

UNIVERSITE DU QUEBEC A CHICOUTIMI

Mémoire présenté à
l'Université Laval
comme exigence partielle
de la maîtrise en médecine expérimentale
offerte à
l'Université du Québec à Chicoutimi
en vertu d'un protocole d'entente
avec l'Université Laval

Par
SOPHIE BERNIER

**Épidémiologie génétique du glaucome primaire à angle ouvert:
Étude de deux mutations du gène TIGR observées
chez deux familles de l'est du Québec**

Avril 1999

© Sophie Bernier, 1999



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.

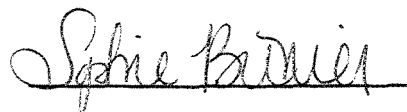
L'auteur conserve néanmoins la propriété du droit d'auteur qui protège ce mémoire ou cette thèse. Ni le mémoire ou la thèse ni des extraits substantiels de ceux-ci ne peuvent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

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.

RESUME

Le glaucome primaire à angle ouvert (POAG) est une neuropathie optique affectant environ 2 % de la population de 40 ans et plus. Les études familiales démontrent que le POAG ségrège sous un mode autosomal dominant. Plusieurs mutations du gène TIGR ont été trouvées responsables du POAG. Deux de ces mutations (Gln368Stop et Lys423Glu) ont été identifiées chez deux familles québécoises. Afin de mieux connaître la prévalence et l'origine de ces deux mutations, plusieurs cas sporadiques de glaucome ont été recrutés au Québec. À l'aide d'un test d'analyse mutationnelle nous avons vérifié la présence des mutations chez ces individus. De plus, une étude de correspondance génotype/phénotype a également été réalisée pour ces deux mutations.

Les résultats obtenus démontrent que les deux mutations sont peu répandues au Québec et ce, même si la mutation Gln368Stop est la plus rapportée au monde. La mutation Lys423Glu n'existerait qu'au Québec car aucun autre groupe de recherche ne l'a rapportée. La présence de cette mutation dans une seule famille nous laisse croire à l'apparition récente de celle-ci.


Sophie Bernier


Vincent Raymond M.D. Ph.D.

AVANT-PROPOS

Je voudrais tout d'abord remercier mes co-directeurs de maîtrise M. Jean Morissette et le Dr. Vincent Raymond de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce projet. Ce fut un grand honneur pour moi de faire partie de leur équipe. Je voudrais également remercier les ophtalmologistes du Réseau Vision - axe glaucome pour leur participation au projet.

Un grand merci à toute l'équipe de recherche du Dr. Vincent Raymond: Stéphane Dubois, pour son expérience et ses nombreux conseils. Annie Duchesne, ma complice et voisine qui m'a appris beaucoup de choses même si elle ne s'en doute pas, merci pour tes encouragements et ton sourire si contagieux. Mathieu Faucher, mon deuxième voisin un peu dur d'approche certains matins mais avec qui j'ai eu bien du plaisir à discuter sur différents sujets comme "les guedoches!". Merci également à Steve Moisan, Marc-André Rodrigue et Josée Bergeron.

Merci à l'équipe de l'IREP avec qui j'ai travaillé pendant près d'un an. Une équipe très dynamique et accueillante. Merci à Hélène Vézina, Michèle Jomphe, Marc Tremblay, France Néron, celui dont la généalogie n'est plus un secret, Julie Arsenault, ma grande amie qui m'a poussé à faire cette maîtrise et dont je ne suis pas déçue. Merci pour tes encouragements et ta bonne humeur reconfortante. Merci également à Josée Villeneuve qui a bien voulu valider mes généalogies.

Le plus grand des mercis va certainement à ma famille, qui m'a soutenue pendant toutes ces années, merci pour votre générosité, votre affection et vos

encouragements. Sans vous, je ne serais certainement pas rendue ici aujourd'hui. Nicolas, je te félicite d'avoir supporté mes nombreux changements d'humeur et de m'avoir aidée lors de la mise en page de ce document. Merci également à Constance et Micheline, elles vont certainement comprendre.

Finis les bancs d'école, finie la vie d'étudiante, enfin le vrai monde, le monde des grands, un monde qui me fait tout aussi peur que quand j'ai fait mon entrée dans le monde d'étudiant pour la première fois... il y a de cela 20 ans, déjà.

*À mes parents,
Claude et Madeleine.*

TABLE DES MATIERES

	Page
RESUME	ii
AVANT-PROPOS	iii
TABLE DES MATIERES	vi
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES TABLEAUX	xi
INTRODUCTION GENERALE	xiii

CHAPITRE I: INTRODUCTION

I.1. Anatomie de l'oeil	1
I.1.1 Le trabéculum	3
I.1.2 Le canal de Schlemm	5
I.1.3 Le corps ciliaire	8
I.2 L'humeur aqueuse: sa formation, son évacuation	9
I.3 Définition et classification des glaucomes	10
I.3.1 Le glaucome à angle ouvert	12
I.3.2 Le glaucome congénital ou développemental	14
I.3.3 Le glaucome à angle fermé (angle-closure)	15
I.4 Épidémiologie du glaucome primaire à angle ouvert	18
I.5 L'analyse de liaison génétique	22
I.5.1 Les bases biologiques de la génétique	22
I.5.2 Les marqueurs microsatellites	23
I.5.3 Les analyses statistiques	25

I.6 Les avantages de la population québécoise	27
I.7 Objectifs de l'étude	28

CHAPITRE II: METHODOLOGIE

II.1 Recrutement	29
II.2 Procédures généalogiques	30
II.3 Les analyses généalogiques	30
II.3.1 La complétude ou exhaustivité des ascendances	30
II.3.2 La consanguinité	31
II.3.3 L'apparentement	33
II.4 Procédures diagnostiques	33
II.5 Ponctions veineuses	34
II.6 Immortalisation et extraction de l'ADN génomique	34
II.6.1 Immortalisation cellulaire	34
II.6.2 Extraction de l'ADN génomique à partir du sang	35
II.6.3 Extraction de l'ADN génomique à partir des lymphocytes	36
II.7 Génotypage des marqueurs microsatellites	36
II.7.1 Analyse des répétitions des microsatellites par PCR	37
II.7.2 Électrophorèse sur gel et lecture des allèles	38
II.8 Analyses statistiques	39
II.9 Test d'analyse mutationnelle: Amplification-refractory mutation system (ARMS)	40

CHAPITRE III: RESULTATS

III.1 Les familles étudiées	42
III.1.1 La famille CA	42
III.3.2 La famille CT	46

III.2 Les cas sporadiques	50
III.3 Les analyses généalogiques	52
III.3.1 Complétude ou exhaustivité des ascendances	52
III.3.2 La répartition géographique des cas sporadiques	53
III.3.3 La consanguinité	55
III.3.4 L'apparentement	56

CHAPITRE IV : DISCUSSION

IV.1 Informativité des familles	59
IV.2 Les mutations connues au Québec	60
IV.2.1 La mutation Lys423Glu	60
IV.2.2 La mutation Gln368Stop	61
IV.3 Les cas sporadiques	63
IV.3.1 Les analyses généalogiques	63
IV.3.1.1 Répartition géographique des cas sporadiques	64
IV.3.1.2 Les coefficients de consanguinité	64
IV.3.1.3 Les coefficients d'apparentement	65
CONCLUSION GENERALE	68
BIBLIOGRAPHIE	70
ANNEXE	80

LISTE DES FIGURES

- Figure 1.** p.2 Structures internes de l'oeil humain.
- Figure 2.** p.3 Angle de la chambre antérieure et structures avoisinantes.
- Figure 3.** p.5 Trabéculum normal (à gauche) et trabéculum d'un oeil atteint de glaucome primitif à angle ouvert (à droite).
- Figure 4.** p.7 Représentation schématique du cycle de vacuolisation au niveau de l'endothélium de la paroi interne du canal de Schlemm.
- Figure 5.** p.8 Les efférents du canal de Schlemm: la voie directe vers les veines aqueuses.
- Figure 6.** p.11 Classification des différents types de glaucome.
- Figure 7.** p.13 Schématisation de la tête du nerf optique normal (à gauche) et excavation (à droite) de la tête du nerf optique chez un malade souffrant de glaucome.
- Figure 8.** p.17 Glaucome à angle fermé. La fermeture est due à la projection de la racine de l'iris sur le trabéculum.
- Figure 9.** p.20 Schématisation du gène TIGR/MYOC.
- Figure 10.** p.25 Le génotypage par microsatellites.
- Figure 11.** p.37 Différentes étapes de la réaction en chaîne de la polymérase (PCR).

- Figure 12.** p.43 La famille CA.
- Figure 13.** p.45 Mutation Lys423Glu.
- Figure 14.** p.46 Haplotype commun retrouvé chez la famille CA.
- Figure 15.** p.47 La famille CT.
- Figure 16.** p.48 Mutation Gln368Stop.
- Figure 17.** p.49 Haplotype commun retrouvé chez la famille CT.
- Figure 18.** p.52 Exemple des résultats que l'on peut obtenir en effectuant un test d'analyse mutationnelle.

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1.** p.16 Corrélation entre la profondeur de la chambre antérieure et la fréquence de glaucome par fermeture de l'angle
- Tableau 2.** p.19 Différentes localisations chromosomiques reliées au glaucome
- Tableau 3.** p.21 Mutations responsables de glaucome primaire à angle ouvert identifiées dans le gène TIGR/MYOC
- Tableau 4.** p.32 Equivalence des codes de consanguinité
- Tableau 5.** p.44 Marqueurs microsatellites utilisés pour l'analyse de liaison de la famille CA
- Tableau 6.** p.45 Répartition du nombre de porteurs de l'haplotype dans la famille CA
- Tableau 7.** p.50 Nombre de porteurs de la mutation Gln368Stop dans la famille CT
- Tableau 8.** p.50 Table des valeurs de Lodscore
- Tableau 9.** p.51 Répartition géographique des cas sporadiques de glaucome
- Tableau 10.** p.53 Complétude du groupe de généalogies étudié
- Tableau 11.** p.54 Répartition des mariages comparativement au lieu de résidence de l'égo

- Tableau 12.** p.55 Coefficients de consanguinité calculés à la 3^e génération
- Tableau 13.** p.56 Coefficients de consanguinité calculés à la 6^e génération
- Tableau 14.** p.57 Valeurs de ϕ des ascendances couplées avec la famille CT à la 6^e génération
- Tableau 15.** p.58 Valeurs de ϕ des ascendances couplées avec la famille CA à la 6^e génération

INTRODUCTION GENERALE

Le glaucome est une neuropathie optique qui entraîne, chez la plupart des cas non-traités, une cécité irréversible. Mondialement, cette maladie oculaire se retrouve au deuxième rang parmi les 3 grandes causes de cécité. À l'aube du troisième millénaire, on estime qu'un peu moins de 7 millions d'individus dans le monde sont atteints de glaucome, affectant autant d'hommes que de femmes (Quigley, 1996). Cependant, son incidence est beaucoup plus élevée chez les Noirs-américains (Klein et al, 1992).

Parmi toutes les formes de la maladie, le glaucome primaire à angle ouvert est la plus répandue. On ignore totalement la cause de cette maladie mais l'on pense qu'elle serait associée à une défectuosité du trabéculum (une structure anatomique localisée au creux de l'angle irido-cornéen) dont la porosité diminue. Ce type de glaucome affecte environ 2% des gens âgés de plus de 40 ans et s'élève même jusqu'à 6% chez les plus de 60 ans (Leske, 1983).

La transmission de cette maladie s'effectue, dans la majorité des cas, sous un mode autosomal dominant avec une pénétrance réduite qui augmente avec l'âge. On estime qu'environ 30 à 50% des cas de glaucome ont une origine génétique. Plusieurs gènes ont été localisés sur le génome et le premier (GLC1A) a été cartographié sur le chromosome 1 (1q23-q25) (Sheffield et al. 1993). Ce gène, communément appelé TIGR ou MYOC, comporte 51 mutations responsables de glaucome primaire à angle ouvert. La fonction exacte de ce gène n'est pas encore connue mais plusieurs équipes de recherche travaillent afin de trouver l'implication directe du gène avec cette pathologie.

L'équipe de recherche du docteur Vincent Raymond a identifié 2 mutations du gène TIGR chez deux familles québécoises. Il s'agit des mutations Gln368Stop et Lys423Glu situées sur l'exon III du gène. Le but principal de mon projet de recherche était d'évaluer la prévalence et l'origine de ces deux mutations dans la population québécoise. Pour ce faire, nous avons recruté 189 cas sporadiques de glaucome dans différentes régions (Montréal, Québec, Saguenay-Lac-Saint-Jean, Beauce, Rimouski et Rivière-du-Loup). Afin d'évaluer si ces individus étaient porteurs ou non d'une des 2 mutations, nous avons effectué un test d'analyse mutationnelle. De plus, une analyse généalogique a été réalisée afin de retracer l'origine possible de ces 2 mutations.

D'autre part, une étude de correspondance génotype/phénotype a été réalisée pour chacune des deux mutations ainsi qu'une analyse de liaison entre ces mutations et des marqueurs microsatellites situés de chaque côté du gène.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

Le glaucome regroupe un ensemble de maladies oculaires caractérisées par une atteinte du nerf optique et une perte progressive des champs visuels. Cette neuropathie optique, qui affecte un grand nombre d'individus, s'accompagne souvent d'une augmentation de la pression intraoculaire (Shield et al., 1996). Afin de mieux comprendre cette maladie, nous allons d'abord réviser l'anatomie de l'oeil.

I.1 Anatomie de l'oeil

Chez l'adulte, le globe oculaire mesure environ 2,5 cm de diamètre. Seul le sixième antérieur de sa surface est exposé, le reste est logé dans l'orbite qui le protège (Tortora & Grabowski, 1994). L'oeil comprend 3 compartiments: la chambre antérieure, occupant l'espace entre la cornée et l'iris; la chambre postérieure, située entre l'iris, le procès ciliaire et le cristallin; et l'espace vitré, entouré par la rétine, s'étend derrière le cristallin (Figure 1). Les chambres antérieure et postérieure contiennent un liquide pauvre en protéines appelé l'humeur aqueuse et l'espace vitré est rempli par une substance gélatineuse appelée le corps vitré (Junqueira et al., 1992). Du point de vue anatomique, le globe oculaire peut être divisé en trois couches: la tunique externe, fibreuse,

qui comprend la sclérotique et la cornée; la tunique moyenne, vascularisée, dont fait partie la choroïde, le corps ciliaire et l'iris; et la tunique interne, nerveuse: la rétine. Cette dernière communique avec le système nerveux central via le nerf optique (Junqueira et al., 1992). Un élément très important lors de la caractérisation des différents types de glaucome est l'angle irido-cornéen situé, comme son nom l'indique, à la jonction de l'iris et de la cornée. C'est au creux de cet angle que sont situés le trabéculum et le canal de Schlemm (Paquet, 1988).

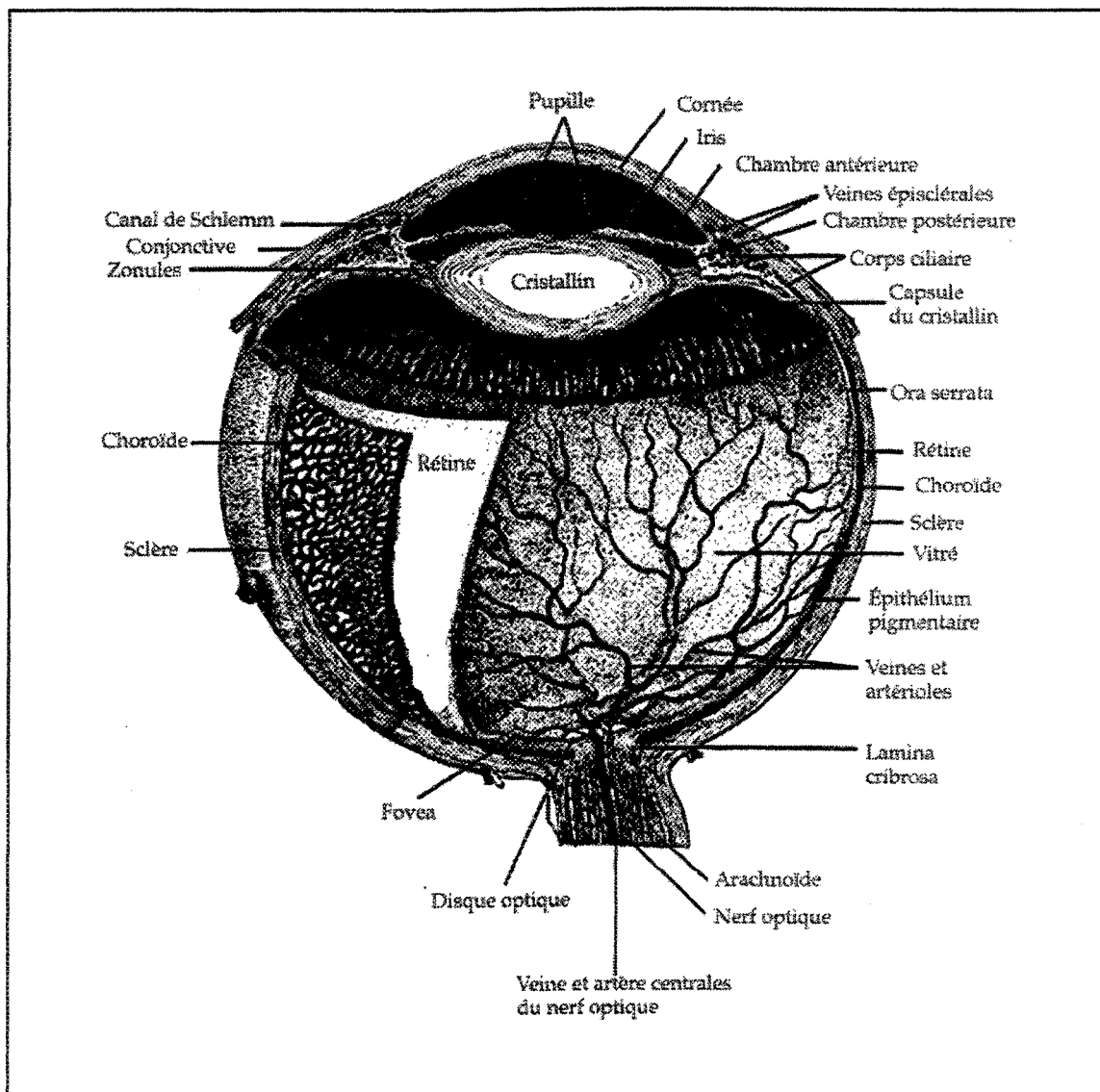


Figure 1. Structures internes de l'oeil humain. Tiré de Vaughan et al., 1995.

I.1.1 Le trabéculum

Le trabéculum, localisé dans l'apex de l'angle, est bordé par l'iris, la racine de l'iris et la cornée (Figure 2). Il est constitué de feuillets perforés et de tissus conjonctifs arrangés concentriquement. Les feuilles varient en épaisseur ($3 - 13\mu$), ont une ouverture variable ($12 - 20\mu$), et sont liées avec des cellules endothéliales contenant des vacuoles géantes. La portion plus à l'extérieur du trabéculum est encerclée par le canal de Schlemm, un grand canal à la jonction de la cornée et de la sclère (Danyluk & Paton, 1992).

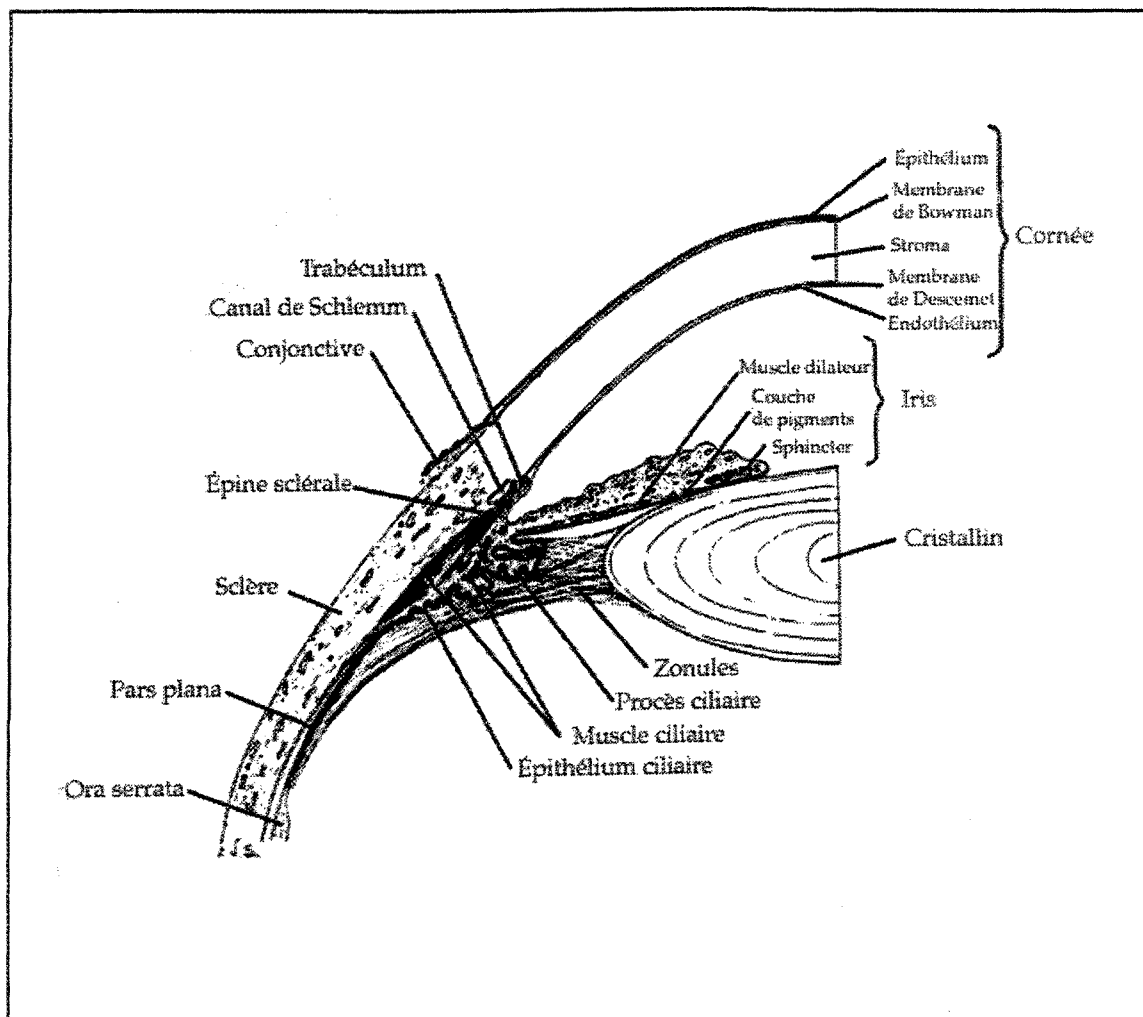


Figure 2. Angle de la chambre antérieure et structures avoisinantes.

