Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
**Université Mouloud MAMMERI**
**TIZI OUZOU**
**Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques**
**Département de Biologie**

**Thèse de Doctorat**
**En vue de l'obtention du diplôme de Docteur en Sciences Biologiques**
**Option : Génétique Humaine**

# Titre : Etude génétique du retard mental familial non spécifique.

**Présentée par : Madame GUESSAIBIA Nadia Epouse SARRAI**

**Soutenue publiquement le : 23/02/2012**

**Devant le jury suivant:**

| | | | |
|---|---|---|---|
| **- Mme. MATI Farida** | **Professeur** | **UMM Tizi Ouzou** | **Présidente** |
| **- Mr. RIDOUH Bachir** | **Professeur** | **EHS Frantz Fanon Blida** | **Rapporteur** |
| **- Mme. BOUHAMED CHAABOUNI Habiba** | **Professeur** | **Hôpital Charles Nicolle Tunis** | **Co-rapporteur** |
| **- Mr. OULD TALEB Mahmoud** | **Professeur** | **EHS Drid Hocine Alger** | **Examinateur** |
| **- Mr. ZIRI Abbas** | **professeur** | **EHS Oued Aissi Tizi Ouzou** | **Examinateur** |
| **- Mr. HOUALI Karim** | **Maître de conférence (A)** | **UMM Tizi Ouzou** | **Examinateur** |

# D é d i c a c e

Je dédie ce modeste travail à tous les malades déficients mentaux de par le monde, ainsi qu'à leurs familles, grâce à qui j'ai reçu une belle leçon de courage et d'amour.

Que Dieu leur vienne en aide.

# R e m e r c i e m e n t s

Une thèse, bien entendu, c'est un travail de longue haleine, un défi que l'on se donne à soi-même. Mais c'est surtout une formidable histoire de relations, de rencontres et d'amitié. La pratique de la recherche scientifique vous place souvent face à des questionnements intellectuels et des obstacles techniques. Les solutions, rarement simples et linéaires, ne se sont jamais trouvées à ma portée. Non, elles se sont imposées par le fruit des nombreux contacts que j'ai eu l'occasion de créer avec nombre de personnes passionnées dans leur projet et dans leurs spécialités. Cette période de doctorat aura été probablement l'un des plus importants chapitres de ma vie. J'aimerais remercier ceux et celles qui d'une manière ou d'une autre ont participé à son écriture…

En tout premier lieu, je tiens tout particulièrement à remercier mes maîtres, mes illustres directeurs de thèse à qui je dois mon éternelle gratitude et mon profond respect.

D'abord le Pr. Bachir Ridouh pour m'avoir accueillie dans son service. Merci pour les précieux conseils scientifiques, son aide sans limite, sa générosité et surtout ses qualités humaines.

J'espère avoir été digne de la chance qu'il m'a donnée, et de la confiance qu'il a bien voulu m'accorder.

Ensuite je remercie tout particulièrement Mme le Pr Habiba Bouhamed-Chaabouni pour m'avoir si aimablement accueillie dans son laboratoire, et qui, durant des années n'a ménagé ni son temps, ni sa peine pour m'aider à mener à bien ces travaux. Avec une disponibilité sans faille, elle su me transmettre sa rigueur et ses connaissances scientifiques, en prodiguant à maintes reprises les encouragements nécessaires.

Aucun mot ne saurait exprimer ma profonde reconnaissance et mon éternelle gratitude à ces deux grands noms de la science.

Merci à madame Mati Farida pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de cette thèse, veuillez trouver ici, le témoignage de ma sincère gratitude et de ma profonde estime.

Je remercie les professeurs Ould Taleb, Ziri et Houali d'avoir bien voulu me faire l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de ma thèse. Recevez ici l'expression de ma profonde reconnaissance et ma très grande admiration.

Un travail de thèse est le fruit d'un travail collectif. Je tiens à remercier toutes les personnes m'ayant aidé tout au long de mon parcours.

Je tiens à remercier tout particulièrement mon mari Dr Sarrai N, sans qui cette thèse n'aurait pu aboutir. En effet, sans son aide précieuse, tant sur le plan médical (pour le coté clinique de la thèse), que sur le plan humain, je crois qu'il m'aurait été impossible de mener à terme ce travail. Je le remercie infiniment pour son éternel soutien, sa disponibilité et surtout sa patience pendant toutes ces années.

Il est difficile pour moi de lui exprimer toute ma gratitude, qu'il trouve en cette thèse le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Je remercie tous les membres du service de psychiatrie de l'hôpital Frantz Fanon de Blida pour leur aide et leur soutien moral sans fin. Il s'agit vraiment d'une équipe enthousiaste et passionnée.

Je remercie également tous les membres du laboratoire de génétique Humaine de la Faculté de Médecine de Tunis, ainsi que du service à l'hôpital Charles Nicolle de Tunis pour leur accueil, leur soutien et la chaleur familiale avec laquelle ils m'ont entourée en particulier Leila Abaied, pour son aide inestimable, ses conseils scientifiques et sa générosité.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Pr Jamel Chelly du laboratoire de génétique moléculaire de l'hôpital Cochin à Paris pour sa précieuse collaboration sur les puces à ADN.

Je remercie infiniment le Dr. Nassima Metahri du service de Pédopsychiatrie de l’hôpital Frantz Fanon de Blida pour son aide, ses encouragements et surtout son agréable accueil.

Je remercie Mr Mati et Mr Talbi de la faculté des sciences biologiques de l'université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou pour leur aide si précieuse et leur accueil si chaleureux.

J'aimerais profiter de l'occasion pour remercier chaleureusement tous les membres de ma famille: ma mère, mes frères et sœurs, mon beau-frère Khoufir et sa femme, pour leur soutien sans faille pendant toutes ces années, et en particulier mes enfants pour les nombreux sacrifices qu'ils ont dû subir à cause de mes nombreuses absences, je leur en demande pardon.

Je remercie également ceux qui m'ont accordé leur confiance et leur aide sans limite, j'ai une pensée particulière pour le regretté Mohamed Benteftifa qui nous a quittés trop tôt (que Dieu ait son âme!) Merci à lui et à sa femme.

Enfin, je remercie infiniment toutes mes amies qui m'ont soutenue et qui m'ont fait confiance depuis toujours.

# Liste des tableaux et des figures

## Liste des tableaux


| | | pages |
|---|---|---|
| Tableau I : | Etiologie des retards mentaux…….. | 19 |
| Tableau II : | Adresses web des banques de données…… | 43 |
| Tableau III : | Amorces de microsatellites des chromosomes 3 et 19…… | 62 |
| Tableau IV : | Programme et conditions de PCR pour les microsatellites du chromosome 3…… | 62 |
| Tableau V : | Programme et conditions de PCR pour le microsatellite du chromosome 19…. | 63 |
| Tableau VI : | Amorces des microsatellites utilisés pour le génotypage par séquençage automatique…… | 67 |
| Tableau VII : | Programme et conditions de PCR pour les microsatellites utilisés par le séquenceur automatique…… | 67 |
| Tableau VIII : | Températures de fusion Tm des différents microsatellites……. | 68 |


## Liste des figures


| | | |
|---|---|---|
| Figure 1 : | Répartition des causes de déficience mentale..... | 20 |
| Figure 2 : | Principales causes génétiques de la déficience mentale..... | 21 |
| Figure 3 : | Arbres généalogiques de familles ayant au moins deux garçons présentant un retard mental..... | 22 |
| Figure 4 : | Cartographie des gènes responsables des formes syndromiques du retard mental liés à l'X..... | 24 |
| Figure 5 : | Cartographie des gènes responsables du retard mental non syndromique liés à l'X..... | 25 |
| Figure 6 : | Localisation chromosomique du gène PRSS12..... | 29 |
| Figure 7 : | Localisation neurotrypsique dans les synapses..... | 30 |
| Figure 8 : | Localisation chromosomique du gène CRBN..... | 31 |
| Figure 9 : | Localisation chromosomique du gène CC2D1A..... | 32 |
| Figure 10 : | Localisation chromosomique du gène GRIK2..... | 33 |
| Figure 11 : | Localisation chromosomique du gène TUSC3..... | 35 |
| Figure 12 : | Localisation chromosomique de la région 1p21.1p133..... | 36 |
| Figure 13 : | Rôle du complexe médiateur dans la transcription des gènes..... | 38 |
| Figure 14 : | Protéine MED 23 mutée..... | 38 |
| Figure 15 : | Photographie d'une puce à ADN..... | 46 |
| Figure 16 : | Utilisation d'une puce à ADN..... | 47 |
| Figure 17 : | Disposition des marqueurs sur les chromosomes..... | 54 |
| Figure 18 : | Les différentes étapes de la PCR..... | 56 |
| Figure 19 : | Amplification exponentielle de l'ADN par PCR..... | 56 |
| Figure 20 : | Electrophorèse sur gel de polyacrylamide..... | 60 |
| Figure 21 : | Principes du génotypage par amplification PCR de microsatellites..... | 61 |

Figure 22 : Vérification des produits d'amplification ..... 64
Figure 23 : Principes des marqueurs microsatellites ..... 69
Figure 24 : Arbre généalogique de la famille KM ..... 72
Figure 25 : Arbre généalogique de la famille Ben A-Z ..... 73
Figure 26 : Arbre généalogique de la famille Ar ..... 74
Figure 27 : Arbre généalogique de la famille Kh ..... 75
Figure 28 : Arbre généalogique de la famille Ch ..... 76
Figure 29 : Arbre généalogique de la famille Si ..... 77
Figure 30 : Haplotypes reconstruits après lecture des autoradiographies pour les familles KM1-KM2-KM3 et Kh ..... 79
Figure 31 : Gel d'acrylamide (12%) : génotypage du marqueur D19S558 ..... 82
Figure 32 : Pics assignés par le logiciel Genemapper ..... 84
Figure 33 : Haplotypes construits après lecture des génotypages effectués par le séquenceur pour les 6 familles ..... 85
Figure 34 : Intervalle d'homologie pour deux branches de la famille KM ..... 87

# Liste des Abréviations

A : Adenine.
ADNc : ADN complémentaire.
ARN : Acide RiboNucléique.
ARNSMR : Retard Mental Non Syndromique Autosomique Récessif
BET : Bromure d'éthidium
C : Cytosine
Cen : Centromère
DI : Déficience Intellectuelle
DMSO : Diméthyl sulfoxyde
dNTP : désoxyNucléotide-Tri-Phosphate.
DO : Densité Optique
DS : Déviation Standard
DSM-IV : Diagnostic ans Statistical manual of Mental disorder
EDTA : Acide ethylènediamine tétra acétique
G : Guanine
Kb : Kilo base
KDa : kilodalton
Lod Score: Logarithm of Odds
Mb : Méga base
MgC12 : Chlorure de magnesium
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PA : Persulfate d'ammonium
Pb : Paire de base
PCR : Polymérase Chain Reaction
QI : Quotient Intellectuel
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism
RM : Retard Mental
RMX : RM lié à X
SNP : Single Nucleotide Polymorphism
SSCP : polymorphisme de conformation simple brin
STR : Short Tandem Repeats
T : Thymine
TBE : Tris Bromate EDTA
Tel : Télomère
Tm : Température de fusion
VNTR : Variable Number of Tandem Repeats

# Glossaire

**Ataxie :** Pathologie neuromusculaire qui consiste en un manque de coordination fine des mouvements volontaires.
**Cartographie** : c'est la détermination de la position d'un locus sur un chromosome.
**Conseil génétique :** a pour but d'évaluer le risque de survenue ou de récurrence d'une maladie ou d'une malformation dans la descendance d'un couple et de proposer à celui-ci les différentes solutions de prévention.
**Cortex :** il désigne la substance grise périphérique des hémisphères cérébraux.
**Courbe staturo-pondérale :** c'est l'étude correspondant à l'évolution du poids et de la taille fonction de l'âge.
**Dystonie :** fait partie d'un groupe de maladies caractérisées par des troubles moteurs.
**Faculté cognitive :** faculté liée au processus d'acquisition des connaissances.
**Gène candidat :** est un gène dont on pense qu'il peut être associé à une maladie de par sa localisation sur un chromosome.
**Hippocampe :** c'est une structure du cerveau des mammifères. Il joue un rôle central dans la mémoire et la navigation spatiale.
**Homozygotie :** se dit d'un gène qui, chez un individu, sera représenté par deux allèles identiques.
**Hypotonie :** c'est la diminution de la tonicité musculaire.
**Marqueur génétique** : est une séquence polymorphe d'ADN aisément détectable, utilisée en cartographie génétique pour « baliser » le génome.
**Microcéphalie :** un volume de crâne plus petit que celui des individus du même âge et du même sexe.
**PCR :** Réaction de Polymérisation en Chaine.
**Phanères :** ce sont des productions épidermiques, protectrices, représentées essentiellement chez les hommes par les poils et les ongles.
**Pronostic :** prédiction par le médecin du progrès de la maladie du patient, et ses chances éventuelles de guérison.
**Quotient Intellectuel :** QI ; c'est le résultat d'un test psychométrique qui, lorsqu'il est corrélé avec les autres éléments d'un examen psychologique, entend fournir une indication quantitative standardisée liée à l'intelligence abstraite.
**RT-PCR :** Reverse Transcriptase PCR, soit une PCR après transcription inverse d'un acide ribonucléique (ARN) en ADN complémentaire.
**Test psychométrique** : test relatif à la psychométrie qui est une science étudiant l'ensemble des techniques de mesures pratiquées en psychologie.

# Table des matières


| | | pages |
|---|---|---|
| | Introduction générale | 13 |
| Première partie | synthèse bibliographique | 13 |
| Chapitre I : | Définitions et classification | 14 |
| | 1.1.Diagnostic and Statistical Manuel of Mental Disorders | 14 |
| | 1.2.La classification Internationale des Maladies | 15 |
| | 1.3.La classification française des troubles mentaux | 15 |
| | 1.4.Définition du Quotient Intellectuel (QI) | 16 |
| | 1.5.La classification selon le QI | 16 |
| Chapitre II : | Evaluation clinique | 17 |
| | 2.1.Histoire familiale | 17 |
| | 2.2.Histoire clinique | 18 |
| | 2.3.Examen morphologique | 18 |
| | 2.4.Examen neurologique | 18 |
| | 2.5Prévalence | 18 |
| Chapitre III : | Etiologie du Retard Mental | 19 |
| | 3.1.Les causes environnementales | 20 |
| | 3.2.Les causes génétiques du retard mental | 21 |
| | 3.2.1.Les anomalies chromosomiques | 21 |
| | 3.2.2.Les causes monogéniques du retard mental | 22 |
| | 3.2.2.1.Les retards mentaux liés à l'X | 22 |
| | 3.2.2.2.Les retards mentaux liés aux gènes autosomiques | 26 |
| | 3.2.3.Identification de gènes de Retard Mental | 39 |
| | 3.2.3.1.Les stratégies d'identification de gènes | 39 |
| | 3.2.4.Le clonage positionnel | 40 |
| | 3.2.4.1.Localisation chromosomique | 40 |
| | 3.2.4.2.Analyse de liaison génétique | 40 |

3.2.4.3.Identification des gènes candidats 41
3.2.4.4.Homologie avec des gènes connus 42
3.2.4.5.Approche bioinformatique 42
3.2.5.Etude de la liaison génétique 43
3.2.5.1.Principe 43
3.2.5.2.Les méioses informatiques 43
3.2.5.3.Les marqueurs génétiques 44
3.2.6.Les puces à ADN 45
3.2.7.La méthode du Lod Score 47
Deuxième partie : Expérimentation
Chapitre I : Matériels et Méthodes 49
1.1. Matériels : 49
1.1.1.Fiches cliniques et explorations 49
1.2. Méthodes : 50
1.2.1.Introduction 50
1.2.2.Matériel biologique : obtention de l'ADN 50
1.2.2.1.Extraction de l'ADN 51
1.2.2.2.Contrôle de qualité et quantité de l'ADN 53
1.2.2.3.Les marqueurs génétiques utilisés 53
1.2.2.3.1.Localisation chromosomique 54
1.2.2.4.La Réaction de Polymérisation en Chaine (PCR) 55
1.2.2.4.1.Principe de la technique 55
1.2.2.4.2.Les différentes étapes de la PCR 55
1.2.2.4.3.Les thermocycleurs 57
1.2.2.4.4.Description d'un programme classique de PCR 57
1.2.2.5.Amplification des marqueurs polymorphes 58
1.2.2.5.1.Les réactifs utilisés 58
1.2.2.6.Electrophorèse sur gel de polyacrylamide 59

1.2.2.7.Génotypage à la radioactivité 62
1.2.2.7.1.Conditions de PCR pour les marqueurs utilisés 62
1.2.2.7.2.Vérification des produits d'amplification 63
1.2.2.7.3.Migration sur gel de polyacrylamide 64
1.2.2.7.4.Le transfert sur membrane 65
1.2.2.7.5.Marquage de la sonde 65
1.2.2.7.6.Hybridation de la membrane 65
1.2.2.7.7.Révélation 66
1.2.3.Génotypage par séquençage automatique 66
1.2.4.Utilisation des SNP microarrays 70
Chapitre II : Résultats et Discussion : 71
2.1. Résultats : 71
2.1.1.Construction des arbres généalogiques 71
2.1.2Etude mendélienne : mode de transmission et consanguinité 78
2.1.3.Résultats de l'étude moléculaire 78
2.1.3.1.Génotypage par radioactivité 78
2.1.3.1.1.Reconstitution des haplotypes 79
2.1.3.2.Génotypage au séquenceur 83
2.1.3.2.1.Reconstitution des haplotypes 84
2.1.3.3.Résultats des biopuces 86
2.2. Discussion 88
Conclusion 92
Bibliographie 94
Annexes 106

# Introduction Générale

## Première partie : synthèse bibliographique

Le retard mental est le handicap majeur le plus fréquent, 1 à 3% dans la population générale. Les progrès récents en cytogénétique et en biologie moléculaire ont permis d'identifier de nombreux gènes responsables du retard mental, notamment dans les formes autosomiques. Le présent travail consiste à rechercher une liaison génétique aux loci impliqués dans le retard mental non spécifique transmis en autosomique récessif dans des familles algériennes avec plusieurs membres atteints de cette pathologie.

L'étude a concerné 34 individus dont 15 malades, appartenant à six familles algériennes consanguines. Les patients sont atteints d'un retard mental non spécifique de transmission autosomique récessive. Une étude de liaison génétique a été réalisée pour les 4 loci connus : 3p25-pter, 4q24-q25, 19p13.12 et 1p21.1-p.13.

La stratégie de recherche choisie est celle du clonage positionnel : les méthodes utilisées dans ce travail sont :

L'extraction de l'ADN, l'amplification par PCR, le génotypage par radioactivité, le génotypage par séquençage, le génotypage par puces à ADN, construction des haplotypes et analyse de liaison par calcul des lod-scores.

Le génotypage a été réalisé sur un analyseur automatique à ADN et l'analyse effectuée grâce au programme Gene Mapper software.

L'étude réalisée a permis d'exclure l'ensemble de ces locus pour 3 familles, néanmoins la liaison d'une famille au locus 1p21.1-p13.3 est possible.

L'étude de liaison de 4 familles algériennes avec le retard mental autosomique récessif qui montre l'absence de liaison pour les 3 loci connus, confirme l'hétérogénéité génétique de cette pathologie et nous incite à poursuivre la recherche de gènes grâce à ces familles informatives.

L’exploration d’une des 6 familles par les puces à ADN a montré une région d’homozygotie partagée entre les atteints et qui se résume à un intervalle bien précis sur le chromosome 17 (en 17q12-q21.2).

# Chapitre I : Définitions et classification

Trois classifications, présentées ci-dessous, définissent des critères diagnostiques pour la déficience mentale.

## 1.1. Le Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM)

Ce manuel publié en 1952 par l'American Psychiatric Association (APA), société savante de psychiatres pour la plupart américains était conçu à l’origine pour classifier les troubles psychiatriques, structurés en psychoses et névroses. Il a fait l’objet de 4 révisions, la version actuelle est le DSM-IV, publié en 1994 avec une mise à jour datant de 2000.

Le DSM est un catalogue descriptif des pathologies mentales avec une approche multiaxiale (5 axes d’analyse) devant permettre « une approche globale et intégrative des patients », mais l’étiologie des pathologies n’y est pas abordée.

Il s’agit d’un fonctionnement intellectuel général significativement inférieur à la moyenne, le niveau de QI est inférieur ou égal à 70 et les troubles apparaissent avant l’âge de 18 ans. Le fonctionnement adaptatif est altéré dans au moins deux des secteurs suivants: la communication, l'autonomie, la vie domestique, les aptitudes sociales, la mise à profit des ressources de l’environnement, la responsabilité individuelle, l'utilisation des acquis scolaires, le travail, les loisirs ou encore la santé et la sécurité.

### 1.2. La Classification Internationale des Maladies (CIM)

Son origine remonte à 1893 avec la « classification des causes de décès » par Jacques Bertillon. Elle avait été conçue pour « permettre l'analyse systématique, l'interprétation et la comparaison des données de mortalité et morbidité recueillies dans différents pays à des époques différentes » et a fait l'objet de 5 révisions décennales jusqu'en 1938. En 1945,l'OMS nouvellement créée entreprend sa mise à jour, qui aboutit en 1948 à la « Classification statistique internationale des maladies, traumatismes et causes de décès » appelée CIM-6. La CIM est une classification mono-axiale, chaque maladie ne correspondant qu'à un seul code.

La version actuellement utilisée est la CIM-10, parue en 1992. Des mises à jour sont effectuées régulièrement, la dernière datant de 2008. Cette classification recense toutes les maladies, dont le retard mental qui figure au chapitre V, section F, « troubles mentaux et du comportement ».

L'organisation mondiale de la santé définit le retard intellectuel comme un arrêt du développement mental ou un développement mental incomplet, caractérisé par une insuffisance des facultés et du niveau global d'intelligence, notamment au niveau des fonctions cognitives, du langage de la motricité et des performances sociales. Comme le DSM-IV-R, la CIM-10 définit quatre degrés de retard mental classés en fonction du QI.

**1.3. La classification française des troubles mentaux** définit le niveau mental et la catégorie de la déficience. Le retard mental peut être léger, modéré ou profond. Les déficiences sont classées en plusieurs catégories:

– harmoniques, elles sont fixes et peu évolutives

– dysharmoniques, elles présentent un processus évolutif, avec des poly-handicaps sensoriels et/ou moteurs et des démences.

De façon consensuelle et selon les classifications officielles, le retard mental est un arrêt du développement mental ou un développement mental incomplet, caractérisé par une insuffisance des facultés et du niveau global d'intelligence, notamment des

fonctions cognitives, du langage, de la motricité et des performances sociales. L'âge de survenue doit être inférieur à 18 ans.

### 1.4. Définition du Quotient Intellectuel (QI)

Le quotient intellectuel est le résultat d'un test psychométrique qui, lorsqu'il est corrélé avec les autres éléments d'un examen psychologique, entend fournir une indication quantitative standardisée liée à l'intelligence abstraite. La construction des tests de QI est totalement empirique, le résultat est considéré comme simplement indicatif de difficultés cognitives de l'enfant. Le QI constitue surtout un classement d'un individu par rapport à une population donnée, et ne renseigne que sur son écart par rapport à la norme (adaptation à des types de raisonnements logiques, voire de cognition, et prédéfinis).

Le Test de Wechsler est l'outil d'évaluation psychométrique le plus utilisé au monde.

La première version date de 1949. La dernière version, le Wechsler Intelligence Scale for Children **(WISC IV**) date de 2005. Il comprend 4 indices d'évaluation : compréhension verbale, raisonnement perceptif, mémoire de travail et vitesse de traitement. Le résultat est exprimé sous forme d'un score, le Quotient Intellectuel.

Le QI moyen dans la population générale est, par définition, de 100. On parle de Déficience intellectuelle lorsque le QI est inférieur à 70.

Ces valeurs sont à considérer avec prudence car relativement imprécises, et d'autre part la composante socio-culturelle n'y est pas prise en compte.

Certains auteurs utilisent le terme de Retard Mental, tandis que d'autres préfèrent celui de Déficience Intellectuelle ou Déficience Mentale.

### 1.5. La classification selon le QI

Les trois classifications distinguent quatre degrés dans le retard mental, évalué par la mesure du QI. En admettant un QI moyen de 100 et un écart-type de 15 dans la population générale, l'échelle de classement est la suivante (QI déterminés selon le test de Wechsler) :

-Retard léger: le QI se situe entre 50/55 et 70 et décrit des personnes connaissant des difficultés scolaires mais capables de s'intégrer à la société de façon autonome à l'âge adulte. Cette catégorie représente 85% des déficients mentaux.

-Retard modéré: le QI se situe entre 35/49 et 50/55 et décrit des personnes connaissant dans l'enfance des retards de développements importants mais ayant de bonnes capacités de communication et une indépendance partielle. Ces individus, qui représentent 10% des déficients mentaux, ont des problèmes d'intégration dans la société à l'âge adulte. Leur niveau intellectuel ne dépasse pas celui du CP.

-Retard grave: le QI se situe entre 20/25 et 35/40 et définit des personnes ayant besoin d'une assistance prolongée. Leur âge mental ne dépasse pas celui d'un enfant de 2 à 3 ans, leur langage est rudimentaire et les acquisitions sont incomplètes. Ce trouble concerne 3 à 4% des déficients mentaux.

-Retard profond: le QI est inférieur à 20/25 et représente des personnes ayant peu de capacités à communiquer, une absence de langage, des troubles moteurs graves et une autonomie très limitée voire nulle. Un à deux pourcent des déficients mentaux sont concernés par ce retard.

Cette classification a été simplifiée par l'association Américaine sur le Retard Mental (American Association of Mental Retardation, 1992), qui a définit deux degrés de sévérité: le retard mental sévère (QI<50) et le retard mental léger (50<QI<70).

## Chapitre II : Evaluation clinique

La consultation comprend d'abord la réalisation d'un arbre généalogique, puis un examen clinique avec réalisation des courbes staturo-pondérale et du périmètre crânien (PC) et s'attache particulièrement a `l'examen neurologique (neurologue) et morphologique (généticien) (HERON 2009)

### 2.1. Histoire familiale

Le recueil des antécédents familiaux (sur 3 générations) vise a` mettre en évidence un éventuel mode d'hérédité´ et peut permettre dans certains cas d'évoquer d'emblée une étiologie ou un mode de transmission (par exemple une déficience intellectuelle liée au chromosome X). Certains éléments, comme les antécédents de fausses couches ou de décès périnataux sont rarement signales spontanément

et constituent pourtant un argument précieux en faveur d'une anomalie chromosomique familiale.

**2.2. Histoire clinique**

Elle est détaillée, du déroulement de la grossesse jusqu'a` la période actuelle en insistant sur la période néonatale (troubles d'alimentation, hypotonie…), les étapes du développement psychomoteur, l'existence de troubles du comportement,
de convulsions, de régression, d'intolérance a` la fièvre ou` au jeune. Une attention particulière doit être portée sur certains éléments d'allure banale (infections
ORL a` répétition, reflux gastro œsophagien, eczéma…) qui peuvent revêtir une valeur diagnostique importante dans un syndrome donne´.

**2.3. Examen morphologique (généticien)**

Il recherche des critères majeurs que sont les malformations, ou des critères mineurs qui correspondent a` des variations morphologiques individuelles ou familiales pouvant contribuer a` l'identification d'un syndrome connu, alors même que la DI paraissait isolée. Il peut nécessiter de visionner des photographies des autres membres de la famille, voire d'examiner les parents. L'examen morphologique s'intéresse particulièrement a` la forme du crâne, a `l'aspect général de la face, aux phanères, aux extrémités et aux organes génitaux externes.
A` l'âge adulte, l'évolution du morphotype avec l'âge implique souvent de retrouver des photographies du patient a` différents âges. Dans tous les cas, les photographies du patient lors de la consultation sont nécessaires.

**2.4. Examen neurologique (neurologue)**

L'examen neurologique recherchant en particulier un déficit moteur ou sensitif, une ataxie, une dystonie ou des troubles du comportement et de la relation, est essentiel
dans la démarche diagnostique d'un patient présentant une DI, et contribue au diagnostic étiologique dans presque la moitié des cas.

**2.5. Prévalence**

La prévalence de la déficience mentale est de l'ordre de 1 à 3% dans la population générale (Chelly *et al.*, 2006). On estime qu'il y a 1,2 garçon pour une fille (McLaren

et Bryson, 1987), voir 2,2 garçons pour une fille lorsque le retard mental est sévère, suggérant que les gènes localisés sur le chromosome X seraient impliqués dans une proportion non négligeable des déficiences mentales (LEMAY *et al.*, 2003). Les retards mentaux (RM) sévères ont une incidence estimée entre 0,3 et 0,4%, les retards mentaux légers quant à eux pourraient concerner jusqu'à 3% de la population générale (MOSER, 2004). La prévalence des patients atteints de retard mental sévère représente 10 à 20% des retards mentaux (ROELEVELD *et al*, 1997). La plupart des retards mentaux modérés ont tendance à être d'ordre familial ou polygénique comparativement aux retards mentaux sévères qui apparaissent plus sporadiquement (LEMAY *et al*, 2003).

**Chapitre III : Etiologie du Retard Mental**

Les causes du retard mental sont extrêmement hétérogènes et restent inexpliquées dans approximativement la moitié des cas (tableau I). L'identification des causes du retard mental est primordiale puisqu'elle permet une prise en charge des patients et de leur famille, elle fournit des réponses sur la cause et le pronostic et elle apporte les informations nécessaires pour le conseil génétique.

Tableau I : Etiologie des retards mentaux.

| **Cause du RM** | **Fréquence (%)** | **Exemples** |
|---|---|---|
| Environnementale (acquis) | 18 | |
| Prénatale | | Intoxications maternelles, infections fœtales |
| Périnatale | | Prématurité, traumatismes, accident vasculaire, asphyxie |
| Postnatale | | Infections, traumatismes |
| Génétique (constitutif) | 29 | |
| Anomalies chromosomiques | | Anomalie du nombre : trisomie21<br>Anomalie de structure : trisomie partielle délétion 5p- cri du chat<br>Remaniements cryptiques : subtélomériques |
| Dérégulation de l'empreinte | | Syndrome de Prader-Willi<br>Syndrome d'Angelman |
| Maladie monogénique | | RM liés au chromosome X ou autosomiques |
| Inexpliquée | 56 | |

Les causes anténatales représentent environ 80% des déficiences mentales, les causes périnatales et postnatales représentent, quant à elles, environ 10% chacune. La majorité des causes anténatales a un déterminisme génétique.

### 3.1. Les causes environnementales :

Les embryopathies et les fœtopathies d'origine toxique, infectieuse ou métabolique sont liées à des facteurs environnementaux. Les causes périnatales et postnatales semblent, quant à elles, avoir une étiologie environnementale.

Une étude menée par STEVENSON (2003) et reprise par ROGERS en 2008, sur une population de 10997 individus de Caroline du Sud, âgés de 20 ans et dont 59% étaient des garçons, illustre la fréquence des causes de déficience mentale classées d'un point de vue génétique et environnemental. Cette répartition est illustrée sur la Figure 1.

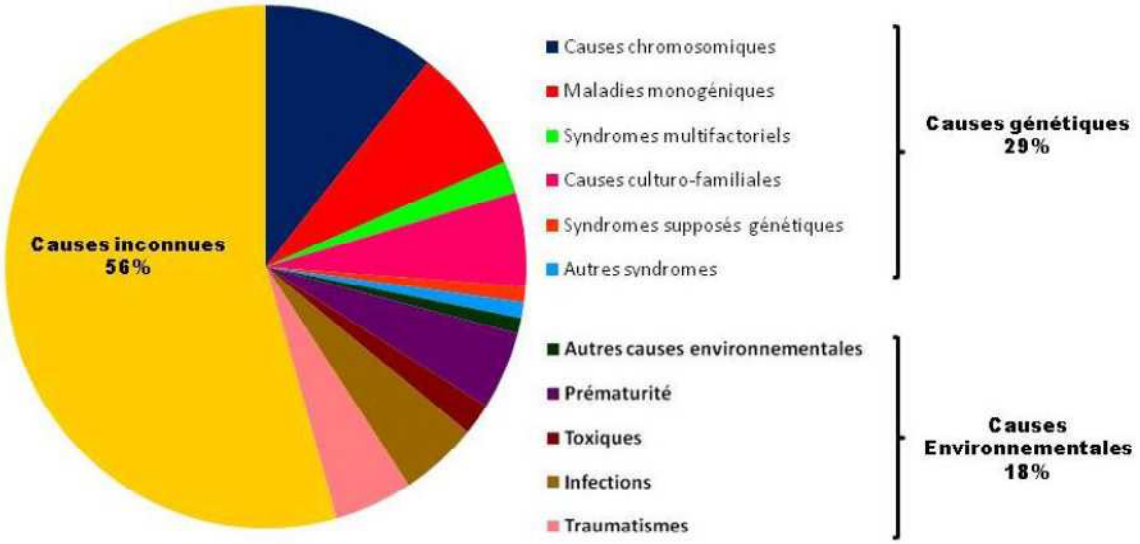



**Figure 1:** Répartition des causes de déficience mentale d'après STEVENSON *et al*, 2003, ROGERS *et al*, 2008.

Les causes acquises de déficience intellectuelle sont en régression, en particulier les causes anténatales en raison des mesures de surveillance des grossesses, de dépistage néonatal et de réanimation (HERON et DES PORTES 2008).

### 3.2. Les causes génétiques du retard mental

On estime qu'environ 1/3 des gènes humains sont exprimés au niveau du cerveau, et que plusieurs d'entre eux jouent un rôle essentiel dans le développement et le fonctionnement cérébral (TAKAHASCHI *et al* 1995). En effet les grandes délétions et les réarrangements chromosomiques s'accompagnent presque toujours d'un retard mental sévère à modéré traduisant l'implication d'une grande partie de nos gènes dans le développement du cerveau fœtal (FLINT *et al* 1995).

