



AMYOTROPHIES SPINALES PROXIMALES

Référence : **ANPGM_004**Numéro de version : **2.0**

Page 1/16

Date de Création : **Avril 2009**Date de 1^{ère} mise en application : **15/06/2009**Numéro de l'ancienne version du document: **ANPGM_004_V2.0**Date de la mise à jour V2.0 : **Juillet 2018**

Motif : rédaction des indications par les cliniciens référents ; actualisation des stratégies de diagnostic moléculaire

Validation : 11 décembre 2018

	Nom	Hôpital	Date
Rédacteur(s)	<i>Dr. Pascale Saugier-Veber</i>	<i>Laboratoire de Génétique Moléculaire- CHU Charles Nicolle Rouen</i>	<i>avril 2009</i>
Vérificateur(s)	<i>Dr. Séverine Drunat</i>	<i>UF de Génétique Moléculaire, Hôpital Robert Debré, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris</i>	<i>mai 2015</i>
Filières	<i>Dr. Jean-Marie Cuisset</i> FILNEMUS	<i>Service de Neuropédiatrie CHRU de Lille</i>	
Approbateur(s)	<u>Pour le CA de l'ANPGM :</u> Benoît Arveiler Cécile Acquaviva Anne-Françoise Roux Pascale Saugier-Veber	CHU Bordeaux CHU Lyon CHU Montpellier CHU Rouen	<i>11 décembre 2018</i>

AMYOTROPHIES SPINALES PROXIMALES

Référence : ANPGM_004

Numéro de version : 2.0

Page 2/16

SOMMAIRE

1. Introduction.....	3
2. Contextes cliniques pour l'analyse génétique.....	4
2.1. Cas index	4
2.2. Exploration des apparentés d'un sujet atteint de SMA.....	5
2.3 Diagnostic prénatal	5
3. Quelques points clés.....	6
4. Pathologie moléculaire.....	6
5. Corrélations génotype-phénotype.....	7
6. Méthodes de diagnostic moléculaire	8
6.1. Recherche d'une délétion homozygote du gène SMN1	8
6.2. Quantification des copies des gènes SMN1 et SMN2.....	8
6.3. Séquençage du gène SMN1.....	8
7. Arbre décisionnel pour l'analyse génétique.....	9
7.1. Étude des cas index.....	9
7.1.1. Recherche d'une délétion homozygote du gène SMN1.....	9
7.1.2. Établissement du génotype complet (nombre de gènes SMN1 et SMN2)	9
7.1.3. Recherche d'une mutation ponctuelle	9
7.2. Étude des apparentés.....	11
7.3. Diagnostic prénatal	14
8. Cotation des analyses selon le RIHN.....	14
9. Références bibliographiques.....	15
Annexe : liste des laboratoires.....	16

AMYOTROPHIES SPINALES PROXIMALES

Référence : ANPGM_004

Numéro de version : 2.0

Page 3/16

1. Introduction

Les amyotrophies spinales proximales (ou amyotrophies spinales infantiles (ASI) ou spinal muscular atrophy (SMA)) constituent un groupe d'affections caractérisées par une dégénérescence des neurones de la corne antérieure de la moelle épinière conduisant à une paralysie progressive touchant la partie proximale des membres et à une atrophie musculaire. Les patients sont habituellement classés en cinq groupes en fonction de l'âge de début de l'affection, et de la dernière acquisition motrice (Munsat and Davies Neuromuscul Disord 1992). Avec une incidence de 1/6000 soit environ 124 nouveaux cas par an en France, la SMA constitue la deuxième maladie autosomique récessive de l'enfant la plus fréquente après la mucoviscidose. La fréquence des hétérozygotes dans la population générale est estimée à 1/40.

Sous-type clinique	OMIM#	Age de début	Acquisitions motrices
SMA type 0		anténatal	
SMA type I (Werdnig-Hoffmann)	253300	< 6 mois	Pas d'acquisition de la station assise
SMA type II	253550	< 18 mois	Acquisition de la station assise; pas d'acquisition de la marche
SMA type III (Kügelberg-Welander)	253400	> 18 mois	Acquisition de la marche
SMA de type IV	271150	20-30 ans	

Les trois formes de SMA ont d'abord été localisées dans le même intervalle chromosomique en 5q11-q13 (Melki *et al.*, Nature 1990; Brzustowicz *et al.*, Nature 1990). En 1995, il a été démontré que 95 % des patients atteints de SMA présentent une délétion à l'état homozygote du gène *SMN1* (Lefebvre *et al.*, Cell 1995). La caractérisation de mutations intragéniques chez les 5% de patients restants a confirmé l'implication du gène *SMN1* dans les SMA (Lefebvre *et al.*, Cell 1995; Parsons *et al.*, Am J Hum Genet 1998; Wirth *et al.*, Am J Hum Genet 1999). Le gène *SMN1* (*Survival of Motor Neuron*) est localisé dans une région de 500 Kb qui s'est dupliquée et inversée au cours de l'évolution. Le gène *SMN1*, situé dans la région télomérique, possède donc un gène copie dans la région centromérique, le gène *SMN2*.

Les gènes *SMN1* et *SMN2* sont extrêmement homologues et ne diffèrent que par 5 nucléotides. L'une de ces différences nucléotidiques (c.840C>T) est une mutation synonyme (p.Phe280Phe) qui modifie un site régulateur d'épissage : le gène *SMN1* produit un transcrit pleine longueur incluant l'exon 7 (FL) tandis que le gène *SMN2* génère principalement un transcrit sans exon 7 ($\Delta 7$) mais également une faible proportion de transcrits FL. La protéine produite à partir du transcrit $\Delta 7$ est instable. Ainsi, la protéine SMN sera essentiellement produite par le gène *SMN1* mais également en faible proportion par le gène *SMN2*.

Il existe une corrélation statistique inverse entre le nombre de copies du gène *SMN2* et la sévérité du phénotype : ainsi, 80 % des patients atteints de SMA de type I ont 1 ou 2 copies du gène *SMN2*, 82 % des patients atteints de SMA de type II présentent 3 copies du gène *SMN2*, et 96 % des patients atteints de SMA de type III ont 3 ou 4 copies du gène *SMN2* (Feldkötter *et al.*, Am J Hum Genet 2002). Le gène *SMN2* constitue donc un gène modificateur de la SMA par sa capacité à produire une faible quantité de protéine SMN fonctionnelle.

