



**HAL**  
open science

# **Génétique des surdités héréditaires au sein de la population marocaine : étude des gènes MPZL2, CO4A3, MASP1 et ELMOD2**

Ghita Amalou

► **To cite this version:**

Ghita Amalou. Génétique des surdités héréditaires au sein de la population marocaine : étude des gènes MPZL2, CO4A3, MASP1 et ELMOD2. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers; Université Chouaïb Doukkali (El Jadida, Maroc), 2023. Français. ⟨NNT : 2023ANGE0012⟩. ⟨tel-04274741⟩

**HAL Id: tel-04274741**

**<https://theses.hal.science/tel-04274741v1>**

Submitted on 8 Nov 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire HAL, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

# THESE DE DOCTORAT

DE  
L'UNIVERSITE D'ANGERS  
L'UNIVERSITE CHOUAIB DOUKKALI

ECOLE DOCTORALE N° 605

*Biologie Santé*

*Spécialité : « Génomique, Génétique et Biologie moléculaire »*

Par

**Ghita AMALOU**

**Génétique des surdités héréditaires au sein de la population marocaine**

Etude des gènes *MPZL2*, *CO4A3*, *MASP1* et *ELMOD2*

Thèse présentée et soutenue à El Jadida, le 01.06.2023

Unité de recherche : Laboratoire MitoVasc – Equipe MitoLab – UMR CNRS 6015, INSERM U1083

## Rapporteurs avant soutenance :

Nourdin Harich	Professeur de l'Enseignement Supérieur – Faculté des Sciences, El Jadida, Maroc
Jing Wang	Directeur de Recherche – Institut des Neurosciences de Montpellier, France
Redouane Boulouiz	Professeur Habilité – Institut Supérieur des Professions Infirmières et Techniques de Santé, Oujda, Maroc

## Composition du Jury :

Présidente :	Rkia Belahsen	Professeur de l'Enseignement Supérieur – Faculté des Sciences, El Jadida, Maroc
Examinatrice :	Sophie Boucher	Praticien Hospitalier Universitaire – Université d'Angers, France
Dir.de thèse :	Guy Lenaers	Directeur de recherche – Université d'Angers, Unité MitoVasc, France
Co-Dir.de thèse :	Mostafa Kandil	Professeur de l'Enseignement Supérieur – Faculté des Sciences, El Jadida, Maroc
Co-Enc. de thèse :	Abdellhamid Barakat	Docteur – Institut Pasteur du Maroc, Maroc

**L'auteur du présent document vous autorise à le partager, reproduire, distribuer et communiquer selon les conditions suivantes :**



- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).
- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.
- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.

**Consulter la licence creative commons complète en français :**  
**<http://creativecommons.org/licences/by-nc-nd/2.0/fr/>**

Ces conditions d'utilisation (attribution, pas d'utilisation commerciale, pas de modification) sont symbolisées par les icônes positionnées en pied de page.



## Remerciements

Je remercie l'ensemble des membres de mon jury de thèse: Madame Jing Wang, Monsieur Redouane Boulouiz, Monsieur Nourdin Harich, Madame Sophie Boucher et Madame Rkia Belahsen qui m'ont fait l'honneur de consacrer du temps à la lecture et l'évaluation de ce manuscrit.

Mes remerciements vont à Mr le Président l'Université d'Angers, Mr. le vice-président de la recherche et Mr le directeur de l'école doctoral biologie et santé de m'avoir accepté en cotutelle dans le cadre du projet PHC-Toubkal.

Mes remerciements vont à Mr le Président de l'Université Chouaib Doukkali et Mr le Doyen de la Faculté des Sciences El Jadida pour m'avoir offert le privilège d'être comptée parmi leurs lauréats du Centre d'Etude Doctorale (CEDoc).

Je remercie toutes les composantes du partenariat Hubert Curien (PHC) franco-marocain, pour assurer le financement nécessaire lors de mes séjours en France.

Je voudrais exprimer ma profonde gratitude à Dr. Guy Lenaers, mon directeur de thèse. Merci d'avoir été présent sur ces années de thèse. Nos réunions et vos conseils m'ont toujours beaucoup apporté. Merci pour votre bienveillance et gentillesse durant les mois passés à Mitolab et Angers. Vous avez su me donner la motivation, la confiance et les encouragements que je sois à Mitolab ou de l'autre côté de la Méditerranée qui m'ont permis de toujours redoubler d'effort et poursuivre cette longue aventure.

Je remercie vivement mon directeur de thèse, Pr. Mostapha Kandil, je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral. Je vous remercie pour vos conseils et réflexions.

Dr. Abdelhamid Barakat sans qui ce projet n'existerait pas, je suis fière du travail que nous avons accompli et très heureuse de pouvoir continuer ces projets de recherche avec vous. Merci pour tout ce que vous m'avez appris, votre présence sans faille. Merci de m'avoir fait confiance depuis mon stage de master.

Pr. Majida Charif, je tiens à te remercier pour ta présence, ton aide inestimable tu as su être là du premier moment jusqu'aux répétitions de ma soutenance.

Pr. Amale Bousfiha, khalti Amale, c'est grâce à toi que j'ai pu intégrer le laboratoire de génétique en master. Tu as su me donner la motivation malgré toutes les difficultés auxquelles nous avons fait face.

Je ne pourrais oublier de remercier aussi l'ensemble de l'équipe mitolab pour tous les moments passés ensemble. Salim, Arnaud, Olivier, Morgane, Yannick, Cinzia, Valérie, David, Naig, Magalie, Florian, Jade, Jérémy, Charlotte, Cléis, Nolwenn, Anais, vous m'avez accueilli, accompagné et formé durant mes passages à Mitolab.

Je remercie aussi très particulièrement Rym et Asmaa, mes 2 tunisiennes préférées. A chacune de mes venues à Angers, il me tardait de vous retrouver. Grace à vous, nos sorties, nos rires et nos partages sais mes séjours à Angers ne me paraissait pas si long.

Mes immenses remerciements vont à Dr. Hassan ROUBA et Dr. Halima NAHILI pour l'accueil au sein du laboratoire de Génomique et de Génétique Humaine (LGGH). Hicham pour tout ton aide et assistance spécialement en bio-informatique.

Ayman, cher ami avec qui j'ai partagé temps de souvenir, on a fait une bonne équipe que ça soit au LGGH ou à Angers, je te remercie pour ton partage, ta gentillesse et tout ton aide et support.

Soukaina, Chaimaa, Mahdi, Charlène, Nouara, Imane, Touré, my partners in crime, tout cette thèse n'aurait pas été aussi facile sans votre présence, les moments passé ensemble, les angoisses, les joies, et triomphes et échecs. Tous nos aventures sont gravées à jamais dans ma mémoire.

Boutaina, Imane, Lamiaa, Zouhair, Zineb, Sara et Yassine les anciens, je vous remercie pour votre accueil depuis mon master, c'est grâce à votre bonne humeur et motivation que je me suis motivé d'avantage pour faire ma thèse dans notre labo.

Loubna, Najat, Chorouk, Khaoula, Hind, Houda, Salah vous étiez magnifiques, merci. Assia, Kenza E, Fatima-Zahra, Kenza S, nouvelles recrues, bon courage et une excellente thèse, I believe in you.

Enfin à ma famille, je vous aime de tout mon cœur, ce travail est pour vous.

Kenza, Hiba, haboubati, je vous aime et je sais que sans vous, ma vie serait très ennuyeuse.

Maman oumii, Papa, les mots de manquent pour exprimer toute ma gratitude. Merci de tout cœur de m'avoir soutenue toutes ces années, votre soutien inconditionnel, votre amour et votre encouragement tout au long de ce voyage.

## **Avant-propos**

Ce travail de thèse a été réalisé dans le cadre d'une cotutelle établie entre l'Université Chouaib Doukkali, faculté des sciences El Jadida, Maroc, sous la direction du Pr. Mostafa KANDIL de l'équipe des Sciences Anthropogéniques et Biotechnologiques (SAB) et l'Université d'Angers, France, sous la direction du Dr. Guy LENAERS de l'unité Physiopathologie Mitochondriale et CardioVasculaire (MitoVasc), équipe MitoLab (Inserm U1083, CNRS 6015) soutenue par le programme bilatéral franco-marocain PHC TOUBKAL 2019 (Grant Number: 39005ZL).

Les travaux de thèses ont été réalisés dans les locaux et grâce à une étroite collaboration du laboratoire de Génomique et de Génétique Humaine (LGGH) à l'Institut Pasteur du Maroc (IPM) dirigé par Dr. Abdelhamid BARAKAT, et au sein de l'équipe MitoLab dirigé par Dr. Guy Lenaers.

Le laboratoire LGGH, spécialisé dans l'étude des déterminants génétiques responsables des maladies héréditaires, a été pour moi un laboratoire d'accueil depuis mon stage de fin d'étude de Master 2, au sein duquel j'ai débuté mes travaux de recherche sur les surdités héréditaires.

Dans le cadre du projet PHC TOUBKAL, couvrant mes 4 années de thèse, j'ai effectué mes travaux de recherche pendant 3 à 4 mois par an au sein de l'équipe MitoLab sous la direction du Dr. Guy Lenaers. Grâce à l'expertise de cette équipe dans les études de physiopathologie mitochondriale, j'ai pu initier l'étude du réseau mitochondrial de fibroblastes d'un patient sourd et de son parent.

# Sommaire

LISTE DES PUBLICATIONS

LISTE DES COMMUNICATIONS

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES TABLEAUX

**INTRODUCTION GENERALE ..... 1**

**SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE..... 5**

**I. OREILLE ET AUDITION ..... 6**

**1. Anatomie .....6**

1.1. Oreille externe .....6

1.2. Oreille moyenne .....6

1.3. Oreille interne.....7

**2. Son ..... 11**

**3. Transmission et perception sonore ..... 11**

**II. SURDITE ..... 13**

**1. Epidémiologie ..... 13**

**2. Facteurs de risques et protecteurs ..... 14**

2.1. Causes et facteurs de risque ..... 15

2.2. Facteurs protecteurs..... 16

**3. Classification..... 16**

**III. SURDITES GENETIQUES..... 18**

**1. Les surdités non-syndromiques ..... 19**

1.1. Gène *MPZL2* ..... 20

**2. Surdités syndromiques ..... 21**

2.1. Syndrome d'Alport et gène *COL4A3* ..... 22

2.2. Syndrome 3MC et gène *MASPI* ..... 24

**IV. SURDITES MITOCHONDRIALES..... 27**

**1. Implication des mutations de l'ADNn ..... 27**

**2. Implication des mutations de l'ADNmt ..... 29**

**3. Implication de la dynamique mitochondriale..... 31**

3.1. Dynamique mitochondriale ..... 31

3.2. Pathologies mitochondriales liées à une atteinte de la dynamique mitochondriale ..... 32

3.3. Implication de la protéine *ELMOD2* ..... 33

**V. SURDITE DANS LA POPULATION MAROCAINE..... 38**

**1. Surdités non syndromiques ..... 38**

**2. Surdités syndromiques ..... 40**

**OBJECTIF DE THESE ..... 43**

<b>PATIENTS ET METHODES .....</b>	<b>44</b>
<b>I. PATIENTS .....</b>	<b>45</b>
<b>II. METHODES.....</b>	<b>46</b>
<b>1. Stratégie expérimentale .....</b>	<b>46</b>
<b>2. Extraction d'ADN .....</b>	<b>47</b>
2.1. Extraction au phénol-chloroforme .....	47
2.2. Extraction par kit Qiagen .....	48
2.3. Mesure de la concentration et contrôle qualitatif de l'ADN .....	49
<b>3. Amplification génique par PCR.....</b>	<b>49</b>
3.1. Recherche de mutation dans le gène <i>GJB2</i> et <i>LRTOMT Ex8</i> .....	51
<b>4. Séquençage de Sanger.....</b>	<b>51</b>
<b>5. Analyse des marqueurs STR du gène <i>MPZL2</i>.....</b>	<b>53</b>
5.1. Amplification des marqueurs .....	53
5.2. Purification des produits PCR .....	53
<b>6. Analyse d'exome par WES.....</b>	<b>54</b>
6.1. Illumina HiSeq 2000 .....	55
6.2. BGI Tech Solutions™ sur un séquenceur BGISEQ-500.....	55
6.3. Analyse bio-informatique.....	57
6.4. Analyse de co-ségrégation .....	58
<b>7. Modélisation moléculaire .....</b>	<b>59</b>
7.1. Structure tridimensionnelle des protéines .....	59
7.2. Analyse des changements de structures locales .....	59
<b>8. Etude du réseau mitochondrial des fibroblastes .....</b>	<b>60</b>
8.1. Matériel biologique .....	60
8.2. Culture des fibroblastes .....	60
8.3. Mitotracker .....	60
8.4. Microscopie et traitement d'image.....	61
<b>RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>62</b>
<b>CHAPITRE 1 : ANALYSE <i>GJB2</i> ET DU VARIANT RECURRENT DE <i>LRTOMT</i>.....</b>	<b>63</b>
<b>1. Introduction.....</b>	<b>63</b>
<b>2. Résultats.....</b>	<b>64</b>
2.1. Analyse du gène <i>GJB2</i> .....	64
2.2. Analyse du gène <i>LRTOMT</i> .....	66
<b>3. Discussion.....</b>	<b>66</b>
<b>4. Conclusion.....</b>	<b>70</b>
<b>CHAPITRE 2 : UNE DELETION HOMOZYGOTE SUR LE GENE <i>MPZL2</i> ASSOCIEE A UNE SURDITE NON SYNDROMIQUE.....</b>	<b>71</b>
<b>1. Introduction.....</b>	<b>71</b>
<b>2. Patients.....</b>	<b>72</b>
<b>3. Résultat .....</b>	<b>72</b>
<b>4. Discussion.....</b>	<b>74</b>
<b>5. Conclusion.....</b>	<b>75</b>
<b>CHAPITRE 3 : SURDITES SYNDROMIQUES CHEZ DEUX FAMILLES ASSOCIEES A DES VARIANTS HOMOZYGOTES DANS LES GENES <i>COL4A3</i> ET <i>MASPL</i>.....</b>	<b>76</b>
<b>1. Introduction.....</b>	<b>76</b>

<b>2. Patients</b> .....	<b>77</b>
2.1. Famille SF 237 .....	77
2.2. Famille SF 266 .....	78
<b>3. Résultats</b> .....	<b>79</b>
3.1. Analyse génétique .....	79
3.2. Modélisation moléculaire et analyse de stabilité.....	81
<b>4. Discussion</b> .....	<b>82</b>
<b>5. Conclusion</b> .....	<b>85</b>
<b>CHAPITRE 4 : <i>ELMOD2</i> UN NOUVEAU GENE DE SURDITE ?</b> .....	<b>86</b>
<b>1. Introduction</b> .....	<b>86</b>
<b>2. Patients</b> .....	<b>87</b>
<b>3. Résultats</b> .....	<b>87</b>
3.1. Analyse WES .....	87
3.2. Analyse du réseau mitochondrial .....	88
<b>4. Discussion</b> .....	<b>92</b>
<b>5. Conclusion</b> .....	<b>93</b>
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>95</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>99</b>
<b>ANNEXES</b> .....	<b>116</b>

## Liste des Publications

### *Articles*

• **Ghita Amalou**, Imane Aitraise, Aymane Bouzidi, Soukaina Essadssi, Majida Charif, Mostafa Kandil, Sophie Boucher, Guy Lenaers, Abdelhamid Barakat.

**Syndromic Hearing Loss in Moroccan families is associated to homozygous missense variants in *COL4A3* and *MASPI*.** Human Gene 2022 Sep;33:201053. doi: 10.1016/j.humgen.2022.201053.

• **Ghita Amalou**, Crystel Bonnet, Zied Riahi, Aymane Bouzidi, Soukaina Elrharchi, Amale Bousfiha, Majida Charif, Mostafa Kandil, Guy Lenaers, Christine Petit, Abdelhamid Barakat.

**A homozygous *MPZL2* deletion is associated with non syndromic hearing loss in a moroccan family.** Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2021 Jan;140:110481. doi: 10.1016/j.ijporl.2020.110481.

### *Autres Articles*

• Falah Nouara\*, **Ghita Amalou**\*, Aymane Bouzidi, Majida Charif, Hicham Charoute, Guy Lenaers, Samira El Arabi, Bouchra Bousfiha, Abdelhamid Barakat. \* Contribution égale  
**First characterization of *LTBP3* variants in two Moroccan families with hypoplastic amelogenesis imperfecta.** Arch Oral Biol. 2022 Aug 6;142:105518. doi: 10.1016/j.archoralbio.2022.105518.

• Imane AitRaise, **Ghita Amalou**, Amale Bousfiha, Hicham Charoute, Hassan Rouba, Houria Abdelghaffar, Crystel Bonnet, Christine Petit, Abdelhamid Barakat.  
**Genetic heterogeneity in *GJB2*, *COL4A3*, *ATP6V1B1* and *EDNRB* variants detected among hearing impaired families in Morocco.** Mol Biol Rep. 2022 May;49(5):3949-3954. doi: 10.1007/s11033-022-07245-z

• Aymane Bouzidi, Hicham Charoute, Majida Charif, **Ghita Amalou**, Mostafa Kandil, Abdelhamid Barakat, Guy Lenaers.

**Clinical and genetic spectrums of 413 North African families with inherited retinal dystrophies and optic neuropathies.** Orphanet J Rare Dis. 2022 May 12;17(1):197. doi: 10.1186/s13023-022-02340-7.

• Al Mehdi Krami, Aymane Bouzidi, Majida Charif, **Ghita Amalou**, Hicham Charoute, Hassan Rouba, Rachida Roky, Guy Lenaers, Abdelhamid Barakat, Halima Nahili.

**A homozygous nonsense *HECW2* variant is associated with neurodevelopmental delay and intellectual disability.** Eur J Med Genet. 2022 Apr 27;65(6):104515. doi: 10.1016/j.ejmg.2022.104515.

• Aymane Bouzidi, Majida Charif, Adil Bouzidi, **Ghita Amalou**, Mostafa Kandil, Abdelhamid Barakat, Guy Lenaers.

**Clinical and genetic investigations of three Moroccan families with retinitis pigmentosa phenotypes.** Mol Vis. 2021 Jan 15;27:17-25.

• Aymane Bouzidi, Nisrine Aboussair, Majida Charif, **Ghita Amalou**, David Goudenège, Valérie Desquirit-Dumas, Céline Bris, Najat Sifeddine, Halima Nahili, Meriem Elqabli, Kenza Dafir, Mostafa Kandil, Patrizia Amati-Bonneau, Vincent Procaccio, Abdelhamid Barakat, Guy Lenaers.

**First characterization of LHON pedigrees in North Africa.** Eye (Lond). 2020 Nov;34(11):2138-2139. doi: 10.1038/s41433-019-0755-x.

• Soukaina Essadssi, Al Mehdi Krami, Lamiae Elkhatabi, Zouhair Elkarhat, **Ghita Amalou**, Houria Abdelghaffar, Hassan Rouba, Abdelhamid Barakat.

**Computational Analysis of nsSNPs of *ADA* Gene in Severe Combined Immunodeficiency Using Molecular Modeling and Dynamics Simulation.** J Immunol Res. 2019 Nov 3;2019:5902391. doi: 10.1155/2019/5902391.

# Liste des Communications

## *Orales*

• **Ghita Amalou**, Crystel Bonnet, Zied Riahi, Aymane Bouzidi, Soukaina Elrharchi, Amale Bousfiha, Majida Charif, Mostafa Kandil, Guy Lenaers, Christine Petit, Abdelhamid Barakat. **A homozygous *MPZL2* deletion is associated with non-syndromic hearing loss in a Moroccan family.** First International Congress of the Moroccan Society of Genomic and Human Genetics and the third edition of the school of immunogenetics, 19-21 Décembre 2019, Agadir, Maroc.

• **Ghita Amalou**, Majida Charif, Abdelhamid Barakat, Guy Lenaers. **WES analysis for the study of hereditary hearing loss in the Moroccan population.** Scientific days 2020, École doctorale Biologie et santé, 10 Décembre 2020, Université d'Angers, Angers, France.

• Aymane Bouzidi, Majida Charif, Adil Bouzidi, Hicham Charoute, **Ghita Amalou**, Mostafa Kandil, Abdelhamid Barakat, Guy Lenaers. **Inherited Retinal Dystrophies and Hereditary Optic Neuropathies. State of art in North Africa and molecular study of 5 Moroccan families.** The week of science 2022, 30 et 31 Mai 2022, UPM6, Benguerir, Maroc.

## *Affichées*

• **Ghita Amalou**, Imane Aitraise, Amale Bousfiha, Majida Charif, Mostapha Kandil, Guy Lenaers, Abdelhamid Barakat **Identified variants associated with syndromic deafness in Moroccan patients.** The week of science 2022, 30 Mai au 3 Juin 2022, UPM6, Benguerir, Maroc.

• **Ghita Amalou**, Imane Aitraise, Amale Bousfiha, Crystel Bonnet, Mostapha Kandil, Christine Petit, Guy Lenaers, Abdelhamid Barakat  
**Genetics of Syndromic and Non-Syndromic Hereditary Deafness: 3 case studies in the Moroccan population** Second international congress on biological and health sciences, du 24 au 27 Février 2022, Turquie.

## Liste des Abréviations

3MC	: Malpeuch-Michels-Mingarelli-Carnevale
ADN	: Acide DésoxyriboNucléique
ADNmt	: ADN mitochondriale
ADNn	: ADN nucléaire
AOD	: Atrophie Optique Dominante
ARF	: ADP-Ribosylation Factor
ARL2	: ARF-like 2
ARN	: Acide Ribonucléique
ATP	: Adenosine Triphosphate
BET	: Bromure d'Ethidium
CAGSSS	: Cataracts, Growth hormone deficiency, Sensory neuropathy, Sensorineural hearing loss, and Skeletal dysplasia
CCP	: Complement Control Protein
CMT	: Charcot-Marie-Tooth
CO4LA3	: Collagène de type IV, alpha 3
CO4LA4	: Collagène de type IV, alpha 4
CO4LA5	: Collagène de type IV, alpha 5
COLEC10	: Collectin, Liver, 1
COLEC11	: Collectin, Kidney, 1
COMT2	: Catechol-O-MethylTransferase 2
CUB	: C1r/C1s, urchin-EGF, and Bone morphogenetic protein
Cx 26	: Connexine 26
dB	: déciBels
DFNA	: Deafness Autosomal Dominant
DFNB	: Deafness Autosomal Récessif
DFNX	: Deafness X-linked
DNB	: DNA Nanoball
dNTP	: déoxyNucléotide TriPhosphates
EDTA	: Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EGF	: Epidermal Growth Factor
ELMOD	: Cell <u>E</u> ngulfment and <u>M</u> otility <u>D</u> omain containing

EVA	: Epithélial de type V
GAP	: GTPase-Activating Protein.
GJB2	: Gap Junction Protein Beta 2
Hz	: Hertz
IPSc	: Induced Pluripotent Stem cells
LRTOMT	: Leucine Rich Transmembrane And O-Methyltransferase Domain Containing
MASP1	: Mannan-Binding Lectin Serine Protease 1
MBG	: Membrane Basale Glomérulaire
MEF	: Fibroblastes embryonnaires de souris
MEGDEL	: 3-Methylglutaconic aciduria Deafness Encephalopathy and Leigh-like disease
MELAS	: Mitochondrial Encephalomyopathy Lactic Acidosis and Stroke-Like Episodes
MERRF	: Myoclonic Epilepsy with Ragged-Red Fibers
MFF	: Mitochondrial Fission Factor
MFN1/2	: Mitofusine 1/2
MIDD	: Maternally Inherited Diabetes and Deafness
MPZL2	: Myelin Protein Zero-Like protein 2
MTS	: Mitochondrial Targeting Sequence
NGS	: New Generation Sequencing
NSHL	: Non-Syndromic Hearing Loss
OPA1	: Optic Atrophy 1
OXPHOS	: Phosphorylations Oxydative
pb	: Paire de bases
PCR	: Polymerase Chain Reaction
RCA	: Rolling Circle Amplification
SDS	: Sodium Dodecyl Sulfate
STR	: Short Tandem Repeats
TAE	: Tris Acétate EDTA
TE	: Tris-EDTA
WES	: Whole Exome Sequencing

## Liste des Illustrations

Figure 1 : Oreille externe et moyenne .....	7
Figure 2 : Anatomie de l'oreille interne et la cochlée.....	8
Figure 3 : Structure d'une cellule ciliée .....	10
Figure 4 : Transduction électromécanique dans les cellules ciliées.....	12
Figure 5 : Facteurs de risques et protecteurs .....	15
Figure 6 : Distribution des facteurs environnementaux et génétiques des surdités neurosensorielles .....	18
Figure 7 : Structure du gène et domaines de la protéine MPZL2 .....	20
Figure 8 : Structure du collagène et hétéro-trimères .....	23
Figure 9 : <i>MASPI</i> gène et transcrits .....	26
Figure 10 : Représentation des domaines constituant les protéines ELMOs et ELMODs .....	34
Figure 11 : Localisation d'ELMOD2 sur le cil connecteur du photorécepteur .....	36
Figure 12 : Représentation de la stratégie de travail .....	46
Figure 13 : Procédure d'extraction par QIamp sur colonnes .....	49
Figure 14 : Lavage par billes magnétiques sur plaque de 96 puits .....	54
Figure 15 : Etapes de la formation des DNB développé par BGI™ .....	56
Figure 16 : Chargement de la puce, et processus de séquençage par la technique cPAS .....	57
Figure 17 : Répartition géographique des variants <i>GJB2</i> entre nord, centre et sud du Maroc	65
Figure 18 : Pedigree et audiogrammes de la famille SF 165 .....	72
Figure 19 : Ségrégation et analyse STR de la famille SF 165.....	74
Figure 20 : Pedigree et audiogrammes de la famille SF 237 .....	78
Figure 21 : Arbre généalogique de la famille SF 266 .....	79
Figure 22 : Co-ségrégation du variant <i>COL4A3</i> c.4153G>C chez la famille SF 237 .....	80
Figure 23 Co- ségrégation du variant <i>MASPI</i> c.1426G>A au sein de la famille SF 266 .....	80
Figure 24 : Analyse structurale des interactions de l'acide aminé 1385 de la protéine COL4A3 sauvage et mutée par modélisation moléculaire.....	81
Figure 25 : Analyse structurale des interactions de l'acide aminé 476 de la protéine MASPI sauvage et mutée par modélisation moléculaire.....	82
Figure 26 : Arbre généalogique de la famille SF 242 .....	87
Figure 27 : Résultats de la ségrégation de c.316A>G au sein de la famille SF 242 .....	88
Figure 28 : Structure des mitochondries dans les fibroblastes de peau.....	89

Figure 29 : Graphe à barre (A) et histogrammes (B) des moyennes des longueurs des mitochondries des fibroblastes du contrôle à gauche, de la mère au milieu et du patient à droite..... 91

## Liste des Tableaux

Tableau 1 : Nombre de personnes et pourcentage de prévalence selon les degrés de perte auditive au Maroc.....	13
Tableau 2 : Degré de surdité .....	17
Tableau 3 : Gènes responsables du syndrome d'Alport.....	23
Tableau 4 : Gènes responsables du syndrome 3MC .....	25
Tableau 5 : Gènes nucléaires liés aux surdités mitochondriales .....	28
Tableau 6 : Gènes de l'ADNmt liés aux surdités mitochondriales.....	29
Tableau 6 suite : Gènes de l'ADNmt liés aux surdités mitochondriales .....	30
Tableau 7 : Gènes et variants de surdité non syndromique chez la population marocaine.....	39
Tableau 8 : Gènes et variants de surdité syndromique dans la population marocaine.....	41
Tableau 8 suite : Gènes et variants de surdité syndromique dans la population marocaine ....	42
Tableau 9 : Mélange réactionnel PCR.....	50
Tableau 10 : Séquences d'amorces <i>GJB2</i> et <i>LRTOMT</i> .....	51
Tableau 11 : Mélange Réactionnel pour séquençage Sanger .....	52
Tableau 12 : Séquence d'amorces des marqueurs STR.....	53
Tableau 13: Bases de données et outils bio-informatiques de prédiction de pathogénicité utilisés.....	58
Tableau 14 : Séquences d'amorces de ségrégation.....	59
Tableau 15 : Génotypes et fréquences <i>GJB2</i> identifiés chez les patients sourds d'une cohorte comportant 220 familles.....	64
Tableau 16 : Résumé de la fréquence allélique globale de 4 variants de la connexine 26 .....	67
Tableau 17 : Variants identifiés dans <i>LRTOMT</i> .....	69
Tableau 17 suite : Variants identifiés dans <i>LRTOMT</i> .....	70
Tableau 18 : Variants candidats homozygotes potentiellement pathogènes révélés par le WES dans l'ADN du patient. ....	73
Tableau 19 : Variants pathogènes de <i>MASPI</i> publiés, liés à la surdité et au syndrome 3MC. 84	
Tableau 20 : Pourcentages moyens des longueurs des mitochondries des fibroblastes de peau .....	90
Tableau 21 : p-value du test Wilcoxon Mann Whitney réalisé sur les pourcentages des longueurs mitochondriales entre témoin, mère et patient .....	91

# INTRODUCTION GENERALE

Il est bien reconnu que l'ouïe est l'un des sens les plus importants dans la vie de tout être humain. Aujourd'hui plus que jamais, nous vivons dans un environnement où le son est une composante dominante de notre quotidien, notamment par l'utilisation de technologies récentes associant vision et audition. Privé de l'audition, l'humain vit dans une situation d'handicap majeur. L'interaction et l'intégration dans son environnement deviennent des tâches lourdes, complexes et parfois impossibles. Lorsque la surdité survient avant l'acquisition du langage, une situation qualifiée de surdité pré-linguale, l'enfant se retrouve isolé manquant de toutes références sonores.

Cette pathologie touche, selon les dernières estimations, 1 à 2 nouveau-nés sur 1000, et la malentendance affecte près de 1.5 milliard de personnes à travers le monde. Les surdités se distinguent par différents critères, tel que l'âge d'apparition, la localisation de l'atteinte au niveau de l'oreille, le degré de la perte auditive et la cause de cette perte, dont les origines sont multiples et varient entre des causes environnementales et des causes génétiques.

Les surdités d'origine génétique comptent pour environ 50 à 60 % des surdités, et se classent en non syndromiques (isolées) ou syndromiques (associées à un ou plusieurs autres symptômes). Les gènes associés aux surdités sont actuellement estimés à plus de 220 selon différentes bases de données englobant tous les modes de transmission mendélienne par l'altération de gènes nucléaires, ou spécifiquement maternel à cause des variants de gènes mitochondriaux.

Les surdités non mitochondriales sont causées par des variants dans les gènes nucléaires de transmission récessive, dominante, liée à l'X ou à l'Y, représentant 99% des surdités héréditaires. On retrouve les surdités isolées ou associées à différents symptômes tels les syndromes d'Usher, de Waardenburg, de Pendred et d'Alport pour les plus répandus et le syndrome 3MC parmi les plus rares.

Les surdités mitochondriales englobent différentes surdités, syndromique ou non syndromique, dues à un variant dans un gène mitochondrial ou un gène nucléaire codant une protéine à fonction mitochondriale. Ces variants entraînent une dysfonction mitochondriale affectant les mécanismes auditifs ou la survie des cellules qui composent la cochlée.

Tous ces paramètres contribuent à une large hétérogénéité clinique et génétique des surdités héréditaires.

De nombreuses études réalisées sur la population marocaine ont permis de bâtir une carte génétique des patients marocains atteints de surdité congénitale. Au sein du laboratoire de Génomique et Génétique Humaine de l'Institut Pasteur du Maroc, et grâce aux collaborations avec l'équipe Mitolab de l'Unité Mitovasc à l'Université d'Angers et l'équipe de Physiologie de

l'audition de l'Institut Pasteur de Paris, nous avons pu identifier au sein de familles marocaines une multitude de variants dans des gènes, tels que *GJB2*, *LRTOMT*, *TMC1*, *TBC1D24*, *TPRN*, *ESPN*, *EDNRB*, *MTRNR1*, *MYO7A*, *MYO15A*, *PJVK*, *MET*, *BSND*, *GPR98*, *ATP6V1B1*. D'autres gènes ont été reportés par d'autres équipes, permettant d'élargir le profil génétique de la population marocaine atteinte de surdités, dont *CLDN9*, *FAM20C*, *KCNQ1*, *LARS2*, *PNPT1*, *PTPRQ*, *SDR42E1*, *SLC22A4*.

Le *Next Génération Sequencing* (NGS) est la technologie sur laquelle repose nos études génomiques. Par séquençage ciblé de gènes ou par séquençage de l'exome (*Whole Exome Sequencing*, WES), nous avons pu établir la cause génétique de la surdité de certains de nos patients, et l'incrimination de nouveaux gènes par WES.

Dans l'optique d'élargir notre connaissance du spectre de la diversité génétique de la surdité héréditaire congénitale et infantile au sein de la population marocaine, l'identification et la liaison de variants et gènes potentiellement nouveaux à la surdité, nous avons développé par analyse NGS, des investigations génomiques et moléculaires sur la cohorte de patients sourds recrutée depuis de nombreuses années. Les résultats obtenus ont permis d'identifier de nouvelles composantes génétiques de la surdité au sein de la population marocaine.

Ce manuscrit s'ouvre sur une synthèse bibliographique introduisant le sujet de cette thèse avec des rappels de l'anatomie et physiologie de l'oreille, une vue d'ensemble de la surdité, son épidémiologie et ses classifications, puis un aperçu sur les surdités génétiques, les surdités mitochondriales et un état de l'art des surdités héréditaires au sein de la population marocaine. Ensuite dans une seconde partie, notre stratégie expérimentale concernant le recrutement des patients et les techniques et méthodes réalisées pour répondre à nos objectifs seront exposées. La partie résultats et discussion est répartie en 4 chapitres correspondant aux quatre volets menés aux cours de ce travail de thèse.

Chapitre I : les investigations moléculaires primaires des familles marocaines recrutées souffrant d'une déficience auditive ont permis l'identifier le profil génétique de patients portants un variant des gènes *GJB2* et *LRTOMT*, et ainsi de réaliser une actualisation du spectre de mutations de ces gènes dans les surdités non syndromiques au sein de la population marocaine

Chapitre II : nous présentons le cas de patients de mêmes fratries atteints de surdité non syndromique, étudié par WES, dont l'analyse d'haplotype a relevé un variant sur le gène *MPZL2*.

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans l'International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology.

Chapitre III : nous présentons des cas de surdité syndromique, avec deux frères atteints d'une surdité associée à une atteinte rénale ou syndrome d'Alport, lié au gène *COL4A3*, et un patient d'une seconde famille présentant le syndrome 3MC, identifié pour la première fois au Maroc et associé à un variant *MASPI*. Ces résultats ont abouti à une publication dans le journal Human Gene.

Chapitre IV : nous traitons de patients sourds d'une même fratrie, présentant des troubles du spectre autistique. L'analyse d'exome a révélé un variant homozygote de transmission autosomique récessive sur le gène *ELMOD2*. C'est le premier cas associé à un variant d'*ELMOD2* associé à une surdité. L'implication d'*ELMOD2* dans la fusion mitochondriale, nous a amené à étudier l'effet du variant *ELMOD2* sur l'intégrité du réseau mitochondrial chez l'un des patients et chez sa mère.

L'ensemble de ce travail fait enfin l'objet d'une conclusion générale s'ouvrant sur des perspectives à mettre en œuvre pour la poursuite de ces études.

# SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

# I. Oreille et audition

L'oreille, organe sensoriel complexe, est responsable de deux sens indispensables, l'audition et l'équilibre. Se focalisant sur l'audition, l'oreille par ses trois parties et ses différents compartiments, cellules et fluides, permet la transmission du son, son amplification, son traitement selon sa fréquence et son intensité, et sa perception.

## 1. Anatomie

### 1.1. Oreille externe

L'oreille externe se compose d'un rebord partiellement cartilagineux appelée le pavillon, d'une cavité résonante appelée la conque, et du canal de l'oreille ou le conduit auditif externe menant au tympan ou à la membrane tympanique (Figure 1). L'oreille externe a deux rôles dans la transmission du son : elle facilite la localisation sonore en modifiant le spectre du son en fonction de la direction de la source du son, et elle augmente par résonances, la pression sonore à la membrane tympanique (Pickles 2013).

### 1.2. Oreille moyenne

L'oreille moyenne couple l'énergie sonore du conduit auditif externe à la cochlée, et par son action transformatrice aide à transformer l'impédance du conduit auditif en une impédance beaucoup plus élevée des fluides cochléaires. De fait, en l'absence d'un mécanisme transformateur, une grande partie du son serait réfléchi. Le son est transmis de la membrane tympanique à la cochlée par trois petits os, connus comme les osselets. On les appelle le marteau, l'enclume et l'étrier (Figure 1). Les deux premiers sont reliés de façon relativement rigide de sorte que lorsque la pointe du marteau est poussée par la membrane tympanique, les os pivotent ensemble et transfèrent la force à l'étrier. Ce dernier est fixé à une fenêtre flexible dans le mur de la cochlée, appelée fenêtre ovale. (Pickles 2013). L'oreille moyenne communique aussi avec le pharynx par la trompe d'Eustache et avec l'oreille interne par deux orifices membraneux : la fenêtre ronde à la base de la rampe tympanique et la fenêtre ovale limitant la base de la rampe vestibulaire (Møller 2006).

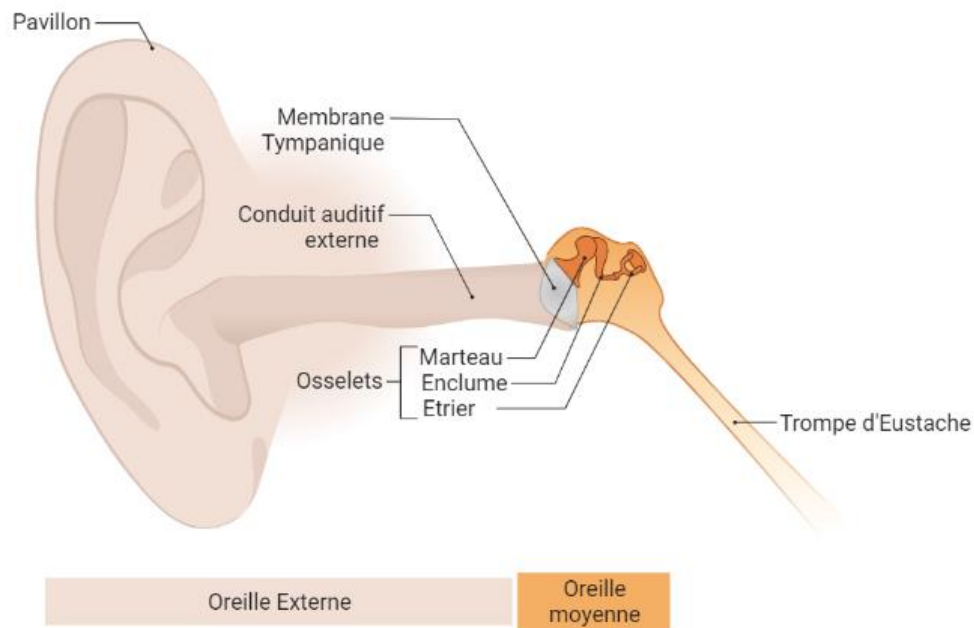


Figure 1 : Oreille externe et moyenne

### 1.3. Oreille interne

L'oreille interne, ou labyrinthe, est située au sein de la pyramide pétreuse de l'os temporal du crâne. Elle comporte un ensemble de cavités osseuses, ou labyrinthe osseux, contenant des structures tubulaires formant le labyrinthe membraneux. Au sein de ce dernier se trouvent l'organe sensoriel cochléaire destiné à l'audition et les capteurs sensitifs vestibulaires spécialisés dans la détection des accélérations angulaires et linéaires de la tête (Sauvage et al. 1999) (Figure 2A).

#### 1.3.1. Cochlée

La cochlée tire son nom du grec *cochlos*, désignant le mot escargot. Ancrée profondément dans la partie temporale du crâne, la cochlée mesure environ 1 cm de largeur et 5 mm de la base à l'apex et contient une membrane basilaire enroulée d'environ 35 mm de long. Elle réalise la détection sonore et son analyse. La cochlée est divisée en trois rampes spiralées: la rampe vestibulaire placée vers l'apex et la rampe tympanique placée vers la base et le canal cochléaire au milieu, séparé de la rampe vestibulaire par la membrane de Reissner et de la rampe tympanique par la membrane basilaire.

Les deux rampes extérieures sont reliées au sommet de la cochlée (Figure 2B). Les rampes vestibulaire et tympanique contiennent de la périlymphe, un fluide similaire au fluide extracellulaire dans sa composition ionique, avec une concentration forte en  $\text{Na}^+$  et faible en  $\text{K}^+$ .

Le canal cochléaire forme un compartiment intérieur ne communiquant pas directement avec les deux autres et contenant l'endolymphe dont la composition est similaire au liquide intracellulaire par sa concentration élevée en  $Ka^+$  et faible en  $Na^+$ . (Sauvage et al. 1999; Pickles 2013).

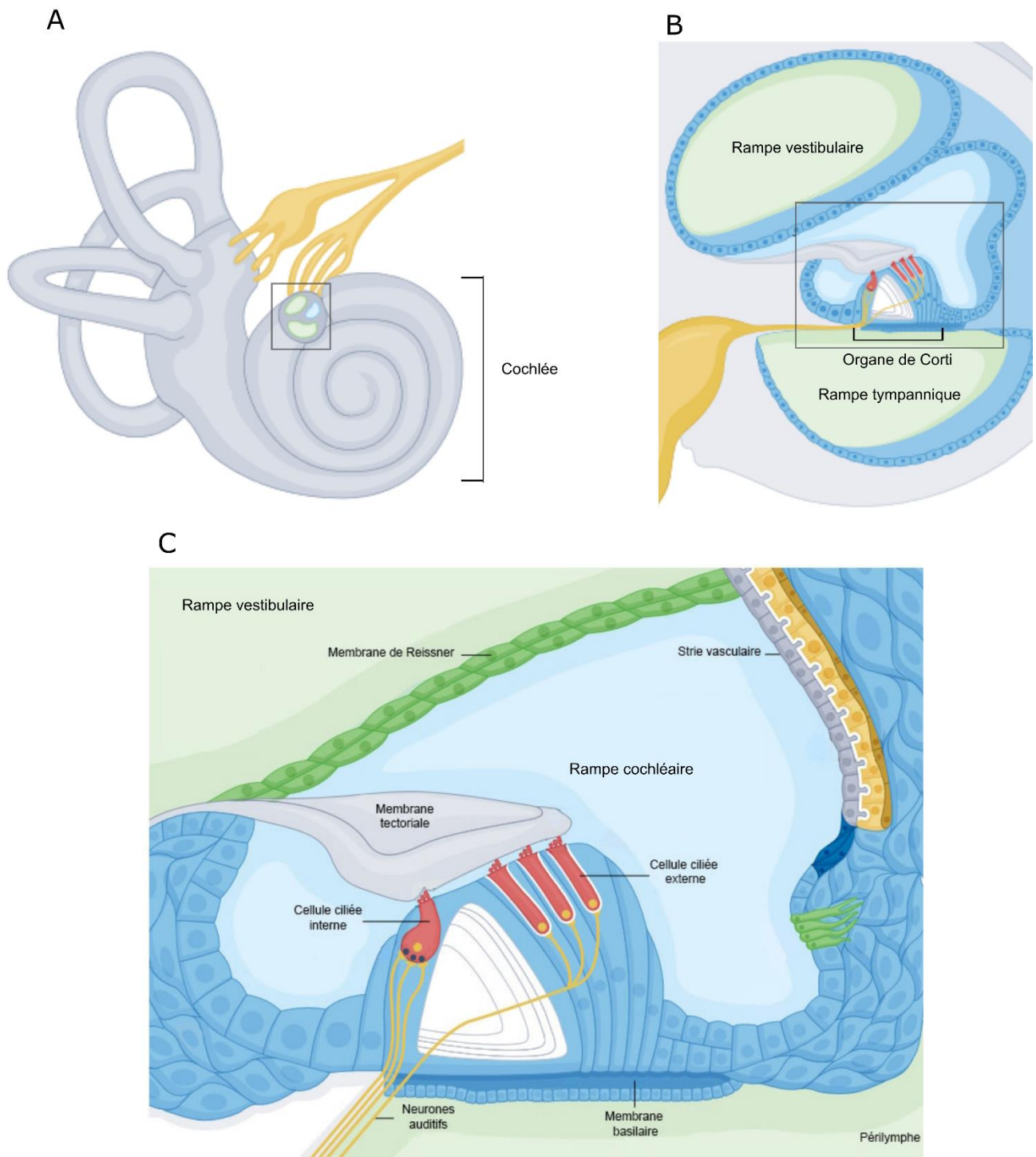


Figure 2 : Anatomie de l'oreille interne et la cochlée

Traduit et modifié de (Petit et al. 2023)

### 1.3.2. Organe de Corti

La cochlée a ses cellules sensorielles ou réceptrices dans l'organe de Corti, décrit pour la première fois par Corti en 1851. Depuis, les expériences de neurophysiologie et de biochimie identifiant la composition des fluides de l'oreille interne ont illustré à quel point l'interface entre cellules sensorielles et fluides intra-cochléaires sont capitaux pour la fonction auditive (Ades and Engström 1974).

L'organe de Corti est le système de transduction sensorielle de l'oreille, car il convertit les ondes sonores dans l'endolymphe du conduit cochléaire en impulsions électriques. Ces impulsions sont relayées par des fibres nerveuses à travers le nerf auditif, les noyaux du tronc cérébral jusqu'aux aires auditives primaires puis secondaires.

L'organe de Corti est posé sur la membrane basilaire, une structure fibreuse divisant le canal cochléaire de la rampe tympanique. Sa rigidité est assurée par des cellules piliers le long de sa longueur, se terminant dans leur extrémité supérieure par la lamine réticulaire, qui assure la division chimique entre les ions dans les fluides du canal cochléaire et ceux de la rampe tympanique (Figure 2).

Les récepteurs auditifs sont les cellules ciliées de l'organe de Corti, qui transforment les stimuli mécaniques induits par le son, en impulsions électriques. Elles sont de deux types : internes et externes (Brownell et al. 1985; Stelma and Bhutta 2014). Ces cellules sensorielles sont supportées par des cellules de soutien, dont les cellules phalangiennes internes qui entourent complètement les cellules ciliées internes.

Les cellules phalangiennes externes ou cellules de Deiters reposent sur la membrane basilaire. Leur pôle supérieur déprimé en cupule reçoit et ancre solidement la base des cellules ciliées externes. Externe aux cellules ciliées externes se trouve une rangée de cellules de soutien, connues comme les cellules de Hensen (Sauvage et al. 1999; Pickles 2015).

Entre les cellules ciliées internes et externes se trouve le tunnel de Corti, bordé de cellules piliers internes et externes, permettant le maintien de la rigidité de l'organe de Corti pendant le mouvement de cisaillement (Pickles 2015).

### 1.3.3. Cellules ciliées

Les cellules ciliées internes fonctionnent comme les acteurs sensoriels, capturant des informations sur la fréquence, l'intensité et la temporalité du son, alors que les cellules ciliées externes fonctionnent comme amplificateurs cochléaires, modifiant la sensibilité et la sélectivité du son.

La cochlée humaine compte environ 12 000 cellules ciliées externes de forme cylindrique disposées en 3 à 5 rangées le long de la membrane basilaire, et environ 3 500 cellules ciliées

internes de forme communément comparée à celle d'une fiole, disposées en ligne simple (Figure 3). Sur chaque cellule ciliée externe, 50 à 150 stéréocils sont disposés en 3-4 lignes qui prennent une forme en W ou V, alors que les stéréocils des cellules ciliées internes sont disposés en formations aplaties en U (Møller 2006).

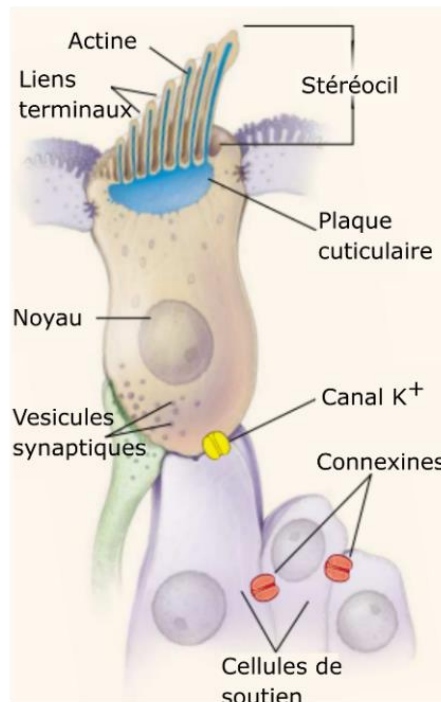


Figure 3 : Structure d'une cellule ciliée  
(Willems 2000)

La partie apicale d'une cellule ciliée est la région impliquée dans la transduction sensorielle. Dans les deux types de cellules ciliées, les plus hauts cils sont situés sur le côté le plus externe de la cellule, et les plus courts sur le côté interne. Les cils ont un squelette intra-cellulaire d'actine et de myosine non conventionnels, et sont reliés entre eux ; ils oscillent donc en faisceau. Les filaments d'actine donnent aux cils une raideur considérable, de sorte qu'ils se comportent comme des leviers rigides en réponse aux déformations mécaniques (Flock et al. 1977; Pickles 2013). Les cils situés sur la surface apicale de chaque cellule ciliée sont interconnectés par de fines fibres appelées liens terminaux, qui émergent des extrémités des stéréocils les plus courts du faisceau, pour remonter vers le haut et rejoindre les stéréocils adjacents, plus grands (Flock et al. 1982; Pickles 2013). La plaque cuticulaire, une région riche en actine dans le domaine apical des cellules ciliées, ancre les cils au cytosquelette de la cellule ciliée. Les extrémités des cils des cellules ciliées externes sont noyées dans une feuille visqueuse et élastique appelée membrane tectoriale recouvrant l'organe de Corti.

Les quelques 16 000 cellules ciliées de chaque cochlée sont innervées par environ 30 000 fibres nerveuses afférentes, qui portent l'information au cerveau le long du huitième nerf crânien (Kandel et al. 2000). Les cellules ciliées internes sont associées à 95 % des fibres afférentes du nerf auditif, qui transmet l'information auditive de la cochlée au tronc cérébral. Les propriétés électrocontractiles des cellules ciliées externes permettent l'amplification des signaux sonores. Les électromobilités sont régulées par le système efférent médium et les cellules ciliées externes sont connectées au système nerveux centrale par le système afférent spiral (Ades and Engström 1974; Kandel et al. 2000).

## 2. Son

Les ondes sonores sont définies comme étant la partie audible du spectre des vibrations acoustiques. D'une manière générale, un son est défini par l'amplitude de l'onde sonore et sa fréquence ou nombre d'ondes par unité de temps. Elles se caractérisent par trois paramètres : leur fréquence, leur intensité et leur durée.

- La fréquence, exprimée en Hertz (Hz), correspond au nombre de vibrations par seconde. Ainsi, un son grave est caractérisé par une fréquence basse, alors qu'un son aigu a une fréquence élevée. L'homme est capable de percevoir des sons allant de 20 Hz pour les plus graves, à 20.000 Hz pour les plus aigus. Les ondes sonores de fréquence inférieure à 20 Hz sont qualifiées d'infrasons, et celles dont la fréquence dépasse les 20.000 Hz d'ultrasons.

- L'intensité exprimée en décibel (dB), qui tire son nom du pionnier des télécoms Alexander Graham Bell, correspond à l'amplitude de la vibration. Le niveau de référence sonore standard adopté par l'Acoustical Society of America correspond à 0 dB, une valeur qui se situe juste au seuil auditif de l'Homme moyen. Une valeur de 0 dB ne signifie donc pas l'absence de son mais le seuil minimum d'audibilité de l'être humain. La plage de 0 à 140 dB correspond à l'échelle comprise entre la pression seuil et la pression dommageable pour l'organe de Corti (Barrett et al. 2010).

## 3. Transmission et perception sonore

Les ondes sonores sont captées par le pavillon de l'oreille externe. Elles sont ensuite amplifiées et acheminées à l'oreille moyenne par le conduit auditif externe en faisant vibrer le tympan. Les mouvements de la membrane tympanique en réponse aux ondes sonores sont amplifiés par les osselets de l'oreille moyenne et génèrent des ondes de compression à travers l'étrier, qui exerce une pression sur la membrane de la fenêtre ovale de la rampe vestibulaire à la manière d'un piston qui comprime la périlymphe.

Les ondes hydrauliques se propagent tout le long de la rampe vestibulaire jusqu'à la fenêtre ronde de la rampe tympanique, vers l'oreille moyenne. Les parois de la rampe vestibulaire et de la

rampe tympanique subissent une déformation lors du passage des ondes hydrauliques, ce qui engendre le déplacement de la membrane vestibulaire. Ce déplacement entraîne une variation de pression dans l'endolymphe qui à son tour est responsable de la création d'un mouvement ondulatoire de la membrane basilaire de l'organe de corti.

L'onde déplace la membrane tectoriale et produit un mouvement de cisaillement qui plie les cils. Quand le faisceau de cils est dévié dans la direction des plus longs cils, les liens terminaux sont placés sous tension, en tirant sur les canaux mécano-transducteurs. Ceci provoque l'ouverture de canaux ioniques spécifiques, déclenchant un afflux d'ions  $K^+$  et  $Ca^{2+}$  qui dépolarise la cellule ciliée, ce qui entraîne l'exocytose, sous la dépendance du  $Ca^{2+}$ , de vésicules de neurotransmetteurs sur la surface basolatérale de la cellule, dans une zone appelée ruban synaptique. La libération de neurotransmetteurs excite les neurones auditifs adjacents qui envoient des signaux aux centres auditifs du cerveau, contribuant ainsi à la perception des sons (Willems 2000; Tekin et al. 2001; Stelma and Bhutta 2014; Pickles 2015) (Figure 4).

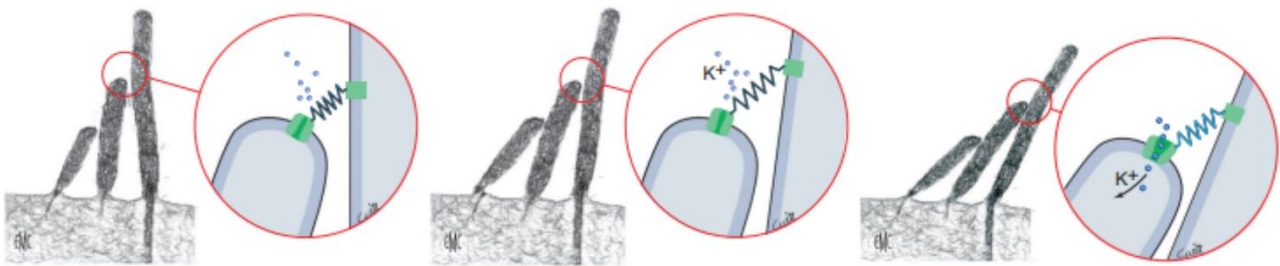


Figure 4 : Transduction électromécanique dans les cellules ciliées  
(Boucher and Avan 2023)

Pour maintenir une audition normale, les ions  $K^+$  qui entrent dans les cellules ciliées doivent être recyclés. Après l'influx et l'initiation du potentiel d'action, les ions  $K^+$  passent d'abord par un canal sur le côté basolatéral de la membrane de la cellule ciliée, pour atteindre les cellules de soutien. Là, les ions diffusent passivement de cellule à cellule par les jonctions gaps, qui sont composées en grande partie de protéines connexines multimériques présentes dans les cellules de soutien, les cellules du limbe spiral et du ligament spiral. Une fois que les ions  $K^+$  atteignent la strie vasculaire, ils sont activement repompés dans l'endolymphe par des canaux de  $K^+$  dépendant du voltage. Le maintien d'un pH de 7,4 de l'endolymphe de la cochlée est également nécessaire à une audition normale. La forte concentration d'ions  $K^+$  dans l'endolymphe tend à augmenter le pH. Les pompes  $H^+$ -ATPase présentes dans les cellules interdentaires et dans le sac endolymphatique du labyrinthe membraneux facilitent la régulation du pH (Tekin et al. 2001).

## II. Surdité

La surdité est le défaut neurosensoriel humain le plus fréquent. C'est le handicap majeur dans l'intégration social des individus du fait que l'ou ie joue un rôle primordial dans le développement intellectuel. La surdité touche l'adulte, l'enfant et le nouveau-né. Elle affecte le développement de la parole, l'acquisition du langage, et l'éducation chez les enfants et, en conséquence, mène souvent à la diminution des opportunités d'épanouissement professionnel menant à un isolement social (Egilmez and Kalcioglu 2016).

La surdité est une altération de l'acuité auditive (fondationpourlaudition.org). L'OMS définit la perte auditive chez une personne lorsque celle-ci n'est pas capable d'entendre aussi bien qu'un individu ayant une audition normale, avec une perte des seuils d'audition de 20 dB ou plus dans les deux oreilles. La perte auditive "invalidante" désigne une perte auditive supérieure à 35 dB dans l'oreille la mieux entendant. Le terme "malentendant" désigne les personnes souffrant d'une perte auditive allant de légère à grave. Les personnes "sourdes" ont pour la plupart une perte auditive profonde (voir page 32 pour la description des seuils).

