



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



جامعة باجي مختار-عنابة

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR ANNABA

FACULTE DES SCIENCES

DOMAINE SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

Laboratoire de Recherche en Biochimie et Toxicologie Environnementale

Thèse de Doctorat en Biochimie appliquée

**Génotypage des microsatellites pour l'étude de mutations
dynamiques :
Syndrome de l'X-Fragile**

Par

Aicha Zoubeida BENMOSTEFA

Soutenue le 12 Janvier 2017

JURY DE SOUTENANCE

Président	Mr. N. BOUZERNA	Professeur	Univ. Annaba
Directrice de thèse	Mme D. SATTI	Professeur	Univ. Constantine
Examineur	Mr. D.E. BENOURETH	Professeur	Univ. Guelma
Examineur	Mr. A.M. BAIRI	Professeur	Univ. Annaba
Membre invité	Mme I. CREVEAUX	Professeur	Univ. Auvergne

2017

REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié du soutien du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique.

Avant tout, je tiens à remercier les membres du jury pour avoir consacré de leur temps à l'évaluation de ce manuscrit. Merci d'une part au Professeur BOUZERNA N. d'avoir accepté de présider cette thèse et d'autre part au Professeur BENOUARETH et au Professeur BAIRI de me faire l'honneur d'être examinateurs.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Madame le Professeure SATTA D. Je vous remercie de m'avoir donné la chance de mener à terme ce travail de longue haleine et de m'avoir soutenue tout au long du chemin ardu pour compléter mon parcours.

Un immense merci au Professeur ABADI N. Merci de m'avoir accepté au sein du Laboratoire de Biologie et Génétique Moléculaire, Centre Hospitalo-universitaire Ben-Badis, Constantine, j'associe Madame Yasmina pour l'aide qu'elle m'a fourni au sein dudit laboratoire à ces remerciements !

Je tiens à remercier Mme le Professeur CREVEAUX I. pour son accueil au niveau du Laboratoire de Biochimie Médicale et Biologie Moléculaire, Faculté de Médecine, Clermont-Ferrand, merci pour le travail effectué ensemble.

Merci à toute l'équipe, et notamment à Renée, merci pour votre savoir-faire et votre disponibilité de tous les instants.

Un merci tout particulier à Nadia (ah la connectivité Algérienne fil ghorba).

Je voudrais également remercier Madame KRECHIEM Y. et Dr LABIDI S. pour m'avoir aidé pour le recrutement des malades, et surtout d'avoir joué le jeu ! Elles comprendront !

Tout le travail présenté dans ce manuscrit n'aurait pas été possible sans l'aide, l'encadrement et le soutien de beaucoup de personnes.

MERCI

Résumé

Les mutations dynamiques correspondent à des variations atypiques du génome humain. Elles sont caractérisées par une dynamique représentée par le taux de polymorphisme très élevée, allant jusqu'à une instabilité de degré de répétitions d'ADN microsatellites.

Plusieurs gènes constituent la base moléculaire de conditions dites pathologies à amplification de triplet, la première de ces pathologies à avoir été identifiée et la plus fréquente est le syndrome de Martin-Bell ou le syndrome de l'X-Fragile. L'étiologie moléculaire de cette maladie héréditaire liée à l'X et monogénique correspond au gène *FMR1* qui comprend à son extrémité 5'UTR une séquence riche en CG, dont l'amplification au-delà d'un seuil entraîne l'apparition de signes cliniques assez subtiles pour être dilués dans la population de malades atteints de déficiences mentales et de malades atteints d'autisme.

Dans notre étude, première dans son genre en Algérie, nous avons effectué le dépistage du gène *FMR1*, gène causale du syndrome de l'X-Fragile sur 55 malades. L'analyse par Southern blot après amplification du locus FRAXA nous a permis de mettre en évidence la présence de mutation complète et par des analyses en cascade la présence de prémutation. Ce qui nous a conduits à poser un diagnostic moléculaire suivi par l'établissement d'un conseil génétique et une meilleure prise en charge du malade.

Le génotypage de l'ADN microsatellite sur deux loci FRAXA et FRAXE nous a permis d'étudier d'une part le taux de polymorphisme, la distribution des variants alléliques et enfin l'hétérozygotie au niveau des gènes *FMR1* et *FMR2* au sein de notre population.

Mots clés: autisme, répétitions CGG, gène *FMR1*, Syndrome de l' X-Fragile, retard mental.

Summary

Dynamic mutations are unusual variations in the human genome. They are characterized by an instability represented by the very high levels of polymorphism, signing up the repeats instability in microsatellite DNA.

Several genes are the molecular basis of conditions known as trinucleotide repeat disorders. Fragile X syndrome (FXS) is the leading cause of inherited mental retardation. The underlying molecular alteration consists of a CGG repeat expansion within the *FMR1* gene. Therefore, searching for CGG expansion at the FXS locus among the mentally retarded should become a routine investigation in neuro-paediatric practices.

In our study, first of its kind in Algeria, we conducted the screening of the *FMR1* gene, on 55 patients with mental deficiency. The Southern blot analysis after amplification of the FRAXA locus allowed us to highlight the presence of full mutation and analyzes in cascade allowed us to detect premutation. These findings helped us to establish a molecular diagnosis and to set up a session of genetic counseling among the members of the FXS family and therefore by a better follow up of the patient.

Genotyping of microsatellite DNA on FRAXA and FRAXE loci allowed us to study in one hand the polymorphism rate, the distribution of the allelic variants and finally the heterozygosity at the *FMR1* and *FMR2* genes.

Keywords: autism, CGG repeats, *FMR1* gene, fragile X Syndrome, mental retardation.

ملخص

تتوافق الطفرات الوراثية الحركية مع التغيرات غير العادية في الجينوم البشري. فهي تتميز بحركية ممثلة بمستوى عالي جدا من تعدد الأشكال لتصل إلى عدم استقرار درجة تكرارات ADN الصغري .

تمثل العديد من المورثات الأساس الجزيئي للأوضاع المعروفة بأمراض التضاعف الثلاثي، وأول هذه الأمراض التي تم تحديدها وأكثرها شيوعا هي متلازمة Martin-Bell أو متلازمة X-الهش. المسبب الجزيئي لهذا المرض الوراثي المرتبط بالصبغي X و أحادي المورث يتمثل في المورث *FMR1* الذي يحتوي في نهايته 5'UTR سلسلة غنية بالقواعد CG، حيث أن تضاعفها فوق عتبة معينة يسبب ظهور أعراض سريرية دقيقة بما يكفي لتكون غير ظاهرة في فئة المرضى المصابين بإعاقات عقلية ومرضى التوحد.

في هذه الدراسة والتي تعد الأولى من نوعها في الجزائر، قمنا بفحص المورث *FMR1* المسبب لمتلازمة X-الهش ل 55 مريض. التحليل بطريقة Southern blot بعد مضاعفة الموقع الجيني *FRAXA* سمح لنا بتسليط الضوء على وجود طفرة وراثية كاملة، وكذلك التحليلات المتتالية اظهرت وجود طفرة وراثية مبدئية. أدى هذا إلى وضع تشخيص جزيئي متنوع بإنشاء استشارة وراثية و توفير رعاية أفضل للمريض.

التنميط الجيني ADN الصغري في الموقعين الجينيين *FRAXA* و *FRAXE* سمح لنا بدراسة مستوى تعدد الأشكال، توزيع المتغيرات الأليلية و أخيرا التغيرات الزيجوتي في المورثين *FMR1* و *FMR2* عند فئة المرضى المدروسة.

كلمات المفتاح: التوحد، تكرارات CGG، مورث *FMR1*، متلازمة X-الهش، التخلف العقلي

TABLE des MATIERES

<i>Abréviations</i>	<i>i</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>iii</i>
<i>Liste des tableaux</i>	<i>vi</i>
INTRODUCTION GENERALE	01
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
CHAPITRE I. COMPLEXITE ET ORGANISATION DU GENOME HUMAIN	04
INTRODUCTION	04
I.1- Les séquences géniques	05
I.2- Les séquences extra-géniques répétées	05
I.2.1- L'ADN satellite classique	06
I.2.2- L'ADN minisatellite	07
I.2.3- L'ADN microsatellite	07
I.3- Polymorphismes et mise en évidence des séquences répétées	07
I.3.1- Polymorphisme au niveau d'un seul nucléotide (SNP)	08
I.3.2- Polymorphisme de longueur d'une séquence (SSLP)	09
I.4- Les mutations atypiques du génome humain	09
I.4.1- Les mutations instables ou dynamiques	10
I.4.2- Différents types de répétitions de trinuécléotides et leur expansion	10
I.4.3- Origine des mutations dynamiques	11
CHAPITRE II. GENETIQUE MOLECULAIRE DU SYNDROME DE L'X-FRAGILE	13
INTRODUCTION	13
II.1- Principe du diagnostic moléculaire des répétitions de trinuécléotides	13
II.2- Les pathologies à répétitions de trinuécléotides	15
II.3- Le syndrome de l'X-Fragile (XFS)	16
II.3.1- Aspect phénotypique du syndrome de l'X-Fragile	16
II.3.1.1- Manifestations cliniques	16
II.3.1.2- Prévalence et mode de transmission	18
II.3.2- Aspect génotypique du syndrome de l'X-Fragile	19
II.3.2.1- Identification du gène <i>FMR1</i>	19
II.3.2.2- Structure et expression du gène <i>FMR1</i>	19
II.3.3- Pathologie moléculaire du gène <i>FMR1</i>	20
II.3.3.1- Amplification et taille des répétitions	20
II.3.3.2- Modifications épigénétiques de <i>FMR1</i>	23
II.3.4- La protéine FMRP	25
II.3.5- Traitements du syndrome de l'X-Fragile	28
II.3.6- Diagnostic différentiel du syndrome de l'X-Fragile/Autisme	30
MATERIELS ET METHODES	
I. Echantillonnage biologique	31
I.1- Loci FRAXA et FRAXE	31
I.2- Distributions des répétitions CGG et des répétitions GCC	32
II. Extraction de l'ADN génomique (ADNg)	34
II.1- Protocole d'extraction de l'ADNg	34
II.1.1- Principe d'extraction de l'ADNg	34
II.1.2- Procédure d'extraction	34
II.2- Quantification et dosage de l'ADNg	35
II.2.1- Principe de quantification de l'ADNg par spectrophotométrie	35
II.2.2- Détermination de la concentration de l'ADNg	36

II.3- Purification de l'ADNg	37
II.3.1- Principe de la purification de l'ADNg	37
II.3.2- Procédure de purification de l'ADNg	37
III. Amplification de l'ADNg par PCR fluorescente	38
III.1- Principe de l'amplification de l'ADNg par PCR fluorescente	38
III.2- Amorces utilisées	41
III.3- Protocole d'amplification	41
III.4- Conditions d'amplification	42
IV. Electrophorèse capillaire et génotypage	43
IV.1- Principe de l'électrophorèse capillaire	43
IV.2- Protocole de l'électrophorèse capillaire	43
IV.3- Génotypage des loci FRAXA et FRAXE par GeneMapper	44
IV.3.1- Le séquenceur ABI 3130	44
IV.3.2- Programmation et lecture du logiciel GeneMapper v4.0	45
V. Transfert sur membrane par Southern-blot et hybridation moléculaire	51
V.1- Principe du Southern-blot	51
V.2- Protocole du transfert sur membrane	52
V.2.1- Digestion de l'ADNg	54
V.2.2- Electrophorèse sur gel d'agarose	54
V.2.3- Transfert sur membrane	56
V.2.4- Pré-hybridation	56
V.2.5- Préparation de la sonde	56
V.2.6- Lavage de la membrane et mise en cassette	59

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

I. Echantillonnage biologique	61
I.1- Patients autistiques	63
I.2- Patients RM	64
II. Génotypage du locus FRAXA	65
II.1- Détermination de la taille des répétitions	65
II.2- Individus non apparentés	68
II.2.1- Individus de sexe masculin	68
II.2.2- Individus de sexe féminin	75
II.3- Etudes familiales	77
II.3.1- Famille 1	77
II.3.2- Familles 2 et 3	79
II.3.3- Famille 4	80
III. Génotypage des patients au locus FRAXE	85
IV. Hybridation moléculaire par Southern-blot	90
IV.1- Blot Z01	90
IV.1.1- Migration sur gel d'agarose	90
IV.1.2- Interprétation des résultats du blot Z01	93
IV.2- Blot Z02	93
IV.2.1- Migration sur gel d'agarose	94
IV.2.2- Interprétation des RFLPs obtenus	96
2.2.1- Interprétation des résultats du blot Z02	97
2.2.2- Calcul de la taille des bandes des RFLPs	97
2.2.3- Calcul des RFLPs des individus I1 et I2	99
2.2.4- Calcul du RFLP de l'individu III	100

V. Diagnostic moléculaire	101
VI. Distributions allélique des répétitions CGG (FRAXA) et GCC (FRAXE)	102
VI.1- Caractéristiques des patients étudiés	102
VI.2- Polymorphisme allélique des répétitions CGG	102
VI.3- Polymorphisme allélique des répétitions GCC	106
VI.4- Hétérozygotie des loci FRAXA et FRAXE	109
DISCUSSION	112
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	115
<i>Références bibliographiques</i>	117
<i>Annexes</i>	
PRODUCTION SCIENTIFIQUE	

Abréviations

A	Adénine
ABI	<i>Applied Biosystems</i>
AGG	Triplet de nucléotides adenine–guanine–guanine
ADN (DNA)	Acide désoxyribonucléique (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
ADNg	Acide désoxyribonucléique génomique
ARN (RNA)	Acide ribonucléique (<i>Ribonucleic acid</i>)
ARNm	Acide ribonucléique messager
AUT	Autiste
BET	Bromure d’Ethidium
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Cytosine
CAG	Triplet de nucléotides cytosine– adénine–guanine
CGG	Triplet de nucléotides cytosine–guanine–guanine
CEN	ADN centromérique
CNP	<i>Copy number polymorphism</i>
CNV	<i>Copy number variation</i>
Cpm	Coups par minute
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat</i>
CXR	Carboxy-X-Rhodamine
dATP	2’ désoxy-Adénosine 5’-Triphosphate
dCTP	2’ désoxy-Cytidine 5’-Triphosphate
dGTP	2’ désoxy-Guanosine 5’-Triphosphate
dNTP	désoxynucléoside Triphosphate
DO	Densité Optique
Dpm	Désintégration par minute
dTTP	2’ désoxy-Tymidine 5’-Triphosphate
EDTA	Acide éthylène Diamine Tétra-Acétique (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
FAM	5-carboxyfluorescéine
FMR1	Gène <i>Fragile X mental retardation 1</i>
FMR2	Gène <i>Fragile X mental retardation 2</i>
FMRP	Protéine <i>Fragile X mental retardation 1</i>
FRAXA	Site fragile au niveau de Xq27.3 (répétition CGG) du gène <i>FMR1</i>
FRAXE	Site fragile au niveau de Xq28 (répétition GCC) du gène <i>FMR2</i>
FXTAS	<i>Fragile X tremor ataxia syndrome</i>
FXS	Syndrome de l’X-Fragile (<i>Fragile-X Syndrome</i>)
G	Guanine
GCC	Triplet de nucléotides guanine– cytosine– cytosine
HCL	Acide chlorhydrique
HEX	6-carboxy 2',4',7', 4,7 - hexachlorofluorescéine
HNPCC	<i>Hereditary non-polyposis colorectal cancer</i>
ILS 600	<i>Internal Lane Standard 600</i>
Kb	Kilobase(s)
LINES	<i>Linear interspersed nuclear elements</i>

LTD	<i>Long term depression</i>
LTP	<i>Long term potentiation</i>
Mb	Mégabase(s)
MGlu5	<i>Metabotropic Glutamate receptor 5</i>
MMR	<i>Mismatch repair</i>
nm	Nanomètre
(P)	Groupe phosphate (PO ₄)
pb	Paire(s) de bases
PCR	Réaction en chaîne de polymérisation (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PIC	<i>Polymorphism Information Content</i>
pH	Potentiel hydrogène
PLAT	Platinum
POF	<i>Premature ovarian failure</i>
POP-7	Polymère de capillaire de silice de 7 ^e génération
PR	Primer
QI	Quotient Intellectuel
RFLP	Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (<i>restriction fragment length polymorphism</i>)
RSP	<i>Restriction Site Polymorphism</i>
RM	Retard Mental
RMLX-S	Retard Mental Lié à l'X-Syndromique
rpm	Rotation par minute
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SMM	<i>Stepwise mutation model</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SSC	Saline Sodium Citrate
SSLP	<i>Simple sequence length polymorphism</i>
SSPE	Saline-Sodium Phosphate-EDTA
STR	<i>Short tandem repeat</i>
TBE	Tris, Borate, EDTA
TE	Tampon d'éluion
TEL	ADN télomérique
TKM	Tris-Hcl Kcl Mgcl ₂
TRED	<i>Trinucleotide repeat disorders</i>
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane
Tris-HCL	Solution de Tris ajusté au HCL
UV	Ultra-Violet
V	Volt
VNTR	<i>Variable Number Tandem Repeat</i>
3' UTR	Région 3' non traduite (3' <i>untranslated region</i>)
5' UTR	Région 5' non traduite (5' <i>untranslated region</i>)

Liste des figures

Figure 1. Cinétique de réassociation et complexité du génome humain	04
Figure 2. Différents types d'ADN satellites	06
Figure 3. RFLP mettant en évidence un RSP dû à un SNP	08
Figure 4. Représentation schématique d'un SSLP	09
Figure 5. Différents types d'expansion des répétitions de trinuécléotides	11
Figure 6. Dérapage répliatif	12
Figure 7. Principe du diagnostic moléculaire des répétitions de trinuécléotides	14
Figure 8. Localisation et motif de trinuécléotides instables dans différentes pathologies	15
Figure 9. Paradoxe de Sherman	18
Figure 10. Structure fine du gène <i>FMR1</i> humain	20
Figure 11. Représentation schématique des allèles du gène <i>FMR1</i> et conditions liées	22
Figure 12. Modifications épigénétiques liées à l'expansion des répétitions CGG dans la région 5'UTR de <i>FMR1</i>	24
Figure 13. Positions des domaines fonctionnels de la protéine FMRP1	25
Figure 14. Rôle de la protéine FMRP	27
Figure 15. (a) Régulation des récepteurs mGluR par utilisation d'agents antagonistes (b) Réactivation du promoteur <i>FMR1</i> par utilisation des CRISPR/Cas9	29
Figure 16. Principe de la PCR	39
Figure 17. Principe de la PCR fluorescente	40
Figure 18. Plaque de run pour un séquenceur automatique ABI 3130	46
Figure 19. Capture d'écran pendant le séquençage	47
Figure 20. Capture d'écran à la fin du séquençage	48
Figure 21. Graphique de l'ILS 600	49
Figure 22. Principe du Southern-blot	52
Figure 23. Localisation de la sonde <i>StB-12.3</i>	53
Figure 24. Séquence de reconnaissance de la sonde <i>StB-12.3</i>	53
Figure 25. Mesure et découpage du gel	55
Figure 26. Taux de comptage de la radioactivité du gel 1	58
Figure 27. Taux de comptage de la radioactivité du gel 2	58
Figure 28. Disposition de la membrane dans la cassette	59
Figure 29. Répartition des malades selon les critères cliniques	61
Figure 30. Répartitions des malades de sexe masculin (A), de sexe féminin (B) et par rapport aux critères cliniques RM et AUT (C)	62
Figure 31. Association des différents troubles cliniques des AUT	63
Figure 32. Répartition des RM selon le score du QI	64
Figure 33. Distribution des différents signes cliniques des RM	65
Figure 34. Electrophorégramme de l'individu (18 XY PLAT 008 D02) représentant un pic unique (en bleue) correspondant à une bande normale de 290.35 pb	69

Figure 35. Electrophorégramme du patient (20AJPLAT012F02) représentant un pic unique (en bleue) correspondant à une bande de 328.36 pb	71
Figure 36. Electrophorégramme du patient (24ANPLAT003B03) représentant un pic unique (en bleue) correspondant à une bande de 343.82 pb	72
Figure 37. Electrophorégrammes des patients (49SAPLAT015H11) et (50GYMIPLAT002A12) représentant deux pics au locus FRAXA (bleue) et un pic au locus FRAXE (vert)	74
Figure 38. Pic incorrectement étiqueté de l'ILS (<i>shoulder</i>)	74
Figure 39. Electrophorégramme de la patiente (1TIPLAT006C06) ne présentant qu'un seul pic suggérant ou une homozygotie ou un allèle muté ou un allèle pré-muté	76
Figure 40. Pedigree de la famille 1	77
Figure 41. Electrophorégramme de l'individu I2 (16BASPLAT004B02)	78
Figure 42. Sib-pairs des familles 2 et 3	79
Figure 43. Trio de la famille 4	80
Figure 44. Electrophorégramme du patient (2MKCEII007D05) ne présentant pas de pic suggérant la présence d'un allèle non amplifié	81
Figure 45. a. Electrophorégramme de l'individu (1FKMLII005C05) présentant un pic suggérant la présence d'un allèle pré-muté b. Zoom de l'électrophorégramme présentant le profil électrophorétique de l'allèle pré-muté	82
Figure 46. a. Electrophorégramme de l'individu (3FKLII2009E05) présentant un pic suggérant la présence d'un allèle pré-muté b. Zoom de l'électrophorégramme présentant le profil électrophorétique de l'allèle pré-muté	83
Figure 47. Zooms des électrophorégrammes de témoins pré-muté(e)s (a, b et e), Zooms des électrophorégrammes de témoins muté(e)s (c et d)	84
Figure 48. Electrophorégrammes représentant les allèles de 297.69 et 297.57 pb au niveau du locus FRAXE	88
Figure 49. Electrophorégrammes représentant les allèles de 294.42, 294.11 et 281.3 pb au niveau du locus FRAXE	89
Figure 50. Fiche d'identification des dépôts du gel 1	90
Figure 51. Courbe de migration de l'échelle moléculaire du gel 1	91
Figure 52. RFLP révélé par double digestion (<i>EagI</i> et <i>EcoRI</i>) et hybridation à la sonde <i>StB-12.3</i> du gel 1	92
Figure 53. Fiche d'identification des dépôts du gel 2	93
Figure 54. Courbe de migration de l'échelle moléculaire du gel 2	94
Figure 55. RFLP révélé par double digestion (<i>EagI</i> et <i>EcoRI</i>) et hybridation à la sonde <i>StB-12.3</i> du gel 2	95
Figure 56. Représentation schématique de la double digestion <i>EcoRI</i> et <i>EagI</i> révélée par hybridation avec la sonde <i>StB12.3</i>	96
Figure 57. Représentation schématique des RFLPs révélés par hybridation avec la sonde <i>StB12.3</i>	97
Figure 58. Représentation schématique des profils de migration pour le calcul de la taille des répétitions pour les différents statuts de XFRA	98
Figure 59. Courbe de migration des patients et témoins	98
Figure 60. Pedigree de la famille 4 représentant le statut de vectrices non atteintes pour les individus I1 et I2, et le statut de porteur de mutations complètes pour le patient III	101
Figure 61. Distribution des différentes formes alléliques sur les 66 loci FRAXA	105

Figure 62. Distribution des différentes formes alléliques sur les 66 loci FRAXE	108
Figure 63. Diagramme de dispersion des variants FRAXA (♀)	110
Figure 64. Diagramme de dispersion des variants FRAXE (♀)	110

Liste des tableaux

Tableau 1. Séquences d'ADN extra-géniques répétées	07
Tableau 2. Echantillonnage complet de l'étude	33
Tableau 3. Amorces FRAXA et FRAXE	41
Tableau 4. Mélange réactionnel de l'amplification	42
Tableau 5. Conditions de la migration capillaire	44
Tableau 6. Fiche technique des gels	60
Tableau 7. Résultat du génotypage du locus <i>FMR1</i> effectué sur les 60 individus	66
Tableau 8. Taille en pb du fragment amplifié du patient (18 XY PLAT008D02)	70
Tableau 9. Taille de la bande amplifiée du patient (20AJPLAT012F02)	71
Tableau 10. Taille de la bande amplifiée du patient (24ANPLAT003B03)	73
Tableau 11. Taille de la bande amplifiée de la patiente (1TIPLAT006C06)	76
Tableau 12. Taille des différentes bandes amplifiées de l'individu I2 (16BASPLAT004B02)	79
Tableau 13. Taille des différentes bandes amplifiées du patient (2MKCEII1007D05)	81
Tableau 14. Résultat du génotypage du locus <i>FMR2</i> effectué sur les 60 individus	85
Tableau 15. Distance de migration de l'échelle moléculaire du gel 1	91
Tableau 16. Distance de migration de l'échelle moléculaire du gel 2	94
Tableau 17. Echantillonnage de la distribution des répétitions	102
Tableau 18. Variants alléliques du locus FRAXA	103
Tableau 19. Variants alléliques du locus FRAXE	107

INTRODUCTION GENERALE

Les développements récents dans le domaine de la génétique moléculaire humaine ont eu pour conséquence une compréhension de plus en plus précise des pathologies à étiologie génétique. Contrairement aux idées reçues, beaucoup de maladies génétiques, loin d'être rares, représentent en fait une cause significative de maladie et de mortalité (Rodwell et Aymé. 2014). Des pathologies qui, prises individuellement apparaissent rares, sont d'une manière globale une cause majeure de mortalité et de morbidité. Environ 3 % de toutes les grossesses aboutissent à la naissance d'un enfant ayant une maladie génétique significative ou une anomalie congénitale responsable d'un handicap, de retard mental ou de mort précoce (Gelehrter et Collins. 1992).

Le retard mental (RM) est la cause la plus fréquente de handicap grave chez les enfants et les jeunes adultes et constitue un problème majeur du point de vue social et médical. 0.3 – 0.5 % de la population mondiale est affectée par des formes de RM de grave à profond et cette fréquence peut atteindre 1-1.5 % si on considère les formes modérées de RM (Chelly et al., 2006). Les causes de RM sont très variables et peuvent être de nature environnementale ou génétique ou bien une combinaison des deux. Parmi les 1000 différentes maladies héréditaires que l'on trouve associées au RM, 20 % environ montrent une ségrégation liée au chromosome X. Les RM liés au chromosome X syndromique (RMLX-S) intéressent 1 garçon sur 700 environ, soit autant que la trisomie 21 (Ropers et Hamel. 2005).

Le syndrome de l'X fragile (FXS) est le premier RMLX à avoir été identifié et expliqué génétiquement. Il constitue la cause la plus importante de RMLX-S. A lui seul, il explique 2 à 3 % des retards mentaux chez les hommes et 1 % chez les femmes (Chiurazzi et al., 2007). FXS est également la principale cause de l'autisme identifié à ce jour. Entre 2 et 6 % des enfants atteints d'autisme ont FXS, et environ 3 % des enfants atteints de FXS ont l'autisme (Belmonte et Bourgeron, 2006). L'élucidation de la base moléculaire du syndrome de l'X fragile au locus FRAXA, a mis en évidence une nouvelle classe de mutations à transmission atypique, les mutations dynamiques. Ces mutations sont le résultat d'une instabilité de l'ADN au niveau de l'ADN microsatellite, séquences hautement répétées au niveau du génome humain (Fu et al., 1991).

Le but de notre recherche est d'apporter notre contribution pour l'établissement d'un diagnostic moléculaire chez des patients souffrant de retard mental (RM) et de patients autistes (AUT) recrutés à Annaba. Pour cela, le génotypage du locus FRAXA a été réalisé, en

parallèle avec celui du locus FRAXE, région chromosomique responsable d'un autre syndrome de retard mental lié à l'X non syndromique (Ropers et al., 2005).

Dans cette tentative de dépistage des RMLX, une amplification de l'ADN par PCR fluorescente suivit par l'analyse de fragments sur séquenceur capillaire a été réalisé, selon les profils obtenus, un Southern blot a été effectué pour compléter l'analyse moléculaire.

L'objectif de cette étude, en établissant un diagnostic moléculaire précis, est de fournir une prise en charge appropriée pour les patients, suivis par l'instauration du conseil génétique aux familles à risque. Le véritable défi de cette étude était de recueillir une plus grande quantité d'échantillons du fait de l'absence d'une prise de conscience effective des cliniciens algériens sur le syndrome du X fragile en tant que cause de retard mental.

A notre connaissance, ce travail de génotypage de microsatellites pour la recherche éventuelle de mutation dynamique sur le gène *FMR1* n'a jamais été entrepris en Algérie, d'où l'émergence d'une distribution particulière, représentée par des variants à des fréquences alléliques propres à notre échantillon d'étude.

Ce manuscrit s'organise principalement autour de deux grands axes. Le premier axe correspond à une étude bibliographique qui comprend deux chapitres, chaque chapitre s'ouvre sur un énoncé introductif des différents points qui y sont abordés. Le deuxième axe présente la méthodologie, les résultats et leur interprétation, propres à notre travail de recherche

Le chapitre I est un chapitre d'introduction de la génomique structurale humaine. Il permet de poser les fondements nécessaires à la compréhension de la démarche scientifique sur laquelle s'appuie toute l'étude. Nous présentons à cette occasion les séquences et motifs d'ADN qui constituent la complexité du génome des eucaryotes en général et du génome humain en particulier, en insistant sur les séquences extragéniques répétées. En particulier l'accent est mis sur les microsatellites, leur instabilité et les mécanismes qui les rendent si instables, ce qui constitue la problématique principale de cette thèse.

Le chapitre II est consacré au syndrome de l'X-Fragile, allant de l'aspect phénotypique jusqu'à l'aspect physiopathologique. Nous déroulons également toutes les notions nouvelles qui ont émergés de l'analyse moléculaire de cette pathologie. Ce chapitre se termine sur le défi que pose parallèlement toute la complexité intrinsèque aux données auxquelles on s'intéresse notamment le diagnostic différentiel.