Les principales causes génétiques de la déficience mentale sont exposées Figure 2 Il est actuellement admis qu'environ 50% des déficiences mentales seraient d'origine génétique (CURRY *et al*, 1997, STEVENSON *et al*, 2003, WINNEPENNINCKX *et al*, 2003). Des mutations, préalablement décrites dans certains cas de déficience mentale, impliqueraient plusieurs gènes simultanément (ROPERS *et al*, 2007).

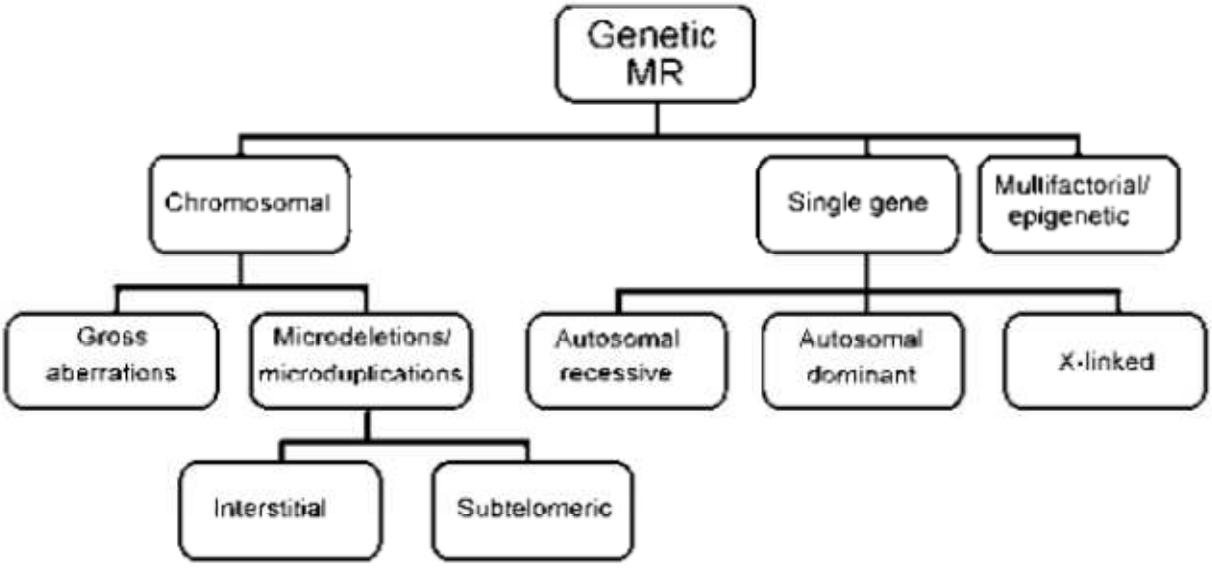



**Figure 2 :** Principale causes génétiques de la déficience mentale (Basel-Vanagaite L., 2008).

#### 3.2.1. Les anomalies chromosomiques

Plusieurs anomalies chromosomiques sont associées à un retard mental. On estime qu'elles sont responsables de 40% des retards mentaux sévères et de 10% des retards mentaux modérés (BRADELAY *et al*, 1992).

Les délétions et les translocations touchant les régions télomériques et subtélomériques riches en gènes expliquent une grande partie des retards mentaux. Ceci est illustré dans plusieurs anomalies telles que le syndrome du cri du chat ( délétion 5 p), α-thalassémie/retard mental dû à une cause monogénique sur le chromosome X, syndrome de Miller Dieker dû à une micro délétion sue le chromosome 6 et le syndrome de Wolf-Hirschhorn (délétion 4p) (ALTER *et al* 1991).

Actuellement les recherches visant à identifier les gènes autosomiques responsables du RM concernent l'étude des réarrangements et des délétions submicroscopiques en particulier au niveau des régions télomériques et subtélomériques (85). Plusieurs de ces réarrangements ont récemment été identifiés (FLINT *et al*, 1995).

### 3.2.2. Les causes monogéniques du retard mental

Dans ce travail, nous nous intéresserons uniquement aux RM dûs à des causes géniques.

Le retard mental peut être attribué à un gène localisé, soit sur un autosome, soit sur le chromosome X.

#### 3.2.2.1. Les retards mentaux liés à l'X (RMX)

Les retards mentaux liés au sexe sont la cause la plus fréquente des retards mentaux d'origine génique. Ces pathologies atteignent donc préférentiellement les garçons et sont habituellement transmises par des femmes conductrices, pas (ou peu) retardées (figure 3).

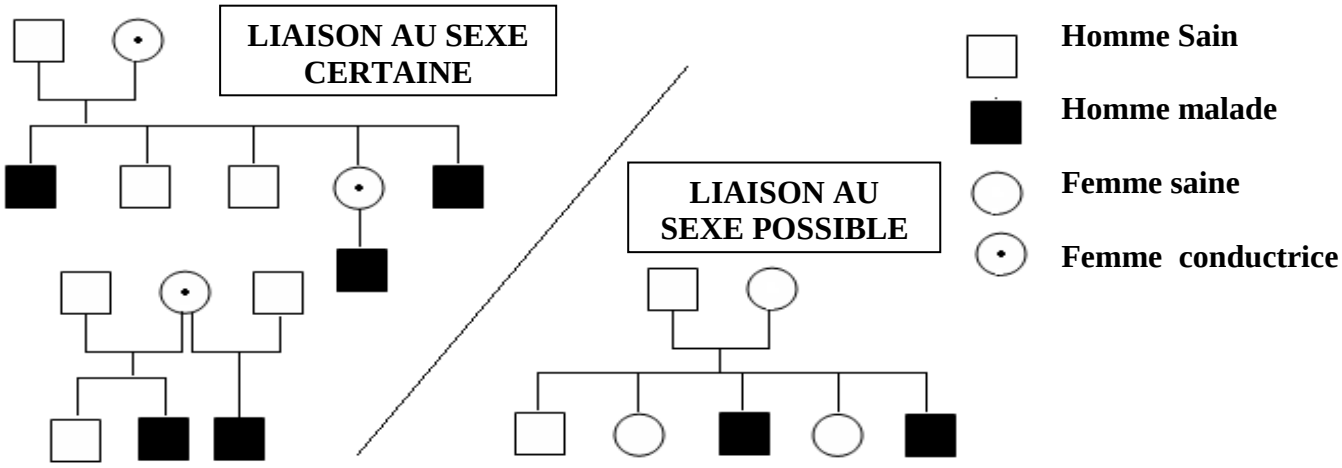



**Figure 3 :** Arbres généalogiques de familles ayant au moins deux garçons présentant un retard mental (MORAINE 1997).

Les déficiences mentales liées au sexe constituent un ensemble de pathologies qui sont cliniquement différentes et qui traduisent des mutations de gènes différents. Dans cet ensemble d'affections encore regroupé sous le terme de « retards mentaux liés au chromosome X», certaines se distinguent par l'adjonction de signes cliniques précis à la déficience mentale, à savoir des anomalies morphologiques, viscérales ou biochimiques caractéristiques ce qui facilite leur reconnaissance chez les garçons atteints : il s'agit de formes spécifiques ou syndromiques (LUBS *et al*, 1996).

Celles-ci s'opposent aux formes non spécifiques ou non syndromiques, bien plus fréquentes, définies par un retard mental non progressif, isolé sans autre anomalie clinique.

- **Les RMX syndromiques (RMXS)**

Grâce à des signes cliniques caractéristiques propres à chaque syndrome, des analyses de liaison génétique peuvent être effectuées en additionnant les données de plusieurs familles atteintes d'une même maladie. C'est ainsi que de nombreux gènes responsables de retards mentaux syndromiques ont été identifiés depuis quelques années. Le premier de ces gènes, et non des moindres, est celui qui est responsable du syndrome X fragile, dont la dysmorphie caractéristique a été décrite par Martin Bell dès 1943. Plus tard, une fragilité du chromosome X qui est une anomalie cyto génétique, a été rapportée par Harvey puis Sutherland (SUTHERLAND *et al*, 1997). C'est l'équipe de Jean-Louis Mandel à Strasbourg qui découvrit le mécanisme original de mutation par amplification de triplet CGG (OBERLE *et al*, 1991), associée à une inactivation du gène FMR-1 (Fragile X Mental Retardation-1). En plus de ce mécanisme mutationnel fascinant qui ouvrait la voie à de nombreuses autres mutations dynamiques impliquées en pathologie humaine, l'étude de ce gène a révélé que certaines femmes atteintes de retard mental sont en fait transmettrices hétérozygotes, d'où un élargissement aux filles le champ des retards mentaux liés à l'X jusque là réservé aux seuls garçons. Depuis la découverte du gène FMR-1, plusieurs autres gènes impliqués dans des formes syndromiques ont été identifiés.

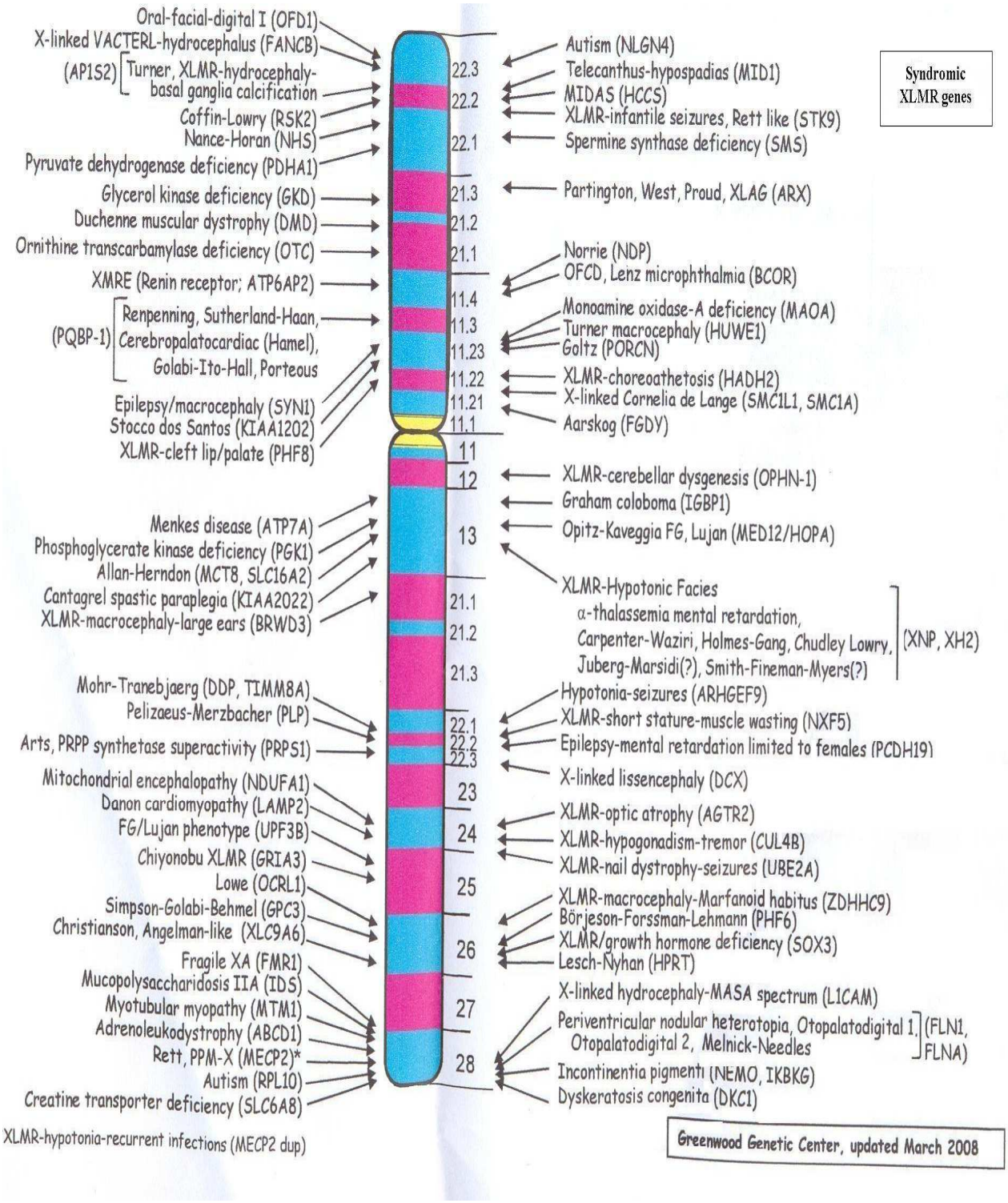



**Figure 4 :** Cartographie des gènes responsables des formes syndromiques du retard mental liés à l'X.
Greenwood Genetic Center, updated March 2008

- **Les RMX non spécifiques ou non syndromiques (RMXNS)**

Les RMXNS se caractérisent par un retard mental sans autre manifestation somatique, neurologique, biochimique ou comportementale associée. La prévalence des RMXNS semble être égale ou supérieure à 1 pour 1000 garçons (MORAINE 1997).

Approximativement deux tiers des patients avec un RMLX sont considérés comme atteints de RM non syndromique (FISHBURN *et al*, 1983).

La recherche de gènes impliqués dans les RMX a été très active ces dernières années, ayant permis l'identification de nombreux gènes.

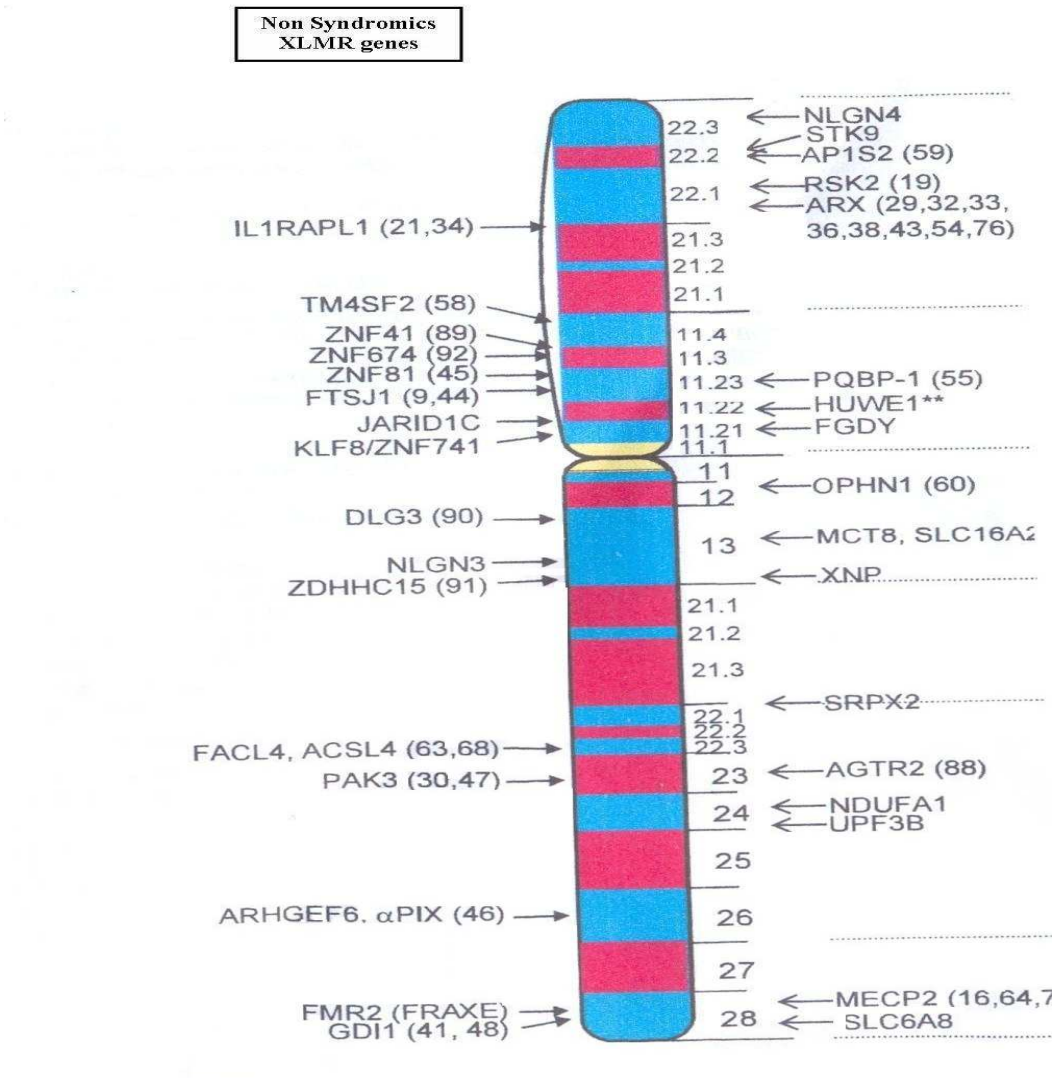



**Figure 5 :** Cartographie des gènes responsables du retard mental non syndromique liés à l'X.

Cependant, grâce à l'amélioration des corrélations génotype/phénotype, et grâce à l'examen plus détaillé des patients, la proportion des cas syndromiques diagnostiqués va en augmentant avec une diminution concomitante des cas non syndromiques.

- **Frontière entre les RM syndromiques et non syndromiques**

La frontière entre les RM syndromiques et non syndromiques semble de plus en plus floue (FRINTS *et al*, 2002) puisque de plus en plus de gènes de RMXNS apparaissent impliqués à la fois dans les RM syndromiques et non syndromiques.

La différence de phénotype observée pour un gène impliqué à la fois dans un RM syndromique et non syndromique pourrait être fonction du type de mutation affectant le gène.

Nous garderons, néanmoins la classification conventionnelle en RM "syndromiques" et "non syndromiques".

#### 3.2.2.2. Les retards mentaux liés aux gènes autosomiques

- **Les retards mentaux autosomiques syndromiques**

Durant ces vingt dernières années, un très grand nombre de gènes autosomiques ont été identifiés et impliqués dans diverses formes de RM syndromiques autosomiques.

On distingue généralement les RM syndromiques en fonction des symptômes qui leur sont associés.

Parmi les RM autosomiques récessifs, on peut citer l'exemple de la phénylcétonurie, maladie autosomique fréquente avec dérèglement métabolique, provoquée par un déficit de la phénylalanine hydroxylase, enzyme permettant la transformation de la phénylalanine en tyrosine (SCRIVER 1999). L'absence de dégradation de la phénylalanine provoque son accumulation toxique. La phénylalanine a une toxicité sur le développement fœtal et sur le cerveau surtout pendant l'enfance provoquant ainsi un RM métabolique. Le dépistage néonatal systématique a été mis en place en France depuis 1970 en raison de son incidence (1/17000 naissances en France) et de l'existence d'un traitement efficace (régime alimentaire très strict); ce dépistage se fait également dans d'autres pays.

D’autres exemples de maladies autosomiques dominantes ont également été décrits, comme par exemple le syndrome de Rubinstein- Taybi. Ce syndrome dysmorphique associe retard mental, aspect caractéristique de la face et des extrémités, retard de croissance, malformations diverses et propension aux tumeurs. Il s’agit d’une anomalie rare et généralement sporadique (néo-mutations) dont l’incidence est estimée à 1/125000 nouveaux-nés vivants. Le gène responsable, CBP, localisé sur le chromosome 16p13.3, est un facteur de remodelage de la chromatine.

- **Les retards mentaux autosomiques non syndromiques**

Le nombre de gènes connus impliqués dans les formes non syndromiques de RM autosomique est très faible. Cela s’explique par la difficulté à cartographier et identifier ces gènes en raison de la petite taille des familles et de faible nombre de mariages consanguins dans les pays développés, mais surtout à cause de l’hétérogénéité génétique des RM non syndromiques. En effet, le défaut de familles consanguines limite l’utilisation de l’analyse de liaison par homozygotie et l’hétérogénéité génétique empêche le rassemblement des intervalles de liaison de différentes familles pour réduire l’intervalle candidat. Jusqu’à aujourd’hui, aucun gène de RM autosomique non syndromique dominant n’a été trouvé. Et bien que de nombreux gène liés à l’X aient été identifiés, seulement six loci sont connus comme étant une cause de RM non syndromique autosomique récessif (MHAMDI et CHAABOUNI *et al*, 2011).

Le premier, c’est le gène PRSS12, sur le bras long du chromosome 4 (4q25-q26) chez une famille algérienne (MOLINARI *et al*, 2002), ensuite le gène CRBN sur le bras court du chromosome 3 (3p26.2) chez une grande famille américaine (HIGGINS *et al* 2000-2004), puis le gène CC2D1A sur le bras court du chromosome 19(19p13.2) chez une grande famille Arabo-Israélienne (BASEL-VANAGAITE *et al*, 2003-2006).Ensuite, le gène GRIK2 situé sur le chromosome 6q16.1-q21 chez une grande famille Iranienne, puis le gène TUSC3 sur le chromosome 8p22-p23.1.

Enfin, un sixième locus situé sur le bras court du chromosome 1(1p21.1-p13.3) chez une grande famille consanguine turque (UYGUNER *et al*, 2007).

- **Le gène PRSS12 : Protéase Sérine 12 (neurotrypsine)**

En 2002, Molinari et son équipe, localise le gène de la neurotrypsine.

L'étude réalisée dans une famille algérienne consanguine, composée de 8 enfants : 4 sains et 4 atteints de RM sévère (QI inférieur à 50) a été faite par homozygotie par filiation et a été la première à associer un gène à une forme de RM autosomique récessif.

Ce travail a permis l'identification d'une région unique d'homozygotie commune à tous les malades sur le bras long du chromosome 4 en 4q24-q25.

La région candidate de 14 Mb, cernée par les marqueurs D4S1570 et D4S1575 (lod score = 3.33 pour $\theta=0$ au locus D4S407), comportait plusieurs gènes candidats (environ 29 gènes) mais un gène en particulier, le PRSS12 en 4q26 a été étudié.

Ce gène, initialement identifié chez la souris et membre de la famille des protéases à sérine, a été étudié chez l'homme.

L'homologue humain de ce gène est formé de 13 exons correspondant à un cadre de lecture de 2625 pb codant pour une sérine protéase en multidomaine de 875 AA. Cette dernière présente une homologie de 82.5 % avec la neurotrypsine murine et possède un récepteur additionnel riche en répétitions de cystéines.

La neurotrypsine humaine, présente du 14$^{ème}$ jour à la 15$^{ème}$ semaine de la vie embryonnaire, est hautement exprimée dans le cortex, l'hippocampe et le noyau moteur. Elle participe à l'élaboration et au maintien des fonctions d'apprentissage et de mémorisation de même qu'au processus de maturation synaptique et de plasticité neuronale (MURRAY *et al*, 1999).

Des expériences d'immunohistochimie, par utilisation d'anticorps dirigés contre son domaine protéolytique, ont permis de localiser la neurotrypsine au niveau de la membrane présynaptique.

La neurotrypsine joue un rôle important dans le fonctionnement synaptique normal.

Elle agit comme un neurotransmetteur en activant par protéolyse un récepteur spécifique ancré dans la membrane postsynaptique (figure 7).

L’inactivation du gène de la neurotrypsine entraîne une mauvaise transmission synaptique suite à l’absence de la protéine.

L’étude des différents exons du gène a permis d’identifier une mutation, au niveau de l’exon 7 du gène PRSS12, qui co-ségrége avec le phénotype de RM dans la famille.

Cette mutation, qui abolit un site de restriction AatII, consiste en la délétion de quatre paires de bases entraînant un décalage du cadre de lecture avec création d’un codon stop à 147 nucléotides en aval de la délétion d’où un arrêt prématuré de la traduction.

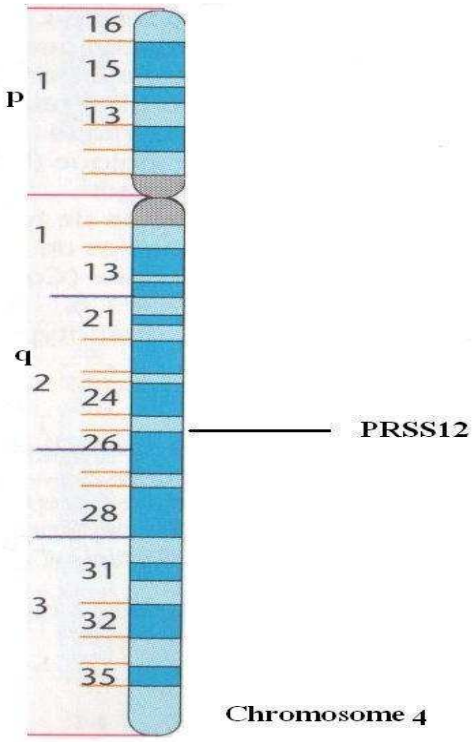



**Figure 6 :** Localisation chromosomique du gène PRSS12. (MOLINARI *et al*, 2002)

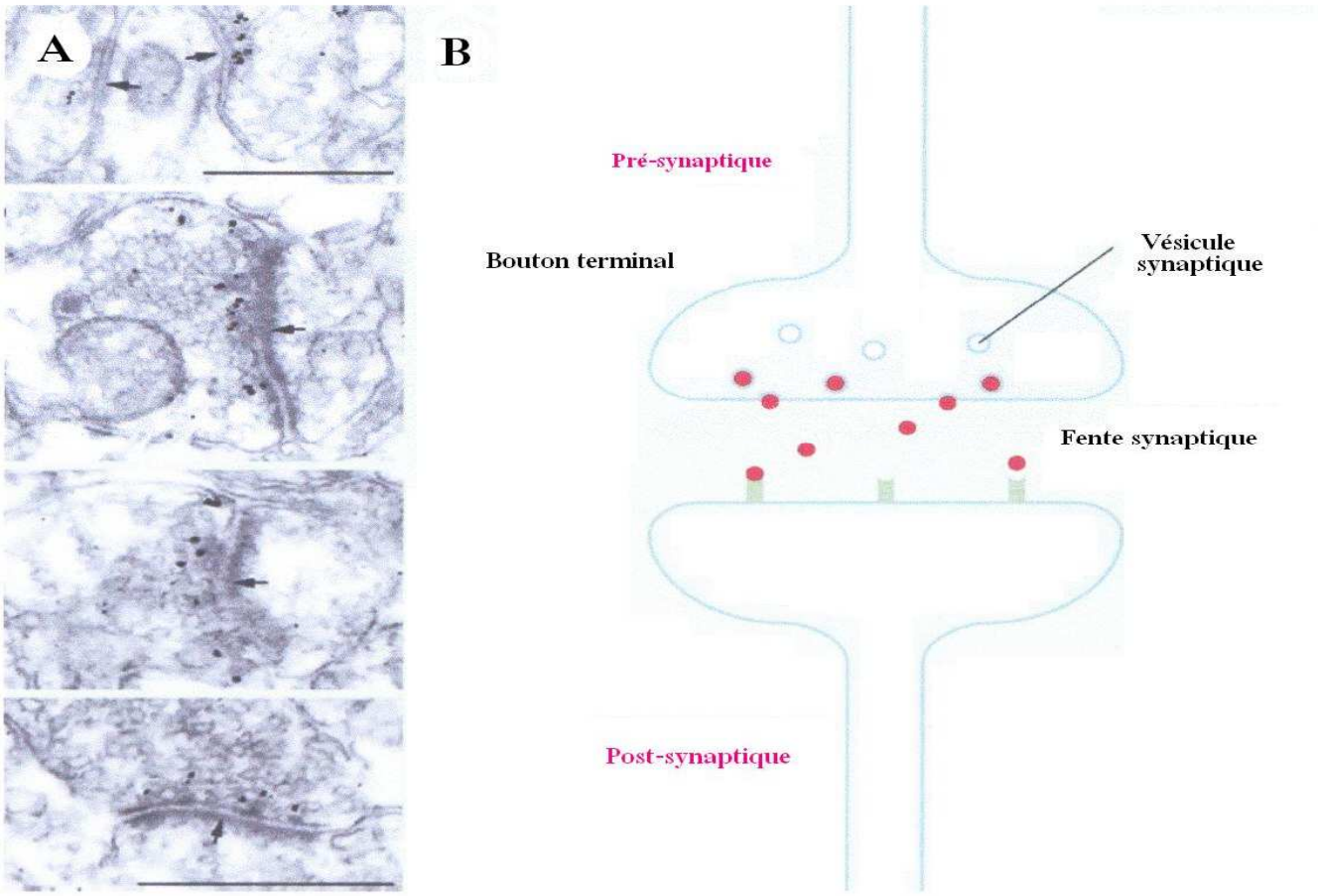



**Figure 7 :** Localisation de la neurotrypsine dans les synapes corticales par immunohistochimie et observation en microscopie électronique.(MOLINARI *et al*, 2003)

- **Le gène CRBN : Cereblon**

Higgins et ses collaborateurs ont cartographié par recherche d'homozygotie chez une famille consanguine présentant un RM léger non syndromique autosomique récessif, le locus morbide dans un intervalle de 4.2 Mb en 3p25-pter (figure 8). En 2004, Higgins et ses collègues ont mis en évidence une mutation non sens dans le gène CRBN chez la famille décrite. Ce locus était déjà connu puisqu'un syndrome de gènes contigus, le syndrome 3p- était déjà localisé au même endroit. Le syndrome 3p- se caractérise par un RM sévère, un ptôsis (chute de la paupière supérieure due à la paralysie du releveur), une microcéphalie et un retard de croissance. La différence de sévérité du RM entre la famille décrite par Higgins et les patients présentant le syndrome 3p- suggère que CRBN et d'autres gènes de l'intervalle délété ont des

conséquences neurologiques et cognitives. Cereblon code pour une protéase Lon ATP dépendante, fortement exprimée dans le cerveau et localisée dans la mitochondrie. Elle interagit avec le domaine cytosolique de la sous unité α du canal ionique neuronal à potassium activé par la dépolarisation membranaire et régulé par le calcium intracellulaire, BKca. Cerelbon jouerait un rôle dans la modulation de l'activité de BKca (canal à calcium qui permet la repolarisation des cellules) en régulant sa traduction et son assemblement *in vivo* (JO *et al*, 2005).

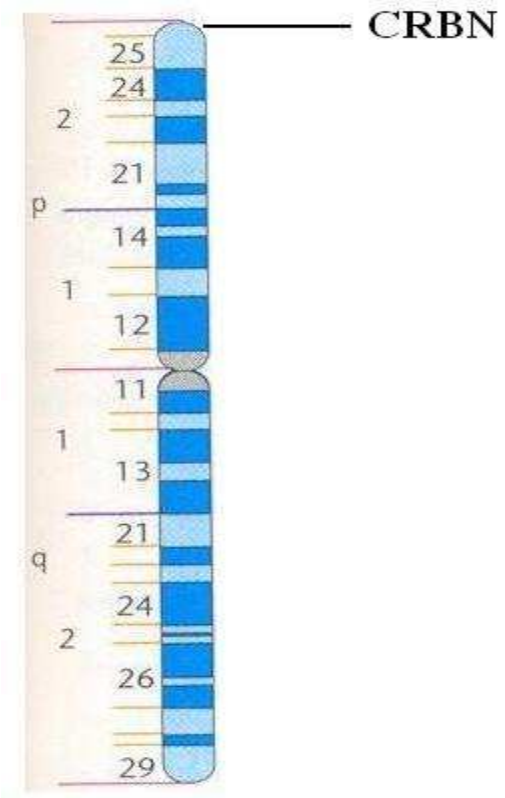



**Figure 8 :** Localisation chromosomique du gène CRBN. (HEGGINS *et al*, 2004)

- **Le gène CC2D1A : Coiled-Coil and C2 Domain Containing 1A**

L'étude de neuf familles consanguines a permis d'identifier un locus de RM non syndromique récessif dans un intervalle de 0.9 Mb en 19p13.12 (BASEL-VANAGAITE, 2003). La recherche de mutation dans les gènes de cet intervalle a mis en évidence une délétion provocant un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop prématuré dans le gène CC2D1A pour toutes les familles (BASEL-VANAGAITE 2006). Le gène CC2D1A est exprimé chez la souris au cours du développement du cerveau (zone ventriculaire et plaque corticale) et son expression persiste à l'âge adulte dans le cortex cérébral et l'hippocampe. CC2D1A code pour une protéine contenant deux domaines e conservés : le domaine C2 et le motif DM14 dont la fonction n'est pas connue. Le domaine C2 est retrouvé dans les protéines intervenant dans la fixation aux phospholipides calcium dépendant. CC2D1A serait impliqué dans la voie de transmission du signal qui active la cascade de I-KappaB/NF-KappaB (MATSUDA *et al*, 2003).

NF- Kappa B est un facteur de transcription impliqué de manière très importante dans de nombreuses réponses cellulaires : Il participe à la prolifération des cellules, à leur différentiation au développement embryonnaire. C'est une molécule centrale de la cellule. NF- Kappa B est cytoplasmique en absence de la stimulation de la cellule et migre dans le Ny lorsque celle-ci est activée.Dans des conditions où la cellule n'est pas stimulée, NF-Kappa B est retenu dans le cytoplasme par un inhibiteur, la molécule I-Kappa B. Cette dernière empêche la translocation du facteur vers le noyau.

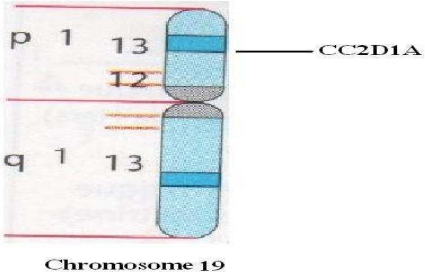



**Figure 9 :** Localisation chromosomique du gène CC2D1A. (BASEL-VANAGAITE, 2003).

- **Le gène GRIK2 (ou GLUR6) : Glutamate Receptor,Inotropic,Kainate 2**

Najmabadi et al (2006) ont réalisé une cartographie par homozygotie chez 78 familles consanguines Iraniennes avec un RM autosomique récessif non syndromique ce qui leur a permis de déterminer la localisation chromosomique d'au moins 8 nouveaux loci pour cette affection, dont l'un des gènes candidats est GRIK2. Cette étude a été poursuivie par MOTAZAKER *et al* (2007) qui ont rapporté une mutation complexe du gène du récepteur 6 du glutamate ionotropique (GRIK2, aussi appelé GLUR6) qui co-ségrège avec un RM autosomique récessif non syndromique modéré à sévère chez une grande famille consanguine Iranienne. Il s'agit d'un intervalle de 9.98Mb sur le chromosome 6q16.1-q21. Cela se traduit par une suppression de 84 aminoacides, entre les acides aminés 317 et 402.

