

UNIVERSITÉ LAVAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À  
L'UNIVERSITÉ LAVAL  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN MÉDECINE EXPÉRIMENTALE  
VOLET GÉNÉTIQUE OFFERTE À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI  
EN VERTU D'UN PROTOCOLE D'ENTENTE

PAR  
FRANCE LEBEL

ÉVALUATION DE TROIS TESTS DE DÉPISTAGE DE PORTEURS ET  
RECHERCHE D'UN EFFET FONDATEUR DANS LA TYROSINÉMIE  
HÉRÉDITAIRE DE TYPE 1 AU SAGUENAY-LAC-ST-JEAN

JANVIER 1992

Droits réservés



### **Mise en garde/Advice**

Afin de rendre accessible au plus grand nombre le résultat des travaux de recherche menés par ses étudiants gradués et dans l'esprit des règles qui régissent le dépôt et la diffusion des mémoires et thèses produits dans cette Institution, **l'Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)** est fière de rendre accessible une version complète et gratuite de cette œuvre.

Motivated by a desire to make the results of its graduate students' research accessible to all, and in accordance with the rules governing the acceptance and diffusion of dissertations and theses in this Institution, the **Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)** is proud to make a complete version of this work available at no cost to the reader.

L'auteur conserve néanmoins la propriété du droit d'auteur qui protège ce mémoire ou cette thèse. Ni le mémoire ou la thèse ni des extraits substantiels de ceux-ci ne peuvent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

The author retains ownership of the copyright of this dissertation or thesis. Neither the dissertation or thesis, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

Ce mémoire a été réalisé à l'Université du Québec à Chicoutimi dans le cadre du programme de maîtrise en médecine expérimentale (génétique) extensionné de l'Université Laval à l'Université du Québec à Chicoutimi

## Résumé

La tyrosinémie héréditaire de type 1 est une maladie autosomale récessive qui affecte principalement le nouveau-né et l'enfant. Cette maladie est due à une déficience de l'enzyme fumarylacétoacétase principalement au foie, enzyme faisant partie du sentier de dégradation de la tyrosine. Cette maladie est fréquente au Québec et particulièrement dans la région du Saguenay-Lac-St-Jean. Le présent mémoire comporte deux parties. La première est la recherche d'un effet fondateur de la tyrosinémie par la reconstitution généalogique de 90 familles de porteurs obligatoires. La deuxième partie de l'étude consiste en l'évaluation de trois tests de dépistage de porteurs, deux tests s'effectuant sur les globules rouges et un sur les globules blancs. La reconstitution généalogique a permis d'identifier 30 individus communs (20 fondateurs et 10 ancêtres communs). L'évaluation des tests de dépistage a permis de mettre en évidence l'utilité du test sur les globules blancs dans le cadre d'un dépistage intra-familial afin de rassurer les individus et de diminuer le nombre d'amniocentèses dans la région du Saguenay-Lac-St-Jean.

-----  
France Lebel

-----  
Marc DeBraekeleer

## AVANT-PROPOS

Cette étude a été réalisée grâce à l'appui de plusieurs personnes auxquelles je tiens à exprimer toute ma gratitude. Mes remerciements s'adressent d'abord au Dr. Marc DeBraekeleer, mon directeur de recherche, qui fut présent à chacune des étapes de ce projet et qui avait toujours de judicieux conseils et de nombreux mots d'encouragement à m'offrir. Au cours de ma formation, j'ai également profité et surtout apprécié sa générosité, sa compréhension et sa grande disponibilité.

Je tiens à souligner la contribution très importante du Dr. Jean Larochelle et de Madame Claude Prévost à ce projet de recherche par la transmission à mon directeur de recherche de plusieurs données utilisées pour cette étude. Qu'ils trouvent ici l'expression de mon entière reconnaissance.

Je veux également remercier le Dr. André Grenier et le Dr. Bernard Grignon qui ont rendu possible la réalisation des trois tests de dépistage et

m'ont permis l'accès aux résultats par l'intermédiaire de mon directeur de recherche.

En terminant, je voudrais remercier sincèrement les membres de ma famille , ainsi que mon mari, pour leur support du début à la toute fin de la réalisation de ce projet.

Cette recherche a été réalisée en partie grâce à un travail d'étudiant gradué qui me fut accordé par une subvention du FCAR. Je tiens à remercier également cet organisme.

## TABLE DES MATIERES

	PAGE
Résumé.....	iii
Avant-propos.....	iv
Table des matières.....	vi
Liste des Figures.....	x
Liste des Tableaux.....	xi
Introduction.....	xii
 Chapitre 1: Revue de littérature et objectifs	
1.1 Historique.....	2
1.2 Clinique.....	3
1.3 Biochimie.....	4
1.4 Biologie moléculaire.....	6
1.5 Défaut métabolique.....	7
1.6 Pathologie.....	10

1.7 Diagnostic.....	10
1.8 Traitement.....	11
1.9 Pronostic.....	11
1.10 Dépistage.....	12
1.11 Génétique des populations.....	13
1.12 Effet fondateur.....	13
1.13 Objectifs de l'étude.....	14

## Chapitre 2 : Recherche d'un effet fondateur dans la tyrosinémie héréditaire de type 1 au Saguenay-Lac-St-Jean.

2.1 Matériel et méthodes.....	16
2.1.1 La région étudiée.....	16
2.1.2 Population à l'étude.....	17
2.1.3 Recherche d'un effet fondateur.....	17
2.2. Résultats.....	21
2.3 Discussion.....	23
2.3.1 Critique des sources et de la reconstitution généalogique.....	23
2.3.2 Origine de la tyrosinémie héréditaire de type 1.....	24



### Chapitre 3: Evaluation de trois tests de dépistage de porteurs de la tyrosinémie héréditaire de type 1 au Saguenay-Lac-St-Jean

3.1 Matériel et méthodes.....	29
3.1.1 Validation des tests de dépistages.....	30
3.2 Résultats.....	32
3.2.1 Figures de distribution.....	32
3.2.2 Moyennes et écart-types.....	33
3.2.3 Fiabilité du test sur globules blancs.....	33
3.2.4 Efficacité du test sur les globules blancs après congélation de certains aliquots.....	39
3.2.5 Sensibilité, spécificité et valeur prédictive du test sur les globules blancs.....	39
3.3 Discussion.....	42
3.3.1 Critique de la méthodologie.....	42
3.3.1.1 Critique du groupe contrôle.....	42
3.3.1.2 Critique des tests de dépistage.....	42

3.3.2 Discussion des tests de dépistage.....	43
3.3.2.1 Les tests sur les globules rouges et les spots.....	43
3.3.2.2 Le test sur les globules blancs.....	43
Conclusion.....	50
Bibliographie.....	53

## LISTE DES FIGURES

	PAGE
<b>Figure 1</b> : Sentier de dégradation de la tyrosine.....	8
<b>Figure 2</b> : Carte géographique représentant le Québec et la région du Saguenay-Lac-St-Jean.....	13
<b>Figure 3</b> : Distribution des résultats obtenus pour le test sur les globules blancs.....	34
<b>Figure 4</b> : Distribution des résultats obtenus pour le test sur les globules rouges.....	35
<b>Figure 5</b> : Distribution des résultats obtenus avec les spots.....	36

## LISTE DES TABLEAUX

### PAGE

<b>Tableau 1 :</b> Liste des fondateurs et des ancêtres communs aux 173 porteurs obligatoires de tyrosinémie héréditaire de type 1.....	22
<b>Tableau 2 :</b> Moyennes et écart-types des résultats obtenus par chacun des groupes aux trois tests.....	37
<b>Tableau 3 :</b> Résultats des tests faits en duplicata pour le test sur les globules blancs.....	38
<b>Tableau 4 :</b> Résultats des tests sur des échantillons congelés pour le test sur les globules blancs.....	40
<b>Tableau 5 :</b> Résultats comparés du test sur les globules blancs.....	41
<b>Tableau 6 :</b> Risque de tyrosinémie relié au risque d'être porteur.....	48

## INTRODUCTION

Il existe plusieurs maladies héréditaires récessives et dominantes au Québec et les régions de Charlevoix et du Saguenay-Lac-St-Jean sont particulièrement touchées. La tyrosinémie héréditaire de type 1, maladie autosomale récessive, en est une. Cette maladie affecte le nouveau-né et l'enfant et est due à la déficience d'un enzyme du sentier de dégradation de la tyrosine principalement au foie, la fumarylacétoacétate hydrolase. Ces enfants présentent une cirrhose hépatique et des crises neurologiques. Malgré une approche thérapeutique agressive dès le diagnostic, 50% de ces enfants décèdent avant l'âge de 5 ans et peu atteignent l'âge de 10 ans. De plus, le seul traitement valable demeure la transplantation hépatique et éventuellement rénale.

Actuellement, aucun test de dépistage des hétérozygotes n'est disponible et une proportion importante de personnes à risque ne peut être identifiée. La gravité des conséquences pour les enfants atteints ainsi que

leurs parents ont motivé la réalisation de cette étude afin de mieux comprendre la présence de la maladie et un taux de porteurs de 1/22 au Saguenay-Lac-St-Jean. De plus, cette recherche évalue des tests existants de dépistage de porteurs afin de rassurer les individus et diminuer le nombre d'amniocentèses avec tous les risques que ces interventions comportent.

Ce mémoire comprend donc deux orientations de recherche. Le premier volet (généalogique) consiste en la recherche d'un effet fondateur par la reconstitution généalogique de 90 familles de porteurs obligatoires de la tyrosinémie héréditaire de type 1 du Saguenay-Lac-St-Jean. L'analyse d'un tel effet fondateur permet de mieux saisir la dynamique de cette maladie par rapport à sa grande fréquence et au taux de porteurs obtenu pour cette région.

Le deuxième volet concerne l'évaluation de trois tests de dépistage de porteurs de la tyrosinémie. Deux de ces tests se font sur les globules rouges, le premier étant la méthode des spots sur papier buvard et le deuxième un dosage radio-immunologique. Le troisième test est effectué sur les globules blancs et consiste en un dosage enzymatique de la présence de l'enzyme déficient.

L'analyse de tous ces résultats permettra de répondre à certaines interrogations sur la maladie elle-même et d'évaluer la possibilité d'instaurer un test de dépistage de porteurs.

Cette étude s'inscrit donc dans le cadre des travaux de SOREP (Centre interuniversitaire de recherches sur les populations) qui s'est donné pour

objectif de mieux comprendre la problématique des maladies héréditaires au Saguenay-Lac-St-Jean.

Elle s'inscrit également comme exigence au programme de maîtrise expérimentale (volet génétique humaine) de l'Université Laval.

# **Chapitre 1**

**Revue de littérature et objectifs**



La tyrosinémie héréditaire de type 1 est une maladie autosomale récessive affectant le nouveau-né et l'enfant (Gentz et al.,1965; Laberge et Dallaire, 1967; Larochelle et al., 1967). Cette maladie est due à une déficience en un enzyme du sentier de dégradation de la tyrosine, la fumarylacétoacétate hydrolase (FAAH) (Lindblad et al.,1977). Les principales conséquences de ce défaut métabolique sont une cirrhose hépatique, des problèmes rénaux et des crises neurologiques (Larochelle et al.,1967; Goldsmith et Laberge,1989; Mitchell et al.,1990). Il existe également un type 2 de la maladie qui consiste dans une manifestation chronique apparaissant à l'âge adulte et résultant d'une déficience en un autre enzyme de la voie métabolique de la tyrosine (Goldsmith et Laberge, 1989 ).

