvais pronostic. Pour les familles dont un enfant est porteur ou décédé de cette cytopathie mitochondriale, un DPN a pu être proposé pour les grossesses ultérieures.

Objectifs : Cette étude a pour but au-delà de la découverte de pathologies mitochondriales rares, de montrer la complexité du DPN pour ce type de maladies.

Méthode : Une étude de cas au CHU d'Angers entre 2000 et 2011 a été réalisée. Elle comporte 2 familles distinctes porteuses d'une mutation de l'ADNmt différente (14487C>T 14459G>A) sur le même gène ND6 de l'ADNmt. Chacune des familles a vécu le décès d'un enfant dans sa première année de vie. Pour ces deux familles des diagnostics prénataux ont pu être proposés et réalisés. Cette étude comporte l'analyse de 3 diagnostics prénataux par choriocentèse et amniocentèse.

Résultats : Les résultats de cette étude nous montrent que le taux d'hétéroplasmie est étroitement corrélé à la sévérité de la maladie. Plus le taux de mutation est élevé, plus sévère sera la maladie. Les cas index de ces familles présentaient plus de 90% de mutant. Pourtant dans cette étude il est vrai que les mères asymptomatiques étaient porteuses de taux importants. Il y a également d'après cette étude une corrélation du taux d'hétéroplasmie dans les différents tissus ou organes étudiés pour ces deux mutations.

Discussion : Cette étude montre que le DPN à l'heure actuelle pour les maladies mitochondriales fait face à certaines difficultés. En effet il apparait des enjeux psychologiques pour ces couples étant dans l'incapacité d'avoir des enfants sains, et éthiques ; par rapport à la réalisation de ce diagnostic, à la décision qui en dépend et à l'avenir des générations non diagnostiquées.

Conclusion : Davantage d'investigations sont nécessaires, d'une part pour établir de véritables consensus afin d'améliorer les pratiques des professionnels de santé, d'autre part pour le suivi des couples dans ce parcours de diagnostic prénatal.

Mots-clés : Diagnostic prénatal, maladies mitochondriales, ADN mitochondrial, syndrome de Leigh, éthique.

ABSTRACT

Introduction: Mitochondrion is a sub cellular organelle, which is the provider of cellular energy. Mitochondria have their own DNA. It follows maternal inheritance when DNA is mutated, it can lead to many rare diseases as the Leigh syndrome. This pathology appears in early infancy and causes a necrotizing encephalopathy with a poor prognosis. When a family had an affected child or lost one from this disease, prenatal diagnosis could be offered for next pregnancies.

Objectives: This study intends to show how complex is the prenatal diagnosis for mitochondrial diseases such as the Leigh syndrome.

Methods: A case study has been conducted in Angers Hospital between 2000 and 2011. Two different families with a different DNA mutation (14487C>T 14459G>A) both on ND6 gene were studied. Each family lost a child before reaching one year of age. A prenatal diagnosis was suggested for these two families. This study present 3 prenatal diagnosis realized with choriocentesis or amniocentesis.

Results: The case study results show us that heteroplasmy level is correlated to the seriousness of the disease. The higher the mutant load is, the more serious will be the disease. Probands of this study had heteroplasmy levels higher than 90%. It is true that, those mothers in these cases were asymptomatic with high levels. There is another correlation in this study between heteroplasmy levels in different organs or tissues.

Discussion: This study shows prenatal diagnosis nowadays for mitochondrial diseases facing difficulties. Some psychological issues appear for parents who have difficulties to give birth to healthy children, and ethical issues related to the prenatal diagnosis, the decision relying on it and the future of the other members of the family who have not been diagnosed.

Conclusion: Further researches are required upon that question to reach real consensus to improve professional practices and help these couples in their prenatal diagnosis journey.

Keywords: Prenatal diagnosis, mitochondrial diseases, mitochondrial DNA, Leigh syndrome, ethics.