Tiré de Vaughan et al., 1995.

Le trabéculum, même normal, est un treillis comprenant des cellules, des débris et des grains de pigments en provenance de la chambre antérieure et ceux-ci peuvent modifier l'écoulement de l'humeur aqueuse. Ces éléments étrangers sont normalement phagocytés et digérés avant d'être éliminés par les voies étroites qui donnent accès au canal de Schlemm. Le trabéculum agit comme un filtre biologique qui retient, digère et élimine tout ce qui est anormal dans l'humeur aqueuse qui le traverse. Toutes les couches du trabéculum participent à ce processus qui s'apparente à celui d'un filtre autonettoyant. Cependant, chez les patients atteints de glaucome, la fonction du trabéculum peut être ralentie (Figure 3) (Demailly, 1989).

Dans l'oeil atteint de glaucome, il y a moins de cellules dans les couches du trabéculum. Les espaces intertrabéculaires, les fibres élastiques sont modifiées et détendues. On note également une diminution du nombre des macrovacuoles au niveau des cellules endothéliales de la paroi interne du canal de Schlemm (Demailly, 1989).

Lors d'une étude de réponse phagocytaire du trabéculum de lapin, suite à une photocoagulation de l'iris, Chisholm et Grierson (1977) ont observé que dans un premier temps, les débris sont entourés par des pseudopodes provenant des cellules endothéliales du canal de Schlemm. Puis ils sont complètement encerclés et digérés par des vacuoles qui se forment par invagination de la membrane cellulaire. Quand ces cellules sont trop encombrées, elles se détachent du trabéculum et deviennent des macrophages circulants qui traversent, chargés de leurs débris digérés, l'endothélium de la paroi interne du canal de Schlemm. Après environ 90 jours, le trabéculum est complètement nettoyé. La phagocytose joue un rôle important pour débarrasser le filtre trabéculaire des éléments étrangers qui l'encombrent. On observe d'ailleurs une résistance supplémentaire quand les capacités de ce

filtre sont dépassées, ce qui suggère son importance dans des circonstances normales (Demailly, 1989).



Figure 3. Trabéculum normal (à gauche) et trabéculum d'un oeil atteint de glaucome primitif à angle ouvert (à droite). Tiré de Demailly, 1989.

I.1.2 Le canal de Schlemm

Le canal de Schlemm est situé dans la gouttière sclérale entre le septum scléral en avant, le trabéculum en arrière et l'éperon scléral à la périphérie. Ce

canal circulaire, parallèle au limbe, de 40 mm de long et d'un diamètre moyen de 200 μm , a la structure histologique d'un vaisseau. Sa lumière est le plus souvent unique mais elle peut se dédoubler sur tout ou une partie de son trajet (Etienne, 1969).

Le canal est bordé par une couche continue de cellules endothéliales qui recouvrent sa paroi interne et sa paroi externe. L'originalité de ces cellules est la présence de vacuoles géantes probablement intracytoplasmiques. La taille et la forme de ces vacuoles sont très variables, leur diamètre est de l'ordre de 2 à 6 μm , pouvant exceptionnellement aller jusqu'à 20 μm . Ces vacuoles ont le plus souvent une ouverture étroite sur leur face trabéculaire. La population des cellules de la paroi interne du canal de Schlemm diminue aussi avec l'âge. Grierson (1984) estime que la perte est de l'ordre de 320 cellules par an pour l'ensemble de la paroi interne du canal, c'est-à-dire une perte de l'ordre de grandeur de celle que l'on constate au niveau de l'endothélium cornéen et des cellules trabéculaires. On observe parallèlement une diminution du nombre de vacuoles avec l'âge (Etienne, 1969).

La couche épithéliale monocellulaire qui borde la paroi interne du canal de Schlemm est certainement le siège d'une résistance à l'écoulement. Ces cellules sont reliées par des jonctions serrées. Tripathi (1976) considère que le passage de l'humeur aqueuse, à travers la barrière endothéliale intacte, est sous la dépendance d'un processus dynamique de vacuolisation endothéliale. Des calculs théoriques (Tripathi, 1973) ont montré que les micropores dynamiques formés par les vacuoles endothéliales pouvaient assurer la facilité d'écoulement normal de l'humeur aqueuse alors que le passage par voie intercellulaire est difficile et quantitativement insignifiant. L'humeur aqueuse vient à bout de la résistance de l'endothélium de la paroi interne du canal de Schlemm grâce à un processus de vacuolisation intracellulaire entretenu par un gradient de pression hydrostatique (Figure 4).

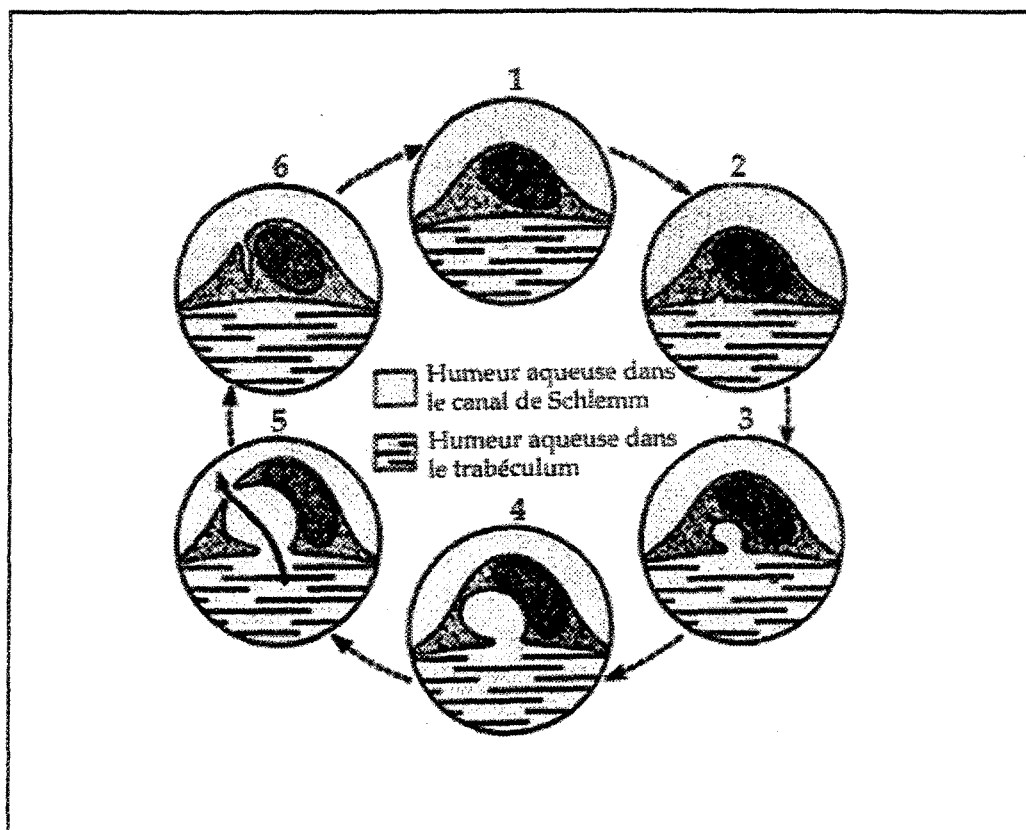


Figure 4. Représentation schématique du cycle de vacuolisation au niveau de l'endothélium de la paroi interne du canal de Schlemm.

Tiré de Demailly, 1989.

Les efférents du canal de Schlemm ou collecteurs externes sont en nombre variable, entre 17 et 35; plus nombreux du côté nasal. Leur calibre varie de celui d'un fin capillaire à celui d'un vaisseau plus large, de la taille d'une veine épisclérale. À la sortie du canal, la plupart des collecteurs s'anastomosent en un plexus intrascléral, de type veineux, formé de très nombreux rameaux qui s'enchevêtrent en tous sens. Il existe aussi une voie directe du canal de Schlemm aux veines épisclérales qui débouchent dans les veines aqueuses (Figure 5). C'est donc dire que le canal de Schlemm communique avec les veines aqueuses soit directement, soit indirectement, par l'intermédiaire du plexus intrascléral (Etienne, 1969).

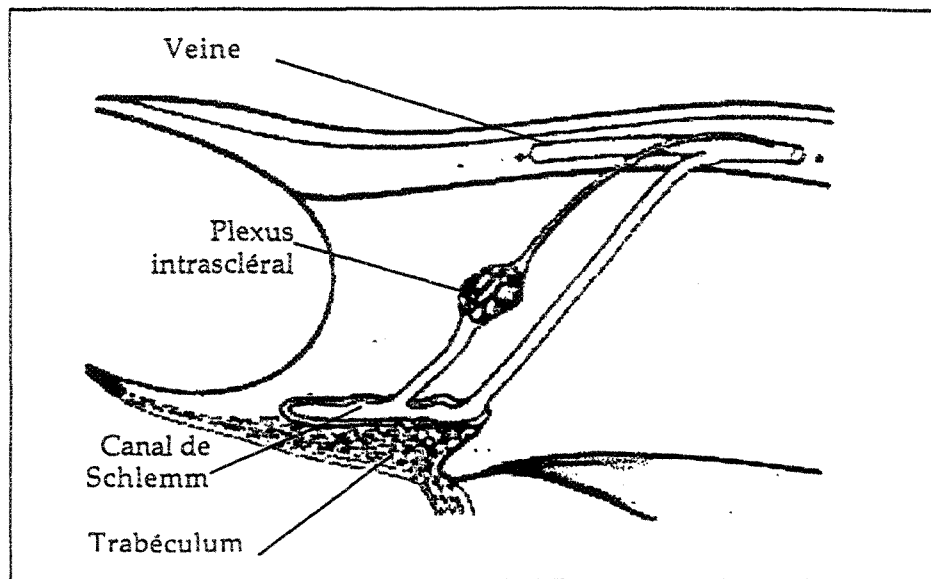


Figure 5. Les efférents du canal de Schlemm: la voie directe vers les veines aqueuses. Tiré de Demailly, 1989.

I.1.3 Le corps ciliaire

D'un point de vue descriptif, le corps ciliaire associe un muscle et une glande étalée en surface, car elle n'a pas de canal excréteur (Etienne, 1969). Le corps ciliaire, une structure triangulaire hautement vascularisée, contient plusieurs groupes de fibres musculaires à sa base et est localisé dans la partie latérale de la chambre postérieure. L'apex du corps ciliaire est composé d'une série de protubérances, ou procès, contenant un noyau de vaisseaux et de tissus conjonctifs recouvert par deux couches de cellules épithéliales. Les procès ciliaires produisent l'humeur aqueuse. La partie musculaire du corps ciliaire contrôle l'accommodation, l'habileté du cristallin à changer le focus et permet aussi à l'iris de se dilater ou de se contracter. Le corps ciliaire est également responsable d'un faible degré d'écoulement de l'humeur aqueuse (Danyluk & Paton, 1992). En arrière, le muscle s'amincit et finit par constituer une sorte de tendon qui ira se perdre dans la choroïde et la suprachoroïde; aux fibres

tendineuses succèdent des fibres élastiques qui amarrent solidement le muscle ciliaire à la choroïde. Le muscle ciliaire est donc tendu, entre 2 insertions, l'une antérieure, se faisant sur l'éperon scléral et l'autre, postérieure, se faisant sur la choroïde.

Comme le tissu est fortement plissé, la surface propre à la sécrétion occupe finalement peu de place, mais si on pouvait l'étaler, elle formerait un glande d'environ 670 m m^2 (Etienne, 1969).

I.2 L'humeur aqueuse: sa formation, son évacuation

L'humeur aqueuse est un liquide clair qui remplit les chambres antérieure et postérieure de l'œil. Elle est produite par le corps ciliaire, à travers différents mécanismes de diffusion, de transport actif et d'écoulement osmotique (Danyluk & Paton, 1992). Un ultrafiltrat de plasma, produit dans le stroma du procès ciliaire, est modifié par la fonction barrière et sécrétoire de l'épithélium ciliaire. Étant déversée dans la chambre postérieure, l'humeur passe à travers la pupille vers la chambre antérieure jusqu'au trabéculum, situé au creux de l'angle iridocornéen et se jette enfin dans le canal de Schlemm. Son volume est d'environ $250 \mu\text{L}$, et son taux de production, lequel est sujet à des variations diurnes, est de $1,5$ à $2 \mu\text{L}/\text{min}$. Sa pression osmotique est légèrement plus élevée que celle du plasma, sauf qu'elle a une plus grande concentration d'ascorbate, de pyruvate et de lactate et une concentration plus faible de protéines ($0,1\%$ par rapport à 7% dans le plasma), d'urée et de glucose. Le glucose a un rôle nutritif vis-à-vis du cristallin et de la cornée. Les bicarbonates jouent le rôle d'une solution tampon et sont en concentration extrêmement variables selon les espèces animales. Les chlorures établissent, par opposition aux bicarbonates, un équilibre électrique.

Il en résulte que l'humeur aqueuse est légèrement hyperosmotique par rapport au plasma, l'excès étant de l'ordre de 3 à 5 mosm/L. Ainsi, l'eau a tendance à quitter le plasma pour gagner l'humeur aqueuse et, dans une proportion différente, le vitré. Si ce phénomène d'osmolarité contribue à l'écoulement du fluide dans l'oeil, son importance est d'emblée réduite, par le fait qu'il se trouve sous la dépendance de la perméabilité relative de la barrière hémato-oculaire, alors que, par ailleurs, la sortie de l'humeur aqueuse par le canal de Schlemm peut se faire avec la plus grande facilité. (Etienne, 1969).

Chez l'individu non glaucomateux, près de 90% de l'humeur aqueuse filtre hors de l'oeil, sous l'effet d'un gradient de pression. L'humeur passe à travers les tissus de l'angle et de la chambre antérieure, s'écoule vers le canal de Schlemm et ses efférents, puis vers les vaisseaux de l'épiscière et de la conjonctive. Cette sortie n'est pas libre mais canalisée, au prix d'une certaine résistance à l'écoulement, au travers de structures anatomiques qui sont les voies principales de l'écoulement. L'élimination de l'humeur aqueuse est assurée, en grande partie (~80%), par la voie trabéculaire. Les 20% restants sont éliminés par la voie uvéosclérale (Demailly, 1989).

I.3 Définition et classification des glaucomes

Le glaucome est une neuropathie optique dans laquelle une dégénérescence des cellules ganglionnaires de la rétine mène à une excavation caractéristique de la tête du nerf optique (Shield et al., 1996). Il existe différents types de glaucome que l'on peut classer en trois catégories: le glaucome à angle ouvert, le glaucome congénital¹ ou développemental et le glaucome à angle fermé (Figure 6). La principale différence entre le glaucome à angle fermé et à angle

¹ Le terme congénital doit être réservé aux cas pour lesquels des signes de glaucome sont présents chez les moins d'un an.

ouvert réside dans la configuration de l'angle irido-cornéen. Ce dernier, situé à la jonction de l'iris et de la cornée, peut varier entre 20 et 45° chez des individus normaux (Paquet, 1988). Les glaucomes associés à une anomalie de développement sont causés par un problème de différenciation embryonnaire (Mears, 1996; Shield, 1996).

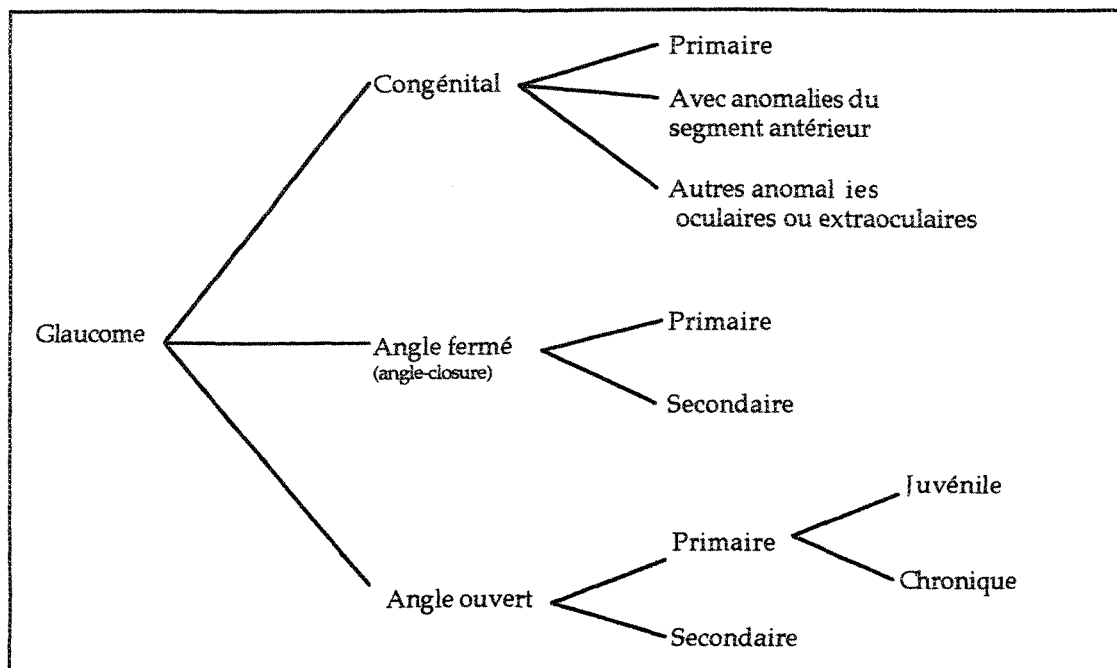


Figure 6. Classification des différents types de glaucome.

Les glaucomes à angle fermé ou à angle ouvert se subdivisent en deux groupes: le glaucome primaire et le glaucome secondaire. Le glaucome primaire n'est relié à aucune autre maladie et la chambre antérieure de l'oeil paraît normale. Il peut survenir à tout âge, de la vie intra-utérine à la vieillesse. La forme juvénile survient généralement chez des individus âgés entre 3 et 35 ans. Le glaucome de l'adulte, qui peut se présenter sous une forme aiguë ou chronique, touche les individus âgés de plus de 35 ans. Le glaucome a souvent un caractère héréditaire et il est responsable d'environ 5% des cas de cécité chez les enfants d'âge scolaire. (Paquet, 1988)

Le glaucome chronique est beaucoup plus fréquent que le glaucome aigu mais l'incidence des deux formes augmente de manière significative après l'âge de quarante ans (Paquet, 1988).

Le glaucome secondaire est associé à une anomalie ou à une maladie de l'oeil, une tumeur intra-oculaire, une hémorragie, un traumatisme; il peut également être attribué à l'effet d'un médicament, telle la cortisone (Paquet, 1988).

I.3.1 Le glaucome à angle ouvert

Le terme angle ouvert précise d'emblée que, pendant toute la maladie, l'angle irido-cornéen restera ouvert et normal. La largeur de l'angle peut se modifier dans le temps par augmentation du volume du cristallin qui double d'épaisseur entre 18 et 80 ans (Demailly, 1989).

On ignore totalement la cause de cette maladie. C'est une neuropathie progressive ayant très probablement une origine au niveau des cellules ganglionnaires de la rétine, et est associée à une maladie du trabéculum sclérocornéen, dont la porosité diminue. La perte des axones rétiniens modifie l'aspect de la papille, créant une excavation très spécifique (Figure 7) qui s'associe à une atteinte du champ visuel débutant entre 5 et 30°. En l'absence de tout traitement, l'affection conduit à la cécité (Demailly, 1989).