### **1.1 Historique**

Au début des années 1960, un groupe de médecins de la région de Chicoutimi au Québec ont rapporté une augmentation du nombre de cirrhoses hépatiques infantiles létales dans cette région. En 1967, quelques uns de ces cas furent attribués à la tyrosinémie héréditaire de type 1 (Scriver et al.,1967; Larochelle et al.,1967). Cette maladie avait également été décrite en Scandinavie (Zetterstrom,1963; Vestermark et al,1964; Gentz et al.,1965; Halvorsen et al.,1966).

## 1.2 Clinique

On connaît deux formes à la tyrosinémie héréditaire de type 1. La première est une atteinte aiguë au foie dans la petite enfance. La deuxième, appelée "Baber's syndrome" (Scriber et al.,1967) apparaît chez les survivants de l'atteinte aiguë au foie et est caractérisée par une atteinte hépatique chronique et un dysfonctionnement rénal (Laberge,1969).

Les formes aiguë et chronique de cette maladie peuvent apparaître dans une même famille (Goldsmith et Laberge,1989). Dans la forme aiguë, dès les premières semaines ou mois de vie , on observe une incapacité du sujet à se développer normalement, des vomissements, une diarrhée et une odeur de choux. L'hépatomégalie, la fièvre, l'oedème, le melen et l'epistaxis sont aussi fréquemment observés. Des crises abdominales et une polyneuropathie sont aussi observées dans la forme aiguë. Sans traitement, le sujet décède de cirrhose hépatique en 6 à 8 mois (Goldsmith et Laberge,1989; Larochelle, 1988).

La forme chronique de la maladie présente des particularités similaires mais amoindries de la forme aiguë. Elle se caractérise par une atteinte chronique au foie , un dysfonctionnement tubulaire rénal (syndrome de Fanconi) et du rachitisme avec hypophosphatémie. La mort survient habituellement au cours de la première décade (Goldsmith et Laberge,1989).

Tous ces symptômes avaient été rapportés par Larochelle et al. dans leur expérience sur 37 enfants atteints de tyrosinémie héréditaire de type 1 en 1967.

De nos jours, on reconnaît des épisodes récurrents de crises neurologiques chez certains patients hospitalisés. Ces crises ont été observées chez 42% des enfants admis à l'Hôpital Ste-Justine de Montréal et surtout chez les enfants originaires d'autres régions que le Saguenay-Lac-St-Jean. Ces états de crise intense de la maladie sont rares et semblent être attribuables à une perte de contrôle de l'état stable de la maladie. Ils consistent dans une faiblesse musculaire (29%), une extension hypertonique (75%), des vomissements, un ileus paralytique (69%) et des douleurs intenses amenant même de l'automutilation (8%) (Mitchell et al.,1990). Une complication tardive est l'apparition d'un hépatocarcinome chez 37% des patients (Goldsmith et Laberge,1989; Van Spronsen et al.,1989).

### **1.3 Biochimie**

En 1967, LaDu a démontré une déficience de l'acide para-hydroxyphenylpyruvique oxidase dans le foie de certains patients atteints de tyrosinémie héréditaire de type 1 (Laberge,1968). On a longtemps attribué à cet enzyme les conséquences et symptômes de la maladie.

La tyrosinémie héréditaire de type 1 est le résultat d'un défaut du métabolisme de la tyrosine. Un blocage enzymatique au niveau de la fumarylacétacétate hydrolase (FAAH) entraîne la production de

succinylacétone (SA) et de succinylacétoacétate (SAA) qui sont des métabolites retrouvés dans l'urine des personnes atteintes (Kvittingen et al.,1985; Berger ,1987). La démonstration de ce blocage enzymatique a été faite par Lindblad et ses collaborateurs en 1977.

En 1983, Kvittingen et ses collaborateurs ont mesuré l'activité de la fumarylacétoacétate hydrolase (FAAH) dans les lymphocytes isolés du sang. Leur étude a démontré une absence d'activité de la FAAH chez les sujets atteints de la tyrosinémie héréditaire de type 1 et une activité intermédiaire chez les porteurs obligatoires. Ceci était en conformité avec le mode de transmission autosomal récessif attribué à la maladie (Laberge et Dallaire,1967). Les expériences menées par Kvittingen l'ont amené à tester une méthode de dosage enzymatique permettant de mesurer l'activité de la FAAH.

Cette méthode consiste à mesurer au spectrophotomètre la disparition du substrat, l'acide fumarylacétoacétique, à une longueur d'onde de 330nm et à une température de 37c, avec un coefficient d'extinction molaire de 13,500. La concentration du substrat est exprimée en fonction de la quantité de protéines déterminées par la méthode de Lowry. Enfin, l'activité enzymatique est donnée en micromoles de substrat utilisé par minute et par gramme de protéine.

Cette méthode de dosage enzymatique fut adaptée puis utilisée par le laboratoire de génétique médicale de l'hôpital Ste-Justine au cours des années1983 à 1987. L'enzyme fut dosé selon cette méthode chez quatre sujets atteints, douze porteurs obligatoires (parents d'enfants atteints) et trente-quatre sujets normaux. La distinction entre le groupe contrôle et le groupe porteurs ne fut cependant pas nette.

Les résultats de ces travaux n'ont pas permis de conclure que la mesure de l'activité de la FAAH dans les lymphocytes représentait une méthode fiable d'identification des porteurs de la tyrosinémie. En fait, la technique n'était pas totalement au point, ce qui amenait des problèmes. Il apparaissait donc essentiel d'effectuer une étude de la mesure de l'activité de la FAAH dans les lymphocytes de sujets sains et de porteurs obligatoires dans le but d'établir la fiabilité de cette méthode.

Une méthode radio-immunologique consistant à doser la présence de la protéine FAAH dans les érythrocytes fut mise au point par les chercheurs du Centre Hospitalier de l'Université Laval à Ste-Foy. Ce dosage s'effectue en faisant réagir les extraits érythrocytaires contre des anticorps obtenus de lapins sensibilisés à la FAAH purifiée à partir de foie de boeuf.

#### **1.4 Biologie moléculaire**

Une équipe de chercheurs du Centre Hospitalier de l'Université Laval a récemment isolé et localisé le gène de l'enzyme déficient sur le bras long du chromosome 15, plus précisément entre les bandes 15q23 et 15q25 (Bérubé et al., 1989). Cette localisation fut faite par hybridation "*in situ*" sur les chromosomes à l'aide d'une sonde radioactive fabriquée à partir de l'ARNm de la protéine fumarylacétoacétate hydrolase. La prochaine étape de leur recherche est la détermination de la(des) mutation(s) responsable(s) de la tyrosinémie héréditaire de type 1.

## 1.5 Défaut métabolique

La tyrosine, sans être un acide aminé essentiel, est un constituant de plusieurs protéines de l'alimentation. Son métabolisme se fait au niveau du foie, où l'on retrouve de la tyrosine provenant de la digestion de protéines ingérées et venant aussi du catabolisme de protéines endogènes (Laberge et al., 1981). Ce sentier métabolique est également celui de la phénylalanine, qui est un acide aminé essentiel transformé enzymatiquement en tyrosine au niveau du foie.

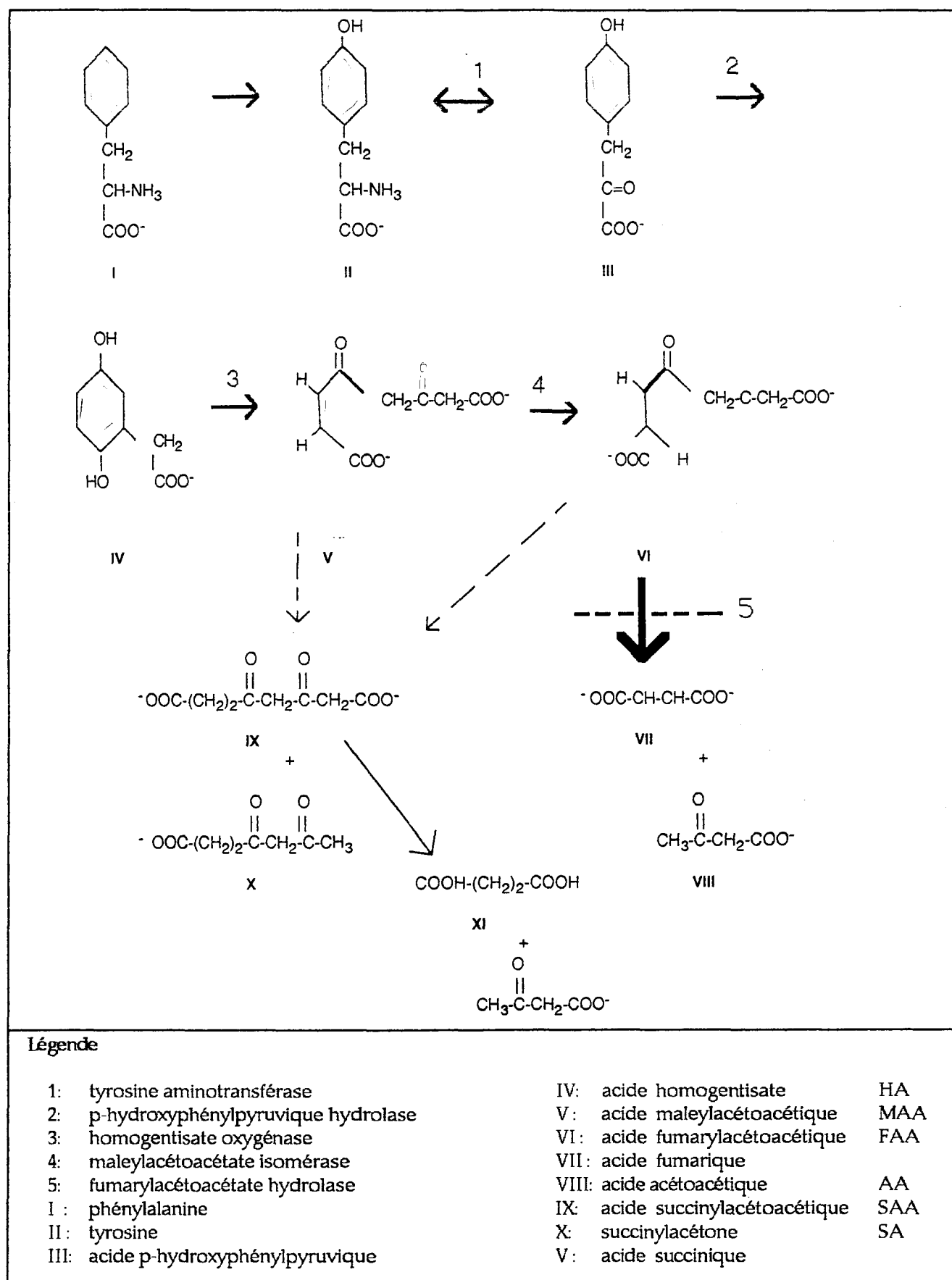
La figure 1 montre le principal sentier catabolique de la tyrosine. Ce sentier est celui de la dégradation enzymatique en 5 étapes de la tyrosine pour donner du fumarate et de l'acétoacétate. Ce sentier est donc glycogénique et cétogénique ( Laberge et al., 1981).