### 1. Epidémiologie

Le 'Global Burden of Disease' a estimé qu'en 2019, 1.5 milliard (intervalle d'incertitude 95% 1.51–1.64) de personnes souffraient d'une forme de perte auditive, dont environ 450 millions avec une perte de 40 dB et plus (GBD 2019 Hearing Loss Collaborators 2021). En 2019, l'OMS a estimé qu'une population de 78 millions de personnes malentendantes vivaient dans la région Orientale-Méditerranéenne, soit 3.1% de la population, dont 22.1 millions avec une perte supérieure à 40dB. Selon les prédictions, en 2050 cette même région comptera 194 millions de sourds, et 2.45 milliards (2.35–2.56) mondialement. Selon la même étude du 'Global Burden of Disease', le Maroc devrait compter environ 4.200.000 individus atteints de surdité, tous degrés confondus (Tableau 1).

Tableau 1 : Nombre de personnes et pourcentage de prévalence selon les degrés de perte auditive au Maroc

	Surdité	Moyenne	Modérée	Moyennement sévère	Sévère	Profonde	Totale
<b>Prévalence ajustée selon l'âge en % (IC à 95 %)</b>	12.8 (12.2–13.4)	8.16 (7.73–8.61)	2.99 (2.59–3.4)	1.11 (0.923–1.35)	0.23 (0.18–0.286)	0.176 (0.14–0.219)	0.12 (0.0981–0.148)
<b>Cas en milliers (IC à 95 %)</b>	4.200 (3.990–4.410)	2.820 (2.670–2.980)	902 (778–1040)	308 (252–373)	66.6 (51.7–82.6)	57.4 (45.1–72.1)	39 (31.4–48.8)

Global Buren of Disease, 2021

Depuis la fin du siècle dernier, les programmes de dépistage de l'audition néonatale sont devenus accessibles en Amérique du Nord, Europe et la plupart des pays développés. De fait, le dépistage auditif néonatal universel est préconisé, c'est-à-dire le dépistage de tous les nouveau-nés, plutôt que seulement ceux à porteurs de facteurs de risque de perte auditive. Ces programmes ont montré que la prévalence estimée de la perte auditive congénitale bilatérale est de 1,33 pour 1000 naissances dans les pays développés. Pour les enfants en âge d'aller à l'école primaire, la prévalence passe à 2,83 pour 1000 enfants, avec une progression à 3,5 pour 1000 chez les adolescents. Cette augmentation au fil du temps reflète vraisemblablement le cumul de patients souffrant d'une perte auditive due à une cause génétique acquise ou apparue tardivement (Korver et al. 2017).

Dans les pays sans programmes universel de dépistage de l'audition néonatale, les estimations de prévalence varient entre 19 pour 1000 nouveau-nés en Afrique subsaharienne, jusqu'à 24 pour 1000 en Asie du Sud. Cette différence considérable dans les estimations de prévalence entre les pays à revenu élevé ou faible est essentiellement due à l'utilisation de différentes méthodes de diagnostic ou au choix de critères pour définir les seuils de perte auditive. Néanmoins, la présence de facteurs de risque constitue le facteur prédictif le plus important responsable de surdité (Korver et al. 2017).

## 2. Facteurs de risques et protecteurs

Depuis la conception du fœtus, de nombreux facteurs rentrent en jeu dans l'élaboration du niveau d'audition d'une personne. Les facteurs protecteurs assurent le maintien d'une bonne audition le long de la vie de la personne, tandis que les facteurs de risques contribuent à la dégradation progressive de l'ouïe menant à une surdité de différents degrés, ou à une perte sévère pouvant entraîner la surdité (Figure 5).

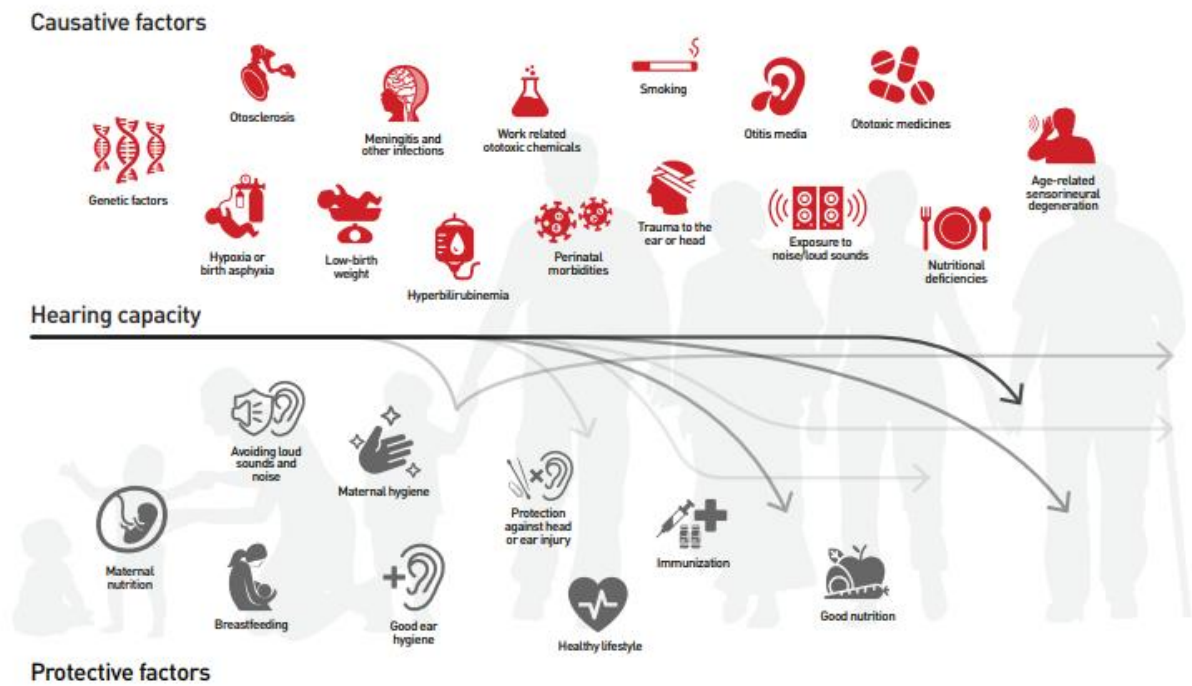


Figure 5 : Facteurs de risques et protecteurs  
 “World Hearing Day 2021 - Report of activities,” 2021

## 2.1. Causes et facteurs de risque

Alors que fœtus se développe encore, le facteur génétique et les infections intra-utérines sont les premiers risques menaçant la future audition.

A la naissance une hypoxie ou une asphyxie, un faible poids, une hyperbilirubinémie ou des morbidités périnatales tels des infections périnatales et l’utilisation de médicament ototoxiques peuvent compromettre l’audition du nouveau-né.

Durant l’enfance et adolescence, l’otite et les méningites demeurent d’autres facteurs de risque. Des infections par Epstein-Barr virus, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Plasmodium falciparum*, *Streptococcus pneumoniae* et le *Varicella zoster virus* sont aussi responsables de pertes auditives.

A l’âge adulte, d’autres risques peuvent compromettre l’audition: les maladies chroniques (hypertension, diabète...), l’otosclérose conduisant à une croissance osseuse anormale à l’intérieur de l’oreille, la cigarette ou la fumée passive.

On dénombre aussi des causes liées à du cérumen coincé, un traumatisme crânien ou de l’oreille, l’expositions aux bruits et sons forts - causant un dommage permanent aux cellules ciliées et structures de la cochlée -, les médicament ototoxiques, l’exposition à des produits chimiques ototoxiques dans l’environnement professionnel, la malnutrition pauvre en certains macro ou micro

nutriments tel la vitamine A, le zinc et le fer, une infection virale (HIV; Herpes simplex type 1 et 2; Ebola; Lassa virus; and West Nile virus) ou d'autres sources d'agression de l'audition, comme la dégénérescence neurosensorielle due à l'âge, la surdité neurosensorielle soudaine et les facteurs de risque non modifiables dues à des mutations génétiques se manifestant à partir de l'enfance, des syndromes, des effets de genre ou d'ethnicité (2021).

## 2.2. Facteurs protecteurs

Durant la grossesse une bonne hygiène et une bonne nutrition maternelle sont considérées comme les premiers facteurs protecteurs. L'allaitement procure au nouveau-né une protection contre l'otite moyenne aigue. Garder une bonne hygiène de vie de l'oreille, avoir une bonne nutrition, acquérir une bonne immunité naturelle et vaccinale, éviter la cigarette, prévenir l'exposition aux bruits forts et se protéger contre les traumatismes crâniens et de l'oreille, sont les meilleurs moyens de garder une bonne audition tout le long d'une vie (2021).

## 3. Classification

Les caractéristiques phénotypiques de la surdité peuvent être classées comme suit : congénitale ou à apparition tardive ; conductive, neurosensorielle ou mixte ; légère à profonde ; progressive ou non progressive ; unilatérale ou bilatérale et symétrique ou asymétrique en termes de gravité ou de configuration (Wang et al. 2009).

### ○ L'âge d'apparition

L'apparition de la perte d'audition peut être congénitale, prénatale ou périnatale, ou postnatale. Une seconde classification est basée selon les 3 phases majeures d'acquisition du langage, qui est étroitement lié à l'audition. En effet le développement de la communication orale nécessite l'intégrité de la fonction auditive ; et toute perte de cette fonction aura un impact négatif sur les compétences langagières, variable selon l'âge d'apparition de la surdité (Shearer et al. 1993).

Ainsi la surdité est classée selon les 3 stades suivants :

- Surdité prélinguale : avant l'acquisition de la parole (avant 2 ans)
- Surdité périlinguale : lors du développement du langage (de 2 à 4 ans)
- Surdité postlinguale : après l'acquisition de la parole (après 4 ans).

○ Localisation de l'atteinte otologique

Trois types de surdité sont relevées selon la localisation de l'atteinte otologique.

- **Les surdités de transmission** sont liées à l'atteinte des structures de l'oreille externe (pavillon, conduit auditif externe) ou de l'oreille moyenne (système tympano-ossiculaire de la caisse du tympan, trompe d'Eustache). Elles ne sont jamais totales, plutôt légères ou moyennes ne dépassant généralement pas 60 dB et concernent surtout les sons graves.

- **Les surdités de perception** ou neurosensorielles sont liées soit à l'atteinte de l'oreille interne ou de la cochlée, soit du nerf auditif (VIII), des voies nerveuses auditives ou des structures centrales de l'audition. Les surdités de perception peuvent être uni ou bilatérales, d'apparition progressive ou brutale, et sont surtout caractérisées par la perte des sons aigus et par de grandes difficultés dans la compréhension de la parole.

- **La surdité mixte** associant surdité de transmission et de perception. Les deux fonctions de transmission et de transduction sont touchées avec des degrés variables selon l'importance de l'atteinte de l'une ou de l'autre (Shearer et al. 1993).

○ Le degré de surdité

Le Bureau International d'Audiophonologie classe les surdités selon le degré de pertes auditives exprimé en dB, en mesurant le seuil minimal de perception des sons pour les fréquences de 500 Hz, 1000 Hz, 2000 Hz et 4000 Hz. L'intensité du bruit varie de 0 à 120 dB. Une personne est considérée comme ayant une audition normale si la perte tonale moyenne ne dépasse pas 20 dB. Et selon le seuil de l'audition en dB de la personne, on distingue alors une surdité légère, moyenne, moyennement sévère, sévère, profonde ou totale (Tableau 2).

Tableau 2 : Degré de surdité

Degré	Seuil d'audition en dB
Léger	21-40
Moyen	41-55
Moyennement sévère	56-70
Sévère	71-90
Profond	≥ 91

### III. Surdités génétiques

La cause génétique représente entre 50 à 60 % des cas de surdité chez l'enfant, les 40 à 50 % autres sont de causes environnementales (Tekin et al. 2001; Smith et al. 2005). 50% des cas de surdité congénitale neurosensorielle et près de 40 % des pertes auditives de l'enfance sont d'origine génétique (Smith et al. 2005; GBD 2019 Hearing Loss Collaborators 2021).

Cliniquement, la déficience auditive peut être isolée, caractérisant la surdité non syndromique ou associée à d'autres symptômes, définissant la surdité syndromique. Les surdités non syndromiques représentent 75 à 80 % des surdités génétiques. Les surdités syndromiques présentent une surdité et des atteintes dans diverses organes et mécanismes, responsables ainsi de 20 à 25 % des surdités génétiques (Smith et al. 2005; Carpena and Lee 2018).

Plus de 220 gènes ont été répertoriés entre la 'Deafness Variation Database' (accès Février 2023) et la 'Hereditary Hearing Loss Homepage' (accès Février 2023). Ces gènes ont différents modes de transmissions : autosomal dominant, autosomal récessif, lié à l'X, lié à l'Y et mitochondrial (Jonard et al. 2011). Certains gènes peuvent être l'étiologie de formes syndromiques ou non syndromiques, néanmoins la plupart sont responsables d'une des deux formes uniquement (Figure 6).

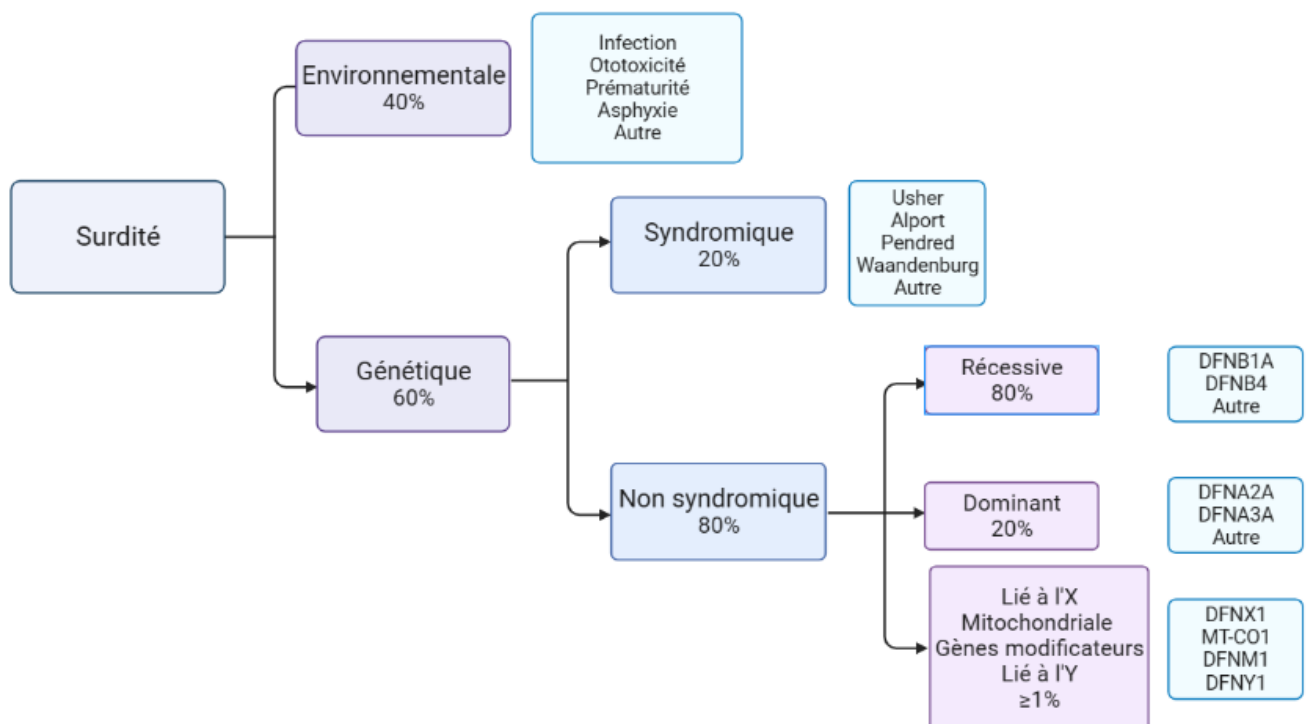


Figure 6 : Distribution des facteurs environnementaux et génétiques des surdités neurosensorielles

Les gènes de surdité codent pour des protéines ayant des rôles multiples dans la physiologie de l'oreille et la perception du son. On retrouve des protéines qui contrôlent la transcription, l'adhérence des cellules, les jonctions cellulaires, l'intégrité des structures, le transport intracellulaire, la libération de neurotransmetteurs, l'hémostasie ionique et le cytosquelette des cellules ciliées. Des mutations dans l'un des nombreux gènes de surdité peuvent entraîner des dysfonctions de l'audition (Tekin et al. 2001; Hilgert et al. 2009).

## 1. Les surdités non-syndromiques

La surdité non syndromique (*Non Syndromic Hearing Loss* : NSHL) est extrêmement hétérogène. Sous la forme récessive, elle représente 75 à 80% des cas génétiques et est typiquement congénitale. A l'inverse, la perte auditive associées aux formes autosomiques dominantes non syndromiques, qui représentent les 20 % restants des cas, est souvent progressive avec un âge d'apparition plus tardif. Les modes de transmission liés à l'ADN mitochondrial ou liés à l'X sont rares et représentent moins de 1 % des cas (Toriello and Smith 2013; Korver et al. 2017), et seulement 3 études ont identifié des familles ayant une surdité lié à l'Y (Wang et al. 2004; Fu et al. 2011; Di Stazio et al. 2019).

En général, les formes dominantes non syndromiques sont postlinguales, progressives, de fréquence élevée et commencent dans la deuxième ou troisième décennie. Cependant, les surdités autosomiques récessives sont très fréquemment pr linguales, non progressives, et sévères à profondes. La plupart des phénotypes non syndromiques liés au chromosome X sont caractérisés par une fixation de l'étrier avec un écoulement périlymphatique conduisant à une d ficiance auditive mixte et parfois à une perte auditive congénitale profonde (de Kok et al. 1995; Wang et al. 2006). Quant aux phénotypes de surdité mitochondriale, elles sont congénitales ou induites par des traitements aux antibiotiques de la famille des aminoglycosides (Bom et al. 1999; Li and Friedman 2002).

Selon HHLHomepage, 78 gènes sur 90 locus sont de transmission récessive et 51 gènes sur 68 locus sont de transmission dominante. Pour certains locus, aucun gène n'a pu encore être identifié. Les locus de surdité non syndromique sont désignés DFN (pour DeaFNness) et sont classés selon leur mode de transmission : DFNA (autosomal dominant), DFNB (autosomal récessive), DFNX (lié à l'X), DFNY (lié à l'Y) suivi d'un nombre, indiquant l'ordre de découverte du locus ou du gène (Shearer et al. 1993). On connait aussi des gènes modificateurs (DFNM) qui interviennent dans l'expression phénotypique et moléculaire d'autres gènes responsables de surdité.

Les gènes de surdité non syndromiques récessifs sont considérés comme les plus fréquents. Par fréquence, on retrouve *GJB2*, *SLC26A4*, *MYO15A*, *OTOF*, *CDH23* and *TMC1* (Hilgert et al. 2009). Inversement, les gènes responsables de surdité non syndromique dominante ne sont pas une cause fréquente de surdité. D'après Hilgert et al., 2009, les mutations dans les gènes *WFS1*, *KCNQ4*, *COCH* et *GJB2* sont les plus fréquemment rapportés.

## 1.1. Gène *MPZL2*

Myelin Protein Zero-Like protein 2 ou *MPZL2* a été décrit initialement en 1998 comme un antigène épithélial de type V (EVA) de la superfamille des immunoglobulines. Localisé sur la région 11q23.3, *MPZL2* code un médiateur de l'adhésion cellule-cellule homophile et hétérophile (Guttinger et al. 1998). L'alignement des séquences protéiques humaine et murine a permis d'identifier 4 domaines: le peptide signal, le domaine extracellulaire, le domaine transmembranaire et le domaine cytoplasmique. Au sein du domaine extracellulaire, un domaine de type V et deux sites potentiels de N-glycosylation ont été localisés. Le domaine cytoplasmique contient un site potentiel de phosphorylation par la protéine caséine kinase 2 (Figure 7).

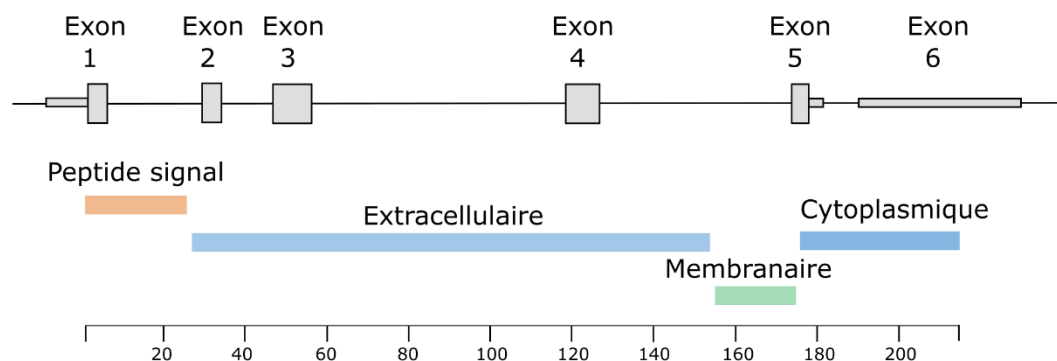


Figure 7 : Structure du gène et domaines de la protéine *MPZL2*

Adapté de Bademci et al. 2018

La protéine *MPZL2* est impliquée dans l'embryogenèse précoce lors du développement des thymocytes et a également été trouvée dans le foie adulte (Guttinger et al. 1998). Récemment, deux études ont montré que la protéine est également présente dans les tissus de l'oreille interne (Bademci et al. 2018; Wesdorp et al. 2018). L'expression relative de *MPZL2* dans divers tissus humains fœtaux et adultes par RT-qPCR a montré que le niveau le plus élevé était détecté dans la cochlée fœtale, suivi du poumon et du foie adultes (Wesdorp et al. 2018).

L'immunomarquage d'une section de l'organe de Corti chez des souris sauvages a révélé que la protéine s'exprime dans la cochlée, spécifiquement dans la zone de contact entre les cellules de Deiter et la membrane basilaire. La protéine est également présente, mais à de faibles niveaux d'expression, dans les cellules ciliées internes et externes. En outre, la colocalisation avec l'anti- $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPase dans la strie vasculaire, a montré que MPZL2 est présente dans la couche basale. L'étude de l'organe de Corti chez les souris mutantes *Mpzl2*<sup>-/-</sup> a montré une désorganisation de la structure cellulaire, avec la couche basale très altérée, du fait de la perte des cellules ciliées et de soutien, ainsi que de certains neurones du ganglion spiral. Ces souris présentaient une surdité non syndromique neurosensorielle progressive à apparition précoce, plus prononcée aux fréquences élevées (Wesdorp et al. 2018).

## 2. Surdités syndromiques

Les pertes auditives syndromiques consistent en des surdités accompagnées de symptômes affectant l'œil, les reins, le cœur, les systèmes musculosquelettique et nerveux, le métabolisme, et/ou de multiples autres organes et fonctions (Smith et al. 2005; Koffler et al. 2015). Aujourd'hui, on recense entre 400 et 500 syndromes pour lesquels la surdité est un symptôme (Jonard et al. 2011; Toriello and Smith 2013). Parmi eux, les plus connus sont les syndromes d'Usher, de Pendred et Waardenburg (Koffler et al. 2015).

**Le syndrome de USHER** est le plus fréquent, avec une prévalence de 1/10.000, représentant plus de la moitié de tous les cas de surdité-cécités héréditaires, et de 3 à 6 % de tous les cas de surdité infantile. Le syndrome est classé en 3 sous types cliniques, USH1, USH2 et USH3. Le type 1 (USH1) est caractérisé par une surdité congénitale et aréflexie vestibulaire ; le type 2 (USH2) avec une surdité congénitale modérée et sans aréflexie vestibulaire ; et le type 3 (USH3) avec une perte auditive et vestibulaire progressive. Tous les patients présenteront une rétinite pigmentaire, dont l'âge d'apparition est variable. Neuf gènes responsables ont été identifiés à ce jour : *MYO7A*, *USH1C*, *CDH23*, *PCDH15* et *SANS* pour le Usher de type 1; *USH2A*, *GPR98* et *WHRN* pour le Usher de type 2; et *CLRN1* pour le Usher de type 3 (Kimberling et al. 2010; Delmaghani and El-Amraoui 2022) (<https://hereditaryhearingloss.org/>).

**Le syndrome de Pendred** est caractérisé par une perte auditive prélinguale profonde, un élargissement de l'aqueduc vestibulaire dû à une malformation de l'oreille interne, et un défaut d'incorporation de l'iode dans la thyroïde, causant un goitre. Trois gènes ont été identifié *SLC26A4* avec plus de 150 variants, *FOXI1* et *KCNJ10* (Yang et al. 2009).

**Le syndrome de Waardenburg (WS)** est présent chez 2 à 5 % des personnes atteintes d'une déficience auditive congénitale. Les traits les plus caractéristiques de ce syndrome sont des coins inférieurs de la paupière très espacés (*dystopia canthorum*), une racine nasale large, des sourcils confluent (synophrys), des anomalies pigmentaires des cheveux, de l'iris et de la peau, souvent avec un front blanc et une hétérochromie iridienne, et une surdité neurosensorielle avec une classification clinique en 4 types. WS type I comporte une *dystopia canthorum* absent dans WS type II. Une combinaison des symptômes de WS type I avec des anomalies des membres supérieurs a été appelée syndrome de Klein-Waardenburg ou WS type III. WS type II récessive avec la maladie de Hirschsprung a été appelée syndrome de Waardenburg-Shah ou WS type IV. Les gènes *PAX3*, *MITF*, *SNAI2*, *SOX10*, *EDNRB* et *EDN3* sont responsable du WS avec deux locus supplémentaires dont les gènes n'ont pas encore été identifié (Toriello and Smith 2013) (<https://hereditaryhearingloss.org/>).

## 2.1. Syndrome d'Alport et gène *COL4A3*

Le syndrome de glomérulonéphrite progressive héréditaire avec hématurie intermittente ou grossière et perte auditive neurosensorielle a été décrit pour la première fois par Alport en 1927 (Alport 1927). Un individu atteint du syndrome d'Alport doit présenter trois des quatre critères suivants: antécédents familiaux positifs d'hématurie avec ou sans insuffisance rénale ; preuve d'altérations de la membrane basale glomérulaire (MBG) tel la lamellation ou l'amincissement des MBG relevé par microscopie électronique lors d'une biopsie rénale ; signes ophtalmologiques caractéristiques de lenticône antérieur, cataracte, taches rétiniennes , ou érosions cornéennes et une perte auditive neurosensorielle à sons aigus généralement progressive pendant l'enfance (Toriello and Smith 2013; Savige et al. 2019).

La fréquence de ce syndrome est d'environ 1/5 000 à 1/10 000, et elle est présente chez au moins 1 % des personnes souffrant d'une perte auditive congénitale, et jusqu'à 5 % des personnes souffrant d'insuffisance rénale. Le syndrome d'Alport représente un groupe de troubles génétiquement hétérogènes, avec quelques 85 % des personnes atteintes présentant la forme liée au chromosome X. Les autres présentent un mode de transmission autosomique récessif (15% de cas restants) ou exceptionnellement autosomique dominant (Hanson et al. 2011).

Trois gènes de collagène de type IV sont associés à ce syndrome : *COL4A3* codant pour le collagène de type IV,  $\alpha 3$ , et *COL4A4* codant pour le collagène de type IV,  $\alpha 4$  pour les types autosomiques, et *COL4A5* codant pour le collagène de type IV,  $\alpha 5$  pour le type lié au chromosome X (Tableau 3) (Kochhar et al. 2007).

Tableau 3 : Gènes responsables du syndrome d'Alport

Gène	Localisation	Protéine	Transmission	Référence
<i>COL4A3</i>	2q36.3	Collagen, type IV, alpha 3	Autosomique récessif et dominant	(Mochizuki et al. 1994)
<i>COL4A4</i>	2q36.3	Collagen, type IV, alpha 4	Autosomique récessif	(Mochizuki et al. 1994)
<i>COL4A5</i>	Xq22.3	Collagen, type IV, alpha 5	Lié à l'X	(Barker et al. 1990)

Ces 3 types de collagène partagent une structure commune, composée d'un court domaine 7S N-terminal (25 acides aminés), d'un long domaine collagène (environ 1400 acides aminés) et d'un domaine non collagène C-terminal (NC1) (environ 230 acides aminés). Le domaine collagène possède la séquence d'acides aminés répétitive typique Gly-X-Y, où X est normalement la proline et Y est normalement la 4-hydroxyproline, avec un rôle fondamental dans l'assemblage de l'hétéro-trimère (Wu and Ge 2019).

COL4A3 joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité de la MBG. Elle forme un hétéro-trimère hélicoïdal avec les COL4A4 et COL4A5, le réseau  $3\alpha4\alpha5(IV)$ . Deux autres réseaux sont formés avec les chaînes  $\alpha1\alpha1\alpha2(IV)$  et  $\alpha5\alpha5\alpha6(IV)$ . Les trois hétéro-trimères sont présents dans différents compartiments glomérulaires (Figure 8).

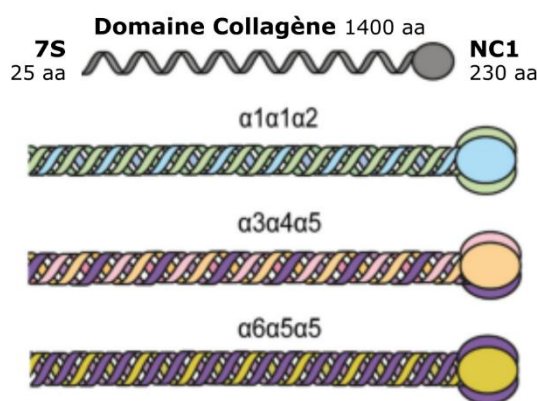


Figure 8 : Structure du collagène et hétéro-trimères (Martínez-Pulleiro et al. 2021)

Les chaînes de collagène  $\alpha3$ ,  $\alpha4$  et  $\alpha5$  sont situées dans les membranes basales du glomérule, des tubules distaux du rein, de la cochlée, de la rétine, de la cornée, de la capsule du cristallin, de la peau et dans les cellules musculaires lisses (Martínez-Pulleiro et al. 2021). Le réseau  $3\alpha3\alpha4\alpha5(IV)$  définit la MBG mature (Hudson et al. 2003 ; Miner 1998). Les dépôts anormaux de  $3\alpha3\alpha4\alpha5(IV)$  du

MBG sont une conséquence visible de l'altération de l'une des chaînes de collagène (Jais et al. 2000). L'oreille interne, les membranes basales des structures de la cochlée, le cristallin et la rétine sont aussi endommagés par les mutations survenant dans *COL4A3* (Kalluri et al. 1998 ; Kashtan 1999 ; Miner 2014).

En 1994 Mochizuki et al. ont identifié les premiers variants pathogènes de *COL4A3* chez des familles atteintes du syndrome d'Alport: une délétion de 5 paires de base CTTTT et deux non-sens Arg43Ter et Ser86Ter (Lemmink et al. 1994; Mochizuki et al. 1994). Selon la 'deafness variation database' 308 variants du gène *COL4A3* ont été retenus comme responsables du syndrome d'Alport.

## 2.2. Syndrome 3MC et gène *MASPI*

En 1978, Michels et al. (Michels et al. 1978) ont décrit quatre frères et sœurs présentant une pléiade de symptômes impliquant les paupières, à savoir un *blépharophimosis*, un *blépharoptosis* et un *épicanthus* inverse, en association avec une limitation du regard vers le haut, un hypertélorisme, une fente labiale et palatine, diverses anomalies du squelette, une légère déficience intellectuelle et une surdité mixte. En 2005, Titomanlio et al. (Titomanlio et al. 2005) ont noté les similitudes entre le syndrome de Michels, le syndrome de Malpuech (Malpuech et al. 1983), le syndrome de Carnevale (Carnevale et al. 1989) et le cas rapporté par Mingarelli (Mingarelli et al. 1996). Ils ont été les premiers à postuler que les similitudes entre ces quatre syndromes pouvaient être associées en un même spectre clinique, plus tard nommé "le syndrome Malpuech-Michels-Mingarelli-Carnevale" ou 3MC (Titomanlio et al. 2005).

Selon une comparaison clinique de ces quatre syndromes, les caractéristiques les plus fréquentes sont la perte auditive, la triade des paupières (*blépharoptose*, *blépharophimose*, *épicanthus inversus*), l'hypertélorisme, les sourcils arqués et la dépression ombilicale (Titomanlio et al. 2005). En 2011, Rooryck et al. ont déterminé que les dysmorphies faciales telles que l'hypertélorisme, le *blépharophimosis*, le *blépharoptosis* et les sourcils fortement arqués sont rencontrés dans 70 à 95 % des cas. Les symptômes tels que la perte d'audition, les troubles cognitifs, la fente labiale et palatine, le déficit de croissance postnatale sont présents dans 40 à 68 % des cas. Les défauts de la chambre antérieure, l'appendice caudal, les anomalies cardiaques, le diastasis recti et la hernie ombilicale sont considérés comme les caractéristiques les plus rares (Rooryck et al. 2011). Dans la base de données Human Phenotype Ontology, les caractéristiques suivantes sont les plus fréquentes : sourcils très arqués, pronation/supination limitée de l'avant-bras, déficience auditive, synostose radio-ulnaire, ptosis et *épicanthus inversus* (<https://hpo.jax.org/app/>).

On distingue trois types du syndrome selon le gène muté. Le gène correspondant à 3MC1 a été cartographié sur le chromosome 3q22 (Ohdo et al. 1986) et identifié comme étant *MASPI*

(Sirmaci et al. 2010). On reconnaît que le syndrome de Malpeuch est une entité distincte, désignée sous le nom de 3MC2 en raison d'une mutation pathogène dans le gène *COLEC11* (Rooryck et al. 2011; Toriello and Smith 2013). Le syndrome 3MC2 est rarement associé à une perte auditive. La première caractérisation du type 3MC3 a été rapportée par Munye et al. en 2017, après identification de variants pathogènes de *COLEC10* chez des patients (Munye et al. 2017) (Tableau 4).

Tableau 4 : Gènes responsables du syndrome 3MC

Gène	Localisation	Protéine	Type	Référence
<i>MASPI</i>	3q22	Mannan-Binding Lectin Serine Protease -1 et -3	3MC1	(Ohdo et al. 1986; Sirmaci et al. 2010)
<i>COLEC11</i>	2p25.3	Collectin, Kidney, 1	3MC2	(Rooryck et al. 2011)
<i>COLEC10</i>	8q24.12	Collectin, Liver, 1	3MC3	(Munye et al. 2017)

*MASPI*, *COLEC11* et *COLEC10* sont les trois gènes connus à l'origine du syndrome 3MC. Tous les trois sont impliqués dans la voie du complément de la lectine. Pendant l'embryogenèse, cette voie est critique, car elle guide la migration des cellules pour la formation des organes et des systèmes (Gardner et al. 2017). La dysfonction des protéines codées (MASP-1 &-3, CL-K1, CL-L1) dans les premières phases du développement du cerveau, notamment aux stades postnatals, entraîne le syndrome 3MC avec son dysmorphisme craniofacial et ses multiples anomalies cliniques (Rooryck et al. 2011).

*MASPI* est situé sur le chromosome 3q27-q28. Trois isoformes MASP-1, MASP-3 et MAP44 (MAP-1) sont produites par épissage alternatif du pré-ARNm primaire. MASP-1 et 3 contiennent une chaîne lourde identique, à l'exception de 15 résidus C-terminaux. Cette chaîne est composée de deux domaines CUB (C1r/C1s, urchin-EGF, and bone morphogenetic protein), CUB1 et CUB2 séparés par un domaine EGF et suivis de deux domaines de Protéine de Contrôle du Complément (CCP) CCP1 et CCP2. La chaîne légère contenant le domaine sérine protéase est codée par les exons 13-18 et l'exon 12 dans MASP-1 et MASP-3, respectivement (Figure 9) (Takahashi et al. 2007; Skjoedt et al. 2010; Andrade et al. 2017).

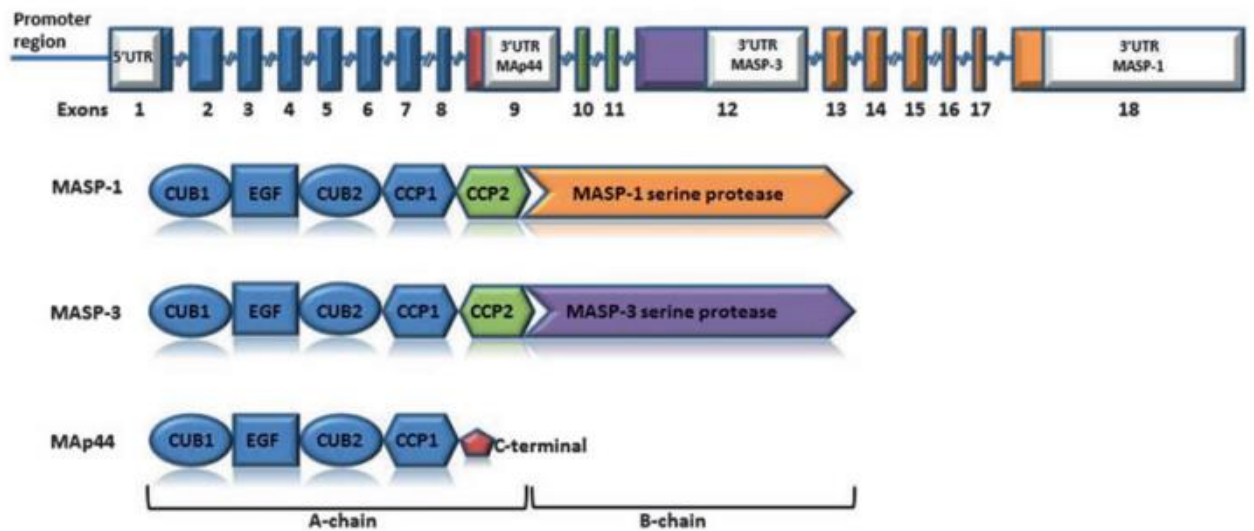


Figure 9 : *MASP1* gène et transcrits  
(Boldt et al. 2016)

MASP-1 est principalement exprimée dans le foie, alors que MASP-3 présente une expression tissulaire ubiquitaire (Seyfarth et al. 2006). Les études réalisées sur le modèle *zebrafish* suggèrent que MASP-1 induit un signal dirigeant la migration des cellules de la crête neurale au cours du développement embryonnaire générant et des malformations du cartilage crânien (Rooryck et al. 2011). Les protéines MASP-1 et MASP-3 sont aussi impliquées dans les voies d'activation du complément, la ligne de défense par phagocytose de l'immunité inné contre les pathogènes (Andrade et al. 2017).

## IV. Surdités mitochondriales

La mitochondrie est l'organite cellulaire responsable de la production d'énergie sous forme d'adénosine tri-phosphate (ATP) par la respiration associée à la phosphorylation oxydative (OXPHOS). La mitochondrie est aussi la principale source intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui régulent l'expression de gènes nucléaires, établissant une communication avec le noyau, afin de détecter et répondre aux signaux ou stress extracellulaires et intracellulaires (Lee and Wei 2000). Elle joue également un rôle important dans l'apoptose.

La mitochondrie mesure entre 0.5 et 1 µm de diamètre, et entre 1 et 10 µm de long. Sa forme peut être plus ou moins allongée selon le type cellulaire. Elle est constituée de deux membranes, l'une externe et l'autre interne convolutive et plissée en crêtes. Ces 2 membranes délimitent deux compartiments, l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale. Elle possède son propre génome l'ADNmt sous la forme d'une molécule d'ADN circulaire double brin de 16,569 paires de bases, contenu au sein de la matrice.

Des mutations de cet ADNmt peuvent engendrer des maladies mitochondriales, des pathologies fréquentes du métabolisme caractérisées par une forte hétérogénéité clinique et génétique. Les maladies mitochondriales sont dues soit à des mutations affectant l'ADNmt ou des gènes nucléaires codant des protéines ayant une fonction mitochondriale. Elles induisent de nombreuses dysfonctions du métabolisme énergétique mitochondrial, et aussi de multiples pathologies systémiques associées à des phénotypes cliniques spécifiques : les neuropathies optiques héréditaires, le syndrome de Leigh, le MELAS/MIDD et des surdités. De nombreux systèmes et organes sont touchés tel le cœur, le cerveau, les nerfs, le muscle, les reins, les tissus endocriniens, le foie, l'œil et l'oreille.

Les surdités mitochondriales englobent toutes surdités syndromiques et non syndromiques, associé à une dysfonction mitochondriale, dû à une mutation dans un gène mitochondrial ou nucléaire à fonction mitochondriale. Les signes cliniques, autres que la surdité, sont extrêmement variés : neuropathies, cardiopathies, diabète, dégénérescence rétinienne ...

### 1. Implication des mutations de l'ADNn

Si l'ADNmt code pour 13 protéines et 24 ARN nécessaires à la traduction mitochondriale, l'ADNn lui en produit plus de 1400. Ces protéines remplissent des rôles structuraux, d'assemblage des complexes d'OXPHOS, de maintenance de l'ADNmt, de transport protéique, de synthèse des protéines mitochondriales, d'homéostasie des ions de fer, d'intégrité du réseau mitochondrial

(Kokotas et al. 2007; Wallace et al. 2019). Les pathologies causées par les variants touchant ces gènes nucléaires sont diverses et variées. Le tableau 5 est une liste brève et non exhaustive des gènes et de leurs phénotypes associés à la surdité (Jardel and Rucheton 2018; Tilokani et al. 2018; Wallace et al. 2019).

Encéphalopathies, déficits intellectuelles, myopathies, pathologies visuelles et retards de développement sont des troubles accompagnant la surdité neurosensorielle formant des maladies mitochondriales. Ces pathologies sont liées par exemple à des altérations de la dynamique mitochondriale (*MFN2*, *OPA1*), aux transports protéiques (*DDP*) à l'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire (*BCSIL*), d'enzymes du cycle de Krebs (*SUCLA2*) ou de charge des ARNs de transfert (*NARS2*, *KARS1*) (Wallace et al. 2019).

Tableau 5 : Gènes nucléaires liés aux surdités mitochondriales

Gène	Phénotype	OMIM Gene ID
<i>OPA1</i>	Atrophie Optique Dominante plus	605290
<i>MFN2</i>	Maladie Charcot-Marie-Tooth type 2A2A et 2A2B	608507
<i>INF2</i>	Maladie Charcot-Marie-Tooth type E	610982
<i>POLG</i>	Syndrome d'ataxie neuropathique sensorielle, dysarthrie, ophtalmoplégie Syndrome d'Alpers-Huttenlocher	174763
<i>SUCLA2</i>	Syndrome de Déplétion de l'ADN Mitochondrial 5	603921
<i>PNPT1</i>	Surdité non-syndromique neurosensorielle mitochondrial	610316
<i>TIMM8A</i>	Syndrome Mohr-Tranebjaerg	304700
<i>IARS2</i>	Syndrome CAGSSS	612801
<i>KARS1</i>	Surdité non-syndromique neurosensorielle Surdité congénitale avec leucoencephalopathie progressive	601421
<i>NARS2</i>	Surdité non-syndromique neurosensorielle Syndrome de Leigh Syndrome d'Alpers-Huttenlocher	612803
<i>BCSIL</i>	Syndrome de Bjornstad	603647
<i>SERAC1</i>	Syndrome MEGDEL	614725
<i>HARS2</i>	Syndrome de Perrault	600783
<i>LARS2</i>	Syndrome de Perrault	604544
<i>WFS1</i>	Syndrome de Wolfram	606201

CAGSSS: Cataractes, déficience en hormone de croissance, neuropathie sensorielle, neurosensorielle surdité, et dysplasie du squelette

MEGDEL: 3-Methylglutaconic aciduria, Deafness, Encephalopathy, and Leigh-like disease

## 2. Implication des mutations de l'ADNmt

L'ADNmt est présent en 1 à 2 copies au sein de chaque mitochondrie contenue dans une cellule, donc en quelques centaines à quelques milliers de copies selon le type cellulaire. L'ADNmt code pour 13 protéines de la chaîne respiratoire, 22 ARNt et 2 ARNr (Wallace et al. 2013).

Les syndromes neuromusculaires systémiques tels que le syndrome de Kearns-Sayre, l'Encéphalomyopathie mitochondriale avec acidose lactique et pseudo-épisodes vasculaires cérébraux (MELAS), et l'Épilepsie myoclonique avec fibres rouges déchiquetées (MERRF), présentent fréquemment une perte auditive comme l'un de leurs signes cliniques (Fischel-Ghodsian 2003). D'autres symptômes peuvent être associés à la surdité, tels que le diabète dans le cas du syndrome MIDD ou une Kératodermie palmoplantaire.

Le tableau 6 représente les gènes portés sur l'ADNmt et les principaux phénotypes associés à une atteinte auditive. En effet, certains gènes engendrent des surdités non syndromiques tels que *MT-CO1*, *MT-RNR1* ; et d'autres des formes syndromiques tels les syndromes de MELAS, MERRF et MIDD (Surdité-Diabète de transmission maternelle). Certains de ces gènes sont impliqués dans les formes de surdité isolée et associé comme *MT-ND1*. Par ailleurs, le variant A1555G du gène *MT-RNR1* est l'exemple le plus connu à l'origine d'une susceptibilité de la cochlée aux antibiotiques de la famille des aminosides, entraînant une surdité (Bris et al. 2018; Wallace et al. 2019).

Tableau 6 : Gènes de l'ADNmt liés aux surdités mitochondriales

Gène	Variants	Phénotypes	OMIM Gene ID
<i>MT-CO1</i>	m.7445A>G	Surdité non-syndromique neurosensorielle mitochondriale	516030
	m.7444G>A		
<i>MT-ND1</i>	m.3376G>A	Syndrome de MELAS	516000
	m.3697G>A	Surdité non-syndromique neurosensorielle	
	m.3697G>A	mitochondriale	

Tableau 6 suite : Gènes de l'ADNmt liés aux surdités mitochondriales

Gène	Variants	Phénotypes	OMIM Gene ID
<i>MT-RNR1</i>	m.1494C>T m.1555A>G m.961_962delTinsC(n) m.1095T>C m.1291T>C	Surdités induites ou pas par aminoglycoside	561000
<i>MT-TE</i>	m.14709T>C m.14692A>G	MIDD avec ou sans myopathie Surdité, Encéphalomyopathie	590025
<i>MT-TH</i>	m.12147G>A m.12183G>A m.12201T>C	MERRF-MELAS overlap syndrome Surdité non-syndromique neurosensorielle mitochondriale	590040
<i>MT-TI</i>	m.4269A>G m.4295A>G	Cardiomyopathie, familiale hypertrophique Surdité non-syndromique neurosensorielle mitochondriale	590045
<i>MT-TK</i>	m.8296A>G m.8313G>A m.8363G>A	Syndrome de MERRF MEERF-MELAS overlap MIDD Cardiomyopathie avec surdités Autisme, Syndrome de Leigh, Ataxie	590060
<i>MT-TL1</i>	m.3243A>G m.3243A>T m.3271T>C	Syndrome de MELAS Syndrome de MERRF MIDD	590050
<i>MT-TS1</i>	m.7444G>A m.7445A>C m.7471C>insC m.7505T>C	MERRF-MELAS overlap syndrome Keratodermie palmoplantaire avec surdités Surdité non-syndromique neurosensorielle mitochondrial	590080
<i>MT-TS2</i>	m.12207G>A	MEERF-MELAS overlap syndrome	590085
<i>MT-TV</i>	m.1606G>A	Ataxie, Myopathie et surdités	590105

MERRF: Myoclonic Epilepsy with Ragged-Red Fibers

MELAS: Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis and Stroke-Like Episodes

MIDD: Maternally Inherited Diabetes and Deafness

### 3. Implication de la dynamique mitochondriale

#### 3.1. Dynamique mitochondriale

Le développement et le cycle cellulaire, les stress et les stimuli toxiques font des mitochondries un réseau dynamique en perpétuel changement. La taille, la forme et le nombre de mitochondries répondent aux différentes conditions et besoins d'une cellule durant sa vie et lors de sa mort. La dynamique mitochondriale résulte d'événements de fusion et fission des membranes afin de répondre aux besoins cellulaires. La fusion mitochondriale contribue à établir un réseau réticulé et filamenteux, alors que la fission fragmente le réseau (Chen and Chan 2004). Ces mécanismes engagent de nombreux gènes nucléaires codant des Grandes GTPases de la famille des dynamines.

La fission implique principalement les protéines DRP1 (Dynamain Related Protein 1) (Smirnova et al. 2001), FIS1 (mitochondrial FISSion protein 1) (James et al. 2003), GDAP1 (Ganglioside-induced Differentiation Associated Protein 1) (Niemann et al. 2005) et MFF (Mitochondrial Fission Factor) (Gandre-Babbe and van der Blik 2008).

La fusion est médiée par les mitofusines MFN1 et MFN2 qui fusionnent les membranes externes mitochondriales de 2 mitochondries adjacentes et OPA1 (OPTic Atrophy type 1) qui fusionne les membranes internes mitochondriales (Youle and van der Blik 2012).

MFN1 et MFN2 sont localisées à la membrane externe et sont constituées d'un domaine GTPase N-terminal cytosolique et de deux motifs répétés hydrophobes HR1 et HR2 qui encadrent deux domaines transmembranaires (Karbowski and Youle 2003).

OPA1 est une GTPase de la famille des dynamines, localisée dans l'espace intermembranaire mitochondrial, et retrouvée essentiellement au niveau des crêtes mitochondriales. OPA1 code 8 isoformes par épissage alternatif. Tous les isoformes sont composés d'une séquence d'adressage mitochondriale (MTS) en N-terminal, d'un domaine transmembranaire (TM), d'une séquence à structure coiled-coil ou superhélice, d'un domaine GTPase, d'un motif central très conservé de type dynamine, d'un domaine d'homologie aux pleckstrines et d'un domaine GTPase effecteur (GED) en C-terminal qui régule l'hydrolyse du GTP (Delettre et al. 2000; Olichon et al. 2002). Par homologie avec les protéines de la famille des dynamines GTPases, il a été suggéré que OPA1 puisse être impliquée dans le contrôle de la courbure et de la tubulation de la membrane interne, et donc de la structure des crêtes mitochondriales (Olichon et al. 2003; Griparic et al. 2004).

### 3.2. Pathologies mitochondriales liées à une atteinte de la dynamique mitochondriale

Les pathologies mitochondriales peuvent être dues à une dysfonction de la machinerie de fusion-fission qui permet de garder un équilibre entre les états filamentés et fragmentés. Tilokani et al. a montré dans une liste non exhaustive que les gènes *OPA1*, *MFN2*, *MSTO1*, *DNM1L*, *MFF*, *MIEF1*, *MIEF2*, *DNM2*, *SLC25A46*, *GDAP1* et *INF2* de la dynamique mitochondriale sont liés à des pathologies mitochondriales. Certaines de ces pathologies peuvent présenter un symptôme de surdité neurosensorielle. Des variants d'*OPA1* sont responsables de l'atrophie optique dominante (AOD) et de *MFN2* et *INF2* de la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2A (CMT2A) (Burté et al. 2015; Tilokani et al. 2018).

L'AOD est considérée comme la neuropathie optique héréditaire la plus courante, qui altère la vision centrale. Elle est liée principalement aux mutations d'*OPA1* qui affectent la fusion mitochondriale, le métabolisme énergétique, l'apoptose, les niveaux de calcium et le maintien de l'intégrité du génome mitochondrial. La réduction de la fonction d'*OPA1* entraîne un déséquilibre vers la fission mitochondriale qui conduit à une fragmentation du réseau mitochondrial, à une altération de la phosphorylation oxydative, une augmentation des espèces réactives de l'oxygène et une altération de l'homéostasie du calcium. Dans 15 à 20 % des patients *OPA1*, une surdité neurosensorielle est observée, générant l'AOD<sub>plus</sub> (Delettre et al. 2000; Milone et al. 2009; Leruez et al. 2013).

La maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) représente un groupe de neuropathies héréditaires cliniquement et génétiquement hétérogènes affectant le système nerveux périphérique. Les symptômes typiques de la CMT2A sont une faiblesse et/ou une atrophie musculaire progressive des membres distaux, une démarche en escalier, une perte sensorielle distale et une mobilité réduite. Plusieurs études ont identifié des mutations dans le gène *MFN2*, lié à la fusion mitochondriale, comme étant responsables de la CMT2A. *MFN2* joue un rôle crucial dans la fusion mitochondriale, et fait partie d'un complexe moteur impliqué dans le mouvement des mitochondries (Kijima et al. 2005; Suárez-Rivero et al. 2017).

Un plus grand chevauchement des manifestations cliniques de la CMT2A et de la AOD est apparu avec l'étude d'autres familles touchées. En plus de l'atrophie optique, certains patients atteints de l'AOD présentent des symptômes supplémentaires, notamment une neuropathie motrice-sensorielle périphérique, une surdité neurosensorielle, une atrophie cérébrale, une ataxie cérébelleuse, une ophthalmoplégie externe chronique progressive, une myopathie mitochondriale et

une atteinte psychiatrique (Amati-Bonneau et al. 2008; Hudson et al. 2008). De même, certains patients CMT présentant des mutations de *MFN2* souffrent d'atrophie optique ainsi que de surdité, d'une dysfonction cognitive, d'anomalies cérébrales et cérébelleuses, de parésie des cordes vocales et de scoliose (Chen and Chan 2009).

De nombreuses autres pathologies sont causées par des variants pathogènes de gènes reliés à la dynamique mitochondriale, dont les protéines interagissent ou contrôlent les protéines effectrices de la dynamique mitochondriale. Par ailleurs, la plupart des maladies neurodégénératives communes ou héréditaires, présentent une altération de la dynamique mitochondriale, comme la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington et la sclérose latérale amyotrophique (Suárez-Rivero et al. 2017). Les altérations de la dynamique mitochondriale peuvent causer une baisse de l'efficacité énergétique et une accumulation de mitochondries endommagées, résultant en une baisse de la production d'ATP et une dysfonction du contrôle de qualité mitochondrial (Chen and Chan 2009; Suárez-Rivero et al. 2017).

### 3.3. Implication de la protéine ELMOD2

De nombreuses protéines sont impliquées dans la régulation de l'équilibre entre la fusion et la fission mitochondriale, en particulier en ciblant les grandes GTPases de la famille des dynamines comme MFN1/2 ou OPA1, qui montrent de faibles niveaux intrinsèques d'hydrolyse du GTP. Elles passent d'un état actif lié au GTP à un état inactif lié au GDP, ce qui constitue un élément essentiel de leurs fonctions biologiques. Une hydrolyse plus rapide du GTP nécessite l'action d'une protéine d'activation de la GTPase (GAP). ARL2 (ARF-like 2), membre de la famille ARF, est une GTPase régulatrice de 20 kDa. Elle est activée par les GAPs ELMOD1, 2 et 3 (cell Engulfment and Motility Domain containing), qui font parties de la famille des ELMO domain-containing (Cell Engulfment and Motility) (Newman et al. 2017b).

Cette famille est composée de 6 protéines subdivisée en 2 groupes, les ELMOs et les ELMODs, toutes incluant un domaine ELMO. Trois de ces protéines, ELMO1, 2 & 3, contiennent des domaines supplémentaires, alors que ELMOD1, 2 & 3 ne possèdent que le domaine ELMO. La fonction GAP des ELMODs est assurée par une arginine catalytique, non présente chez les ELMOs, située après un motif en doigt de zinc composé de quatre résidus cystéines espacés de manière spécifique (CX<sub>2</sub>CX<sub>16-18</sub>CX<sub>2</sub>CX<sub>4</sub>R) (Figure 10) (East et al. 2012; Xu and Jin 2017).

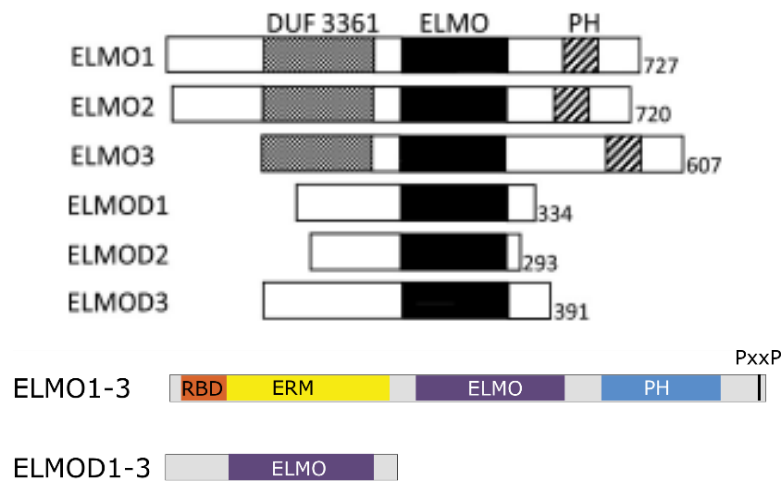


Figure 10 : Représentation des domaines constituant les protéines ELMOs et ELMODs (East et al. 2012; Xu and Jin 2017)

Une étude a établi un lien entre les déficits auditif et l'équilibre entre les deux variants d'ELMOD1 chez des souris. L'analyse du phénotype de ces souris a révélé des défauts morphologiques des stéréocils, acteurs de la mécano-transduction basée sur l'actine des cellules ciliées internes et externes. La morphologie des stéréocils était normale chez les souris nouveau-nées mais progressivement détériorée avec l'âge. De fait, ELMOD1 est essentiel pour le maintien chronique des stéréocils des cellules ciliées (Johnson et al. 2012). En 2019, trois membres d'une famille Iranienne avec un déficit intellectuel et un spectre autistique, mais sans déficit auditif ont été reportés associés à une délétion dans le gène *ELMOD1* (Miryounesi et al. 2019).