Le glaucome primaire à angle ouvert (POAG: primary open-angle glaucoma), qui est en cause dans 60 à 70% de tous les cas de glaucome primaire, est subdivisé en 2 groupes, selon l'âge d'apparition, la sévérité et le mode d'héritabilité. La forme la plus commune est le glaucome chronique à angle ouvert (COAG: chronic open-angle glaucoma), lequel est diagnostiqué après

l'âge de 35 ans environ. Il est caractérisé par une apparition lente et insidieuse (Shield, 1996; Wilson & Martone, 1996). La forme la moins commune, le glaucome juvénile à angle ouvert (JOAG: juvenile open-angle glaucoma), survient habituellement, entre 3 et 35 ans environ. Il se manifeste d'une façon très agressive avec une pression intra-oculaire très élevée, sans anomalies de l'angle (François, 1980).

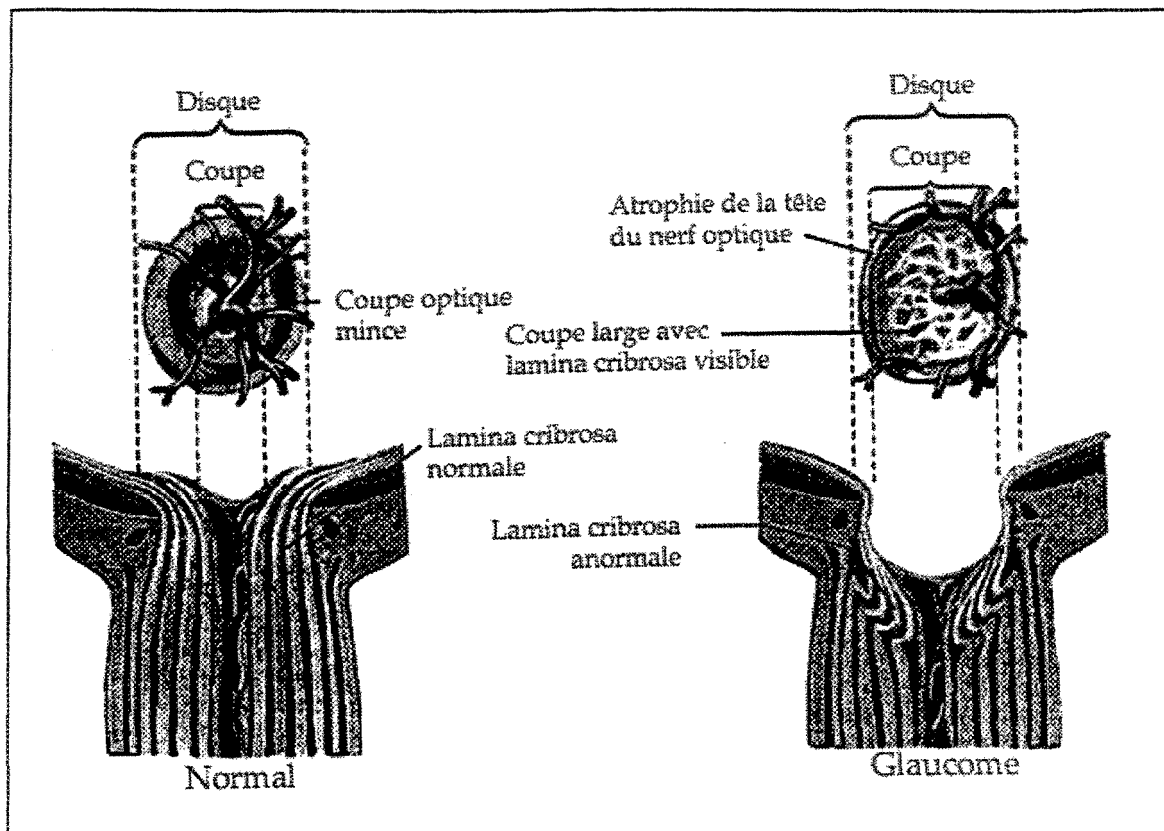


Figure 7. Schématisation de la tête du nerf optique normal (à gauche) et de l'excavation (à droite) de la tête du nerf optique chez un individu souffrant de glaucome. Tiré de Danyluk & Paton (1992).

Un des facteurs qui en conditionnent son évolution est l'hypertension oculaire (HTO) que l'on considérait autrefois comme l'unique cause du

glaucome et qui n'en est plus aujourd'hui qu'un signe fréquent mais facultatif (Demailly, 1989). L'HTO n'est pas un critère de diagnostic du glaucome car, une minorité substantielle d'individus, atteints de glaucome à angle ouvert ont des niveaux de pression intra-oculaire (PIO) tout à fait normaux (Leske, 1983). De plus, Schwartz (1986) a observé que, 6 ans après le diagnostic, 20% des HTO étaient redevenues normales, 13% plus fortes, les autres restant invariables. Ceci démontre l'impossibilité d'un diagnostic positif sur une simple mesure tonométrique.

Pour qu'un diagnostic de glaucome à angle ouvert soit posé, il faut obligatoirement qu'il y ait une détérioration de la papille ou du nerf optique. Souvent, chez les individus atteints de glaucome, on observe également une atteinte des champs visuels ainsi qu'une PIO supérieure à 21 mmHg. Cependant, il se peut qu'il y ait une atteinte papillaire ainsi qu'une perte des champs visuels sans élévation de la PIO. Cette forme clinique est définie comme un glaucome à tension normale. De plus, il est possible que des patients aient une PIO supérieure à 21 mmHg sans dommage au nerf optique. Ils sont alors diagnostiqués hypertensifs oculaires, glaucome suspects ou pré-glaucomateux (Vaughan et al., 1995).

I.3.2 Le glaucome congénital ou développemental

Le glaucome congénital est une forme clinique et génétique clairement distincte des formes juvéniles (Anderson, 1996; Lichter, 1994). Les glaucomes associés à une anomalie du développement sont causés par un problème de différenciation embryonnaire. Cette forme de glaucome peut être subdivisée en 1) glaucome congénital primaire, dans lequel les anomalies développementales sont restreintes à l'angle de la chambre antérieure; 2) les anomalies développementales du segment antérieur - syndrome d'Axenfeld, anomalie de Peter et syndrome de Rieger - dans lesquels le développement

de l'iris et de la cornée sont aussi anormaux; et 3) une variété d'autres conditions - incluant l'aniridie, le syndrome de Sturge-Weber, la neurofibromatose, le syndrome de Lowe, la rubéole congénitale - dans lesquels les anomalies de développement de l'angle sont associées à d'autres anomalies oculaires ou extraoculaires (Vaughan et al., 1995).

L'affection est congénitale dans 1/3 des cas et devient manifeste avant l'âge de 9 mois dans 88% des cas. Sa fréquence est au maximum de 1/15 000 naissances et les sujets masculins sont 2 fois plus atteints que les sujets féminins. Le glaucome congénital est, en outre, manifestement héréditaire dans 20 à 25% des cas et même dans 30 à 40% des cas selon Nakajima et coll. (1979). C'est une affection bilatérale dans 75 à 80% des cas (Demailly, 1989).

Le glaucome congénital se transmet souvent suivant un mode autosomal récessif, ayant une pénétrance variable (40 à 100%). La principale caractéristique clinique est l'agrandissement du globe oculaire, la buphthalmie, qui se produit lorsque la PIO s'élève (Bejjani et al., 1998). Deux loci ont présentement été associés au glaucome congénital: GLC3A (2p21) (Sarfarazi 1995) et GLC3B (1p36) (Arkasu 1996).

Les cas sporadiques (isolés) de glaucome congénital peuvent être expliqués par: une hérédité autosomale récessive, une nouvelle mutation, un manque de pénétrance, qui ne peut dépasser 40%, la rareté relative du gène en cause et l'existence de phénocopies (François, 1980).

1.3.3 Le glaucome à angle fermé (angle-closure)

Le glaucome à angle fermé reste relativement fréquent puisqu'il représente plus de 10% de l'ensemble des glaucomes primitifs ou secondaires. Il peut être défini comme une "hypertonie oculaire apparaissant lorsque l'angle

iridocornéen se ferme, déclenchant un syndrome douloureux plus ou moins accusé et susceptible d'entraîner la perte fonctionnelle du globe" (Perdriel, 1983).

Les yeux prédisposés au glaucome par fermeture de l'angle ont des caractéristiques biométriques bien déterminées et souvent héréditaires. La tension oculaire s'élève sous l'influence de facteurs déclenchants. Les mesures optiques actuelles prouvent l'existence d'une corrélation entre la profondeur de la chambre antérieure et la probabilité de développer une hypertonie par fermeture de l'angle. D'après Lowe (1972), cette probabilité est une certitude si la profondeur de la chambre antérieure est inférieure à 1,5 mm. Par contre, cette probabilité est pratiquement inexistante si la profondeur de la chambre antérieure est supérieure à 2,5 mm (Tableau 1).

Tableau 1. Corrélation entre la profondeur de la chambre antérieure et la fréquence de glaucome par fermeture de l'angle (D'après Lowe, 1972)

Profondeur de la chambre antérieure (mm)	Fréquence de glaucome par fermeture de l'angle (%)
2,2-2,3	1
2,0-2,1	3
1,8-1,9	11-14
1,6-1,7	33-40
1,4-1,5	33
1,1-1,3	100

Le glaucome par fermeture de l'angle survient d'autre part avec une fréquence particulière dans les yeux hypermétropes, c'est-à-dire dans les yeux dont la longueur axiale est diminuée.

Le premier phénomène physiopathologique du glaucome à angle fermé est le blocage pupillaire. Il existe chaque fois que l'arc de contact de la face antérieure du cristallin et de la face postérieure de l'iris est anatomiquement important, ce qui se produit avant tout sur les yeux qui ont une chambre antérieure étroite. Ils constituent 5% environ des yeux examinés pour troubles de la réfraction. Une faible proportion de ces yeux aura un jour un glaucome par fermeture de l'angle (figure 8), car il faut qu'un mécanisme neurogène intervienne pour transformer un blocage pupillaire relatif en blocage absolu: ceci ne peut se faire que par une perturbation de l'innervation des muscles iriens et/ou du muscle ciliaire.

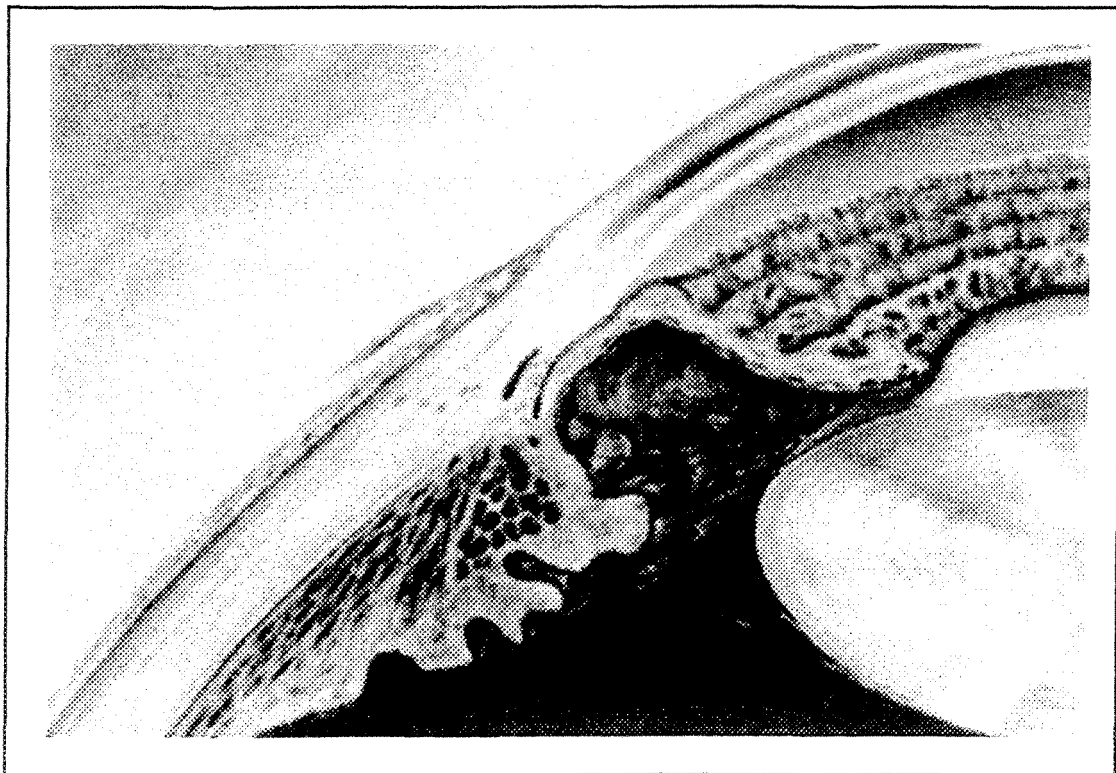


Figure 8. Glaucome à angle fermé. La fermeture est due à la projection de la racine de l'iris sur le trabéculum (Tiré de Etienne, 1984).

Lorsque, dans un premier temps, le blocage de la pupille s'est accru, l'humeur aqueuse située dans la chambre antérieure va s'évacuer par les émonctoires trabéculaires. La pression diminuera donc dans la chambre antérieure au moment même où elle reste élevée en amont de la pupille. La périphérie de l'iris viendra s'appliquer sur le trabéculum et se constituera alors le blocage trabéculaire dont la première conséquence sera une hypertension oculaire. On peut remarquer que, si la pupille est totalement dilatée, il n'y a pas de blocage pupillaire possible parce qu'en périphérie, l'iris et le cristallin n'entrent plus en contact (Etienne, 1983).

I.4 Épidémiologie du glaucome primaire à angle ouvert

Dans la population mondiale, environ 5,2 millions de gens sont aveugles à cause du glaucome (Thylefors & Negrel, 1994) et on prévoit qu'il y en aura environ 6,7 millions en l'an 2000, faisant de cette affection, la deuxième cause de cécité au monde après les cataractes (Quigley, 1996) et la première chez les Afro-américains (Klein et al., 1992). On estime que la prévalence du glaucome à angle ouvert est de 2% chez les individus de plus de 40 ans et peut s'élever jusqu'à 6% chez les plus de 60 ans (Leske, 1983). Cependant, selon les critères de diagnostic utilisés, l'incidence de la maladie peut varier. En effet, certains diagnostics de glaucome à angle ouvert sont basés sur une simple augmentation de la TIO sans autres manifestations alors que dans d'autres cas, l'excavation papillaire et les déficits caractéristiques des champs visuels sont nécessaires au diagnostic. On peut cependant dire que l'incidence chez les plus de 40 ans se situe entre 1 et 2% par année (François, 1980).

Bien que l'HTO est reconnu comme un des plus importants facteurs de risque (Quigley & Vitale, 1997), il a été démontré que l'âge est tout aussi important et les personnes de plus de 60 ans sont environ 7 fois plus touchées que les moins de 40 ans. De plus, l'incidence et la prévalence sont augmentées de 4

fois chez les gens de race noire (Leske, 1983). Une histoire familiale de glaucome augmente également le risque, pour un enfant ou un parent de second degré d'un sujet atteint de glaucome, de 10 à 40%, en tenant compte de la pénétrance qui peut être variable (François, 1980).

La transmission de cette maladie s'effectue surtout sous un mode autosomal dominant avec une pénétrance assez élevée (Johnson et al., 1993) pouvant varier de 60 à 100% (François, 1980). Plusieurs localisations chromosomiques ont été cartographiées sur le génome (Tableau 2). Le premier gène (GLC1A) causant une forme sévère de POAG fut localisé sur le chromosome 1 (1q23-q25) par Sheffield et al. (1993). Ce gène est également appelé TIGR (trabecular meshwork induced response protein) ou MYOC (myocilin).

Tableau 2. Différentes localisations chromosomiques reliées au glaucome

Locus*	Type de glaucome	Localisations	Références
GLC1A	Juvenile/ chronique	1q23-q25	Sheffield et al. 1993 Morissette et al. 1995
GLC1B	chronique	2cen-q13	Stoilova et al. 1996
GLC1C	chronique	3q21-q24	Wirtz et al. 1997
GLC1D	chronique	8q23	Trifan et al. 1998
GLC1E	chronique	10p15-p14	Sarfarazi et al. 1998
GLC1F	chronique	7q35-q36	Wirtz et al. 1999

* GLC: Abréviation pour glaucome
 1: Glaucome à angle ouvert
 A-F: Ordre de localisation

Le gène TIGR est composé de 3 exons, a un poids moléculaire de 57 kilo daltons (Kubota et al., 1998) et encode une protéine de 504 acides aminés (Fingert et al., 1998b) (Figure 9). On retrouve TIGR en grande quantité dans le trabéculum et son ARNm a été détecté dans les cellules photoréceptrices

(Kubota et al., 1997), le corps ciliaire, l'iris, le muscle squelettique et dans le muscle cardiaque (Ortego et al., 1997).

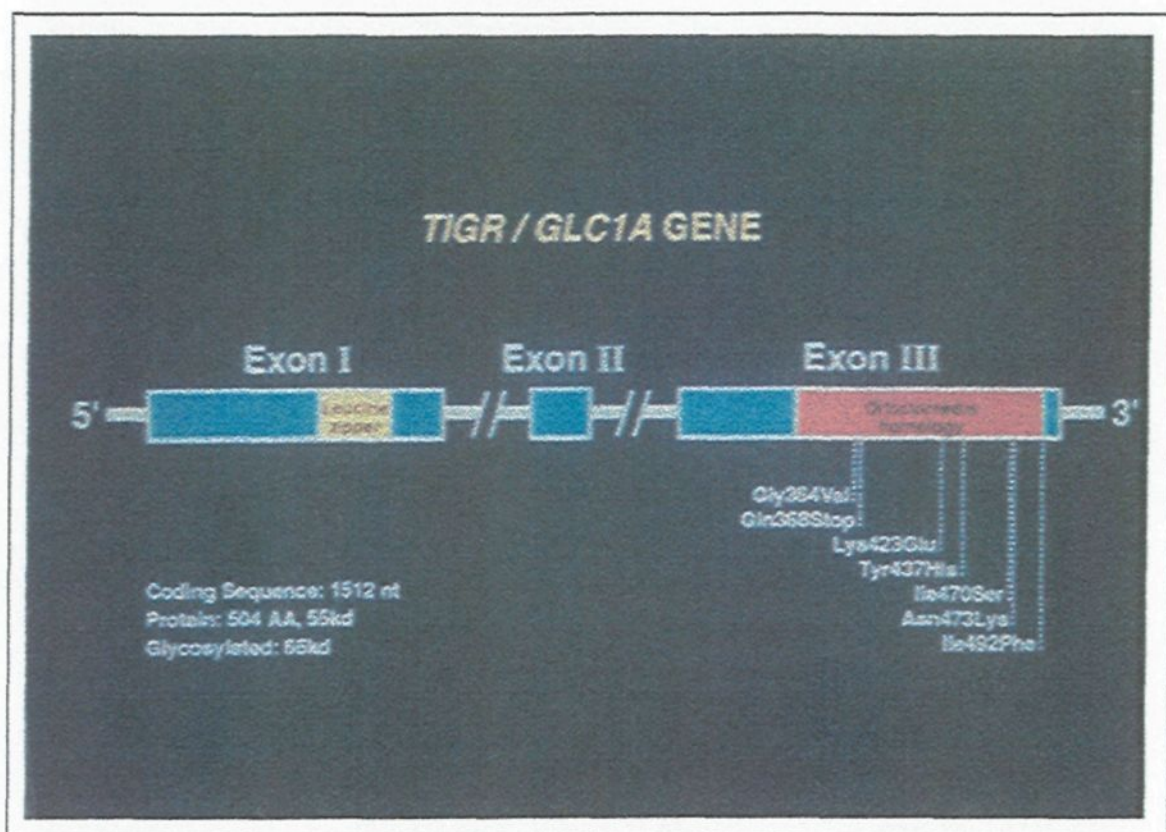


Figure 9. Schématisation du gène TIGR/MYOC.

Cependant, la fonction exacte du gène n'est pas connue mais une étude récente a démontré que la protéine du gène TIGR est plus abondante dans le trabéculum des yeux de glaucomateux que chez les yeux d'individus normaux (Lütjen-Drecoll et al., 1998). Le gène TIGR contient une région que l'on nomme leucine zipper, qui permet entre autre à deux protéines d'interagir ensemble et de s'enrouler, formant ainsi un dimère (Alber, 1992). Le gène contient également un domaine de 25% d'homologie avec la chaîne de myosine et un autre de 40% d'homologie avec l'olfactomedine (Kubota et al., 1998). Depuis l'identification du gène TIGR, 50 mutations ont été reliées au POAG (Tableau 3).