Le séquençage de cette région chez ces patients montre une délétion complète des exons 7 et 8 du gène GRIK2. Ceci se traduit par une suppression de 84 aminoacides, entre les acides aminés 317 et 402, à proximité du premier domaine ligand-binding, le domaine transmembranaire adjacent et la boucle putative des pores, ce qui suggère une perte complète de fonction de la protéine GLUR6.

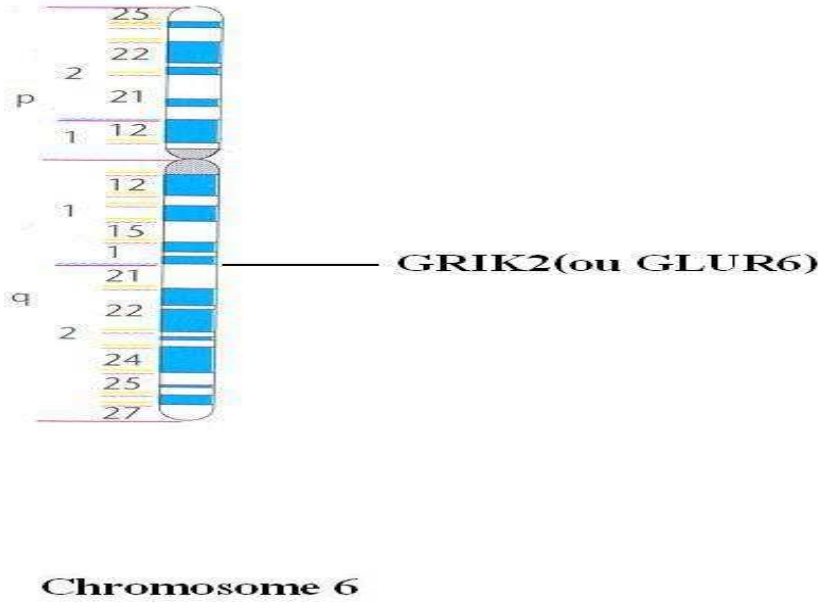



**Figure 10 :** Localisation chromosomique du gène GRIK2 (ou GLUR6).

MOTAZAKER *et al* (2007)

- **Le gène TUSC3 : Tumor Suppressor Candidate 3**

Récemment, deux équipes indépendantes ont démontré, simultanément, l'implication du gène TUSC3 (ou N33), dans la forme non syndromique du retard mental autosomique récessive. Ainsi, GARSHASBI *et al* (2008), ont réalisé une analyse sur une grande famille consanguine comprenant 7 patients avec un RM autosomique récessif non syndromique, dans 4 fratries.

Le typage SNP à l'échelle du génome a permis de cartographier une anomalie génétique à un intervalle de 4.6Mb sur le chromosome 8. Les analyses d'haplotypes et l'étude des nombres de copies ont permis l'identification d'une suppression partielle du gène TUSC3 (N33) chez tous les patients. Tous les porteurs obligatoires de cette famille étaient hétérozygotes. L'absence totale d'un transcrit fonctionnel TUSC3 a été vérifiée chez tous les patients par RT-PCR.

D'autre part, MOLINARI *et al* (2008) ont rapporté l'implication du même gène dans le RMARNS.

Ainsi, grâce à une cartographie par homozygotie chez 2 frères nés de parents français, cousins du premier degré, ils ont permis d'identifier une région en 8p22-p23.1. Cet intervalle comprend le gène N33/TUSC3, qui code pour une sous-unité du complexe oligosaccharyl–transférase (OTase), qui catalyse le transfert d'un oligosaccharide sur la chaine de nouvelles protéines, l'étape clé de la N-glycosylation. Le séquençage du gène N33/TUSC3 a identifié l'insertion d'1pbc.787-788 ins C, résultant en un codon stop prématuré, et conduisant à la dégradation des ARN messagers.

Des études récentes sur la modification des cellules neurales et des glycoprotéines d'adhésion ont montré le rôle essentiel de la glycosylation dans la plasticité synaptique (MOLINARI 2008).

Ces résultats démontrent que la régulation rigoureuse de l'activité de l'OTase est essentielle pour une fonction cognitive normale, ceci permet de mieux comprendre les bases physiopathologiques du RM.

Une nouvelle mutation non-sens a été identifiée plus tard dans le second exon de ce gène TUSC3 (GARSHASBI *et al*, 2011)

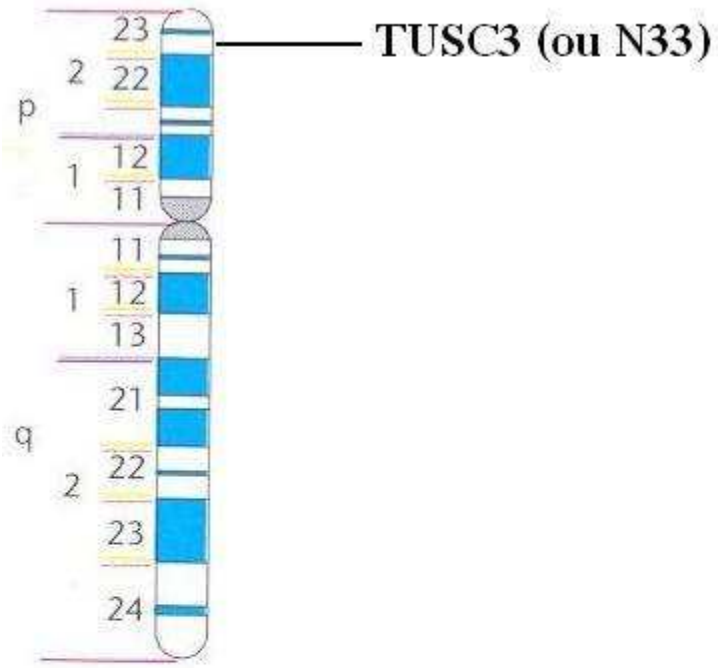



**Figure 11 :** Localisation chromosomique du gène TUSC3 (ou N33) GARSHASBI *et al* (2008), MOLINARI *et al* (2008)

- **Le locus 1p21.1-p13.3**

UYGUNER *et al* (2007) ont étudié une grande famille turque, dans laquelle ils rapportent des mariages consanguins, avec quatre individus ayant un RM, provenant de différentes branches de la famille.

Les tests cliniques ont montré une diminution cognitive significative, par contre aucune anomalie du point de vue neurologique, squelettique, ou biochimique n'a été révélée.

Une large cartographie du génome a montré une liaison à un locus unique avec un LOD Score paramétrique de 4.92 pour $\theta=0$ dans une région du chromosome 1 : 1p21.1-p13.

De plus des analyses utilisant des marqueurs microsatellites polymorphes ont défini une région critique de 6.6 Mb contenant approximativement 130 gènes connus.

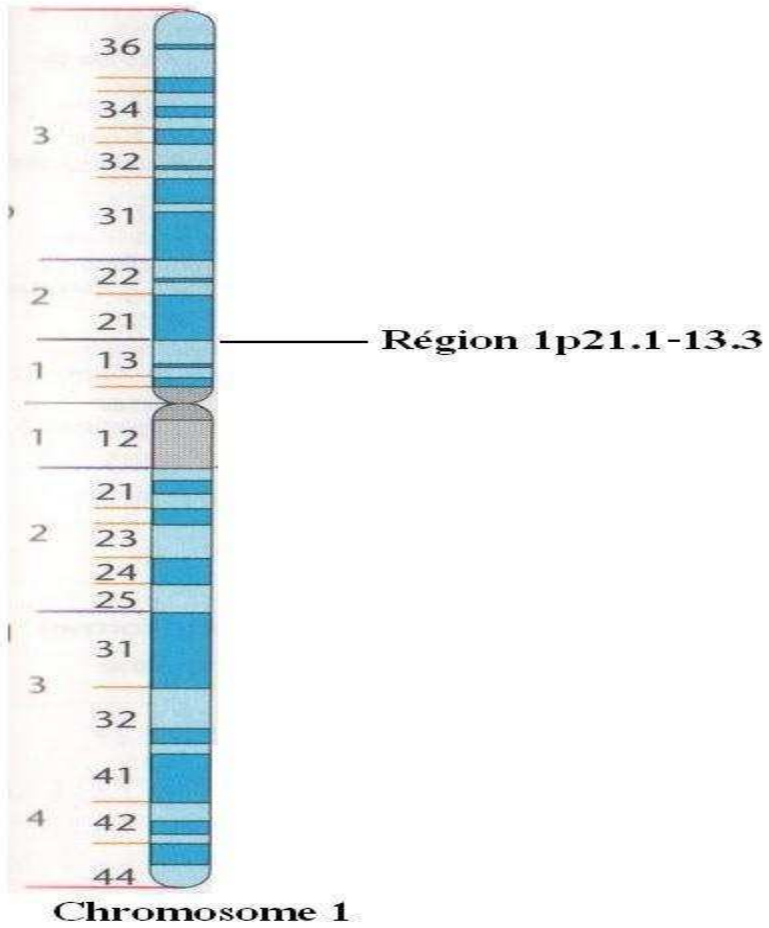



**Figure 12 :** Localisation chromosomique de la région 1p21.1-p13.3 UYGUNER *et al* (2007)

D’autres gènes intervenant de façon indirecte dans le RM ont été récemment découverts :

Les équipes de recherche de Laurence Colleaux et Jean Marc Egly, ont identifié une mutation du gène *MED23* qui est liée à une DI isolée (HASHIMOTO, BOISSEL, EGLY, COLLEAUX *et al*, 2011). *MED23* code une des sous-unités d’un large complexe multiprotéique : le Médiateur (MED, cf. Figure 13). Ce complexe est connu pour son rôle dans une étape clé de la régulation de l'expression des gènes : la transcription. Il permet aux facteurs de transcription spécifiques d'un gène de s'assembler pour interagir avec l’ARN polymérase, l'enzyme clé de cette étape.

Au cours de ces travaux, les chercheurs ont démontré que les cellules de patients atteints de DI présentent un défaut d’expression de certains gènes parmi lesquels les gènes "précoces" *JUN* et *FOS*. Ces derniers sont impliqués dans l'expression d'une cascade de gènes liés à diverses fonctions cellulaires, notamment au niveau du système nerveux central. Leur activation rapide et transitoire est une étape clé dans le développement et la plasticité cérébrale.

La mutation identifiée conduit à la synthèse d’une protéine MED23 modifiée devenue incapable d’interagir correctement avec les facteurs spécifiques des deux gènes considérés. Par exemple, dans le cas du gène *JUN*, l’assemblage permettant la transcription est défectueux suite à un mauvais contact entre la protéine MED23 mutée et le facteur TCF4 (en bleu cf. Figure 14).

La localisation chromosomique des gènes sus-cités étant (d’après ensembl.org) :

MED23 : 10q24

JUN : 1p32-p31

FOS :14q24.3

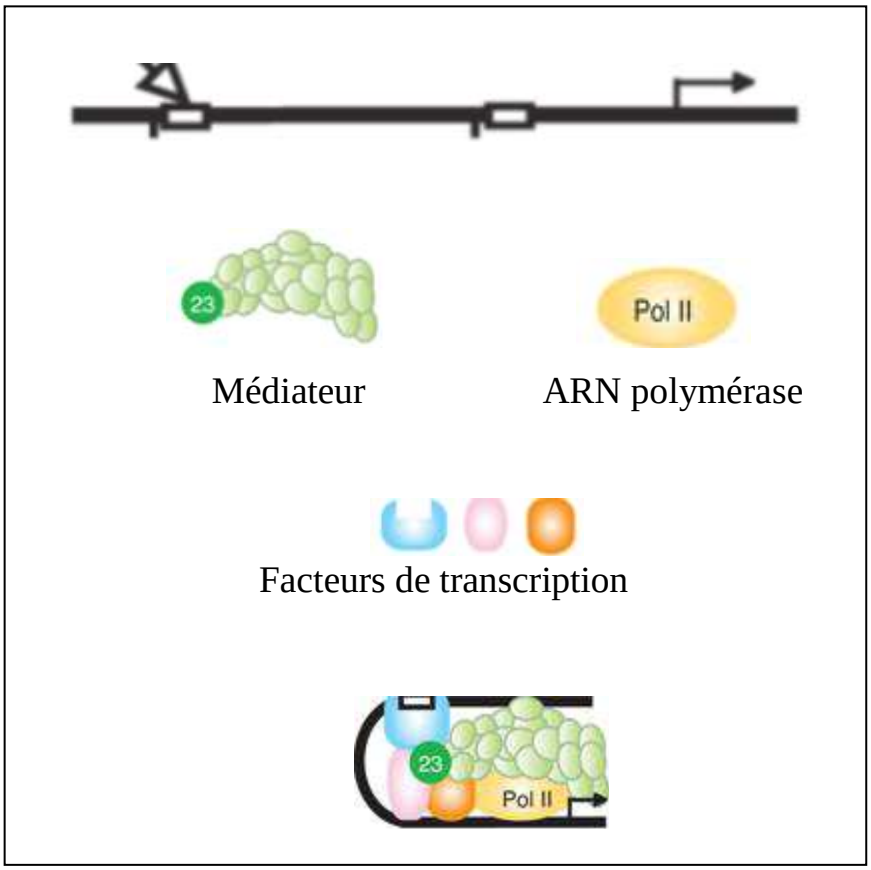



**Figure 13 :** Rôle du complexe Médiateur dans la transcription des gènes

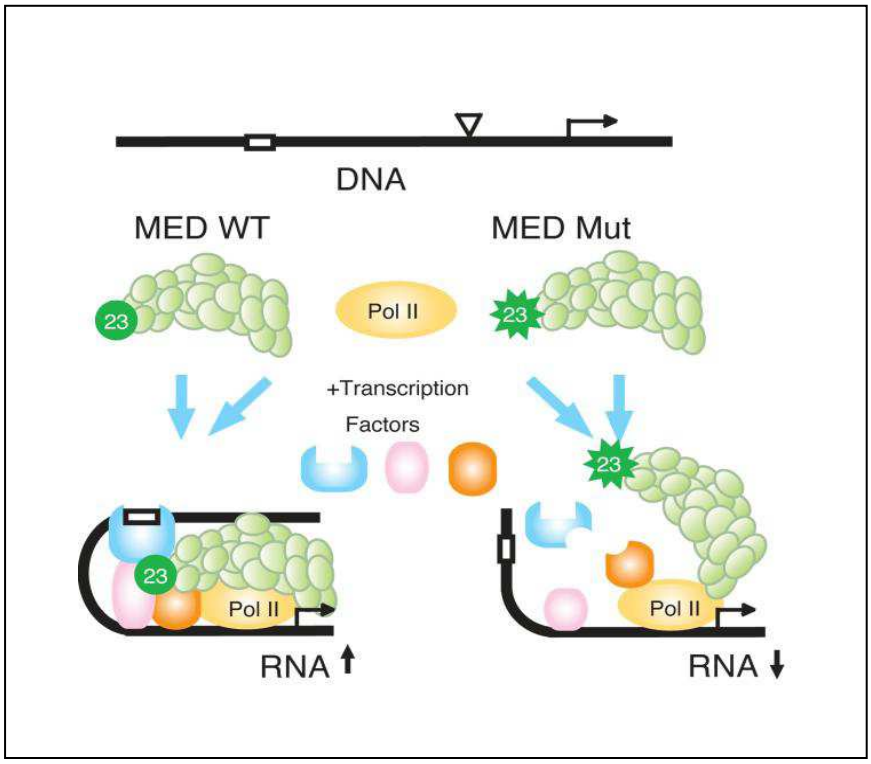



**Figure 14 :** Dans le cas du gène JUN, la protéine MED23 mutée ne permet plus l'assemblage nécessaire à la transcription

### 3.2.3. Identification de gènes de Retard Mental

#### 3.2.3.1. Les stratégies d'identification de gènes

Le choix de la stratégie pour identifier un gène responsable de maladie génétique dépend de l'informativité des familles, des ressources,et de la quantité d'informations disponibles sur la pathogénie de la maladie. Deux stratégies peuvent être utilisées pour identifier les gènes responsables de maladie : le clonage fonctionnel (GITSCHIER *et al*, 1984) et le clonage positionnel (ROYER-POKORA *et al*, 1986 ; COLLINS 1992).

Le clonage fonctionnel est historiquement la première stratégie utilisée pour identifier des gènes responsables de la maladie. Il consiste en l'utilisation des connaissances sur la fonction d'un gène morbide non identifié. Deux approches sont essentiellement utilisées : celle qui repose sur la disponibilité du produit purifié du gène (production d'oligonucléotides correspondant à la rétrotranscription de la protéine ou d'anticorps dirigés spécifiquement contre le produit du gène) et celle pour laquelle un test fonctionnel du gène peut être réalisé (complémentation fonctionnelle). L'identification de gène de maladies génétiques par clonage fonctionnel n'a été fructueuse que dans quelques rares cas, comme pour l'identification de la phénylalanine hydroxylase, gène responsable de la phénylcétonurie (ROBSON *et al*, 1982).

Le clonage positionnel correspond à l'identification du gène uniquement à partir de sa localisation chromosomique approximative, sans la nécessité d'avoir des informations sur sa pathogenèse ou sa fonction biochimique. La première étape consiste à définir une région candidate la plus étroite possible, la taille de cette région déterminant le travail nécessaire pour arriver jusqu'au gène. En absence d'anomalies cytogénétiques, la méthode d'analyse de liaison sera utilisée pour localiser la région candidate.

Une fois la région candidate minimale déterminée, les gènes localisés dans la région sont identifiés par une recherche dans les bases de données du génome humain et par la cartographie des transcrits. Si plusieurs gènes sont présents dans l'intervalle

candidat, on essaye de déterminer le meilleur gène candidat, c'est-à-dire le gène pour lequel une perte ou un gain de fonction serait compatible avec le phénotype observé chez les patients. Un gène candidat ne sera définitivement validé que par la mise en évidence de mutations délétères spécifiquement chez les patients.

### 3.2.4. Le clonage positionnel

#### 3.2.4.1. Localisation chromosomique

Cette étape consiste à assigner au gène morbide un locus chromosomique soit par l'analyse de liaison génétique entre le locus de la maladie et des marqueurs génétiques ségréguant dans les familles atteintes, soit par l'observation d'anomalies chromosomiques de structure associées à la maladie.

#### 3.2.4.2. Analyses de liaison génétique

L'analyse de liaison génétique consiste à étudier la co-ségrégation du gène responsable d'une maladie génétique avec des marqueurs polymorphiques. Cette stratégie repose sur la recombinaison méiotique (crossing-over). Des loci physiquement proches sur un chromosome seront rarement séparés par une recombinaison et auront tendance à être transmis ensemble. Ainsi, plus deux loci sont proches, moins ils ont de chance d'être séparés par un crossing-over et plus la distance génétique entre eux sera petite. Le pourcentage de recombinaisons méiotiques entre deux loci permet d'évaluer la distance génétique qui les sépare. Cette distance est exprimée en centi-Morgans (cMs) ; lcM correspond à 1% de recombinaison homologue entre deux loci pendant la méiose (OTT 1991). La carte génétique consiste en un ensemble dense de loci marqueurs génétiques. Ces marqueurs sont des polymorphismes au niveau de l'ADN : polymorphisme de restriction (RFLP), polymorphisme de répétitions en tandem (VNTR et STR) ou polymorphisme au niveau d'un seul nucléotide (SNP).

Si un marqueur polymorphe est proche du locus morbide, des allèles identiques de ce marqueur vont être partagés par les individus atteints d'une famille et non par les individus sains. L'analyse de marqueurs polymorphes chez les individus d'une famille permet donc de déterminer quels marqueurs co-ségrégent avec la maladie. Cependant, cette co-ségrégation peut survenir au hasard et la liaison d'un locus à une

maladie n'est prouvée que si le nombre de méioses étudié est suffisamment grand. Le risque de liaison dû au hasard est évalué par un test statistique appelé LOD score (logarithme of the odds ratio for linkage) qui correspond au logarithme décimal du rapport de la probabilité de liaison entre deux marqueurs au numérateur et la probabilité d'absence de liaison au dénominateur (MORTON 1995). Les pics au-dessus de trois pour les loci autosomiques ou au-dessus de deux pour les loci liés au chromosome X sur la courbe des LOD scores identifient la localisation des gènes d'intérêt. Les loci ont alors moins de 1 chance sur 1000 de ne pas être liés pour les loci autosomiques (log décimal de 1000 est égale à 3) et moins de 1 chance sur 100 pour les loci sur le chromosome X (log décimal de 100 est égal à 2).

**3.2.4.3. Identification des gènes candidats**

La stratégie d'identification de gènes candidats utilise une recombinaison d'informations positionnelles et non positionnelles. En effet, les approches indépendantes de la position aboutissent rarement et les approches uniquement dépendantes de la position sont souvent insuffisantes car les régions candidates contiennent souvent plusieurs gènes.

- **Les critères de sélection de gène candidat**
- **Profil d'expression et fonction**

Un des premiers critères est un profil d'expression approprié, c'est-à-dire compatible avec le phénotype de la maladie. Le gène peut être exprimé spécifiquement dans les tissus touchés par la maladie ou, du moins, au moment et à l'endroit où la pathologie est observée. Les méthodes d'analyse de l'expression d'un gène candidat sont la RT-PCR, le Northern-Blot et surtout l'hybridation in situ des ARNm sur les coupes de tissus et/ou d'embryons qui permet de visualiser précisément les lieux d'expressions du gène.

La fonction du gène doit également être appropriée. Le gène doit avoir une relation fonctionnelle proche avec d'autres gènes impliqués dans des maladies similaires. Ces relations peuvent être un récepteur et son ligand, des intéracteurs ou des protéines de la même voie métabolique ou de développement.

### 3.2.4.4.. Homologie avec des gènes connus

D’autres critères de sélection peuvent être une homologie avec un gène impliqué dans une maladie avec un phénotype apparenté ou une orthologie avec un gène identifié dans un modèle animal montrant un phénotype similaire à celui de l’homme. En effet, virtuellement tous les gènes de la souris ont leur équivalent chez l’homme. Les différentes voies sont également très bien conservées entre les différents organismes.

La prédiction d’interaction entre protéines gouvernant une voie peut également aider à l’identification de nouveaux gènes de maladies.

### 3.2.4.5. Approche bioinformatique

La bioinformatique a connu une évolution spectaculaire ces dernières années. Elle est devenue un outil indispensable dans la recherche de nouveaux gènes. Cet outil comprend : l’annotation des séquences génomiques accessibles sur les sites Internet des banques de données (tableau II) et les programmes d’analyses de séquences. La plupart des études de recherches de gènes responsables de maladies commencent, une fois le locus de la maladie identifié, par la recherche bioinformatique de gènes ou de séquences exprimées puis toutes les séquences potentiellement codantes sont validées par les approches expérimentales.

*** Les banques de données de séquence du génome humain**

Ces banques de données sont construites grâce à la concaténation de fichiers de séquences. Elles contiennent la séquence brute, mais également d’autres informations constituant la carte d’identité du génome. Une banque de données est d’autant plus complète qu’elle contient toutes les séquences du génome humain mais aussi par la qualité et la quantité de ses annotations complémentaires.

**Tableau II :** Adresses web des principales banques de données de séquences du génome humain.

| Banques de données | Adresses web |
|---|---|
| Human Genome Working Draft | http://genome.ucsc.edu/ |
| Ensembl Genome Server | http://www.ensembl.org/ |
| Sanger Center | http://www.sanger.ac.uk/ |
| RZPD | http://www.rzpd.de/ |
| NCBI | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ |

### 3.2.5. Etude de la liaison génétique

#### 3.2.5.1. Principe

L'analyse de liaison consiste à étudier la coségrégation de deux ou plusieurs loci dans une famille pour tester leur liaison génétique.

Le degré de liaison entre les deux loci est estimé en calculant le taux de recombinaison entre eux.

Pour localiser, ou tester le degré de liaison d'un gène impliqué dans une maladie à un locus donné, on aura besoin d'un nombre suffisant de méioses informatives et d'un marqueur génétique, un locus dont on connaît l'emplacement sur le génome, c'est-à-dire qu'il peut marquer le chromosome sur lequel un allèle pathologique est situé.

#### 3.2.5.2. Les méioses informatives

Une méiose est informative pour une liaison si l'on peut déterminer si le gamète est ou non recombinant, en d'autres termes si elle permet d'observer la coségrégation ou la ségrégation indépendante entre deux loci.

### 3.2.5.3.Les marqueurs génétiques

**Définition**

Pour environ 10%, la molécule d'ADN est constituée par les gènes qui sont le support de l'information.

En revanche, la plus grande partie (90%) de l'ADN nucléaire ne commande directement aucune synthèse protéique et l'on ignore actuellement sa fonction précise. Dans cette partie non codante, l'analyse a mis en évidence des régions variables (qui représentent 30 à 40% de cet ADN non codant). Il s'agit de séquences d'ADN qui existent sous deux versions distinctes ou plus. Ce sont des marqueurs génétiques. Ils sont situés sur un emplacement connu sur le génome et en cartographie, ils servent à « baliser » les chromosomes.

Il existe trois types de séquences qui peuvent prétendre au titre de marqueur ADN : les fragments de restriction polymorphes (RFLP), les séquences simples, présentant un polymorphisme de longueur (SSLP), et les polymorphismes portant sur un seul nucléotide (SNP).

- **Polymorphisme de restriction de l'ADN (RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphisme) :**

  Fragment de restriction dont la longueur est variable en raison de la présence d'un site de restriction polymorphe à l'une des extrémités ou aux deux.

- **Les polymorphismes portant sur un seul nucléotide (SNP : Single Nucléotide Polymorphisme) :**

  Il s'agit d'une variation ponctuelle retrouvée chez certains individus d'une population. Certains SNP peuvent être à l'origine de RFLP.

- **Les séquences simples présentant un polymorphisme de longueur (SSLP :** Simple Séquence Length Polymorphism). Ce sont des séquences ordonnées, répétitives dont les différents allèles contiennent un nombre différent d'unités de répétition. Il existe deux types de SSLP :

- **Les minisatellites ou VNTR (Variable Number of Tandem Repeats)**

Ce sont des séquences d'ADN constituées de motifs répétés de taille comprise entre 9 et 64 pb ; ils sont mis en évidence, après coupure enzymatique et séparation électrophorétique des fragments obtenus, par hybridation d'une sonde spécifique d'un motif répété. Leur taille peut aller de 0.1 à 20 kb en fonction du nombre de répétions.

Ce sont des marqueurs polyalléliques (les différents allèles correspondant aux différents nombres de répétitions possibles), ils permettent une importante informativité.

- **Les microsatellites ou STR (Short Tandem Repeats)**

Ce sont des séquences d'ADN constituées de motifs di-tri- ou tétranucléotidiques répétés n fois. Exemples : (CA) n, (CCT) n… où n est variable de 10 à 40 en moyenne.

Ce sont des marqueurs polyalléliques hautement informatifs et très fréquents dans le génome.

Les marqueurs génétiques de choix pour une étude de liaison doivent remplir les conditions suivantes :

- Etre le plus proche possible du locus de la maladie
- Posséder plusieurs allèles
- Etre informatifs (Polymorphism Information Content ou PIC > 70%).

L'informativité d'un marqueur est estimée grâce aux fréquences alléliques.

Dans le cas de notre travail, nous allons réaliser une étude de liaison avec des marqueurs de type microsatellites.

### 3.2.6. Les puces à ADN :

Il s'agit d'une nouvelle technologie qui permet l'identification de régions d'intérêt sur le chromosome. Nous avons opté pour la méthode affymetrix, utilisant les puces à ADN, une nouvelle technologie qui permet de génotyper 10000 SNP répartis sur tout le génome.

Les puces à ADN, aujourd'hui communément appelées «DNA microarrays » en anglais (de « array »=rang ordonné) sont préparées sur de petites plaques de verre divisées en très petites surfaces appelées puits (petits carrés). Chaque puits peut être aussi petit que la moitie de l'épaisseur d'un cheveu.

**Figure 15 :** Photographie d'une puce à ADN.

Dans chaque puits, des copies d'une sonde synthétique d'ADN spécifique (les différents marqueurs microsatellites) d'environ 20 nucléotides de longueur, sont attachées au verre. Les puits de la puce peuvent ainsi contenir différentes combinaisons de nucléotides, aussi bien des allèles normaux que de divers allèles mutés.

Les puces permettent de cribler jusqu'à 125000 polymorphismes différents en une seule expérience, en présumant qu'il y a dans la biopuce autant d'oligonucléotides qu'il y a d'allèles pour chacun des sites SNP.

L’utilisation des puces à ADN n’est pas très compliquée. Afin de permettre une hybridation éventuelle, la plaque d’oligonucléotides est incubée avec l’ADN cible à étudier, marqué auparavant avec un ou plusieurs fluorochromes et dénaturé en simple brin. La puce est ensuite balayée par un rayon laser qui induit une fluorescence sur les puits où une hybridation a eu lieu, ou par microscopie confocale à fluorescence. Un logiciel associé analyse les résultats.

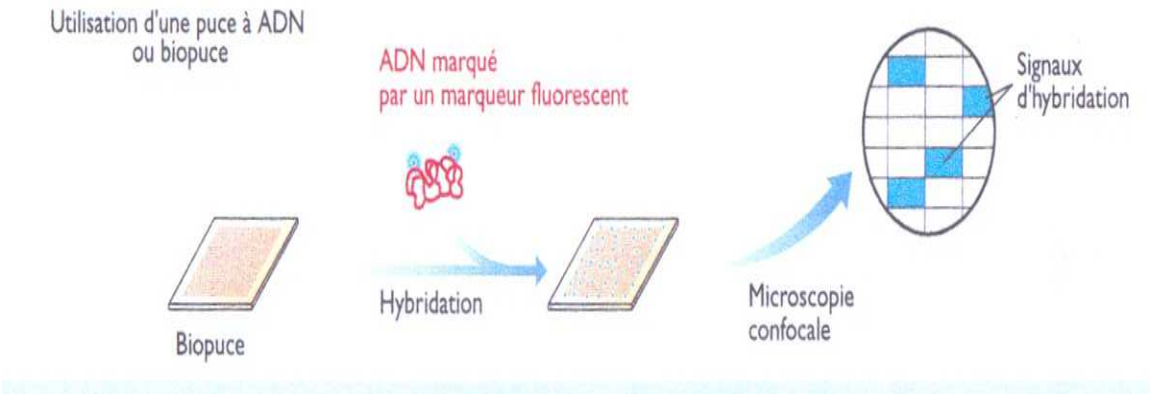



**Figure 16 :** Utilisation d’une puce à ADN ou biopuce

Les marqueurs de type SNP sont décelés sur l’ensemble du génome.

Leur utilisation est accrue grâce au développement de la technologie de puces à SNP.

Ainsi, des régions d’homozygotie partagées par les sujets porteurs d’une pathologie (malades) autosomique récessive ont pu être identifiées.

Notre capacité croissante d’effectuer des analyses à haut débit du génotype en utilisant des microarrys a contribué pour beaucoup à l’augmentation du taux de découverte des gènes RMNS au cours des dix dernières années. Tous les gènes identifiés sur le mode autosomique récessif RMNS jusqu’à présent ont été identifiés grâce à la technologie des biopuces combinée à la cartographie par homozygotie utilisant de grandes familles consanguines (KAUFMAN, AYUB, VINCENT 2010).

### 3.2.7. La méthode du Lod Score :

L’analyse lod score est une méthode paramétrique établie par Morton en 1955. Elle est basée sur le principe de vraisemblance pour estimer le taux de recombinaison

$\theta$ et tester la liaison génétique entre deux loci en l'occurrence un locus marqueur et un locus de maladie (analyse deux points).

La vraisemblance (L) du pedigree est calculée entre le locus de la maladie et le locus marqueur pour une valeur x du taux de recombinaison et pour $\theta$=0.5, en se basant sur le nombre d'individus recombinants et non recombinants.

Lorsque les parents sont en phase connue (on connaît le génotype des grands parents) les recombinants sont facilement identifiés, la vraisemblance sera :

$$L=(1-\theta)^{nr}.\ \theta^{r}$$

Avec : r nombre de recombinants et nr nombre des non recombinants.

Lorsque la phase des parents n'est pas connue (on ne connaît pas le génotype des grands parents), on ne peut pas identifier l'allèle marqueur transmis avec la maladie. Dans ce cas la vraisemblance sera calculée selon la formule suivante :

$$L=[1/2\ (1-\theta)^{nr}.\ \theta^{r}] + [1/2\ (1-\theta)^{r}.\ \theta^{nr}]$$

La vraisemblance de l'hypothèse de non liaison est toujours :

$$L=0.5^{\ r+nr}$$

Le test du lod score pour cette valeur de $\theta$ est alors défini comme le log décimal du rapport de la vraisemblance de l'hypothèse de liaison et de non liaison :

$$Z(x)=\log_{10}[L\ (\theta=x)\ /\ L\ (\theta=0.5)]$$

La valeur de $\theta$ relative au Z maximal ($Z_{max}$) correspond à l'estimation du maximum de vraisemblance du taux de recombinaison.

Une valeur seuil du lod score de 3 est généralement suffisante pour déclarer la liaison pour une analyse deux-points. Alors qu'une valeur de -2 suffit pour l'exclure.