Introduction générale

La suite du manuscrit détaille plus spécifiquement le travail de recherche réalisé à l'occasion de cette thèse. Ce deuxième grand axe réunit l'ensemble du travail réalisé sur notre échantillonnage, où nous mettons en valeur les différentes étapes méthodologiques adoptées au cours de notre travail de recherche. Il décrit également l'élément qui constitue pour nous le développement méthodologique le plus important réalisé durant cette thèse : le génotypage construit à partir du logiciel GeneMapper. Ce chapitre traitant d'aspects assez variés s'achève sur une synthèse qui permet de replacer nos résultats dans le contexte actuel.

Il est suivi d'une discussion qui reprend naturellement l'ensemble des points développés dans cette thèse concernant l'apport de la Biologie Moléculaire à grande échelle en Génétique Humaine et comment cet apport doit s'intégrer dans une démarche plus générale d'acquisition de connaissances permettant d'élucider les mécanismes moléculaires à l'origine des maladies à amplification de triplet.

Ce manuscrit s'achève par une conclusion à plusieurs objectifs tels que le conseil génétique et la thérapie génique, mais également sur différentes perspectives scientifiques quant à l'analyse à l'échelle moléculaire de pathologies à étiologie génétique.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I. COMPLEXITE ET ORGANISATION DU GENOME HUMAIN

INTRODUCTION

Par définition un génome est complexe lorsque les séquences d'ADN, dont il n'existe qu'une copie par génome, constituent une fraction minime de l'ADN, par exemple le gène de la β -globine représente seulement 0.00005% de l'ADN génomique humain (Strachan et Read 2012). La complexité du génome humain est mise en évidence par des expériences de cinétique de réassociation. La vitesse de réassociation de telles séquences est relativement lente. Au contraire, certaines autres séquences hautement répétées dans l'ADN génomique ont une concentration beaucoup plus élevée et une vitesse de réassociation comparativement plus rapide. Le paramètre qui contrôle cette réassociation est le produit de la concentration initiale d'ADN monocaténaire par le temps d'incubation \Rightarrow Cot.

Le $Cot_{1/2}$ est le produit de la concentration initiale d'ADN monocaténaire et du temps d'incubation pour obtenir 50 % de réassociation.

Pour une concentration donnée, si le $Cot_{1/2}$ est élevé la réassociation est lente donc le nombre de séquences différentes est élevé. Au contraire, si le $Cot_{1/2}$ est faible, la réassociation est d'autant plus aisée que le nombre de séquences différentes est bas.

Avec l'ADN des procaryotes, la cinétique de réassociation forme une sigmoïde presque parfaite, alors que pour l'ADN humain, elle est sous forme d'une courbe complexe représentée par la superposition de trois sigmoïdes (Strachan et Read 2012). (Figure 1)

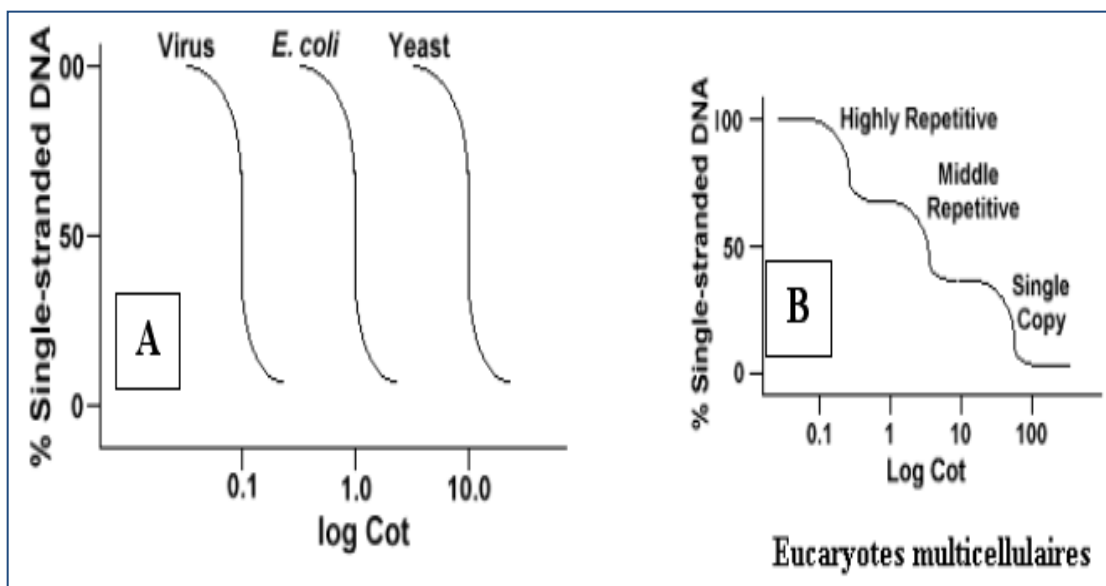


Figure 1. Cinétique de réassociation et complexité du génome humain

Cette expérience permet de mettre en évidence l'existence de trois types d'ADN :

→ **ADN hautement répété** : se réassociant quasi-immédiatement ($Cot < 0.01$) correspond à de l'ADN présent en un très grand nombre.

→ **ADN moyennement répété** : se réassociant plus lentement ($0.01 < Cot < 10$) correspond à de l'ADN présent en un nombre plus restreint de copies.

→ **ADN à copie unique** : se réassociant très lentement ($10 < Cot < 10^4$) correspond à de l'ADN à séquence unique.

I.1- Les séquences géniques

Elles sont le plus souvent à copie unique ou en faible quantité sauf pour les gènes codants pour les histones. Cet ADN code toujours pour des chaînes polypeptidiques.

Du point de vue structural, un gène peut être subdivisé en sections pouvant être transcrites (unité de transcription) et en séquences de régulation. Les séquences régulatrices sont situées non seulement en amont mais aussi en aval du gène.

Le premier et le dernier exon contiennent généralement des séquences qui ne sont pas traduites. Il s'agit de la région 5' non traduite (5' UTR) pour *untranslated region* de l'exon 1 et de la région 3' UTR à l'extrémité 3' du dernier exon (Strachan et Read 2012).

I.2- Les séquences extra-géniques répétées

Lorsque de l'ADN humain fractionné est centrifugé dans un gradient de densité de chlorure de césium, la principale portion de l'ADN (Euchromatine) forme une bande de forte densité : 1.701 g/cm^3 .

Trois bandes supplémentaires (satellites) apparaissent aux densités 1.687, 1.693 et 1.697 g/cm^3 . Elles sont moins denses en raison de leur pauvreté en CG par rapport à la bande principale. (Figure 2)

Ces séquences correspondent à de l'ADN non codant d'où le nom d'ADN extra-géniques répétées. Selon leur taille, leur degré de répétition et leur structure, ces séquences d'ADN sont subdivisées en trois catégories : ADN satellites « classiques », ADN minisatellites et ADN microsatellites (Hardman. 1986).

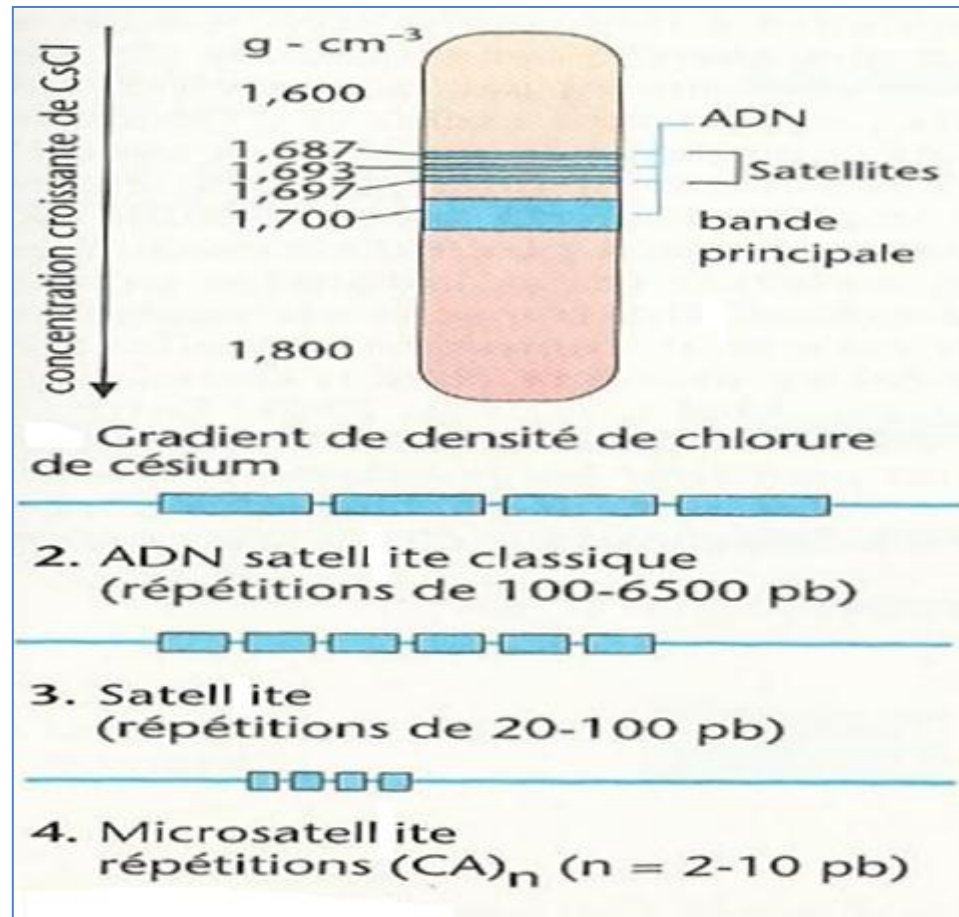


Figure 2. Différents types d'ADN satellites

I.2.1- L'ADN satellite classique

Cet ADN hautement répétitif correspond à de l'hétérochromatine constitutive, il n'est pas codant et représente 20 à 30% du génome humain. Les séquences qui constituent ces satellites sont de grande taille (100 à 200 pb), organisées en tandem, elles ne sont pas dispersées dans le génome, mais localisées en certains points particuliers. Il en existe deux types : les séquences centromériques (CEN) et les séquences télomériques (TEL). Chez l'Homme et les primates, les séquences centromériques constituent la famille de l' α -satellite qui correspond à la répétition en tandem d'une séquence de 171 pb. Ces répétitions ont une longueur qui varie entre 300 Kb (Y) à $5 \cdot 10^3$ Kb (Ahmad et Henikoff, 2001). Les séquences télomériques situées aux deux extrémités chromosomiques, sont constituées de motifs hautement répétés, riches en G, très conservés (TTAGGG). Elles ont un rôle très important dans la préservation de l'entité chromosomique en empêchant leur dégradation ou leur raccourcissement jusqu'à une longueur critique qui conduirait à l'entrée de la cellule en sénescence (Blackburn, 2001).

I.2.2- L'ADN minisatellite

Il existe dans le génome humain en dehors de l'hétérochromatine constitutive, des séquences de 9 à 64 pb hautement répétées en tandem mais dispersées au niveau de différents points du génome (Singer et Berg 1992). Il s'agit de minisatellites hypervariables car très polymorphes dans leur degré de répétitions, les VNTR pour *Variable Number Tandem Repeat*.

I.2.3- L'ADN microsatellite

Ce deuxième type d'ADN hautement répétitif et qui correspond aussi à de l'hétérochromatine constitutive est largement prioritaire. Ces séquences sont composées de motifs constitués de courtes séquences (2 à 4 pb) disposés en tandem. Ces séquences sont répétées de très nombreuses fois. (Tableau 1)

Tableau 1. Séquences d'ADN extra-géniques répétées

Classe d'ADN Type de répétition dans le génome	Taille de l'unité de répétition (pb)	Nombre total de répétition	Localisation chromosomique
ADN hautement répété :			
*ADN satellite :			Hétérochromatine :
Séquence simple	5 →25	?	1q-9q-16q et Yq
Séquence α	171	8 10 ⁵	Centromère
Séquence β	68	5 10 ⁴	Hétérochromatine :
Télomérique	6	2-3 10 ⁴	9-13-14-15-21 et 22
			Télomères
*ADN mini satellite :			
Hypervariable (VNTR)	9→64	3 10 ⁴	Tous les chromosomes
*ADN micro satellite :			
-(A)n/(T)n	1	10 ⁷	Tous les chromosomes
-(CA)n/(GT)n	2	7 10 ⁶	Tous les chromosomes
-(CGG)n/(GCC)n	3	3 10 ⁶	Tous les chromosomes

I.3- Polymorphisme des séquences extra-géniques répétées

Le polymorphisme génétique est l'existence de variants, que ce soit au niveau du locus d'un gène (allèles), d'une structure chromosomique (par exemple, taille de l'hétérochromatine centromérique), du produit d'un gène (variants présentant des activités enzymatiques ou des affinités de liaison différentes) ou d'un phénotype.

Le terme « polymorphisme de l'ADN » fait référence à un grand éventail de variations dans une séquence nucléique, à la longueur des répétitions de nucléotides ou à la variation d'un seul nucléotide. Les polymorphismes de l'ADN sont utiles en tant que marqueurs génétiques, permettant d'identifier et de distinguer les allèles à un locus donné et de déterminer leur origine parentale (Hartl et Clark. 2007).

I.3.1- Polymorphisme au niveau d'un seul nucléotide (SNP)

Les SNPs pour *single nucleotide polymorphism* sont des variants alléliques qui diffèrent au niveau d'un seul nucléotide, à une position spécifique. Au moins 1base/1000 diffère entre chaque individu (Roy-Engel et al., 2001). Un SNP peut être visualisé en Southern blot (Figure 3) sous la forme d'un polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) si la différence dans les deux allèles correspond à une différence dans le site de reconnaissance d'une enzyme de restriction, polymorphisme de site de restriction (RSP pour *restriction site polymorphism*).

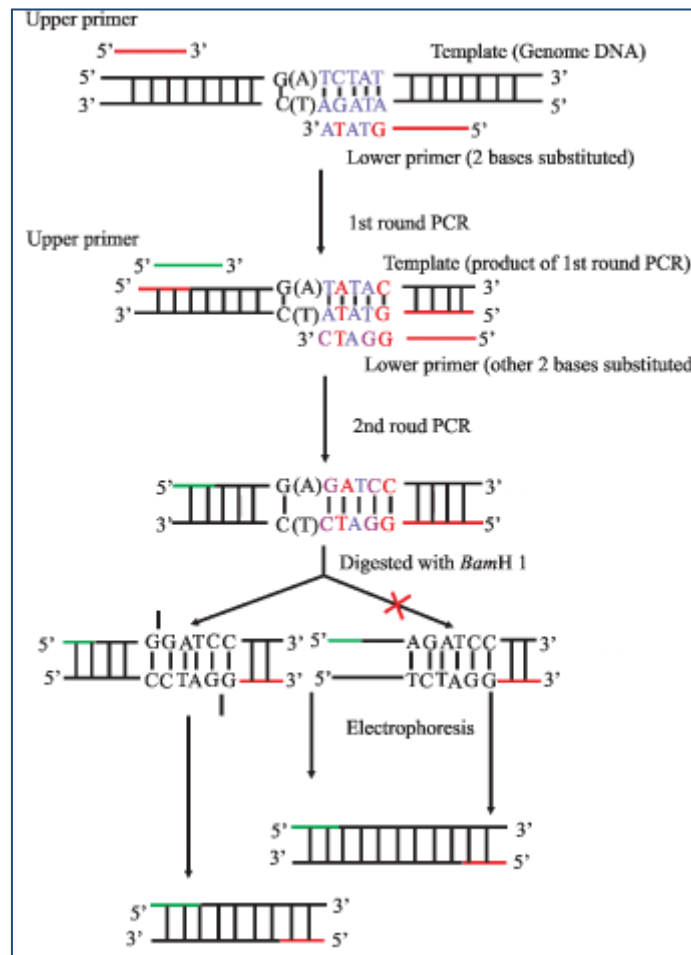


Figure 3. RFLP mettant en évidence un RSP dû à un SNP

I.3.1- Polymorphisme de longueur d'une séquence (SSLP)

Les SSLPs pour *simple sequence length polymorphism* sont des variants alléliques qui diffèrent en ce qui concerne le nombre de répétitions en tandem de courtes séquences nucléotidiques présentes dans l'ADN non codant (Roy-Engel et al., 2001).

Les courts tandems répétés (STR, pour *short tandem repeat*) consistent en unités de 1, 2, 3 ou 4 paires de bases répétées de 3 à environ 10 fois. Les courts tandems répétés les plus typiques sont des répétitions de (CA) sur le brin 5' → 3', chaque allèle étant défini par le nombre de répétitions (CA). Les différences de taille dues au nombre de répétitions sont révélées par la réaction en chaîne de polymérisation (PCR pour *Polymerase chain reaction*) suivie d'une électrophorèse sur gel d'agarose. (Figure 4)

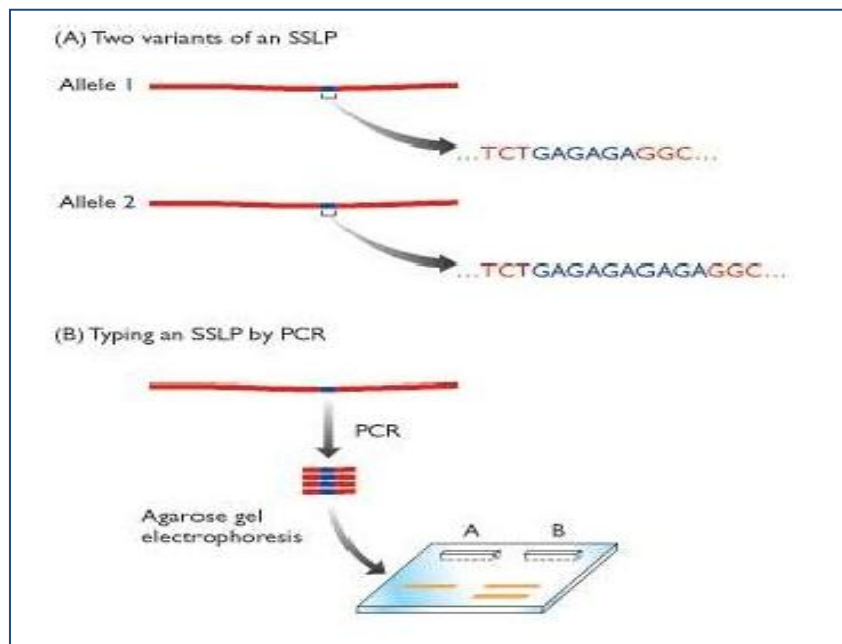


Figure 4. Représentation schématique d'un SSLP

I.4- Les mutations atypiques du génome humain

Lorsque I. H. Morgan, à découvert en 1910 que des changements (mutations) survenaient spontanément dans les gènes, les mutations sont entrées au cœur des études de la génétique.

En effet, l'ADN subit en permanence des lésions : plusieurs dizaines de milliers de lésions surviennent ainsi en moyenne par cellule et par jour. Des mécanismes de réparation efficaces permettent de réparer ces lésions, afin de maintenir l'intégrité du génome. Lorsque la variation touche la molécule à l'échelle chromosomique la mutation est dite mutation chromosomique, lorsque la variation touche la molécule à l'échelle nucléotidique (un ou

quelques nucléotides) la mutation est dite mutation ponctuelle, ces mutations suivent généralement un modèle de transmission classique.

Le génome humain contient des répétitions de trinuécléotides en tandem. Normalement, on les trouve en groupes de 5 à 35 répétitions. Quand leur nombre excède un certain seuil et quand ils sont situés à l'intérieur ou à proximité d'un gène, ils provoquent des maladies. Une fois que la longueur normale, variable, a été dépassée, les répétitions en surnombre tendent à augmenter encore dans la lignée germinale ou au cours des mitoses. Les expansions de trinuécléotides forment donc une classe de mutations instables, à ce jour observées uniquement chez les êtres humains (Pearson et al., 2005)

I.4.1- Les mutations instables ou dynamiques

Des modifications dans le nombre de groupes répétés de trois nucléotides chacun (répétitions de trinuécléotides ou de triplets) qui peuvent être héritées constituent une nouvelle classe de mutations chez l'homme. Pour l'instant, il n'a pas été identifié de mutation comparable dans d'autres organismes (Bacolla et al., 2008) . Ces répétitions se produisent soit dans un gène, et sont alors traduites, soit hors d'un gène, dans une région non traduite, et sont instables au cours de la transmission d'une génération à la suivante, dans la lignée germinale (Mirkin, 2006). Les personnes non atteintes peuvent porter une prémutation, qui peut être convertie en une mutation à part entière chez la génération suivante en passant par la lignée germinale. Les effets des mutations diffèrent donc dans leur sévérité chez les membres atteints à l'intérieur d'une même famille. Occasionnellement, une régression survient et une génération est épargnée.

I.4.2- Différents types de répétitions de trinuécléotides et leur expansion

Les répétitions de trinuécléotides peuvent être distinguées en fonction de leur localisation par rapport à un gène. Les expansions sont plus importantes en dehors des gènes et plus modérées à l'intérieur des régions codantes (Figure 5). Dans plusieurs maladies neurologiques sévères, les répétitions de CAG anormalement étendues font partie du gène. Les répétitions de CAG codent une série de glutamines (séquence poly-glutamine). Quand le nombre de répétitions normal n'est pas dépassé « ce nombre varie en fonction du gène impliqué » le gène fonctionne normalement. En revanche, une augmentation du nombre de répétitions a pour conséquence un produit du gène anormal ayant des fonctions altérées (An et al., 2014). Des répétitions de trinuécléotides se produisent également dans les régions non codantes d'un gène. Les types les

plus communs sont les répétitions de CCG et de GCC. L'augmentation du nombre de ces répétitions peut être drastique, jusqu'à 1000 ou plus répétitions. Les premières étapes de l'expansion ne sont généralement pas associées aux signes cliniques d'une maladie, mais elles prédisposent à une augmentation de l'expansion des répétitions dans la descendance du porteur, prémutation (Adams et al., 2008).

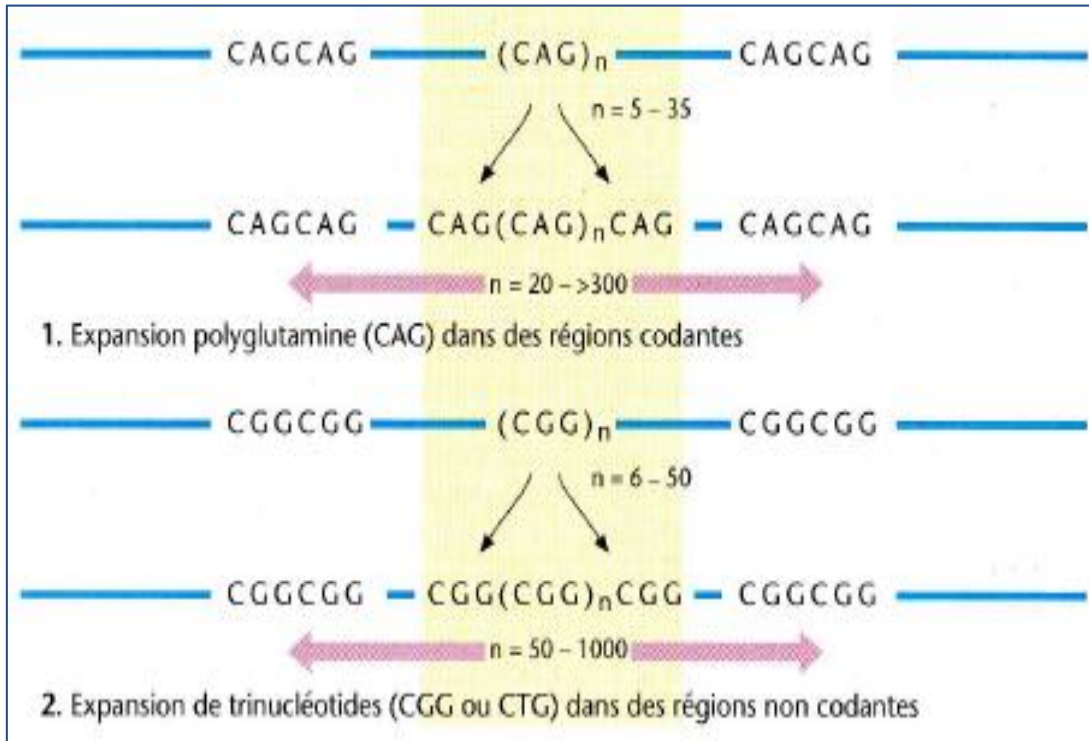


Figure 5. Différents types d'expansion des répétitions de trinuéotides

I.4.3- Origine des mutations dynamiques

Cette classe de mutation n'est pas causée par l'altération d'un seul nucléotide, mais par l'alignement incorrect de séquences alléliques ou non alléliques au cours de la réplication.

Quand le brin matrice contient une courte séquence d'ADN répété comme dans les microsatellites, le brin néoformé et le brin matrice peuvent glisser l'un par rapport à l'autre.

À la suite d'un dérapage répliatif ou de la polymérase, conduisant à un appariement incorrect des répétitions, des séquences répétées peuvent être copiées deux fois ou, au contraire, ne pas être copiées, en fonction de la direction du dérapage (Admiral et al., 2006). On peut distinguer le dérapage vers l'avant et le dérapage vers l'arrière du brin néoformé. Si le brin d'ADN néoformé se décale vers l'avant, une région non appariée demeure dans le brin d'origine. Il en résulte donc une insertion. Au contraire, un décalage du brin néoformé vers l'arrière résulte en une délétion (Freudenreich et Lahiri, 2004).

L'instabilité des microsatellites est une caractéristique du cancer héréditaire non polyposique du côlon (HNPCC, pour *hereditary nonpolyposis cancer of the colon*). Les gènes impliqués dans le HNPCC sont localisés sur les chromosomes humains en 2p15-22 et 3p21.3. Environ 15 % des carcinomes colorectaux, gastriques et endométriaux présentent une instabilité des microsatellites (Sammalkorpi et al., 2007).

Le dérapage réplcatif doit être distingué du crossing-over inégal qui survient au cours d'une méiose. Il s'agit dans ce cas du résultat de la recombinaison entre des séquences adjacentes, mais non alléliques, portées par des chromatides non-sœurs de chromosomes homologues.

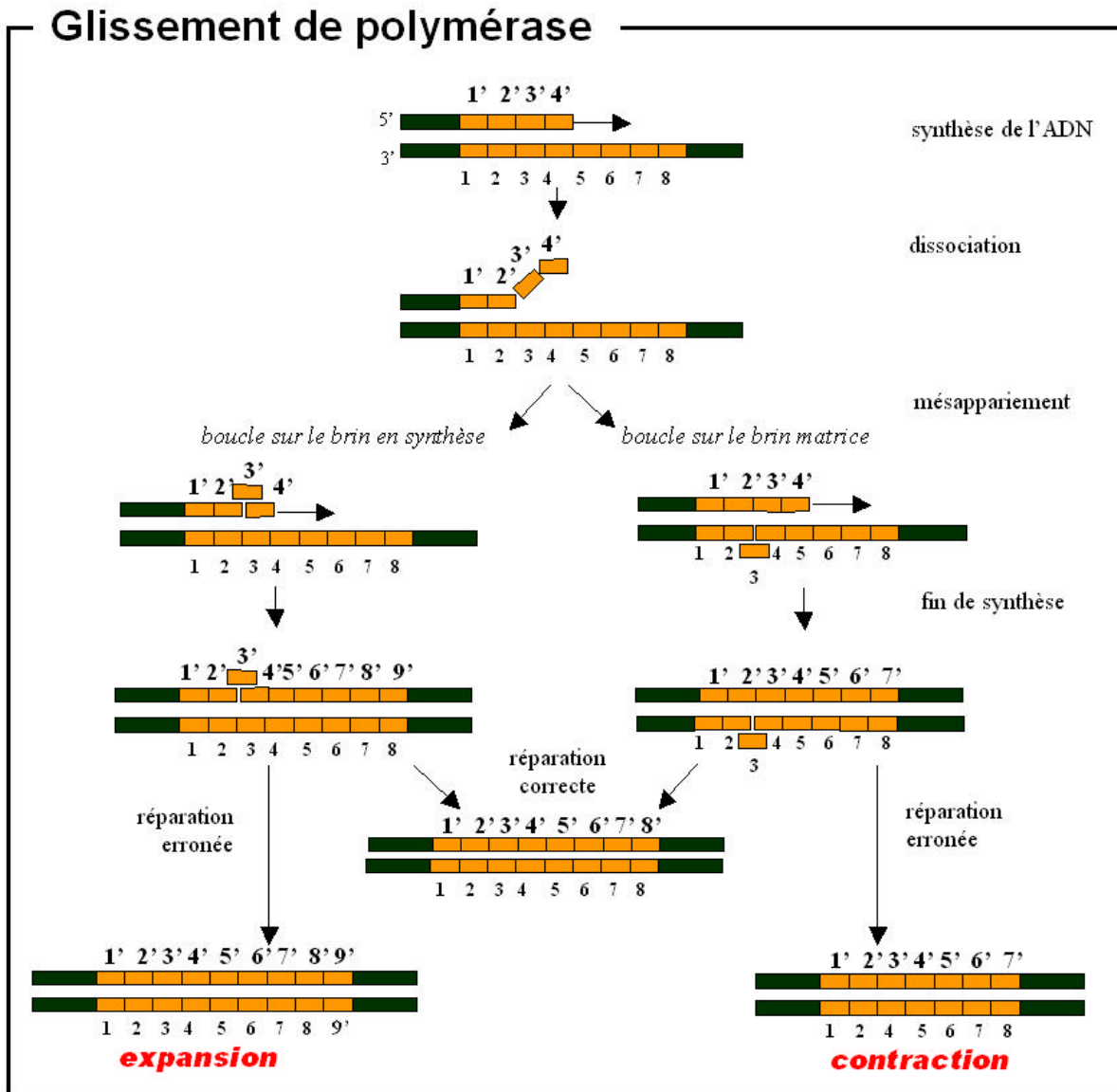


Figure 6. Dérapage réplcatif

CHAPITRE II. GENETIQUE MOLECULAIRE DU SYNDROME DE L'X-FRAGILE

INTRODUCTION

Le diagnostic d'une maladie génétique nécessite une approche systématique qui prenne en compte à la fois les données cliniques et génétiques. Alors que la médecine clinique cherche à classer les maladies selon le système organique touché, l'âge de survenue de la maladie, le genre du patient, ou la méthode de détection principale (radiologie, imagerie médicale), la génétique humaine se concentre sur la cause à l'échelle moléculaire, donc le ou les gène(s) atteint(s) par une modification génétiquement significative (Read et Donnai, 2009). Le diagnostic génétique est basé sur une analyse interdisciplinaire de toutes les données cliniques et biologiques d'un point de vue génétique. Le point de départ est le phénotype, c'est-à-dire l'ensemble des manifestations cliniques, y compris les antécédents médicaux de l'individu et de sa famille (Feinberg, 2007). Le généticien va tout d'abord devoir définir si le patient présente un ensemble significatif de symptômes.