Deux des 5 différences nucléotidiques entre les gènes *SMN1* et *SMN2*, localisées dans les exons 7 et 8, sont mises à profit pour distinguer *SMN1* de *SMN2* pour le diagnostic moléculaire de la SMA. L'absence de détection de l'exon 7 du gène *SMN1* (liée soit à une délétion homozygote du gène *SMN1* soit à une conversion génique partielle de *SMN1* en *SMN2*) conduit au diagnostic de SMA dans 95 % des cas. Dans 5 % des cas, une mutation ponctuelle intragénique sera associée à une délétion ou une conversion génique du second allèle. D'exceptionnels cas de mutations ponctuelles à l'état homozygote ont été décrits dans des familles consanguines.

AMYOTROPHIES SPINALES PROXIMALES

Référence : ANPGM_004

Numéro de version : 2.0

Page 4/16

2. Contextes cliniques pour l'analyse génétique

2.1. Cas index

1. **En période néonatale**, le diagnostic peut être évoqué devant une hypotonie majeure contrastant avec un éveil cortical optimal, prédominant aux membres inférieurs (avec attitude en batracien caractéristique), associée à une aréflexie ostéotendineuse et à un balancement thoraco-abdominal (traduisant l'effet de contraste entre l'atteinte des muscles intercostaux et de la sangle abdominale et le respect, remarquable, du diaphragme dans l'amyotrophie spinale liée au gène *SMN1*).

2. **Chez le nourrisson et le jeune enfant**, la présentation clinique est typique avec une atteinte initiale proximale : hypotonie axiale majeure avec un déficit moteur des quatre membres prédominant aux membres inférieurs, aréflexie ostéo-tendineuse, fasciculations de la langue alors que l'éveil est normal. Le profil évolutif de cette affection, « en plateau » (arrêt de tout progrès moteur dès que la maladie a débuté) est un élément très caractéristique et représente un argument diagnostique.

⇒ Pour les formes néonatales et infantiles, la réalisation d'un électroneuromyogramme (ENMG) n'est pas un prérequis à l'analyse génétique. La décision de réaliser ou non cet examen est laissée au choix du clinicien référent. S'il est réalisé, l'ENMG objective un pattern neurogène très évocateur : tracé neurogène en électromyographie de détection, vitesses de conduction nerveuses motrices et sensitives normales (ou sub-normales). Les CPK plasmatiques sont normales ou modérément élevées (entre 2 et 5 fois la normale)

3. **Chez l'adulte**, la présentation est plus trompeuse, classiquement pseudo-myopathique (déficit des ceintures prédominant aux membres inférieurs, réflexes ostéo-tendineux possiblement conservés). Les formes pauci-symptomatiques sont souvent difficiles à diagnostiquer. L'âge de début des symptômes peut être très tardif (parfois après l'âge de 30 ans).

⇒ Dans la majorité des cas, le dosage des CPK, l'étude des vitesses de conduction nerveuse et un électromyogramme devraient être proposés afin de caractériser l'atteinte et de rechercher un diagnostic différentiel. Dans certains cas difficiles, une biopsie musculaire peut être discutée. Ces examens ne constituent néanmoins pas un prérequis nécessaire à l'étude génétique. Devant une attente pseudo-myopathique, l'ENMG peut redresser le diagnostic en révélant une atteinte neurogène. De même, lorsque la présentation d'allure myopathique a motivé une biopsie musculaire, un pattern histologique neurogène (atrophie des fibres de type 1 et 2, hypertrophie des fibres de type 1, phénomènes de grouping de fibres musculaires de même type) imposera une exploration du gène *SMN1*.

Critères d'exclusion et diagnostics différentiels:

- l'existence d'une cardiomyopathie exclut l'implication du gène *SMN1*. Des malformations cardiaques peuvent cependant être observées en anténatal dans la SMA de type 0.
- un profil évolutif avec des acquis moteurs réguliers exclut l'implication du gène *SMN1*.
- la présence d'une épilepsie myoclonique dans les cas de SMA est exceptionnelle et conduit plutôt à rechercher une mutation dans le gène *ASAH1*.
- à la présence d'une atrophie ponto-cérébelleuse exclut l'implication du gène *SMN1*. Il conviendra de rechercher une mutation dans le gène *VRK1*. Une hypoplasie cérébelleuse marquée doit faire évoquer un CDG syndrome.
- chez l'adulte, l'existence d'une forme distale autosomique dominante très lentement progressive doit inciter à rechercher une mutation du gène *BICD2*.
- chez l'enfant, en cas de paralysie du muscle diaphragmatique, il faut évoquer le SMARD (*Spinal Muscular Atrophy with Respiratory Distress*) et rechercher les mutations du gène *IGHMBP2*.

AMYOTROPHIES SPINALES PROXIMALES

Référence : ANPGM_004

Numéro de version : 2.0

Page 5/16

Remarque :

- l'arthrogrypose congénitale et l'atteinte des paires crâniennes chez le nouveau-né ne sont pas des critères d'exclusion absolus: les patients atteints de SMA de type 0 présentent dans la majorité des cas une arthrogrypose congénitale et une atteinte des paires crâniennes.

Pour les cas difficiles, il est recommandé d'utiliser les recours offerts par les centres de référence ou de compétence dévolus aux maladies neuromusculaires.

2.2. Exploration des apparentés d'un sujet atteint

Lorsqu'une mutation ou une délétion du gène *SMN1* est détectée chez un cas index, une exploration moléculaire doit être proposée :

- chez ses parents, pour détecter les cas de délétion *de novo* et d'éventuelle duplication en *cis* pouvant compliquer l'exploration familiale
- chez ses apparentés et leur conjoint dans le cadre d'un projet parental.
- chez les apparentés (sans leur conjoint) dans le cadre d'une enquête familiale sans projet parental

Le test génétique ne devrait être proposé que pour les couples dont le risque *a priori* d'avoir un enfant atteint de SMA **est supérieur ou égal à 1/1500** (soit risque *a priori* de 1/8 de l'apparenté d'être hétérozygote pour un conjoint de la population générale). En effet, le bénéfice du test génétique, étant donné sa sensibilité imparfaite, ne pourra réduire ce risque au mieux qu'à cette valeur, si l'apparenté se révèle hétérozygote.