### Etape 1

La tyrosine aminotransférase (1) est un enzyme réversible et inductible, par l'AMP cyclique et les stéroïdes. Elle requiert de la vitamine B6 et son produit de réaction avec la tyrosine est l'acide para-hydroxyphényl-pyruvique (pHPP).

### Etape 2

La pHPP hydroxylase (2) contrôle une réaction complexe, impliquant un changement de chaîne sur le noyau benzène et n'est pas réversible chez l'Homme. La vitamine C est nécessaire comme agent redox et stabilise l'enzyme. Ceci empêche son auto-inhibition par le substrat pHPP. On retrouve une déficience relative de cette enzyme dans la tyrosinémie héréditaire mais elle ne constitue pas la déficience primaire de la maladie.



**Figure 1 : Sentier de la dégradation de la tyrosine**

### **Etape 3**

L'homogentisate oxydase (3) brise le noyau benzène de l'acide homogentisique et requiert la présence de glutathion réduit (GSH) et de vitamine C. Cette étape est irréversible et produit l'acide maléylacétoacétique (MAA).

### **Etape 4**

La maléylacétoacétate isomérase (4) nécessite du GSH comme co-facteur essentiel et produit de l'acide fumarylacétoacétate (FAA). Cette étape est également irréversible.

### **Etape 5**

L'acide fumarylacétoacétique est transformé finalement en fumarate (FA) qui s'intègre au cycle de Krebs mitochondrial et en acétoacétate par la fumarylacétoacétate hydrolase qui dégrade aussi l'acide succinylacétoacétique (SAA) en succinate et en acétoacétate. Son activité est grandement réduite dans la tyrosinémie héréditaire avec des activités résiduelles allant jusqu'à 5%.



## 1.6 Pathologie

La tyrosinémie héréditaire de type 1 est donc causée par une déficience en FAAH . Cette déficience provoque l'accumulation, dans le foie, de différents acides aminés ( phénylalanine, tyrosine et méthionine) ainsi que des produits de dégradation du sentier métabolique. Ces accumulations sont responsables des problèmes hépatiques et rénaux caractéristiques de la maladie comme le syndrome de Fanconi (Laberge,1968).

Il y a également aminoacidurie et excrétion de succinylacétone et succinylacétate dans l'urine. Le succinylacétone est une substance qui est toxique pour le parenchyme hépatique et rénal.

## 1.7 Diagnostic

Depuis plus de vingt ans, le Réseau de Médecine Génétique du Québec s'est vu confier par le Ministère des Affaires Sociales le mandat d'identifier, de traiter et de prévenir les maladies métaboliques héréditaires au Québec. Le diagnostic prénatal s'insère dans le programme du Réseau de Médecine Génétique qui assure également le dépistage des maladies métaboliques chez le nouveau-né.

C'est dans ce cadre que les enfants atteints de tyrosinémie héréditaire de type 1 sont diagnostiqués dès la naissance par détection dans le sang de l'enzyme fumarylacétoacétate hydrolase ( Grenier et al.,1982; Goldsmith et Laberge,1989).

## **1.8 Traitement**

Dès qu'ils sont diagnostiqués, les enfants atteints de la maladie sont soumis à une diète stricte faible en protéines contenant les acides aminés tyrosine et phénylalanine. Cette diète demande l'utilisation d'un lait spécial pour les nourissons (Laroche et al.,1967). Les enfants plus âgés voient leur nourriture pesée à chaque repas pour contrôler les grammes de protéines ingérées.

Le seul traitement existant demeure la transplantation hépatique et éventuellement rénale (Van Spronsen et al.,1989) . La transplantation est réalisée en fonction du degré de dégradation du foie. La vitesse de dégradation du foie étant très variable d'un enfant à l'autre, dans un cas la transplantation peut s'avérer nécessaire vers 20 mois de vie et dans un autre elle ne peut être nécessaire que vers une dizaine d'années.

## **1.9 Pronostic**

Le pronostic des enfants atteints de la tyrosinémie héréditaire de type 1 est très sombre. Malgré une approche thérapeutique agressive, 50% de ces enfants décèdent avant l'âge de 5 ans et peu d'entre eux atteignent l'âge de 10 ans ( Laroche, 1988).

## **1.10 Diagnostic prénatal**

Il existe un diagnostic prénatal pour la tyrosinémie héréditaire de type 1 qui consiste à déterminer la présence de succinylacétone dans le liquide amniotique prélevé entre la 13 ème et la 16 ème semaine de grossesse. Le

succinylacétone est dosé dans le liquide amniotique, sa présence indiquant que le foetus est atteint de la maladie (Gagné et al., 1982). Cependant ce test n'est offert qu'aux personnes à haut risque de transmettre la maladie, c'est-à-dire les couples ayant déjà un enfant atteint et ceux présentant une histoire familiale de tyrosinémie héréditaire de type 1.

Actuellement, aucun test de dépistage des hétérozygotes n'est disponible et une proportion importante de personnes à risque ne peut être identifiée. La gravité des conséquences pour les enfants atteints ainsi que leurs parents montre bien l'urgence d'avoir un test de dépistage de porteurs afin de diminuer le nombre de naissances de ces enfants, en offrant aux couples porteurs le test de dépistage prénatal dès la première grossesse. Un test de dépistage de porteurs permettrait aussi de donner la possibilité aux couples qui le désirent de connaître leur situation et de profiter du conseil génétique. Enfin, cela permettrait de diminuer le nombre d'amniocentèses qui comportent des risques pour la mère et le foetus.

### **1.11 Génétique des populations**

La tyrosinémie héréditaire de type 1 a une prévalence à la naissance élevée au Québec (1/14800) (Grenier et al., 1982) et plus particulièrement dans la région du Saguenay-Lac-St-Jean (figure 2). Elle est rarement rencontrée ailleurs dans le monde, par exemple en Suède (1/120000) ou en Norvège (1/100000) (Goldsmith et Laberge, 1989). Au Saguenay-Lac-St-Jean, cette maladie a une prévalence à la naissance de 1/1845 et le taux de porteurs est estimé selon la loi d'Hardy-Weinberg à 1/22 (DeBraekeleer et Larochelle, 1990). Les taux de prévalence à la naissance et de porteurs avaient

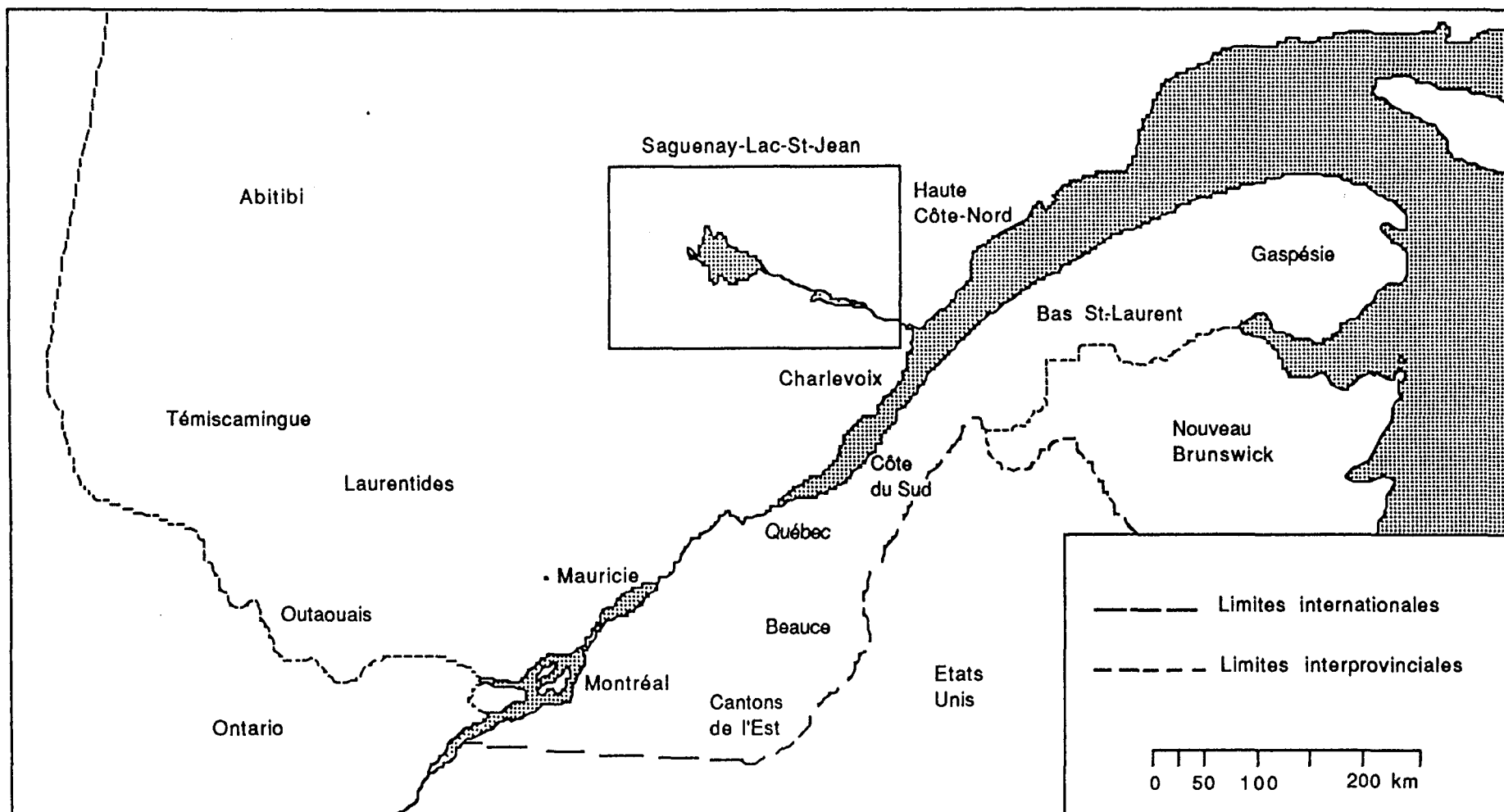


Figure 2 : Carte géographique représentant le Québec et la région du Saguenay-Lac-St-Jean

déjà été calculés par Laberge et Dallaire (1987), par Bergeron et al. (1974) et par Bouchard et al. (1984).

### **1.12 Effet fondateur**

L'effet fondateur est un concept qui se définit comme étant un phénomène migratoire en vertu duquel un groupe d'immigrants en provenance d'une population mère s'établit dans un territoire inoccupé où il se reproduit et donne naissance à une nouvelle population (Mayer, 1974; Bouchard et De Braekeleer, 1991). Etant donné que le gène de la tyrosinémie est très rare en dehors du Québec, un effet fondateur a été postulé pour expliquer sa fréquence élevée au Saguenay-Lac-St-Jean (Laberge, 1969; De Braekeleer, 1991a).

### **1.13 Objectifs de l'étude**

- Evaluation et validation de trois tests de dépistage de porteurs par une analyse statistique.
- Recherche d'un effet fondateur à partir de 90 familles atteintes de tyrosinémie héréditaire de type 1 au Saguenay-Lac-St-Jean .