Les outils qui peuvent l'aider dans cette prise de décision sont la bibliographie appropriée, les outils de recherche en ligne tels que : OMIM: pour *On-line Mendelian Inheritance in Man*, PubMed: pour *Public Access to Medline*, POSSUM: pour *Pictures of Standard Syndromes and Undiagnosed Malformations* et LMD pour *London Dysmorphology Data Base for congenital malformations* et enfin les banques de données cytogénétiques.

Si les caractéristiques d'une pathologie sont identifiées, il est nécessaire de définir la catégorie du syndrome. Bien que difficile à établir en pratique, la catégorie pathologique doit être identifiée pour mener à bien les prochaines étapes suivantes. Ainsi, on doit définir si la pathologie est monogénique ou multigénique. Un phénotype donné peut être causé par des mutations à différents loci (hétérogénéité de locus) ou par différents allèles mutants au même locus (hétérogénéité allélique).

Toutes les démarches de diagnostics génétiques devraient être précédées d'un conseil génétique, qui, doit inclure l'obtention du consentement (éclairé) des personnes concernées (Pembrey et al., 2001).

II.1- Principe du diagnostic moléculaire des répétitions de trinuécléotides

Le diagnostic moléculaire consiste à comparer les tailles des répétitions de trinuécléotides dans les deux allèles du gène étudié (Figure 7). On peut distinguer les très

CHAPITRE II. GENETIQUE MOLECULAIRE DU SYNDROME DE L'X FRAGILE

grandes expansions de répétitions qui surviennent en dehors des séquences codantes, 50 à plus de 1000 répétitions et les expansions modérées à l'intérieur des séquences codantes, 20 à 100-200 répétitions (Cummings et Zoghbi, 2000).

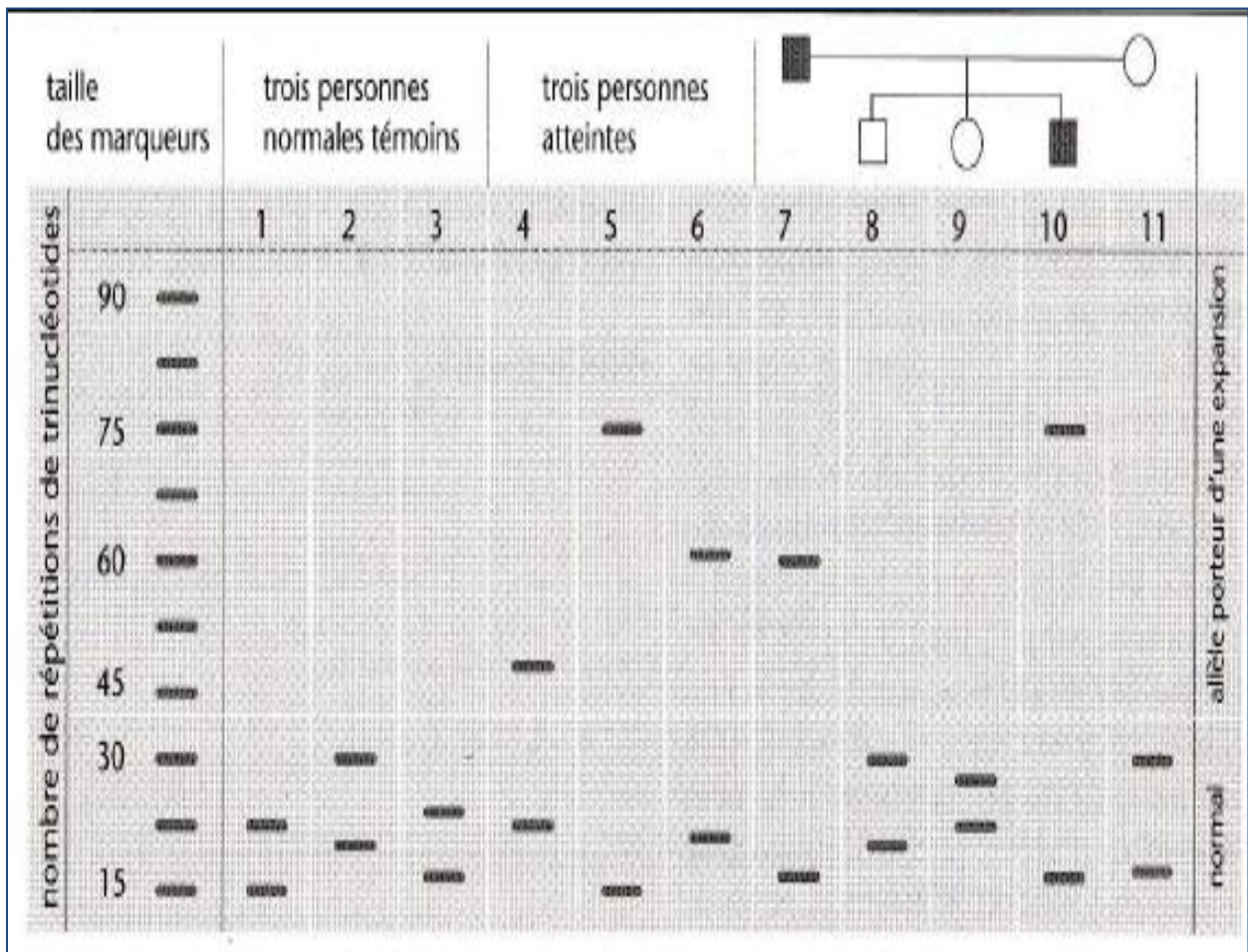


Figure 7. Principe du diagnostic moléculaire des répétitions de trinucleotides

Dans la figure ci-contre sont représentés 11 puits, chacun correspondant à un individu. Des témoins normaux (puits 1 à 3) ; des patients témoins, dont la pathologie est confirmée (4 à 6) ; et une famille avec un père atteint (puits 7), un fils atteint (puits 10), une mère non atteinte (puits 11) et deux enfants non atteints : un fils (puits 8) et une fille (puits 9). Les répétitions du locus amplifiées par PCR sont représentées par une bande de taille définie. Les deux allèles de chaque individu sont visibles. Chez les personnes atteintes, une bande représentant l'un des deux allèles est située au-delà du seuil, dans la partie du gel correspondant à l'expansion (en pratique, les bandes sont légèrement floues car la taille exacte des répétitions varie entre les différentes cellules).

II.2- Les pathologies à répétitions de trinucléotides

Les pathologies dues aux expansions de répétitions de trinucleotides (TRED pour *Trinucleotide repeat disorders*) peuvent être distinguées par plusieurs paramètres tels que : le type de répétitions, la séquence des trois nucléotides, leur localisation par rapport au gène impliqué et leurs caractéristiques phénotypiques. Toutes impliquent le système nerveux central ou périphérique (Hagerman, 2006 ; Lutz 2007). (Figure 8)

Les pathologies liées aux trinucleotides de type I sont caractérisées par une expansion de trinucleotides CAG à l'intérieur de la région codante de différents gènes. Le triplet CAG code la glutamine. Au stade de la maladie, le nombre de glutamines est considérablement augmenté dans la protéine impliquée, d'où leur nom de maladies des polyglutamines.

Les pathologies de type II sont caractérisées par des expansions de CTG, GAA, GCC ou CGG à l'intérieur de régions non codantes du gène impliqué : soit à l'extrémité 5' (GCC) dans le syndrome de l'X fragile de type A, FRAXA ; à l'extrémité 3' (CGG) dans le FRAXE et (CTG) dans la dystrophie myotonique, ou dans un intron (GAA dans l'ataxie de Friedreich).

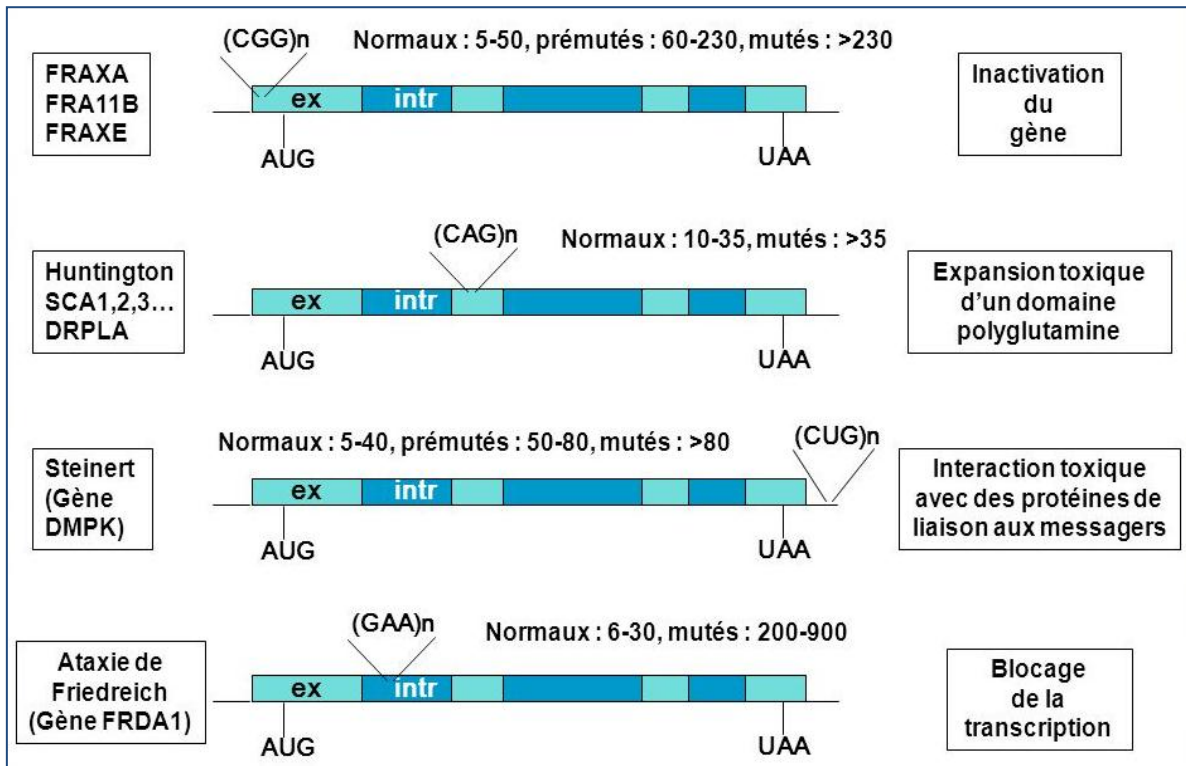


Figure 8. Localisation et motif de trinucleotides instables dans différentes TRED

II.3- Le syndrome de l'X-Fragile (XFS)

Le syndrome de l'X-Fragile (309550); (autres dénominations : syndrome X-fra, retard mental lié au chromosome X avec site fragile sur le chromosome X, syndrome de Martin-Bell) est la forme la plus fréquente de retard mental héréditaire, chez le sexe masculin. Il touche environ un garçon sur 2000 à 4000 (Moore et al., 2004 ; Rifé et al., 2003). La plupart du temps, la mutation responsable consiste en une amplification instable du nombre de triplets nucléotidiques.

Contrairement à la transmission classique liée au chromosome X, certains individus masculins porteurs de la mutation ne présentent pas de manifestations cliniques, et une proportion importante des femmes conductrices exprime partiellement la pathologie (Nolin et al., 2003).

II.3.1- Aspect phénotypique du syndrome de l'X-Fragile

Le phénotype est très variable. Le retard mental est plus ou moins prononcé (Ahuja et al., 2005). Aucune anomalie neurologique marquée n'a été retrouvée. Les individus malades sont généralement bien intégrés dans leur famille et peuvent apprendre à évoluer dans un environnement familial (Crawford et al., 1999).

II.3.1.1- Manifestations cliniques

****Les troubles cognitifs :***

La sévérité du retard mental associé au syndrome de l'X-fragile varie d'un individu à l'autre mais également selon le sexe. La plupart des patients masculins souffrent d'un retard mental modéré et possèdent un QI situé autour de 50. Cependant, certains patients présentent un retard mental profond, alors que pour 10 à 15%, le retard mental est au contraire qualifié de léger (Crawford et al., 2001). La sévérité du retard mental est globalement moindre chez les femmes : 30 à 50% des patientes souffrent d'un retard mental léger, et les 50 à 70% restant présentent un QI considéré comme limite, puisque compris entre 70 et 85 (Chelly et al., 2006). Dans la majorité des cas, la déficience intellectuelle apparaît précocement, et peut être détectée dès l'âge de 3 ans à l'aide de tests appropriés. La richesse du vocabulaire et les capacités de mémorisation sont en général meilleures que ne le laisserait prévoir le résultat du QI (Chelly et Mandel, 2001).

****Les troubles comportementaux :***

Les troubles comportementaux sont généralement marqués chez les patients atteints du syndrome de l'X-fragile et constituent de ce fait un critère diagnostique majeur (Martin et Bell, 1943). 80 à 90% des jeunes garçons atteints sont hyperactifs, impulsifs et présentent des bouffées d'agressivité en cas de stress. La plupart développent également des tics et des stéréotypies motrices, consistant par exemple à agiter et à mordre leurs mains ou à mâchonner leurs vêtements. Ces manifestations pourraient être une réponse au sentiment d'anxiété qui les habite. Cette angoisse se traduit également par une faible capacité d'adaptation et par une inquiétude face au changement (Hagerman, 2002 ; Cornish et al., 2004; 2008).

Le tableau clinique se précise ensuite progressivement au cours des années et comporte (De Caro et al., 2008 ; Kleefstra et Hamel, 2005 ; Aziz et al., 2003):

- une dysmorphie faciale, visible dans environ 64% des cas. Les patients peuvent présenter un visage allongé, un front haut, de grandes oreilles proéminentes, des lèvres minces, et/ou une mâchoire prognathe avec un palais étroit. Enfin, le périmètre crânien est souvent supérieur à la moyenne, notamment à la naissance.

- une atteinte des tissus conjonctifs, qui se manifeste par une hyperlaxité ligamentaire chez 67% des patients. Cette grande souplesse articulaire est notamment repérable au niveau des articulations méta-carpo-phalangiennes chez les enfants de moins de onze ans.

Cette atteinte pourrait par ailleurs expliquer le prolapsus de la valve mitrale observé chez 35% des patients (Coffey et al., 2008).

- une macrorchidie chez 70% des garçons après la puberté. Ce symptôme, défini par un volume testiculaire supérieur à 30 ml, est, historiquement, le premier à avoir été associé au syndrome de l'X fragile et a permis son rattachement au groupe des RMLX-S (Martin et Bell, 1943). Il serait provoqué par des œdèmes ou par une augmentation de la masse du tissu interstitiel.

- des problèmes orthopédiques affectant 21% des patients, associant affaissement de la voûte plantaire et scoliose.

- des otites moyennes à répétition chez 85% des patients (Hagerman et al., 2001).

- des crises épileptiques chez 22% des patients.

II.3.1.2-Prévalence et mode de transmission

Compte tenu de la variabilité des symptômes, l'estimation de la prévalence du syndrome de l'X fragile est délicate et souvent variable d'une étude à l'autre (Mandel et Chelly, 2004). Ces séquences instables ont un mode de transmission particulier (Dobyns et al., 2004). C'est en analysant la transmission du syndrome de l'X fragile dans plusieurs familles qu'en 1985 Sherman a établi l'hypothèse du mode particulier de mutagenèse à l'origine du syndrome (Sherman et al., 1985). Sherman estima que la pénétrance du syndrome était de l'ordre de 80% chez les hommes et donc que 20% des individus porteurs de la mutation étaient asymptomatiques. Elle constata également que les filles de ces porteurs sains avaient un risque de transmettre le syndrome à leur descendance plus élevé que celui de leur grand-mère, ou encore, que les petits-fils de ces porteurs sains étaient fréquemment atteints et leurs arrière petits-fils encore davantage. Afin d'expliquer ces observations, connues sous le nom de "paradoxe de Sherman" (Figure 9), elle postula alors qu'il puisse exister une prémutation sans effet phénotypique susceptible d'évoluer vers une mutation complète lorsque transmise par la mère.

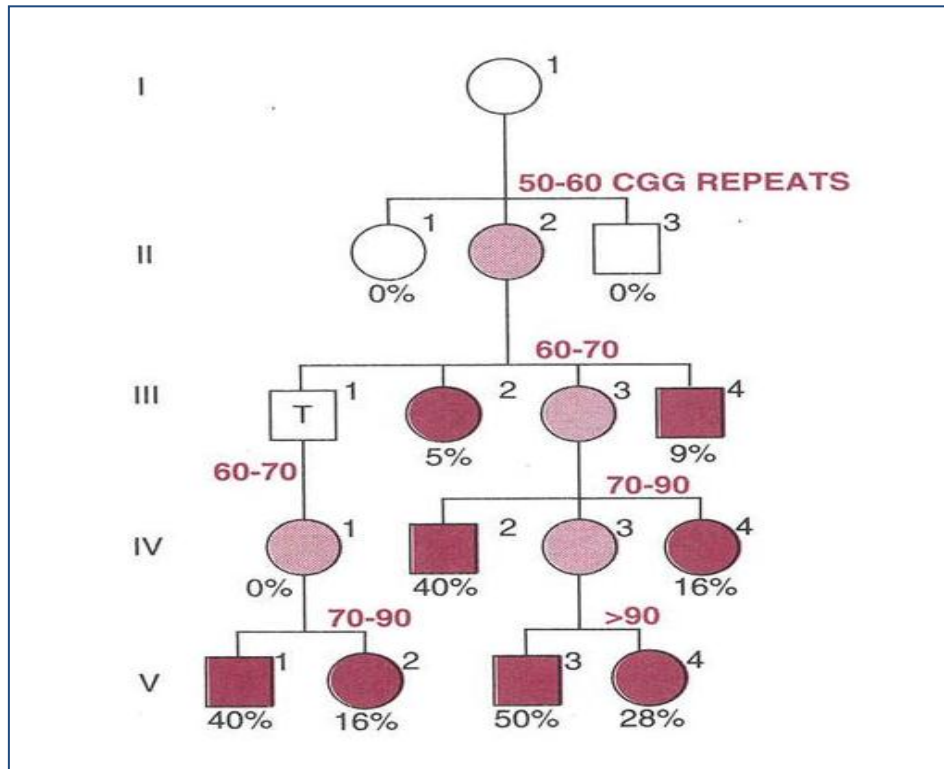


Figure 9. Paradoxe de Sherman

II.3.2- Aspect génotypique du syndrome de l'X-Fragile

II.3.2.1- Identification du gène *FMR1*

C'est en 1991 que les bases moléculaires du "paradoxe de Sherman" furent déterminées. L'existence d'une séquence chromosomique instable au niveau du site fragile a été mise en évidence grâce à l'identification, par Southern blot (Oberle et al., 1991 ; Arlt et al., 2003), clonage et PCR (Fu et al., 1991; Kremer et al., 1991), de fragments chromosomiques de taille variable, systématiquement plus longs chez les patients. Cette séquence chromosomique instable correspond à l'expansion d'une répétition du trinuéotide CGG au niveau de la région 5' UTR du gène *FMR1*, 150 nucléotides en aval du site d'initiation de la transcription. Le locus (FRAXA) du gène *FMR1* est situé sur la partie distale du bras long du chromosome X, au niveau de la bande 7.3 de la région 2 (Xq27.3).

La grande majorité des patients et une partie des sujets hétérozygotes féminins présentent dans environ 2 à 25 % des métaphases analysées une constriction ou site fragile dans cette région du chromosome X atteint (Admire et al., 2006). Cette fragilité de l'X n'apparaît que dans un milieu de culture spécifique, pauvre en acide folique, et doit être distinguée des autres sites fragiles de cette région, tel que le site FRAXE (Elbaz et al., 1998 ; Freudenreich 2007).

II.3.2.2- Structure et expression du gène *FMR1*

L'intégralité de la séquence codante du gène *FMR1* (*Fragile X Mental Retardation 1*) a été identifiée en 1991 (Verkerk et al., 1991). Le gène *FMR1* contient 17 exons et s'étend sur 38 kb au niveau de la région Xq27.3 du chromosome X (Eichler et al., 1993). Le transcrit complet de *FMR1* mesure 3,9 kb : 0,2 kb et 1,8 kb correspondant respectivement aux régions 5' et 3' UTR et 1,9 kb correspondant à la séquence codante (Jacquemont et al., 2007). Différents transcrits sont produits grâce à l'épissage alternatif du transcrit le plus long affectant la présence des exons 12 et 14 et le choix des sites accepteurs d'épissage des exons 15 et 17 (figure 10) (Penagarikano et al., 2007). Le gène *FMR1* code une protéine ubiquitaire, *FMRP* (pour *Familial Mental Retardation Protein*).

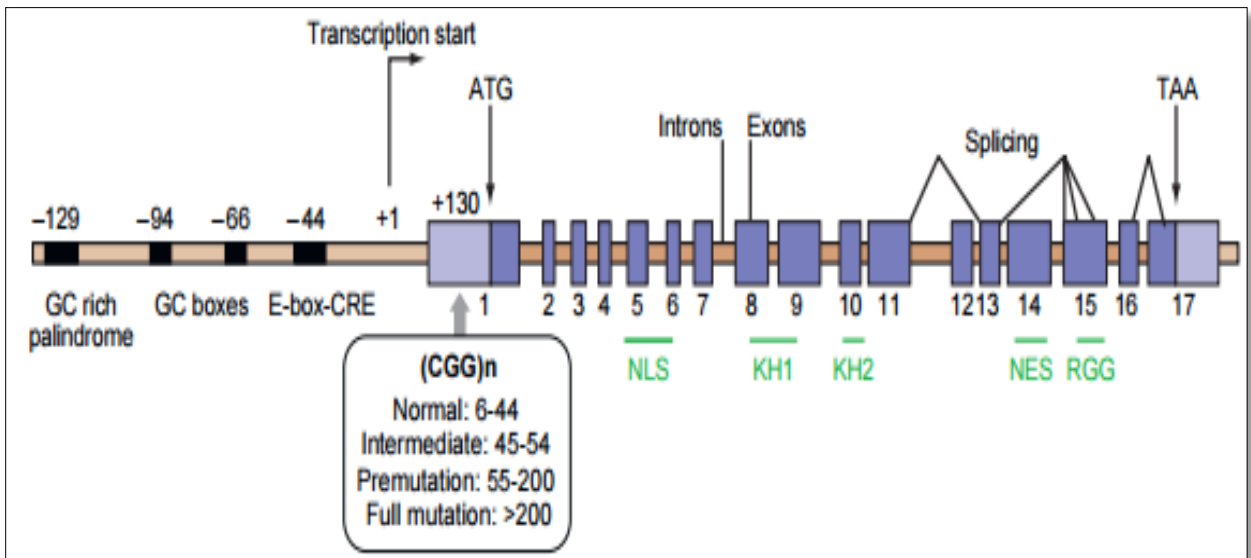


Figure 10. Structure fine du gène *FMRI* humain

II.3.3- Pathologie moléculaire du gène *FMRI*

II.3.3.1- Amplification et taille des répétitions

Chez les individus sains, la taille de la répétition est extrêmement polymorphe variant de 6 à 50 triplets CGG (Kunst et al., 1996). Les allèles les plus fréquents comportent en moyenne 30 triplets. Les allèles constitués par 40 à 50 triplets pourraient être légèrement instables, allèles intermédiaires (Mornet et al., 1998) et représenter un groupe de transition vers les allèles mutés. On considère deux classes de mutations : les prémutations et les mutations complètes (Figure 11).

Les allèles prémutés sont constitués par des expansions modérées comportant de 55 à 200 triplets CGG. Les individus porteurs d'allèles intermédiaires ne présentent pas de retard mental et ont longtemps été considérés comme asymptomatiques (Bodega et al., 2006 ; Bennett et al. 2010). Cependant, les prémutations ont été associées à deux autres syndromes: la ménopause précoce chez les femmes (POF pour *premature ovarian failure*) (Pesso et al., 2000 ; Sherman, 2002) et le développement d'un trouble neurologique évolutif, le "syndrome d'ataxie à tremblements liée à l'X fragile" (FXTAS pour *Fragile X tremor ataxia syndrome*), chez 20 à 30% des hommes de plus de 50 ans (Biancalana et al., 2005 ; Hagerman et Hagerman, 2007 ; Berry-Kravis et al., 2007). Ces syndromes sont dus à la toxicité de l'ARNm qui est en surnombre suite à une transcription exagérée du gène *FMRI* avec une prémutation (Garber et al., 2006 ; 2008 ; Jacquemont et al., 2003).

Enfin, la mutation complète à l'origine du syndrome de l'X fragile comporte de 200 à plus de 1000 triplets CGG (Fu et al., 1991). Le passage de la prémutation à la mutation complète se fait uniquement par transmission maternelle avec une efficacité d'amplification proportionnelle à la taille de la prémutation (Nolin et al., 1996). La transmission maternelle du syndrome s'explique par l'instabilité des prémutations (et des mutations) pendant les divisions méiotiques de l'oogenèse (Fu et al., 1991). L'existence de jumeaux monozygotes possédant des allèles de tailles différentes et d'individus mosaïques porteurs d'allèles normaux, mutés et prémutés dans différentes cellules suggère que l'instabilité et l'expansion de la série puisse se prolonger pendant les tous premiers stades de l'embryogenèse (Devys et al. 1992; Krayer et al. 1994).

La détermination du risque de transition d'un allèle prémuté en un allèle muté est délicate puisque ce risque est fonction de la taille de l'expansion (Fu, et al. 1991). La fréquence d'apparition d'une mutation complète est inférieure à 5 % lorsque les allèles maternels comportent moins de 60 triplets, il est de 50 % lorsque les allèles comportent environ 80 répétitions et atteint 95 % lorsque leur taille dépasse 100 répétitions. Par ailleurs, les allèles prémutés ont tendance à s'étendre pendant l'oogenèse, même lorsque le seuil de la mutation n'est pas atteint.

Ce qui revient au modèle SMM : "*Stepwise mutation model*", suppose qu'à chaque mutation est associée une diminution ou une augmentation de charge nette d'une unité, ceci déplaçant les allèles d'une classe de mobilité à une autre (Kimura et Ohta, 1975). Ce modèle suit le profil des microsatellites, le SMM suppose ainsi qu'un allèle muterait à travers le gain ou la perte d'un motif de base du fait qu'un état allélique conserve la «mémoire» de son état antérieur.

L'expansion de la répétition trinuécléotidique se fait par addition de triplets CGG supplémentaires à son extrémité 3'. Le mécanisme moléculaire à l'origine de l'expansion des répétitions n'a pas encore été clairement identifié. Il est suggéré que l'ADN polymérase glisse lors de la réplication sur des structures en épingle à cheveux formées par appariement des triplets CGG.

Bien que l'expansion des répétitions CGG soit retrouvée chez la plupart des patients affectés par le syndrome de l'X fragile, plusieurs cas de patients présentant les caractéristiques cliniques du syndrome sans l'expansion typique de triplets nucléotidiques ont été rapportés. Trois cas de mutations ponctuelles induisant une modification du cadre de

lecture ou affectant un site d'épissage ont été identifiés (De Boulle et al., 1993; Lugenbeel et al., 1995). Un seul cas de mutation ponctuelle faux-sens est connu à ce jour (De Boulle et al., 1993). Cette mutation conduit au remplacement d'une isoleucine hydrophobe en asparagine hydrophile en position 304 de la chaîne d'acides aminés constituant la protéine FMRP (mutation I304N). Des délétions, partielles voire totales, du gène *FMRI* ont également été décrites (Hammond et al., 1997; Wolff et al., 1997). Ces mutations ont pour conséquence la production d'une protéine FMRP inactive voire son absence de synthèse. La découverte de telles mutations, affectant l'intégrité du gène *FMRI*, a permis de confirmer le rôle causal exclusif de l'inactivation de *FMRI* dans l'apparition du syndrome de l'X fragile (Bassell et Warren 2008).

