

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA
FACULTE DES SCIENCES AGRO-VETERINAIRES ET BIOLOGIQUES



Mémoire de Master

Option : Génétique et Physiologie

**ETUDE GENETIQUE ET MOLECULAIRE DU
RETARD MENTAL AUTOSOMIQUE RECESSIF
NON-SPECIFIQUE.**

Présenté par : M^{lle} SLIMANA Imene.

Soutenu publiquement le : 24/06/2013.

Devant le jury :

-Mme SAIDI.F	Professeur	USDB	Présidente
-Mme GUESSAIBIA.N	MCB	USDB	Promotrice
-Mme MEKLAT.A	MCB	USDB	Examinatrice
-Mme CHERRALLAH.A	MAA	USDB	Examinatrice

Remerciements

En préambule à ce manuscrit de mémoire, je tiens à remercier sincèrement l'ensemble des personnes ayant permis sa réalisation et en particulier :

A madame le professeur Habiba CHAABOUNI BOUHAMED

Pour m'avoir fait l'honneur de m'accueillir et de diriger la partie pratique de ce mémoire.

Pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail, pour votre disponibilité, vos conseils et votre aide qui ont permis son aboutissement.

Veillez trouver dans ce travail l'expression de mon profond respect.

Sincères remerciements.

A madame Nadia GUESSAÏBIA

Pour m'avoir fait l'honneur de me confier et de diriger ce mémoire.

Pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail, pour votre disponibilité, vos conseils, votre relecture attentive et votre aide qui ont permis son aboutissement.

Veillez trouver dans ce travail l'expression de mon profond respect.

Sincères remerciements.

A monsieur Ramdan MOHAMED-SAID et madame le professeur Fayrouz SAIDI

Pour votre confiance, d'avoir accepté un jour de me donner ma chance pour me mettre sur les rails, votre patience au jour le jour, votre pédagogie et de m'avoir guidé durant mes premiers pas au sein des affaires réglementaires avec bienveillance.

A mademoiselle Manel CHOGRANI

Merci pour votre confiance, votre bonne humeur et d'avoir pris du temps de me former.

J'en suis sincèrement reconnaissante.

A l'équipe du laboratoire de génétique humaine de la faculté de médecine de Tunis

A monsieur Maher KHARAT, Manel, Imen, Wided, Awatef

Pour votre accueil, cette bonne ambiance et d'avoir pris du temps pour me former.

A ma mère, au souvenir de mon père, mes frères, mes belles sœurs et mon neveu adoré

Merci de m'avoir supporté, soutenu, aidé et encouragé durant toutes ces années d'études.

Recevez ce mémoire en guise de remerciements et témoignage de mon amour.

Merci maman de m'avoir encouragé et soutenu durant tout le parcours, j'en suis sincèrement reconnaissante.

A tous mes amis de longue date,

Yasmine, Imen, Amina, Marwa, Isma, Yasmine H, Jugurtha

Merci pour votre présence, votre écoute durant toutes ces années.

A mes amis de la faculté,

Amina, Imen, Louiza, Chahra, Yacine, Chahinez, Melissa, Hichem, Karima B, Karima

Merci à tous de m'avoir accompagné durant tout ce chemin, pour votre présence, votre écoute durant toutes ces années.

Que notre amitié perdure encore de longues années.

A toutes les personnes qui ont quelque chose à voir de près ou de loin avec ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

-Tous les enfants atteints d'une déficience intellectuelle.

-Mon encadreur, Madame Nadia Guesaïbia.

-Notre chef d'option, Monsieur Ramdan Mohamed-Said.

-Notre chef de département, madame le professeur Fayrouz Saaidi.

-Tous mes enseignants de la faculté des sciences agro-vétérinaires et biologique.

-Ma mère et à la mémoire de mon père.

-Toute ma famille.

Résumé

Le retard mental est un trouble cognitif extrêmement hétérogène qui touche 1 à 3% de la population générale, caractérisé par une altération des fonctions cognitives, de la motricité, langage et un manque d'autonomie.

Le but de ce travail est de faire une étude génétique et moléculaire d'une famille tunisienne consanguine colligée au service des maladies congénitales et héréditaires de l'hôpital Charles-Nicolle de Tunis.

Ce travail consiste à vérifier par séquençage des variations identifiées au niveau de six exons de six gènes différents (*APBB1IP*, *TAF5*, *ENO4*, *ERLIN1*, *FRMPD2*, *WDFY4*) situés dans la région candidate 10p12.1-q25.3 chez deux patients atteints de retard mental autosomique récessif non-spécifique associé à la cataracte congénitale et une microcéphalie ainsi que leurs parents.

Les résultats obtenus montrent que les variations se trouvent uniquement au niveau des gènes *APBB1IP*, *TAF5*, *ENO4*, *ERLIN1* et *WDFY4* dont celle retrouvée au niveau du gène *ENO4* n'est pas pathogène. La variation au niveau du gène *FRMPD2* n'a pas été retrouvée chez les parents.

En conclusion, les gènes *APBB1IP*, *TAF5*, *ERLIN1* et *WDFY4* sont probablement impliqués dans retard mental associé à la cataracte congénitale et à une microcéphalie, il s'agit d'un phénotype polygénique.

Summary

The mental retardation is a very heterogeneous cognitive trouble which affects 1 to 3 % of the general population, characterized by an alteration of the cognitive functions, motor function, language and lack of autonomy.

This work aims at carrying out a genetic and molecular study of a Tunisian consanguineous family colligated for congenital and hereditary diseases of Tunis Charles-Nicolle Hospital.

This work consists in checking, by sequencing, the variations that have been identified in six exons of six different genes (*APBB1IP*, *TAF5*, *ENO4*, *ERLIN1*, *FRMPD2*, and *WDFY4*) located in the selected area 10p12.1-q25.3 of two patients suffering from non-syndromic autosomal recessive mental retardation associated to congenital cataract and microcephaly as well as their parents.

The obtained results show that the variations are found only in the genes *APBB1IP*, *TAF5*, *ENO4*, *ERLIN1* and *WDFY4* whereas the variation found in the gene *ENO4* is not pathogenic. The variation in the *FRMPD2* has not been found in the parents.

In conclusion, the genes *APBB1IP*, *TAF5*, *ENO4*, *ERLIN1* and *WDFY4* may be involved in the mental retardation associated with congenital cataract and microcephaly. It is a polygenic phenotype.

ملخص

يُعتبر التخلف العقلي بمثابة اضطراب في الإدراك غير متجانس، يمس نسبة 1 إلى 3 % من السكان على العموم، ويتميز بتغير الوظائف الإدراكية، الحركية، اللغة ونقص التحكم في الذات.

يهدف هذا العمل إلى إجراء دراسة وراثية و جزيئية لعائلة تونسية متقاربة، مقتطفة لفائدة الأمراض الخلقية و الوراثة بمستشفى شارل نيكول بتونس.

يتمثل هذا العمل في مراقبة تغيرات محددة عن طريق تحديد تسلسل الجينات على مستوى ستة إكسونات لستة جينات مختلفة (*APBB1IP, TAF5, ENO4, ERLIN1, FRMPD2, WDFY4*) تقع بالمنطقة المرشحة q25.3-10p12.1 لدى شخصين مُصابين بتخلف عقلي صبغي جسدي متتحي غير خاص يصاحبه سادّ (كاتراكت) وراثي و صغر الرأس وكذا والديهما.

تظهر النتائج المتحصل عليها أن التغيرات موجودة فقط على مستوى الجينات *APBB1IP, TAF5, ENO4, ERLIN1, WDFY4* منها تلك المكتشفة على مستوى الجينة *ENO4* وهي غير مُسببة للمرض. لم نجد لدى الوالدين تغير على مستوى الجينة *FRMPD2*.

في الختام، قد يكون للجينات *APBB1IP, TAF5, ENO4, ERLIN1, WDFY4* دور في التخلف العقلي الذي يصاحبه سادّ (كاتراكت) وراثي و صغر الرأس. يتعلق الأمر بنمط ظاهري جيني.

Liste des abréviations

- AAMD : American Association on Mental Retardation/Deficiency.
- ADNc: ADN complémentaire.
- AM: âge mental, pour un sujet adulte.
- APA : American Psychological Association.
- CIM10 : Classification internationale des maladies 10.
- DI : Déficience Intellectuel.
- DS : Déviation Standard.
- EDTA : Ethylène diamine tétraacétique.
- M : A ou C aMine.
- M.T : Marqueur de Taille.
- nt : nucléotide.
- QI : Quotient Intellectuel.
- pb : paire de base.
- PCR : Polymerase Chain Reaction (Réaction de polymérisation en chaîne).
- R : A ou G puRine.
- RM: Retard Mental.
- RM-NS: Retard mental Non-Syndromique.
- S : C ou G 3 liaisons H (Strong en anglais).
- SDS : Sodium Dodecyl Sulfate.
- SLR : Solution de lyse des globules rouges.
- TBE : Tris-borate-EDTA.

-Tris : (Hydroxymethyl) aminomethane.

-W : A ou T 2 liaisons H (Weak en anglais).

-Y : C ou T pYrimidine.

Liste des figures

Figure 1 : Les étapes de la réaction de polymérisation en chaine (PCR)	33
Figure 2 : Arbre généalogique de la famille étudiée	36
Figure 3 : Résultats de l'amplification d'ADN lors de l'optimisation	53
Figure 4 : Résultats d'amplification des exons	54
Figure 5 : Variation détectée au niveau du gène <i>APBB1IP</i>	55
Figure 6 : Variation détectée au niveau du gène <i>TAF5</i>	56
Figure 7 : Variation détectée au niveau du gène <i>ENO4</i>	57
Figure 8 : Variation détectée au niveau du gène <i>ERLIN1</i>	57
Figure 9 : Variation SNP détectée au niveau du gène <i>FRMPD2</i>	58
Figure 10 : Variation détectée au niveau du gène <i>WDFY4</i>	59
Figure 11 : Variation intronique détectée au niveau du gène <i>WDFY4</i>	59

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification du retard mental	20
Tableau 2 : Localisation chromosomique des gènes impliqués dans le RM-NS autosomique récessif	28
Tableau 3 : Tableau clinique des patients IV-10 et IV-11	37
Tableau 4 : Résultats d'analyse par <i>Exome sequencing</i>	38
Tableau 5 : Les couples d'amorces utilisées pour l'amplification	41
Tableau 6 : Les composants utilisés lors d'une optimisation de PCR	42
Tableau 7 : Les concentrations de MgCl ₂ utilisées pour chaque exon lors de l'optimisation	43
Tableau 8 : Programme de PCR <i>Touch Down</i> réalisée par le thermocycleur (<i>Gene Amp, PCR system 9700</i> de type <i>Applied Biosystem</i>)	43
Tableau 9 : Amplification des gènes <i>APBB1IP</i> et <i>ENO4</i>	44
Tableau 10 : Amplification des gènes <i>TAF5</i> et <i>FRMPD2</i>	44
Tableau 11 : Amplification des gènes <i>ERLIN1</i> et <i>WDFY4</i>	45
Tableau 12 : Taille de chaque exon amplifié	45
Tableau 13 : Les composants nécessaire pour chaque produit PCR	48
Tableau 14 : Protocole de réaction de séquence	49
Tableau 15 : Dosage de l'ADN des patients et des parents	52

Tables des matières

Introduction

Objectifs

*Chapitre I: Synthèse bibliographique

I-Retard mental	18
I.1-Définition du retard mental	18
I.2-Définition du quotient intellectuel	18
I.3-Classification du retard mental selon le QI	19
I.4-Types de retard mental	20
I.4.1-Retard mental spécifique	20
I.4.2-Retard mental non-spécifique	20
I.5-Prévalence	21
I.6-Etiologie du retard mental	21
I.6.1-Causes génétiques du retard mental	21
I.6.2-Anomalies chromosomiques	22
I.6.3-Causes environnementales	22
I.7-Modes de transmission du retard mental	22
I.7.1-Retard mental autosomique	22
I.7.2-Retard mental lié à l’X	23
I.8-Gènes de retard mental autosomique récessif non-spécifique	24
I.8.1-Localisation chromosomique	27
I.9-Association du retard mental avec d’autres anomalies	29
I.9.1-RM associé à la cataracte congénitale et à une microcéphalie	29
I.10-Gènes pouvant être impliqué dans le retard mental	30
I.11- Quelques approches de biologie moléculaire	31

I.11.1- <i>Exome sequencing</i>	31
I.11.2- <i>Genome scan</i>	32
I.11.3-Réaction de polymérisation en chaine (PCR)	32
*Chapitre II : Matériels et méthodes	
I-Stratégie du travail	35
II- Famille étudiée	35
II.1-Examen génétique	36
II.2-Données cliniques	36
III-Gènes étudiés	38
III.1-Résultats obtenus par <i>Exome sequencing</i>	38
IV-Méthodes d'analyse du génome	38
IV.1-Extraction d'ADN	38
IV.1.1-Protocole d'extraction	39
IV.1.2-Dosage de l'ADN	39
IV.2-La réaction de polymérisation en chaine (PCR)	40
IV.2.1-Choix des couples d'amorces utilisées	40
IV.2.2-Protocole de la PCR	41
IV.2.2.1-Les réactifs utilisés	41
IV.2.2.2-Optimisation de la PCR	42
IV.2.2.3-Protocole de PCR	43
IV.2.4-Contrôle de PCR	45
IV.2.4.a-Protocole de contrôle	45
IV.2.4.b-Préparation du gel d'agarose et du tampon de migration	46
IV.3-Séquençage	46
IV.3.1-Principe et méthode	46
IV.3.2-Protocole	46
IV.3.3-Purification des produits PCR	47

IV.3.4-Réaction de séquence	48
IV.3.4.1-Purification des produits de la réaction de séquence	49
*Chapitre III: Résultats et discussion	
I-Résultats	52
I.1-Résultats du dosage de l'ADN effectué par spectrophotométrie	52
I.2-Résultats d'amplification par PCR	52
I.3-Résultats de séquençage	55
II-Discussion	60
Conclusion	
Perspectives	
Bibliographie	
Annexes	

Introduction

Le retard mental est un trouble cognitif extrêmement hétérogène qui touche environ 1 à 3% de la population générale (Khan.M.A et *al.*2011), caractérisé par un fonctionnement intellectuel en-dessous de la moyenne et un manque ou absence d'autonomie dont ces caractéristiques doivent apparaître avant l'âge de 18 ans. Il est classé selon le mode de transmission, en retard mental autosomique et retard mental lié au chromosome X, les deux modes de transmission sont caractérisés par des formes spécifiques et des formes isolées (non-spécifiques). Le retard mental spécifique est une déficience associée à d'autres anomalies malformatives qui définissent un syndrome connu. Contrairement au retard mental non-spécifique, qui est plus fréquent que le retard mental spécifique (Ropers.H.H et *al.* 2008), peut être associé à d'autres signes cliniques mais il est non-syndromique.

Au cours de ces dernières années beaucoup de travaux de recherche visant le retard mental ont été réalisés. Jusqu'ici 102 gènes ont été identifiés comme étant impliqués dans le retard mental lié à l'X (Lubs.H.A et *al.* 2012) et seulement 23 gènes impliqués dans le retard mental autosomique (Najmabadi.H et *al.*2011), parmi ces gènes, 12 sont impliqués dans le retard mental autosomique récessif non-spécifique : *PRSS12*, *CC2D1A*, *CRBN*, *GRIK2*, *TUSC3*, *TRAPPC9* (Ropers.F et *al.* 2011), *TECR* (Çalışkan.M et *al.* 2011), *MAN1B1* (Rafiq.M.A et *al.* 2011), *ST3GAL3* (Hu.H et *al.* 2011), *NSUN2* (Khan.M.A et *al.* 2012), *ZNF526* (Najmabadi.H et *al.*2011), *MED23* (Hashimoto.S et *al.*2011).

Le retard mental autosomique récessif non-spécifique peut être associé à d'autres signes cliniques. Chez les populations arabo-israéliennes consanguines, le retard mental autosomique récessif non-spécifique est associé à une microcéphalie (Mochida.G.H et *al.* 2009 ; Abou-Jamra.R et *al.* 2011), dont la mutation a été retrouvée au niveau du gène *TRAPPC9* chez ces patients (Mochida.G.H et *al.* 2009). Outre la microcéphalie, Kahrizi et *al.* rapportent que le retard mental sévère est associé à des anomalies oculaires telles que la cataracte, dans ce cas syndromique.

Objectifs :

L'objectif de ce travail de recherche est d'effectuer une analyse génétique et moléculaire d'une famille tunisienne consanguine à deux générations comportant deux patients atteints de retard mental héréditaire familial non-spécifique associé à d'autres signes cliniques : microcéphalie, cataracte congénitale ainsi que d'autres anomalies secondaires. Notre travail

consiste à étudier des gènes candidats obtenus suite à l'approche *Exome-Sequencing* et *Genome-Scan* déjà réalisées dans cette famille, les gènes candidats sont au nombre de six *APBB1IP*, *TAF5*, *ENO4*, *ERLIN1*, *FRMPD2*, *WDFY4*. Ces deux techniques (*Exome-Sequencing* et *Genome-Scan*) ont permis la détection des régions candidates et la détection des variations (1exon/gène) homozygotes chez les deux patients.

L'analyse génétique et moléculaire repose sur des techniques de biologie moléculaire dont l'extraction de l'ADN, la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et confirmation par séquençage (méthode de Sanger) des variations retrouvées chez les cas index et leur recherche chez leurs parents.

Chapitre I :

Synthèse bibliographique

I- Retard mental

I.1-Définition du retard mental :

Retard mental/Déficience intellectuelle est défini par une détérioration cognitive non-progressive caractérisée par un fonctionnement intellectuel en-dessous de la moyenne et un manque d'autonomie et de compétences de survie. Le retard mental est défini aussi par le quotient intellectuel(QI) qui est de score inférieur à 70 (Gilling et *al.*2011), il est considéré comme étant l'handicap majeur dans la population générale et l'un des plus grands problèmes de santé non-résolus.

Le retard mental est défini selon la classification internationale des maladies(CIM), l'Organisation mondiale de la santé (OMS) comme un arrêt ou développement incomplet du fonctionnement mental, caractérisé essentiellement par une altération, durant la période du développement, des facultés qui déterminent le niveau global d'intelligence, c'est-à-dire des fonctions cognitives, du langage, de la motricité et des capacités sociales. Le retard mental peut accompagner un autre trouble mental ou physique ou survenir isolément. D'autres définitions du RM, qui mettent un accent plus franc sur les capacités adaptatives, ont été proposées par l'AAMR (devenue AAMD : American Association on Mental Retardation/Deficiency, puis American Association On Intellectual and Developmental Disabilities [AAIDD]) et l'American Psychological Association (APA), le retard mental est une incapacité caractérisée par des limitations significatives du fonctionnement intellectuel et du comportement adaptatif qui se manifeste dans les habiletés conceptuelles, sociales et pratiques (Définition de l'AAMR 2002). Cette incapacité survient avant l'âge de 18 ans (Verloes et *al.*2012).

