

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université SAAD DAHLEB - BLIDA**

**FACULTE DES SCIENCES AGROVETERINAIRES ET BIOLOGIQUES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE**



**MEMOIRE DE FIN D'ETUDE EN VUE DE L'OBTENTION DU
DIPLOME MASTER EN BIOLOGIE
OPTION : GENETIQUE ET PHYSIOLOGIE**

Thème :

**Etude moléculaire du syndrome de l'X fragile
(FRAXA) chez une cohorte de patients
Algériens**

Présenté par :

Date de soutenance : 20/12/2012

Mr. BENMOHAMED Mohamed Ryad

Devant le jury composé de :

- | | | |
|---------------------------|----------------------------|--------------|
| • Melle BIREM Z. | M.A.A. USD Blida | Présidente |
| • Mme ELFERTAS-AISSANI R. | M.A.B. USD Blida | Examinatrice |
| • Mr BENYAHIA N. | M.A.A. USD Blida | Examineur |
| • Mr IMESSAOUDENE B. | Professeur CHU
Mustapha | Promoteur |

Promotion : 2011-2012

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail à la mémoire de mon défunt grand père qui m'a toujours encouragé pour aller de l'avant.

A la mémoire de ma défunte grand-mère paternelle.

A ma grand-mère maternelle.

Aux êtres les plus chers à mon cœur, ma mère et mon père qui m'ont toujours soutenu.

A ma chère sœur Sihem, à qui je souhaite beaucoup de réussite et de succès dans ses études.

A ma deuxième famille BOUTICHE.

A mes tantes et mes oncles en particulier : Khalid et sa femme Wassila.

A mes cousins et cousines.

A tous mes amis en particulier Soumia, Walid, Djalil, Hamid,...

A mes camarades de l'option Génétique et Physiologie Promotion 2012.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux qui m'a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

En second lieu, je tiens à remercier mon promoteur le Professeur **IMESSAOUDENE Belaid**, pour ses précieux conseils et son aide durant toute la période de mon travail.

Je tiens également à présenter toute ma gratitude et mes remerciements aux membres du jury qui ont bien voulu consacrer un peu de leurs temps précieux pour juger mon travail.

Au Professeur **BERHOUNE A.**, qui m'a permis d'intégrer l'unité de génétique de son service.

Par la même occasion je tiens à remercier **Docteur HELLAL S.**, pour sa contribution dans ce travail, sa disponibilité et sa patience.

Je remercie aussi tous le personnel de l'unité de génétique.

Je tiens à remercier aussi l'Université **SAAD DAHLAB** de BLIDA de nous donner l'opportunité de vivre une expérience aussi enrichissante autant sur le plan humain que professionnel, tout en gardant la possibilité de poursuivre nos études.

Je remercie tout mes Professeurs pour leurs aides et leurs encouragements.

Je tiens à remercier en particulier :

Mon père et ma mère pour leur précieux soutien parental.

Monsieur. BOUTICHE Mohamed, qu'il soit assuré de mon immense gratitude et de mon profond respect.

Melle. KECHIDI S., pour son aide et son soutien.

Au terme de ces remerciements, je tiens à exprimer ma reconnaissance et ma gratitude à toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de cette étude.

Résumé

Le syndrome de l'X fragile est la cause la plus fréquente du retard mental héréditaire. Les progrès récents dans le domaine de la biologie moléculaire ont pu mettre l'approche diagnostique de cette maladie.

Le présent travail concerne les aspects cliniques, génétiques et diagnostiques du syndrome de l'X fragile ; 54 garçons retardés mentaux émanant des différentes régions de l'Algérie ont été testés par deux techniques (méthode PCR et PCR des triplets CGG).

La mutation est une expansion instable de la répétition d'un tri-nucléotide des $(CGG)_n$ d'une séquence d'ADN située sur le chromosome X dans le premier exon du gène *FMRI* (Fragile Mental Retardation 1).

Les outils fiables de la biologie moléculaire utilisés dans notre étude ont permis de diagnostiquer 8 patients atteints de l'X fragile (15%) et de proposer un conseil génétique approprié aux familles nucléaires pour la prévention.

Mots clés

Syndrome de l'X fragile ; diagnostic génétique ; conseil génétique ; retard mental ; PCR ; mutation ; chromosome.

Abstract

The fragile X syndrome is the most common cause of inherited mental retardation. Recent advances in the field of molecular biology have been able to approach the diagnosis of this disease.

The present work deals with the clinical, genetic and diagnostic syndrome, fragile X, 54 mentally retarded boys from the different regions of Algeria were tested by two techniques (methyl PCR and PCR triplet CGG).

The mutation is an unstable expansion of a repeat of tri-nucleotide (CGG) n a sequence of DNA located on the X chromosome in the first exon of the *FMRI* gene (Fragil Mental Retardation 1).

Reliable tools of molecular biology used in our study were diagnosed eight patients with fragile X (15%) and to offer appropriate genetic counseling to families to prevent nuclear.

Keywords

Fragile X syndrome, genetic diagnosis, genetic counseling, mental retardation PCR mutation, chromosome

ملخص

متلازمة X الهش هو السبب الأكثر شيوعا للتخلف العقلي الموروثة. وكانت التطورات الحديثة في مجال البيولوجيا الجزيئية قادرة على الاقتراب من تشخيص هذا المرض.

تم اختبار عروض العمل الحالي مع متلازمة السريرية، والتشخيص الوراثي، X الهش، 54 الأولاد المتخلفين عقليا من مختلف مناطق الجزائر من قبل اثنين من تقنيات (والم تثيل PCR و PCR الثلاثي CGG).

الطفرة هو التوسع غير مستقرة من تكرار ثلاثي النوكليوتيدات (CGG) تسلسل الحمض النووي لا يوجد يقع على الكروموسوم X في اكسون الأول من هذا الجين *FMRI* (Fragil Mental Retardation 1).

تم تشخيص أدوات موثوقة البيولوجيا الجزيئية المستخدمة في دراستنا مع ثمانية مرضى X الهش (15%)، وتقديم الاستشارة الوراثية المناسبة للأسر لمنع النوية.

كلمات البحث

متلازمة X الهش، التشخيص الوراثي، وتقديم المشورة الوراثية والعقلية طفرة PCR التخلف، كروموسوم

SOMMAIRE

Index des figures
Index des tables
Abréviations

Introduction

Chapitre 1 : étude de la littérature.....	2
1- Définition et classification du retard mental.....	2
1-1- Le diagnostic and Statistical Of Manual Disorders (DSM).....	2
1-2- La classification Internationale des Maladies (CIM).....	2
1-3- La classification française des troubles mentaux (CFTMEA).....	3
2- Tests utilisés pour l'évaluation du RM.....	3
3- Degré du retard mental.....	3
4- Evaluation clinique.....	3
4-1- Histoire familiale (Premier niveau).....	4
4-2- Histoire clinique et examen morphologique (Deuxième niveau).....	4
4-3- Troisième niveau.....	4
5- Prévalence du retard mental.....	5
6- Etiologie du retard mental.....	6
6-1- Les causes environnementales.....	6
6-2- Les causes génétiques.....	6
6-2-1- RM autosomique.....	7
6-2-1-1- RM autosomique syndromique.....	7
6-2-1-2- RM autosomique non syndromique.....	8
6-2-2- RM lié au chromosome X (RMLX).....	8
6-2-2-1- RMLX syndromique (RMXS).....	8
6-2-2-2- RMLX non syndromique.....	9
7- Syndrome de l'X-fragile.....	10
7-1- Historique et génétique moléculaire.....	10
7-2- Clinique.....	12
7-2-1- Individus porteurs d'une mutation complète.....	12
7-2-1-1- Chez le garçon.....	12
7-2-1-2- Chez la fille.....	12
7-2-2- Individus porteurs d'une prémutation.....	13
7-2-2-1- Chez l'homme.....	13
7-2-2-2- Chez la femme.....	13
Chapitre 2 : Matériels et méthodes.....	14
1- Matériels.....	14
1-1- Matériels non biologiques.....	14
1-1-1- Equipements de laboratoire.....	15

1-2- Matériels biologiques.....	16
1-2-1- Echantillons.....	16
2- Méthodes.....	16
2-1- Extraction de l'ADN génomique par sel (salting out).....	17
2-1-1- Principe.....	17
2-1-2- Réalisation pratique.....	17
2-2- Dosage et conservation de l'ADN.....	18
2-2-1- Le dosage.....	18
2-2-2- La conservation.....	18
2-3- Méthyle PCR.....	18
2-3-1- Principe.....	18
2-3-2- Réalisation pratique.....	19
2-3-2- 1- Traitement de l'ADN.....	19
2-3-2- 2- Purification de l'ADN traité via le kit QIAGEN.....	19
2-3-2- 3- Traitement supplémentaire de l'ADN.....	19
2-3-2- 4- La technique PCR.....	20
2-4- Visualisation par électrophorèse.....	20
2-4-1- Principe.....	20
2-4-2- Réalisation pratique.....	21
2-5- PCR des triplets de CGG.....	21
2-5-1- Principe.....	21
2-5-2- Réalisation pratique.....	23
2-6- L'analyse de fragment (Genmapper).....	23
2-6-1- Principe.....	23
2-6-2- Réalisation pratique.....	24
Chapitre 3 : Résultats et discussion.....	25
1-Résultats.....	25
1-1- Résultats de la méthyle PCR.....	25
1-2- Résultats de la PCR des triplets de CGG.....	25
2-Discussion.....	28
Conclusion.....	29
Références bibliographiques	
Les annexes	

Index des figures

Figure 1. Démarche diagnostic devant un retard mental-----	5
Figure 2. Gènes liés à l’X impliqués dans le RM syndromique-----	9
Figure 3. Gènes liés à l’X impliqués dans le RM non syndromique-----	10
Figure 4. Localisation chromosomique de <i>FMRI</i>-----	11
Figure 5. Structure du gène <i>FMRI</i>-----	11
Figure 6. Morphotype d’un enfant atteint du syndrome de l’X Fragile-----	13
Figure 7. Séquenceur ADN 3130 Genetic Analyzer-----	15
Figure 8. Thermocycleur MJ Mini TM-----	15
Figure 9. Cuve (à droite) et alimentation (à gauche)-----	16
Figure 10. La désamination par le bisulfite de sodium de la cytosine non méthylée en uracile-----	18
Figure 11. Principe de l’amplification de l’ADN par PCR-----	22
Figure 12. Electrophorèse sur gel de Nusieve-agarose 4% des produits PCR; des différents ADN traités (Méthyl-PCR)-----	25
Figure 13. Profil électrophorétique d’un sujet sain : nombre de répétition CGG: 32----	26
Figure 14. Profil électrophorétique d’un male atteint : aucun allèle n’est assimilé-----	27
Figure 15. Arbre généalogique d’une famille atteinte du syndrome de l’X Fragile : La mère est conductrice et les 3 enfants sont atteints-----	27
Figure 16. Profil électrophorétique d’une femme conductrice portant: un allèle normal de 32 CGG et un allèle muté-----	28

Index des tables

Tableau I. Distribution des prévalences du RM, estimation données par le DSM-IV-----6

**Tableau II. La répartition des anomalies chromosomiques selon la répartition de
Phelan-----7**

Tableau III. Les différentes classes d'allèle au locus FRAXA et leur transmission-----12

Abréviation

ADN	Acide Désoxyribo-Nucléique
APA	American Psychiatric Association
ARN	Acide Ribo-Nucléique
BET	Bromure d'Ethidium
C	Cytosine
CFTMEA	Classification Française des Troubles Mentaux
CIM	Classification Internationale des Maladies
CMV	Cytomégalovirus
CpG	Région riche en Cytosine et Guanine.
dNTPs	DésoxyNucléotides-Tri-Phosphates
DSM	Diagnostic and Statistical of Manual Disorders
EDTA	Ethylène Diamine Tétra-Acétique
FMR1	Fragil X Mental Retardation 1
FMRP	Fragil X Mental Retardation Protein
FXPOI	fragile X premature ovarian failure
FXTAS	fragile X tremor ataxia syndrome
G	Guanine
HIV	Human Immunodeficiency Virus
Kb	Kilo Base
kDa	Kilo Dalton
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
Pb	Paire de base
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PRSS12	Protéase à serine 12
QI	Quotient Intellectuel
RM	Retard Mental
RMLX	Retard Mental Lié à l'X
RMS	Retard Mental Syndromique
RMNS	Retard Mental Non Syndromique
RMXS	Retard Mental lié à l'X Syndromique
RMX	Retard Mental lié à l'X Non syndromique
RPM	Rotation Par Minute
SDS	Dodécyl-Sulfate de Sodium
TBE	Tris Borate EDTA
UpG	Région riche en Uracile et Guanine
UTR	Untranslated Regions
UV	Ultra Violet
WLB	White Lysis Buffer

Introduction

Introduction

Le diagnostic d'un retard mental nécessite une collaboration multidisciplinaire à laquelle sont associés : Pédiatres, Neurologues, Généticiens cliniciens, cytogénéticiens et biologistes moléculaires.