## **Chapitre 2**

**Recherche d'un effet fondateur dans la tyrosinémie héréditaire de type 1 au Saguenay-Lac-St-Jean.**

## **2.1 Matériel et méthodes**

### **2.1.1 La région étudiée**

Située au nord-est de la ville de Québec, la région du Saguenay-Lac-St-Jean fut ouverte au peuplement blanc en 1838 ( figure 2 ). C'est de la région de Charlevoix, située sur la rive nord du fleuve St-Laurent à l'est de Québec, que provenaient près de 75% des immigrants entre les années 1838 et 1871. Cette proportion d'immigrants d'une seule région expliquerait la grande ressemblance génétique entre le Saguenay-Lac-St-Jean et la région de Charlevoix ( Bouchard et al.,1988; Gauvreau et Bourque, 1988).

A partir de 1871, mais surtout après 1911, l'immigration se diversifie de façon considérable. Les immigrants provenaient des autres régions de l'est du Québec, de la région de Québec, et des autres régions de la province (Gauvreau et Bourque,1988).

La population de cette jeune région augmenta très rapidement par accroissement naturel, passant de 5 000 habitants dans la première décennie à près de 50 000 en 1911 et à 285 000 de nos jours et cela malgré un solde migratoire négatif dès 1870 ( Bouchard et al.,1988)

Le bassin génétique de la population du Saguenay-Lac-St-Jean fut constitué par une immigration de type familial provenant, au départ, en grande partie de la région de Charlevoix, un accroissement très rapide de la population et d'autres facteurs tels que le choix du conjoint, la fécondité très élevée et également l'enracinement des individus.

Ces éléments ont contribué de façon plus ou moins importante à des incidences très élevées de plusieurs maladies autosomales dominantes et récessives (DeBraekeleer, 1991b).

### **2.1.2 Population à l'étude**

Pour cette recherche, les 90 couples porteurs obligatoires de tyrosinémie originaire du Saguenay-Lac-St-Jean ont servi de point de départ.

### **2.1.3 Recherche d'un effet fondateur**

La recherche d'un effet fondateur se fit par reconstitution généalogique de 90 familles dans lesquelles la tyrosinémie héréditaire de type 1 s'était manifestée depuis 1960.

Cette reconstitution se fit en deux étapes à partir des informations données par les familles, de façon automatique grâce au fichier de population informatisé de SOREP qui retrace les individus à partir de l'ouverture de la région du Saguenay-Lac-St-Jean c'est-à-dire vers 1838 jusqu'en 1986 . Ce fichier fut développé dans le cadre du projet BALSAC. La reconstitution fut ensuite complétée de façon manuelle à l'aide de plusieurs sources (DeBraekeleer,1991c):

1. répertoires de mariage publiés, qui sont de deux types: les livres qui donnent une liste des mariages célébrés dans une ou plusieurs paroisses avec les noms des père et mère des conjoints ainsi que la date de mariage.



(ex. : Basse Côte Nord, Rimouski), et les recueils de mariages de toute une région avec les liens généalogiques déjà reconstruits (par exemple : Charlevoix-Saguenay, Beauce-Dorchester-Frontenac).

2. fichier Loiseleur: sur micro-fiches contenant plus de 410 000 mariages à travers le Québec et même quelques uns de l'Ontario, du Nouveau-Brunswick et des Etats-Unis d'Amérique.

3. fichier Jetté : contenant 140 000 mariages célébrés au Québec depuis les origines de la Nouvelle-France jusqu'en 1825.

4. dictionnaires généalogiques, ex.: Dictionnaire généalogique des familles canadiennes de Jetté, Dictionnaire généalogique des familles canadienne de Tanguay.

Une fois la reconstitution généalogique terminée , les données ont été entrées dans la base de données généalogiques BELGE (DeBraekeleer 1991c). Le programme BELGE fut développé spécifiquement pour bâtir des généalogies: il sert à entrer les données généalogiques selon un format déterminé et sert aussi à jumeler les données de façon interactive. Les jumelages sont effectués sur des couples en utilisant les éléments nominatifs, ces données nominatives ayant été phonétisées par le programme FONEM. Ce dernier programme permet d'éliminer les variations orthographiques les plus superficielles avant les opérations de jumelage.

Deux autres programmes ont aussi été écrits afin de remédier à certains problèmes qui pourraient survenir au niveau du fichier BELGE ou encore au niveau des fichiers de tri qui sont nécessaires pour le jumelage des données;

ce sont le programme BELGE\_TIRET\_INDEX.FOR et le programme CREE\_TRI\_BELGE.FOR (DeBraekeleer 1991c).

L'étape suivante consiste à valider les données. Cette validation n'a pas pour but de vérifier la qualité de la reconstitution généalogique mais elle sert à vérifier s'il n'y a pas eu d'erreurs ni d'oublis lors de l'entrée des données. Elle sert aussi à vérifier s'il n'y a pas eu de sous-jumelage. La validation se fait en quatre étapes, à l'aide de quatre programmes différents (DeBraekeleer 1991c):

1. BELGE\_COUPLE\_VALID: ce programme permet de vérifier que tous les couples sont complets.
2. FLOTTANT: ce programme permet de s'assurer qu'aucune génération n'a été oubliée lors de l'entrée des données généalogiques dans le fichier BELGE.
3. JUM\_MAN\_CONTINU et JUM\_MAN: ces deux derniers programmes permettent de récupérer des jumelages qui auraient été oubliés ou qui n'auraient pas été présentés lors de la phase de jumelage interactif de l'entrée des données. La différence entre les deux programmes vient du fait que JUM\_MAN est une opération interactive tout comme la phase de jumelage lors de l'entrée des données, alors que JUM\_MAM\_CONTINU se fait en batch.
4. EXTRAIT\_BELGE: ce programme a une fonction de validation qui est d'extraire les généalogies du fichier BELGE. Il rend plus facile l'identification des fondateurs dans le fichier.

L'étape finale est l'étape d'analyse des données généalogiques. Celle-ci se fait en ayant recours à plusieurs commandes et programmes. Certains programmes servent aussi de passerelle pour l'utilisation des données par

d'autres programmes. Ces programmes, au nombre de cinq (5) sont les suivants (DeBraekeleer 1991c):

1. EXTRAIT\_BELGE: ce programme sert de passerelle pour l'ensemble de programmes PEDPACK développé par Thomas et Thompson à l'Université de Washington à Seattle. Cet ensemble permet de calculer les coefficients de consanguinité, de parenté et de relation en plus de tracer les graphiques de noeuds de mariage, ce qui est une autre façon de représenter des généalogies.

2. TRACE\_BELGE: cette commande est une passerelle qui permet d'extraire des généalogies de BELGE, de les formater et de les transférer sur un Macintosh où elles peuvent être tracées grâce à l'ensemble PEDIGREE DRAW développé à la Southwest Foundation for Biomedical Research à San Antonio, Texas. Cette commande comprend deux programmes, TRACE\_BELGE.FOR et TRACE2\_BELGE.FOR dont les rôles sont respectivement d'extraire les généalogies et de formater le nouveau fichier afin de la rendre compatible avec le format de l'ensemble PEDIGREE DRAW.

3. MEDIC4\_BELGE: cette commande contient plusieurs commandes et programmes dont la principale est MEDIC4 qui permet d'extraire les généalogies du fichier BELGE et à calculer les coefficients de consanguinité et de parenté.

4. PED\_BELGE: ce programme permet d'extraire les ancêtres communs à deux individus ou plus dans une population tirée du fichier BELGE.

5. PED\_DESC: ce programme permet, à partir des fichiers d'individus et de fondateurs (créés par PED\_BELGE), de créer la descendance d'un fondateur

donné et ainsi de déterminer le chemin le plus probable qu'a suivi le gène ou (le caractère) dans la population étudiée.

## **2.2 Résultats**

La recherche a porté sur les 90 couples identifiés à ce jour au Saguenay-Lac-St-Jean parce qu'ils avaient eu au moins un enfant atteint de tyrosinémie héréditaire de type 1. Cependant, les données de certaines familles étaient insuffisantes pour commencer la reconstitution généalogique. C'est pourquoi des 180 porteurs obligatoires connus, seules les généalogies de 173 individus ont été faites. On a identifié les individus ancêtres communs à toutes les familles. Les résultats sont présentés au tableau 1; on y retrouve 30 individus. De ces 30 individus, 20 sont dits fondateurs parce que ce sont des individus nés à l'extérieur du Québec et 10 sont des ancêtres communs qui sont définis comme étant des individus nés au Québec.

Tableau 1 : Liste des fondateurs et des ancêtres communs aux 173 porteurs  
obligatoires de tyrosinémie héréditaire de type 1

#	Nom	Paroisse de mariage	Date	Lieu de naissance	Date	Fondateur / Ancêtre
1	G.J. I	BSP	1709	CR	28-11-1685	A
2	T.M.	BSP	1709	BSP	19-07-1688	A
3	G.J. II	CR	1670	Québec	05-02-1648	A
4	D.M.	CR	1670	Québec	27-12-1655	A
5	T.P. I	AG	1685	Québec	12-08-1660	A
6	R.M. I	AG	1685	CR	25-11-1669	A
7	S.N.	CR	1661	Angoumois		F
8	R.M. II	CR	1661	Québec	25-07-1646	A
9	J.D.	CR	1662	Maine		F
10	C.C.	CR	1662	Québec	24-11-1649	A
11	G.J. III	BP	1640	Perche		F
12	C.M. I	BP	1640	Normandie		F
13	D.R.	Québec	1649	Perche		F
14	C.M. II	Québec	1649	Brie		F
15	T.P. II	Québec	1657	Perche		F
16	A.O.	Québec	1657	Aunis		F
17	R.N.	BP	1667	Perche	1635	F
18	P.M.	BP	1667	Québec	03-08-1653	A
19	B.C.	Québec	1654	Maine		F
20	G.L.	Québec	1654	Perche	1642	F
21	R.E.	Québec	1638	Normandie		F
22	M.M.	Québec	1638	Québec	04-01-1624	A
23	F.J.	Québec	1652	Maine		F
24	G.G.	Québec	1652	Paris		F
25	C.R.	Québec	1637	O.I.		F
26	C.M. III	Québec	1637	Normandie		F
27	P.P.	Perche	1632	Perche		F
28	G.B.	Perche	1632	Perche	1617	F
29	M.A.	France	1620	O.I.		F
30	L.M.	France	1620	O.I.		F

AG= Ange-Gardien; BP= Beauré; BSP= Baie-St-Paul; CR= Château-Richer;  
O.I.= origine inconnue

## **2.3 Discussion**

### **2.3.1 Critique des sources et de la reconstitution généalogique**

Entre le mariage de deux personnes et la reconstitution généalogique réalisée dans le cadre d'une recherche ou dans le cadre du programme BELGE, il y a plusieurs étapes qui peuvent toutes être sources d'erreurs. La première étape est la transcription dans l'acte de mariage par le prêtre de l'information orale qui lui est donnée. Cette transcription peut amener des erreurs de compréhension et d'interprétation.

Ensuite, le dépouilleur de cet acte peut avoir de la difficulté à comprendre l'écriture du prêtre ou encore, l'état de conservation du registre paroissial est tel que sa lecture en est rendue très difficile (DeBraekeleer, 1991c).

Des erreurs peuvent aussi se produire aux étapes de transcription des registres, de préparation du manuscrit et de dactylographie du répertoire qui sera publié. De plus, s'il s'agit de répertoires dans lesquels les liens généalogiques ont été reconstitués, il peut y avoir eu des erreurs de jumelage en plus des erreurs de transcription (DeBraekeleer, 1991c).