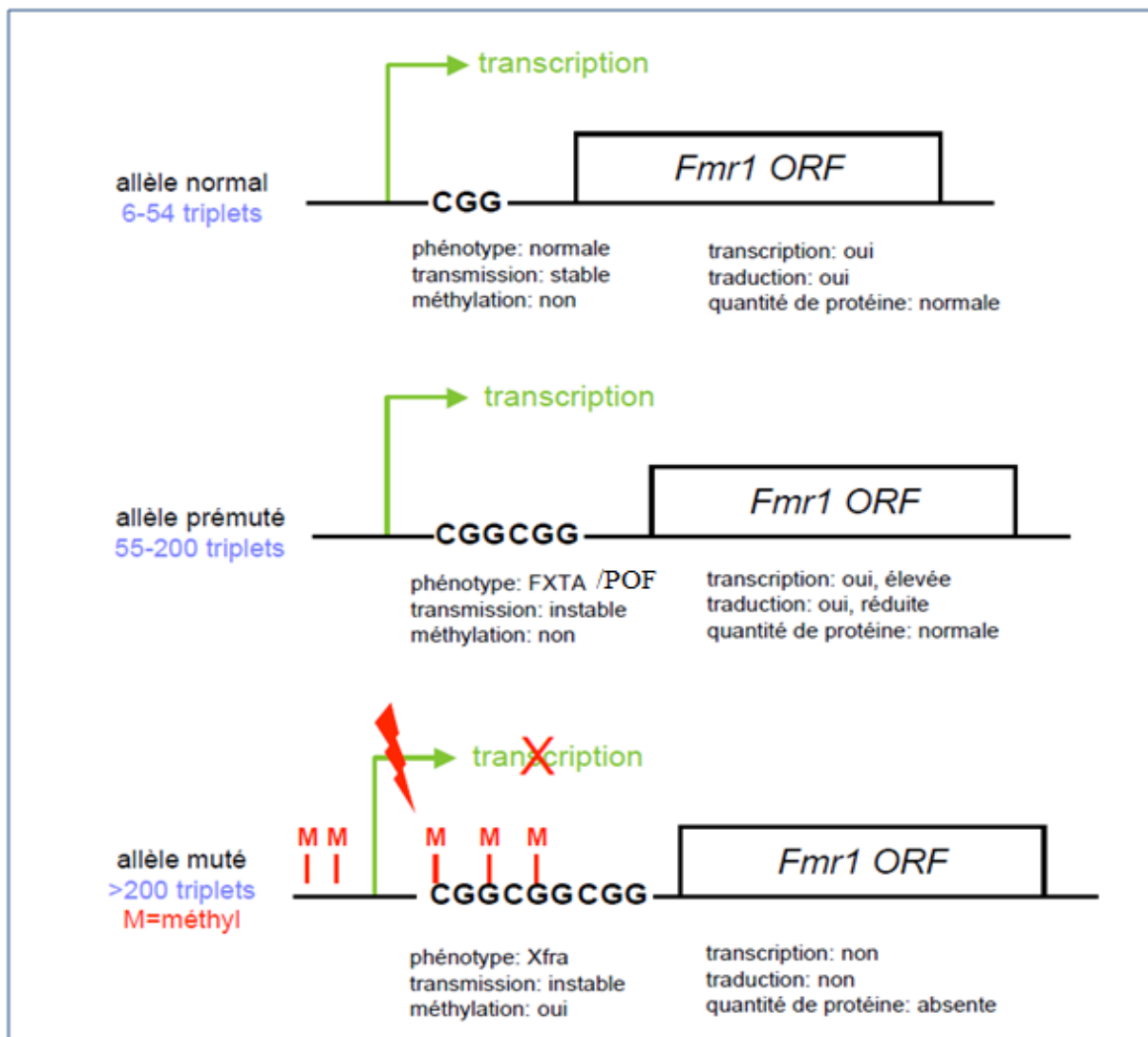


Figure 11. Représentation schématique des allèles du gène *FMRI* et conditions liées

II.3.3.2- Modifications épigénétiques de *FMR1*

L'expansion de la répétition CGG n'empêche pas elle-même la transcription de *FMR1*, mais induit plusieurs phénomènes épigénétiques (van Bokhoven et Kramer 2010 ; Avitzour et al., 2014). Il y a méthylation des cytosines de la répétition elle-même et de la région promotrice du gène *FMR1* (Froyen et al., 2006). Parallèlement, le profil d'acétylation et de méthylation des histones est modifié (Coffee et al., 2002; Coffee et al., 1999). Les histones H3 et H4 sont désacétylées et la lysine 9 de l'histone H3 méthylée ce qui correspond à un état de transcription inactif du gène (Chandler et al., 2003). L'ensemble de ces modifications épigénétiques induit l'inhibition de la transcription du gène *FMR1* et, de ce fait, l'absence d'expression de la protéine FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*) (figure 12). L'ensemble de ces modifications épigénétiques empêche la transcription du gène *FMR1* via deux mécanismes (Lim et al. 2005) :

- certains des facteurs de transcription de *FMR1*, comme AP-2a ou NRF1, sont sensibles à la méthylation. Des expériences conduites *in vitro* ont permis de montrer que les capacités de liaison de ces facteurs et d'activation de la transcription du gène *FMR1* sont diminuées lorsque les cytosines du promoteur sont méthylées (Ghedof et al., 2006).

- la méthylation de l'ADN et la désacétylation des histones induisent une condensation de la chromatine en amont du gène *FMR1*. Sous cette forme condensée, le promoteur du gène n'est plus accessible, ni pour la machinerie de transcription, ni pour les facteurs de transcription (Dahl et al., 2007 ;Napierala et al., 2005 ; Naumann et al., 2009).

L'expansion de la série CGG ne semble pas en elle-même empêcher la transcription de *FMR1*. En effet, le gène est transcrit chez la plupart des hommes porteurs de prémutations de taille comprise entre 100 et 200 triplets, et même chez certains porteurs de mutation complète dont la série CGG n'est pas anormalement méthylée (Tassone et al., 2000a; Tassone et al., 2000b).

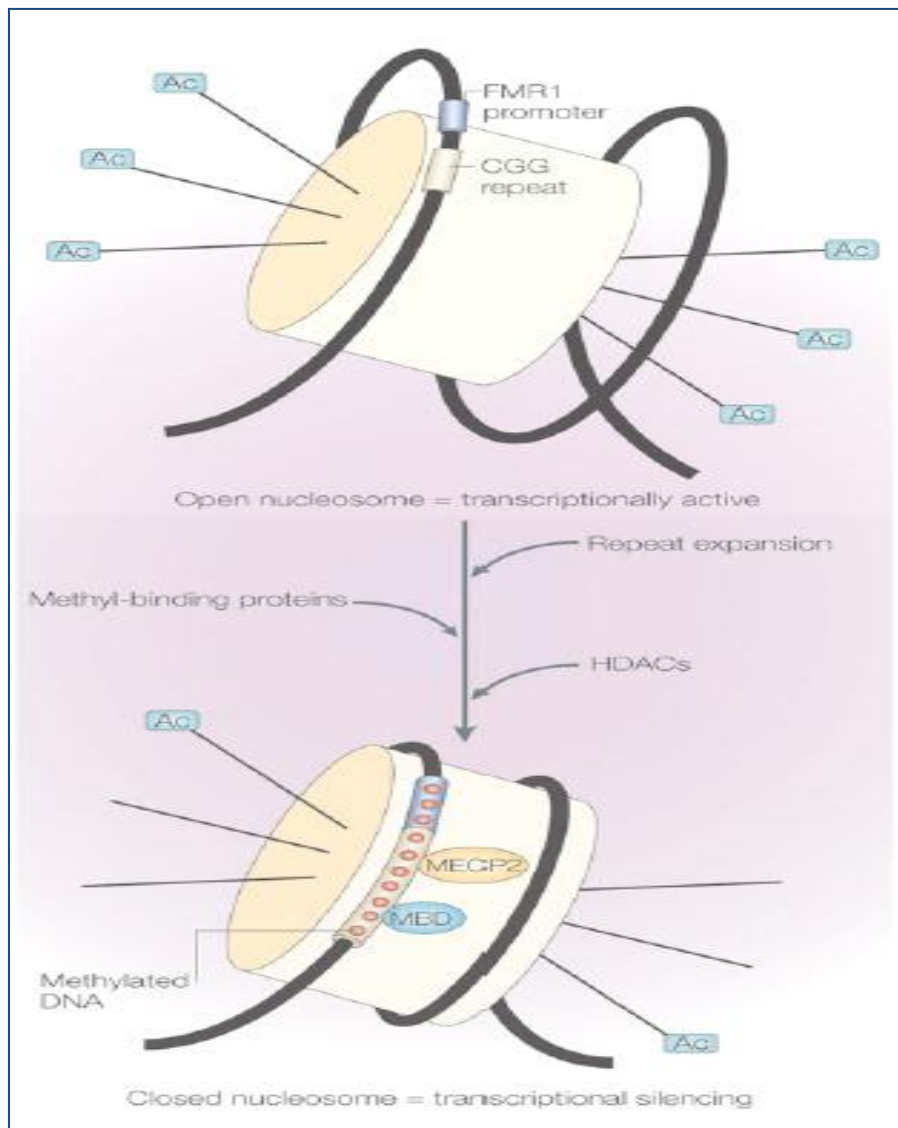


Figure 12. Modifications épigénétiques liées à l'expansion des répétitions CGG dans la région 5' UTR de *FMR1*

Méthylation des cytosines de la région promotrice du gène et de la répétition elle-même, méthylation et acétylation des histones H3 et H4. Les cercles rouges représentent les groupements méthyl sur les cytosines ; le cylindre beige représente le nucléosome ; Ac : acétyl ; HDAC : Histone DeAcéthylase

II.3.4- La protéine FMRP

La protéine FMRP (Figure 13) correspond à un ensemble d'isoformes synthétisées à partir des différents ARNm produits par épissage alternatif du gène *FMRI* (Verkerk et al., 1993). Une vingtaine d'isoformes différentes pourrait être théoriquement obtenue au vu des sites potentiels donneurs et accepteurs d'épissage. Cependant, seulement 4 à 6 bandes sont détectées par western-blot (Khandjian et al., 1996). Le poids moléculaire de ces isoformes varie de 70 à 80 kDa et pourrait correspondre à 10 isoformes différentes. L'isoforme la plus longue, codée par l'ensemble des exons, comporte 632 acides aminés (isoforme 1 ou iso1). L'isoforme la plus fréquente est dépourvue de l'exon 12 (isoforme 7 ou iso7) (Sittler et al., 1996).

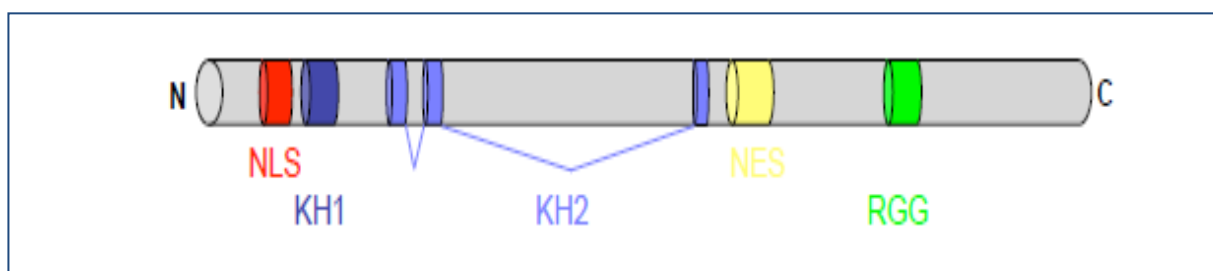


Figure 13. Positions des domaines fonctionnels de la protéine FMRP1

NLS= Nuclear Localisation Signal, NES=Nuclear Export Signal, KH1/KH2=hnRNP K Homology domain 1 et 2, RGG=boite arginine, glycine, glycine.

En immunofluorescence, FMRP est majoritairement détectée dans le cytoplasme, notamment autour du noyau (Abibtol et al., 1993 ; Eberhart et al., 1996). Cependant, des expériences de transfection ont permis de montrer que les isoformes minoritaires dépourvues de l'exon 14 sont localisées dans le noyau (Sittler et al., 1996). Ces résultats ont conduit à l'identification d'un signal d'export nucléaire (NES) dans l'exon 14 de FMRP (Eberhart et al., 1996). Ce NES est analogue à celui de la protéine Rev du virus de l'immunodéficience acquise humaine et consiste en une dizaine d'acides aminés comportant quatre résidus hydrophobiques au sein d'une série hydrophile. La localisation nucléaire des isoformes dépourvues de l'exon 14 suggérait également la présence d'un signal de localisation nucléaire (NLS). L'analyse de la localisation de formes tronquées de FMRP et de protéines produites par fusion d'un gène rapporteur à différentes portions de *FMRI* a permis l'identification d'un NLS entre les résidus 115 et 196 de FMRP (Bardoni et al. 1999 ; Adinolfi et al., 2003).

La présence simultanée d'un NLS et d'un NES le long de la séquence d'acides aminés a suggéré que FMRP puisse faire la navette entre le noyau et le cytoplasme. Des expériences d'inhibition de l'export nucléaire par traitement des cellules par la leptomycine B, a induit une accumulation partielle de la protéine FMRP dans le noyau (Tamanini et al., 2000). Une partie de FMRP serait donc en transit entre le noyau et le cytoplasme au sein de la cellule (Brown et al., 2001). De plus, FMRP a été détectée au niveau des pores nucléaires en microscopie électronique (Feng 2002).

Les premières pistes quant à la détermination du rôle de FMRP furent fournies par l'analyse bioinformatique de sa séquence et l'identification de trois domaines putatifs de liaison à l'ARN, deux domaines K homologues (KH) (Musco et al., 1996) et une boîte arginine-glycine (RGG) (Siomi et al., 1995 ; Kiledjian et Dreyfuss, 1992). Les domaines KH préalablement identifiés sur la protéine hnRNP K (pour *heterogeneous nuclear RiboNucleoProtein K*), puis par homologie de séquences, dans plusieurs protéines faisant partie de groupes phylogénétiquement éloignés (protéine ribosomale S3 de l'archéobactérie *Halobacterium halobium*, protéine MER1 de la levure *Saccharomyces cerevisiae*...). L'unique point commun entre ces protéines étant leur association physique et/ou fonctionnelle aux ARN, il a été postulé que ces motifs soient des domaines de liaison aux ARN (Bole et Mihailescu 2008). Au niveau structural, les domaines KH comportent classiquement environ 70 acides aminés adoptant une structure tridimensionnelle formée par l'enchaînement de feuillets béta et d'hélices alpha (motif typique baabba) entre lesquels s'insèrent deux boucles, dont une boucle Gly-X-X-Gly invariante (Burd et Dreyfuss 1994; Musco et al., 1996).

FMRP comporte deux domaines KH de liaison à l'ARN, le premier entre les acides aminés 212 et 266 (KH1), le second entre les acides aminés 285 et 328 (KH2). L'importance fonctionnelle de ces domaines fut démontrée par l'identification d'un patient présentant un phénotype sévère associé à une mutation ponctuelle unique, modifiant une isoleucine très conservée du domaine KH2 en asparagine (mutation I304N) (De Boulle et al., 1993). Cette mutation modifie la structure tridimensionnelle du domaine KH2 et altère les propriétés de FMRP (Musco et al., 1996).

Le domaine RGG a été identifié chez une autre hnRNP, hnRNP U pour (*heterogeneous nuclear RiboNucleoProtein U*) (Chen et al., 2003), puis dans différentes protéines se liant aux ARN (nucléoline, SSB-1, fibrillarine, hnRNP A1...) (Kiledjian et Dreyfuss 1992). La fusion d'un tel multimère de glycines et d'arginines à une protéine suffit à

lui conférer la capacité de se lier à l'ARN. FMRP contient un seul motif RGG, localisé en C terminal, entre les acides aminés 527 et 552.

FMRP a pour rôle principal (Figure 14) la diminution de l'activité des récepteurs MGlu5 pour *Metabotropic Glutamate receptor 5* (Ferrari et al., 2007 ; Nakamoto et al., 2007), essentiels pour le bon fonctionnement cérébral et les connexions neuronales (Bear et Warren 2004). Au final, c'est la sur-activation des MGlu5 cérébraux induite par la mutation du gène FMR qui expliquerait partiellement les symptômes observé (Brower et al., 2009).

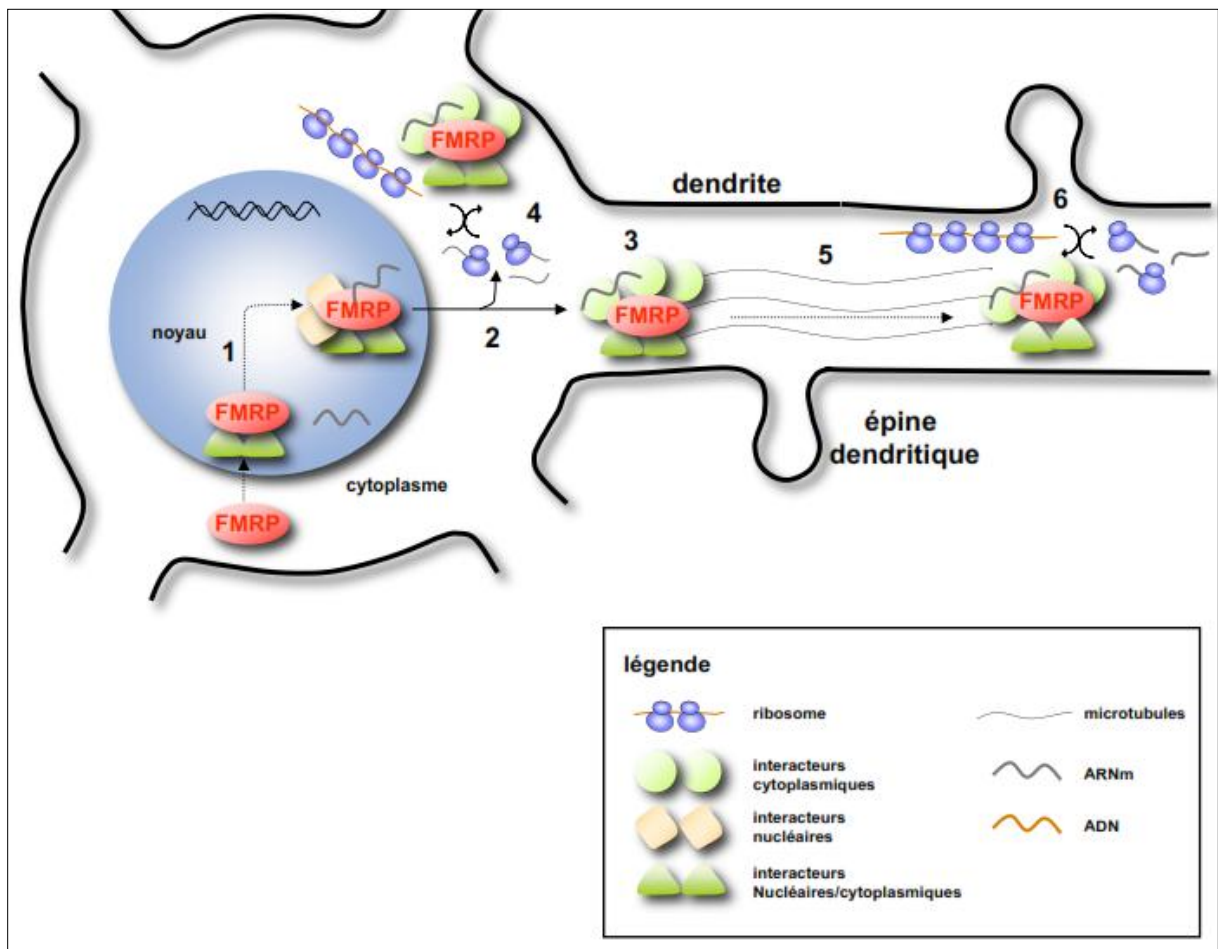


Figure 14. Rôle de la protéine FMRP

L'absence de la protéine FMRP change la plasticité des synapses (Antar et al., 2004 ; 2006 ; Pfeiffer et Huber, 2007), effectivement cette plasticité post et pré-synaptique permet de mettre en place un double système d'apprentissage antagoniste entre eux, l'apprentissage en LTP pour *long term potentiation* et l'apprentissage en LTD pour *long term depression* (Huber et al., 2002 ; Desai et al., 2006).

II.3.5- Traitements du syndrome de l'X-Fragile

En tant que la plus fréquente forme de retard mental hérité, le syndrome de l'X fragile intéresse les chercheurs depuis de nombreuses années comme modèle monogénique pour le traitement du retard mental et de l'autisme (Pearson et al., 2003 ; Hagerman et al., 2009). La découverte sur le chromosome X du gène *FMR1* date de 1991, mais ce n'est qu'en 2011 qu'un essai thérapeutique ciblé a été entrepris par l'utilisation d'une molécule l'AFQ056 (Jacquemont et al., 2011). Celle-ci freine spécifiquement l'activité des récepteurs mGluR5 essentiels au bon fonctionnement cérébral (Figure 15a). En effet, absente la protéine FMRP ne remplit plus sa fonction de régulation de ces récepteurs. Grâce à ce «frein médicamenteux», certains enfants ont interagi davantage avec leurs proches, qui ont pu constater ainsi des améliorations importantes de leur comportement (Jacquemont 2011 ; Bar-Nur et al., 2012).

Ultérieurement, des essais pharmacologiques ciblant la réactivation de la transcription de *FMR1*, entrepris par utilisation d'analogues nucléotidiques (5-azadéoxycytidine) ou d'inhibiteurs de l'activité des histones désacétylases (trichostatine A), ont permis une certaine restauration de la transcription de *FMR1* dans les cellules de patients en culture (Chiurazzi et al., 1999; Chiurazzi et al., 1996; Pietrobono et al., 2005). Cependant, ces composés ont un faible intérêt thérapeutique en raison de leur toxicité, et de leur inutilité sur les cellules non proliférantes comme les neurones.

Grâce à l'avènement, des CRISPR pour *Clustered, Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat*, à l'élucidation du mécanisme moléculaire de ce système immunitaire bactérien et à la création du système CRISPR/Cas 9 (Cho et al., 2014), une réactivation du promoteur du gène *FMR1* a été conduite par Park et collaborateurs (Figure 15b). Après avoir généré des cellules souches embryonnaires et des cellules souches pluripotentes porteuses de la mutation FXS (Eiges et al., 2007 ; Urbach et al., 2010), le système CRISPR/Cas 9 pour XFS a été créé par la synthèse d'un ARN guide complémentaire à la séquence de répétition CGG, ainsi lorsque l'ARN guide reconnaît cette séquence il s'y attache grâce à l'action de l'endonucléase Cas 9 qui va couper l'ADN porteur de la mutation complète. Dès qu'il y a excision des triplets surnuméraires, un phénomène de déméthylation se produit au niveau des séquences CpG à l'extrémité 5'UTR du gène, induisant ainsi sa réactivation (Fu et al., 2013 ; Park et al., 2015).

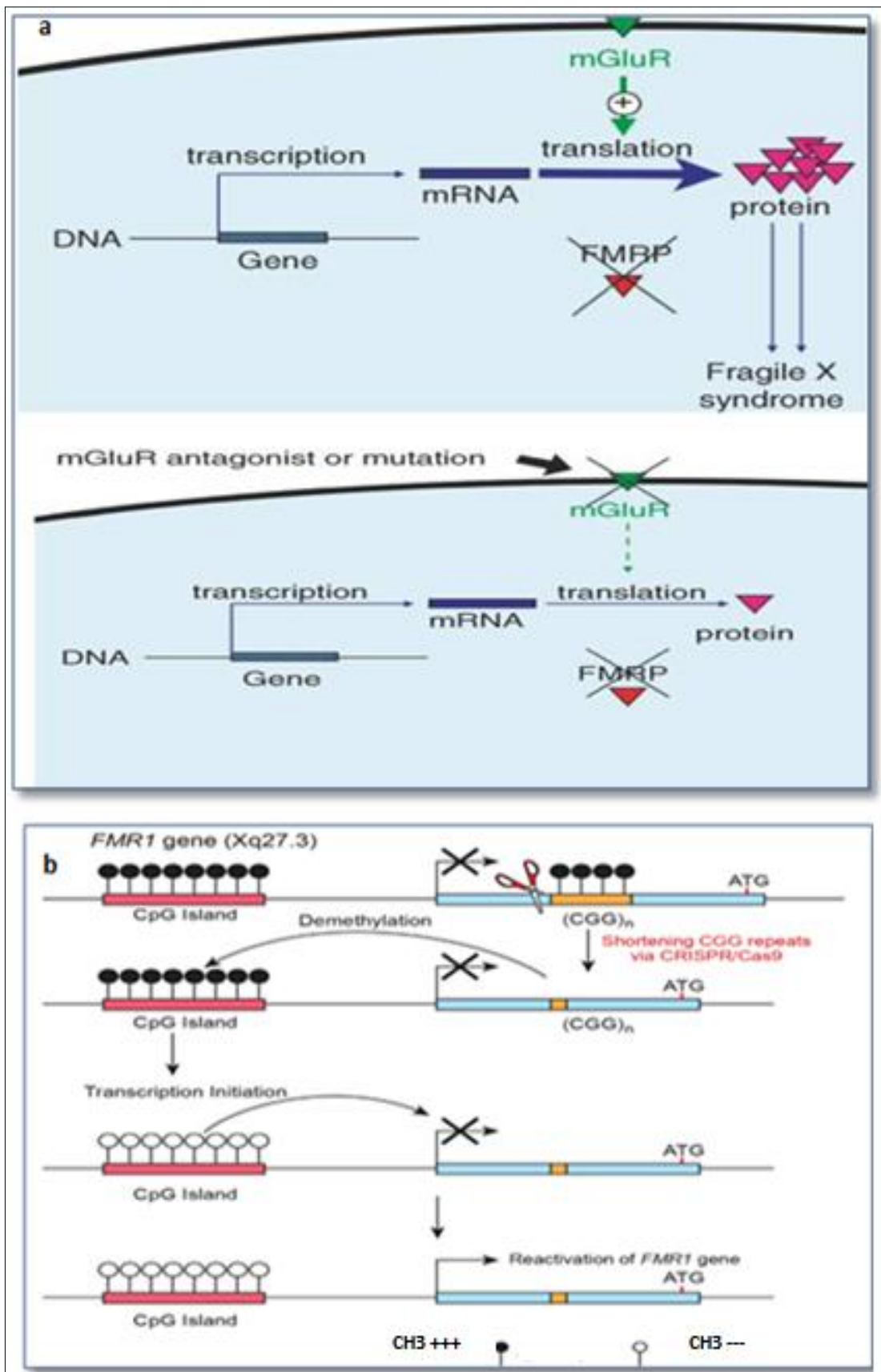


Figure 15. (a) Régulation des récepteurs mGluR par utilisation d'agents antagonistes
(b) Réactivation du promoteur FMR1 par utilisation des CRISPR/Cas9

II.3.6- Diagnostic différentiel du syndrome de l'X-Fragile/ Autisme

Certaines des caractéristiques comportementales du syndrome de l'X fragile sont communes à celles observées en cas d'autisme : les patients ont un contact visuel fuyant, évitent les regards et refusent les contacts physiques (Farzin et al., 2006). Un diagnostic d'autisme est d'ailleurs réellement posé pour 15 à 33 % des patients.

Réciproquement, 5 à 7 % des individus autistes seraient atteints du syndrome de l'X fragile (Kaufmann et al., 2004 ; García-Nonell et al., 2006).

Le syndrome du X fragile est associée à des symptômes allant de l'apprentissage, les carences affectives à un retard mental (QI <70) signes qui sont aussi associés au spectre d'autisme (Garber et al, 2008). Jusqu'à 60 % des hommes FXS remplissent les critères de troubles du spectre autistique (ASD pour *Autistic spectrum disorder*) (Hagerman 2006 ; Bailey et al, 1998 ; Hatton et al, 2006), faisant de FXS la cause monogénique la plus fréquente de ASD syndromique (Hagerman 2011).

Presque tous les individus avec FXS montrent au moins certaines caractéristiques autistiques comme le retrait social, la timidité excessive, l'angoisse de la séparation et certaines répétitions gestuelles (Hatton et al, 2006 ; Dahlhaus et El-Husseini, 2010).

A l'échelle histologique ce diagnostic différentiel entre FXS et l'autisme est représenté par la similitude de l'aspect des épines dendritiques qui au lieu d'être denses et bien épaisses, sont au contraire filamenteuses et disparates expliquant ainsi les troubles comportementaux et cognitifs communs aux deux pathologies (Vanderklish et Edelman 2002 ; Bourne et Harris 2008).

MATERIELS ET METHODES

I. Echantillonnage biologique

I.1- Loci FRAXA et FRAXE

Les patients de cette étude ont été recrutés au niveau de l'Hôpital El-Razzie et au niveau de deux cabinets médicaux (Annaba) où officient respectivement une pédopsychiatre et une psychologue clinicienne, et cela sur une période de 10 mois (Février-Novembre 2009).

Le diagnostic et le bilan sur l'état de santé mentale de chaque individu a été établie en se basant sur :

-Une évaluation psychologique : réalisée par une psychologue-clinicienne et a pour but d'évaluer le profil développemental et intellectuel de l'enfant.

-Une évaluation psychomotrice et sensorimotrice : réalisée par un psychomotricien, elle permet d'évaluer les compétences psychomotrices et sensorielles du malade.

-Une évaluation orthophonique : réalisée par un orthophoniste et a pour objectif d'évaluer les compétences de langage de l'enfant.

-Des évaluations complémentaires pour diagnostic différentiel : dans certains cas, certains examens ont été pratiqués (ultérieurement à notre étude) afin de vérifier que les troubles mentaux et/ou autistiques ne sont pas liés à d'autres syndromes.

Une fois le groupe primaire identifié, les patients ont été divisés en deux sous-groupes en fonction des caractéristiques cliniques établis : Retard mental sans troubles autistiques (RM) et troubles autistiques avec retard mental (AUT).

- Les critères d'inclusion correspondent à un groupe de conditions qui doivent être remplies pour prendre part à cette étude dans le sous-groupe (RM) ou le sous-groupe (AUT).

Ils ont été établis avec l'aide de cliniciens pour déterminer s'il est approprié qu'un malade répertorié dans un premier temps soit pris en compte.

Pour les malades RM, un questionnaire médical a été dûment rempli lors de la consultation, par le médecin traitant (*Annexe 1*), alors que pour les malades (AUT) un questionnaire M-CHAT a été proposé par le médecin traitant aux parents de chaque enfant (*Annexe 2*).