Chez l'humain, le variant c.794T>C, p.(Leu265Ser) de *ELMOD3*, ou DFNB88 a été identifié comme cause de surdité non syndromique dans une large famille Pakistanaise incluant 6 individus atteints. La protéine a été localisée dans la cochlée de la souris au niveau des stéréocils des cellules ciliées externes et dans les kinocils des cellules ciliées internes et externes. Un model murin muté pour le variant retrouvé chez cette famille montre l'inactivation de l'activité GAP d'ELMOD3 (Jaworek et al. 2013). Une seconde famille d'origine chinoise a été rapportée avec le variant c.512A>G, p.(His171Arg), associé à une surdité non syndromique (Li et al. 2018).

ELMOD2 a été identifié comme la protéine activatrice (GAP) de ARL2, de la superfamille ARF, une petite GTPase régulatrice fortement conservée exprimée de manière ubiquitaire, localisée dans le cytosol, les centrosomes, le noyau, le réticulum endoplasmique, les gouttelettes lipidiques et les mitochondries (Schiavon et al. 2019). ELMOD2 comporte 293aa et est codée par le gène *ELMOD2* situé en 4q31.1. Les fonctions d'ELMOD2 concernent la fusion mitochondriale, le

métabolisme des graisses des gouttelettes lipidiques dans la cytokinèse et la dynamique des microtubules et des cils (Bowzard et al. 2007; East et al. 2012; Suzuki et al. 2015; Turn et al. 2020).

### 3.3.1. Rôle d'ELMOD2 dans la dynamique mitochondriale

Il existe plusieurs liens fonctionnels entre ARL2 et ELMOD2. ELMOD2 est la seule protéine ELMOD localisée aux mitochondries (Newman et al., 2014), et ARL2 est le seul membre de la famille ARF (sur les ~30 des mammifères) que l'on retrouve de manière similaire à l'intérieur des mitochondries.

Les siRNA ARL2 et ELMOD2 provoquent une fragmentation mitochondriale et un regroupement périnucléaire des mitochondries (Newman et al., 2014). À l'inverse, l'expression d'un mutant ARL2 dominant actif provoque l'allongement des mitochondries en raison d'une augmentation du taux de fusion nécessitant l'action en aval d'ELMOD2 (Newman et al. 2014, 2017a; Schiavon et al. 2019).

Il est reconnu qu'en condition de stress les mitochondries fusionnent, et dans des milieux sans ou appauvris en glucose, l'ARL2 et l'ELMOD2 mitochondriaux augmentent en réponse aux facteurs de stress qui provoquent l'élongation mitochondriale.

En induisant des stress métaboliques inhibant la production de l'ATP comme par le traitement par le 2-deoxyglucose (inhibiteur de la glycolyse), l'oligomycine (inhibiteur du complexe V), la roténone (inhibiteur du complexe I) ou l'antimycin (inhibiteur du complexe III), les mitochondries deviennent fragmentées, en parallèle à une augmentation de marquage d'ARL2 mais pas d'ELMOD2, suggérant qu'ARL2 régule les niveaux d'ATP en préservant l'ultrastructure de la membrane interne mitochondriale, indépendamment de l'action d'ELMOD2 (Newman et al. 2017b).

L'expression d'ARL2 et ELMOD2 est aussi liée à la mitofusine MFN2. En effet, une surexpression de la GTPase et de la GAP dans des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) *mfn2*<sup>-/-</sup> immortalisés, reverse la fragmentation des mitochondries. Cette surexpression est aussi observée dans des MEFs *Mfn1*<sup>-/-</sup> *Mfn2*<sup>-/-</sup>, mais pas *Mfn1*<sup>-/-</sup>. ELMOD2 est donc sensible au niveau de MFN2 (Newman et al. 2017b) et agirait en aval d'ARL2 et en amont des mitofusines (Newman et al. 2014; Schiavon et al. 2019).

En plus de réguler la dynamique des mitochondries, ARL2 en association avec ELMOD2, régule la motilité mitochondriale (Newman et al., 2017 ; Newman et al., 2014), et la colocalisation mitochondriale des protéines ELMOD2, ARL2, MFN1 et MFN2 suggère l'existence d'un complexe

protéique localisé à la membrane externe mitochondriale, qui serait important à la fois pour la fusion et la motilité des mitochondries (Schiavon et al. 2019).

### 3.3.2. Rôle d'ELMOD2 dans la ciliogenèse

Les cils sont composés d'un échafaudage de microtubules appelé axonème, ancré d'un centriole spécialisé appelé corps basal. On retrouve entre les deux, une zone de transition entourée du complexe périciliaire. A la base du cil se trouve une structure qui fournit un support au cil et aux corps basaux, nommé radicelle (Rachel et al. 2012) (Figure 11).

Les cils primaires assurent la médiation de fonctions intracellulaires et intercellulaires essentielles : au cours du développement, le métabolisme, la reconnaissance des stimuli sensoriels, le cycle cellulaire, et autres. Ces cils sont liés aux pathologies humaines appelées ciliopathies, comprenant entre autre la surdité neurosensorielle, le déficience vestibulaire, le syndrome de Bardet-Biedl, la dyskinésie du cil primaire et le syndrome de Joubert (Van der Heiden et al. 2011).

L'audition en particulier nécessite le fonctionnement précis et efficace de cils et stéréocils, l'une des structures clés du processus de mécano-transduction, surface apicale des cellules ciliées, cellules mécano-sensorielles de structure complexe.

ELMOD2 a été localisé chez l'Homme dans les photorécepteurs, plus précisément à la base de l'axonème du segment externe, et à la base du cil connecteur dans la région périciliaire entre le corps basal et le centriole adjacent. Un signal plus faible a été détecté aux radicelles (Turn et al. 2021).

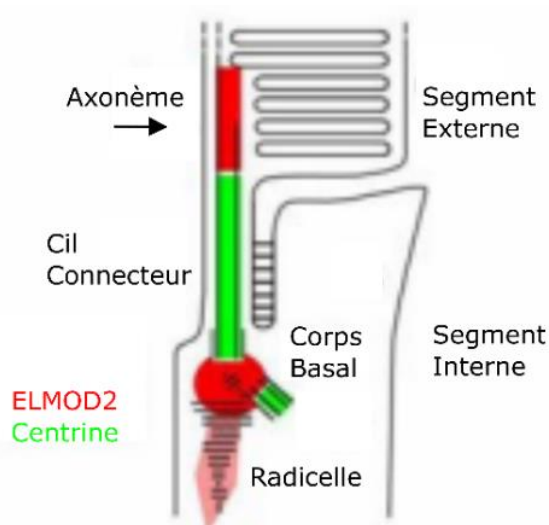


Figure 11 : Localisation d'ELMOD2 sur le cil connecteur du photorécepteur (Turn et al. 2021)

Au côté d'autres protéines, ELMOD2 intervient dans le maintien de l'équilibre de la cytokinèse (division du cytoplasme dans les dernières phases de division cellulaire) avec la dynamique des microtubules et des cils. Seul 2 études ont étudié ces rôles, et ont proposé que ELMOD2, ARL2 et la Rootletin, protéine située dans la partie la plus distale du cil permettant son ancrage, agissent dans une voie commune qui contrôle la ciliation et le maintien de la cohésion des centrosomes.

En effet, un modèle MEF Elmod2 KO, a démontré que la perte d'ELMOD2 entraîne une augmentation de la ciliation (une multiciliation), une morphologie ciliaire anormale, une multinucléation, une polyploïdie, des centrosomes surnuméraires, une perte de l'attachement des radicelles aux centrosomes et une perte de la cohésion des centrosomes. En culture *in vitro*, ces cellules KO se divisent beaucoup plus (index mitotique élevé) que les cellules contrôles, mettant en évidence qu'une perte d'inhibition par contact, et une habilité de croissance indépendante de l'ancrage (absence de N-cadhérine).

Dans ce sens, ELMOD2 inhibe la ciliogenèse non contrôlée, en régulant la morphologie des radicelles, affectant ainsi la capacité des centrioles mères à se développer en corps basaux et à effectuer le recrutement et la libération régulés de facteurs clés dirigeant la ciliogenèse (Turn et al. 2020, 2021).

## V. Surdité dans la population marocaine

Dans l'étude de la génétique des surdités héréditaires de la population marocaine, on considère séparément les Marocains arabo-berbères des Marocains juifs.

### 1. Surdités non syndromiques

Au sein de la population marocaine atteinte de NSHL, deux gènes sont prédominants : *GJB2* et *LRTOMT*. Selon Bakhchane *et al*, en 2016, sur 152 familles présentant une NSHL étudiées au Maroc, les variants *GJB2* sont à l'état homozygote dans 53 familles (34,87 %), à l'état hétérozygote composite dans 4 familles (2,63 %) et hétérozygote dans 9 familles (5,92 %), faisant un totale 66 familles donnant une fréquence de 43,42%. Sept mutations ont été détectées: c.35delG (p.Gly12Valfs\*2), c.109G>A (p.Val37Ile), c.139G>T (p.Glu47Ter), c.224G>A (p.Arg75Gln), c.358\_360delGAG (p.Glu120del), c.385G>T (p.Glu129Ter), c.598G>T (p.Gly200Arg) (Bakhchane *et al.* 2016a). 35 familles additionnelles ont été identifiées avec le variant biallélique 35delG par d'autres équipes, chez des patients atteints de surdité non syndromique (Lench *et al.* 1998; Gazzaz *et al.* 2005; Ratbi *et al.* 2007).

Concernant le gène *LRTOMT*, la substitution c.242C>T (p.Arg81Gln) a été identifiée dans 18 familles NSHL congénitales ou post linguales, sévères à profondes.

Par ailleurs, notre équipe et d'autres ont identifié d'autres gènes et variants responsables de NSHL chez des familles marocaines. Cette liste est non-exhaustive, car elle n'inclut pas les nouveaux gènes en voie de publication (Tableau 7).

Les études génétiques des patients Marocains juifs atteints de NSHL ont identifié 4 variants sur les 3 gènes *MT-RNR1*, *GJB2* et *TMC1* décrits (Shohat *et al.* 1999; Brownstein *et al.* 2011). Néanmoins ces résultats ne semblent pas représentatifs de toute l'hétérogénéité des variants pouvant se trouver chez les Marocains juifs, car rares sont les études réalisées sur des cohortes incluant cette population.

Tableau 7 : Gènes et variants de surdité non syndromique chez la population marocaine

Gène	Variant	Nombre de familles	Source
<i>MT-RNR1</i>	m.1555A>G	3	(Nahili et al. 2010)
		10	(Shohat et al. 1999)
<i>AIFM1</i>	c.1045A>G	1	(Elrharchi et al. 2021)
<i>CLDN14</i>	c.11C>T	1	(Charif et al. 2013)
<i>CLDN9</i>	c.370_372dupATC	1	(Ramzan et al. 2021)
<i>ESPN</i>	c.1757insG	1	(Boulouiz et al. 2008)
<i>GJB2</i>	c.35delG	1	(Lench et al. 1998;
		22	Gazzaz et al. 2005;
		12	Ratbi et al. 2007;
		56	Bakhchane et al. 2016a)
		10	(Brownstein et al. 2011)
	c.109G>A	9	(Bakhchane et al. 2016a)
	c.139G>T	1	(Bakhchane et al. 2016a)
	c.224G>A	1	(Bousfiha et al. 2016; Bakhchane et al. 2016a)
	c.358_360delGAG	1	(Bakhchane et al. 2016a)
c.385G>T	1	(Bakhchane et al. 2016a)	
c.551G>A	1	(AitRaisa et al. 2022)	
c.598G>T	1	(Bakhchane et al. 2016a)	
<i>LRTOMT</i>	c.242G>A	9	(Charif et al. 2012)
<i>MET</i>	c.948A>G	1	(Bousfiha et al. 2019)
<i>MPZL2</i>	c.72delA	1	(Amalou et al. 2021)
<i>MYO15A</i>	c.5203C>T	1	(Salime et al. 2017)
<i>PJVK</i>	c.113_114insT	2	(Ebermann et al. 2007; Salime et al. 2017)
		1	(Salime et al. 2017)
<i>PNPT1</i>	c.1424A>G	1	(von Ameln et al. 2012)
<i>PTPRQ</i>	c.715A>G	1	(Schraders et al. 2010)
<i>SLC22A4</i>	c.338G>A	1	(Chiereghin et al. 2021)
<i>TBC1D24</i>	c.641G>A	2	(Bakhchane et al. 2015a)
		1	(Bakhchane et al. 2015a)
		1	(Bakhchane et al. 2015a)
		1	(Bakhchane et al. 2015a)
<i>TMC1</i>	c.1810C>G	1	(Bakhchane et al. 2015b)
		25	(Brownstein et al. 2011)
<i>TPRN</i>	c.42_52del	1	(Li et al. 2010)

## 2. Surdités syndromiques

De nombreuses surdités syndromiques ont été identifiées dans la population marocaine, avec un total 49 familles portant un variant d'un gène causant les syndromes d'Usher, de Pendred, de Waardenburg, d'Alport parmi les plus fréquents, et les syndromes de Raine, 3MC, de Jervell and Lange-Nielsen, de Perrault moins fréquents dans la population.

Les syndromes d'Usher de types 1 et 2 sont présents au sein de la population marocaine avec les variants dans *MYO7A*: c.1690G>A, c.2283-1G>T, c.655\_660del, et *USH2C* c.1054C>A, c.16544delT chez les Marocains non juifs et *MYO7A* c.2065delC, c.640G>C, c.2476G>A, c.285+2T>G et *USH2A* c.1000C>T et c.5519G>T chez les Marocains juifs.

D'autres syndromes plus rares ont été identifiés par notre laboratoire tel que le syndrome de 3MC, la kératodermie palmoplantaire associé et non associé à une variation de la différenciation sexuelle. Des cas de syndrome de Heimler type 1 causé par *PEX1* (Ratbi et al. 2015; 2016), et un cas de syndrome de Raine dont la cause est un variant faux-sens du gène *FAM20C* (Elalaoui et al. 2016) ont été reportés. Une équipe a identifié pour la première fois le gène *SDR42E1* comme cause du syndrome génital oculocutané (Bouhouche et al. 2021). Une translocation t(X,Y) causant une délétion Xp22.33 impliquant les gènes *SHOX* et *ARSE* est responsable d'une Chondrodysplasie punctata lié à une surdité chez deux frères issus d'un mariage consanguin (Amasdl et al. 2018).

De plus des cas de patients marocains atteints de surdité liée à une myopathie mitochondriale progressive (Di Fonzo et al. 2009), ou à une dystrophie cornéenne endothéliale (Abramowicz et al. 2002), ou à une dystrophie musculaire et insuffisance ovarienne (Foley et al. 2020) ont été reporté (Tableau 8).

Tableau 8 : Gènes et variants de surdité syndromique dans la population marocaine

Gène	Variant	Nombre de familles	Syndrome	Source
<i>ATP6V1B1</i>	c.1169dupC	1	Acidose tubulaire rénale distale	(Boualla et al. 2016; AitRaise et al. 2022)
	c.1155dupC	3		
<i>B4GALT7</i>	c.829G>T	1	Spondylodysplastic Ehlers-Danlos syndrome	(Ritelli et al. 2017)
<i>BSND</i>	c.22C>G	1	Bartter	(Elrharchi et al. 2018)
	c.107C>A	1		
<i>COL4A3</i>	c.3829G > A	1	Alport	(AitRaise et al. 2022; Amalou et al. 2022)
	c.4153G>C	1		
<i>COL9A1</i>	c.883C>T	2	Stickler	(Van Camp et al. 2006; Nikopoulos et al. 2011)
<i>EDNRB</i>	c.1133A>G	1	Waardenburg type IV	(Doubaj et al. 2015; AitRaise et al. 2022)
	c.1225C> T	1		
<i>FAM20C</i>	c.676T>A	1	Raine	(Elalaoui et al. 2016)
<i>GFER</i>	c.581G>A	1	Hypotonie musculaire progressive avec cataracte congénitale, surdité et retard de développement	(Di Fonzo et al. 2009)
<i>GGPS1</i>	c.866G>A	1	Dystrophie musculaire, surdité congénitale et insuffisance ovarienne	(Foley et al. 2020)
	c.854T>G	1		
<i>GJB2</i>	c.224G>A	1	Kératodermie Palmoplantaire	(Bousfiha et al. 2016)
	c.35delG			
<i>GPR98/USH2C</i>	c.1054C>A c.16544delT	1	Usher, type 2	(Bousfiha et al. 2017)
<i>HOXB1</i>	c.66C>G	1	Paralysie faciale congénitale héréditaire et surdité	(Vogel et al. 2016)
<i>KCNQ1</i>	c.1343dupC	1	Jervell and Lange-Nielsen	(Adadi et al. 2017)
<i>LARS2</i>	c.1565C>A	1	Perrault	(Zerkaoui et al. 2017)
<b>locus CDPD1</b> <b>(<i>SLC4A11</i>)</b>	-	1	Dystrophie endothéliale cornéenne et surdité de perception	(Abramowicz et al. 2002)

Tableau 8 suite : Gènes et variants de surdité syndromique dans la population marocaine

Gène	Variant	Nombre de familles	Syndrome	Source
<i>MASP1</i>	c.1426G>A	1	Malpeuch-Michels-Mingarelli-Carnevale (3MC)	(Amalou et al. 2022)
<i>MYO7A</i>	c.1690G>A	1	Usher, type 1	(Boulouiz et al. 2007; Jaijo et al. 2007)
	c.2283-1G>T	1		
	c.655_660del	1		
	c.2065delC	2		
	c.640G>C	1		
	c.2476G>A	5		
	c.285+2T>G	1		
<i>PEX1</i>	c.3140T>C	1	Heimler, type 1	(Ratbi et al. 2015; 2016)
	c.3750G>A	1		
<i>PJVK</i>	c.113_114insT	1	Dystrophie des cônes et des bâtonnets et surdité	(Ebermann et al. 2007)
<i>RSPO1</i>	c.332G>A	1	Désordres du développement sexuel + Kératodermie palmoplantaire	(Naasse et al. 2017)
<i>SDR42E1</i>	c.461G>A	1	Oculocutaneous genital syndrome	(Bouhouche et al. 2021)
<i>SLC29A3</i>	c.243delA	1	H syndrome	(Bakhchane et al. 2016b)
	c.300+1G>C			
<i>SLITRK6</i>	c.696delG	1	Syndrome de myopie forte-surdité neurosensorielle	(Salime et al. 2018)
<i>USH2A</i>	c.1000C>T	3	Usher, type 2	(Adato et al. 2000; Auslender et al. 2008)
	c.4544C>T	1		
	c.5519G>T	1		
<b>t(X;Y)<sup>1</sup></b>	-	1	Chondrodysplasia punctata	(Amasdl et al. 2018)

<sup>1</sup> t(X;Y) donnant une délétion Xp22.33 impliquant les gènes *SHOX* et *ARSE*

## OBJECTIF DE THESE

Les surdités héréditaires englobent les atteintes touchant le sens de l'ouïe, rendant la personne malentendante, partiellement ou totalement sourde. La génétique des surdités héréditaires chez l'enfant a été un sujet d'intérêt majeur au sein de l'équipe LGGH permettant la caractérisation des gènes *GJB2* et *LRTOMT* comme cause principale de la surdité au Maroc.

Grâce aux technologies de séquençage, de nombreux variants de différents gènes au sein de la population marocaine atteinte de surdité congénitale ont été détectés, et ces études ont permis de définir le spectre génétique des surdités trouvées au Maroc.

Le présent travail de thèse poursuit cet élan, par la recherche, l'identification et la liaison de variants et gènes potentiellement nouveaux impliqués dans la surdité, avec l'objectif d'augmenter nos connaissances sur les déterminants génétiques responsables de cette pathologie au Maroc.

Ce manuscrit présente les travaux menés pour répondre aux objectifs suivants :

- Détermination du spectre mutationnel des gènes *GJB2* et *LRTOMT* chez des patients marocains atteints de surdité non syndromique par séquençage Sanger et l'actualisation de leurs fréquences,
- Recherche des gènes et variants pathogènes responsables des surdités héréditaires syndromique et non syndromique au sein de la population marocaine en utilisant les technologies de séquençages de nouvelle génération,
- Etude du réseau mitochondrial chez un patient atteint de surdité portant un variant du gène *ELMOD2* permettant de comprendre son implication dans l'apparition de sa surdité.

# PATIENTS ET METHODES

## I. Patients

Le recrutement de patients atteints de surdité génétique a été réalisé au travers de collaborations mises en place depuis le début du projet d'étude des surdités héréditaires au sein de la population marocaine au sein du Laboratoire de Génomique et Génétique Humain (LGGH) de l'Institut Pasteur du Maroc.

Deux médecins ORL privés, Dr Detsouli et Dr Snoussi   Casablanca, et l'Association Marocaine pour Enfants Sourds (AMES) ont permis de recruter plusieurs dizaines de patients et familles sourdes, ainsi qu'occasionnellement des patients et familles du service de pédiatrie du CHU 20 Août de Casablanca.

En mai 2019, nous avons établis une nouvelle collaboration avec le service ORL du CHU Ibn Rochd, dirigé par le Pr Mahtar, chef de service, et la résidente Dr Halily, qui nous ont fourni 34 familles en 2 ans. Le recrutement de patients a connu un arrêt brutal de Mars 2020   Septembre 2020 d  à la pandémie de la Covid-19. Depuis, le recrutement de patients a progressivement repris, mais reste lent.

Pendant mon travail de thèse, j'ai participé au recrutement de 68 familles atteinte de surdité familiale SF 250   SF 318, et j'ai poursuivi la recherche des causes génétiques de 28 familles recrutées antérieurement.

Nous incluons dans cette étude les surdités congénitales et pré-linguales sans cause environnementale, et les formes syndromiques et non syndromiques. La présence d'une consanguinité et d'une forme de surdité familiale non sporadique sont deux facteurs qui orientent la cause de la perte d'audition vers une origine génétique.

Les familles sont adressées à notre laboratoire à l'Institut Pasteur du Maroc. Un entretien initial permet d'informer les parents de l'intérêt de l'analyse génétique et du concept de la transmission mendélienne. Gr ce à un questionnaire détaillé, nous étudions les dossiers médicaux du ou des patients pour récupérer les données médicales tel que l'étiologie de la surdité, des problèmes ou facteur externes de la grossesse aux premiers mois du patient -afin d'éliminer tout cas de surdité environnementale-, des antécédents familiaux de surdités, et construisons un arbre généalogique (Annexe 1). Le consentement éclairé est signé par tous les participants d'âge majeur, et l'un des parents consent pour leurs enfants mineurs (Annexe 2).

Le prélèvement de sang total est ensuite réalisé sur deux tubes EDTA de 5 ml, pour tous les membres de la famille, parents et enfants atteints de surdité ou non.

## II. Méthodes

### 1. Stratégie expérimentale

La stratégie d'étude dans le laboratoire LGGH après recrutement des patients est la suivante : sur l'ADN du patient, la recherche des mutations *GJB2* et c.242G>A du gène *LRTOMT* chez les patients atteints de NSHL est réalisée par PCR et séquençage Sanger. Les ADN négatifs de ces patients et ceux des patients atteints de surdité syndromiques sont envoyés pour séquençage d'exome *Whole exome sequencing* (WES) à l'un de nos collaborations avec l'Institut Pasteur de Paris et l'équipe MitoLab de l'Institut MitoVasc, à l'Université d'Angers. L'analyse bio-informatique des données recueillies permet de sélectionner des gènes et variants candidats. Les mutations identifiées par WES sont vérifiées par séquençage Sanger pour la validation de la ségrégation familiale (Figure 12).

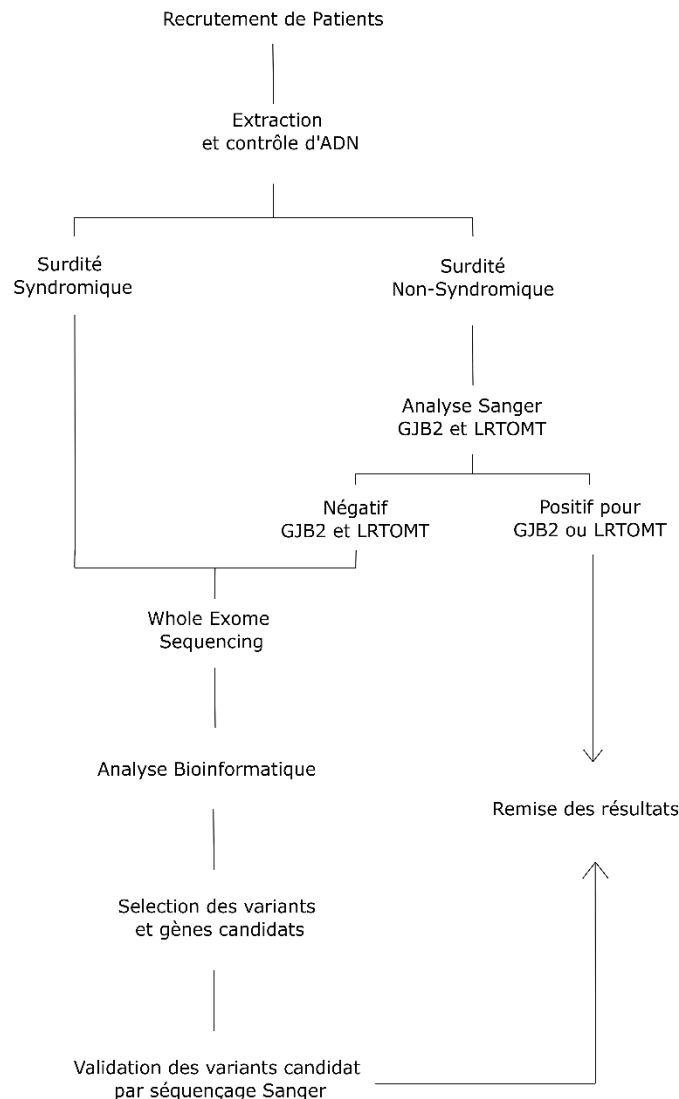


Figure 12 : Représentation de la stratégie de travail

## 2. Extraction d'ADN

### 2.1. Extraction au phénol-chloroforme

#### ○ Principe

Le principe de cette technique est basé sur la solubilisation différentielle des acides nucléiques dans un solvant aqueux et celle des autres molécules (protéines, lipides...) dans un solvant organique (phénol). Le chloroforme est utilisé pour éliminer l'excès de phénol. L'ADN récupéré est solubilisé dans un tampon adéquat pour prévenir toute dégradation mécanique ou enzymatique.

#### ○ Protocole

#### **1. Lyse des globules rouges**

500 µl de sang est soumis à une lyse complète des globules rouges par incubation pendant 15 min à 4 °C dans 800 µl de la solution de Tris-EDTA (TE) (20 :5) (Annexe 3). Après centrifugation à 6500 t/min pendant 15 min et à 4 °C, le culot est récupéré, resuspendu dans le même tampon et recentrifugé dans les mêmes conditions jusqu'à l'obtention d'un culot blanc, constitué de leucocytes qui peut être conservé à 20 °C.

#### **2. Lyse des globules blancs**

Les cellules leucocytaires sont resuspendues dans une solution de lyse cellulaire contenant 300 µl de TE (10 :5), 5 µl de la protéinase K à 20 mg/ml et 100 µl de SDS à 20 %. Le mélange est ensuite incubé à 56 °C toute la nuit.

#### **3. Extraction au phénol – chloroforme**

A un volume de préparation d'ADN, est ajouté un volume de phénol saturé. L'ensemble est mélangé vigoureusement jusqu'à l'obtention d'une solution d'aspect crémeux. Une centrifugation à 6500 t/min pendant 15 min, permet de séparer deux phases : la phase supérieure aqueuse qui renferme les acides nucléiques, et la phase inférieure contenant les extraits cellulaires et les protéines. A l'aide d'une micropipette, la phase aqueuse est récupérée.

Un volume de chloroforme-alcool isoamylique (24 :1) est ajouté à la phase aqueuse pour éliminer l'excès du phénol. Après centrifugation à 6500 t/min pendant 15 min, la phase supérieure aqueuse est récupérée. Cette étape est répétée deux fois afin d'augmenter la pureté de l'ADN.

#### **4. Précipitation de l'ADN**

1 ml d'éthanol absolu (96 %) à -20 °C est ajouté à la préparation d'ADN. La méduse est obtenue après agitation douce. Une centrifugation à 6500 t/min pendant 15 min permet de précipiter la méduse et la coller sur la paroi du tube. L'éthanol absolu est éliminé. 500 µl d'éthanol 70% est

ajouté à la méduse puis centrifuger à 6500 t/min pendant 15 min afin de rincer cette dernière. L'éthanol est éliminé et les tubes sont mis à sécher à l'air libre ou sous la hotte. L'ADN est resuspendu dans 50 µl de TE (10 :1) et est alors conservé à -20 °C.

## 2.2. Extraction par kit Qiagen

### ○ Principe

L'ADN se lie spécifiquement à la membrane de gel de silice de QIAamp pendant que les contaminants traversent cette dernière. Les inhibiteurs de la PCR, tels que les cations et les protéines divalents, sont complètement éliminés en deux étapes de lavage efficaces, laissant l'acide nucléique pur s'échapper soit dans l'eau, soit dans un tampon fourni dans le kit. Ce kit permet de produire de l'ADN génomique, mitochondrial ou viral à partir de sang et de liquides corporels prêt à être utilisé dans les procédures de PCR et de transfert.

### ○ Protocole

Dans un tube Eppendorf de 1,5 ml, 200 µl de sang, 20 µl protéase et 200 µl de tampon de lyse Buffer AL sont mixé par vortex. Le mélange est ensuite incubé à 56 °C pour 10 min puis centrifugé brièvement. 200 µl éthanol pur (96-100 %) sont ajoutés et mixé par vortex et centrifugation brève.

La totalité du mélange est alors pipetée dans la colonne QIAamp Mini placée sur un tube collecteur de 2 ml. Après une centrifugation à 6000 x g (8000 rpm) pendant 1 min le tube collecteur et la solution collectée sont éliminés. La colonne est placée sur un nouveau tube collecteur à laquelle est ajouté 500 µl du tampon de lavage Buffer AW1 et centrifugée à 6000xg (8000 rpm) pendant 1 min. Le tube collecteur contenant la solution collectée est à nouveau éliminé et remplacé par un nouveau. 500 µl du tampon de lavage Buffer AW2 sont ajoutés à la colonne puis centrifugé à 20 000 x g (14 000 rpm) pendant 3 min. La solution récoltée est éliminée, le tube collecteur remis sous la colonne ; et afin d'éliminer toute solution potentiellement présente dans la colonne une centrifugation à vitesse maximale pendant 1 min est réalisée.

La colonne est placée dans un tube Eppendorf de 1,5 ml à laquelle est ajouté entre 50 à 200 µl du tampon d'élution AE. Après incubation de 2 min à température ambiante (15-25 °C), la colonne et le tube sont centrifugés à 6000 x g (8000 rpm) pendant 1 min. L'ADN élué peut être conservé à -20 °C (Figure 13).

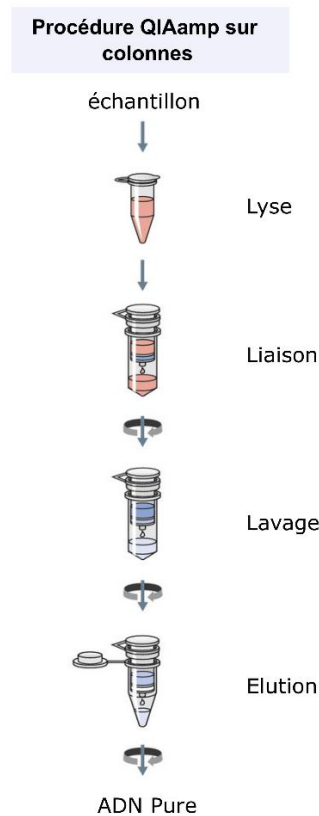


Figure 13 : Procédure d'extraction par QIAamp sur colonnes

### 2.3. Mesure de la concentration et contrôle qualitatif de l'ADN

La quantité et la qualité de l'ADN extrait sont déterminées par dosage spectrophotométrique à l'UV au NanoDrop. La concentration de l'ADN est mesurée par absorbance de la solution obtenue après extraction à 260 nm. Le rapport des densités optiques à 260 nm et à 280 nm permet d'évaluer le degré de contamination de l'ADN par les protéines. De même, le rapport des absorbances à 260 nm et à 230 nm permet d'évaluer la présence des traces de phénol. Si ces deux rapports sont compris entre 1,8 et 2 l'ADN est considéré de bonne qualité.

Une électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % permet d'apprécier l'intégrité de l'ADN visualisé en UV (Annexe 3).

## 3. Amplification génique par PCR

### o Principe

L'amplification par PCR ou *Polymerase-Chain-Reaction* est une technique d'amplification *in vitro* d'une séquence d'ADN par l'action de la Taq-Polymerase. Le principe de la PCR est basé sur la synthèse du brin complémentaire par une ADN polymérase (Taq polymérase) thermorésistante activée par le MgCl<sub>2</sub> et initiée par la fixation d'un oligonucléotide spécifique (amorce) sens ou *forward* (F) et anti-sens ou *reverse* (R) capables de s'hybrider sur l'ADN matrice

de façon opposée. La réplication se fait dans le sens 5' vers 3' par incorporation progressive des nucléotides libres (dNTPs : désoxynucléotides) à la suite de la formation d'un pont phospho-diester entre le groupement OH de l'extrémité 3' de la chaîne et l'extrémité 5' du groupement phosphate du dNTP correspondant. Le nombre de cycle (25 à 35), la durée et la température des différentes étapes sont spécifiques à chaque réaction PCR.

○ Protocole

La PCR a été réalisée par 2 protocoles différents (Tableau 9).

Le protocole de la Taq ADN polymérase Vazyme 5 U/μl (#P101), requière 0,15 μl de Taq (5 U/μl), 20 ng d'ADN génomique, 0,3 μl de dNTP 10 mM, 1,5 μl du 10×PCR Buffer, 0,6 μl de chacune des amorces sens et anti-sens de 10 μM et de l'H<sub>2</sub>O stérile pour compléter le volume à 15 μl.

La PCR effectuée par HotGoldStar Mix Eurogentec (PK-0072-02), comporte 20 ng d'ADN génomique, 7,5 μl de HotGoldStar Mix (contenant la HotGoldStar ADN polymérase, dNTPs à 200 μM, MgCl<sub>2</sub> à 1,5 mM, tampon pH) et 0,35 μl de chacune des amorces sens et anti-sens de 10 μM et de l'H<sub>2</sub>O stérile jusqu'à atteindre 15 μl.

Les amorces sont désignées par le programme Primer3 sur la base de la séquence de référence hg19.

Tableau 9 : Mélange réactionnel PCR

Mélange réactionnel	Protocole Taq ADN polymérase (Vazyme)	Protocole HotGoldStar Mix (Eurogentec)
<b>Taq (5 U/μl)</b>	0,15 μl	-
<b>MasterMix</b>	-	7,5 μl
<b>Amorce F (10 μM)</b>	0,6 μl	0,35 μl
<b>Amorce R (10 μM)</b>	0,6 μl	0,35 μl
<b>dNTPs (10 mM)</b>	0,3μl	-
<b>10×PCR Buffer</b>	1,5 μl	-
<b>H<sub>2</sub>O stérile</b>	9,85 μl	4,8 μl
<b>ADN (10 ng/μl)</b>	2 μl	2 μl
<b>Volume finale</b>	15 μl	15 μl

### 3.1. Recherche de mutation dans le gène *GJB2* et *LRTOMT Ex8*

La recherche de mutation sur l'exon codant du gène *GJB2* et *LRTOMT* se fait par séquençage direct de Sanger grâce aux amorces du tableau 10. Les PCR des deux gènes sont réalisées par l'un des deux protocoles du tableau 9 décrit et différent dans les programmes.

Le programme de la PCR *GJB2* commence par une dénaturation initiale à 95 °C pendant 5 min, suivi de 5 et 30 cycles dont la température d'hybridation est respectivement de 58 et 60 °C. Les 2 cycles commencent par une dénaturation à 95 °C pendant 30 s, une hybridation pendant 35 s et une élongation à 72 °C pendant 1min. Une élongation finale est réalisée à la fin des 35 cycles à 72°C pendant 7 min.

Le programme de *LRTOMT* commence par une dénaturation initiale à 95 °C pendant 5 min, ensuite 35 cycles comprenant chacun une dénaturation à 95 °C pendant 30 s, une hybridation à 58 °C pendant 35 s et une élongation à 72 °C pendant 40 s. Une élongation finale est réalisée à la fin des 35 cycles à 72 °C pendant 7 min.

Tableau 10 : Séquences d'amorces *GJB2* et *LRTOMT*

Gène	Amorce Sens 5'→3'	Amorce Anti-sens 5'→3'	Longueur en pb
<i>GJB2</i>	AGAGTTGGTGTGTTGCTCAGGA	GACTGAGCCTTGACAGCTGA	788
<i>LRTOMT</i>	AGGATAATAATTGCTACTGGCAAAA	ATCCCAAATATTCCTTCACTGTCTT	423

Une électrophorèse sur gel d'agarose à 2 % permet d'apprécier l'intégrité de l'ADN visualisé en UV.

## 4. Séquençage de Sanger

### ○ Principe

La détermination de la succession des nucléotides d'un fragment d'ADN ou séquençage est très utilisée pour identifier ou confirmer la présence d'une mutation par comparaison à la séquence de référence. Le principe de séquençage automatique selon la réaction de Sanger repose sur l'utilisation de didéoxynucléotides (ddNTP : ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) marqués par quatre fluorochromes de couleurs différentes (vert, rouge, bleu, noir) et de spectre d'émission spécifique. Les ddNTPs présentent une extrémité 3'H différente de l'extrémité 3'OH des dNTPs ce qui empêche la formation de la liaison phosphodiester entre le ddNTP incorporé et le nucléotide suivant interrompant ainsi l'élongation de la chaîne d'ADN en cours de synthèse. On obtient un mélange de plusieurs fragments de différentes tailles. Ces fragments sont séparés par une électrophorèse sur

capillaires remplis du gel polymère POP7 à l'aide d'un séquenceur automatique 'ABI 3130 Genetic Analyser' (Applied Biosystems). La déduction de la séquence initiale se fait par conversion des signaux émis par les fluorochromes en nucléotides correspondants.

○ Protocole

Les fragments amplifiés sont purifiés par l'action de deux enzymes. L'exonucléase I (EXO I) dégrade les amorces monobrins en excès et la phosphatase alcaline (PSA) déphosphoryle les dNTPs. A 3 µl de produit PCR sont ajoutés 2 µl d'ExoProStar (Fisher scientific) et 1 µl d'H<sub>2</sub>O stérile. Le mélange réactionnel est incubé au thermocycleur pendant 30 min à 37 °C puis 15 min à 80 °C.

Purifiés, les produits PCR subissent la réaction de séquençage selon le protocole du kit « BigDye Terminator V3.1 cycle sequencing » (Applied Biosystems) détaillé dans le tableau 11. La réaction de séquence par PCR est effectuée dans les conditions suivantes : une dénaturation initiale à 96 °C pendant 2 min suivie de 25 cycles comprenant chacun une dénaturation à 96 °C pendant 10 s, une hybridation à 50 °C pendant 5 s et une élongation à 60 °C pendant 4 min.

Tableau 11 : Mélange Réactionnel pour séquençage Sanger

Mélange réactionnel	Volume (µl)
Produit PCR purifié	3
BigDye sequencing Buffer (5X)	2
Ready Reaction Premix (BigDye)	1
Amorce F ou R (10µM)	0,32
H <sub>2</sub> O stérile	3,68
Volume final	10

Les produits de séquençage sont précipités en ajoutant 35 µl d'éthanol absolu (100 %) à température ambiante et 5 µl d'EDTA (125 mM). Le mélange est agité délicatement par inversion puis centrifugé à 4500 t/min à 12 °C pendant 40 min. L'élimination du surnageant est obtenue par une brève centrifugation des tubes à l'envers pendant 30 s à 1200 t/min et pendant 1 min à 3000 t/min pour l'élimination de l'excès de l'éthanol. 35 µl d'éthanol 70 % sont ensuite ajoutés au précipitât. Le mélange est centrifugé à 15 min à 3500 t/min. Le surnageant est éliminé de la même façon à la suite d'une centrifugation des tubes à l'envers pendant 30 s à 1200 t/min et 1min à 3000 t/min pour éliminer l'excès d'éthanol. Les produits de séquençage sont solubilisés dans 15 µl du tampon d'injection Hi-Di- formamide (Applied Biosystems).

Les produits de séquence sont chargés dans le séquenceur ABI 3130 Genetic analyser. Les tracés électrophorétiques sont lus par des logiciels appropriés tels que : BioEdit, Ugene ou SeqScape.

## 5. Analyse des marqueurs STR du gène *MPZL2*

Le marqueur STR (*Short Tandem Repeats*) est un type de microsatellite, une répétition en tandem qui comporte des unités répétitives. L'utilisation des amorces spécifiques à une région chromosomique contenant un marqueur microsatellite polymorphe permet l'amplification d'un fragment génomique. L'amplification du marqueur polymorphe permet l'obtention des fragments d'ADN de différentes tailles.

### 5.1. Amplification des marqueurs

Les amorces sens sont marquées et doivent rester à l'abri de la lumière. L'amplification des marqueurs a été réalisée par PCR classique. La température d'hybridation du marqueur D11S4195 est 58 °C, des marqueurs D11S1341, RH70809 et D11S1364 de 58 °C, et enfin celle du marqueur D11S4104 de 60 °C. Le temps d'élongation est de 40 s pour tous les marqueurs (Tableau 12).

Tableau 12 : Séquence d'amorces des marqueurs STR

Marqueur	Amorce Sens 5'→3'	Amorce Anti-sens 5'→3'	Gamme de taille des allèles (pb)
<b>D11S4195</b>	GTGGCCCAGGCTGTTC	GCTGCTAAATGTCACACTGAGA	269 – 289
<b>D11S1341</b>	CCCAGTCCTCTCTCTCTCTC	ACAGATGCTCTTCAAAGCAA	167 – 181
<b>RH70809</b>	TAGAAGCAGCCATTACCAAC	CTGTCTGTGTGAGGCAGAG	85 – 196
<b>D11S1364</b>	ACTCCAGCCTGGGCAA	GATAGATGGATCATGGATACAGG	134 – 144
<b>D11S4104</b>	GGAGAATGGCCTGAACCTG	ATCTCTATCATGGGCAATTTGG	183 – 200

### 5.2. Purification des produits PCR

Les échantillons sont déposés dans une plaque de 96 puits (utilisée pour cette expérimentation) ou des tubes individuels auxquels les billes 'Agencourt AMPure XP reagent' (2 x le volume de l'échantillon) sont ajoutées à chaque échantillon. Le mélange est mixé par aspiration/refoulement, la suspension est incubée à température ambiante pendant 5 min.

La plaque 96 puits est placée sur un portoir magnétique jusqu'à ce que la solution soit claire (au moins 3 min). Le surnageant est éliminé sans toucher au culot. Un rinçage à l'éthanol 70 % est effectué en ajoutant 150 µl d'éthanol 70 % (500 µl pour les tubes) par échantillon et incubé pendant

30 s. La plaque est décalée d'une colonne sur le portoir magnétique de manière à faire migrer le culot de billes, puis remise à sa position initiale (Figure 14).

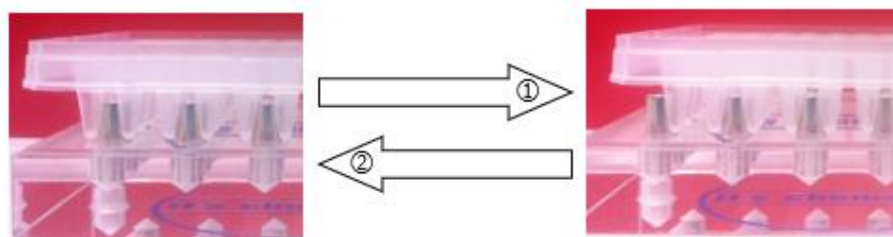


Figure 14 : Lavage par billes magnétiques sur plaque de 96 puits

Le surnageant est éliminé et le lavage à l'éthanol 70 % est répété une seconde fois. Après le second lavage, le surnageant est à nouveau éliminé. La plaque est centrifugée rapidement et l'éthanol résiduel est éliminé en laissant sécher le culot à l'air libre pendant 5 min maximum. La plaque est retirée du portoir magnétique et 20  $\mu$ l d'eau nucléase free est ajoutée sur chaque culot de billes mélangée par aspiration/refoulement 5 fois. La plaque est placée à nouveau sur un portoir magnétique jusqu'à ce que la solution devienne claire (au moins 1 min). Le surnageant contenant les amplicons purifiés est transféré dans un tube de 1,5 ml.

Un mix Hi-Di- formamide / 'GeneScan™ 350 ROX™ dye Size Standard' (Applied Biosystems) est préparé : 2  $\mu$ l de Rox + 16  $\mu$ l Hi-Di- formamide (par échantillon). 2  $\mu$ l du produit PCR purifié sont ajoutés au 18  $\mu$ l du mix.

Les échantillons sont chargés dans le séquenceur ABI 3130 Genetic analyseur (Applied Biosystems). La longueur des fragments est déterminée par le logiciel Peak Scanner Software 1.0.

## 6. Analyse d'exome par WES

Le séquençage entier d'exome (WES) a été réalisé sur un patient par famille atteint de surdité. En séquençant toutes les régions codantes du génome (exons), ainsi que les sites accepteurs et donneurs d'épissage, le WES identifie des variants responsables des maladies mendéliennes (Ng et al. 2010). Le WES de nos patients a été donc réalisé à deux endroits différents : IntegraGen sur un séquenceur HiSeq 2000 sequencer (Illumina, San Diego, CA, USA) et BGI Tech Solutions™ sur un séquenceur BGISEQ-500.

Ces deux technologies se regroupent dans les étapes fondamentales mais divergent dans les technologies utilisées dans le but d'obtenir les séquences des parties cibles de l'ADN. Nous allons tenter ci-dessous de donner une vision simplifiée des deux procédés.

## 6.1. Illumina HiSeq 2000

### a. Préparation de la librairie d'ADN

La préparation de la librairie d'ADN commence par sonication des fragments d'ADN en petits fragments plus faciles à gérer d'environ 200 à 300pb, ensuite une fixation des courtes séquences 62 d'oligonucléotidiques appelée adaptateur sont attachées à l'extrémité de chaque brin d'ADN. Les fragments d'ADN liés à l'adaptateur sont ensuite amplifiés par PCR et purifiés sur gel pour obtenir une librairie d'ADN.

### b. Amplification clonale

La librairie d'ADN obtenue pour chaque échantillon est dénaturée en simple brin par la suite fixé sur une surface d'un support solide. Des amorces complémentaires se fixent aux adaptateurs qui sont déjà fixés aux extrémités de l'ADN, après il y a formation de ponts (*bridges*) d'amplification par PCR, l'ADN double brin est ensuite dénaturé en ADN simple brin. Les brins nouvellement synthétisés initient la synthèse d'autres brins par polymérisation en utilisant de l'ADN polymérase. Cette étape se répète plusieurs fois jusqu'à avoir 1000 copies identiques pour chaque brin formant des clones nommés « clusters » et pour obtenir à la fin près de 40 millions de clusters. Lorsque la génération du cluster est terminée, les modèles sont prêts pour le séquençage.

### c. Séquençage

Le séquençage de l'exome a été effectué directement sur les clusters sur la plate-forme Illumina HiSeq2000 avec la capture des exons avec le kit Agilent SureSelect Human All Exon V5 50 Mb. Ces amorces s'hybrident aux extrémités des exons. Une étape d'élongation est réalisée base par base pour la formation du brin complémentaire à la matrice en utilisant 4 nucléotides marqués par une fluorescence. Grâce à un rayon laser le nucléotide fixé est excité générant par la suite un signal fluorescent. Le marqueur fluorescent est par la suite clivé permettant la fixation à la suite de nucléotide. Et ainsi, le processus se poursuit jusqu'à ce que des millions de clusters aient été séquencés

## 6.2. BGI Tech Solutions™ sur un séquenceur BGISEQ-500

### a. Préparation de la librairie

L'ADN subit une fragmentation par sonication en petits fragments de 150 et 250 pb en utilisant la technologie Covaris, puis les fragments sont liés à des séquences adaptatrices. Ces fragments sont ensuite amplifiés par PCR, et hybridés sur la puce d'enrichissement. La technique d'enrichissement utilisée repose sur le principe d'enrichissement par capture, dans laquelle des

sondes d'ADN ou d'ARN simple brin sont utilisées pour la capture des fragments d'intérêts. Les fragments capturés sont prêts à l'amplification clonale et le séquençage.

### b. Amplification de la librairie

L'amplification clonale est réalisée par la technologie *DNA Nanoball* (DNB) réalisé en deux principales étapes. Premièrement la production des ADN simple brin (ADNsb) circulaire (Figure 15) qui commence par la dénaturation de l'ADN double brin (ADNdb) avec ses séquences adaptatrices liées aux extrémités terminales. Ensuite un oligonucléotide avec une séquence complémentaire aux extrémités 5' et 3' terminales de l'ADNsb s'hybride aux extrémités pour former une entaille, qui est ensuite réparée à l'aide d'une ADN ligase et forme ainsi un ADNsb circulaire.

La deuxième étape correspond à la formation des DNB à partir des ADNsb circulaires formés utilisant la technique *Rolling Circle Amplification* (RCA), pour obtenir de 100-1000 copies à l'aide d'une polymérase *phi29* (Figure 15). Ce processus permet d'amplifier les signaux fluorescents lors du séquençage et de diminuer de façon très importante l'accumulation exponentielle des erreurs de séquençage en comparaison avec la PCR. En effet, l'amplification linéaire dans la RCA utilise toujours le même brin de départ comme cible, et donc impossible de faire des erreurs dans la même position tout au long des 100-1000 copies (Fehlmann et al. 2016; Zhou et al. 2019).

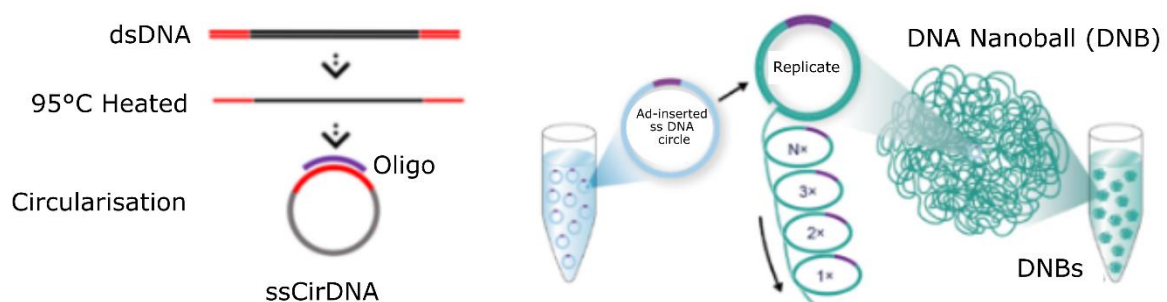


Figure 15 : Etapes de la formation des DNB développé par BGI™

(adapté de en.mgi-tech.com)

### c. Séquençage

Le séquençage sur BGISEQ-500 repose sur la technologie '*cambinatorial Probe-Anchor Synthesis*' (cPAS). Les DNB formés sont dispersés et immobilisés sur la puce de séquençage (Figure 16) par un appareil de chargement. Lors du séquençage, la technique cPAS utilise une sonde hybridée à l'adaptateur du DNB, et durant chaque cycle, l'ADN polymérase incorpore une base marquée avec un groupe de fluorescence, et les quatre signaux lumineux colorés émis par les bases sont collectés via un système d'imagerie à haute résolution et convertis en bases après un appel de base (*Base calling*) utilisant DNBseq basecalling Software.

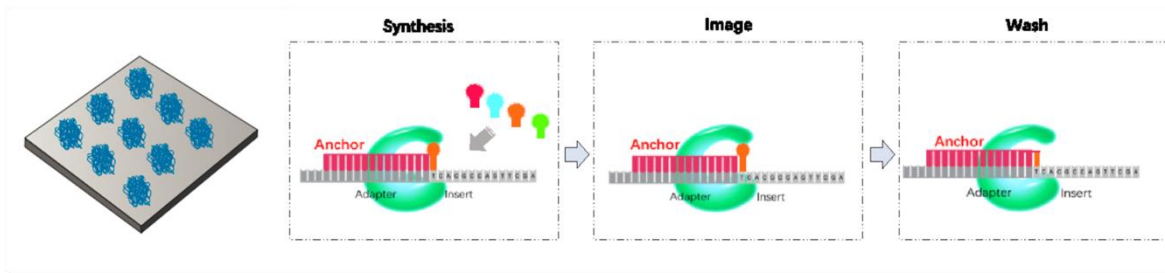


Figure 16 : Chargement de la puce, et processus de séquençage par la technique cPAS (adapté de en.mgi-tech.com)

### 6.3. Analyse bio-informatique

L'analyse finale a été faite sur le fichier VCF (Variant Calling Format) reçu de la société BGI, dans lequel on trouve toutes les variations trouvées chez les patients, et les informations nécessaires à leurs annotation et priorisation, notamment leur position génomique, statut des variations (hétérozygote ou homozygote), fréquence allélique dans les bases de données 1000G et GnomAD, ainsi que les résultats des différents outils de prédiction.

Afin d'identifier le ou les variants pathogènes responsables des symptômes cliniques chez les patients, une série de filtre a été effectuée. Nous avons tout d'abord limité la recherche aux variants trouvés dans les gènes connus dans la survenue de surdité (Annexe 4). Ensuite, nous avons sélectionné les variants homozygotes ou hétérozygotes composites causant des changements faux-sens, non-sens, de décalage du cadre de lecture et affectant le site d'épissage avec des fréquences alléliques < 0,01 à l'aide de bases de données SNP telles que le 1000Genomes et gnomAD ont été examiné.

L'évaluation de la pathogénicité a été faite en utilisant des outils de prédiction *in silico* notamment, les outils SIFT, Polyphene2, et Mutation Taster, Mutation Assessor. L'outil Human Splicing Finder a été utilisé pour l'évaluation des variants introniques altérant les sites d'épissages.

Lorsque l'analyse des variants portée sur la liste de gènes de surdité ne permet pas de relever quelconque variants candidats, nous passons à l'analyse du reste des gènes. Ceci nous permet l'identification de nouveaux gènes pouvant potentiellement être impliqués dans la surdité.

Tableau 13: Bases de données et outils bio-informatiques de prédiction de pathogénicité utilisés

Base de données / sites	Adresse
<i>Ensembl</i>	<a href="http://www.ensembl.org">http://www.ensembl.org</a>
<i>OMIM</i>	<a href="https://www.omim.org/">https://www.omim.org/</a>
<i>The Human Protein Atlas</i>	<a href="https://www.proteinatlas.org/">https://www.proteinatlas.org/</a>
<i>Hereditary Hearing Loss</i>	<a href="https://hereditaryhearingloss.org">https://hereditaryhearingloss.org</a>
<i>Deafness Variation Database</i>	<a href="https://deafnessvariationdatabase.org/">https://deafnessvariationdatabase.org/</a>
<i>Varsome</i>	<a href="https://varsome.com/">https://varsome.com/</a>
<i>gnomAD</i>	<a href="https://gnomad.broadinstitute.org/">https://gnomad.broadinstitute.org/</a>
<i>Hman Genetic Mutation Database</i>	<a href="http://hgmd.org">http://hgmd.org</a>
<i>Human Phenotype Ontology</i>	<a href="https://hpo.jax.org/app/">https://hpo.jax.org/app/</a>
<i>Uniprot</i>	<a href="https://www.uniprot.org/">https://www.uniprot.org/</a>
<i>NeXtprot</i>	<a href="https://www.nextprot.org/">https://www.nextprot.org/</a>
<i>NHLBI ESP</i>	<a href="https://evs.gs.washington.edu/EVS/">https://evs.gs.washington.edu/EVS/</a>
<i>PDB :Protein DataBase</i>	<a href="http://www.pdb.org">http://www.pdb.org</a>
<i>Genome-Browser</i>	<a href="http://www.genome.ucsc.edu">http://www.genome.ucsc.edu</a>
Outils de prédiction	Adresse
<i>PolyPhen2</i>	<a href="http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/">http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/</a>
<i>SIFT</i>	<a href="http://sift-dna.org">http://sift-dna.org</a>
<i>Mutation Assessor</i>	<a href="http://mutationassessor.org/r3/">http://mutationassessor.org/r3/</a>
<i>Mutation Taster</i>	<a href="https://www.mutationtaster.org/ChrPos.html">https://www.mutationtaster.org/ChrPos.html</a>
<i>CUPSAT</i>	<a href="http://cupsat.uni-koeln.de">http://cupsat.uni-koeln.de</a>
<i>SDM Site</i>	<a href="http://www-cryst.bioc.cam.ac.uk/~sdm/sdm.php">http://www-cryst.bioc.cam.ac.uk/~sdm/sdm.php</a>

## 6.4. Analyse de co-ségrégation

Les variants candidats ont été amplifiés par PCR, à l'aide d'amorces conçues via Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>). Pour confirmer la ségrégation des mutations, un séquençage Sanger de tous les membres de la famille disponibles a été effectué avec le kit de réaction de séquençage ABI Big-Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) et analysé sur l'analyseur génétique ABI 3130 (Applied Biosystems). Le logiciel UGENE v36.0 a été utilisé pour analyser les séquences des chromatogrammes.