Ces dernières années, le terme retard mental est rarement utilisé, on utilise plutôt le terme « Déficience Intellectuelle (DI) » pour désigner l'handicap mental.

I.2-Définition du quotient intellectuel(QI) :

Le quotient intellectuel (QI) est le résultat d'un test psychométrique qui donne une indication de l'intelligence, les résultats obtenus lors de ce test permettent d'évaluer les capacités intellectuelles d'un individu. Le test de Wechsler est le plus couramment utilisé afin de connaître le niveau intellectuel d'un individu, il est basé sur des échelles qui sont une série de tests standardisés utilisés pour évaluer les capacités cognitives et intellectuelles chez les enfants et les adultes (Bak. 2001 ; Di Nuovo et *al.* 2012 ; Ropers. 2008).

Le résultat du quotient intellectuel permet de noter la vivacité intellectuelle de l'enfant ou de l'adulte. Il peut s'avérer très utile lorsque l'on recherche à vérifier la précocité d'un enfant, ou à l'inverse, un retard intellectuel (Psychologies.com).

Le quotient intellectuel n'est pas le seul référent, il y a d'autres critères qu'il faut chercher afin d'identifier la déficience intellectuelle tels que les dysmorphies faciales et certains syndromes liés au retard mental dans le cas d'une déficience intellectuelle spécifique. Dans le cas d'une déficience intellectuelle non-spécifique, la recherche des causes génétiques serait idéale afin de compléter l'évaluation faite par le QI.

I.3-Classification du retard mental selon le QI : (Verloes et al.2012)

Selon l'AAMD le retard mental est classé comme suit :

- Retard mental léger : se définit par un QI compris entre 50/55 et 70/75, souvent diagnostiqué tardivement, à l'entrée de la maternelle ou au cours préparatoire, il conduit à des difficultés d'apprentissage scolaires plus ou moins sévères.

Environ 50% des sujets peuvent suivre une scolarité primaire en milieu ordinaire suivie d'une orientation précoce vers une formation professionnelle. Les sujets adultes sont susceptibles de travailler et d'acquérir une bonne autonomie personnelle et une indépendance sociale.

-Retard mental modéré : se définit par un QI compris entre 35/40 et 50/55, associé à des difficultés d'apprentissage importantes. L'acquisition de compétences simples, permettant la communication sociale, un certain degré d'autosuffisance et une vie semi-indépendante est habituellement possible. Les bases de la lecture et de l'écriture sont rarement maîtrisées.

-Retard mental sévère : se définit par un QI compris entre 25/25 et 35/40, il s'accompagne d'une dépendance complète pour les gestes du quotidien.

-Retard mental profond : se définit par un QI inférieur à 20/25, il s'accompagne aussi d'une dépendance pour les gestes du quotidien ainsi qu'une réduction sévère des possibilités de communication et de mobilité.

Tableau 1 : Classification du retard mental.

NIVEAU DE RM	CIM10	AAMD	APA	
Léger	50-69 AM : 9-11 ans	50-55 à 70-75	55-70 (-2 DS)	+ au moins deux déficits adaptatifs
Modéré (CIM10 : moyen)	35-49 AM : 6-8 ans	35-40 à 50-55	35-54 (-3 DS)	
Sévère (CIM10 : grave)	20-34 AM : 3-5 ans	20-25 à 35-40	20-34 (-4DS)	+ déficits dans toutes les catégories
Profond :	< 20 AM < 3ans	< 20-25 Avant 19 ans	< 20 Avant 22 ans	

*Les bornes imprécises proposées par l'AAMD sont justifiées par l'erreur expérimentale sur les valeurs. (Verloes et *al.* 2012)

I.4-Types de retard mental :

I.4.1-Retard mental spécifique :

Caractérisé par un retard mental associé à d'autres anomalies, malformations, dysmorphies faciales, troubles neurologiques,...etc, qui caractérise un syndrome connu.

I.4.2-Retard mental non-spécifique :

Le retard mental ou non-spécifique ou non-syndromique peut survenir isolément ou s'associer à d'autres signes cliniques mais ces signes ne désignent pas un syndrome, il est caractérisé par l'absence de syndromes associés.

La notion de syndromique, non-syndromique est de moins en moins utilisée. On désigne actuellement le retard mental par retard mental spécifique et retard mental non-spécifique, ce sont les deux expressions les plus correctes qui puissent définir le retard mental.

I.5-Prévalence :

Le retard mental touche 1-3% de la population générale (Khan et *al.*2011; Ropers et *al.* 2011), il est considéré comme l'un des problèmes de santé non-résolus dans le monde avec une prévalence de 0.3-0.4% des cas de retard mental modéré à sévère (Rauch et *al.*2012). Des anomalies génétiques sont retrouvées chez 50% des patients atteints de retard mental modéré à sévère (Kahrizi et *al.* 2009; Goldenberg et *al.* 2010) et chez 40% des patients les causes de retard mental demeurent inexplicées (Philippe et *al.* 2009). Les causes environnementales prénatales, périnatales et post-natales représentent environ 10% des cas (Verloes et *al.* 2012).

En outre, le mode autosomique récessif de retard mental non-spécifique représente environ 25% du nombre total des cas de RM (Rehman et *al.*2011; Philippe et *al.* 2009) et le mode de transmission lié au chromosome X est estimé de 5%-10% du nombre total des patients atteints de RM (Lubs et *al.* 2012).

I.6-Etiologie du retard mental :

Les étiologies ou causes du retard mental sont diverses, elles comprennent les anomalies chromosomiques, syndromes malformatifs, syndromes monogéniques, anomalies structurales du cerveau ainsi que les facteurs environnementaux. Parmi les facteurs environnementaux, il y a la nutrition, privation culturelle et le manque de soins médicaux. De plus, la consanguinité parentale est considérée comme un facteur étiologique majeur dans le retard mental.

I.6.1-Causes génétiques du retard mental :

Il n'est pas surprenant de dire que des causes génétiques sont retrouvées dans les deux tiers des cas de retard mental (Basel-Vanagaite et *al.* 2003) car près de la moitié des gènes humains sont exprimés au niveau du cerveau. Les causes génétiques sont le plus souvent dues à des anomalies chromosomiques, qui sont identifiées par analyse cytogénétique, cette dernière met en évidence les anomalies de nombre et les anomalies de structures des chromosomes, ou à des anomalies monogéniques. On estime que 15% des cas ont des anomalies chromosomiques visibles par cytogénétique (Ropers. 2008).

En outre, les mutations, délétions et duplications qui ne sont détectées que par les nouvelles techniques de biologie moléculaire, telles que : le séquençage et puces à ADN, sont des causes génétiques très fréquentes dans le retard mental, elles peuvent être interstitielles ou sub-télomériques. Les remaniements sub-télomériques représentent 6 à 8% des retards

mentaux sévères (Odent et *al.* 2008) et une minorité de cas atteints de retard mental dont les recombinaisons homologues en sont la cause. Les anomalies chromosomiques qui touchent les protéines kinétochoriens et les mécanismes de ségrégation des chromosomes mitotiques ont été mises en évidence dans les cas de retard mental lié à une microcéphalie (Ropers. 2008)

I.6.2-Anomalies chromosomiques :

La trisomie 21, en est un exemple parfait pour décrire une anomalie du nombre impliquée dans le retard mental, dans ce cas syndromique. C'est la première cause de retard mental d'origine génétique. Ces anomalies peuvent être identifiées par un caryotype standard, voire haute résolution, mais certaines trisomies ne sont viables qu'en mosaïque et caryotype sur fibroblaste (biopsie de peau) (Odent et *al.* 2008).

I.6.3-Causes environnementales :

Le retard mental peut être dû à des causes non-génétiques, les causes environnementales peuvent avoir un lien avec le retard mental telles que la consommation des médicaments, alcool et drogues pendant la grossesse, les infections maternelles durant la période du développement embryonnaire ainsi que les traumatismes périnataux et post-nataux. Dans les formes sévères de RM, souvent il est dû à des phénomènes prénatals ou périnataux tels que l'asphyxie périnatale et les infections prénatales (Ropers. 2008). Cependant, la prise des médicaments tératogènes pendant la grossesse, une phénylcétonurie maternelle ou syndrome d'alcoolisation fœtale peuvent se manifester par un retard mental syndromique (Odent et *al.* 2008)

I.7-Modes de transmission du retard mental :

I.7.1-Retard mental autosomique :

Une maladie dite autosomique récessive est une maladie dont le(les) gène(s) impliqué(s) ne s'exprime (phénotype) qu'à l'état homozygote, à l'état hétérozygote l'individu est porteur de la maladie mais il n'est pas malade, contrairement à une maladie autosomique dominante, même si un seul allèle est muté la maladie s'exprime quand-même.

Najmabadi et *al.* (2011) rapportent que des mutations ont été mises en évidence dans 23 gènes impliqués dans le retard mental autosomique récessif ou liés à des troubles neurologiques et des variations identifiées dans 50 gènes candidats, dont le produit de ces gènes candidats interagit directement avec les produits (protéines) codés par les gènes impliqués directement

dans le retard mental. La majorité des gènes candidats sont impliqués dans des voies de signalisation fondamentales telles que la transcription, traduction, régulation du cycle cellulaire, métabolisme énergétique, synthèse des acides gras,...etc, qui semblent avoir un rôle important dans le développement et le fonctionnement du cerveau.

A ce jour 30 loci et 55 gènes candidats ont été identifiés dans le retard mental autosomique récessif non-syndromique (Khan et al. 2011; Kakar et al. 2012, respectivement) et plus de dix gènes impliqués ont été identifiés, mais ça reste peu car le retard mental autosomique récessif non-syndromique est génétiquement très hétérogène et touche le plus souvent des patients issus de familles consanguines qui sont rares dans les pays développés. Deux gènes seulement ont été identifiés comme étant impliqués dans le retard mental autosomique non-syndromique dominant, le premier est SYNGAP1, il code pour une protéine ras à activité GTPase, cette protéine est exprimée au niveau du cerveau et joue un rôle dans la plasticité synaptique et la morphogenèse de la colonne vertébrale, qui sont nécessaires à l'apprentissage et la mémoire (Hamdan et al. 2009). Le second, PPP2R2C, code pour la sous-unité régulatrice de la protéine phosphatase A2, il est hautement exprimé au niveau du cerveau et beaucoup plus au niveau de l'hippocampe. La protéine phosphatase A2 est une sérine thréonine phosphatase qui joue un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire, contrôle de la croissance ainsi que d'autres voies de signalisation (Backx et al. 2010). Le retard mental autosomique dominant est connu souvent dans des cas sporadiques car les personnes affectées sont rarement reproductives (Najmabadi et al. 2007,2011).

Des considérations fonctionnelles sont plus communes dans le retard mental autosomique récessif que dans le retard mental autosomique dominant, la raison pour laquelle on dit que les patients qui présentent un retard mental idiopathique portent des anomalies au niveau des gènes autosomiques de forme récessive.

I.7.2-Retard mental lié à l'X :

C'est un retard mental dont les gènes défectueux sont situés au niveau du chromosome X. Des mutations ont été identifiées au niveau de 102 gènes impliqués dans le retard mental situés sur ce chromosome (Lubs et al. 2012).

Le retard mental lié à l'X est plus fréquent chez les mâles, il a été identifié chez une minorité de femelles, mais ce n'est ni avec la consistance ni avec la sévérité observée chez les mâles. Environ 50% des filles portant une mutation ont un retard mental (Odent et al. 2008).

Tout comme le retard mental autosomique, il y a des formes spécifiques ou syndromique de retard mental lié à l’X et il y a des formes isolées (non-spécifiques), mais les formes non spécifiques sont les plus fréquentes.

Parmi les syndromes les plus courants associés au retard mental lié à l’X, le syndrome de l’X-fragile, c’est la deuxième cause de retard mental d’origine génétique. Il touche environ 25% des cas de retard mental lié à l’X chez les garçons (Ropers. 2008).

Il s’agit de mutations en position Xq27.3 qui touchent le gène *FMRI* avec une amplification anormale d’un triplet CGG entraînant une hyper-méthylation des îlots CpG, ce qui provoque l’inactivation du gène *FMRI* (le syndrome est présent lorsque le nombre de répétitions CGG dépasse les 200 copies).

I.8-Les gènes de retard mental autosomique récessif non-spécifique:

Les gènes qui causent le retard mental autosomique récessif non-syndromique codent pour des protéines qui appartiennent à différentes familles, y compris les sérines protéases, Adénosine 5’-triphosphate dépendante et LON protéases. L’expression des gènes mutés de manière homozygote donnent des protéines tronquées ce qui représente le phénotype de la maladie.

Il n’est pas surprenant de dire qu’environ un millier de gènes sont impliqués dans le retard mental autosomique récessif puisque près de la moitié des 25000 gènes humains sont exprimés au niveau du cerveau. De plus, plusieurs centaines de gènes sont en cause de déficience intellectuelle autosomique récessive non-spécifique (Najmabadi et *al.* 2011).

- ***PRSS12* : (MRT1 ; OMIM)**

Le gène *PRSS12* est le premier gène identifié dans le retard mental autosomique récessif non syndromique, il code pour une sérine protéase neuronale appelée neurotrypsine (Basel-Vanagaite. 2007). C’est une protéine fortement exprimée dans le cortex cérébral, l’hippocampe et les amygdales. Dans les cellules neuronales elle est localisée dans la membrane pré-synaptique et la zone de connexion des neurones, elle est répartie tout au long des dendrites et axones. La neurotrypsine a un rôle important dans les fonctions synaptiques adaptatives plutôt que dans la formation des synapses, comme la réorganisation des synapses au cours du développement neurologique adulte et la plasticité synaptique (Basel-Vanagaite. 2007).

- **CRBN** : (MRT2 ; OMIM)

Le gène *CRBN* code pour une protéine appelée cereblon, deuxième gène identifié dans le retard mental autosomique récessif non-syndromique, il appartient à la famille du gène codant pour LON protéase. Cereblon est une Adénosine 5'-triphosphate-dépendante, associée directement aux canaux calciques (Ca^{2+}) qui activent à leur tour les canaux potassiques (K^+) et provoque la libération du potassium K^+ . Ce dernier a un rôle important dans l'excitabilité neuronale et la libération du neurotransmetteur (Basel-Vanagaite. 2007).

- **CC2DIA** : (MRT3 ; OMIM)

CC2DIA code pour une protéine régulatrice, qui est impliqué dans la régulation de l'endocytose et du trafic endosomal. Elle contrôle le devenir des cellules au cours du développement (Rajadhyaksha et al. 2012).

La mutation de *CC2DIA* retrouvée cause des troubles cognitives plus sévères par rapport aux familles ayant une mutation au niveau du gène *CRBN*. Il est difficile de dire que des mutations différentes sur un même gène hérité de forme autosomique récessif peuvent causer à la fois des formes non-syndromiques et des formes syndromique de RM comme cela a été montré pour le retard mental lié à l'X (Basel-Vanagaite. 2007).

- **NSUN2** : (MRT5 ; OMIM)

NSUN2 est un gène qui code pour une ARN-méthyltransférase qui catalyse la formation de 5-méthyl-cytosine au niveau du C34 de l'ARNt-leucine, elle joue un rôle important dans la formation du fuseau mitotique et la ségrégation des chromosomes lors de la mitose. Le gène *NSUN2* semble jouer un rôle important dans le développement neurocognitif humain (Khan et al. 2012).

- **GRIK2** : (MRT6 ; OMIM)

GRIK2 est un gène codant pour un récepteur à glutamate appelé « Ionotropic Glutamate Receptor 6 », il code pour une sous-unité du récepteur Kaïnate qui est hautement exprimé au niveau du cerveau.

GRIK2 est le premier gène identifié dans le retard mental autosomique récessif non-syndromique dont la fonction de la protéine pour laquelle il code au niveau du système

nerveux central est connue, Il co-ségrége avec les cas modérés à sévères du RM (Motazacker et *al.* 2007).

- ***TUSC3*** : (MRT7 ; OMIM)

TUSC3 est le cinquième gène identifié dans le retard mental autosomique récessif non-syndromique, il code pour une enzyme oligosaccharyltransférase, elle catalyse la réaction de glycosilation (Garshasbi et *al.* 2008 ; Khan et *al.* 2011). *TUSC3* est impliqué dans le transport de Mg^{2+} à travers la membrane plasmique qui est nécessaire pour le développement embryonnaire (Zhou et Clapham. 2009), il est impliqué dans les cas sévères de RM.

Dans la population iranienne, une mutation au niveau du gène *TUSC3* est observée chez 1% des patients atteints de retard mental autosomique récessif non-syndromique (Garshasbi et *al.* 2011).

- ***ST3GAL3*** : (MRT12 ; OMIM)

H.Hu et *al.* Ont récemment découvert que le gène *ST3GAL3* est impliqué dans le retard mental autosomique récessif non-syndromique, ce gène code pour une protéine appelée ST3Gal-III (Beta –galactoside-alpha2,3-sialyltransférase-III).

L'expression de ce gène a été observée au niveau du tissu neural chez le fœtus, ce qui explique le rôle important de la protéine dans le fonctionnement du cerveau (Hu et *al.* 2011).

- ***TRAPPC9*** : (MRT13 ; OMIM)

TRAPPC9 est un gène qui code pour la protéine kinase NIK et la protéine IKK-beta (Kakar et *al.* 2012). Il est fortement exprimé au niveau des neurones post-mitotiques du cortex cérébral, et est considéré comme un régulateur positif du NFκB (Ganeshwaran et *al.* 2009). Le gène *TRAPPC9* défaillant est souvent observée dans les cas modérés à sévères de retard mental et souvent associé à une microcéphalie post-natale, retard de langage ainsi que d'autres troubles neurologiques (Kakar et *al.* 2012).

- ***TECR*** : (MRT14 ; OMIM)

TECR est le septième gène identifié dans le retard mental autosomique récessif non-syndromique, il code pour une glycoprotéine synaptique, tran-2,3-enoyl-CoA réductase, qui est impliquée dans le métabolisme des acides gras. La protéine tronquée affecte la synthèse

des acides gras, en soulignant l'importance de l'homéostasie des lipides pour le bon développement du cerveau (Çalışkan et al.2011).

- **MAN1B1** : (MRT15 ; Rafiq et al.2011)

Ce gène est aussi impliqué dans le retard mental autosomique récessif non-syndromique, il code pour une protéine du réticulum endoplasmique appelée : mannosyl-oligosaccharide1,2-alpha-mannosidase, enzyme clé impliquée dans la maturation des N-glycans dans les voies de sécrétion.