De nouveau, de nombreuses étapes sont nécessaires entre la lecture de la source utilisée et l'enregistrement définitif dans le programme BELGE. Ces erreurs peuvent en être de transcription de la source utilisée ou avoir lieu lors de l'entrée des données ou encore survenir lors du jumelage interactif.

En effet, dans certains cas, il est à peu près impossible de décider d'entre deux couples lequel est le bon. Plusieurs cas d'homonymie des quatre

éléments nominatifs ont été ainsi détectés alors que dans d'autres cas les variations sont minimales et amènent la confusion (DeBraekeleer, 1991c).

On doit aussi ajouter les cas de non paternité et d'adoption qui représentent des problèmes majeurs lors de la reconstitution généalogique. Il en est de même des cas d'insémination artificielle (DeBraekeleer, 1991c).

Étant donné tous ces problèmes qu'il est possible de rencontrer, il faut prendre les résultats avec une certaine réserve et être prudent lors de l'interprétation.

### **2.3.2 Origine de la tyrosinémie héréditaire de type 1**

Comme il est souligné à la section résultats du présent chapitre, les généalogies de sept porteurs obligatoires n'ont pu être faites à cause d'un manque d'information. Il est donc impossible de savoir si ses individus sont porteurs de la même mutation ou d'une mutation différente de la maladie que les 173 autres porteurs obligatoires.

A partir des 173 généalogies reconstituées, 30 individus communs ont pu être identifiés; parmi eux, dix sont nés au Québec et les autres venaient tous de France. Il est donc possible que la mutation de tyrosinémie héréditaire de type 1 présente au Saguenay-Lac-St-Jean se soit produite au Québec. Dans le cas où la mutation aurait été amenée de la France, une telle mutation pourrait encore être retrouvée dans ce pays.

On peut alors se demander si on est en présence d'une ou de plusieurs mutations de tyrosinémie héréditaire de type 1 au Saguenay-Lac-St-Jean.

Dans leur article intitulé "Neurologic crises in hereditary tyrosinemia" Mitchell et al. (1990) décrivent des crises neurologiques apparues chez des enfants atteints de tyrosinémie et ayant été hospitalisés depuis 1970. De 48 enfants atteints, 20 (42%) ont vécu de telles crises qui apparaissent vers l'âge d'un an, pour un total de 108 admissions à l'hôpital. Ces crises neurologiques sont caractérisées par une douleur intense avec hypertonie périphérique (75%), des vomissements ou ileus paralytique (69%), de la faiblesse musculaire (29%) et même de l'auto-mutilation (8%) (Mitchell et al.,1990). De ces 20 enfants 14 sont décédés à la suite de telles crises et les survivants ont récupéré. Aucun marqueur biochimique n'a été trouvé relié à ces crises neurologiques. Mitchell et al. ont conclu que les épisodes de crises neurologiques étaient caractéristiques de la tyrosinémie héréditaire de type 1 sans se produire chez tous les enfants atteints. Des facteurs environnementaux et des gènes autres que celui de la fumarylacétoacétate hydrolase peuvent être nécessaires pour permettre le phénotype des crises neurologiques (Mitchell et al.,1990).

On est donc en présence d'un phénomène de crises présentes chez certains enfants atteints de tyrosinémie et absentes chez d'autres. Il semble y avoir deux formes à la maladie, soient une forme aiguë et une forme chronique. Ces deux formes d'expression de la maladie peuvent être attribuées à des expressions différentes d'une même mutation du gène de la FAAH, ce qui expliquerait la variabilité dans la sévérité de l'atteinte de la maladie. Cependant, on ne peut pas exclure la possibilité que de tels épisodes de crises neurologiques chez les enfants atteints de tyrosinémie héréditaire de type 1 soient dus à une mutation différente du gène de la fumarylacétoacétate hydrolase. Il y aurait alors une mutation pour chacune des formes de la maladie.



Après avoir démontré l'absence de la FAAH dans les tissus de patients atteints de la forme aiguë de la maladie et une activité résiduelle chez les atteints chroniques, des analyses de biologie moléculaire pour identifier le gène de la FAAH chez l'humain ont été faites et l'expression de la FAAH dans le foie fut analysée de différentes façons dont par les ARN messagers. Parmi les différents échantillons testés, qui viennent en majeure partie du Saguenay-Lac-St-Jean, on a pu constituer trois groupes basés sur les ARNm. En effet, dans certains cas une quantité normale d'ARNm est présente, chez d'autres on retrouve une quantité réduite d'ARNm et enfin chez d'autres on ne retrouve aucun ARNm (Tanguay et al., 1990a,b). De tels résultats suggèrent que la tyrosinémie est une maladie avec une certaine hétérogénéité moléculaire. Ces études biochimiques montrent qu'il est possible que l'on soit en présence de plus d'une mutation de la FAAH dans la tyrosinémie.

Si l'hypothèse de la présence de plus d'une mutation se révèle exacte, il faudrait reprendre la recherche de l'effet fondateur en considérant les différentes mutations.

Les 20 fondateurs que l'on a identifiés ont eu une forte contribution à la population canadienne-française. Cette forte contribution nous amène à deux conclusions. La première est que l'on est en présence d'un facteur confondant, c'est-à-dire que les individus que l'on identifie comme fondateurs le sont parce qu'ils ont eu un grand nombre de descendants et non pas parce qu'ils ont un lien avec la tyrosinémie. La deuxième est que étant donné que plus un individu a de descendants plus il a de chance que ses gènes soient transmis, il est fort probable que au moins un des fondateurs identifiés ait amené la tyrosinémie au Québec.

Etant donné qu'il n'y a pas qu'un seul individu commun à toutes les généalogies, l'analyse de ces généalogies ne nous permet pas de conclure à une seule mutation pour la maladie. Il peut y avoir un seul porteur parmi les 30 individus communs, il peut y avoir deux individus porteurs de la même mutation parmi les 30 individus communs et, enfin on est peut-être en présence de deux ou plusieurs porteurs de mutations différentes de la maladie. La recherche de l'effet fondateur ne nous permet donc pas d'exclure qu'il y ait plus d'une mutation pour la tyrosinémie héréditaire de type 1 au Saguenay-Lac-St-Jean.

## **Chapitre 3**

**Evaluation de trois tests de dépistage de porteurs de la tyrosinémie héréditaire de type 1 au Saguenay-Lac-St-Jean.**

### 3.1 Matériel et méthodes

La population étudiée était composée de sujets canadiens-français divisés en trois sous-groupes à savoir des sujets atteints, des hétérozygotes (porteurs obligatoires) et des sujets contrôles.

Les deux premiers sous-groupes ont été constitués grâce au regroupement "Parents Témoins Tyrosinémie Saguenay-Lac-St-Jean". Les sujets atteints qui étaient au nombre de trois ont eu un diagnostic de tyrosinémie confirmé par la présence de succinylacétone dans l'urine et/ou par l'absence d'activité enzymatique dans le foie. Les hétérozygotes étaient porteurs obligatoires car parents biologiques ( père ou mère ) d'un enfant atteint de tyrosinémie. Quarante et un hétérozygotes ont participé à l'étude.

Le groupe contrôle était composé de 75 sujets n'ayant aucune origine au Saguenay-Lac-St-Jean ou dans la région de Charlevoix et dont le patronyme des grands-parents ne figurait pas parmi les dix patronymes les plus fréquents de ces régions. Ont donc été éliminés les patronymes suivants (avec leur fréquence relative en %) :

Tremblay	7.06
Bouchard	2.61
Gagnon	2.44
Simard	2.07
Girard	1.87
Fortin	1.63
Lavoie	1.51

Côté	1.37
------	------

Gauthier	1.23
----------	------

Larouche	1.22
----------	------

-----

total : 23.01

Cette liste a été tirée de Bouchard et al., 1985. Tous les sujets de l'étude n'avaient pas reçu de transfusion sanguine au cours des six derniers mois et avaient complété un formulaire de consentement à participer à l'étude.

### **3.1.1 Validation des tests de dépistage de porteurs**

Un prélèvement de 30 cc de sang par ponction veineuse sur tube EDTA est effectué pour chaque sujet. Après l'identification par numéro, les échantillons sont remis au laboratoire d'hématologie de l'hôpital de Chicoutimi qui effectue une formule de sang complète.

En tout, trois tests seront effectués sur deux tissus différents, soit les lymphocytes et les érythrocytes.

Les lymphocytes sont isolés en traitant 10 cc de sang au Leucoprep. Les lymphocytes ainsi recueillis sont analysés dans les trois jours suivant le prélèvement. Le test de dosage enzymatique effectué sur les globules blancs est fait à l'hôpital Ste-Justine par le Dr. Grignon; la méthodologie utilisée est celle décrite par Kvittingen et al. (1983,1985).

Il s'agit de mesurer au spectrophotomètre la disparition du substrat, le FAA, à 330nm à 37c, le coefficient d'extinction molaire étant de 13,500. La concentration du substrat est ensuite exprimée en fonction des protéines déterminées par la méthode de Lowry. L'activité enzymatique est exprimée par micromole de substrat utilisé, par minute et par gramme de protéine. Deux aliquots de sang de certains sujets sont envoyés au laboratoire de l'hôpital Ste-Justine, un congelé et l'autre non-congelé.

Les érythrocytes sont isolés par centrifugation de 10 cc de sang à 1500g pendant 10 minutes à 4c. On conserve 1 cc du culot érythrocytaire qui est congelé à -70c. Les érythrocytes peuvent être ainsi conservés pendant six mois avant leur analyse.

Deux tests sont effectués sur les globules rouges, le premier est la méthode des spots sur papier buvard et le deuxième est un dosage radio-immunologique qui s'effectue en faisant réagir les extraits érythrocytaires contre des anticorps obtenus de lapins sensibilisés à la FAAH purifiée à partir de foie de boeuf. Pour ce deuxième test tous les aliquots sont arrivés congelés au laboratoire du Centre Hospitalier de l'Université Laval (Dr. Grenier). Les résultats sont exprimés en pourcentage des valeurs contrôles.

Tous les tests, qu'ils soient faits sur les globules blancs ou rouges ont été faits en double-aveugle, c'est-à-dire que ceux qui ont effectué les tests ne savaient pas le nom ni le statut des échantillons et même ils ont parfois reçu deux tubes de sang d'une même personne. La clé fut gardée à l'hôpital de Chicoutimi tout au long de l'étude et ne fut divulguée une fois tous les tests terminés.

La dernière étape est l'analyse statistique des résultats. Les moyennes et les écarts type des trois groupes pour les trois tests ont été calculés. La sensibilité, la spécificité et la valeur prédictive des tests ont été déterminées.

## **3.2 Résultats**

### **3.2.1 Figures de distribution**

Les trois figures suivantes nous donnent la distribution des résultats obtenus pour chacun des trois tests. La figure 3 donne la distribution des résultats du test sur les globules blancs; c'est à partir de ce graphique que fut déterminé le point de rupture ("cutoff point") qui partage les sujets porteurs obligatoires des sujets contrôles. Ce point de rupture fut établi à 2.91 pour toute l'étude; c'est pour cette valeur que l'on obtient les meilleurs résultats de spécificité, de sensibilité, de fiabilité et d'efficacité (voir 3.2.5).

De ce premier graphique on constate que les différents groupes de sujets sont bien départagés de part et d'autre du point de rupture.