Les causes de retard mental sont nombreuses et souvent inconnues. Néanmoins, les études réalisées en génétique moléculaire ont permis de poser un diagnostic du retard mental dans 60% des cas. L'origine génétique, c'est à dire les anomalies chromosomiques ou monogéniques, représente 40% des cas. Il faut ajouter des facteurs environnementaux (infections fœtales, ischémies néonatales) comme cause de retard mental dans 20% des cas [Stevenson RE., 1996].

Le syndrome de l'X-fragile fait partie du groupe des maladies impliquées dans les retards mentaux syndromiques et de l'autisme. Ce syndrome est la cause la plus fréquente de retard mental après la trisomie 21.

Vu la fréquence de cette pathologie qui est estimée à 1/4000 garçon atteints et vu la variabilité de l'expression clinique de cette maladie, il est plus que nécessaire de rechercher l'anomalie moléculaire par des techniques fiables et moins coûteuses permettant de poser le diagnostic de certitude. Vu le coût bas de l'investigation biologique ainsi que les délais de réponse assez courts, il nous a paru indispensable de tester chez tous les garçons atteints de retard mental la fragilité du chromosome X [Bardoni, et al., 2002].

Le présent travail que nous avons effectué à l'unité de génétique dirigée par le professeur B.IMESSAOUDENE au laboratoire central de biochimie au niveau du CHU MUSTAPHA, et durant 7 mois de stage, a permis d'abordé une étude d'un gène lié au chromosome X (FRAXA) responsable du retard mental syndromique touchant exclusivement les garçons « syndrome de l'X-fragile ».

Le nom de ce syndrome est en rapport avec la fragilité du chromosome X observée chez les personnes atteintes. Cette maladie génétique qui entraîne un retard mental et des anomalies physiques (visage allongé, front haut,...) a des manifestations très variables d'une personne à l'autre qui sont plus marquées chez les hommes. Il est la cause la plus fréquente de déficit intellectuel héréditaire.

Le but de notre travail comporte trois volets, le premier consiste à maîtriser les différentes techniques moléculaires, le second de détecter la mutation chez les enfants atteints d'un retard mental et le troisième volet consiste à pouvoir, donner le conseil génétique aux parents des patients.

Chapitre 1

Etude bibliographique

1- Définition et classification du retard mental

La définition du retard mental varie selon l'angle de vue. D'une part les médecins définissent le retard mental comme un résultat d'une anomalie de la formation et/ou de la fonction du système nerveux central. D'une autre part, la santé publique, le définit comme un handicap qui peut concerner tout individu quel que soit son niveau socioculturel. Son incidence élevée pose le problème de son coût et la société le perçoit comme une infirmité qui limite la productivité et crée une dépendance et une vulnérabilité.

Actuellement, il existe un accord sur les délimitations des déficiences au niveau des grandes classifications (CIM10, CFTMEA et DSM).

1-1- Le Diagnostic and Statistical of Manual Disorders (DSM)

Publié en 1952 par l'Association Américaine de Psychiatrie (APA), quatre mises à jour ont été faites, le dernier est la DSM-IV, publié en 1994.

La DSM définit le retard mental comme un fonctionnement intellectuel général significativement inférieur à la moyenne qui s'accompagne de limitations significatives du fonctionnement adaptatif dans deux ou plusieurs des secteurs d'aptitude comme la communication, l'autonomie, l'apprentissage scolaire, la vie sociale, la responsabilité individuelle, le travail, les loisirs, la santé et la sécurité, ces troubles apparaissent avant l'âge de 18 ans [American Psychiatric Association, 1995].

1-2- La Classification Internationale des Maladies (CIM)

Publié en 1893 par Jacques Bertillon, conçue pour « permettre l'analyse systématique, l'interprétation et la comparaison des données de mortalité et morbidité ». Cinq révisions faites jusqu'à 1938. En 1945 l'OMS entreprend sa mise à jour, la version actuelle est la CIM-10. La CIM est une classification qui recense toutes les maladies, dont le retard mental qui figure au chapitre V, section F « troubles mentaux et du comportement ».

Elle définit le retard intellectuel comme un arrêt du développement mental ou un développement mental incomplet, caractérisé par une insuffisance des facultés et du niveau global de l'intelligence, notamment au niveau des fonctions cognitives, du langage, de la motricité et des performances sociales.

1-3- La classification française des troubles mentaux (CFTMEA)

Définit le niveau mental et la catégorie de la déficience qui sont, dans l'axe 1 du chapitre 1, classées en plusieurs catégories :

- Harmoniques : les troubles de l'intelligence sont fixés et peu évolutifs.
- Dysharmoniques : les troubles de l'intelligence présentent un processus évolutif, avec des poly-handicaps.

2- Tests utilisés pour l'évaluation du RM

L'intelligence varie d'un individu à l'autre et peut être mesuré, approximativement, grâce à des tests psychométriques standardisés dont le résultat est exprimé en quotient intellectuel (QI). Le QI moyen de la population générale est fixé à 100. On parle de RM, lorsque le QI est à -3ds c'est-à-dire inférieur à 70.

3- Degrés du retard mental

Selon Richardson, le fonctionnement intellectuel et la faculté d'adaptation sont les deux éléments centraux de cette définition [Richardson S.A., 1989]. Ces deux fonctions sont exprimées par le quotient intellectuel (QI). L'organisation mondiale de la santé (OMS) parle de 4 degrés de retard mental inscrits dans la DSM-IV :

- Le retard léger : le QI se situe entre 50 et 69 et décrit des personnes connaissant des difficultés scolaires mais capables de s'intégrer à la société de façon autonome à l'âge adulte.
- Le retard modéré : le QI se situe entre 35 et 49 et décrit des personnes connaissant dans l'enfance des retards de développement importants mais ayant de bonnes capacités de communication et une indépendance partielle. Ces individus ont des problèmes d'intégration dans la société à l'âge adulte.
- Le retard sévère : le QI se situe entre 20 et 34 et décrit des personnes ayant besoin d'une assistance prolongée.
- Le retard profond : le QI est inférieur à 20 et représente des personnes ayant peu de capacités à communiquer et à prendre soin d'elles-mêmes.

4- Evaluation clinique

L'investigation étiologique d'un RM suit une démarche rigoureuse proposée par la société française de neuropédiatrie comportant une évaluation clinique, une enquête familiale, un bilan para-clinique et des investigations génétiques en fonction de l'évaluation clinique. (Figure 1)

4-1- Histoire familiale (Premier niveau)

Elle consiste à établir un arbre généalogique, qui est une représentation graphique résumant en un seul schéma un grand nombre d'informations sur la composition d'une famille et sur l'état de santé de ses membres. Il doit être reproduit sur au moins trois générations.

La prise de l'arbre généalogique est un temps capital dans l'enquête génétique. Bien pris, il permet d'interpréter rapidement le mode de transmission d'un trait phénotypique ou d'un état pathologique.

L'arbre généalogique s'établit en utilisant des symboles internationaux universels.

4-2- Histoire clinique et examen morphologique (Deuxième niveau)

L'histoire clinique doit être détaillée et complète, du déroulement de la grossesse jusqu'à l'âge du patient, en insistant sur : la période néonatale, l'existence de troubles de comportement, de l'alimentation, du sommeil et les éventuelles pathologies associées, qui peuvent revêtir une valeur diagnostic importante dans un syndrome donné.

L'examen morphologique doit tenir compte d'un certain nombre d'anomalies majeurs que sont les malformations (forme du crâne, aspect général de la face, aux extrémités et aux organes génitaux externes), ou anomalies mineurs qui correspondent à des variations morphologiques individuelles ou familiales pouvant contribuer à l'identification d'un syndrome connu.

4-3-Troisième niveau

A ce niveau du diagnostic, la recherche clinique tente d'identifier les gènes responsables ou les facteurs environnementaux pré et postnataux en cause. Ce niveau intéresse les enfants dont le RM est de cause indéterminée malgré une exploration exhaustive.

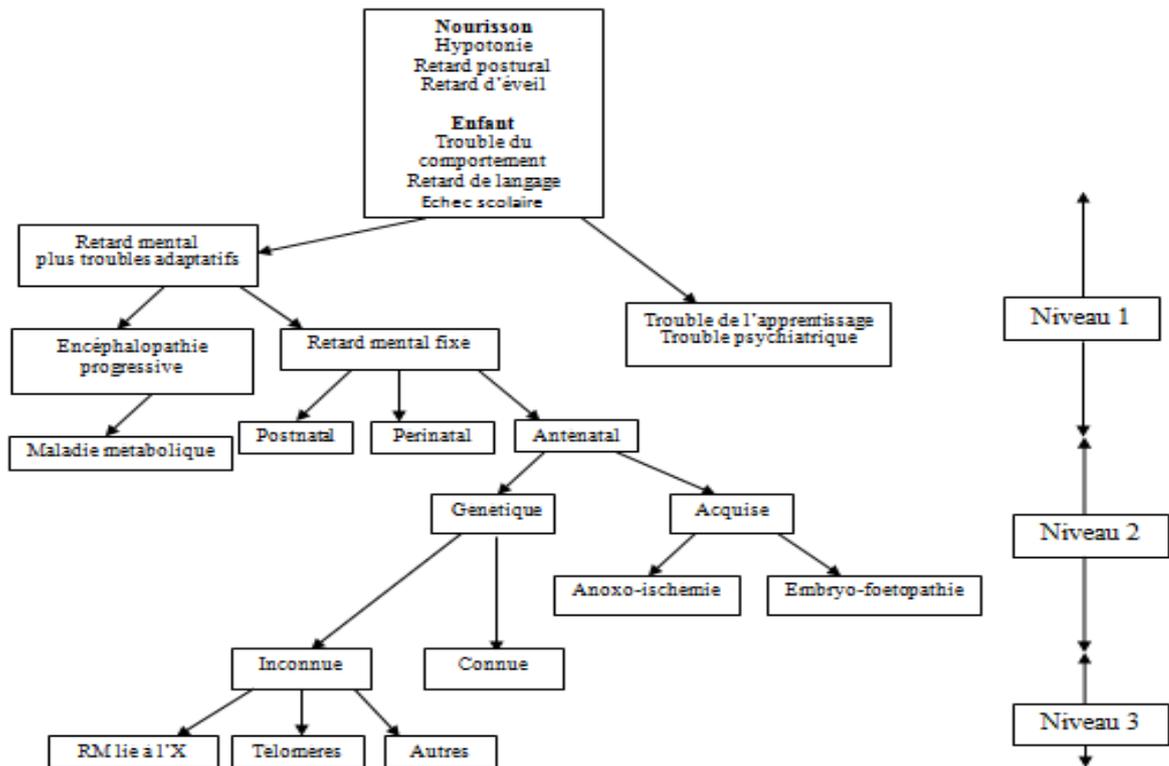


Figure 1. Démarche diagnostic devant un retard mental

5-Prévalence du retard mental

Le taux de prévalence du retard mental est difficile à évaluer, il se situe approximativement autour de 1 à 3% dans la population générale [J.Chelly et al., 2006].

Les études épidémiologiques estiment qu'il y'a 1,2 garçon pour une fille [McLaren et Bryson, 1987], voir 2,2 garçons pour une fille lorsque le retard mental est sévère, suggérant que les gènes localisés sur le chromosome X seraient impliqués [LEMAY et al., 2003].

Des prévalences théoriques des retards mentaux sévères parmi les enfants d'âge scolaire estiment qu'il y'a 3 et 4 pour 1000 des retards mentaux sévères [Mc Donald A.D.,1973 ; Kushlik A.et al.,1973 ;Gustavson K.H. et al., 1977 ; Laxova R.et al.,1977 ; Hagberg B.et al.,1981 ; McQueen P.C et al.,1986 ; Benassi G et al.,1990 ; Wellesley D. Et al.,1991 ; Mlika A. et al.,1993 ; Matilainen R et al., 1995 ; Fernell E.,1998 ; Stromme P. et al., 1998 ; Cans C. el al.,1999 ; Stromme P,2000] (Tableau I, annexe 1).

La distribution des prévalences des RM estimés par le DSM IV (Diagnostic and Statistical Manuel of Mental disorders 4 th) est donnée par le tableau II.