Remarque : Si le cas index est décédé et qu'aucune étude moléculaire n'avait pu être effectuée, la caractérisation d'une délétion hétérozygote chez chacun des parents permet de confirmer le diagnostic clinique et moléculaire chez le cas index.

2.3. Diagnostic prénatal

Le diagnostic prénatal (DPN) peut être réalisé dans deux contextes différents :

- Diagnostic anténatal sur antécédent familial : dans ce cas, la ou les mutations doit (doivent) avoir été mise(s) en évidence au préalable dans la famille.
- Diagnostic anténatal sur signes d'appels échographiques :
 - hypomobilité fœtale au troisième trimestre de la grossesse
 - associée ou non à un hydramnios
 - associée ou non à une malposition des extrémités au 3^{ème}. Les malpositions des extrémités découvertes au 2^{ème} trimestre de la grossesse ne correspondent pas à une SMA

Aucun signe ne suffisamment sensible et spécifique pour définir un arbre décisionnel permettant d'améliorer le diagnostic de la SMA de type 0 (Grotto *et al.*, J Neuromusc Dis 2016).

AMYOTROPHIES SPINALES PROXIMALES

Référence : ANPGM_004

Numéro de version : 2.0

Page 6/16

3. Quelques points clés

- Mode de transmission : autosomique récessif (cas exceptionnels de délétions *de novo*)
- Codes OMIM des différents types de SMA
 - SMA de type 0 : pas de code OMIM
 - SMA de type I : OMIM#253300
 - SMA de type II : OMIM#253550
 - SMA de type III : OMIM#253400
 - SMA de type IV : OMIM#271150
- Gènes
 - SMN1* OMIM#300354 NM_000344.3 ; LRG_676
 - SMN2* OMIM#300354 NM_017411.3
- Structure des gènes

Les gènes *SMN1* et *SMN2* sont hautement homologues avec seulement 5 nucléotides de différence, dont une variation dans l'exon 7 et une variation dans l'exon 8. Attention, l'usage est de conserver une nomenclature spécifique des exons comprenant exon 2a et exon 2b. Ainsi, les gènes *SMN1* et *SMN2* comportent 9 exons, l'exon 7 étant le 8^{ème} exon et l'exon 8 étant le dernier exon.

4. Pathologie moléculaire

Sujet atteint :

La SMA résulte de l'inactivation bi allélique du gène *SMN1*. La fréquence des génotypes au locus *SMN1* est résumée dans le tableau 1 :

Dans 95 % des cas, les patients présentent une délétion à l'état homozygote du gène *SMN1* ou une conversion génique du gène *SMN1* en gène *SMN2*.

Dans 5 % des cas, les patients présentent une délétion à l'état hétérozygote du gène *SMN1* associée à une mutation du gène *SMN1*.

De façon exceptionnelle, les patients présentent une mutation du gène *SMN1* à l'état homozygote.

Tableau 1 : Génotypes au locus *SMN1* des sujets atteints de SMA

Génotype <i>SMN1</i> observé	Fréquence estimée
Délétion homozygote	95 %
Délétion hétérozygote + mutation ponctuelle	5 %
Mutation ponctuelle + mutation ponctuelle	<<1 %

Porteurs sains :

Dans 95 % des cas, les porteurs de SMA présentent une seule copie du gène *SMN1* (1 allèle avec 1 copie du gène *SMN1* et 1 allèle avec 0 copie du gène *SMN1*).

Dans 4 à 8 % des cas, selon leur origine ethnique, les porteurs de SMA présentent une duplication en *cis* des gènes *SMN1* sur le même chromosome (1 allèle avec 2 copies du gène *SMN1* et 1 allèle avec 0 copie du gène *SMN1*).

Enfin, de façon exceptionnelle, les porteurs peuvent présenter 2 copies du gène *SMN1* mais 1 des 2 copies porte une mutation ponctuelle (1 allèle avec 1 copie du gène *SMN1* et 1 allèle avec 1 copie du gène *SMN1* muté).

AMYOTROPHIES SPINALES PROXIMALES

Référence : ANPGM_004

Numéro de version : 2.0

Page 7/16

Les tableaux 2 et 3 présentent la fréquence de ces différents allèles dans la population des patients SMA et dans la population générale.

Tableau 2 : Fréquence allélique dans la population des patients atteints de SMA

	Fréquence allélique estimée
Allèle avec 0 gène SMN1	0.97
Allèle avec 1 gène SMN1 muté	0.03

Tableau 3 : Fréquence allélique dans la population générale

	Fréquence estimée selon Ogino et al., Eur J Hum Genet, 2004	Fréquence estimée en France
Allèle avec 1 gène SMN1	0.95	
Allèle avec 2 gènes SMN1	0.038	0.04 à 0.08 en fonction de l'origine ethnique
Allèle avec 0 gène SMN1	0.013	
Allèle avec 1 gène SMN1 portant une mutation ponctuelle	0.00024	

5. Corrélations génotype-phénotype

La physiopathologie de la SMA repose sur la quantité de transcrit FL généré à partir des gènes SMN1 et SMN2.

L'une des 5 différences nucléotidiques entre les gènes SMN1 et SMN2 est localisé en position +6 de l'exon 7. Cette variation est localisée dans un élément régulateur d'épissage. La présence d'un C à cette position conduit à l'apparition d'un élément activateur exonique d'épissage (ESE ; *Exonic Splicing Enhancer*) et à la suppression d'un élément inhibiteur exonique d'épissage (ESS ; *Exonic Splicing Silencer*). La présence d'un T à cette position conduit à la suppression de l'élément activateur exonique d'épissage (ESE ; *Exonic Splicing Enhancer*) et au renforcement de l'élément inhibiteur exonique d'épissage (ESS ; *Exonic Splicing Silencer*).

Ainsi, le gène SMN1 ne produit que le transcrit FL tandis que le gène SMN2 produit essentiellement le transcrit $\Delta 7$ et seulement une petite quantité de transcrit FL.

Le génotype 0 SMN1 0 SMN2 n'est pas viable. Les patients présentent toujours au moins 1 copie du gène SMN2 à partir de laquelle une petite quantité de transcrits FL est générée.

Le gène SMN2

Le gène SMN2 est le principal gène modificateur de la sévérité de la SMA.