- Les critères d'exclusion sont les conditions indiquées qui rendent impossible l'entrée de candidats dans notre recherche bien qu'ils remplissent les critères d'inclusion.

Le critère le plus important utilisé pour déterminer l'élimination d'un malade de notre échantillonnage, correspond à l'étiologie du RM, si ce dernier est secondaire à une cause bien spécifique, le malade est automatiquement éliminé de l'étude (Jorde et al., 2004).

Les causes de déficience mentale secondaire peuvent être :

-prénatales : cas des maladies héréditaires du métabolisme (la phénylcétonurie), les troubles de la répartition du matériel génétique (Le syndrome de Turner, le syndrome de Klinefelter) et les atteintes dues à des maladies transmissibles (rubéole, toxoplasmose).

- périnatales : hémorragies cérébraux-méningées (atteintes mécaniques).

-postnatales : cas des maladies infectieuses, accidents avec traumatisme cérébral, les carences graves en stimulation et les facteurs psychosociaux (Malafosse 2000).

Les autistes diagnostiqués pour le syndrome de Rett et le syndrome d'Asperger ont été éliminé de l'étude puisque l'étiologie moléculaire est d'ores et déjà définie dans ces deux cas.

Sur les 77 patients recrutés, 24 ont été éliminé (critères d'exclusion, absence lors des prélèvements) amenant le nombre des patients primaires de l'étude à 53 individus.

Des recrutements supplémentaires ont été effectués incluant ainsi 4 familles ayant au moins un propositus appartenant à la première vague de patients, amenant l'effectif total étudié à 60 individus (Tableau 2).

L'anonymat des patients devant être protégée, aucune information d'identification n'est révélée (nom, prénom et date de naissance). Tous les prélèvements sur mineurs ont été effectués en présence du parent du malade, et un consentement éclairé comprenant les informations nécessaires au patient ou à son parent / représentant légal, a été dûment signé.

Une copie du consentement est présentée au niveau de l'annexe 3.

I.2- Distributions des répétitions CGG et des répétitions GCC

Les données de cette étude dérivent des résultats obtenus sur l'échantillonnage cité dans la section précédente. Pour ne pas biaiser les fréquences du polymorphisme étudié (nombre de répétition CGG et GCC), seuls **52** individus n'ayant aucun lien de parenté entre eux ont été inclus dans cette étude.

En ce qui concerne les différentes familles, les membres pris en considération correspondent à chaque fois au cas index ou propositus, une des familles (Famille 4) a été écarté en totalité de l'étude.

Les différents degrés de répétitions pour les deux loci ont donc été répertoriés sur **66** chromosomes X (**38** individus de sexe masculin et **14** individus de sexe féminin).

Tableau 2. Echantillonnage complet de l'étude

	N°	Sexe	N/P	Cat	Age (ans)		N°	Sexe	N/P	Cat	Age (ans)
	1	F	TI	RM	5		30	M	ZM	AUT	7
	2	M	BAM	RM	6		31	M	GAM	RM	4
	3	M	MTE	RM	8		32	F	AMD	AUT	4
	4	F	OJ	RM	5		33	M	SAE	AUT	-
	5	M	AL	RM	7		34	M	GYMI	AUT	-
	6	F	ZM	RM	8		35	M	HAE	AUT	-
	7	M	GME	RM	5		36	M	MBHK	AUT	-
	8	M	BA	RM	20		37	M	GLM	AUT	-
	9	F	KZ	RM	4		38	M	KC	AUT	4
Famille 1	10	M	BO	AUT	15	Famille 4	39	F	KLM	-	32
	11	M	BA	-	9		40	F	KL	-	3
	12	F	BAS	-	40		41	M	BAM	AUT	9
	13	M	BS	-	45		42	M	BRM	RM	8
	14	M	AJ	RM	11		43	M	TS	AUT	-
	15	M	HSE	AUT	6		44	M	BA	AUT	-
	16	M	HA	AUT	3		45	M	DH	AUT	-
	17	M	MN	AUT	5		46	M	OZE	AUT	2
	18	M	AN	AUT	7		47	F	RN	AUT	13
Famille 2	19	M	BMA	AUT	7		48	M	CH	AUT	15
	20	F	BR	RM	7		49	M	SA	AUT	-
	21	F	BJ	RM	13		50	F	KA	AUT	-
	22	M	BI	AUT	7		51	F	ZLY	AUT	-
	23	M	MM	AUT	5		52	F	AR	AUT	-
	24	M	LSMC	AUT	7		53	M	KO	AUT	12
	25	M	DK	AUT	17		54	F	BM	AUT	5
	26	M	BDE	RM	4		55	M	NMA	AUT	-
	27	F	RI	AUT	7		56	M	BAN	AUT	-
Famille 3	28	F	AM	RM	19		57	M	LC	AUT	20
	29	M	AMO	RM	5		58	F	DW	AUT	-
							59	M	BSE	AUT	-
							60	M	NS	AUT	4

N/P : nom et prénom(s) (données sous forme d'initiales pour raison de confidentialité),

F : féminin, M : masculin, Cat : catégorie, RM : retard mental, AUT : autiste.

Les flèches pointent dans chaque famille le cas index ou propositus.

II. Extraction de l'ADN génomique (ADNg)

Le détail des réactifs utilisés est représenté au niveau de l'annexe 4

II.1- Protocole d'extraction de l'ADNg

II.1.1- Principe d'extraction de l'ADNg

La source majeure pour extraire de l'ADNg est les globules blancs. A partir de sang total prélevé sur EDTA et après lyse préférentielle des cellules anucléées, on peut obtenir quelques centaines de microgrammes d'ADN (Milá et al., 1996).

Quelle que soit la méthode d'extraction des acides nucléiques utilisée à partir du sang fraîchement recueilli ou décongelé, le sang doit être initialement vigoureusement mélangé à une solution hypotonique pour faire éclater les globules rouges. Les solutions de lyse des globules rouges sont nombreuses et variées. La lyse est en général réalisée à 4 °C pendant 20 à 30 minutes. Le lysat est centrifugé et, après élimination du surnageant, le culot cellulaire contenant les leucocytes (0,3 % des cellules circulantes) est repris dans une solution saline et est traité par une solution de lyse des globules blancs. Il existe un grand nombre de solutions de lyse en fonction de la nature du détergent anionique utilisé. L'ADN nucléaire libéré dans le milieu est alors le plus souvent traité par une protéinase très active, la protéinase K, qui a pour but de digérer les protéines qui lui étaient associées. C'est à partir de ce stade en général que les procédés d'extraction et de purification varient. Dans la méthode utilisant des solvants organiques (phénol-chloroforme) dite « de référence », le principe consiste à traiter le lysat cellulaire dans un premier temps par du phénol volume à volume, le phénol est un puissant agent déprotéinisant dans lequel les acides nucléiques ne sont pas solubles. Après centrifugation l'élimination de la phase phénolique se fait par un mélange chloroforme-alcool iso-amylque qui a notamment pour objectif d'éliminer les traces éventuelles de phénol qui auraient pu être emportées avec la phase aqueuse et qui sont fortement inhibitrices des réactions enzymatiques.

II.1.2- Procédure d'extraction

L'extraction de l'ADNg a été effectuée au niveau du laboratoire de Biochimie et Génétique Médicale de l'hôpital Ben Badis-Constantine. Le principe de la méthode utilisée

est basé sur l'obtention d'une concentration d'ADNg comprise entre 200 à 500 ng avec un minimum de contamination par précipitation des protéines avec du phénol/chloroforme.

5 à 10 ml de sang périphérique prélevé dans des tubes EDTA sont transférés dans des tubes Falcon de 50 ml. 15 à 20 ml d'eau distillée et 25 ml de solution de Lyse sont rajoutés puis les tubes sont placés dans de la glace.

Après 30 mn, les tubes sont centrifugés à 4°C pendant 15 mn à la vitesse de 3500 rpm. Le surnageant contenant le plasma et les débris cellulaires est éliminé par pipetage.

50 ml de solution de Lyse est rajouté aux tubes qui sont replacés dans de la glace pour 10 mn puis centrifugés sous les mêmes conditions.

Après élimination du surnageant, le culot est resuspendu dans 3 ml de tampon d'élution (TE 1X) et 300 µl de SDS à 10% et 20 µl de protéinase K sont rajoutés. Les tubes sont ensuite incubés à 37°C sur une plateforme rotative.

Après 12 h, 450 µl de Perchlorate de Potassium (6M) sont rajoutés, les tubes sont ensuite incubés à 37°C pour 2 h.

4 ml de phénol froid sont rajoutés puis les tubes sont agités pendant 10 mn puis centrifugés à la vitesse de 6000 rpm à température ambiante.

Le surnageant contenant l'ADNg est transféré délicatement dans un autre tube. Pour purifier et précipiter l'ADNg, 2 ml de phénol et 2 ml de chloroforme sont rajoutés suivie d'un dernier lavage avec de l'éthanol à 70% froid (-70°C).

La méduse d'ADNg qui se forme est ensuite récupérée par enroulement autour d'une pipette pasteur scellée, puis dissoute dans 200 à 500 µl de TE. Les tubes sont finalement placés sur une plateforme rotative pendant 12 h.

L'ADN a été conservé à -4°C pendant 48 h (au maximum) avant d'être acheminé vers le laboratoire de Biochimie Médicale à Clermont-Ferrand, où les analyses moléculaires ont été effectués.

II.2- Quantification et dosage de l'ADNg

II.2.1- Principe de la quantification de l'ADNg par spectrophotométrie

Le spectrophotomètre utilise la transmission de la lumière à travers une solution pour déterminer la concentration d'un soluté à l'intérieur de la solution. L'appareil fonctionne suivant un principe simple dans lequel de la lumière d'une longueur d'onde connue traverse

un échantillon et où la quantité d'énergie lumineuse transmise est mesurée à l'aide d'une cellule photoélectrique placée de l'autre côté de l'échantillon. Toutes les molécules absorbent de l'énergie radiante à une longueur d'onde spécifique à partir de laquelle il est possible d'extrapoler la concentration d'un soluté à l'intérieur d'une solution (Watson et al., 2009).

Selon la loi de Beer-Lambert, il existe une relation linéaire entre l'absorption A (également appelée densité optique, DO) et la concentration de la macromolécule qui est donnée par l'équation suivante :

$$A = OD = \epsilon l c$$

Où : ϵ : est égal au coefficient d'extinction molaire

l : représente la longueur de parcours de la cuvette

c : indique la concentration

Les protéines et les acides nucléiques absorbent la lumière dans la plage des ultraviolets dans des longueurs d'onde comprises entre 210 et 300 nm. L'absorbance maximale de solutions ADN et ARN est fixée à 260 nm, tandis que l'absorbance maximale de solutions à base de protéines est de 280 nm. Dès lors, tant les solutions d'ADN que les solutions d'ARN absorbent partiellement la lumière à 280 nm, tandis que les solutions de protéines l'absorbent partiellement à 260 nm. Le ratio entre les valeurs à 260 nm et à 280 nm (A_{260}/A_{280}) fournit une estimation du degré de pureté des acides nucléiques. Des préparations pures d'ADN et d'ARN ont des valeurs à A_{260}/A_{280} de 1,8 et 2,0 respectivement.

Sur une longueur de parcours de 10 mm avec une longueur d'onde de 260 nm, l'absorption $A = 1$ correspond à environ 50 $\mu\text{g/ml}$ d'ADN double brin, environ 37 $\mu\text{g/ml}$ d'ADN simple brin, 40 $\mu\text{g/ml}$ d'ARN ou environ 30 $\mu\text{g/ml}$ d'oligonucléotides.

En cas de contamination par une protéine, le rapport A_{260}/A_{280} sera nettement inférieur aux valeurs données ci-dessus et une quantification précise de la quantité d'acide nucléique ne pourra être envisagée.

II.2.2- Détermination de la concentration de l'ADNg

La quantité de solution d'acide nucléique utilisée pour mesurer l'absorbance A dépend de la capacité de la cuvette, du facteur de dilution et du volume d'échantillon disponible.

Le spectrophotomètre est calibré en sélectionnant le type d'acide nucléique analysé (ADN double brin), en introduisant le facteur de dilution (1/500), et en mesurant une solution vierge (blanc) constituée d'eau où $A_{260} = 0$ (Klug et al., 2006).

Après l'étalonnage du spectrophotomètre et la dilution de la solution d'acide nucléique (5 µl d'ADNg dans 495 µl de TE), la cuvette est bouchonnée, la solution est mélangée et l'absorbance est mesurée.

La mesure de l'absorbance de chaque échantillon à 260 nm et 280 nm est établie suivie du rapport A_{260}/A_{280} qui doit être compris entre 1.8 et 2 et cela afin de pouvoir considéré l'ADN débarrassé des protéines cellulaires.

D'autres parts la mesure de la DO à 230 nm est établie suivie du rapport DO_{260}/DO_{230} qui doit être inférieur à 2 pour s'assurer que la solution contient peu ou pas de phénol résiduel.

Pour calculer la concentration d'ADNg : 1 unité DO_{260} correspond à une concentration de 50 µg/ml d'ADN double brin/ml.

Donc : La concentration de l'ADNg en µg/ml = $1/500$ (facteur de dilution) $\times A_{260} \times 50 \mu\text{g/ml}$.

II.3- Purification de l'ADNg

II.3.1- Principe de la purification de l'ADNg

La purification de l'ADNg permet d'optimiser la digestion enzymatique ultérieure en rendant accessible tous les sites de coupure spécifique donc seul les échantillons d'ADNg qui seront transférés sur membrane ont subi ce traitement, et cela par précipitation des protéines « résiduelles » et par hydrolyse des ARN « résiduels » par le rajout de solution fortement alcaline de NaCl. A pH alcalin seul l'ARN est hydrolysé et pas l'ADN qui est protégé par l'absence de groupement hydroxyle en 2' sur son désoxyribose (Ameziane et al., 2006).

II.3.2- Procédure de purification de l'ADNg

A 400 µl d'ADNg (0.5 µg/µl) sont rajoutés 600 µl de TKM (Tris-HCl 50 mM, KCl 25 mM, $MgCl_2$ 5mM, pH 7,5) et 75 µl de SDS à 10%.

Les tubes sont agités par retournement puis placer 5 mn à 55°C.

375 µl de NaCl (6M) sont rajoutés puis les tubes sont centrifugés pendant 5 mn à la vitesse de 13000 rpm.

Une fois le surnageant récupéré, les protéines sont précipitées dans 2 volumes et demi d'éthanol froid (-80°C), puis l'ADNg est resuspendu dans à peu près 200 µl de TE.

III. Amplification de l'ADNg par PCR fluorescente

III.1- Principe de l'amplification de l'ADNg par PCR fluorescente

L'introduction de méthodes permettant de multiplier des fragments d'ADN d'origines définies ou amplification de l'ADN indépendamment de tout système cellulaire, inaugura une nouvelle ère de la génétique moléculaire (Mullis 1985). Cette technologie fondamentale s'est rapidement propagée avec le développement des équipements automatisés dans les laboratoires de recherche fondamentale et appliquée (Read et Donnai 2009). La PCR est une méthode rapide et sensible. Une réaction standard et de nombreuses méthodes basées sur la PCR ont été développées pour étudier les polymorphismes et les mutations. La PCR standard est une technique *in vitro* permettant d'amplifier une séquence d'ADN cible, même à partir d'une très petite quantité de matériel (Figure 16). Il est nécessaire d'avoir des informations concernant les séquences flanquant l'ADN cible, afin de pouvoir amplifier celui-ci sélectivement (Khaniani et al., 2008). À partir de ces informations, deux amorces nucléotidiques d'environ 15 à 25 paires de bases sont élaborées. Les amorces sont complémentaires des séquences extérieures aux extrémités 3' de la séquence cible et hybrident spécifiquement sur elles. La PCR est une réaction en chaîne car les brins d'ADN néoformés sont utilisés comme matrice pour les synthèses d'ADN suivantes, ceci pendant environ 25 à 35 cycles consécutifs. Théoriquement, à chaque cycle, la quantité d'ADN amplifié est doublée. A la fin de la réaction, au moins 10^5 copies de la séquence cible ont été synthétisées. On peut les visualiser sous la forme d'une bande distincte d'une taille spécifique après électrophorèse du produit de la réaction dans un gel. Chaque cycle est composé de trois réactions dont les durées et les températures sont contrôlées précisément dans un thermocycleur automatique, et prend environ 1 à 5 minutes. Les trois étapes de chaque cycle sont : La dénaturation de l'ADN double brin, à environ 93-95°C pour l'ADN humain; une hybridation des amorces à environ 50-70 °C, suivant la température de fusion attendue pour le duplexe d'ADN; et enfin la synthèse d'ADN à l'aide de la DNA polymérase, enzyme thermostable qui provient de micro-organismes vivant dans des sources chaudes, tel que *Thermophilus aquaticus*, d'où le nom de l'enzyme Taq polymérase, typiquement entre 70 et 75 °C. A chaque cycle, la matrice et l'ADN qui a été formé au cours du cycle précédent servent de matrice pour une nouvelle réaction de synthèse.

Le premier cycle résulte en un ADN néoformé de taille variable à son extrémité 3' car la synthèse continue après la séquence cible. Le même phénomène se produit au cours des cycles suivants mais les brins de taille variable sont rapidement surpassés en nombre par le

nouvel ADN dont la taille est contrôlée à ses deux extrémités, puisque la synthèse ne peut se poursuivre après l'extrémité de l'amorce sur la matrice d'ADN opposée (Ameziane et al., 2006).

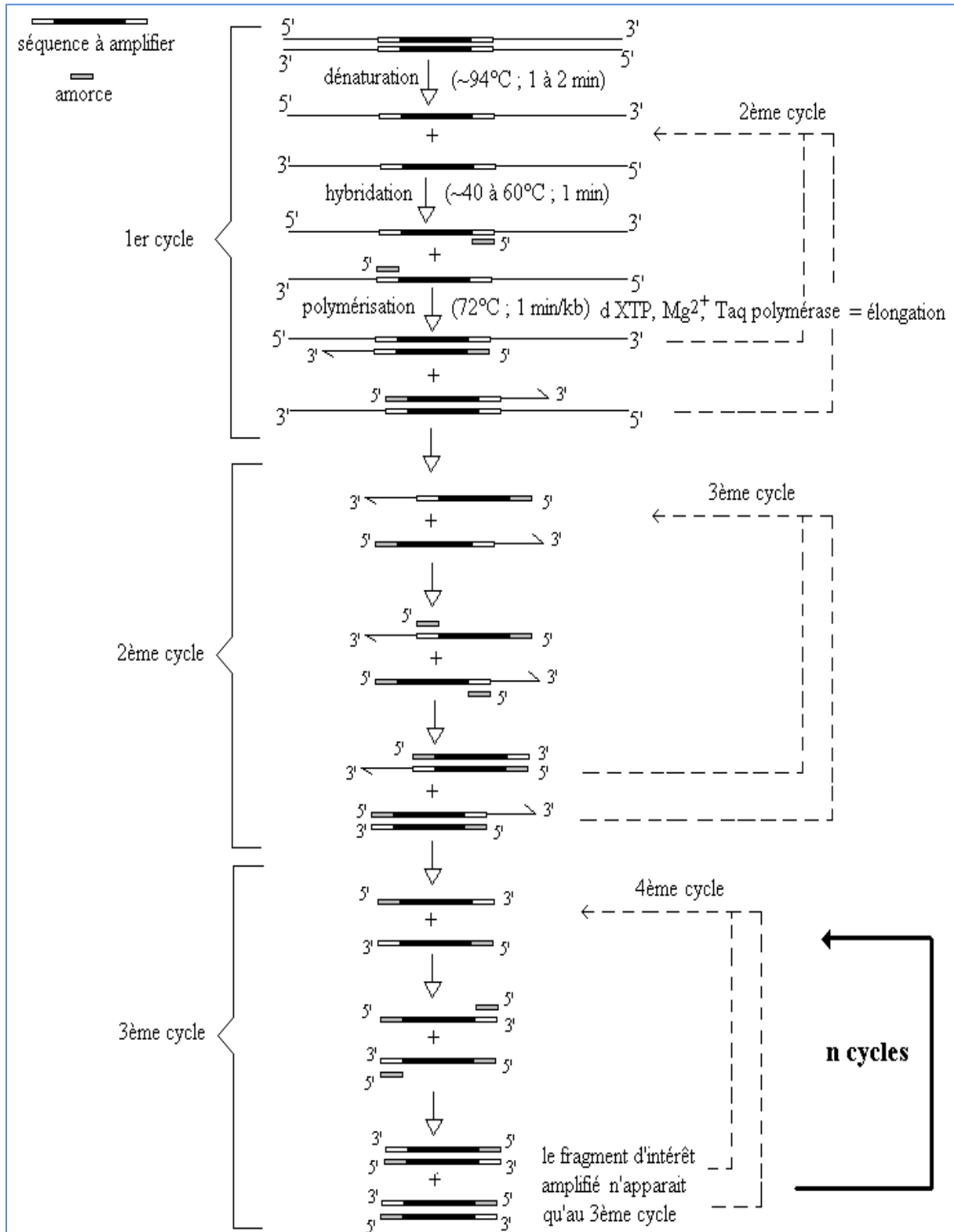


Figure 16. Principe de la PCR

La PCR fluorescente est basée sur la détection et la quantification d'un «reporter» fluorescent. L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR. Lors de la réaction d'amplification par PCR, le colorant libre en solution exhibe peu de fluorescence. Durant l'étape d'élongation, une augmentation de la fluorescence est associée à la quantité de colorant se fixant à l'ADN double brin naissant (Figure 17). Cette technologie ne nécessite aucune sonde fluorescente, sa spécificité repose entièrement sur ses amorces (Read 1989). Elle ne requiert donc aucune expertise particulière pour le design des sondes fluorescentes et n'est pas affectée par des mutations dans l'ADN cible qui influencent l'hybridation des sondes spécifiques. Étant donné que les fluorochromes se fixent à n'importe quelle molécule d'ADN double brin, cette technologie présente une certaine versatilité puisque le même agent peut être utilisé pour détecter plus d'un produit d'amplification dans la même séquence réactionnelle (Gold et al., 2000).

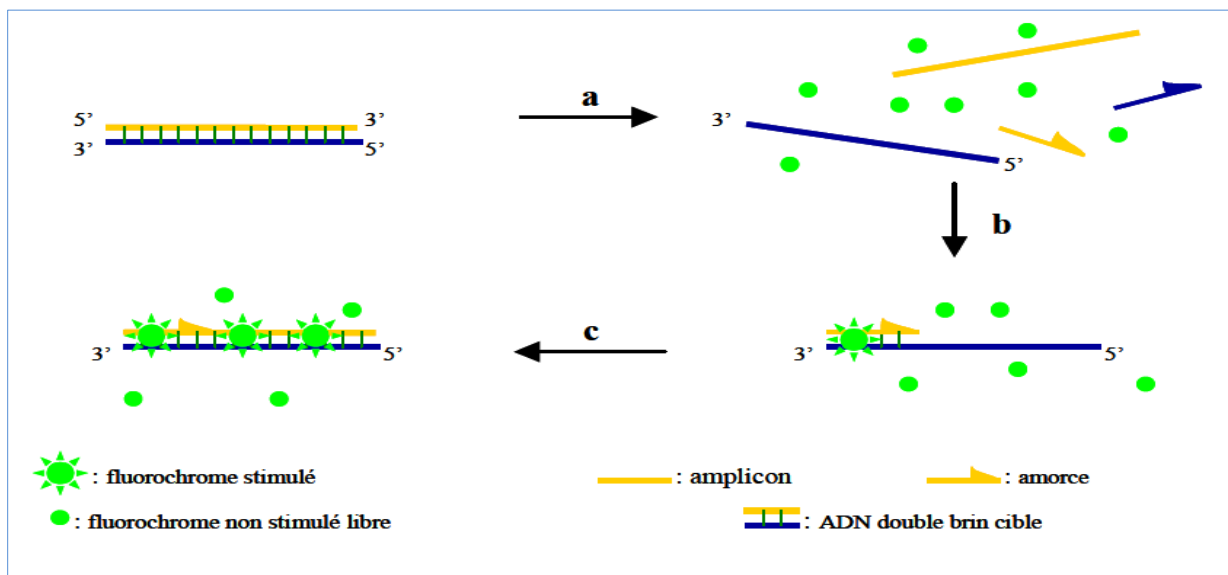


Figure 17. Principe de la PCR fluorescente

La mesure de la fluorescence permet de déterminer si l'amplicon, qui correspond à la molécule d'ADN double brin délimitée à ses deux extrémités par l'extrémité 5' des deux amorces, est effectivement présent et donc amplifié sans avoir besoin de faire une électrophorèse sur gel.

III.2- Amorces utilisées

Les sites FRAXA (Fu et al., 1991) et FRAXE (Wang et al., 1995) ont été amplifiés simultanément, par l'utilisation simultanée de deux couples d'amorces spécifiques (Tableau 3). La feuille de route est représentée au niveau de l'annexe 5

Tableau 3. Amorces FRAXA et FRAXE

Site	Identification	Séquences oligonucléotidiques	Concentration
FRAXA	PR156 : FAM	AGCCCCGCACTTCCACCAGCTCCTCCA	5 pmol/μl
	PR155	GCTCAGCTCCGTTTCGGTTTCACTTCCGGT	5 pmol/μl
FRAXE	PR134 : HEX	GCGAGGAAGCGGCGGCAGTGGCACTGG	20 pmol/μl
	PR135	CCTGTGAGTGTGTAAGTGTGTGATGCTGCCG	20 pmol/μl

◆ Préparation du Mix Primers 1 (site FRAXA) :

Le Mix Primers 1 est préparé à partir de PR156 (100 pmol/ μl) dilué au ¼ [5 μl PR156 + 15 μl d'H₂O] et de PR155 (100 pmol/ μl) comme suit :

$$5 \mu\text{l PR155} + 5 \mu\text{l PR156} + 90 \mu\text{l d'H}_2\text{O}$$

◆ Préparation du Mix Primers 2 (site FRAXE) :

Le Mix Primers 2 est préparé à partir de PR134 (100 pmol/ μl) dilué au ¼ [10 μl PR134 + 30 μl d'H₂O] et de PR135 (100 pmol/ μl) comme suit :

$$20 \mu\text{l PR134} + 20 \mu\text{l PR135} + 60 \mu\text{l d'H}_2\text{O}$$

III.3- Protocole d'amplification

200 ng d'ADNg des patients est amplifié dans un volume réactionnel de 20μl. L'ADN cible étant riche en CG, la Taq polymérase utilisée généralement dans une PCR classique est remplacée par l'ADN polymérase *Pfx* (Platinum[®]). Cette enzyme est extraite d'une souche recombinée de *Thermococcus* KOD et possède une activité 3'→5' exonucléasique. Elle est fournie sous forme inactive, liée à un anticorps Platinum R, son activité est rétablie après une

étape de dénaturation à 94°C, faisant ainsi un démarrage à chaud (*Hot start*) pour augmenter la spécificité, la sensibilité et le rendement de l'amplification (Sambrook et Maniatis 1989).

Pour chaque réaction de PCR, en plus du panel des malades, des échantillons témoins sont amplifiés simultanément, un témoin positif pour vérifier l'optimisation des conditions de l'amplification et un témoin négatif ne contenant que le mélange réactionnel sans ADNg, pour mettre en évidence d'éventuels « faux positifs » et donc pour vérifier la spécificité de la réaction (intra ou inter contamination).

Le mélange réactionnel est représenté au niveau du tableau 4.

Tableau 4. Mélange réactionnel de l'amplification

Produit	Volume (µl) 1X
ADN (200 ng/ µl)	1
Tampon 10X (Kit Platinum)	2
Mix Primers 1	3
MgSO ₄ (Kit Platinum)	0.6
dNTP 2mM (Promega)	2
PCR enhancer (Kit Platinum)	8
Platinum Pfx ADN polymérase	0.3
Mix Primers 2	4
H ₂ O	0.1
Mélange réactionnel	20

III.4-Conditions d'amplification

L'amplification assurée par un thermo-cycler (TECHNE 200) débute par une première phase de dénaturation à 95°C pendant 3 mn suivie de 28 cycles d'amplification selon le programme suivant :

- ◆ Dénaturation à 95°C pendant 15 s
- ◆ Hybridation à 64°C pendant 2 mn
- ◆ Elongation à 72°C pendant 2 mn

L'amplification est terminée par une phase d'élongation finale à 72°C pendant 10 mn.

Les amplicons sont rapidement mis à 4°C.

IV. Electrophorèse capillaire et génotypage

IV.1- Principe de l'électrophorèse capillaire

Le génotypage des microsatellites a été réalisé par criblage en utilisant un séquenceur automatique, ABI PRISM 3130 (96 puits) (*Applied Biosystems*).

Les différents profils alléliques sont visualisés grâce au marquage des microsatellites lors de l'amplification par PCR *via* l'utilisation d'une amorce marquée par un fluorochrome à son extrémité 5'.

Lors de l'électrophorèse capillaire les fragments marqués à la suite de l'amplification PCR sont séparés les uns des autres selon leur taille, le long d'un capillaire de silice rempli de tampon sous voltage élevé, puis détectés par fluorométrie (*Applied Biosystems 3500/3500XL Genetic Analyzer 2011*).

La séparation par électrophorèse capillaire possède une grande résolution et permet la détection de fluorochromes en l'occurrence FAM, 5-carboxyfluorescéine, fluorescent dans le bleu (locus FRAXA) et HEX, 6-carboxy 2',4',7', 4,7 -hexachlorofluorescéine, fluorescent dans le vert (locus FRAXE).