Le plus souvent il n'est pas possible d'effectuer les calculs de façon analytique, mais du moment oú l'on spécifie un modèle génétique (mode de transmission), différents programmes informatiques peuvent être utilisés pour estimer ces recombinaisons et calculer des lod scores sur des pedigrees pouvant avoir des données phénotypiques et génotypiques manquantes et éventuellement avec des boucles de consanguinité.

# Deuxième partie : Expérimentation

## Chapitre I : Matériels et Méthodes

## 1.1.Matériels

Dans cette étude, six familles algériennes atteintes d'un retard mental non spécifique ont été recensées, où il existe au moins deux malades par famille, pour confirmer le caractère héréditaire de la maladie. L'étude mendélienne des généalogies a montré un mode de transmission autosomique récessif.

Les familles étudiées ont été recrutées à l'hôpital Frantz Fanon de Blida : 4 d'entre elles au niveau du service de Psychiatrie (B) et les 2 autres, à partir du service de Pédopsychiatrie. Le choix de ces familles a été basé sur les critères suivants:

- Au moins 2 individus dans une fratrie sont atteints de RM pour que le facteur génétique soit bien mis en évidence.
- Les malades doivent avoir des parents vivants et accessibles et un maximum de frères et sœurs, malades ou non (pour avoir un maximum d'haplotypes).
- Il doit exister une consanguinité (c'est-à-dire qu'on peut remonter à un ancêtre commun) chez les parents, car il s'agit d'une affection récessive.
- on doit retrouver autant de filles que de garçons malades puisque le RM étudié est autosomique récessif.

### 1.1.1. Fiches cliniques et explorations :

En Annexe, est présenté un exemple de fiche clinique. En effet, un dossier détaillé a été dressé pour chaque malade. Celui-ci commence par un questionnaire sur les antécédents familiaux et personnels, comme le développement de la grossesse, l'accouchement, les courbes de croissance, en vérifiant le carnet de vaccin, ainsi que les maladies générales sévères.

Ensuite on a pris en compte le développement psychomoteur, c'est-à-dire l'âge des premières acquisitions et le mode évolutif probable du retard psychomoteur.

L'examen clinique a été surtout basé sur les signes neurologiques, l'épilepsie, les troubles psychiatriques et du comportement, ainsi que les signes physiques en prenant des photographies sur plusieurs pauses, pour démontrer qu'il n'existe aucune

dysmorphie, et donc aucune tare physique associée, le RM est isolé, non syndromique.

En ce qui concerne l'exploration biologique, il a été procédé au bilan sanguin usuel (NFS, glycémie…), tandis que le caryotype standard en bandes R, et la recherche de l'X-fragile ont été effectués au service de génétique humaine du Pr. H. Chaabouni à Tunis.

Enfin, un scanner a été réalisé pour un représentant malade de chaque famille.

Il est à préciser qu'aucune anomalie n'a été décelée pour toutes les explorations précédentes.

L'évaluation du RM, c'est-à-dire l'estimateur du Quotient Intellectuel a été réalisée au niveau du service de Psychiatrie du Pr. Ridouh.

Les arbres généalogiques ont été dressés grâce aux questions précises posées aux chefs de familles, mais nous nous sommes basés surtout sur « le livret de famille » pour éviter le moindre oubli.

## 1.2. Méthodes

**1.2.1. Introduction :** Notre but sera de faire un génotypage par microsatellites, c'est-à-dire la détermination des allèles pour chacun des marqueurs chez les différents individus.

L'analyse s'effectue en utilisant les séquences flanquantes d'un microsatellite donné (communes aux différents individus à étudier) pour amplifier celui-ci chez les différents individus. La taille des différents produits amplifiés (correspondant aux différents allèles du microsatellite) est alors évaluée par électrophorèse.

### 1.2.2. Matériel biologique : obtention de l'ADN

La méthode d'extraction de l'ADN à la protéinase K est utilisée au laboratoire de génétique humaine de l'hôpital Charles Nicolle de Tunis.

**La méthode pour l'extraction de l'ADN :**

Pour le génome humain, les leucocytes constituent une source simple de DNA pour les études de Biologie Moléculaire.

Un prélèvement de 5 à 10ml de sang recueilli sur un anticoagulant comme l'EDTA, permet d'obtenir quelques centaines de microgrammes d'ADN sous la forme de fragments de taille supérieure à 20kb.

**La lyse des cellules :**

La lyse des cellules sanguines met en jeu l'intervention de détergents ioniques qui désorganisent la double couche des phospholipides des membranes

Le sang recueilli sur EDTA est vigoureusement mélangé à une solution hypotonique pour faire éclater les hématies dépourvues de noyaux. Les leucocytes sont alors récupérés par centrifugation, suivie d'un lavage avec la même solution hypotonique.

Ils sont ensuite traités par un mélange de détergent, comme le SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) qui permet de désagréger les membranes cellulaires et de libérer les contenus cytoplasmiques et nucléaires.

Un traitement à la protéinase K (une protéase) permet de libérer l'ADN nucléaire en digérant les histones qui lui sont associées dans les chromosomes eucaryotes.

**1.2.2.1. Extraction de l'ADN**

L'ADN est extrait à partir du sang total. 10 à 30ml de sang sont prélevés en présence d'un anticoagulant (EDTA) et l'ADN est récupéré à partir des leucocytes par un protocole d'extraction.

- **Récupération des leucocytes**

Le sang prélevé est centrifugé à 2500 tours/min pendant 10 min à 4° C, la phase intermédiaire (buffy coat) correspondant aux globules blancs est récupérée.

- **Lyse des globules rouges**

Les globules rouges anucléés sont lysés dans une solution de lyse SLR 1X (solution hypotonique permettant l'éclatement de la membrane cellulaire) dont la constitution est suivante :

- Tris-HCl 10mM pH 7,5
- $MgCl_2$ 5mM
- NaCl 10mM

- **Traitement au tampon de lyse**

Après un temps de repos de 10 à 20 min on centrifuge à 3500 tours/min pendant 10 min à 4°C le culot leucocytaire est récupéré. On ajoute 15ml de tampon de lyse 1X de composition :

Pour 100 ml de tampon de lyse 10 X :

- 20 ml Tris HCI pH 7,5
- 10 ml EDTA 0,5 M
- Eau milliQ qsp 100 ml

Puis on procède à une centrifugation à 4° C pendant 10 min et à raison de 3500 tours/min. Le surnageant est rejeté et le culot récupéré. Ce dernier est remis en suspension dans 10 ml de tampon de lyse 1X. Cette opération est répétée jusqu'à ce que le culot soit propre.

- **Traitement à la protéinase K**

Au culot leucocytaire obtenu, on ajoute :

- 5 ml de tampon de lyse
- 250 ml SDS 10 %
- 100 $\mu$l de protéinase K (10 $\mu$g/$\mu$l)

Le SDS qui est un détergent va lyser la membrane cellulaire des leucocytes en agissant sur les lipides membranaires. La protéinase K (une serine protéinase non spécifique) permet, après un temps d'incubation d'une nuit à 37°C, de détruire les protéines liées à l'ADN.

- **Précipitation de l'ADN**

On ajoute deux volumes d'éthanol glacial à 80 %, une agitation douce fait apparaître la méduse d'ADN qui sera récupérée dans un tube Ependroff.

On centrifuge pendant 2 min et on lave avec l'éthanol absolu.

- **Resuspension de l'ADN**

Après avoir laissé sécher 1 à 2 nuits, on ajoute 250 $\mu$l $T_{10}E_1$. On conserve à 4°C.

### 1.2.2.2. Contrôle de qualité et quantité de l'ADN

- **La quantité :**

On a utilise la méthode du dosage spectrophotométrique de l'ADN qui consiste à mesurer la densité optique (DO) des acides nucléiques puriques et pyrimidiques qui absorbent à 260 nm et d'en déduire la concentration.

1 unité de DO correspond à 50 $\mu$g/ml

L'ADN est dilué 300 fois (facteur de dilution F) avant de prendre les mesures. La concentration sera donc calculée par la formule suivante :

$$C\ \mu g/ml = (DO_{échantillon}-DO_{eau})\times 50\times F$$

La concentration des échantillons d'ADN à amplifier a été réglée à 100 ng/$\mu$l.

- **La qualité**

Une deuxième lecture à 280 nm est nécessaire pour mettre en évidence une éventuelle contamination protéique ou par les sels. Un ADN pur bicaténaire possède un rapport de densité R compris entre 1.8 et 2 : avec :

R=DO 260/ DO 280

Une valeur de R inférieure à 1.8 détecte une contamination protéique.

Alors qu'une valeur supérieure à 2 signifie une contamination par les sels, dans ce cas un lavage par l'éthanol est nécessaire.

### 1.2.2.3. Marqueurs génétiques utilisés :

Dans le cas de notre travail, nous allons réaliser une étude de liaison avec des marqueurs de type microsatellites.

Ils sont analysés par PCR, puis électrophorèse en gel de plolycrylamide dénaturant qui permet de distinguer les allèles en fonction de leur taille.

Le microsatellite est entouré par des séquences uniques de bases dans lesquelles ou définit des portions d'une vingtaine de nucléotides appelées amorces ou primers. Ce sont elles, qui permettent de cibler les microsatellites (réaction PCR).

La réalisation d'un génotypage consistera à amplifier une série, ou un panel de microsatellites d'intérêt, puis à analyser la taille, ou longueur (en paires de bases : pb) de chaque microsatellite amplifié, cette taille déterminée à la base prés, reflète

directement le nombre de répétitions du motif de base du microsatellite. Chaque taille correspond à un allèle bien précis du microsatellite. (figure 17)

#### 1.2.2.3.1. Localisation chromosomique des différents marqueurs utilisés au cours de notre travail

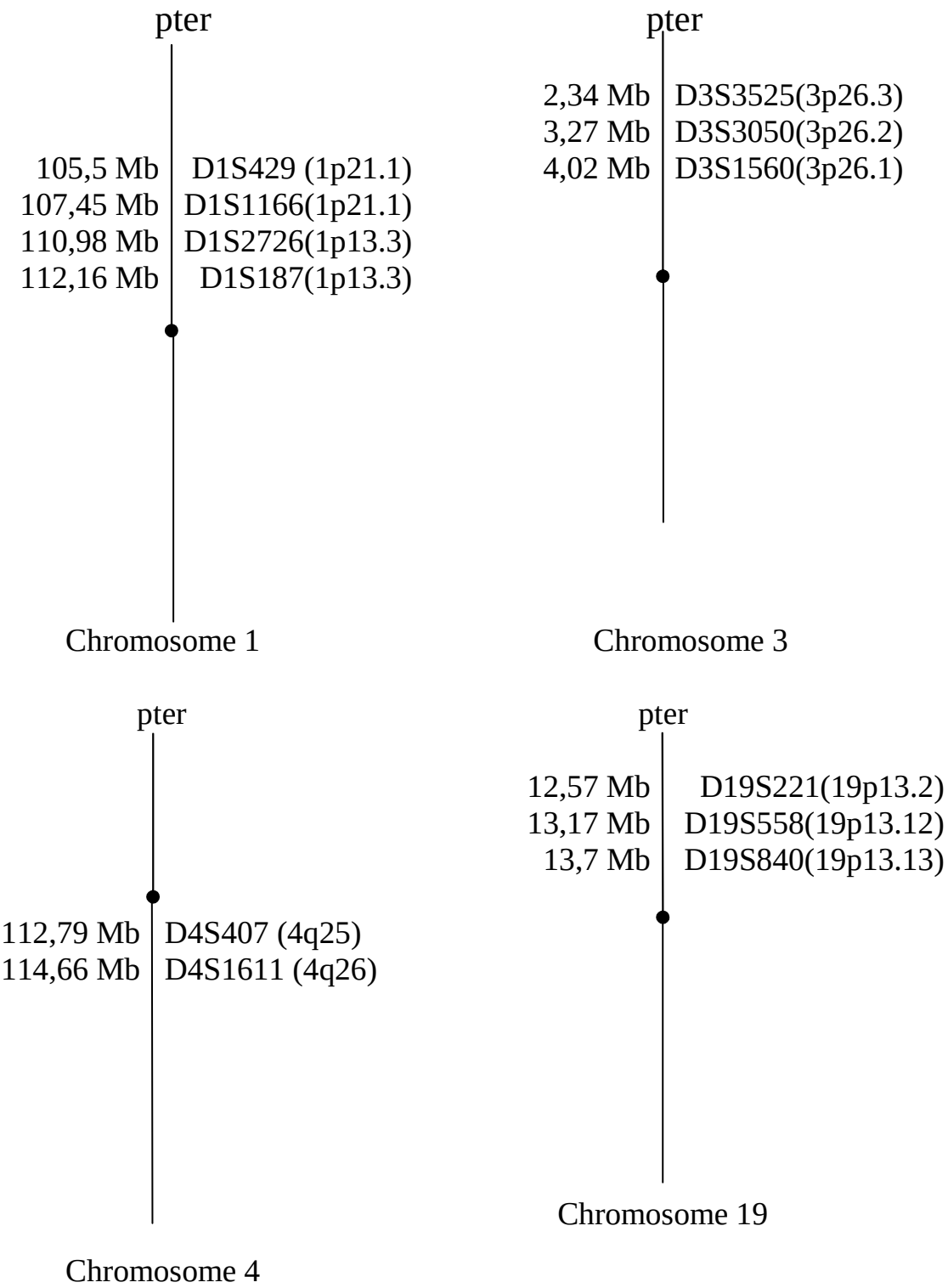



**Figure 17 :** Disposition des marqueurs sur les chromosomes 1, 3, 4 et 19. La distance, à partir de pter est indiquée en mégabases (Mb).

#### 1.2.2.4. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

L'amplification de ces loci marqueurs est réalisée par la technique de PCR. Cette technique décrite en 1985 par Karry MULLIS permet d'amplifier des séquences d'ADN de manière spécifique et d'augmenter considérablement la quantité d'ADN dont on dispose initialement.

##### 1.2.2.4.1. Principe de la technique

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est une procédure rapide pour une amplification très importante d'une région bien précise de l'ADN : c'est en fait une cyclisation in vitro d'une réplication successive d'ADN, effectuée à l'aide d'une ADN polymérase thermorésistante extraite de la bactérie Thermus aquaticus (Taq polymérase) qui, comme toutes les ADN polymérase, ne peut synthétiser le brin complémentaire d'une séquence d'ADN qu'à partir d'une amorce oligonucléotidique (Figure18).

##### 1.2.2.4.2. Les différentes étapes de la PCR

**La réaction**

Une réaction de PCR correspond à la succession d'une trentaine de cycles comportant chacun 3 étapes :

- Dénaturation pendant quelques secondes à 94°. Les brins d'ADN se séparent. On dit alors que l'ADN est dénaturé.
- Hybridation : la température est rapidement abaissée à la température optimale d'hybridation des amorces. Les amorces « reconnaissent » leurs séquences complémentaires sur les brins d'ADN cible. Elles s'hybrident chacune à son brin respectif. Cette étape dure de 30 secondes à 1 minute l'ADN total étant plus long, n'aura pas le temps de se réhybrider.
- Elongation : La température est ensuite augmentée à 72° C, ce qui permet à la Taq polymérase d'ajouter des nucléotides aux amorces hybridées, dans le sens 5'vers 3'. Les nucléotides sont incorporés en fonction de la séquence cible (nucléotide complémentaire).

- Un nouveau brin d'ADN, dont la séquence est complémentaire de celle du brin cible, vient d'être synthétisé.

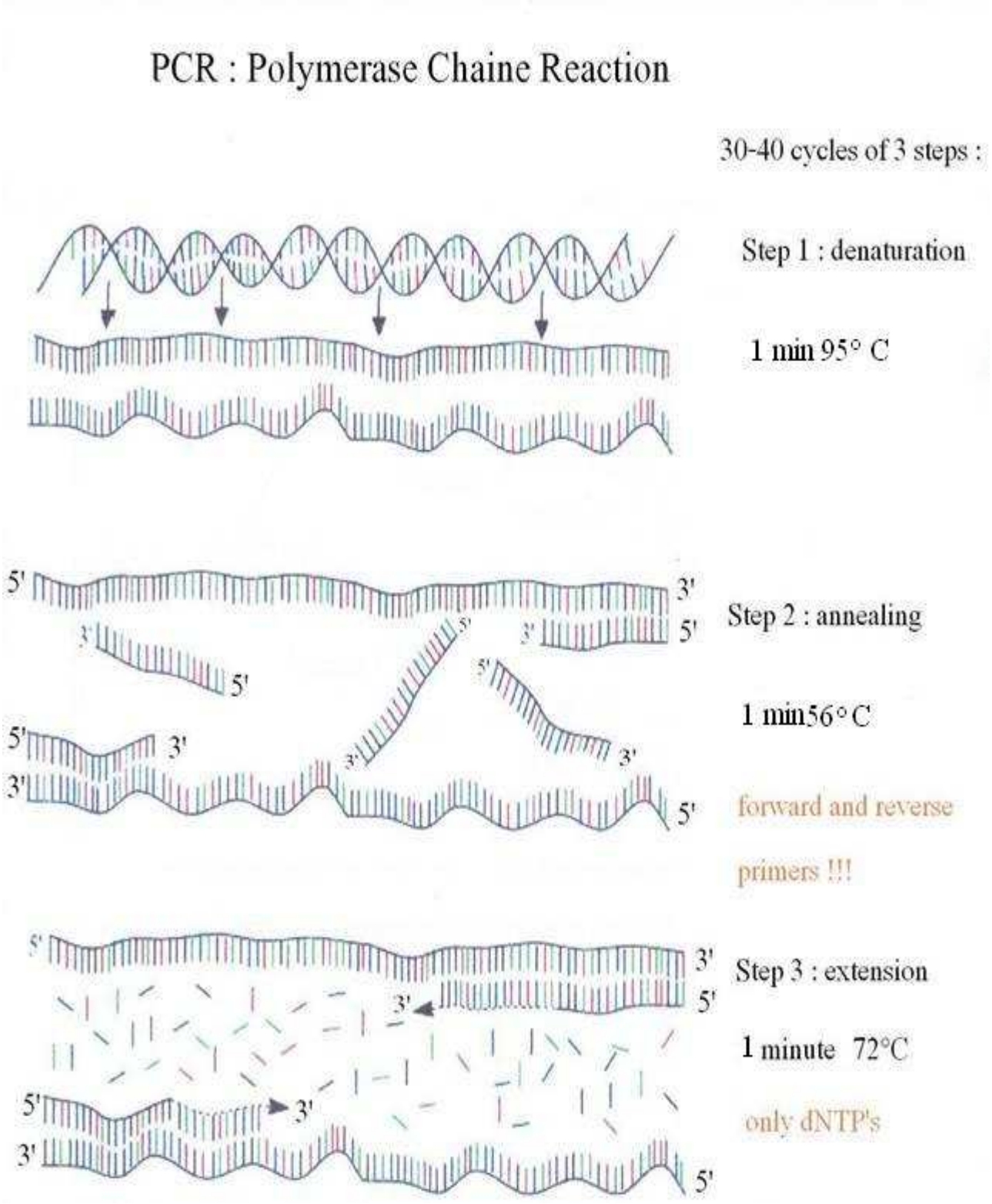



**Figure 18 :** Les différentes étapes de la PCR

### 1.2.2.4.3. Les thermocycleurs

La cyclisation de la polymérisation a été grandement facilitée par la commercialisation de machines à PCR : les thermocycleurs. Ce ne sont en fait que des blocs chauffants-refroidissants programmables. Les montées et les descentes en températures ainsi que les durées de chacune des étapes sont pilotées par un microprocesseur.

Chaque amplification nécessite une programmation spécifique du thermocycleur, et de ce programme, dépendent plusieurs points importants : une bonne dénaturation des structures double-brns, une polymérisation suffisament efficace et surtout une réassociation correcte entre les amorces et les régions de la séquence cible qui leur sont bien homologues.

### 1.2.2.4.4. Description d'un programme classique de PCR :

**1°/3 Minutes de** dénaturation à 95° C, c'est une étape qui sert à bien dénaturer l'ADN dés le départ.

**2°/30 cycles de réplication** :

1 minute de dénaturation à 95°C

1 minute d'hybridation à 56°C

1 minute d'extension à 72°C

**3°/5 minutes d'extension finale à 72°C.**

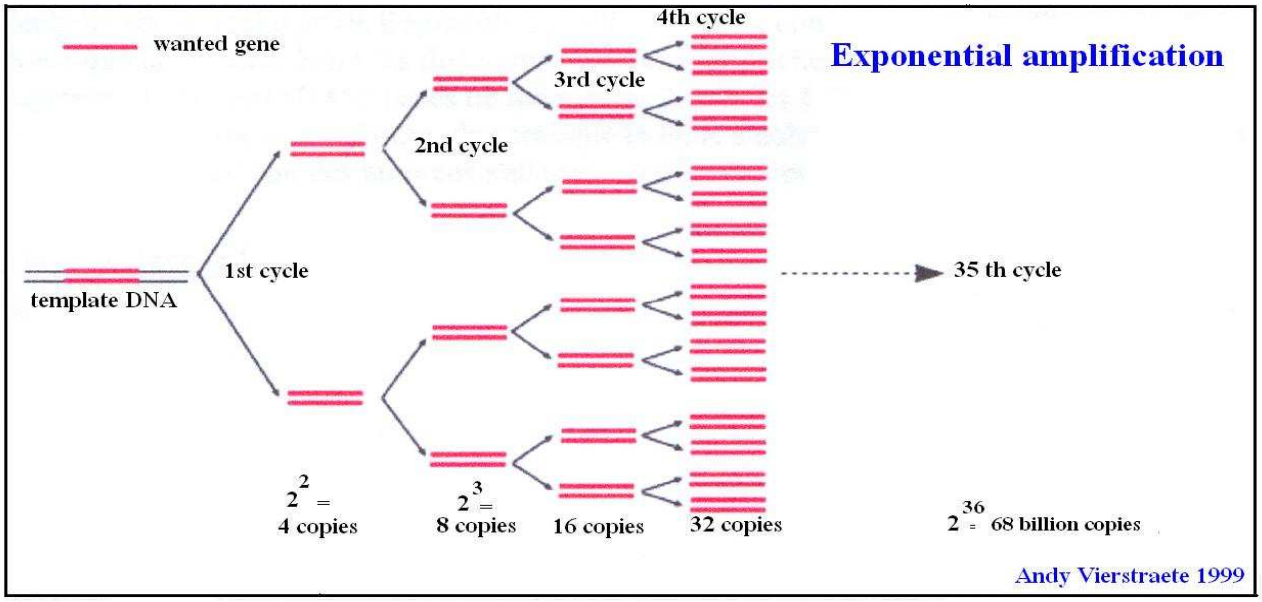



**Figure 19 :** Amplification exponentielle de l'ADN par PCR

### 1.2.2.5. Amplification des marqueurs polymorphes

L'amplification des marqueurs polymorphes choisis pour cette étude est réalisée par la technique de PCR. Cette dernière permet d'amplifier des séquences d'ADN de manière spécifique et d'augmenter considérablement la quantité d'ADN dont on dispose initialement.

#### 1.2.2.5.1. Les réactifs utilisés

- La molécule d'ADN

  Généralement sous forme de double brin, elle contient le fragment à amplifier. La concentration de l'ADN dans le milieu réactionnel est de 400 ng/$\mu$l.

- Deux amorces (sens et anti-sens)

  Ce sont de petits brins d'ADN d'environ 20 bases, (oligonucléotides) capables de s'hybrider de façon spécifique, grâce à la complémentarité des bases, sur le brin d'ADN correspondant. Les amorces sont choisies de façon à encadrer la séquence d'ADN à amplifier. Ils sont livrés sous forme de solution. La concentration a été ajustée à 150 ng/$\mu$l.

- L'enzyme

  La Taq Polymérase est une ADN polymérase thermorésistante extraite de la bactérie Thermus aquaticus. Sa température optimale d'action est de 72°C et elle est capable de résister à des passages successifs à 95°C, ce qui a rendu possible l'automatisation de la procédure. Elle présente une activité exonucléasique 5' à 3', c'est-à-dire de la fonction d'édition. 2,5 Unités sont nécessaires par réaction de PCR de volume final de 50 $\mu$l.

- Le tampon de la taq polymérase (10X)

  Il est indispensable à l'activité de l'enzyme et est livré avec elle. La concentration nécessaire pour la réaction est de 1X.

- Les nucléotides (Eurobio)

  dGTP,dATP,dTTP,dCTP, appelés globalement dNTPs (DésoxyNucléotides-Tri-Phosphates), qui sont les éléments de base utilisés par la Taq Polymérase pour

synthétiser les brins d'ADN complémentaires. La concentration initiale des dNTPs est de 100 Mm.

- Le chlorure de magnésium $MgCl_2$

La concentration du $MgCl_2$ doit être déterminée à chaque fois qu'un nouveau fragment est à amplifier. On réalise en général, pour optimiser la réaction de PCR, une gamme de $MgCl_2$ dont la concentration finale varie de 0.5 à 2 mM.

#### 1.2.2.6. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

Ou possibilité de séparation de molécules d'ADN qui ne diffèrent que par un seul nucléotide :

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide est utilisée pour la séparation des produits de PCR dirigé au niveau des microsatellites de l'ADN, pour lesquels les produits synthétisés à partir de différents loci allèliques pourraient ne différer que par deux ou trois paires de bases seulement.

Un gel de polyacrylamide est constitué de chaînons d'acrylamide constitués de monomères ($CH_2$=CH-CO-NH-$CH_2$) qui sont reliés entre eux par des chaines de n,n'-methylène biscrylamide ($CH_2$=CH-CO-NH-$CH_2$-NH-CO-CH-$CH_2$) communément appelé bis ou comonomère.

La polymérisation de la solution d'acrylamide et de bis est initialisée par adjonction de persulfate d'ammonium et catalysée par le TEMED (N,N,N',N'-tretraméthyl-éthylène-diamine),de l'urée, un agent dénaturant qui prévient les réappariements intra-chaine.

La concentration en monomère et en comonomère, ainsi que le degré de polymérisation (longueur de la chaîne), et de réticulation (quantité de N,N'-méthylène-bisacrylamide incorporé) déterminent la densité , la viscosité, l'élasticité et la résistance mécanique du gel.

Le gel de polyacrylamide est déposé entre deux plaques de verre séparées par des réglettes définissant l'épaisseur du gel (spacers). Ce type de préparation des gels a deux avantages. Tout d'abord cela permet de faire des plaques de polyacrylamide très fines(<1 mm),ce qui améliore d'autant la qualité de la lecture des séquences ADN en donnant des bandes très bien séparées. Ensuite, cela permet d'améliorer la qualité de

la polymérisation sur l'ensemble du gel, puisque la réaction est inhibée par l'oxygène.

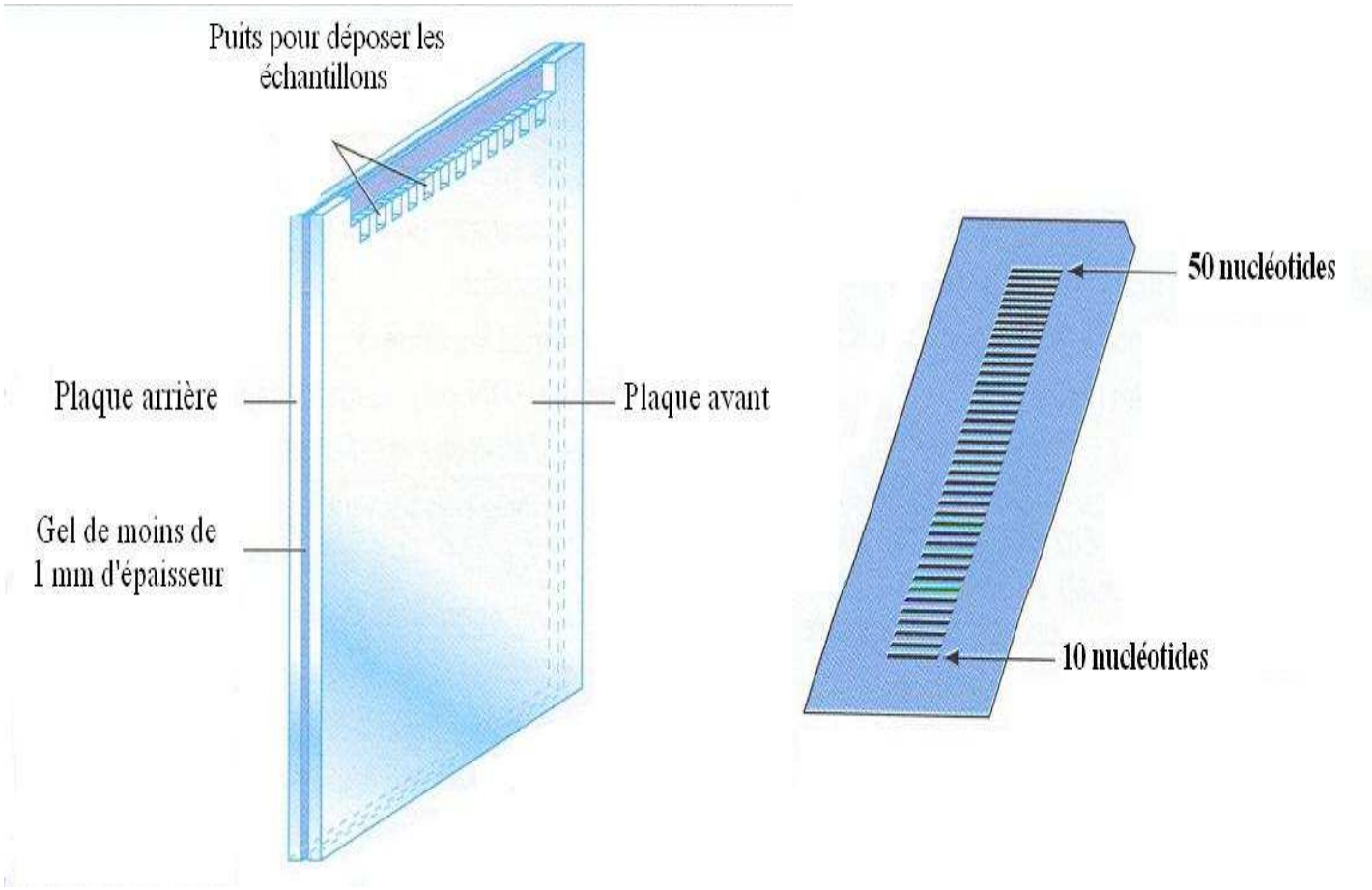



**Figure 20 :** L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide permet de séparer des molécules d'ADN dont la longueur ne diffère que d'un nucléotide.

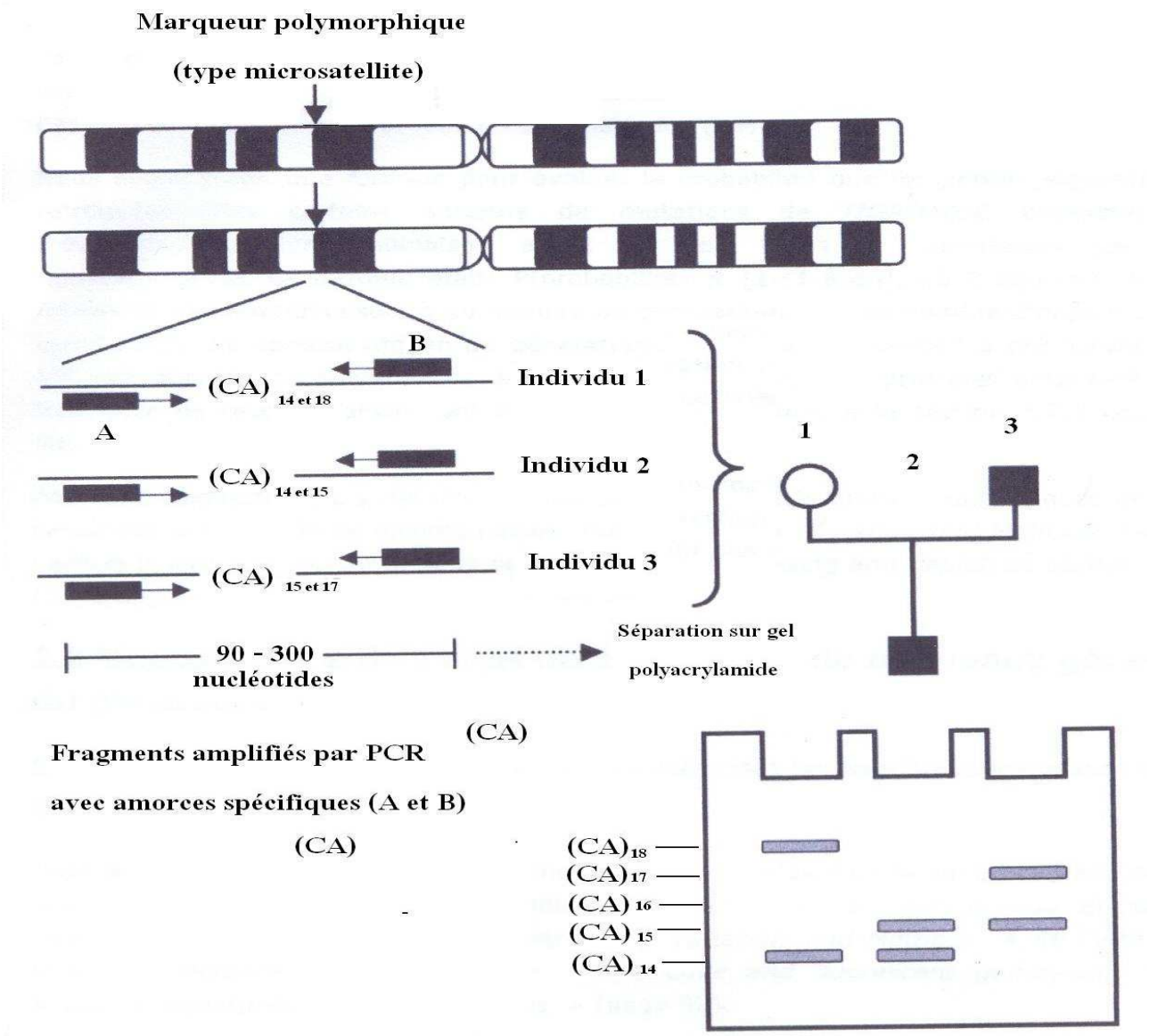



**Figure 21 :** Principes du génotypage par amplification PCR de microsatellites

**En résumé :**

L'utilisation d'amorces spécifiques à une région du génome contenant une séquence microsatellite polymorphique permet l'amplification par PCR d'un fragment variant entre 90 et 300 nucléotides. Lorsque le marqueur utilisé est informatif, les fragments d'ADN des individus génotypés peuvent être discriminés selon leur longueur grâce à une migration des échantillons sur gel polyacrylamide. Ainsi, la transmission des allèles parentaux à l'intérieur d'un pedigree peut être nettement établie (figure 21).