Tableau 3. Mutations responsables de glaucome primaire à angle ouvert identifiées dans le gène TIGR/MYOC

Mutations	Références	Mutations	Références
Cys9ser	19	1171GACA→T	15
Gly12Arg	11	Ser393Arg	11
Gln19His	1,11,19	396INS397	1
Arg46Stop	11,12	Lys398Arg	5
Asn73Ser	19	Arg422Cys	19
Arg82Cys	1,11,19	Arg422His	1,19
Ser203Phe	13	Lys423Glu	10,19
Asp208Glu	11	Val426Phe	3,8,13,19
Gly246Arg	2,3,19,20	Gly434Ser	14
Gly252Arg	3,13,19	Tyr437His	1,6,11,17,19,21
Trp286Arg	1,11,19	Ala445Val	1,11,19
Thr293Lys	1,11,19	Asn450Asp	14
Glu308Stop	14	1bpDELcodon453	11
Glu323Lys	13,19	Ile465Met	11
Gln337Arg	4,5,19	Arg470Cys	1,11,14,19
Glu352Lys	11,13,19	Tyr473Cys	19
Thr353Ile	11,12	Ile477Ser	1,2,3,11,13,19,20
Pro361Ser	1,11,19	Ile477Asn	16,19
Glu364Val	1,6,11,19,21	Asn480Lys	2,18,19,20
Gly367Arg	7,8,9,14,19	Pro481Thr	11
Gln368Stop	1,5,6,11,17	Glu483Stop	11
Pro370Leu	2,7,9,13,14,17,19,20	Val495Ile	19
Thr377Met	1,11,17,19	Ile499Phe	2,19,20
Asp380Gly	1,19	Lys500Arg	1,19
Asp380Ala	5,22,23	Ser502Pro	5,22

Références

1. Alward et al. 1998
2. Adam et al. 1997
3. Rozsa et al. 1998a
4. Stoilova et al. 1997
5. Stoilova et al. 1998a
6. Stone et al. 1997
7. Suzuki et al. 1997
8. Mansergh et al. 1998
9. Michels-Rautenstrauss et al. 1998
10. Morissette et al. 1998
11. Finghert et al. 1998a
12. Yoon et al. 1998
13. Rozsa et al. 1998c
14. Michels-Rautenstrauss et al. 1998
15. Angius et al. 1998
16. Richard et al. 1998
17. Wiggs et al. 1998
18. Brezin et al. 1998
19. Rozsa et al. 1998b
20. Adams et al. 1997
21. Stone et al. 1997
22. Stoilova et al. 1998b
23. Kennan et al. 1998

I.5 L'analyse de liaison génétique

I.5.1 Les bases biologiques de la génétique

Pour une espèce donnée, le génome est globalement semblable pour tous les individus. Il existe cependant des variations entre génomes d'individus différents: c'est le polymorphisme. Il peut être silencieux ou se manifester par la modification d'un caractère observable et quelques fois induire un dysfonctionnement grave de l'organisme (maladie génétique) (Bernot, 1996). De façon stricte, on considère qu'un locus est polymorphique lorsque la fréquence de l'allèle le plus commun de ce locus est inférieure à 0,99 dans la population.

Le mot gène est un terme général définissant l'entité physique transmise des parents aux enfants, lors du processus de reproduction. C'est le matériel héréditaire. Toutes les formes différentes d'un gène, y compris la forme normale, sont appelées des allèles. Les gènes sont arrangés linéairement le long de corps filamenteux microscopiques, les chromosomes, et la position d'un gène le long de la paire de chromosome homologue est le locus. Si les 2 allèles sont chimiquement identiques, l'individu est homozygote au locus considéré; si les 2 allèles sont chimiquement différents, l'individu est hétérozygote (Hartl, 1994).

À la méiose, la répartition des chromosomes homologues se produit au hasard, c'est-à-dire que les membres paternel et maternel de chaque paire de chromosomes homologues subissent une ségrégation indépendante. Cependant, la plupart des cellules en méiose sont le siège d'un autre événement génétique capital. Avant la première division méiotique, les chromosomes homologues s'adosent l'un à l'autre et c'est à ce moment qu'une recombinaison peut s'effectuer entre les chromatides sœurs. Cet

échange de matériel entre chromosome est le *crossing-over* ou recombinaison génétique (Darnell et al., 1993). Cependant, les recombinaisons ne surviennent pas avec la même fréquence dans toutes les régions du génome humain mais préférentiellement dans des régions que l'on qualifie de points chauds de recombinaisons, ou "hot spot" (Kaplan & Delpech, 1989). De plus, les recombinaisons sont plus fréquentes chez la femme (Watson et al., 1994).

La fréquence des recombinaisons méiotiques permet de définir la distance génétique dont l'unité est le Morgan (M). Un Morgan correspond à la longueur chromosomique moyenne où il doit obligatoirement y avoir une recombinaison. Le centiMorgan représente le centième de cette distance et correspond à une fréquence de recombinaison de 1% (1 recombinaison pour 100 méioses). Les recombinaisons se produisent de façon aléatoire et imprévisible, cependant, elles obéissent à une loi statistique et la probabilité de recombinaison entre 2 loci est proportionnelle en moyenne à la distance physique qui les sépare; plus la distance est grande entre 2 loci, plus les chances de recombinaisons sont grandes. Lorsqu'un gène de susceptibilité et un marqueur se retrouvent près l'un de l'autre, on dit qu'ils sont liés car ils seront presque toujours transmis ensemble (Terwilliger & Ott, 1994).

I.5.2 Les marqueurs microsatellites

L'identification de la transmission d'un marqueur génétique est effectuée par la caractérisation de ses différents allèles, qui sont des polymorphismes de la séquence d'ADN. Quatre types de marqueurs ont été développés jusqu'à maintenant: les RFLP (restriction fragment length polymorphism), les minisatellites ou VNTR (variable number tandem repeat), les microsatellites et plus récemment les SNP (single nucleotide polymorphism).

Un RFLP est un fragment d'ADN génomique humain cloné qui, lorsqu'il est utilisé comme sonde sur de l'ADN génomique humain digéré par une enzyme de restriction, détecte des fragments dont la taille est différente selon les individus. Le polymorphisme d'un RFLP peut provenir d'une mutation dans un site de restriction ou d'une délétion ou encore d'une insertion entre deux sites de restriction (Bernot, 1996). Les minisatellites ou VNTR sont constituées de séquences d'une longueur de 15 à 100 paires de base et le polymorphisme des VNTR provient de la variation du nombre de répétitions de ces séquences (Watson et al., 1994).

Les marqueurs microsatellites sont constitués de très courtes séquences d'ADN, soit moins de 4 nucléotides, répétées en tandem (10 à 15 répétitions). Chaque microsatellite correspond à un locus unique dans le génome, parfaitement défini par les séquences uniques qui encadrent la répétition. Le polymorphisme de ces marqueurs est dû à la variation dans la longueur des séquences répétées d'un individu à l'autre et la longueur des répétitions identifie les allèles correspondants de chacun des loci étudiés (figure 10). C'est avec ces variations de longueur que l'on peut attribuer les allèles à chacun des individus (génotype) faisant partie d'une étude d'analyse de liaison. Les avantages de ces marqueurs microsatellites sont: leur haut degré de polymorphisme et leur répartition uniforme sur l'ensemble du génome (Bernot, 1996). Le laboratoire Généthon a développé et cartographié plus de 5200 marqueurs microsatellites de type $(CA)_n$ à partir du génome humain (Dib et al., 1996).

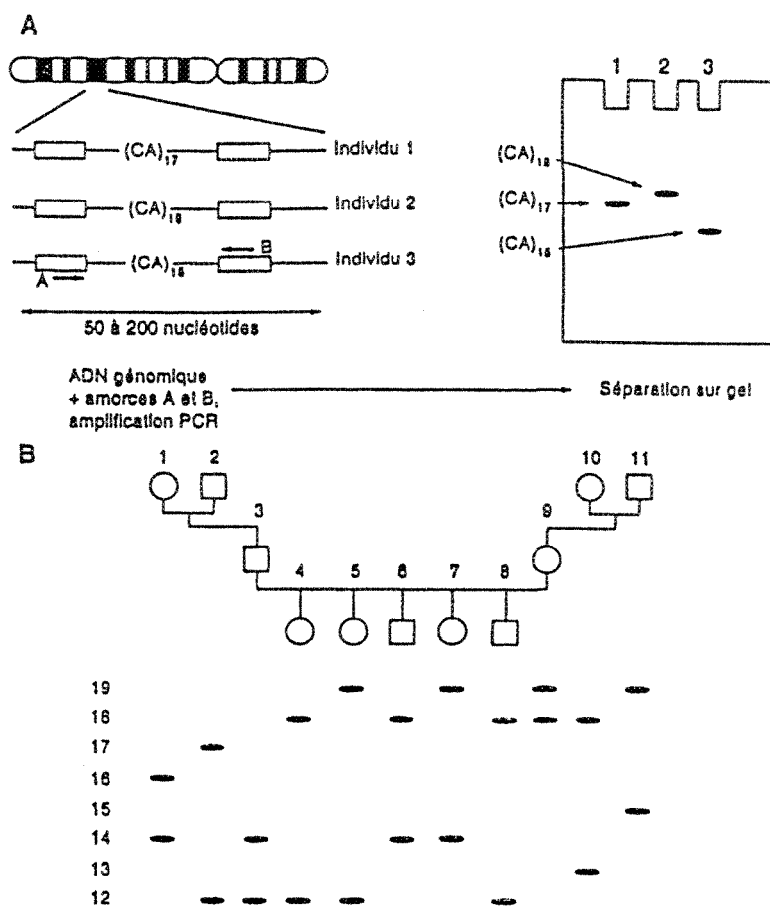


Figure 10. Le génotypage par microsatellites. **A)** Différences alléliques entre les séquences microsatellites. Le dinucléotide CA est répété 17 fois pour l'individu 1, 18 fois pour l'individu 2 et 15 fois pour l'individu 3. **B)** Exemple de génotypage de microsatellites chez une famille. La taille du microsatellite est évaluée par électrophorèse et l'attribution des différents allèles peut être ainsi effectuée.

I.5.3 Les analyses statistiques

Les différents génotypes obtenus lors des études chez des familles atteintes d'une maladie peuvent être analysés statistiquement afin de localiser un gène responsable de cette maladie par rapport à un marqueur génétique dont on connaît la position chromosomique. La méthode statistique utilisée a été

élaborée par Morton en 1955 et consiste à évaluer le rapport de vraisemblance entre deux hypothèses: la probabilité de la vraisemblance avec une fraction de recombinaison $\theta < 0,5$ sur la probabilité de la vraisemblance avec $\theta = 0,5$. On utilise plus précisément le logarithme en base 10 de ce rapport et cette statistique est appelée le Lodscore, qui est symbolisé par Z . On peut écrire cet estimateur sous la forme de l'équation suivante: $Z_{(\theta)} = \text{Log}_{10} L_{(\theta)} / L_{(\theta=0,5)}$ où $L_{(\theta)}$ symbolise la vraisemblance. Comme nous ne connaissons pas la position du locus au départ, le Lodscore est calculé pour plusieurs valeurs de θ comprises entre 0 et 0,5. La valeur du Lodscore maximal (Z_{max}) indique la fraction de recombinaison pour laquelle la vraisemblance est optimale (Ott, 1991).

Lors d'une étude de liaison, 3 règles générales sont acceptées:

- A) Il y a absence de liaison génétique si $Z_{\text{max}} < -2$
- B) On peut conclure à une liaison génétique significative si $Z_{\text{max}} > 3$.
À ce moment-là, la probabilité de la vraisemblance est 1000 fois plus élevée pour $\theta < 0,5$ que celle de $\theta = 0,5$
- C) Si $0 < Z_{\text{max}} < 3$, la liaison génétique ne peut être ni exclue, ni affirmée. Si Z_{max} est négatif, la tendance se dirige vers l'exclusion d'une liaison, s'il est positif, vers un potentiel de liaison.

(Terwilliger et Ott, 1994)

En utilisant le progiciel LINKAGE développé par Lathrop (Lathrop et al., 1984), il est possible d'évaluer la probabilité, dans un pedigree donné, d'une fraction de recombinaison entre 2 loci (Morton, 1955). Le calcul de Lodscore nous permet, d'une part, de tester statistiquement s'il y a liaison et d'autre part d'évaluer la distance entre un marqueur génétique et un locus maladie. Pour une maladie mendélienne simple, quand $Z_{\text{max}} > 3$, l'hypothèse de liaison indique que la probabilité de la vraisemblance $L_{(\theta)}$ est 1000 fois plus grande que la vraisemblance $L_{(\theta=0,5)}$; on affirme alors que la liaison est

statistiquement significative. La valeur de θ associée permet en plus d'estimer la distance entre le locus de la maladie et le marqueur utilisé (Ott, 1991).

I.6 Les avantages de la population québécoise

L'étude de maladies héréditaires avec les familles du Québec est grandement facilitée par les avantages suivants. 1) De grandes familles étendues sur 3 ou 4 générations; 2) Des registres de très grande qualité comportant des actes de naissances, de mariages et de décès remontant jusqu'au XVII^e siècle; 3) Un système de santé gratuit et universel (Bouchard, 1990).

De plus, avec l'apparition de SOREP, maintenant devenu l'IREP (Institut interuniversitaire de recherches sur les populations), il est de plus en plus facile de faire des reconstitutions généalogiques. Un des objectifs du centre est de poursuivre le développement et l'exploitation d'une banque de données qui prend la forme d'un fichier-réseau de population.

Le fichier-réseau BALSAC est une base de données, gérée par le logiciel INGRES. À partir de ce logiciel, on peut entreprendre une construction automatique des généalogies ascendantes et descendantes. On peut également effectuer le calcul des principaux coefficients pour l'analyse de la parenté (ϕ), de la consanguinité (F), de la profondeur généalogiques... On peut également comparer les familles étudiées avec un groupe de cas-témoin afin d'évaluer ces paramètres (Bouchard, 1987).

1.7 Objectifs de l'étude

Le groupe de recherche du Dr. Vincent Raymond a identifié 2 mutations chez 2 familles québécoises originaires de l'est du Québec atteintes de glaucome. Ces 2 mutations apportent un phénotype différent (glaucome juvénile et glaucome chronique) même si elles sont situées sur le même gène défectueux, le gène TIGR situé au locus GLC1A.

Dans ce projet de recherche, nous visons la réalisation des objectifs suivants:

- 1- Valider la présence des deux mutations chez des cas sporadiques recrutés dans différentes régions du Québec;
- 2- Étudier l'origine de ces deux mutations ainsi que leur répartition;
- 3- Réaliser une analyse généalogique chez les cas sporadiques qui résident dans l'est du Québec;
- 4- Évaluer l'âge d'apparition de la maladie chez les sujets atteints;
- 5- Établir une corrélation génotype/phénotype chez les deux familles étudiées.

CHAPITRE II

METHODOLOGIE

II.1 Recrutement

L'étude débute par l'identification d'un probant (proposant ou égo) atteint de glaucome. Cette première étape est réalisable grâce aux ophtalmologistes qui nous réfèrent des patients. Après s'être assuré que le probant est informé au sujet de l'étude et qu'il accepte d'y participer, il doit contacter tous les autres membres de la familles et demander leur participation. Tout membre qui accepte sera, par la suite, contacté par l'infirmière en charge du recrutement. Lors d'une clinique de recrutement, nous recueillons toutes les informations nécessaires afin de poser un premier diagnostique, de cibler des individus-clés et faire l'histoire familiale en relation avec la maladie. Tous les individus qui acceptent de participer à l'étude doivent obligatoirement signer un formulaire de consentement, conforme aux règles d'éthique.

II.2 Procédures généalogiques

Dans une étude d'épidémiologie génétique, il devient important d'effectuer la reconstitution généalogique de la famille. Plusieurs outils sont utilisés tels, les registres d'état civil, les Archives nationales du Québec, les registres civils, différents volumes généalogiques ainsi que le fichier-réseau BALSAC de l'IREP qui contient, entre autres, une base de données généalogiques étendue à la grandeur du Québec. Lorsque les généalogies sont complétées, des analyses descriptives peuvent être effectuées ainsi que des calculs portant sur la consanguinité et l'apparentement des proposants.

II.3 Les analyses généalogiques

Les analyses généalogiques effectuées dans le cadre de ce mémoire ont été entièrement effectuées par un programme d'analyses élaboré à l'IREP. Celui-ci est un ensemble de commandes et de programmes comprenant 3 sous-ensembles destinés à l'entrée, la validation et l'analyse des données. Lors d'analyses effectuées sur un groupe d'ascendances, il est possible de calculer plusieurs coefficients et plusieurs paramètres. Dans le cadre de cette recherche, les paramètres suivants ont été étudiés:

- la complétude ou exhaustivité des ascendances;
- la consanguinité;
- la répartition géographique des proposants;
- l'apparentement.

II.3.1 La complétude ou exhaustivité des ascendances.

La complétude (exhaustivité) permet de comparer les généalogies reconstituées à celles que l'on devrait obtenir théoriquement en terme de quantité d'ancêtres, si on arrivait à les identifier tous, à toutes les générations

(Jetté, 1991). On calcule l'exhaustivité à la génération x selon la formule suivante:

$$C_x = \frac{\text{nb. d'ascendants connus}}{\text{nb. d'ascendants attendus}}$$

II.3.2 La consanguinité

La consanguinité concerne les unions entre individus apparentés et elle augmente l'homozygotie dans une population (Hartl, 1994). Le coefficient de consanguinité (F) est la probabilité que les 2 allèles que porte un individu en un locus déterminé soient identiques par ascendance et hérités d'un ancêtre commun à son père et sa mère (Malécot, 1966). On peut calculer le coefficient de consanguinité de chacun des égos (F_s) selon la formule suivante (Tremblay et al., 1998):

$$F_s = \sum_{b=1}^N (1/2)^{i_b} (1+F_{A_b})$$

où: S = égo

N = nombre de boucles de consanguinité

i_b = nombre d'individus présents dans chaque boucle

A_b = ancêtre commun dans chaque boucle

La sommation s'effectue sur toutes les boucles de consanguinité possibles pour tous les ancêtres communs. Dans ce cas-ci, $1+F_{A_b}$ est toujours égal à 1, car la possibilité que certains ancêtres soient eux-même issus d'une union consanguine n'est pas prise en compte. Ceci peut conduire à une légère sous-estimation des coefficients de consanguinité des individus.

Le programme utilisé calcule aussi le coefficient moyen de la population traitée, c'est-à-dire les 36 généalogies utilisées pour ce mémoire. Dans l'espèce humaine, le degré de consanguinité le plus proche qui existe entre conjoints dans la plupart des sociétés se manifeste par les mariages entre cousins germains, où le coefficient (F) atteint une valeur de 1/16 ou 0,0625 (Hartl, 1994). Pendant longtemps nous avons pensé que la fréquence des mariages consanguins était très élevée dans la région de Charlevoix, cependant, seulement 0,5 % des mariages de ce type ont été rapportés dans cette région, pour la période de 1778-1802. À cette époque, l'Église catholique exerçait de fortes pressions sociales afin de freiner les unions entre conjoints de parenté rapprochée. On observe, en effet, aucun mariage oncle-nièce ou tante-neveu, et très peu de mariages entre cousins germains pour cette période (Morissette, 1990). Dans les registres paroissiaux, lors d'un mariage consanguin, le prêtre apposait toujours le degré de parenté des conjoints. Le tableau 4 représente l'équivalence du coefficient de consanguinité à ce degré de parenté.

Tableau 4. Équivalence des codes de consanguinité
(Tiré de Bouchard & De Braekeleer, 1990)

Codes	Degré de parenté	Coefficient de consanguinité (F)
1	2:2	0,0625
2	2:3	0,03125
3	3:3	0,015625
4	3:4	0,0078125
5	4:4	0,00390625
6	4:5	0,00195315
7	5:5	0,0009765
8	1:2	0,125

II.3.3 L'apparentement

L'apparentement est la probabilité qu'un allèle choisi au hasard à un locus chez un individu soit identique par ascendance (hérité d'un ancêtre commun) à un allèle pris au hasard au même locus chez un deuxième individu (d'une autre ascendance). Le coefficient d'apparentement de chaque paire d'égo (ϕ_{xy}) a été calculé selon la formule suivante (Tremblay et al., 1998):

$$\phi_{xy} = \sum_{b=1}^N (1/2)^{G_{xb}+G_{yb}+1}$$

où: X et Y = égos

N = nombre de boucles d'apparentement

G_{xb} et G_{yb} = nombre de générations qui séparent X et Y de l'ancêtre commun dans chaque boucle.

Le programme utilisé calcule également le coefficient moyen de la population traitée.

II.4 Procédures diagnostiques

Tout participant doit passer un test chez un ophtalmologiste afin de détecter toutes les anormalités oculaires qui peuvent survenir dans l'angle irido-cornéen, au niveau des champs visuels ou encore à la papille optique. Les tensions intraoculaires sont également évaluées afin de dépister la moindre anormalité. Dans cette étude, le diagnostic de glaucome à angle ouvert est fait après avoir observé une détérioration papillaire. Un champs visuel diminué ou une pression intraoculaire supérieure à 21 mmHg sont également notés.

II.5 Ponction veineuse

Tous les sujets voulant participer à l'étude reçoivent, à domicile ou au centre hospitalier, la visite d'une infirmière qui procède à une ponction veineuse. Habituellement, trois tubes héparinés de 10cc sont prélevés. Deux servant à l'extraction de l'ADN génomique et l'autre à l'immortalisation cellulaire lorsque nécessaire. Cette dernière technique est effectuée afin de ne pas reprendre la ponction ou encore d'éviter de perdre l'information précieuse de certains sujets clés.