Tableau 14 : Séquences d'amorces de ségrégation

Gène	Amorce Sens 5'→3'	Amorce Sens 5'→3'	Longueur en pb
<i>MPZL2</i>	TGTCAGCAGAAGTTCTCACAATAC	GAAAGGAGAAATGGACTGGC	306
<i>COL4A3</i>	CGTGAGGCCATCATCTTCTT	TGCCCTAAAGTGTATTTGTTCA	399
<i>MASP1</i>	CCTAACAGGGTGAGGAGCTG	TGCCAGAGACAGACCAGGAT	394
<i>ELMOD2</i>	TGAACCACAAGCTATGAAAGAC	AGCGTTCAACAACCTCCACAT	242

## 7. Modélisation moléculaire

Les variants faux-sens confirmés chez les familles ont été étudiés *in silico* par modélisation moléculaire afin de visualiser les changements de liaison et de conformation théorique induits par le changement d'acide aminé.

### 7.1. Structure tridimensionnelle des protéines

La base de données pdb (rcsb.org) contenant les structures protéiques obtenues par cristallographie a été consultée en premier sans trouver de modèle pour les protéines COL4A3 et MASP-1.

Les séquences d'acides aminés de COL4A3 [Q01955] et MASP-1 [P48740] ont été obtenues à partir de la base de données UniProt (consulté en janvier 2021) sous format FASTA. La structure 3D du domaine sérine protéase de MASP-1 a été prédite en utilisant le serveur en ligne SWISS-MODEL (consulté en janvier 2021). Parmi les modèles proposés, la structure a été sélectionnée sur la base de l'identité de séquence et de la fonction QMEAN (Waterhouse et al. 2018).

La région triple hélice COL4A3, de l'acide aminé 43 à 1438 a été modélisée par le serveur I-TASSER (Yang et al. 2015) (consulté en janvier 2021) car aucun modèle incluant les acides aminés ciblés n'a pu être généré par le serveur SWISS-MODEL. La minimisation de l'énergie pour toutes les structures 3D a été effectuée avec le serveur de minimisation YASARA (Krieger et al. 2009).

### 7.2. Analyse des changements de structures locales

La visualisation et l'analyse de la différence des liaisons hydrogène et hydrophobe entre les acides aminés de la protéine de type sauvage et sa forme mutée ont été réalisées à l'aide du logiciel YASARA (version 20.12.24) (Krieger and Vriend 2014).

Le changement de stabilité de la protéine dû aux modifications d'un seul acide aminé a été prédit à l'aide des outils bioinformatiques mCSM (Pires et al. 2014), SDM (Worth et al. 2011) et DUET (unimelb.edu.au) (consulté en février 2021).

## 8. Etude du réseau mitochondrial des fibroblastes

### 8.1. Matériel biologique

Une biopsie de peau du patient (SF242-IV:2) et de sa mère (SF242-III:2) a été réalisée avec un punch de 4mm après désinfection cutanée à la Chlorexidine au CHU Ibn Roch de Casablanca et mise dans 50 ml de DMEM. La mise en culture des deux biopsies a été réalisée le lendemain au service de cytogénétique à l'IBS à Angers.

Chaque biopsie a été découpée en 12 morceaux de taille équivalente et divisées équitablement sur 2 flask T25. Les fibroblastes sont cultivés dans 2/3 de milieu DMEM contenant 25mM de glucose et 1/3 d'Amniomax, supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF). Toutes les cellules sont cultivées à 37°C, dans des conditions à 5% d'atmosphère humidifiée en CO<sub>2</sub>. Le test mycoplasme était négatif dans les 2 flasques.

### 8.2. Culture des fibroblastes

La culture des fibroblastes est maintenue sur des T75. A confluence, le milieu de culture est éliminé à la pipette 10ml, 5ml de PBS sont ajoutés. La flask est agitée très doucement puis vidée. 2 ml de Trypsine sont ajoutés et répartis uniformément sur le fond de la flask, incubée pendant 6mn dans l'incubateur à 37°C. La flask est ensuite récupérée et frappée sur les côtés pour décoller les cellules. (Si besoin, une flask neuve est préparée pendant l'incubation). 4ml de milieu de culture sont alors ajoutés pour arrêter l'activité de la trypsine. A l'aide d'un cône 200µl fixé à une pipette 5ml, plusieurs reflux sont effectués sur le fond de la T75 pour décoller et individualiser les cellules. 4ml de la suspension cellulaire sont éliminées et la flask est complétée avec 12ml de milieu de culture et placée dans l'incubateur à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

### 8.3. Mitotracker

La visualisation du réseau mitochondriale a été réalisée par Mitotracker® Green (100µM) (Molecular Probes, CA USA) avec des fibroblastes témoins. Ce *mitotracker* est un fluorophore avec la propriété de se fixer sur les membranes chargées des mitochondries.

Sur une plaque ibidi 4 puits, 50µl de suspension cellulaire (~ 30 000 cellules) et 800µl de milieu placé dans l'incubateur 24h à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Un mélange de 2ml de milieu et 0,5 µl de mitotracker est préparé. Après élimination de tout surnageant, 500µl du mélange est ajouté dans chacun des puits. La plaque ibidi est incubée pendant 30min à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> avant la lecture.

## 8.4. Microscopie et traitement d'image

Les images de fluorescence sont réalisées par microscopie à champ large Nikon Ti-E inversé (Nikon Instruments Europe) équipé d'une caméra Evolve® 512 (Photometrics®), cette caméra ayant des pixels de 16µm. Les images sont obtenues en utilisant un objectif d'huile 100x (APO TIRF/1,49). Une moyenne de 35 plans d'images a été réalisée le long de l'axe Z à des incréments de 0,1 µm, pour un temps d'exposition de 90ms pour chaque image. Toutes les données sont obtenues en utilisant Métamorph® software (Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA, USA). Les mesures sont effectuées à température stabilisée à 25°C pour réduire les mouvements des mitochondries et standardiser les conditions d'acquisitions.

Chaque stack d'images est déconvolué avec Huygens Essential Software (Scientific Volume Imaging, Hilversum, Pays-Bas) qui a permis d'améliorer la résolution et le bruit des images acquises en microscopie à fluorescence. Le rapport signal sur bruit de fond permet d'isoler les variations d'intensités émises par les sondes en fonction de l'activité bioénergétique de celle-ci (O'Reilly et al. 2003).

L'étude du réseau a été dupliquée pour les fibroblastes du patient et de sa mère. Au total 11 captures de cellules témoins, 19 de cellules de la mère hétérozygote et 21 de cellules du patient homozygote pour le variant ont été réalisées.

# RESULTATS ET DISCUSSION

# Chapitre 1 : Analyse *GJB2* et du variant récurrent de *LRTOMT*

## 1. Introduction

Au sein du laboratoire de Génomique et Génétique Humaine, la recherche des variants dans les gènes *GJB2* et *LRTOMT* est la première étape de l'analyse génétique des patients sourds.

En effet, les premières recherches des causes génétiques des surdités héréditaires au sein de la population marocaine ont été marquées par les travaux de Abidi et al. 2007 et 2008, démontrant que des variants de *GJB2* sont retrouvés chez 43,20% des patients atteints de surdité héréditaire chez 29 familles sur un total de 81 familles testées. Ces résultats ont permis de statuer que les mutations du gène codant la connexine 26 sont la principale cause de surdité autosomique récessive non syndromique au Maroc. En 2016, les travaux de Bakhchane et al. ont permis d'appuyer ces résultats avec une fréquence de 37,5% (57/152 familles) entre les variants homozygote et hétérozygote composite confirmant que les variants de *GJB2* sont la première cause de surdité non syndromique au Maroc. De plus dans cette même étude, 9 familles (5,92%) étaient hétérozygotes pour les variants c.35delG (2 familles) et c.109G>A (7 familles).

Charif et al. 2012 a identifié le variant c.242G>A du gène *LRTOMT* chez 9/105 patients marocains atteints de NSHL avec une fréquence de 8,57%.

Ces résultats ont permis de mettre en place une stratégie d'analyse des patients NSHL s'appuyant sur l'exploration directe du gène *GJB2* et du variant c.242G>A du gène *LRTOMT*.

La recherche de variant *GJB2* est entreprise par différentes techniques : PCR-PSDM pour la recherche de la mutation 35delG ou par séquençage direct de l'exon 2. Le variant c.242G>A *LRTOMT* est recherché par PCR-RFLP ou séquençage direct.

Dans ce chapitre suivant, nous présentons un résumé des analyses moléculaires sur cohorte de 220 familles atteintes de surdité non syndromique, recrutées depuis le début du projet de recherche des génétiques des surdités au sein de la population marocaine du Laboratoire de Génomique et Génétique Humaine, relevant les familles dont la cause est liée aux variants de *GJB2* ou *LRTOMT*.

## 2. Résultats

### 2.1. Analyse du gène *GJB2*

Sur une cohorte de 220 familles (426 patients), 81 familles (156 patients) portent un ou deux variants *GJB2* induisant une surdité congénitale ou postlinguale, sévère à profonde représentant une fréquence de 36,8% (81/220) et une fréquence allélique 36,15 (308/852). Sur ces 81 familles un variant *GJB2* est présent sous la forme homozygote (74), hétérozygote composites (5) et hétérozygote (2). Les 10 variants retrouvés sont : c.35delG (p.Gly12Valfs\*2), c.109G>A (p.Val37Ile), c.139G>T (p.Glu47Ter), c.167del (p.Leu56Argfs\*26), c.224G>A (p.Arg75Gln), c.235del (p.Leu79Cysfs\*3), c.358\_360delGAG (p.Glu120del), c.385G>T (p.Glu129Ter), c.551G>A (p.Arg184Gln) et c.598G>T (p.Gly200Ter) (Tableau 15). Sur la cohorte de 220 patients le génotype c.35delG/c.35delG est présent à une fréquence 62,27%.

Tableau 15 : Génotypes et fréquences *GJB2* identifiés chez les patients sourds d'une cohorte comportant 220 familles

Génotype	F ou SP	Patients	Familles
<b>c.35delG / c.35delG</b>	F	126	58
	SP	11	11
<b>c.109G&gt;A / c.109G&gt;A</b>	F	2	1
	SP	1	1
<b>c.167delT / c.167delT</b>	F	1	1
<b>c.224G&gt;A / +</b>	F	1	1
<b>c.235delC / c.235delC</b>	F	2	1
<b>c.551G&gt;A / +</b>	F	3	1
<b>c.598G&gt;T / c.598G&gt;T</b>	SP	1	1
<b>c.35delG / c.139G&gt;T</b>	F	5	2
<b>c.35delG / c.167delT</b>	SP	1	1
<b>c.35delG / c.385G&gt;T</b>	SP	1	1
<b>c.109G&gt;A / c.358_360delGAG</b>	F	2	1

F : Familiale ; S : Sporadique

Par ailleurs, on retrouve 7 familles dont 7 patients portant le variant c.109G>A, 1 patient le variant c.35delG et 1 patient le variant c.358\_360delGAG, tous à l'état hétérozygote sans être la cause de l'apparition de leur surdité. On recense alors 317 allèles des 165 patients portant un

variant *GJB2* sur les 380 patients de la cohorte (852 allèles) ramenant la fréquence allélique à 37,2% (317/852).

L'analyse de la distribution géographique des variant *GJB2* montre une distribution homogène pour la c.35delG à travers les régions marocaines. Le variant 109G>A est aussi présent dans les 3 régions, mais avec fréquence presque doublée dans la région du nord. Le variant c.167delT est retrouvé chez 2 familles l'une au nord et l'autre au centre. Le centre du pays connaît une diversité de variant plus importante, mais équilibrée entre les variants c.224G>A c.235delC c.139G>T, c.385G>T et 551G>A. Le nord du pays se distingue par la présence des variants c.358\_360delGAG et c.598G>T (Figure 17).

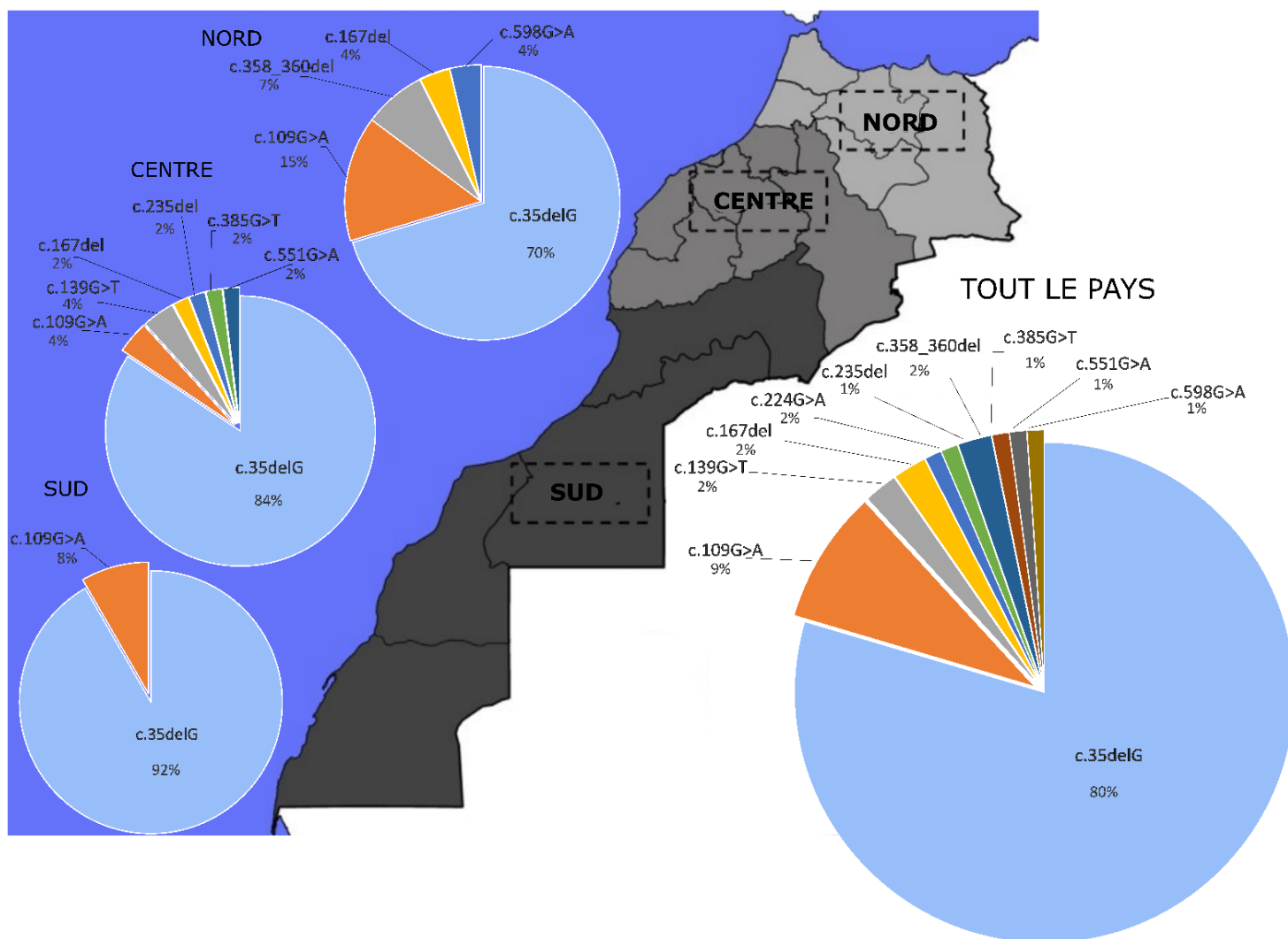


Figure 17 : Répartition géographique des variants *GJB2* entre nord, centre et sud du Maroc (mise à jour de Bakhchane et al 2016)

## 2.2. Analyse du gène *LRTOMT*

Sur la même cohorte de 220 familles, 19 familles (35 patients) ont été identifiés avec la substitution c.242G>A homozygote présentant une surdité non syndromique, dont 9 familles (23 patients) précédemment rapportées par Charif et al. 2012. Ceci représente une fréquence de 8,63% et une fréquence allélique de 8,21 % (70/852).

## 3. Discussion

La connexine 26 codée par le gène *GJB2* est une protéine retrouvée dans les jonctions communicantes ou gap jonction. Ces canaux assurent la diffusion passive de molécules dont la masse ne dépasse pas 1kDa incluant les métabolites, les seconds messagers et les ions K<sup>+</sup> et Ca<sup>2+</sup>. Ces derniers sont essentiels dans la transduction mécano-électrique du son. La Cx26 est localisée sur la membrane cytoplasmique de cellules de différents tissus incluant les cellules de l'oreille interne. Les surdités DFNA3A et DFNB1A sont toutes deux induites par la présence des variants de *GJB2*.

Dans notre étude, nous avons reporté un total de 88 familles (81+7) portant un ou deux variants *GJB2*, à cela viennent s'ajouter 51 familles portant le variant 35delG, dont 45 à l'état homozygote sur un total de 194 familles identifiées par les études menées sur la population marocaine (Lench et al. 1998; Gazzaz et al. 2005; Ratbi et al. 2007; Brownstein et al. 2011). En combinant ces résultats la fréquence de *GJB2* sur les 414 familles est amenée à 33,6 % (139/414) et une fréquence allélique de 33,7 % (418/1240).

Adadey et al. ont dressé, dans un article de revue, le profil des variants *GJB2* par continent (Adadey et al. 2020b) (Tableau 16). *GJB2* représente près de 50 % des cas de surdité autosomale récessive non syndromique dans les populations européennes et asiatiques. Le variant le plus courant est c.35delG, représente jusqu'à 70 % des cas en Europe, Afrique du Nord et au Moyen-Orient (Adadey et al. 2021). Dans une analyse par pays, le plus grand nombre d'allèles portant le variant c.35delG provenait du Royaume-Uni (Adadey et al. 2020b). D'autres variants sont prévalents dans des populations spécifiques, notamment c.235delC chez les Asiatiques, p.Trp24Ter chez les Indiens, c.427C>T chez les Africains du Ghana, qui représente 26 % de la population atteinte de surdité et 1,45 % au sein la population saine, reflétant un effet fondateur dans ce pays (Chan and Chang 2014; Adadey et al. 2020a, 2021).

Tableau 16 : Résumé de la fréquence allélique globale de 4 variants de la connexine 26

Variant	Notre étude	Afrique	Asie	Australie	Europe	Amérique Du Nord	Amérique Du Sud
<b>c.35delG</b>	243/852 (28.5%)	770/3848 (20.0%)	5917/71209 (8.3%)	50/104 (48.1%)	15616/65019 (24.0%)	3237/26976 (12.0%)	822/8191 (10.0%)
<b>c.235delC</b>	4/852 (0.4%)	2/262 (0.8%)	9666/250680 (3.9%)	31/520 (6.0%)	32/4382 (0.7%)	80/20406 (0.4%)	2/866 (0.2%)
<b>c.109G&gt;A</b>	13/852 (1.5%)	24/1192 (2.0%)	2833/81139 (3.5%)	8/104 (7.7%)	95/13227 (0.7%)	530/27288 (1.9%)	30/4852 (0.6%)
<b>c.167delT</b>	3/852 (0.3%)	2/50 (4.0%)	240/17350 (1.4%)	1/104 (1.0%)	93/12141 (0.8%)	275/21540 (1.3%)	30/3094 (1.0%)

Dans les pays du Maghreb, des variants pathogènes de *GJB2* sont rapportés en Tunisie pour 39% des cas dans 131 familles (Riahi et al. 2013), en Algérie pour environ 40% des cas (21/53 patients), 47,7% (31/65 familles) en 2015 et 26,25% en 2019 (21/80 patients) selon les études (Ammar-Khodja et al. 2009, 2015; Talbi et al. 2019). Ces résultats confirment la participation majoritaire des variants de ce gène dans la région du Maghreb. Le variant 35delG à l'état homozygote a été retrouvé avec une fréquence de 27.48% selon l'étude Riahi et al 2013 en Tunisie, semblable à l'Algérie avec près de 29% (42 des 145 patients).

De plus, on trouve en Tunisie les variants c.139G>T, c.109G>A, 235delC, c.389G>C (p.Gly130Ala), IVS1+1G>A (Riahi et al. 2013), et en Algérie c.109G>A, c.139G>T, c.167delT, c.617A>G (p.Asn206Ser) et IVS1+1G>A (Ammar-Khodja et al. 2009, 2015; Talbi et al. 2019).

Au Pakistan 158 familles présentent un variant de *GJB2* avec un profil très hétérogène réparti sur 21 mutations (Naz et al., 2022). Au sein de 20 pays de la population Latino, on retrouve les variants c.35delG, c.131G>A et c.19C>T comme les plus représentés (Bouzaher et al. 2020). En Asie, les variants c.109G>A et c.235delC sont les variants les plus fréquemment rapportés. En Inde, le variant c.71G>A représente 95% de tous les variants *GJB2* retrouvés au sein de la population (Adadey et al. 2020b).

Aux USA, le variant c.167delT se démarque du reste des variants par sa fréquence élevée. En Russie et plus particulièrement en Sibérie, et dans d'autres groupes ethniques isolés d'Asie, on enregistre des fréquences élevées du variant c.IVS1+1G>A (c.-3170 G>A), situé dans le site donneur d'épissage de l'intron 1 de *GJB2* précédant l'exon 1 non codant, affectant le codon AUG d'initiation de la traduction. Dans d'autres pays d'Asie (Inde, Turquie, Mongolie), trois autres

variants rares touchant l'acide aminé Trp172 (c.514T>A, c.516G>A et c.516G>C) ont été identifiés (Adadey et al. 2020b).

*LRTOMT* est le gène de la surdité autosomique récessive DFNB63. *LRTOMT2*, également appelée *COMT2*, comprend un domaine catéchol-O-méthyltransferase et un domaine transmembranaire selon les processus d'épissage. Elle catalyse le transfert du groupe méthyl du S-adenosyl-L-méthionine à un hydroxyle groupe des catéchols, inactivant ainsi les neurotransmetteurs à catécholamines et hormones à catécholamines. *COMT2* est essentielle au fonctionnement auditif et vestibulaire ; en effet elle est exprimée dans les cellules ciliées internes et externes de la cochlée, ainsi que dans les cellules ciliées vestibulaires, mais pas dans les stéréocils (Du et al. 2008; Ahmed et al. 2008).

Elle participerait à la machinerie de mécano-transduction de la cellule ciliée cochléaire, par son implication dans l'assemblage du *tip-link*. *LRTOMT2* pourrait interagir avec *TMC1* et *TMC2* pour assurer leur transport dans les stéréocils des cellules ciliées (Cunningham et al. 2017).

La seule mutation homozygote *LRTOMT* retrouvée chez les familles marocaines est le variant c.242G>A ; p.(Arg81Gln), initialement présente dans 8,57% des cas sur 105 familles étudiées (Charif et al. 2012). L'extension de notre analyse moléculaire de *LRTOMT* à 220 familles n'a pas varié cette fréquence qui reste à 8,63% de familles marocaines atteintes de NSHL causée par ce variant. Cette mutation est située dans l'exon 8 du gène et a été identifiée par Ahmed et al en 2008, comme altérant la fonction *COMT2* de la protéine *LRTOMT2* par la rupture d'un pont disulfure et d'une liaison hydrogène entre les deux hélices H1 et H2 de la protéine (Ahmed et al. 2008). De plus, de nombreux autres variants ont été rapportés chez de multiples familles et patients dans 10 autres pays (Tableau 17).

Tableau 17 : Variants identifiés dans *LRTOMT*

<b>Variants</b>	<b>Génotype</b>	<b>Nombre de familles ou patients</b>	<b>Pays</b>	<b>Source</b>
<b>c.242G&gt;A</b>	HMZ	9 familles	Tunisie	(Mosrati et al. 2021)
<b>c.242G&gt;A</b>	HMZ	6 familles	Tunisie	(Ahmed et al. 2008)
<b>c.208C&gt;T</b>	HMZ	1 famille de 3 patients	Tunisie	(Riahi et al. 2014)
<b>c.313T&gt;C</b>	HMZ	1 famille de 3 patients	Tunisie	(Ahmed et al. 2008)
<b>c.242G&gt;A</b>	HMZ	1 famille	Libye	(Mosrati et al. 2021)
<b>c.242G&gt;A</b>	HTZ	1 patient	Egypte	(Gibriel et al. 2019)
<b>c.358+4G&gt;A</b>	HMZ	1 famille de 8 patients	Turquie	(Ahmed et al. 2008)
<b>c.328G&gt;A</b>	HMZ	1 famille de 9 patients	Pakistan	(Ahmed et al. 2008)
<b>c.154C&gt;T</b>	HMZ	1 famille de 5 patients	Pakistan	(Wang et al. 2017)
<b>c.47T&gt;C</b>	HMZ	1 famille de 2 patients	Iran	(Du et al. 2008)
<b>c.213C&gt;G</b>	HMZ	1 famille de 2 patients	Iran	(Du et al. 2008)
<b>c.353G&gt;A</b>	HTZ	1 famille	Iran	(Du et al. 2008)
<b>c.503G&gt;A</b>	HTZ	2 familles	Iran	(Du et al. 2008)
<b>c.104delC</b>	HMZ	1 famille de 4 patients	Iran	(Vanwesemael et al. 2011)
<b>c.102G&gt;A</b>	HMZ	1 famille	Iran	(Babanejad et al. 2012)
<b>c.240G&gt;T</b>	HMZ	1 famille	Iran	(Babanejad et al. 2012)
<b>c.241C&gt;T</b>				
<b>c.509_524del</b>	HMZ	1 patient	Iran	(Sarmadi et al. 2020)
<b>c.249C&gt;G</b>	HTZ	1 patient	Tcheks	(Marková et al. 2016)

Tableau 17 suite : Variants identifiés dans *LRTOMT*

Variants	Génotype	Nombre de familles ou patients	Pays	Source
c.95_108del	HMZ	1 patient	USA	(Strauss et al. 2018)
c.151dupG	HMZ	1 patient	USA	(Sloan-Heggen et al. 2016)
c.655C>T	HMZ	1 patient	USA	(Sloan-Heggen et al. 2016)
c.614_617dup	HMZ	1 patient	USA	(Farwell et al. 2015)
c.161G>A	HTZ C	1 patient	Japon	(Ichinose et al. 2015)
c.565_566delT				
c.451C>T	HTZ C	1 patient	Chine	(Wang et al. 2021)
c.358G>A				
c.242G>A	HMZ	9 familles 23 patients	Maroc	(Charif et al. 2012)
c.242G>A	HMZ	7 familles 10 patients	Maroc	Cette étude

HMZ: Homozygote ; HTZ : Hétérozygote ; HTZ C : Hétérozygote composite

## 4. Conclusion

Notre étude a confirmé que les mutations de *GJB2* restent responsables de la majeure partie des NSHL récessives chez les patients marocains avec 36,8% de cas; c.35delG étant le plus fréquent des variants identifié. D'autres variants de ce gène ont été également identifiés tel c.109G>A et c.167delT à l'état homozygote ou encore c.385G>T et c.139G>T en hétérozygote composite, avec c.35delG.

En seconde place au sein de la population marocaine, arrive le variant c.242G>A de *LRTOMT*, qui contribue avec une fréquence de de 8,63% aux NSHL récessives.

## Chapitre 2 : Une délétion homozygote sur le gène *MPZL2* associée à une surdité non syndromique.

### 1. Introduction

Actuellement, les origines génétiques des surdités héréditaires sont liées à plus de 220 gènes nucléaires, dont 70 gènes et 85 locus identifiés pour la NSHL ([hereditaryhearingloss.org](http://hereditaryhearingloss.org)).

Parmi ceux-ci, *MPZL2* a été associé à une NSHL récessive en 2018, chez cinq familles consanguines d'origines géographiques différentes (néerlandaise, nord-est de l'Iran et turque). *MPZL2*, est une glycoprotéine transmembranaire de l'adhésion cellule-cellule homophile et hétérophile, identifiée dans la cochlée de la souris (Bademci et al. 2018; Wesdorp et al. 2018).

Par séquençage de l'exome du patient de la famille SF 165, nous présentons, pour la première fois en Afrique du Nord, l'implication du variant *MPZL2* dans la surdité héréditaire non syndromique récessive avec la possibilité d'un effet fondateur avec les autres familles *MPZL2*.

Ce travail, a fait l'objet d'un article scientifique décrivant la première caractérisation du gène *MPZL2* au Maroc et dans la population d'Afrique du Nord, publié dans l'*International journal of pediatric otorhinolaryngology* (Annexe 5) :

**Amalou Ghita**, Crystel Bonnet, Zied Riahi, Aymane Bouzidi, Soukaina Elrharchi, Amale Bousfiha, Majida Charif, Kandil Mostafa, Lenaers Guy, Petit Christine, Barakat Abdelhamid. **A homozygous *MPZL2* deletion is associated with non syndromic hearing loss in a moroccan family.** Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2021 Jan;140:110481. doi: 10.1016/j.ijporl.2020.110481. Epub 2020 Nov 2. PMID: 33234333.

## 2. Patients

La famille SF 165 est originaire d'Agadir, dans le sud-ouest du Maroc. D'un mariage consanguin sont nés trois enfants, deux garçons et une fille. L'examen clinique a révélé une perte auditive neurosensorielle bilatérale prélinguale légère à sévère chez la fille et le garçon aîné (Figure 18 A). Le test audiométrique effectué à 0,25, 0,5, 1, 2, 4 et 8 kHz des enfants affectés a révélé une perte auditive maximale de 75 et 70 dB à 4 kHz, respectivement (Figure 18 B,C). L'IRM du cerveau du fils affecté n'a révélé aucune anomalie.

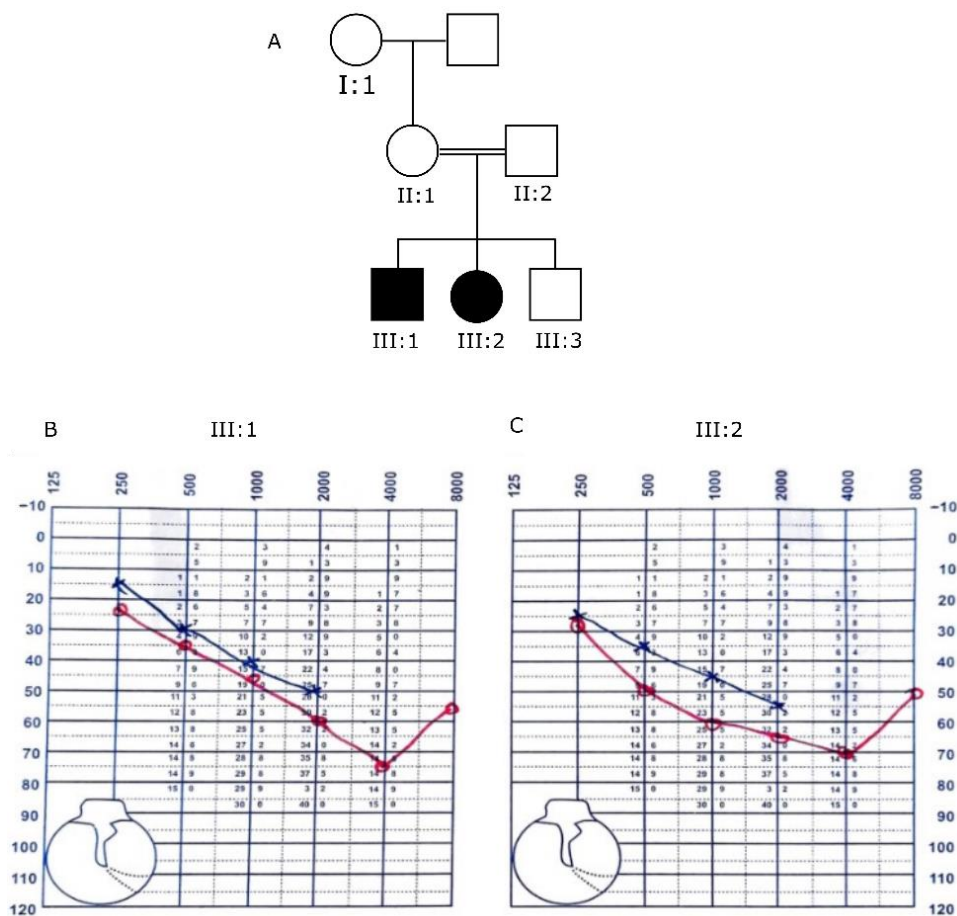


Figure 18 : Pedigree et audiogrammes de la famille SF 165

(A) Arbre généalogique ; (B) Test audiométrique du patient III:1 ; (C) Test audiométrique du patient III:2. Les seuils ont été déterminés à 0.25,0.5, 1, 2, 4 et 8 kHz. Oreille droite : cercle rouge ; Oreille gauche : croix bleue

## 3. Résultat

Le WES du patient SF 165-III:1 a été réalisé à IntegraGen sur un séquenceur HiSeq 2000 (Illumina, San Diego, CA, USA). Un mode de transmission autosomique récessif a été considéré, retenant ainsi les variants homozygotes et hétérozygotes composites. Au sein des variants non

synonymes, frameshift, indel et sites d'épissage, nous avons retenu les variants prédits comme pathogènes à l'aide des outils bioinformatiques (Polyphen-2, SIFT) avec une fréquence allélique inférieure ou égale à 0,01. Suite à l'application des filtres, 6 variants candidats homozygotes ont été sélectionnés (Tableau 18).

Tableau 18 : Variants candidats homozygotes potentiellement pathogènes révélés par le WES dans l'ADN du patient.

Gène	Variant	rs	Frequence GnomAD
<i>LRP1B</i>	Arg2430Gln	rs111444554	3.897 e-5
<i>TBC1D9B</i>	Arg301Trp	rs748486833	7.965 e-6
<i>TAF1L</i>	Ser648Cis	rs202136681	1.202 e-4
<i>MPZL2</i>	Ile24MetfsTer22	rs752672077	7.688 e-4
<i>FOXRED1</i>	His380Arg	rs7116126	3.264 e-3
<i>ZNF77</i>	Cis144Phe	rs76396690	2.582 e-3

De ces gènes, *MPZL2* est le seul à être lié à une surdité, ce qui a conduit à la sélection de ce variant pertinent pour expliquer l'origine de la surdité non syndromique : la délétion *MPZL2* NM\_005797.3 : c.72delA (p.Ile24Metfs\*22) avec une fréquence allélique mineure globale de 7.688e-4. Ce variant crée un décalage de cadre de lecture et un codon stop prématuré, aboutissant à une protéine tronquée. Le séquençage Sanger a confirmé son statut homozygote chez les enfants affectés III:1 et III:2, et son statut hétérozygote chez la mère II:1, la grand-mère maternelle I:1 et le frère non affecté III:3.

L'analyse des marqueurs STR a été réalisée pour caractériser les haplotypes dans la région chromosomique *MPZL2* (Figure 19). L'analyse a montré un haplotype commun compris entre les marqueurs D11S1341 et D11S4104 pour l'allèle muté chez tous les individus, différent de celui de l'allèle sauvage porté par les individus sains.

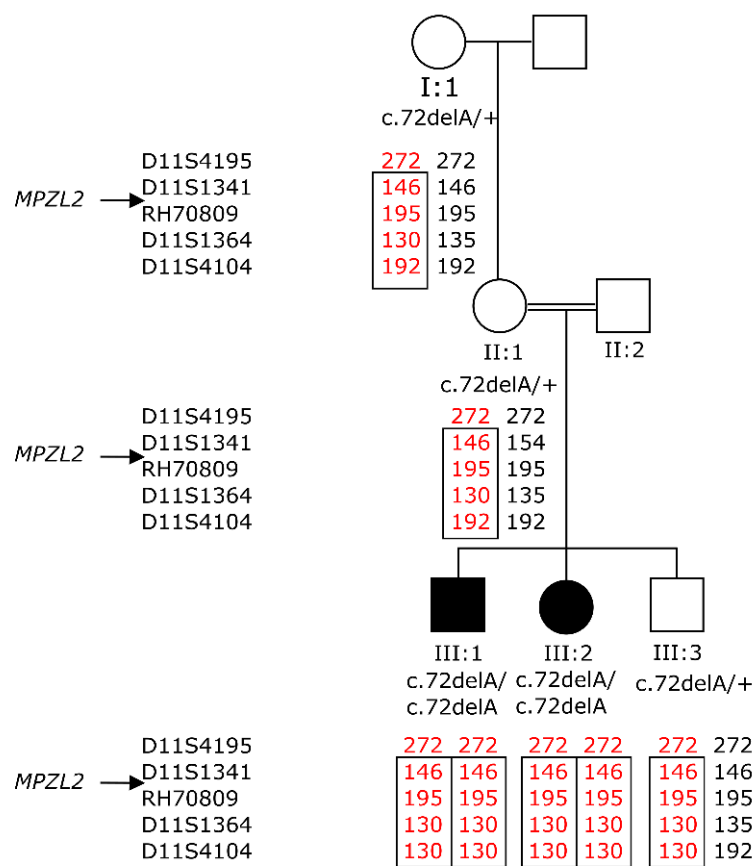


Figure 19 : Ségrégation et analyse STR de la famille SF 165

## 4. Discussion

Dans cette étude, nous avons réalisé un WES sur un patient marocain atteint d'une perte auditive autosomique récessive non-syndromique, qui ne présentait pas de variant dans les gènes *GJB2* et *LRTOMT* les plus fréquemment impliqués dans la population NSHL marocaine. Ainsi, nous avons identifié pour la première fois dans une famille africaine du nord, une délétion homozygote c.72delA (p.Ile24Metfs\*22) dans le gène *MPZL2*. *MPZL2* code pour la protéine de la myéline de type 2, une glycoprotéine transmembranaire membre de la super-famille des immunoglobulines, impliquée dans l'adhésion cellule-cellule homophile et hétérophile. Cette protéine a été décrite impliquée dans l'embryogenèse précoce, et dont l'expression est la plus élevée a été trouvée au niveau de la cochlée fœtale, principalement dans les tissus de l'oreille interne (Bademci et al. 2018; Wesdorp et al. 2018).

L'immunomarquage de *MPZL2* dans l'organe de Corti de souris a révélé une forte expression dans la zone de contact entre les cellules de Deiter et la membrane basilaire, et une expression plus légère dans les cellules ciliées internes et externes et dans la couche basale de la *stria vascularis*. La souris mutante, présentant une délétion intra-génique de l'exon 2 et 3 *Mpzl2*, présente une organisation altérée des cellules ciliées externes et des cellules de soutien, ainsi qu'une

dégénérescence de l'organe de Corti, en plus d'une légère dégénérescence des neurones du ganglion spiral, plus prononcée à la base cochléaire. Ces données convergent vers une apparition précoce de NSHL chez les humains porteurs de mutations *MPZL2*, sans pouvoir statuer si la déficience auditive est congénitale ou si elle se manifeste à la petite enfance (Wesdorp et al. 2018).

Dans deux études précédentes de ce gène, des mutations de *MPZL2* (OMIM : 604873) ont été découvertes comme la cause de la surdité autosomique récessive-111 (DFNB111) (Bademci et al. 2018; Wesdorp et al. 2018). Une seule délétion homozygote *c.72delA* (p.Ile24Metfs\*22) a été trouvée chez 12 patients présentant une surdité légère à modérée symétrique non syndromique, provenant de cinq familles consanguines : néerlandaise (Wesdorp et al. 2018), issu d'un métissage entre la Turquie du nord-est de l'Iran (Bademci et al. 2018) et turque (Bademci et al. 2018; Wesdorp et al. 2018). Nous ajoutons à ces familles, une famille marocaine élargissant ainsi la localisation géographique de cette mutation dans les pays d'Afrique du Nord.

De plus au sein d'une famille turque dont 4 membres, incluant la mère, sont malades, cette délétion a été trouvée à l'état hétérozygote composite avec la substitution *c.220C>T* (Wesdorp et al. 2018). De même, le génotype *c.220C>T/c.463delG* chez un patient Coréen (Kim et al. 2020) et *c.220C>T/c.68delC* chez un patient Chinois (Wang et al. 2022) ont été identifiés. Enfin, le variant *c.220C>T* a été retrouvée en Corée chez 8 patients sourds et en Chine chez une patiente présentant un génotype biallélique (Kim et al. 2020; Wang et al. 2022).

L'analyse des haplotypes de Wesdorp et al. sur trois familles a montré que tous les allèles *c.72delA* de *MPZL2* partagent une région commune de 0,5 Mb délimitée par les marqueurs D11S1341 et D11S4104 (Wesdorp et al. 2018) proposant ainsi un effet fondateur. Par contre, le marqueur D11S4195 inclus dans cette région, présente deux tailles différentes dans un haplotype pathologique, ce qui suggère qu'il n'est pas informatif. Par conséquence le variant *c.72delA* pourrait être d'origine ancienne.

## 5. Conclusion

Notre étude présente la première caractérisation de la mutation *c.72delA* de *MPZL2* au Maroc dans une famille consanguine présentant une surdité légère. Cette délétion rapportée comme cause de surdité dans différentes populations est probablement d'origine ancienne et a été distribuée géographiquement à la suite d'immigrations. L'identification d'autres mutations pathogènes dans *MPZL2* permettra de confirmer le rôle essentiel de la protéine *MPZL2* dans la fonction auditive et son origine.

# Chapitre 3 : Surdités syndromiques chez deux familles associées à des variants homozygotes dans les gènes *COL4A3* et *MASP1*.

## 1. Introduction

Certaines surdités syndromiques sont très complexes, avec une expressivité variable, ce qui entraîne des différences importantes dans les descriptions cliniques des patients (Castiglione et al. 2013).

Le syndrome d'Alport est une maladie héréditaire rare avec une insuffisance rénale aboutissant à une insuffisance rénale terminale, ainsi qu'une perte de la vision et perte auditive neurosensorielle progressive (Alport 1927; Mochizuki et al. 1994). Des variants dans trois gènes *COL4A3*, *COL4A4* et *COL4A5* provoquent le syndrome d'Alport entraînant la présence de membranes basillaires glomérulaires lamellés, ou une adhésion défectueuse de l'organe de Corti à la membrane basilaire, responsable du déficit auditif (Merchant et al. 2004; Chew and Lennon 2018; Savige et al. 2019).

Le syndrome 3MC est issu de l'agrégation de quatre présentations cliniques: les syndromes de Mingarelli, Malpeuch, Michels et Carnevale en raison de similitudes cliniques (Titomanlio et al. 2005). *MASP1*, *COLEC10* et *COLEC11* sont impliqués dans la voie du complément de la lectine ; ils guident la migration des cellules dans les organes pendant l'embryogenèse et les dysfonctions de l'une de ces quatre protéines (*MASP-1 & -3*, *CL-L1*, *CL-K1*) lors des premières phases du développement cérébral, entraîne les syndromes 3MC, avec dysmorphisme cranio-facial et symptômes multiples (Rooryck et al. 2011; Gardner et al. 2017).

Dans cette étude, nous rapportons deux familles marocaines consanguines présentant l'une le syndrome d'Alport, l'autre le syndrome de 3MC, analysées par le séquençage d'exome pour identifier les variants responsables de ces deux tableaux cliniques.

Ce travail, a fait l'objet d'un article scientifique décrivant la première caractérisation du gène *MASP1* et la seconde de *COL4A3* au Maroc, associé à l'étude computationnel de leur variant respectif. Il a été publié dans le journal *Human Gene* (Annexe 5) :

**Amalou Ghita**, Imane Aitraise, Aymane Bouzidi, Soukaina Essadssi, Majida Charif, Mostafa Kandil, Sophie Boucher, Guy Lenaers, et Abdelhamid Barakat. **Syndromic Hearing Loss in Moroccan Families Is Associated to Homozygous Missense Variants in *COL4A3* and *MASP1*** ». *Human Gene* 2022 Sep;33:201053. doi: 10.1016/j.humgen.2022.201053.

## 2. Patients

### 2.1. Famille SF 237

La famille SF 237 est composée de 4 frères issus de parents consanguins originaire de Fkih Ben Salah. Deux garçons sont atteints de surdité syndromique, et ont été recrutés à l'âge de 27 et 23 ans, respectivement (Figure 20 A). Les patients IV:1 et IV:3 ont été diagnostiqués avec une surdité postlinguale à l'âge de 7 ans.   8 et 17 ans respectivement, une myopie sévère a été constatée chez les deux frères.

  22 ans, le patient IV:1 a présenté une insuffisance rénale nécessitant une dialyse et à 25 ans, son taux de créatinine était de 47 mg/l (6-13 mg/l) ; l'urée de 0,45g/l (inf à 0,5 g/l) et l'acide urique de 26 mg/l (20-60 mg/l). L'audiogramme a montré une perte auditive neurosensorielle moyenne à modérément sévère, avec un PTA (Pure Tone Average) de 56 dB sur l'oreille droite et de 55dB sur l'oreille gauche, affectant toutes les fréquences (Figure 20 B).

Le patient IV:3 présente une insuffisance rénale chronique avec une créatinine à 25,77 mg/l (7-12 mg/l), une urée à 0,61g/l (0,15-0,39 g/l) et une protéinurie de 7,9g/24h (inf à 0,15g/l), un acide urique à 66,38 mg/l (35-72 mg/l)   19 ans. L'audiogramme a révélé une perte auditive neurosensorielle asymétrique, modérément sévère à l'oreille droite (PTA 60dB) et profonde à l'oreille gauche (PTA 113dB) (Figure 20 C).

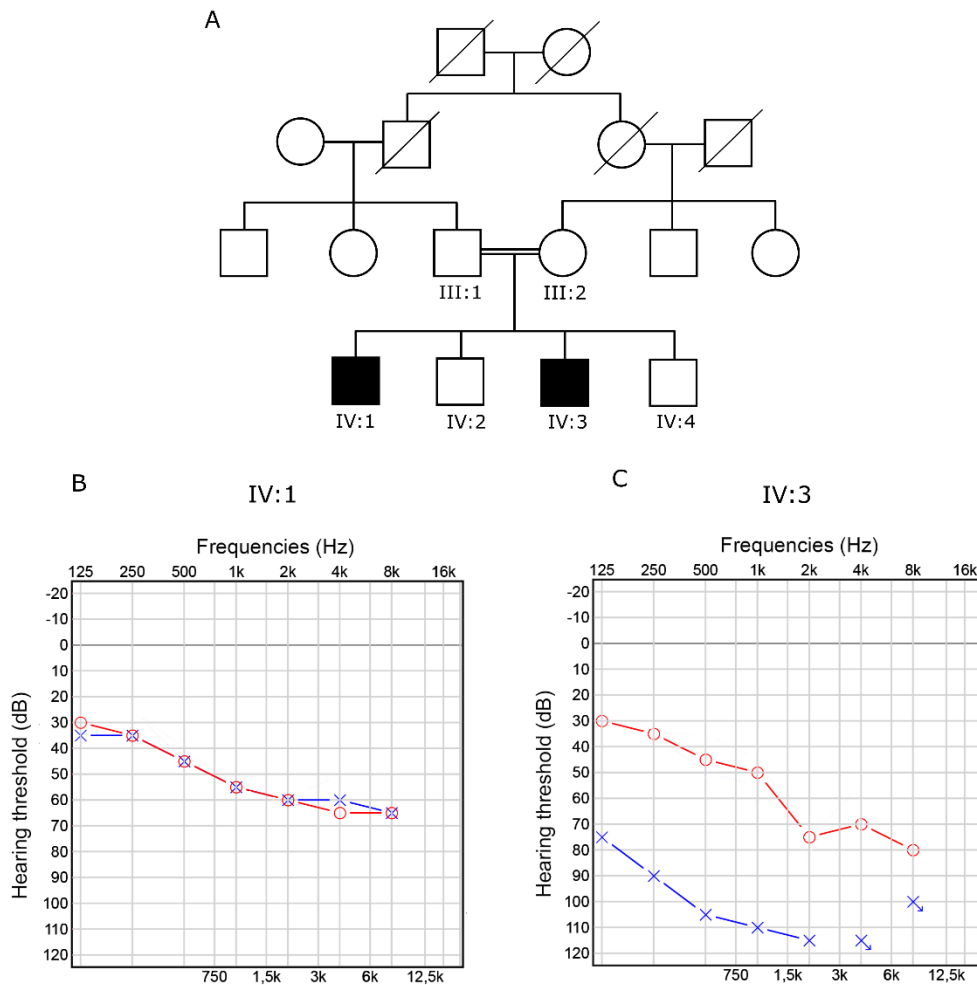


Figure 20 : Pedigree et audiogrammes de la famille SF 237

(A) Arbre généalogique ; (B) Test audiométrique du patient IV:1 ; (C) Test audiométrique du patient IV:3. Les seuils ont été déterminés à 0.25,0.5, 1, 2, 4 et 8 kHz. Oreille droite : cercle rouge ; Oreille gauche : croix bleue

## 2.2. Famille SF 266

Issu d'une famille consanguine de la région de Doukkala le patient de la famille SF 266, est l'aîné de deux enfants et âgé de 8 ans ; il est né avec le syndrome 3MC (Figure 21). Il présente un hypertélorisme et la triade des paupières (blépharoptose, blépharophimose, *épicanthus inversus*) entraînant un déficit de la vision périphérique et nocturne. À 6 mois, il a été diagnostiqué d'une perte auditive bilatérale sévère. Il présentait également un retard à la marche. Des troubles mentaux ont été constatés par sa famille dès la petite enfance, sans diagnostic médical. Aucun autre examen clinique n'était disponible pour cet individu.

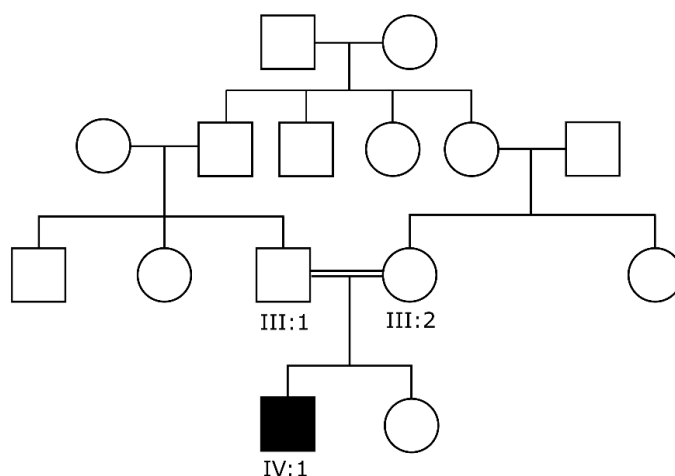


Figure 21 : Arbre généalogique de la famille SF 266

### 3. Résultats

#### 3.1. Analyse génétique

Le WES a été réalisé au BGI Tech Solutions sur BGISEQ-500 sequencer. Les résultats sous format csv ont été téléchargés sur le serveur BGI des trois patients listant les SNP et les indel portés par ces derniers. En commençant par isoler les variants présents sur les gènes de surdité et en appliquant tous les filtres, une liste de quelques variants a été générée, au sein de laquelle nous avons identifié le variant homozygote candidat correspondant à la présentation clinique de chaque patient.

Les frères SF 237-IV :1 et SF 237-IV :3 sont tous deux porteurs du variant homozygote faux-sens NM\_000091.4 : c.4153G>C ; p.(Gly1385Arg) du gène *COL4A3*. Ce variant n'a jamais été identifié et n'est pas présent dans la base de données gnomAD. Le variant est prédit comme pathogène selon la classification ACMG et les logiciels de prédiction SIFT, Polyphen-2 et MutationTaster, MutPred, MutationAssessor, FATHMM.

Le patient SF 266-IV :1 présente le variant homozygote faux-sens NM\_001879 : c.1426G>A ; p.(Gly476Arg) du gène *MASPI*, responsable du syndrome 3MC. La base de données GnomAD rapporte 50 fois cet allèle à l'état hétérozygote, parmi les 251.338 allèles (fréquence de  $1,77 \times 10^{-4}$ ), mais aucune personne à l'état homozygote pour ce variant n'a encore été signalée. La classification ACMG prédit le variant comme probablement pathogène. Le variant est prédit par SIFT comme *uncertain* par Polyphen *Probably damaging*, et par MutationTaster *Disease Causing*.

Le séquençage Sanger de tous les membres de la famille disponibles a confirmé la ségrégation des variants avec la pathologie. En effet, les parents de la famille SF237 étaient porteurs hétérozygotes du variant *COL4A3*, tandis que leurs frères sains étaient soit hétérozygotes (IV :2) soit non mutés (IV :4) (Figure 22).

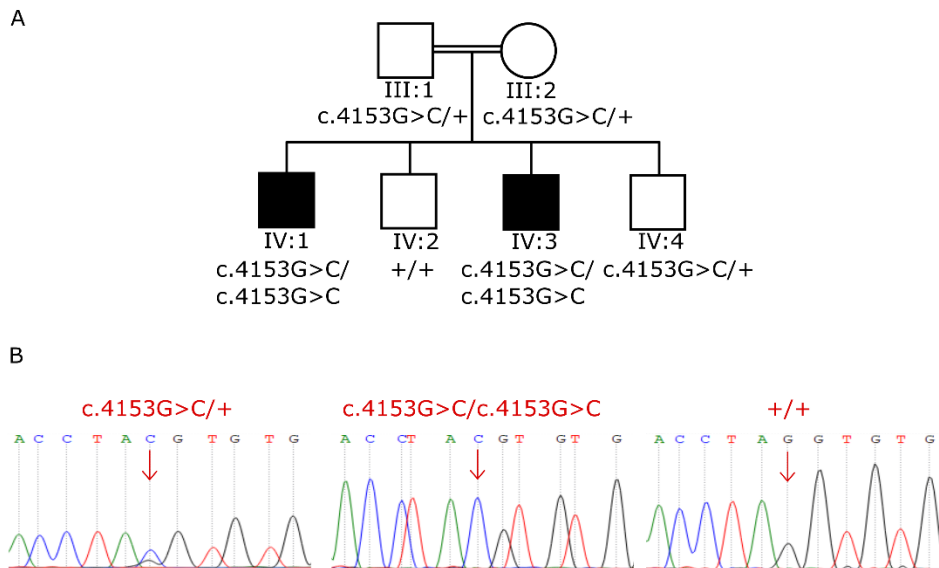


Figure 22 : Co-ségrégation du variant *COL4A3* c.4153G>C chez la famille SF 237

(A) Arbre et génotype ; (B) chromatogramme des membres de la famille SF 237 (de gauche à droite, hétérozygote, homozygote muté, homozygote sauvage)

Chacun des parents des patients SF 266-IV :1 était porteur du variant *MASPI* à l'état hétérozygote. La sœur IV :2 non affectée n'a pas été prélevé en raison de son très jeune âge (Figure 23).

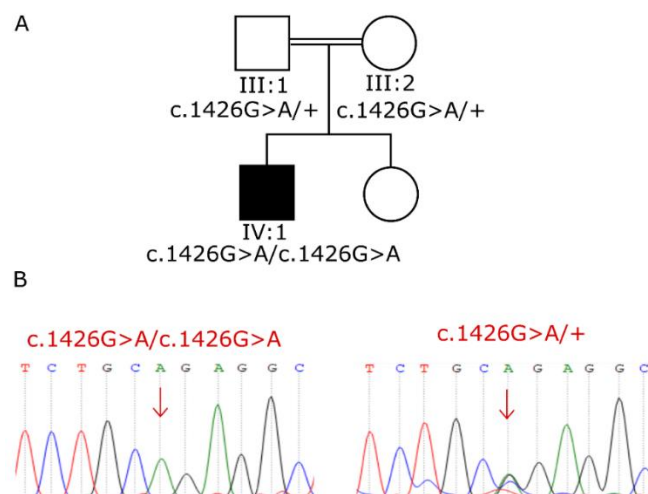


Figure 23 Co- ségrégation du variant *MASPI* c.1426G>A au sein de la famille SF 266

(A) Arbre et génotype ; (B) chromatogramme des membres de la famille SF 266 (de gauche à droite : homozygote muté et hétérozygote)

### 3.2. Modélisation moléculaire et analyse de stabilité

Le serveur SWISS-MODEL a généré trois modèles pour MASP-1 à partir de trois *template* (4igd.1.A, 4aqb.1.A, 6f1c.1.D). Nous avons sélectionné le modèle généré à partir du *template* 4igd.1.A pour les protéines WT et mutées, avec une valeur QMEAN z-score de 0,40 et 0,25, respectivement, et une identité de 99,75% et 99,50% qui contenait les acides aminés cibles au sein de leur domaine conformationnel de l'acide aminé 299 à 699. I-Tasser a généré 5 modèles pour COL4A3, parmi lesquels nous avons sélectionné le plus stable.

Le z-score QMEAN représente une estimation de la comparabilité du modèle théorique avec des structures de taille similaire dérivées expérimentalement en comparant leurs angles de liaison, les distances, etc. Les z-scores QMEAN autour de zéro indiquent un bon accord entre la structure du modèle et les structures expérimentales de taille similaire.

L'analyse structurale du variant COL4A3 p.(Gly1385Arg) montre que le changement de Glycine en Arginine conserve la liaison hydrogène avec Cys1387, et gagne deux interactions hydrophobes supplémentaires avec Glu1407, Lys1411 à Leu1384 et Pro1386 (Figure 24). La valeur RMSD entre les structures mutées et de type sauvage était de 0,9638 Å. Les scores de prédiction mCSM, SDM et DUET de -0.303, -0.17 et -0.078 Kcal/mol respectivement reflètent une déstabilisation de la structure de la protéine due à la substitution de l'acide aminé.