### 1.2.2.7. Génotypage à la radioactivité

Les 3 marqueurs polymorphes ayant donné un résultat dans ce type de génotypage sont principalement localisés dans la région 3p25-pter (prés du gène CRBN en 3p26.2), tandis que le quatrième est localisé en 19p13.13 (prés du gène CC2D1A en 19p13.12).

La séquence des oligonucléotides correspondant à ces marqueurs, ainsi que leur Tm sont résumés dans le tableau suivant :

**TableauIII :** Amorces de microsatellites sur le chromosome 3 et le chromosome 19

| Locus | Amorce sens | Amorce anti-sens | Tm°C |
|---|---|---|---|
| D3S1560 | GCATCTACAGGGGGGTGTCT | AGGCTGATTTTCAGCACA | 56 |
| D3S3050 | TGGTGGTATGCATTTGTCAG | ATTCCCTGACTTCAAGTGCA | 56 |
| D3S3525 | GATTTTGGGACTTGTCAGC | GTGTAATCTCCTGTAGCAGAGTTC | 56 |
| D19S558 | GATTTTCTATTGCATTCAGCT | GACCCTGTCTCAAACAAAC | 54 |

#### 1.2.2.7.1. Conditions de PCR pour les marqueurs utilisés

* Pour les marqueurs D3S1560,D3S3050 et D3S3525

**TableauIV :** programme et conditions de PCR pour les microsatellites du chromosome 3.

| Produits | Concentration | Volumes en $\mu$l | Programme |
|---|---|---|---|
| ADN | 100 ng/$\mu$l | 4 | 96° pendant 5 min |
| dNTP (eurobio) | 2 mM | 4 | 94°C pendant 30 sec<br>56°C pendant 30 sec<br>72°C pendant 30 sec<br>35 Cycles |
| $MgCL_2$ | 50 mM | 1 | |
| Tampon | 10 x | 5 | |
| Amorces | 150 ng/$\mu$l | 0.8+0.8 | 72°C pendant 5 min |
| Taq (eurobio) | 5u/$\mu$l | 0.3 | |
| $H_2O$ | | qsp 50 $\mu$l | |

* Pour le marqueur D19S558 :

**TableauV :** programme et conditions de PCR pour les microsatellites du chromosome 19.

| Produits | Concentration | Volumes en $\mu$l | Programme |
|---|---|---|---|
| ADN | 100 ng/$\mu$l | 4 | 96° pendant 3 min |
| dNTP (eurobio) | 2 mM | 4 | 94°C pendant 30 sec<br>54°C pendant 30 sec<br>72°C pendant 30 sec<br>35 Cycles |
| $MgCL_2$ | 50 mM | 1.5 | |
| Tampon | 10 x | 5 | |
| Amorces | 150 ng/$\mu$l | 1+1 | 72°C pendant 5 min |
| Taq (eurobio) | 5u/$\mu$l | 0.3 | |
| $H_2O$ | | qsp 50 $\mu$l | |

### 1.2.2.7.2. Vérification des produits d'amplification

Dans chaque série d'échantillons amplifiés doit être intégré un témoin négatif qui atteste l'absence de contamination. Sur les 100 $\mu$l de réaction, 1/10 soit 10 $\mu$l sont utilisés pour la vérification de l'amplification. Nous utilisons un gel d'agarose à 0.8% imprégné de bromure d'éthidium (BET) (0.5 $\mu$M/ml final) qui sont déposés dans les puits du gel avec un mélange de bleu de bromophénol (0.25%), bleu de xylène cyanol (0.25%) et glycérol (30%) qui sert d'une part à alourdir l'échantillon déposé donc à le faire tomber au fond du puits et d'autre part à repérer le front de migration.

Après migration par électrophorèse à 80 Volt en présence d'un tampon, le BET permet de visualiser l'ADN en le rendant fluorescent sous ultraviolets. On utilise un marqueur de poids moléculaire pour déterminer approximativement la longueur des fragments utilisés.

La présence d'une bande unique et de taille correspondant au fragment attendu atteste d'une bonne amplification ; par contre, la présence de bandes supplémentaires témoigne d'amplifications non spécifiques nécessitant soit de diminuer la quantité de

$MgCl_2$, soit d'augmenter la température d'amplification voire de changer les oligonucléotides.

**Exemple:**

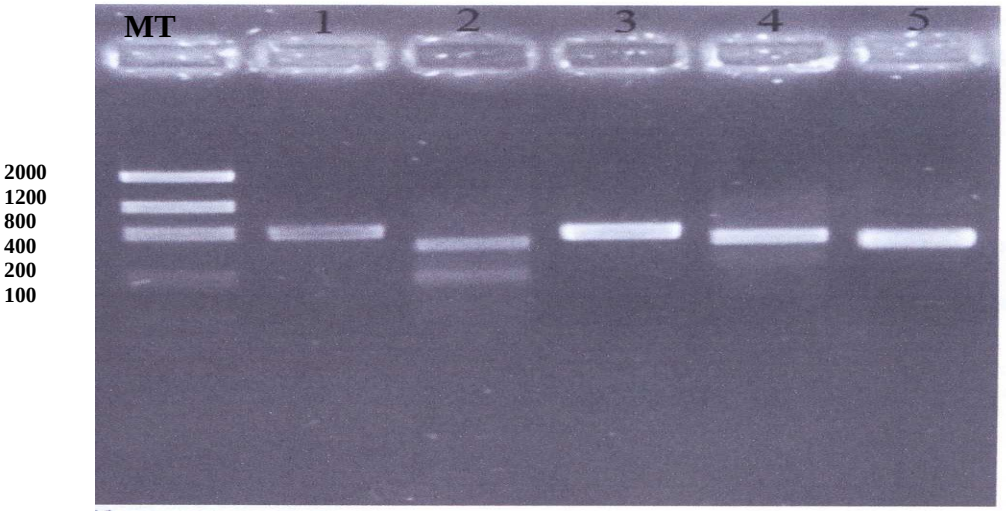



**Figure 22 :** Vérification des produits d'amplification

En haut les puits creusés dans le gel où on dépose l'échantillon de la PCR. Cinq couples d'amorces différents sont utilisés ici pour amplifier 5 segments d'ADN différents. Sur l'échelle de taille dans la première piste la bande la plus haute est à 2000 paires de bases ou bp (base pair), les suivantes à 1200,800,400,200 et 100. Les bandes du bas sont peu visibles. Ainsi le produit PCR dans la piste 1 et de la piste 3 fait environ 800bp. Celui des pistes 4 et 5 environ 700 et 600 respectivement.

Dans la piste 2 on observe deux bandes alors que le fragment attendu était de 700bp. La bande du haut est donc à la taille attendue. La deuxième est une bande « parasite »,signe que nos amorces se sont hybridées ailleurs sur l'ADN, que leur site de liaison n'était pas « unique ».Une bonne PCR n'aura que la bande attendue à la hauteur attendue.

### 1.2.2.7.3. Migration sur gel de polyacrylamide

Le produit de PCR est dénaturé par chauffage à 90°C, on procède à une migration sur gel d'acrylamide dénaturant à 5% :

- Acrymalide de 40% (19 :1) 12.5 ml
- Urée 42 g
- TBE 10x pH8.8 5 ml
- $H_2O$ QSP 100 ml

Le temps de migration dépend de la taille du produit amplifié :

**1.2.2.7.4. Le transfert sur membrane :**

Les fragments d'ADN sont transférés par capillarité sur membrane de nylon N+ (Hybond-N+).

**1.2.2.7.5. Marquage de la sonde :**

L'une des amorces ayant servi à l'amplification est utilisée comme sonde. Le marquage se fait au phosphore 32 ($\alpha$P32/dCT*P) par une terminale transférase.

Dans un volume final de 55 $\mu$l, on mélange :

- 30 $\mu$l $H_2O$
- 11 $\mu$l de tampon de l'enzyme
- 5 $\mu$l de cobalt ($CoCl_2$)
- 3 $\mu$l de la sonde à marquer
- 3.5 $\mu$l de terminal transférase (TT)
- 2.5 $\mu$l $\alpha^{..}$P32/Dct*P

On incube pendant 1h30 min au bain marie.

**1.2.2.7.6. Hybridation de la membrane :**

Avant hybridation, une étape de préhybridation est nécessaire pour saturer les sites de fixation non spécifiques de l'ADN. Pour cela, la membrance est incubée dans un tampon de préhybridation avec l'ADN de saumon dénaturé pendant 1h30 min à 42°C.

La composition du tampon de préhybridation est la suivante :

- SDS 1 %
- NaCl 1 M
- Tris HC1 pH 7.5 50 Mm
- Denhart 5 X

Le Denhart est composé de :

- Ficoll 2 %
- PVP 2 %
- BSA 2 %

La membrane est ensuite hybridée par la sonde marquée en présence d'un tampon d'hybridation à 42°C pendant une nuit.

Le tampon d'hybridation a la même composition que le tampon de préhybridation auquel on ajoute du suflate de dextran à raison de 1mg/100ml.

#### 1.2.2.7.7. Révélation :

Après lavage dans une solution composée de SSC 2X et de SDS 0.5X, la membrane est exposée contre un film d'autoradiographie dans une cassette. Le temps d'exposition dure une nuit à 80°C.

Le film est ensuite développé dans un bain fixateur successif à un bain révélateur.

### 1.2.3. Génotypage par séquençage automatique :

Le principe de fonctionnement du séquenceur est le suivant : la solution contenant les fragments amplifiés et marqués avec un fluorochrome montent dans le capillaire, sur sur une matrice plus fluide que le gel d'agarose : le pop.

Les fragments migrent en fonction de leur taille, les plus petits avant les plus grands.

Le fluorochrome contenu sur les séquences est détecté par un laser. L'intensité du signal obtenu est proportionnelle à la quantité d'ADN marqué.

En installant le pop, il faut faire attention à ne pas mettre de bulle d'air dans le capillaire qui peut servir à environ 1000 analyses.

Dans ce type de génotypage, on a choisi 10 marqueurs fluorescents répartis comme suit : 2 sur le locus 3p25-pter, 2 sur le locus 4q24-q25, 2 sur le locus 19p13.12 et 4 sur le locus 1p21.1-p13.3

La séquence des oligonucléotides correspondant à ces marqueurs ainsi que leurs Tm sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau VI :**Amorces des microsatellites utilisés pour le génotypage par séquençage automatique.

| Locus | Amorce sens | Amorce anti-sens | Tm |
|---|---|---|---|
| D3S3525 | GATTTGGGACTTGTCAGC | GTGTAATCTCCTGTAGCAGAGTTC | 55 |
| D3S3050 | TGGTGGTATGCATTTGTCAG | ATTCCCTGATTCAAGTGCA | 53 |
| D4S407 | AATAATATCCTTTGATCCTTTCGCTA | AAATTTGGTTATTTTTAAGCAAACTATAT | 55 |
| D4S1611 | AGAGTAGTTTCCATCTTTGTTTTC | GGGCAAGGCTCATCAC | 55 |
| D19S840 | ATAGGCCAAGACTGTCTAAAACAA | GCCCTAACTGCTGTAAGAGAACT | 55 |
| D19S221 | GCAAGACTCTTGACTCAACAAAA | CATAGAGATCAATGGCATGAAA | 55 |
| D1S429 | GGTCAAACAGAGAGCAATTG | CAAACCTGCAGTATCTCTAAGG | 55 |
| D1S1166 | CTTGGCCTACATTTATACTCT | AAGGTCAAATCCCTGTAACAA | 53 |
| D1S2726 | CCACAAGTTGCAGGGTT | CTGGATGGATGCTCAAATAC | 53 |
| D1S187 | AGGTGTGAGCTGTTCCCATA | GCAAGACAGCTGCCTCATA | 51 |

* Les conditions de PCR :

**TableauVII :** programme et conditions de PCR pour les microsatellites utilisés par le séquenceur automatique.

| Produits | Concentration | Volumes en $\mu$l | Programme |
|---|---|---|---|
| ADN | 100 ng/$\mu$l | 2 | 95° pendant 12 min |
| dNTP (eurobio) | 2 mM | 8 | 94°C pendant 15 sec<br>T °C pendant 15 sec<br>72°C pendant 30 sec<br>X10 Cycles |
| $MgCl_2$ | 50 mM | 2.5 | |
| Tampon | 10 x | 5 | |
| Amorces | 150 ng/$\mu$l | 1+1 | 89°C pendant 15 sec<br>T °C pendant 15 sec<br>72°C pendant 30 sec<br>X20 Cycles |
| Taq (eurobio) | 5u/$\mu$l | 0.3 | |
| $H_2O$ | | qsp 50$\mu$l | 72°C pendant 10 min |

La température T change d'un marqueur à un autre :

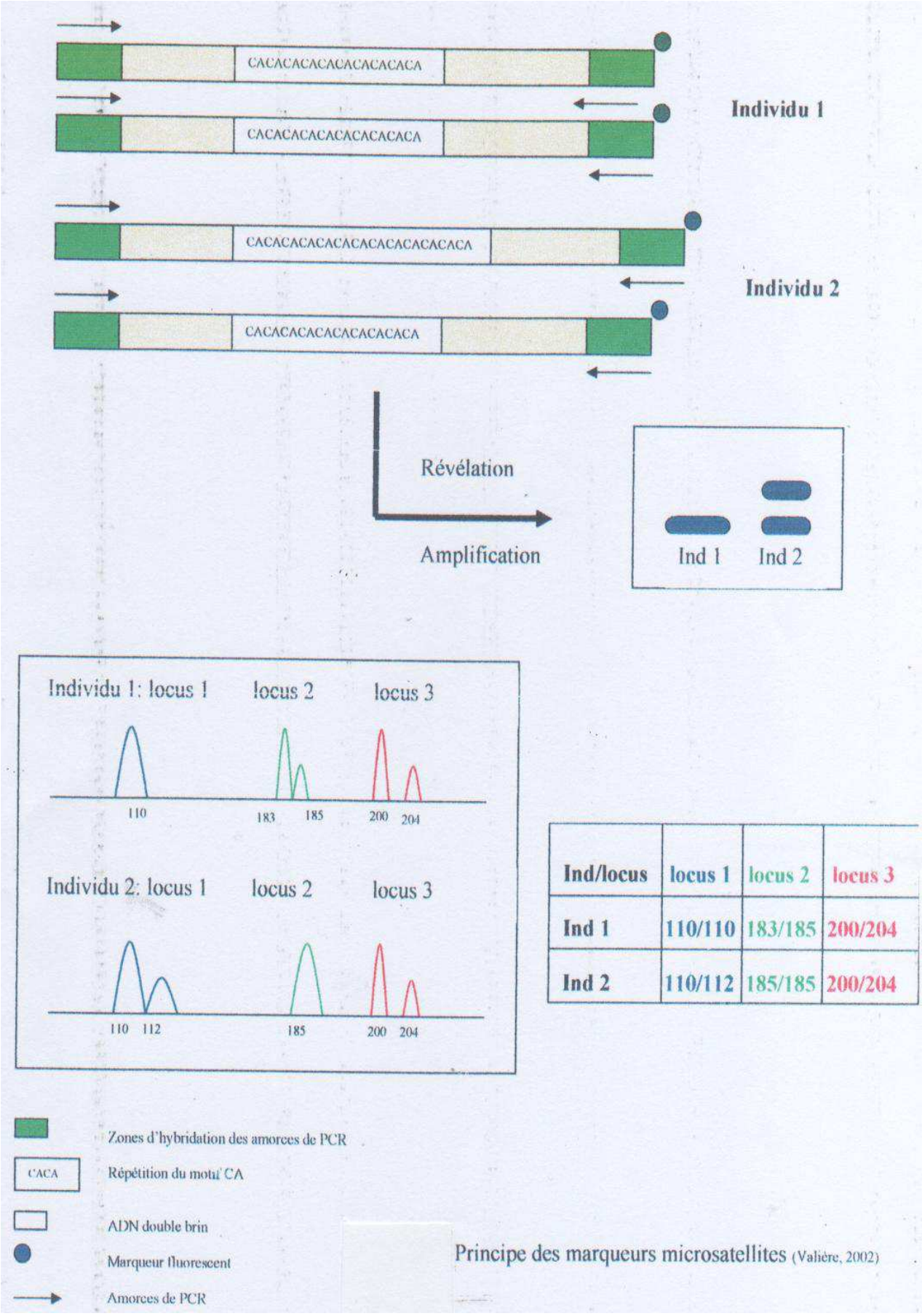
**TableauVIII :** Températures de fusion (Tm) des différents microsatellites

| Marqueurs | T°C |
|---|---|
| D4S2788 | 53 |
| D1S1166 | |
| D1S2726 | |
| D3S3525 | 55 |
| D4S407 | |
| D4S1611 | |
| D19S840 | |
| D19S821 | |
| D1S429 | |
| D1S187 | 51 |

- **Génotypage** : Préparation d'une plaque de 96 puits allant au séquenceur :

  Introduire dans chaque puits un mélange de 1 $\mu$l de chaque produit de PCR avec 13.5 $\mu$l de formamide et 0.5 $\mu$l de marqueur de taille Lyz standard.

  Ensuite, dénaturation de la plaque au thermocycleur à 95°C pendant 3 minutes avant de l'introduire dans le séquenceur.




| Ind/locus | locus 1 | locus 2 | locus 3 |
|---|---|---|---|
| Ind 1 | 110/110 | 183/185 | 200/204 |
| Ind 2 | 110/112 | 185/185 | 200/204 |

**Figure23 :** Principe des marqueurs microsatellites

**En haut :** représentation des microsatellites pour un locus et 2 individus, et résultats sur gel de polyacrylamide après amplification PCR.

**En bas :** représentation des pics de fluorescence (une couleur par locus) par analyseur automatique d'ADN.

Chaque pic correspond à un fragment amplifié d'un locus (allèles dont la longueur est indiquée).

**A droite :** Les génotypes (ensemble des longueurs amplifiés pour chaque locus) des deux individus, donc les allèles différenciant ces individus.

### 1.2.4. Utilisation des SNP microarrays

Les SNP (Single Nucleotid polymorphism) sont des marqueurs biallélicques correspondant à une variation d'une paire de base. Ils sont codominants, très nombreux et répartis sur l'ensemble du génome. Il s'agit de procéder à l'hybridation sur puce Affymetrix 10K contenant 10000SNP. Une puce par sujet servira à une très grande rapidité de criblage de l'ensemble du génome. Deux branches de la famille KM ont été analysé par cette méthode. Leur ADN a été dosé, amplifié, fragmenté et dénaturé, puis marqué au fluorochrome et mis au contact de la biopuce.

# Chapitre II : Résultats et Discussion

## 2.1. Résultats

### 2.1.1. Construction des arbres généalogiques :

Les arbres généalogiques des 6 familles ont été reconstitués à partir de l'enquête génétique. Ceci nous permet d'établir le mode de transmission de la maladie.Dans les généalogies suivantes, on assigne à chaque génération un chiffre romain, et à chaque individu un numéro permettant d'identifier les différents membres de la famille.

- **Famille K.M :**

  Dans 3 branches il y a des descendants porteurs de RM. La consanguinité est nette pour les 2 premières branches, c'est-à-dire les couples (IV8-IV9) et (III5 –IV5), par contre elle n'est pas observée pour le couple (IV3-IV4).

  On observe 2 malades par branche, et les patients sont constitués aussi bien de filles que de garçons (figure 24).

- **Famille Ben A-Z :**

  Il y a 2 grandes branches principales. La consanguinité concerne seulement le 1$^{er}$ couple (II1-II2) : Les 2 sexes sont également représentés par les patients (figure 25).

- **Famille Ar :**Consanguinité apparente des parents, et on n'observe que des garçons atteints, mais leur phénotype est normal (figure 26).
- **Famille Kh :**On observe une consanguinité chez les parents, et 5 enfants de la même fratrie sont atteints, dont 4 garçons et 1 fille (figure 27).
- **Famille Ch :**Mariage consanguin donnant naissance à quatre enfants malades dont 3 garçons et 1 fille (figure 28).
- **Famille Si :**Il existe une consanguinité chez le couple II1 et II2 donnant naissance à 2 filles malades. On observe également que les deux oncles paternels II7 et II8 sont malades (figure 29).

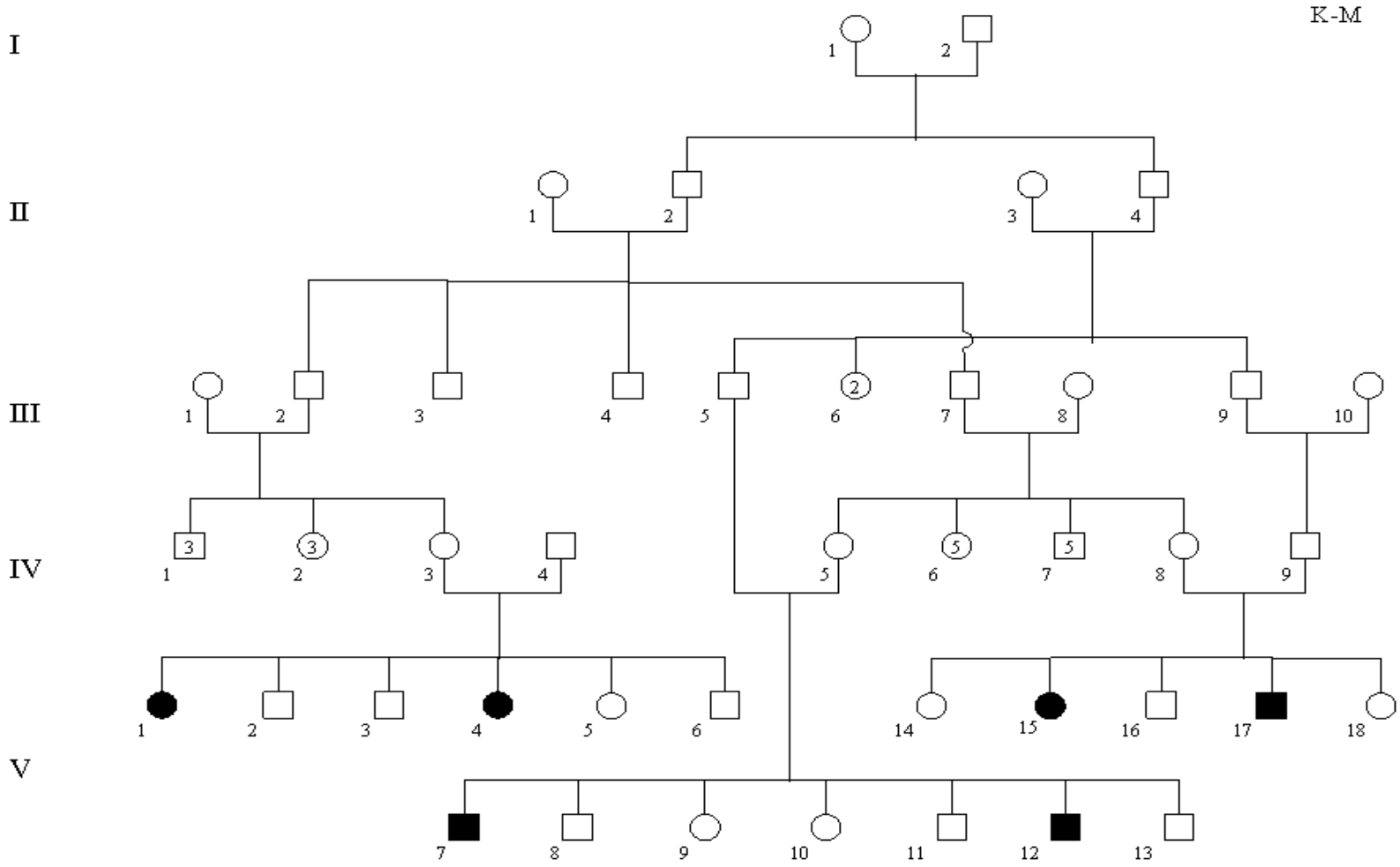



**Figure 24 :** Arbre généalogique de la famille KM

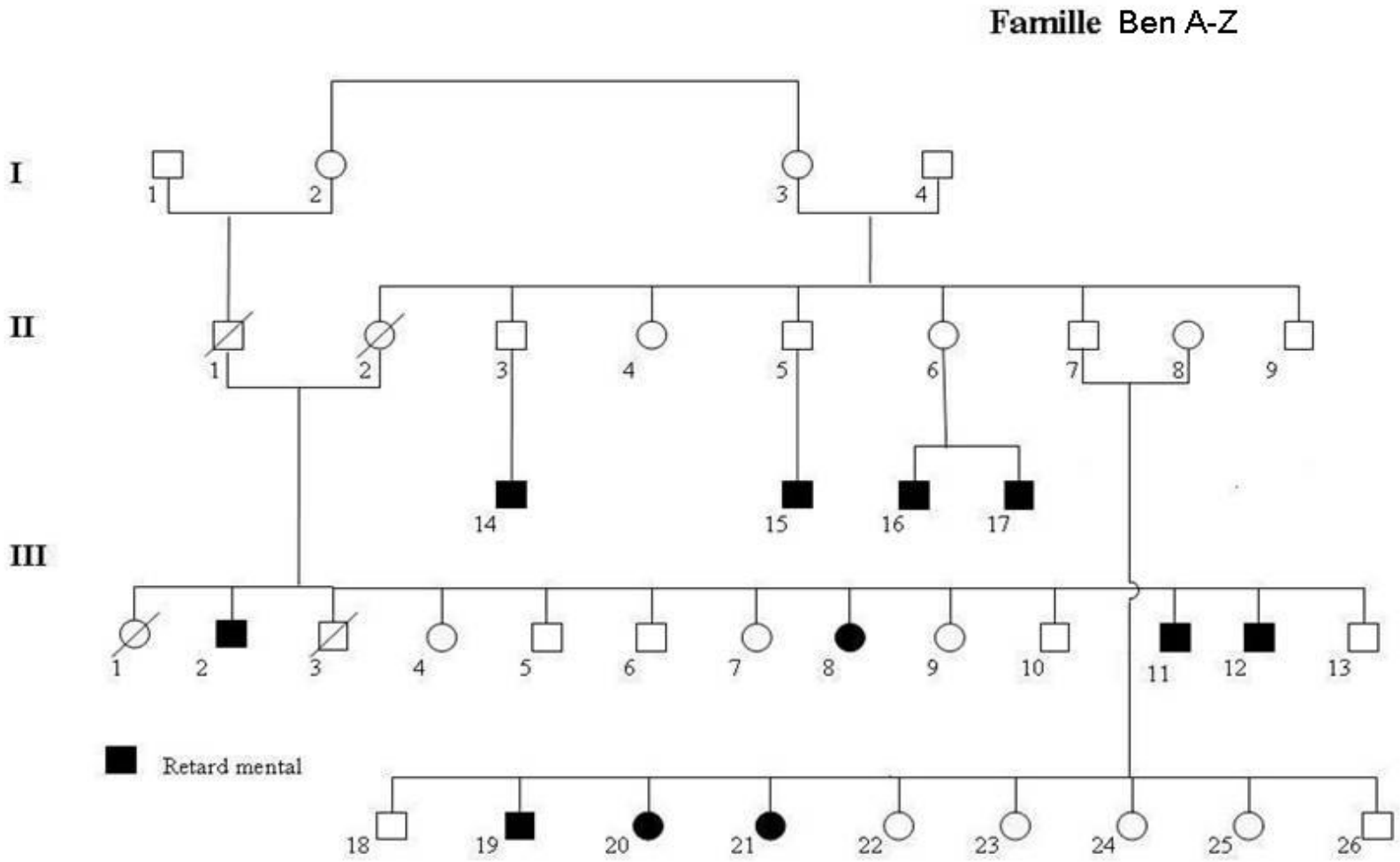



**Figure 25 :** Arbre généalogique de la famille Ben A-Z

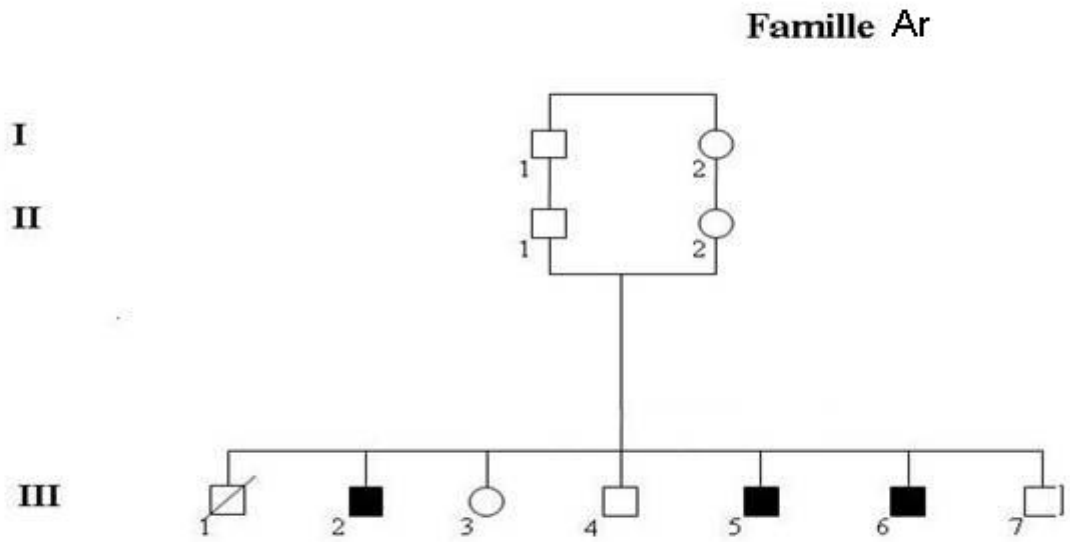



**Figure 26 :** Arbre généalogique de la famille Ar

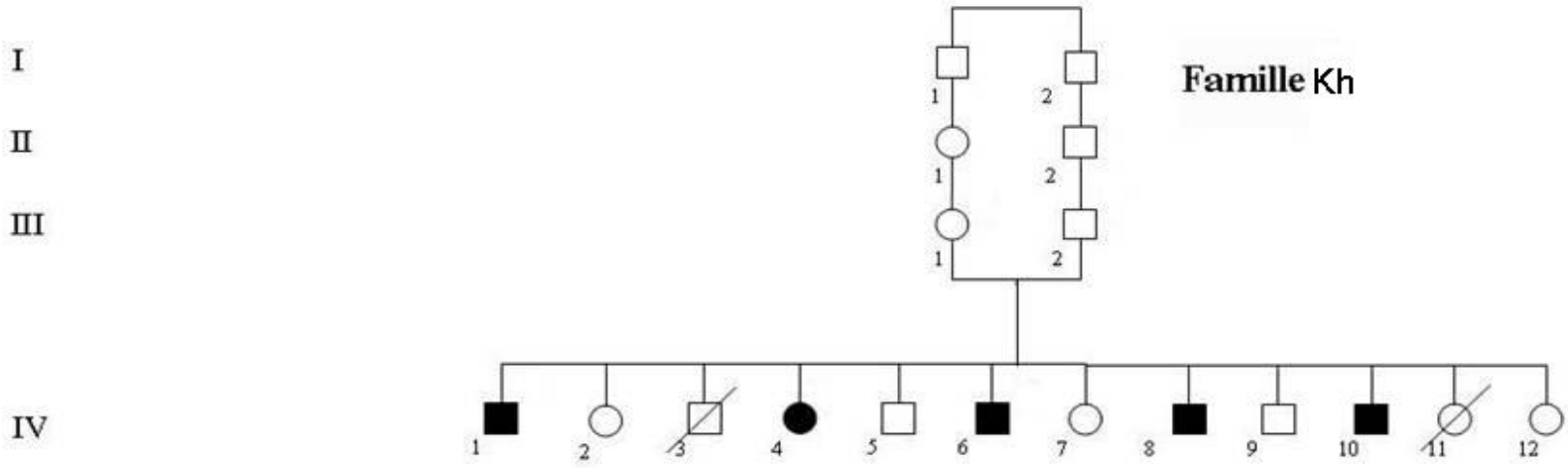



**Figure 27 :** Arbre généalogique de la famille Kh

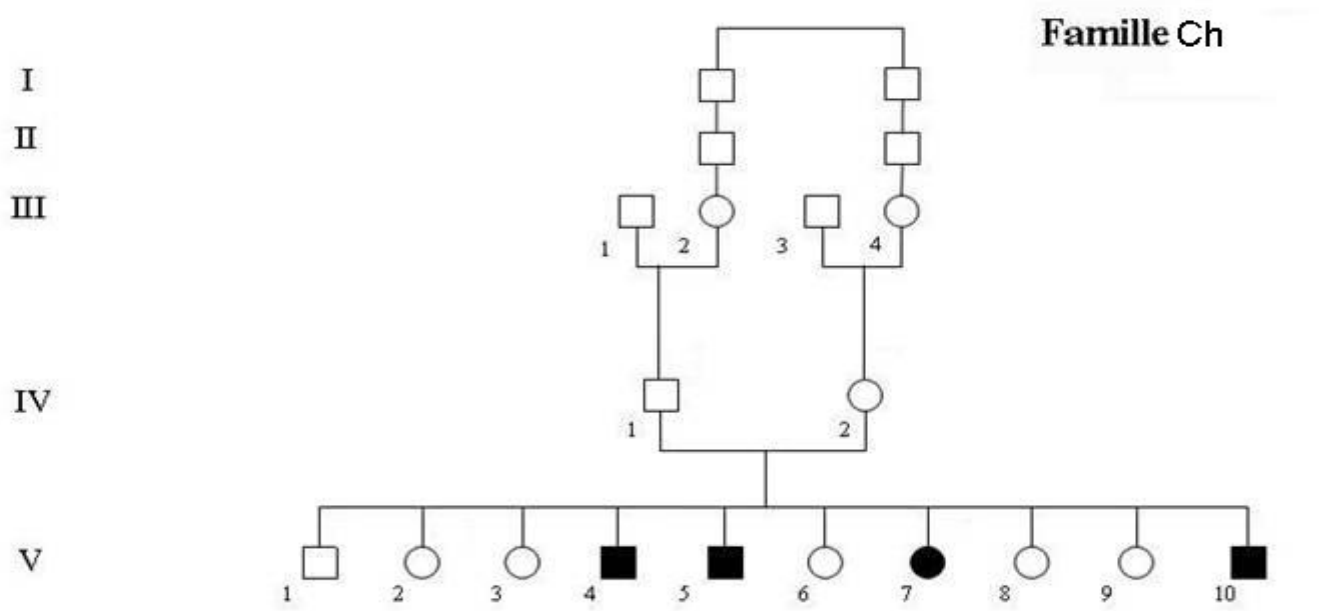



**Figure 28 :** Arbre généalogique de la famille Ch

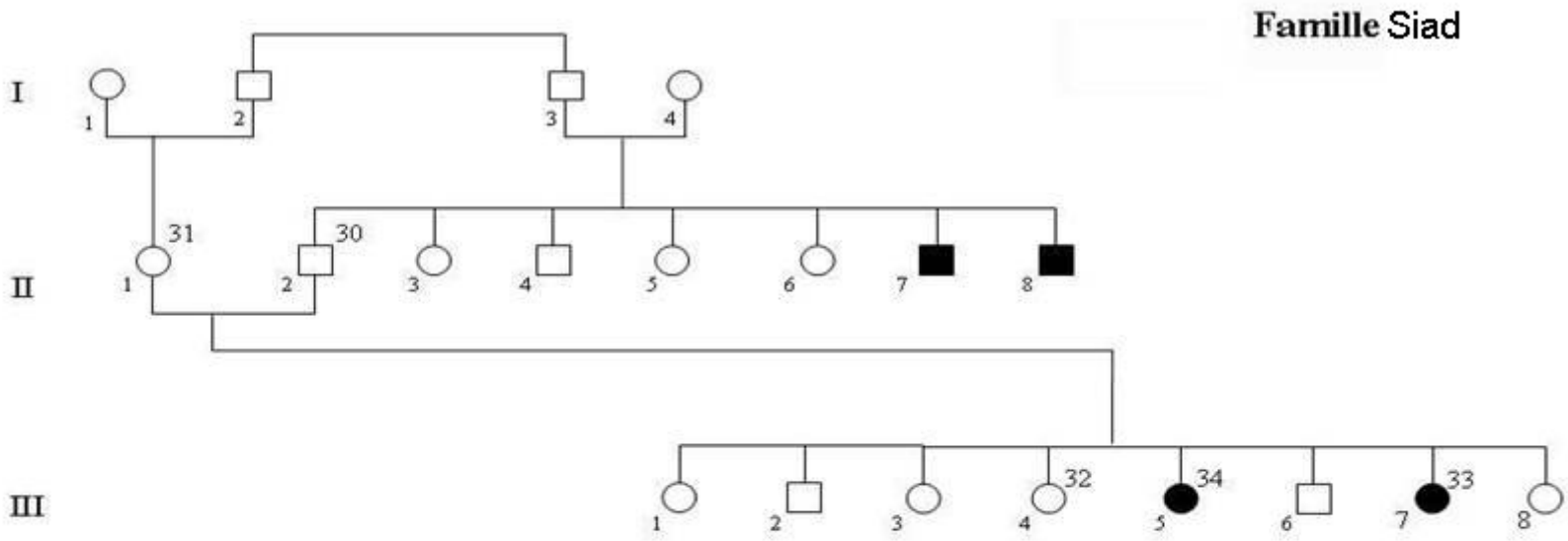



**Figure 29 :** Arbre généalogique de la famille Si

### 2.1.2. Etude mendélienne : mode de transmission et consanguinité

La consanguinité est définie comme étant le résultat d'un mariage entre deux individus apparentés (c'est-à-dire ayant un ou plusieurs ancêtres communs). Pour un descendant donné, elle est d'autant plus importante que le lien de parenté entre les parents est étroit.