- **MED23** : (MRT18 ; OMIM)

MED23 est un récepteur nucléaire (facteur de transcription) (Genatlas Database).Il code pour une sous-unité d'un complexe médiateur régulateur de l'expression des gènes codants des protéines, la mutation détectée semble modifier la réponse des gènes FOS et JUN qui sont des facteurs de transcription dits « immédiats à action précoce ». L'expression de ces derniers est induite par diverses stimulations neuronales. Ceci explique le rôle crucial du gène MED23 dans le développement et le fonctionnement du cerveau (Hashimoto et al.2011).

- **ZNF526** :

Ce gène code pour une protéine à doigt de zinc de type kruppel, impliqué dans le retard mental autosomique récessif non-syndromique. Les protéines à doigt de zinc de type kruppel sont des régulateurs transcriptionnels et *ZNF526* est impliqué dans la traduction des ARNm et la croissance cellulaire (Najmabadi et al. 2011).

Une délétion a été retrouvée au niveau de l'intron 2 du gène *HTR2A* situé au chromosome 13 chez des familles ayant un retard mental autosomique récessif non-syndromique (Najmabadi et al. 2007), cette délétion semble être impliquée dans le retard mental

I.8.1-Localisation chromosomique :

A ce jour, douze gènes impliqués dans le retard mental autosomique récessif non-spécifique ont été identifiés. La localisation chromosomique de ces gènes ainsi que leur expression seront portés sur le tableau suivant :

Tableau 2 : Localisation chromosomique des gènes impliqués dans le RM-NS autosomique récessif.

Gène	Localisation chromosomique	Expression	Références
<i>PRSSI2</i>(MRT1)	4q26	Hippocampe, cortex cérébrale, amygdales, testicules.	OMIM ; Genatlas Database.
<i>CRBN</i>(MRT2)	3p26.2	Cerveau, testicules, rétine.	OMIM ; Genatlas Database.
<i>CC2D1A</i>(MRT3)	19p13.12	Neurones, thymus, œsophage, prostate, peau.	OMIM ; Genatlas Database.
<i>NSUN2</i>(MRT5)	5p15.31	Nucléoles.	OMIM
<i>GRIK2</i>(MRT6)	6q16.3	Cerveau, œil, nerfs, oreille interne, ganglions sensitifs.	OMIM ; Genatlas Database.
<i>TUSC3</i>(MRT7)	8p22		OMIM
<i>ST3GAL3</i> (MRT12)	1p34.1	Foie, poumons, tissu musculaire.	OMIM ; Genatlas Database.
<i>TRAPPC9</i>(MRT13)	8q24.3	Neurones, rate, thymus, reins.	OMIM ; Genatlas Database.
<i>TECR</i>(MRT14)	19p13.12	Foie, pancréas, thyroïde, cerveau, poumon, prostate.	OMIM ; Genatlas Database.
<i>MAN1B1</i>(MRT15)	9q34.3	Cerveau, prostate, reins.	OMIM ; Genatlas Database.
<i>MED23</i>(MRT18)	6q23.2	Nerfs, prostate, larynx, trachée, moelle osseuse, foie.	OMIM ; Genatlas Database.
<i>ZNF526</i>	19q13.2	Peau, os, moelle osseuse.	OMIM ; Genatlas Database.

I.9-Association du retard mental avec d'autres anomalies :

Le retard mental peut être associé à d'autres signes cliniques ou anomalies. Cependant, beaucoup de syndrome malformatifs s'accompagnent d'une déficience intellectuelle.

I.9.1- RM associé à la cataracte congénitale et à une microcéphalie :

La microcéphalie est une anomalie génétiquement hétérogène qui se transmet en mode autosomique récessif, cliniquement elle est caractérisée par une circonférence occipito-frontale de la tête à -3 SD dès la naissance, associé à un retard mental modéré à sévère (Darvish et *al.* 2013). Y compris le retard mental, la microcéphalie peut être associée à l'épilepsie, paralysie cérébrale, troubles ophtalmologiques et d'autres anomalies.

L'étiologie d'une microcéphalie comporte des causes environnementales et le plus souvent des causes génétiques. Les causes environnementales sont les infections congénitales ainsi que la consommation excessive d'alcool et de drogues durant la grossesse. Les causes génétiques sont les différentes variations qui impliquent les anomalies cytogénétiques et les anomalies monogéniques.

La microcéphalie est définie comme un trouble rare de la mitose des neurones, caractérisée par un périmètre crânien réduit, ceci apparait dès la naissance avec un degré variable de retard mental. Les patients atteints de microcéphalie ont un périmètre crânien réduit de presque un tiers du volume initial du cerveau, cela est dû au nombre réduit de neurones corticaux-cérébraux générés au cours de l'embryogénèse (Mahmood et *al.* 2011).

Sept loci sont impliqués dans la microcéphalie de (MCPH1-7), chaque locus comporte un gène impliqué dans la microcéphalie. Parmi ces gènes, *MCPH1* a été identifié chez une famille ayant un retard mental autosomique récessif associé à une légère microcéphalie, il est connu aussi dans des formes syndromiques de retard mental associé à une microcéphalie sévère (Basel-Vanagaite. 2007). Une mutation au niveau du gène *TRAPPC9* a été observée dans des cas de RM autosomique récessif non-syndromique lié un à une microcéphalie.

La cataracte se définit par l'opacification du cristallin, ce dernier est l'une des lentilles réfractives de l'œil qui est transparent pour qu'il puisse accomplir son rôle physiologique.

L'étiologie de la cataracte peut être génétique ou liée au métabolisme, mais dans la plupart des cas reste obscure. Najmabadi et *al.* (2007) rapportent que chez certaines familles le retard mental été associé à une microcéphalie, cataracte ainsi que des anomalies squelettiques.

1.10-Gènes pouvant être impliqués dans le retard mental :

- **APBB1IP (Amyloid beta (A4) Precursor protein-binding, family B, member1 Interacting Protein):**

Code pour une protéine de signalisation qui possède un domaine PH, un domaine d'association à la protéine Ras (Ras-associating domain) et deux régions riches en proline nécessaires à l'activité transcriptionnelle de AP1. Ce gène est exprimé au niveau des tissus lymphatiques primaires et secondaires (rate, thymus, ganglions lymphatiques et amygdales) et au niveau de la moelle osseuse (Genatlas database).

La protéine est impliquée dans plusieurs voies de signalisation telles que la voie de signalisation des neuropeptides, transduction du signal d'activation de la protéine Ras, cette dernière est impliquée dans le remodelage du cytosquelette. La protéine APBB1IP est impliquée aussi dans l'adhésion induite par Rap1 en s'associant à la protéine taline et VASP pour activer les intégrines (Lee et *al.* 2009). Taline est une protéine localisée préférentiellement au niveau de la zone post-synaptique de la jonction neuromusculaire (Sealock et *al.* 1986).

- **TAF5 (TAF5 RNA polymerase II, TATA-box binding protein (TBP)-Associated Factor):**

Le gène TAF5 code pour un facteur de transcription, c'est un co-activateur transcriptionnel qui possède la fonction de reconnaissance des promoteurs et modifie les facteurs généraux de transcription (GTF) afin de faciliter l'assemblage du complexe et initiation de la transcription. TAF5 est exprimé au niveau de l'intestin, ganglions lymphatiques, testicules et la vessie (Genatlas database).

- **ENO4 (Enolase Family member 4) :**

Peu de choses sont connues à propos de ce gène, découvert pour la première fois chez les souris (Nakamura et *al.* 2013), il code pour une enzyme émolase, nécessaire pour l'assemblage normal de la gaine fibreuse du flagelle du spermatozoïde et fournit la plupart des activités émolase dans ce dernier.

Dans le spermatozoïde humain une enzyme émolase a été identifiée au niveau de la pièce intermédiaire du spermatozoïde et qui possède de nouvelles propriétés biochimiques et enzymatiques (Nakamura et *al.* 2013).

- **ERLIN1 (ER lipid raft associated 1):**

Code pour une protéine associée au réticulum endoplasmique (RE), dont l'assemblage de plusieurs oligomères définit les domaines des radeaux lipidiques, cette protéine est exprimée

dans plusieurs tissus, cœur, intestin, utérus, placenta, testicules, moelle osseuse et système nerveux périphérique (Genatlas database), elle est impliquée potentiellement dans l'activation des cellules dendritiques. Observée uniquement au niveau des cellules dendritiques activées par un antigène et absente dans les cellules dendritiques inactives (Browman et *al.* 2006).

- **FRMPD2 (FERM and PDZ domain containing 2):**

Exprimé au niveau de la trachée et le cerveau fœtal, il Code pour une protéine à domaine Kind à l'extrémité N-terminal suivi d'un domaine FERM et trois domaines PDZ. Les protéines codées par ce gène sont localisées à la surface basolatérale des cellules épithéliales et certaines sont également retrouvées au niveau des jonctions serrées, elles jouent un rôle crucial dans l'établissement et la maintenance de la polarisation cellulaire (Stenzel et *al.*2009).

- **WDFY4 (WDFY family member 4):**

Il code pour une protéine de taille énorme dont la fonction demeure inconnue, il est exprimé au niveau de la rate, poumons, reins, cerveau (tout le cerveau adulte), moelle épinière et au niveau du foie du fœtus (Genatlas database). C'est une protéine qui contient un domaine WD40 et un domaine BEACH. Le domaine WD40 est connu dans un nombre important de protéines eucaryotes qui couvre une grande variété de fonctions y compris la régulation du signal de transduction, l'assemblage du cytosquelette et le traitement des pré-ARNm, pendant que le domaine BEACH est impliqué dans le trafic membranaire (Nagase et *al.*2000).

I.11- Quelques approches de biologie moléculaire :

I.11.1-Exome sequencing :

Comprendre des variations présentes dans des régions fonctionnellement importantes d'un génome est essentiel pour répondre à une multitude de questions de recherche en génétique. Cependant, le séquençage de tout le génome fournit une solution optimale pour l'identification des variations, la combinaison des obstacles d'analyse des données et les frais de séquençage de tout le génome a conduit à l'élaboration et l'adoption de la technique *Exome sequencing*. L'*Exome sequencing* interroge la partie interprétable d'un génome à travers des stratégies qui ciblent les régions codantes du génome, les séquences en 3' et les séquences régulatrices non-traduites ainsi que d'autres régions non-codantes. Cette technique a pour but de comprendre les maladies génétiques humaines en dévoilant les régions impliquées dans les troubles héréditaires.

Pour les chercheurs en génétique, *Exome sequencing* permet l'identification des variations nucléotidiques simples et les petites insertions ou délétions responsables des maladies héréditaires mendéliennes ainsi que les mutations de novo qui sont rares, ceci explique l'hérédité des maladies complexes. *Exome sequencing* est un puissant outil de découverte, la découverte des mutations causales dans un certain nombre de troubles du développement, des maladies neurologiques, des troubles métaboliques et des formes héréditaires de perte de vision et les carences du système sanguin et lymphatique.

I.11.2-Genome scan :

Est une nouvelle approche qui détecte des signaux basés sur le contraste d'haplotype d'homozygotie et la détection des régions candidates par les marqueurs SNP (Single Nucleotide Polymorphism).

I.11.3-Réaction de polymérisation en chaine (PCR) :

La PCR est une méthode d'amplification rapide de l'ADN qui permet d'amplifier une séquence d'ADN spécifique par une série de réactions *in-vitro*, et peut amplifier des séquences d'ADN cibles présentes en quantité infinitésimales. Comme condition préalable à la PCR, il est indispensable de connaître la séquence nucléotidique à amplifier afin de pouvoir désigner les amorces sens et anti-sens (en anglais appelées : primers), ces dernières vont s'hybrider avec leur séquence cible (à amplifier) après dénaturation de l'ADN et la polymérisation du reste de la séquence cible se fait par une enzyme thermorésistante appelée Taq polymérase, elle provient de la bactérie *Thermus aquaticus* et ne peut synthétiser de l'ADN qu'à partir d'une amorce oligonucléotidique (caractéristique de toutes les ADN polymérases).

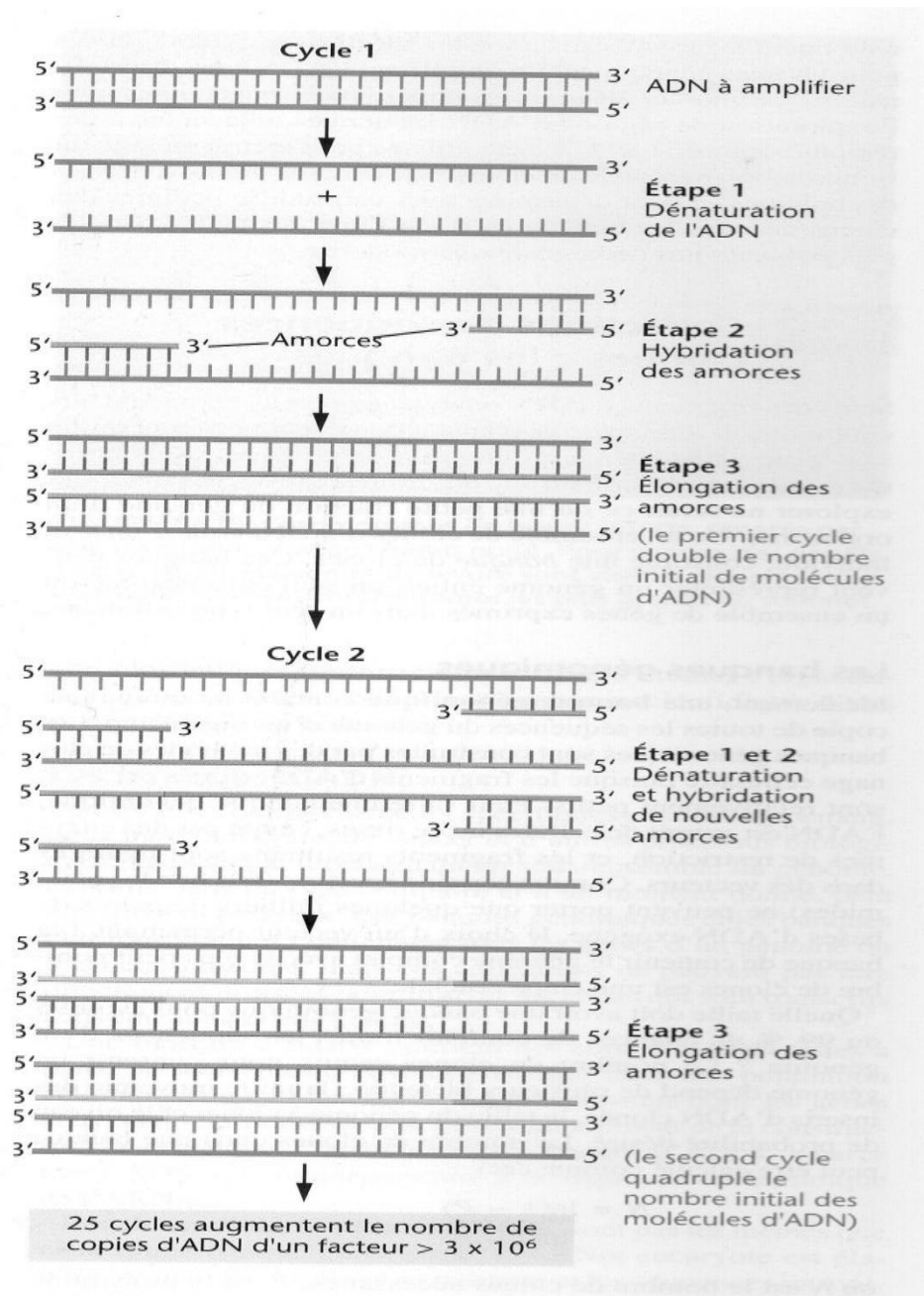
Cette réaction se déroule en trois étapes :

1-Dénaturation : l'ADN double-brin à amplifier est dénaturé en deux molécules d'ADN simple-brin par chauffage à une température de 90-95°C en 5 minutes environ.

2-Hybridation : la température de la réaction est baissée à une valeur comprise entre 42°C et 68°C, et l'hybridation des amorces avec l'ADN simple-brin est réalisée. Cette étape dure de 30 secondes à 1 minute. (Les amorces sont des séquences nucléotidique de 15-30 nucléotides qui flanquent la séquence d'ADN cible à amplifier).

3-Polymérisation : la synthèse d'ADN est réalisée par la Taq polymérase à une température comprise entre 70°C et 75°C. La synthèse se fait dans le sens 5' → 3', produisant ainsi une copie d'ADN double-brin.

Chaque série de ces trois étapes est appelée cycle, la durée de chaque cycle est d'environ 5 minutes. Une réaction de polymérisation en chaîne comporte de 25 à 30 cycles.



Klug et al. 2006, Génétique (8^e édition).

Figure 1 : Les étapes de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

Chapitre II :

Matériels et méthodes

I-Stratégie du travail :

Dans cette étude, on s'est intéressé à une famille tunisienne consanguine à deux générations, comprenant deux patients atteints de retard mental non-spécifique. L'étude de la généalogie a montré un mode de transmission autosomique récessif.

La stratégie suivie dans cette analyse a été la suivante :

A-Etude des gènes candidats :

- 1)-Rechercher les variations déjà rapportées par l'approche *Exome sequencing* et *Genome scan* au niveau de ces gènes.
- 2)-Confirmer l'homozygotie pour les variations chez les patients (par la méthode de *Sanger*).
- 3)-Tester ces mêmes variations chez les parents.

B-Analyser les résultats des variations et leur ségrégation :

Enfin, trois résultats sont possibles :

*Les deux parents ne portent pas les variations, dans ce cas la variation n'est pas causale.

*Un des deux parents est porteur des variations et l'autre non. Là, on a deux cas de figure, soit l'un des deux a un génotype normal et l'autre est homozygote pour les variations mais il ne présente pas le phénotype, soit l'un des deux est normal et l'autre est hétérozygote pour les variations. Dans ces deux cas on peut conclure que les variations ne sont pas causales.

*Les deux parents sont hétérozygotes, donc les variations peuvent être causales et ségréger avec le phénotype étudié.

II- Famille étudiée :

La famille étudiée a été recrutée à l'hôpital Charles Nicolle de Tunis, le choix de cette famille s'est basé sur :

- Présence de nombreux individus de la fratrie sont atteints de retard du développement psychomoteur et intellectuel.
- Les parents sont des cousins germains (il existe une consanguinité).
- Les patients sont atteints de DI non-spécifique, mais il est associé à d'autres signes cliniques.

Le phénotype observé touche les individus IV-10 et IV-11, un garçon et une fille qui sont issus de parents consanguins, où le premier enfant (IV-9) présentant le même tableau clinique est décédé et n'a pas été examiné par l'équipe du département.