II.6 Immortalisation cellulaire et extraction de l'ADN génomique

II.6.1 Immortalisation cellulaire

Pour cette technique d'immortalisation, il faut verser le tube de sang hépariné dans un falcon 50 mL et compléter à 15 mL avec du PBS 1X. Ensuite, une partie de ce mélange sanguin est versé lentement dans un autre tube contenant 10 mL de Ficoll. Grâce à une centrifugation, le sang est séparé en plusieurs couches, et les lymphocytes peuvent être récupérés. D'autres centrifugations sont nécessaires et les cellules sont suspendues à nouveau dans du RPMI-15 pour ensuite être comptées sur un hémacymètre.

Pour chaque million de cellules, 1 million de virus Epstein barr sont ajoutés. Ce mélange cellules-virus est distribué dans des puits et incubé à 37°C avec 5% de CO₂ afin de faciliter la croissance cellulaire. Lorsque les cellules sont en quantité suffisante, on peut les congeler pour une durée illimitée.

II.6.2 Extraction de l'ADN génomique à partir du sang

Pour effectuer cette technique, le sang doit préalablement être transféré dans un Falcon 50 mL et être congelé de 24 à 48 heures. Il est ensuite décongelé lentement à 37°C. Plusieurs centrifugations sont effectuées avec du TE 10:10 constitué de 1M Tris et 0,5M EDTA (acide éthylène-diamine-tétracétique). On laisse reposer sur glace 30 minutes et ensuite, on effectue une centrifugation à 3500 tours pendant 15 minutes. Le surnageant est décanté dans un récipient contenant de l'eau de javel et de l'eau 1:1. Le culot est ensuite homogénéisé au vortex avec 15 mL de TE 10:10 froid, puis, complété par la suite à 50 mL. On laisse reposer sur glace 10 minutes et on effectue une autre centrifugation identique à la précédente. Le surnageant est décanté une fois de plus et on ajoute au culot 14 mL de Guanidine-HCl 6 M et 1 mL d'acétate d'ammonium 7,5 M. On fait agiter le tout 1 heure à la température de la pièce et 1 heure à 37°C. Après ces 2 heures, on ajoute 1 mL de Sarcosine 20% et 200 à 300 μ L de Protéinase-K (10 ng/mL), selon la grosseur du culot. On incube alors à 37°C toute la nuit.

Le lendemain, les tubes sont sortis et chambrés à la température de la pièce. Puis, l'ADN est précipité en complétant le volume avec de l'éthanol 95%. Ensuite, les tubes sont inversés jusqu'à l'apparition d'un flocon blanc (ADN). Le flocon est récupéré et déposé dans un tube frais. Le culot est lavé 2 fois avec de l'éthanol 70% afin de resolubiliser les sels et les parois du tubes sont bien asséchées afin d'éliminer les traces d'éthanol. Trois mL de TE 10:1 sont ensuite ajoutés, puis on laisse agiter à la température de la pièce pendant toute la nuit afin de dissoudre le flocon d'ADN. Le troisième jour, on dose l'ADN au spectrophotomètre et on fait une lecture à 260 et 280 nm. On dilue finalement l'ADN jusqu'à l'obtention d'une concentration de 10 ng d'ADN par μ L. L'ADN concentré est congelé à -20°C. L'ADN dilué se conserve très bien à 4°C.

II.6.3 Extraction de l'ADN génomique à partir des lymphocytes

Au départ, il faut avoir de 10 à 20 millions de cellules que l'on transfère dans un tube de 15 mL. Lorsqu'il y a plusieurs tubes, on équilibre avec une solution saline 0,9%. On centrifuge le tout à 2000 RPM pendant 5 minutes. On enlève le surnageant pour ne garder que le culot visible au fond du tube en laissant cependant un peu de liquide résiduel. Le culot est lysé dans une solution tampon (TE). Ensuite, on fait un traitement à la RNase A (10 ng/ μ L) afin de briser l'ARN. On précipite également les protéines à l'aide d'une solution de protéinase-K (20 mg/mL). Ensuite, on précipite l'ADN avec l'isopropanol et l'éthanol et on termine en hydratant l'ADN récupéré dans une solution de TE 10:1. On dose enfin au spectrophotomètre à 260 et 280 nm pour effectuer les dilutions.

II.7 Génotypage de marqueurs microsatellites

En évaluant la relation qui existe entre la transmission d'une maladie et un segment d'ADN particulier, nous pouvons localiser un gène à quelques milliers de nucléotides près. (White & Lalouel, 1988). La caractérisation récente de répétitions en tandem d'une séquence simple fournit un type de polymorphisme à caractère très informatif. Les répétitions de dinucléotides (dC-dA)_n ont été utilisées pour cette étude. En plus d'être réparties uniformément sur tout le génome, ces répétitions sont également distribuées dans les régions non traduites 5' et 3' ainsi que dans les introns (Bernot, 1996). Les marqueurs génétiques ou microsatellites se caractérisent par leur variabilité d'un individu à l'autre et leur transmission mendélienne, il sont en fait une sonde qui détecte un polymorphisme.

Comme nous étudions la région du bras long du chromosome 1, différents marqueurs de cette régions ont été retenus selon leur degré d'informativité.

II.7.1 Analyse des répétitions des microsatellites par PCR

Cette technique PCR consiste à amplifier des segments d'ADN en une succession d'étapes effectuées à des températures variables. Trois étapes composent un cycle et le protocole utilisé comprend 30 cycles. Dans premier temps, l'ADN est dénaturé à 94,5°C; ensuite les amorces s'hybrident à une température de 56°C, avec leur séquence complémentaire située à l'extrémité 3' de chaque brin; puis la température est élevée à 72°C afin de permettre une polymérisation optimale par l'ADN polymérase. Ces trois étapes de chacun des 30 cycles ont une durée de 40, 50 et 50 secondes respectivement. Au tout début de la réaction, il y a une étape de dénaturation à 95°C pendant 5 minutes et à la toute fin, une étape de polymérisation de 10 minutes est exécutée afin d'assurer une élévation finale complète (Figure 11).

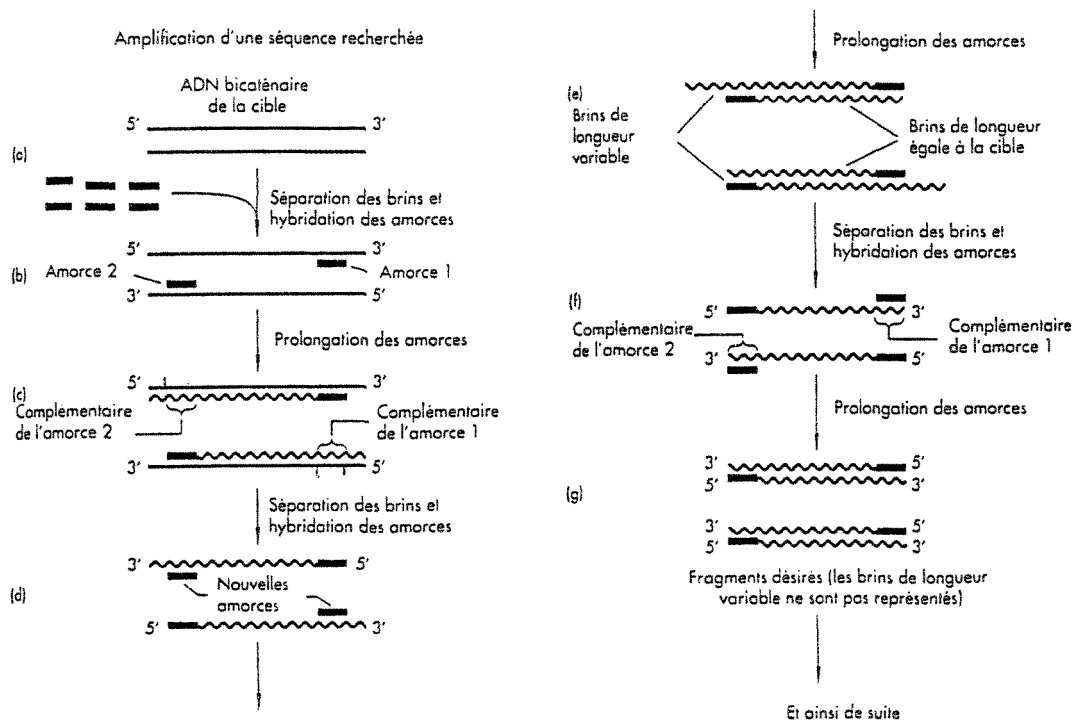


Figure 11. Différentes étapes de la réaction en chaîne de la polymérase (PCR).

Le milieu réactionnel comprend un volume total de 50 μL contenant 100 ng d'ADN génomique, 50 pmol de chacune des amorces, les quatre désoxyribonucléotides (1,25 mM de dNTP), 50 mM KCl, 10 mM Tris (pH 9), 1,5 mM MgCl_2 , 0,01% de gélatine, 0,1% de Triton X-100 et 1U de Taq polymérase, une enzyme thermostable provenant de la bactérie *Thermus Aquaticus* (Perkins Elmer Cetus). L'enzyme est toutefois ajouté après 5 minutes de dénaturation. On ajoute également une goutte d'huile dans chacun des puits afin d'éviter l'évaporation.

II.7.2 Électrophorèse sur gel et lecture des allèles

Les produits d'amplification synthétisés sont déposés sur un gel dénaturant de polyacrylamide 6%. Le principe de l'électrophorèse est qu'une différence de potentiel appliquée aux extrémités d'un gel fait migrer les molécules d'ADN chargées négativement à une vitesse dépendante de leur taille et permet ainsi de les séparer. Des gels de polyacrylamide 6% de 100 mL sont coulés entre 2 plaques de verre qui sont séparées par des espaceurs placés sur les côtés. On utilise également des peignes ayant 96 puits. Les gels sont préparés en dissolvant 50 g d'urée dans 20 mL de TBE 5X en chauffant légèrement. Ensuite, on ajoute 15 mL d'acrylamide 40% (95 g d'acrylamide et 5 g de bis-acrylamide dans un volume total de 100 mL d'eau) et de l'eau pour un volume total de 100 mL. La polymérisation est initiée en ajoutant 500 μL de persulfate d'ammonium 10% (FISHER) et de 50 μL de TEMED (Boehringer-Mannheim). La polymérisation dure environ 90 minutes. Avant de déposer les produits d'amplification, on effectue une pré-électrophorèse de 60 minutes à une puissance de 100 watts. Les échantillons sont chauffés à une température de 96°C pour environ 2 minutes et ensuite déposés sur glace. Les échantillons sont ensuite déposés sur le gel à raison de 5 μL par puits et on fait migrer à une puissance de 100 watts.

Après l'électrophorèse, le gel est dégagé en séparant les 2 plaques de verre et les produits séparés sont ensuite transférés pendant 90 minutes sur une membrane de nylon Hybond N+ (Amersham) à l'aide de poids et la membrane est hybridée avec une sonde (CA)_n marquée en 3' avec la Digoxigenin-11-ddUTP. La sonde est ensuite détectée par chimiluminescence utilisant le système DIG (Boehringer-Mannheim) et avec un film Kodak XAR-5. La longueur des allèles est évaluée relativement à la longueur de l'allèle le plus court de la mère 1347 (individu 134702) d'une famille du CEPH (Centre d'étude du polymorphisme humain). Le génotypage est repris si des incompatibilités ou des événements de recombinaison sont détectés. Les données sont introduites sous format informatique au moyen d'un tableau puis intégrées dans une base de données.

II.8 Analyses statistiques

Lors des analyses statistiques, plusieurs modèles peuvent être utilisés afin de maximiser les chances de détecter une liaison (ségrégation autosomale dominante, récessive ou liée au sexe, pénétrance complète ou réduite). Il faut également tenir compte de plusieurs paramètres tels: l'incidence de la maladie dans la population, l'âge d'apparition de la maladie ainsi que la pénétrance et le taux de phénotopies en accord avec les données épidémiologiques (Ott, 1991). Pour notre étude, on suppose un mode de ségrégation autosomal dominant et un mode de transmission monogénique. Le mode de ségrégation correspond au mode de transmission le plus simple suggéré par les arbres généalogiques des familles. Les analyses statistiques sont effectuées en prenant compte des génotypes des marqueurs utilisés et des phénotypes observés de chacun des individus sélectionnés pour l'étude de liaison.

Les Lodscores sont calculés pour des fractions de recombinaisons (θ) de 0,0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 et 0,4 avec les programmes MLINK du logiciel LINKAGE (Lathrop et al. 1984) sous l'hypothèse d'un seul locus pathologique responsable de la maladie. Les calculs statistiques tiennent compte de la fréquence allélique estimée pour les marqueurs dans la population canadienne française.

II.9 Test d'analyse mutationnelle: Amplification-refractory mutation system (ARMS)

Afin d'identifier les individus porteurs des mutations recherchées, nous avons développé un test d'analyse mutationnelle (ARMS) suivant les procédures décrites par Little (1997). Pour la détection de la mutation Gln368Stop, une des réactions contient une amorce spécifique "forward" pour l'allèle normal, 368Ctn: 5'-AGGAAATCCCTGGAGCTGGCTACCACGGTC-3', et l'autre réaction, une amorce spécifique "forward" pour l'allèle muté, 368Ctm2: 5'-AGATCCCTGGAGCTGGCTACCACGGGT-3'. Dans chaque réaction, une amorce commune "reverse" est ajoutée pour l'allèle inverse GLC1A 1479R: 3'-CAAAGAGCTTCTTCTCCAGGGGGTTGTAGT-5'. Deux amorces contrôles sont également utilisées dans chacune des réactions afin d'amplifier un fragment de 438 bp, l'exon 1 du gène TIGR: l'amorce "forward" de l'exon 1: 5'-AGAGCTTTCAGAGGAAGCC-3' et l'amorce "reverse" 3'-TTGGGTTTCAGCTGGTC-5'. Un protocole standard de PCR a été utilisé et les produits d'amplification sont déposés sur un gel d'agarose 2% contenant du bromure d'éthidium pour une électrophorèse.

En ce qui concerne la détection de la mutation Lys423Glu, une des réactions contient une amorce spécifique "forward" pour l'allèle normal, GLC1A 1313AA: 5'-TCGAACAAACCTGGGAGACAAACATCCGAA-3', et

l'autre réaction, une amorce spécifique "forward" pour l'allèle muté Lys423Glu GLC1A1313GG: 5'TCGAACAAACCTGGGAGACAAACATCCGGG-3'. L'amorce GLC1A 1479R pour l'amplification de la séquence "reverse" est la même que celle utilisée dans le test pour la mutation Gln368Stop ainsi que les amorces pour l'amplification de l'exon 1 du gène TIGR.

CHAPITRE III

RESULTATS

III.1 Les familles étudiées

III.1.1 La famille CA

Cette famille a été décrite dans un article publié dans la revue "American Journal of Human Genetics" (Morissette et al., 1995). Je ne ferai donc qu'un bref rappel des résultats parus dans cet article ainsi qu'une description des nouveaux résultats obtenus depuis sa parution.

La famille CA est originaire de la rive sud du Saint-Laurent. L'étude de l'histoire familiale permet de remonter jusqu'à un ancêtre décédé aveugle en 1872. Cet individu a eu 5 enfants dont 4 qui ont eu une descendance et parmi ceux-ci, 3 filles atteintes de glaucome. Une de ces filles a laissé une descendance très importante, une descendance fortement affectée par le glaucome (Figure 12).

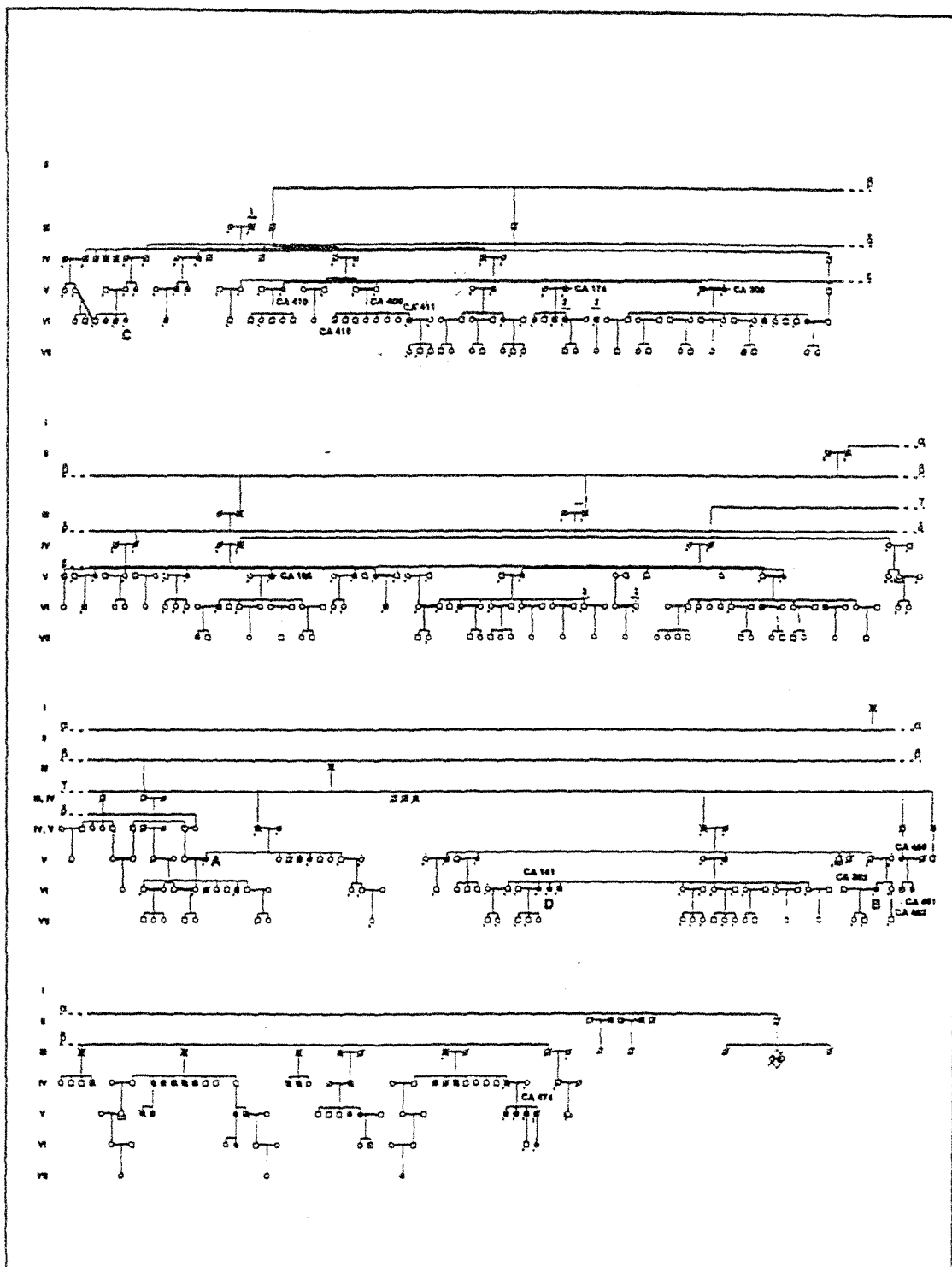


Figure 12. La famille CA. Les cercles et les carrés noirs
représentent des individus atteints.

Cette famille contient plus de 101 membres atteints de POAG. L'âge au diagnostic varie de 8 à 62 ans (glaucome juvénile et chronique), avec une moyenne d'environ 30 ans et seulement 2 enfants ont manifesté la maladie avant l'âge de 12 ans.

Pour effectuer les analyses de liaison, nous avons regroupé tous les individus atteints (JOAG et COAG) sous une même catégorie. Les paramètres établis lors de l'analyse de liaison, sont décrits dans l'article de Morissette et al. (1995). Un haplotype caractéristique composé de 14 marqueurs microsatellites (Tableau 5) a été retrouvé chez 146 individus (Tableau 6) et parmi ceux-ci, 80 ont un diagnostic de glaucome à angle ouvert et 6 ont une pression intraoculaire supérieure à 21 mmHg. Cet haplotype caractéristique n'a pas été retrouvé chez les époux(ses) non-affectés(es).

Tableau 5. Marqueurs microsatellites utilisés pour l'analyse de liaison de la famille CA

Locus	Marqueur	Locus	Marqueur
D1S196	AFM063xg9	---	AFM154xc9
D1S431	AFM212xf6	---	AFM278ye5
D1S445	AFM238xf10	D1S218	AFM157xe7
D1S433	AFM217xe11	D1S242	AFM212xb10
D1S452	AFM248wg5	D1S416	AFM185xd6
D1S210	AFM122xa3	D1S480	AFM290xf9
---	AFM350yh1	D1S212	AFM142xc9

Tableau 6. Répartition du nombre de porteurs de l'haplotype dans la famille CA

Diagnostic	Nombre de porteurs
(JOAG/COAG)	80
HTO \geq 21 mmHg	6
Normal	60
Total	146

Par séquençage de la région, une mutation sur l'exon 3 du gène TIGR a pu être détectée. Il s'agit d'une transition d'un "A" pour un "G" menant au changement d'une lysine pour un acide glutamique à la position 423 (Figure 13). Nous retrouvons donc l'haplotype, d'une longueur d'environ 11 cM, dans toutes les autres branches de la famille CA (Figure 14) et ainsi, tous les porteurs de cet haplotype caractéristique ont la mutation Lys423Glu. Un test d'analyse mutationnelle est maintenant disponible et permet de détecter les porteurs de cette mutation. Ainsi ces individus peuvent avoir un meilleur suivi ophtalmologique.