La figure 4 contient les données du test sur les globules rouges. On constate qu'il y a beaucoup de chevauchement des résultats, le partage entre les différents groupes ne peut être fait de façon claire.

La figure 5 représente la distribution des résultats obtenus avec les spots. Encore une fois, on remarque que les résultats se chevauchent et se retrouvent de part et d'autre du point de rupture indépendamment du fait qu'ils soient du groupe porteurs obligatoires ou contrôles.

### **3.2.2 Moyennes et écart-types**

Le tableau 2 montre les moyennes et les écart-types pour chacun des tests. On remarque que pour les tests sur les globules rouges et les spots les valeurs obtenues pour les écart-types sont très grandes. Ceci est principalement dû au chevauchement remarqué dans les graphiques précédents. Le test sur les spots semble être le meilleur test parmi les trois tests pour détecter les individus atteints.

### **3.2.3 Fiabilité du test sur globules blancs**

Etant donné la grande variabilité des résultats obtenus à partir des globules rouges et des spots, seuls les résultats obtenus à partir des globules blancs ont fait l'objet d'une étude de fiabilité, d'efficacité, de sensibilité et de spécificité.

Afin de vérifier la fiabilité du test sur les globules blancs, certains de ces tests ont été repris à partir des mêmes échantillons et les résultats sont comparés au tableau 3.

On remarque que pour 24 des 25 tests repris les résultats sont pratiquement inchangés. Pour l'échantillon numéro 19, la grande différence est due à un défaut dans le fonctionnement du spectrophotomètre (communication personnelle du Dr.Grignon).



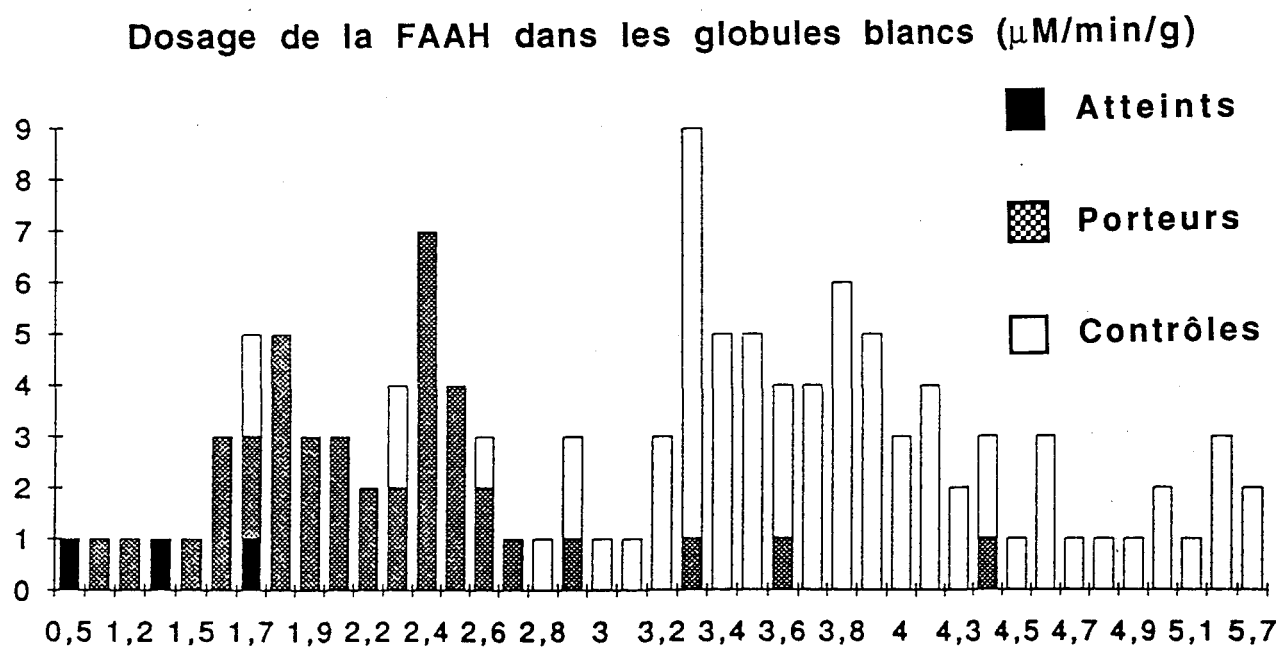


Figure 3: Distribution des résultats obtenus pour le test sur les globules blancs

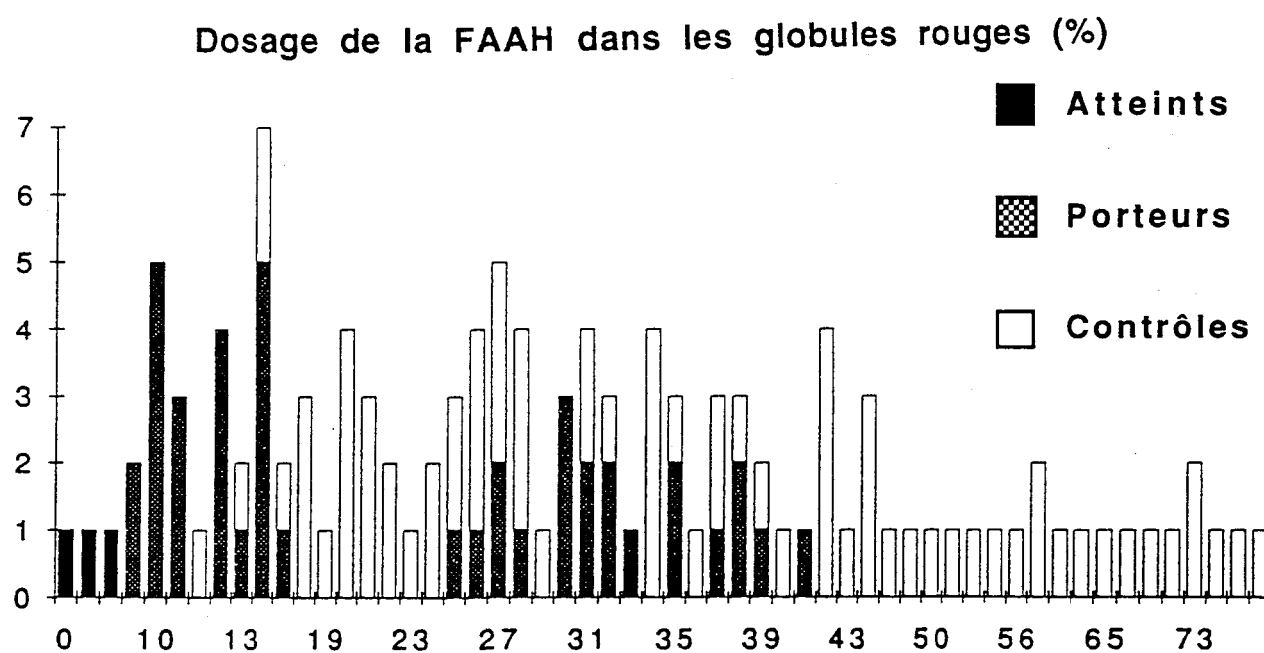


Figure 4: Distribution des résultats obtenus pour le test sur les globules rouges

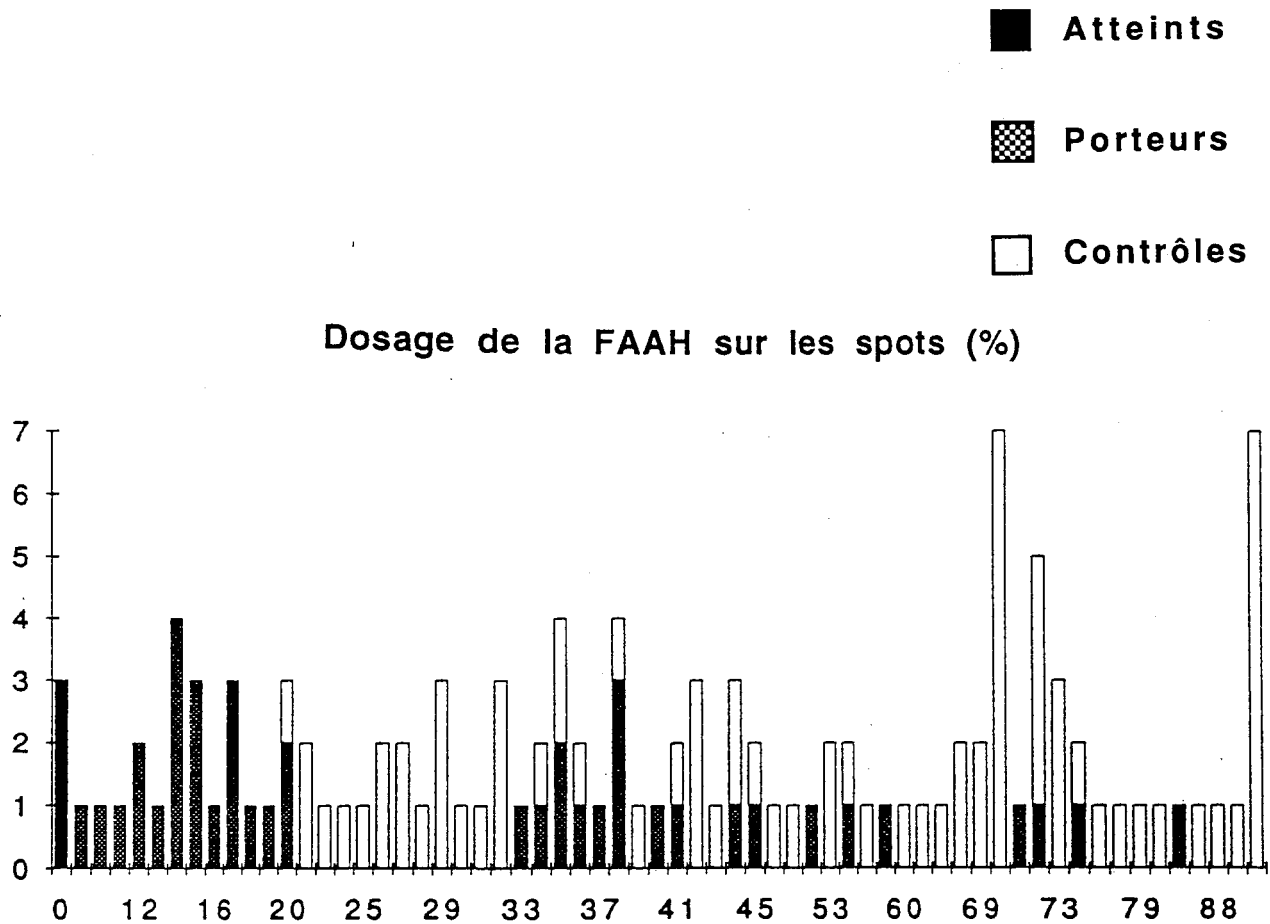


Figure 5: Distribution des résultats obtenus avec les spots

Tableau 2: Moyennes et écarts-types des résultats obtenus  
par chacun des groupes aux trois tests

	Globules blancs ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{g}$ )	Globules rouges %	Spots %
Atteint	$1,20 \pm 0,62$	$1,50 \pm 1,32$	$0,00 \pm 0,00$
Porteur	$2,21 \pm 0,64$	$21,76 \pm 10,93$	$30,93 \pm 20,18$
Normal	$3,79 \pm 0,82$	$37,59 \pm 18,32$	$56,21 \pm 24,33$

Tableau 3: Résultats des tests faits en reprise pour le test  
sur les globules blancs (point de rupture=2,91  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{g}$ )

Echantillon	Statut connu	Résultat de départ	reprise	Modification du statut
1	C	4,6	3,9	non
2	C	4,6	3,7	non
3	C	3,9	3,5	non
4	C	3,3	3,4	non
6	C	4,2	3,7	non
8	P	1,8	2,5	non
9	P	1,8	2,3	non
12	P	2,1	2,6	non
13	P	1,8	2,3	non
19	C	2,3	3,5	?
23	C	3,3	3,2	non
24	A	1,7	1,8	non
41	P	1,7	2,1	non
43	P	2,1	2,2	non
56	P	2,4	2,2	non
57	P	2,1	2,3	non
58	C	4,6	4,3	non
60	C	3,4	3,0	non
76	C	3,3	3,8	non
79	C	3,4	3,5	non
80	C	3,5	3,6	non
85	C	4,4	4,4	non
103	C	3,2	3,2	non
105	C	3,9	3,9	non
107	C	3,3	3,4	non

C=contrôle

P=porteur obligatoire

A=Atteint

### **3.2.4 Efficacité du test sur les globules blancs après congélation de certains aliquots.**

Le tableau 4 contient les résultats obtenus après congélation de certains aliquots. On constate une seule différence majeure (échantillon 66) dans les résultats; celle-ci est due à un défaut dans le fonctionnement du spectrophotomètre (communication personnelle du Dr.Grignon). Dans tous les autres cas, les résultats sont comparables.