En effet, plus le nombre de copies du gène SMN2 est important, plus la quantité de transcrit FL généré est importante et plus le phénotype est atténué (Feldkötter *et al.*, Am J Hum Genet 2002 ; Calucho *et al.*, Neuromusc Dis 2018).

Le gène SMN2 étant localisé en 5q11-q13 à proximité immédiate du gène SMN1, au sein des fratries, les enfants présentent le même type de SMA dans l'immense majorité des cas.

Autres gènes modificateurs

PLS3	→ Plastin 3	(Oprea <i>et al.</i> , Science 2008)
CORO1C	→ CORO1C	(Hosseini-barkoobie <i>et al.</i> , Am J Hum Genet 2016)
NCALD	→ Neurocalcine Delta	(Riessland <i>et al.</i> , Am J Hum Genet 2017)
CHP1	→ CHP1	(Janzen <i>et al.</i> , Brain 2018)

AMYOTROPHIES SPINALES PROXIMALES

Référence : ANPGM_004

Numéro de version : 2.0

Page 8/16

6. Méthodes de diagnostic moléculaire**6.1. Recherche d'une délétion homozygote du gène *SMN1***Méthodes :ACRS (Van der Steege *et al.*, Lancet 1995)NB : toutes les méthodes permettant la quantification des copies des gènes *SMN1* permettent l'identification d'une délétion à l'état homozygote du gène *SMN1*.Applications :

- Confirmation du diagnostic de SMA chez un cas index
- Réalisation d'un diagnostic prénatal de SMA

6.2. Quantification du nombre de copies des gènes *SMN1* et *SMN2*Méthodes :

- Quantification des copies totales des gènes *SMN1* et *SMN2* par PCR quantitative en temps réel et mesure de la proportion *SMN1/SMN2* par extension d'amorce (Gérard *et al.*, Hum Mutat 2000)
- QMPFSF (Saugier-Weber *et al.*, J Med Genet 2001 ; Vezain *et al.*, Hum Mutat 2010)
- MLPA (Arklblad *et al.*, Neuromusc Dis 2006; Scarciolla *et al.*, Neurogenetics 2006)

Applications :

- Recherche d'une délétion hétérozygote du gène *SMN1* chez un cas index qui n'est pas porteur d'une délétion à l'état homozygote. L'identification d'une délétion à l'état hétérozygote du gène *SMN1* chez ce cas index motivera la recherche d'une mutation ponctuelle du gène *SMN1* (cf 6.3.)
- Recherche d'une délétion hétérozygote du gène *SMN1* chez les deux parents un cas index décédé de manière à confirmer indirectement son diagnostic de SMA
- Quantification des copies du gène *SMN2* chez un cas index
- Recherche d'une délétion hétérozygote du gène *SMN1* chez les apparentés d'un cas index dans le cadre du conseil génétique

6.3. Séquençage du gène *SMN1*Méthodes :

- NGS pour identifier les variants suivi du séquençage du produit de Long-Range PCR spécifique d'allèle pour vérifier que ces variants sont localisés sur le gène *SMN1* (et non sur le gène *SMN2*)

Applications :

- Recherche d'une mutation ponctuelle du gène *SMN1* chez un cas index porteur d'une délétion à l'état hétérozygote du gène *SMN1*.
- Recherche d'une mutation du gène *SMN1* chez un cas index porteur de 2 copies du gène *SMN1* dans un contexte de consanguinité.

AMYOTROPHIES SPINALES PROXIMALES

Référence : ANPGM_004

Numéro de version : 2.0

Page 9/16

7. Arbres décisionnels pour l'analyse génétique

7.1. Etude des cas index

7.1.1. Recherche d'une délétion homozygote du gène SMN1

Le diagnostic d'exclusion ou le diagnostic positif d'amyotrophie spinale proximale doit se faire par deux couples d'amorces distincts.

Dans 95 % des cas de SMA, l'exon 7 du gène *SMN1* ne sera pas détecté par la technique utilisée (absence de la bande correspondant à l'exon 7 du gène *SMN1*, absence d'hybridation sur la sonde spécifique de l'exon 7 du gène *SMN1*...) et seul, l'exon 7 du gène *SMN2* sera détecté. Le génotype 0 copie du gène *SMN1*, 0 copie du gène *SMN2* n'a jamais été décrit dans la littérature, il est vraisemblablement létal.

- Dans 90 % des cas, il s'agit d'une délétion. Cette délétion peut être de grande taille (> 70 kb), emportant tout ou partie du gène *SMN1*.
- Dans 10% des cas, il s'agit d'une conversion génique transformant la fin du gène *SMN1* en gène *SMN2*.

Sur les comptes rendus, par souci de lisibilité, nous ne faisons pas de distinction entre les cas de conversion génique ou les délétions. De plus, nous ne cartographions pas en pratique courante la taille de la délétion. Par convention, l'absence de détection de l'exon 7 du gène *SMN1* est rendue comme suit : « **Présence d'une délétion homozygote du gène *SMN1*** ». Le compte rendu doit mentionner que l'étude des parents est nécessaire et qu'un conseil génétique est recommandé.

Un génotype normal est rendu comme suit : « **Absence de délétion homozygote du gène *SMN1*** ». Le compte rendu d'analyse doit préciser la sensibilité d'exclusion du diagnostic (ici, 95 %) et doit mentionner la possibilité d'études complémentaires si les éléments cliniques et/ou para-cliniques sont fortement évocateurs de SMA.

*Remarque : 10 % des sujets dans la population générale présentent une délétion à l'état homozygote du gène *SMN2* sans conséquence phénotypique.*

7.1.2. Etablissement du génotype complet (nombre de gènes *SMN1* et *SMN2*)

L'établissement du génotype complet chez le proposant peut être effectué dans deux cas de figure différents :

- En cas d'absence de délétion homozygote du gène *SMN1* et devant une forte suspicion de SMA chez le cas index, la détection d'une délétion à l'état hétérozygote du gène *SMN1* implique la poursuite de l'analyse du gène à la recherche de mutations ponctuelles.
En revanche, l'absence de délétion hétérozygote et homozygote du gène *SMN1* chez un proposant est en défaveur d'une implication du gène *SMN1* dans sa pathologie en l'absence de consanguinité parentale.
- La quantification du nombre de gènes *SMN2* chez les patients porteurs d'une délétion homozygote du gène *SMN1* est nécessaire pour proposer un traitement aux patients.