Tableau II. Distribution des prévalences du RM, estimation données par le DSMIV

Sévérité de retard mental	Pourcentage	Prévalence pour 1000
RM profond	1 à 2	Pas d'estimation spécifique
RM sévère	3 à 4	Pas d'estimation spécifique
RM modéré	10	Pas d'estimation spécifique
Total RM sévère	15	3.5
RM léger	85	22.3
Total RM	100	25.8

6- Etiologie du retard mental

Connaitre les causes du retard mental est une question primordiale qui permet de poser un bon pronostic et d'apporter les informations nécessaires pour le conseil génétique et la prise en charge des patients, malheureusement les causes exactes de cette déficience mentale sont encore souvent inconnues et restent inexplicées dans 56% des cas [Cury et al.,1997; Schaefer & Bodensteiner, 1992].

La cause la plus importante du retard mental est probablement multifactorielle, ce qui inclut la notion de génétique individuelle et de facteurs environnementaux, seuls ils ne pourraient avoir le pouvoir de causer le retard mental, mais leurs addition est responsable de celui-ci.

6-1- Les causes environnementales

C'est des causes liées à des facteurs environnementaux, encore mal connu à nos jours.

On cite trois causes :

– Causes prénatales : se produisent avant la naissance comme les infections durant la grossesse (CMV, rubéole, toxoplasmose, HIV) qui sont responsables de 3 à 8% des retards mentaux sévères [Seaver L.H, 1996 ; Bower C. et al., 2000]. Sans oublier que les intoxications maternelles pendant la grossesse sont elles aussi responsables de retard mental (drogues, alcool ...) [Sampson P.D.et al., 1997 ; Wide K. et al.,2000].

– Causes périnatales : se produisent pendant la naissance.

– Causes postnatales : se produisent après la naissance (pendant l'enfance).

6-2- Les causes génétiques du retard mental

Plusieurs facteurs génétiques impliquant un retard mental ont été identifiés, ils comprennent essentiellement les anomalies chromosomiques portant sur le nombre et la structure. 80 % de ces anomalies concernent des anomalies de nombre et 20% des anomalies de structure.

Le tableau III illustre la répartition des anomalies chromosomiques [Phelan Mary C.et al.,1996].

Tableau III. La répartition des anomalies chromosomiques selon la répartition de Phelan

Anomalies de nombre	trisomie 21	76%
	Autres aneuploïdies autosomiques	1%
	Dysgonosomies	4%
Anomalies de structures	Anneaux	2%
	Délétions et micro délétions	8%
	Duplications	2%
	Translocations déséquilibrées	3%
	Remaniements équilibrés	3%
	Autres	1%

Le caryotype reste l'un des piliers de l'évaluation diagnostic. Son association aux techniques de cytogénétiques et de biologie moléculaire a permis de mettre en évidence des délétions submicroscopiques comme nouvelles causes chromosomiques de retard mental.

Les techniques du caryotype ont démontré que des syndromes associant des anomalies multisystémiques sont causés par l'implication de plusieurs gènes reliés les uns aux autres par leurs proximités sur le chromosome (syndrome des gènes contigus) [Schmickel R.D.,1986], ce qui permet à un clinicien averti d'en suspecter le diagnostic. La trisomie 21 reste la première cause de retard mental d'origine génétique. Le syndrome de l'X-fragile est considéré comme la deuxième cause de retard mental d'origine génétique et la première cause connue du retard mental lié à l'X. Les études menées sur les causes génétiques, ont pu mettre en évidence les types de retard mental d'origine génétique.

6-2-1- RM autosomique

Une maladie génétique est autosomique quand le gène lié à la maladie est situé sur un chromosome autosome (chromosome non sexuel). Durant ses dernières années, les chercheurs ont identifiés quelques gènes autosomiques impliqués dans diverses formes de retard mental autosomique syndromique et non syndromique.

6-2-1-1- RM autosomique syndromique

Durant ces vingt dernières années, les études ont mené à la découverte des gènes autosomiques impliqués dans des formes de retard mental syndromiques autosomiques métaboliques comme la PCU, sphingolipidose, mucopolysaccharidose.

Généralement, on distingue ce type de retard mental en fonction des symptômes qui leurs sont associés.

6-2-1-2- RM autosomique non syndromique

L'analyse de liaison et l'étude des points de cassures des autosomes chez des familles présentant un RM non syndromique ont conduit à la localisation et l'identification de 4 gènes impliqués dans le retard mental.

Le premier gène autosomique responsable de RM non syndromique fut localisé en 2002 par Molinari et coll, par une approche de cartographie par homozygotie sur une grande famille algérienne consanguine et multiplex. Il s'agit du gène *PRSS12* situé en 4q24-q25 qui code pour une serine protéase la Neurotrypsine. [Molinari F et al.,2002].

6-2-2-RM lié au chromosome X (RMLX)

On considère que 25% à 50% des retards mentaux inexpliqués seraient liés à des gènes situés sur le chromosome X. Les RMLX est reconnaissable sur un simple arbre généalogique, touchant exclusivement les garçons dans le cas d'une hérédité récessive, et affectent aussi, plus modérément, les filles vectrices (hérédité dominante), le syndrome de l'X fragile représentant 10 % des RMLX [Schoer R.J et al.,1996].

On distingue classiquement parmi les RMLX deux grands groupes de patients :

- Le RM lié à l'X syndromique (RMXS) associant un RM et des anomalies morphologiques ou biochimiques caractéristiques.
- Le RM lié à l'X non syndromiques (RMX) définis par un RM non progressif isolé.

6-2-2-1- RMLX syndromique ou RMXS

Présente 10 à 15% des RMX, leurs gènes impliqués sont connus grâce à des signes cliniques caractéristiques propres à chaque syndrome. Grâce à l'analyse des liaisons génétiques, de nombreux gènes responsables de RMLX syndromiques ont été identifiés depuis quelques années (Figure 2) impliqués dans des cascades ayant des effets pléiotropes sur des voies métaboliques ubiquitaires.

Les principaux syndromes dont le gène est désormais connu et responsable de RM syndromique (RMXS) sont résumés dans le tableau II annexe1.

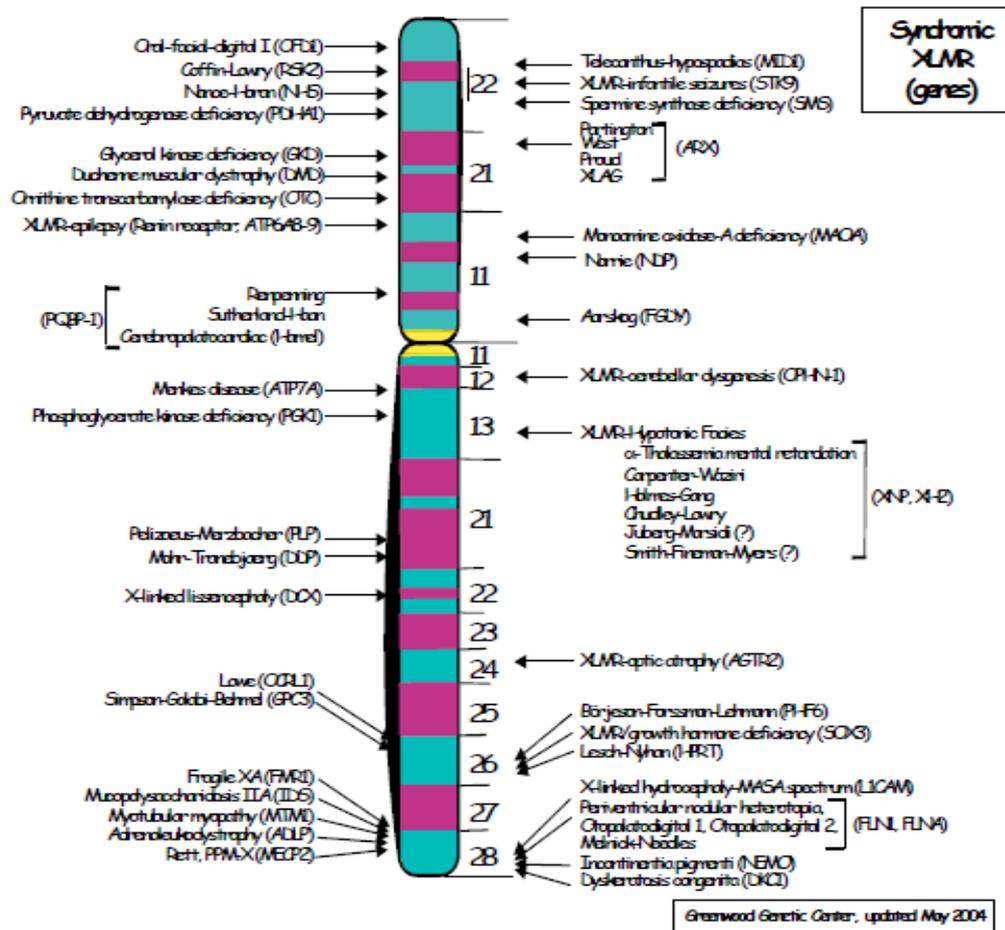


Figure 2. Gènes liés à l’X impliqués dans le RM syndromique

6-2-2-2- RMLX non syndromique

A la différence des RMLX syndromiques, les familles atteintes de RM non spécifiques ne peuvent pas être « additionnées » pour des études de liaisons génétiques. Chaque famille doit donc faire l’objet d’une étude indépendante.

Actuellement on connaît près d’une vingtaine de gènes impliqués dans les RMLX non Syndromiques, plus exactement 17 gènes ont pu être identifiés dont 11 sont exclusivement impliqués dans des fonctions cellulaires ciblées essentielles (Figure 3), (Tableau III, Tableau IV, annexe 1).

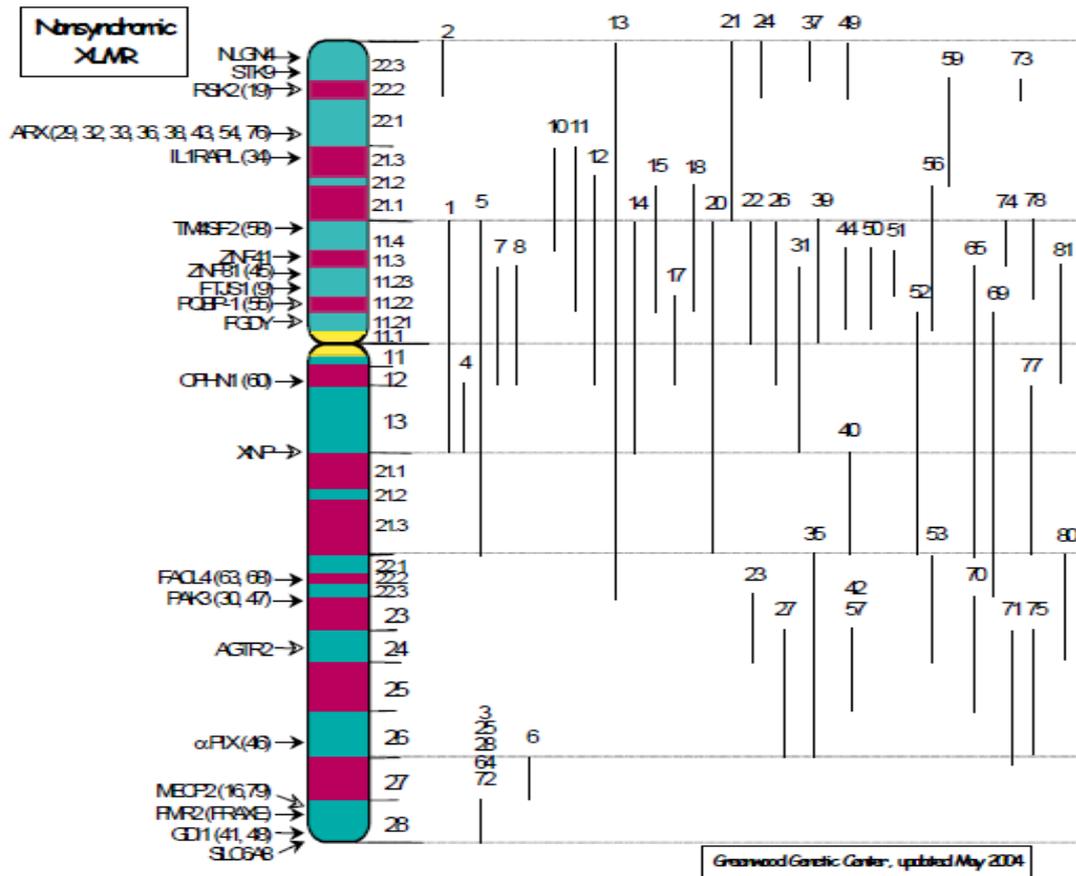


Figure 3. Gènes liés à l’X impliqués dans le RM non syndromique

7- Syndrome de l’X-fragile

C’est le premier gène et le plus connu, responsable du retard mental lié au chromosome X, avec un site fragile sur le chromosome X (FRAXA) lié à une anomalie du gène *FMRI* (Fragil X Mental Retardation 1) [Am J Med Genet 64 :388-394, 1996].