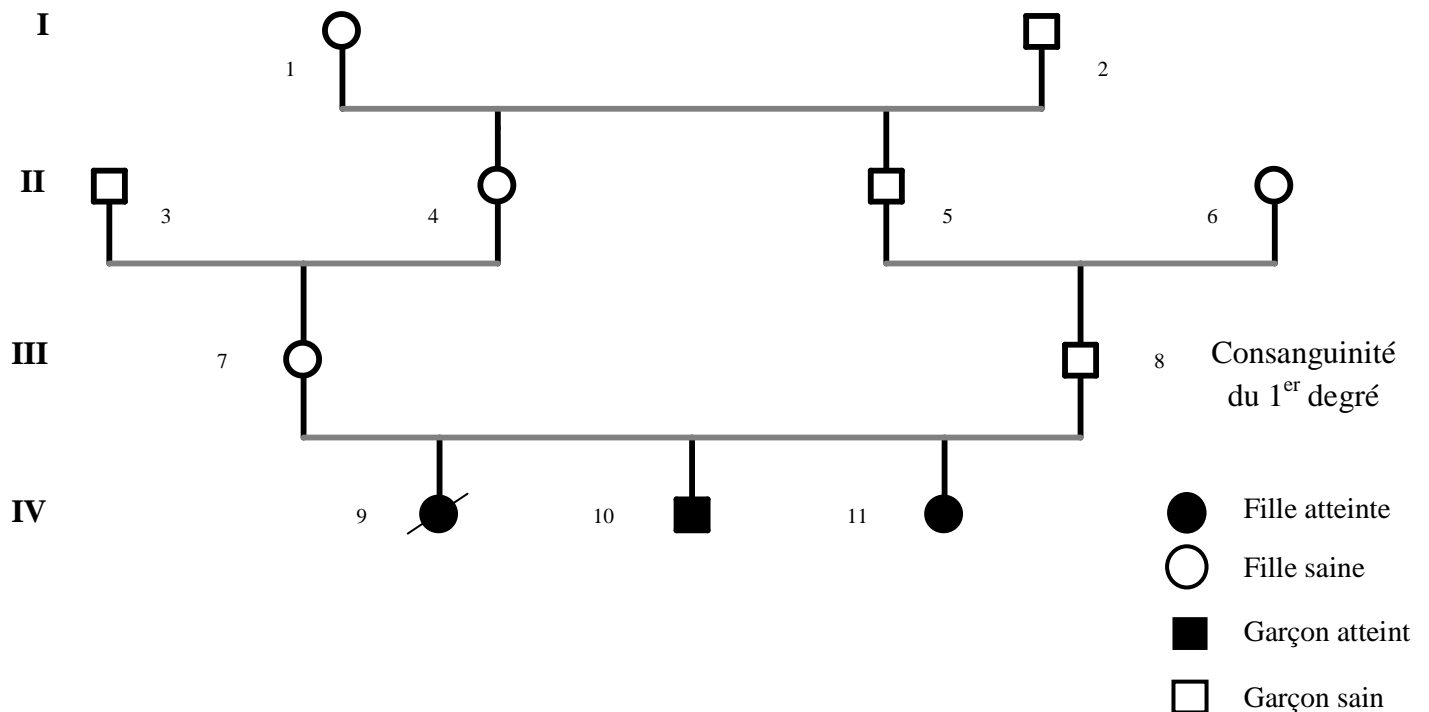


Figure 2 : Arbre généalogique de la famille étudiée.

II.1-Examen génétique :

L'examen génétique a été réalisé auparavant par deux techniques très avancées de biologie moléculaire qui sont l'*Exome sequencing* et *Genome Scan*. Ces deux techniques permettent d'identifier les régions candidates de la pathologie au niveau du génome.

II.2-Données cliniques :

Les deux patients examinés sont atteints de RM associé à la cataracte congénitale et à une microcéphalie ainsi que d'autres dysmorphies. Les deux patients ont un tableau clinique comparable, dysmorphie faciale en particulier des anomalies oculaires à type de microphthalmie et cataracte, une microcéphalie et un retard de croissance.

Les deux patients présentent aussi un retard des acquisitions motrices et/ou déficit intellectuel et retard du langage et de la compréhension. Les principaux éléments cliniques sont portés sur le tableau clinique des patients IV-10 et IV-11.

Tableau 3 : Tableau clinique des patients IV-10 et IV-11.

Patients	IV-10	IV-11
Poids	Normal	Normal
Taille (m)	Normal	Normal
Cataracte	Bilatérale	Bilatérale
Age de cataracte	6 mois	1 an
RM	Modéré	Modéré
RPM	-Parole à 2 ans. -Monosyllabique.	
	-Appris avec aide dès l'âge de 5 ans. -Marche avec aide acquise.	
Microcéphalie	-3,5 DS	-3 DS
IRM	-Anomalie de Dandy Walker. -Amincissement du corps calleux.	
Autres anomalies	-Syndrome polymalformatifs, microphthalmie, strabisme (isotropie), nystagmus. -Hypotonie axiale. -Dysmorphie faciale.	
	-Retard de croissance intra-Utérine (pendant la grossesse). -Cryptorchidie bilatérale opérée. -Hernie ombilicale.	

III-Gènes étudiés :

Les gènes étudiés dans cette étude sont des gènes situés dans une région candidate au niveau du chromosome 10, cette région a été détectée auparavant par *Exome sequencing* et *Genome scan*. Les gènes sont en nombre de six : *APBB1IP*, *TAF5*, *ENO4*, *ERLIN1*, *FRMPD2*, *WDFY4*.

III.1-Résultats obtenus par *Exome sequencing* :

Les résultats d'analyse par *Exome sequencing* révèlent des variations homozygotes chez les patients IV-10 et IV-11 dans la région candidate 10p12.1-q25.3 déterminée par la suite avec *Genome scan*, cette région est située au niveau du chromosome 10. Le tableau ci-dessous résume tous les résultats et détermine la localisation chromosomique de ces variations.

Tableau 4 : Résultats d'analyse par *Exome sequencing*.

Gènes	Variations homozygotes au niveau de l'ADN	Position au niveau de la protéine	Localisation chromosomique
APBB1IP (exon 7)	C.T533A	p.L178H	10p12.1
TAF5 (exon7)	C.G1642A	p.G548R	10q24-q25.2
ENO4 (exon3)	C.A313G	p.I105V	10q25.3
ERLIN1 (exon 11)	C.C878A	p.S293Y	10q21-q22
FRMPD2 (exon3)	C.151 T>A	Site d'épissage	10q11.22
WDFY4 (exon43)	C.A7085G	p.H2362R	10q11.23

IV-Méthodes d'analyse du génome:

Les deux patients et leurs parents constituent notre échantillon pour l'analyse du génome. Un prélèvement du sang total périphérique a été effectué de chacun d'eux.

IV.1-Extraction d'ADN :

L'extraction de l'ADN des patients ainsi que leurs parents a été réalisée antérieurement par la technique d'extraction d'ADN par la protéinase K sur sang total prélevé sur EDTA.

IV.1.1-Protocole d'extraction :

- **Matériels :**

-Falcons.

-Tubes Ependorff.

-SLR 1X (solution de lyse de globules rouges 1X).

-Tampon de lyse 1X.

-SDS (Détergeant qui permet de détruire les membranes des globules blancs, puis libération de l'ADN nucléaire).

-Ethanol 80%, absolu, glacial.

-Ethanol 80%.

-Parafilm.

-Tris 10X, EDTA 1X (TE).

- **Protocole :**

Le protocole d'extraction de l'ADN se déroule en cinq principales étapes :

1-Récupération des leucocytes à partir du sang total.

2-Lyse sélective des globules rouges.

3-Traitement par la protéinase K.

4-Précipitation de l'ADN (Ethanol 80%, absolu, glacial).

5-Reconstitution de l'ADN (T_{10}, E_1).

6-Conservation à +4°C.

IV.1.2-Dosage de l'ADN :

Le contrôle de qualité et de la quantité de l'ADN se fait par spectrophotométrie à l'aide d'un appareil appelé Spectrophotometer Nano Drop ND1000. Cet appareil permet de réaliser des spectres d'absorbance en utilisant des petits volumes, il est spécialement conçu pour la pureté

et la quantité des acides nucléiques à partir d'un volume de 1 à 2 μ l d'échantillon. Il permet des mesures sur une grande gamme de longueurs d'ondes pour l'analyse des spectres dans le visible et les UV.

Le rapport de densité optique (DO) R idéal est de : $1.8 \geq R \text{ (DO 260/DO 280)} \geq 2.0$. Si le rapport de densité est inférieur à 1.8 ceci indique qu'il y a une contamination protéique, et si le rapport est supérieur à 2, il correspond à une contamination par les sels. Dans le cas d'une contamination par les sels, un lavage par éthanol est nécessaire.

Après avoir testé la quantité et la qualité de l'ADN, une concentration de 100ng/ μ l est idéale pour effectuer les expériences, avec un rapport de densité compris entre 1,8 et 2. Si la concentration de l'ADN est supérieure à 400ng/ μ l, on réalise une dilution.

IV.2-La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) :

Dans cette étude on a utilisé la PCR *Touch Down* qui est une réaction de polymérisation en chaîne qui utilise plusieurs gammes de température, se fait par un thermocycleur à 96 puits : *Gene Amp, PCR system 9700* de type *Applied Biosystem*.

IV.2.1-Choix des couples d'amorces utilisées :

Le choix des amorces a été réalisé par le logiciel *Primer3*, qui nous permet de choisir la séquence des amorces sens et anti-sens à partir de la séquence nucléotidique que l'on veut amplifier. (En mettant la séquence à amplifier en forme FASTA dans la case qui est propre à la séquence et l'identifiant de la séquence et en précisant le nombre désiré des nucléotides des amorces)

Tableau 5 : Les couples d'amorces utilisées pour l'amplification.

Gènes	Séquence des primers 5' → 3'	Longueur (nt)	Tm (°C)	Concentration en n.mol
<i>APBB1IP</i> (Exon 7)	F : GCAACTTTGAAACCCTCATC	20	58	100
	R : GCAGCATAGTGAGAGCATGT	20	60	
<i>TAF5</i> (Exon7)	F : AATTCCTCTCCTGCACTGTG	20	60	100
	R : AATTTTCCCAGCATTGTCAT	20	54	
<i>ENO4</i> (Exon3)	F : CATTGTCCCCTTGAAATTGG	20	58	100
	R : CCCGGCTTGTACTTGATGTT	20	60	
<i>ERLIN1</i> (Exon 11)	F : CAGGAGAGCAATAGGTGAAA	20	58	100
	R : ACATTCCAGTGCAGGCAGTA	20	60	
<i>FRMPD2</i> (Exon3)	F : TGCTCACATTTCAGTCCCAGA	20	60	100
	R : GAGAACCAAGCTCTGCAAGG	20	62	
<i>WDFY4</i> (Exon 43)	F : TCCTTGGTGATGTAGGCACA	20	60	100
	R : TAAGTGCGAAAGCTTGTT	20	58	

IV2.2-Protocole de PCR :

Dans ce travail de recherche, on a utilisé la méthode PCR-Touch Down. C'est une technique de polymérisation en chaîne qui utilise plusieurs gammes de température en même temps.

IV.2.2.1-Les réactifs utilisés :

-La molécule d'ADN, de concentration égale à environ 100 ng/μl.

-Deux amorces (sens et anti sens). Ce sont de petits fragments d'environ 20 oligonucléotides qui s'hybrident de façon complémentaire dans des sites bien spécifiques de la séquence à amplifier. Elles sont livrées sous forme lyophilisée, après réalisé une hydratation par H₂O ultra pure, la concentration est ajustée à 100 nM/μl.

-L'enzyme : la Taq polymérase est une ADN polymérase de type *Invitrogen*, qui est une enzyme thermorésistante extraite de la bactérie *E.coli* qui exprime un gène d'ADN polymérase cloné de *Thermus aquaticus*. Une enzyme qui possède la fonction de polymérisation 5' → 3' et une activité exonucléase 5' → 3' et capable de synthétiser à des températures très élevées. 0.3μl sont nécessaire par réaction de PCR de volume final de 50μl.

-Le tampon de la Taq (10X) : il est nécessaire pour l'activité de la Taq, il est livré avec la Taq. Le volume nécessaire pour une réaction PCR est de 5µl.

-Le chlorure de magnésium (MgCl₂) : sa concentration varie pour chaque fragment, généralement on réalise une optimisation de PCR avec une gamme de MgCl₂ qui varie de 1mM à 3mM.

-Les nucléotides de type *BIOLINE* : dATP, dTTP, dGTP,dCTP, appelés dNTPs (désoxynucléotides tri-phosphate), qui sont le constituants de base utilisés par la Taq polymérase afin de synthétiser les brins d'ADN complémentaires. Leur concentration est de 100 mM.

IV.2.2.2-Optimisation de la PCR

L'optimisation de PCR est une étape de pré-PCR, qui consiste à effectuer une PCR en utilisant des ADN témoins à plusieurs concentrations de MgCl₂ pour tester l'amplification des amorces car chaque amorce possède une concentration en MgCl₂ spécifique.

Tableau 6 : Les composants utilisés lors d'une optimisation de PCR.

Les composants	Les volumes (µl)	Les concentrations
ADN	1	100 ng/µl
dNTP	8	1.6 mM
Tampon	5	0.5 X
Taq (Invitrogen)	0,3	1.5U
F (amorce sens)	1	0.1 µM
R (amorce anti-sens)	1	0.1 µM

Ces volumes sont utilisés pour un tube de PCR en complément avec MgCl₂ et H₂O, pour un volume final de 50 µl.

Tableau 7 : Les concentrations d'MgCl₂ utilisées pour chaque exon lors de l'optimisation.

MgCl ₂ (mM)	1	1.5	2	2.5	3
MgCl ₂ (μl)	5	7.5	10	12.5	15
H ₂ O (μl)	28.7	26.2	23.5	21.2	18.7

IV.2.2.3-Protocole de PCR :

Tableau 8: Programme de PCR *Touch Down* réalisée par le thermocycleur (*Gene Amp, PCR system 9700* de type *Applied Biosystem*).

Température en °C	Temps	Nombre de cycle		
95	1 minute	1 cycle		
95	1 minute	13 cycles	} Dénaturation	
64 (64 à 51)	30 secondes			} Hybridation
72	1 minute			
95	1 minute	30 cycles	} Dénaturation	
52	30 secondes			} Hybridation
72	1 minute			
72	5 minutes	1 cycle		
4	∞			

Les PCR ont été réalisées en fonction des résultats de l'optimisation.

Tableau 9 : Amplification des gènes *APBB1IP* et *ENO4*.

Les composants	Les volumes (µl)	Les concentrations
ADN	1	100 ng/µl
dNTP	8	1.6 mM
Tampon	5	0.5 X
Taq (Invitrogen)	0.3	1.5 U
F (amorce sens)	1	0.1 µM
R (amorce anti-sens)	1	0.1 µM
MgCl ₂	15	3 mM
H ₂ O	18.7	

Tableau 10 : Amplification des gènes *TAF5* et *FRMPD2*.

Les composants	Les volumes (µl)	Les concentrations
ADN	1	100 ng/µl
dNTP	8	1.6 mM
Tampon	5	0.5 X
Taq (Invitrogen)	0.3	1.5 U
F (amorce sens)	1	0.1 µM
R (amorce anti-sens)	1	0.1 µM
MgCl ₂	12.5	2.5 mM
H ₂ O	21.2	

Tableau 11 : Amplification des gènes *ERLIN1* et *WDFY4*.

Les composants	Les volumes (μ l)	Les concentrations
ADN	1	100 ng/ μ l
dNTP	8	1.6 mM
Tampon	5	0.5 X
Taq (Invitrogen)	0.3	1.5 U
F (amorce sens)	1	0.1 μ M
R (amorce anti-sens)	1	0.1 μ M
MgCl ₂	10	2 mM
H ₂ O	23.7	

IV.2.4-Contrôle de PCR :**IV.2.4.a-Protocole de contrôle :**

Le contrôle se fait par électrophorèse sur gel d'agarose 2%, et la visualisation du gel est réalisée sous UV dans le *Gel Doc* par le logiciel Quantity One.

On met 2 μ l de bleu de migration sur du parafilm sous forme de petites gouttes, on ajoute 8 μ l de chaque produit PCR et on le mélange avec la goutte du bleu de migration sur le parafilm puis on met le mélange dans les puits du gel. Ce dernier se trouvant dans le bac de migration immergé dans un tampon TBE (Tris Borate, EDTA). (On met un marqueur de taille (100 pb) de type *BIOMATIK*, pour connaître la taille des exons amplifiés)

L'ampérage du générateur (appareil à électrophorèse) est égale à 250 A et le voltage, égale à 160V. La migration dure 15 minutes et se fait du pole négatif vers le pole positif.

Tableau 12 : Taille de chaque exon amplifié.

Gènes	<i>APBB1IP</i>	<i>TAF5</i>	<i>ENO4</i>	<i>ERLIN1</i>	<i>FRMPD2</i>	<i>WDFY4</i>
Taille (pb)	367	312	351	601	381	345

IV.2.4.b-Préparation du gel d'agarose et du tampon de migration :

-On commence par la fixation du support et des peignes et on les met sous hotte.

-On met 150ml de tampon TBE 1X dans un bécher et on ajoute 3g d'agarose (6 petites cuillères à 0.5g), on mélange et on le met au micro-onde pendant 10 minutes (sans évaporation).

-On le laisse refroidir puis on ajoute 2µl de Red Safe (Pour la visualisation des bandes).

-On verse le mélange sur le support.

*Une dilution du tampon de migration TBE 10X est nécessaire, on ajoute 900ml d'H₂O à 100 ml de TBE 10X pour rendre la solution du TBE à une concentration 1X.

IV.3-Séquençage :

IV.3.1-Principe et méthode :

Méthode par synthèse enzymatique du brin complémentaire de l'ADN dont on cherche à déterminer la séquence à l'aide d'une ADN polymérase et de nucléotides « terminateurs de chaîne » ddNTP (didésoxyribonucléotides) qui ont un atome d'hydrogène à la place du groupement OH sur le carbone 3' du ribose. Lorsque le ddNTP s'insère au brin d'ADN complémentaire, l'enzyme (Taq polymérase) arrête la synthèse.

*Les ddNTP sont des didésoxyribonucléotides fluorescents.

On réalise le séquençage par un séquenceur à quatre capillaires de type *ABI Prisme 3130 Genetic Analyser*.

Les produits à utiliser pour le séquençage :

*3130 POP-7 Polymer de type *Applied Biosystem*.

*Tampon *capillary Electrophoresis Running Buffer* (10x) de type *Sigma*.

IV.3.2-Protocole :

-Il faut diluer le tampon avec de l'eau stérilisée pour passer d'une solution 10X à une solution 1X, puis remplir les backs du séquenceur avec ce tampon et les remettre à leur place et placer le flacon du POP-7 dans le séquenceur.

-Placer la plaque de séquençage dans le séquenceur, on le referme.