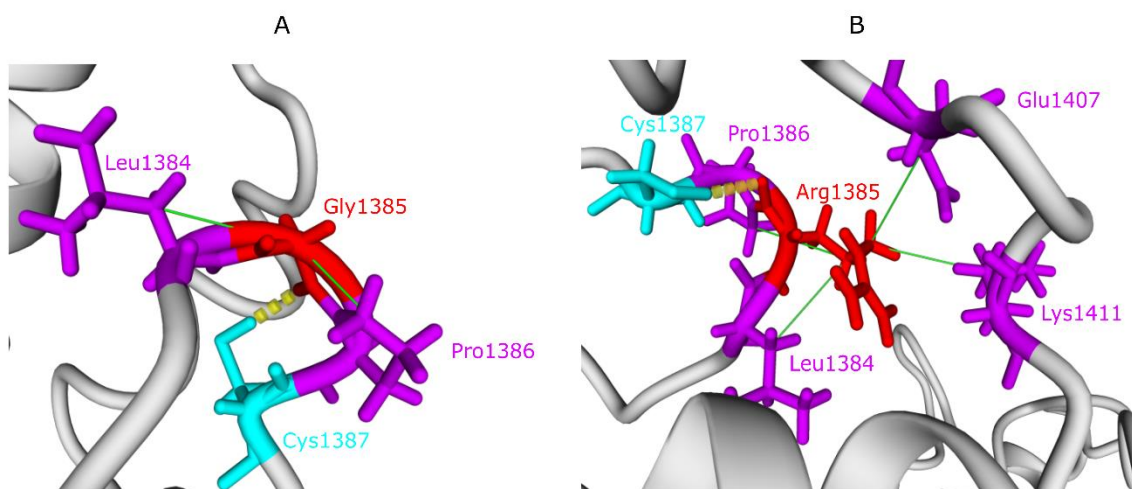


Figure 24 : Analyse structurale des interactions de l'acide aminé 1385 de la protéine COL4A3 sauvage et mutée par modélisation moléculaire

(A) variant sauvage Gly1385 ; (B) variant muté Arg1385

Résidu sauvage et muté : rouge ; résidus impliqués dans les liaisons hydrogènes : cyan ; résidus participant aux interactions hydrophobes : violet ; liaisons hydrogènes : lignes pointillées jaunes, interactions hydrophobes : lignes continue vertes.

Pour la protéine MASP-1 de type sauvage, la Glycine-476 a des interactions hydrophobes avec quatre acides aminés (Leu466, Cys475, Asp645, Gly648) et deux liaisons hydrogènes avec les

acides aminés Thr487 et Ser646. Le changement en Arginine cause la perte des liaisons avec Asp645, Gly648 et établit cinq nouvelles interactions hydrophobes avec Gly477, Pro649, Ile463, Trp589, Met465 et deux liaisons hydrogènes avec Cys475 et Asp645 (Figure 25). La valeur RMSD entre les structures mutée et sauvage est de 0,60626 Å. Les scores de prédiction mCSM, SDM et DUET de -1.091, -2.15 et -1.003 Kcal/mol respectivement reflètent une déstabilisation de la structure de la protéine due à la substitution de l'acide aminé.

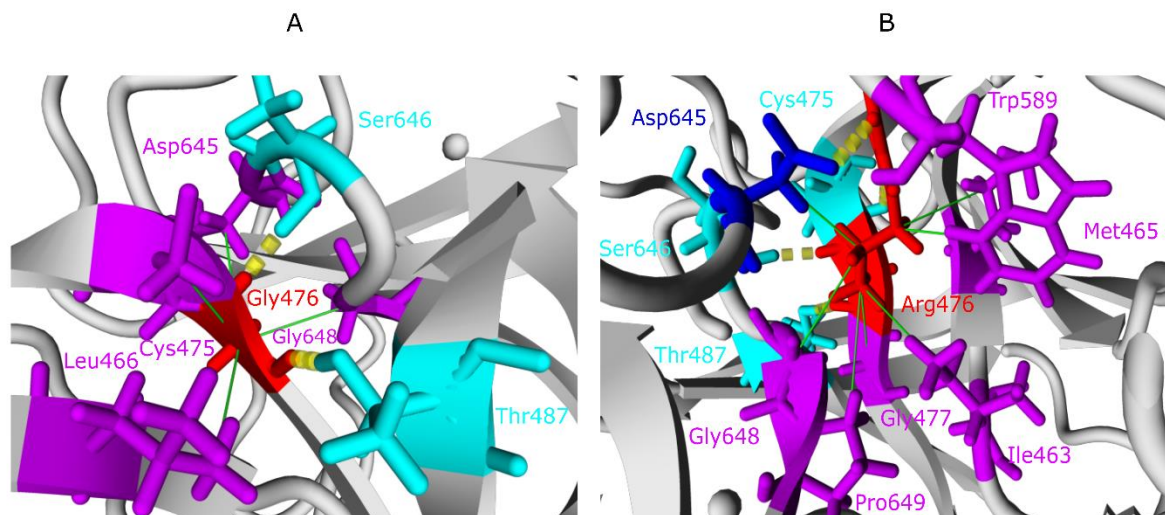


Figure 25 : Analyse structurale des interactions de l'acide aminé 476 de la protéine MASP1 sauvage et mutée par modélisation moléculaire

(A) variant sauvage Gly476 ; (B) variant muté Arg476

Résidu sauvage et muté : rouge ; résidus impliqués dans les liaisons hydrogènes : cyan ; résidus participant aux interactions hydrophobes : violet ; résidus participant à la fois aux liaisons hydrogènes et aux interactions hydrophobes : bleu ; liaisons hydrogènes : lignes pointillées jaunes, interactions hydrophobes : lignes continues vertes.

## 4. Discussion

L'analyse d'exome réalisée sur les patients atteints de surdité syndromique a permis l'identification de deux nouveaux variants homozygotes absents de la base de données Human Gene Mutation database (Stenson et al. 2003), de Deafness Variation Database et de NHLBI GO Exome Sequencing Project.

Les patients SF 237-IV :1 et SF 237-IV :3 atteints du syndrome d'Alport étaient porteurs du variant faux-sens *COL4A3* NM\_000091.4 :c.4153G>C ; p.(Gly1385Arg). Le patient SF 266-IV :1 atteint du syndrome 3MC était porteur du variant faux-sens *MASP1* NM\_001879 :c.1426G>A ; p.(Gly476Arg) rs140743904 répertorié dans dbSNP.

Le variant *COL4A3* affecte l'extrémité du domaine à triple hélice, commençant à l'acide aminé 43 et se terminant à 1438, et modifie une répétition d'un triplet d'acides aminés Gly-X-Y, qui contribue au domaine à triple hélice et confère au collagène IV sa propriété flexible (Hofmann et al.

1984). Les différents logiciels de prédiction étudiés ont classé le variant comme pathogène. Ceci est consolidé par l'analyse structurale qui a révélé que le changement de Glycine en Arginine a fait gagner 2 interactions hydrophobes supplémentaires menant à une déstabilisation de la structure de la protéine.

Adjacentes à la Guanine 4153 mutée chez nos patients, deux substitutions de sites d'épissage pathogènes ont été identifiées : c.4153+1G>A (Zhang et al. 2012) et c.4153+2T>A trouvées toutes deux dans un état hétérozygote composite (Morinière et al. 2014). A noter que nos résultats rapportent le deuxième cas du syndrome d'Alport présentant un variant *COL4A3* en Afrique du Nord, le premier étant p.Gly1277Ser à l'état homozygote rapporté chez un patient marocain présentant une perte d'audition et une myopie, mais pas d'atteinte rénale (AitRaise et al. 2022).

Deux autres familles maghrébines ont été décrites, l'une Berbère d'Algérie avec un variant *COL4A4* (Teebi and Farag 1997), et l'autre de Tunisie avec un variant dominant *COL4A5* (Kharrat et al. 2006), tandis que 4 autres personnes présentant ce syndrome ont été décrites en Tunisie, mais sans diagnostic moléculaire (Kamoun 1997). En outre, certains individus présentant des symptômes rénaux limités, mais pas tous les symptômes du syndrome d'Alport, ont été identifiés avec les variants hétérozygotes composites *COL4A3* c.209G>A et c. 1681\_1698del, ou avec les variants homozygotes c.725G>A ou hétérozygotes c.2225G>A (Ammar et al. 2021), illustrant la variabilité des présentations cliniques associées à ce gène.

Dans le cas du syndrome 3MC, le gène *MASPI* code pour trois ARNm : MASP-1, MASP-3 et MAP-1 par le biais de processus d'épissage alternatif. Le domaine sérine-protéase est codé par les exons 13-18 et l'exon 12 dans MASP-1 et MASP-3, respectivement, et est absent dans le MAP-1 (Takahashi et al. 2007; Skjoedt et al. 2010). Le variant *MASPI* c.1426G>A, rapporté pour la première fois à l'état homozygote, est situé dans l'exon 13 de l'isoforme MASP-1 (Skjoedt et al. 2010). Il a déjà été signalé une fois à l'état hétérozygote dans une étude analysant la séquence de 29 gènes impliqués dans les cascades du complément et de la coagulation, réalisée sur 100 jeunes patients présentant une hypertension sévère et une insuffisance rénale (Larsen et al. 2018). GnomAD a signalé ce variant avec une fréquence de  $1,77 \times 10^{-4}$  et comme dommageable et pathogène par les outils de prédiction, Mutation Assessor, PolyPhen2 et par la classification ACMG. De plus l'analyse structural de la protéine a montrer que le changement en Arginine cause la perte de 2 liaisons hydrophobes et le gain de 5 hydrophobes et 2 liaisons hydrogènes reflétant une déstabilisation de la structure de la protéine.

Dans la littérature, 16 variants de *MASPI* liés au syndrome 3MC et à la perte d'audition ont été décrits, dont 3 variants non-sens dans les exon 2 et 6 (Urquhart et al. 2016) et 11 variants faux

sens, parmi lesquels 9 étaient homozygotes. Parmi ces 9 variants, 7 étaient regroupés dans l'exon 12, et 2 dans les exons 4 et 6. Deux variants faux-sens hétérozygotes composites affectant les exons 2 et 12 étaient à l'origine d'une perte auditive avec des nerfs cochléo-vestibulaires bilatéraux anormaux ou absents (Kari et al. 2017). Deux substitutions dans les sites d'épissage ont été rapportées par Atik et al. (Atik et al. 2015) et une autre délétion de 2306 pb incluant l'exon 12 et une partie de l'intron 12 a été rapportée par Graul-Neumann et al. (Graul-Neumann et al. 2018) (Tableau 19).

Tableau 19 : Variants pathogènes de *MASPI* publiés, liés à la surdité et au syndrome 3MC.

Variant	Acide Aminé	Exon	Source
c.9G>A	p.Trp3*	2	(Urquhart et al. 2016)
c.49G>T/	p.Ala17Ser/	2/	(Kari et al. 2017)
c.1931C>T	p.Thr644Met	12	
c.547G>T	p.Val183Leu	4	(Urquhart et al. 2016)
c.760A>T	p.Leu254*	6	(Urquhart et al. 2016)
c.870G>A	p.Trp290*	6	(Sirmaci et al. 2010)
c.891+1G>T	-	Int 6	(Atik et al. 2015)
c.1012-2A>G	-	Int 7	(Atik et al. 2015)
c.1451G>A	p.Gly484Glu	12	(Atik et al. 2015)
c.1489 C>T	p.His497Tyr	12	(Rooryck et al. 2011)
c.1657G>A	p.Asp553Asn	12	(Atik et al. 2015)
c.1888T>C	p.Cys630Arg	12	(Rooryck et al. 2011)
c.1895_*1602+411del	p.Arg637Cysfs*1	12 à l'Int 12	(Graul-Neumann et al. 2018)
c.1987G>T	p.Asp663Tyr	12	(Atik et al. 2015; Urquhart et al. 2016)
c.1997G>A	p.Gly666Glu	12	(Rooryck et al. 2011)
c.2059G>A	p.Gly687Arg	12	(Sirmaci et al. 2010)
<b>c.1426G&gt;A</b>	<b>p.Gly476Arg</b>	<b>13</b>	<b>Présente étude</b>

Il est important de noter qu'avant ce travail, un seul individu 3MC a été rapporté dans la population maghrébine dans une famille tunisienne avec un variant homozygote récessif *COLEC11*, illustrant ainsi les difficultés à diagnostiquer complètement cette maladie en Afrique du Nord (Rooryck et al. 2011).

## 5. Conclusion

L'analyse d'exome de patients atteints de surdité syndromique a révélé chez deux familles marocaines des variants homozygotes. Deux frères atteints du syndrome d'Alport, syndrome touchant la fonction rénale en plus de l'audition, portaient la substitution c.4153G>C de *COL4A3*, encore jamais décrite. Chez un individu d'une seconde famille, la substitution pathogène c.1426G>A de *MASP1* a été confirmée comme cause de l'apparition des multiples symptômes du syndrome 3MC se développant à la naissance. L'étude *in silico* reposant sur une modélisation moléculaire protéique de ces deux variants est venu confirmer leur statut pathogène par la prédiction de gain et de perte de liaisons hydrogènes et interactions hydrophobes probablement nécessaires à la stabilité de la protéine.

## Chapitre 4 : *ELMOD2* un nouveau gène de surdité ?

### 1. Introduction

Bien qu'étudié durant de nombreuses années en termes de diagnostic moléculaire, la surdité continue à être associée à de nouveaux gènes, grâce à l'évolution des techniques d'analyse du génome. Ces gènes sont aussi bien impliqués dans l'anatomo-physiologie de l'oreille que dans d'autres fonctions cellulaires non liées spécifiquement à l'audition. Certains de ces rôles relèvent du fonctionnement de la mitochondrie, une organelle cellulaire dynamique. En effet, les mitochondries contenues dans une cellule sont en perpétuel mouvement et interaction, formant un réseau fusionné ou fissionné selon les besoins cellulaires.

Les protéines, codées par des gènes nucléaires et mitochondriaux, sont impliquées dans les voies de fusions et fissions mitochondriales et les voies de l'audition. OPA1 et MFN2 sont des protéines clés de la fusion mitochondriale et agissent en interaction avec d'autres protéines pour créer le complexe promouvant la fusion des mitochondries. Ces processus nécessitent de l'hydrolyse de GTP possible grâce aux GTPases qui sont régulées par des petites protéines appelées les GAP pour *GTPase-Activating Protein*.

ELMOD2 est une des GAP contribuant au passage de ses GTPases de leur état actif à inactif par l'hydrolyse du GTP. ELMOD2 fait partie de la sous-famille des ELMOD de la famille des ELMO. Elle possède un domaine fonctionnel ELMO commun aux membres de cette famille. Les fonctions d'ELMOD2 connues à ce jour, concernent la fusion mitochondriale, la ciliogenèse et la cytokinèse. Néanmoins à ce jour ELMOD2 n'a été associé qu'à la fibrose pulmonaire idiopathique, mais jamais à la perte de l'audition.

Durant ce chapitre, nous présentons d'abord les résultats d'exome d'une famille dont les deux enfants sont atteints d'une surdité, portant un variant bi-allélique d'*ELMOD2*. Ensuite, nous avons caractérisé les conséquences fonctionnelles du variant *ELMOD2* à l'état homozygote et hétérozygote sur le réseau mitochondrial d'un des deux patients et de sa mère.

## 2. Patients

Les deux enfants de la famille SF 242 de la région de Doukkala ont été recruté pour une surdité syndromique familiale. La fille (SF 242-IV:1) née en 2013, est atteinte d'une surdité bilatérale pré linguale profonde, a marché à 2 ans et demi et présente un strabisme. Le fils (SF 242-IV:2) né en 2011, est atteint d'une surdité bilatérale prélinguale profonde, a marché à l'âge de 3 ans et présente un strabisme ainsi qu'un comportement autistique (Figure 26).

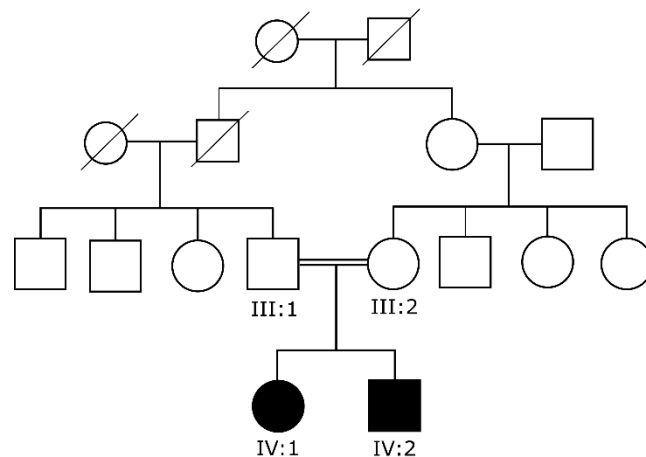


Figure 26 : Arbre généalogique de la famille SF 242

## 3. Résultats

### 3.1. Analyse WES

Le WES du patient SF 242-IV:1 a été réalisé au BGI Tech Solutions sur le BGISEQ-500 sequencer. Les résultats sous format csv ont été téléchargés du serveur BGI pour les deux patients, listant les SNP et les indel présents. En commençant par isoler les variants présents sur les gènes de surdité et en appliquant tous les filtres classiques de sélection des variants pathogènes, aucun variant significatif n'a pu être retenu. De ce fait, nous avons étudiés les variants présents dans les autres gènes, et un variant particulier a été identifié.

Le variant NM\_153702.3:c.316A>G ; p.(Lys106Glu) d'*ELMOD2* est un candidat pour cette famille, car les 2 paralogues de ce gène sont aussi impliqués respectivement dans la surdité et les troubles du spectre autistiques (Jaworek et al. 2013; Miryounesi et al. 2019). Différents degrés de pathogénicité ont été prédit par les logiciels, ainsi le variant est pathogène selon Polyphen-2, *uncertain* selon SIFT, MutPred et FATHMM-XF, bénin selon Mutation Assessor et *disease causing* selon MutationTaster.

Par confirmation Sanger, SF 242-IV:1 et SF 242-IV:1 étaient tous deux porteurs homozygotes du variant faux-sens, alors que les parents sont hétérozygotes pour cette mutation (Figure 27).

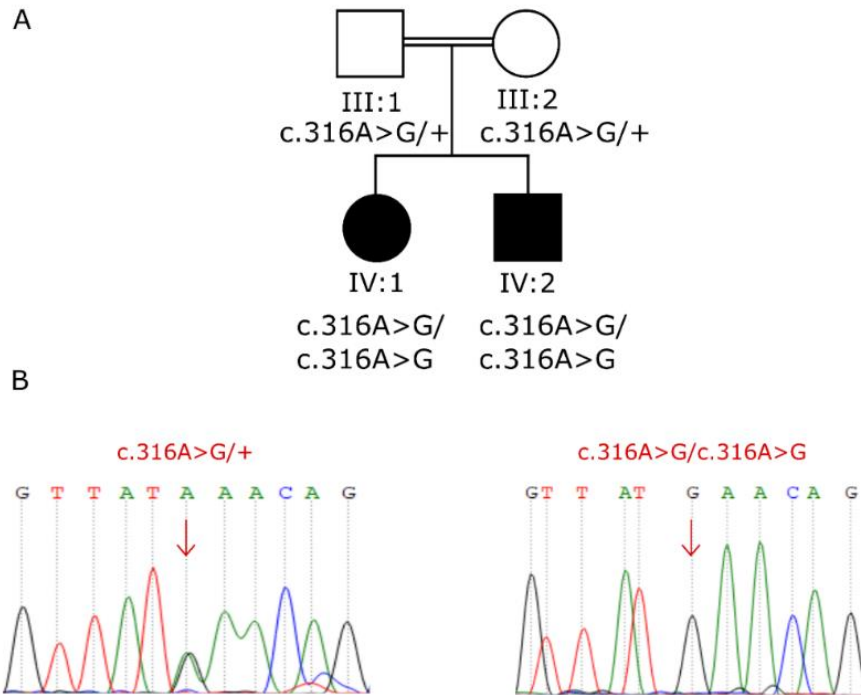


Figure 27 : Résultats de la ségrégation de c.316A>G au sein de la famille SF 242

(A) Arbre et génotype ; (B) chromatogramme des membres de la famille SF 242 (de gauche à droite : hétérozygote, homozygote muté)

### 3.2. Analyse du réseau mitochondrial

Afin de vérifier l'effet de cette mutation sur la structure du réseau mitochondrial, nous avons mis en culture des fibroblastes de peau d'un patient et de sa mère. Les mitochondries ont été visualisées par la sonde fluorescente MitoTracker, et des images représentatives de deux expériences indépendantes sont présentées (Figure 28). Ensuite, les images ont été seuillées pour quantifier la longueur des mitochondries : le rouge indique un réseau mitochondrial fusionné, alors que le bleu un réseau fragmenté (Figure 28).

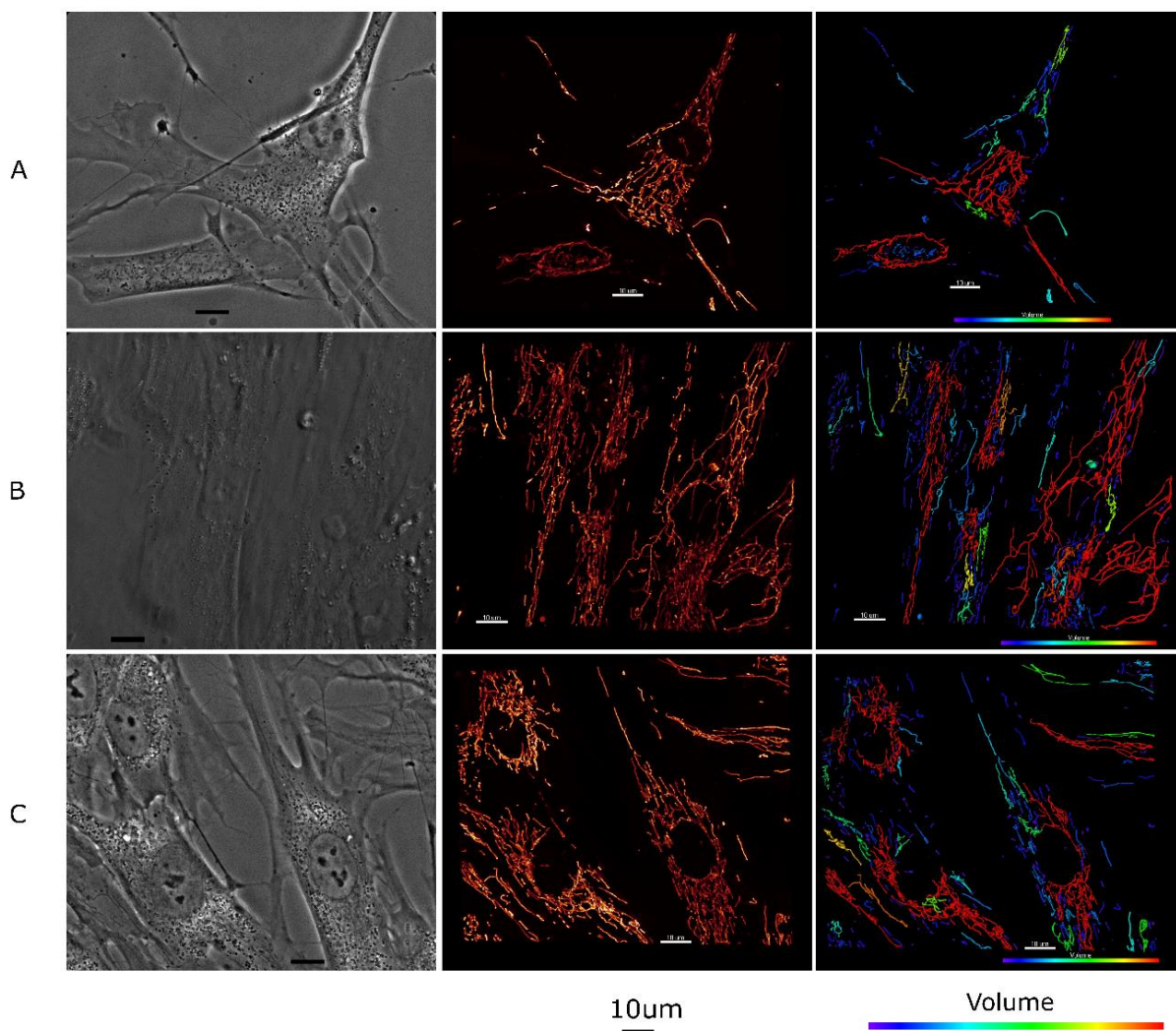


Figure 28 : Structure des mitochondries dans les fibroblastes de peau.

Images par contraste de phase (à gauche), en microscopie à fluorescence (au milieu) et seuillées pour la détermination de la longueur des mitochondries (à droite) des fibroblastes de la peau : (A) Témoin ; (B) Mère ; (C) Patient. Barre d'échelle : 10  $\mu\text{m}$ . Echelle de volume de mitochondrie de  $\leq 1\mu\text{m}$  à

> 20 $\mu\text{m}$  représenté du bleu au rouge

Les moyennes des pourcentages de longueur des 11 captures de cellules témoins, 19 cellules de la mère hétérozygote et 21 cellules du patient homozygote pour le variant *ELMOD2* sont représentées sur le tableau 20. Par défaut, les captures d'image des fibroblastes témoins contenaient 1 à 2 cellules et celles du patient et de sa mère entre 2 et 5 cellules.

Les tailles des mitochondries ont été distribuées selon leur longueur en  $\mu\text{m}$ , et classées selon les catégories de longueurs suivantes  $\leq 1$ ,  $\leq 5$ ,  $\leq 10$ ,  $\leq 20$  et  $> 20 \mu\text{m}$ .

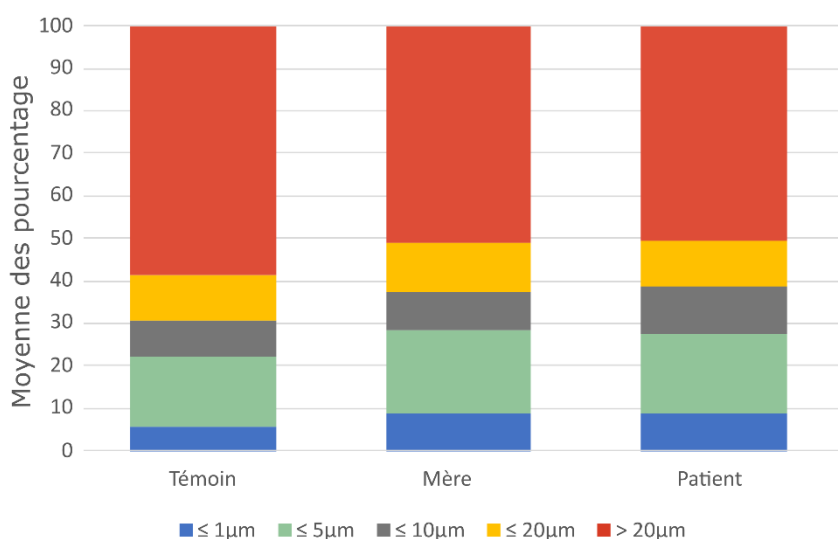
Tableau 20 : Pourcentages moyens des longueurs des mitochondries des fibroblastes de peau

Longueur	Témoin	Mère	Patient
≤ 1µm	5,56%	8,53%	8,89%
≤ 5µm	16,65%	19,94%	18,75%
≤ 10µm	8,28%	8,88%	11,16%
≤ 20µm	10,97%	11,54%	10,65%
>20µm	58,54%	51,12%	50,55%

Les fibroblastes du patient et de la mère présentent 51,12% et 50,55% des mitochondries allongées avec une longueur > 20 µm et 8,53% et 8,89% de mitochondries fragmentées, respectivement. Par contre, les cellules témoins comptent 58,54% des mitochondries allongées de longueur > 20 µm et seulement 5,56% de mitochondries fragmentées.

On remarque une légère différence de pourcentage de mitochondries fusionnées entre les fibroblastes témoins d'un côté, et les fibroblastes du patient et de sa mère, de l'autre. Le variant à l'état homozygote ou hétérozygote pourrait donc entraîner une légère diminution de la fusion et une augmentation de la fragmentation du réseau mitochondrial en passant de 5,56% chez le témoin à 8,89% et 8,53% chez le patient et sa mère. (Tableau 20, Figure 29.A).

A



B

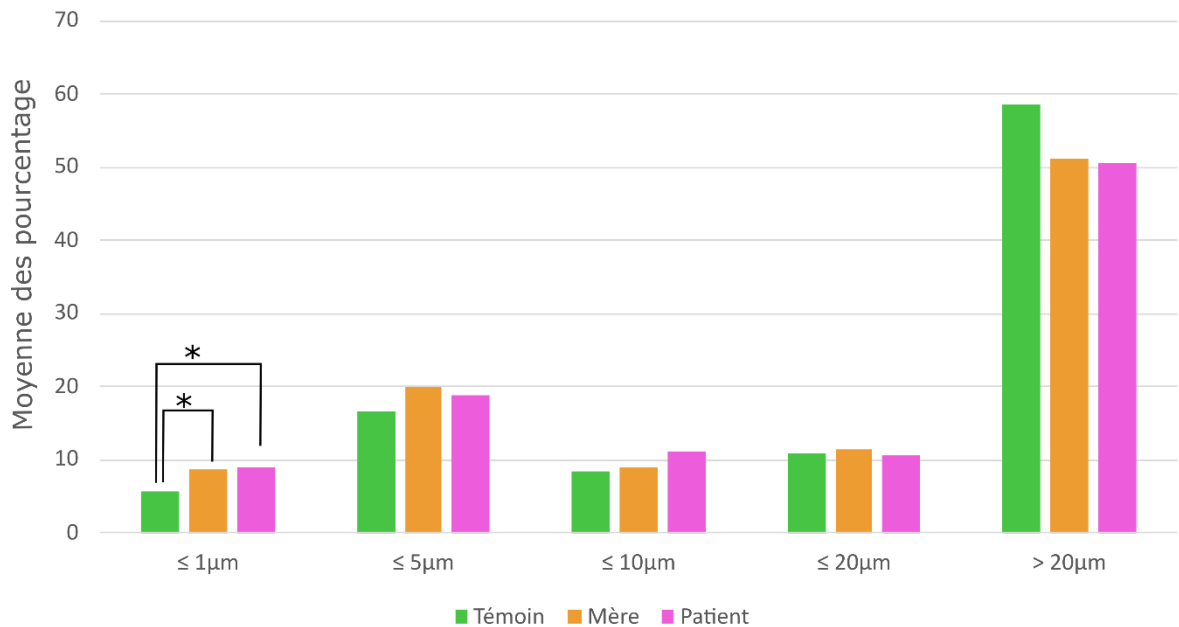


Figure 29 : Graphe à barre (A) et histogrammes (B) des moyennes des longueurs des mitochondries des fibroblastes du contrôle à gauche, de la mère au milieu et du patient à droite.

L'application du test de Wilcoxon Mann Whitney, avec une p-value significative si  $p < 0.05$  montre une différence significative (Tableau 21) entre le pourcentage de mitochondries de longueur  $\leq 1\mu\text{m}$  entre le témoin et la mère, ainsi qu'entre le témoin et le patient (Figure 29.B). On remarque que la différence la p-value est inférieure chez la mère que le patient.

A la base de ces résultats, le variant impacterait probablement un mécanisme physiologique autre que la dynamique mitochondriale dans lequel est impliqué *ELMOD2* tel que la ciliogenèse sachant que les données murines le suggèrent.

Tableau 21 : p-value du test Wilcoxon Mann Whitney réalisé sur les pourcentages des longueurs mitochondriales entre témoin, mère et patient

	Témoïn vs Mère	Témoïn vs Patient	Patient vs Mère
$\leq 1\mu\text{m}$	0.009 *	0.023 *	0.625
$\leq 5\mu\text{m}$	0.157	0.284	0.807
$\leq 10\mu\text{m}$	0.965	0.266	0.297
$\leq 20\mu\text{m}$	0.635	0.873	0.851
$> 20\mu\text{m}$	0.287	0.307	0.727

\* différence statistiquement significative  $p < 0.05$

## 4. Discussion

ELMOD2 (Cell Engulfment and Motility Domain containing 2) a été identifié comme la protéine activatrice (GAP) de la GTPase régulatrice ARL2, et est localisée dans les cils primaires des photorécepteurs, dans les mitochondries, le réticulum endoplasmique, et les gouttelettes lipidiques (East et al. 2012; Schiavon et al. 2019; Turn et al. 2021).

L'analyse WES des deux patients d'une même famille atteints d'une surdité associée à un trouble du spectre autistique a révélé le variant homozygote NM\_153702.3:c.316A>G, p.(Lys106Glu) d'*ELMOD2*, caractérisant potentiellement l'implication de ce gène dans la surdité. Les deux paralogues d'*ELMOD2*, *ELMOD1* et *ELMOD3* ont été liés à une surdité chez la souris et l'humain. Les 3 protéines sont des GAP pour la protéine ARL2.

Les deux variants faux-sens d'*ELMOD3* reportés respectivement chez une famille Chinoise et une famille Iranienne, c.512A>G p.(His171Arg) et c.794T>C p.(Leu265Ser), affectent le domaine ELMO et induisent une surdité non syndromique (Jaworek et al. 2013; Li et al. 2018). L'étude du variant p.His171Arg a localisé la protéine mutée dans le cytoplasme et la membrane cellulaire mais s'est également accumulée dans le noyau, indiquant une localisation anormale d'*ELMOD3* alors que l'*ELMOD3* de type sauvage était localisé dans le cytoplasme et sur la membrane cellulaire. La mutation interfère avec l'interaction de la protéine avec le cytosquelette d'actine, qui joue un rôle crucial dans le développement et le fonctionnement des cellules ciliées de l'oreille (Jaworek et al. 2013). Le variant Iranien c.794T>C a une fréquence de  $3.98 \times 10^{-6}$  alors que c.512A>G reste sans fréquence, localisé dans le domaine ELMO il a entraîné une faible présence à une absence dans les microvillosités et une distribution cytoplasmique diffuse, avec parfois une concentration nucléaire (Li et al. 2018).

La séquence protéique d'*ELMOD2* a une longueur de 293aa, au sein de laquelle, le domaine ELMO est compris entre les acides aminés 126 et 282 (Bowzard et al. 2007). Le variant que nous reportons dans cette étude est c.316A>G, p.(Lys106Glu) n'est par conséquent pas inclus dans le domaine fonctionnel ELMO de la protéine, mais pourrait néanmoins avoir des conséquences structurales sur la fonction de la protéine, car jusqu'à présent les mécanismes par lesquels opèrent les variants des gènes *ELMOD1*, 2 et 3 demeurent peu clairs (Turn et al. 2021).

*ELMOD2* a été identifié comme gène de susceptibilité à la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) suivant l'hypothèse qu'une lésion épithéliale induite par une infection virale agirait comme déclencheur. *ELMOD2* est exprimé dans les macrophages alvéolaires et l'épithélium alvéolaire. Ainsi l'expression des interférons pour la réponse antivirale est dépendante d'*ELMOD2* (Hodgson

et al. 2006; Pulkkinen et al. 2010; Lawson et al. 2011). Une délétion de novo située en 4q28.3-31.23 de 14,56 Mb, contenant 8 gènes dont *ELMOD2* a été retrouvé chez un patient avec de multiples malformations associées à une hypertension pulmonaire. Parmi les fonctions des gènes, un rôle dans la morphogenèse pulmonaire et la tubulogenèse peut être attribuées aux gènes défectés expliquant la caractéristique unique de malformation vasculaire du poumon (Duga et al. 2014).

Les variants d'*ELMOD1* et *ELMOD3* ont été identifiés dans des déficiences intellectuelles (Miryounesi et al. 2019; Loi et al. 2020), ce qui tendrait à suggérer qu'*ELMOD2* pourrait être associé aux troubles du spectre autistique identifiés chez les 2 patients de notre famille.

L'expression ubiquitaire des *ELMODs* et leur spécificité *in vitro* pour les GTPases de la famille ARF suggère que les *ELMODs* interagissent avec de multiples GTPases afin d'augmenter leur susceptibilité à endosser des rôles clés dans de multiples voies de régulations cellulaires (Turn et al. 2020).

L'étude du réseau mitochondrial des fibroblastes de peau chez le patient sourd et sa mère normo-entendante avec la présence d'un témoin nous a permis de visualiser une augmentation statistiquement significative des mitochondries fissionnées dont la longueur est  $\leq 1 \mu\text{m}$  entre patient et témoin ainsi que mère et témoin pouvant indiquer une altération de la fusion du réseau mitochondrial. Cependant aucune différence significative n'a été relevée pour les autres longueurs mitochondriales. Le variant *ELMOD2*:p.(Lys106Glu) ne provoquerait probablement pas une perte considérable de la fonction protéique sur la dynamique mitochondriale. Le variant pourrait peut-être inhiber la protéine dans ses fonctions de ciliogenèse.

## 5. Conclusion

*ELMOD2*, est un gène codant pour une protéine GAP impliquée dans la dynamique mitochondriale et la ciliogenèse, et retrouvé pour la première fois chez des patients atteints avec perte auditive et troubles du spectre autistique. En effet, le variant c.316A>G; p.(Lys106Glu) du gène *ELMOD2* a été retrouvé chez une sœur et son frère de parents consanguins avec une transmission autosomique récessive.

L'analyse du réseau mitochondrial du patient homozygote et de sa mère saine hétérozygote a révélé une augmentation statistiquement significative des mitochondries fissionnées chez les fibroblastes du patient et de sa mère par rapport au témoin pouvant indiquer une altération de la fusion du réseau mitochondrial. Cependant ces résultats ne permettent pas de statuer sur la pathogénicité de ce variant en termes d'action sur la fusion mitochondriale. Néanmoins, l'idée que ce variant puisse avoir un impact pathologique sur la ciliogenèse dans la cochlée reste entière, et demande à être vérifiée *in vivo*.

De ce fait, dans l'état actuel de nos données, nous ne pouvons affirmer si la mutation identifiée dans *ELMOD2* est responsable ou non du phénotype clinique que nous avons identifié. Il serait donc nécessaire d'identifier d'une part d'autres patients présentant des variants pathogènes dans *ELMOD2* avec un phénotype clinique similaire aux nôtres, et d'étudier les conséquences structurales de ces variants sur la ciliogenèse, soit sur des cellules neuronales dérivées de cellules souches pluripotentes induites (iPSc) provenant des fibroblastes de patients, soit sur un modèle murin reproduisant l'une des mutations d'*ELMOD2* identifiées.

# CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Ce projet de thèse a consisté en la recherche génomique et moléculaire de gènes et variants chez les patients et leurs familles atteints de perte auditive. La surdité est reconnue comme la pathologie neurosensorielle la plus répandue à travers le monde et est génétiquement hétérogène, expliquant un large spectre phénotypique. Nos résultats ont abouti à l'identification de nouveaux génotypes au sein d'une cohorte de patients sourds dans la population marocaine.

L'analyse de la littérature montre que les cas de surdité au sein de la population marocaine présentent une grande hétérogénéité entre individus et ethnies. Un total de 17 gènes explique la liste des surdités non syndromiques : *MTRNR1* (codant l'ARNr 12S mitochondrial), *AIFM1*, *CLDN14*, *CLDN9*, *ESPN*, *GJB2*, *MET*, *MPZL2*, *MYO15A*, *LRTOMT*, *PJKV*, *PNPT1*, *PTPRQ*, *SLC22A4*, *TBC1D24*, *TMC1*, *TPRN*. Les surdités syndromiques quant à elles présentent aussi une diversité très importante avec un ensemble de 24 gènes distribués en multiples syndromes : *ATP6V1B1*, *B4GALT7*, *BSND*, *COL4A3*, *EDNRB*, *FAM20C*, *GJB2*, *GPR98*, *HOXB1*, *KCNQ1*, *LARS2*, *MASP1*, *MYO7A*, *PEX1*, *PJKV*, *RSPO1*, *SLC29A3*, *SLITRK6*, mais aussi la délétion t (X;Y). Notamment, deux gènes impliqués dans la physiologie mitochondriale *LARS2* et *MT-RNR1* ont été identifiés respectivement dans des familles marocaines avec un syndrome de Perrault et une surdité isolée associée ou non à un traitement à la streptomycine.

Notre analyse initiale et systématique des gènes *GJB2* et *LRTOMT* ces 4 dernières années a permis d'identifier de nouveaux variants *GJB2* allongeant la liste de substitutions et délétions retrouvées au Maroc. Les fréquences d'individus sourds porteurs de variants dans *GJB2* et *LRTOMT* demeurent similaires aux fréquences précédemment calculées et les deux principales causes de surdité non syndromique au Maroc, avec parmi 220 familles 36,8% présentant un variant de *GJB2* et 8,63% présentant un variant de *LRTOMT*.

Nos résultats, basés sur la technique de *Whole Exome Sequencing*, ont permis l'identification des causes moléculaires dans un cadre de recherche de nombreuses autres familles, dont 4 ont été incluses dans ce rapport.

Nous avons décrit les cas de patients apparentés atteints de surdité non syndromique portant le variant c.72delA de *MPZL2*. Ce cas représente la première caractérisation de *MPZL2* en Afrique et la sixième au Monde, et suggère après une analyse haplotypique que le variant c.72delA *MPZL2* est issu d'un effet fondateur.

Nous avons aussi caractérisé deux familles atteintes de surdité syndromique, l'une avec le syndrome d'Alport, qui n'avait jusqu'à présent été rapporté qu'à deux reprises au sein de la

population marocaine. La substitution c.4153G>C sur le gène *COL4A3* en est la cause, avec une atteinte auditive et rénal chez les deux frères examinés, signant ensemble les critères cliniques caractéristiques du syndrome d'Alport. La seconde famille présentait le syndrome 3MC avec le variant pathogène c.1426G>A de *MASP1*, l'un des trois gènes liés à ce syndrome particulièrement rare. Une étude *in silico* reposant sur une modélisation moléculaire des deux protéines mutées est venu renforcer leur statut de pathogénicité.

Nous avons identifié un variant de transmission autosomique récessive c.4153G>C ; p.(Gly1385Arg) sur le gène *ELMOD2*, chez deux enfants d'une même fratrie de sourds associés à des troubles du spectre autistique. Bien qu'un faisceau d'argument suggèrent que ce variant soit responsable du tableau clinique observé chez les deux patients, nous ne pouvons affirmer que les variants d'*ELMOD2* soient la cause de cette surdité, car ce gène n'a jusqu'à présent jamais été lié à la physiologie ou physiopathologie de l'audition. L'étude de l'effet du variant sur la structure du réseau mitochondrial chez l'un des 2 patients homozygote et sa mère hétérozygote a révélé une augmentation statistiquement significative du pourcentage de mitochondries fragmentées, chez les fibroblastes du patient et de sa mère, nous ne pouvons pour l'instant conclure, car nos quantifications montraient un effet indépendant du statu homo- ou hétérozygote, ce qui n'est pas attendu s'il existe un effet-dose lié à ce variant comme suggéré par les observations cliniques. D'autres analyses de ce variant d'*ELMOD2* seront donc nécessaires pour affirmer ou infirmer sa pathogénicité, et son implication dans le syndrome décrit ici.

Sur la base des résultats exposés dans ce rapport et en tenant compte de l'état de l'art des études génétiques de la surdité au Maroc et en Afrique du Nord, de multiples questions restent sans réponse. Nous proposons ci-après des axes de recherches futures qui mettront davantage en lumière la complexité génétique de la surdité au Maroc.

Nous envisageons de :

- Promouvoir les recherches de notre laboratoire aux professionnels de la santé, aux familles de malades et au grand public afin de faire bénéficier au plus grand nombre de personnes l'accès précoce au diagnostic génétique.
- Elargir notre cohorte de patients afin de bien déterminer le spectre génétique et mutationnel des surdités héréditaires au sein de la population marocaine.
- Mettre en place les ressources financières et humaines pour le bon recrutement des familles et leur diagnostic clinique et génétique.
- Elaborer un panel de séquençage NGS spécifique à la population marocaine pour favoriser un accès rapide au diagnostic moléculaire.
- Mettre en œuvre une analyse NGS pour le diagnostic moléculaire au sein de du laboratoire de Génétique de l'Institut Pasteur du Maroc.
- Constituer des cohortes cliniquement bien caractérisées pour renforcer les corrélations génotypes-phénotypes, et identifier les patients éligibles aux traitements par les thérapies géniques émergentes.
- Etablir un projet de recherche pour l'étude fonctionnelle de la protéine ELMOD2 dans la ciliogenèse au sein de l'oreille interne.

Ensemble, ces recherches devraient ouvrir la voie vers un démantèlement de plus en plus exhaustif des patients atteints de surdité au Maroc, et permettre la constitution de cohortes de patients parfaitement bien caractérisés sur le plan clinique et génétique, qui soient éligibles aux traitements en émergence.

# BIBLIOGRAPHIE

- Abramowicz MJ, Albuquerque-Silva J, Zanen A (2002) Corneal dystrophy and perceptive deafness (Harboyan syndrome): CDPD 1 maps to 20p13. *Journal of Medical Genetics* 39:110–112. <https://doi.org/10.1136/jmg.39.2.110>
- Adadey SM, Quaye O, Amedofu GK, et al (2020a) Screening for GJB2-R143W-Associated Hearing Impairment: Implications for Health Policy and Practice in Ghana. *Public Health Genomics* 23:184–189. <https://doi.org/10.1159/000512121>
- Adadey SM, Wonkam-Tingang E, Aboagye ET, et al (2021) Hearing loss in Africa: current genetic profile. *Hum Genet.* <https://doi.org/10.1007/s00439-021-02376-y>
- Adadey SM, Wonkam-Tingang E, Twumasi Aboagye E, et al (2020b) Connexin Genes Variants Associated with Non-Syndromic Hearing Impairment: A Systematic Review of the Global Burden. *Life (Basel)* 10:E258. <https://doi.org/10.3390/life10110258>
- Adadi N, Lahrouchi N, Bouhouch R, et al (2017) Clinical and molecular findings in a Moroccan family with Jervell and Lange-Nielsen syndrome: a case report. *Journal of Medical Case Reports* 11:. <https://doi.org/10.1186/s13256-017-1243-1>
- Adato A, Weil D, Kalinski H, et al (1997) Mutation Profile of All 49 Exons of the Human Myosin VIIA Gene, and Haplotype Analysis, in Usher 1B Families from Diverse Origins. *The American Journal of Human Genetics* 61:813–821. <https://doi.org/10.1086/514899>
- Adato A, Weston MD, Berry A, et al (2000) Three novel mutations and twelve polymorphisms identified in the USH2A gene in Israeli USH2 families. *Human mutation* 15:388. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(200004\)15:4<388::AID-HUMU27>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(200004)15:4<388::AID-HUMU27>3.0.CO;2-N)
- Ades HW, Engström H (1974) Anatomy of the Inner Ear. In: Keidel WD, Neff WD (eds) *Auditory System*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 125–158
- Ahmed ZM, Masmoudi S, Kalay E, et al (2008) Mutations of LRTOMT, a fusion gene with alternative reading frames, cause nonsyndromic deafness in humans. *Nature Genetics* 40:1335–1340. <https://doi.org/10.1038/ng.245>
- AitRaise I, Amalou G, Bousfiha A, et al (2022) Genetic heterogeneity in GJB2, COL4A3, ATP6V1B1 and EDNRB variants detected among hearing impaired families in Morocco. *Mol Biol Rep.* <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07245-z>
- Alport AC (1927) HEREDITARY FAMILIAL CONGENITAL HAEMORRHAGIC NEPHRITIS. *Br Med J* 1:504–506
- Amalou G, Aitraise I, Bouzidi A, et al (2022) Syndromic Hearing Loss in Moroccan families is associated to homozygous missense variants in COL4A3 and MASP1. *Human Gene* 33:201053. <https://doi.org/10.1016/j.humgen.2022.201053>
- Amalou G, Bonnet C, Riahi Z, et al (2021) A homozygous MPZL2 deletion is associated with non syndromic hearing loss in a moroccan family. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 140:110481. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2020.110481>
- Amasdl S, Smaili W, Natiq A, et al (2018) Familial X/Y Translocation Encompassing ARSE in Two Moroccan Siblings with Sensorineural Deafness. *Cytogenetic and Genome Research* 153:66–72. <https://doi.org/10.1159/000485071>

- Amati-Bonneau P, Valentino ML, Reynier P, et al (2008) OPA1 mutations induce mitochondrial DNA instability and optic atrophy “plus” phenotypes. *Brain* 131:338–351. <https://doi.org/10.1093/brain/awm298>
- Ammar S, Kanoun H, Kammoun K, et al (2021) Next-generation sequencing in patients with familial FSGS: first report of collagen gene mutations in Tunisian patients. *J Hum Genet* 66:795–803. <https://doi.org/10.1038/s10038-021-00912-2>
- Ammar-Khodja F, Bonnet C, Dahmani M, et al (2015) Diversity of the causal genes in hearing impaired Algerian individuals identified by whole exome sequencing. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* 3:189–196. <https://doi.org/10.1002/mgg3.131>
- Ammar-Khodja F, Faugère V, Baux D, et al (2009) Molecular screening of deafness in Algeria: High genetic heterogeneity involving DFNB1 and the Usher loci, DFNB2/USH1B, DFNB12/USH1D and DFNB23/USH1F. *European Journal of Medical Genetics* 52:174–179. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2009.03.018>
- Andrade FA, Lidani KCF, Catarino SJ, Messias-Reason IJ (2017) Serine Proteases in the Lectin Pathway of the Complement System. In: Chakraborti S, Dhalla NS (eds) *Proteases in Physiology and Pathology*. Springer, Singapore, pp 397–420
- Atik T, Koparir A, Bademci G, et al (2015) Novel MASP1 mutations are associated with an expanded phenotype in 3MC1 syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 10:128. <https://doi.org/10.1186/s13023-015-0345-3>
- Auslender N, Bandah D, Rizel L, et al (2008) Four USH2A founder mutations underlie the majority of Usher syndrome type 2 cases among non-Ashkenazi Jews. *Genet Test* 12:289–294. <https://doi.org/10.1089/gte.2007.0107>
- Babanejad M, Fattahi Z, Bazazzadegan N, et al (2012) A comprehensive study to determine heterogeneity of autosomal recessive nonsyndromic hearing loss in Iran. *Am J Med Genet A* 158A:2485–2492. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35572>
- Bademci G, Abad C, Incesulu A, et al (2018) MPZL2 is a novel gene associated with autosomal recessive nonsyndromic moderate hearing loss. *Hum Genet* 137:479–486. <https://doi.org/10.1007/s00439-018-1901-4>
- Bakhchane A, Bousfiha A, Charoute H, et al (2016a) Update of the spectrum of GJB2 gene mutations in 152 Moroccan families with autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *European Journal of Medical Genetics* 59:325–329. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2016.05.002>
- Bakhchane A, Charif M, Salime S, et al (2015a) Recessive TBC1D24 mutations are frequent in Moroccan non-syndromic hearing loss pedigrees. *PLoS ONE* 10:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138072>
- Bakhchane A, Charoute H, Nahili H, et al (2015b) A novel mutation in the TMC1 gene causes non-syndromic hearing loss in a Moroccan family. *Gene* 574:28–33. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.07.075>
- Bakhchane A, Kindil Z, Charoute H, et al (2016b) Compound heterozygous SLC29A3 mutation causes H syndrome in a Moroccan patient: A case report. *Curr Res Transl Med* 64:65–68. <https://doi.org/10.1016/j.retram.2016.01.008>

- Barker DF, Hostikka SL, Zhou J, et al (1990) Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome. *Science* 248:1224–1227. <https://doi.org/10.1126/science.2349482>
- Barrett KE, Barman SM, Boitano S, Brooks H (2010) Ganong's review of medical physiology. McGraw-Hill Medical; 23 edition (July 24, 2009, New York)
- Boldt ABW, Boschmann SE, Catarino SJ, et al (2016) MASP1 and MASP2. In: Choi S (ed) *Encyclopedia of Signaling Molecules*. Springer New York, New York, NY, pp 1–18
- Bom SJ, Kunst HP, Huygen PL, et al (1999) Non-syndromal autosomal dominant hearing impairment: ongoing phenotypical characterization of genotypes. *Br J Audiol* 33:335–348. <https://doi.org/10.3109/03005369909090117>
- Boualla L, Jdioui W, Souлами K, et al (2016) Clinical and molecular findings in three Moroccan families with distal renal tubular acidosis and deafness: Report of a novel mutation of ATP6V1B1 gene. *Current Research in Translational Medicine* 64:5–8. <https://doi.org/10.1016/j.retram.2016.01.005>
- Boucher S, Avan P (2023) Physiologie cochléaire: anatomie, connaissances cellulaires et moléculaires au service de la compréhension des explorations électrophysiologiques
- Bouhouche A, Albaroudi N, El Alaoui MA, et al (2021) Identification of the novel SDR42E1 gene that affects steroid biosynthesis associated with the oculocutaneous genital syndrome. *Exp Eye Res* 209:108671. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2021.108671>
- Boulouiz R, Li Y, Abidi O, et al (2007) Analysis of MYO7A in a Moroccan family with Usher syndrome type 1B: novel loss-of-function mutation and non-pathogenicity of p.Y1719C. *Molecular Vision* 5
- Boulouiz R, Li Y, Soualhin H, et al (2008) A novel mutation in the Espin gene causes autosomal recessive nonsyndromic hearing loss but no apparent vestibular dysfunction in a Moroccan family. *Am J Med Genet A* 146A:3086–3089. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.32525>
- Bousfiha A, Bakhchane A, Charoute H, et al (2017) Novel compound heterozygous mutations in the GPR98 (USH2C) gene identified by whole exome sequencing in a Moroccan deaf family. *Mol Biol Rep* 44:429–434. <https://doi.org/10.1007/s11033-017-4129-9>
- Bousfiha A, Bakhchane A, Elrharchi S, et al (2016) Intra-familial phenotypic variability in a Moroccan family with hearing loss and palmoplantar keratoderma (PPK). *Current Research in Translational Medicine* 64:61–64. <https://doi.org/10.1016/j.retram.2016.01.011>
- Bousfiha A, Riahi Z, Elkhatabi L, et al (2019) Further Evidence for the Implication of the **MET** Gene in Non-Syndromic Autosomal Recessive Deafness. *Hum Hered* 84:109–116. <https://doi.org/10.1159/000503450>
- Bouzaher MH, Worden CP, Jeyakumar A (2020) Systematic Review of Pathogenic GJB2 Variants in the Latino Population. *Otol Neurotol* 41:e182–e191. <https://doi.org/10.1097/MAO.0000000000002505>
- Bowzard JB, Cheng D, Peng J, Kahn RA (2007) ELMOD2 Is an Arl2 GTPase-activating Protein That Also Acts on Arfs. *J Biol Chem* 282:17568–17580. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701347200>

- Bris C, Desquirit-Dumas V, Gueguen N, et al (2018) Pathologies liées à des mutations de l'ADN mitochondrial. *Revue Francophone des Laboratoires* 2018:71–80. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(18\)30260-0](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(18)30260-0)
- Brownell WE, Bader CR, Bertrand D, de Ribaupierre Y (1985) Evoked Mechanical Responses of Isolated Cochlear Outer Hair Cells. *Science* 227:194–196. <https://doi.org/10.1126/science.3966153>
- Brownstein Z, Friedman LM, Shahin H, et al (2011) Targeted genomic capture and massively parallel sequencing to identify genes for hereditary hearing loss in middle eastern families. *Genome Biology* 12:. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-9-r89>
- Burté F, Carelli V, Chinnery PF, Yu-Wai-Man P (2015) Disturbed mitochondrial dynamics and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol* 11:11–24. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2014.228>
- Carnevale F, Krajewska G, Fischetto R, et al (1989) Ptosis of eyelids, strabismus, diastasis recti, hip defect, cryptorchidism, and developmental delay in two sibs. *Am J Med Genet* 33:186–189. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320330210>
- Carpina NT, Lee MY (2018) Genetic Hearing Loss and Gene Therapy. *Genomics Inform* 16:e20. <https://doi.org/10.5808/GI.2018.16.4.e20>
- Castiglione A, Busi M, Martini A (2013) Syndromic hearing loss: An update. *Hearing, Balance and Communication* 11:146–159. <https://doi.org/10.3109/21695717.2013.820514>
- Chan DK, Chang KW (2014) GJB2-associated hearing loss: Systematic review of worldwide prevalence, genotype, and auditory phenotype. *The Laryngoscope* 124:E34–E53. <https://doi.org/10.1002/lary.24332>
- Charif M, Boulouiz R, Bakhechane A, et al (2013) Genetic and molecular analysis of the CLDN14 gene in Moroccan family with non-syndromic hearing loss. *Indian J Hum Genet* 19:331–336. <https://doi.org/10.4103/0971-6866.120828>
- Charif M, Bounaceur S, Abidi O, et al (2012) The c.242G>A mutation in LRTOMT gene is responsible for a high prevalence of deafness in the Moroccan population. *Molecular Biology Reports* 39:11011–11016. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2003-3>
- Chen H, Chan DC (2004) Mitochondrial Dynamics in Mammals. In: Schatten GP (ed) *Current Topics in Developmental Biology*. Academic Press, pp 119–144
- Chen H, Chan DC (2009) Mitochondrial dynamics—fusion, fission, movement, and mitophagy—in neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet* 18:R169–R176. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp326>
- Chew C, Lennon R (2018) Basement Membrane Defects in Genetic Kidney Diseases. *Front Pediatr* 6:. <https://doi.org/10.3389/fped.2018.00011>
- Chiereghin C, Robusto M, Mauri L, et al (2021) SLC22A4 Gene in Hereditary Non-syndromic Hearing Loss: Recurrence and Incomplete Penetrance of the p.C113Y Mutation in Northwest Africa. *Frontiers in Genetics* 12:. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.606630>