7-1- Historique et Génétique moléculaire

Le syndrome de l’X-fragile est une anomalie cytogénétique découverte en 1991 caractérisée par un retard mental modéré à sévère, affectant presque exclusivement les garçons.

Sa fréquence est estimée à 1/4000 naissances de garçons contre 1/7000 naissances de filles. Il s’agit d’une affection liée à l’X, 80% des hommes porteurs du chromosome muté sont atteints ce qui signifie qu’il existe 20% d’hommes normaux transmetteurs et 5,5% des femmes conductrices sont atteintes.

L’anomalie moléculaire consiste en une mutation instable caractérisée par des séquences répétitives des triplets CGG dans la partie 5’UTR non codante du gène.

Chapitre 1 Etude de la littérature

Le gène de l'X fragile (OMIM300624) (www.Ensemble.com), appelé *FMRI* (Fragile Mental Retardation), se situe sur le chromosome X au locus FRAXA, en Xq27.3 (Figure 4) . Il est composé de 17 exons (38kb) (Figure 5) dont le premier exon contient une répétition de triplets CGG. Ce gène est précédé en 5' par un îlot de CPG normalement non méthylé sur le chromosome X de l'homme et méthylé uniquement sur le chromosome X inactivé de la femme.



Figure 4. Localisation chromosomique de *FMRI*

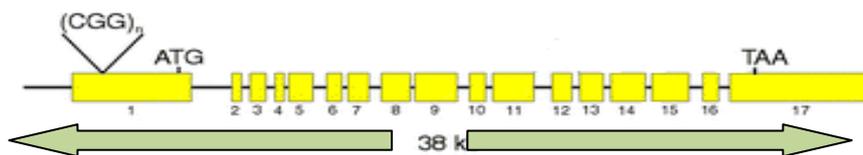


Figure 5. Structure du gène *FMRI*

Les individus avec une répétition comprise entre 5 à 50 ont un phénotype normal et une stabilité de la transmission à la génération suivante.

La mutation s'exprime en 2 temps :

– Une pré-mutation caractérisée par un allongement comprenant 51 à 199 copies du triplet CGG. Les individus ont un phénotype normal, mais il y'a présence du messager. L'homme transmetteur est sain, par contre il y'a une amplification aberrante à la méiose féminine donc y'aura une instabilité du nombre de triplets lors de la transmission à la génération suivante ce qui pourra être à l'origine d'une mutation complète.

– Une mutation complète caractérisée par une expansion supérieure à 200 copies des triplets CGG. Les individus ont un phénotype anormal chez 100% des garçons et 50% des filles. La maladie est due essentiellement à la méthylation de la région amplifiée, c'est se qui se traduit par l'inactivation du gène *FMRI*.

Une femme porteuse d'une prémutation transmet l'anomalie une fois sur deux à ses enfants (garçon ou fille) sous forme d'une prémutation. Le passage d'une prémutation à la mutation complète dépend de la taille de la prémutation de la mère (plus elle est élevée, plus le risque est important), (tableau III).

Tableau III. Les différentes classes d'allèle au locus FRAXA et leur transmission

Nombre de CGG	Statut
6 à 49	Normal
50 à 58	Zone instable, appelée « zone grise »
59 à 200	Prémuation
>à 200	Mutation complète

Le gène *FMRI* code pour une protéine cytoplasmique *FMRP* (Fragil X Mental Retardation Protein) de 70kDa exprimé fortement au niveau des neurones, les testicules, les lymphocytes, les fibroblastes et les cellules épithéliales. Cette protéine est impliquée dans la maturation et le développement neuronal.

7-2- Clinique

Le phénotype classique d'un individu atteint du syndrome de l'X-fragile comprend une macrocraînie, un visage allongé avec un front haut, des oreilles grandes et mal ourlées et une macroorchidie. Mais ces signes cliniques diffèrent selon le sexe et le statut muté ou prémuté de l'individu.

7-2-1- Individus porteurs d'une mutation complète

7-2-1-1- Chez le garçon

Les signes cliniques sont beaucoup moins spécifiques, le diagnostic peut être évoqué chez un garçon sur un retard psychomoteur, retard de développement, en particulier du langage, avec des troubles du comportement.

D'autres signes peuvent être évoqués qui sont non pathognomoniques, et leurs absences ne doivent pas faire récuser le diagnostic. Parmi ces signes, on note la dysmorphie faciale caractérisée par un visage allongé et de grandes oreilles décollées, et la macro-orchidie (Martin Bell syndrome).

Chez d'autres garçons, il peut également exister d'autres signes cliniques tels que la macrocéphalie, un front large et quadrangulaire (Figure 6).



Figure 6. Morphotype d'un enfant atteint du syndrome de l'X Fragile.

7-2-1-2- Chez la fille

Le diagnostic est très difficile à évoquer car l'expression clinique est très variable et n'apparaît habituellement que dans le cas de mutation complète. Mais aussi selon le profil de l'inactivation du chromosome X.

Chez 40% des filles porteuses de la mutation complète il n'y'a pas de signe clinique, et 60% ont un retard psychomoteur léger avec des troubles du comportement et de la relation (timidité, anxiété massive, tendance dépressive...).

7-2-2- Individus porteurs d'une prémutation

7-2-2-1- Chez l'homme

Les hommes porteurs de la prémutation du gène *FMRI* développent un syndrome neurodégénératif (FXTAS : fragile X tremor ataxia syndrome). Ses principaux signes cliniques associant une ataxie cérébelleuse, un tremblement d'intention, une atteinte cognitive (mémoire, comportement, fonctions exécutives) et un syndrome parkinsonien.

Ce risque augmente avec la taille de la prémutation (nombre de répétitions CGG est compris entre 70 et 199) et l'âge de l'individu.

7-2-2-2- Chez la femme

Les femmes porteuses d'une prémutation ont un développement psychomoteur normal mais peuvent présenter une ménopause précoce (FXPOI : fragile X premature ovarian failure).

Il faut juste rappeler que ces signes cliniques sont souvent atypiques ou le seul point d'appel est parfois un retard de langage, des troubles du comportement avec une hyperactivité ou des traits autistiques.

Chapitre 2

Matériels et méthodes

Au cours de mes 7 mois de stage (Mars 2012 à Septembre 2012) au sein du laboratoire central de biochimie du CHU Mustapha à Alger, dans l'unité de génétique dirigée par le professeur B.IMESAOUDENE, on a pu étudier le gène FMR1 de l'X Fragile impliqué dans le processus du retard mental lié au chromosome X dans une cohorte de 54 patients.

1- Matériels

1-1- Matériel biologique

1-1-1-Echantillons

Dans cette étude, on a testé une cohorte de 54 patients provenant de différentes régions du pays, suivis lors de la consultation médicale par le professeur B.IMESAOUDENE.

Ces patients présentaient cliniquement des signes d'un retard mental proches de ceux observés chez les malades atteints du syndrome de l'X-Fragile.

1-1-2-Enzyme

Taq polymérase platinumium pfx (assez particulière) est un ADN polymérase thermorésistante. Sa température optimale est de 72°C et elle est capable de résister à des passages successifs à 95°C, ce qui a rendu possible l'automatisation de la procédure. Elle présente une activité exonucléasique 5' - 3', c'est-à-dire de la fonction d'édition. 0,75 Unités de polymérase sont nécessaires par réaction de PCR de volume final de 20µl.

1-2- Matériels non biologiques

- Les amorces (sens et anti-sens) : ce sont de petits brins d'ADN d'environ 20 bases, (oligonucléotides) capables de s'hybrider de façon spécifique, grâce à la complémentarité des bases, sur le brin d'ADN correspondant. Les amorces choisies dans notre étude sont : FRAXA, FRAX-E 598 F et FRAX-E 603 pour la PCR des triplets de CGG ; et Fx-BS-F, Fx-BS-R, NM-BS-F, NM-BS-R pour la méthyle PCR. (Voir la partie méthode).
- Le kit platinumium de la Taq polymérase : il est indispensable à l'activité de l'enzyme et est livré avec elle.
- Les nucléotides : dGTP, dATP, dTTP, dCTP, appelés globalement les dNTPs (DésoxyNucléotides-Tri-Phosphates), qui sont les éléments de base pour que la Taq polymérase puisse synthétiser les brins d'ADN complémentaires.
- Le sulfate de magnésium MgSO₄ : pour optimiser la réaction de PCR, soit dans la PCR des triplets de CGG ou dans la méthyle PCR.
- Hydroquinone : stimule l'attaque nucléophilique du bisulfite de sodium sur les cytosines non méthylées. Utilisé dans la méthyle PCR.

Chapitre 2 Matériels et méthodes

– Bisulfite de sodium : les traitements chimiques nécessitent pour convertir la cytosine non méthylée en uracile. Utilisé dans la méthyle PCR.

1-1-1- Equipements de laboratoire

– Séquenceur ADN 3130 Genetic Analyzer Applied Biosystem : une électrophorèse capillaire pour séparer les fragments d'ADN, permettant ainsi l'analyse des fragments d'oligonucléotides.(Figure7)



Figure 7. Séquenceur ADN 3130 Genetic Analyzer

– Thermocycleur MJ Mini TM de 48 puits utilisé pour la PCR.(Figure 8)



Figure 8. Thermocycleur MJ Mini TM

- Cuve et alimentation pour électrophorèse.(Figure 9)

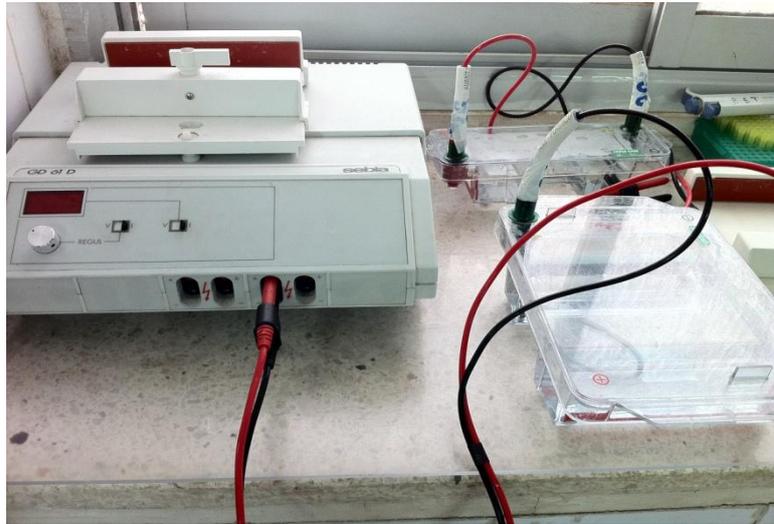


Figure 9. Cuve (à droite) et alimentation (à gauche)

- Spectrophotomètre : eppendorf BIO Photometer ;
- Speed-Vac: Savant DNA120 SpeedVac Concentrator ;
- Bain-marie: Advantage-Lab AL05-01 ;
- Centrifugeuse: eppendorf Centrifuge 5415 D ;
- Vortex: FISHER Vortex ;
- Gel DOC. (Annexe 2).

2- Méthodes

Le présent travail a comporté 6 étapes, à savoir :

- Extraction ;
- Dosage et conservation de l'ADN ;
- Méthyle PCR ;
- Visualisation par électrophorèse ;
- Réaction de polymérisation en chaîne des triplets de CGG (PCR) ;
- L'analyse de fragment.

2-1- Extraction de l'ADN génomique par sels (Salting Out)

2-1-1- Principe

L'extraction de l'ADN est une technique permettant d'isoler l'ADN de cellules ou de tissus. L'ADN ainsi extrait peut ensuite être utilisé pour des recherches de biologie moléculaire, telles que la PCR.

L'ADN est obtenu à partir des leucocytes se trouvant au niveau du sang. Ces leucocytes sont traités par un détergeant capable d'éclater les membranes leucocytaires. L'étape suivante, consiste à éliminer les débris cellulaires et les protéines liées à l'ADN et les autres acides nucléiques (ARN...). L'ADN est précipité sous haute force ionique (NaCl) en présence d'éthanol absolu froid.

2-1-2- Réalisation pratique

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

Se prélèvement est traité par 40ml d'une solution hypotonique, tampon de lyse (10 mM NH₄Cl et 1mM NH₄HCO₃), permettant la lyse des globules rouges.

Après centrifugation de 10 minutes à 2500 rpm, le surnageant est directement versé et le culot blanchâtre des leucocytes récupéré et laver dans la même solution, afin d'éliminer les protéines.