-Remplir la feuille de route (sur ordinateur).

-Mettre le séquenceur en marche.

*Avant de réaliser le séquençage, il faut passer par plusieurs étapes, ce sont des étapes post-PCR ou bien pré-séquençage. Ce sont des étapes indispensables pour la réalisation d'un séquençage.

IV.3.3-Purification des produits PCR :

On réalise une purification des produits PCR afin d'éliminer les excès d'amorces et de dNTPs. Cette purification se fait par un kit de purification appelé *DNA Clean & ConcentratorTM*-25 de type *ZYMO RESEARCH*.

Le kit de purification contient :

-Un flacon de DNA Binding Buffer.

-Un flacon de DNA Elution Buffer.

-Un flacon de DNA Wash Buffer.

-Les tubes de collection.

-Les micro-spins

Le protocole à suivre afin de purifier les produits PCR est le suivant :

-Dans un tube 1.5ml, on met 5x le volume de *DNA Binding Buffer* (80µl) à chaque volume de produit PCR, puis mixer brièvement par vortex.

-Mettre le mélange de chaque tube dans un micro-spin, ce dernier se trouve dans un tube collecteur.

-Centrifuger : 14000 tr/min pendant 1 minute.

-Ajouter 200µl de *DNA Wash Buffer* à chaque micro-spin, puis centrifuger : 14000 tr/min pendant 1 minute (protocole RCF). (Répéter cette étape deux fois)

-Mettre chaque micro-spin dans un tube 1.5ml stérile, puis ajouter 25µl de *DNA Elution Buffer* à chaque micro-spin. Laisser 1 minute à l'air libre.

-Centrifuger : 14000 tr/min pendant 1 minute (protocole RCF).

On obtient de l'ADN pure, qui prêt à utiliser.

IV.3.4-Réaction de séquence :

Le but de cette étape est d'avoir des produits post-PCR prêts pour être séquencés.

Pour faire une réaction de séquence, on prépare un mélange constitué de :

-Produit PCR purifié.

-Big Dye Terminator V3.1 (ddNTP) de type *Applied Biosystems*. (À mettre en dernier).

-Tampon 5X du Big Dye (Buffer 5x).

-Une amorce sens ou anti-sens.

-H₂O.

Tableau 13 : Les composants nécessaire pour chaque produit PCR.

Les composants	Volume (µl)
Big dye	2
Tampon	3
Amorce	0.2
H₂O	11.8
Volume final	17 + produit PCR purifié

On réalise la réaction de séquence par le thermocycleur ‘S-1000 Thermal Cycler’ de type *Bio-Rad*, selon le protocole suivant :

Tableau 14 : Protocole de réaction de séquence.

Température en °C	Temps	Nombre de cycle
96	1 minute	
96	1 minute	} 25 cycles
50	5 secondes	
60	4 minutes	
4	∞	

Remarque :

La réaction de séquence se fait à l’obscurité car le Big Dye est fluorescent.

IV.3.4.1-Purification des produits de la réaction de séquence :

On réalise la purification de réaction de séquence par le Sephadex G-50 de type *Sigma*. Cette étape a pour but d’éliminer tout excès de produits (ddNTP, amorces)

Préparation du Sephadex :

-On pèse 3g de Sephadex et on le met dans un falcon de 50ml stérile, puis on ajoute 40ml d’eau extra pure et on mélange (La solution doit être gardée à +4°C et ne doit pas être utilisée avant les trois heures qui suivent sa préparation).

Protocole :

-On prend des tubes collecteurs et des membranes à filtre spécifiques pour le Sephadex, on les lave avec de l’eau distillée.

-Centrifugation : 14000 tr/min pendant 2 minutes (Protocole RPM) des tubes collecteurs+membranes à filtre pour faire sécher l’eau distillée qui se trouve dans les tubes collecteurs et les membranes à filtre.

-On prélève 1000µl de solution de Sephadex après avoir jeté le surnageant et on remplit chaque membrane à filtre avec le Sephadex.

-Centrifugation : 3000 tr/min pendant 3 minutes (Protocole RPM).

-On prend les membranes à filtres et on les met dans des tubes Ependorff (1.5).

-On prend 20 μ l des produits de réaction de séquence, puis on les met sur la colonne de Sephadex qui se trouve dans la membrane à filtre.

-Centrifugation : 3000 tr/min pendant 3 minutes (Protocole RPM).

-On jette le contenu de la membrane à filtre et on garde le contenu des tubes Ependorff et on rajoute 10 μ l de formamide.

-On prélève 20 μ l de chaque tube Ependorff (Produit de réaction de séquence+formamide) et on les met dans les puits d'une plaque de séquençage à 96 puits stérile (96-well mounted plate) de type *Biosystem* puis on met un couvercle stérile sur les puits appelé : Septa.

Remarque : le formamide est utilisé comme solvant ou pour cristalliser des produits pharmaceutiques.

Chapitre III :

Résultats et discussion

I-Résultats :

I.1-Résultats du dosage de l'ADN effectué par spectrophotométrie :

Les résultats du dosage de l'ADN pour chaque membre de la famille étudiée seront résumés sur le tableau suivant :

Tableau 15 : Dosage de l'ADN des patients et des parents.

Individus	Concentration d'ADN ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	R (DO 260/DO 280)
III-7	69.5	1.61
III-8	312.5	1.88
IV-10	211.9	1.90
IV-11	77.3	1.72

I.2-Résultats d'amplification par PCR :

Une optimisation de PCR des exons à étudier a été faite par des ADN témoins, et avec une gamme de concentration variable de MgCl_2 afin de déterminer la concentration en MgCl_2 idéale pour chaque exon. Suite à cette optimisation, on a obtenu les résultats suivant :

-*APBB1IP* : l'exon7 a été amplifié à plusieurs concentrations de MgCl_2 qui sont : 1.5mM, 2mM, 2.5mM et 3mM. La bande bien amplifiée été observée à une concentration de MgCl_2 égale à 3mM.

-*TAF5* : l'exon 7 a été amplifié à des concentrations de MgCl_2 égale à 2mM, 2.5mM et 3mM.

-*ENO4* : l'exon 3, a été amplifié aussi à plusieurs concentrations de MgCl_2 , 2mM, 2.5mM et 3mM. L'amplification idéale est au niveau d'une concentration de MgCl_2 égale à 3mM.

-*ERLIN1* : l'exon11, a été amplifié à plusieurs concentrations de MgCl_2 , 1mM, 1.5mM et 2mM. Une bande bien amplifiée été observée à une concentration de MgCl_2 égale à 2mM.

-*FRMPD2* : l'exon 3, amplifié à plusieurs concentrations de MgCl_2 , 2mM, 2.5mM et 3mM. Une meilleure amplification était à une concentration de MgCl_2 égale à 2.5mM.

-*WDFY4* : l'exon 43, amplifié à concentration de MgCl_2 égale à 2mM.

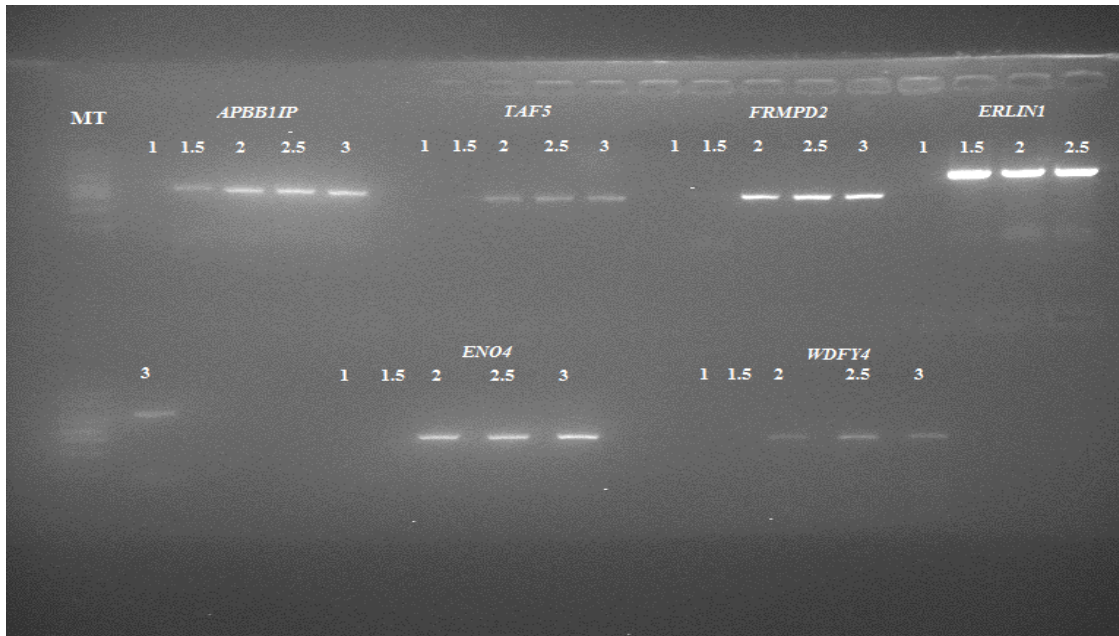


Figure 3 : Résultats de l'amplification d'ADN lors de l'optimisation.

❖ **Résultats d'amplification des ADN de la famille étudiée :**

Les PCR effectuées sur les ADN des patients et celui de leurs parents ont donné les résultats suivant :

❖ ***APBB1IP* :**

Amplification de l'exon 7 du gène APBB1IP sur l'ADN des individus malades, le garçon IV-10 et la fille IV-11 ainsi que celui de la mère III-7 et du père III-8 à une concentration de MgCl₂ égale à 3mM.

❖ ***TAF5* :**

Amplification de l'exon 7 du gène TAF5 sur l'ADN des individus malades, le garçon IV-10 et la fille IV-11 ainsi que celui de la mère III-7 et du père III-8 à une concentration de MgCl₂ égale à 2.5mM.

❖ ***ENO4* :**

Amplification de l'exon 3 du gène ENO4 sur l'ADN des individus malades, le garçon IV-10 et la fille IV-11 ainsi que celui de la mère III-7 et du père III-8 à une concentration de MgCl₂ égale à 3mM.

❖ ***ERLIN1*** :

Amplification de l'exon 11 du gène *ERLIN1* sur l'ADN des individus malades, le garçon IV-10 et la fille IV-11 ainsi que celui de la mère III-7 et du père III-8 à une concentration de $MgCl_2$ égale à 2mM.

❖ ***FRMPD2*** :

Amplification de l'exon 3 du gène *FRMPD2* sur l'ADN des individus malades, le garçon IV-10 et la fille IV-11 ainsi que celui de la mère III-7 et du père III-8 à une concentration de $MgCl_2$ égale à 2.5mM.

❖ ***WDFY4*** :

Amplification de l'exon 43 du gène *WDFY4* sur l'ADN des individus malades, le garçon IV-10 et la fille IV-11 ainsi que celui de la mère III-7 et du père III-8 à une concentration de $MgCl_2$ égale à 2mM.

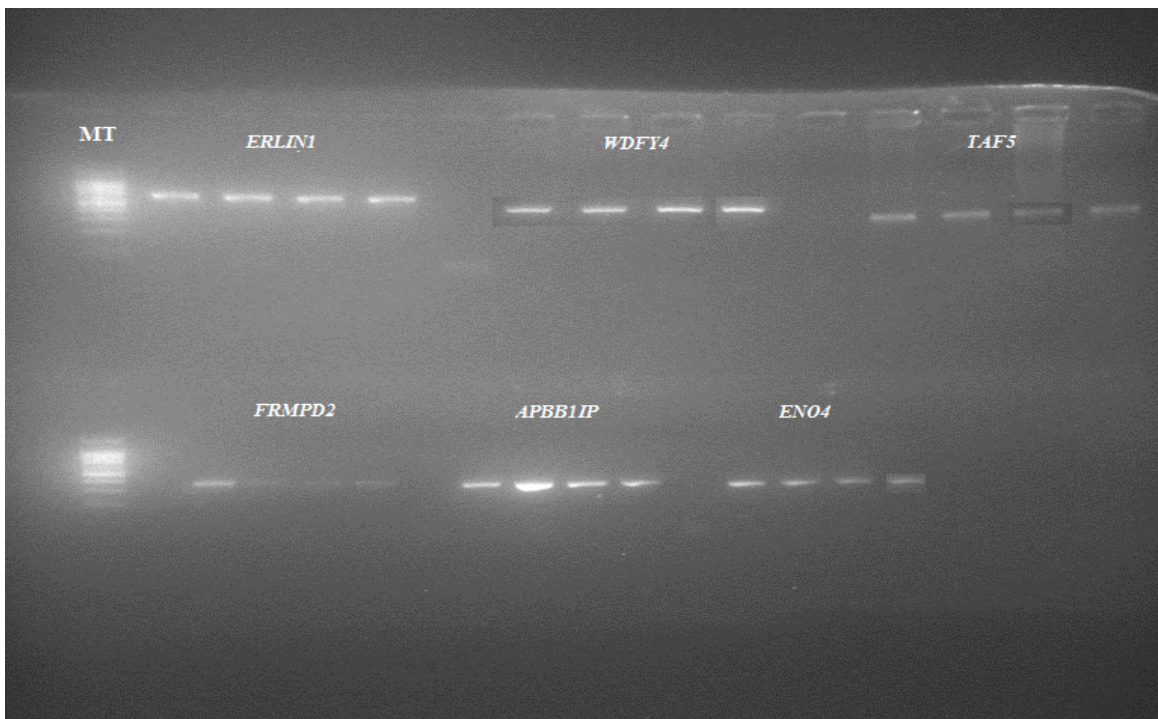


Figure 4 : Résultats d'amplification des exons.

Remarque :

Le choix des concentrations de $MgCl_2$ pour chaque exon a été fait en fonction des résultats de l'optimisation de PCR.

I.3-Résultats de séquençage :

Selon les résultats du séquençage, il y a confirmation des variations au niveau de cinq exons de cinq gènes différents, c'est-à-dire les patients sont homozygotes pour ces variations et les parents sont hétérozygotes pour ces mêmes variations. Une seule et unique variation qui n'a pas été trouvée chez les parents, dans ce cas la variation n'est probablement pas causale du phénotype.

❖ Le gène *APBB1IP* :

La variation est confirmée, qui est une substitution de T en A au niveau de l'exon 7 à la position 533 de la séquence d'ADNc. Cette variation est homozygote chez les patients IV-10 et IV-11 et elle est hétérozygote chez les parents III-7 et III-8. Suite à cette substitution de T en A, il y a eu changement de l'acide aminé au niveau de la position 178, il est passé d'une leucine qui est un acide aminé aliphatique hydrophobe à une histidine qui est un acide aminé dibasique. Ce passage d'un acide aminé aliphatique hydrophobe à un acide aminé dibasique provoque un changement propriétés structurales de la protéine (changement de conformation) car les deux acides aminés ne possèdent pas les mêmes caractéristiques physiologiques et biochimiques.

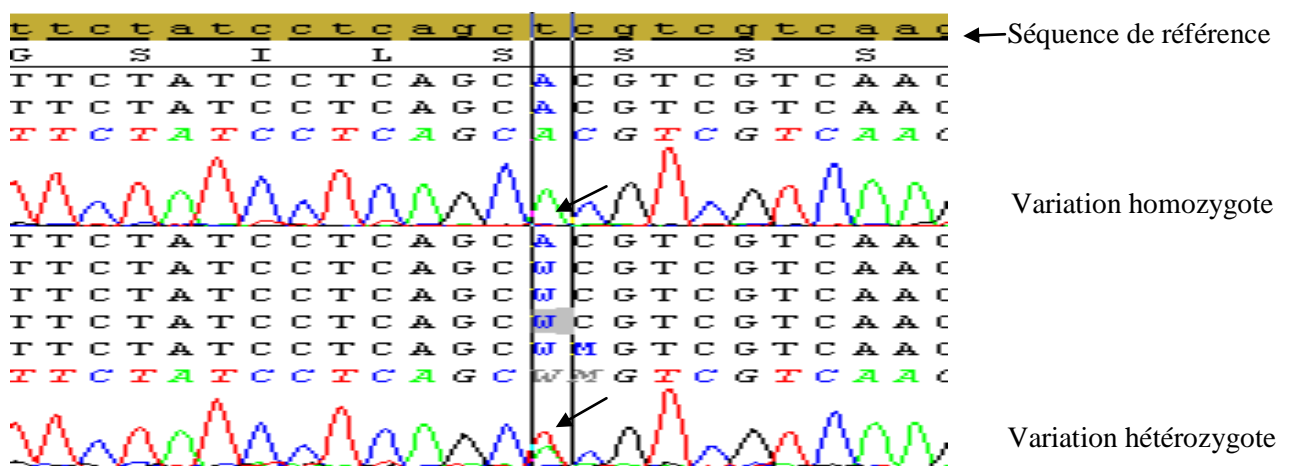


Figure 5 : Variation détectée au niveau du gène *APBB1IP*.

❖ Le gène *TAF5* :

La variation est confirmée, il s'agit d'une substitution de G en A au niveau de l'exon 7 à la position 1642 de la séquence d'ADNc. Elle est homozygote chez les patients IV-10 et IV-11 et hétérozygote chez les parents III-7 et III-8. Il y a eu changement de l'acide aminé glycine en arginine à la position 548 de la protéine. La glycine est un acide aminé aliphatique

hydrophobe contrairement à l'arginine qui est un acide aminé dibasique, ceci provoque un changement de conformation de la protéine, de propriétés biochimiques et de milieu physiologique.

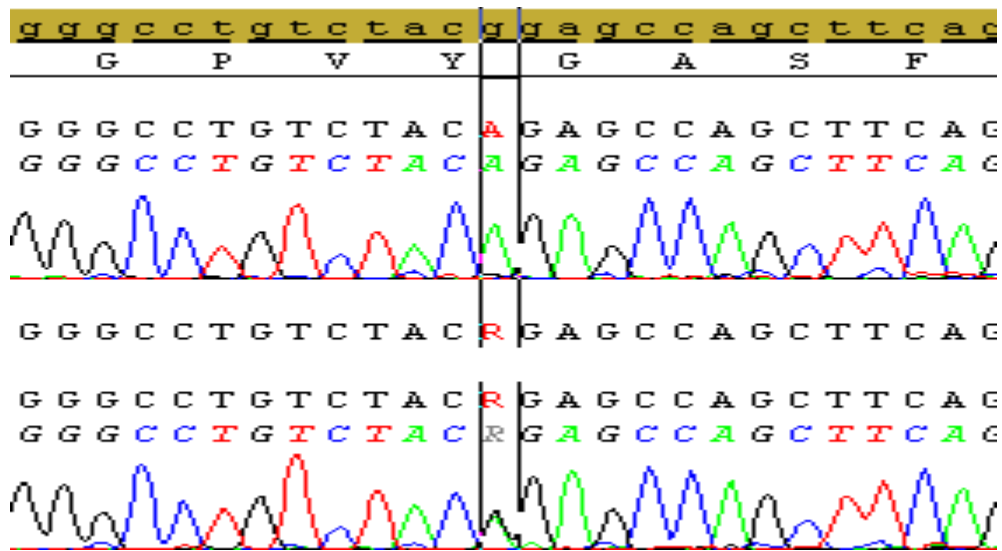


Figure 6 : Variation détectée au niveau du gène *TAF5*.