7.1.3. Recherche d'une mutation ponctuelle

Elle est à réserver aux cas index hautement suspects de SMA dans les deux cas suivants :

- 1) Le cas index présente une délétion hétérozygote du gène *SMN1*
- 2) Le cas index présente 2 copies du gène *SMN1* dans un contexte de consanguinité confirmée par l'étude des marqueurs microsatellites de la région.

AMYOTROPHIES SPINALES PROXIMALES

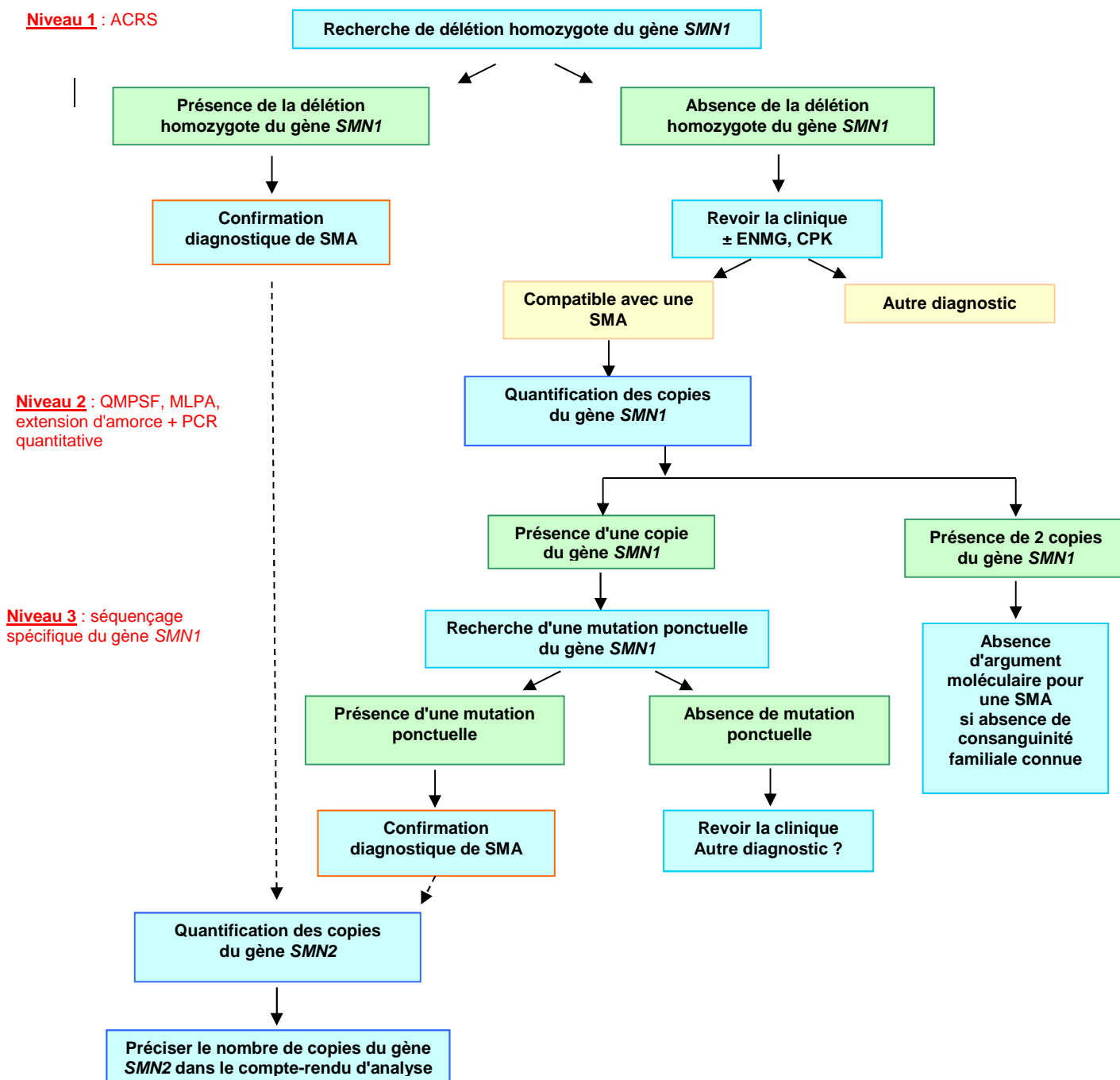
Référence : ANPGM_004

Numéro de version : 2.0

Page 10/16

Figure 1 : Exploration du gène *SMN1* dans le cadre d'une confirmation d'amyotrophie spinale proximale chez un cas index. Les niveaux d'exploration correspondant à des degrés de complexité d'analyse croissants sont spécifiés.

NB : cette stratégie donne les lignes directrices mais n'illustre pas tous les cas particuliers qui peuvent nécessiter la mise en oeuvre de techniques complémentaires.



AMYOTROPHIES SPINALES PROXIMALES

Référence : ANPGM_004

Numéro de version : 2.0

Page 11/16

7.2. Etude des apparentés

Chez les apparentés d'un sujet atteint de SMA ou porteur sain de SMA, l'analyse du génotype complet, et éventuellement la recherche de mutation ponctuelle, peut être réalisée.

Les conditions pour réaliser cette analyse sont les suivantes :

1. Une délétion (ou mutation) à l'état homozygote ou hétérozygote doit avoir été préalablement identifiée dans la famille. Il est important de préciser au laboratoire effectuant l'analyse quelles sont les mutations identifiées chez le cas index. Au mieux, le compte rendu de l'analyse moléculaire du cas index est joint à l'arbre généalogique de la famille.
2. Le patient doit être majeur et souhaiter connaître son statut vis-à-vis de la maladie (conseil génétique obligatoire).

Le compte rendu doit spécifier le résultat (normal/hétérozygote sain), la sensibilité du test et le calcul du risque résiduel d'être hétérozygote en étant porteur de 2 (ou 3) copies du gène *SMN1*.

En cas d'étude du couple, le risque résiduel du couple d'avoir un enfant atteint d'amyotrophie spinale proximale doit être précisé.