Les leucocytes sont repris dans 2ml d'une solution de lyse, tampon WLB (10mM de tris HCL à PH 7.6 ; 400mM NaCl ; 2mM EDTA), avec 100 µl de détergeant (SDS 20%), et 50µl de protéinase K (0.5mg/ml).

Après une incubation toute la nuit à 37°C, l'ADN est précipité par addition de 1.3ml de NaCl 6M saturé puis centrifuger à 3500 rpm pendant 25 minutes. On ajoute 20 à 40ml d'éthanol absolu froid et une douce agitation fait apparaitre la méduse d'ADN qui sera récupérée dans un tube ependorff.

Après le lavage dans de l'éthanol à 70% et séchage au speed vas, l'ADN est repris dans 300µl de tris EDTA (10mM tris HCl ; 0.1mM EDTA pH 8). Le contrôle de la concentration de l'ADN est ensuite calculé par la mesure de l'absorbance à 260nm.

2-2- Dosage et conservation de l'ADN

2-2-1- Le dosage

Il est effectué par spectrophotométrie dans UV à 260nm. L'absorption se définit par l'unité de densité optique mesurée à 260nm. Une unité de densité optique correspond à l'absorption d'une solution d'ADN double brins à la concentration de 50µg/ml.

2-2-2- La conservation

Le stockage de notre ADN se fait au froid :

- Stockage à court terme, l'ADN est gardé à +4°C.
- Stockage à long terme (pour la banque à ADN), l'ADN est gardé à -20°C.

2-3- Méthyle PCR

2-3-1- Principe

Elle est basée sur une réaction chimique de bisulfite de sodium avec l'ADN qui permet de convertir des cytosines non méthylées dinucléotides CpG à l'uracile ou UpG grâce à une attaque nucléophilique stimulée par l'hydroquinone dans un milieu alcalin (NaOH).(Figure10)

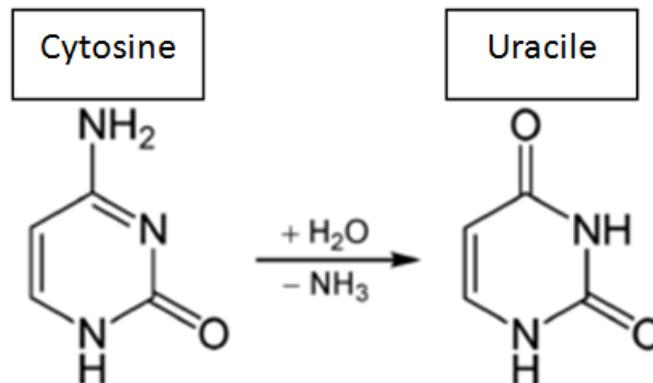


Figure 10. La désamination par le bisulfite de sodium de la cytosine non méthylée en uracile

2-3-2- Réalisation pratique

2-3-2-1- Traitement de l'ADN

La première étape consiste à traiter l'ADN.

	Concentration initiale	Concentration final	Volume initiale (μl)
ADN	$\cong 500 \text{ ng}/\mu\text{l}$	$\cong 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$	5
NaOH	10 mM	0,3 mM	1.5
H_2O_b			43.5

$$V_f = 50 \mu\text{l}$$

On laisse incuber à 37°C pendant 10 minutes au bain-marie pour la dénaturation de l'ADN et après on ajoute à notre mélange :

- 30 μl d'hydroquinone à 10mM ;
- 320 μl de bisulfite de sodium à 2M ;
- 7 gouttes de paraffine au dessus de notre mélange pour la protection.

On laisse incuber à 55°C pendant toute la nuit.

Chapitre 2 Matériels et méthodes

2-3-2-2- Purification de l'ADN traité via le kit QIAGEN

- Prendre 400µl de l'ADN traité sous paraffine et ajouter 800µl du tampon KIT QIAGEN ;
- Transférer le tout en deux fois sur une colonne (c'est-à-dire deux fois 600µl) et on centrifuge à 13000 rpm pendant une minute ;
- Faire un lavage en deux fois (c'est-à-dire 600µl et 200µl) avec le tampon PE du KIT QIAGEN et centrifuger à 13000 rpm pendant une minute ;
- Sécher la colonne en centrifugeant à 13000 rpm pendant 2 minutes ;
- Ajouter 50µl de H₂O dans la colonne pour reprendre l'ADN puis centrifuger à 13000 rpm pendant une minute.

2-3-2-3- Traitement supplémentaire de l'ADN

- Ajouter 5µl de NaOH 10M dilué jusqu'à 0,3M pour éliminer les traces de bisulfite de sodium et laisser incuber à température ambiante pendant 5 minutes ;
- Pour la précipitation de l'ADN, il y'a lieu d'ajouter 150µl d'éthanol absolu puis le centrifuger à 13000 rpm pendant 20 minutes ;
- Faire un lavage avec 200µl d'éthanol à 70%, puis centrifuger à 13000 rpm pendant 5 minutes ;
- Couvrir la colonne avec de la paraffine, sécher dans le speed-vac et reprendre le tout dans 50µl d'H₂O.

2-3-2-4- La technique PCR :

Pour amplifier notre région d'intérêt on utilise une technique PCR selon les conditions suivantes :

	Concentration initiale	Concentration final	Volume initiale (µl)
ADN traité par le bisulfite	≅ 20 ng/µl	≅ 30 ng/µl	2
dNTP	10 mM	0,2 mM	1
Tampon sans MgCl ₂	10X	1X	5
MgCl ₂	25 mM	2.5 mM	5
Amorce : Fx-BS-F	50 mM	1 mM	1
Amorce : Fx-BS-R	50 mM	1 mM	1
Amorce : NM-BS-F	50 mM	1 mM	1
Amorce : NM-BS-R	50 mM	1 mM	1
Enzyme Taq polymérase platinumium pfx	2,5 U/µl	0,01 U/µl	0,2
Eau			32,8

V_f = 50 µl

Couple d'amorce méthylé

Couple d'amorce non méthylé

Chapitre 2 Matériels et méthodes

Ce mélange est calculé pour un échantillon est mis dans un tube PCR. L'amplification est réalisée dans un thermocycleur et le programme d'amplification est le suivant :

- 10 minutes de dénaturation à 94°C ;
- 35 cycles de réplication ;
 - 30 secondes de dénaturation à 94°C ;
 - 30 secondes d'hybridation à 64°C ;
 - 30 secondes d'élongation à 72°C ;
- 10 minutes d'élongation finale à 72°C.

2-4- Visualisation par électrophorèse

2-4-1- Principe

La technique d'électrophorèse permet de séparer des molécules en fonction de leurs tailles et de leurs charges en utilisant un courant électrique dans un tampon à PH basique appelé Tris Borate EDTA (TBE). On peut ainsi analyser et purifier dans un milieu gélifié (gel d'agarose, gel de polyacrylamide...) l'ADN, l'ARN et les protéines.

La détermination précise des tailles des fragments séparés par électrophorèse est effectuée en faisant migrer des marqueurs de poids moléculaires en parallèle avec les échantillons à analyser.

Après séparation, la lecture est réalisée par exposition aux rayons UV dans le Gel Doc après réaction avec un réactif spécifique, le Bromure d'Ethidium (un agent intercalant entre les brins d'ADN).

2-4-2- Réalisation pratique

On prépare un gel nusieve 3% agarose 1% (3g nucive, 1g d'agarose, remplir jusqu'à 100ml et ajouter 50µl de BET et laisser se gélifier) pour une meilleure résolution, on dépose nos produits PCR mélangés au bleu de dépôt, et on laisse migrer pendant 2 heures.

Par la suite, on dépose notre gel avec nos produits dans un GEL DOC de type pour la visualisation aux rayons UV. Les données obtenues sont envoyées à un ordinateur qui les analyse avec le logiciel QUANTITY ONE.

2-5- PCR des triplets de CGG

2-5-1- Principe

Cette technique décrite en 1985 par Karry MULLIS et al, permet d'amplifier des séquences d'ADN de manière spécifique et d'augmenter considérablement la quantité d'ADN dont on dispose initialement.

Chapitre 2 Matériels et méthodes

La réaction de la PCR est une procédure rapide pour une amplification très importante d'une région bien précise de l'ADN, c'est en fait une cyclisation in vitro d'une réplication successive d'une séquence déterminée en présence de 4 desoxynucléotides (dTTP, dCTP, dATP, dGTP).

Effectuée à l'aide d'une ADN polymérase thermorésistante extraite de la bactérie *Thermus aquaticus* (Taq polymérase) qui, comme toutes les ADN polymérase, ne peut synthétiser le brin complémentaire d'une séquence d'ADN qu'à partir d'une amorce oligonucléotidique sur laquelle elle se fixe.

Cet ensemble ADN / oligonucléotides sera alors dénaturé par chauffage à haute température, puis, la température sera abaissée afin que les deux amorces choisies viennent s'hybrider avec les régions qui leurs sont complémentaires. A la fin, la température sera augmentée pour permettre la réplication à partir des amorces.

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

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

A la fin de ses 3 étapes on obtiendra un nouveau brin d'ADN dont la séquence est complémentaire de celle du brin cible qui vient d'être synthétisé. (Figure11)

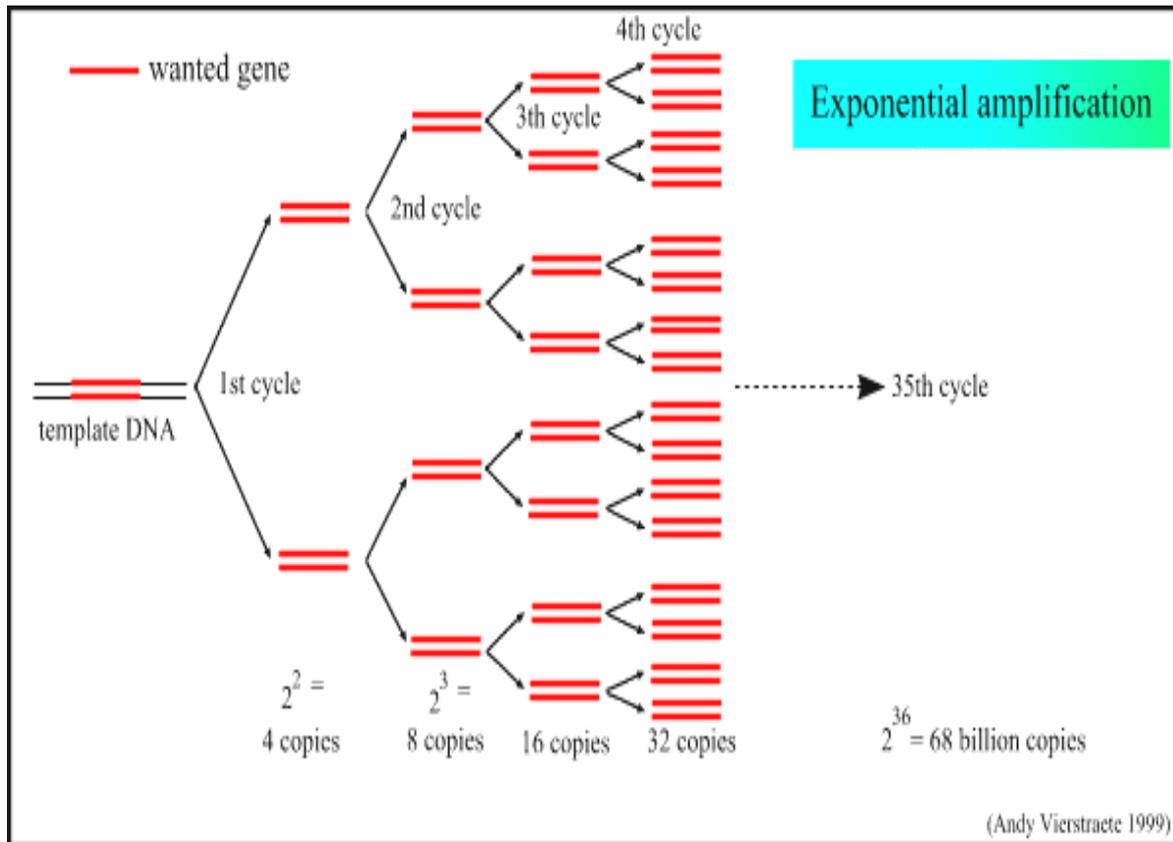


Figure 11. Principe de l'amplification de l'ADN par PCR

2-5-2- Réalisation pratique

Dans cette étude, on utilise la technique PCR multiplexe pour amplifier la région 5'UTR du gène *FMRI*, selon les ingrédients suivant :

	Concentration initiale	Concentration final	Volume initiale (µl)
Mix Buffer (Platinum)	10X	1 X	2
Amorce FRAXA-F	25 mM	2,4 mM	2
Amorce FRAXA-R	25 mM	2,4 mM	2
MgSO4	50 mM	1,43 mM	0.6
dNTP	25 mM	1,19 mM	1
Enhancer (platinum)	10 X	3,34 X	7
Enzyme Taq polymérase platinum pfx	2,5 U/µl	0,03 U/µl	0.3
Amorce FRAXE-F	100 µM	9,57 µM	2
Amorce FRAXE-R	100 µM	9,57 µM	2
ADN	≅ 500 ng/µl	≅ 50 ng/µl	2

Vf = 20,9µl

Chapitre 2 Matériels et méthodes

Ce mélange calculé pour un échantillon est mis dans un tube PCR. L'amplification est réalisée dans un thermocycleur et le programme d'amplification est le suivant :

- 3 minutes de dénaturation à 95°C ;
- 32 cycles de réplication :
 - 15 secondes de dénaturation à 95°C ;
 - 2 minutes d'hybridation à 62°C ;
 - 2 minutes d'élongation à 75°C.
- 10 minutes d'élongation finale à 75°C.