❖ **Le gène *ENO4* :**

Pour ce gène aussi, la variation est confirmée, il s'agit d'une substitution de A en G au niveau de l'exon 3 en position 316 de la séquence d'ADNc. Les parents III-7 et III-8 sont hétérozygotes pour la variation et les patients IV-10 et IV-11 sont homozygotes. Cependant, il y a eu un changement de l'acide aminé isoleucine à l'acide aminé valine en position 105 de la protéine. Les deux acides aminés sont aliphatiques hydrophobes et possèdent les mêmes propriétés physiques et biochimiques, cette variation peut ne pas être l'une des causes de la pathologie.

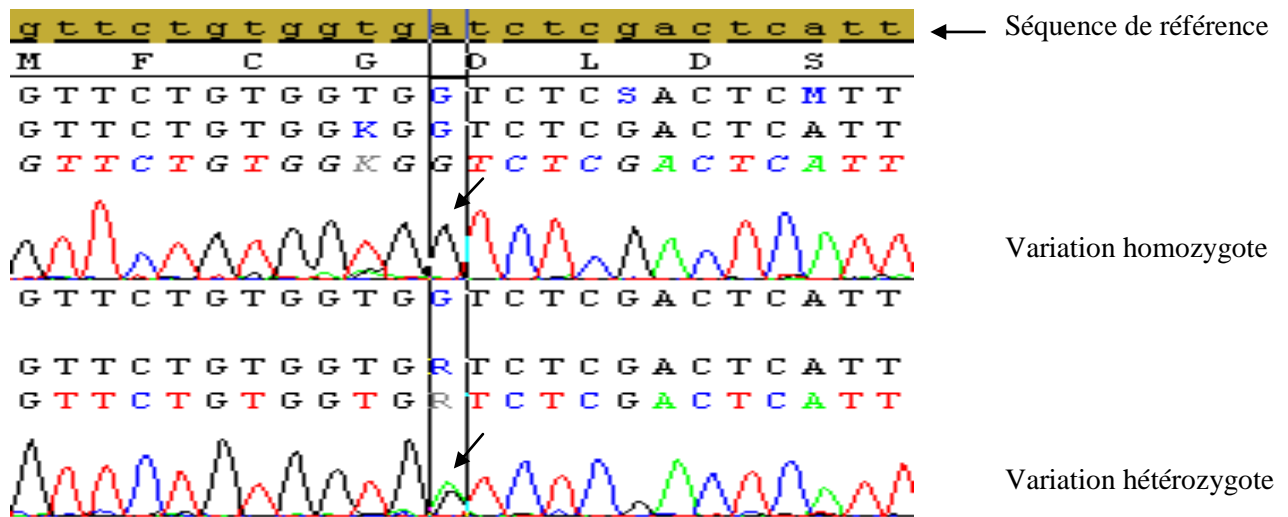


Figure 7 : Variation détectée au niveau du gène *ENO4*.

❖ Le gène *ERLIN1* :

La variation est confirmée, c'est une substitution de C en A en position 878 de la séquence d'ADNc de l'exon 11. Les parents III-7 et III-8 sont hétérozygotes pour la variation et les patients sont homozygotes. Il s'agit d'un changement de l'acide aminé sérine en un acide aminé tyrosine. La sérine est hydrophile hydroxylée (linéaire) contrairement à la tyrosine qui est un acide aminé aromatique hydroxylé (cyclique), ceci provoque un changement de conformation de la protéine ainsi que des propriétés chimiques.

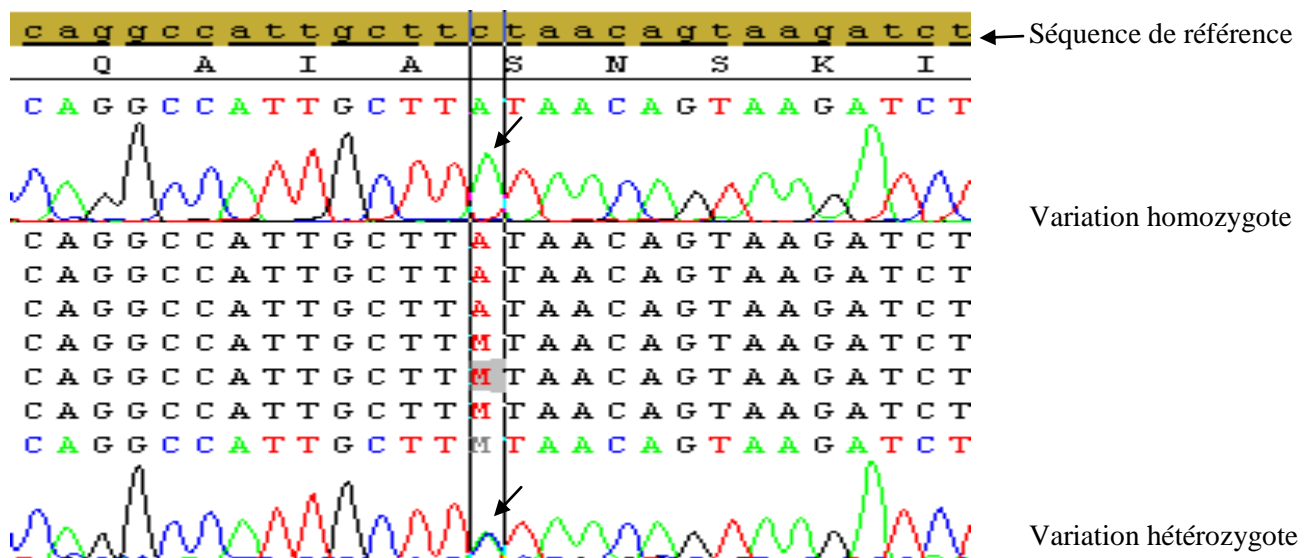


Figure 8 : Variation détectée au niveau du gène *ERLIN1*.

❖ **Le gène *FRMPD2* :**

La variation détectée par *Exome sequencing* chez les patients IV-10 et IV-11 qui sont homozygotes n'a pas été détectée chez les parents. IL s'agit d'une substitution de T en A en position 151 de l'ADN au niveau de l'exon3. Cette variation est située au niveau de la jonction intron-exon du site d'épissage, se trouvant dans la région 5'UTR. Elle peut toucher les séquences régulatrices telles que les activateurs (enhancers) et les inhibiteurs (silencers).

En conclusion, la variation ne ségrége pas avec le phénotype.

Une autre variation a été détectée, il s'agit d'une substitution de T en C à la position 171 de la séquence d'ADNc. Le patient IV-10 est homozygote pour la variation et les individus III-7, III-8 et IV-11 sont hétérozygotes. Il s'agit d'un SNP décrit (rs440943), il y a changement d'un acide aminé valine en un acide aminé valine en position 57 de la protéine, donc la variation est silencieuse.

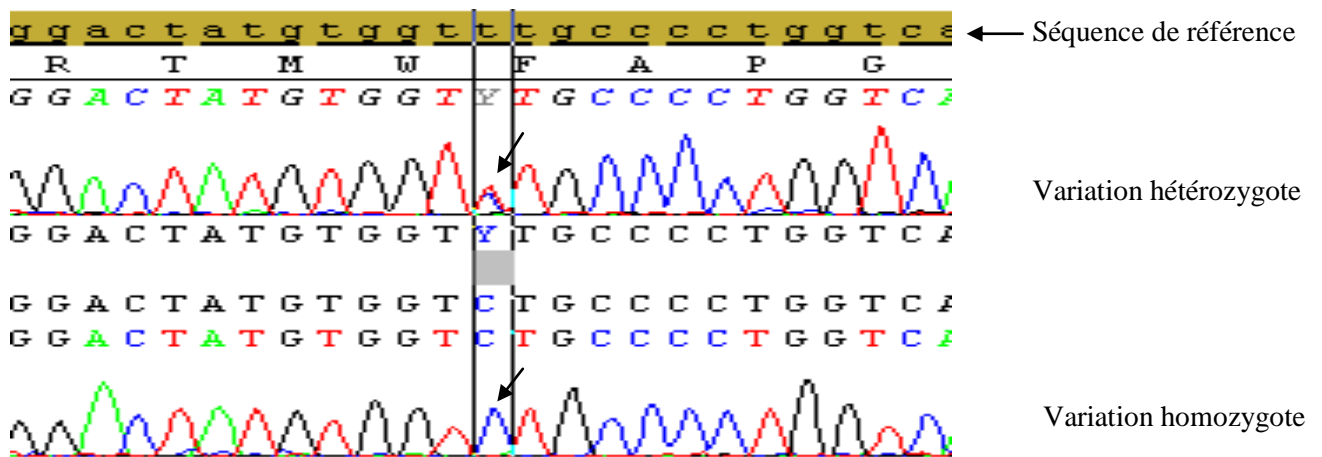


Figure 9 : Variation SNP détectée au niveau du gène *FRMPD2*.

❖ **Le gène *WDFY4* :**

La variation est confirmée, il s'agit d'une substitution de A en G en position 7085 de la séquence d'ADNc au niveau de l'exon 43. La variation est homozygote chez les patients IV-10 et IV-11 et hétérozygote chez les parents III-7 et III-8. Elle provoque un changement de l'acide aminé histidine (acide aminé basique à radical cyclique) en un acide aminé arginine (Acide aminé à radical linéaire) en position 2362 de la protéine, tous les deux sont basiques mais leur structure diffère ce qui induit un changement de conformation de la protéine.

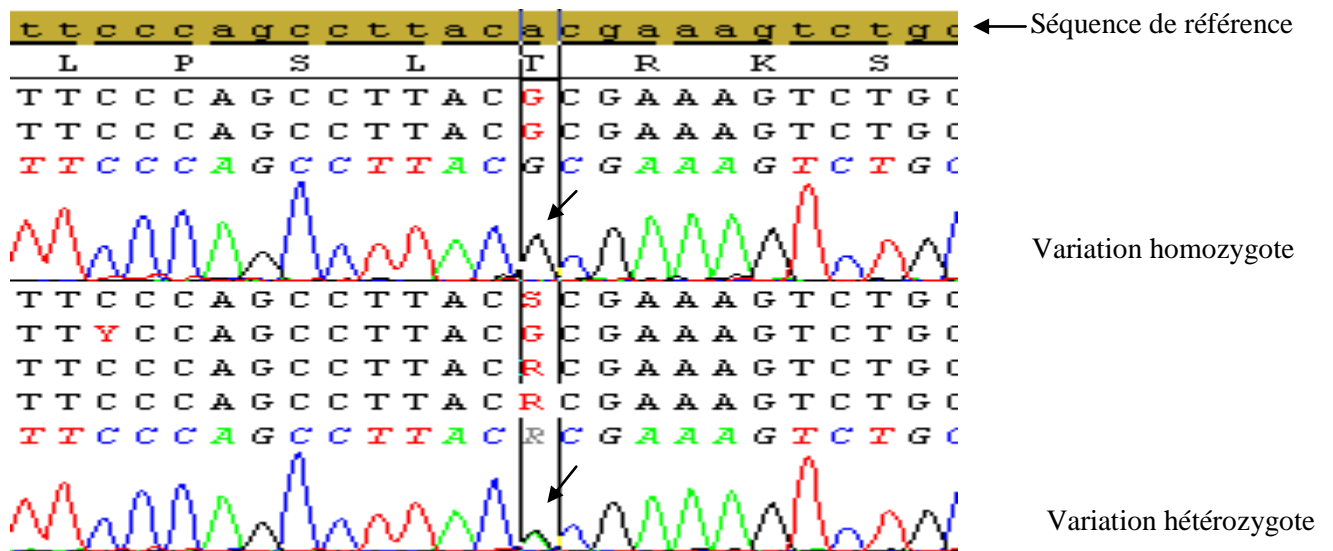


Figure 10 : Variation détectée au niveau du gène *WDFY4*.

Une autre variation a été détectée au niveau de ce gène, la variation est homozygote chez les individus III-7, IV-10 et IV-11 et elle est hétérozygote chez l'individu III-8. Il s'agit d'une variation non-informative située à la fin de l'exon 43 dans la région intronique (IVS 43-23 C > G).

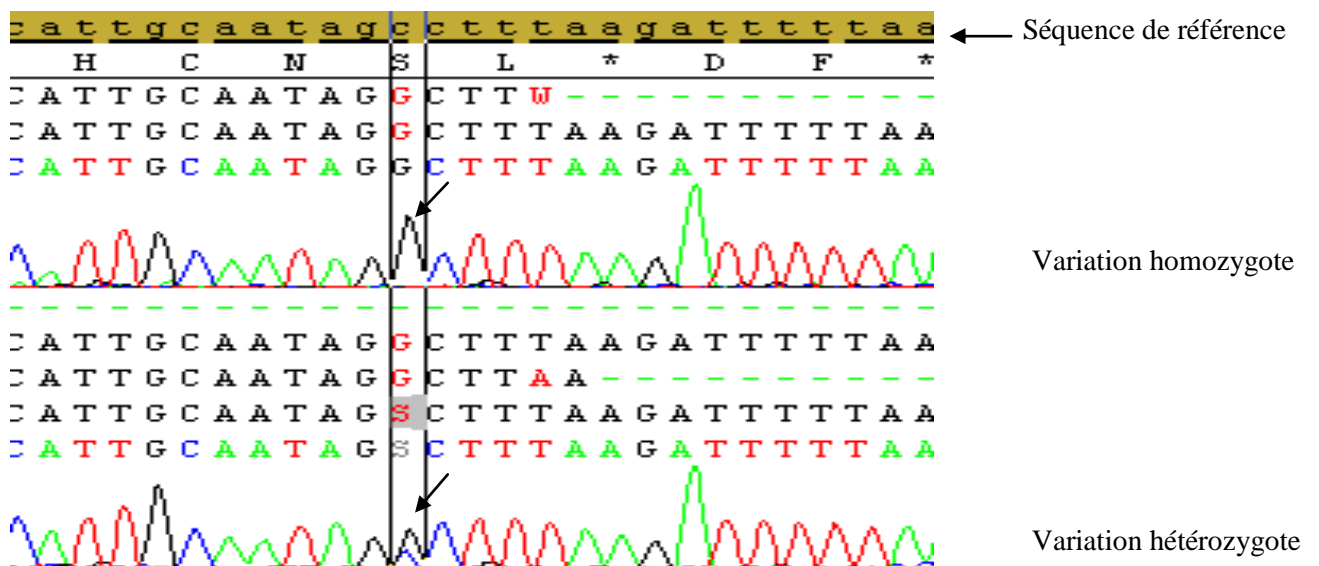


Figure 11 : Variation intronique détectée au niveau du gène *WDFY4*.

En conclusion, les variations confirmées qui sont situées au niveau de l'exon 7, exon 7, exon 3, exon 11 et exon 43 des gènes *APBB1IP*, *TAF5*, *ENO4*, *ERLIN1* et *WDFY4*, respectivement, sont probablement causales et ségrégent avec le phénotype autosomique récessif car elles ne

causent la pathologie qu'à l'état homozygote. Une seule variation n'a pas été confirmée, elle est homozygote chez les individus IV-10 et IV-11 mais les parents sont normaux, ceci indique que cette variation n'est pas causale et ne ségrège pas avec le phénotype.

II-Discussion :

Les variations homozygotes détectées par *Exome sequencing* chez les patients ensuite confirmées par séquençage (Sanger) chez les patients et retrouvées à l'état hétérozygote chez les parents sont des variations non-décrites dans la littérature, ni dans les bases de données. Il s'agit de nouvelles variations situées sur une région candidate au niveau du chromosome 10. Aucune mutation, ni variation située au niveau du chromosome 10 n'a été décrite comme étant impliquée dans le retard mental. Une délétion située au niveau du bras long du chromosome 10, c'est une délétion terminale qui débute au point d'arrêt des bandes 10q25-10q26, elle est identifiée chez des individus ayant un retard mental et d'autres malformations, dysmorphies faciales, retard psychomoteur, strabisme, cryptorchidie chez les males et retard de développement (Chang.Y.T et *al.*2012).

➤ Pour le gène *APBB1IP* :

APBB1IP est un gène qui contient 15 exons. La variation détectée au niveau de l'exon 7 de ce gène est confirmée, c'est une substitution de T en A en position 533 de l'ADNc et un changement de leucine en histidine en position 178 de la protéine (C.533 T > A ; P.178 L > H). Selon *Polyphen database* la mutation est probablement pathogène avec un score égal à 1 et l'acide aminé leucine est hautement conservé chez différentes espèces, ce qui nous amène à prédire qu'il s'agit probablement d'une mutation. Le gène *APBB1IP* est exprimé au niveau des tissus lymphatiques primaires et secondaires et la moelle osseuse (OMIM), il code pour une protéine appelée RIAM qui est une protéine adaptatrice impliquée dans la voie de signalisation des neuropeptides, impliqué aussi dans l'adhésion cellulaire induite par Rap1, cette dernière est une protéine Ras-GTP. Les protéines Ras-GTP sont de petits monomères à activité GTPase jouant un rôle dans l'adhésion, prolifération et survie cellulaire (Takala.H et Ylännä.J. 2012). RIAM est une protéine importante pour l'activation des intégrines via Rap1, elle lie Rap1-GTPase et la protéine taline et recrute cette dernière au niveau de la membrane cytoplasmique ce qui facilite l'activation des intégrines dépendantes de taline. Taline est une protéine localisée préférentiellement au niveau de la zone post-synaptique de la jonction neuromusculaire (Sealock.R et *al.* 1986).

La surexpression de *APBB1IP* induit la $\beta 1$ et $\beta 2$ -intégrines qui provoquent l'adhésion et la diffusion cellulaire. Par contre, sa répression réduit l'activation des intégrines et l'adhésion cellulaire dépendante de Rap1, ce qui conduit à la réduction du contenu cellulaire en F-actine (Worth.D.C et *al.* 2010).

Une autre voie d'activation des intégrines induite par RIAM, qui comprend la formation du complexe VASP-RIAM qui favorise la liaison de taline à la $\beta 1$ -intégrine. La $\beta 1$ -intégrine activée contrôle la régulation de la dynamique d'adhésion, protubérance et migration cellulaire (Worth.D.C et *al.* 2010). VASP est un régulateur clé de l'actine, localisé au niveau des régions de remodelage de l'actine y compris la protubérance cellulaire, les jonctions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire (Genatlas database). La déphosphorylation de VASP en S153 peut être nécessaire pour l'augmentation de la force d'adhésion lors de la rétraction membranaire dans la microglie (ensemble de cellules réticulo-endothéliales présentes dans le système nerveux centrale) qui soutient le rôle de VASP dans la régulation de la fonction des intégrines (Lee.H.S et *al.* 2009).