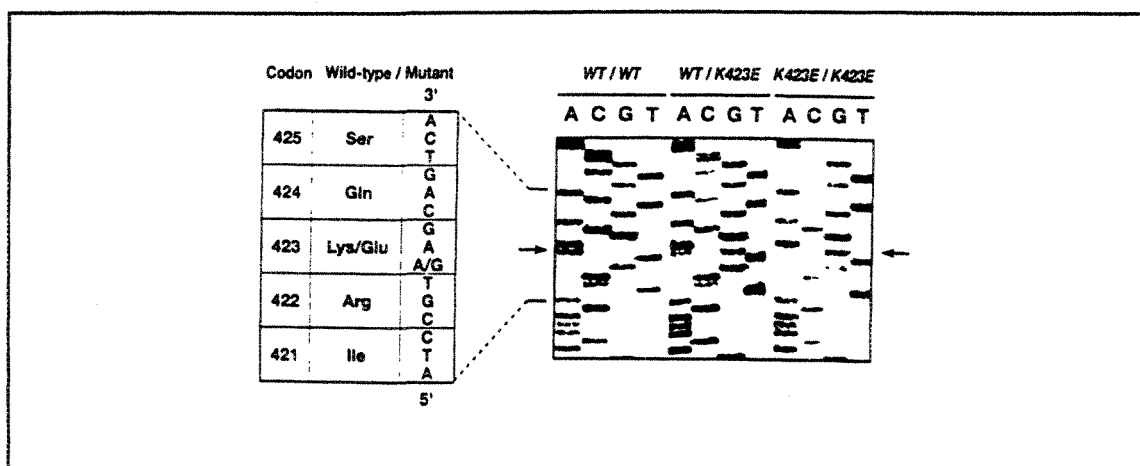


Figure 13. Mutation 423.

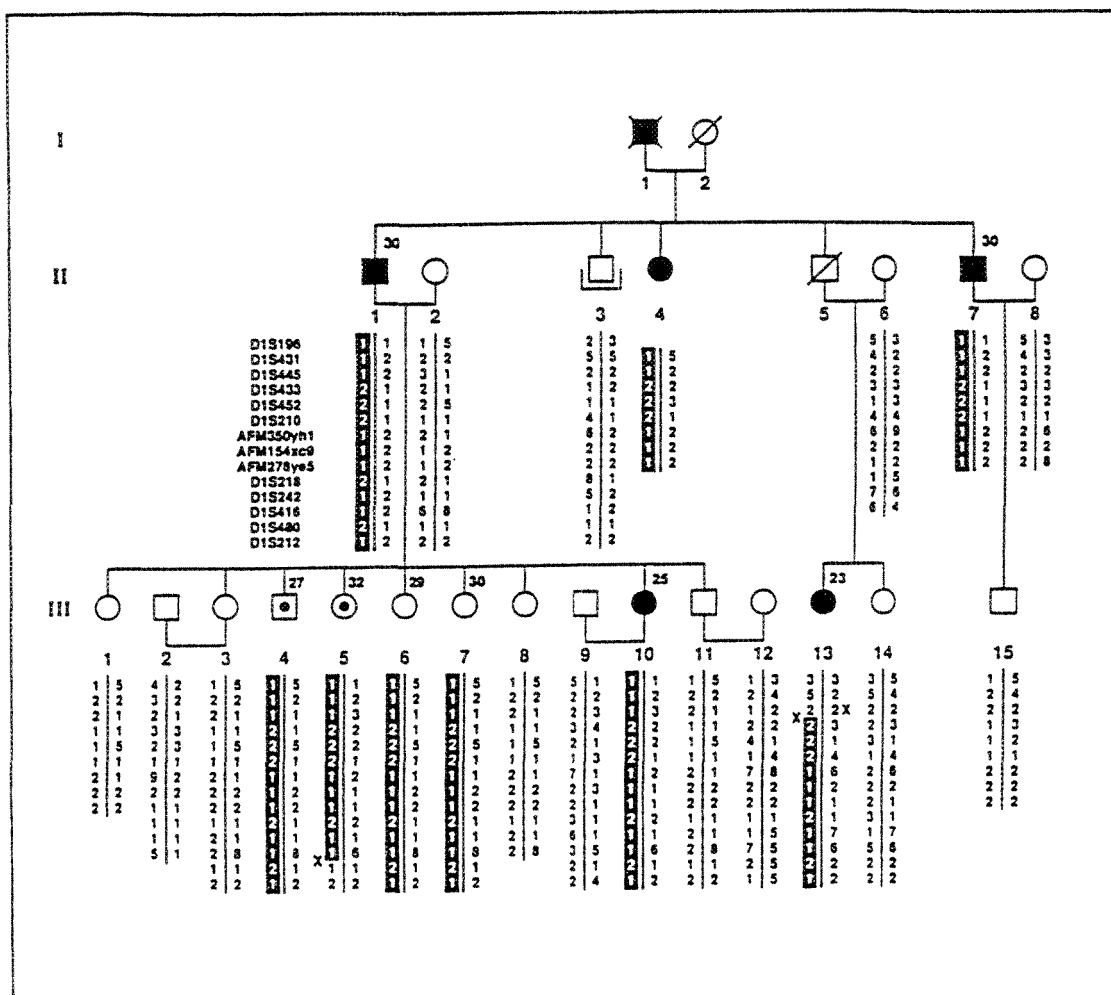


Figure 14. Haplotype caractéristique de la famille CA

III.1.2 La famille CT

La famille CT comprend plusieurs individus atteints de glaucome à angle ouvert. L'âge au diagnostic varie de 47 à 62 ans, avec une moyenne de 58 ans, ce qui correspond, selon la nomenclature, au glaucome chronique. Au total, 7 individus ont un diagnostic de glaucome chronique, 7 ont une pression intraoculaire supérieure à 21 mmHg et il y a un patient souffrant de glaucome à angle fermé (Figure 15).

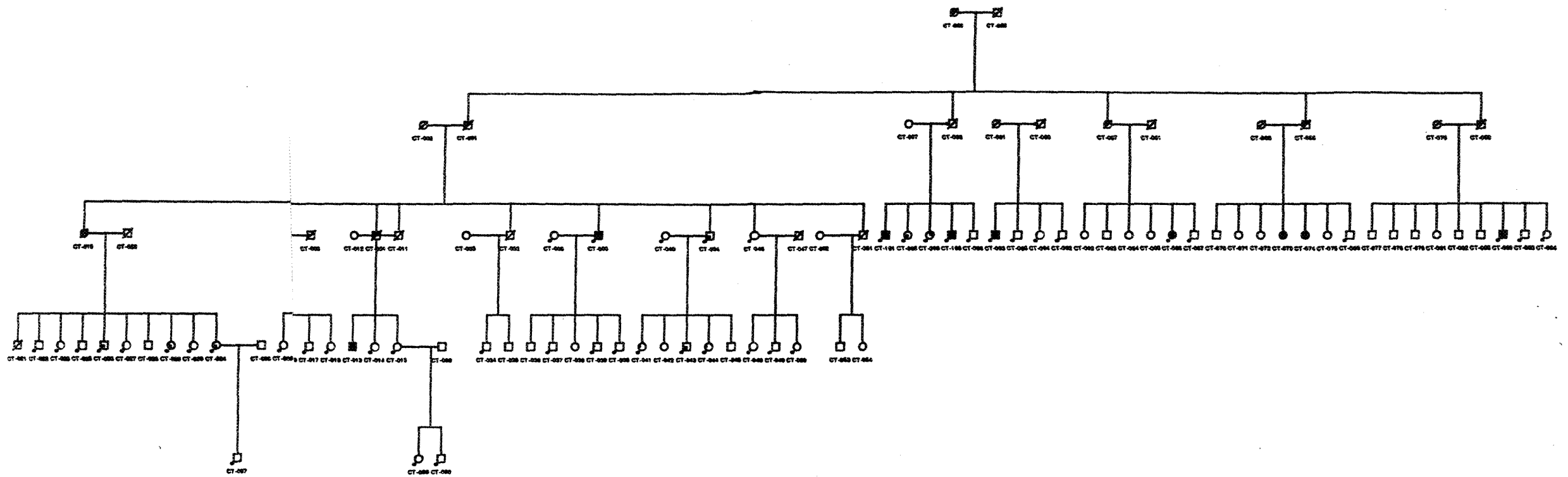


Figure 15. La famille CT.

- POAG
- ◻ HTO
- ◉ Angle fermé

En débutant le recrutement de cette famille et sachant qu'il y a plusieurs mutations sur le gène TIGR impliquées dans le glaucome, nous avons séquencé quelques individus atteints et normaux sur l'exon 3 du gène TIGR. Il s'est avéré que les individus atteints étaient porteurs d'une mutation à la position 368 qui entraîne le changement d'une paire de base (C → T) occasionnant par le fait même la transition d'une glutamine en un codon Stop (Figure 16).

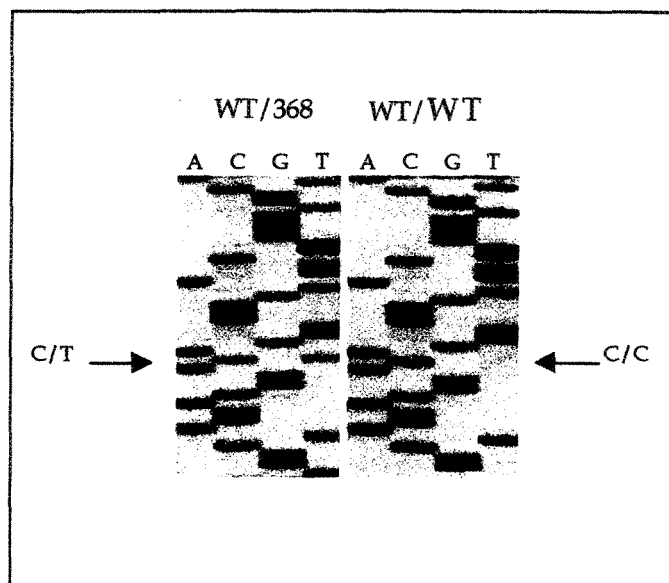


Figure 16. Mutation Gln368Stop.

Par la suite, en analysant les haplotypes, nous avons remarqué que la mutation coségrégait avec un haplotype caractéristique qui s'étend sur une longueur d'environ 6 cM (figure 17). Un test d'analyse mutationnelle a été développé afin de détecter tous les porteurs de cette mutation. Cependant, en recrutant d'autres membres de la famille, nous avons remarqué que certains sujets atteints, faisant partie d'une autre branche, n'étaient pas porteurs de la mutation Gln368Stop (Tableau 7). Une analyse de liaison a été exécutée par la suite et nous avons obtenu les différents lod score présentés au tableau 8.

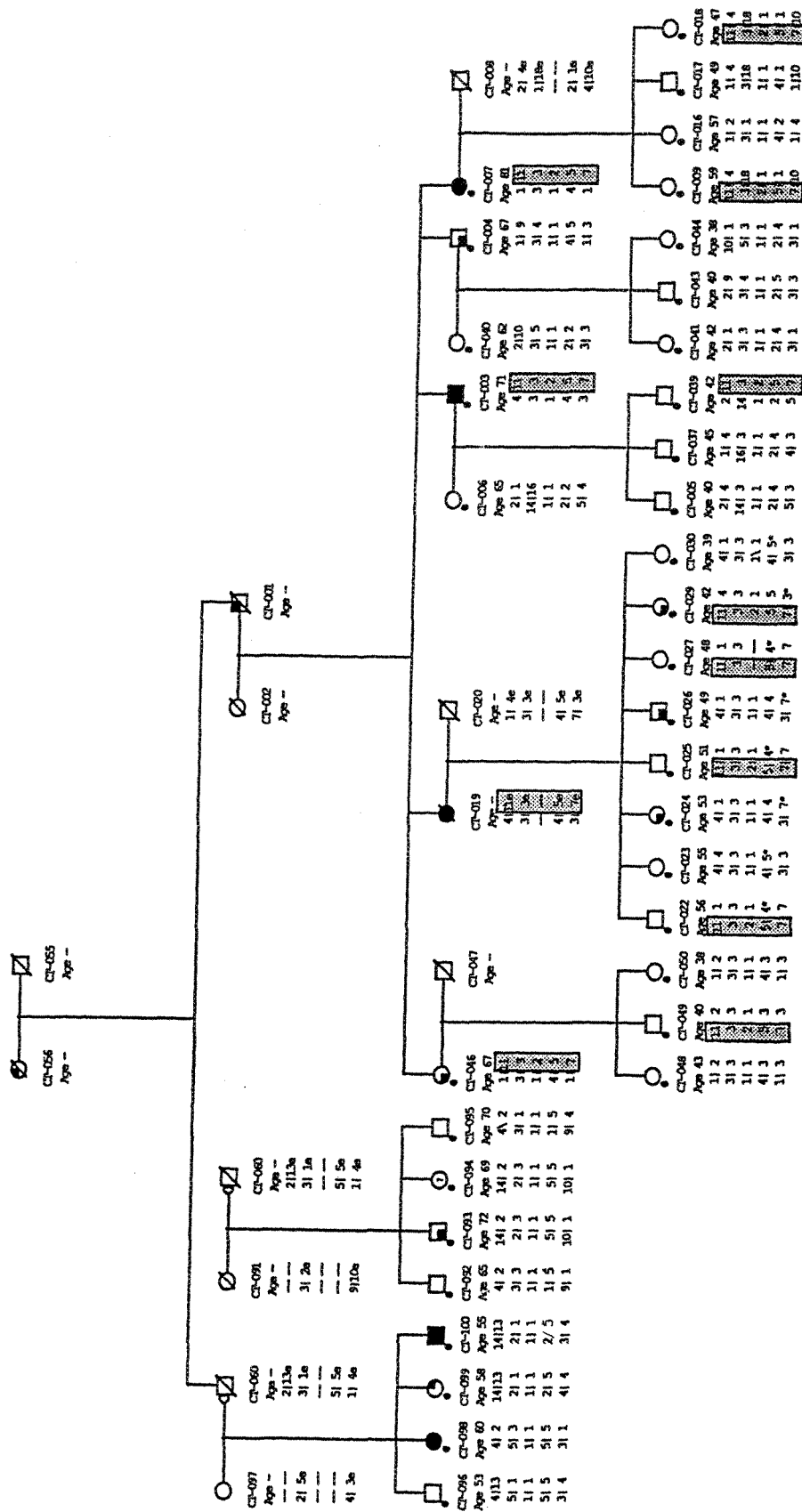


Figure 17. Haplotype caractéristique retrouvé dans la famille CT.

Tableau 7. Nombre de porteurs de la mutation Gln368Stop dans la famille CT

Diagnostic médical	porteur de la mutation/diagnostic médical
COAG	4/7
HTO	3/7
NORMAUX	7/34
TOTAL	14/48

Tableau 8. Table des valeurs de Lodscore

Marqueurs	Fractions de recombinaison (θ)						
	0.0	0.01	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
AFM22	-6,18	-5,49	-3,33	-2,08	-0,90	-0,35	-0,08
AFMc018yd9	0,37	0,37	0,36	0,33	0,25	0,14	0,04
Gln368Stop	-1,42	-1,36	-1,08	-0,76	-0,35	-0,13	-0,03
AFMb352xe9	-1,83	-1,61	-1,11	-0,67	-0,21	-0,04	-0,00
AFM157xe7	-4,74	-3,79	-2,21	-1,36	-0,58	-0,23	-0,06

III.2 Les cas sporadiques

Pour réaliser cette partie de l'expérimentation, qui était le principal objectif de mon mémoire, nous avons eu la participation de plusieurs ophtalmologistes du Réseau Vision, axe glaucome. C'est grâce, en partie, à leur collaboration que nous avons pu mettre sur pied ce projet. Comme le but de cette recherche

est de tenter de retrouver les 2 mutations présentes au Québec (Lys423Glu et Gln368Stop), nous avons recruté au total 189 cas sporadiques de glaucome, provenant de différentes régions du Québec. La proportion homme/femme est d'environ 50% et le lieu de résidence de chacun des ces individus est présenté au tableau 9.

Tableau 9. Répartition géographique des lieux de résidence des cas sporadiques de glaucome

Régions	Nombre de cas recrutés
Montréal	155
Québec	20
Rimouski	4
Riv.-du-Loup	4
Saguenay-Lac-St-Jean	3
Beauce	3
Total	189

Afin de nous permettre d'identifier les porteurs des 2 mutations, nous avons procédé par un test d'analyse mutationnelle (ARMS test), une technique nécessitant l'utilisation du PCR (Polymerase Chain Reaction). Les résultats que nous pouvions obtenir, sur gel d'agarose, pouvaient se présenter sous 3 formes: homozygote normal, hétérozygote muté et homozygote muté, selon que l'individu possède une ou 2 copies de l'allèle au même locus ciblé (Figure 18). Sur tous les tests effectués, quelques-uns ont dû être abandonnés soit à cause de la qualité de l'ADN extrait, de la quantité trop faible d'ADN récupéré ou encore à cause d'une contamination survenue au laboratoire. Nous avons pu obtenir des résultats (qu'ils soient positifs ou négatifs) dans 92% des tests effectuée pour la mutation 423 et dans 68% des tests pour la mutation 368.

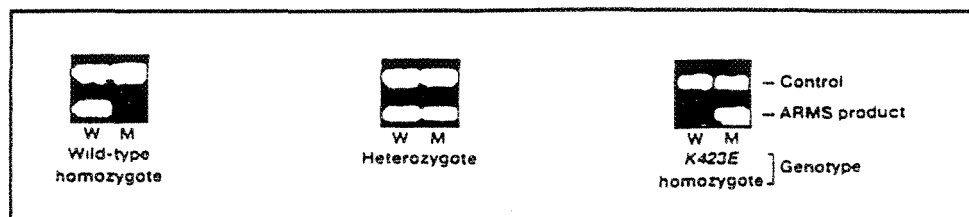


Figure 18. Exemple des résultats que l'on peut obtenir en effectuant un test d'analyse mutationnelle.

Nous avons effectué les 2 tests d'analyse mutationnelle sur tous les cas sporadiques et nous n'avons trouvé aucun individu porteur d'une de ces mutations.

III.3 Les analyses généalogiques

Afin d'appuyer les résultats obtenus par le test d'analyse mutationnelle, nous avons jugé bon de faire des analyses généalogiques chez les sujets recrutés dans les régions de l'est du Québec seulement, c'est-à-dire les individus résidant dans les régions de Québec, Rimouski, Rivière-du-Loup, Saguenay-Lac-St-Jean et la Beauce. En tout, 36 ascendances ont été réalisées et plusieurs analyses ont été effectuées. Parmi ces ascendances, la famille CT porte le numéro 1 et la famille CA, le numéro 6.

III.3.1 La complétude ou exhaustivité des ascendances

La complétude a été calculée à toutes les générations pour les 36 ascendances complétées (Tableau 10). Jusqu'à la génération 9, nous obtenons un taux de complétude encore assez élevé (86.34%), ensuite elle décline pour atteindre 0% à la 16ième génération.

Tableau 10. Complétude du groupe de généalogies étudié

Génération	Complétude (%)	Génération	Complétude (%)
0	100,00	9	86,34
1	100,00	10	69,89
2	98,61	11	36,87
3	97,22	12	11,43
4	97,22	13	2,22
5	96,53	14	0,32
6	95,23	15	0,03
7	93,66	16	0,00
8	91,19		

III.3.2 La répartition géographique des cas sporadiques

La répartition géographique des 36 cas sporadiques était basée sur le lieu de résidence de ceux-ci au moment de leur participation à l'étude. À l'aide d'un programme, nous avons précisé le lieu de mariage des parents et des grands-parents afin de vérifier si ces événements (mariages et lieux de résidence) sont au même endroit (Tableau 11).

Tableau 11. Répartition des mariages comparativement
au lieu de résidence de l'égo

Ascendance	Lieu de mariage		
	Parents	Grands-parents paternels	Grands-parents maternels
1	A	A	A
2	A	B	A
3	A	A	B
4	A	B	A
5	A	A	A
6	A	A	A
7	A	A	A
8	A	A	B
9	A	---	A
10	A	A	A
11	A	A	A
12	A	A	A
13	A	B	C
14	A	B	B
15	A	A	A
16	A	B	A
17	A	A	A
18	A	A	A
19	A	A	A
20	A	A	A
21	A	A	A
22	A	A	A
23	A	B	A
24	A	A	A
25	A	B	A
26	A	B	A
27	A	A	B
28	A	A	B
29	A	B	C
30	A	A	A
31	A	A	A
32	A	---	A
33	A	A	A
34	A	A	A
35	A	A	A
36	A	A	A

N.B. Les carrés en gris indiquent que le lieu de mariage est le même que le lieu de résidence de l'égo au moment de la participation à l'étude. Le trait indique que le lieu n'était pas disponible.

Dans 53% des cas, le lieu de résidence de l'égo au moment de l'étude était le même que le lieu de mariage de ses parents ou de ses grands-parents.