Remarque :

En cas de projet parental, il est fortement recommandé d'étudier

- Soit simultanément des deux conjoints
- Soit l'apparenté seul et s'il présente 2 copies du gène *SMN1*, l'étude de ses parents pour éliminer le risque de duplication en cis des gènes *SMN1*

Calcul du risque résiduel :

Aucune des méthodes développées pour la recherche de la délétion à l'état hétérozygote du gène *SMN1* n'est capable de dépister la totalité des allèles morbides.

En effet, le test ne dépiste pas :

- La présence possible d'une duplication en *cis* du gène *SMN1* masquant une délétion sur l'autre allèle. En effet, **4 à 8 %** des allèles sont porteurs d'une duplication en cis des gènes *SMN1* (McAndrew *et al.*, Am J Hum Genet 1997; Wirth *et al.*, Am J Hum Genet 1999; Gerard *et al.*, Hum Genet 2000 ; Saugier-Veber *et al.*, J Med Genet 2001; Feldkötter *et al.*, Am J Hum Genet 2002).
- L'existence de mutations ponctuelles dans le gène *SMN1* qui ne peuvent pas être décelées par les méthodes citées ci-dessus (IIIA1 et IIIA2) : 5% des patients atteints de SMA sont hétérozygote composite [del *SMN1*] + [mutation ponctuelle *SMN1*] (Wirth *et al.*, Am J Hum Genet 1999). Les allèles porteurs d'une mutation ponctuelle représentent donc **0.023 %** des allèles dans la population générale.
- La survenue d'une délétion *de novo* : 2 % des cas de SMA (Raclin *et al.*, J Med Genet 1997; Wirth *et al.*, Am J Hum Genet 1997; Chen *et al.*, Am J Med Genet 1999) soit **0.02 %** de risque de délétion *de novo* à chaque méiose.

Au total, la sensibilité du test est estimée à 90 % lorsque le génotype montre 2 copies du gène *SMN1* et à 99 % lorsque le génotype montre 3 copies du gène *SMN1*.

*Par exemple, un sujet ayant un risque initial de 1/2 d'être hétérozygote présentant 2 gènes *SMN1*, a un risque résiduel de 1/11 d'être hétérozygote pour cette délétion (calcul de Bayes).*

AMYOTROPHIES SPINALES PROXIMALES

Référence : ANPGM_004

Numéro de version : 2.0

Page 12/16

Le tableau 4 présente la sensibilité du test génétique en fonction du génotype chez l'apparenté

Tableau 4 : Sensibilité considérée du test génétique en fonction du génotype observé chez l'apparenté

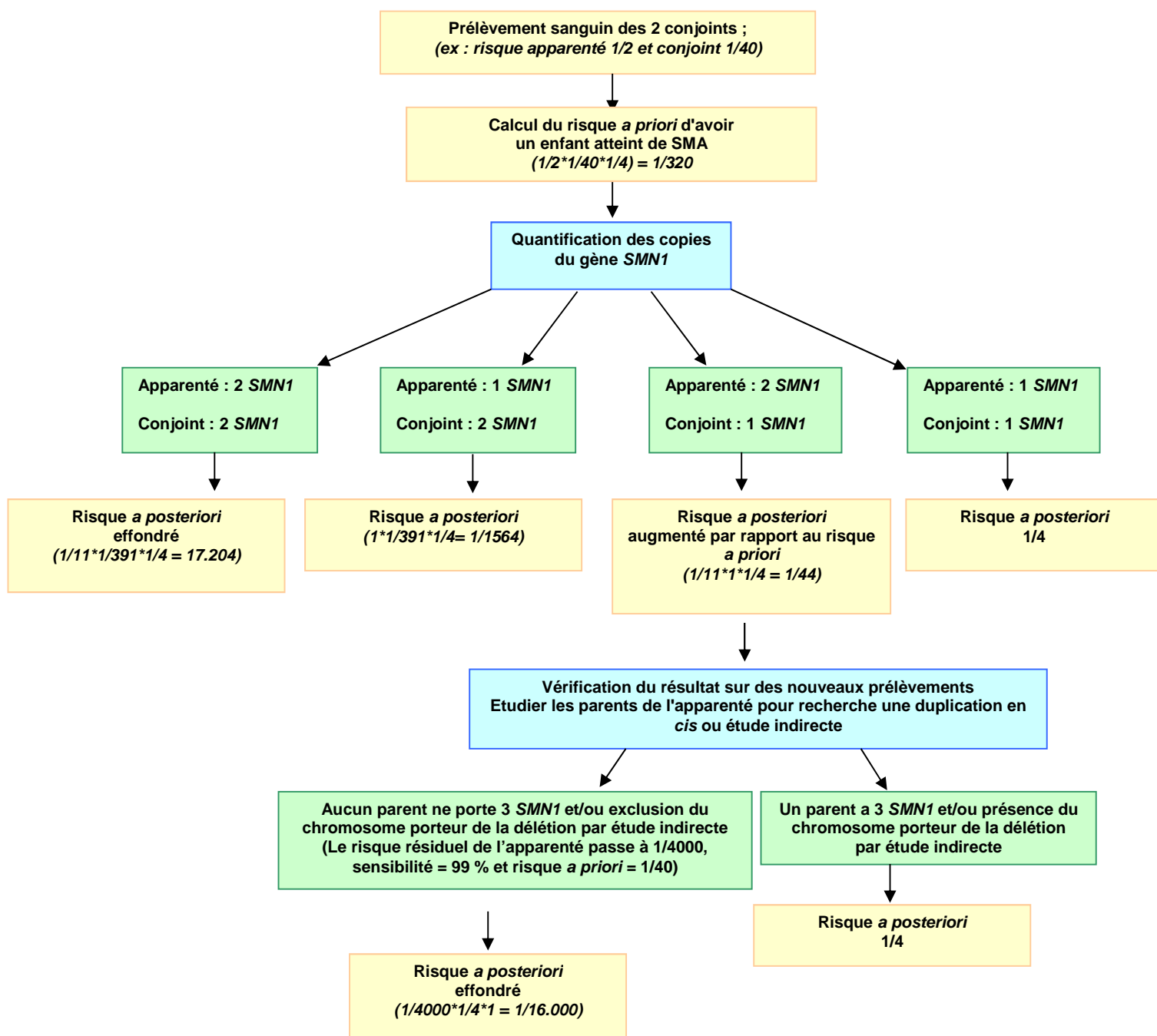
<i>Mutation du cas index</i>		Sensibilité considérée du test	Faux négatifs
<i>Délétion du gène SMN1</i>	<i>Génotype avec 3 gènes SMN1</i>	99 %	<i>Mutation ponctuelle : 0.02 % Délétion de novo : 0.02 %</i>
	<i>Génotype avec 2 gènes SMN1</i>	90 %	<i>Duplication en cis : maximum 8 % Mutation ponctuelle : 0.02 % Risque de délétion de novo : 0.02 %</i>
<i>Mutation ponctuelle identifiée</i>	<i>Absence de la mutation</i>	99 %	<i>Autre mutation ponctuelle : 0.02 % Risque de délétion de novo : 0.02 %</i>