IV.2- Protocole de l'électrophorèse capillaire

Après une étape de dénaturation à 95°C pendant 5 mn, les produits PCR sont placés rapidement dans de la glace. 1 µl du produit de PCR est transféré dans un mélange réactionnel de 10 µl constitué de 10 µl de Formamide Hi-Di (*Applied Biosystem*) et 0.5 µl d'un marqueur de taille standard l'ILS 600 (*Internal Lane Standard 600 Promega*).

L'ILS 600 est une échelle qui comprend 22 bandes dont la taille varie de 60 pb à 600 pb. Les fragments de 60 à 200 pb sont espacés par des intervalles de 20 pb, les fragments de 200 à 500 pb sont espacés toutes les 25 pb, et les fragments de 500 à 600 pb sont espacés toutes les 50 pb. L'ILS 600 double-brin est asymétriquement marquée avec un fluorochrome la carboxy-X-rhodamine (CXR).

L'ILS 600 est utilisée pour assigner les tailles des fragments d'ADN cibles séparés par électrophorèse par détection de la fluorescence.

Les produits de PCR migrent par électrophorèse dans des capillaires contenant du polymère d'acrylamide POP 7 (Applied Biosystem).

De multiples mises au point ont permis d'obtenir les conditions adéquates de séparation, représentées au niveau du tableau 5.

Tableau 5. Conditions de la migration capillaire

Conditions pour 3130 Genetic Analyser	
Injection	1 µl d'ADN 15 s 1.6 Volt
Température de migration	60°C
Marqueur ILS 600	0.5 µl
Formamide Hi-Di	10 µl
Polymère utilisé	POP-7

IV.3- Génotypage des loci FRAXA et FRAXE par GeneMapper

Le marqueur de taille (ILS600), couplé à un fluorochrome est présent dans chaque puits et migre en même temps que l'ADN. Cela permet de calibrer et de définir la taille des différents allèles du microsatellite dans l'intervalle d'environ 50 à 500 pb. L'analyse des profils alléliques pour chaque marqueur pour les différents individus est réalisée à l'aide du logiciel GeneMapper (PE Applied Biosystems).

Le run est lancé en suivant les étapes suivantes :

IV.3.1- Le séquenceur ABI 3130

→ Ouvrir « Run 3130 Data Collection v 4.0 »

⇒ Ouverture de « SERVICE CONSOLE » : attendre que les cases deviennent vertes (sauf VIEWER)

- ⇒ Cliquer sur VIEWER, sélectionner START
- ⇒ Une fois que VIEWER est ouvert, cliquer sur (+) et ouvrir tous les menus

IV.3.2- Programmation et lecture du logiciel GeneMapper v4.0

Au niveau de l'ordinateur

- Aller dans PLATE MANAGER, sélectionner NEW
- Ouverture de NEW PLATE DIALOG et entrer des informations de l'analyse en cours :
 - ⇒ NAME : (La plaque est nommée : Initiales du malade)
 - ⇒ APPLICATION: Gene Mapper
 - ⇒ OWNER NAME: (Code BZ XFRA)
 - ⇒ OPERATOR NAME: (BZ XFRA)
 - ⇒ Cliquer sur OK
- Ouverture de GENEMAPPER PLATE EDITOR :
 - ⇒ SAMPLE NAME : 01, 02, 03, 04, 05, 06, jusqu'à 96 (qui correspondra au puits H12)
 - ⇒ RESULT GROUP (avant dernière colonne) : (mettre le code qui correspond au run, ce sera le dossier où aller chercher les résultats sur le disque E :/)
 - ⇒ INSTRUMENT PROTOCOL (dernière colonne) : (sélectionner XFRA)
 - ⇒ Sélectionner les 2 dernières colonnes (RESULT GROUP et INSTRUMENT PROTOCOL), puis faire Ctrl + D pour l'appliquer aux 96 individus
 - ⇒ Cliquer sur OK
- Une plaque est éditée tant qu'elle n'a pas été analysée par le séquenceur :
 - ⇒ Dans PLATE MANAGER
 - ⇒ Rechercher la plaque dans le mode « Advanced »
 - ⇒ Chercher la plaque en tapant son nom dans PLATE NAME
 - ⇒ Sélectionner la plaque et cliquer sur EDIT
 - ⇒ Modifier l'emplacement des puits, le SAMPLE NAME, le RESULT GROUP et l'INSTRUMENT PROTOCOL
 - ⇒ Cliquer sur OK
- Lorsque la plaque n'est pas complète :
 - ⇒ Faire entrer le numéro d'échantillon (SAMPLE NAME) exactement dans le puits où commence nos échantillons (SAMPLE NAME 01 dans le puits A8, 02 dans B8... etc.)
 - ⇒ Remplir les puits par groupe de 16

S'il n'y a pas assez d'échantillons pour remplir deux lignes, les puits sont remplis avec du formamide HI-Di (10 µl). Ces puits seront ignorés lors de l'analyse par le GeneMapper.

◆*Au niveau du séquenceur*

- ⇒ Appuyer sur TRAY et attendre que le charriot ne bouge plus pour ouvrir les portes du séquenceur
- ⇒ Enlever la ou les plaques déjà présentes.
- ⇒ Vérifier le niveau de polymère qui doit être suffisant pour le run
- ⇒ S'assurer qu'il n'y a aucune bulle dans les tuyaux et dans la pompe, sinon un BUBBLE REMOVE WIZARD doit être appliqué.
- ⇒ Mettre la plaque dans le support de plaque noir, puis les septas dans les trous de la plaque. (Figure 18)
- ⇒ Ensuite mettre le couvercle troué blanc par-dessus en le superposant bien sur les trous
- ⇒ Remettre le bloc dans le charriot (A1 en haut à droite) dans la position A (gauche) ou B (droite).

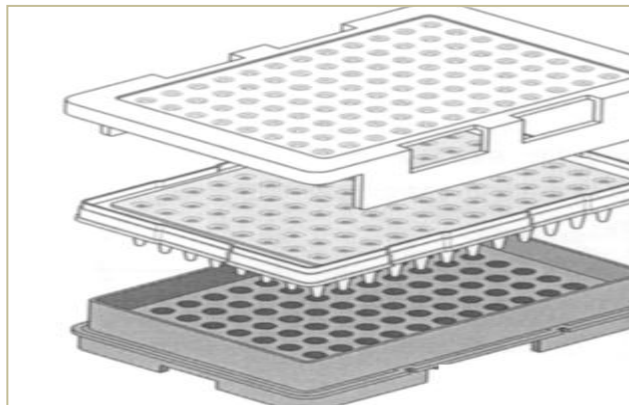


Figure 18. Plaque de run pour un séquenceur automatique ABI 3130

◆*Revenir sur l'ordinateur*

- ⇒ Cliquer sur RUN SCHEDULER et chercher la plaque à séquencer avec SEARCH (dans le mode « Advanced »)

- ⇒ Chercher notre plaque en tapant son nom dans PLATE NAME
- ⇒ Sélectionner notre plaque (STATUS « PENDING »)
- ⇒ Les plaques à droite : le rectangle devient jaune
- ⇒ Cliquer sur ce rectangle jaune : il devient VERT
- ⇒ En haut à gauche, attendre que la petite flèche devienne verte et cliquer dessus
- ⇒ Cliquer sur OK

◆ **Vérification en cours de séquençage** (Figure 19)

Environ 15 minutes après le début du run de séquençage, il faut s'assurer :

- Que les capillaires ne sont pas endommagés
 - ⇒ Dans le menu de gauche, cliquer sur CAPILLARIES VIEWER dans le sous-menu 3130 ; c'est la qualité des capillaires en temps réel durant le run.
- Que le courant du laser, la température du four et le voltage de l'appareil sont constants
 - ⇒ Dans le menu de gauche, cliquer sur EPT CHART dans le sous-menu 3130/Instrument STATUS, c'est l'électrophorèse en temps réel durant le run.
 - ⇒ Il faut s'assurer que tous les instruments (lignes) soient stables après 15-20 minutes.



Figure 19. Capture d'écran pendant le séquençage

◆**Vérification à la fin du séquençage** : Figure 20.

→ Il faut vérifier le bon déroulement du processus à la fin du séquençage des plaques

⇒ RUN HISTORY

⇒ Chercher la plaque en tapant son nom dans PLATE NAME

⇒ Sélectionner le run

⇒ CAPILLARY VIEWER dans le sous-menu de RUN HISTORY

⇒ EPT CHART dans le sous-menu de RUN HISTORY

⇒ Faire défiler tous les runs

→ Tous les runs (6 pour une plaque de 96 individus, 12 pour deux plaques) s'enregistrent sur le disque E : / dans le dossier sélectionné au départ (RESULT GROUP : XFRAX).

→ Il faut transférer les données sur un support externe en copiant les dossiers des runs.

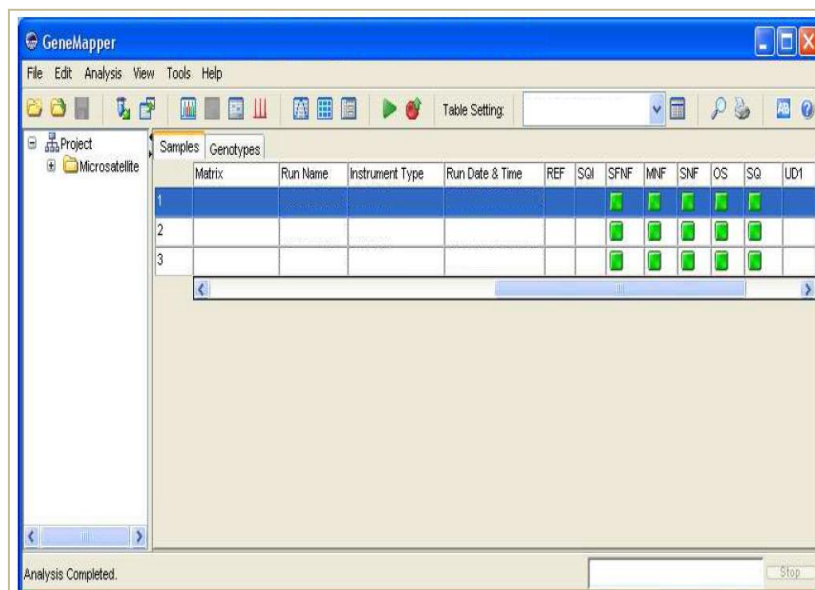


Figure 20. Capture d'écran à la fin du séquençage

◆**Lecture du logiciel GeneMapper**

→ Ouvrir le logiciel

⇒ Aller sur l'analyse de fragments XFRAX

⇒ Les dossiers sont transférés sur le disque E : / dans un dossier (IMAGE)

⇒ Ouvrir le logiciel GeneMapper

→ Créer une nouvelle analyse/Ajouter des échantillons

⇒ Cliquer sur « File/New Project/XFRAX/OK »

⇒ Cliquer une deuxième fois sur « File/ADD SAMPLES TO PROJECT/LOCAL DISK E : /IMAGE/nos runs »

⇒ Sélectionner les runs à ajouter puis cliquer sur « ADD TO LIST »

⇒ Une fois les runs sélectionnées, cliqué sur « ADD »

→ Analyser les échantillons

⇒ ANALYSIS METHOD : FRAGMENT

⇒ Panel : XFRA

⇒ Size Standard : ILS 600

⇒ Cliquer sur la flèche verte pour l'analyse des échantillons

⇒ Le logiciel demandera de sauvegarder notre analyse, cette plaque sera nommée comme sur le séquenceur

→ Ajuster l'ILS 600 (Figure 21)

⇒ Vérifier la colonne SIZING QUALITY, elle indique la qualité du marqueur (ILS 600)

⇒ Toutes les lignes où un octogone rouge apparaît seront sélectionnées

⇒ Cliquer sur « Size Match Editor »

⇒ Ouverture d'un graphique avec des pics orange

⇒ Pour chaque échantillon sélectionné, il y aura un graphique de l'ILS 600 associé

⇒ Il faut ajouter, enlever, repositionner ou changer les pics.

Dans certain cas, il y a juste un (ou quelques) pic aléatoire, le logiciel veut vérifier si les pics sont correctement nommés.

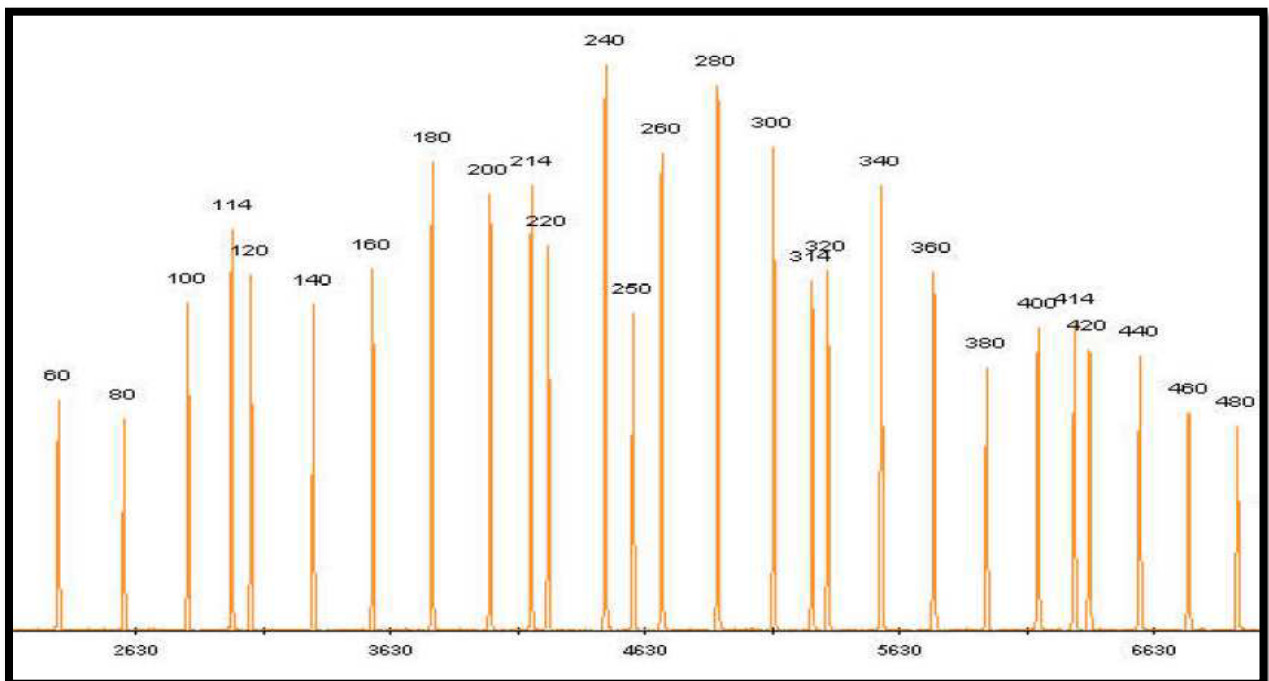


Figure 21. Graphique de l'ILS 600

En sélectionnant un pic, trois options sont proposées :

→ADD : Ajouter une pb si elle n'apparaît pas sur un des pics lui correspondant

→DELETE : Supprimer une pb quand elle se situe sur un mauvais pic

→CHANGE : Changer la pb du pic

⇒Lorsque tous les pics sont correctement assignés, cliquer sur « OVERRIDE SQ » en haut

⇒Répéter pour tous les échantillons où la SQ est de mauvaise qualité

⇒Lorsque les échantillons sont vérifiés, cliquer sur « APPLY » puis « Ok »

⇒Cliquer à nouveau sur la flèche verte

→Analyser les données

⇒Cliquer sur l'onglet « FRAGMENTS »

⇒Cliquer sur l'icône « Table Setting Editor »

⇒Cliquer sur l'onglet « FRAGMENTS », et s'assurer de trier les échantillons en ordre croissant par « SAMPLE NAME »

⇒Cliquer sur le multiplex

⇒Sélectionner tous nos individus en cliquant sur « SAMPLE NAME »

⇒Cliquer sur l'icône « Display Plots »

⇒Regarder chaque échantillon séparément et s'assurer que les pics sont bien identifiés

⇒Pour changer, ajouter ou supprimer un pic, il faut le sélectionner puis choisir l'option avec le bouton droit de la souris

Une fois tous les échantillons analysés, les deux colonnes avec les allèles (pb) sont « copier/coller » dans un fichier Excel, afin de créer une matrice de génotypage pour tous nos individus.

V. Transfert sur membrane par Southern-blot et hybridation moléculaire

Le détail du matériel et des réactifs utilisés est présenté au niveau de l'Annexe 6

V.1- Principe du Southern-blot

Les endonucléases de restriction sont des enzymes qui coupent l'ADN à des sites particuliers. Chaque enzyme coupant l'ADN uniquement à son site de reconnaissance spécifique, l'ADN total d'un individu, présent dans ses cellules nucléées, peut être coupé en fragments de tailles définies, d'une manière reproductible (Suzuki et al., 1986). Les fragments d'ADN individuels peuvent alors être sélectionnés, ligaturés dans des vecteurs adaptés, multipliés et étudiés. Grâce à la répartition irrégulière des sites de restriction, les fragments d'ADN diffèrent par leur taille. Le mélange initial de fragments d'ADN est en premier trié suivant le critère de la taille, grâce à une électrophorèse dans un gel (Strachan et Read 2012). Un protocole permet ensuite de détecter les fragments d'ADN cibles par buvardage ou Southern blot, baptisé ainsi par E. Southern qui développa cette méthode en 1975 (Figure 22).

L'analyse commence avec l'ADN génomique, l'ADN est isolé puis digéré par des enzymes de restriction. Un (ou plusieurs) de ces fragments, non encore identifié, contient le gène ou une partie du gène recherché. Les fragments sont séparés en fonction de leur taille dans un gel (le plus souvent, de l'agarose) dans un champ électrique donc par électrophorèse. La vitesse de migration d'un fragment est inversement proportionnelle à sa taille, d'autant plus rapide que la taille est petite, d'autant plus lente que la taille est grande. Ensuite, les fragments contenus dans le gel sont transférés sur une membrane de nitrocellulose ou de nylon.

L'ADN est ensuite dénaturé par traitement alcalin puis fixé à la membrane sous l'action de la chaleur (environ 80°C) ou par irradiation aux UV. La membrane est alors incubée avec une sonde d'ADN (ADN génomique ou ADNc simple brin), complémentaire du gène d'intérêt. La sonde hybride spécifiquement avec le fragment complémentaire recherché.

La sonde étant marquée par un isotope radioactif ^{32}P , le fragment recherché peut être repéré en plaçant un film radiosensible sur la membrane. Après développement du film, le fragment est visualisé sous la forme d'une bande noire (autoradiographie). La taille du fragment est corrélée à sa position, et on la définit à l'aide de fragments d'ADN de tailles connues qui ont migré en parallèle dans le gel lors de l'électrophorèse (Echelle moléculaire).

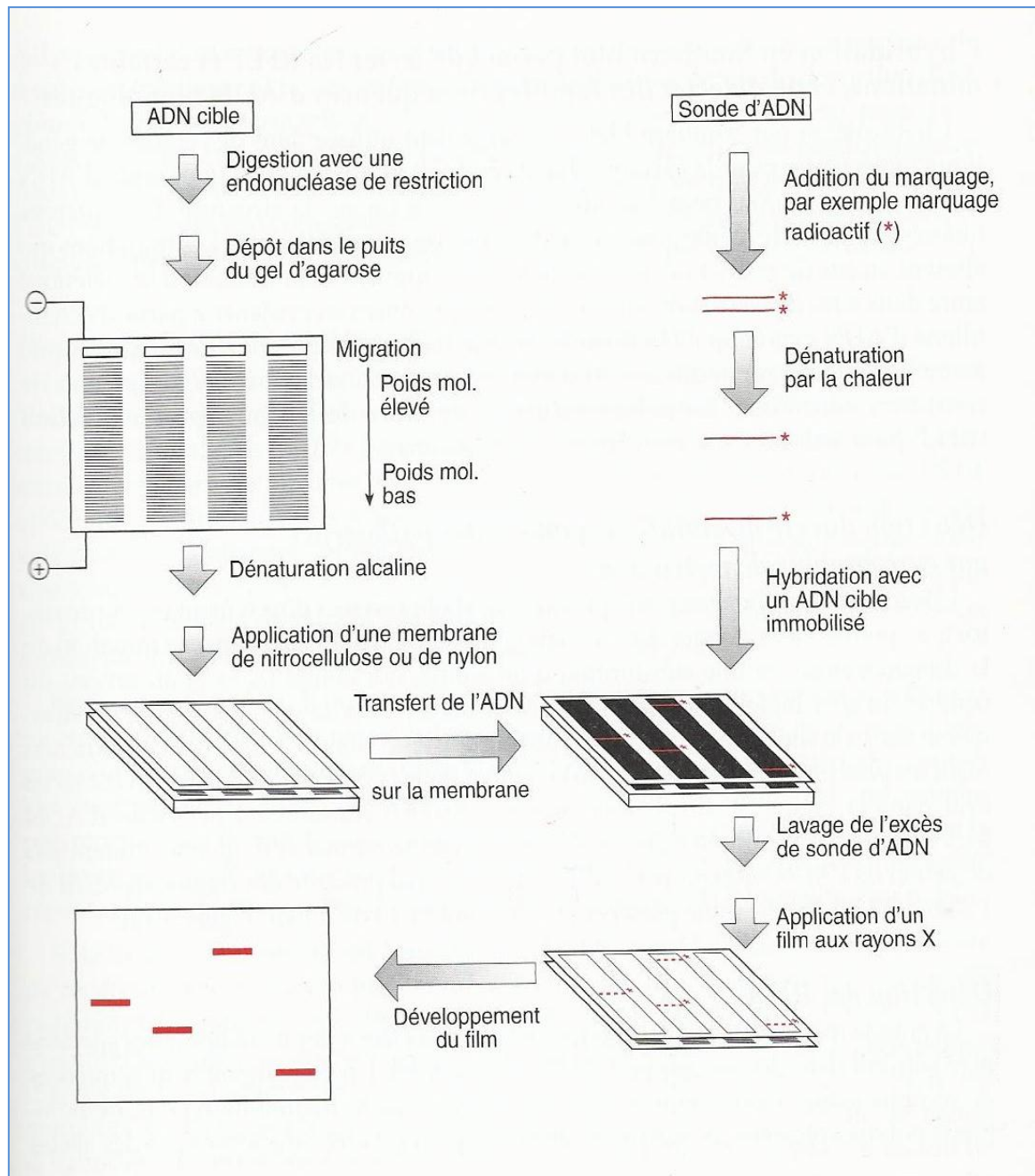


Figure 22. Principe du Southern-blot

V.2- Protocole du transfert sur membrane

La totalité de la procédure dure à peu près 13 jours au cours desquels les différentes étapes du Southern-blot sont réalisées : une double digestion de l'ADNg par les enzymes de restrictions EcoRI et EagI, la séparation électrophorétique des fragments de digestion obtenus sur gel d'agarose, leur transfert sur membrane puis leur hybridation avec la sonde *Stb-12.3*. Cette sonde s'hybride en amont de l'ilot CpG à l'extrémité 5'UTR du locus *FMRI* (Figure

23). La séquence nucléotidique (Figure 24) recouvre ainsi les sites de restriction d'EcoRI et d'EagI. Cette dernière ne coupe pas si son site est méthylé.

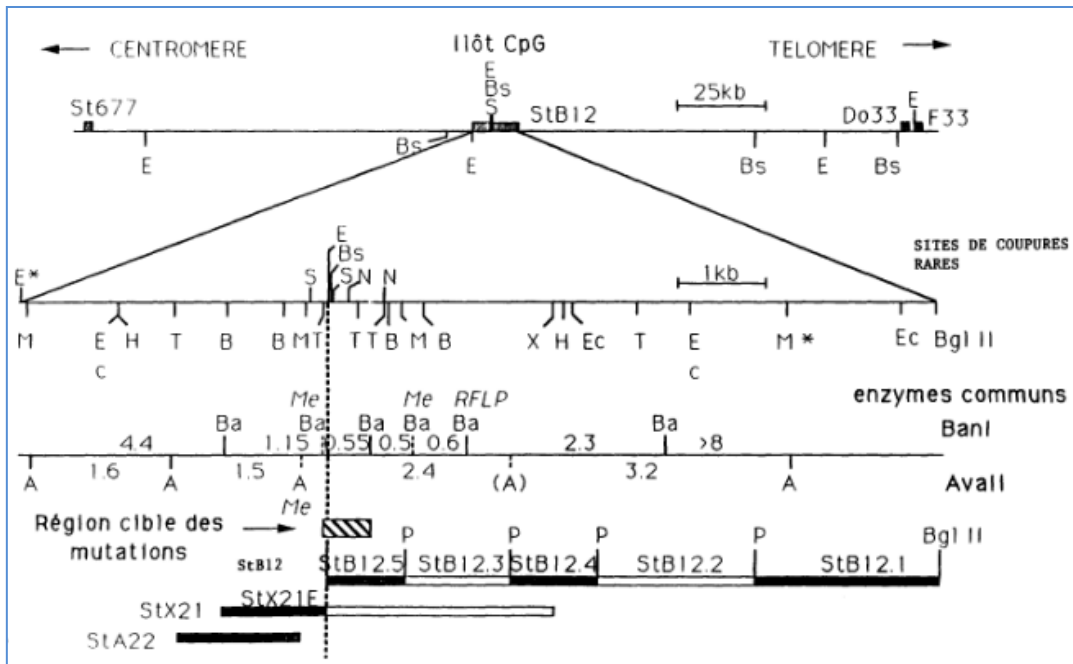


Figure 23. Localisation de la sonde *Stb-12.3*

	1510	1520	1530	1540	1550
	GCCTGCCCTA	GAGCCAAGTA	CCTTGTAGAA	AGCGCCATTG	GAGCCCCGCA
	CGGACGGGAT	CTCGGTTTCAT	GGAACATCTT	TCGCGGTAAC	CTCGGGGCGT
	1560	1570	1580	1590	1600
	CTTCCACCAC	CAGCTCCTCC	ATCTTCTCTT	CAGCCCTGCT	AGCGCCGGA
	GAAGGTGGTG	GTCGAGGAGG	TAGAAGAGAA	GTCGGGACGA	TCGCGGCCCT
	1610	1620	1630	1640	1650
	GCCC GCCCCC	GAGAGGTGGG	CTGCGGGCC	TCGAGGCCCA	GCCGCGCCG
	CGGCGGGGG	CTCTCCACCC	GACGCCCGG	AGCTCGGGT	GCGCGGGCG
	1660	1670	1680	1690	1700
	CCGCGCGCGC	CGCGCGCGCC	TCCGCGCGCG	CCGCGCGCGC	CGCGCGCGCG
	CGCGCGCGCG	GCGCGCGCGG	AGCGCGCGCG	GCGCGCGCGG	GCGCGCGCGG
	1710	1720	1730	1740	1750
	GCGCTGCCGC	ACGCCCCCTG	GCAGCGCGCG	CTCCGTCACC	GCCGCGCGCG
	CGCGACGGCG	TGCGGGGGAC	CGTCGCGCGG	GAGGCAGTGG	CGGCGGGCGG
	1760	1770	1780	1790	1800
	GCGCTCGCCG	TCGGNCCGCC	GNCCGCTCAG	AGGCGGCCCT	CCACCGGAAG
	CGCGAGCGCG	AGCCNCGCGG	CNCGCGAGTC	TCCGCGGGGA	GGTGCGCCTC
	1810	1820	1830	1840	1850
	TGAAACCGAA	ACGGAGCTGA	GCGCCTGACT	GAGGCCGAAC	CCCCGGCCCC
	ACTTTGGCTT	TGCCCTGACT	CGCGGACTGA	CTCCGGCTTG	GGGGCCGGGC
	1860	1870	1880	1890	1900
	CTGCGGGTGT	AAACACTGAA	ACCACGTAC	CTGATCACG	CTGTTCCTC
	GACGCCACA	TTTGTGACTT	TGGTGACGTG	CACTAGTTC	GACAAGGGAG
	1910	1920	1930	1940	1950
	CCGCGCGCGG	CTCAGCCCCT	CGGCCCGGCC	CTCTCTCTTC	AAGTGGCCTG
	GGCGCGCGCG	GAGTCGGGGA	GCCGGGGCGG	GAGAGAGAAG	TTCACCGGAC
	1960	1970	1980	1990	2000
	GGAGCGCGCG	CATGCGCGCT	GCTGGGAAC	GGCCGCGGTG	CGGGGTCGAA
	CCTCGCGCGC	GTACGCGCGA	CGACCCCTTG	CCGGGTCAC	GGCCCCAGCTT
	2010	2020	2030	2040	2050
	AGACAGACGC	NGCGGCCGGG	CGTGCAGCGG	CTTGGTGGAG	GGCGGGAAGG
	TCTGTCTGCG	NGCCCGGCC	GCACGCGCCC	GAACCACCTC	CCGCCCTTC
	2060	2070	2080	2090	2100
	CTGAAGGGCG	GTGACAGGTC	GCACCTGCCTC	GCGAGGGCCA	GAACGCCCAT
	GACTTCCCGC	CACTGTCCAG	CGTGACGGAG	CGCTCCCGGT	CTTGGCGGTA
	2110	2120	2130	2140	2150
	TTCTGCAGAG	GTGCACTCAG	TGGCGTGGGA	AATCAAATGC	ATCCGGTTAT
	AAAGCGTCTC	CACGTGAGTC	ACCGCACCCCT	TTAGTTTACG	TAGGCCAATA
	2160	2170	2180		
	CCAGTTCGGC	CTCTCTGGGA	TTCCGCGGGA	GGG	
	GGTCAAGCCG	GAGAGACCCCT	AAAGCGCGCT	CCC	

Figure 24. Séquence de reconnaissance de la sonde *Stb-12.3*

V.2.1- Digestion de l'ADNg

L'ADNg des patients ayant présentés un profil électrophorétique anormal est digéré en parallèle avec l'ADNg des témoins, comprenant :

- Un témoin normal pour les deux sexes
- Un témoin prémutée de sexe féminin
- Un témoin muté de sexe féminin
- Un témoin muté de sexe masculin

Le panel des témoins a été gracieusement fourni par le laboratoire de biochimie médicale et biologie moléculaire, Faculté de médecine, Clermont-Ferrand.