- Cunningham CL, Wu Z, Jafari A, et al (2017) The murine catecholamine methyltransferase mTOMT is essential for mechanotransduction by cochlear hair cells. *Elife* 6:e24318. <https://doi.org/10.7554/eLife.24318>
- de Kok YJM, Merckx GFM, van der Maarel SM, et al (1995) A duplication/paracentric inversion associated with familial X-linked deafness (DFN3) suggests the presence of a regulatory element more than 400 kb upstream of the POU3F4 gene. *Human Molecular Genetics* 4:2145–2150. <https://doi.org/10.1093/hmg/4.11.2145>
- Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM, et al (2000) Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* 26:207–210. <https://doi.org/10.1038/79936>
- Delmaghani S, El-Amraoui A (2022) The genetic and phenotypic landscapes of Usher syndrome: from disease mechanisms to a new classification. *Hum Genet*. <https://doi.org/10.1007/s00439-022-02448-7>
- Di Fonzo A, Ronchi D, Lodi T, et al (2009) The mitochondrial disulfide relay system protein GFER is mutated in autosomal-recessive myopathy with cataract and combined respiratory-chain deficiency. *Am J Hum Genet* 84:594–604. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.04.004>
- Di Stazio M, Collesi C, Vozzi D, et al (2019) TBL1Y: a new gene involved in syndromic hearing loss. *Eur J Hum Genet* 27:466–474. <https://doi.org/10.1038/s41431-018-0282-4>
- Doubaj Y, Pingault V, Elalaoui SC, et al (2015) A Novel Mutation in the Endothelin B Receptor Gene in a Moroccan Family with Shah-Waardenburg Syndrome. *Mol Syndromol*. <https://doi.org/10.1159/000371590>
- Du X, Schwander M, Moresco EMY, et al (2008) A catechol-O-methyltransferase that is essential for auditory function in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:14609–14614. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807219105>
- Duga B, Czako M, Komlosi K, et al (2014) Deletion of 4q28.3-31.23 in the background of multiple malformations with pulmonary hypertension. *Mol Cytogenet* 7:36. <https://doi.org/10.1186/1755-8166-7-36>
- East MP, Bowzard JB, Dacks JB, Kahn RA (2012) ELMO Domains, Evolutionary and Functional Characterization of a Novel GTPase-activating Protein (GAP) Domain for Arf Protein Family GTPases. *J Biol Chem* 287:39538–39553. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.417477>
- Ebermann I, Walger M, Scholl HPN, et al (2007) Truncating mutation of the DFNB59 gene causes cochlear hearing impairment and central vestibular dysfunction. *Hum Mutat* 28:571–577. <https://doi.org/10.1002/humu.20478>
- Egilmez OK, Kalcioğlu MT (2016) Genetics of Nonsyndromic Congenital Hearing Loss. *Scientifica* 2016:1–9. <https://doi.org/10.1155/2016/7576064>
- Elalaoui SC, Al-Sheqaih N, Ratbi I, et al (2016) Non lethal Raine syndrome and differential diagnosis. *European Journal of Medical Genetics* 59:577–583. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2016.09.018>
- Elrharchi S, Riahi Z, Salime S, et al (2021) Novel Mutation in AIFM1 Gene Associated with X-Linked Deafness in a Moroccan Family. *Human Heredity* 85:35–39. <https://doi.org/10.1159/000512712>

- Elrharchi S, Riahi Z, Salime S, et al (2018) Two novel homozygous missense mutations identified in the BSND gene in Moroccan patients with Bartter's syndrome. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 113:46–50. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2018.07.010>
- Farwell KD, Shahmirzadi L, El-Khechen D, et al (2015) Enhanced utility of family-centered diagnostic exome sequencing with inheritance model-based analysis: results from 500 unselected families with undiagnosed genetic conditions. *Genet Med* 17:578–586. <https://doi.org/10.1038/gim.2014.154>
- Fehlmann T, Reinheimer S, Geng C, et al (2016) cPAS-based sequencing on the BGISEQ-500 to explore small non-coding RNAs. *Clin Epigenet* 8:123. <https://doi.org/10.1186/s13148-016-0287-1>
- Fischel-Ghodsian N (2003) Mitochondrial deafness. *Ear Hear* 24:303–313. <https://doi.org/10.1097/01.AUD.0000079802.82344.B5>
- Flock Å, Bretscher A, Weber K (1982) Immunohistochemical localization of several cytoskeletal proteins in inner ear sensory and supporting cells. *Hearing Research* 7:75–89. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(82\)90082-X](https://doi.org/10.1016/0378-5955(82)90082-X)
- Flock A, Flock B, Murray E (1977) Studies on the sensory hairs of receptor cells in the inner ear. *Acta Otolaryngol* 83:85–91. <https://doi.org/10.3109/00016487709128817>
- Foley AR, Zou Y, Dunford JE, et al (2020) GGPS1 Mutations Cause Muscular Dystrophy/Hearing Loss/Ovarian Insufficiency Syndrome. *Ann Neurol* 88:332–347. <https://doi.org/10.1002/ana.25772>
- Fu S, Yan J, Wang X, et al (2011) The audiological characteristics of a hereditary Y-linked hearing loss in a Chinese ethnic Tujia pedigree. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 75:202–206. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2010.10.035>
- Gandre-Babbe S, van der Blik AM (2008) The Novel Tail-anchored Membrane Protein Mff Controls Mitochondrial and Peroxisomal Fission in Mammalian Cells. *MBoC* 19:2402–2412. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-12-1287>
- Gardner OK, Haynes K, Schweitzer D, et al (2017) Familial Recurrence of 3MC Syndrome in Consanguineous Families: A Clinical and Molecular Diagnostic Approach with review of the Literature. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal* 54:739–748. <https://doi.org/10.1597/15-151>
- Gazzaz B, Weil D, Raïs L, et al (2005) Autosomal recessive and sporadic deafness in Morocco: High frequency of the 35delG GJB2 mutation and absence of the 342-kb GJB6 variant. *Hearing Research* 210:80–84. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2005.08.001>
- GBD 2019 Hearing Loss Collaborators (2021) Hearing loss prevalence and years lived with disability, 1990-2019: findings from the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet* 397:996–1009. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00516-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00516-X)
- Gibrieli AA, Abou-Elew MH, Masmoudi S (2019) Analysis of p.Gly12Valfs\*2, p.Trp24\* and p.Trp77Arg mutations in GJB2 and p.Arg81Gln variant in LRTOMT among non syndromic hearing loss Egyptian patients: implications for genetic diagnosis. *Mol Biol Rep* 46:2139–2145. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04667-0>

- Graul-Neumann LM, Mensah MA, Klopocki E, et al (2018) Biallelic intragenic deletion in *MASP1* in an adult female with 3MC syndrome. *European Journal of Medical Genetics* 61:363–368. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2018.01.016>
- Griparic L, Wel NN van der, Orozco JJ, et al (2004) Loss of the Intermembrane Space Protein Mgm1/OPA1 Induces Swelling and Localized Constrictions along the Lengths of Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 279:18792–18798. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400920200>
- Guttinger M, Sutti F, Panigada M, et al (1998) Epithelial V-like Antigen (EVA), a Novel Member of the Immunoglobulin Superfamily, Expressed in Embryonic Epithelia with a Potential Role as Homotypic Adhesion Molecule in Thymus Histogenesis. *The Journal of Cell Biology* 141:1061–1071. <https://doi.org/10.1083/jcb.141.4.1061>
- Hanson H, Storey H, Pagan J, Flinter F (2011) The value of clinical criteria in identifying patients with X-linked Alport syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol* 6:198–203. <https://doi.org/10.2215/CJN.00200110>
- Hilgert N, Smith RJH, Van Camp G (2009) Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: Which ones should be analyzed in DNA diagnostics? *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 681:189–196. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.08.002>
- Hodgson U, Pulkkinen V, Dixon M, et al (2006) *ELMOD2* Is a Candidate Gene for Familial Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Hum Genet* 79:149–154
- Hofmann H, Voss T, Kühn K, Engel J (1984) Localization of flexible sites in thread-like molecules from electron micrographs: Comparison of interstitial, basement membrane and intima collagens. *Journal of Molecular Biology* 172:325–343. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(84\)80029-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(84)80029-7)
- Hudson G, Amati-Bonneau P, Blakely EL, et al (2008) Mutation of *OPA1* causes dominant optic atrophy with external ophthalmoplegia, ataxia, deafness and multiple mitochondrial DNA deletions: a novel disorder of mtDNA maintenance. *Brain* 131:329–337. <https://doi.org/10.1093/brain/awm272>
- Ichinose A, Moteki H, Hattori M, et al (2015) Novel mutations in *LRTOMT* associated with moderate progressive hearing loss in autosomal recessive inheritance. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 124 Suppl 1:142S–7S. <https://doi.org/10.1177/0003489415575043>
- Jaijo T, Aller E, Beneyto M, et al (2007) *MYO7A* mutation screening in Usher syndrome type I patients from diverse origins. *J Med Genet* 44:e71. <https://doi.org/10.1136/jmg.2006.045377>
- James DI, Parone PA, Mattenberger Y, Martinou J-C (2003) *hFis1*, a Novel Component of the Mammalian Mitochondrial Fission Machinery. *Journal of Biological Chemistry* 278:36373–36379. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303758200>
- Jardel C, Rucheton B (2018) Diagnostic des maladies mitochondriales. *Revue Francophone des Laboratoires* 2018:36–48. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(18\)30119-9](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(18)30119-9)
- Jaworek TJ, Richard EM, Ivanova AA, et al (2013) An alteration in *ELMOD3*, an Arl2 GTPase-activating protein, is associated with hearing impairment in humans. *PLoS Genet* 9:e1003774. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003774>

- Johnson KR, Longo-Guess CM, Gagnon LH (2012) Mutations of the Mouse ELMO Domain Containing 1 Gene (*Elmod1*) Link Small GTPase Signaling to Actin Cytoskeleton Dynamics in Hair Cell Stereocilia. *PLoS ONE* 7:e36074. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036074>
- Jonard L, Marlin S, Louha M, et al (2011) Molecular diagnosis of genetic deafness. *Clinical Biochemistry* 44:510–511. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.02.031>
- Kamoun A (1997) Spectrum of Pediatric Renal Diseases in Tunisia. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation* 8:317
- Kandel E, Schwartz JH, Jessell TM (2000) *Principles of Neural Science*, 2th ed. McGraw-Hill Medical
- Karbowski M, Youle RJ (2003) Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ* 10:870–880. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401260>
- Kari E, Schrauwen I, Llaci L, et al (2017) Compound heterozygous mutations in *MASPI* in a deaf child with absent cochlear nerves. *Neurol Genet* 3:e153. <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000153>
- Khalaileh A, Abu-Diab A, Ben-Yosef T, et al (2018) The Genetics of Usher Syndrome in the Israeli and Palestinian Populations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 59:1095. <https://doi.org/10.1167/iovs.17-22817>
- Kharrat M, Makni S, Makni K, et al (2006) Autosomal Dominant Alport's syndrome: Study of a Large Tunisian Family. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation* 17:320
- Kijima K, Numakura C, Izumino H, et al (2005) Mitochondrial GTPase mitofusin 2 mutation in Charcot–Marie–Tooth neuropathy type 2A. *Hum Genet* 116:23–27. <https://doi.org/10.1007/s00439-004-1199-2>
- Kim BJ, Oh D-Y, Han JH, et al (2020) Significant Mendelian genetic contribution to pediatric mild-to-moderate hearing loss and its comprehensive diagnostic approach. *Genetics in Medicine* 22:1119–1128. <https://doi.org/10.1038/s41436-020-0774-9>
- Kimberling WJ, Hildebrand MS, Shearer AE, et al (2010) Frequency of Usher syndrome in two pediatric populations: Implications for genetic screening of deaf and hard of hearing children. *Genet Med* 12:512–516. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181e5afb8>
- Kochhar A, Hildebrand MS, Smith RJH (2007) Clinical aspects of hereditary hearing loss. *Genetics in Medicine* 9:393–408. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3180980bd0>
- Koffler T, Ushakov K, Avraham KB (2015) Genetics of Hearing Loss-Syndromic. *Otolaryngologic Clinics of North America* 48:1041–1061. <https://doi.org/10.1016/j.otc.2015.07.007>
- Kokotas H, Petersen M, Willems P (2007) Mitochondrial deafness. *Clinical Genetics* 71:379–391. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2007.00800.x>
- Korver AMH, Smith RJH, Van Camp G, et al (2017) Congenital hearing loss. *Nature Reviews Disease Primers* 3:1–17. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.94>

- Krieger E, Joo K, Lee J, et al (2009) Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: Four approaches that performed well in CASP8. *Proteins* 77 Suppl 9:114–122. <https://doi.org/10.1002/prot.22570>
- Krieger E, Vriend G (2014) YASARA View—molecular graphics for all devices—from smartphones to workstations. *Bioinformatics* 30:2981–2982. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu426>
- Larsen CP, Wilson JD, Best-Rocha A, et al (2018) Genetic testing of complement and coagulation pathways in patients with severe hypertension and renal microangiopathy. *Mod Pathol* 31:488–494. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2017.154>
- Lawson WE, Loyd JE, Degryse AL (2011) GENETICS IN PULMONARY FIBROSIS – FAMILIAL CASES PROVIDE CLUES TO THE PATHOGENESIS OF IPF. *Am J Med Sci* 341:439–443. <https://doi.org/10.1097/MAJ.0b013e31821a9d7a>
- Lee H-C, Wei Y-H (2000) Mitochondrial Role in Life and Death of the Cell. *JBS* 7:2–15. <https://doi.org/10.1159/000025424>
- Lemmink HH, Mochluzk T, van den Heuvel LPWJ, et al (1994) Mutations in the type IV collagen  $\alpha 3$  (COL4A3) gene in autosomal recessive Alport syndrome. *Human Molecular Genetics* 3:1269–1273. <https://doi.org/10.1093/hmg/3.8.1269>
- Lench NJ, Markham AF, Mueller RF, et al (1998) A Moroccan family with autosomal recessive sensorineural hearing loss caused by a mutation in the gap junction protein gene connexin 26 (GJB2). *Journal of Medical Genetics* 35:151–152. <https://doi.org/10.1136/jmg.35.2.151>
- Leruez S, Milea D, Defoort-Dhellemmes S, et al (2013) Sensorineural hearing loss in OPA1-linked disorders. *Brain* 136:e236. <https://doi.org/10.1093/brain/aws340>
- Li W, Sun J, Ling J, et al (2018) ELMOD3, a novel causative gene, associated with human autosomal dominant nonsyndromic and progressive hearing loss. *Hum Genet* 137:329–342. <https://doi.org/10.1007/s00439-018-1885-0>
- Li XC, Friedman RA (2002) Nonsyndromic hereditary hearing loss. *Otolaryngol Clin North Am* 35:275–285. [https://doi.org/10.1016/s0030-6665\(02\)00013-0](https://doi.org/10.1016/s0030-6665(02)00013-0)
- Li Y, Pohl E, Boulouiz R, et al (2010) Mutations in TPRN Cause a Progressive Form of Autosomal-Recessive Nonsyndromic Hearing Loss. *The American Journal of Human Genetics* 86:479–484. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.02.003>
- Loi E, Moi L, Blois S, et al (2020) ELMOD3-SH2D6 gene fusion as a possible co-star actor in autism spectrum disorder scenario. *J Cell Mol Med* 24:2064–2069. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14733>
- Malpuech G, Demeocq F, Palcoux JB, Vanlieferinghen P (1983) A previously undescribed autosomal recessive multiple congenital anomalies/mental retardation (MCA/MR) syndrome with growth failure, lip/palate cleft(s), and urogenital anomalies. *Am J Med Genet* 16:475–480. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320160405>
- Marková S, Šafka Brožková D, Mészárosová A, et al (2016) Mutations in eight small DFNB genes are not a frequent cause of non-syndromic hereditary hearing loss in Czech patients. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 86:27–33. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2016.04.005>

- Martínez-Pulleiro R, García-Murias M, Fidalgo-Díaz M, García-González MÁ (2021) Molecular Basis, Diagnostic Challenges and Therapeutic Approaches of Alport Syndrome: A Primer for Clinicians. *Int J Mol Sci* 22:11063. <https://doi.org/10.3390/ijms222011063>
- Merchant SN, Burgess BJ, Adams JC, et al (2004) Temporal bone histopathology in alport syndrome. *Laryngoscope* 114:1609–1618. <https://doi.org/10.1097/00005537-200409000-00020>
- Michels VV, Hittner HM, Beaudet AL (1978) A clefting syndrome with ocular anterior chamber defect and lid anomalies. *J Pediatr* 93:444–446. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(78\)81154-8](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(78)81154-8)
- Milone M, Younge BR, Wang J, et al (2009) Mitochondrial disorder with OPA1 mutation lacking optic atrophy. *Mitochondrion* 9:279–281. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2009.03.001>
- Mingarelli R, Castriota Scanderbeg A, Dallapiccola B (1996) Two sisters with a syndrome of ocular, skeletal, and abdominal abnormalities (OSA syndrome). *J Med Genet* 33:884–886. <https://doi.org/10.1136/jmg.33.10.884>
- Miryounesi M, Bahari S, Salehpour S, et al (2019) ELMO Domain Containing 1 (ELMOD1) Gene Mutation Is Associated with Mental Retardation and Autism Spectrum Disorder. *J Mol Neurosci* 69:312–315. <https://doi.org/10.1007/s12031-019-01359-z>
- Mochizuki T, Lemmink HH, Mariyama M, et al (1994) Identification of mutations in the  $\alpha 3(\text{IV})$  and  $\alpha 4(\text{IV})$  collagen genes in autosomal recessive Alport syndrome. *Nat Genet* 8:77–82. <https://doi.org/10.1038/ng0994-77>
- Møller AR (2006) *Hearing: anatomy, physiology, and disorders of the auditory system*, 2nd ed. Academic Press, Amsterdam ; Boston
- Morinière V, Dahan K, Hilbert P, et al (2014) Improving mutation screening in familial hematuric nephropathies through next generation sequencing. *J Am Soc Nephrol* 25:2740–2751. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013080912>
- Mosrati MA, Fadhlaoui-Zid K, Benammar-Elgaaied A, et al (2021) Deep analysis of the LRTOMTc.242G>A variant in non-syndromic hearing loss North African patients and the Berber population: Implications for genetic diagnosis and genealogical studies. *Mol Genet Genomic Med* 9:e1810. <https://doi.org/10.1002/mgg3.1810>
- Munye MM, Diaz-Font A, Ocaña L, et al (2017) COLEC10 is mutated in 3MC patients and regulates early craniofacial development. *PLoS Genet* 13:e1006679. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006679>
- Naasse Y, Bakhchane A, Charoute H, et al (2017) A Novel Homozygous Missense Mutation in the FU-CRD2 Domain of the R-spondin1 Gene Associated with Familial 46,XX DSD. *Sex Dev* 11:269–274. <https://doi.org/10.1159/000485393>
- Nahili H, Charif M, Boulouiz R, et al (2010) Prevalence of the mitochondrial A 1555G mutation in Moroccan patients with non-syndromic hearing loss. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 74:1071–1074. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2010.06.008>
- Naz S (2022) Molecular genetic landscape of hereditary hearing loss in Pakistan. *Hum Genet* 141:633–648. <https://doi.org/10.1007/s00439-021-02320-0>

- Newman LE, Schiavon CR, Turn RE, Kahn RA (2017a) The ARL2 GTPase regulates mitochondrial fusion from the intermembrane space. *Cell Logist* 7:e1340104. <https://doi.org/10.1080/21592799.2017.1340104>
- Newman LE, Schiavon CR, Zhou C, Kahn RA (2017b) The abundance of the ARL2 GTPase and its GAP, ELMOD2, at mitochondria are modulated by the fusogenic activity of mitofusins and stressors. *PLoS ONE* 12:e0175164. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175164>
- Newman LE, Zhou C, Mudigonda S, et al (2014) The ARL2 GTPase Is Required for Mitochondrial Morphology, Motility, and Maintenance of ATP Levels. *PLoS One* 9:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099270>
- Ng SB, Buckingham KJ, Lee C, et al (2010) Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nat Genet* 42:30–35. <https://doi.org/10.1038/ng.499>
- Niemann A, Ruegg M, La Padula V, et al (2005) Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network : new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *Journal of Cell Biology* 170:1067–1078. <https://doi.org/10.1083/jcb.200507087>
- Nikopoulos K, Schrauwen I, Simon M, et al (2011) Autosomal recessive Stickler syndrome in two families is caused by mutations in the COL9A1 gene. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 52:4774–4779. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-7128>
- Ohdo S, Madokoro H, Sonoda T, Hayakawa K (1986) Mental retardation associated with congenital heart disease, blepharophimosis, blepharoptosis, and hypoplastic teeth. *J Med Genet* 23:242–244. <https://doi.org/10.1136/jmg.23.3.242>
- Olichon A, Baricault L, Gas N, et al (2003) Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* 278:7743–7746. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200677200>
- Olichon A, Emorine LJ, Descoins E, et al (2002) The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Letters* 523:171–176. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02985-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02985-X)
- O'Reilly CM, Fogarty KE, Drummond RM, et al (2003) Quantitative Analysis of Spontaneous Mitochondrial Depolarizations. *Biophysical Journal* 85:3350–3357. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74754-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74754-7)
- Petit C, Bonnet C, Safieddine S (2023) Deafness: from genetic architecture to gene therapy. *Nat Rev Genet*. <https://doi.org/10.1038/s41576-023-00597-7>
- Pickles J (2013) *An Introduction to the Physiology of Hearing: Fourth Edition*. Brill
- Pickles JO (2015) Auditory pathways: anatomy and physiology. In: *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier, pp 3–25
- Pires DEV, Ascher DB, Blundell TL (2014) mCSM: predicting the effects of mutations in proteins using graph-based signatures. *Bioinformatics* 30:335–342. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt691>

- Pulkkinen V, Bruce S, Rintahaka J, et al (2010) *ELMOD2*, a candidate gene for idiopathic pulmonary fibrosis, regulates antiviral responses. *The FASEB Journal* 24:1167–1177. <https://doi.org/10.1096/fj.09-138545>
- Rachel RA, Li T, Swaroop A (2012) Photoreceptor sensory cilia and ciliopathies: focus on CEP290, RPGR and their interacting proteins. *Cilia* 1:22. <https://doi.org/10.1186/2046-2530-1-22>
- Ramzan M, Philippe C, Belyantseva IA, et al (2021) Variants of human CLDN9 cause mild to profound hearing loss. *Hum Mutat* 42:1321–1335. <https://doi.org/10.1002/humu.24260>
- Ratbi I, Falkenberg KD, Sommen M, et al (2015) Heimler Syndrome Is Caused by Hypomorphic Mutations in the Peroxisome-Biogenesis Genes PEX1 and PEX6. *Am J Hum Genet* 97:535–545. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.08.011>
- Ratbi I, Hajji S, Ouldin K, et al (2007) The mutation 35delG of the gene of the connexin 26 is a frequent cause of autosomal-recessive non-syndromic hearing loss in Morocco. *Archives de Pédiatrie* 14:450–453. <https://doi.org/10.1016/j.arcped.2006.12.004>
- Ratbi I, Jaouad IC, Elorch H, et al (2016) Severe early onset retinitis pigmentosa in a Moroccan patient with Heimler syndrome due to novel homozygous mutation of PEX1 gene. *Eur J Med Genet* 59:507–511. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2016.09.004>
- Riahi Z, Bonnet C, Zainine R, et al (2014) Whole Exome Sequencing Identifies New Causative Mutations in Tunisian Families with Non-Syndromic Deafness. *PLoS One* 9:e99797. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099797>
- Riahi Z, Hammami H, Ouragini H, et al (2013) Update of the spectrum of GJB2 gene mutations in Tunisian families with autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Gene* 525:1–4. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.04.078>
- Ritelli M, Dordoni C, Cinquina V, et al (2017) Expanding the clinical and mutational spectrum of B4GALT7-spondylodysplastic Ehlers-Danlos syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 12:. <https://doi.org/10.1186/s13023-017-0704-3>
- Rooryck C, Diaz-Font A, Osborn DPS, et al (2011) Mutations in lectin complement pathway genes COLEC11 and MASP1 cause 3MC syndrome. *Nat Genet* 43:197–203. <https://doi.org/10.1038/ng.757>
- Salime S, Charif M, Bousfiha A, et al (2017) Homozygous mutations in PJVK and MYO15A genes associated with non-syndromic hearing loss in Moroccan families. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 101:25–29. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2017.07.024>
- Salime S, Riahi Z, Elrharchi S, et al (2018) A novel mutation in SLITRK6 causes deafness and myopia in a Moroccan family. *Gene* 659:89–92. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.03.042>
- Sarmadi A, Nasrniya S, Soleimani Farsani M, et al (2020) A novel pathogenic variant in the LRTOMT gene causes autosomal recessive non-syndromic hearing loss in an Iranian family. *BMC Medical Genetics* 21:127. <https://doi.org/10.1186/s12881-020-01061-7>
- Sauvage J-P, Puyraud S, Roche O, Rahman A (1999) Anatomie de l'oreille interne. In: *Vertiges*. pp 9–12

- Savige J, Ariani F, Mari F, et al (2019) Expert consensus guidelines for the genetic diagnosis of Alport syndrome. *Pediatr Nephrol* 34:1175–1189. <https://doi.org/10.1007/s00467-018-3985-4>
- Schiavon CR, Turn RE, Newman LE, Kahn RA (2019) *ELMOD2* regulates mitochondrial fusion in a mitofusin-dependent manner, downstream of *ARL2*. *Mol Biol Cell* 30:1198–1213. <https://doi.org/10.1091/mbc.E18-12-0804>
- Schraders M, Oostrik J, Huygen PLM, et al (2010) Mutations in *PTPRQ* Are a Cause of Autosomal-Recessive Nonsyndromic Hearing Impairment DFNB84 and Associated with Vestibular Dysfunction. *American Journal of Human Genetics* 86:604–610. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.02.015>
- Shearer AE, Hildebrand MS, Smith RJ (1993) Hereditary Hearing Loss and Deafness Overview. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al. (eds) *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle, Seattle (WA)
- Shohat M, Fischel-Ghodsian N, Legum C, Halpern GJ (1999) Aminoglycoside-induced deafness associated with the mitochondrial DNA mutation A1555G. *American Journal of Otolaryngology* 20:64–67. [https://doi.org/10.1016/S0196-0709\(99\)90054-6](https://doi.org/10.1016/S0196-0709(99)90054-6)
- Sirmaci A, Walsh T, Akay H, et al (2010) *MASP1* Mutations in Patients with Facial, Umbilical, Coccygeal, and Auditory Findings of Carnevale, Malpuech, OSA, and Michels Syndromes. *The American Journal of Human Genetics* 87:679–686. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.09.018>
- Skjoedt M-O, Hummelshoj T, Palarasah Y, et al (2010) A Novel Mannose-binding Lectin/Ficolin-associated Protein Is Highly Expressed in Heart and Skeletal Muscle Tissues and Inhibits Complement Activation. *J Biol Chem* 285:8234–8243. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.065805>
- Sloan-Heggen CM, Bierer AO, Shearer AE, et al (2016) Comprehensive genetic testing in the clinical evaluation of 1119 patients with hearing loss. *Hum Genet* 135:441–450. <https://doi.org/10.1007/s00439-016-1648-8>
- Smirnova E, Griparic L, Shurland DL, van der Blik AM (2001) Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 12:2245–2256. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.8.2245>
- Smith RJ, Bale JF, White KR (2005) Sensorineural hearing loss in children. *The Lancet* 365:879–890. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)71047-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)71047-3)
- Stelma F, Bhutta MF (2014) Non-syndromic hereditary sensorineural hearing loss: review of the genes involved. *The Journal of Laryngology & Otology* 128:13–21. <https://doi.org/10.1017/S0022215113003265>
- Stenson PD, Ball EV, Mort M, et al (2003) Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Hum Mutat* 21:577–581. <https://doi.org/10.1002/humu.10212>
- Strauss KA, Gonzaga-Jauregui C, Brigatti KW, et al (2018) Genomic diagnostics within a medically underserved population: efficacy and implications. *Genet Med* 20:31–41. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.76>

- Suárez-Rivero JM, Villanueva-Paz M, De la Cruz-Ojeda P, et al (2017) Mitochondrial Dynamics in Mitochondrial Diseases. *Diseases* 5:1. <https://doi.org/10.3390/diseases5010001>
- Suzuki M, Murakami T, Cheng J, et al (2015) ELMOD2 is anchored to lipid droplets by palmitoylation and regulates adipocyte triglyceride lipase recruitment. *MBoC* 26:2333–2342. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-11-1504>
- Takahashi M, Mori S, Shigeta S, Fujita T (2007) Role of MBL-associated Serine Protease (MASP) On Activation of the Lectin Complement Pathway. In: Lambris JD (ed) *Current Topics in Innate Immunity*. Springer New York, New York, NY, pp 93–104
- Talbi S, Bonnet C, Boudjenah F, et al (2019) The spectrum of GJB2 gene mutations in Algerian families with nonsyndromic hearing loss from Sahara and Kabylie regions. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 124:157–160. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2019.05.036>
- Teebi AS, Farag TI (1997) *Genetic Disorders Among Arab Populations*. Oxford University Press
- Tekin M, Arnos KS, Pandya A (2001) Advances in hereditary deafness. *Lancet* 358:1082–1090. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)06186-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)06186-4)
- Tilokani L, Nagashima S, Paupe V, Prudent J (2018) Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays in Biochemistry* 62:341–360. <https://doi.org/10.1042/EBC20170104>
- Titomanlio L, Bennaceur S, Bremond-Gignac D, et al (2005) Michels syndrome, Carnevale syndrome, OSA syndrome, and Malpuech syndrome: Variable expression of a single disorder (3MC syndrome)? *American Journal of Medical Genetics Part A* 137A:332–335. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.30878>
- Toriello HV, Smith SD (2013) *Hereditary Hearing Loss and Its Syndromes*. OUP USA
- Turn RE, East MP, Prekeris R, Kahn RA (2020) The ARF GAP ELMOD2 acts with different GTPases to regulate centrosomal microtubule nucleation and cytokinesis. *Mol Biol Cell* 31:2070–2091. <https://doi.org/10.1091/mbc.E20-01-0012>
- Turn RE, Linnert J, Gigante ED, et al (2021) Roles for ELMOD2 and Rootletin in ciliogenesis. *Mol Biol Cell* 32:800–822. <https://doi.org/10.1091/mbc.E20-10-0635>
- Urquhart J, Roberts R, de Silva D, et al (2016) Exploring the genetic basis of 3MC syndrome: Findings in 12 further families: Exploring The Genetic Basis of 3MC syndrome. *Am J Med Genet* 170:1216–1224. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37564>
- Van Camp G, Snoeckx RL, Hilgert N, et al (2006) A new autosomal recessive form of Stickler syndrome is caused by a mutation in the COL9A1 gene. *American Journal of Human Genetics* 79:449–457. <https://doi.org/10.1086/506478>
- Van der Heiden K, Egorova AD, Poelmann RE, et al (2011) Chapter three - Role for Primary Cilia as Flow Detectors in the Cardiovascular System. In: Jeon KW (ed) *International Review of Cell and Molecular Biology*. Academic Press, pp 87–119
- Vanwesemael M, Schrauwen I, Ceuppens R, et al (2011) A 1 bp deletion in the dual reading frame deafness gene LRTOMT causes a frameshift from the first into the second reading frame.

- Vogel M, Velleuer E, Schmidt-Jiménez LF, et al (2016) Homozygous HOXB1 loss-of-function mutation in a large family with hereditary congenital facial paresis. *Am J Med Genet A* 170:1813–1819. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37682>
- von Ameln S, Wang G, Boulouiz R, et al (2012) A mutation in PNPT1, encoding mitochondrial-RNA-import protein PNPase, causes hereditary hearing loss. *Am J Hum Genet* 91:919–927. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.09.002>
- Wallace DC, Lott MT, Procaccio V (2019) 10 - Mitochondrial Biology and Medicine. In: Pyeritz RE, Korf BR, Grody WW (eds) *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics and Genomics (Seventh Edition)*. Academic Press, pp 267–322
- Wallace DC, Lott MT, Procaccio V (2013) Chapter 11 - Mitochondrial Medicine: The Mitochondrial Biology and Genetics of Metabolic and Degenerative Diseases, Cancer, and Aging. In: Rimoin D, Pyeritz R, Korf B (eds) *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics (Sixth Edition)*. Academic Press, Oxford, pp 1–153
- Wang Q, Lu C, Li N, et al (2004) Y-linked inheritance of non-syndromic hearing impairment in a large Chinese family. *J Med Genet* 41:e80. <https://doi.org/10.1136/jmg.2003.012799>
- Wang Q-J, Li Q-Z, Rao S-Q, et al (2006) A Novel Mutation of POU3F4 Causes Congenital Profound Sensorineural Hearing Loss in a Large Chinese Family. *The Laryngoscope* 116:944–950. <https://doi.org/10.1097/01.MLG.0000215285.53045.24>
- Wang Q-J, Rao S-Q, Zhao Y-L, et al (2009) The large Chinese family with Y-linked hearing loss revisited: clinical investigation. *Acta Otolaryngol* 129:638–643. <https://doi.org/10.1080/00016480802216347>
- Wang R, Han S, Khan A, Zhang X (2017) Molecular Analysis of Twelve Pakistani Families with Nonsyndromic or Syndromic Hearing Loss. *Genet Test Mol Biomarkers* 21:316–321. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2016.0328>
- Wang Y, Ma Y, Qin Y, et al (2021) Novel Mutations in LRTOMT Associated with Congenital Profound Sensorineural Hearing Loss in a Chinese Patient. *Russ J Genet* 57:1322–1327. <https://doi.org/10.1134/S1022795421110144>
- Wang Z, Jiang M, Wu H, et al (2022) A novel MPZL2 c.68delC variant is associated with progressive hearing loss in Chinese population and literature review. *Laryngoscope Investigative Otolaryngology* 7:870–876. <https://doi.org/10.1002/lio2.829>
- Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, et al (2018) SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research* 46:W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Wesdorp M, Murillo-Cuesta S, Peters T, et al (2018) MPZL2, Encoding the Epithelial Junctional Protein Myelin Protein Zero-like 2, Is Essential for Hearing in Man and Mouse. *Am J Hum Genet* 103:74–88. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.05.011>
- Willems PJ (2000) Genetic causes of hearing loss. *New England Journal of Medicine* 342:1101–1109

- Worth CL, Preissner R, Blundell TL (2011) SDM—a server for predicting effects of mutations on protein stability and malfunction. *Nucleic Acids Research* 39:W215–W222. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr363>
- Wu Y, Ge G (2019) Complexity of type IV collagens: from network assembly to function. *Biol Chem* 400:565–574. <https://doi.org/10.1515/hsz-2018-0317>
- Xu X, Jin T (2017) ELMO proteins transduce G protein-coupled receptor signal to control reorganization of actin cytoskeleton in chemotaxis of eukaryotic cells. *Small GTPases* 1–9. <https://doi.org/10.1080/21541248.2017.1318816>
- Yang J, Yan R, Roy A, et al (2015) The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods* 12:7–8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>
- Yang T, Gurrola JG, Wu H, et al (2009) Mutations of KCNJ10 Together with Mutations of SLC26A4 Cause Digenic Nonsyndromic Hearing Loss Associated with Enlarged Vestibular Aqueduct Syndrome. *Am J Hum Genet* 84:651–657. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.04.014>
- Youle RJ, van der Blik AM (2012) Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* 337:1062–1065. <https://doi.org/10.1126/science.1219855>
- Zerkaoui M, Demain LAM, Cherkaoui Jaouad I, et al (2017) Marfanoid habitus is a nonspecific feature of Perrault syndrome. *Clinical Dysmorphology* 26:200–204. <https://doi.org/10.1097/MCD.0000000000000198>
- Zhang Y, Wang F, Ding J, et al (2012) Genotype-phenotype correlations in 17 Chinese patients with autosomal recessive Alport syndrome. *Am J Med Genet A* 158A:2188–2193. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35528>
- Zhou Y, Liu C, Zhou R, et al (2019) SEQdata-BEACON: a comprehensive database of sequencing performance and statistical tools for performance evaluation and yield simulation in BGISEQ-500. *BioData Mining* 12:21. <https://doi.org/10.1186/s13040-019-0209-9>
- Le décibel. In: Fondation Pour l’Audition. <https://www.fondationpourlaudition.org/fr/le-decibel-519>. Accessed 26 Feb 2022
- (2021) World Hearing Day 2021 - Report of activities. <https://www.who.int/publications/m/item/world-hearing-day-2021---report-of-activities>. Accessed 24 Feb 2022

# ANNEXES

# Annexe 1

## Questionnaire en vue du diagnostic de surdité

### Code de la famille :

<b>Identité du sujet</b> Nom :..... Prénom :..... Date de naissance :..... Sexe : <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F Code:.....	<b>Hôpital :.....</b> <b>Service :.....</b> <b>Nom du médecin :</b> ..... <b>Nom d'association :</b> .....	<b>Tél:.....</b>  <b>Adresse :.....</b> .....
---	---	--

### CARACTERISTIQUE DE LA SURDITE :

- **Perception**       **Transmission**
- **Age estimé de début :** Congénitale  naissance à 10 ans  11 à 30 ans   
31 à 50 ans  après 50 ans  incertains
- **Age du diagnostic de la perte auditive :** .....
- **Bilatérale**     **Asymétrique**     **Unilatérale**     **Evolutive**     **Stable**
- **Degré :** Légère     Moyenne     Sévère     Profonde
- **Audiogramme**    OD:.....    OG:.....
- **Réhabilitation actuelle :**  
Aucune   
Aide auditive conventionnelle unilatérale   
Aide auditive conventionnelle bilatérale   
Implant cochléaire unilatéral   
Implant cochléaire bilatéral   
Implant cochléaire + Aide auditive controlatérale
- **Age du port de la première aide auditive:**.....    **Age de l'implantation :**.....
- **Mode de communication :** Oral  Langage des signes     Les deux
- **Education :** Scolarité habituelle     Intégration partielle     Ecole spécialisée   
Niveau d'études :.....
- **Facteurs environnementaux :** Bruit     Méningite     Médicaments     Périnataux   
Autres  Lesquels :.....  Aucun

### DONNEES FAMILIALES :

- **Nombre de personnes atteintes dans la famille :**.....
- **Consanguinité :** oui  non     Degré:.....
- **Origine ethno-géographique des parents :**  
Père :.....    Mère :.....

**Prélèvement :** Date:.....  
 Nature:.....  
 Date d'extraction d'ADN:.....  
 Concentration:.....

**Questionnaire/explorations cliniques pour évaluer la présence d'un syndrome d'Usher**

**Caractéristique de la baisse de vision :**

- |   |                              |                              | <u>Age de début</u> |
|---|------------------------------|------------------------------|---------------------|
| • Déficience de vision nocturne                     | oui <input type="checkbox"/> | non <input type="checkbox"/> | .....               |
| • Déficience de vision périphérique                 | oui <input type="checkbox"/> | non <input type="checkbox"/> | .....               |
| • Présence d'une rétinite pigmentaire au fond d'œil | oui <input type="checkbox"/> | non <input type="checkbox"/> | .....               |
| • Perte de l'acuité visuelle                        | oui <input type="checkbox"/> | non <input type="checkbox"/> | .....               |

**Atteinte vestibulaire :**

- Troubles de l'équilibre :    oui     non     Age de la marche: .....mois
- Vidéo-Nystagmogramme (VNG)
- Equitest:

**Comportement de l'enfant à la tombée de la nuit, indiquer l'âge d'apparition des symptômes :**

- Baisse de l'acuité visuelle
- Maladresse
- Vision périphérique

**Difficulté d'adaptation au passage lumière/obscurité (est-ce l'enfant cligne ou se frotte des yeux ?)**

**Comportement de l'enfant à la lumière, indiquer l'âge d'apparition des symptômes**

- Maladresse
- Photophobie
- Problème de lecture
- Vision périphérique

**Présence d'œdème maculaire**

**Age de la position assise sans soutien**

**Autres symptômes cliniques :**

**Age de début**

Diabète :	oui	non	.....
Problème rénal :	oui	non	.....
Déficit pigmentaire :	oui	non	.....
Problème cardiaque :	oui	non	.....
Retard mental :	oui	non	.....
Malformation :	oui	non	.....
Problème thyroïdienne (Goitre) :	oui	non	.....
Maladie dermatologique :	oui	non	.....
Autres:.....			
Type de syndrome:.....			

**Autres remarques**

## Arbre généalogique

## Annexe 2

### Consentement pour l'examen des caractéristiques génétiques d'une personne et la conservation des échantillons dans une banque d'ADN

<p><b>IDENTIFICATION du PATIENT</b></p> <p>Nom : .....</p> <p>Prénom : .....</p> <p>Date de naissance : .....</p>	<p><b>IDENTITE du REPRESENTANT LEGAL</b> (Si patient mineur ou majeur sous tutelle)</p> <p>Nom : ..... Prénom : .....</p> <p>Lien avec le patient : .....</p>
---	---

Je soussigné(e) reconnais avoir été informé(e) par le :  Dr.....  sous la responsabilité du Dr. **BARAKAT Abdelhamid**

quant à l'examen des caractéristiques génétiques qui sera réalisé à partir :

- Du (des) prélèvement(s) pratiqué(s) sur moi-même
- Du (des) prélèvement(s) pratiqué(s) sur mon enfant mineur ou sur la personne majeure placée sous tutelle

Pour (préciser obligatoirement le nom de la pathologie ou l'indication de l'examen réalisé, et sa nature) :

.....	<b>Code</b> : .....
-------	---------------------

Je reconnais avoir reçu l'ensemble des informations permettant la compréhension de cet examen et sa finalité.

Le résultat de l'examen me sera rendu et expliqué en l'état actuel des connaissances par le médecin qui me l'a prescrit. Ce dernier m'expliquera les moyens de prise en charge nécessaire le cas échéant.

Je souhaite être informé du résultat de l'examen réalisé	oui <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/>
--	---

J'ai compris que si une anomalie génétique pouvant être responsable d'une prédisposition ou d'une affection grave était mise en évidence, je devrai permettre la transmission de cette information au reste de ma/sa famille. J'ai été averti que mon silence pouvait leur faire courir des risques ainsi qu'à leur descendance, dès lors que des mesures de prévention, y compris de conseil génétique ou de soins, peuvent être proposées. Ainsi, lors du rendu des résultats, je devrai choisir entre :

- Assurer moi-même cette diffusion d'information génétique aux membres de ma/sa famille.
- Autoriser le médecin prescripteur à cette diffusion d'information génétique aux membres de ma/sa famille.

J'autorise, dans le respect du secret médical :

La transmission des informations de mon/son dossier médical nécessaires aux médecins concernés par cet examen des caractéristiques génétiques.	oui <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/>
La conservation d'un échantillon de matériel biologique issu de mes/ses prélèvements et son utilisation ultérieure pour poursuivre les investigations dans le cadre de cette même démarche diagnostique, en fonction de l'évolution des connaissances.	oui <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/>
L'utilisation des résultats par le médecin prescripteur au profit des membres de ma/sa famille si ces résultats apparaissent médicalement utiles pour eux	oui <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/>
Des informations génétiques sans lien direct avec la pathologie mais pouvant avoir un impact sur la santé ou celle d'apparentés peuvent être révélées. Je souhaite que mon/son médecin me tienne informé(e)	oui <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/>
Dans le cadre de la démarche diagnostique, une partie de mon/son prélèvement peut ne pas être utilisée. Elle peut être importante pour la recherche scientifique. Ainsi, sans que l'on puisse me recontacter : J'autorise le stockage de mon/son prélèvement et son utilisation pour la recherche	oui <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/>

Conformément aux dispositions de la loi N° 78/17 relative au droit de l'information, je dispose d'un droit d'opposition, d'accès et de rectification.

*Tout consentement non signé empêche la réalisation de l'examen.*

<b>Fait à : INSTITUT PASTEUR DU MAROC</b>	<b>Le :</b> .....
<b>Nom, prénom et signature du patient ou de son représentant légal :</b> .....	<b>Signature et cachet du responsable du laboratoire en génétique :</b>

## Annexe 3

### Préparation des solutions et tampons

- **Tris- base 1M :**

Dissoudre 121,1g de Tris-base dans 800 ml d'H<sub>2</sub>O distillée. Ajuster le pH à 8 avec HCL 12N. Compléter à 1litre, répartir en aliquotes et autoclaver.

- **Hydroxyde de sodium (NaOH) 10N :**

Ajouter 600ml d'eau distillée à 400g de NaOH, bien agiter et ajuster le volume final à 1litre.

- **Disodium-ethyle-diamine-tétraacetate (EDTA) 0,5M pH 8 :**

Dissoudre 93,05g d'EDTA dans 400 ml d'eau distillée. Bien agiter en ajustant le pH à 8 avec du NaOH 10N. Répartir en aliquotes et mettre à l'autoclave.

- **Tris-EDTA (TE) 20/5 :**

Mélanger 20 ml de Tris 1M à pH 7,6 avec 10 ml d'EDTA 0,5M à pH 8. Compléter à 1 litre avec de l'eau distillée.

- **Tris-EDTA (TE) 10/5 :**

Mélanger 10 ml de Tris 1M à pH 7,6 avec 10 ml d'EDTA 0,5M à pH 8. Compléter à 1 litre avec de l'eau distillée.

- **Tris-EDTA (TE) 10/1 :**

Mélanger 10 ml de Tris 1M à pH 7,6 avec 2ml d'EDTA 0,5 M à pH 8. Compléter à 1 litre avec de l'eau distillée.

- **Sodium-dodecyl-sulfate 20% (SDS) :**

Dissoudre 200 g de SDS dans 800 ml d'eau distillée et chauffer à 68°C. Ajuster le pH à 7,2. Compléter le volume à 1litre. Stocker à température ambiante.

- **Chloroforme alcool isoamylique 24/1 :**

Ajouter 10ml d'alcool isoamylique à 240 ml de chloroforme.

- **Tris Acide acétique EDTA (TAE) 50X :**

Dissoudre 242 g de Tris dans 500 ml d'eau distillée. Ajouter 100ml de Na<sub>2</sub>EDTA 0,5M (pH=8) et 57,1 ml d'acide acétique. Ajuster le volume à 1 litre avec de l'eau distillée.

- **Tampon de charge : BBP (Bleu de Bromophenol) :**

Dissoudre 12,5 mg de BBP et 12,5mg de Xylème Cyanol dans 5 ml d'eau distillée. Ajouter 1,5ml de glycérol à 30%. Compléter à 10 ml avec de l'eau distillée tout en agitant.

- **Bromure d'Ethidium (BET) 10 mg/ml :**

Dissoudre 1g de BET dans 100 ml d'eau distillée. Bien agiter. Couvrir le flacon avec du papier aluminium et stocker à température ambiante.

- **Gel d'Agarose 1% pour le contrôle de la qualité de l'ADN :**

Dissoudre 0,25 g d'agarose dans 25 ml de tampon TAE 1X. Ajouter 2 µl de BET. Couler le gel dans la cuve d'électrophorèse et laisser refroidir quelques minutes. Déposer dans chaque puits 1 µl d'ADN mélangé à 2 µl de tampon de charge. Laisser migrer le gel pendant 10 min à 50V. Visualiser le gel sous UV.

- **Gel d'agarose 2% pour le contrôle des produits PCR :**

Dissoudre 0,5 g d'agarose dans 25 ml de tampon TAE 1X. Ajouter 2 µl de BET. Couler le gel dans la cuve d'électrophorèse et laisser refroidir quelques minutes. Déposer dans chaque puits 3 µl des produits PCR mélangés à 2 µl de tampon de charge. Laisser migrer le gel pendant 15 min à 100 V. Visualiser le gel sous UV.

## Annexe 4

### Liste des gènes de surdité utilisée dans l'analyse WES

<i>ACTG1</i>	<i>COL4A5</i>	<i>GJB2</i>	<i>MARVELD2</i>	<i>PDZD7</i>	<i>SPNS2</i>
<i>ADCY1</i>	<i>COL4A6</i>	<i>GJB3</i>	<i>MASP1</i>	<i>PEX1</i>	<i>STRC</i>
<i>ADGRV1</i>	<i>COL9A1</i>	<i>GJB6</i>	<i>MCM2</i>	<i>PEX6</i>	<i>SYNE4</i>
<i>AIFM1</i>	<i>COL9A2</i>	<i>GPR98</i>	<i>MET</i>	<i>PJKK</i>	<i>TBC1D24</i>
<i>ALMS1</i>	<i>CRYM</i>	<i>GPSM2</i>	<i>MIR96</i>	<i>PLS1</i>	<i>TBX1</i>
<i>ATP2B2</i>	<i>DCDC2</i>	<i>GRAP</i>	<i>MIRN96</i>	<i>PNPT1</i>	<i>TCOF1</i>
<i>ATP6V1B1</i>	<i>DFNA5</i>	<i>GRHL2</i>	<i>MITF</i>	<i>POLR1C</i>	<i>TECTA</i>
<i>BDP1</i>	<i>DIABLO</i>	<i>GRHL2</i>	<i>MPZL2</i>	<i>POLR1D</i>	<i>TECTB</i>
<i>BSND</i>	<i>DIAPH1</i>	<i>GRXCR1</i>	<i>MSRB3</i>	<i>POU3F4</i>	<i>TIMM8A</i>
<i>C10orf2</i>	<i>DIAPH3</i>	<i>GRXCR2</i>	<i>MT-RNR1</i>	<i>POU4F3</i>	<i>TJP2</i>
<i>CABP2</i>	<i>DMXL2</i>	<i>GSDME</i>	<i>MT-TL1</i>	<i>PPIP5K2</i>	<i>TMC1</i>
<i>CACNA1D</i>	<i>DSPP</i>	<i>HARS</i>	<i>MT-TS1</i>	<i>PRPS1</i>	<i>TMEM132E</i>
<i>CCDC50</i>	<i>EDN3</i>	<i>HARS2</i>	<i>MYH14</i>	<i>PTPRQ</i>	<i>TMIE</i>
<i>CD164</i>	<i>EDNRB</i>	<i>HGF</i>	<i>MYH9</i>	<i>RDX</i>	<i>TMPRSS3</i>
<i>CDC14A</i>	<i>ELMOD3</i>	<i>HOMER2</i>	<i>MYO15A</i>	<i>REST</i>	<i>TNC</i>
<i>CDH23</i>	<i>EPS8</i>	<i>HSD17B4</i>	<i>MYO3A</i>	<i>ROR1</i>	<i>TPRN</i>
<i>CEACAM16</i>	<i>EPS8L2</i>	<i>IFNLR1</i>	<i>MYO6</i>	<i>S1PR2</i>	<i>TRIOBP</i>
<i>CHD7</i>	<i>ERAL1</i>	<i>ILDR1</i>	<i>MYO7A</i>	<i>SANS</i>	<i>TRRAP</i>
<i>CIB2</i>	<i>ESPN</i>	<i>KARS</i>	<i>NARS2</i>	<i>SEMA3E</i>	<i>TSPEAR</i>
<i>CISD2</i>	<i>ESRP1</i>	<i>KCNE1</i>	<i>NDP</i>	<i>SERPINB6</i>	<i>TWNK</i>
<i>CLDN14</i>	<i>ESRRB</i>	<i>KCNJ10</i>	<i>NLRP3</i>	<i>SIX1</i>	<i>USH1C</i>
<i>CLDN9</i>	<i>EYA1</i>	<i>KCNQ1</i>	<i>OPA1</i>	<i>SIX5</i>	<i>USH1G</i>
<i>CLIC5</i>	<i>EYA4</i>	<i>KCNQ4</i>	<i>OSBPL2</i>	<i>SLC17A8</i>	<i>USH2A</i>
<i>CLPP</i>	<i>FAM65B</i>	<i>KITLG</i>	<i>OTOA</i>	<i>SLC22A4</i>	<i>VLGR1</i>
<i>CLRN1</i>	<i>FGF3</i>	<i>KNCQ1</i>	<i>OTOF</i>	<i>SLC26A4</i>	<i>WBP2</i>
<i>COCH</i>	<i>FGFR1</i>	<i>LARS2</i>	<i>OTOG</i>	<i>SLC265</i>	<i>WFS1</i>
<i>COL11A1</i>	<i>FGFR2</i>	<i>LHFPL5</i>	<i>OTOGL</i>	<i>SLITRK6</i>	<i>WHRN</i>
<i>COL11A2</i>	<i>FOXI1</i>	<i>LMX1A</i>	<i>P2RX2</i>	<i>SMAC</i>	
<i>COL2A1</i>	<i>GAB1</i>	<i>LOXHD1</i>	<i>PAX3</i>	<i>SMPX</i>	
<i>COL4A3</i>	<i>GATA3</i>	<i>LOXL3</i>	<i>PCDH15</i>	<i>SNAI2</i>	
<i>COL4A4</i>	<i>GIPC3</i>	<i>LRTOMT</i>	<i>PDE1C</i>	<i>SOX10</i>	

# Annexe 5

PUBLICATIONS parues en lien avec les travaux exposés dans ce manuscrit de thèse

## Article 1

International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology 140 (2021) 110481



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijporl](http://www.elsevier.com/locate/ijporl)



Case Report

### A homozygous *MPZL2* deletion is associated with non syndromic hearing loss in a moroccan family

Ghita Amalou<sup>a,c,d</sup>, Crystel Bonnet<sup>b</sup>, Zied Riahi<sup>e</sup>, Aymane Bouzidi<sup>a,c,d</sup>, Soukaina Elrharchi<sup>a</sup>, Amale Bousfiha<sup>a,h</sup>, Majida Charif<sup>c,i</sup>, Mostafa Kandil<sup>d</sup>, Guy Lenaers<sup>c</sup>, Christine Petit<sup>b,f,g</sup>, Abdelhamid Barakat<sup>a,j</sup>

<sup>a</sup> Human Molecular Genetics Laboratory, Institut Pasteur du Maroc, Casablanca, Morocco

<sup>b</sup> Genetics and Physiology of Hearing Laboratory, Institut Pasteur, 75015, Paris, France

<sup>c</sup> MitoLab Team, Institut MitoVase, UMR CNRS 6015, INSERM U1083, Université d'Angers, Angers, France

<sup>d</sup> Team of Anthropogenetics and Biotechnologies, Faculty of Sciences, Chouaib Doukkali University, Eljadida, Morocco

<sup>e</sup> Complexité Du Vivant, Sorbonne Universités, 75005, Paris, France

<sup>f</sup> Institut de l'Audition, 75012, Paris, France

<sup>g</sup> Collège de France, 75005, Paris, France

<sup>h</sup> Laboratoire de Physiopathologie et Génétique Moléculaire, Faculté des Sciences Ben M'sik, Université Hassan II, Casablanca, Morocco

<sup>i</sup> Genetics, and Immuno-cell Therapy Team, Mohammed First University, Oujda, Morocco

#### ARTICLE INFO

##### Keywords

*MPZL2*

Non syndromic hearing loss

Morocco

#### ABSTRACT

Adhesion glycoproteins are implicated in the pathophysiology of hearing loss, the most frequent inherited sensory disorder, affecting 1 in 1000 new-borns. Exome sequencing of a consanguineous Moroccan patient with mild hearing loss identified for the first time in a North African family a single homozygous mutation c.72delA in *MPZL2* gene, encoding the Myelin Protein Zero-Like 2, reported as causing deafness in two other populations. Variable tandem repeat genotyping of this family revealed that the c.72delA *MPZL2* allele shared a common haplotype with Turkish and Dutch families. These results confirm the pathogenicity of this *MPZL2* mutation in recessive mild to moderate non-syndromic deafness.

#### 1. Introduction

Hearing loss (HL) is the most frequent sensory disorder affecting 1 in 1000 new-borns in the world population. HL is categorized in several ways: conductive HL typically implies a defect of the outer or middle ear while sensorineural HL refers to a defect of the inner ear [1]. In 70% of neonates who fail newborn hearing screens (NBHS) and are presumed to have inherited HL, there are no other distinguishing physical findings and the HL is classified as nonsyndromic [2]. In most cases, a genetic origin related to one of the 121 genes associated to non-syndromic HL (NSHL) is responsible for the symptom. Today, more than 70 genes and 85 locus have been identified for the recessive NSHL (<https://hereditaryhearingloss.org/> accessed on December 29, 2019)<sup>1</sup>. In Morocco, *GJB2* gene is the primary cause of hearing impairment, with mutations

identified in 43% of the studied NSHL cases [3].

In two recent studies, mutations in *MPZL2* (OMIM: 604873)<sup>2</sup> were newly found as the cause of autosomal recessive deafness-111 (DPNB111) [4,5]. *MPZL2* encodes the Myelin Protein Zero-Like 2, a transmembrane glycoprotein member of the immunoglobulin super-family, implicated in homophilic and heterophilic cell-cell adhesion mediation [5]. A single homozygous deletion c.72delA (p.Ile24-Metfs\*22) was found in 12 patients with a non-syndromic symmetrical mild to moderate hearing impairment, from five consanguineous families: Dutch [5], Turkmen ethnicity from north-eastern Iran [4] and Turkish [4,5] origins.

We present in this study the result of a whole exome sequencing of a patient from a consanguineous Moroccan family affected with NSHL associated to a *MPZL2* deletion for the first time in North Africa; and the

\* Corresponding author. Laboratoire de Génomique et Génétique Humaine, Département de Recherche Scientifique, Institut Pasteur du Maroc, 1 Place Louis Pasteur, 20360, Casablanca, Morocco.