### **3.2.5 Sensibilité, spécificité et valeur prédictive du test sur les globules blancs**

Les résultats contenus dans le tableau 5 concernent la sensibilité, la spécificité et la valeur prédictive du test sur les globules blancs. Les statuts connus des individus ont été comparés aux statuts obtenus par le test sur les globules blancs. Dans ce tableau le terme "normaux " signifie des individus identifiés non-porteurs à partir du test. Les résultats ont été obtenus en partant d'un point de rupture fixé à 2,91; ce point assurait les résultats les plus élevés lors des différents calculs (voir 3.2.1.).

Tableau 4 : Résultats des tests faits sur des échantillons congelés  
pour le test sur les globules blancs

Echantillon	Statut	Résultat de départ	Résultat congelé	Modification de statut
40	C	3,7	3,8	non
50	P	2,4	2,8	non
53	C	3,5	3,4	non
65	C	---	3,8	---
66	C	1,7	3,5	?
75	C	3,3	3,3	non
88	C	5,7	5,3	non
93	C	5,4	4,9	non
112	P	2,2	2,2	non
130	P	1,5	1,8	non

C = contrôle

Point de rupture = 2,91  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{g}$

P = porteur obligatoire

Tableau 5 : Résultats comparés du test sur les globules blancs

	Statut connu des individus		Total
	Porteurs	Contrôles	
Porteurs	38	8	46
Normaux	3	67	70
Total	41	75	116

Sensibilité =  $38 / 41 = 92,68 \%$

Spécificité =  $67 / 75 = 89,33 \%$

Valeur prédictive =  $38+67/116=90,52\%$

Point de rupture =  $2,91 \mu\text{M}/\text{min}/\text{g}$



### **3.3 Discussion**

#### **3.3.1 Critique de la méthodologie**

##### **3.3.1.1 Critique du groupe contrôle**

Malgré toutes les précautions prises lors du choix des individus faisant partie du groupe contrôle, par exemple les exclusions patronymiques (voir section 2.1.2), on ne peut exclure de façon certaine qu'il ne se soit glissé un ou plusieurs porteurs non connus parmi les 80 individus choisis. En effet, avec un taux de porteurs au Saguenay-Lac-St-Jean de 1/22 (DeBraekeleer et Larochelle, 1990) et une prévalence à la naissance de 1/14800 au Québec (Grenier et al., 1982), il est fort probable qu'il y ait au moins un porteur non connu à l'intérieur de l'échantillon contrôle.

##### **3.3.1.2 Critique des tests de dépistage**

Pour les tests sur les globules rouges et les spots, les analyses ont été faites en une seule fois, ce qui diminue le risque d'erreur, de manipulation et d'écart entre les résultats dû à des problèmes de manipulation.

Les analyses sur les globules blancs ont été faites plusieurs fois et de plus cette méthode requiert la préparation d'un substrat. Les paramètres de ce dernier peuvent varier légèrement d'une série à l'autre et ainsi faire varier les résultats. Aussi, lors de ces expérimentations, différents problèmes avec le spectrophotomètre sont survenus ayant comme conséquence de fausser quelques résultats.

### **3.3.2 Discussion des tests de dépistage**

#### **3.3.2.1 Les tests sur les globules rouges et les spots**

Ainsi que le montraient les figures 4 et 5 concernant les globules rouges et les spots, ces deux méthodes ne sont pas fiables pour dépister les porteurs de la tyrosinémie dans une population étant donné le chevauchement trop important des valeurs attribuées aux contrôles et aux porteurs obligatoires.

Par contre, l'analyse à partir des spots confirme la fiabilité de cette technique pour dépister les homozygotes (Grenier et al., 1982). En effet, à la figure 5 on voit que les atteints représentés par le rectangle foncé ont tous une absence enzymatique. Ce même résultat se retrouve au tableau 2 (moyenne nulle).

#### **3.3.2.2 Les tests sur les globules blancs**

Le test de dépistage sur les globules blancs fut mis au point et décrit par Kvittingen en 1985. Cette méthode mesure l'hydrolyse de l'acide fumarylacétoacétique à l'aide d'un spectrophotomètre. Lors de leur expérimentation, Kvittingen et son équipe ont testé 184 sujets contrôles, six patients atteints de tyrosinémie et leurs parents. Aucune différence ne fut observée entre les hommes et les femmes. Onze sujets contrôles ont eu des résultats d'activité enzymatique correspondant à ceux des sujets hétérozygotes pour la tyrosinémie. Les résultats d'activité enzymatique de la FAAH chez les parents des atteints de la tyrosinémie montrent que seulement

dans cinq cas un des parents a une activité enzymatique correspondant à celle attendue d'un hétérozygote. Les auteurs suggèrent que la variabilité des résultats pourrait être due à la présence d'un gène pseudodéficient qui rendrait la distinction entre les normaux et les hétérozygotes difficile. En conclusion, ils notent l'importance de rechercher un marqueur pour le gène de la tyrosinémie afin d'éviter ce genre de problèmes (Kvittingen et al., 1985).

Pour la présente étude, rappelons que le test sur les globules blancs procure une sensibilité de 92,68% et une spécificité de 89,3%. On se pose donc la question suivante: ces valeurs sont-elles suffisamment élevées pour décider d'utiliser ce test comme moyen de dépistage dans la population du Saguenay-Lac-St-Jean en général?

La valeur prédictive du test étant de 90.5%, le risque d'erreur demeure trop élevé pour utiliser ce test dans le cadre d'un dépistage général dans une population donnée.

Par contre, s'il est utilisé au sein de groupes familiaux dans lesquels il y a un membre atteint, il pourrait s'avérer très utile. Il peut donner de bonnes indications à des couples à risque et diminuer le nombre d'amniocentèses effectuées au sein de tels groupes familiaux.

Voici quelques exemples de l'utilité d'un tel test de dépistage de porteur dans une population à risque ou un groupe familial.

#### A. Cas d'un homme ayant un frère atteint

Le fait d'avoir un frère atteint de la tyrosinémie donne à cet homme un risque d'être porteur de la maladie de  $2/3$ . Dans son cas, il aura une valeur

prédictive du dosage de la FAAH lymphocytaire positif de 94,5% et une valeur prédictive d'un test négatif de 85,8%.

Dans une première situation cet homme est déclaré porteur de la maladie par le test de dépistage et sa conjointe a un test négatif.

Leur risque d'avoir un enfant atteint est de 1/30 si la conjointe a un frère atteint de la maladie. Par contre, si la femme a un neveu atteint, ce risque diminue à 1/31. Si la femme a un cousin atteint, ce risque est alors de 1/38 et enfin, si elle fait partie de la population du Saguenay-Lac-St-Jean sans avoir d'histoire familiale de tyrosinémie, le résultat du risque passe à 1/91.

Dans la deuxième situation possible, les deux conjoints sont déclarés porteurs de la tyrosinémie par le test de dépistage sur les globules blancs.

Les deux conjoints étant porteurs, le risque d'avoir un enfant atteint de la maladie est de 1/4 si la femme a un frère atteint. Si la conjointe a un neveu atteint, ce risque passe à 1/5. Dans le cas où la femme a un cousin atteint ce risque diminue à 1/6 et enfin si la femme fait partie de la population du Saguenay-Lac-St-Jean sans histoire familiale de tyrosinémie ce risque est alors de 1/14.

La troisième et dernière situation possible suppose que les deux conjoints sont déclarés non porteurs par le test de dépistage.

Pour cette dernière possibilité, les risques d'avoir un enfant atteint de la tyrosinémie sont les suivants ; si la conjointe a un frère atteint, le risque est de 1/200. Si la femme a un neveu atteint, le risque passe à 1/375. Si elle a un cousin atteint le risque est alors de 1/1083. Enfin, si la femme fait

partie de la population du Saguenay-Lac-St-Jean sans histoire familiale de tyrosinémie, le risque diminue alors à 1/5634.

#### B. Cas d'une femme ayant un cousin atteint

Le fait d'avoir un cousin atteint donne à cette femme un risque d'être porteuse de la maladie de 1/4. La valeur prédictive du dosage de la FAAH lymphocytaire positif est alors de 74,4% et la valeur prédictive d'un test négatif est de 97,4%.

La première possibilité est que cette femme est déclarée porteuse et son conjoint obtient un test négatif.

Leur risque d'avoir un enfant atteint de la tyrosinémie est de 1/163 si le conjoint a un frère atteint; ce risque passe à 1/172 si le père a un neveu atteint. Dans le cas où le père a un cousin atteint le risque d'avoir un enfant atteint de la maladie est de 1/207 et enfin si le conjoint fait partie de la population du Saguenay-Lac-St-Jean sans histoire familiale de tyrosinémie, ce risque diminue à 1/496.

La deuxième possibilité est que les deux conjoints soient déclarés porteurs par le dosage de la FAAH lymphocytaire.

Dans une telle situation, le risque d'avoir un enfant atteint de la tyrosinémie est de 1/6 (17,6%) si le conjoint a un frère atteint, un risque de 1/6 (16,7%) si le conjoint a un neveu atteint. Si le père a un cousin atteint, ce risque passe alors à 1/7 et si le conjoint fait partie de la population du

Saguenay-Lac-St-Jean sans histoire familiale de tyrosinémie, le risque est de 1/17.

La dernière possibilité est qu'aucun des conjoints ne soit déclaré porteur par le test de dépistage.

Dans ce cas, si le conjoint a un frère atteint le risque d'avoir un enfant atteint est de 1/1083. Si le père a un neveu atteint le risque diminue à 1/2051 et si le conjoint a un cousin atteint ce risque est alors de 1/5917. Enfin, dans la situation où le conjoint fait partie de la population du Saguenay-Lac-St-Jean en général, le risque n'est plus que de 1/30 769. Le tableau 6 résume les résultats énumérés plus haut.