Pour un volume total de 40 μ l, la solution de digestion est composée de :

- ◆ 27 μ l d'H₂O
- ◆ 5 μ l de tampon de digestion
- ◆ 5 μ l de BSA spermidine
- ◆ 1.5 μ l EagI 10 UI/ μ l
- ◆ 1 μ l EcoRI 10 UI/ μ l

La durée de la digestion est de 22 h, elle comprend 3 phases d'incubation de respectivement 5 h, 18 h et 8 h.

Les tubes contenant 10 μ l d'ADNg (0.5 μ g/ μ l) dans 40 μ l de solution de digestion sont placés dans un bain-marie à 37°C pour la première phase d'incubation. Après 5 h puis 18 h, 1.5 μ l d'EagI et 1 μ l EcoRI sont rajoutés pour la deuxième et troisième phase d'incubation.

Au bout de 8 h, 5 μ l de bleu d'arrêt (soit 10 % du volume total) est ajouté pour stopper la digestion et pour alourdir les prélèvements. Les tubes sont agités doucement à la main et les prélèvements sont ainsi près à être déposés sur le gel d'agarose pour la migration.

V.2.2- Electrophorèse sur gel d'agarose

◆ Préparation du gel : Avant la fin de la digestion, le gel d'agarose à 0.8 % (1.6 g d'agarose dans 200 ml de TBE 1X) est coulé pour une solidification minimum de 1 h 30 mn.

12 μ l de BET sont rajoutés au gel avant solidification pour la visualisation ultérieure par détection des bandes digérées sous UV.

La totalité des échantillons digérés (50 μ l) et le bleu d'arrêt (2 μ l) sont déposés au niveau des puits en parallèle avec 12 μ l de l'échelle à 1 μ g/ μ l (1Kb DNA Ladder ; invitrogen[®]).

La migration se fait dans des cuves d'électrophorèse horizontales remplies de TBE 1X à 74 V pour toute une nuit.

♦ Visualisation des bandes : Le gel est placé sur une platine UV avec une règle fluorescente, le gel est mesuré à partir des puits ainsi que les différentes bandes de l'échelle (12 pb \rightarrow 2 pb). Une fois les mesures prises, le gel est découpé au raz des bandes d'ADN, l'échelle est éliminée pour ne pas altérer l'hybridation moléculaire des bandes digérées avec la sonde.

Le gel découpé est encore une fois mesuré (hauteur à partir du bas du gel / largeur des 4 cotés A, B, C et D), une encoche est faite sur l'angle supérieur droit pour donner une orientation au gel. (Figure 25)

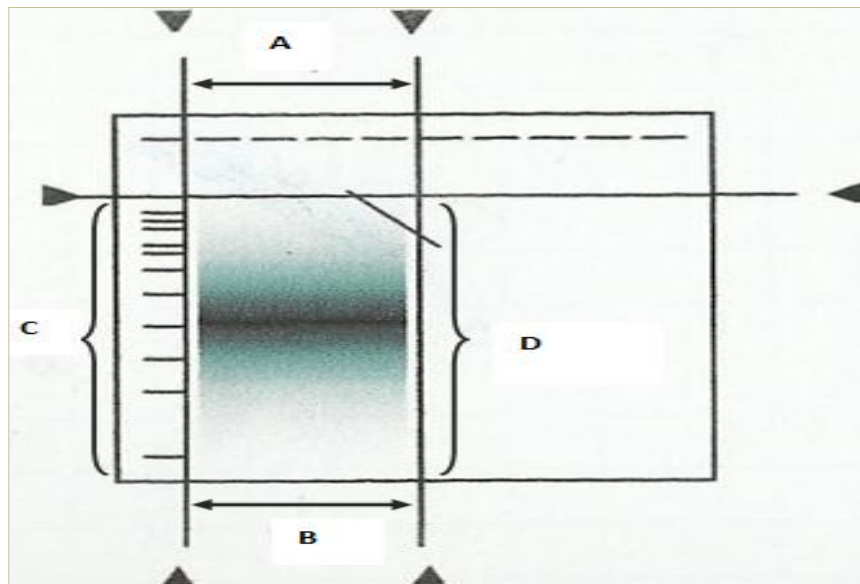


Figure 25. Mesure et découpage du gel

♦ Traitements du gel :

Avant le transfert de l'ADN sur membrane, le gel doit subir plusieurs traitements.

*Dépuration : avec une solution d'HCl à 0.25 N pendant 10 mn, puis le gel est rincé avec de l'eau ultra-pure stérile.

*Dénaturation : avec une solution de NaOH à 0.5 M et de NaCl à 1.5 M pendant 30 mn puis le gel est rincé avec de l'eau ultra-pure stérile.

*Neutralisation : avec une solution de Tris à 0.5 M et de NaCl à 1.5 M pH : 7.2, pendant 15 mn.

V.2.3-Transfert sur membrane

La membrane utilisée Hybond N⁺ (Amersham[®]) est brièvement pré-trempée dans du SSPE 20X puis positionné sur le gel lui-même posé sur du papier Wattman[®] au niveau de l'apparatus du Southern-blot. Des couches de papier absorbant, environ 10 cm de hauteur, sont empilées sur la membrane, le transfert se fait sur toute une nuit.

Après le transfert, les bandes d'ADN sont fixées à la membrane dans un four à UV (0.120 pendant 10 s).

V.2.4- Pré-hybridation

La pré-hybridation consiste à la saturation avec de l'ADN spermatique de saumon des sites de fixation de la membrane capables de capter de l'ADN non spécifique.

La membrane est placée dans un rouleau à hybridation, très peu de SSC 2X est rajouté, juste pour mouiller la membrane pour qu'elle adhère aux parois du rouleau, l'excédent est éliminé. 12 ml du liquide d'hybridation (40% de formamide) préchauffé à 65°C sont versés dans le rouleau. Ce dernier est placé dans une étuve rotative à 65°C pour 5 h.

V.2.5- Préparation de la sonde

Dans un tube de 500 µl, 2 µl de sonde *Stb 12-3* (fournie par Le Centre de Recherche sur le *Fragile X, Strasbourg*) sont rajoutés à 19 µl d'H₂O, le tube est placé 5 mn au bain-marie à 100°C puis plongé dans de la glace pour 5 mn.

Après centrifugation, 3 µl du mélange dGTP, dATP et dTTP (Kit Nonaprimer) et 20 µl de solution tampon (Kit Nonaprimer) sont rajoutés.

La suite des manipulations se fait derrière un écran de protection en plexiglas.

5 µl de dCTP marqué au ^{32}P (Kit RadPrime DNA) sont ajoutés avec 2 µl de l'enzyme Klenow, le tube est centrifugé pour 15 s. Le tube est étanchéifié et placé dans un bain-marie à 37°C pendant 30 mn.

Il est ensuite centrifugé afin d'éviter les projections et 5 µl de tampon stop sont rajoutés (Kit Nonaprimer).

◆ Mesure de l'activité radioactive

Une colonne en verre est placée sur un support vertical, avec une pipette en verre avec au bout de la laine de verre, du TE 1X est versé dans la colonne puis du sephadex en alternant du moins épais et du plus épais tout en rajoutant du TE 1X pour que la colonne ne se dessèche pas.

Une fois la colonne prête, 200 µl de TE1X sont pipetés avec la totalité de la sonde et sont placés dans la colonne. 4 fois 200 µl de TE1X sont rajoutés dans la colonne.

Cette dernière est placée au-dessus d'une série de tubes de 1.5 ml.

100 µl de TE1X sont rajoutés dans la colonne.

Une fois que 2 gouttes sont récupérées dans le premier tube, un deuxième tube est placé sous la colonne puis 100 µl de TE1X sont rajoutés de nouveau pour récupérer 2 autres gouttes et cela jusqu'à l'obtention de 8 tubes.

Les tubes avec la radioactivité la plus forte sont rassemblés et 10 µl de sondes sont placés dans un tube de 500 µl pour effectuer la mesure de la radioactivité et calculer la quantité de formamide à 40% qui sera rajoutée pour avoir la sonde à la bonne concentration ($3.5 \cdot 10^6$ µg/µl).

La mesure du taux de comptage d'une source radioactive avec un détecteur, correspond au nombre de désintégrations *défectées* par unité de temps, ou le nombre de coup par minute (Cpm*).

La mesure de l'activité d'une source radioactive représente le nombre de désintégration par minute (Dpm*) à l'intérieur de cette source.

La radioactivité Cpm* est dans un premier temps mesurée au niveau d'un compteur puis convertie en Dpm* selon la formule suivante, ce qui permet de calculer la quantité de formamide à rajouter.

$$\text{CPM}^* \times 10^3 \times 2.2 = \text{DPM}^* 10^3$$

$$\text{DPM}^* \times 10^3 \times 50 \text{ (si 5 tubes, 60 si 6 tubes)} = \text{DPM}^* 10^6 \text{ totaux}$$

$$\text{DPM}^* 10^6 \text{ totaux} / 3.5 = \text{Quantité de formamide (40\%)}$$

Dans notre étude, deux gels (Gel 1 et Gel 2) ont été transféré par Southern blot.

Le calcul du taux de radioactivité du gel 1 est représenté au niveau de la figure 26.

S#	TIME	CPMA	SIS	FLAG
1	1.00	363973.	21.278	

Figure 26. Taux de comptage de la radioactivité du gel 1

$$364 \times 10^3 \text{ Cpm}^* \times 2.2 = 800.8 \times 10^3 \text{ Dpm}^* \times 50 = 40.0 \times 10^6 \text{ Dpm}^* \text{ totaux} / 3.5$$

$$= \mathbf{11.4 \text{ ml}} \text{ de 40\% de formamide.}$$

Le calcul du taux de radioactivité du gel 2 est représenté au niveau de la figure 27.

S#	TIME	CPMA	SIS	FLAG
1	1.00	358951.	20.680	

Figure 27. Taux de comptage de la radioactivité du gel 2

$$358 \times 10^3 \text{ Cpm}^* \times 2.2 = 787 \times 10^3 \text{ Dpm}^* \times 50 = 39.35 \times 10^6 \text{ Dpm}^* \text{ totaux} / 3.5$$

$$= \mathbf{11.2 \text{ ml}} \text{ de 40\% de formamide.}$$

Le volume adéquat de formamide est donc rajouté à la sonde et le tube est placé au bain-marie à 100°C pendant 5 mn pour la dénaturation, puis plongé dans de la glace pour 5 mn pour empêcher sa réassociation.

Après une brève centrifugation, la totalité de la sonde est vidée dans le rouleau à hybridation contenant la membrane.

Le rouleau est placé dans une étuve rotative à 42°C pour 20 h maximum.

V.2.6- Lavage de la membrane et mise en cassette

Le rouleau est vidé puis une solution de SSC 0.5 et de SDS 0.1% y sont rajoutés. Le rouleau est ensuite placé 15 mn à 60°C. Cette opération est répétée 4 fois.

Une bandelette Stratagène[®] est exposée quelques minutes à la lumière pour l'emmagasiner puis dans une chambre noire, positionnée au-dessus de la membrane dans une cassette Kodak[®] avec 2 films X-ray (Figure 28).

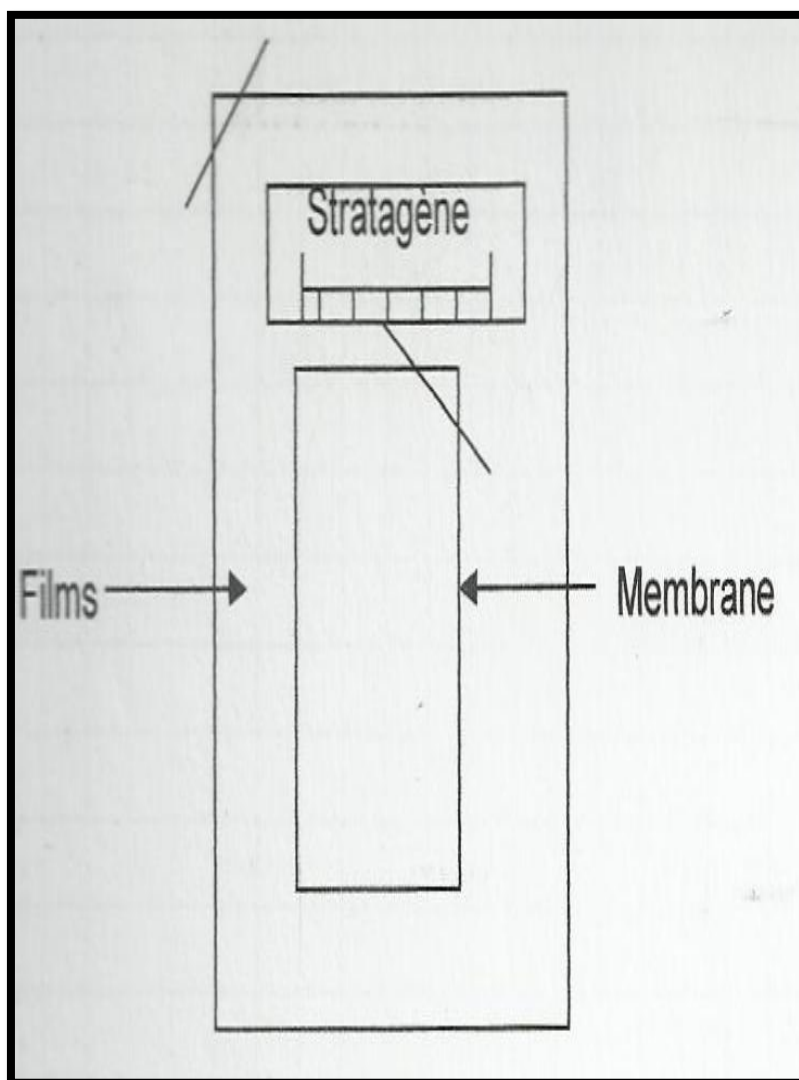


Figure 28. Disposition de la membrane dans la cassette

La cassette est ensuite placée à - 80°C pendant minimum 8 jours pour le premier film et 12 jours pour le deuxième film.

La révélation des films est réalisée au niveau d'une développeuse de film radiographique. Pour chaque gel transféré (Gel 1 et Gel 2), une fiche technique est remplie, spécifiant les enzymes de restrictions utilisées, le numéro du filtre, le volume de la colonne, les CPM* et DPM* totaux (Tableau 6).

Tableau 6. Fiche technique des gels

	Caractéristiques Gel 1 (volume, concentration...)	Caractéristiques Gel 2 (volume, concentration...)
ADN dénaturé	2 µl	2 µl
dATP, dGTP, dTTP	3 µl	3 µl
Tampon	20 µl	20 µl
H2O	19 µl	19 µl
Gel agarose (15 x 20)	0.8%	0.8%
Electrophorèse	74 V/16h	74 V/16h
dCTP (32P)	5 µl	5 µl
Enzymes	EagI, EcoRI	EagI, EcoRI
Colonne	500 µl	500 µl
Cpm*	364 10³	358 10³
Dpm*	40 10⁶	39.35 10⁶
N° Filtre	Z 01	Z 02
Température d'hybridation	42°C	42°C
Pré-hybridation	12 ml 40% Formamide	12 ml 40% Formamide
Mouillage blot	SSC 2X	SSC 2X
40% Formamide rajouté	11.4 ml	11.2 ml
Sonde	3.5 10 ⁶ µg/µl	3.5 10 ⁶ µg/µl
Temps d'exposition	12 jours	12 jours

RESULTATS
ET
INTERPRETATIONS

I. Echantillonnage biologique

L'échantillon primaire (ne comprenant que des malades) est constitué de 55 patients dont l'âge est compris entre 2 et 20 ans.

Le sexe ratio est de 0.38 avec 15 individus de sexe féminin (27.3%) et 40 individus de sexe masculin (72.7%).

Des recrutements supplémentaires ont été effectués incluant ainsi 3 individus de sexe féminin et 2 individus de sexe masculin, n'ayant pas de signes cliniques mais apparentés à au moins un propositus de l'échantillon primaire, amenant l'effectif total de l'échantillon étudié à 60 individus.

Pour chaque axe étudié (génotypage, polymorphisme, distribution et hétérozygotie), l'échantillonnage a été restructuré et cela pour la conformité des résultats obtenus (*Annexe7*).

Les patients atteints de déficience mentale ont été divisés en deux groupes selon la présence ou l'absence de signes autistiques (Figure 29), puis en deux sous-groupes selon le sexe (Figure 30).

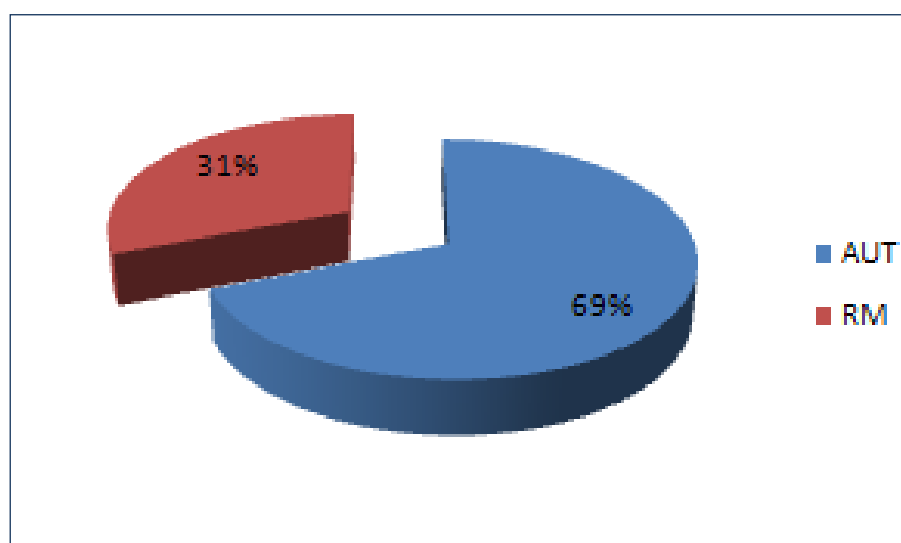


Figure 29. Répartition des malades selon les critères cliniques
AUT : autiste RM : retard mental

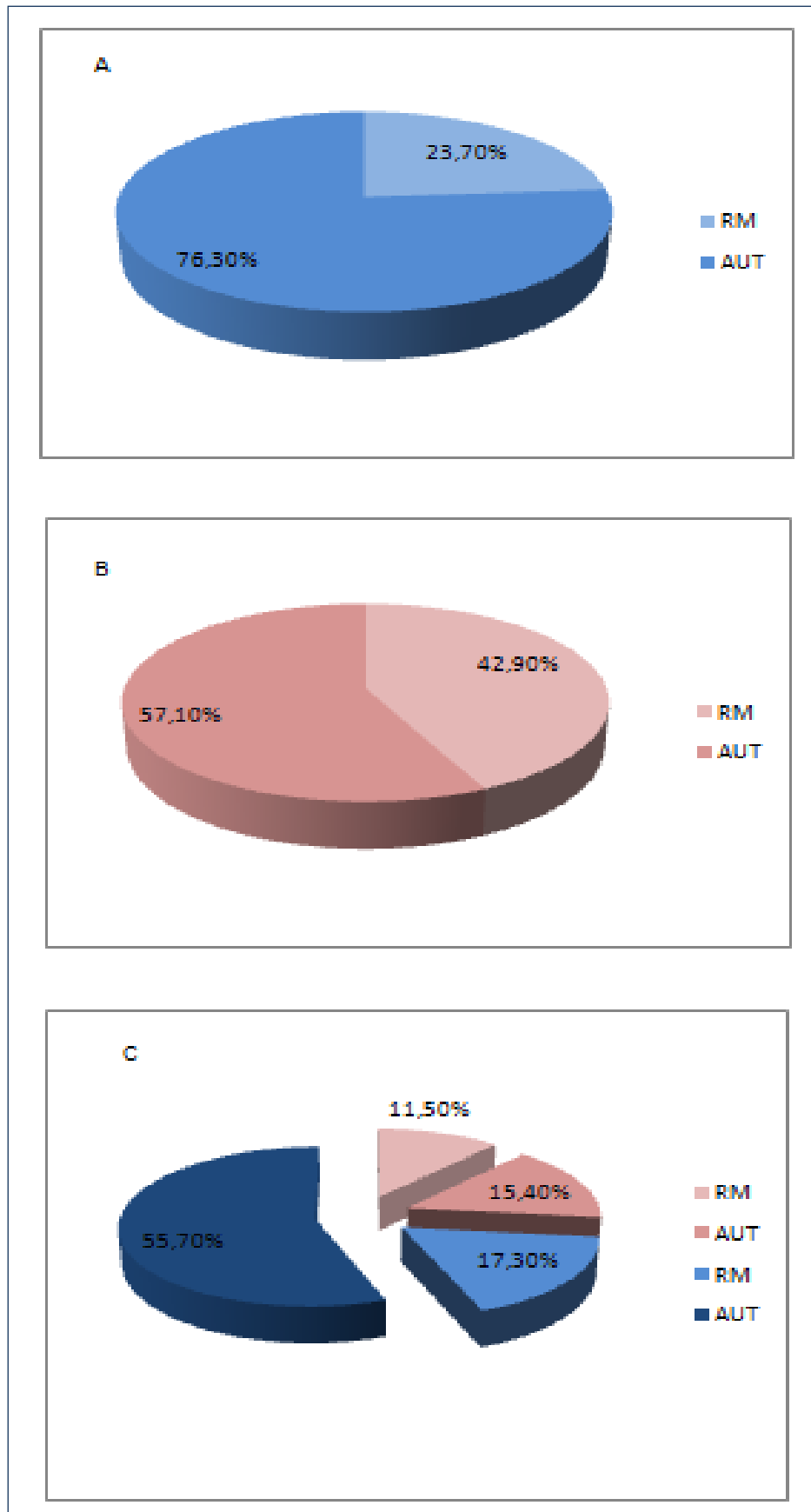


Figure 30. Répartitions des malades de sexe masculin (A), de sexe féminin (B) par rapport aux critères cliniques RM et AUT (C)

I.1-Patient autistiques

Pour la majorité des cas recrutés (69%) le diagnostic posé est la présence d'une déficience mentale couplée à des signes du spectre autistique (Figure 31) avec les manifestations cliniques les plus fréquentes telles que :

- Stéréotypie gestuelle :
 - balancement du corps
 - battement des mains
- Communication :
 - absence du langage
 - retard du langage (très restreint)
- Troubles :
 - de l'attention
 - regard fuyant
- Angoisses :
 - de la séparation
 - de l'imprévu et de l'inconnu

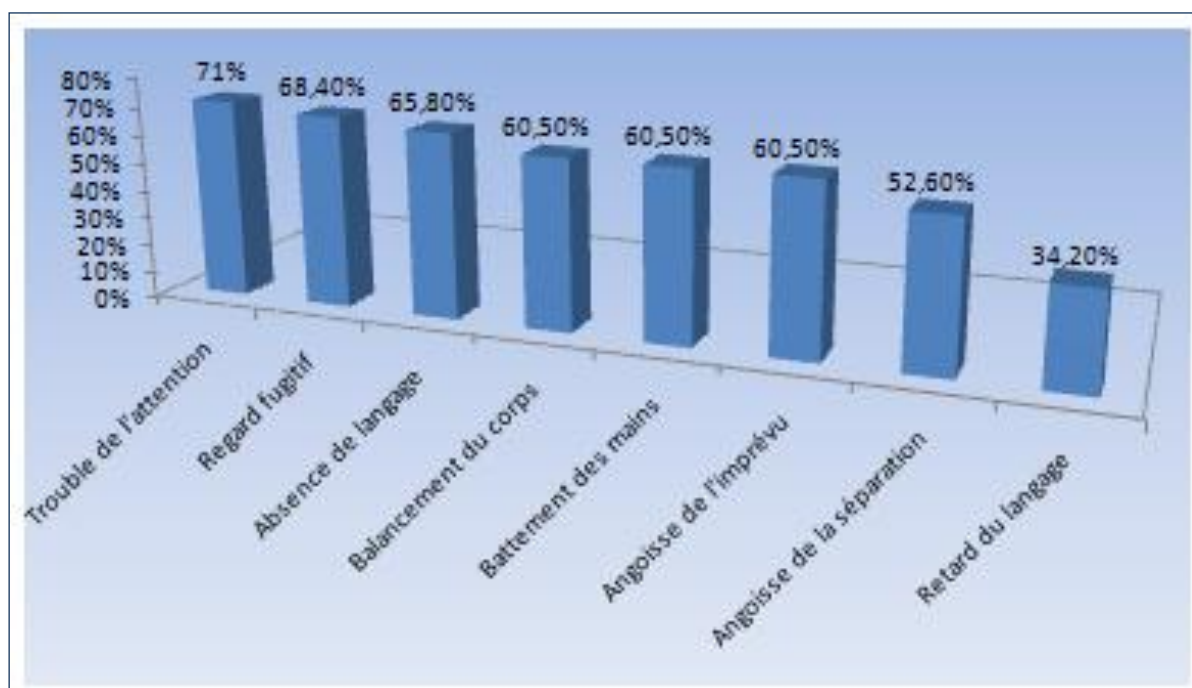


Figure 31. Association des différents troubles cliniques des AUT

I.2-Patients RM

Le reste des malades (31%) présentent un retard mental à étiologie inconnue, diagnostique posé par observation des signes cliniques suivants :

Un quotient intellectuel (QI) inférieur à 50-40 (RM modéré),

Un QI à 40-20 (RM grave)

Un QI inférieur à 20 (RM profond) (Figure 32)

Et/ou : (Figure 33)

- Hyperactivité
- Absence totale de communication
- Impossibilité de suivre une scolarité « spécialisée »
- Agressivité
- Automutilation

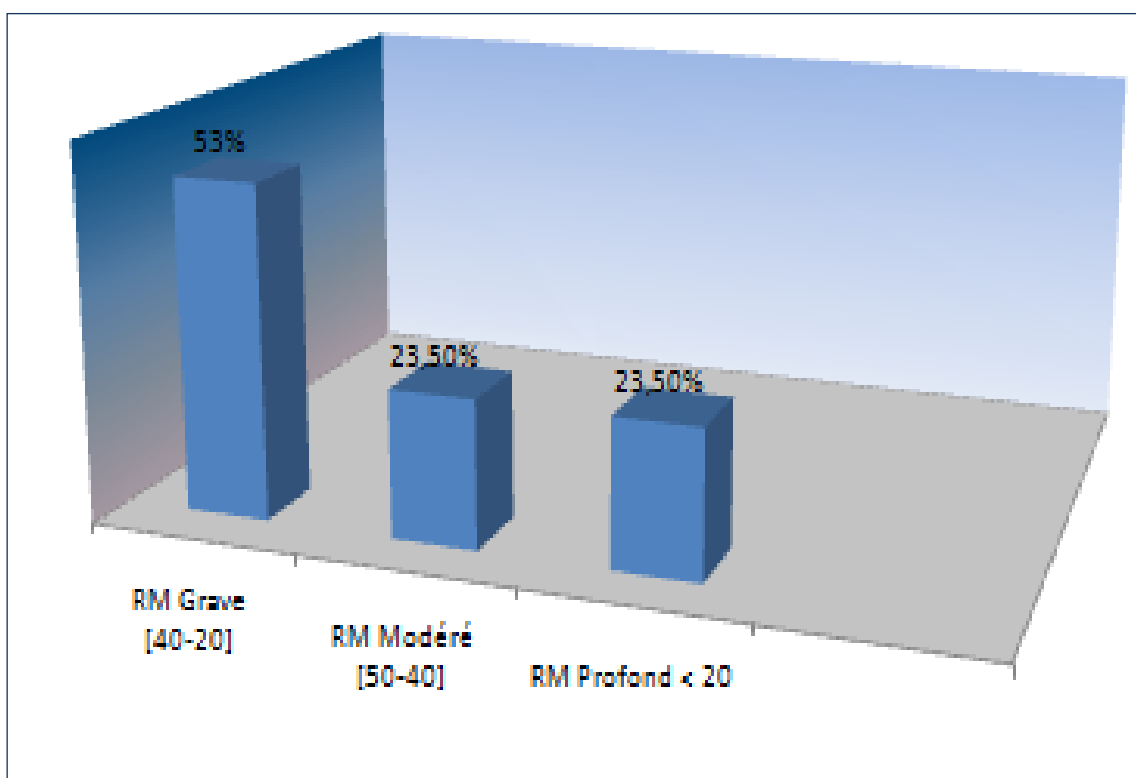


Figure 32. Répartition des RM selon le score du QI

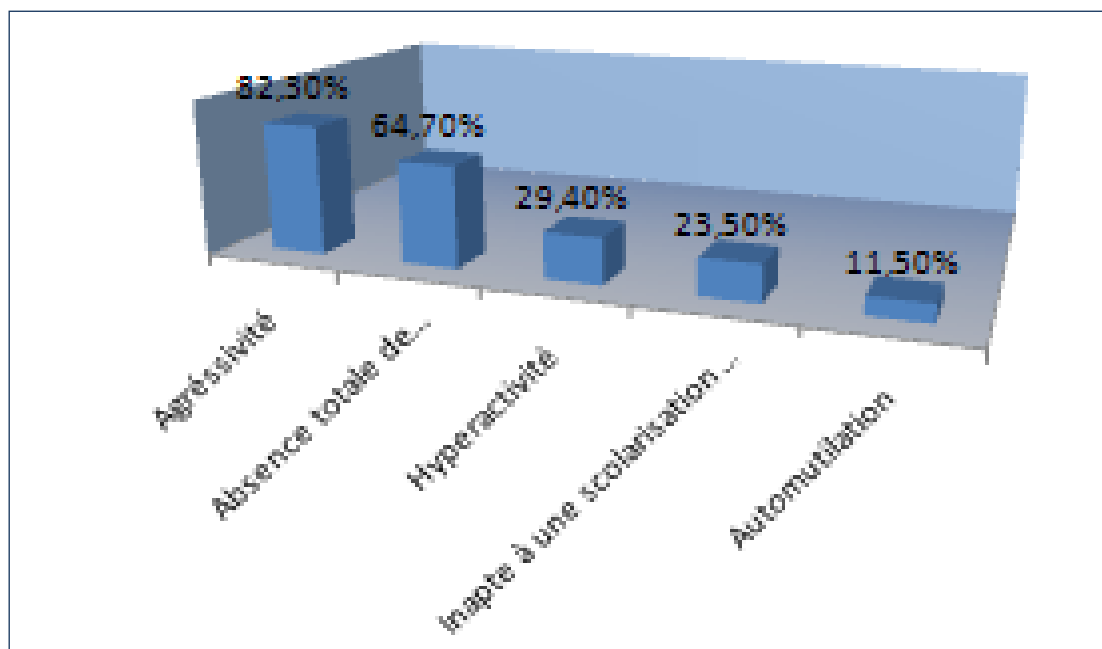


Figure 33. Distribution des différents signes cliniques des RM

II. Génotypage des patients au locus FRAXA

II.1- Détermination de la taille des répétitions

Le génotypage comporte deux étapes : la première étape consiste à l'amplification de la région cible (FRAXA) à l'aide d'amorces marquées (FAM) de façon à générer des produits de PCR fluorescents, la deuxième étape consiste à la détermination de la taille du produit obtenu à l'aide d'un séquenceur ABI 3130.