E-mail address: [hamid.barakat@pasteur.ma](mailto:hamid.barakat@pasteur.ma) (A. Barakat).

<sup>1</sup> HHL, <https://hereditaryhearingloss.org>

<sup>2</sup> OMIM, <http://www.omim.org>

<https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2020.110481>

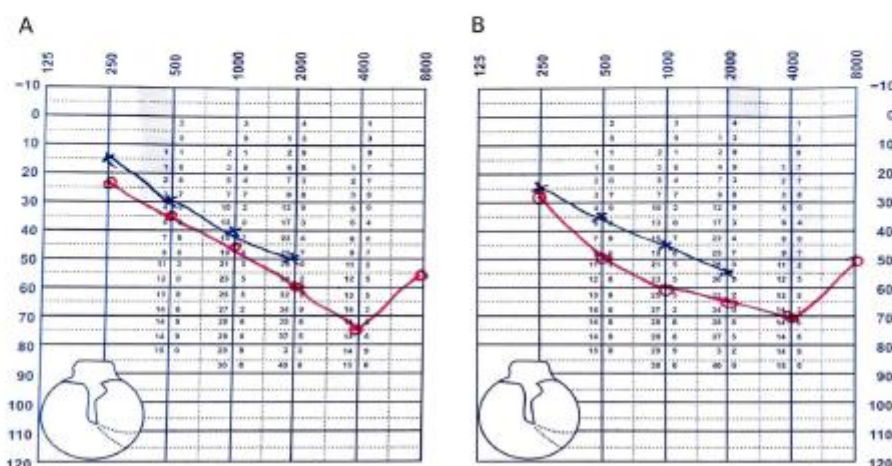
Received 20 June 2020; Received in revised form 29 October 2020; Accepted 29 October 2020

Available online 2 November 2020

0165-5876/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Table 1**  
Identity of the six possibly pathogenic homozygous candidate variants disclosed by the WES in the proband DNA.

Gene	cDNA Variation	Amino Acid Variation	dbSNP Variant ID	MAF GnomAD
<i>LRP1B</i>	c.7289G > A	Arg2430Gln	rs111444554	0.00003897
<i>TBC1D9B</i>	c.901C > T	Arg301Trp	rs748486833	0.000007965
<i>TAF11</i>	c.1943C > G	Ser648Cys	rs202136681	0.0001202
<i>MPZL2</i>	c.72delA	Ile24Metfs*22	rs752672077	0.0007688
<i>FOXRED1</i>	c.1139A > G	His380Arg	rs7116126	0.003264
<i>ZNF77</i>	c.431G > T	Cys144Phe	rs76396690	0.002582



**Fig. 1.** Results of the pure tone audiogram of the affected son (A) and daughter (B). Audiometric tests of the affected son and daughter revealed a maximum hearing loss of 75 and 70 dB at 4 kHz, respectively. The thresholds were determined at 0.25, 0.5, 1, 2, 4, and 8 kHz. (Right ear – red circle; Left ear – blue cross)

possibility of a common ancestor with the other *MPZL2* families.

## 2. Patients and methods

### 2.1. Patients

This study was approved by the Ethics Committee for the biomedical research of Rabat, and is in accordance with the principles of the World Medical Association Declaration of Helsinki.

The family originates from Agadir in the south-west of Morocco and is consanguineous. Family members were informed about the objective of the study and provided informed consent. Clinical examination disclosed prelingual mild to severe bilateral sensorineural hearing loss in two of the three children (Fig. 1). The audiometric test performed at 0.25, 0.5, 1, 2, 4, and 8 kHz on the affected son and daughter revealed a maximum hearing loss of 75 and 70 dB at 4 kHz, respectively. Brain MRI on the affected son did not reveal any abnormality.

### 2.2. Whole exome sequencing

Whole exome sequencing (WES) of the patient III:3 was performed at IntegraGen (Evry, France) on a HiSeq 2000 sequencer (Illumina, San Diego, CA, USA) using the SureSelect Agilent Human exome V5 capture kit (Agilent technologies, Mississauga, ON, Canada) as described elsewhere [6]. Reads were aligned using the human genome reference (hg19). Candidate pathogenic variants were defined as missense, nonsense, splice-site and frameshift mutations with a minor allele frequency lower than 0.01, using the 1000 Genomes Project and gnomAD<sup>3</sup>

exomes databases. The design of specific primers was done with Primer 3 (<http://primer3.ut.ee/>). PCR amplification of the *MPZL2* exon 2 sequence using the forward 5'-TGTCAAGCAGAAAGTTCTCACAATAC-3' and reverse 5'-GAAAAGGAGAAATGGACTGGC-3' primers, and Sanger sequencing were performed on an ABI 3130 Genetic analyzer (Applied Biosystems) with the Big Dye Terminator Cycle Sequencing V1.1 (Life Technologies) to confirm the DNA sequence and validate the segregation of the selected variant.

### 2.3. Genotyping

Genotyping of variable number of tandem repeat (VNTR) markers was performed by DNA amplification with standard PCR and analysis on an ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) on DNA from all available members of the family. In order to establish if the haplotype linked to the variant found by Weedorp et al. (2018) is the same in our family, we used the same molecular markers described. Primers for amplification of VNTR loci were picked from GeneLoc<sup>4</sup> and Genome Browser<sup>5</sup>. Marker order was confirmed in the human genome assembly GRCh37/hg19. Alleles were assigned with Peak Scanner Software v1.0.

## 3. Results

From the WES data generated on the proband case, we focused on non-synonymous, frameshift, indel and splice sites variants, and considered an autosomal recessive mode of inheritance, thus retaining homozygous and compound heterozygous variants. Selected variants

<sup>3</sup> gnomAD, <http://gnomad.broadinstitute.org>

<sup>4</sup> GeneLoc <https://genecards.weizmann.ac.il/geneloc/index.shtml>

<sup>5</sup> UCSC Genome Browser, <https://genome.ucsc.edu>

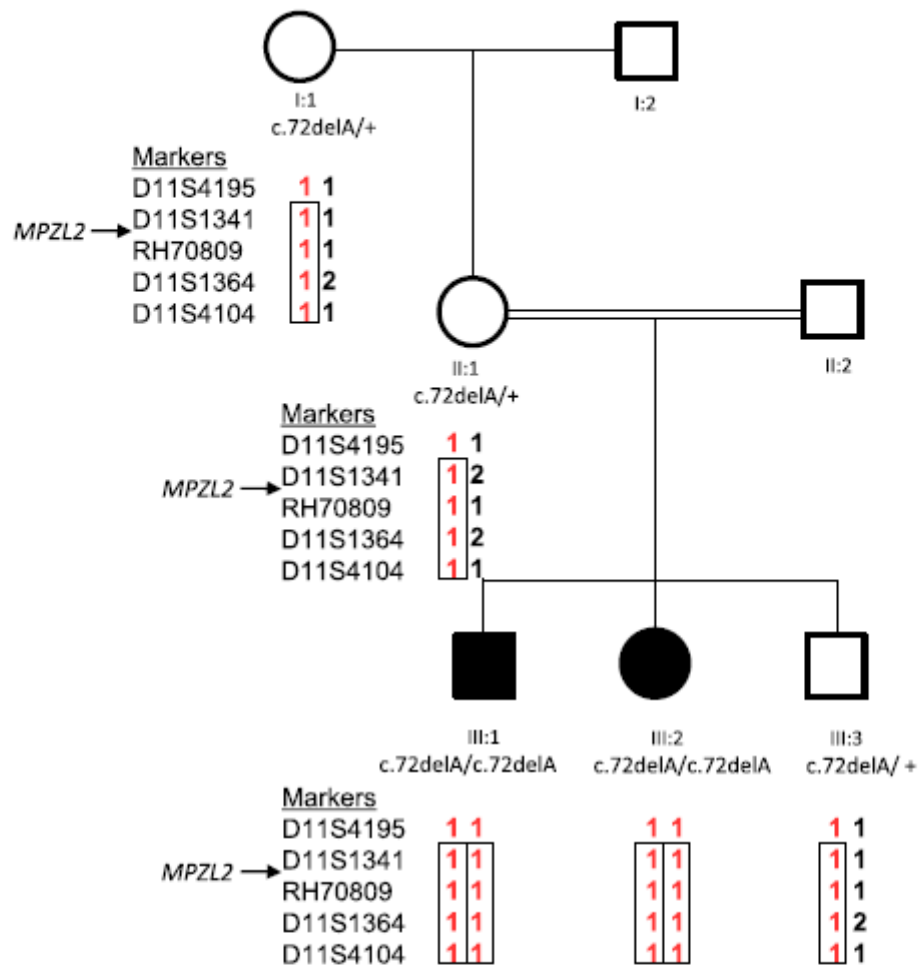


Fig. 2. Pedigree of Moroccan family with VNTR genotypes and the segregation of the *MPZL2* variant.

Segregation and genotyping analysis of the studied families with the c.72delA variant. Haplotypes around the *MPZL2* gene were determined by genotyping VNTR-markers. All c.72delA *MPZL2* alleles (depicted in red) shared the discriminants markers between D11S1341 and D11S4104 (boxed).

were filtered using Polyphen-2 and SIFT bioinformatics tools to retain those predicted as damaging. Six homozygous candidate variants were selected by the filtering process (Table 1).

The literature and databases showed that the *MPZL2* gene is the only one related to deafness, which led to the selection of a single variant relevant to NSHL: the *MPZL2* NM\_005797.3: c.72delA (p.Ile24Metfs\*22) deletion, with a global minor allelic frequency of 0.0007633. Using direct sequencing, we confirmed its homozygous status in the two affected siblings III:1 and III:2, and the heterozygous status in the mother II:1, the maternal grandmother I:1 and in the unaffected brother III:3.

VNTR marker analysis was performed to characterize the haplotypes in the *MPZL2* chromosomal region (Fig. 2). Both c.72del *MPZL2* alleles in the two affected individuals shared a common haplotype delimited by markers D11S1341 and D11S4104.

#### 4. Discussion

In the present study, we performed WES on a Moroccan proband with autosomal recessive non-syndromic hearing loss, who did not show

mutation in the most common genes involved in the Moroccan deaf population, like *GJB2* [3] and *LRTOMT* [7]. We identified, for the first time in a North African family, a single homozygous deletion c.72delA (p.Ile24Metfs\*22) in the *MPZL2* gene.

*MPZL2* encodes a transmembrane glycoprotein involved in early embryogenesis with the highest expression in the foetal cochlea, mainly in the inner ear tissues [4,5]. It mediates both homophilic and heterophilic cell-cell adhesion [7]. Immunostaining of mouse Organ of Corti disclosed a strong expression in the contact zone between the Deiter cells and the basilar membrane, and a mild expression in both the inner and outer hair cells and in the basal layer of the stria vascularis. The *Mpzl2*-mutant mouse demonstrated an altered organization of outer hair cells and supporting cells, and degeneration of the organ of Corti, in addition to a mild degeneration of spiral ganglion neurons that was most pronounced at the cochlear base [5]. These data converge with an early onset NSHL in humans with *MPZL2* mutations, although questioning if the hearing impairment is congenital or has an early childhood onset [5].

The homozygous c.72delA variant in *MPZL2* creates a frameshift, disrupting the reading frame leading to a premature stop codon, and a

truncated protein. This *MPZL2* variant was found in 12 homozygous and one compound heterozygous NSHL patients with mild to moderate hearing impairment [4,5] from Dutch [5], Iran [4] and Turkish [4,5] origins. We add to these previous families, a Moroccan family thus widening the geolocation of this mutation into North African countries.

Haplotype analysis of three families by Weedorp et al. showed that all c.72del *MPZL2* alleles shared a common region of at least 0.5 Mb delimited by markers D11S1341 and D11S4104 [5]. Although the D11S4195 marker is included in the region analysed, two sizes of this marker were reported in previous pathologic haplotype, thus suggesting that this marker is not informative.

## 5. Conclusion

In the present study, using WES, we identified the first *MPZL2* mutation c.72delA (p.Ile24Metfs\*22) in a consanguineous Moroccan family with mild sensorineural hearing loss. This deletion has been reported to cause deafness in different populations, and is likely to be of ancient origin. The identification of supplementary disease-causing mutations in this gene should further confirm the essential role of the *MPZL2* protein in auditory function.

## Ethical statement

All subjects gave their informed consent for inclusion before they participated in the study. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the Ethics Committee for the biomedical research of Rabat.

## Funding

This work was supported by Pasteur Institute of Morocco (IPM). This project was financially supported by CAMPUS FRANCE (PHC TOUBKAL 2019 (French-Morocco bilateral program) Grant Number: 39005ZL).

## Declaration of competing interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

## Acknowledgements

The authors are indebted to the family that contributed to this study and to the CAMPUS FRANCE French-Morocco PHC TOUBKAL 2019 bilateral program (Grant Number: 39005ZL).

## References

- [1] C.C. Morton, W.E. Nance, Newborn hearing screening—a silent revolution, *N. Engl. J. Med.* 354 (2006) 2151–2164, <https://doi.org/10.1056/NEJMra050700>.
- [2] A.J.H. Genet, Nonsyndromic hearing impairment: unparalleled heterogeneity, *Am. J. Hum. Genet.* 7 (1997).
- [3] A. Bakkechane, A. Bousfiha, H. Charoute, S. Salime, M. Detsouli, K. Snoussi, S. Nadif, M. Kabine, H. Rouba, H. Dehbi, R. Roky, M. Charif, A. Barakat, Update of the spectrum of *GJB2* gene mutations in 152 Moroccan families with autosomal recessive nonsyndromic hearing loss, *Eur. J. Med. Genet.* 59 (2016) 325–329, <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2016.05.002>.
- [4] G. Bademci, C. Abad, A. Incesulu, A. Rad, O. Alper, S.M. Kolb, F.B. Cengiz, O. Diaz-Horta, F. Silan, E. Mihci, E. Ocak, M. Najafi, R. Maroofian, E. Yilmaz, B.G. Nur, D. Duman, S. Guo, D.W. Sant, G. Wang, F.V. Monje, T. Haaf, S.H. Blanton, B. Vona, K. Walz, M. Tekin, *MPZL2* is a novel gene associated with autosomal recessive nonsyndromic moderate hearing loss, *Hum. Genet.* 137 (2018) 479–486, <https://doi.org/10.1007/s00439-018-1901-4>.
- [5] M. Weedorp, S. Murillo-Cuesta, T. Peters, A.M. Celaya, A. Oonk, M. Schraders, J. Costrik, E. Gomez-Rosas, A.J. Beynon, B.P. Hartel, K. Okkersen, H.J.P.M. Koenen, J. Weeda, S. Lelieveld, N.C. Voermans, I. Joosten, C.B. Hoyng, P. Lichtner, H.P. M. Kunst, I. Feenstra, S.E. de Bruijn, DOOFNI Consortium, R.J.C. Admiraal, H. G. Yntema, E. van Wijk, I. Del Castillo, P. Serra, I. Varela-Nieto, R.J.E. Pennings, H. Kremer, *MPZL2*, encoding the epithelial junctional protein Myelin protein zero-like 2, is essential for hearing in man and mouse, *Am. J. Hum. Genet.* 103 (2018) 74–88, <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.05.011>.
- [6] S. Delmaghani, A. Aghaie, N. Michalski, C. Bonnet, D. Weil, C. Petit, Defect in the gene encoding the EAR/EPTP domain-containing protein TSPEAR causes DFNB98 profound deafness, *Hum. Mol. Genet.* 21 (2012) 3835–3844, <https://doi.org/10.1093/hmg/dds212>.
- [7] M. Charif, S. Bouaceur, O. Abidi, H. Nahili, H. Rouba, M. Kandil, R. Boulouiz, A. Barakat, The c.242G>A mutation in *LRTOMT* gene is responsible for a high prevalence of deafness in the Moroccan population, *Mol. Biol. Rep.* 39 (2012) 11011–11016, <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2003-3>.



## Syndromic Hearing Loss in Moroccan families is associated to homozygous missense variants in *COL4A3* and *MASPI*

Ghita Amalou<sup>a,b,c</sup>, Imane Aitraise<sup>a</sup>, Aymane Bouzidi<sup>a,b,c</sup>, Soukaina Essadssi<sup>a</sup>, Majida Charif<sup>d</sup>, Mostafa Kandil<sup>c</sup>, Sophie Boucher<sup>b,e</sup>, Guy Lenaers<sup>b,f</sup>, Abdelhamid Barakat<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Genomics and Human Genetics Laboratory, Pasteur Institute of Morocco, Casablanca, Morocco

<sup>b</sup> Université d'Angers, Equipe MitoLab, INSERM U1083, CNRS 6015, MitoVasc, SFR ICAT, Angers, France

<sup>c</sup> Team of Anthropogenetics and Biotechnologies, Faculty of Sciences, Chouab Doukkali University, Eljadida, Morocco

<sup>d</sup> Genetics and Immuno-cell therapy Team, Mohammed First University, Oujda, Morocco

<sup>e</sup> Service d'Oto-Rhino-Laryngologie et Chirurgie Cervico-Faciale, CHU d'Angers, France

<sup>f</sup> Service de Neurologie, CHU d'Angers, France

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
COL4A3  
MASPI  
Syndromic Hearing Loss  
Morocco

### ABSTRACT

Syndromic hearing loss (SHL) represent a frequent origin of deafness worldwide. Aiming at improving the molecular diagnosis of SHL in Morocco, we analyzed two consanguineous families with Alport syndrome (AS) and Carnevale, Mingarelli, Malpeuch, and Michels syndrome (3MC). Using whole exome sequencing, we identified two novel homozygous variants, the p.(Gly1385Arg) in *COL4A3* in two siblings of the first family, and the p.(Gly476Arg) in *MASPI* in the simplex case of the second family, respectively. Molecular modelling and stability analyses of the mutated proteins disclosed changes in the structure and destabilization of the wild-type structure. Our data, in the line with previous genetic analyses, illustrate the molecular variability of these two forms of SHL, and contribute to expand the molecular diagnosis of deafness in Morocco.

### 1. Introduction

Deafness is frequently a symptom of severe clinical syndromic disease presentations (syndromic hearing loss, SHL), which accounts for 30 % of the genetic causes of all deafness (Castiglione et al., 2013). Some developmental SHL are highly complex, with variable expressivity, resulting in important differences in the clinical descriptions of patients (Castiglione et al., 2013). In this study, we are reporting cases with a clinical presentation compatible with the Alport and the Mingarelli, Malpeuch, Michels, and Carnevale (3MC) syndromes.

Alport Syndrome (AS), with a worldwide prevalence of one in 10,000 individuals (Savigne and Colville, 2009), is a rare hereditary disorder, starting with a progressive glomerulonephropathy affecting the glomerular basement membrane (GBM), causing renal failure and resulting in end-stage kidney disease. Progressive sensorineural hearing loss and ocular anomalies leading to vision loss may also occur later during childhood or early adolescence (Alport, 1927; Mochizuki et al., 1994). Variants in three genes, *COL4A3*, *COL4A4*, and *COL4A5* cause AS, with dominant (*COL4A3*), recessive (*COL4A4* and *COL4A5*), and X-

linked (*COL4A5*) modes of transmission (Savigne et al., 2019). Variants in one of these genes can cause the presence of lamellated GBM or abnormal deposition of  $\alpha3(\alpha4\alpha5)$  (IV) and  $\alpha5$  (IV) collagen chains in the GBM and skin, respectively (Chew and Lennon, 2018), or a defective adhesion of the organ of Corti to the basilar membrane responsible for the hearing deficit, as the type IV collagen  $\alpha3$ ,  $\alpha4$ , and  $\alpha5$  chains are present in the basement membrane of the organ of Corti (Merchant et al., 2004).

3MC syndromes merge four disorders that were initially considered separately: the Mingarelli, Malpeuch, Michels, and Carnevale syndromes. Today, because of their clinical similarities, these four syndromes have been associated in the same spectrum called '3MC syndromes', including common but not systematic features, as hearing loss, eyelid triad (blepharoptosis, blepharophimosis, *epicanthus inversus*), hypertelorism, arched eyebrows and umbilical depression (Titomanlio et al., 2005). *MASPI*, *COLEC10* and *COLEC11* are the three known genes associated with 3MC syndromes. All three are involved in the lectin complement pathway, to guide cells migration in organs, which is critical during embryogenesis (Gardner et al., 2017). Indeed,

\* Corresponding author at: Genomics and Human Genetics Laboratory, Département de Recherche Scientifique, Institut Pasteur du Maroc, 1 Place Louis Pasteur, 20360 Casablanca, Morocco.

E-mail address: [hamid.barakat@pasteur.ma](mailto:hamid.barakat@pasteur.ma) (A. Barakat).

<https://doi.org/10.1016/j.humgen.2022.201053>

Received 15 January 2022; Received in revised form 15 April 2022; Accepted 3 May 2022

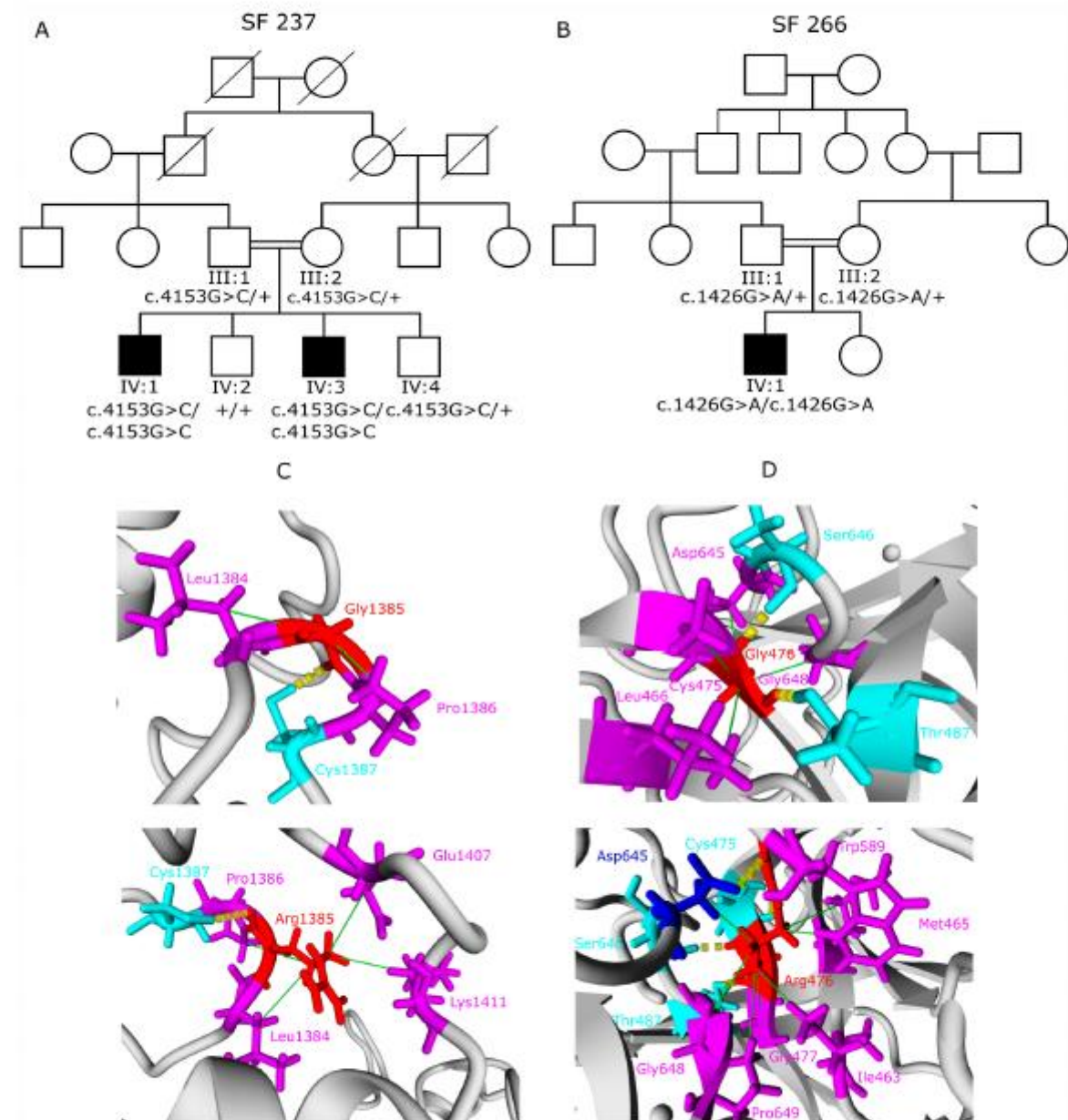
Available online 20 May 2022

2773-0441/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

dysfunctions of one of the four encoded proteins (MASP-1 &-3, CL-L1, CL-K1) in the first phases of brain development, result in the 3MC syndromes, with craniofacial dysmorphism and multiple anomalies (Roorjck et al., 2011).

In this study, we recruited two Moroccan consanguineous families with AS and 3MC syndromes and undertook whole exome sequencing

(WES) analysis to identify the causative variants.



**Fig. 1.** Pedigrees and structural analyses. **A** Pedigree of the SF237 family with the Alport syndrome and the *COL4A3* c.4153G>C variant. **B** Pedigree of the SF266 family with the 3MC syndrome and the *MASP1* c.1426G>A variant. **C** Gly1385 in the wild-type *COL4A3* protein and Arg1385 in the mutated protein. **D** Gly476 in the wild-type *MASP-1* protein and Arg476 in the mutated protein. Substituted residues are shown in red; residues involved in hydrogen bonds are labeled in cyan; residues that participate in hydrophobic interactions are indicated in purple; residues that participate in both hydrogen bonds and hydrophobic interactions are in blue; hydrogen bonds are marked by yellow dashed lines, and hydrophobic interactions are shown in green lines. Double lines indicate consanguinity. The black squares correspond to the affected siblings.

## 2. Patients and methods

### 2.1. Patients

Two unrelated consanguineous Moroccan families were investigated. Two siblings and a third simplex proband were clinically diagnosed, respectively with AS and 3MC syndromes. Written informed consent was obtained from the patients' parents. The Ethics Committee for the biomedical research of Rabat had approved the commitment to ethical principles. This work was carried out in accordance with the guidelines of the declaration of Helsinki. The clinical diagnosis of patients was carried out by their respective physician.

SP237-IV:1 and SP237-IV:3 from SP237 family are siblings from consanguineous parents, respectively 27 and 23 years old (Fig. 1A). Both individuals were diagnosed with post-lingual deafness at 7 years old, then with a severe myopia at 8 and 17 years, respectively. At 22 years old, patient SP237-IV:1 suffered from a renal failure requiring dialysis. The audiogram test showed a flat moderate to moderately severe sensorineural hearing loss (Pure Tone Average (PTA): 56 dB on right ear and 55dB on left ear) affecting all frequencies. His 4 years younger brother SP237-IV:3 had a chronic renal disease. His audiograms showed an asymmetric sensorineural hearing loss, which was moderately severe on right ear (PTA: 60dB) and profound on left ear (PTA: 113dB).

SP266-IV:1 from the SP266 consanguineous family is an 8 year old boy born with the 3MC syndrome (Fig. 1B). He has hypertelorism and the eyelid triad (blepharoptosis, blepharophimosis, *epicanthus inversus*) causing a peripheral and nocturnal vision deficiency. At 6 months, he was diagnosed with a severe bilateral hearing loss. He also was late to walk, suggesting a vestibular anomaly. Mental disorder was noticed early in his infancy by his family, without proper a diagnostic or classification by a physician. Further clinical examination reports were not available for this individual.

### 2.2. Genetic analyses

Genomic DNA was extracted from peripheral blood of all available family members, using QIAamp DNA Blood Mini Kit Qiagen. Without access to gene panels addressing these syndromic diseases in Morocco, WES analysis of the three probands was performed at BGI Tech Solutions (Hong Kong, China), on a BOISEQ-500 sequencer.

To select the pathogenic candidate variants, we prioritized known genes reported in hereditary deafness especially those related to the patients' syndromes. Homozygous and heterozygous compound missense, nonsense, frameshift and splice-site variants with allele frequencies < 0,01 using SNP databases such as the 1000 genomes project or gnomAD exomes were selected, since the pedigree of the three families suggested an autosomal recessive mode of inheritance. The pathogenicity of variants was evaluated using PolyPhen-2, Mutation Taster, and SIFT, whereas analyses of splicing mutation were performed using the Human Splicing Finder v.3.1 tool. To infer the variants' segregation, Sanger sequencing was performed on all available family members.

### 2.3. Molecular modelling and stability analysis

To predict the effects of p.(Gly1385Arg) and p.(Gly476Arg) variants on the respective protein structure, we used a molecular modelling approach. The FASTA format of the amino acid sequences of COL4A3 [Q01955] and MASP1 [P48740] were obtained from the UniProt database (accessed January 2021). The 3D structure of MASP-1 serine protease domain was predicted using SWISS-MODEL online server (accessed January 2021) and the structure was selected based on the sequence identity and the QMEAN function (Waterhouse et al., 2018). I-TASSER server (accessed January 2021) (Yang et al., 2015) was used to generate a 3D structure of the COL4A3 triple-helical region, from amino acid 43 to 1438 of the protein, because no model inclusive of the targeted amino acids was generated by the SWISS-MODEL server. Energy

minimization for all the 3D structures was performed with YASARA minimization server (Krieger et al., 2009). The protein stability change due to the single amino-acid changes was predicted using mCSM (Pires et al., 2014), SDM (Worth et al., 2011) and DUBT bioinformatic tools (unimelb.edu.au) (accessed February 2021). Wild-type and mutant structures were visualized using YASARA tool (version 20.12.24) (Krieger and Vriend, 2014).

## 3. Results

### 3.1. Identification of the pathogenic variants

WES followed by bioinformatics analyses performed on the three patients identified SNPs and short in-del variants. After applying all filters, we identified a single candidate homozygous variant for each patient fitting with their clinical presentations.

Both SP237-IV:1 and SP237-IV:3 brothers carry the homozygous missense variant NM\_000091.4: c.4153G>C; p.(Gly1385Arg) in COL4A3. This COL4A3 variant has never been reported and is not present in the gnomAD database. Software prediction methods, such as SIFT, Polyphen-2, Mutation assessor, MutationTaster, MutPred, PATHMM-XP, available on Varoome, predicted this variant as pathogenic.

SP266-IV:1 had the NM\_001879: c.1426G>A; p.(Gly476Arg) homozygous missense variant in MASP1, a gene reported to cause the 3MC syndrome. GnomAD database reports 50 times this allele in a heterozygous state among 251338 alleles (frequency of 1.77e-4), but no homozygote state has yet been reported. Prediction softwares classified the variant as pathogenic.

### 3.2. Co-segregation analysis

Sanger sequencing of all available family members confirmed that the variants segregated with the disease. Indeed, the parents of the SP237 patients harbored the COL4A3 variant in a heterozygous state, while their healthy brothers were either heterozygous (IV:2) or wild-type (IV:4) for the COL4A3 variant. Each parent of patients SP266-IV:1 harbored the MASP1 variant in a heterozygous state, while DNA sample was not available from the unaffected IV:2 sister, due to her very young age.

### 3.3. Molecular modelling and stability analysis

The SWISS-MODEL server generated three models for MASP-1 based on three templates (4igd.1.A, 4aqb.1.A, 6f1c.1.D). We selected the model generated from the 4igd.1.A template for both the WT and mutated proteins, with a QMEAN value of 0.40 and 0.25, respectively, and 99.75% and 99.50% identity that contained the target amino acids and their domain, whereas I-Tasser generated 5 models for COL4A3, from which we selected the most stable.

The structural analysis of the COL4A3 p.(Gly1385Arg) variant showed that the Glycine to Arginine change conserves the hydrogen bond with Cys1387, and gained two additional hydrophobic interactions with Glu1407, Lys1411 to Leu1384 and Pro1386 (Fig. 1C). The RMSD value between the mutated and wild-type structures was 0.9638 Å.

For the MASP-1 wild-type protein, Glycine-476 had hydrophobic bonds with four amino acids (Leu466, Cys475, Asp645, Gly648) and two hydrogen bonds with Thr487 and Ser646. The change for Arginine lost the Asp645, Gly648 bonds and established five new hydrophobic bonds with Gly477, Pro649, Ile463, Trp589, Met465 and two hydrogen bonds with Cys475 and Asp645 (Fig. 1D). The RMSD value between the mutated and wild-type structures was 0.60626 Å. The mCSM, SDM and DUBT prediction scores reflected a destabilization of the protein structure due to the amino acid substitution.

#### 4. Discussion

The search for new genes and variants in Moroccan families with hearing loss has been one of the major research axes of our laboratory with more than 300 families genetically tested, ultimately today by whole exome next generation sequencing. Although usually we screen a panel of genes on all recruited individuals with hearing loss, in this study we moved directly to WES analysis because of the unusual clinical presentation in both families, suggesting the involvement of genes that we do not routinely assess.

The successful identification of two variants causing SHL presentations, one being Alport Syndrome and one being 3MC, illustrates the power of WES to identify variants that were absent from the Human Gene Mutation database (Stenson et al., 2003), the Deafness Variation Database and the NHLBI GO Exome Sequencing Project, although the *MASPI* variant was present in dbSNP as rs140743904.

The SP237-IV:1 and SP237-IV:3 patients with the AS syndrome carried the *COL4A3* missense variant NM\_000091.4:c.4153G>C; p.(Gly1385Arg), and the SP266-IV:1 patient with 3MC syndrome carried the *MASPI* missense variant NM\_001879:c.1426G>A; p.(Gly476Arg).

The *COL4A3* variant affects the far end of the triple-helical domain, starting at amino acid 43 and ending at 1438, and modifies one Gly-X-Y amino acid triplet repeat, which contributes to the triple-helical domain giving the flexible property to collagen IV (Hofmann et al., 1984). Adjacent to the Guanine-4153 mutated in our patients, two pathogenic splicing site substitutions were identified: c.4153+1G>A (Zhang et al., 2012) and c.4153+2T>A found both in a compound heterozygous state (Morinière et al., 2014). Importantly, the AS case that we report here is the second individual with a *COL4A3* variant in North Africa, as the first variant p.Gly1277Ser has been reported in a Moroccan patient with hearing loss and myopia but no kidney problem (AitRaine et al., 2022). Two additional maghrebien AS families were described, one Berbera living in Algeria with a *COL4A4* variant (Teebi and Farag, 1997), and one in Tunisia with a *COL4A5* dominant variant (Kharrat et al., 2006), while 4 additional AS individuals were described in Tunisia, but without a molecular diagnosis (Kamoun, 1997). In addition, some individuals with a restricted kidney symptom, but not with the full symptoms of AS, were identified with the c.209G>A and c. 1681\_1690del compound heterozygous *COL4A3* variants, or with the homozygous c.725G>A or the heterozygous c.2225G>A variants (Ammar et al., 2021), illustrating the variability of the clinical presentations associated to this gene.

*MASPI* encodes for three mRNA *MASP-1*, *MASP-3*, and *MAP-1* through alternative splicing processes of the pre-mRNA. The Serine Protease domain is encoded by exons 13–18 and exon 12 in *MASP-1* and *MASP-3*, respectively, and lacking in *MAP-1* (Skjoedt et al., 2010; Takahashi et al., 2007). The c.1426G>A *MASPI* variant, reported for the first time in a homozygote state, is located in exon 13 of the *MASP-1* isoform (Skjoedt et al., 2010). It has already been reported in a heterozygous state once in a study analyzing the sequence of 29 genes involved in the complement and coagulation cascades performed on 100 non-elderly patients presenting severe hypertension and renal failure (Larsen et al., 2018). OnomAD reported this variant with a frequency of 1.77e-4, and although it was rated of uncertain significance by VarSome, we found that it is predicted as damaging and pathogenic by the Mutation Taster, Mutation Assessor, PolyPhen2 and GIPT prediction tools.

Altogether, 16 *MASPI* variants related to the 3MC syndrome and hearing loss have been described, including 3 nonsense variants in exon 2 and 6 (Urquhart et al., 2016) and 11 missense variants, among which 9 were homozygous. Of these 9 variants, 7 were clustered in exon 12, and 2 in exon 4 and 6. Two compound heterozygous missense variants affecting exon 2 and 12 were the cause of hearing loss with abnormal or absent bilateral cochlea-vestibular nerves (Kari et al., 2017). Two substitutions in splicing sites were reported by Atik et al. (Atik et al., 2015) and a further deletion of 2306 bp including exon 12 and part of intron 12 was reported by Graul-Neumann et al. (Graul-Neumann et al., 2018) (Table 1).

**Table 1**

Published pathogenic *MASPI* variants linked to HL and 3MC syndrome.

Variant	Amino Acid change	Exon	Source
c.9G>A	p.Trp3*	2	(Urquhart et al., 2016)
c.49G>T/c.1931C>T	p.Ala178Ser/p. Thr644Met	2/12	(Kari et al., 2017)
c.547G>T	p.Val183Leu	4	(Urquhart et al., 2016)
c.760A>T	p.Leu254*	6	(Urquhart et al., 2016)
c.870G>A	p.Trp290*	6	(Sirmaci et al., 2010)
c.891+1G>T	-	Intr 6	(Atik et al., 2015)
c.1012-2A>G	-	Intr 7	(Atik et al., 2015)
c.1451G>A	p.Gly484Glu	12	(Atik et al., 2015)
c.1489 C>T	p.His497Tyr	12	(Rooryck et al., 2011)
c.1657G>A	p.Asp553Asn	12	(Atik et al., 2015)
c.1888T>C	p.Cys630Arg	12	(Rooryck et al., 2011)
c.1895_*1602+411del	p.Arg637Cysfs*1	12 to Intr 12	(Graul-Neumann et al., 2018)
c.1987G>T	p.Asp663Tyr	12	(Urquhart et al., 2016; Atik et al., 2015)
c.1997G>A	p.Gly666Glu	12	(Rooryck et al., 2011)
c.2059G>A	p.Gly687Arg	12	(Sirmaci et al., 2010)
c.1426G>A	p.Gly476Arg	13	This study

Importantly, before this work, only a single 3MC individual was reported in the Maghrebien population in a Tunisian family with a *COL4A3* homozygous recessive variant, thus illustrating the difficulties to fully diagnose this disease in North Africa (Rooryck et al., 2011).

#### 5. Conclusion

Whole Exome Sequencing on 2 Moroccan families with syndromic hearing loss revealed one new substitution on *COL4A3* in 2 siblings with Alport syndrome and a *MASPI* variant in an individual with 3MC syndrome.

#### Data availability statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author, [AB], upon reasonable request.

#### Ethical approval

All subjects gave their informed consent for inclusion before they participated to the study. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the Ethics Committee for the biomedical research of Rabat, Morocco.

#### ORCID authorship contribution statement

Ghita Amalou: Methodology, Formal analysis, Investigation, Visualization, Writing – original draft. Imane Aittraise: Methodology, Investigation, Writing – original draft. Aymane Bouzidi: Investigation. Soukaina Essadssi: Formal analysis. Majida Charif: Visualization, Writing – review & editing. Moustafa Kandil: Conceptualization, Writing – review & editing. Sophie Boucher: Investigation, Writing – review & editing. Guy Lenaers: Resources, Funding acquisition, Writing – review & editing. Abdelhamid Barakat: Conceptualization, Resources, Funding acquisition, Writing – review & editing.

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

#### Acknowledgements

The authors are indebted to the family members that contributed to this study and to the CAMPUS FRANCE French-Morocco PHC TOUBKAL 2020 bilateral program (Grant Number: 39005ZL).

## References

- AitRais, I., Amalou, G., Bousfiha, A., Charoute, H., Rouba, H., Abdelghaffar, H., et al., 2022. Genetic heterogeneity in GJB2, COL4A3, ATP6V1B1 and EDNRB variants detected among hearing impaired families in Morocco. *Mol. Biol. Rep.* <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07245-z>.
- Alport, A.C., 1927. Hereditary familial congenital haemorrhagic nephritis. *Br. Med. J.* 1, 504–506.
- Ammar, S., Kanoun, H., Kammoun, K., Domingo-Gallego, A., Ruiz, P., Loente-Grandoso, L., et al., 2021. Next-generation sequencing in patients with familial FSGS: first report of collagen gene mutations in Tunisian patients. *J. Hum. Genet.* 66, 795–803.
- Atik, T., Koparic, A., Bademci, G., Foster, J., Altunoglu, U., Mutlu, G.Y., et al., 2015. Novel MASP1 mutations are associated with an expanded phenotype in 3MC1 syndrome. *Orphanet. J. Rare Dis.* 10, 128.
- Castiglione, A., Busi, M., Martini, A., 2013. Syndromic hearing loss: An update. *Hear. Balance Commun.* 11, 146–159.
- Chew, C., Lennon, R., 2018. Basement membrane defects in genetic kidney diseases. *Front. Pediatr.* 6.
- Gardner, O.K., Haynes, K., Schweitzer, D., Johns, A., Magee, W.P., Urata, M.M., et al., 2017. Familial recurrence of 3MC syndrome in consanguineous families: a clinical and molecular diagnostic approach with review of the literature. *Cleft Palate-Craniofacial J.* 54, 739–748.
- Graul-Neumann, L.M., Mensah, M.A., Klopocki, E., Uebe, S., Ekcici, A.B., Thiel, C.T., et al., 2018. Biallelic intragenic deletion in MASP1 in an adult female with 3MC syndrome. *Eur. J. Med. Genet.* 61, 363–368.
- Hofmann, H., Voss, T., Kühn, K., Engel, J., 1984. Localization of flexible sites in thread-like molecules from electron micrographs: Comparison of interstitial, basement membrane and intima collagens. *J. Mol. Biol.* 172, 325–343.
- Kanoun, A., 1997. Spectrum of pediatric renal diseases in Tunisia. *Saudi J. Kidney Dis. Transpl.* 8, 317.
- Kari, E., Schrauwen, I., Ljaci, L., Fisher, L.M., Go, J.L., Naymik, M., et al., 2017. Compound heterozygous mutations in MASP1 in a deaf child with absent cochlear nerves. *Neurol. Genet.* 3, e153.
- Kharrat, M., Makni, S., Makni, K., Kammoun, K., Charfeddine, K., Azaiz, H., et al., 2006. Autosomal dominant Alport's syndrome: Study of a Large Tunisian family. *Saudi J. Kidney Dis. Transpl.* 17, 320.
- Krieger, E., Vriend, G., 2014. YASARA View—molecular graphics for all devices—from smartphones to workstations. *Bioinformatics.* 30, 2981–2982.
- Krieger, E., Joo, K., Lee, J., Lee, J., Raman, S., Thompson, J., et al., 2009. Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: Four approaches that performed well in CASP8. *Proteins.* 77 (Suppl. 9), 114–122.
- Larsen, C.P., Wilson, J.D., Best-Rocha, A., Beggs, M.L., Hennigar, R.A., 2018. Genetic testing of complement and coagulation pathways in patients with severe hypertension and renal microangiopathy. *Mod. Pathol.* 31, 488–494.
- Merchant, S.N., Burgess, B.J., Adams, J.C., Kashtan, C.E., Gregory, M.C., Santi, P.A., et al., 2004. Temporal bone histopathology in alport syndrome. *Laryngoscope.* 114, 1609–1618.
- Mochizuki, T., Lemmink, H.H., Maruyama, M., Antignac, C., Gubler, M.-C., Pison, Y., et al., 1994. Identification of mutations in the  $\alpha 3(\text{IV})$  and  $\alpha 4(\text{IV})$  collagen genes in autosomal recessive Alport syndrome. *Nat. Genet.* 8, 77–82.
- Morinière, V., Dahan, K., Hilbert, P., Lison, M., Lebbah, S., Topa, A., et al., 2014. Improving mutation screening in familial hematuric nephropathies through next generation sequencing. *J. Am. Soc. Nephrol.* 25, 2740–2751.
- Pires, D.E.V., Ascher, D.B., Blundell, T.L., 2014. mCSM: predicting the effects of mutations in proteins using graph-based signatures. *Bioinformatics.* 30, 335–342.
- Rooryck, C., Diaz-Font, A., Osborn, D.P.S., Chabchoub, E., Hernandez-Hernandez, V., Shamseldin, H., et al., 2011. Mutations in lectin complement pathway genes COLEC11 and MASP1 cause 3MC syndrome. *Nat. Genet.* 43, 197–203.
- Savige, J., Colville, D., 2009. Ocular features aid the diagnosis of Alport syndrome. *Nat. Rev. Nephrol.* 5, 356–360.
- Savige, J., Ariani, F., Mari, F., Bruttini, M., Renieri, A., Gross, O., et al., 2019. Expert consensus guidelines for the genetic diagnosis of Alport syndrome. *Pediatr. Nephrol.* 34, 1175–1189.
- Sirmaci, A., Walsh, T., Akay, H., Spiliopoulos, M., Şakalar, Y.B., Hasanefendioglu-Bayrak, A., et al., 2010. MASP1 mutations in patients with facial, umbilical, coccygeal, and auditory findings of Carnevale, Malpuech, OSA, and Michels syndromes. *Am. J. Hum. Genet.* 87, 679–686.
- Skjold, M.-O., Hummelshøj, T., Palarasah, Y., Honoe, C., Koch, C., Skjold, K., et al., 2010. A novel mannose-binding Lectin/Ficolin-associated protein is highly expressed in heart and skeletal muscle tissues and inhibits complement activation. *J. Biol. Chem.* 285, 8234–8243.
- Stenson, P.D., Ball, E.V., Mort, M., Phillips, A.D., Shiel, J.A., Thomas, N.S.T., et al., 2003. Human gene mutation database (HGMD): 2003 update. *Hum. Mutat.* 21, 577–581.
- Takahashi, M., Mori, S., Shigeta, S., Fujita, T., 2007. Role of MBL-associated Serine Protease (MASP) On Activation of the Lectin Complement Pathway. In: Lambiris, J.D. (Ed.), *Current Topics in Innate Immunity*. Springer New York, New York, NY, pp. 93–104.
- Teebi, A.S., Farag, T.I., 1997. *Genetic Disorders Among Arab Populations*. Oxford University Press.
- Titomanlio, L., Bennaceur, S., Bremond-Gignac, D., Baumann, C., Dupuy, O., Verloes, A., 2005. Michels syndrome, Carnevale syndrome, OSA syndrome, and Malpuech syndrome: Variable expression of a single disorder (3MC syndrome)? *Am. J. Med. Genet. A* 137A, 332–335.
- Urquhart, J., Roberts, R., de Silva, D., Shalev, S., Chervinsky, E., Nampoothiri, S., et al., 2016. Exploring the genetic basis of 3MC syndrome: Findings in 12 further families: Exploring The Genetic Basis of 3MC syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 170, 1216–1224.
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., et al., 2018. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 46, W296–W303.
- Worth, C.L., Preissner, R., Blundell, T.L., 2011. SDM—a server for predicting effects of mutations on protein stability and malfunction. *Nucleic Acids Res.* 39 (suppl\_2), W215–W222.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., Zhang, Y., 2015. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat. Methods* 12, 7–8.
- Zhang, Y., Wang, F., Ding, J., Zhang, H., Zhao, D., Yu, L., et al., 2012. Genotype-phenotype correlations in 17 Chinese patients with autosomal recessive Alport syndrome. *Am. J. Med. Genet. A* 158A, 2188–2193.



## Genetic heterogeneity in *GJB2*, *COL4A3*, *ATP6V1B1* and *EDNRB* variants detected among hearing impaired families in Morocco

Imane AitRais<sup>1,2</sup> · Ghita Amalou<sup>1</sup> · Amale Bousfha<sup>1,3</sup> · Hicham Charoute<sup>4</sup> · Hassan Rouba<sup>1</sup> · Houria Abdelghaffar<sup>2</sup> · Crystal Bonnet<sup>5</sup> · Christine Petit<sup>5,6,7</sup> · Abdelhamid Barakat<sup>1</sup>

Received: 23 August 2021 / Accepted: 8 February 2022 / Published online: 17 March 2022  
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2022

### Abstract

**Background** Deafness is the most prevalent human sensorineural defect. It may occur as a result of an external auditory canal involvement, or a deficiency in the sound conduction mechanism, or an impairment of the cochlea, the cochlear nerve or central auditory perception. The genetic causes are the most common, as approximately 70% of hearing disorders are of hereditary origin, divided into two groups, syndromic (associated with other symptoms) and no syndromic (isolated deafness).

**Methods** A whole exome sequencing was performed to identify the genetic cause of hearing loss in six Moroccan families and Sanger sequencing was used to validate mutations in these genes.

**The results** The results of four out of the six families revealed four genetic variants in the genes *GJB2*, *COL4A3*, *ATP6V1B1* and *EDNRB* responsible for non-syndromic and syndromic hearing loss. Multiple Bioinformatics programs and molecular modelling predicted the pathogenic effect of these mutations.

**Conclusions** We identified in Moroccan deaf patients four homozygous mutations. These results show the importance of whole exome sequencing to identify pathogenic mutations in heterogeneous disorders with multiple genes responsible.

**Keywords** Whole exome sequencing · Mutation · Hearing loss · Moroccan patients

### Introduction

The global population living with disabling hearing impairment is approximately 6.1% as estimated by the WHO recently [1]. Hearing loss is the most common human neurosensory defect in the world, occurring in approximately

1 in 1000 newborns, and 60% of these cases have a genetic etiology [2]. Hereditary hearing loss is transmitted by various modes: autosomal recessive, autosomal dominant, X- or Y-linked, and mitochondrial. It can be either isolated (non-syndromic) or associated with damage to other organs (syndromic) [3]. The *GJB2* gene is the main cause of hereditary

✉ Abdelhamid Barakat  
hamid.barakat@pasteur.ma

<sup>1</sup> Genomics and Human Genetics Laboratory, Institut Pasteur du Maroc, Casablanca, Morocco

<sup>2</sup> Laboratoire de Biochimie, Environnement et Agroalimentaire, Faculty of Science and Techniques of Mohammed VI University of Casablanca, Casablanca, Morocco

<sup>3</sup> Laboratoire de physiopathologie et génétique moléculaire,

Faculté des Sciences Ben M'sik, Université Hassan II, Casablanca, Morocco

<sup>4</sup> Research unit of epidemiology, biostatistics and bioinformatics, Institut Pasteur du Maroc, Casablanca, Morocco

<sup>5</sup> Unité de Génétique et Physiologie de l'Audition, Institut Pasteur, 75015 Paris, France

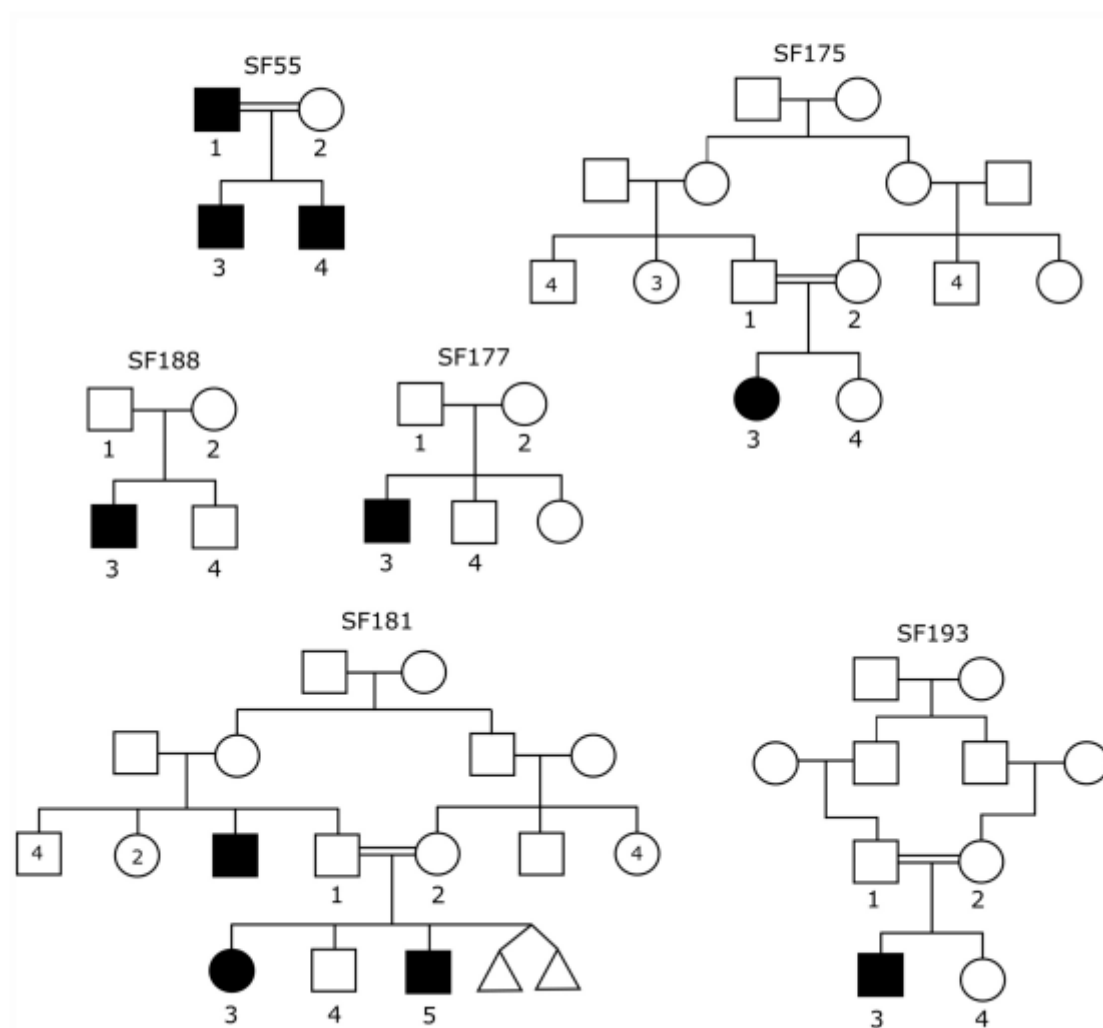
<sup>6</sup> Institut de l'Audition, 75012 Paris, France

<sup>7</sup> Collège de France, 75005 Paris, France

non-syndromic hearing loss (NSHL) in Morocco as several mutations in this gene have been described as causing autosomal recessive and more rarely dominant hereditary deafness. The most prominent variant in Morocco and the Mediterranean region is the deletion c.35delG[4]. The second cause of deafness in Morocco is the presence of the substitution c.242G>A located on *LRTOMT* gene [5]. Among the syndromic genes linked to deafness and which occur in the Moroccan population *MYO7A*[6], *PEXI*[7], *ADGRV1*[8] and many others. For non-syndromic genes, there is *TMC1*[9], *CLDN14*[10], *PJVK*[11] and *MPZL2*[12]. These genes play a very important role in maintaining the

**Table 1** Primers' sequences for allele-specific PCR

Genes	Forward Primers (5'-3')	Reverse Primers (5'-3')	Product size
<i>GJB2</i>	AGAGTTGGTGTGGCT-CAGGA	GACTGAGCCTT-GACAGCTGA	900pb
<i>COL4A3</i>	AGAACCCTC-CAAGCTCCCTG	GTCTCCCAGC-CATGTAGAA	383pb
<i>EDNRB</i>	CACTTCGGTTC-CACTTCACA	AAAATG-GTAGTCT-GTCTTTCTGC	398pb
<i>ATP6V1B1</i>	TGTTAGGAATGTGT-GTG GGG	ACAATTTGGGGA-CAGGGG	567pb



**Fig. 1** The pedigree of all six families

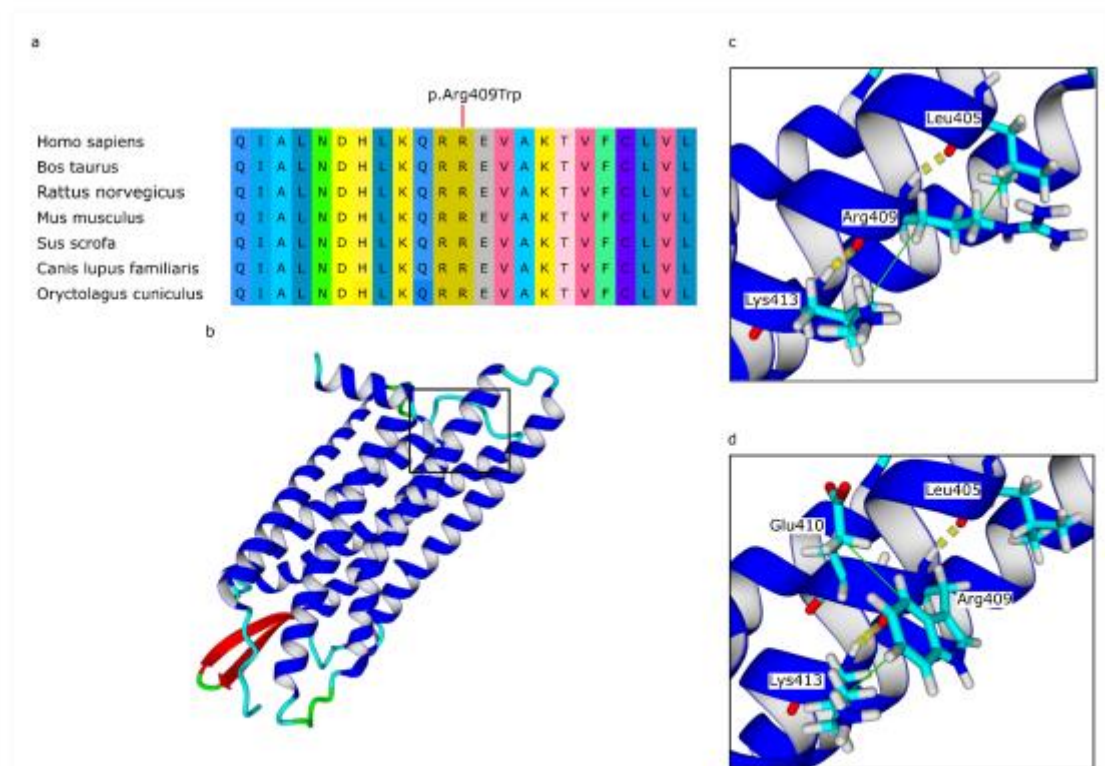
normal physiology of the inner ear, each mutation of these can affect normal hearing physiology[13]. The genetic diagnosis of hearing loss plays a crucial role for the clinical evaluation of deaf persons and their families. The Next Generation Sequencing (NGS) provides an opportunity to explore the genetic structure of the disease, and can be further be used as a benchmark for medical genetic testing[14]. In this study, whole exome analysis was used to resolve the etiology of hearing loss in six Moroccan families.