Comme l'amniocentèse est une technique qui n'est pas dépourvue de risques, ce test de dépistage de porteurs est utile pour effectuer des dépistages intra-familiaux afin de rassurer les individus concernés et ce malgré le risque d'erreur. Si on considère que les amniocentèses sont effectuées pour un risque se situant entre 1/120 et 1/160 de tyrosinémie, un tel test de dépistage peut être très utile à l'intérieur de groupes familiaux afin de calculer des risques plus près de la réalité et ainsi diminuer le nombre d'amniocentèses. Le but ultime de la recherche demeure cependant l'identification de la(des) mutation(s) de tyrosinémie héréditaire de type 1 afin de pouvoir identifier les porteurs avec une fiabilité approchant les 100%.

Tableau 6: Risque de tyrosinémie relié au risque d'être porteur.

Cas	lien conjoint	lien conjoint	situation des conjoints		
	1 vs atteint	2 vs atteint	2 porteurs	1 porteur	aucun
A	frère	frère	1 / 4	1 / 30	1 / 200
	frère	neveu	1 / 5	1 / 31	1 / 375
	frère	cousin	1 / 6	1 / 38	1 / 1083
	frère	population	1 / 14	1 / 91	1 / 5634
B	cousin	frère	1 / 6	1 / 163	1 / 1083
	cousin	neveu	1 / 6	1 / 172	1 / 2051
	cousin	cousin	1 / 7	1 / 207	1 / 5917
	cousin	population	1 / 17	1 / 496	1 / 30 769

Enfin, un regard critique des résultats des différents tests (figures 3,4,5) semble nous montrer une distribution bimodale pour les porteurs; ceci pourrait être la conséquence de la présence de deux mutations et ainsi soutenir les hypothèses soulevées par l'étude sur les crises neurologiques (Mitchell et al.,1990) et sur les quantités d'ARNm retrouvées dans les différents échantillons testés (Tanguay et al.,1990a,b).



## CONCLUSION

Bien que la tyrosinémie héréditaire soit connue dans la région du Saguenay-Lac-St-Jean depuis les années 1960 et que son incidence y soit particulièrement élevée, aucun test de dépistage de porteurs n'est disponible pour les personnes à haut risque de transmettre la maladie. Ceci combiné à la gravité des conséquences de cette maladie pour les enfants atteints et leurs parents a grandement contribué au désir de réaliser ce projet.

Il existe trois tests de dépistage des hétérozygotes de la maladie mais jusqu'à présent aucun n'avait encore fait l'objet d'une évaluation en vue d'une utilisation dans une population donnée.

L'analyse des résultats obtenus pour ces trois tests permet de conclure que les deux tests sur les globules rouges ne sont pas fiables pour distinguer les porteurs des individus normaux à cause du chevauchement trop important

des résultats. Par contre, le test sur les spots demeure excessivement précis pour identifier les individus atteints.

Seul le test sur les globules blancs demeure en lice; les résultats obtenus pour sa spécificité (89,33%) , sa sensibilité (92,68%) et sa valeur prédictive (90,5%) nous permettent de dire que ce test pourrait être très utile dans le cadre d'un dépistage intra-familial et ainsi informer les individus les plus à risque de leur situation et diminuer le nombre d'amniocentèses effectuées à l'Hôpital de Chicoutimi.

Les résultats de la recherche d'un effet fondateur nous donne 30 individus communs dont 20 fondateurs et 10 ancêtres communs nés au Québec. Dès lors il est possible qu'il s'agisse d'une mutation apparue de novo au Québec mais aussi que l'on soit en présence de plus d'une mutation de la maladie dans la population du Saguenay-Lac-St-Jean.

Ces résultats semblent venir appuyer les conclusions tirées de l'étude sur les crises neurologiques selon laquelle il existerait deux formes à la maladie; les résultats de dosage des ARNm semblent aussi démontrer la présence de plus d'une mutation.

La distribution bimodale des résultats dans les trois tests pourrait être due à la présence de plus d'une mutation. Cette hypothèse ne peut donc pas être écartée et des recherches au point de vue moléculaire sur le gène seront très importantes afin de l'élucider.

Enfin, si l'hypothèse de la présence de plus d'une mutation se confirme dans le futur, la recherche d'un effet fondateur devra être reprise en considérant les différentes mutations.

Nous pouvons donc conclure de cette recherche que nous connaissons mieux la tyrosinémie héréditaire de type 1 et qu'un test de dépistage de porteurs s'effectuant sur les globules blancs pourrait et devrait être disponible à l'échelle de la région du Saguenay-Lac-St-Jean et contribuer à un meilleur contrôle de la maladie et à un encadrement plus précis des familles à risque.

## Bibliographie

- Berger R, Van Faassen H, Taanman JW, De Vries H, Agsteribbe E (1987)  
Type 1 tyrosinemia : lack of immunologically detectable  
fumarylacetoacetase enzyme protein in tissues and cell extracts.  
Pediatric Res 22 : 394-398
- Bergeron P, Laberge C, Grenier A (1974) Hereditary tyrosinemia in the  
province of Quebec : Prevalence at birth and geographic distribution.  
Clin Genet 5 : 157-162
- Bérubé D, Phaneuf D, Tanguay RM, Gagné R (1989) Assignment of the  
fumarylacetoacetate hydrolase gene to chromosome 15q23-15q25.  
Cytogenet Cell Genet 51: 962
- Bouchard G, DeBraekeleer M (1991) Histoire d'un génome. Sillery: Presses  
de l'Université du Québec.
- Bouchard G, Laberge C, Scriver CR (1988) Reproduction démographique  
et transmission génétique dans le Nord-Est de la province de Québec  
(18-20 siècles ), Eur J Population 4: 39-67
- Bouchard G, Laberge C, Scriver CR (1985) La tyrosinémie héréditaire et  
le rachitisme vitamino-dépendant au Saguenay. Une approche génétique  
et démographique. Union Méd Canada 114 : 633-636
- Bouchard G, Laberge C, Scriver CR, Glorieux F, Declos M, Bergeron L,  
Larochelle J, Mortezaei S (1984) Etude démographique et généalogique  
de deux maladies héréditaires au Saguenay. Cahiers Québécois de  
Démographie 13 : 118-137

DeBraekeleer M , Larochelle J (1990) Genetic epidemiology of hereditary tyrosinemia in Quebec and in Saguenay-Lac-St-Jean. Am J Hum Genet 47:302-307

DeBraekeleer M (1991a) Les maladies autosomales récessives. Dans : Bouchard G, DeBraekeleer M (eds) Histoire d'un génome. Sillery : Presses de l'Université du Québec

DeBraekeleer M (1991b) Hereditary disorders in Saguenay-Lac-St-Jean (Québec, Canada). Hum Hered 41: 141-146

DeBraekeleer M (1991c) Belge : un ensemble d'analyse génétique des généalogies. Chicoutimi : SOREP

Gagné R, Lescault A, Grenier A, Laberge C, Melançon SB , Dallaire L (1982) Prenatal diagnosis of hereditary tyrosinemia : Measurement of succinylacetone in amniotic fluid. Prenat Diagn 2 :185-188.

Gauvreau D, Bourque (1988) Mouvements migratoires et familles : le peuplement du Saguenay avant 1911. Rev Histoire Amerique Fr 42:167-191

Gentz J, Jagenburg R, Zetterstrom R (1965) Tyrosinemia. J Pediatr 66 : 670-696

Grenier A, Lescault A, Laberge C, Gagné R, Mamer O (1982)

Detection of succinylacetone and the use of its measurement in mass screening for hereditary tyrosinemia. Clin Chim Acta 123 :93-99.

Goldsmith LA, Laberge C (1989) Tyrosinemia and related disorders.

Dans: Scriver C, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. The metabolic basis of inherited disease. 6th ed. New York : McGraw-Hill, 1: 547-562

Habvorsen S, Pande H, Loken A Gjessing LR (1966) Tyrosinosis. A study of 6 cases. Arch Dis Child 41 : 238-249

Kvittingen EA, Halvorsen S, Jellum E (1983) Deficient

fumarylacetoacetate fumarylhydrolase activity in lymphocytes and fibroblasts from patients with hereditary tyrosinemia. Pediatric Res 14 : 541-544

Kvittingen EA, Leonard JV, Pettit BR, King (1985) Concentrations of succinylacetone after homogentisate and tyrosine loading in healthy individuals with low fumarylacetase activity. Clin Chim Acta 152 : 271-279

Laberge C (1969) Hereditary Tyrosinemia in a French Canadian Isolate. Am J Hum Genet 21 : 36-45

Laberge C, Dallaire L (1967) Genetic Aspects of tyrosinemia in the Chicoutimi region, Canad Med Ass J 97: 1099-1100

Laberge C, Lescault A, Grenier A, Gagné R (1981) Effet succinylacétone après surcharges orales d'homogentisate. Union Med Canada 110: 621-625

La Du BN (1967) The enzymatic deficiency in tyrosinemia. Amer J Dis Child 113 : 54

Larochelle J (1988) Tyrosinemia in the Saguenay population. In: Bouchard G (ed) From population dynamics to genetic epidemiology. SOREP, University of Quebec at Chicoutimi, p.353-369

Larochelle J, Mortezaei A, Belanger M, Tremblay M, Claveau JC, Aubin G (1967) Experience with 37 infants with Tyrosinemia. Canad Med Ass J 97 :1051-1054

Lindblad B, Lindstedt S, Steen G (1977) On the enzymic defects in hereditary tyrosinemia. Proc Natl Acad Sci USA 74 : 4641- 4645.

Mayer E (1974) Populations, espèces et évolution. Paris, Herman, 496 pages

Mitchell G, Larochelle J, Lambert M et al (1990) Neurological crises in hereditary tyrosinemia. N Engl J Med 322 : 432-437

Scriver CR et al (1967) Hereditary tyrosinemia and tyrosyluria in a french canadian geographic isolate. Amer J Dis Child 113 : 41-46

- Tanguay RM, Laberge C, Lescault A, Valet JP, Duband JL, Quenneville Y  
(1984) Molecular basis of hereditary tyrosinemia: proof of the primary defect by western blotting. In : Scott WA, Ahmad F, Black S, Schultz J, Whelan WJ (eds) Advances in gene technology: human genetic disorders. Cambridge University Press, Cambridge, pp 256-257
- Tanguay RM, Phaneuf D, Labelle Y, Demers S (1990a) Molecular cloning and expression of the c-DNA encoding the enzyme deficient in hereditary tyrosinemia : evidence for molecular heterogeneity. Am J Hum Genet 47 : A168
- Tanguay RM, Valet JP, Lescault A, Duband JL, Laberge C, Lettre F, Plante M  
(1990b) Different molecular basis for fumarylacetoacetate hydrolase deficiency in the two clinical forms of hereditary tyrosinemia. Am J Hum Genet 47:308-316
- Van Spronsen FJ, Berger R, Smit PA et al (1989) Tyrosinemia type 1 : Orthotopic liver transplantation as the only definitive answer to a metabolic as well as an oncological problem. J Inher Metab Dis 12 : 339-342
- Vestermarck S, Wulf HLG, Zachznchristiansen B (1964) Familial hepatic cirrhosis in infancy. Danish Med Bull 11 : 46
- Zetterstrom R (1963) Tyrosinosis. Ann N.Y. Acad Sci 111 : 220