AMYOTROPHIES SPINALES PROXIMALES

Référence : ANPGM_004 Numéro de version : 2.0

Page 13/16

Figure 2: Stratégie d'étude dans le cadre du conseil génétique d'un couple (antécédent familial de SMA avec délétion homozygote du gène SMN1)



NB : cette stratégie donne les lignes directrices mais n'illustre pas tous les cas particuliers qui peuvent nécessiter la mise en oeuvre de techniques complémentaires.

AMYOTROPHIES SPINALES PROXIMALES

Référence : ANPGM_004

Numéro de version : 2.0

Page 14/16

7.3. Diagnostic prénatal

Il peut s'effectuer sur villosités chorales ou liquide amniotique. La recherche de contamination du prélèvement fœtal par du tissu d'origine maternelle doit être effectuée selon les procédures habituellement recommandées.

Dans le cas d'un DPN sur antécédent familial de SMA, deux approches indépendantes, réalisés à des moments différents doivent être effectuées. Le compte rendu doit répondre exclusivement à la question posée : le fœtus est-il sain ou atteint. Il n'est pas souhaitable d'exprimer clairement dans les commentaires si le fœtus est homozygote pour l'allèle normal ou hétérozygote sain.

Dans le cas d'un DPN sur signes d'appel échographiques, la seule recherche de la délétion à l'état homozygote est possible. Il est aussi possible de faire la recherche de délétion homozygote et hétérozygote du gène *SMN1*, de préférence directement sur le prélèvement fœtal.

1. En cas de recherche de délétion homozygote seule : le compte rendu d'un profil normal doit mentionner « absence de délétion homozygote du gène *SMN1* ». Le compte rendu d'analyse doit également préciser la sensibilité d'exclusion du diagnostic (ici, 95 %) et la possibilité d'études complémentaires si nécessaire.
2. Recherche conjointe de délétion homozygote et hétérozygote du gène *SMN1*. La réponse d'un profil normal doit mentionner « absence de délétion homozygote ou hétérozygote du gène *SMN1* ». Le compte rendu d'analyse doit préciser la sensibilité d'exclusion du diagnostic (ici, 99 %)

Tableau 5 : Liste de marqueurs microsatellites à proximité des gènes SMN

Nom	Locus	Position génomique	
VS19	D5S435	68096912	68097049
C272	D5F150s1/s2	69344898	69345106
C212	D5F149s1/s2	70207797	70208015
I105	D5S351	71538451	71538691

8. Cotation des analyses selon le RIHN

N318 Recherche de réarrangements génomiques ciblés
Ou 4082 : B500 dans certains laboratoires