L'examen des différentes généalogies montre un mode de transmission autosomique récessif. En effet les pedigrees vérifient les conditions suivantes :

1. La maladie atteint aussi bien le sexe masculin que le sexe féminin avec la même probabilité (le sexe ratio est de 8♂/7♀).
2. Le caractère n'apparaît que dans la fratrie (pas chez les parents): la distribution des sujets atteints au sein des généalogies est de type horizontal.
3. La maladie n'apparaît qu'à la troisième ou la quatrième génération souvent suite à un mariage entre apparentés qui doivent être dans ce cas hétérozygotes.

La ségrégation mendélienne attendue dans cette catégorie de mariage est de type :

- ¼ homozygotes normaux, de génotype AA
- ½ hétérozygotes normaux, de génotype Aa
- ¼ homozygotes récessifs, c'est-à-dire atteints, de génotype aa

Avec « A » l'allèle dominant (normal) et « a » l'allèle récessif (muté)

### 2.1.3. Résultats de l'étude moléculaire :

L'étude moléculaire a concerné 34 individus répartis sur les 6 familles étudiées, dont 15 malades.

#### 2.1.3.1. Génotypage par radioactivité :

La lecture des autoradiographies nous a permis de reconstituer les génotypes ainsi que les haplotypes des individus concernés par cette étude.

Les haplotypes sont déterminés à partir des allèles des différents loci hérités d'un même parent.

Pour chaque allèle d'un marqueur donné, on a attribué un numéro. Les haplotypes obtenus sont rapportés sur la figure suivante :

### 2.1.3.1.1. Reconstitution des haplotypes

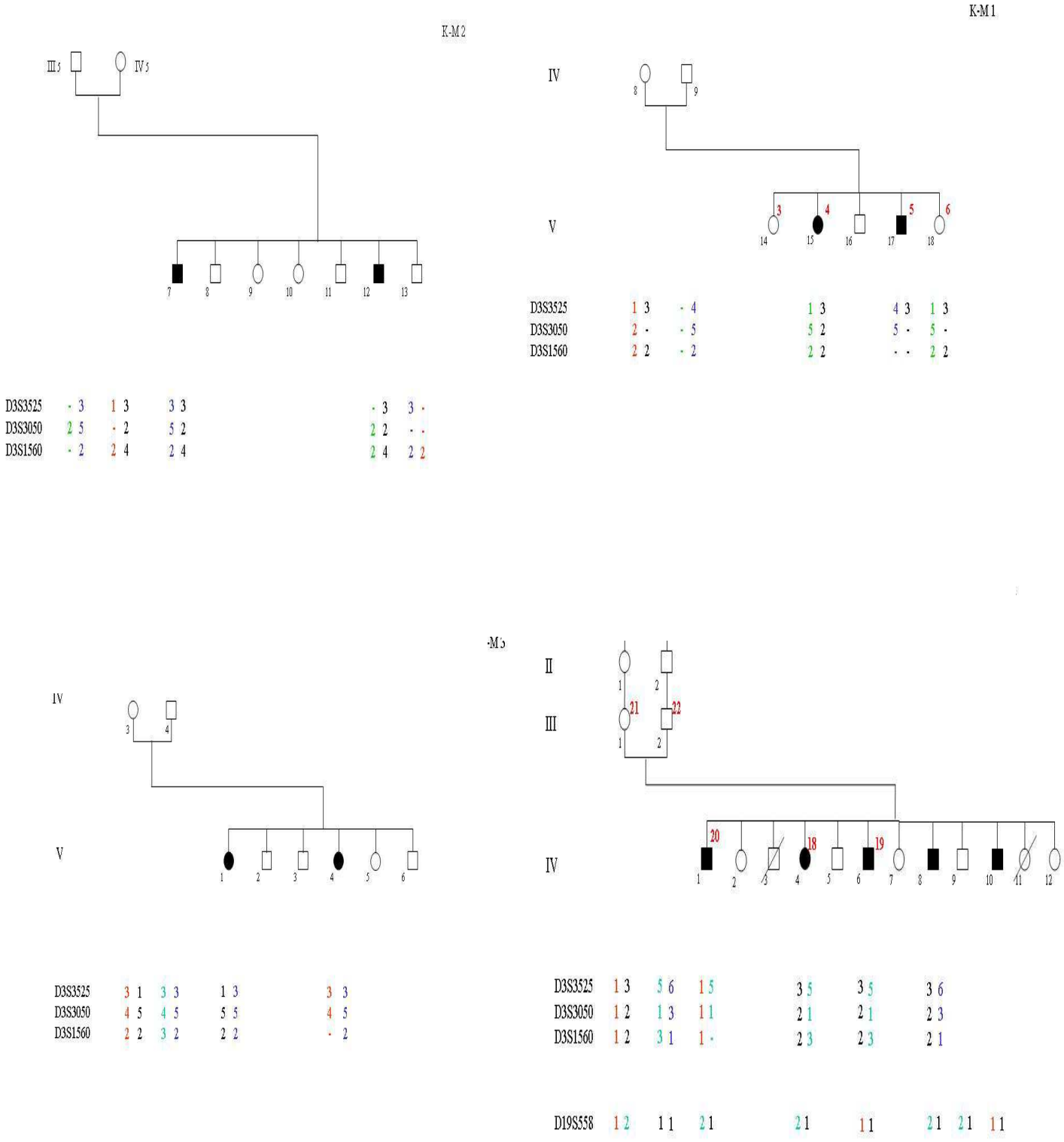



**Figure 30:** haplotypes reconstruits après lecture des autoradiographies.

Des tirets sont mis lorsqu'il est difficile de lire les autoradiographies.

Le but de l'étude moléculaire c'est de reconstituer des génotypes et les haplotypes des différents individus testés, ce qui permet de préciser la phase.

La méthode utilisée est l'homozygotie mapping qui se base sur le fait que dans les unions consanguines, étant donné que les parents appartiennent à la même famille, si leurs enfants sont malades, c'est qu'ils sont homozygotes pour le gène délétère, et de là, pour les marqueurs proches ou à l'intérieur du gène, ces marqueurs, comme le gène délétère proviennent d'un même ancêtre commun.

Remarque : L'homozygotie mapping ne s'applique qu'aux maladies autosomiques récessives.

Seulement, pour réaliser une étude de liaison il faut des familles (méioses) informatives, c'est-à-dire permettant de voir s'il y a coségrégation entre le locus de la maladie et les marqueurs étudier ou non coségrégation c'est-à-dire indépendance (loci très éloignés d'où absence de recombinaison).

En fait l'informativité d'une famille dépend de l'hétérozygotie des parents. Ainsi, il faut qu'au moins l'un des parents soit hétérozygote pour le marqueur étudié.

Par contre si les deux parents sont homozygotes, on ne peut trancher quant la transmission des allèles dans la descendance c'est-à-dire préciser l'allèle qui conségrège avec la maladie : la famille étudiée est alors considérée comme non informative.S'ils sont tous les deux hétérozygotes, leur informativité peut être bonne.

**Liaison au locus 3p25-pter :**

Famille K.M : Les individus atteints n'ont pas d'haplotype commun ni à l'état homozygote, ni à l'état hétérozygote, c'est-à-dire que les atteints de chaque branche de la famille ne présentent pas la même combinaison.

Un haplotype est constitué par plusieurs génotypes, c'est-à-dire une succession d'allèles sur plusieurs marqueurs identifiés sur le même chromosome (en cis) et dont on connaît l'ordre.

Les haplotypes ne sont pas toujours conservés d'une génération à l'autre.

On peut observer dans la descendance :

- Les haplotypes parentaux.
- Les haplotypes recombinés.

Dans le cas d'une liaison entre le marqueur et le locus de la maladie lors d'une transmission autosomique récessive, on s'attend à ce que tous les sujets atteints soient homozygotes pour le même allèle du marqueur (sauf recombinaison).
De même il faut retrouver un génotype commun entre les différents sujets atteints qui soit différent de celui observé pour les individus sains.

**Famille Kh :**

De même, on observe l'absence d'un haplotype homozygote commun aux atteints, ainsi que les combinaisons d'haplotypes différentes (donc à l'état hétérozygote) pour les malades.
On peut donc exclure la liaison de la maladie au locus 3p25-pter pour les familles K.M et Kh.

Les résultats obtenus pour le marqueur D19S558 des individus de la famille Kh sont représentés ci-dessous (figure 31).

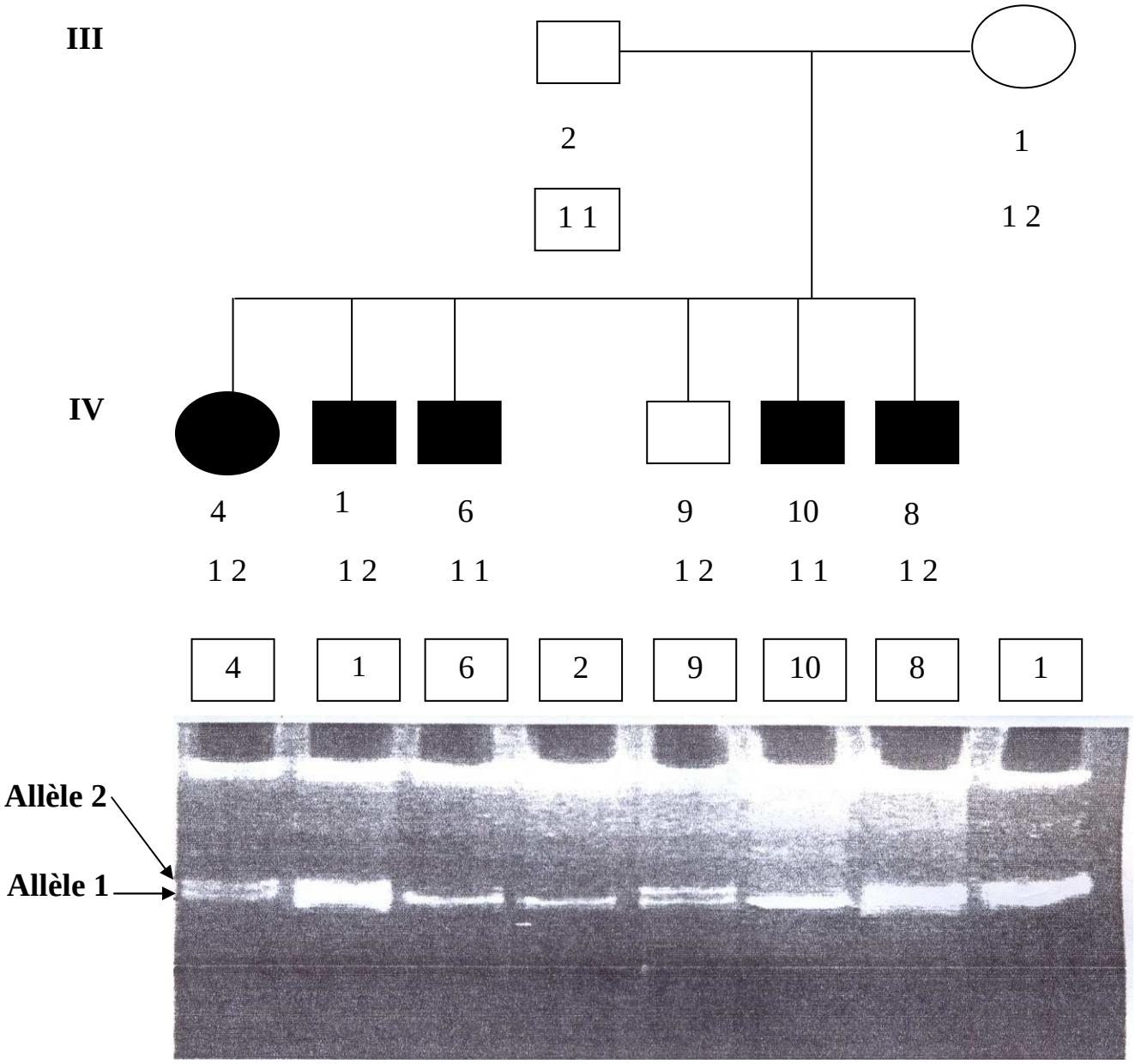



**Figure 31 :** gel d'acrylamide (12%) : génotypage du marqueur D19S558

Les homozygotes 1/1 ou 2/2 présentent une seule bande 1 ou 2.

Les hétérozygotes ½ présentent les deux types de bandes correspondant aux 2 allèles 1 et 2.

- **Pour le locus 19p13.12-p13.2 :**

Dans le cas de la famille Kh, et pour le marqueur D19S558, celle-ci peut être considérée comme informative car au moins un des parents est hétérozygote (mère III-2).

Dans le cas de notre famille, on n'observe pas de génotype commun à tous les malades.

Les individus malades IV1, IV4 et IV8 possèdent un génotype 1/2, tandis que les individus IV6 et IV10 ont un génotype homozygote 1/1.

Il n'y a donc pas de transmission préférentielle d'un allèle donné avec la maladie chez les individus atteints.

De même le père III est homozygote 1/1 comme les deux malades IV6 et IV10 ce qui est en faveur d'une exclusion pour ce marqueur D19S558.

Il serait souhaitable de compléter avec les autres marqueurs du 19.

**2.1.3.2. Génotypage au séquenceur**

Le logiciel qui a permis l'analyse des génotypes s'appelle GeneMapper Software version 4.0 (Applied Biosystems). Il retranscrit les données enregistrées par le séquenceur automatique en calculant la taille des fragments analysés en nombre de paires de bases (pb).

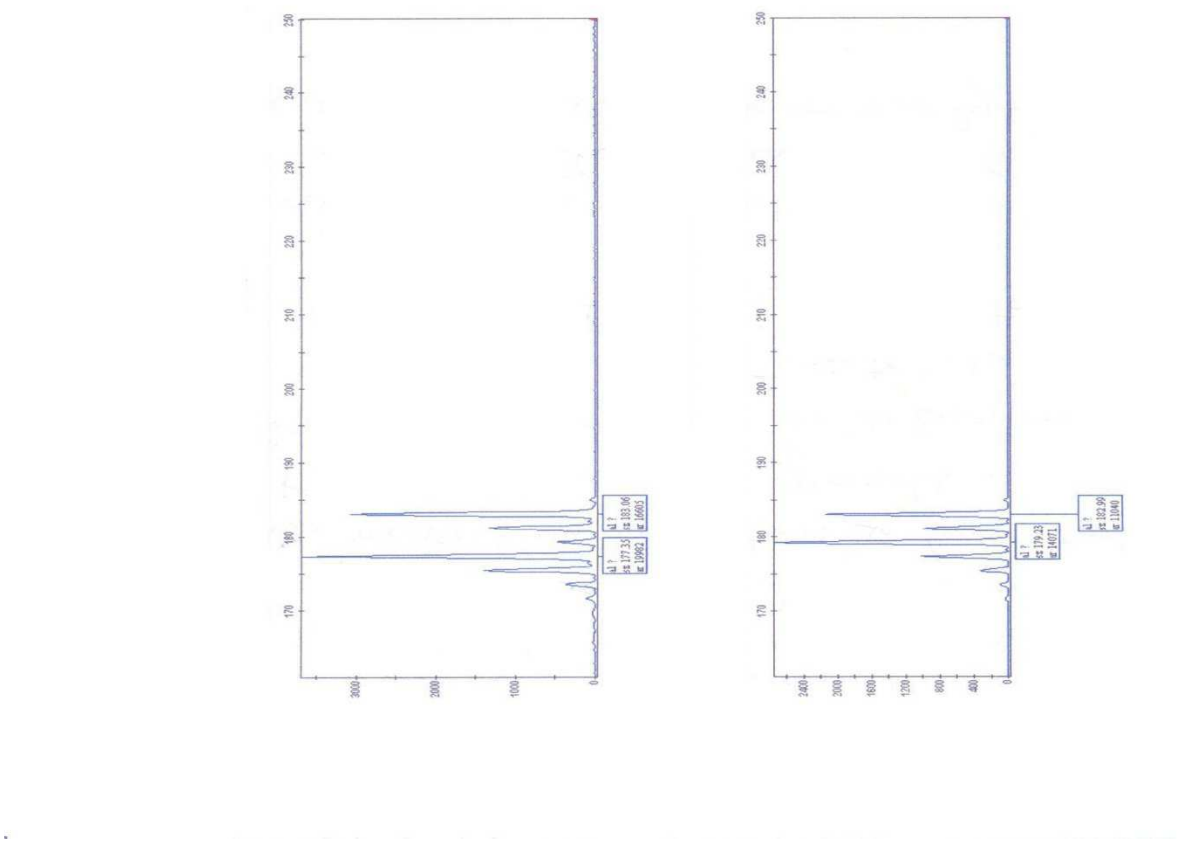


**Figure 32 :** Pics assignés à des allèles différents,de tailles différentes,par le logiciel Genemapper.

### 2.1.3.2.1. Reconstitution des haplotypes :

La lecture des génotypages effectués par le séquenceur nous a permis de construire les haplotypes de chaque individu. Pour chaque allèle d'un marqueur donné, on a attribué un numéro. Les haplotypes obtenus sont rapportés sur les figures suivantes :

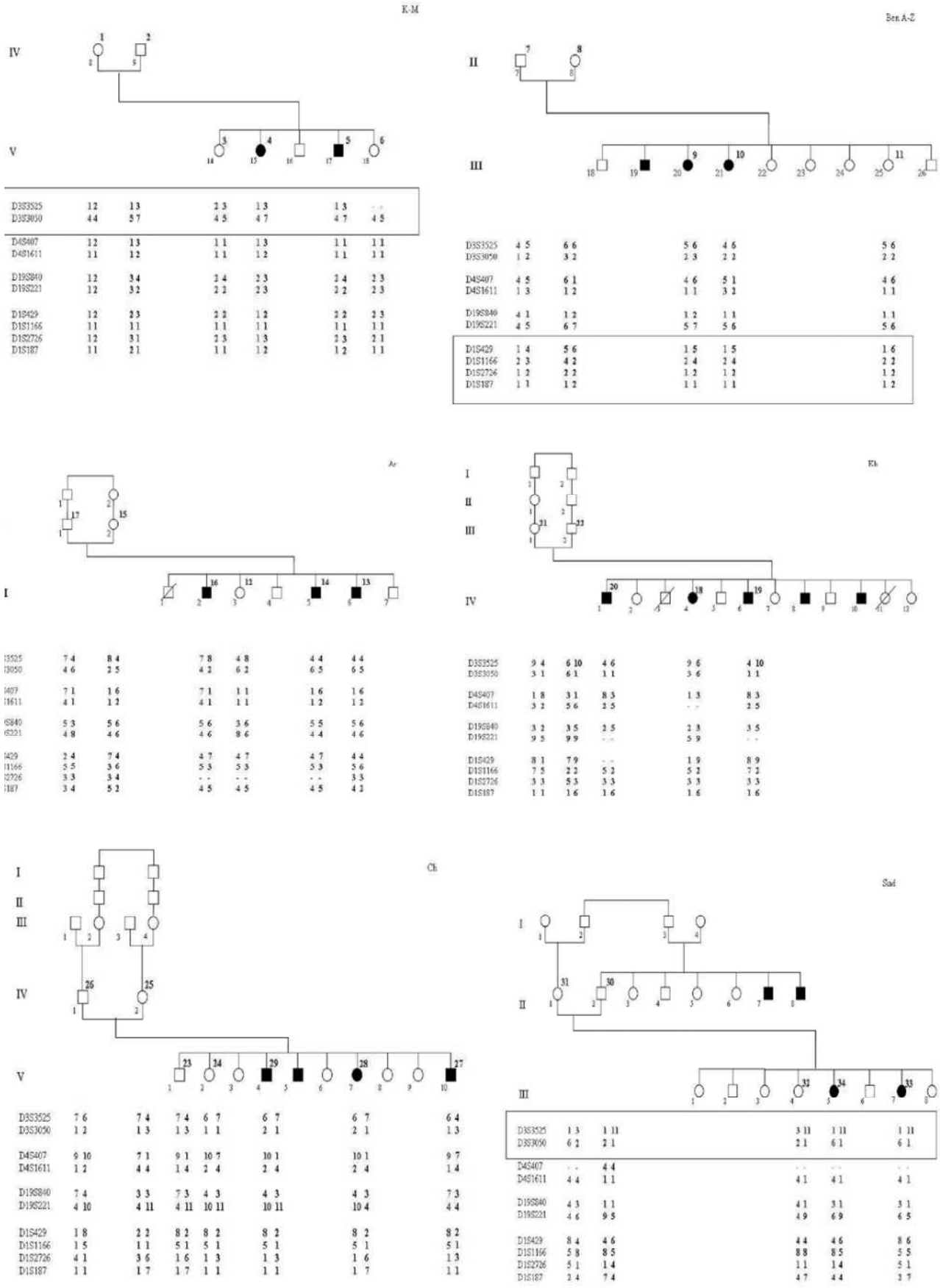


**Figure 33 :** Haplotypes construits après lecture des génotypages effectués par le séquenceur pour les 6 familles

### 2.1.3.3. Résultats des biopuces

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 34

Les malades et les enfants sains sont ceux de IV 8 et IV 5. Seul un intervalle du chromosome 17 (en 17q12 – q 21.2) est à l'état homozygote chez tous les malades.

L'analyse des autres branches de la famille devrait nous permettre de réduire l'intervalle.

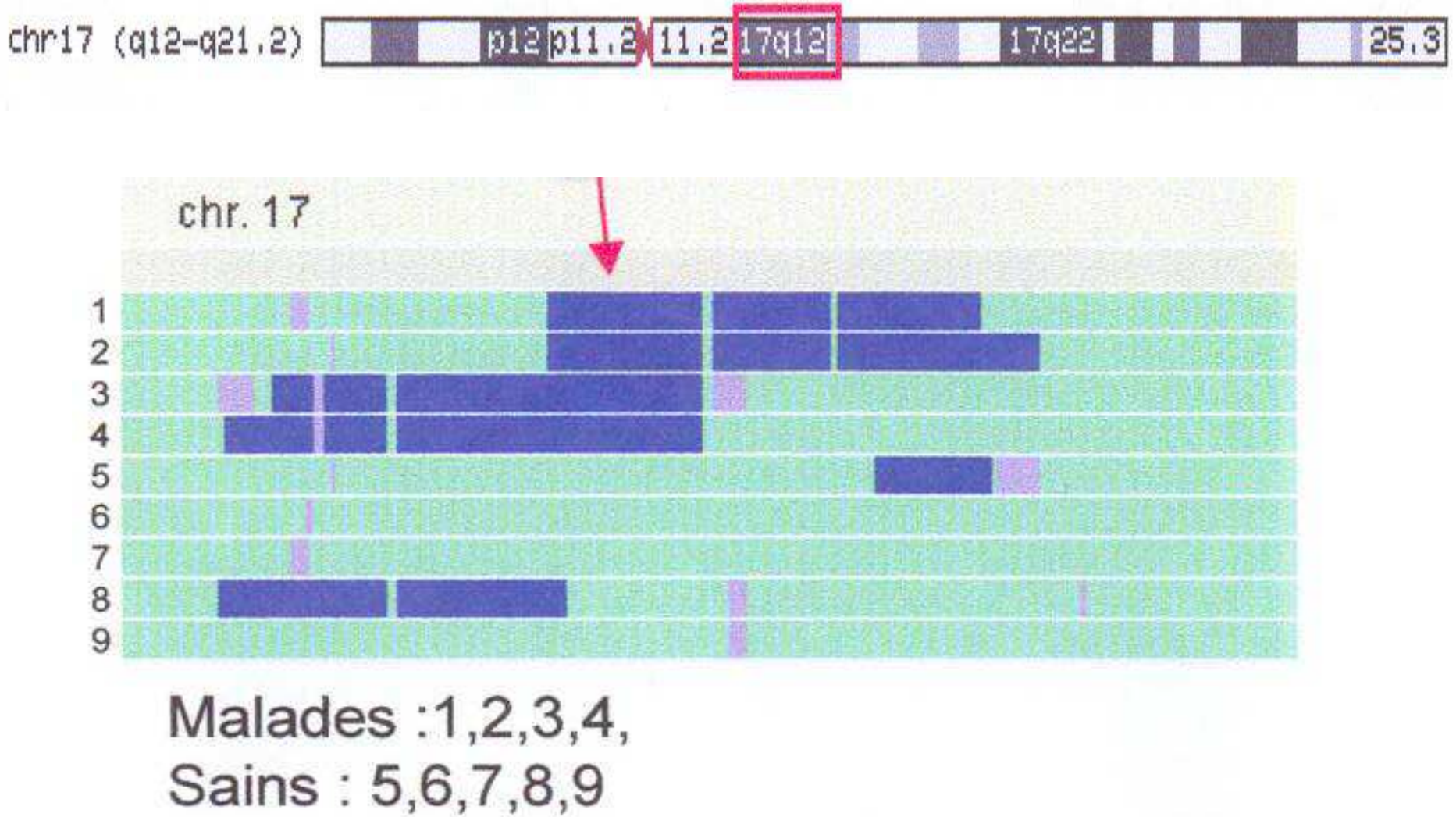



**Figure 34 :** Intervalle d'homologie pour deux branches de la famille KM.

## 2.2. Discussion :

❖ **Pour le locus 3p25-pter :**

- **Famille K.M :**

  On remarque une combinaison commune aux deux atteints à l'état hétérozygote (haplotype vert + haplotype noir). Cette combinaison n'est pas présente chez les autres individus sains, ce qui ne nous permet pas d'exclure la liaison à cette région. On observe une recombinaison pour l'individu V14.

  Calcul des lod scores :

- D3S3525 : Z max =0.73 pour θ=0 (Z max : valeur maximal de lod score et θ : fraction de recombinaison).
- D3S3050 : Z max =0.55 pour θ=0.

  Remarque : Etant donné que plusieurs branches de cette famille (KM1, KM2 et KM3) ont été génotypées suivant la technique du génotypage à la radioactivité précédemment, nous pouvons donc exclure la liaison au chromosome 3.

- **Familles Ben A-Z, Ar, Kh et Ch :**

  Absence d'un haplotype homozygote commun aux atteints au niveau de ce locus.

- **Famille Siad :**

  On observe une combinaison commune aux deux atteints à l'état hétérozygote (haplotype vert + haplotype noir). Cette combinaison n'est pas présente chez les autres individus sains, ce qui ne nous permet pas d'exclure la liaison à cette région.

  Calcul des lod scores :

- D3S3525 : Z max =0.73 pour θ=0.
- D3S3050 : Z max =0.73 pour θ=0.

❖ **Pour le locus 4q24-25 :**

- **Familles KM, Ben A-Z, Ar, Kh et Ch :**

  Absence d'un haplotype homozygote commun aux atteints au niveau de ce locus.

- **Famille Siad :**

  Les marqueurs du chromosome 4 ne sont pas informatifs.

❖ **Pour le locus 19p13.12-p13.2 :**

Absence d'un haplotype homozygote commun aux atteints au niveau de ce locus pour

toutes les familles étudiées.

❖ **Pour le locus 1p21.1-p13.3 :**

- **Familles KM, Ar, Kh, Ch et Siad :**

  Absence d'un haplotype homozygote commun aux atteints au niveau de ce locus.

- **Famille Ben A-Z :**

  On a une combinaison commune aux deux atteints à l'état hétérozygote (haplotype vert + haplotype rouge). Cette combinaison n'est pas présente chez les autres individus sains, ce qui ne nous permet pas d'exclure la liaison à cette région.

  Calcul des lod scores :

- D1S429 : Z max=0.73 pour $\theta$=0.
- D1S1166 : Z max=0.73 pour $\theta$=0.
- D1S2726 : Z max=0.12 pour $\theta$=0.
- D1S187 : Z max=0.43 pour $\theta$=0.

De manière générale, une nette exclusion a été démontrée avec tous les loci testés pour les familles KM,Ar,Kh et Ch.

En ce qui concerne les autres familles, on remarque respectivement une combinaison commune aux deux atteints à l'état hétérozygote pour le chromosome 1 chez la famille Ben A-Z, et pour le chromosome 3 chez la famille Siad.

Globalement, les valeurs des Lod Scores, calculées suivant une étude statistique par le programme Linkage,sont positives,sans qu'elles soient significatives, car elles sont bien inférieures à la valeur seuil de 3.

Les génotypages du reste des membres de ces 2 familles nous permettra de vérifier ou d'exclure la liaison génétique.

Dans ce travail, nous avons réalisé le génotypage suivant deux techniques différentes :

- le génotypage à la radioactivité
- le génotypage au séquenceur.

La première technique est une méthode lourde, dangereuse, et qui nécessite de grandes précautions à prendre. En effet, quand on manipule de la radioactivité, on ne doit pas s'exposer sans protection, donc toujours travailler derrière un écran en plexiglas, mettre deux paires de gants et faire le moins de déchets possibles qu'on doit jeter dans des poubelles spéciales en plexiglas. D'autre part, la radioactivité ayant une demi-vie relativement courte, il est primordial de l'utiliser dès son arrivée, d'autant plus qu'elle n'est pas disponible à longueur de l'année.