➤ **Pour le gène *TAF5* :**

La variation détectée au niveau de l'exon 7 du gène *TAF5*, c'est une substitution de G en A en position 1642 de l'ADNc et un changement de glycine en arginine en position 548 de la protéine (C.1642 G > A ; P. 548 G > R) est confirmée, ce gène est constitué de 11 exons. Selon Polyphen database et SIFT prediction database cette variation est probablement pathogène avec un score égal à 0.994. L'acide aminé glycine est conservé chez différentes espèces, alors on peut déduire qu'il s'agit probablement d'une mutation.

La transcription est le premier niveau de l'expression des gènes, elle est finement régulée afin d'assurer les niveaux d'expression appropriés pour les produits des gènes. *TAF5* est un gène qui code pour une protéine qui joue un rôle fondamental dans la transcription, cette protéine est un facteur co-activateur de la transcription qui possède la fonction de reconnaissance des promoteurs et modifie les facteurs généraux de transcription (GTF) afin de faciliter l'assemblage du complexe d'initiation de la transcription, elle est exprimée au niveau de l'intestin, ganglions lymphatiques, testicules et vessie (OMIM).

Les protéines TAFs sont des composantes majeures de la machinerie de régulation de la transcription des gènes eucaryotes transcrits par l'ARN polymérase II, elles peuvent fonctionner en tant que facteurs de reconnaissance des promoteurs, en tant que co-activateurs

et comme coenzymes d'autres protéines (Zaborowska.J et al. 2012), ces facteurs (TAFs) sont hautement conservés chez les espèces. Il a été démontré que TAF5 se lie à l'ARN polymérase II qui transcrit l'ARNsn (small nuclear RNA) (Zaborowska.J et al. 2012) en sachant que TAF5 constitue l'une des sous-unités du TFIID (l'un des constituants du complexe de pré-initiation de la transcription). Parmi les TAFs, seul TAF5 a été identifié au niveau des promoteurs des gènes codants pour l'ARNsn, ces derniers sont des composants majeurs des snurps (petits ribonucléoprotéines) qui sont impliqués dans la formation du spliceosome lors de la maturation des pré-ARNm.

➤ **Pour le gène *ENO4* :**

Variation confirmée, située au niveau de l'exon 3 du gène *ENO4*, il s'agit d'une substitution de A en G en position 316 de l'ADNc et changement de l'isoleucine en valine en position 105 de la protéine (C.316 A > G ; P.105 I > V), le nombre total des exons de ce gène est de 16. Selon polyphen database, cette mutation peut être bénigne et ne provoque pas de pathologies. De plus, l'Acide aminé valine située dans cette position est plus ou moins conservé chez les différentes espèces.

Les gènes de la famille des émolases apparaissent dans la lignée des cellules germinales des mâles. L'*ENO4*, code pour une nouvelle émolase identifiée chez les souris et considérée comme étant la principale émolase au niveau des spermatozoïdes des souris, elle est impliquée dans les réactions de glycosylation et la production de l'ATP. De plus, elle est nécessaire pour l'assemblage de la gaine fibreuse du flagelle du spermatozoïde et fournit la plupart des activités émolase dans le sperme. En outre, une nouvelle émolase a été retrouvée au niveau de la pièce intermédiaire du spermatozoïde humain qui possède de nouvelles propriétés biochimiques et enzymatiques (Nakamura.N et al. 2013), on suppose qu'il s'agit de l'émolase codée par le gène *ENO4*.

➤ **Pour le gène *ERLIN1* :**

Variation confirmée au niveau de l'exon 11 du gène *ERLIN1*, c'est une substitution de C en A en position 878 de l'ADNc et un changement de sérine en tyrosine en position 293 de la protéine (C.C878A ; P.S293Y), cette substitution de base induit le changement de l'acide aminé dans cette position, la sérine est remplacée par la tyrosine ce qui provoque un changement de conformation de la protéine. Selon *Polyphen database*, cette variation est probablement pathogène avec un score égal à 0,988 et vu que l'acide aminé sérine est

conservée chez différentes espèces, donc il est fort probable qu'il s'agit d'une mutation et non d'une simple variation qui est survenue d'une façon sporadique.

Le gène *ERLIN1* contient 12 exons, il est exprimé au niveau du cœur, intestin, utérus, placenta, testicules, moelle osseuse et système nerveux périphérique. Il code pour une protéine impliquée potentiellement dans l'activation des cellules dendritiques, elle est toujours présente au niveau des cellules dendritiques activées par un antigène et absente au niveau des cellules dendritiques inactives (Browman.D.T et *al.* 2006). *ERLIN1* code pour un membre de la famille des protéines prohibitines qui définissent les domaines des radeaux lipidiques, se sont des protéines à domaine SPFH. Les radeaux lipidiques sont des régions avec différentes caractéristiques dans la composition structurelle qui semble agir comme plates-formes pour co-localiser les protéines impliquées dans les voies de signalisation cellulaire (Feitosa.M.F et *al.* 2013).

Les protéines à domaine SPFH sont impliquées dans la régulation des canaux ioniques de la membrane plasmique, principalement les stomatines (Pednekar.D et *al.* 2011), qui sont des protéines membranaires retrouvées principalement au niveau des hématies et leur absence provoque la stomatocytose (anémie hémolytique) (Green.J.B et *al.* 2004). Outre les stomatines, il y a les prohibitines qui contrôlent l'intégrité fonctionnelle de la membrane mitochondriale interne (Pednekar.D et *al.* 2011), il s'agit de protéines ubiquitaires nécessaires à la prolifération cellulaire et le développement. Des anomalies provoquant une perte de fonction du gène de prohibitine est largement impliquée dans le dysfonctionnement des mitochondries (Osman.C et *al.* 2009).

ERLIN2 est la protéine homologue de *ERLIN1* situées au niveau du réticulum endoplasmique dont l'assemblage forme un complexe en forme d'anneau (Pednekar.D et *al.* 2011) et elle sont situées aussi au niveau de la membrane nucléaire (Yildirim.Y et *al.* 2011). Il a été démontré que la protéine *ERLIN2* tronquée été impliquée dans le retard mental, et le dysfonctionnement moteur, il semble que le développement s'arrête à un point puis il régresse avec le temps. Cela est dû à une pathologie qui touche les motoneurones (Yildirim.Y et *al.* 2011). Ces derniers sont situés dans la corne antérieure de la moelle épinière (SNC) intervenant dans le commandement des fibres musculaires.

➤ **Pour le gène *FRMPD2* :**

Au niveau de ce gène la variation (C.T151A) qui se trouve dans la région intronique 5'UTR (site d'épissage) n'a pas été détectée chez les parents, ces derniers présentent un génotype normal, ce qui explique que cette variation n'est peut être pas impliquée dans ce phénotype. Une autre variation a été détectée, il s'agit d'une substitution de T en C (C.T171C ; P.V57=) retrouvée à l'état hétérozygote chez les individus III-7, III-8 et IV-11 et à l'état homozygote chez l'individu IV-10. C'est une variation SNP-décrit (rs440943), il y a un changement d'acide aminé valine par une autre valine donc c'est une variation silencieuse qui n'est pas pathogène.

FRMPD2 est un gène à 29 exons exprimé au niveau de la trachée et le cerveau fœtal, il code pour une protéine à domaine multi-PDZ qui joue un rôle crucial dans l'établissement et la maintenance de la polarisation cellulaire (Stenzel.N et *al.* 2009), la protéine est localisée principalement au niveau de la surface basolatérale des cellules épithéliales (Lipinski.S et *al.* 2012) à proximité des marqueurs protéiques de la jonction étanche « Zonula occludens », son recrutement au niveau des jonctions cellule/cellule est strictement dépendant de la E-cadhérine, qui joue un rôle dans la formation des jonctions étanches (Stenzel.N et *al.* 2009).

➤ **Pour le gène *WDFY4* :**

Variation confirmée au niveau de l'exon 43 du gène *WDFY4*, qui est une substitution de A en G en position 7085 de l'ADNc et qui provoque un changement de l'histidine en arginine en position 2362 au niveau de la protéine (C.A7085G ; P.H2362R) qui provoque un changement de conformation de la protéine. Selon *Polyphen database*, il est possible que cette substitution soit pathogène avec un score égal à 0,501. En outre, l'acide aminé histidine située dans cette position est conservée chez différentes espèces, dans ce cas il s'agit probablement d'une mutation.

Une autre variation a été détectée au niveau de cet exon, elle est hétérozygote chez le père (III-8), homozygote chez les individus III-7, IV-10 et IV-11. Il s'agit d'une substitution de C en G qui est une variation non-informative située dans la partie intronique à la fin de l'exon 43 (IVS43-23C > G) donc c'est une variation non-causale.

WDFY4 est un gène qui contient 61 exons, il code pour une protéine de taille énorme exprimée au niveau du cerveau, moelle épinière, poumon, rate, rein et foie du fœtus (Nagase.T et *al.* 2000) dont la fonction est encore inconnue. C'est une protéine à deux

domaines, WD40 et BEACH. Le domaine WD40 est connu dans un nombre important de protéines eucaryotes qui couvre une grande variété de fonctions y compris la régulation du signal de transduction, l'assemblage du cytosquelette et le traitement des pré-ARNm, pendant que le domaine BEACH est impliqué dans le trafic membranaire (Yang.W et *al.* 2010). Peu de choses sont connues à propos de la fonction de cette protéine, mais elle est hautement conservée chez différentes espèces et son expression prédomine au niveau des tissus immunitaires (nœuds lymphatiques, rate, thymus et tonsils laryngiques) (Yang.W et *al.* 2010).

D'après les résultats obtenus, le phénotype (RM, cataracte, microcéphalie) est probablement causé par plusieurs gènes donc il s'agit d'un phénotype polygénique. Ces gènes sont impliqués dans la régulation des voies de signalisation fondamentales de la cellule, ceci explique qu'il existe une relation entre la sévérité de la pathologie et l'effet polygénique.

Conclusion

Conclusion

Dans ce travail de recherche, nous nous sommes proposé de faire une étude génétique et moléculaire sur une famille tunisienne dont deux individus sont atteints de retard mental non-spécifique associé à la cataracte et une microcéphalie et qui présentent une transmission autosomique récessive.

Ces patients ont été examinés cliniquement et ont bénéficié d'une IRM (imagerie par résonance magnétique). L'examen clinique a montré que le RM été associé principalement à une microcéphalie et une cataracte congénitale, ainsi que d'autres signes cliniques secondaires. L'examen cytogénétique a révélé un caryotype normal chez ces patients et l'IRM a montré la présence du syndrome de Dandy Walker et un amincissement du corps calleux.

Le but de cette étude était de vérifier et confirmer des variations homozygotes identifiées au niveau de six gènes différents par l'approche *Exome sequencing* et *Genome scan*, chez les patients et de les vérifier chez les parents par la technique de séquençage (méthode de Sanger).

Des mutations ont été confirmées au niveau des gènes *APBB1IP*, *TAF5* et *ERLIN1* et qui sont pathogènes (*SIFT prediction database*, *Polyphen database*) donc ces gènes sont probablement impliqués dans le phénotype retrouvé chez ces patients qui est le retard mental associé principalement à une cataracte congénitale et une microcéphalie.

En ce qui concerne les gènes *WDFY4* et *ENO4*, les mutations ont été confirmée mais avec un degré de pathogénicité faible (*SIFT prediction database*, *Polyphen database*). Pour le gène *ENO4*, la mutation elle est plutôt bénigne (non-pathogène) et la mutation retrouvée au niveau du gène *WDFY4*, il y a une possibilité qu'elle soit pathogène.

La variation retrouvée au niveau du gène *FRMPD2* n'a pas été retrouvée chez les parents, donc ce gène n'est pas impliqué dans le phénotype, bien que ce gène soit exprimé au niveau du cerveau foetal et est impliqué dans des voies de signalisation très importantes, qui sont l'adhésion et la polarisation cellulaire.

En conclusion, les gènes probablement impliqués dans le retard mental associé à la cataracte congénitale et microcéphalie sont *APBB1IP*, *TAF5*, *ERLIN1* et *WDFY4*, il s'agit d'un phénotype polygénique. Ce résultat est attendu car ces gènes sont impliqués dans des voies de

signalisation majeures et fondamentales pour les cellules telles que le développement, la prolifération, l'adhésion, l'immunité, la réponse synaptique et la régulation de la transcription.

Perspectives

Ce résultat ouvre des portes pour la recherche dans l'avenir des causes impliquées dans l'association du retard mental à d'autres anomalies , qui est une pathologie extrêmement hétérogène et serait idéal de refaire ces expérimentations sur d'autres patients afin de pouvoir améliorer le pronostic, le conseil génétique et la prise en charge des patients. Ceci est considéré comme un soutien moral pour leurs familles et procure de la gratification.

Bibliographie

Les bases de données informatiques :

- Human-Ensembl Genome Browser : http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index
- Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>
- Polyphen-2 database : <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>
- Primer 3 : <http://simgene.com/Primer3>
- Psychologies.com : <http://www.psychologies.com/Dico-Psycho/Quotient-intellectuel>
- SIFT prediction database : http://sift.jcvi.org/www/SIFT_enst_submit.html
- UCSC Genome Browser: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>

*Abbasi-Moheb.L, Mertel.S, Gonsior.M, Nouri-Vahid.L, Kahrizi.K, Cirak.S.T, Wieczorek.D, Motazacker.M.M, Esmaeeli-Nieh.S, Cremer.K, Weißmann.R, Tzschach.A, Garshasbi.M, Abedini.S.S, Najmabadi.H, Ropers.H.H, Sigrist.S.J, Kuss.A.W. Mutations in NSUN2 Cause Autosomal-Recessive Intellectual Disability (2012). *Am J Hum Genet* 90, 847–855.

*Abou Jamra.R, Wohlfart.S, Zweier.M, Uebe.S, Priebe.L, Ekici.A, Giesebrecht.S, Abboud.A, Al Khateeb.M.A, Fakher.M, Hamdan.S, Ismael.A, Muhammad.S, Nöthen.M.M, Schumacher.J, Reis.A. Homozygosity mapping in 64 Syrian consanguineous families with non-specific intellectual disability reveals 11 novel loci and high heterogeneity (2011). *Eur J of Hum Genet*; 19, 1161-1166.

*Abou Jamra.R, Philippe.O, Raas-Rothschild.A, Eck.S.H, Graf.E, Buchert.R, Borck.G, Ekici.A, Brockschmidt .F.F, Nöthen.M.M, Munnich.A, Strom.T.M, Reis.A, Colleaux.L. Adaptor Protein Complex 4 Deficiency Causes Severe Autosomal-Recessive Intellectual Disability, Progressive Spastic Paraplegia, Shy Character, and Short Stature (2011). *Am J of Hum Genet*; 88,788-795.

*Backx.L, Vermeesch.J, Pijkels.E, De Ravel.T, Seuntjens.E, Esch.H.V. PPP2R2C, a gene disrupted in autosomal dominant intellectual disability (2010). *Eur J of Med Genet* 53: 239-243.

*Bak.O. Some aspects of measurement by Wechsler Intelligence Scale in the context of mental retardation diagnosis in adults. *Psychiatr Pol* 2001; 35(4): 635-46.

* Basel-Vanagaite.L. Genetics of autosomal recessive non-syndromic mental retardation: recent advances (2007). *Clin Genet* 72: 167–174.

- *Browman.D.T, Resek.M.E, Zajchowski.L.D, Robbins.S.M. Erlin-1 and erlin-2 are novel members of the prohibitin family of proteins that define lipid-raft-like domains of the ER. *J Cell Sci.* 119: 3149-3160, 2006.
- *Çalışkan.M, Chong.J.X, Uricchio.L, Anderson.R, Chen.P, Sougnez.C, Garimella.K, Gabriel.S.B, Depristo.M.A, Shakir.K, Matern.D, Das.S, Waggoner.D, Nicolae.D.L, Ober.C. Exome sequencing reveals a novel mutation for autosomal recessive non-syndromic mental retardation in the TECR gene on chromosome 19p13 (2011). *Hum Mol Genet, Vol. 20, No. 7.*
- *Chang.Y.T, Chou.I.C, Wang.C.H, Chin.Z.N, Kuo.H.T, Lin.C.C, Tsai.C.H, Tsai.F.J. Chromosome 10q Deletion del (10)(q26.1q26.3) is Associated with Cataract (2012). *Ped and Neo xx:* 1-5.
- *Darvish.H, Esmaeeli-Nieh.S, Monajemi.G.B, Mohseni.M, Ghasemi-Firouzabadi.S, Abedini.S.S, Bahman.I, Jamali.P, Azimi.S, Mojahedi.F, Dehghan.A, Shafeghati.Y, Jankhah.A, Falah.M, Soltani Banavandi.M.J, Ghani-Kakhi.M, Garshasbi.M, Rakhshani.F, Naghavi.A, Tzschach.A, Neitzel.H, Ropers.H.H, Kuss.A.W, Behjati.F, Kahrizi.K, Najmabadi.H. A clinical and molecular genetic study of 112 Iranian families with primary microcephaly (2013). *J Med Genet 47:* 823-828.
- *Di Nuovo.A.G, Di Nuovo.S, Buono.S. Intelligent quotient estimation of mental retarded people from different psychometric instruments using artificial neural networks. *Artif Intell Med.* 2012; 54(2): 135-45.
- *Feenstra.I, Vissers.L.E.L.M, Pennings.R.J.E, Nillessen.W, Pfundt.R, Kunst.H.P, Admiraal.R.J, Veltman.J.A, Ravenswaaij-Arts.C.M.A.V, Brunner.H.G, Cremers.C.W.R.J. Disruption of Teashirt Zinc Finger Homeobox 1 Is Associated with Congenital Aural Atresia in Humans (2011). *Am J of Hum Genet 89:* 813-819.
- *Feitosa.M.F, Wojczynski.M.K, North.K.E, Zhang.Q, Province.M.A, Carr.J.J, Borecki.I.B. The ERLIN1-CHUK-CWF19L1 gene cluster influences liver fat deposition and hepatic inflammation in the NHLBI Family Heart Study. *Atherosclerosis xxx* (2013) 1-6.
- *Garshasbi.M, Hadavi.V, Habibi.H, Kahrizi.K, Kariminejad.R, Behjati.F, Tzschach.A, Najmabadi.H, Ropers.H.H, Kuss.A.W. A Defect in the TUSC3 Gene Is Associated with Autosomal Recessive Mental Retardation (2008). *Am J of Hum Genet 82:* 1158-1164.
- *Garshasbi.M, Kahrizi.K, Hosseini.M, Vahid.L.N, Falah.M, Hemmati.S, Hu.H, Tzschach.A, Ropers.H.H, Najmabadi.H, Kuss.A.W. A Novel Nonsense Mutation in TUSC3 is Responsible for non-syndromic Autosomal Recessive Mental Retardation in a Consanguineous Iranian Family (2011). *Am J Med Genet Part A 155:* 1976-1980.