## Patients and methods

We recruited six families with syndromic and no syndromic hereditary deafness SF55, SF175, SF177, SF181, SF188 and SF193. Family members were informed of the purpose of the study and gave their informed consent. The genetic study was approved by the medical ethics committee of the Pasteur Institute of Morocco and carried out in accordance with the protocol of the Helsinki declaration.

First, the Whole Exome Sequencing (WES) was performed at IntegraGen (Evry, France). The Agilent Human exome V5 (50 Mb) capture kit allows the capture of libraries, followed by paired end sequencing on Illumina Hiseq 2000. Using Illumina Real-Time Analysis Pipeline version 1.14 image analysis and call up databases were carried out with default parameters. The short reads with paired ends were aligned against the human genome reference sequence hg19 (GRCH37). Then, the bioinformatics analysis of the sequencing data was based on the Illumina pipeline (CASAVA.1.8). We have filtered the variants based on dbSNP (build132) and 1000 genome project databases. Finally, the functional effects of the novel variants were predicted using SIFT and PolyPhen-2. To determine the segregation with the phenotype of the disease in these families, sanger sequencing was carried out to validate the mutation in the candidate gene. Specific primers have been designed using primer 3 (Table 1).

The 3D structures of the native and mutant EDNRB protein were predicted using SWISS Model, a fully automated



**Fig. 2** (a) Alignment of EDNRB amino acid from different species (b) The potential structural impact of the p.Arg409Trp mutation of the *EDNRB* gene is revealed by molecular modeling and analysis of amino acid conservation. Yellow dotted lines represent hydrogen bonds, and green lines represent hydrophobic interaction

protein structure homology-modelling server [15]. The predicted models were generated based on the structure of the Endothelin type B receptor in complex with Endothelin-3 (PDB ID: 6IGK). We noticed that targets (native and mutated EDNRB proteins) and template proteins share more than 94% of sequence similarity. The obtained structures were minimized using the Yasara Energy Minimization Server [16].

Amino acids interactions analysis and visualization were performed using YASARA software [17]. We used the following bioinformatics tools to analyze the impact of amino acid substitutions on the stability of the EDNRB protein structure: mCSM [18], SDM [19], DUET [20] et DeepDDG [21].

## Results

For the six families analyzed, results were obtained for the following four families SF55, SF175, SF181 and SF193. For the remaining two (SF177 and SF188), the analysis of the WES results did not identify any gene or variant. (Figure 1).

SF177.04 patient was affected with profound prelingual congenital deafness with a trisomy 21 and cardiac disease; whereas the patient SF188.04 had a profound bilateral prelingual deafness with an operated cardiac malformation.

### Syndromic genes

For syndromic families, SF181.5 patient suffered from Waardenburg syndrome characterized with profound congenital prelingual bilateral deafness, hypopigmented skin patches, scratching, bright blue irides whereas his older sister only exhibited a profound hearing loss and some white hairs. WES results revealed a novel homozygous mutation NM\_001201397.1:c.1225 C>T;p.(Arg409Trp) (rs200363611) of *EDNRB*. Then, sanger sequencing confirmed that the parents and the brother were heterozygous.

The c.1225 C>T missense variant has been predicted to be possibly damaging to damaging using the SIFT, FATHMM-MKL and POLYPHEN programs, deleterious by LRT software and disease causing by MutationTaster.

Moreover, the alignment of multiple sequences of orthologous EDNRB proteins of different species showed that the missense mutation p.(Arg409Trp) affected a highly conserved residue (Fig. 2.a).

The amino acid interactions analyses showed that this variant did not affect hydrogen bounds. However, it may disturb the hydrophobic interactions between the residue in 409 position and its adjacent amino acids as we observed that the interaction with Leu405 residue was replaced by one with Glu410 (Fig. 2.b, c, d). A destabilizing effect was

predicted based on the four different computational tools (Table 2).

The SF193.3 patient is from consanguineous parents, affected with congenital profound bilateral deafness, bilateral medullary nephrocalcinosis, distal renal tubular acidosis (dRTA), hypokalemia and growth retardation. WES analysis identified an insertion of *ATP6V1B1* NM\_001692.4: c.1155dupC; p.(Ile386HisfsTer56) (rs781969081) has been identified in the proband. Sanger sequencing confirmed that the affected patient (SF193.3) was homozygous for the mutation, while the unaffected father (SF193.1) and healthy mother (SF193.2) were heterozygous for this mutation.

Concerning the SF175.3, the proband is a girl with bilateral, prelingual deafness and early onset myopia. WES results showed homozygous variant, NM\_000091.5:c.3829G>A;p.(Gly1277Ser) (rs190598500) in *COL4A3*, and had been confirmed in a heterozygous state in the parents and the proband's sister.

### Non-syndromic genes

The SF55 family has severe deafness. The results showed that a heterozygous variant was already described in *GJB2*, and was involved in a dominant form. Sanger sequencing confirmed that the affected members (SF55.1, SF55.3 and SF55.4) harboured the heterozygous missense mutation NM\_004004.6:c.551G>A;p.(Arg184Gln) (rs80338950), while the mother (SF55.02) is homozygous wild-type.

## Discussion

In this work, we describe two genes that had been described in the Moroccan population. Complete sequencing of the exome revealed the first characterization of a new mutation in Morocco in *GJB2*, identified as being the main cause of hereditary NSHL in Morocco affecting around 35% of cases [4]. The most prominent mutation in Morocco and around the Mediterranean is the c.35delG deletion, that is, in our laboratory, always initially sought by direct sequencing as the first step in molecular diagnosis. Other mutations in this gene have been described by Abidi et al. [22] as causing autosomal recessive hereditary deafness, while dominant inheritance rarely occurs in the Moroccan population. The Arg184Gln variant cited in our study was observed for the

**Table 2** Mutation effects on EDNRB 3D structure stability

Software	Prediction	Stability change ( $\Delta\Delta G$ :Kcal/mol)
mCSM	Destabilizing	-0.017
SDM	Destabilizing	-0.31
DUET	Destabilizing	-0.31
DeepDDG	Destabilizing	-0.369

first time in the Moroccan population. According to Hamelmann et al. [23], this mutation was observed for the first time in Ghana in 2001 without any associated syndrome. It was then reported in the province of Jiangsu in China in 2016 [24] and in the Indian population in 2017 [25].

The second gene, *ATP6V1B1*, encodes the vacuolar H + ATPase B1 subunit located on the apical surface of alpha intercalated cells in the distal tubule, and is also expressed in epithelium of the human cochlea and the endolymphatic sac [26]. People with *ATP6V1B1* mutations have sensorineural hearing loss, the homozygous variant c.1155dupC in *ATP6V1B1* causes a change in the reading frame of isoleucine 386 introducing a premature stop codon with a frequency of 3.20e-5. This variant of *ATP6V1B1* was found in a homozygous patient from a Mexican family [27], two Moroccan patients [26] as well as the patient SF193.3 of this study, and Tunisian children with recessive form of dRTA associated to precocious hearing loss [28].

Besides the common genes previously published in Morocco, we have described here the first mutation of the *COL4A3* gene in the Moroccan population in a patient affected with Alport Syndrome. The p.(Gly1277Ser) has a frequency of 3.63e-4 on the gnomAD database. Mutations in the *COL4A3* gene are linked to kidney problems, deafness, and eye damage known as Alport syndrome [29]. Fallarini et al. had already described the p.(Gly1277Ser) variant in *COL4A3* in 3 families in Italy with Alport syndrome, and was found here in a Moroccan family for the first time with hearing loss and an onset of myopia and no kidney problem for the moment but probably because the patient is still very young. They also found this mutation in the heterozygous state in a patient with the autosomal dominant form [30].

The c.1225 C>T missense in *EDNRB* is reported in the gnomAD database (rs200363611) with a frequency of 1.78e-4. *EDNRB* mutations are linked to the Waardenburg type IV (WS4) [31]. The SF181 family presents an intrafamilial WS with a variable severity and no declared Hirschsprung disease. Other studies [32, 33] have suggested that *EDNRB* should be considered as another pathogenic gene prevalent in WS type 1 to the heterozygous state, whereas [31] (Issa 2017 et al.) estimated that the *EDNRB* mutations are responsible for 5–6% of WS type 2.

A molecular modeling study was performed to evaluate the structural impact of the p.Arg409Trp missense mutation. This mutation appears to cause a change in hydrophobic interactions, which resulted in a change in the 3D structure of the *EDNRB* protein between the native state and the mutated state. In addition, this mutation has a destabilizing effect on the stability of proteins.

In conclusion, this study describes the involvement of genetic variants of the *GJB2*, *COL4A3*, *EDNRB* and *ATP6V1B1* genes in syndromic and non-syndromic deafness

in Moroccan patients. These results can be considered very important because they allow to show even more the genetic diversity of hereditary deafness in Moroccan patients. In addition, they also make it possible to enrich national and international data concerning the Moroccan population.

**Acknowledgements** The authors are indebted to the families who contributed to this study. This project was supported by the Institut Pasteur du Maroc (IPM), we also thanks Dr. Snoussi Khalid for the clinical auditory investigation.

**Author contributions** Conceptualization: [Houria Abdelghaffar], [Abdelhamid Barakat] and [Hicham Charoute]; Formal analysis: [Imane Ait Raise], [Ghita Amalou] and [Amale Bousfiha]; Funding acquisition: [Abdelhamid Barakat], [Hassan Rouba]; Investigation: [Imane Ait Raise], [Ghita Amalou]; Methodology: [Imane Ait Raise], [Amale Bousfiha] and [Crystal Bonnet]; Resources: [Christine Petit] and [Abdelhamid Barakat]; Software: [Imane Ait Raise], [Hicham Charoute]; Writing—original draft: [Imane Ait Raise], [Ghita Amalou]; Writing—review & editing: [Houria Abdelghaffar], [Crystal Bonnet], and [Abdelhamid Barakat].

**Funding** No funds, grants, or other support was received.

**Availability of data and material** Data will be provided by the authors upon request.

**Code availability** Not applicable.

## Declarations

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Ethics approval** The genetic study was approved by the medical ethics committee of the Morocco Pasteur Institute.

**Consent to participate** Informed consent was obtained from legal guardians.

**Consent to publish** Patients signed informed consent regarding publishing their data.

## References

1. Olusanya BO, Davis AC, Hoffman HJ (2019) Hearing loss: rising prevalence and impact. Bull World Health Organ 97:646–646. <https://doi.org/10.2471/BLT.19.224683>. A
2. Wong S-H, Yen Y-C, Li S-Y, Yang J-J (2020) Novel Mutations in the *TMPRSS3* Gene may Contribute to Taiwanese Patients with Nonsyndromic Hearing Loss. Int J Mol Sci 21:E2382. <https://doi.org/10.3390/ijms21072382>
3. Buonfiglio P, Bruque CD, Luce L et al (2020) *GJB2* and *GJB6* Genetic Variant Curation in an Argentinean Non-Syndromic Hearing-Impaired Cohort. Genes 11:E1233. <https://doi.org/10.3390/genes11101233>
4. Bakhchane A, Bousfiha A, Charoute H et al (2016) Update of the spectrum of *GJB2* gene mutations in 152 Moroccan families with autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. Eur J Med Genet 59:325–329. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2016.05.002>

5. Charif M, Bounaceur S, Abidi O et al (2012) The c.242G>A mutation in LRTOMT gene is responsible for a high prevalence of deafness in the Moroccan population. *Mol Biol Rep* 39:11011–11016. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2003-3>
6. Bakhchane A, Charif M, Bousfiha A et al (2017) Novel compound heterozygous MYO7A mutations in Moroccan families with autosomal recessive non-syndromic hearing loss. *PLoS ONE* 12:e0176516. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176516>
7. Bousfiha A, Bakhchane A, Charoute H et al (2017) A novel PEX1 mutation in a Moroccan family with Zellweger spectrum disorders. *Hum Genome Var* 4:17009. <https://doi.org/10.1038/hgv.2017.9>
8. Bousfiha A, Bakhchane A, Charoute H et al (2017) Novel compound heterozygous mutations in the GPR98 (USH2C) gene identified by whole exome sequencing in a Moroccan deaf family. *Mol Biol Rep* 44:429–434. <https://doi.org/10.1007/s11033-017-4129-9>
9. Bakhchane A, Charoute H, Nahili H et al (2015) A novel mutation in the TMC1 gene causes non-syndromic hearing loss in a Moroccan family. *Gene* 574:28–33. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.07.075>
10. Charif M, Bakhchane A, Abidi O et al (2013) Analysis of CLDN14 gene in deaf Moroccan patients with non-syndromic hearing loss. *Gene* 523:103–105. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.03.123>
11. Salime S, Charif M, Bousfiha A et al (2017) Homozygous mutations in PJKV and MYO15A genes associated with non-syndromic hearing loss in Moroccan families. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 101:25–29. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2017.07.024>
12. Amalou G, Bonnet C, Riahi Z et al (2021) A homozygous MPZL2 deletion is associated with non syndromic hearing loss in a moroccan family. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 140:110481. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2020.110481>
13. Shearer AE, Hildebrand MS, Smith RJ (2017) Hereditary Hearing Loss and Deafness Overview. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA et al (eds) *GeneReviews*®. University of Washington, Seattle, Seattle (WA)
14. Shearer AE, DeLuca AP, Hildebrand MS et al (2010) Comprehensive genetic testing for hereditary hearing loss using massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:21104–21109. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012989107>
15. Biasini M, Bienert S, Waterhouse A et al (2014) SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res* 42:W252–258. <https://doi.org/10.1093/nar/gku340>
16. Krieger E, Joo K, Lee J et al (2009) Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: Four approaches that performed well in CASP8. *Proteins* 77 Suppl 9:114–122. <https://doi.org/10.1002/prot.22570>
17. Krieger E, Vriend G (2014) YASARA View - molecular graphics for all devices - from smartphones to workstations. *Bioinforma Oxf Engl* 30:2981–2982. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu426>
18. Pires DEV, Ascher DB, Blundell TL (2014) mCSM: predicting the effects of mutations in proteins using graph-based signatures. *Bioinforma Oxf Engl* 30:335–342. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt691>
19. Pandurangan AP, Ochoa-Montaño B, Ascher DB, Blundell TL (2017) SDM: a server for predicting effects of mutations on protein stability. *Nucleic Acids Res* 45:W229–W235. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx439>
20. Pires DEV, Ascher DB, Blundell TL (2014) DUET: a server for predicting effects of mutations on protein stability using an integrated computational approach. *Nucleic Acids Res* 42:W314–319. <https://doi.org/10.1093/nar/gku411>
21. Cao H, Wang J, He L et al (2019) DeepDDG: Predicting the Stability Change of Protein Point Mutations Using Neural Networks. *J Chem Inf Model* 59:1508–1514. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.8b00697>
22. Abidi O, Boulouiz R, Nahili H et al (2008) Carrier frequencies of mutations/polymorphisms in the connexin 26 gene (GJB2) in the Moroccan population. *Genet Test* 12:569–574. <https://doi.org/10.1089/gte.2008.0063>
23. Hamelmann C, Amedofu GK, Albrecht K et al (2001) Pattern of connexin 26 (GJB2) mutations causing sensorineural hearing impairment in Ghana. *Hum Mutat* 18:84–85. <https://doi.org/10.1002/humu.1156>
24. Shi L, Chen J, Li J et al (2016) Prevalence of GJB2 gene mutation in 330 cochlear implant patients in the Jiangsu province. *J Laryngol Otol* 130:902–906. <https://doi.org/10.1017/S0022215116008689>
25. Pavithra A, Chandru J, Jeffrey JM et al (2017) Rare compound heterozygosity involving dominant and recessive mutations of GJB2 gene in an assortative mating hearing impaired Indian family. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol Off J Eur Fed Oto-Rhino-Laryngol Soc EUFOS Affil Ger Soc Oto-Rhino-Laryngol - Head Neck Surg* 274:119–125. <https://doi.org/10.1007/s00405-016-4229-5>
26. Boualla L, Jdioui W, Soulami K et al (2016) Clinical and molecular findings in three Moroccan families with distal renal tubular acidosis and deafness: Report of a novel mutation of ATP6V1B1 gene. *Curr Res Transl Med* 64:5–8. <https://doi.org/10.1016/j.retram.2016.01.005>
27. Escobar LI, Simian C, Treard C et al (2016) Mutations in ATP6V1B1 and ATP6V0A4 genes cause recessive distal renal tubular acidosis in Mexican families. *Mol Genet Genomic Med* 4:303–311. <https://doi.org/10.1002/mgg3.205>
28. Elhayek D, Perez de Nanclares G, Chouchane S et al (2013) Molecular diagnosis of distal renal tubular acidosis in Tunisian patients: proposed algorithm for Northern Africa populations for the ATP6V1B1, ATP6V0A4 and SCL4A1 genes. *BMC Med Genet* 14:119. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-14-119>
29. Fallerini C, Baldassarri M, Trevisson E et al (2017) Alport syndrome: impact of digenic inheritance in patients management. *Clin Genet* 92:34–44. <https://doi.org/10.1111/cge.12919>
30. Heidet L, Arondel C, Forestier L et al (2001) Structure of the human type IV collagen gene COL4A3 and mutations in autosomal Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol JASN* 12:97–106
31. Issa S, Bondurand N, Faubert E et al (2017) EDNRB mutations cause Waardenburg syndrome type II in the heterozygous state. *Hum Mutat* 38:581–593. <https://doi.org/10.1002/humu.23206>
32. Li W, Mei L, Chen H et al (2019) New Genotypes and Phenotypes in Patients with 3 Subtypes of Waardenburg Syndrome Identified by Diagnostic Next-Generation Sequencing. *Neural Plast* 2019:7143458. <https://doi.org/10.1155/2019/7143458>
33. Morimoto N, Mutai H, Namba K et al (2018) Homozygous EDNRB mutation in a patient with Waardenburg syndrome type 1. *Auris Nasus Larynx* 45:222–226. <https://doi.org/10.1016/j.anl.2017.03.022>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



## First characterization of *LTBP3* variants in two Moroccan families with hypoplastic amelogenesis imperfecta

Falah Nouara<sup>a,b,1</sup>, Ghita Amalou<sup>a,c,1</sup>, Aymane Bouzidi<sup>a,c</sup>, Majida Charif<sup>d</sup>, Hicham Charoute<sup>a</sup>, Guy Lenaers<sup>c,e</sup>, Samira El Arabi<sup>b</sup>, Bouchra Bousfiha<sup>b</sup>, Abdelhamid Barakat<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Genomics and Human Genetics Laboratory, Institut Pasteur du Maroc, Casablanca, Morocco

<sup>b</sup> Faculty of Dentistry of the Hassan II University of Casablanca, Morocco

<sup>c</sup> Université d'Angers, Equipe MitoLab, INSERM U1083, CNRS 6015, MitoVasc, SFR ICAT, Angers, France

<sup>d</sup> Genetics and Immuno-cell therapy Team, Mohammed First University, Oujda, Morocco

<sup>e</sup> Service de Neurologie, CHU d'Angers, France

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Hypoplastic amelogenesis imperfecta

Brachyolmia

DASS

*LTBP3*

Whole exome sequencing

Moroccan population

### ABSTRACT

**Objectives:** To decipher and improve the molecular diagnosis of Hypoplastic Amelogenesis Imperfecta in Morocco.

**Design:** Using whole exome sequencing, we analyzed two Moroccan families with Hypoplastic Amelogenesis Imperfecta. The 2 patients from the first family had dental anomalies and short stature syndrome, brachyolmia and nephrocalcinosis with difference in severity, while the proband of the second family had Hypoplastic Amelogenesis Imperfecta with a suspicion of brachyolmia.

**Results:** We identified two novel *LTBP3* homozygous variants, the c.2495delT deletion (p.Phe832SerfsTer36) and the c.3716 G>A (p.Cys1239Tyr) missense variant, respectively. Molecular modelling and stability analyses of the missense variant disclosed a possible destabilization of the wild-type structure.

**Conclusion:** Although *LTBP3* variants were related to this phenotype in various populations, we report the first *LTBP3* variants in the Moroccan population, in families with Hypoplastic Amelogenesis Imperfecta.

### 1. Introduction

Amelogenesis Imperfecta (AI) are inherited genetic disorders affecting the clinical structure, thickness and strength of enamel. Their prevalence varies according to the studied population from 1.4/1000 in Sweden (Bäckman & Holm, 1986) to 1/14000 in the USA (Kim et al., 2008). According to the amelogenesis stage, AI can be expressed by different phenotypes such a hypomature, hypocalcified, hypoplastic and hypomature-hypoplastic (Koruyucu et al., 2018; Witkop, 1988).

The Hypoplastic Amelogenesis Imperfecta (HAI), a quantitative enamel defect, represents 60–73% of AI cases (Nakata et al., 1985), and manifests as a low or reduced thickness enamel, characterized by the presence of pits or streaks; the enamel is nevertheless hard, translucent, sometimes with a rough or pitted appearance, giving the patient an unattractive appearance. The HAI can be isolated or associated with

other symptoms, such as nephrocalcinosis and brachyolmia (Bloch-Zupan et al., 2012). The latter is a heterogeneous group of rare genetic skeletal disorders, characterized by short trunked and stature, with platyspondyly and scoliosis (Huckert et al., 2015).

One of the multiple causes of association of brachyolmia and HAI is the blockage of TGF-beta signaling, which leads to ameloblast inability to produce an enamel layer in incisors (Klopčič et al., 2007). Over-expression of TGF-beta1 in teeth results in ameloblast detachment and enamel defects (Crawford et al., 2007; Haruyama et al., 2006). Latent TGF-beta 1, 2 and 3 form a large complex with *LTBP3* (Penttinen et al., 2002) and *LTBP3* variants have been related to HAI associated with short stature and brachyolmia (OMIM 601216) in many populations (Huckert et al., 2015; Verloes et al., 1996).

The LTBP family contains 4 members (LTBP-1, LTBP-2, LTBP-3, and LTBP-4) (Todorović & Rifkin, 2012). *LTBP3* (NM\_001130144.2) extends

Abbreviations: AI, Amelogenesis Imperfecta; HAI, Hypoplastic Amelogenesis Imperfecta; DASS, Dental Anomalies and Short Stature syndrome.

\* Correspondence to: Laboratoire de génomique et génétique humaine, Département de Recherche Scientifique, Institut Pasteur du Maroc, 1 Place Louis Pasteur, 20360 Casablanca, Morocco.

E-mail address: [hamid.barakat@pasteur.ma](mailto:hamid.barakat@pasteur.ma) (A. Barakat).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2022.105518>

Received 25 April 2022; Received in revised form 2 August 2022; Accepted 4 August 2022

Available online 6 August 2022

0003-9969/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Table 1**  
Primers' Sequences.

	Forward Prime	Reverse Primer
Family 1	AAAGCTTTGGCTGCCTCA	ATTACTGCTCCCTGCCAGAT
Family 2	CGAGAGCAATTCCTCTGGG	TATCTGAAGGTGAGGGCGAC

over 28 exons and encodes an extracellular matrix protein (NP\_001157738.1) involved in regulating the secretion, uptake and activation of TGF-beta (Hyytiäinen et al., 2004; Klopčič et al., 2007). The LTBP3 protein has 3 types of domains: an epidermal growth factor (EGF) like calcium-binding domain, a TGF-beta-binding protein-like domain and an EGF like-domain (Robertson et al., 2011). LTBP3 is also involved in bone formation and remodeling, while its inhibition reduces the TGF-beta activation, and consequently decreases the associated cell proliferation and osteogenic differentiation (Koli et al., 2008).

LTBP3 variants are implicated in HAI pathologies (Flex et al., 2021), but none was described in Moroccan and North African populations. In this study, using whole exome sequencing, we identified the first LTBP3 pathogenic variants in three patients of two consanguineous Moroccan families with hypoplastic AI.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Patients

This study was carried out in accordance with the guidelines of the declaration of Helsinki and approved by the local research ethics committee of the Pasteur Institute of Morocco.

Three Moroccan patients from two unrelated families were referred to the service of Pedodontics Department of the Casablanca Dental Consultation and Treatment Center for a brownish-yellow discoloration of all teeth and a dental hypersensitivity. They were born from consanguineous Moroccan couples, both parents and fraternity having normal teeth and no dental problem was reported in other family members.

### 2.2. Whole Exome Sequencing

Genomic DNA was extracted from peripheral blood of all available family members using QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, USA), according to the manufacturer's protocol. DNA from the two probands underwent whole exome sequencing (WES) at BGI Tech Solutions Company (Hongkong, China), using a GBSEQ-500 high-throughput sequencing platform as described elsewhere (Bouzidi et al., 2021).

To select the pathogenic candidate variants, we prioritized known genes reported in HAI. Then variants with minor allele frequencies greater than 0.01 in 1000 Genomes and genomAD databases were also eliminated. And since pedigrees suggested an autosomal recessive mode of inheritance, only homozygous and compound heterozygous missense, nonsense, frameshift, and splice-site variants were selected. Data were filtered to eliminate benign variants based on predictions obtained from different bioinformatics tools, including PolyPhen, SIFT, MutationAssessor, MutationTaster, FATHMM-MKL and LRT.

### 2.3. Validation by Sanger sequencing

Sanger sequencing was performed to confirm the segregation of the potential causative variants identified by WES. PCR primers were designed using Primer 3 online tool, and PCR products were sequenced using ABI 3130 genetic Analyzer (Applied Biosystems) and analyzed using UGENE software (Table 1).

### 2.4. Molecular modelling and stability analysis

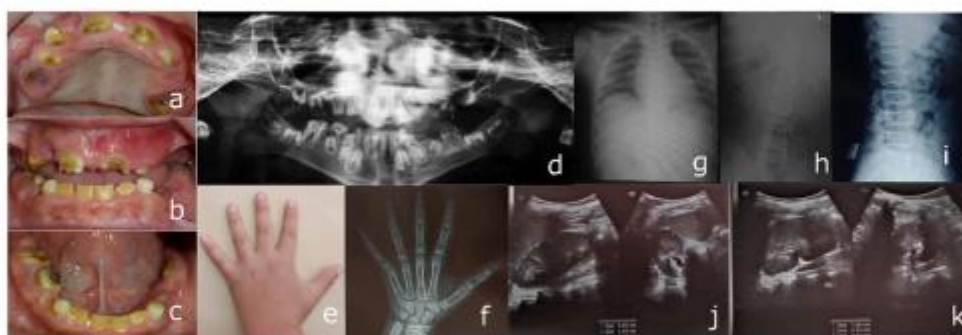
To predict the deleterious effects of identified variants on the protein structure, we used a molecular modelling approach. The LTBP3 FASTA amino acid sequence [Q9NS15-1] was obtained from the UniProt database. The protein 3D structure was predicted using SWISS-MODEL online server, and the structure was selected based on the sequence identity and the QMEAN function. The energy minimization for all 3D structures was done with YASARA minimization server. The protein stability change due to single point variant was predicted using mCSM, SDM and DUET bioinformatics tools. Wild-type and mutant structures were visualized using YASARA tool.

## 3. Results

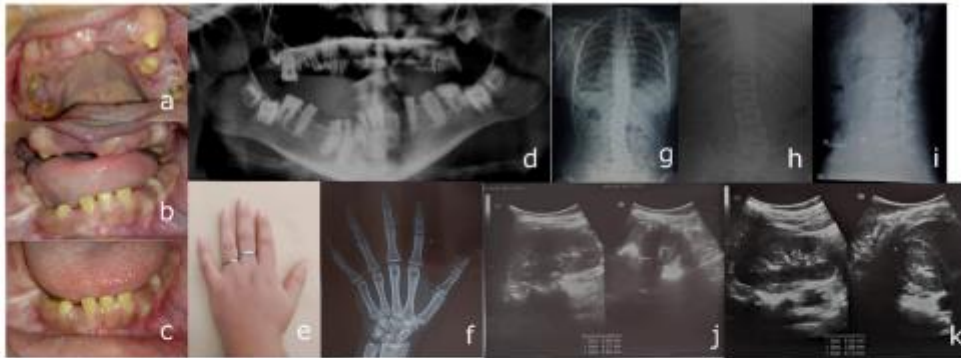
### 3.1. Patient presentations

#### 3.1.1. Family 1 patient II:1

A 14-year-old male was born at term after a normal pregnancy. Physical examinations showed a delayed short stature of 138 cm (-2 DS) of height. His facial features are without particularity. Endobuccal examination at 11 years old revealed poor oral hygiene, generalized gingival inflammation, brown-yellowish discoloration of all teeth with absent or very thin enamel, microdontia and some dental retentions. Structural defects were complicated by caries. Occlusion examination revealed an anterior and lateral open bite. He had a generalized gingival fibromatosis. The panoramic examination showed a complete dental



**Fig. 1.** Clinical features of family 1 patient II:1. (a, b, c) Endobuccal view of the maxilla and mandible, showing the severity of the disease and the yellowish color of the teeth. (d) Panoramic x-ray showing reduced thickness or even absent enamel and significant dental decay. (e) Photo of the hand shows a brachydactyly. (f) Left hand X-ray shows no metaphyseal, epiphyseal or diaphyseal anomaly; the patient's bone age corresponds to 13 years. (g) The thorax radiograph does show a free pleural sac. (h) Front X-ray picture of the dorsal-lumbar spine shows a discrete flattening of the vertebral bodies in H-shape. (i) Profile X-ray of the dorso-lumbar spine shows normal spinal curvature and the absence of scoliosis. (j, k) Renal ultrasound shows an appearance of bilateral grade 2 nephrocalcinosis.



**Fig. 2.** Clinical features of family 1 patient II:2. (a, b, c) Endobuccal view of the maxilla and mandible showing the severity of the damage. (d) Panoramic radiograph shows microdontia, retention of most teeth with enamel hypoplasia. (e) Picture of the left hand shows a brachydactyly. (f) Left hand X-ray shows no metaphyseal, epiphyseal or diaphyseal anomaly. The patient's bone age corresponds to 16 years. (g) Thorax radiography shows an elevation of the right diaphragmatic dome, bilateral interstitial syndrome, absence of parenchymal foci and a bone framework without anomaly. (h, i) Dorsal-lumbar scoliosis with left convexity, discrete straightness on the profile view, vertebral bodies of normal height, doubt about a wedge-shaped compression of vertebrae L3 and L4, absence of posterior wall recession. (j, k) Renal ultrasound shows an appearance of bilateral grade 2 nephrocalcinosis.

formula, microdontia, delayed eruption of some teeth, the presence of enamel hypoplasia in temporary and permanent teeth, and even in germs (Fig. 1a, b, c and d). At 13 years old, X-ray of the left hand showed the persistence of the epiphyses of the first, second and third phalanges, in their equal MP3 stage (Fig. 1e, f). A blood test revealed that the child was deficient in vitamin D with a level of 23,9 ng/ml (30–100 ng/ml).

Frontal X-ray of the thorax appears without pulmonary and bone abnormality (Fig. 1g). Radiography of the dorso-lumbar spine showed discrete flattening of the H-shaped vertebral bodies and normal the spinal curves, without scoliosis (Fig. 1h, i). Renal ultrasound shows an appearance of bilateral grade 2 nephrocalcinosis (Fig. 1j, k) with normal serum levels of calcium, alkaline phosphate, urea, creatinine, and growth hormone.

### 3.1.2. Family 1 patient II:2

The patient is an 18-year-old female with a short waist, and a height of 144 cm, - 2 DS, witnessing a delayed height-weight. Endobuccal examination at 16 years old reveals a more severe condition than her brother with yellowish discoloration of all teeth, coronal decay of the upper permanent molars, delayed eruption of most teeth and microdontia. She has a poor oral hygiene with generalized gingival fibromatosis. Occlusion examination revealed a significant anterior open bite and bilateral posterior disocclusion. Radiographic examination revealed reduced thickness or totally absent enamel, dental retentions of the teeth, persistence of temporary teeth and taurodontism on a maxillary right molar (Fig. 2a, b, c and d).

At 17 years old, the X-ray of the left hand was in MP3 stage (Fig. 2e, f). A blood test revealed a deficiency in vitamin D of 9,0 ng/ml (30–100 ng/ml).

Thorax frontal X-ray appeared without pulmonary and bone abnormality (Fig. 2g). Dorso-lumbar spine radiography showed scoliosis with left convexity. In addition, it showed a discrete straightness on the side view, a discrete flattening of the H-shaped vertebral bodies with a respect of the spinal curves, with scoliosis (Fig. 2h, i). Renal ultrasound shows an appearance of bilateral grade 2 nephrocalcinosis (Fig. 2j, k) with normal serum levels of calcium, alkaline phosphate, urea, creatinine, and growth hormone.

### 3.1.3. Family 2 patient II:3

A 10-year-old female consulted for dental sensitivities, yellowish aspect of the teeth and an aesthetic reason. On endobuccal examination revealed temporary and permanent affected teeth, with horizontal striations and pits. Teeth had yellow color with a reduced enamel thickness



**Fig. 3.** Dental features of family 2 patient II:3 (a) Endobuccal view of the maxilla and mandible disclosing damages to both teeth with an enamel collar at the cervical level. (b) Panoramic radiograph showing reduced enamel thickness.

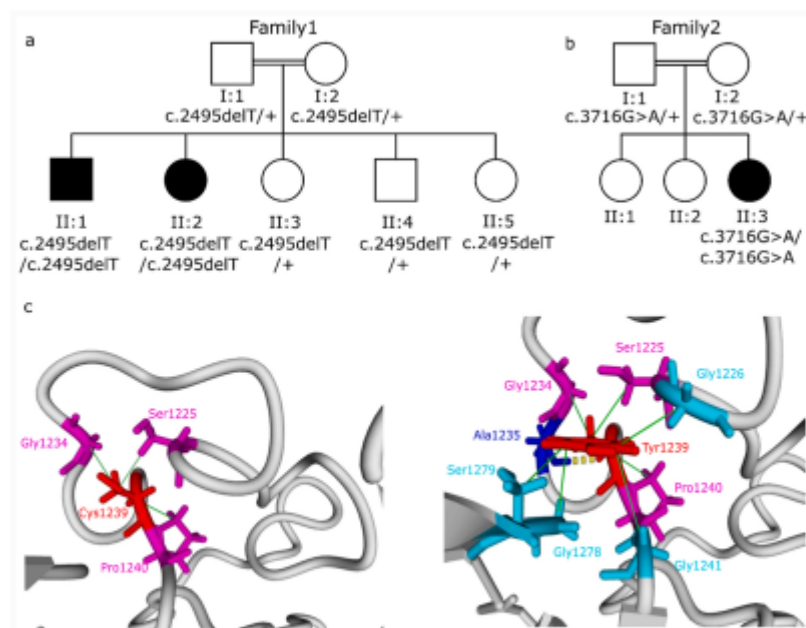
over the entire surface, except in the cervical area where it was hard and thick. The child had poor oral hygiene, inflamed gums, and caries in the temporary and permanent molars. Occlusal examination showed a class III molar occlusion on the right and a class I on the left. Radiographic examination showed a complete dental formula, thin or absent enamel in some places and normal contrast between enamel and dentin (Fig. 3a, b).

The patient suffers from back pain, joint pain in the knees without the ability to bend them, and she had rounded shoulders, thus suspecting a brachyolmia that was unfortunately not confirmed by rachis radiography.

### 3.2. Molecular investigations

WES followed by bioinformatics analyses were performed on the two index patients. Family 1 patients II:1 carry the homozygous deletion c.2495delT (p.Phe832SerfsTer36) in *LTBP3* gene. Using *in-silico* software prediction methods, the variant was predicted pathogenic. Family 2 index patient had the c.3716 G>A (p.Cys1239Tyr) homozygous missense variant that was predicted to be pathogenic by softwares. Both variants are novel and absent in the gnomAD and the dbSNP databases.

Sanger sequencing of all available family members confirmed that variants segregated with the disease. Indeed, in family 1, the patient II:2 harbored also the deletion in a homozygous state, while the parents and



**Fig. 4.** Segregation of *LTBP3* variants and their structural analysis (a, b) Pedigrees of the two families are shown with the segregation of the *LTBP3* identified variants. (c) Structural analysis of the different interactions in the wild-type Cys1239 (on the left) and the mutated Tyr1239 (on the right) *LTBP3* protein. The original Cys and mutated Tyr amino-acid is shown in red; residues that participate in hydrophobic interactions are indicated in purple; residues that participate in gained hydrophobic interactions are marked in light blue; residues that participate in gained hydrogen bonds are marked in blue; hydrogen bonds are marked by yellow dashed lines, and hydrophobic interactions are shown in green lines.

healthy siblings (II:3, II:4, II:5) were heterozygous (Fig. 4a). In family 2, both parents harbored the missense variant in a heterozygous state (Fig. 4b), while DNA was not available for the other siblings.

### 3.3. Molecular modelling and stability analysis

The SWISS-MODEL server generated 21 models for *LTBP3* based on three templates. We selected the model generated from the 1uzj.3.A template for both the WT and mutated protein with a QMEAN value of  $-5.94\%$  and  $39.49\%$  identity that contained the mutated amino acid.

The structural analysis of *LTBP3* variants using YASARA software showed differences in the hydrogen bonds and hydrophobic interactions. The wild-type cysteine had no hydrogen bond, and three hydrophobic interactions with Ser1225, Pro1240 and Gly1234. Change to Tyrosine gained a hydrogen bond with Ala1236 and four additional hydrophobic interactions with Gly1226, Gly1241, Gly1278 and Ser1279 (Fig. 4c). The RMSD of the superposed mutated and wild structures type was  $0.7531 \text{ \AA}$ .

The mCSM ( $-0.749 \text{ kcal/mol}$ ), SDM ( $-0.1 \text{ kcal/mol}$ ) and DUET ( $-0.669 \text{ kcal/mol}$ ) scores and predictions are all witnessing destabilization effects on the protein structure due to the Cysteine to Tyrosine substitution.

## 4. Discussion

HAI is a dental anomaly affecting the quantity of teeth enamel. It is a clinically and genetically diverse disorder, as it can be linked to multiple other symptoms and caused by many genes. Implication of the *LTBP3* gene in AI has been established by Verloes and al in 1996 in his first description of a combination of AI and brachyolmia in a brother and sister from a consanguineous family (Verloes et al., 1996). In 2009, two other families were described, presenting AI, generalized platyspondyly and taurodontism (Bertola et al., 2009).

In this study, two novels pathogenic *LTBP3* variants were identified using WES in three Moroccan patients with HAI and brachyolmia. Patients II:1 and II:2 from family 1 are sibling from a consanguineous

marriage, diagnosed with dental anomalies, characterized by HAI, delayed eruption of teeth, brachyolmia, and associated with short stature, as reported for Dental Anomalies and Short Stature syndrome (DASS). DASS most frequent clinical features are AI (100%), short stature (95%), delayed eruption of teeth (91,6%), oligodontia (88%), brachyolmia (80%) and scoliosis (80%), although additional features can be associated as thoracic aortic aneurysms and dissection (Dugan et al., 2015; Guo et al., 2018; Huckert et al., 2015; Intarak et al., 2019; Noor et al., 2009).

In addition, nephrocalcinosis was observed in both Family I siblings, but scoliosis was found only in the sister, thus with a variable expression. Nephrocalcinosis has never been associated with *LTBP3* variants. The Human Protein Atlas and Nexprot databases revealed significant *LTBP3* expression in the kidney and it's has been showed that *LTBP4* affects renal fibrosis (Su et al., 2021), but functional studies are necessary to confirm and prove the *LTBP3* variants and nephrocalcinosis association.

The most common reported *LTBP3* variants were frameshifts, rather than nonsense, missense, splice-site and insertion-deletion (Table 2) (Kaur et al., 2020). Family 1 siblings had the c.2495delT homozygous deletion leading to a frameshift at the 832 amino acid position (p.Phe832SerfsTer36). Two *LTBP3* frameshift variants (p.Tyr691LeufsTer95 and p.Val786TrpfsTer82) were reported in 5 Turkish and Pakistani patients sharing many clinical features with our patients (Huckert et al., 2015). p.Val230AlafsTer16 variant has been found in a compound heterozygous state in an Indian patient with a congenital cardiac pathology in addition to the standard clinical features of the DASS syndrome (HAI, brachyolmia, short stature) (Kaur et al., 2020). These 4 frameshift variants are all located in the EGF-beta calcium binding domain and are likely to result in a truncated protein and subsequent disruption of calcium binding.

Family 2 patient II:3 presents a HAI with a high suspicion of brachyolmia, although without growth delay. Her brachyolmia is supported by the usual symptoms as back pain, joint pain in the knees and rounded shoulders, although she did not show the short stature commonly associated to *LTBP3* variants. The patient harbored the c.3716 G>A (p.Cys1239Tyr) homozygous missense variant predict to be pathogenic.

**Table 2**  
Published pathogenic *LTBP3* pathogenic variants.

Variant	Amino Acid change	rs	Phenotype	Origin	Ref
c.2322 C>G	p.(Tyr774Ter)	-	AI, Oligodontia, SS.	Consanguineous Pakistani family	(Noor et al., 2009)
c.1858_1859insG c.2071_2084del	p.(Cys620TrpfsTer171) p.(Tyr691LeufsTer95)	rs878853262 rs875989822	Complete agenesis of permanent dentition, SS. AI, SS, Generalized platyspondyly.	2 Emirati sisters 2 Turkish sisters	(Dugan et al., 2015) (Huckert et al., 2015)
c.421 C>T/ c.1531+1 G>T c.2216del	p.(Gln141Ter)/- p.(Gly739AlafsTer7)	- /rs875989823 rs752375653	AI, SS, Mild platyspondyly. AI, SS, Delayed eruption of dentition, Mild platyspondyly.	French sister and brother Brazilian boy	(Huckert et al., 2015) (Bertala et al., 2009; Huckert et al., 2015)
c.2356delG	p.(Val786TrpfsTer82)	rs875989824	AI, SS, Oligodontia, Generalized platyspondyly, Scoliosis.	3 Pakistani siblings	(Huckert et al., 2015)
c.132delG/ c.2248 G>T	p.(Pro45ArgfsTer25)/ p. (Glu750Ter)	rs1286042594/ rs1554973844	Dental anomalies, SS, Mitral valve prolapses, Arterial aneurysmal disease.	A brother and 2 sisters of unknown origin	(Guo et al., 2018)
c.2033_2041 delinsCTT	p.(Asn678_Gly681 delinsThrCys)	-	AI, SS, Scoliosis (sister only), Thoracic aortic aneurysms/dissection.	A brother and his sister	(Guo et al., 2018)
c.1721-2 A>G	-	-	HAI, SS, Scoliosis, Congenital heart defects.	Thai girl	(Intarak et al., 2019)
c.3153_3154del/ c.689_690del c.2894-2 A>G	p.(Cys1051Ter)/ p.(Val230AlafsTer16) p.(Ala965GlyfsTer38)	-/- -	AI, Delayed eruption of dentition, Oligodontia, SS, Platyspondyly. AI, Oligodontia, SS, Brachyactyly, Scoliosis, Cardiomyopathy.	Indian boy Peruvian boy	(Gaur et al., 2020) (Flex et al., 2021)
c.1630_1631dup/ c.3107-2 A>G	p.(Arg545ProfsTer22) /-	-/rs112261752	HAI, Mild brachyactyly, Osteopenia, Mitral valve prolapse, Mild enlargement in the aortic root.	Turkish girl	(Kantaputra et al., 2022)
c.1630_1631dup	p.(Arg545ProfsTer22)	-	Maxillary hypoplasia, Prognathic Mandible, Craniofacial manifestations, Enlargement in the aortic root, Aneurysm in the interatrial septum.	Her mother	
c.3107-2 A>G c.2495delT	- p.(Phe832SerfsTer36)	rs112261752 -	SS, Prognathic mandible. AI, Brachyolmia, SS, Delayed eruption of dentition, Brachyactyly, Scoliosis (sister only), Nephrocalcinosis.	Her father Moroccan sister and brother	<b>This study</b>
c.3716 G>A	p.(Cys1239Tyr)	-	AI, Brachyolmia suspicion.	Moroccan girl	<b>This study</b>

AI: Amelogenesis imperfecta, HAI: Hypoplastic Amelogenesis imperfecta, SS: Short stature

The aa change is located in the EGF-like domain, and a molecular modelling and stability analyses disclosed a possible destabilization of the wild-type structure. Though, functional studies are a request to prove that c.3716 G>A leads to fully loss of function of *LTBP3*.

To the best of our knowledge, all *LTBP3* patients with a short stature have been diagnosed with a variant in one of the twelve *LTBP3* EGF calcium-binding domains. Table 2 summarizes all patients with *LTBP3* variants who exhibited dental anomalies (HAI, dental agenesis, delayed eruption of dentition) and short stature, except for one of our patients. Variabilities in other clinical features were also reported, as some of the patients suffered from brachyolmia, scoliosis and cardiac diseases. All variants were found in different countries from four different continents, with clinical and genetic diversity.

## 5. Conclusion

Here, we presented the first characterization of *LTBP3* variants in 2 Moroccan families with HAI and brachyolmia, thus prompting regular dental and bone follow-up for early intervention, especially if other symptoms appear.

## Funding

The work was supported by CAMPUS FRANCE (PHC TOUBKAL 2020, "Université d'Angers" and "Pasteur Institute of Morocco"

bilateral program, Grant Number: 39005ZL)

## C. RediT authorship contribution statement

**Falah Nouara:** Methodology, Investigation, Visualization, Writing – original draft. **Ghita Amalou:** Methodology, Investigation, Visualization, Writing – original draft. **Aymane Bouzidi:** Investigation, Writing – original draft. **Majida Charif:** Formal analysis, Writing – review & editing. **Hicham Charoute:** Conceptualization, Writing – original draft. **Guy Lenaers:** Resources, Funding acquisition, Writing – review & editing. **Samira El Arabi:** Investigation, Writing – review & editing. **Bouchra Bousfiha:** Conceptualization, Funding acquisition, Writing – review & editing. **Abdelhamid Barakat:** Conceptualization, Resources, Funding acquisition, Writing – review & editing. All authors approved the final version of this manuscript.

## Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

## Acknowledgements

The authors are indebted to the family members that contributed to this study.

## References

- Bäckman, B., & Holm, A. K. (1986). Amelogenesis imperfecta: Prevalence and incidence in a northern Swedish county. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 14(1), 43–47. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0528.1986.tb01493.x>
- Bertola, D. R., Antequera, R., Rodvalho, M. J., Honjo, R. S., Albano, L. M. J., Furguim, I. M., ... Kim, C. A. (2009). Brachyolmia with amelogenesis imperfecta: Further evidence of a distinct entity. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 149A(3), 532–534. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.32661>
- Bloch-Zupan, A., Sedano, H., & Scully, C. (2012). *Dento/Oro/Craniofacial Anomalies and Genetics*. Elsevier.
- Bouzidi, A., Charif, M., Bouzidi, A., Amalou, G., Kandil, M., Barakat, A., & Lenaers, G. (2021). Clinical and genetic investigations of three Moroccan families with retinitis pigmentosa phenotypes. *Molecular Vision*, 9.
- Crawford, P. J. M., Aldred, M., & Bloch-Zupan, A. (2007). Amelogenesis imperfecta. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 2, 17. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-2-17>
- Dagan, S. L., Tenme, R. T., Olson, R. A., Mikhailov, A., Law, R., Mahmood, H., ... Vincent, J. B. (2015). New recessive truncating mutation in *LTBP3* in a family with oligodontia, short stature, and mitral valve prolapse. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 167(6), 1396–1399. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37049>
- Flex, E., Imperatore, V., Carpentieri, G., Bruselles, A., Cioffi, A., Pizzi, S., ... Prontera, P. (2021). A rare case of brachyolmia with amelogenesis imperfecta caused by a new pathogenic splicing variant in *LTBP3*. *Genes*, 12(9), 1406. <https://doi.org/10.3390/genes12091406>
- Gao, D., Regalado, E. S., Pinaud, A., Chen, J., Lee, K., Riegelsky, C., ... Milewicz, D. M. (2018). *LTBP3* pathogenic variants predispose individuals to thoracic aortic aneurysms and dissections. *The American Journal of Human Genetics*, 102(4), 706–712. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.03.002>
- Haruyama, N., Thyagarajan, T., Skobe, Z., Wright, J. T., Septier, D., Sreenath, T. L., ... Kulkarni, A. B. (2006). Overexpression of transforming growth factor-beta1 in teeth results in detachment of ameloblasts and enamel defects. *discussion 39-41*, 379 *European Journal of Oral Sciences*, 114(Suppl 1), 30–34. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2006.00276.x>
- Huckert, M., Stoetzel, C., Morkmued, S., Laugel-Haushalter, V., Geoffroy, V., Muller, J., ... Bloch-Zupan, A. (2015). Mutations in the latent TGF-beta binding protein 3 (*LTBP3*) gene cause brachyolmia with amelogenesis imperfecta. *Human Molecular Genetics*, 24(11), 3038–3049. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv053>
- Hyttiäinen, M., Penttinen, C., & Keski-Oja, J. (2004). Latent TGF-beta binding proteins: Extracellular matrix association and roles in TGF-beta activation. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 41(3), 233–264. <https://doi.org/10.1080/10408360490460933>
- Intarak, N., Theerapanon, T., Thaweesapthithak, S., Suphacetiporn, K., Porntaveest, T., & Shotleersuk, V. (2019). Genotype-phenotype correlation and expansion of orodental anomalies in *LTBP3*-related disorders. *Molecular Genetics and Genomics*, 294(3), 773–787. <https://doi.org/10.1007/s00438-019-01547-x>
- Kantaputra, P., Guven, Y., Kalayci, T., Özer, P. K., Panyarak, W., Intachai, W., ... Ketudat Cairns, J. R. (2022). Expanding genotypic and phenotypic spectrums of *LTBP3* variants in dental anomalies and short stature syndrome. *Clinical Genetics*, 102(1), 66–71. <https://doi.org/10.1111/cpg.14134>
- Kaur, R., Siddiqui, I., Mathur, V., Jana, M., Kabra, M., & Gupta, N. (2020). Bi-allelic loss-of-function novel variants in *LTBP3*-related skeletal dysplasia: Report of first patient from India. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 182(8), 1944–1946. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61629>
- Kim, J.-W., Lee, S.-K., Lee, Z. H., Park, J.-C., Lee, K.-E., Lee, M.-H., ... Simmer, J. P. (2008). FAM83H mutations in families with autosomal-dominant hypocalcified amelogenesis imperfecta. *American Journal of Human Genetics*, 82(2), 489–494. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.09.020>
- Klopke, B., Maass, T., Meyer, E., Lehr, H. A., Metzger, D., Chambon, P., ... Blessing, M. (2007). TGF-beta superfamily signaling is essential for tooth and hair morphogenesis and differentiation. *European Journal of Cell Biology*, 86(11–12), 781–799. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2007.03.005>
- Koli, K., Ryyänen, M. J., & Keski-Oja, J. (2008). Latent TGF-beta binding proteins (*LTBP3*)-1 and -3 coordinate proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Bone*, 43(4), 679–688. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2008.06.016>
- Koriyouchi, M., Kang, J., Kim, Y. J., Seymen, F., Kasimoglu, Y., Lee, Z. H., ... Kim, J. W. (2018). Hypoplastic AI with highly variable expressivity caused by ENAM mutations. *Journal of Dental Research*, 97(9), 1064–1069. <https://doi.org/10.1177/0022034518763152>
- Nakata, M., Kimura, O., & Bixler, D. (1985). Interradicular dentin dysplasia associated with amelogenesis imperfecta. *Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology*, 60(2), 182–187. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(85\)90289-0](https://doi.org/10.1016/0030-4220(85)90289-0)
- Noor, A., Windpassinger, C., Vincu, I., Orlie, M., Arshad Rafiq, M., Khalid, M., ... Vincent, J. B. (2009). Oligodontia is caused by mutation in *LTBP3*, the gene encoding latent TGF-beta binding protein 3. *The American Journal of Human Genetics*, 84(4), 519–523. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.03.007>
- Penttinen, C., Sabarinen, J., Weikköläinen, K., Hyttiäinen, M., & Keski-Oja, J. (2002). Secretion of human latent TGF-beta-binding protein-3 (*LTBP-3*) is dependent on co-expression of TGF-beta. *Journal of Cell Science*, 115(Pt 17), 3457–3468.
- Robertson, I., Jensen, S., & Handford, P. (2011). TB domain proteins: Evolutionary insights into the multifaceted roles of fibrillin and *LTBP3*. *Biochemical Journal*, 433(2), 263–276. <https://doi.org/10.1042/BJ20101320>
- Su, C.-T., Jao, T.-M., Urban, Z., Huang, Y.-J., See, D. H. W., Tsai, Y.-C., ... Huang, J.-W. (2021). *LTBP4* affects renal fibrosis by influencing angiogenesis and altering mitochondrial structure. *Cell Death & Disease*, 12(10), 943. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04214-5>
- Todorovic, V., & Rifkin, D. B. (2012). *LTBP3*, more than just an escort service. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(2), 410–418. <https://doi.org/10.1002/jcb.23385>
- Verloes, A., Jamblin, P., Koulscher, L., & Bourguignon, J.-P. (1996). A new form of skeletal dysplasia with amelogenesis imperfecta and platyspondyly. *Clinical Genetics*, 49(1), 2–5. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.1996.tb04315.x>
- Witkop, C. J. (1988). Amelogenesis imperfecta, dentinogenesis imperfecta and dentin dysplasia revisited: Problems in classification. *Journal of Oral Pathology*, 17(9–10), 547–553. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.1988.tb01332.x>

**Titre:** Génétique des surdités héréditaires au sein de la population marocaine - Etude des gènes *MPZL2*, *CO4A3*, *MASP1* et *ELMOD2*

**Mots clés :** Surdité, population marocaine, *MPZL2*, *COL4A3*, *MASP1*, *ELMOD2*

**Résumé :** L'audition, le sens médié par l'oreille, si altéré abouti à une surdité de différent degré, affectant quelques 430 millions de personnes souffrant de surdité moyenne à sévère. Ce handicap neurosensoriel est causé par des facteurs environnementaux et des défauts génétiques. La recherche de nouveaux déterminants génétiques pathogènes responsables des surdités syndromiques et non syndromiques au sein de la population marocaine a été l'objectif principal de ces travaux de thèse permettant de mieux cerner son hétérogénéité. L'analyse génétique menée sur une famille atteinte d'une surdité non syndromique a révélé le variant c.72delA *MPZL2*. Pour les surdités syndromiques, nous avons identifié des variants pathogènes de *COL4A3* chez deux frères atteints du syndrome d'Alport et de *MASP1* chez un cas atteint du syndrome 3MC.

Nous avons aussi mis en évidence une mutation homozygote d'*ELMOD2*, codant une GAP impliquée dans la dynamique mitochondriale et la ciliogenèse, retrouvé pour la première fois chez deux patients avec surdité et troubles du spectre autistique. L'analyse du réseau mitochondrial du patient et de sa mère suggère une légère altération de la fusion du réseau mitochondrial. Nous avons confirmé que les variants *GJB2* restent responsables de la majeure partie des surdités non syndromiques récessives chez les patients marocains avec 36,8%, suivie de *LRTOMT* avec une fréquence de 8,63%. L'ensemble de ces résultats contribue à l'amélioration des connaissances sur les surdités héréditaires au Maroc, ainsi qu'à l'ouverture vers un meilleur diagnostic moléculaire et la possibilité de traitements par les thérapies géniques émergentes.

**Title :** Genetic of hereditary deafness in the moroccan population - Study of the genes *MPZL2*, *CO4A3*, *MASP1* and *ELMOD2*

**Keywords :** Deafness, moroccan population, *MPZL2*, *COL4A3*, *MASP1*, *ELMOD2*

**Abstract :** Hearing, mediated by the ear, if impaired results in deafness of varying degrees affecting some 430 million people with moderate to severe hearing loss. This neurosensory disability is caused by environmental factors and genetic defects. The search for new pathogenic genetic determinants responsible for syndromic and non-syndromic deafness in the Moroccan population was the main objective of this work, allowing a better understanding of its heterogeneity. Genetic analysis conducted on a family with non-syndromic deafness revealed the c.72delA variant of *MPZL2*. For syndromic deafness, we identified pathogenic variants in *COL4A3* in two brothers with the Alport syndrome, and in *MASP1* in an individual with the 3MC syndrome. We also identified

a homozygous variant in *ELMOD2*, encoding a GAP involved in mitochondrial dynamics and ciliogenesis, found for the first time in two patients with hearing loss and autism spectrum disorders. The analysis of the mitochondrial network of the patient and his healthy mother disclosed an alteration of the mitochondrial network fusion. We confirmed that *GJB2* variants remain responsible for most of the recessive non-syndromic deafness in Moroccan patients with 36,8% followed by *LRTOMT* variants, with a frequency of 8,63%. Together, these results contribute to the improvement of the knowledge on hereditary deafness in Morocco, as well as an improvement of the molecular diagnosis, opening novel opportunities to treat patients with emerging gene therapies.