Diagnostic prénatal
4083 : B700

AMYOTROPHIES SPINALES PROXIMALES

Référence : ANPGM_004

Numéro de version : 2.0

Page 15/16

9. Références bibliographiques

- Arklblad EL, Darin N, Berg K, Kimber E, Brandberg G, Lindberg C, Holmberg E, Tulinius M, Nordling M. Multiplex ligation-dependent probe amplification improves diagnostics in spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord*. 2006;16(12):830-8.
- Brzustowicz LM, Lehner T, Castilla LH, Penchaszadeh GK, Wilhelmsen KC, Daniels R, Davies KE, Leppert M, Ziter F, Wood D, et al. Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2-13.3. *Nature*. 1990;344(6266):540-1.
- Calucho M, Bernal S, Alías L, March F, Venceslá A, Rodríguez-Álvarez FJ, Aller E, Fernández RM, Borrego S, Millán JM, Hernández-Chico C, Cuscó I, Fuentes-Prior P, Tizzano EF. Correlation between SMA type and SMN2 copy number revisited: An analysis of 625 unrelated Spanish patients and a compilation of 2834 reported cases. *Neuromuscul Disord*. 2018;28(3):208-215.
- Chen KL, Wang YL, Rennert H, Joshi I, Mills JK, Leonard DG, Wilson RB. Duplications and de novo deletions of the SMN1 gene demonstrated by fluorescence-based carrier testing for spinal muscular atrophy. *Am J Med Genet*. 1999;85(5):463-9.
- Feldkötter M, Schwarzer V, Wirth R, Wienker TF, Wirth B. Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet*. 2002;70(2):358-68.
- Gérard B, Ginet N, Matthijs G, Evrard P, Baumann C, Da Silva F, Gérard-Blanluet M, Mayer M, Grandchamp B, Elion J. Genotype determination at the survival motor neuron locus in a normal population and SMA carriers using competitive PCR and primer extension. *Hum Mutat*. 2000;16(3):253-63.
- Grotto S, Cuisset JM, Marret S, Drunat S, Faure P, Audebert-Bellanger S, Desguerre I, Flurin V, Grebille AG, Guerrot AM, Journel H, Morin G, Plessis G, Renolleau S, Roume J, Simon-Bouy B, Touraine R, Willems M, Frébourg T, Verspyck E, Saugier-veber P. Type 0 Spinal Muscular Atrophy: Further Delineation of Prenatal and Postnatal Features in 16 Patients. *J Neuromuscul Dis*. 2016;3(4):487-495.
- Hosseini-barkoie S, Peters M, Torres-Benito L, Rastetter RH, Hupperich K, Hoffmann A, Mendoza-Ferreira N, Kaczmarek A, Janzen E, Milbradt J, Lamkemeyer T, Rigo F, Bennett CF, Guschlbauer C, Büschges A, Hammerschmidt M, Riessland M, Kye MJ, Clemen CS, Wirth B. The Power of Human Protective Modifiers: PLS3 and CORO1C Unravel Impaired Endocytosis in Spinal Muscular Atrophy and Rescue SMA Phenotype. *Am J Hum Genet*. 2016;99(3):647-665.
- Janzen E, Mendoza-Ferreira N, Hosseinibarkoie S, Schneider S, Hupperich K, Tschanz T, Grysko V, Riessland M, Hammerschmidt M, Rigo F, Bennett CF, Kye MJ, Torres-Benito L, Wirth B. CHP1 reduction ameliorates spinal muscular atrophy pathology by restoring calcineurin activity and endocytosis. *Brain*. 2018 Epub ahead of print.
- Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*. 1995;13(80(1)):155-65.
- McAndrew PE, Parsons DW, Simard LR, Rochette C, Ray PN, Mendell JR, Prior TW, Burghes AH. Identification of proximal spinal muscular atrophy carriers and patients by analysis of SMN1 and SMN2 gene copy number. *Am J Hum Genet*. 1997;60(6):1411-22.
- Melki J, Abdelhak S, Sheth P, Bachelot MF, Burlet P, Marcadet A, Aicardi J, Barois A, Carriere JP, Fardeau M, et al. Gene for chronic proximal spinal muscular atrophies maps to chromosome 5q. *Nature*. 1990;344(6268):767-8.
- Munsat TL, Davies KE. International SMA consortium meeting. (26-28 June 1992, Bonn, Germany). *Neuromuscul Disord*. 1992;2(5-6):423-8.
- Ogino S, Wilson RB, Gold B. New insights on the evolution of the SMN1 and SMN2 region: simulation and meta-analysis for allele and haplotype frequency calculations. *Eur J Hum Genet*. 2004;12(12):1015-23.
- Oprea GE, Kröber S, McWhorter ML, Rossoll W, Müller S, Krawczak M, Bassell GJ, Beattie CE, Wirth B. Plastin 3 is a protective modifier of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Science*. 2008;320(5875):524-7.
- Parsons DW, McAndrew PE, Iannaccone ST, Mendell JR, Burghes AH, Prior TW. Intragenic telSMN mutations: frequency, distribution, evidence of a founder effect, and modification of the spinal muscular atrophy phenotype by cenSMN copy number. *Am J Hum Genet*. 1998;63(6):1712-23.
- Raclin V, Veber PS, Bürglen L, Munnich A, Melki J. De novo deletions in spinal muscular atrophy: implications for genetic counselling. *J Med Genet*. 1997;34(1):86-7.
- Riessland M, Kaczmarek A, Schneider S, Swoboda KJ, Löhr H, Bradler C, Grysko V, Dimitriadi M, Hosseinibarkoie S, Torres-Benito L, Peters M, Upadhyay A, Biglari N, Kröber S, Hölker I, Garbes L, Gilissen C, Hoischen A, Nürnberg G, Nürnberg P, Walter M, Rigo F, Bennett CF, Kye MJ, Hart AC, Hammerschmidt M, Kloppenburg P, Wirth B. Neurocalcin Delta Suppression Protects against Spinal Muscular Atrophy in Humans and across Species by Restoring Impaired Endocytosis. *Am J Hum Genet*. 2017;100(2):297-315.
- Saugier-veber P, Drouot N, Lefebvre S, Charbonnier F, Vial E, Munnich A, Frébourg T. Detection of heterozygous SMN1 deletions in SMA families using a simple fluorescent multiplex PCR method. *J Med Genet*. 2001;38(4):240-3.
- Scarciolla O, Stuppia L, De Angelis MV, Murru S, Palka C, Giuliani R, Pace M, Di Muzio A, Torrente I, Morella A, Grammatico P, Giacanelli M, Rosatelli MC, Uncini A, Dallapiccola B. Spinal muscular atrophy genotyping by gene dosage using multiple ligation-dependent probe amplification. *Neurogenetics*. 2006;7(4):269-76.
- van der Steege G, Grootsholten PM, van der Vlies P, Draaijers TG, Osinga J, Cobben JM, Scheffer H, Buys CH. PCR-based DNA test to confirm clinical diagnosis of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Lancet*. 1995;345(8955):985-6.
- Vezain M, Saugier-veber P, Goina E, Touraine R, Manel V, Toutain A, Fehrenbach S, Frébourg T, Pagani F, Tosi M, Martins A. A rare SMN2 variant in a previously unrecognized composite splicing regulatory element induces exon 7 inclusion and reduces the clinical severity of spinal muscular atrophy. *Hum Mutat*. 2010;31(1):E1110-25.
- Wirth B, Schmidt T, Hahnen E, Rudnik-Schöneborn S, Krawczak M, Müller-Myhsok B, Schönling J, Zerres K. De novo rearrangements found in 2% of index patients with spinal muscular atrophy: mutational mechanisms, parental origin, mutation rate, and implications for genetic counseling. *Am J Hum Genet*. 1997;61(5):1102-11.



AMYOTROPHIES SPINALES PROXIMALES

Référence : ANPGM_004

Numéro de version : 2.0

Page 16/16

Wirth B, Herz M, Wetter A, Moskau S, Hahnen E, Rudnik-Schöneborn S, Wienker T, Zerres K. Quantitative analysis of survival motor neuron copies: identification of subtle SMN1 mutations in patients with spinal muscular atrophy, genotype-phenotype correlation, and implications for genetic counseling. Am J Hum Genet. 1999;64(5):1340-56.

Annexes : liste des laboratoires de diagnostic moléculaire des amyotrophies spinales proximales

(Source : Orphanet 2018)

Ville	Responsables	SMN1 : délétion homozygote	SMN1 : nb de copies SMN2 : nb de copies	Recherche de mutations ponctuelles	Etude indirecte
Grenoble	J. Faure	X			
Nancy	C. Bonnet	X			
Nice	V. Paquis/C. Rouzier	X	X		X
Paris, Bicêtre	A. Mantel	X			
Paris, Necker	JP. Bonnefont	X	X	X	X
Paris, Robert Debré	S. Drunat	X	X	X	X
Poitiers	F. Bilan	X			
Pontoise-CERBA	JM. Costa	X			
Rouen	P. Saugier-Veber	X	X		X
Saint-Etienne	R. Touraine	X			
Toulouse	E. Bieth	X			