2-6- Analyse de fragment (Genmapper)

2-6-1- Principe

Cette technique est basée sur l'analyse de la longueur et de la quantité de fragments d'ADN amplifiés par PCR, utilisant des primers marqués avec de la fluorescence, en utilisant le logiciel GeneMapper.

2-6-2- Réalisation pratique

Les produits PCR à séquencer sont traités en ajoutant :

- 10µl de formamide HiDi™ pour la déstabilisation des acides nucléiques à 95°C (rupture des liaisons hydrogènes entre les bases) ;
- 0,5µl ROX 500™ size standard, un produit livré avec le séquenceur son rôle consiste à étalonner la région ciblée et pouvoir la visualiser.

Par la suite, les échantillons obtenus sont dénaturés à 95°C pendant 3 minutes et déposés dans un séquenceur automatique de type. Les données obtenues sont envoyées à un ordinateur qui les analyse avec le logiciel GEN MAPPER (V4.0).

Chapitre 3

Résultats et discussion

1- Résultats

Notre étude a concerné 54 garçons âgés de 20 mois à 15 ans émanant des différents services de Pédiatrie et Neurologie et suivis lors des consultations du professeur B.IMESSAOUDENE.

Une mutation complète du gène *FMRI* a été trouvée chez 8 garçons.

1-1- Résultat de la méthyle PCR

La technique méthyle PCR est une approche de deuxième intention, où l'expansion des triplets CGG entraîne une méthylation du gène *FMRI*, utilisée dans notre étude seulement dans le cas d'une mutation complète pour confirmer le résultat de la PCR des triplets CGG.

Après la migration sur le gel nusieve 3% agarose 1% et la visualisation par le GEL DOC.

Deux tailles seront visibles, une taille de l'allèle méthylé de 255Pb (cas de présence de mutation) et une taille de l'allèle non méthylé de 163Pb (cas de non mutation) (Figure 12).

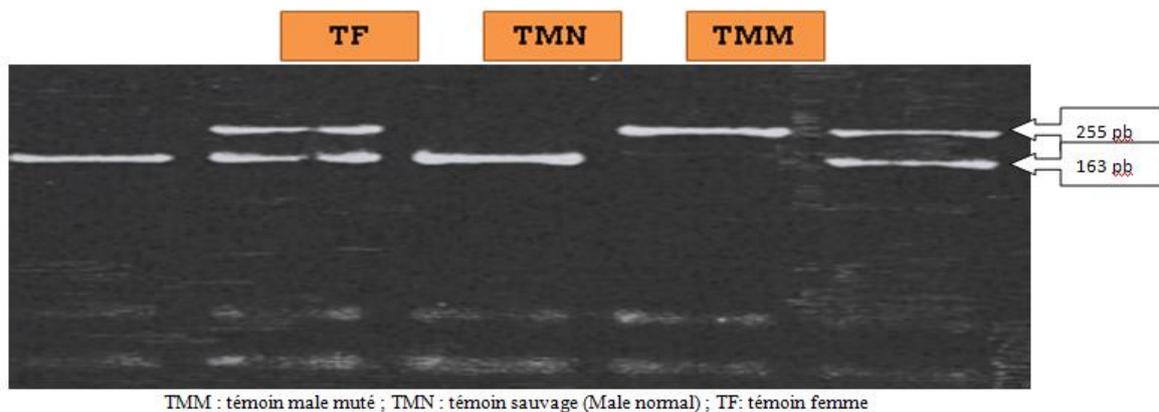


Figure 12. Electrophorèse sur gel de Nusieve-agarose 4% des produits PCR; des différents ADN traités (Méthyl-PCR)

1-2- Résultat de la PCR des triplets de CGG

La technique PCR des triplets de CGG est une approche de première intention utilisée dans notre étude pour chaque malade suspect du syndrome FRAXA.

Pour confirmer que notre amplification de la région FRAXA est sa réussite, on lance en même temps l'amplification du gène FRAXE situé en aval du FRAXA.

L'analyse de fragment via le séquenceur automatique et la lecture des résultats par le logiciel GENE MAPPER V4.0 donne les résultats suivants :

– Cas d'un sujet sain (non muté) : les 46 garçons sains présentent un profil électrophorétique similaire où la seule différence se situe dans la taille de l'allèle et le nombre des triplets CGG. Le profil électrophorétique FRAXA donne un allèle assimilé dans la zone étalonnée (pique visible) déterminant que notre fragment du gène *FMRI* a été amplifié.

Chapitre 3 Résultats et discussion

Le profil électrophorétique FRAXE confirme la réussite de l'amplification.

Le nombre des triplets CGG est calculé selon une formule établie par rapport à la technique de référence « Southern Blot » (annexe 3) qui donne le nombre exacte des triplets CGG :

$$\text{nombre de CGG} = \frac{\text{la taille} - 205}{3}$$

La taille est donnée par le logiciel en dessous du pic (figure 13).

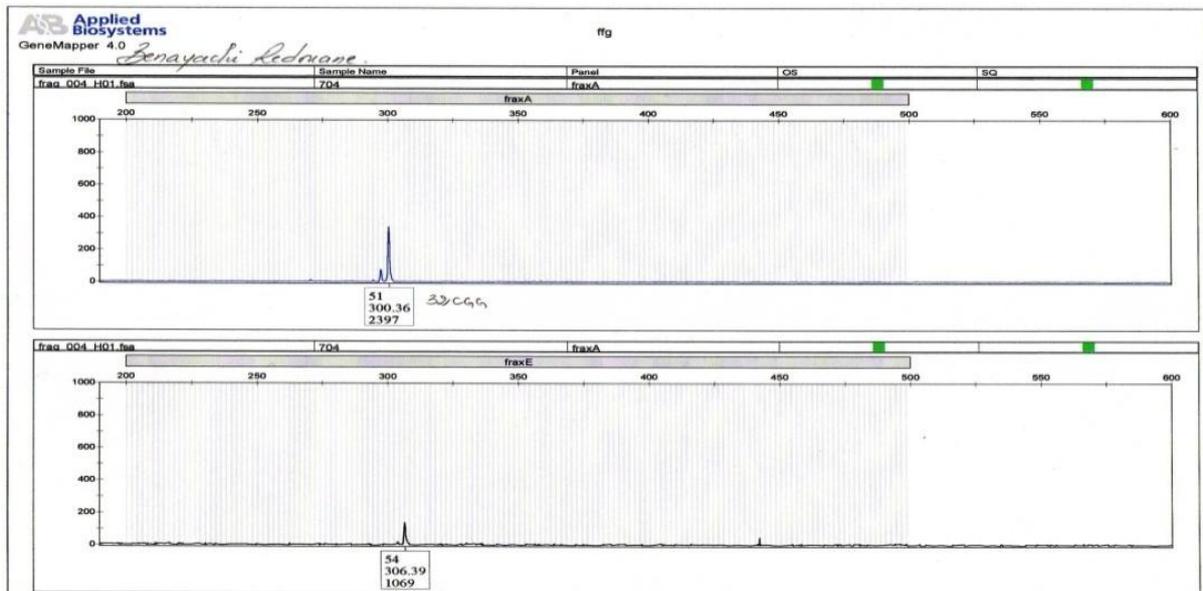


Figure 13. Profil électrophorétique d'un sujet sain : nombre de répétition CGG: 32

– Cas d'un sujet atteint du syndrome FRAXA (muté) : les 8 garçons atteints présentent un profil électrophorétique FRAXA sans amplification; aucun allèle n'est assimilé (aucun pique visible). Cela résulte d'absence d'amplification dû à la grande taille du fragment amplifié. Par contre le profil électrophorétique FRAXE confirme la réussite de notre PCR et la présence d'une mutation du gène *FMRI* (Figure 14).

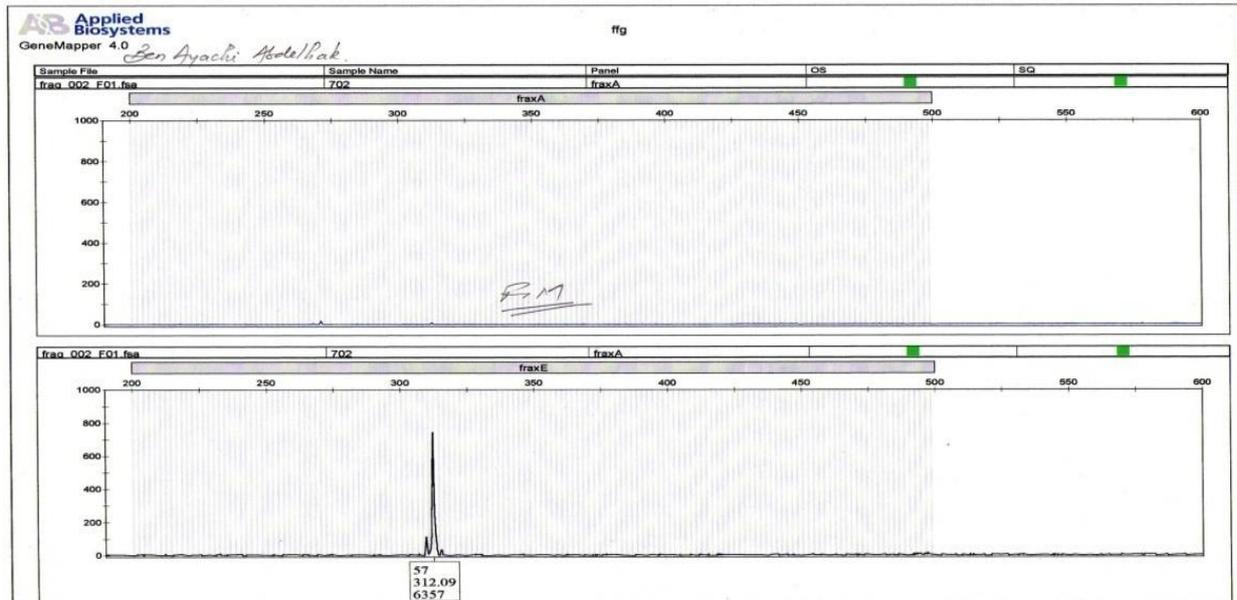
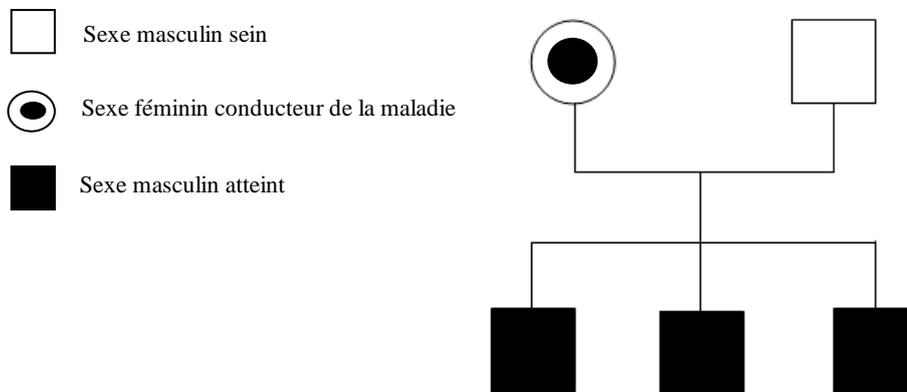


Figure 14. Profil électrophorétique d'un male atteint : aucun allèle n'est assimilé

Parmi les 8 mutations détectées dans ce travail, il y avait 3 frères atteints tous du syndrome de l'X-fragile. Ce qui nous a poussés à étudier d'avantage la famille en analysant leurs parents.