- *Gilling.M, Lind-Thomsen.A, Mang.Y, Bak.M, Møller.M, Ullmann.R , Kristoffersson.U, Kalscheuer.V.M, Henriksen.K.F, Bugge.M , Tümer.Z, Tommerup.N. Biparental inheritance of chromosomal abnormalities in male twins with non-syndromic mental retardation. *Eur J of Med Genet* 54 (2011) e383ee388.
- *Goldenberg.A, Saugier-veber.S. Retards mentaux d'origine génétique. *Pathologie biologie* 58 (2010) 331–342.
- *Green.J.B, Fricke.A.B, Margaret.B, Chetty.C, Von Du`Ring.A.M, Preston.B.G, Stewart.G.W. Eukaryotic and prokaryotic stomatins: the proteolytic link. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 32 (2004) 411 –422.
- *Gussaibia.N, Sarrai.N, Methari.N, Ridouh.B, Chaabouni Bouhamed.H. Analyse génétique de six familles Algériennes avec retard mental non spécifique autosomique récessif (2011). *La Tunisie médicale Vol 89(n°05) : 466-470.*
- *Halevy.A, Basel-Vanagaite.L, Shuper.A, Helman.S, Har-Zahaf.A, Birk.E, Maya.I, Kornreich.L, Inbar.D, Nürnberg.G, Nürnberg.P, Steinberg.T, Straussberg.R. Microcephaly-Thin Corpus Callosum Syndrome Maps to 8q23.2-q24.12. *J Pediatr Neurol* 46 (2012) 363-368.
- *Hamdan.F.F, Gauthier.J, Araki.Y, Lin.D.T, Yoshizawa.Y, Higashi.K, Park.A.R, Spiegelman.D, Dobrzyniecka.S, Piton.A, Tomitori.H, Daoud.H, Massicote.C, Henrion.E, Diallo.O, S2d Group, Shekarabi.M, Marineau.C, Shevell.M, Maranda.B, Mitchell.G, Nadeau.A, D'anjou.G, Vanasse.M, Srour.M, Lafrenière.R.G, Drapeau.P, Lacaille.J.C, Kim.E, Lee.J.R, Igarashi.K, Huganir.R.L, Rouleau.G.A, Michaud.J.L. Excess of De Novo Deleterious Mutations in Genes Associated with Glutamatergic Systems in Nonsyndromic Intellectual Disability (2011). *Am J Hum Genet* 88: 306-316.
- *Higgins.J.J, Pucilowska.J, Lombardi.R.Q, Rooney.J.P. Candidate genes for recessive non-syndromic mental retardation on chromosome 3p (MRT2A). *Clin Genet* 2004:65: 496-500.
- *Hu.H, Eggers.K, Chen.W, Garshasbi.M, Motazacker.M.M, Wrogemann.K, Kahrizi.K, Tzschach.A, Hosseini.M, Bahman.I, Hucho.T, Mühlhoff.M, Gerardy-Schahn.R, Najmabadi.H, Roppers.H.H, Kuss.A.W. ST3GAL3 Mutations Impair the Development of Higher Cognitive functions (2011). *Am J Hum Genet* 89: 407-414.
- *Huang.B Et He.W. Molecular characteristics of inherited congenital cataracts. *Eur J of Med Genet* 53 (2010): 347-357.
- *Huang.L, Jolly.L.A, Willis-Owen.S, Gardner.A, Kumar.R, Douglas.E, Shoubridge.C, Wiczorek.D, Tzschach.A, Cohen.M, Hackett.A, Field.M, Froyen.G, Hu.H, Haas.S.A, Ropers.H.H, Kalscheuer.V.M, Corbett.M.A, Gecz.J. A noncoding, Regulatory Mutation

Implicates HCFC1 in Nonsyndromic Intellectual Disability (2012). *Am J Hum Genet* 91: 694-702.

*Kahrizi.K, Najmabadi.H, Kariminejad.R, Jamali.P, Malekpour.M, Garshasbi.M, Ropers.H.H, Kuss.A.W, Tzschach.A. An autosomal recessive syndrome of severe mental retardation, cataract, coloboma and kyphosis maps to the pericentromeric region of chromosome 4. *Eur J of Hum Genet* (2009) 17: 125-128.

*Kakar.N, Goebel.I, Daud.S, Nürnberg.G, Agha.N, Ahmad.A, Nürnberg.P, Kubisch.C, Ahmad.J, Borck.G. A homozygous splice site mutation in TRAPPC9 causes intellectual disability and microcephaly. *Eur J of Med Genet* 55 (2012): 727-731.

*Khan.M.A, Rafiq.M.A, Noor.A, Ali.N, Ali.G, Vincent.J.B, Ansar.M. A novel deletion mutation in the TUSC gene in a Consanguineous Pakistani family with autosomal recessive nonsyndromic intellectual disability. *BMC Med Genet* 2011: 12:56.

*Lee.H.S, Lim.C.J, Puzon-McLaughlin.W, Shattil.S.J, Ginsberg.M.H. RIAM Activates Integrins by Linking Talin to Ras GTPase Membrane-targeting Sequences (2009). *J of Biological Chemistry Vol284 N° 8*.

*Lipinski.S, Grabe.N, Jacobs.G, Billmann-Born.S, Tili.A, Häsler.R, Aden.K, Paulsen.M, Arlf.A, Kraemer.L, Hagemann.N, Erdmann.K.S, Schreiber.S, Rosenstiel.P. RNAi screening identifies mediators of NOD2 signaling: Implications for spatial specificity of MDP recognition (2012). *PNAS Vol 109 no 52*.

*Lubs.H.A, Stevenson.R.E, Schwartz.C.E. Fragile X and X-Linked Intellectual Disability: Four Decades of Discovery (2012). *Am J Hum Genet* 90: 579-590.

*Mahmood.S, Ahmad.W, Hassan.M.J. Autosomal recessive primary microcephaly (MCPH): clinical manifestations, genetic heterogeneity and mutation continuum. *ORPHANET J of Rare Diseases* 2011, 6:39.

*McLaren.J, Bryson.S.E. Review of recent epidemiological studies of mental retardation: prevalence, associated disorders, and etiology. *Am J Mental Retardation* (1987);92:243-54.

*Mir.A, Kaufman.L, Noor.A, Motazacker.M.M, Jamil.T, Azam.M, Kahrizi.K, Rafiq.M.A, Weksberg.R, Nasr.T, Naeem.F, Tzschach.A, Kuss.A.W, Ishak.G.E, Doherty.D, Ropers.H.H, Barkovich.A.J, Najmabadi.H, Ayub.M, Vincent.J.B. Identification of Mutation in TRAPPC9, which Encodes the NIK-and IKK- β -Binding Protein, in Nonsyndromic Autosomal-Recessive Mental Retardation (2009). *Am J Hum Genet* 85: 909-915.

*Mochida.G.H, Mahajanah.M, Hill.A.D, Basel-Vanagaite.L, Gleason.D, Hill.R.S, Bodell.A, Crosier.M, Straussberg.R, Walsh.C.A. A Truncating Mutation of TRAPPC9 Is Associated

with Autosomal-Recessive Intellectual Disability and Postnatal Microcephaly (2009). *Am J of Hum Genet* 85: 897-902.

*Mosrati.M.A, Schrauwen.I, Kamoun.H, Charfeddine.I, Fransen.E, Ghorbel.A, Camp.G.V, Masmoudi.S. Genome wide analysis in a family with sensorineural hearing loss, autism and mental retardation. *Gene* 510 (2012) 102-106.

*Motazacker.M.M, Rost.B.R, Hucho.T, Garshasbi.M, Kahrizi.K, Ullmann.R, Abedini.S.S, Nieh.S.E, Amini.S.H, Goswami.C, Tzschach.A, Jensen.L.R, Schmitz.D, Ropers.H.H, Najmabadi.H, Kuss.A.W. A Defect in the Ionotropic Glutamate Receptor 6 Gene (GRIK2) Is Associated with Autosomal Recessive Mental Retardation (2007). *Am J of Hum Genet Vol* 81.

*Nagase.T, Kikuno.R, Nakayama.M, Hirosawa.M, Ohara.O. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XVIII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res.* 7: 273-281, 2000.

*Najmabadi.H, Hu.H, Garshasbi.M, Zemojtel.T, Abedini.S.S, Chen.W, Hosseini.M, Behjati.F, Haas.S, Jamali.P, Zecha.A, Mohseni.M, Pu`Ttmann.L, Vahid.L.N, Jensen.C, Moheb.L.A, Bienek.M, Larti.F, Mueller.I, Weissmann.R, Darvish.H, Wrogemann.K, Hadavi.V, Lipkowitz.B, Esmaeeli-Nieh.S, Wieczorek.D, Kariminejad.R, Firouzabadi.S.G, Cohen.M, Fattahi.Z, Rost.I, Mojahedi.F, Hertzberg.C, Dehghan.A, Rajab.A, Banavandi.M.J.S, Hoffer.J, Falah.M, Musante.L, Kalscheuer.V, Ullmann.R, Kuss.A.W, Tzschach.A, Kahrizi.K, Ropers.H.H. Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders (2011). *Nature vol* 478.

*Nakamura.N, Dai.Q, Williams.J, Goulding.E.H, Willis.W.D, Brown.P, Eddy.E.M. Disruption of spermatogenic Cell-Specific Mouse Enolase 4 (Eno4) Gene Causes Sperm Structural Defects and Male Infertility (2013).

*Odent.S, Pasquier.L, De La Rochebrochard.C, Journal.H, Lazaro.L. Le retard mental syndromique. *ELSEIVER MASSON Arch Ped* 2008; 15: p705-p707.

*Osman.C, Merkwirth.C, Langer.T. Prohibitins and the functional compartmentalization of mitochondrial membranes (2009). *J Cell Science* 122, 3823-3830.

*Palumbo.O, Palumbo.P, Palladino.T, Stallone.R, Zelande.L, Carella.M. A novel deletion in 2q24.1q24.2 in a girl with mental retardation and generalized hypotonia: a case report. *Molecular Cytogenetics* 2012, 5:1.

*Pednekar.D, Wang.Y, Fedotova.T.V, Wojcikiewicz.R.J.H. Clustred Hydrophobic Amino Acids In Amphipathic Helices Mediate Erlin1/2 Complex Assembly. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 415 (1): 135-140.

- *Philippe.O, Rio.M, Carioux.A, Plaza.J.M, Guigue.P, Molinari.F, Boddaert.N, Bole-Feysot.C, Nitschke.P, Smahi.A, Munnich.A, Colleaux.L. Combination of Linkage Mapping and Microarray-Expression Analysis Identifies NF- κ B Signaling Defect as a Cause of Autosomal-Recessive Mental Retardation (2009). *Am J Hum Genet* 85:903-908.
- *Rafiq.M.A, Kuss.A.W, Puettmann.L, Noor.A, Ramiah.A, Ali.G, Hu.H, Kerio.N.A, Xiang.Y, Garshasbi.M, Khan.M.A, Ishak.G.E, Weksberg.R, Ullmann.R, Tzschach.A, Kahrizi.K, Mahmood.K, Naeem.F, Ayub.M, Moremen.K.W, Vincent.J.B, Ropers.H.H, Ansar.M, Najmabadi.H. Mutations in the Alpha 1,2-Mannosidase Gene, MAN1B1, Cause Autosomal-Recessive Intellectual Disability (2011). *Am J Hum Genet* 89:176-182.
- *Rajadhyaksha.A.M, Ra.S, Kishinevsky.S, Lee.A.S, Romanienko.P, Duboff.M, Yang.C, Zupan.B, Byrne.M, Daruwalla.Z.R, Mark.W, Kosofsky.B.E, Toth.M, Higgins.J.J. Behavioral characterization of cereblon forebrain-specific conditional null mice: A model for human non-syndromic intellectual disability. *Behavioral Brain Research* 236 (2012) 428-434.
- *Rauch.A, Wiczorek.D, Graf.E, Wieland.T, Endeles.S, Schwarzmayr.T, Albrecht.B, Bartholdi.D, Beygo.J, Di Donato.N, Dufk.A.E, Cremer.K, Hempel.M, Horn.D, Hoyer.J, Joset.P, Röpke.A, Moog.U, Riess.A, Thiel.C.T, Tzschach.A, Wiesener.A, Wohlleber.E, Zweier.C, Ekici.A.B, Zink.A.M, Rump.A, Meisinger.C, Grallert.H, Sticht.H, Schenck.A, Engels.H, Rappold.G, Schröck.E, Wieacker.P, Riess.O, Meitinger.T, Reis.A, Strom.T.M. Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study. *Lancet* 2012; 380:1674-82.
- *Rehman.Sh.U, Baig.S.M, Eiberg.H, Rehman.Si.U, Ahmad.I, Malik.N.A, Tommerup.N, Hansen.L. Autozygosity mapping of a large consanguineous Pakistani family reveals a novel non-syndromic autosomal recessive mental retardation locus on 11p15-tel. *Neurogenetics* (2011) 12: 247-251.
- *Robin.G, Boitrelle.F, Marcelli.F, Colin.P, Leroy-Martin.B, Mitchell.V, Dewailly.D, Rigot.J.M. Cryptorchidie: de la physiopathologie à l'infertilité. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 38 (2010) 588-599.
- *Ropers.F, Derivery.E, Hu.H, Garshasbi.M, Karbasiyan.M, Herold.M, Nürnberg.G, Ullman.R, Gautreau.A, Sperling.K, Varon.R, Rajab.A. Identification of a novel candidate gene for non-syndromic autosomal recessive intellectual disability: the WASH complex member SWIP (2011). *Hum Mol Genet*, Vol 20 No.13.
- *Ropers.H.H. Genetics of intellectual Disability. *Genetics & Development* 2008, 18: 241-250.
- *Sealock.R, Paschal.B, Beckerle.M, Burridge.K 1986. Talin Is a Post-synaptic Component of the Rat Neuromuscular Junction. *Experimental Cell Research* 163 (1986) 143-150

- *Stenzel.N, Fetzler.C.P, Heumann.R, Erdmann.K.S. PDZ-domain-directed basolateral targeting of the peripheral membrane protein FRMPD2 in epithelial cells (2009). *J of Cell Science* 122, 3374-3384.
- *Takala.H, Yläne.J. Binding Properties and stability of the Ras-Association Domain of Rap1-GTP Interacting Adapter Molecule (RIAM) (2012). *PLoS ONE* 7 (4): e31955.
- *Vanagaite.L.B, Alkelai.A, Straussberg.R, Magal.N, Inbar.D, Mahajna.M, Shohat.M. Mapping of 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: 729-732.
- *Verloes.A, Héron.D, Billette De Villemeur.T, Afenjar.A, Baumann.C, Bahi-Buisson.N, Charles.P, Faudet.A, Jacquette.A, Mignot.C, Moutard.M.L, Passemard.S, Rio.M, Robel.L, Rougeot.C, Ville.D, Burglen.L, V. Des Portes, Et Le Réseau Defiscience. Stratégie d'exploration d'une déficience intellectuelle inexplicée (2012);19:194-207.
- *Worth.D.C, Hodivala-Dilke.K, Robinson.S.D, King.S.J, Morton.P.E, Gertler.F.B, Humphries.M.J, Parsons.M. Av β 3 integrin spatially regulates VASP and RIAM to control adhesion dynamics and migration (2010). *J of Cell Biology*. Vol.189 No.2 369-383.
- *Yang.W, Shen.N,Ye.D.Q, Liu.Q, Zhang.Y, Qian.X.X, Hirankarn.N, Ying.D, Pan.H.F, Mok.C.C,Chan.T.M, Wong.R.W.S, Lee.K.W, Mok.M.Y, Wong.S.N, Leung.Am.H, Li.X.P, Avihingsanon.Y, Wong.C.M, Lee.T.L, Ho.M.H.K, Lee.P.P.W, Chang.Y.K, Li.P.H, Li.R.J, Zhang.L,Wong.W.H.S, Ng.I.O.L, Lau.C.S, Sham.P.C, Lau.Y.L, Asian Lupus Genetics Consortium (Algc). Genome-wide Association Study in Asian Populations Identifies Variants in ETS1 and WDFY4 Associated with Systemic Lupus Erythematosus (2010). *PLoS Genet* 6 (2): 1000841.
- *Yildirim.Y, Orhan.E.K, Iseri.S.A.U, Serdaroglu-Oflazer.P, Kara.B, Solakoğlu.S, Tolun.A. A frameshift mutation of ERLIN2 in recessive intellectual disability, motor dysfunction and multiple joint contractures. *Hum Mol Genet*, 2011, Vol. 20, No. 10.
- *Zaborowska.J, Taylor.A, Roeder.R.G, Murphy.S. A novel TBP-TAF complex on RNA polymerase II-transcribed snRNA genes (2012). *Transcription* 3:2, 92-104.
- *Zaghba.N, Yassine.N, Bakhatar.A, Bahlaoui.A. Syndrome de Buckley associé à un syndrome de Dandy-Walker révélés par une staphylococcie pulmonaire chez un adulte jeune : à propos d'un cas. *R Française d'allergologie* 52 (2012) 345-348.

Annexes

Annexes

➤ **Composition du Sodium Dodecyl Sulfate 10% (SDS 10%)**

Faire dissoudre 10g de SDS dans 80ml de H₂O, puis compléter avec H₂O qsp 100ml.

➤ **Composition de la solution de lyse des globules rouges (SLR 1X) :**

La solution est composée de :

-Tris-HCl (10 mM ; pH=7.5).

-MgCl₂ (5 mM).

-NaCl (10mM).

➤ **Composition du tampon de lyse 10X :**

Pour 100ml de tampon 10X :

-Tris-HCl (20ml ; pH=7.5).

-EDTA (10ml ; 0.5M).

-Eau milliQ qsp 100ml (Eau milliQ = H₂O ultra pure).

*Pour obtenir une solution 1X de tampon de lyse on fait une dilution (1/9 volume du tampon de lyse 10X + 9/10 volume de H₂O).

➤ **Composition du tampon de migration TBE 10X :**

Le TBE 10X est constitué de :

-Tris (890mM).

-Acide borique (890mM).

-EDTA (20mM).

➤ **Red Safe : (Nucleic Acid Staining Solution)**

C'est une solution qui n'est pas toxique, ni cancérigène, ni mutagène, elle sert à colorer les acides nucléiques et à émettre une lumière fluorescente verte une fois lié aux acides nucléiques, il est similaire au BET (Bromure d'éthidium) sauf que le BET est cancérigène.