III.3.3 La consanguinité

La consanguinité est un bon indice de l'homogénéité d'une population (Hartl, 1994). Ainsi, c'est souvent à l'intérieur des familles qui présentent un degré élevé de consanguinité que l'on peut retrouver une fréquence plus élevée des maladies récessives. Dans le tableau 12, les coefficients de consanguinité F ont été calculés à la 3^e génération. Ils ont été calculés pour chacune des 36 ascendances et chez 33 d'entre elles, leur coefficient était égal à 0 (aucune consanguinité). En ce qui concerne les 3 ascendances ayant un $F > 0$, dans les 3 cas, leur F est supérieur à la valeur moyenne calculée du groupe d'ascendance étudié.

Tableau 12. Coefficients de consanguinité calculés à la 3^e génération

Ascendances	Coefficient (F)
10	0,0625
11	0,0625
18	0,0625
Valeur moyenne du groupe étudié	0,0052

À la 6^e génération, 25 ascendances avaient un coefficient égal à 0. Les valeurs des 11 autres coefficients sont présentées au tableau 13. Les valeurs dans un encadré gris représentent les ascendances qui ont un coefficient F supérieur à la moyenne du groupe, soit supérieur à 0,0073. Évidemment, les ascendances 10, 11 et 18 sont également retrouvées au tableau 13.

Tableau 13. Coefficients de consanguinité calculés à la 6^e génération

Ascendances	Coefficient de consanguinité F
1	0,0039
6	0,0078
10	0,0669
11	0,0625
13	0,0020
18	0,0635
21	0,0010
25	0,0010
30	0,0029
31	0,0156
34	0,0342
Valeur moyenne du groupe étudié	0,0073

III.3.4 L'apparentement

Le coefficient d'apparentement (ϕ) a également été calculé à la 3^e et à la 6^e génération et ce, pour toutes les ascendances prises 2 à 2. Il y avait une possibilité de 630 couples d'ascendances dans les 2 cas. À la 3^e génération,

seulement 1 couple d'ascendances avaient un degré d'apparentement supérieur à 0. Les ascendances 20 et 21 ont un coefficient de 0,125, correspondant à un apparentement oncle, tante/neveux, nièce. En ce qui concerne les valeurs de ϕ à la 6^e génération, elle sont présentées en annexe A.

Cependant, l'on remarque parmi ces valeurs de la 6^e génération que l'ascendance #1 (famille CT) a un coefficient ϕ supérieur à 0 lorsqu'elle est couplée avec 11 ascendances (tableau 14). La famille CA (ascendance #6) a un coefficient ϕ supérieur à 0 et ce, avec 5 ascendances (Tableau 15).

Tableau 14. Valeurs de ϕ des ascendances couplées avec la famille CT à la 6^e génération

Couples d'ascendances	Coefficient d'apparentement (ϕ)
1 et 2	0,0004
1 et 3	0,0023
1 et 4	0,0015
1 et 5	0,0002
1 et 8	0,0002
1 et 21	0,0001
1 et 26	0,0002
1 et 30	0,0001
1 et 31	0,0001
1 et 32	0,0014
1 et 33	0,0003
ϕ moyen du groupe étudié	0,0003

Tableau 15. Valeurs de ϕ des ascendances couplées avec la famille CA à la 6^e génération

Couples d'ascendances	Coefficient d'apparement (ϕ)
6 et 10	0,0002
6 et 13	0,0001
6 et 26	0,0001
6 et 29	0,0002
6 et 30	0,0002
ϕ moyen du groupe étudié	0,0003

CHAPITRE IV

DISCUSSION

IV.1 Informativité des familles

L'obtention de résultats significatifs lors d'analyses de liaison par la méthode des Lodscores, dépend de la puissance statistique des familles étudiées. Pour les maladies mendéliennes, cette puissance est fonction de la structure familiale, de son mode de transmission ainsi que du niveau d'hétérogénéité de cette maladie dans la population (Martinez et al. 1989; Cavalli-sforza & King, 1986; Ott, 1986.). D'après Cavalli-Sforza & King (1986), l'informativité d'une famille est proportionnelle à sa taille, au nombre d'individus atteints de la maladie étudiée ainsi que de la distribution des cas affectés dans la famille.

Selon l'article de Morissette et al. (1995), la famille CA était suffisamment puissante pour mettre en évidence une liaison. En ce qui concerne la famille CT, une simulation a été effectuée en présumant un marqueur comportant 6 allèles et situé à 5 puis à 10 cM d'un locus maladie. Seules les personnes chez qui un prélèvement sanguin a été effectué ont été considérées lors de cette

simulation. La simulation a été réalisée au moyen du programme SLINK (Weeks et al, 1990).

La fréquence du gène muté a été estimée à 0,005. La pénétrance a été fixée à 0,3, 0,5 et 0,9 pour trois classes de liability correspondant aux intervalles d'âges suivants: 0-20 ans, 20-40 ans et 40 ans et plus. On a estimé la proportion de phénocopies à 0,01. Les valeurs moyennes obtenues de Lodscore pour un marqueur situé à 5 et 10 cMorgan ont été respectivement de 3,17 et 2,11. Ceci indique que cette famille présente une puissance statistique assez élevée pour mettre en évidence une liaison génétique d'un marqueur et d'un locus maladie.

IV.2 Les mutations connues au Québec

IV.2.1 Mutation Lys423Glu

Selon nos résultats, la mutation Lys423Glu est peu répandue au Québec. En effet, aucun des 189 cas sporadiques de glaucome n'étaient porteurs de cette mutation. Puisqu'aucun autre groupe de recherche dans le monde ne l'a observée, la mutation Lys423Glu, est définie comme une mutation unique au Québec. On peut penser que celle-ci est apparue récemment puisqu'on ne la retrouve (coségrégant avec un haplotype caractéristique) que chez une seule famille québécoise affectée par le glaucome. Un fait intéressant est qu'un individu affecté par la maladie et ayant le même patronyme que la famille CA est porteur de l'haplotype caractéristique sans toutefois avoir la mutation 423. On ne peut parler d'une phénocopie puisque certains enfants de cet individu sont également atteints de glaucome. La présence de ce cas nous permet de supporter l'hypothèse de l'avènement récent de la mutation Lys423Glu, et nous donne des informations concernant l'origine de celle-ci. Il est probable

que la mutation a été introduite dans cette famille par cet ancêtre décédé aveugle en 1872 ou par un ancêtre qui l'a précédé de quelques générations.

Ces résultats nous amènent également à penser qu'un autre gène, ou mutation, peut être en cause dans cette famille. Selon Bernot (1996), on remet de plus en plus souvent en question la classification des maladies génétiques retrouvées chez l'homme. On se rend compte de l'importance de l'hétérogénéité des maladies génétiques, et ce, tant du point de vue phénotypique (présentation de la maladie sous différentes formes cliniques) que génétique. En effet, si l'individu malade partageant le même haplotype que celui retrouvé dans la famille CA, n'a pas la mutation, son glaucome est certainement causé par un deuxième facteur génétique probablement relié à la famille CA également. Cette hypothèse peut être expliquée par l'intervention de gènes qui modulent l'action du gène délétère (gènes modificateurs) (Ott, 1991). Ce deuxième facteur pourrait agir sur l'apparition précoce de la maladie ou de la gravité des symptômes de celle-ci (cas de glaucome juvénile). Cependant, notre étude ne nous permet pas, pour l'instant, d'identifier l'autre facteur génétique en cause, mais des études plus poussées sur cette famille nous permettra peut-être d'expliquer ce phénomène.

IV.2.2 Mutation Gln368Stop

Bien que la mutation Gln368Stop causant le glaucome est une des plus rapportée dans le monde (tableau 3), il s'avère que cette dernière est très peu répandue au Québec. En effet, parmi les cas sporadiques étudiés, aucun n'était porteur de cette mutation, on la retrouve donc dans une seule famille québécoise, la famille CT. Selon les résultats obtenus lors de l'analyse de liaison, si nous n'avions pas connu, au départ, le gène impliqué dans cette

famille, nous aurions exclu la région contenant le gène TIGR car la valeur de Z_{max} obtenue est de 0,37 ($\theta=0$) pour le marqueur AFMc018yd9 et de -6,18 ($\theta=0$) pour le marqueur AFM22. Si l'analyse de liaison n'a pas donné les résultats attendus c'est d'une part, parce qu'à l'intérieure de cette famille, une branche affectée par la maladie n'est pas porteuse de l'haplotype ni de la mutation. Pourtant, leurs liens généalogiques sont très rapprochés (figure 15). D'autre part, un grand nombre d'individus porteurs de la mutation et de l'haplotype à la génération IV n'ont encore aucun symptôme (figure 17). Ces individus sont âgés en moyenne de 45 ans alors que les premiers symptômes apparaissent autour de 58 ans.

Encore une fois, on peut penser qu'il y a un autre facteur génétique en cause dans cette famille. Un fait intéressant au point de vue moléculaire est que la mutation 368 remplace une glutamine par un codon stop, ce qui amène une troncature au niveau de la protéine encodée par le gène TIGR. Les porteurs de cette mutation devraient donc avoir une forme plus agressive de la maladie puisque la protéine n'est pas produite entièrement. Cependant, les porteurs développent la maladie vers la fin de la cinquantaine. On peut supposer qu'un autre gène viendrait protéger les porteurs de la mutation 368, mais ce n'est encore qu'une hypothèse. Des recherches plus poussées sur cette famille pourront nous aider à comprendre ce paradoxe.

Quant à l'origine de cette mutation, le premier ancêtre ayant eu les signes de la maladie, selon les témoignages de certains membres de la famille, s'est marié en 1887 et serait décédé aveugle. Cependant, nous ne pouvons savoir avec certitude si cet individu était porteur de la mutation 368 ou de l'autre facteur génétique présent dans la seconde branche recrutée. L'origine de la mutation Gln368Stop chez la famille CT demeure donc ambiguë.

IV.3 Les cas sporadiques

Comme mentionné dans les résultats précédents, nous n'avons détecté aucun porteur des deux mutations à l'étude. On devrait donc s'attendre à des cas sporadiques qui sont éloignées du point de vue généalogique. C'est ce que nous avons vérifié lors des analyses généalogiques effectuées en collaboration avec l'IREP.

IV.3.1 Les analyses généalogiques

Tel que précisé dans le chapitre III, les analyses généalogiques ont été effectuées seulement pour les cas recrutés dans les régions de l'est du Québec ainsi que pour les 2 familles porteuses des mutations. Il est important de mentionner que cette situation entraînera une diminution de la puissance des analyses généalogiques. Les raisons de cette procédure sont les suivantes: 1) les 2 mutations ont été retrouvées chez des familles provenant de l'est du Québec; 2) les informations sur les dates de mariages n'étaient disponibles que pour les individus provenant de ces régions.

La complétude calculée pour les 36 ascendances (Tableau 8) nous révèle un pourcentage assez élevé jusqu'à la 9^e génération ce qui indique que s'il y avait eu de l'apparentement ou de la consanguinité entre les ascendances, il aurait été possible de l'observer. La baisse de la complétude à partir de la 2^e génération s'explique par l'incapacité de retracer la branche paternelle de l'égo

32.

IV.3.1.1 La répartition géographique des cas sporadiques

Étant donné que la région d'où provenait les cas sporadiques était établie par le lieu de résidence des égos, nous avons voulu évaluer si ce lieu était le même que le lieu de mariage des parents ou des grands-parents de l'égo (Tableau 11). Dans 53% des cas, le lieu de résidence de l'égo est le même que le lieu de mariage de ses parents ou grands-parents. De plus, dans 44% des cas, le lieu de résidence de l'égo est le même que le lieu de mariage de ses parents. Il aurait été préférable cependant, de considérer le lieu de mariage de l'égo puisque dans plusieurs cas, les individus se marient dans leur région natale. Cependant, l'information nécessaire n'était pas toujours disponible sur le formulaire de consentement et certains proposants étaient célibataires. La répartition géographique des proposants, basée sur leur lieu de résidence, ne s'avère pas pertinente dans le cas d'une étude génétique, comme nous le démontre ces résultats

IV.3.1.2 Les coefficients de consanguinité

La consanguinité est un indicateur du degré d'homogénéité de la population étudiée. À la 3^e génération, 3 des 36 ascendances (8,3%) ont un coefficient de consanguinité F égal à 0,0625, ce qui nous indique que ces égos sont issus d'un mariage entre cousins germains, soient des cousins du premiers degrés. Cette valeur est toutefois assez élevée et, dans le cas d'une étude génétique, elle pourrait nous mettre sur la piste d'une maladie récessive. Cependant, le glaucome est transmis de façon autosomale dominante dans la plus grande majorité des cas (François, J. 1980). Cette valeur est probablement le résultat du hasard de l'échantillonnage. De plus, la taille de l'échantillon étudié étant petite il devient difficile de comparer cette valeur à d'autres valeurs obtenues pour d'autres populations.

Le tableau 13 présente les valeurs de F obtenues à la 6^e génération. Six ascendances ont une valeur F supérieure à la moyenne de la population qui est de 73×10^{-4} , ce qui équivaut à un degré de parenté du 3:4 (tableau 3). La plupart des études décrivant les populations humaines de la fin du XIX^e siècle et du début du XX^e siècle obtiennent des coefficients de consanguinité moyens compris entre 3×10^{-4} et $0,3 \times 10^{-4}$ avec des fréquences de mariages entre cousins germains allant de 0,2% à 2% (Lebel, 1983). Cependant, la taille des populations étudiées est plus élevée comparativement à l'échantillon utilisé pour la présente étude. Il devient alors difficile de comparer les résultats obtenus à ceux des études réalisées avec de grandes populations.

IV.3.1.3 Les coefficients d'apparentement

L'apparentement, est un paramètre qui permet de calculer la probabilité qu'un allèle à un locus donné et choisi au hasard, chez un individu, soit identique par ascendances à l'allèle correspondant au même locus chez un deuxième individu, donc, hérité d'un ancêtre commun. Calculé à la 3^e génération, il y a seulement un couple d'ascendances qui ont un coefficient supérieur à 0. Les ascendances 20 et 21 ont une valeur de ϕ égale à 0,125, une valeur très élevée. Cependant, en regardant ces 2 égos plus en détail, on a remarqué qu'ils font partie de la même famille, ce qui explique pourquoi cette valeur de ϕ est si élevée. À la 6^e génération, 135 ascendances couplées avaient une valeur de ϕ supérieure à 0 (Annexe 1). Le ϕ moyen de la population étudiée est de 3×10^{-4} . Parmi le groupe, 34% ont le même lieu de résidence. Ce qui explique en partie que leur coefficient ϕ est plus élevé que la moyenne de la population. En considérant maintenant le lieu de mariage des parents des égos, 41% avaient le même lieu de mariage. On peut donc affirmer que le lieu de résidence des égos ainsi que le lieu de mariage de ses parents sont en corrélation avec le coefficient d'apparentement.

CONCLUSION GENERALE

Le but principal de ce projet était d'étudier la prévalence et l'origine de deux mutations du gène TIGR: la mutation Gln368Stop présente chez la famille CT et la mutation Lys423Glu observée chez la famille CA. Les résultats obtenus à partir d'un test d'analyse mutationnelle nous révèlent qu'aucune des deux mutations n'étaient présentes chez les différents cas sporadiques recrutés au Québec. Ceci démontre qu'elles sont peu fréquentes au Québec puisqu'elles ont été retrouvées seulement dans deux familles québécoises. Il est à noter cependant que la mutation 368 est une des plus rapportées dans le monde. La mutation 423, n'ayant pas été observée par d'autres groupes de recherche, fait de celle-ci, une mutation unique au Québec.

Dans les deux cas, les mutations coségrègent avec un haplotype caractéristique et même si elles sont situées sur le même gène, elles apportent un phénotype différent. Les sujets atteints dans la famille CT présentent un glaucome chronique alors que chez la famille CA, les individus présentent, en majorité, les symptômes d'un glaucome juvénile. Maintenant, tous les porteurs de ces mutations chez les deux familles peuvent être détectés et être suivis de près par leur médecin afin de limiter les dommages que peut occasionner la maladie.

Chez les deux familles on suppose qu'un deuxième facteur génétique est impliqué et viendrait moduler l'expression du gène TIGR. Cependant, cette étude n'a pas permis de l'identifier. Une étude de liaison pour d'autres loci pourrait probablement aider à localiser et à caractériser ce deuxième facteur

génétique. Ainsi, une étude plus approfondie de ces familles pourrait également aider à mieux comprendre l'expressivité variable de cette maladie.

Il serait cependant intéressant de continuer le recrutement et de poursuivre les tests d'analyse mutationnelle afin de tenter de retrouver d'autres porteurs. Le gène TIGR comporte un grand nombre de mutations impliquées dans le POAG. Il serait également intéressant de vérifier, pour chacun de ces individus atteints, la présence ou l'absence d'une de ces nombreuses mutations afin de déterminer la proportion de ces mutations au Québec.

BIBLIOGRAPHIE

Adams, M.F., Belmouden, A., Binisti, P., Brezin, A.P., Valtot, F., Bechetoille, A., Dascotte, J.C., Copin, B., Gomez, L., Chaventre, A., Back, J.F. & Garchon, H.J. (1997). Recurrent mutations in a single exon encoding the evolutionarily conserved olfactomedin-homology domain of TIGR in familial open-angle glaucoma. *Hum. Mol. Genet.* 6: 2091-2097.

Alber, T. (1992). Structure of the leucine zipper. *Current opinion in genetics and development.* 2:205-210.

Alward, W.L.M., Fingert, J.H., Coote, M.A., Johnson, T., Lerner, S.F., Junqua, D., Durcan, F.J., McCartney, P.J., Mackey, D.A., Sheffield, V.C., & Stone, E.M. (1998). Clinical features associated with mutations in the chromosome 1 open-angle glaucoma gene (*GLC1A*). *The New England Journal of Medicine.* 338:1022-1027.

Anderson, K.L., Lewis, R.A., Bejjani, B.A., Baird, L., Ollerud, B., Tomey, K.F. & Astle, W.F. (1996). A gene for primary congenital glaucoma is not linked to the locus on chromosome 1q for autosomal dominant juvenile-onset open angle glaucoma. *J. Glaucoma* 5: 416-421.

Angius, A., De Gioia, E., Loi, A., Fossarello, M., Sole, G., Orzalesi, N., Grignolo, F., Coa, A., Piratsu, M. (1998). A novel mutation in the *GLC1A* gene causes juvenile open-angle glaucoma in 4 families from the Italian region of Puglia. *Arch. Ophthalmol.* 116;6: 793-797.

Arkasu, A.N., Turacli, M.E., Aktan, S.G., Barsoum-Homsy, M., Chevrette, L., Saly, B.S., & Sarfarazi, M. (1996). A second locus (*GLC3B*) for primary congenital glaucoma (buphthalmos) maps to 1p36. *Hum. mol. genet.* 5:1199-1203.

Becker, B. (1972). *Clinical gonioscopy*. Saint-Louis: CV Mosby company.

Bejjani, B.A., Lewis, R.A., Tomey, K.F., Anderson, K.L., Dueker, D.K., Jabak, M., Astle, W.F., Otterud, B., Leppert, M., & Lupski, J.R. (1998). Mutations in *CYP1B1*, the gene for cytochrome P4501B1, are the predominant cause of primary congenital glaucoma in Saudi Arabia. *Am. J. Hum. Genet.* 62: 325-333.

Bernot, A. (1996). *L'analyse des génomes, Cartographie, séquençage, identification des gènes*. Paris, Éditions Nathan.

Bouchard, G. (1987). *Le centre SOREP et le fichier-réseau BALSAC. Présentation générale*. Document no.: I-C-64. Chicoutimi, Québec.

Bouchard, G. (1990). *Extension du fichier de population BALSAC à l'ensemble du Québec, du 17e au 20e siècle. Les données du projet*. Document no.: I-C-90. Chicoutimi, Québec.

Brezin, A.P., Adam, M.F., Belmouden, A., Lureau, M.A., Chaventre, A., Copin, B., Gomez, L., Dupont de Dinechin, S.D., Berkani, M., Valtot, F., Rouland, J.-F., Dascot, J.-C., Bach, J.-F., & Garchon, H.-J. (1998). Founder effect in *GLC1A*-linked familial open-angle glaucoma in northern France. *Am. J. Med. Genet.* 76:438-445.

Cavalli-sforza, L.L. & King, M.C. (1986). Detecting linkage for genetically heterogeneous diseases and detecting heterogeneity with linkage data. *Am. J. Hum. Genet.*, 35: 599-616.

Chisholm, I.A. & Grierson, I. (1977). Particulate phagocytosis by trabecular meshwork endothelium. *Canad. J. Ophthalmol.*, 12: 293-299.

Danyluk, A.W., & Paton, D. (1992). *Diagnosis and management of glaucoma - Clinical symposia*. CIBA-GEIGY, #1.

Darnell, J., Lodish, H., & Baltimore, D. (1990). *Biologie moléculaire de la cellule*. 2^{ème} Édition. De Boeck université. Bruxelles.

De Braekeleer, M., Bouchard, G. & Gradie, M. (1990) Consanguinité et parenté au Saguenay. In G. Bouchard & M. De Braekeleer (Éds), *Histoire d'un génome* (pp.324-342), Québec: Presses de l'Université du Québec.

Demailly, P.H. (1989). *Traitement actuel du glaucome primitif à angle ouvert*. Société française d'ophtalmologie. Masson. 419p.