Le père était sain mais la mère était conductrice de la maladie sur un de ses deux allèles.



**Figure 15. Arbre généalogique d'une famille atteinte du syndrome de l'X Fragile :
La mère est conductrice et les 3 enfants sont atteints**

Chez la mère, le profil électrophorétique FRAXA montre un allèle sain et un allèle muté sachant que la femme a deux chromosomes X (Figure 16). Tandis que le profil électrophorétique FRAXE assimile les deux allèles portés sur les deux chromosomes X (deux pics).

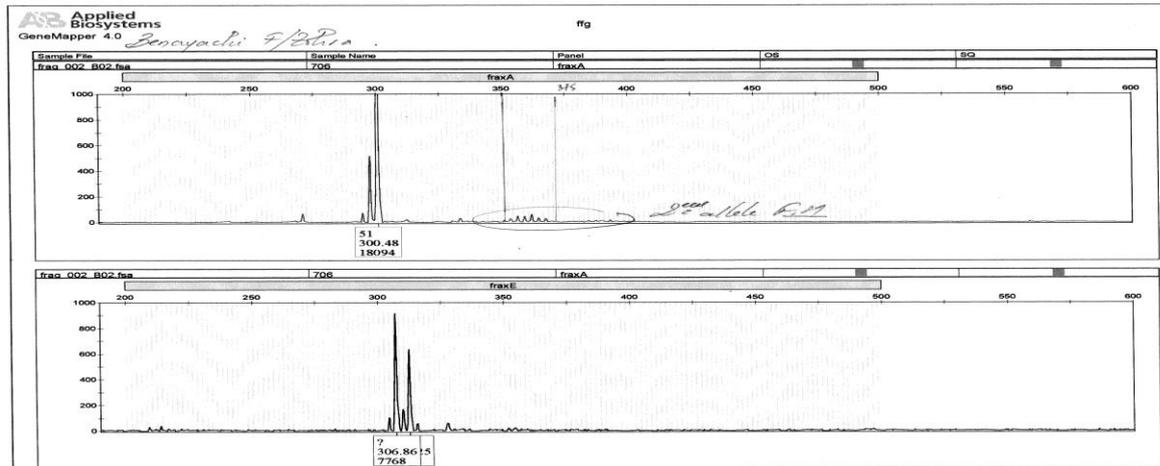


Figure 16. Profil électrophorétique d'une femme conductrice portant: un allèle normal de 32 CGG et un allèle muté

2– Discussion

Le retard mental est une déficience intellectuelle qui concerne près de 3% de la population générale. Il est le motif principal des consultations de pédiatrie en particulier de la neuropédiatrie.

Les facteurs environnementaux présentent 20% des retards mentaux, 40% sont des causes génétiques et 40% restent inconnues [Curry, et al., 1997].

L'objectif de notre travail comportait 3 points :

- Maîtriser les différentes techniques moléculaires.
- Diagnostiquer et détecter la mutation chez des enfants atteints d'un retard mental et plus précisément du syndrome de l'X-FRAGILE.
- Pouvoir donner un conseil génétique aux parents des patients malades.

L'étude du gène *FMRI* dans une cohorte de 54 garçons a été concluante car on a pu détecter 8 mutations du gène chez 8 garçons de notre cohorte. Ce qui représente un taux proche de 15%.

La réalisation de la PCR des triplets CGG est moins coûteuse par rapport à la « Southern Blot » (Annex2). Mais, n'empêche qu'elle donne toujours des résultats fiables.

L'avantage principal de la southern blot est qu'elle donne le nombre exact des triplets CGG dans le cas d'une mutation complète et surtout estime le nombre exact de CGG chez un patient prémuté. A l'inverse, la PCR des triplets CGG ne donne pas le nombre exacte, à cause d'absence d'amplification qui est du à l'arrêt du fonctionnement de l'enzyme TAQ polymérase à un certain nombre élevé des triplets CGG ($\cong 70$ CGG).

Chapitre 3 Résultats et discussion

Ce qui explique l'absence d'allèle dans un profil électrophorétique d'un sujet atteint de l'X-fragile.

Dans ce cas, on fait appel à la deuxième technique « méthyle PCR », une technique de deuxième intention qui confirme la présence ou non d'une mutation.

Cette technique peut différencier les fragments d'ADN méthylé et non méthylé selon leurs longueurs, qui sont dues à la variation de nombre de triplet CGG. Le fragment qui présente une mutation (nombre CGG ≥ 200) migre plus lentement que le fragment sain (nombre CGG ≤ 50), ce qui donne à la visualisation deux fragments : un de 163 Pb (fragment non méthylé) ; et un de 255 Pb (fragment méthylé).

Les inconvénients de la méthyle PCR sont :

- On ne peut pas avoir le nombre exact de triplet CGG dans tous les cas ;
- On ne peut pas différencier entre une mutation complète et une prémutation.

On peut comparer ces résultats obtenus par rapport à l'étude menée par E.Morner, B.Simon-Bouy sur la biologie moléculaire du syndrome de l'X-FRAGILE en 1996, effectuée sur une cohorte de 245 enfants où ils ont trouvé 37 patients atteints du syndrome de l'X-FRAGILE [E.Morner, B.Simon-Bouy ;1996] ce qui correspond à 15% d'enfants malades de notre étude.

Conclusion

Conclusion

Le retard mental est un handicap majeur touchant 3% de la population générale. Malgré toutes les avancées des études en cytogénétique et biologie moléculaire, 40% des causes des RM restent toujours inexpliqués.

L'étude du syndrome de l'X-FRAGILE réalisée à l'unité de génétique du laboratoire central de biochimie, CHU Mustapha, dirigée par le professeur B.IMESSAOUDENE, nous a permis d'utiliser des techniques de biologie moléculaire afin de diagnostiquer et de détecter la mutation concernant ce syndrome sur une cohorte de 54 garçons algériens, et ainsi pouvoir donner un conseil génétique aux parents.

Les deux principaux buts fixés dans notre étude, qui sont la maîtrise des différentes techniques biomoléculaires, le diagnostic et la détection de la mutation chez des enfants atteints d'un retard mental, ont été atteints.

Quant au conseil génétique, il repose sur l'aboutissement des deux buts atteints cités précédemment ; la suite logique serait de mettre au point une technique basée sur l'étude de l'inactivation du chromosome X chez les mères des enfants. Cette étude peut aider de loin le conseil génétique en précisant si oui ou non la présence d'une femme conductrice dans une famille et minimiser le nombre des personnes atteintes.

Références bibliographiques

- American Psychiatric Association. DSM-IV, Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 4th Ed. Washington DC: The American Psychiatric Association 1994.
- BARDONI B, MANDEL JL (2002). Advances in understanding of fragile X pathogenesis and FMRP function, and in identification of X linked mental retardation genes. *Curr Opin Genet Dev.* 12: 284-93.
- BENASSI G, GUARINO M, et al. (1990). An epidemiological study on severe mental retardation among schoolchildren in Bologna, Italy. *Dev. Med. Child Neurol.* 32: 895-901.
- BOWER C, LEONARD H, PETERSON B (2000). Intellectual disability in Western Australia. *J. Paediatr. Child Health.* 36: 213-215.
- BRADLEY SCHAEFER G, BODENSTEINER JB 1992. Evaluation of the child with idiopathic mental retardation. *Pediatr Clin North Am*; 39: 229-43.
- CANS C, WILHELM L, et al. (1999). Aetiological findings and associated factors in children with severe mental retardation. *Dev. Med. Child Neurol.* 41: 233-239.
- CHELLY J, KHELFAOUI M, FRANCIS F, BELDJORD C, BIENVENU T (2006) Genetics and pathophysiology of mental retardation. *Eur J Hum Genet* 14: 701-713.
- Curry CJ, Stevenson RE, Aughton D, et al. (1997). Evaluation of mental retardation recommendations of a consensus conference: American College of Medical Genetics. *Am J Med Genet* 72:468-77
- DEFRESNE P (2002). Les retards mentaux liés au chromosome X. *LOUVAIN MED* 121: 430-435.
- FERNELL E (1998). Aetiological factors and prevalence of severe mental retardation in children in a Swedish municipality : the possible role of consanguinity. *Dev. Med. Child Neurol* 40:608-611.
- GOLDENBERG A, SAUGIER-VEBER P (2010) Retards mentaux d'origine génétique. *Pathologie Biologie* 58: 331-342.
- GUESSAIBIA N, et al. (2011). Linkage analysis of six Algerian families with autosomal recessive non specific mental retardation. *LA TUNISIE MEDICALE Vol 89 (n°05):* 466 – 470.
- GUSTAVSON H, HOLMGREN G, et al. (1977). Severe mental retardation in children in a northern Swedish county. *J. Ment. Defic.Res.* 21: 161-180.
- HAGBERG B, HAGBERG G, et al. (1981). Mild mental retardation in Swedish school children. I. Prevalence. *Acta PaediatrScand.* 70: 441-444.
- KUSHLICK A, COX G R (1973). The epidemiology of mental handicap. *Dev. Med. Child Neurol.* 15: 748-759.

- LAXOVA R, RIDLER M A, BOWMEN-BRAVERY M (1977). An aetiological survey of the severely retarded Hertfordshire children who were born between January 1, 1965 and December 31, 1967. . *Am. J. Med. Genet.* 1: 75-86.
- LEMAY JF, HERBERT AR, DEWEY D, INNES M (2003). A rational approach to the child with mental retardation for the paediatrician *Paediatr Child Health* 8(6): 345-56.
- MATILAINEN R, AIRAKSINEN E, et al. (1995). A population-based study on the causes of mild and severe mental retardation. *Acta. Paediatr.* 84: 261-266.
- MC DONALD AD (1973). Severely retarded children in Quebec: Prevalence , causes and care. *Am J Ment Defic.* 78(2): 205-15.
- MC LAREN J, BRYSON SE (1987) Review of recent epidemiological studies of mental retardation: prevalence, associated disorders, and etiology. *Am. J.Ment. Retard* 92: 243-254.
- MC QUEEN P C, SPENCE M W, et al. (1986). Causal origins of major mental handicap in the Canadian maritime provinces. *Dev Med Child Neurol.* 28(6): 697-707.
- MLIKA A, DU MAZAUBRUN C, RUMEAU-ROUQUETTE (1993). Prevalence of severe mental retardation and trisomy 21 in 3 generations: 1972, 1976, and 1981. *Rev. Epidemiol. Sante Publique.*41 : 44-52.
- MORNER E, SIMON-BOUY B (1996). Biologie moléculaire du syndrome de l’X fragile: données récentes et applications diagnostiques. *Arch Pediatr* 3:814-821.
- PHELAN C, CRAWFORD ERIC C, BEALER DEBORAH M (1996). Mental retardation in South Carolina III. Chromosome aberrations. *Proceedings of the Greenwood Genetic Center* 15: 45-60.
- RIO M, MOLINARI F, et al. (2002). Automated fluorescent genotyping detects 10% of cryptic subtelomeric rearrangements in idiopathic syndromic mental retardation. *J. Med. Genet.* 39: 266-270.
- SAMPSON P D, STREISSGUTH A P, et al. (1997). Incidence of foetal alcohol syndrome and prevalence of alcohol-related neurodevelopmental disorder. *Teratology* 56: 317-326.
- SCHMICKEL R D (1986). Contiguous gene syndromes: a component of recognizable syndromes. *J.Pediatr.*109: 231-241.
- SCHOER R J, SCHWARTZ C (1996). Mental retardation in South Carolina IV. X-linked disorders. *Proceedings of the Greenwood Genetic Center.* 15: 61-66.
- SEAVER L H (1996). Mental retardation in South Carolina VIII. Infections. *Proceedings of the Greenwood Genetic Center.* 15: 80-85.

- STEVENSON RE (1996). Mental retardation : Overview and historical perspective. *Proc Greenwood Genet Center*.15: 19-25.
- STROMME P (2000). Aetiologi in severe and mild mental retardation: a population-based study of norwegian children.*Dev Med Child Neurol*. 42(2):76-86.
- STROMME P, VALVATNE K (1998). Mental retardation in Norway: Prevalence and sub-classification in a cohort of 30037 children born between 1980 and 1985. *Acta Paediatr*.87: 291-296.
- RICHARDSON SA (1989). Issues in the definiton of mental retardaton and the representativeness of studies. *Res Dev Disabil*. 10(3):285-94.
- WELLESLEY D, HOCKEY A, STANLEY F (1991). The aetology of intelectual disabiliy in western australia: a community based study. *Dev Med Child Neurol*. 33 (11): 963-967.
- WIDE K, WINBLADH B, et al. (2000). Psychomotor development and minor anomalies in children exposed to antiepileptic drugs in utero: a prospective population-based study. *Dev Med Child Neurol*. 42: 87-92.