Seulement deux familles ont été génotypées suivant cette méthode, et ce, parce que les autres familles ont été recrutées plus tard, quand le génotypage à la radioactivité n'était plus utilisé au laboratoire.

Il est à noter également que les marqueurs situés sur le chromosome 4 ont été contaminés, donc on n'a pas pu les utiliser.

Par contre le génotypage par analyseur automatique d'ADN est une technique simple et rapide qui permet d'identifier des allèles de marqueurs d'ADN en trois temps : amplification du marqueur en question par PCR en utilisant des amorces fluorescentes , puis migration electrophorétique des produits de PCR sur l'analyseur automatique pour la séparation des fragments selon leur taille , les différents fragments qui sont donc fluorescents seront détectés grâce à un système de détection par rayon laser, enfin, interprétation des fichiers bruts, donnée par un logiciel (Genemapper) qui permet d'assigner un pic et une taille à chaque fragment.

Ainsi, pour analyser les résultats obtenus grâce aux deux techniques précédentes, il est important de savoir que si un marqueur polymorphe est proche du locus morbide, des allèles identiques de ce marqueur vont être partagés par les individus atteints d'une famille et non par les individus sains. L'analyse des marqueurs polymorphes chez les individus d'une famille permet donc de déterminer quels marqueurs co-ségrégent avec la maladie.

L'haplotype est la zone qui entoure la mutation fondatrice : tous les porteurs de la mutation fondatrice ont le même haplotype.

L'analyse moléculaire des haplotypes a permis de conclure à une exclusion de la liaison pour tous les marqueurs et avec la majorité des familles étudiées.

Par la suite on a procédé en un deuxième temps à un mapping par homozygotie, c'est-à-dire un génome scan ; dont le principe est le suivant :

Le génome scan est l'analyse du génome entier d'un individu contre un ensemble de marqueurs dont la position sur le chromosome est bien connue. Le génome scan recherche les modèles communs de la transmission entre ces marqueurs et les caractéristiques du retard mental.

# Conclusion

Dans ce travail, nous nous sommes proposé de faire des études moléculaires sur des familles algériennes dont certains membres sont atteints de retard mental non spécifique et qui présentent une transmission autosomique récessive. Six familles algériennes consanguines atteintes d'un retard mental non spécifique ont été recensées. L'étude mendélienne des généalogies a montré un mode de transmission autosomique récessif. Les cas index ont été explorés cliniquement. Au moins un membre atteint de chaque famille a bénéficié d'un scanner, un bilan métabolique et un caryotype. Aucune anomalie n'a été détectée pour ces explorations.

Notre but a été, dans un premier temps, de tester la liaison entre le gène de la maladie au sein de ces familles et les quatre loci connus pour être responsables du retard mental non spécifique à transmission autosomique récessive.

10 marqueurs (STR) ont été choisis pour l'étude de liaison :

- 2 sur le locus 3p25-pter.
- 2 sur le locus 4p25-q25.
- 2 sur le locus 19p13.12-p13.2
- 4 sur le locus 1p21.1-1p13

Le génotypage a été réalisé suivant deux techniques différentes :

- génotypage à la radioactivité.
- Génotypage au séquenceur.

Ces quatre régions ont été exclues pour la majorité des familles après génotypage et étude des haplotypes.

Pour la plus grande famille recrutée et qui compte 6 individus atteints (famille composée de 3 branches), on a procédé dans un deuxième temps (grâce à l'aide du Pr Jamel Chelly de l'hôpital Cochin à Paris) à un mapping par homozygotie qui a concerné deux branches de cette famille, et on a opté pour la méthode affymetrix (utilisant les puces à ADN) qui permet de génotyper 10000 SNP répartis sur tout le génome. Ceci nous a d'abord confirmé l'exclusion de la liaison entre le phénotype

présenté par notre famille et les loci testés préalablement par génotypage des STR. Nous avons aussi pu exclure une bonne partie du génome en comparant les génotypes des sains et des atteints.

La région d'homozygotie partagée entre les atteints se résume à un intervalle bien précis sur le chromosome 17 (en 17q12-q21.2), ce qui présente en soi ; un résultat très satisfaisant.

Ces régions devraient être explorées par analyse de microsatellites. Si une liaison était confirmée pour une région donnée, on devrait procéder à la recherche du gène impliqué en se basant sur l'approche du gène candidat.

La région 17q12-q21.2 mesure approximativement 6Mb et contient 45 gènes connus à nos jours (cf : Dataset of Genes on chromosome 17).

Evidemment, l'idéal serait d'appliquer le même protocole aux autres familles.

En conclusion, le retard mental est un problème de santé publique majeur qui reste encore méconnu, sous-estimé, et peu étudié.

Les situations de risque d'avoir un enfant présentant une déficience intellectuelle ne sont pas rares en cours de grossesse, en particulier du fait de la systématisation de la surveillance échographique et des progrès de l'imagerie fœtale, il est donc à souligner l'importance de la recherche clinique et génétique dans le domaine du Diagnostic Pré Natal afin de permettre une information plus précise (HERON D-MOUTARD 2008).

La fréquence du handicap mental, la gravité des problèmes qu'il pose, la complexité des notions qu'il implique, font de cette question l'une des plus épineuses et des plus angoissantes à aborder (BOUCEBCI 1984).

L'identification de nouveaux gènes de retards mentaux reste un objectif primordial pour le pronostic, le conseil génétique et la prise en charge des patients et de leur famille. La connaissance de leurs fonctions permet de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques à l'origine des retards mentaux et peut-être à long terme d'envisager des perspectives thérapeutiques.

# Bibliographie


Les bases de données informatiques utilisées sont :

1) European XLMR Consortium : http://www.euromrx.com/
2) Greenwood genetic center-XLMR update : http://www.ggc.org/xlmr.htm
3) Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM): : http://www.ncbi.nih.gov/omim
4) XMLR genes update: http://xmlr.interfree.it/home.htm

American Psychiatric Association. DSM-IV, Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 4th Ed.washington DC : The American Psychiatric Association 1994.

ALTER MR, BENGTSSON U, ELDER FFB. 1991 Molecular confirmation of a Wolf-Hirshorn Syndrome identified by allele loss and in situ hybridization. *J Med Genet* ;49 :1235-42.

BRUNNER HG, NELEN MR, VAN ZANDVOORT P, ABELING NG 1993. X-linked borderline mental retardation with prominent behavioural disturbance: phenotype, genetic localization, and evidence for disturbed monoamine metabolism. *Am. J. Hum. Genet.*; 52(6): 1032 – 9.

BERGMAN C, ZERRES K, SENDEREK J, RUDNIK-SCHONEBORN S, EGGERMAN T, HAUSLER M, MULL M, RAMAEKERS VT. OLIGOPHRENIN 1(OPHN1) 2003gene: mutation causes syndromic X-linked mental retardation with epilepsy, rortral ventricular enlargement and cerebellar hypoplasia. *Brain*; 126(Pt7)1537.

BILLUART P, BIENVENU T, RONCE N, DES PORTES V, VINET MC, ZEMNI R, ROEST CROLLIUS H, CARRIE A (1998). Oligophrenin-1 encodes a rho GAP protein involved in X-linked mental retardation. *Nature* 392: 923-926.

BIENVENU T, DES PORTES V, MC DONNELL N,CARRIE A 2000. Missense mutation in PAK3, R67C, causes X-linked non specific mental retardation. *Am.J. Med. Genet* ;; 93(4): 294-8.

BAHI N, FRIOCOURT G, CARRIÉ A, GRAHAM ME, WEISS JL. 2003 IL1 receptor accessory protein like, a protein involved in X-mental retardation, interacts with

Neuronal Calcium Sensor 1 and regulates exocytosis. *Hum. Mol. Genet*;12(12): 1415-25.

BASEL – VANAGAITE L , ALKLAI A , STRANSBERG R , MAGEL N, INBAR D, MAHAJNA M AND SHOHAT M 2003. Mapping of a new locus for autosomal recessive non – syndromic mental retardation in the chromosomal region 19 p13.12-p13.2: further genetic heterogeneity .*J. Med .Genet* ; 40 :729-732.

BASEL – VANAGAITE L, ATTIA R, YAHAV M 2006 . the CC2D1A, a member of a new gene family with C2 domains, is involved in autosomal recessive non – syndronic mental retardation .*J. Med . Genet*; 46 . 203-210.

BRADLEY SCHAEFER G, BODENSTEINER JB 1992. Evaluation of the child with idiopathic mental retardation. *Pediatr Clin North Am* ; 39 :229-43.

BASEL-VANAGAITE L (2008) Clinical approches to genetic mental retardation. *Isr Med Assoc J* 10 : 821-26.

BOUCEBCI « Maladie mentale et handicap mental » Editions EMAL – 1984.

COLOMBO E, COLLOMBAT P, COLASANTE G, BIANCHI M, MANSOURI A: Inactivation of ARX, the murine ortholog of the x-linked lissencephaly with ambigous genitalia gene, leads to severe disorganization of the ventral telencephalon with impaired neuronal migration and differentiation. *The Journal of Neuroscience,April* 2007 , 27 (17) : 4786 – 4798.

CASON AL, IKEGUCHI Y, SKINNER C, WOOD TC, HOLDEN KR, LUBS HA MARTINEZ F, SIMENSEN RJ, STEVENSON RE, PEGG AE, SCUWARTZ CE 2003.X-linked spermine synthase gene (SMS) défect : *the first Eurc J Hum Genet* ; 11 (12) : 937-44.

CLARK Lin, BRUNELLA Franco and Marsha Rich Rosner 2005. CDKL5/STK9 kinase inactivation is associated with neuronal developmental disorders. *Human Molecular Genetics*.14 (24) : 3775-3786.

CHIURAZZI P, TABOLACCI E, NERI G 2004. X-linked mental retardation (XLMR): from clinical conditions to cloned genes. Crit. *Rev Clin Lab Sciences*; 41(2): 117-158.

CARGILE CB, GOH DL, GOODMAN BK, CHEN XN, KORENBERG JR, SEMENZA

GL, THOMAS GH (2002). Molecular cytogenetic charactérization of a subtile interstitial del (3) (p25.3-p26.2) in a patient with deletion 3p syndrome. *Am J Med Genet* ; 109 :133-138.

COLLINS FS (1992) Positionnal cloning: let's not call it reverse anymore. *Nat Genet*1: 3-6.

CHELLY J, KHELFAOUI M, FRANCIS F, BELDJORD C, BIENVENU T (2006) Genetics and pathophysiology of mental retardation. *Eur J Hum Genet* 14 : 701-713.

DES PORTES V, LIVET MO, VALLEE L et le groupe de travail de la société française de neuropédiatrie (SFNP) sur les retards mentaux. Démarche diagnostique devant une déficience mentale de l'enfant en 2002. *Arch Pédiatr* 2002 ; 7 : 709-25.

DES PORTES V, BODDAERT N, SACCO S, BRIAULT S, MAINCENT K, BAHI N (2004). Specific clinical and brain MRI features in mentally retarded patients with mutations in the Oligophrenin -1 gene. *Am. J. Med. Genet A* 124:364-371.

D'ADAMO P, WELZL H, PAPADIMITRIOU S, RAFFAELE di BARLETTA M 2002. Deletion of the mental retardation gene GDI1 impairs associative memory and alters social behaviour in mice. *Hum. Mol. Genet*; 11(21): 2567-80.

DAVLETOV BA, SUDHOF TC (1993). A single C2 domain from synaptotagmin I is sufficient for high affinity Ca 2+/ phospholipid binding. *J Biol Chem* 268 : 26386-26390.

FRIES MH, LEBO RV, SCHONBERG SA, GOLABI M, 2005. mental retardation locus in xp21 chromosome microdeletion. *Al J Med Genet* ; vol 46,Issue 4 : 363-368.

FISCHBURN J, TURNER G, DANIEL A, BROOKWELL R (1983) The diagnosis and frequency of X-linked conditions in a cohorte of moderately retarded males with affected brothers. *Am. J. Med. Genet*; 14:713-724.

FRINTS SGM, FRAYEN G, MARYNEN P, FRYNS J-P 2002. X-linked mental retardation: vanishing boundaries between non-specific (MRX) and syndromic (MRXS) forms. *Clin. Genet*: 62: 423-432.

FERNELL E 1998. Etiological factors and prevalence of severe mental retardation in children in Swidish municipality the possible role of consanguinity. *Dev Med Child Neurol* ;40 :608-11.

FLINT J, WILKIE AO, BUCKLE VJ, WINTER RM, HOLLAND AJ, MC DERMID HE.

1995. The detection of subtelomeric chromosomal rearrangement in idiopatic mental retardation. *Nat Genet* ; 9 :132-40.

GRAWFORD J, LOWER KM, HENNEKAM RC, VAN ESCH H, MEGARBANE A, LYNCH SA, TURNER G, GEEZY J.

GARCIA CC, BLAIR HJ, SEAGER M, COULTHARD A, TENNANT S, BUDDLES M, CURTIS A, GOOD SHIP JA 2004. Identification of a mutation in synapsin I, a synaptic vesicle protein in a family with epilepsy. *J Med Genet* ; 41 (3) : 183-6.

GOMOT M, RONCE N, DESSAY S, ZEMNI R, AYRAULT AD 2002. TM4SF2 gene involvement reconsidered in an XLMR family after neuropsychological assessment. *Am. J. Med. Genet*; 112(4):400- 4.

GIULIANO F, BADENS C, RICHELME C, LEVY N, LAMBERT JC 2005. Syndrome ATR-X: une nouvelle mutation du gene XNP/ATR-X à proximité du domaine hélicase. *Archives de Pédiatrie,* Vol 12, issue 9: 1372-75.

GSCHWEND TP, KUEGER SR, KOZLOV SV, SONDERGGER P 1997. Neurotrypsin, a novel multidomain serine protease expressed in the nervous system. *Mol cell Neurosci*;9:207-19.

GLASS IA 1991. X linked mental retardation. *J Med Genet* ; 28 :361-71.

GARSCHASBI M, HADAVI V, HABIBI H, KAHRIZI K, KARIMINEJAD R, BEHJATI F, TZSCHACH A, NAJMABADI H, ROPERS HH, KUSS AW (2008) . A defect in the TUSC3 gene is associated with autosomal recessive mental retardation. *Am J Hum Genet*; 82(5) : 1158-64.

GITSCHIER J, WOOD WI, GORALKA TM, WION KL, CHEN EY, EATON DH, VEHAR GA, CAPON DJ, LAWN RM. (1984). Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* 312 :326-330.

GARSHASBI M, KAHRIZI K, HOSSEINI M, NOURI VAHID L, FALAH M, HEMMATI S, HU H, TZSCHACH A, ROPERS HH, NAJMABADI H, KUSS AW 2001. A novel nonsens mutation in TUSC3 is responsible for non-syndromic recessive mental retardation in a consanguineous Iranian family. *Am J Med Genet* Aug : 155A (8) : 1976-80.

GITSCHIER J, WOOD WI, GORALKA TM, WION KL, CHEN EY, EATON DH,

VEHAR GA, CAPON DJ, LAWN RM (1984) Characterisation of the human factor VIII gene *Nature* 312 : 326-330.

HARVEY CG, MENON SD, STACOWIAK B, NOOR A 2007. Sequence variants within exon 1 of MECP2 occur in females with mental retardation. *AmJ Med Genet Part B* : 144B : 355-360.

HAGENS O, DUBOS A, ABIDI F, BARBIG, VAN ZUTVEN L, 2005: Disruption of the novel KIAA1202 gene are associated with x-linked mental retardation. *Hum.Genet* ; 1-13 16 24 98 84.

HIGGINS JJ , ROSEN DR , LOVELESS JM , CLYMAN JC , GRAN MJ 2000. A gene for non –syndromic mental retardation maps to chromosome 3p25 –pter .*Neurology*; 55 : 335 -340 .

HIGGINS JJ, PUCILOWSKA JMD, RONI QMS 2004. Amutation in a novel ATP – dependent Lon protease gene in a kindered with mild mental retardation . *Neurology* ; 63(10) :1927 -1931.

HAGBERG B, KYLLERMAN M 1983. Epidemiology of mental retardation. A Swedish survey. *Brain Dev* ; 5 : 441-9.

HAGBERG B, HAGBERG G, LEWWERTH A, LINDBERG U 1981. Mild mental retardation in Swedish school children. *Acta Pediatr Scand* ;70 :445-52.

HILA L, BEN JEMAA L, DAOUDI R, MAAZOUL F, CHAABOUNI H, (2006). FISH pantélomérique : Application à l'étude du retard mental idiopathique. *Antropo*, 12,73-82.

HERON D, DES PORTES V(008) Déficience intellectuelle non syndromique : quel bilan étiologique ? *Médecine thérapeutique / Pédiatrie. Vol 11*, numero 4, 202-10.

HERON D, MOUTARD ML (2008) Déficience intellectuelle et diagnostic prénatal *Medecine thérapeutique/Pédiatrie. Volume 11*, Numéro 4, 22-7.

HERON D, JAQUETTE A. Comment explorer une déficience intellectuelle chez l'adulte ? *Neurologie.com. Vol 1*, n°8, 219-22 (2009).

JENSEN LR, AMENDE M, GUROK U, MOSER B, GIMMEL V 2005: Mutations in the JARID1C gene with is involved in transcriptional regulation and chromatine remodeling, *AM.J.Hum.Genet*, 76 (2) : 227-36.

JO S, LEE KH, SONG S, JUNG YK, PARK CS (2005). Identification and functional characterization of cereblon as a binding protein for large-conductance calcium-activated potassium channel in rat brain. J Neurochem 94 : 1212-1224.

KESLER SR, SIMENSEN RJ, VOELLER K, ABIDI F, STEVENSEN RE, SCHWARTZ CE, REISS AL 2007: Altered neurodeveloppement associated with mutations of RSK 2: a morphometric MRI study of Coffin-Lowry syndrome. *Neurogenetics*; 8(2): 143-7.

KONDOH T, OKAMOTO N, NORIMATSU N, UETANI M, NISHIMURA G, MORIUGHI H 2007. A Japanese case of oto palato-digital syndrome type II : an apparent lack of phenotype-genotype correlation. *I Hum Genet* ;52 54° : 370-3.

KUTSCHE K, YNTEMA H, BRANDT A, JANTKE I 2000. Mutations in ARHGEF6, incoding a guanine nucleotide exchange factor for Rho GTPases in patients with X-linked mental retardation. *Nat. Genet*; 26(2):247-50.

KUWANO A, LEDBETTER SA, DOBYNS WB, EMANUEL BS, LEDBETTER DH 1991 ; Detection of deletions and cryptic translocations in Miller-Dieker Syndrome by in situ hybridization. *Am J Hum Genet* ; 49 :707-14.

KAUFMAN L, MUHAMMAD AYUB, JOHN B (2010). Vincent. A genetic base of non-syndromic intellectual deficiency : a review. *J Neurodev Disord* December ; 2 (4) : 182-209.

LUBS HA, SCHWARTZ CE, STEVENSEN RE, ARENA JF. Study of X-linked Mental Retardation (XLMR): Summury of 61 Families in the Miami/Greenwood Study. Am. J. Med. Genet. 1996; 64:169 – 75.

LACOMBE D, VILLARD L, FONTES M, BATTIN J 1996. Retard mental syndromique et mutations dans le gene XNP. *Archives de Pédiatrie, vol3*, suppl1,;377.

LUBS H, ABIDI FE, ECHEVERI R, HOLLOWAY L, MEINDL A, STEVENSEN RE, SCHWARTZ CE 2006. Golabi-Ito-Hall syndrome results from a missense mutation in the ww domain of the PQBP1 gene. *J. Med. Genet*; 43(6):e30.

LAUMONNIER F, HOLBERT S, RONCE N, FARAVELLI F 2005: Mutations in PHF8 are associated with X-linked mental retardation and cleft lip/cleft palate. *J. Med. Genet* : 42 : 780-786.

LESCA G, BERNARD V, BOZON M, TOURAINE R, GERARD D (2007): Mutation screening of the MECP2 gene in a large cohort of 613 fragile-Xnegative patients with

mental retardation European journal of medical Genetics 50 200-208.

LEBEL RR, MAY M, POULS S, LUBS HA, STEVENSEN RE, SCHWARTZ CE 2002. Non syndromic x-linked mental retardation associated with a mimisserise mutation (P132L) in the FGD1 gene. *Clin Genet* ; 61 (2) : 139-45.

LAUMONNIER F, BONNET-BRILHAULT F, GOMOT M, BLANC R, X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the neuroligin family.

LANDER ES, BOTSTEIN D 1987.Homozygoty mapping: a way to map human recessive traits with the DNA of inbred children. *Science*; 236: 1567-70.

LEMAY JF, HERBERT AR, DEWEY D, INNES M (2003) A rational approch to the child with mental retardation for the paediatrician Peadiatr Child Health 8(6) : 345-56.

MC LAREN J, BRYSON SE (1987) Review of recent epidemiological studies of mental retardation: prevalence, associated disorders, and etiology. *Am. J.Ment. Retard* 92: 243 – 254.

MORAINE CLAUDE. Les retards mentaux lies au sexe. In Progrés en pédiatrie génétique. Ed doin 1997 ; 303 – 317.

MULLEY JC, YU S, LOESH DZ, HAY DA, DONNELY A, GEDEON AK 1995. FRAXE and mental retardation, *J. Med. Genet*.; 32 (3) : 162 – 9.

MANDEL JL 2004. Comparative frequency of fragile-X (FMR1) and creatine transporter (SLC6A8) mutations in X-linked mental retardation. *Am. J. Hum. Genet*;75(4): 730-1.

MARANDUBA CM, FRIESEMA EC, KOK F, KESTER MH, JANSEN J, SERTIE AL, PASSOS-BUENO MR, VISSER TJ 2006. Decreased cellular uptake and metabolism in Almlan-Herndan Dudley syndrome (AHDS) due to a novel mutation in the MCT80 thyroid hormone transporter. *I Med Genet*; 43 (5) : 457-60.

MARTINEZ-GARAY I, TOMAS M, OLTRA S, RAMSER J2007: A two base pair deletion the PQBP1 gene is associated with microphtalmia , microcephay , and mental retardation *Eur J Hum Genet* ; 15 : 1,29.

MERIENNE K, JACQUOT S, PANNETIER S, ZENIOU M, BANKIER A (1999). A missense mutation in RPS6KA3(RSK2) responsible for non-specific mental retardation. *Nat. Genet*; 22:13-14.

MURRAY A, WEBB J, DENNIS N, CONWAY G, MORTON N 1999, Microdeletions in FMR 2 may be a significant cause of premature ovarian failure.*J. Med. Genet*; 36(10): 767-70.

MANDEL JL 2004. Comparative frequency of fragile-X (FMR1) and creatine transporter (SLC6A8) mutations in X-linked mental retardation. *Am. J. Hum. Genet*;75(4):730-1.

MELONI I, MUSCETTOLA M, RAYMOND M, LONGO I *et al*: FACL4? encoding fatty acid-CoA ligase 4 , is mutated in non spécific X-linked mental retardation. Nat Genet 2002 ; 30 (4) : 346-40.

MOLINARIE F, RIO M, MESKENAITE V 2002. Truncating neurotrypsin mutation in autosomal recessive non-syndromic mental retardation. *Science*; 298: 1779-1781.

MOLINARI F, RIO M, MUNNICH A, COLLEAUX L 2003. Mutations de la neurotrypsine et retard mental. M/S : *Medecine sciences*, *Vol 19*, n°5: 525-527.

MLIKA A, MAZAUBRUN C, RUMAU-ROUQUETTE C 1993. Prévalence des retards intellectuels sévères et des trisomies 21 dans trois générations : 1972,1976 et 1981. *Rev Epidemiol Santé Publique* ; 41 :44-52.

MATSUDA A, SUZYKI Y, HONDA G, MURAMATSU S, MATSUZAKI O, NAGANO Y, DOI T, SHIMOTOHNO K, HARADA T, NISHIDA E, HAYASHI H, SUGANO S (2003). Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappa B and MAPK signaling pathways. *Oncogene* 22 :3307-3318.

MOTAZACKER MM, ROST BR, HUCHO T, GARSHASBI M, KAHRIZI K, ULLMAN R, ABEDINI SS, NIEH SE, AMINI SH, GOSWAMI C, TZSCHACH A, JENSEN LR, SCHMITZ D, ROPERS HH, NAJMABADI H, KUSS AW(2007). A defect in the Ionotropic Glutamate Receptor 6 Gene (GRIK2) is associated with autosomal recessive mental retardation. *Am J Hum Genet* Vol 81(4) : 792-798.

MOLINARI F, FOULQUIER F, TARPEY PS, MORELLE W, BOISSEL S, TEAGUE J, EDKINS S, FUTREAL PA, STRATTON MR, TURNER G, MATTHIJS G, GECZ J, MUNNICH A, COLLEAUX L(2008) . Oligosaccharyl- transferase- subunit mutations in non syndromic mental retardation. *Am J Hum Genet*; 82(5) :1150-7.

MORTON NE (1985) Sequential tests for the detection of linkage.*Am J Hum Genet* 7: 277-318.

MHAMEDI O, KHARRAT M, MRAD R, MAAZOUL F, CHAABOUNI-BOUHAMED H (2011). Analyse génétique et moléculaire du retard mental non syndromique autosomique récessif chez des familles tunisiennes : Exclusion de la liaison pour les gènes GRIK2 et TUSC3. *La Tunisie Medicale* ; Vol 89(n°05) : 479-484.

MORTON NE (1995) Sequential tets for the detection of linkage. *AmJ Hum Genet* 7 :277-318.

MOSER HW (2004) Genetic causes of mental retardation. *Ann.NY.Ac of Sciences*, 1038 : 44-48.

MC LAREN J, BRYSON SE (1987) Review of recent epidemiological studies of mental retardation: prevalence, associated disorders, and etiolog *Am J Ment Retard* 9 : 243-254.

NARAHARA K, KIKKAWA K, MURAKAMI M, HIRAMOTO K, NAMBA H, TSUJI K, YOKOYAMA Y, KIMOTO H (1990). Loss of the 3p25.3 band is critical in the manifestation of del (3p) syndrome : karyotype-phénotype correlation in cases with deficency of the distal portion of the short arm of chromosome3. *Am J Med Genet* ; 35 :269-273.

NAJMABADI H, MOTAZAKER MM, GARSHASBI M, KAHRIZI K, TZSCHACH A, CHEN W, BEHJATI F, HADAVI V, NIEH SE, ABEDINI SS, VAZIFEHMAND R, FIROUZABADI SG, JAMALI P, FALAH M, SEIFATI SM, GRUTERS A, LENZNER S, JENSEN LR, RUSCHENDORF F, KUSS AW, ROPERS HH(2007). Homozygosity mapping in consanguineous families reveals extreme heterogeneity of non syndromic autosomal recessive mental retardation and identifies 8 novel gene loci. *Hum Genet* Vol 121 ; N°1 : 43-48.

OBERLE I, ROUSSEAU F, HEITZ D, 1991. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science;* 252:1097 – 102.

ORRICO A, GALLI L, CAVALIERE ML, (2004). Phenotypic and molecular characterisation of the Aarskog-Scott Syndrome : a survey of the clinical variability in light of FGD1 mutation analysis in 46patients. *Eur. J. Hum. Genet*. 12(1):16 – 23.

OVERHAUSER J, BENGTSSON U, MC MAHON J, 1989. Prenatal diagnosis an carrier detection of cryptic translocation by using DNA markers from the short arm of chromosome 5. *Am J Hum Genet*; 45 :296-303.

OTT J (1991) Analysis of human Genetic Linkage The John Hopkins University Press. Baltimore.

PASSARGE E. in Atlas de poche de génétique. Ed Flammarion.

PROBA K, GSCHWEND TP, SONDERGGER P. Cloning and sequencing of the cDNA encoding human neurotrypsin. Biochim Biophys Acta. 1998;1396:143-7.

RAMSER J, ABIDI FE, BURCKLE CA, LENSKI C, TORIELLO H, WEN G, LUBS HA, ENGERT S 2005. A unique exonic splice enhancer mutation in a family with x-linked mental retardation and epilepsy points to a novel rolr the renin receptor. *Genet* ; 14 (8) : 1019-27.

RAYMOND FL 2006. X-linked mental retardation: a clinical guide. *J. Med. Genet*; 43:193-200.

ROPERS HH, HOELTZENBEIN M, KALSCHEUER V, YNTEMA H 2003. Non-syndromic X-linked mental retardation: where are the missing mutations? *Trends Genet*; 19(6): 316-20.

RAMSER J, WINNEPENNINCKX B, LENSKI C, ERRIJGERS V, PLATZE M 2004: A splice site mutation in t8he smethyltransferase gene FTSJ1 in xp11.23 is associated with non-syndronic mental retardation in a large Belgian family (MRX9). *J.Med.Genet* ; 41 (9) : 6790-83.

ROPERS HH, HAMEL BEN C.J 2005. X-linked mental retardation. *Nature reviews Genet*, Vol 6:46-87.

RAYMOND FL, TARPEY P 2006. The genetics of mental retardation. *Hum. Mol. Genet* ; Vol 15, Review Issue n°2 :R110-R116.

RUTTER M, TIZARD J, YULE W, GRAHAM P, WHITHMORE K 1976. Isle of wight studies (1964-1974). *Psychological Medicine* ; 6 : 313-32.

RAYNHAM H, GIBBON SR, FLINT G, HIGGS D 1996 . The genetic bases of mental retardation. *Q F Med*;89 :169-75.

ROYER-POKORA B, KUNKEL LM, MONACO AP, GOFF SC, NEWBURGER PE, BAHEHNER RL, COLE FS, CURNUTTE JT, ORKIN SH (1986). Cloning the gene for an inherited human disorder-chronic granulomatus disease on the basis of its chromosomal location. *Nature* 322: 32-38.

ROBSON KJ, CHANDRA T, MACGILLIVRAY RT, WOO SL (1982). Polysome

immunoprecipitation of phenylalanine hydroxylase m RNA from rat liver and cloning of its cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 4703-4705.

ROYER-POKORA B, KUNKEL LM, MONACO AP, GOFF SC, NEWBURGER PE, BAHEHNER RL, COLES FS, CURNUTTE JT, ORKIN SH (1986) Cloning the gene for an inherited human disorder-chronic granulomatous disease on the basis of its chromosomal location. *Nature* 322 :32-38.

ROBSON KJ, CHANDRA T, MAC GILLIVRAY RT, WOO SL (1982) Polysome immunaprécipitation of phenylalanine hydroxylase mRNA from rat liver and cloning of its cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 79 : 4701-4705.

ROELEVED N, ZIELHUIS GA (2008) The prevalence of mental retardation : a critical review of recent literature. *Devl Med-Chil Neurol.* Vol39 (2) : 125-132.

ROGERS RC, STEVENSON RO, SIMENSEN RJ, HOLDEN KR, SCHWARTZ CE (2008) Finding new etiologies of mental retardation and hypotonia : X marks the spots. *Dev Med-Child Neurol* Vol 50, Issue 2 : 104-111.

STEVENSEN RE, SCHWARTZ CE, SHOER RL (2000) X-Linked Mental Retardation, ed *Oxford*.

SUTHERLANDGR., 1977 Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. *Science*; 197: 265-6.

SZCZALUBA K, NAWARA M, POIRIER K 2006: Genotype-phenotype associations for ARXgene duplication Neurology ;2073-2075.

SHOICHET SA, HOFFMAN K, MENZEL C, TRAUTMANN U 2003: Mutations in the ZNF41 gene are associated with cognitive deficits : identification of a new candidate for X-linked mental retardation. *Am.J.Hum Genet*, 73 (6) : 1341-54.

STEIN Z, SUSSER M, SAENGER G, 1976. Mental retardation in a national poputation of young men in the netherlands II prevalence of mild mental retardation. *Am J Epidemiol*;104:159-69.

SLAVOLINEK A, ROSENBERG M, KNIGHT S, 1999 Screening for submicroscopic chromosome rearrangements in children with idiopathic MR using microsatellite markers for the chromosome telomeres. *J Med Genet* ;36 :405-11.

SCRIVER CR, WATERS PJ (1999). Monogenic traits are not simple : lessons from

phenylketonuria. *Trends Genet* 15 :267-272.

SATORU H, BOISSEL S, ZARHRATE M, RIO M, MUNNICH , EGLY JM, COLLEAUX L (2011) MED 23 Mediator subunit links intellectual disability to dysregulation of immediate early gene expression. *Science*, 26Aout 2001. Vol 333 n°6046p1161-1163.

STEVENSON RE, PROCOPIO-ALLEN AM, SCHROER RJ, COLLINS JS (2003) Genetic Syndromes among individuals with mental retardation. *Am J medic genet* Vol 123A, Issue 1 : 29-32.

TARPEY P, PARNAU J, BLOW M, WOFFENDIN H, BIGNELL G, COX C, COX J 2004: Mutations in the DLG3 gene cause non syndromic X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet*, 75(2) : 318-24.

TAKAHASHI N, HASHIDA H, ZHAO N, MISUMI Y, SAKAKI Y, 1995. High density cDNA filter analysis of the expressions profiles of the genes preferentially expressed in human brain. *Gene* ; 164 : 219-27.

UYGUNER O, KAYSERILI H , LI Y , KARAMAN, 2007. A new locus for autosomal recessive non – syndromic mental retardation maps to 1p21.1- p13.3.*Clin Genet* ; 71 : 212 – 219 .

WOLFER DP, LANG R, CINELLI P, MADANI R, SONDEREGGER P, 2001. Multiple roles of neurotrypsin in tissue morphogenesis and nervous system development suggested by the mRNA expression pattern. *Mol Cell Neurosci* ;18 :407-33.