Dib, C., Faure, S., Fizames, C., Samson, D., Drouot, N., Vignal, A., Millasseau, P., Marc, S., Hazan, J., Seboun, E., Lathrop, M., Gyapay, G., Morissette, & Weissenbach, J. (1996). A comprehensive genetic map of the human genome based on 5 264 microsatellites. *Nature* Vol. 380.

Etienne, R. (1969). *Les glaucomes*. Librairie France Lyon. 630 pp.

Etienne, R. (1983). Bases physiopathologiques du glaucome par fermeture de l'angle. In R. Etienne (Éd) *Comité de lutte contre le glaucome, Symposium de Bordeaux* (pp. 23-27), Bruxelles, France, SIMEP.

Fingert, J.H., Dickinson, J., Héon, E., Liebmann, J., Yamamoto, T., Kawase, K., Hoh, S., Trope, G., Craig, J., Kitazawa, Y., Ritch, R., Mackey, D., Alward, W.L.M., Sheffield, V.C., & Stone, E.M. (1998a). Analysis of myocilin mutations in 1800 glaucoma patients from five different population. *Am. J. Hum. Genet.* Supplement to vol. 63, no 4 (Abstract No. 2087).

Fingert, J.H., Ying, L., Swiderski, R.E., Nystuen, A.M., Arbour, N.C., Alward, W.L.M., Sheffield, V.C., & Stone, E.M. (1998b). Characterization and comparison of the human and mouse GLC1A glaucoma gene. *Genome Research*. 8: 377-384.

François, J. (1980). La prédisposition génétique au glaucome. *J. F. Ophthalmol.* 3:429-449.

Grierson, I., Howes, R.C., & Wang, Q. (1984). Age-related changes in the canal of Schlemm. *Exp. Eye Res.*, 39, 4, 505-512, 1984.

Hartl, D.L. (1994). *Génétique des populations*. Medecine Science Flammarion, Paris.

Jacquot, A. (1970). *Structures génétiques des populations*. Masson, Paris.

Jetté, R. (1991). *Traité de généalogies*. Presses de l'Université de Montréal.

Johnson, A.T., Drack, A.V., Kwitek, A.E., Cannon, R.L., Stones, E.M., & Alward, W.L.M., (1993). Clinical features and linkage analysis of a family with autosomal dominant juvenile glaucoma. *Ophthalmol.* 100: 524-529.

Junqueira, L.C., Carneiro, J. et Kelley, R.O. (1992). *Basic histology*. An Lange medical book. Appelton and Lange (eds) Norwalk, Connecticut. 518 pp.

Kaplan, J.C., & M, Delpech. (1989). *Biologie moléculaire et médecine*. Paris, Médecine Science Flammarion.

Kennan, A.M., Mansergh, F.C., Fingert, J.H., Clark, T., Ayuso, C., Kenna, P.F., Humphries, P., & Farrar, G.J. (1998). A novel Asp380Ala mutation in the GLC1A/Myocilin gene in a family with juvenile onset primary open-angle glaucoma. *J. Med. Genet.* 35;11:957-960.

Klein, B.E.K., Klein, R., Sponsel, W.E., Franke, T., Cantor, L.B., Martone, J. & Menage, M.J. (1992). Prevalence of glaucoma the Beaver Dam eye study. *Ophthalmology.* 99:1499.

Kubota, R., Kudoh, J., Mashima, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Hejtmanick, J.F., Oguchi, Y., & Shimizu, N. (1998). Genomic organization of the human myocilin gene (MYOC) responsible for primary open-angle glaucoma (GLC1A). *Biochemical and biophysical research communications.* 242, pp396-400.

Kubota, R., Noda, S., Wang, Y., Minoshima, S., Asakawa, S., Kudoh, J., Mashima, Y., Oguchi, Y., & Shimizu, N. (1997). A novel myosin-like protein (myocilin) expressed in the connecting cilium of the photoreceptor: molecular cloning, tissue expression and chromosomal mapping. *Genomics* 41: 360-369.

Lathrop, G.M., Lalouel, J.M., Julier, C., & Ott, J. (1984). Strategies for multilocus linkage analysis in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81:3443-3446.

Lebel, R.R. (1983). Consanguinity studies in Wisconsin I: Secular trends in consanguineous marriage 1843-1981. *Am. J. Hum. Genet.* 15:543-560.

Leske, M.C. (1983). The epidemiology of open-angle glaucoma: a review. *Am. J. Epidemiol.* 118: 166-191.

Lichter, P.R. (1994). Genetics clues to glaucoma's secrets. The L Edouard Jackson Memorial lecture. Part 2. *Am. J. Ophthalmol.* 117:706-727.

Little, S. (1997). *Current Protocols in Human Genetics* (eds Dracopoli, N.C. et al.) John Wiley & Sons, New York. pp 9.8.1-9.8.12.

Lowe, R.F. (1972). Primary angle closure glaucoma. Inheritance and environment. *Br. J. Ophthalmol.* 56: 13-20.

Lütjen-Drecoll, E. May, C.A. Polansky, J.R. Johnsonson, D.H. Bloemendal, H. & Nguyen, T.D. (1998). Localization of the stress proteins alphaB-crystallin and trabecular meshwork inducible glucocorticoid response protein in normal and glaucomatous response protein in normal and glaucomatous trabecular meshwork. *Inv. ophthalmol. and vis. sci.* 39, 3:517-525.

Malécot, G. (1966). *Probabilités et hérédité*. Presses universitaires de France.

Manserg, F.C., Kenna, P.F., Ayuso, C., Kiang, A.-S., Humphries, P., & Farrar, G.J. (1998). Novel mutations in the TIGR gene in early and late onset open angle glaucoma. *Human mutation.* 11:244-251.

Martinez, M., Khat, M., Leboyer, M. & Clerget-Darpoux, F. (1989). Performance of linkage analysis under misclassification error when the genetic model is unknown. *Genet. Epidemiol.*, 6: 253-258.

Mears, A.J., Mirzayans, F., Gould, D.B., Pearce, W.G., & Walter, M.A. (1996). Autosomal dominant iridogoniodysgenesis anomaly maps to 6p25. *Am. J. Hum. Genet.* 59:1321-1327.

Michels-Rautenstrauss, K.G., Mardin, C.Y., Budde, W.B., Liehr, T., Polansky, J., Nguyen, T., Timmerman, V., Van Broeckhoven, C., Naumann, G.O.H., Pfeiffer, R.A., & Rautenstrauss, B.W. (1998). Juvenile open angle glaucoma: fine mapping of the the TIGR gene to 1q24.3-q25.2 and mutation analysis. *Human genetics.* 102:103-106.

Morissette, J. (1990). La consanguinité dans la population de Charlevoix (1680-1852). In G. Bouchard & M. De Braekeleer (Éds), *Histoire d'un génome* (pp.324-342). Québec: Presses de l'Université du Québec.

Morissette, J., Côté, G., Anctil, J.L., Plante, M., Amyot, M., Héon, E., Trope, G.E., Weissenbach, J., & Raymond, V. (1995). A common gene for juvenile and adult-onset primary open-angle glaucomas confined on chromosome 1q. *Am J Hum Genet.* 56:1431-1442.

Morissette, J., Clépet, C., Moisan, S., Dubois, S., Winstall, E., Vermeeren, D., Nguyen, T.D., Poalnsky, J.R., Côté, G., Anctil, J.L., Amyot, M., Plante, M., Falardeau, P., & Raymond, V. (1998). Homozygotes carrying an autosomal dominant TIGR mutation do not manifest glaucoma. *Nature genetics*. 19: 319-321.

Morton, N.E. (1955). Sequential tests for detection of linkage. *Am. J. Hum. Genet.*, 7:277-318.

Nakajima, A., Fujiki, K. & Tanabe, U. (1979). Genetic of buphthalmos. 7th congress Asia Pacific Acad. *Ophthalmol.*, Karachi, Pakistan.

Ortego, J., Escribano, J., & Coca-Prados, M. (1997). Cloning and characterization of substracted cDNAs from a human ciliary library encoding TIGR, a protein involved in juvenile open angle glaucoma with homology to myosin and olfactomedin. *FEBS Letters*. 413: 349-353.

Ott, J. (1986). Computer simulation method in human linkage analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 4175-4178.

Ott, J. (1991) *Analysis of human genetic linkage*. Revised Edition. USA. The Johns Hopkins University Press.

Paquet, J-C. (1988). *Glaucome et cataractes*. Montréal. Les éditions de l'homme.

Perdriel, G. (1983). Introduction et définition. In R. Etienne (Ed) *Comité de lutte contre le glaucome, Symposium de Bordeaux* .(pp. 11-12). Bruxelles, France, SIMEP.

Quigley, HA. (1996). Number of people with glaucoma worldwide. *Br. J. Ophthalmol.* 80:389-393.

Quigley, H.A, & Vitale, S. (1997). Models of open-angle glaucoma prevalence and incidence in the United States. *Inv Ophthalmol and Vis Sci*. Vol 38, 1:83-91.

Richard, J.E., Ritch, R., Lichter, P.R., Rozsa, F.W., Stringham, H.M., Caronia, R.M., Johnson, D., Abundo, G.P., Willcockson, J., Downs, C.A., Thompson, D.A., Musarella, M.A., Gupta, N., Othman, M.I., Torrez, D.M., Herman, S.B., Wong, D.J., Higashi, M., & Boehnke, M. (1998). Novel trabecular meshwork inducible glucocorticoid response mutation in an eight-generation juvenile-onset primary open-angle glaucoma pedigree. *Ophthalmology*. Vol. 105;9: 1698-1707.

Rozsa, F.W., Ritch, R., Othman, M., Lichter, P.R., Johnson, A.T., Shimizu, S., Downs, C.A., Nguyen, T.D., Caronia, R.M., Johnson, D., Abundo, G.P., Musarella, M.A., Gupta, N., Polansky, J., & Richards, J.E. (1998a). GLC1A glaucoma family lacks mutations in coding sequences or splice sites of TIGR glaucoma gene. *IOVS*. Vol. 39 No 4: 32.

Rozsa, F.W., Shimizu, S., Lichter, P.R., Johnson, A.T., Othman, M.I., Scott, K., Downs, C.A., Nguyen, T.D., Polansky, J., & Richards, J.E. (1998b). GLC1A mutations point to regions of potential functional importance on the TIGR/MYOC protein. *Molecular Vision*. 4:20.

Rozsa, F.W., Shimizu, S., Lichter, P.R., Johnson, A.T., Othman, M.I., Scott, K., Downs, C.A., Nguyen, T.D., Polansky, J., & Richards, J.E. (1998c). Mutation screening and analysis of predicted protein structure of the TIGR gene in GLC1A families. *Am. J. Hum. Genet.* Supplement to vol. 63, no. 4 (Abstract No. 2222).

Sarfarazi, M., Akarsu, A.N., Hossain, A., Turacli, M.E., Aktan, S.G., Barsoum-Homsy, M., Chevrette, L. et al. (1995). Assignment of a locus (GLC3A) for primary congenital glaucoma (buphthalmos) to 2p21 and evidence for genetic-heterogeneity. *Genomics* 30:171-177.

Sarfarazi, M., Child, A., Stoilova, D., Brice, G., Desai, T., Trifan, O.C., Poinosawmy, D., & Crick, R.P. (1998). Localization of the fourth locus (GLC1E) for adult-onset primary open-angle glaucoma to the 10p15-p15 region. *Am. J. hum. Genet.* 62;3:641-652.

Schwartz, B. (1986). The management and treatment of ocular hypertension and glaucoma. *Chibret Int. J. Ophthalmol.*, 4, 2, 1-9.

Sheffield, V.C., Stone, E.M., Alward, W.L.M., Drack, A.V., Johnson, A.T., Streb, L.M., & Nichols, B.E. (1993). Genetic linkage of familial open-angle glaucoma to chromosome 1q21-q31. *Nat. Genet.* 4:47-50.

Shield, M., Ritch, R., & Krupin, T. (1996). *Classification of the glaucomas*. In the glaucomas. Vol. 2, Mosby, St-Louis, 717-725.

Stoilova, D., Child, A., Trifan, O.C., Crick, R.P., Coakes, R.L., & Sarfarazi, M. (1996). Localization of a locus (GLC1B) for adult-onset primary open-angle glaucoma to the 2cen-q13 region. *Genomics* 36:142-150.

Stoilova, D., Child, A., Brice, G., Cricks, R.P., Fleck, B.W., & Sarfarazi, M. (1997). Identification of a new TIGR mutation in a family with juvenile-onset primary open-angle glaucoma. *Ophthalmic Genetics*. Vol. 18;3: 109-118.

Stoilova, D., Child, A., Brice, G., Desai, T., Barsoum-Homsy, M., Ozdemir, N., Chevrette, L., Adam, M.F., Garchon, H.J., Crick, R.P., & Sarfarazi, M. (1998a). Novel TIGR/MYOC mutations in families with juvenile onset primary open angle glaucoma. *J. Med. Genet.* 35;12:989-992.

Stoilova, D., Child, A., Desai, T., Brice, G., Fleck, B.W., Barsoum-Homsy, M., Crick, R.P., & Sarfarazi, M. (1998b). Screening of the TIGR gene in 140 primary open angle glaucoma probands identified six mutations in ten families. *IOVS*. Vol. 39; 4: 688.

Stone, E.M., Fingert, J.H., Alward, W.L.M., Nguyen, T.D., Polansky, J.R., Sunden, S.L.D., Nishimura, D., Clark, A.F., Nystuen, A., Nichols, B.E., Mackey, D.A., Ritch, R., Kalenak, J.N., Craven, E.R., & Sheffield, V.C. (1997). Identification of a gene that causes primary open-angle glaucoma. *Science* 275, pp 668-670.

Suzuki, Y., Shirato, S., Taniguchi, F., Ohara, K., Nishimaki, K., & Ohta, S. (1997). Mutations in TIGR gene in a familial primary open-angle glaucoma in Japan. *Am. J. Hum. Genet.* 61:1202-1204.

Terwilliger, J.D., Ott, J. (1994). *Handbook of human genetic linkage*. USA. The Johns Hopkins University Press.

Thylefors, B. & Negrel, A. (1994). The global impact of glaucoma. *World health organ bull.* 72:323-326.

Tortora, G.J., & S.R., Grabowski. (1994). *Principes d'anatomie et de physiologie*, Nouvelle édition. Centre éducatif et culturel. 1204 pp.

Tremblay, M., Jomphe, M., Vézina, H. (sous presse). Comparaison de structures patronymiques et génétiques dans la population québécoise. Actes du colloque «*Le patronyme. Histoire, anthropologie et société*», Onzièmes entretiens du Centre Jacques Cartier, Lyon, décembre 1998.

Trifan, O.C., Traboulsi, E.I., Stoilova, D., Alozie, I., Nguyen, R., Raja, S., & Sarfarazi, M. (1998). The third locus (GLC1D) for adult-onset primary open-angle glaucoma maps to the 8q23 region. *Am. J. Ophthalmol.* 126;1:17-28

Tripathi, R.C. (1976). In. Béchetoille A., Brachet A., Saraux H., Microchirurgie des glaucomes. No. spécial, *Bull. Soc. Ophthalmol. Fr.*

Tripathi, R.C. (1973). Pressure dependancy of the aqueous outflow, letter. *Am. J. Ophthalmol.*, 76: 402-403.

Vaughan, D.G. & Riordan-eva, P. (1995). Glaucoma. In D.G. Vaughan, T. Asbury & P Riordan-Eva (Éds), *General ophthalmology*. (14^e ed)pp 208-225. Appelton and Lange: Norwalk, Connecticut.

Watson, J.D., Gilman, M. Witkowski, J. & Zoller, M. (1994). *ADN recombinant*. 2ième édition. DeBoeck Université. Bruxelles.

White, R. & Lalouel J.M. (1988). *Chromosome mapping with DNA markers*. Scientific American, 1988, vol. 258, no. 2:40-48.

Weeks, D.E., Lathrop, G.M. & Ott, J. (1990). SLINK: A general simulation program for linkage analysis. *Am. J. Hum. Genet.* 47:A 204 (supplement).

Wigg, J.L., Allingham, R.R., Vollrath, D., Jones, K.H., De La Paz, M., Kern, J., Patterson, K., Babb, V.L., Del Bono, E.A., Broomer, B.W., Pericak-Vance, M.A., & Haines, J.L. (1998). Prevalence of mutations in TIGR/Myocilin in patients with adult and juvenile primary open-angle glaucoma. *Am. J. Hum. Genet.* 63:1549-1552.

Wilson, R., & Martone, J. (1996). *Epidemiology of chronic open-angle glaucoma*. In Ritch, R., Schield, M., & Krupin, T. (eds). *The glaucomas*. Vol 2 Mosby, St-Louis, pp.753-763.

Wirtz, M.K., Samples, J.R., Kramer, P.L., Rust, K., Topinka, J.R., Young, J., Koler, R.D., Accot, T.S. (1997). Mapping a gene for adult-onset primary open-angle glaucoma to chromosome 3q. *Am. J. Hum. Genet.* 60;2: 296-304.

Wirtz, M.K., Samples, J.R., Rust, K., Lie, J., Nordling, L., Schilling, K., Acott, T.S., & Kramer, P.L. (1999). *GLC1F*, a new primary open-angle glaucoma locus, maps to 7q35-q36. *Arch. Ophthalmol.* 117:237-241.

Yoon, S., Kim, H., Moon, J., Lim, J., & Joo, C. (1998). Identification of TIGR mutations in Korean JOAG/POAG patients. *Am. J. Hum. Genet.* Supplement to vol. 63, no.4 (Abstract No. 2296).

ANNEXE A

Coefficients d'apparementement ϕ calculés pour toutes les ascendances couplées
et pour lesquelles ϕ est supérieur à 0

Couples d'ascendances	Coefficient ϕ $\times 10^{-4}$	Couples d'ascendances	Coefficient ϕ $\times 10^{-4}$
1 et 2	3,66	12 et 15	1,22
1 et 3	23,19	12 et 16	2,44
1 et 4	16,48	12 et 17	1,22
1 et 5	2,44	12 et 21	1,22
1 et 8	2,44	12 et 25	2,44
1 et 21	1,22	12 et 26	1,22
1 et 26	2,44	12 et 30	7,32
1 et 30	1,22	12 et 31	1,22
1 et 31	1,22	12 et 36	4,88
1 et 32	14,04	13 et 16	1,22
1 et 33	3,05	13 et 18	1,22
2 et 3	6,10	13 et 26	0,61
2 et 4	5,49	13 et 28	1,83
2 et 8	1,83	13 et 30	1,22
2 et 9	4,58	13 et 31	2,44
2 et 11	9,77	14 et 15	1,22
2 et 17	1,22	14 et 16	1,22
2 et 19	1,22	14 et 21	5,49
2 et 26	2,44	14 et 28	2,44
2 et 27	1,22	14 et 31	3,66
2 et 30	10,68	15 et 17	4,88
3 et 4	2,44	15 et 31	1,22

Couples d'ascendances	Coefficient ϕ $\times 10^4$	Couples d'ascendances	Coefficient ϕ $\times 10^4$
3 et 8	9,77	15 et 36	3,66
3 et 13	12,21	16 et 21	3,66
3 et 15	1,22	16 et 28	1,22
3 et 32	24,72	16 et 31	1,22
4 et 5	2,44	17 et 18	9,77
4 et 8	5,49	17 et 20	1,22
4 et 12	2,44	17 et 21	1,22
4 et 26	4,88	17 et 22	1,83
4 et 30	6,71	17 et 28	1,22
5 et 8	2,44	17 et 29	1,22
5 et 13	1,22	17 et 30	6,10
5 et 14	6,41	18 et 22	2,44
5 et 17	17,40	18 et 25	18,31
5 et 18	20,14	18 et 28	1,22
5 et 20	3,66	18 et 29	18,92
5 et 21	4,12	18 et 30	8,54
5 et 22	4,88	18 et 31	1,22
5 et 25	4,88	19 et 30	2,14
5 et 28	6,10	20 et 21	1257,32
5 et 29	2,44	20 et 22	0,61
5 et 30	4,88	20 et 25	4,88
5 et 31	7,63	20 et 26	1,22
6 et 10	1,83	20 et 28	2,44
6 et 13	1,22	20 et 31	1,83
6 et 26	1,22	21 et 28	5,49
6 et 29	1,83	21 et 31	4,88
6 et 30	1,83	22 et 25	2,44

Couples d'ascendances	Coefficient ϕ $\times 10^{-4}$	Couples d'ascendances	Coefficient ϕ $\times 10^{-4}$
7 et 10	2,44	22 et 28	2,44
7 et 19	5,49	22 et 31	2,44
7 et 33	1,22	23 et 29	1,22
7 et 35	1,22	23 et 33	12,21
7 et 36	8,54	23 et 36	2,44
8 et 11	4,88	24 et 36	4,88
8 et 17	1,22	25 et 28	19,53
8 et 21	3,66	25 et 29	3,66
8 et 26	1,22	25 et 30	20,75
8 et 28	1,22	26 et 28	3,66
8 et 30	1,22	26 et 30	1,22
8 et 31	2,44	28 et 31	2,44
9 et 15	2,44	29 et 30	1,22
9 et 18	1,22	29 et 34	1,83
9 et 22	5,49	29 et 35	3,66
10 et 15	1,22	33 et 36	3,66
10 et 19	12,82	34 et 35	12,82
11 et 27	1,22	34 et 36	16,48
12 et 13	1,22	Total de couples d'ascendances	135