Les annexes

Annexe 1

Tableau I. Prévalence des retards mentaux sévères parmi les enfants d'âge scolaire

Références	Année de l'étude et pays	Sources de recueil de données	Taille de la population étudiée	Tranches d'âge en années	Prévalence pour 1000 des retards mentaux sévères
Mc Donald et al.,1973	Canada	Hôpitaux, institutions Ecole pour RM Conseils scolaires	408015	8 à 12	3.84
Kushlick et al.,1973	Angletrre	Registre des RM Hôpitaux pour RM Hôpitaux généraux	Non précisé	5 à 9	2.41
Gustavson et al., 1977	Suède	Registre des RM Dossiers scolaires Département de pédiatrie et psychiatrie infantile	40871	5 à 17	3.9
Laxova et al., 1977	Angletrre	Registre des RM Services sociaux	46960	7 à 9	3.1
Harberg et al.,1981	Suède	Registre des RM	24498	8 à 12	3
Mc Queen et al.,1986	Canada	Registre des RM Dossiers scolaires	84119	7 à 11	3.65
Benassi et al.,1990	Italie	Registre des RM Dossiers scolaires	24494	6 à 13	3.4
Wellesley et al.,1992	Australie	Registre des RM Dossiers scolaires Hôpital pédiatrique	210789	6 à 16	3.9
Mlika et al.,1993	France	Registre de la CDES	152156 122660 143200	13 10 8	3.5 2.8 2.8
Matilainen et al.,1995	Finlande	Registre des RM Hôpital pédiatrique	12882	8 à 9	6.3
Fernell et al.,1998	Suède	Registre des RM Hôpital pédiatrique	14138	3 à 16	4.5
Stromme et al.,1998	Norvège	Ecoles spécialisées Institutions pour RM	30037	8 à 13	2.7
Cans et al.,1999	France	Registre de la CDES	Non précisé	7 à 16	3.53

Tableau II. Liste des gènes identifiés sur l’X et responsable de RM syndromique (RMXS)

RM	Gène	Localisation	Phénotype	Fonction	Référence
Retard mental syndromique	M1D1 (Midline 1)	Xp22	Syndrome d'Opitz G et syndrome BBB	Régulateur de la dégradation de PP2CA	[Quaderi NA et al.,1997]
	STK9 ou CDKL5 (Serine/Thréonine protéine Kinase 9)	Xp22	Syndrome de West	Kinase	[KalscheuerVM et al., 2003]
	PDHA1 (Pyruvate Déshydrogénase Complex)	Xp22	Syndrome de Leigh	Entre dans la composition du complexe de la pyruvate déshydrogénase	[Endo H et al., 1989]
	DMD (Dystrophine)	Xp21	Dystrophie de Duchenne	Entre dans le complexe dystrophine glycoprotéine (DGC), rôle dans la liaison cytosquelette interne et matrice extra-cellulaire	[Bulman DE et al., 1991]
	OTC (Ornithine Carbamyltransférase)	Xp11	Hyperammonémie	Rôle dans le cycle de l'urée	[Maddalena A et al., 1988]
	MAOA (Monoamine Oxydase A)	Xp11	Syndrome de Brunner	Rôle dans la désamination des amines	[Brunner HG et al.,1993]
	OPHN1 (Oligophrenin 1)	Xq12	Ataxie cérébelleuse	Activateur des Rho GTPases Rôle dans l'organisation du cytosquelette et de la signalisation intracellulaire	[Philip N et al.,2003]
	NLGN3 (Neuroigin 3)	Xq13	Syndrome d'Asperger	Rôle dans la plasticité synaptique	[Jamain S et al.,2003]
	MCT8 (Monocarboxylate Transporter 8)	Xq13	RM sévère associé à une forte élévation sérique de T3	Transporteur d'hormones thyroïdiennes	[Dumitrescu AM et al.,2004]

Retard mental syndromique

RM	Gène	Localisation	Phénotype	Fonction	Référence
	XNP (X-linked Nuclear Protein)	Xq13-q21	RM associé à une alpha-thalassémie	Rôle dans le développement et l'organisation du cortex	[Gibbons RJ et al., 1995]
	ATP7A (Cu ²⁺ transporting ATPase, alpha polypeptide)	Xq21	Syndrome de Menkes	Rôle dans la maintenance du taux du cuivre dans les cellules	[Kaler SG et al., 1989]
	PGK (Phosphoglycérate Kinase 1)	Xq21	RM associé à une anémie hémolytique	Enzyme de conversion du 1,3 diphosphoglycérate en 3 phosphoglycérate	[Fujii H et al., 1980]
	TIMM8A (Translocase of inner mitochondrial membrane 8 homolog A)	Xq22	Syndrome de Mohr-Tranebjaerg	Rôle dans le transport de métabolites vers la mitochondrie	[Jin H et al., 1996]
	NXF5 (Nuclear RNA export factor, member 5)	Xq22	RMS	Fonction inconnue	[Frints SG et al., 2003]
	PLP (Proteolipid protein 1)	Xq22	Syndrome de Pelizaeus-Merzbacher	Premier constituant de la myéline	[Gencic S et al., 1989]
	DCX (Doublecortin)	Xq23	Lissencéphalie	Rôle possible dans la migration neuronale et la transduction du signal	[des Portes V et al., 1998 ; Glesson JG et al., 1998]
	OCRL1 (Lowe Oculocerebrorenal syndrome gene)	Xq25	Syndrome de Lowe	Phosphatase régulant le niveau du phosphatidylinositol 4,5 diphosphate	[Leahey AM et al., 1993]
	GPC3 (Glypican 3)	Xq26	Syndrome de Simpson-Golabi-Behmel (SBG)	Rôle possible dans la régulation de l'expression de certains gènes	[Xuan JY et al., 1999]
	PHF6 (PHD finger protein 6)	Xq26	Syndrome de Borjeson-Forssman-Lehmann	Rôle possible dans la transcription	[Lower KM et al., 2002]

Retard mental syndromique

	Gène	Localisation	Phénotype	Fonction	Référence
	HPRT (Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransfé rase 1)	Xq26	Syndrome de Lesch-Nyhan	Contrôle le métabolisme des purines	[Fujimori S et al.,1989]
	SOX 3 (SRY-related HMG- box gene 3)	Xq26	RM associé à un déficit en hormone de croissance	Rôle dans la maturation des neurones	[Laumonnier F et al.,2002]
	FMR1 (Fragile site Mental Retardation1)	Xq27	Syndrome de l'X Fragile	Rôle dans la maturation et le développement neuronal	[De Boule et al.,1993]
	IDS (Iduronate 2 Sulfatase)	Xq28	Syndrome de Hunter	Dégradation des protéoglycanes	[Bunge S et al.,1992]
	SLC6A8 (Solute Carrier Family 6, member 8)	Xq28	RM associé à une déficience en créatine	Transporteur de la créatine	[Salomons GS et al.,2001]
	ABCD 1 (ATP-binding cassette, subfamily D, member 1)	Xq28	Adreno- leucodystrophie	Facilite l'interaction peroxysome/mitocho ndrie	[Cartier N et al.,1993]
	L1CAM (L1 cell adhesion molecule)	Xq28	Hydrocéphalie	Protéine d'adhésion aux cellules	[Rosenthal et al.,1992]
	FLNA (Flamin A)	Xq28	Syndrome otopalatodigital (OPD)	Rôle possible dans la régulation de protéines impliquées dans l'organisation du cytosquelette	[Fox JW et al.,1998]

Tableau III. Liste des gènes identifiés sur l’X et responsable de RM Non syndromique (RMX)

RM	Gène	Localisation	Phénotype	Fonction	Référence
Retard mental non syndromique	IL1RAPL1 (Interlukine 1 Receptor Accessry Protein Like 1)	Xp21	RMNS	Interagit avec NCS1 (Neuronal calcium sensor 1), rôle possible dans l'exocytose Ca ²⁺ - dépendante	[Carier A et al.,1999]
	TM4SF2 (Transmembrane 4, super family, member 2)	Xp11	RMNS	Rôle possible dans l'organisation du cytosquelette et la signalisation intracellulaire	[Zemni R et al.,2000]
	ZNF41 (Zinc Finger protein 41)	Xp11	RMNS	Rôle possible dans la régulation de la transcription	[Shoichet SA et al.,2003]
	ZNF81 (Zinc Finger protein 81)	Xp11	RMNS	Rôle possible dans la régulation de la transcription	[Kleefstra T et al.,2004]
	FTSJ1 (Ftsj homolog 1,)	Xp11	RMNS	Rôle possible dans la régulation de la transcription	[Freude K et al.,2004]
	DLG 3 (Homologue of Disc Large, Drosophila 3)	Xq13	RMNS	Interagit avec la sous unité NR2B du récepteur NMDA	[Tarpey et al.,2004]
	FACL4 (Fatty acid-CoA ligase, long chain 4)	Xq23	RMNS	Rôle dans la synthèse des lipides	[Meloni et al.,2002]
	PAK3 (P21-activated Kinase 3)	Xq23	RMNS	Effecteur des Rho-GTPases, rôle dans l'organisation du cytosquelette et la signalisation intracellulaire	[Allen KM et al.,1998]
	ARHGEF6 (Rho guanine nucleotide exchange factor 6)	Xq26	RMNS	Régulateur des Rho-GTPases et de PAK3, rôle dans l'organisation du cytosquelette et la signalisation intracellulaire	[Fox JW et al.,1998]
	FMR2 (Fragile site Mental Retardation 2)	Xq28	RMNS	Facteur de transcription probable	[Gecz J et al.,1996]
GDI1 (GDP dissociation inhibitor)	Xq28	RMNS	Régulateur des Rab3-GTPases et rôle dans le transport vésiculaire et la croissance des neurites	[D'Adamo P et al.,1998]	

Tableau IV. Liste des gènes identifiés sur l’X et responsable de RM syndromique et non syndromique (RMXS et RMX)

RM	Gène	Localisation	Phénotype	Fonction	Référence
RETARD MENTAL IMPLIQUES A LA FOIS DANS LES FORMES SYNDROMIQUES ET NON SYNDROMIQUES	NLGN4 (Neuroligine 4)	Xp22	Syndrome d'Asperger et RMNS	Protéine membranaire présynaptique, rôle dans la plasticité synaptique	[Jamain S et al.,2003 ; Laumonier F et al.,2004]
	RSK2 (Ribosomal S6 Kinase 2)	Xp22	Syndrome de Coffin-Lowry et RMNS	Cible de ERK (Elk-related Tyrosine Kinase), rôle dans la transcription	[Trivier E et al.,1996]
	ARX (Aristaless Related Homeobox)	Xp22	Syndrome de West et de RMNS	Protéine certainement impliquée dans le développement du système nerveux central	[Stromme P et al.,2002]
	PQBP1 (Polyglutamine Protein 1)	Xp11	RMS et RMNS	Régulateur de la transcription	[Kalscheuer VM et al.,2003]
	FGD1 (Faciogenital Dysplasia Gene)	Xp11	Syndrome d'Aarskog-Scott et RMNS	Rôle dans la cascade des Jun Kinases	[Pasteris NG et al.,1994]
	MECP2 (Methyl-CpG-binding Protein 2)	Xq28	Syndrome de Rett et RMNS	Régulateur de la méthylation	[Tarpey et al.,2004]

Annexe 2



eppendorf BIO
Photometer



Savant
DNA120
SpeedVac
Concentrator



Advantage-Lab
AL05-01



eppendorf
Centrifuge 5415 D



FISHER Vortex

Annexe 3

Technique de southern

On sait découper l'ensemble de l'ADN d'un organisme avec des enzymes (appelé enzymes de restriction) qui coupent chaque fois qu'elles reconnaissent une certaine séquence de bases (par exemple, l'enzyme de restriction EcoRI reconnaît et coupe la séquence GAATTC). On obtient une multitude de fragments d'ADN de longueur différentes, déterminées par la distance entre deux points de coupure. Une électrophorèse de ces fragments d'ADN permet de les classer selon leur longueur et après transfert sur une membrane (méthode de southern [*J Mol Biol*,1975], la sonde moléculaire marquée avec un traceur viendra identifier le ou les fragments d'ADN qui lui sont complémentaires. Cette sonde va donc indiquer la longueur du segment reconnu et déceler les variations de longueur dues, dans le cas de l'X-FRAGILE, aux variations du nombre de triplets CGG. On utilise habituellement deux enzymes, EcoRI et EagI. Ce dernier est sensible à la méthylation (il ne coupe que si l'ADN n'est pas méthylé) et permet donc de déceler la mutation complète par absence de coupure.