WILKIE AOM, BUCKLE VJ, HARRIS PC 1990. Clinical features and molecular analysis of the X thalassemia/mental retardation syndrome : I. Cases due to deletions involving chromosome band 16p13.3. *Am J Hum Genet* ; 46 : 1112-26.

WIRTH J, NOTHWANG HG, HAAF T 1999. Systematic characterization of disease associated balanced chromosome rearrangements by FISH : cytogenetically and genetically anchored YACs identify microdeletions and candidate regions for mental retardation genes. *J Med Genet* ; 36 :271-8.

YLISAUKKO-OJA T, REHNSTORM k, VANHALA R, 2004: identification of two AGTR2 mutations in male patients with non-syndromic mental retardation. *Hum.Genet* ; 114 (2) : 211-3.

# Annexes

## ARTICLE ORIGINAL

# Analyse génétique de six familles Algériennes avec retard mental non spécifique autosomique récessif

Nadia Guessibia[1,2], Noureddine Sarrai[3], Nassima Methari[4], Bachir Ridouh[4], Habiba Chaabouni Bouhamed[1]

[1] *Laboratoire de Génétique Humaine Université Tunis El Manar, Faculté de médecine Tunis, Tunisie.*
[2] *Université Mouloud Maamri, Tizi-Ouzou Algérie.*
[3] *Hôpital El Affroun Blida ; Algérie.* - [4] *CHU Frantz Fanon. Blida ; Algérie.*

*N. Guessibia, N. Sarrai, N. Methari, B. Ridouh, H. Chaabouni Bouhamed*

Analyse génétique de six familles Algériennes avec retard mental non spécifique autosomique récessif

LA TUNISIE MEDICALE - 2011 ; Vol 89 (n°05) : 466 - 470

**RÉSUMÉ**

**Prérequis :** Le retard mental est le handicap majeur le plus fréquent, 1 à 3% dans la population générale. Les progrès récents en cytogénétique et en biologie moléculaire ont permis d'identifier de nombreux gènes responsables du retard mental, notamment dans les formes autosomiques.

**But :** Rechercher une liaison génétique aux loci impliqués dans le retard mental non spécifique transmis en autosomique récessif dans des familles Algériennes avec plusieurs membres atteints de cette pathologie.

**Méthodes :** L'étude a concerné 34 individus dont 15 malades, appartenant à six familles algériennes consanguines. Les patients sont atteints d'un retard mental non spécifique de transmission autosomique récessive. Une étude de liaison génétique a été réalisée pour 4 loci connus: 3p25-pter ; 4q24-q25, 19p13.12 et 1p21.1-p13. Le génotypage a été réalisé sur un analyseur automatique à ADN et l'analyse effectuée grâce au programme Gene Mapper software.

**Résultats :** l'étude réalisée a permis d'exclure l'ensemble de ces locus pour 3 familles, néanmoins la liaison d'une famille au locus 1p21.1-p13.3 est possible.

**Conclusion :** L'étude de liaison de 4 familles Algériennes avec retard mental autosomique récessif qui montre l'absence de liaison pour 3 loci connus, confirme l'hétérogénéité génétique de cette pathologie et nous incite à poursuivre la recherche de gènes grâce à ces familles informatives.

**Mots-clés**

Retard mental ; autosomique récessif ; étude de liaison ; Algérie ; génotypage

*N. Guessibia, N. Sarrai, N. Methari, B. Ridouh, H. Chaabouni Bouhamed*

Linkage analysis of six Algerian families with autosomal recessive non specific mental retardation

LA TUNISIE MEDICALE - 2011 ; Vol 89 (n°05) : 466 - 470

**SUMMARY**

**Background:** Mental retardation is one of the most frequent major handicap, with a 1-3 % frequency in the general population. The recent progress of molecular biology and cytogenetic allowed to identify new genes for non syndromic autosomal recessive mental retardation.

**Aim:** To seek a genetic linkage to the loci implied in the nonspecific mental retardation transmitted into autosomal recessive (ARNSMR) in Algerian families with several affected members and to make the Genetic analysis of ARNSMR for 4 known loci: 3p25-pter; 4q24-q25, 19p13.12 and 1p21.1-p13.

**Methods:** The study concerned 34 individuals including 15 patients, belonging to six consanguineous Algerian families. Genotyping was made using polymorphic microsatellite markers and the analysis carried out thanks to the program Gene Mapper software. Statistical analyses were validated using the Fast Link programme of the Easy linkage software (V4:00 betas).

**Results:** The study carried out made it possible to exclude linkage of all loci for 3 families, nevertheless the linkage of one family to the locus 1p21.1-p13.3 remains possible.

**Conclusion:** The absence of linkage of 4 Algerian families with autosomal recessive mental retardation to 3 well known loci, confirms the genetic heterogeneity of mental retardation. We have to pursue research of candidate genes by whole genome scan.

**Key-words**

Mental retardation; autosomal recessive; linkage analysis; Algeria; genotypin

Le retard mental est défini par l'Association Américaine de Psychiatrie [1] comme "un fonctionnement intellectuel général significativement inférieur à la moyenne, qui s'accompagne de limitations significatives du fonctionnement adaptatif dans les secteurs d'aptitude, tel que l'autonomie, l'apprentissage scolaire, la vie sociale ; le tout doit survenir avant l'âge de 18 ans".
Le retard mental est défini par un quotient intellectuel (QI) <70, et il affecte de 2 à 3% de la population. Il peut résulter de multiples causes environnementales et génétiques [2].
Le retard mental peut représenter un symptôme dans un ensemble clinique complexe, il s'agit d'un retard mental syndromique (RMS) ou constituer la pathologie, et c'est le retard mental non syndromique ou non spécifique (RMNS). Parmi les causes génétiques, le retard mental non syndromique à transmission autosomique récessive (RMNS-AR) compte approximativement 25% de tous les patients avec un RMNS [3]. Bien que de nombreux gènes liés à l'X aient été identifiés comme étant une cause de RMNS [4, 5, 6], peu de loci autosomiques sont impliqués dans le RMNS-AR [7] et à ce jour 6 gènes ont été identifiés. Dans ce travail nous rapportons les résultats de l'analyse de liaison de 6 familles algériennes à 4 locus ; le locus du gène PRSS12, en 4q25-q26 ; le locus du gène CRBN en 3p26.2 ; le locus du gène CC2D1A en 19p13.12 et le locus MRT4 situé sur le bras court du chromosome 1 en 1p21.1-p13.3.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous avons recensé six familles Algériennes issues de la région nord-est du pays regroupant plusieurs membres porteurs d'un retard mental. Il s'agit de familles non apparentées et les branches étudiées comportaient chacune au moins deux patients atteints d'un retard mental non spécifique. Tous les patients sont nés de parents normaux et une consanguinité est présente dans cinq des six familles. Les 15 patients retenus pour l'étude ont été examinés. Il s'agit de 8 garçons et de 7 filles. L'âge des patients au moment de l'examen était compris entre 6 et 38 ans. Chez tous les patients nous n'avons pas noté de dysmorphie faciale spécifique ; leurs mensurations et en particulier le périmètre crânien étaient normaux. L'examen neurologique était normal et aucun patient ne présentait de troubles psychiatriques. Les fonctions sensorielles étaient normales. Le quotient intellectuel était de moyen à sévère.
Les investigations biologiques ont été réalisées chez tous les patients : il s'agissait de l'étude du caryotype en bandes R (résolution 600 bandes) et d'un screening métabolique ; aucune anomalie n'avait été retrouvée.
Au moins un membre atteint de chaque famille a bénéficié d'un scanner cérébral qui n'avait pas décelé d'anomalie cérébrale dans tous les cas.
Un total de 34 individus, regroupant 6 couples de parents, 7 germains sains et les 15 patients ont été retenus pour cette étude. Un consentement a été obtenu auprès des germains adultes ainsi qu'auprès des parents pour eux-mêmes, les germains mineurs et les patients.

**Etude des marqueurs polymorphes:**
Un prélèvement de sang périphérique a été effectué pour toutes les personnes retenues dans l'étude et l'ADN a été extrait suivant le procédé de l'extraction à la protéinase K. Le contrôle de la qualité et de la quantité d'ADN a été réalisé grâce à un spectrophotomètre de nouvelle génération: Nano Drop ND_1000 (Nano Drop Technologies, Wilmington, DE, USA).
Les marqueurs utilisés sont des microsatellites sélectionnés à partir de la base de données du génome humain ENSEMBL (http://www.ensembl.org). Le choix des 10 marqueurs fluorescents utilisés s'est basé sur la connaissance des loci impliqués. Nous avons choisi deux marqueurs par locus pour les gènes identifiés : CRBN en 3p25-pter ; PRSS12 en 4q24-q25 et CC2D1A en 19p13.12 ; alors que pour le locus MRT4 en1p21.1-p13.3, nous avons choisi quatre marqueurs.
La séquence des oligonucléotides correspondant à ces marqueurs ainsi que leurs tailles et le Tm sont résumés dans le tableau 1.
L'amplification des marqueurs est réalisée par PCR (Réaction de Polymérisation en Chaîne). Toutes les réactions PCR ont été effectuées dans un aliquot de 50$\mu$l contenant 100 ng d'ADN génomique, 5 $\mu$l de tampon 10X, un mix dNTPs (0.2mM chacun), 2.5 mM MgCl2, 1 $\mu$M de chaque primer, Forward et Reverse, 0.5 UI de Taq polymérase (In vitrogen, Foster City,

**Tableau 1 :** Schéma des primers utilisés pour l'amplification des régions du génome étudiées par PCR

| Locus | Taille | Amorce sens | Amorce anti-sens | Tm°C |
|---|---|---|---|---|
| D3S3525 | 119 | GATTTGGGACTTGTCAGC | GTGTAATCTCCTGTAGCAGAGTTC | 55 |
| D3S3050 | 227 | TGGTGGTATGCATTTGTCAG | ATTCCCTGACTTCAAGTGCA | 53 |
| D4S597 | 222 | CGGCACTAGTCACATACCTGTTTA | TGGATAACATAATCTGCAATTTGCCA | 55 |
| D4S2788 | 179 | GCAATTGGGAGAGGAACTGA | ACAATCTGTTTCTGATTGCACA | 53 |
| D19S840 | 184 | ATAGGCCAAGACTGTCTAAAACAA | GCCCTAACTGCTGTAAGAGAACT | 55 |
| D19S994 | 276 | CGTACACACACTCAGGCTTCA | CCCATCCTGCTGGATGTC | 58 |
| D1S429 | 213 | GGTCAAACAGAGAGCAATTG | CAAACCTGCAGTATCTCTAAGG | 55 |
| D1S1166 | 205 | CTTGGCCTACATTTATACTCT | AAGGTCAAATCCCTGTAACAA | 53 |
| D1S2726 | 276 | CCACAAGTTGCAGGGTT | CTGGATGGATGCTCAAATAC | 53 |
| D1S187 | 83 | AGGTGTGAGCTGTTCCCATA | GCAAGACAGCTGCCTCATA | 51 |

CA, USA). Les conditions de PCR étaient: 1 cycle à 95°C pendant 5 min, 30 cycles à 94°C pendant 30s, température de fusion spécifique pendant 30s, et 72°C pendant 30s, et un cycle final d'extension à 72°C pendant 7 min. Les réactions PCR ont été faites dans un thermocycleur Perkin Elmer System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA.2400). Une électrophorèse des produits d'amplification est effectuée dans un séquenceur capillaire ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, Foster City, USA) et analysés avec le programme Gene Mapper software (Applied Biosystems, Foster City, USA).

**Analyse statistique et étude de liaison**

*Informativité des marqueurs :* Un marqueur est considéré informatif lorsque l'un au moins des deux parents a un génotype hétérozygote pour ce marqueur.

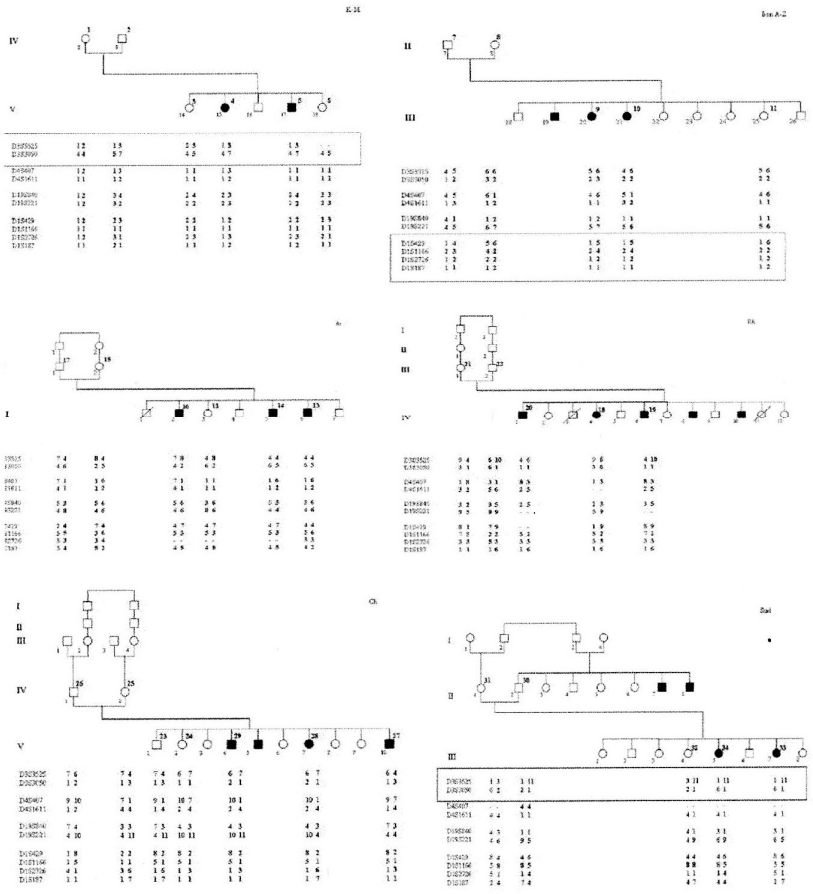
*Analyse de liaison :* L'analyse lod score est une méthode paramétrique basée sur le principe de vraisemblance pour estimer le taux de recombinaison et tester la liaison génétique entre deux loci en l'occurrence un locus marqueur et un locus de maladie (analyse deux points).

La vraisemblance (L) du pedigree est calculée entre le locus de la maladie et le locus marqueur pour une valeur X du taux de recombinaison et pour =0.5, en se basant sur le nombre d'individus recombinants et non recombinants. Dans ce travail, nous avons utilisé le programme Fast Link du Linkage Plus software package (v4.00 beta).

## RÉSULTATS

L'étude de la ségrégation du phénotype retard mental dans ces familles nous a permis de retenir le mode de transmission autosomique récessif dans les six familles. Les patients nés de parents normaux et apparentés sont également répartis entre les deux sexes. La lecture des génotypages effectués par le séquenceur nous a permis de déterminer pour chaque locus les haplotypes de chaque individu étudié dans chacune des six familles. Les résultats des haplotypes obtenus sont rapportés sur la figure 1.

**Figure 1 :** . Répartition des haplotypes des 10 marqueurs chez les individus étudiés portés sur les généalogies des 6 familles. Fam 1 :M-K ; Fam2 :Ben A-Z ; Fam3 :Ar ; Fam4 :KH; Fam5:Ch; Fam6: Sad.



L'analyse des résultats a montré que tous les marqueurs étaient informatifs pour toutes les familles à l'exception des marqueurs du locus 4q25-q26 pour la famille 6.
L'analyse de la ségrégation des haplotypes a montré une exclusion de tous les locus pour les familles 3, 4 et 5.
Pour les familles 1 et 6 une exclusion ne peut être retenue pour le locus 3p26.2 et le calcul du lod score donne un Zmax= 1.46 pour une valeur ı=0.
Pour la famille 2, une liaison au locus 1p21.1-p13.3 ne peut être exclue étant donné la présence d'un haplotype commun chez les 2 patients et qui est différent de celui de leur germain sain. Le calcul du lod score donne un Zmax= 2.01 pour une valeur ı=0.

## DISCUSSION

Le retard mental est une pathologie hétérogène tant sur le plan clinique que sur le plan génétique. Notre intérêt porte essentiellement sur le retard mental autosomique récessif non syndromique. L'évolution dans la connaissance des gènes responsables de cette forme héréditaire reste encore lente malgré les études réalisées à partir de familles consanguines. A ce jour 16 loci sont cernés dont 6 gènes identifiés (CRBN, CC2D1A, PRSS12, GRIK2, TuSC3 et TRAPPC9) [7-9]. Dans ce travail nous présentons les résultats de l'analyse de liaison à 4 locus de 6 familles Algériennes. Le locus du gène PRSS12, en 4q25-q26, décrit initialement dans une famille Algérienne [10] est exclu dans toutes nos familles étudiées ; ce gène code pour une protéine, la neurotrypsine fortement exprimée dans le cerveau ; elle joue un rôle principal dans le maintien de l'équilibre de certaines fonctions cognitives [11, 12]. Le second locus en 3p26.2 est décrit par Higgins dans une famille Américaine qui a permis également l'identification du gène CRBN et son implication dans le RMNS-AR [13, 14]. Ce gène code pour une protéine Cereblon qui intervient dans le contrôle du transport membranaire des ions Ca2+ et K+, elle est fortement exprimée dans les divers tissus, cerveau en particulier [15]. Le gène CC2D1A est localisé sur le chromosome 19 en 19p13.12 chez une grande famille Arabo-israélienne [16,17]. Aucune liaison n'est retenue pour nos familles étudiées. Le gène CC2D1A code pour une protéine de 950 aa qui intervient dans la régulation négative du récepteur 5-HT1A de la basale des neurones [18], ce dernier contrôle la maturation dendritique dans l'hippocampe et la neurogenèse adulte [19].
Enfin, le quatrième locus est situé sur le bras court du chromosome 1, en 1p21.1-p13.3 décrit dans une grande famille consanguine Turque [20], malgré un faible lod score, une liaison de la famille 2 à ce locus ne peut être complètement exclue. Trois autres gènes impliqués dans le RMNS-AR ont été récemment décrits. Il s'agit des gènes GRIK2, TUSC3 et TRAPPC9. Le gène GRIK2, localisé 6q16.1-q21 est identifié en 2007 chez une famille Iranienne [21]. Ce gène code pour une protéine GLUk16, une sous-unité de récepteurs kainate (KARs) hautement exprimés dans le cerveau ; elle jouerait le rôle d'un récepteur pour la glutamate, potentiel neurotransmetteur excitateur dans le système nerveux central située essentiellement au niveau de la membrane synaptique [22]. Le gène TUSC3 localisé en 8p22 est identifié en 2008 dans une famille Iranienne de RMNS-AR [8] et dans une famille française [23]. Ce gène code pour une protéine, la N33 qui constitue une unité du complexe enzymatique l'oligosaccharyltransférase, enzyme exprimée essentiellement au niveau du cerveau, le cœur, le pancréas, les testicules et la rate et qui contrôle certaines modifications post-traductionnelles comme la glycosylation, ultime étape qui confère à la protéine néo synthétisée une structure fonctionnelle. Le gène TRAPPC9 (trafficking protein particle complex 9), localisé en 8q24.3 est identifié dans quatre familles une Israélienne Arabe, une Tunisienne, une Pakistanaise et une Iranienne [24-26]. Ce gène exprimé dans les cellules du cortex cérébral, code pour une protéine NIKK and IKK-Beta-binding protein qui joue un rôle fondamental dans la bonne signalisation du NF-kappaB. Les familles étudiées proviennent d'une même région de l'Algérie sur un rayon de 100 Km environ, il s'agit de familles multiplex. La recherche d'une liaison à ces 4 locus décrits dans le RMNS-AR a permis d'exclure l'ensemble de ces locus pour 3 familles. Les marqueurs utilisés, pour la plupart intragéniques étaient informatifs.
Néanmoins la liaison d'une famille (famille2) au locus 1p21.1-p13.3 est possible malgré un lod score inférieur à 3; toutefois le séquençage du gène s'imposera dès son identification. Alors que pour les familles 1 et 6, la liaison au locus 3 reste peu probable étant donné le faible lod score et l'absence d'homozygotie au niveau de l'haplotype partagé par les patients malgré la présence d'une consanguinité dans ces deux branches. Pour les familles non liées, une étude par genome scan demeure le meilleur moyen qui nous aidera à définir la ou les régions candidates au niveau du génome impliquées dans la pathologie du RMNS-AR.

**Remerciements**
*Nous remercions les patients et leurs familles pour avoir accepté de contribuer à ce travail.*

## Références

1. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 4th.Ed. Washington DC: The American Psychiatric Association 1994.
2. Shevell M, Ashwal S, Donley D, et al. Practice Committee of the Child Neurology Society. Practice parameter: evaluation of the child with global developmental delay: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology; Practice Committee of the Child Neurology Society. Neurology. 2003;60:367-80.
3. Rio M, Colleaux L, Sanlaville D, Borck G, Molinari F, Munnich A. Approches diagnostic chez les patients atteints de retard mental sévère et syndromique. Arch Pediatr. 2004 ;11:566-568.
4. Chelly J. Retards mentaux liés au chromosome X. Médecine/Sciences 2000; 16 :363-367.

5. Ropers HH, Hamel BC. X-Linked mental retardation. Nat Rev Genet. 2005;6:46-57. Review.
6. Ropers HH. X-linked mental retardation: many genes for a complex disorder. Curr Opin Genet Dev. 2006;16:260-9.
7. Basel-Vanagaite L. Genetics of autosomal recessive non-syndromic mental retardation: recent advances. Clin Genet. 2007;72:167-74.
8. Garshasbi M, Hadavi V, Habibi H, et al. A defect in the TuSC3 gene is associated with autosomal recessive mental retardation. Am J Hum Genet 2008;82: 1158-1164.
9. Rafiq MA, Ansar M, Marshall CR, et al. Mapping of three novel loci for non- syndromic autosomal recessive mental retardation (NS-ARMR) in consanguineous families from Pakistan. Clin Genet. 2010; 78: 478-83.
10. Molinari F, Rio M, Meskenaite V, et al. Truncating neurotrypsin mutation in autosomal recessive non syndromic mental retardation. Science 2002; 298: 1779-81.
11. Didelot G, Molinari F, Tchenio P, et al. Tequila, a neurotrypsin ortholog, regulates long-term memory formation in Drosophila. Science 2006;313: 851-53.
12. Mitsui S, Yamaguchi N, Osako Y, Yuri K. Enzymatic properties and localization of motopsin (PRSS12), a protease whose absence causes mental retardation. Brain Res 2007; 1136: 1-12.
13. Higgins J, Rosen D, Loveless J, Clyman J, Grauy M. A gene for non syndromic mental retardation maps to chromosome 3p25-pter. Neurology 2000;55: 335-40.
14. Higgins J, Pucilowska J, Lombardi R, Rooney J. A mutation in a novel ATP-dependent Lon protease gene in a kindred with mild mental retardation. Neurology 2004;63:1927-1931.
15. Xin W, Xiahua N, Peilin C, Xin C, Yaqiong S, Qihan W. Primary function analysis of human mental retardation gene CRBN. Mol Bio Rep 2008;35: 251-6.
16. Basel-Vanagaite L, Alkelai A, Straussberg R, et al. Mapping of a new locus for autosomal recessive non-syndromic mental retardation in the chromosomal region 19p13.12-p13.2: further genetic heterogeneity. J Med Genet 2003; 40:729-32.
17. Basel-Vanagaite L, Attia R, Yahav M, et al. The CC2D1A, member of a new gene family with C2 domains, is involved i autosomal recessive non-syndromic mental retardation. J Me Genet 2006; 43: 203-210.
18. Ou XM, Lemonde S, Jafar-Nejad H, et al. Freud-1: a neuron calcium-regulated repressor of the 5-HT1A receptor gene. Neurosci 2003: 23: 7415-7425
19. Brezun JM, Daszuta A. Depletion in serotonin decrease neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone c adult rats. Neuroscience 1999:89: 999-1002.
20. Uyguner O, Kayserili H, Li Y, et al. A new locus for autosom recessive non-syndromic mental retardation maps to 1p21.1 p13.3. Clin Genet 2007; 71:212-19.
21. Motazacker MM, Rost BR, Hucho T, et al. A defect in th ionotropic glutamate receptor 6 gene (GRIK2) is associated wit autosomal recessive mental retardation. Am J Hum Genet. 200 81:792-8.
22. Lerma J. Roles and rules of kainate receptors in synapti transmission. Nat Rev Neurosci 2003;4: 481-95
23. Molinari F, Foulquier F, Tarpey PS, et a Oligosaccharyltransferase subunit mutations in non syndromi mental retardation. Am J Hum Genet 2008;82: 1150-57.
24. Mochida GH, Mahajnah M, Hill AD, et al. A truncating mutatio of TRAPPC9 is associated with autosomal-recessive intellectu disability and postnatal microcephaly. Am J Hum Gene 2009;85:897-902.
25. Philippe O, Rio M, Carioux A, et al. Combination of linkag mapping and microarray-expression analysis identifies NF kappaB signaling defect as a cause of autosomal-recessive ment retardation. Am J Hum Genet. 2009; 85:903-8.
26. Mir A, Kaufman L, Noor A, et al. Identification of mutations i TRAPPC9, which encodes the NIK- and IKK-beta-bindin protein, in nonsyndromic autosomal-recessive mental retardatior Am J Hum Genet. 2009; 85:909-15.

# ETUDE GENETIQUE DES RETARDS MENTAUX

(seuls les items soulignés et suivis de ** sont nécessaires au protocole d'inclusion)
Nom : …….. prénom : ……..…..……. Né(e) le : ……
Médecin responsable : …….. N° de dossier : ……

## 1) ACTE FAMILIAUX :

1- Arbre généalogique** (page 2)

2- Environnement familial :

- Lieu de vie de l'enfant (domicile) : ……..
- Origine géographique : ……
- Profession des parents : ……..
- Mère : ATCD obstétricaux, dont fausses couches : ……

## 2) ATCD PERSONNELS :

**1- Grossesse ** :**

- Fécondation (+/-FIV homo ou hétérologue) : ……
- Sérologies maternelles (toxoplasmose, rubéole) : ……
- Toxiques (toxicomanie, alcool, médicaments) : ……..
- Pathologie maternelle (diabète, HTA, épilepsie…) : ……..
- MAP (menace d'accouchement prématuré) : ……..
- SFC (souffrance fœtale chronique), croissance fœtale : ……..

**2- Accouchement** : (lieu)**

- Terme : …….. PN :…… TN :…… PCN :……..
- Voie basse : …… Forceps :…….. présentation : ……
- Césarienne (indication) : ……..
- SFA (souffrance fœtale aiguë) : ……..
- IMF (infection maternofoetale) : ……
- Ictère prolongé (traitement) : ……
- Détresse néonatale (réanimation) : ……..

3- **Courbes de croissance :** joindre une courbe de croissance de poids, tailles, PC.

4- **Maladies générales sévères** ** aigués ou chroniques (neuro ou extra neurologiques).

# ARBRE GENEALOGIQUE

Eléments à préciser sur l'arbre : …….
-nom, prénom, sexe, date de naissance +/- décès, de tous mes membres, y compris des frères et sœurs des parents et leurs enfants.
-pour chaque sujet, préciser particulièrement le niveau scolaire actuel ou maximum atteint.
-noter les maladies affectants les parents ou la fratrie (retard mental, autres pathologies)
-rechercher une consanguinité éventuelle.

# DEVELOPPEMNT PSYCHOMOTEUR :

1- **Age d'acquisition** ** (puis +/- âge de perte de l'acquisition) :

……..

- Posture : - tenue de tête : ……
  -tenu assise sans appui : ……
  - marche : …….
- Eveil : -poursuite oculaire :……
  -sourire réponse : ……
  -préhension volontaire : ……
- Langage : -1$^{èr}$ mots signifiants ……. association de deux mots:……
  -phrases simples :…….
- Autonomie : -propreté :…… -repas :…… -habillage :……..

**2- Mode évolutif probable du retard psychomoteur** : A ou B**

A- Retard psychomoteur non progressif : maladie fixée, sans aggravation

B- Régression psychomotrice : maladie progressive (date de début).

## IV/ **EVALUATION DY RETARD MENTAL:**

Mesure du Quotient Intellectuel.

-sévérité du retard (classification OMS).

- Retard mental « léger » : ……..
- Retard mental « moyen » : ……..
- Retard mental « sévère » : ……
- Incassable : …….

# V/ EXAMEN CLINIQUE :

**1- Signes neurologiques :**

- Déficit moteur général (hémiplégie, diplégie) : ……
- Signe extrapyramidal (dystonie, dyskinésie, rigidité, choréathétose) :…….
- Ataxie syndrome cérébelleux : ……
- Atteinte neuromusculaire : ……
- Tronc cérébral et paires crâniennes : ……

**2- Epilepsie :**

- Convulsion occasionnelles :……. -syndrome épileptique :……
- Type de crises : ……. –traitement :……

**3- Troubles psychiatriques et du comportement :**

- Hyperkinésie :……. –agressivité : ……
- Autre : ……. – autisme :…….

**4- Fonctions sensorielles** :**

- Œil : -troubles de réfraction, cristallin : ……
  -mouvements oculaires anormaux :……
  -oculomotricité, paralysies de fonctions :……
  -FO ( atrophie optique, rétinopathie) : ……
  - +/-ERG, PEV :……
- Oreille : - type de surdité (uni ou bilatérale, transmission ou perception) :……
  -seuil audiométrique +/-PEA-TC : ……..

5- **Signes physiques :** joindre des **photographies** du visage F+P, mains, pieds, et corps entier F+P

- Age : …… poids : …… taille : …….. PC (avec DS) : …….
- Forme du crâne : ……..
- Visage : ……
- Rachis :……
- Thorax : ……
- Mains : ……
- Pieds : ……
- Organes génitaux : (taille des testicules)……
- Hépato et/ ou splénomégalie : ……
- Peau : troubles de pigmentation, élasticité : ……
- Malformations viscérales : ……

# BIOLOGIE

**1- Bilan sanguin usuel :**

- NFS
- ure2
- glycémie
- bilan thyroïdien

**2- caryotype**

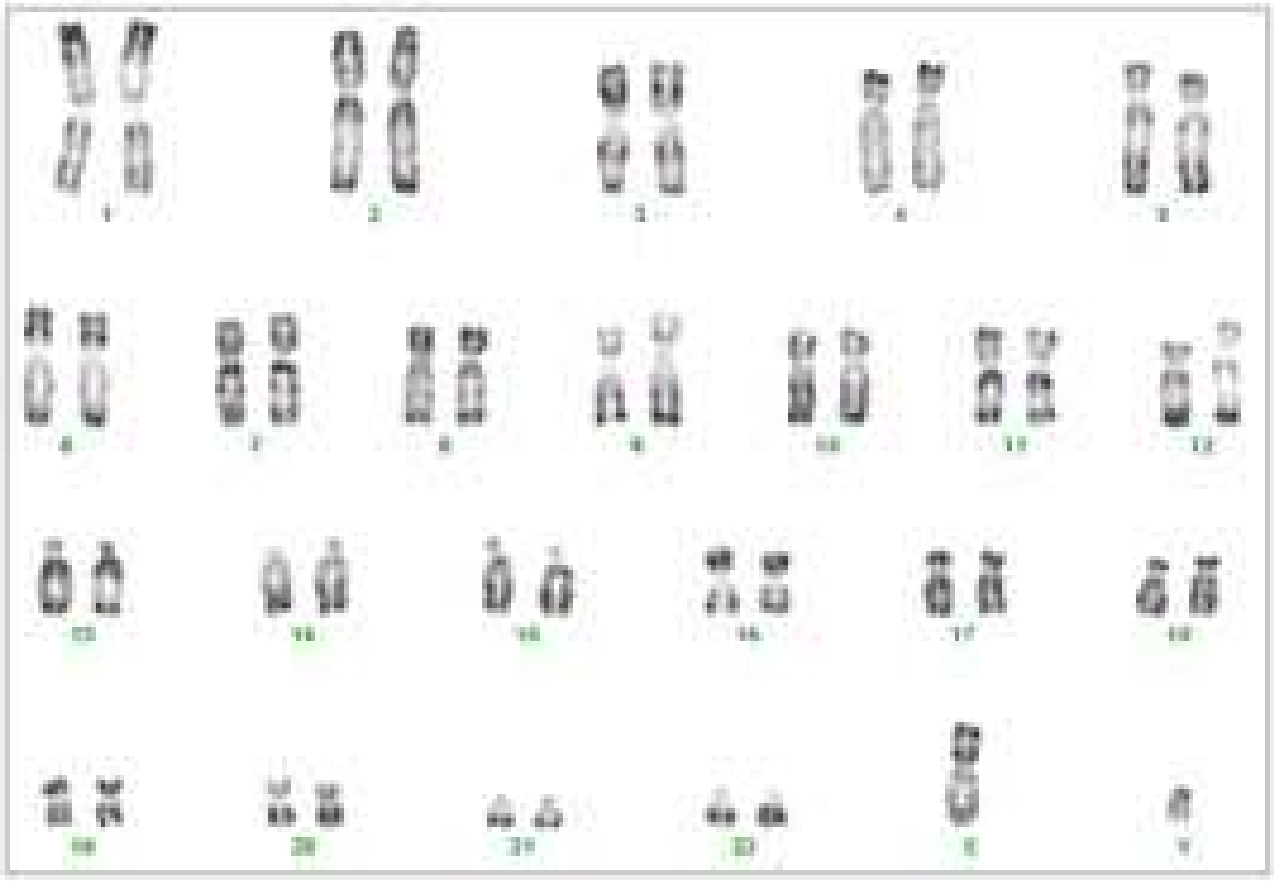
**3- recherche xfragile : cytogénétique et/ou moléculaire**

**4- screening urinaire**

**VII/ Imagerie :**

**5- IRM cérébrale**

**6- scanner**



**Caryotype masculin standard en bandes R**