Les produits de PCR migrent par électrophorèse dans des capillaires contenant une matrice de séparation le polymère POP 7, et sont ainsi séparés en fonction de leur taille.

Le marqueur de taille (ILS 600) migre en même temps que les produits de PCR permettant de déterminer la longueur des fragments à analyser.

Les profils de migration sont générés sous forme d'électrophorégramme et un logiciel (GeneMapper v 4.0) retranscrit ces données en calculant la taille des fragments analysés en nombre de paires de base (pb).

Les allèles sont donc identifiés par leur taille (pb), ce qui permet d'obtenir les allèles de chaque individu pour le locus analysé, et par conséquent le nombre de répétition des triplets CGG au niveau du gène FRAXA (Sherman 1996).

◆ Ainsi, un individu de sexe féminin est considéré comme hétérozygote normale lorsque son profil présente deux pics (un pour chaque chromosome X) avec une taille comprise entre 223 et (325-355) pb +/- 1.

◆ Si le profil ne présente qu'un pic unique au niveau d'un individu de sexe féminin, cela peut suggérer l'homozygotie pour l'allèle analysé (le même allèle sur les deux chromosomes X) ou bien la présence d'un allèle prémuté/muté et donc non amplifié.

◆ Un individu de sexe masculin est considéré porteur de l'allèle normal lorsque son profil présente un pic unique avec une taille comprise entre 223 et (325-355) pb +/- 1 ; par contre l'absence de pic met en évidence la présence d'un allèle trop long pour être amplifié et donc la présence de prémutation ou de mutation complète.

Dans notre étude, l'analyse des fragments par génotypage a révélé la présence de différents allèles représentés au niveau du tableau 7.

Les détails sont représentés au niveau de l'Annexe 8.

Tableau 7. Résultat du génotypage du locus *FMRI* effectué sur les 60 individus

N°	Sexe	N/P	Tailles allèles pb
1	F	TI	298.3/ ?
2	M	BAM	280.64
3	M	MTE	303.9
4	F	OJ	296.3/290.3
5	M	AL	296.16
6	F	ZM	299.14/197.19
7	M	GME	302.1
8	M	BA	299.06
9	F	KZ	296.55/267.22
10	M	BO	272.69
11	M	BA	272.57
12	F	BAS	328.38/273.07
13	M	BS	290.35
14	M	AJ	328.36

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

15	M	HSE	299.06
16	M	HA	296.12
17	M	MN	297.12
18	M	AN	343.82
19	M	BMA	297.7
20	F	BR	299.39/293.1
21	F	BJ	300.66/294.41
22	M	BI	291.22
23	M	MM	324.9
24	M	LSMC	297.32
25	M	DK	297.65
26	M	BDE	302.13
27	F	RI	304.85/296.05
28	F	AM	302.3/296.48
29	M	AMO	296.58
30	M	ZM	284.48
31	M	GAM	302.48
32	F	AMD	299.32/296.47
33	M	SAE	293.31/296.21
34	M	GYMI	272.82/275.27
35	M	HAE	296.65
36	M	MBHK	258.11
37	M	GLM	293.9
38	M	KC	-
39	F	KLM	296.65/ ?
40	F	KL	296.51/ ?
41	M	BAM	266.51
42	M	BRM	301.34
43	M	TS	307.09
44	M	BA	292.95
45	M	DH	295.76
46	M	OZE	304.01
47	F	RN	298.67/275.33

48	M	CH	266.69
49	M	SA	292.87
50	F	KA	295.77/266.5
51	F	ZLY	298.66/292.84
52	F	AR	301.45/295.79
53	M	KO	266.63
54	F	BM	315.76/295.68
55	M	MMA	293.57
56	M	BAN	284.45
57	M	LC	275.68
58	F	DW	296.17/293.25
59	M	BSE	296.14
60	M	NS	266.48

II.2-Individus non apparentés

II.2.1- Individus de sexe masculin

La majorité des profils obtenus (90%) correspondent à un allèle normal illustré par la présence d'un pic unique avec une taille comprise entre 258 pb et 307 pb.

Chaque électrophorégramme de malade est encadré par celui d'un individu normal, témoin positif (cadre du haut), et par celui d'un témoin négatif (cadre du bas). (Figure 34)

Chaque électrophorégramme est suivi d'un tableau représentant les valeurs correspondantes de chaque pic en pb (Tableau 8).

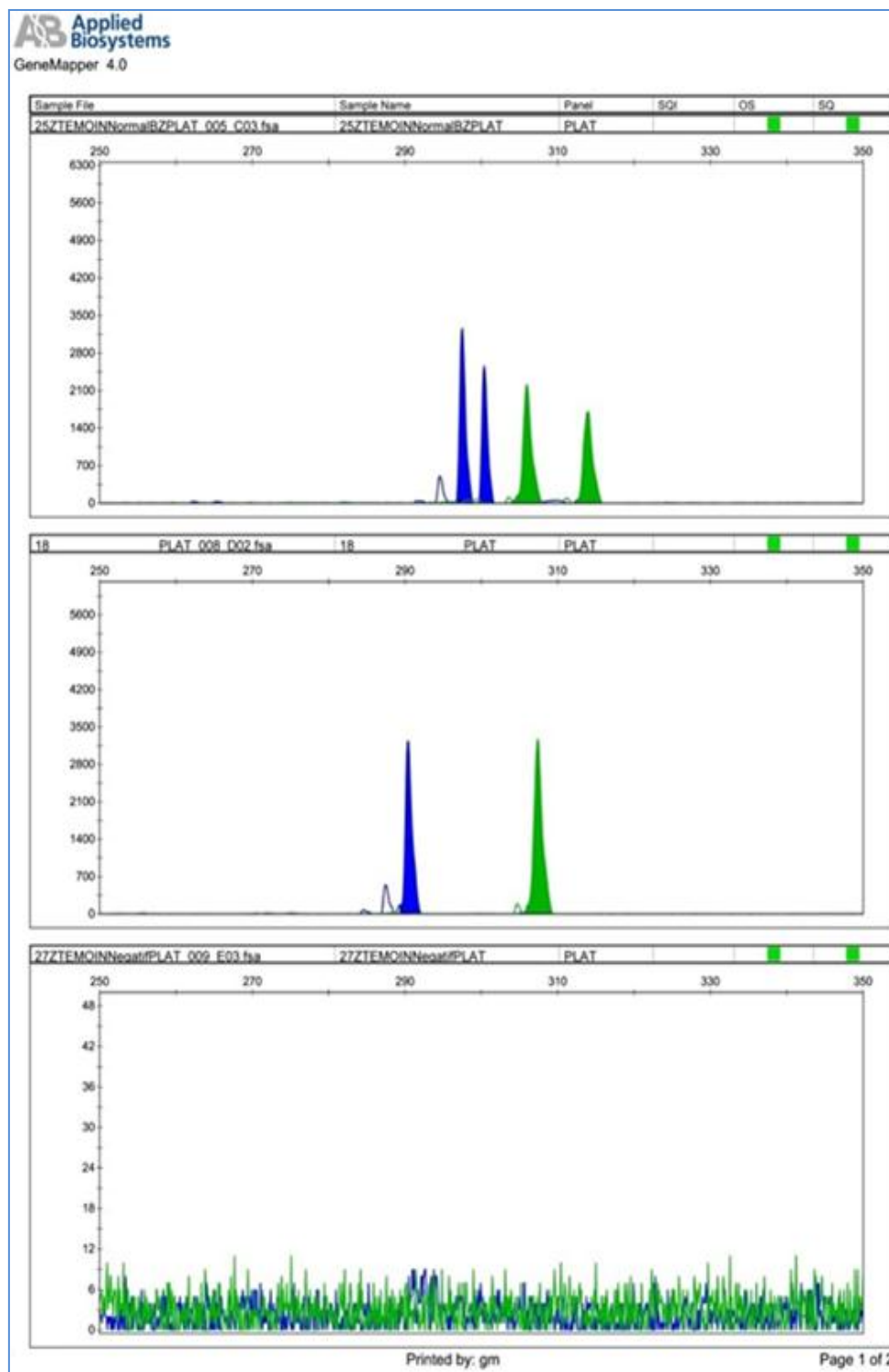


Figure 34. Electrophorégramme de l'individu (18 XY PLAT 008 D02) représentant un pic unique (en bleue) correspondant à une bande normale de 290.35 pb
 Chaque code individuel comprend : pour l'individu (18 XY PLAT 008 D02)
 Le numéro d'identification dans le panel des malades : 18
 Les initiales des noms et prénoms : XY
 L'identification PLAT qui correspond au numéro de série dans l'analyse : 008
 Et à la position de l'échantillon sur la plaque du run : D 02

Tableau 8. Taille en pb du fragment amplifié du patient (18 XY PLAT 008 D02)
FRAXA (bleue) FRAXE (vert)

Applied Biosystems GeneMapper 4.0					
		Sample File Name	Size	Area	Data Point
1	■	25ZTEMOINNormalBZPLAT_005_C03.fsa	297.5	29894	3841
2	■	25ZTEMOINNormalBZPLAT_005_C03.fsa	300.38	22566	3871
3	■	25ZTEMOINNormalBZPLAT_005_C03.fsa	305.98	29976	3930
4	■	25ZTEMOINNormalBZPLAT_005_C03.fsa	313.96	25102	4014
5	■	18 PLAT_008_D02.fsa	290.35	34721	3838

◆ 5 % des profils obtenus ont révélé la présence d'un pic unique correspondant à un allèle se trouvant dans la zone intermédiaire entre allèle normal et allèle instable mais non prémuté (zone grise) : **20AJPLAT012F02** et **24ANPLAT003B03**.

***Cas 20AJPLAT012F02**

Patient de sexe masculin âgé de 11 ans, diagnostiqué avec un RM modéré (QI 30-40) sans signes autistiques apparents. Le tableau clinique comprend un langage quasi-inexistant avec une agressivité traduite par des crises de colère. Le patient présente une morphologie faciale caractéristique du syndrome de l'X fragile avec un visage allongé et des oreilles décollées. Le troisième signe de la triade, la macrorchie, n'a pas été déterminé.

L'électrophorégramme du patient présente un pic unique mais avec une taille de 328.36 pb qui va au-delà de la zone normale, sans pour autant être dans la zone de prémutation. (Figure 35 ; Tableau 9)

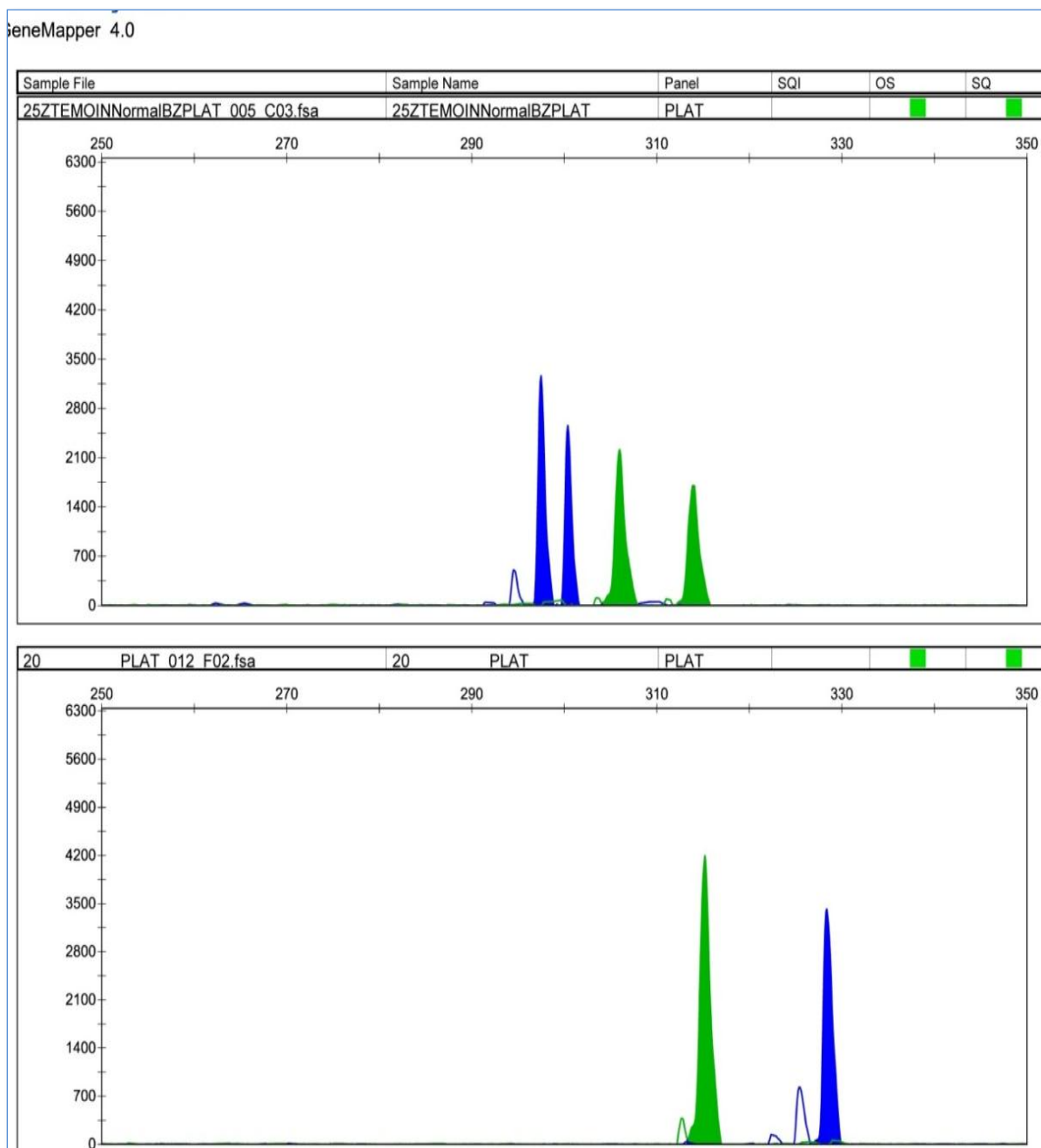


Figure 35. Electrophorégramme du patient (20AJPLAT012F02) représentant un pic unique (en bleue) correspondant à une bande de 328.36 pb

Tableau 9. Taille de la bande amplifiée du patient (20AJPLAT012F02)

GeneMapper 4.0					
		Sample File Name	Size	Area	Data Point
1	■	25ZTEMOINNormalBZPLAT_005_C03.fsa	297.5	29894	3841
2	■	25ZTEMOINNormalBZPLAT_005_C03.fsa	300.38	22566	3871
3	■	25ZTEMOINNormalBZPLAT_005_C03.fsa	305.98	29976	3930
4	■	25ZTEMOINNormalBZPLAT_005_C03.fsa	313.96	25102	4014
5	■	20PLAT_012_F02.fsa	328.36	40955	4263

***Cas 24ANPLAT003B03**

Patient de sexe masculin âgé de 7 ans, diagnostiqué avec un RM modéré (QI 30-40) sans signes autistiques apparents. Le tableau clinique comprend un retard de langage, un retard psychomoteur et des troubles du comportement (hyperactivité), avec absence de la triade caractéristique du syndrome de l’X fragile. L’électrophorégramme du patient présente un pic unique mais avec une taille de 343.82 pb qui va au-delà de la zone normale, sans pour autant être dans la zone de prémutation. (Figure 36 ; Tableau 10)

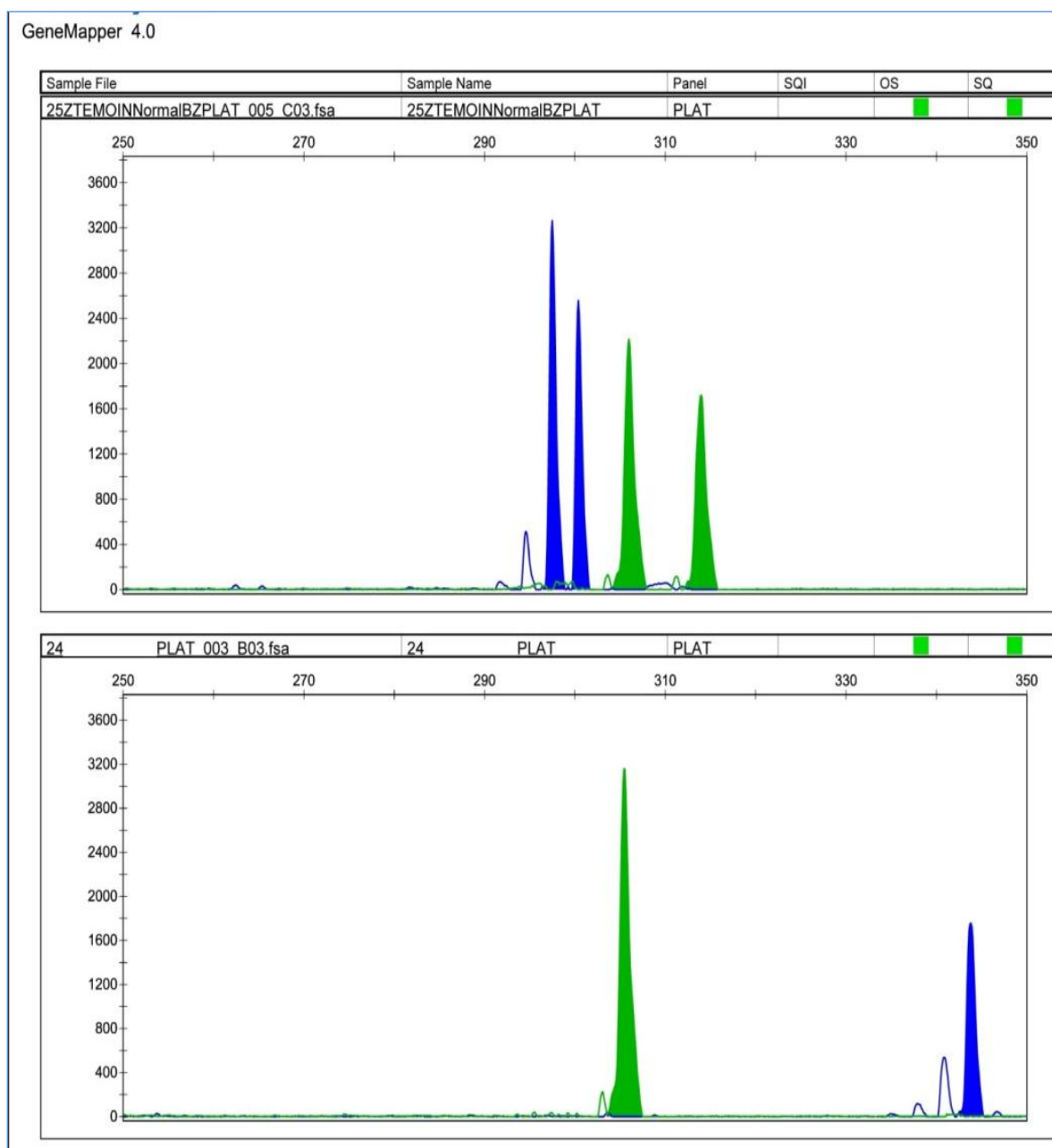


Figure 36. Electrophorégramme du patient (24ANPLAT003B03) représentant un pic unique (en bleu) correspondant à une bande de 343.82 pb

Tableau 10. Taille de la bande amplifiée du patient (24ANPLAT003B03)

GeneMapper 4.0					
		Sample File Name	Size	Area	Data Point
1	■	25ZTEMOINNormalBZPLAT_005_C03.fsa	297.5	29894	3841
2	■	25ZTEMOINNormalBZPLAT_005_C03.fsa	300.38	22566	3871
3	■	25ZTEMOINNormalBZPLAT_005_C03.fsa	305.98	29976	3930
4	■	25ZTEMOINNormalBZPLAT_005_C03.fsa	313.96	25102	4014
5	■	24PLAT_003_B03.fsa_	343.82	20186	4300

◆ 5% des profils obtenus ont révélé la présence de deux pics correspondant chacun à un allèle se trouvant au-dessous du seuil critique : **49SAPLAT015H11** et **50GYMIPLAT002A12**.

***Cas 49SAPLAT015H11**

Patient de sexe masculin âgé de 10 ans, diagnostiqué autiste (AUT) avec un tableau clinique comprenant une apathie, une timidité, un manque d'initiative, une fatigabilité excessive et de faibles capacités intellectuelles, avec absence de la triade caractéristique du syndrome de l'X fragile. L'électrophorégramme du patient présente deux pics avec respectivement une taille de 293.31 pb et de 296.21 pb. (Figure 37)

***Cas 50GYMIPLAT002A12**

Patient de sexe masculin âgé de 14 ans, diagnostiqué autiste avec un tableau clinique comprenant une passivité et une anxiété excessive, une immaturité, et la présence de difficultés d'apprentissage avec absence de la triade caractéristique du syndrome de l'X fragile. L'électrophorégramme du patient présente deux pics avec respectivement une taille de 272.82 pb et de 275.27 pb. (Figure 37)

La présence de deux pics aurait mis en évidence la présence d'un deuxième X, caractéristique du syndrome de Klinefelter (47XXY), mais l'absence d'un deuxième pic sur le locus FRAXE, suggère plutôt qu'un des signaux de l'ILS est tellement élevé que le logiciel l'a identifié comme un second pic « *misidentify a shoulder* » Après vérification, nous avons retrouvé « the shoulder » de l'ILS. Le « *sizing fails* » relative au second pic des deux patients a eu lieu sur le même run. (Figure 38)

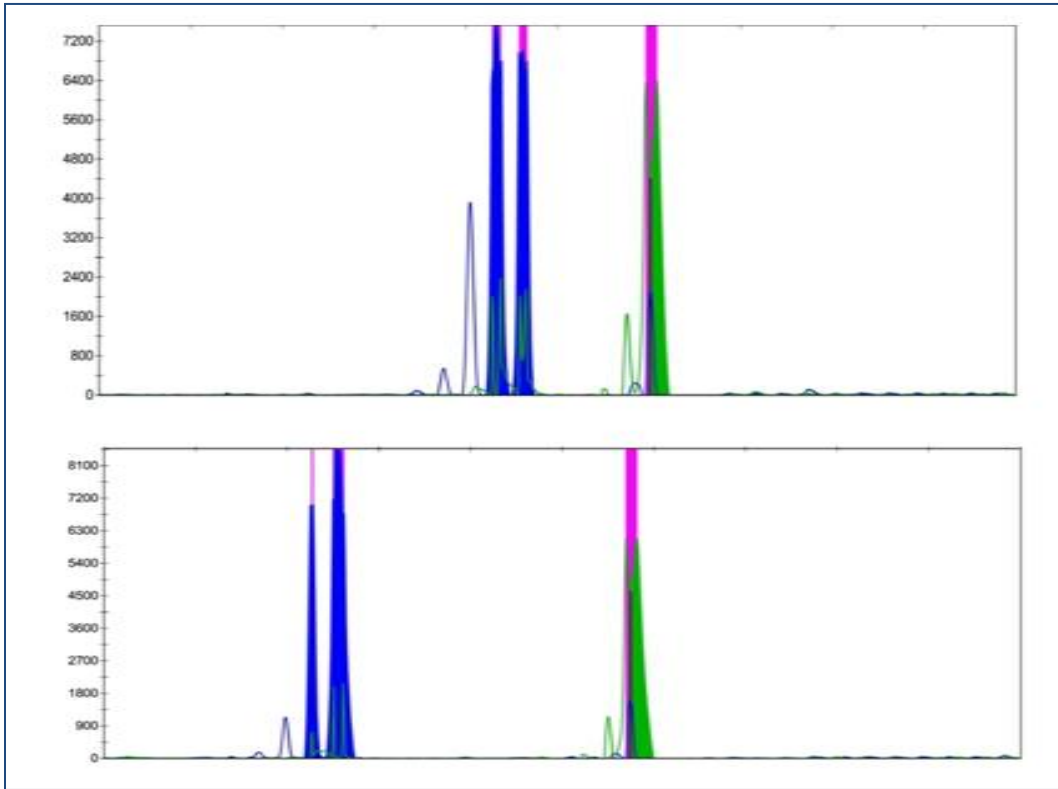


Figure 37. Electrophorégrammes des patients (49SAPLAT015H11) et (50GYMIPLAT002A12) représentant deux pics au locus FRAXA (bleue) et un pic au locus FRAXE (vert)

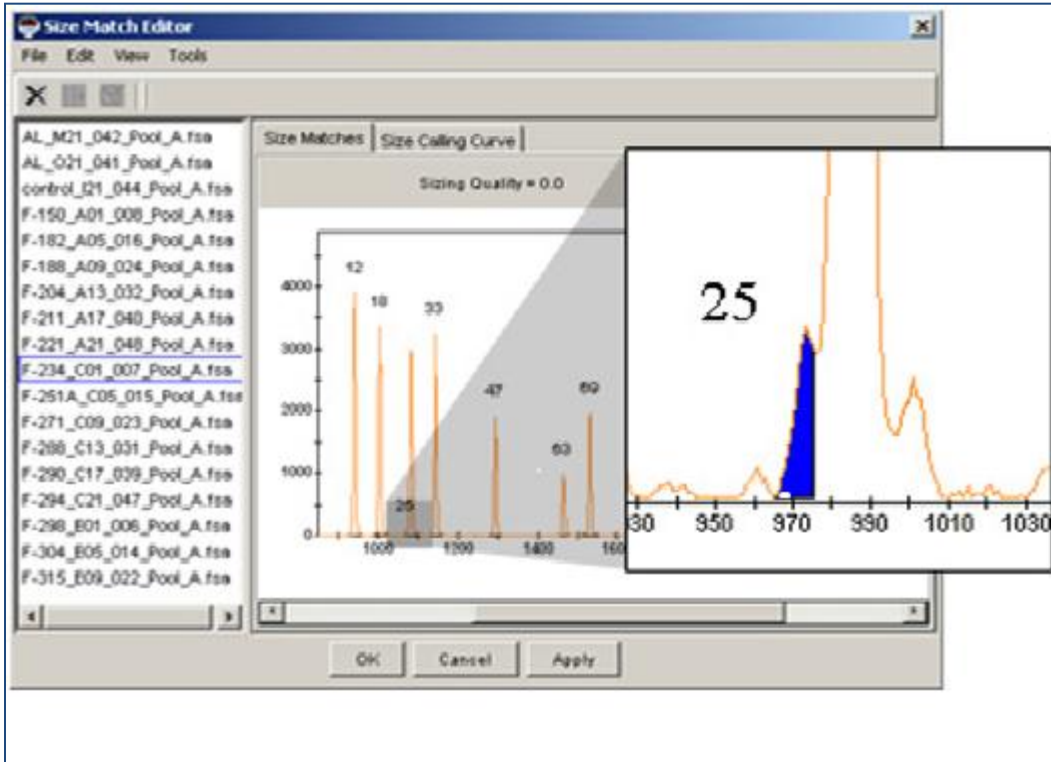


Figure 38. Pic incorrectement étiqueté de l'ILS (*shoulder*)

II.2.2- Individus de sexe féminin

◆ 90.9% des profils ont mis en évidence la présence de deux pics avec une taille comprise entre 267 et 315 pb chez 11 individus de sexe féminin à l'exception d'un seul cas *1TIPLAT006C06* (9.09 %) où le profil électrophorétique a présenté un seul pic.

*Cas 1TIPLAT006C06

Patiente de sexe féminin âgée de 5 ans atteinte d'un retard mental modéré (QI 30-40). Le tableau clinique comprend un retard psychomoteur léger, des problèmes de concentration et une mauvaise coordination spatiale avec des troubles du comportement et de la relation (timidité et anxiété massives).

Le profil électrophorétique met en évidence un seul pic d'une taille de 293 pb suggérant qu'un des deux chromosomes X porte le locus normal.

L'absence d'un deuxième pic peut être dû à l'amplification d'un allèle de même taille sur le deuxième chromosome X (cas d'homozygotie) ou bien peut être expliqué par l'absence d'amplification due à la présence d'une mutation complète ou d'une prémutation (Figure 39 ; Tableau 11).

Ce type de profil électrophorétique est une indication pour une recherche moléculaire plus approfondie. Pour définir le statut de cette malade, une hybridation moléculaire a donc été effectuée.

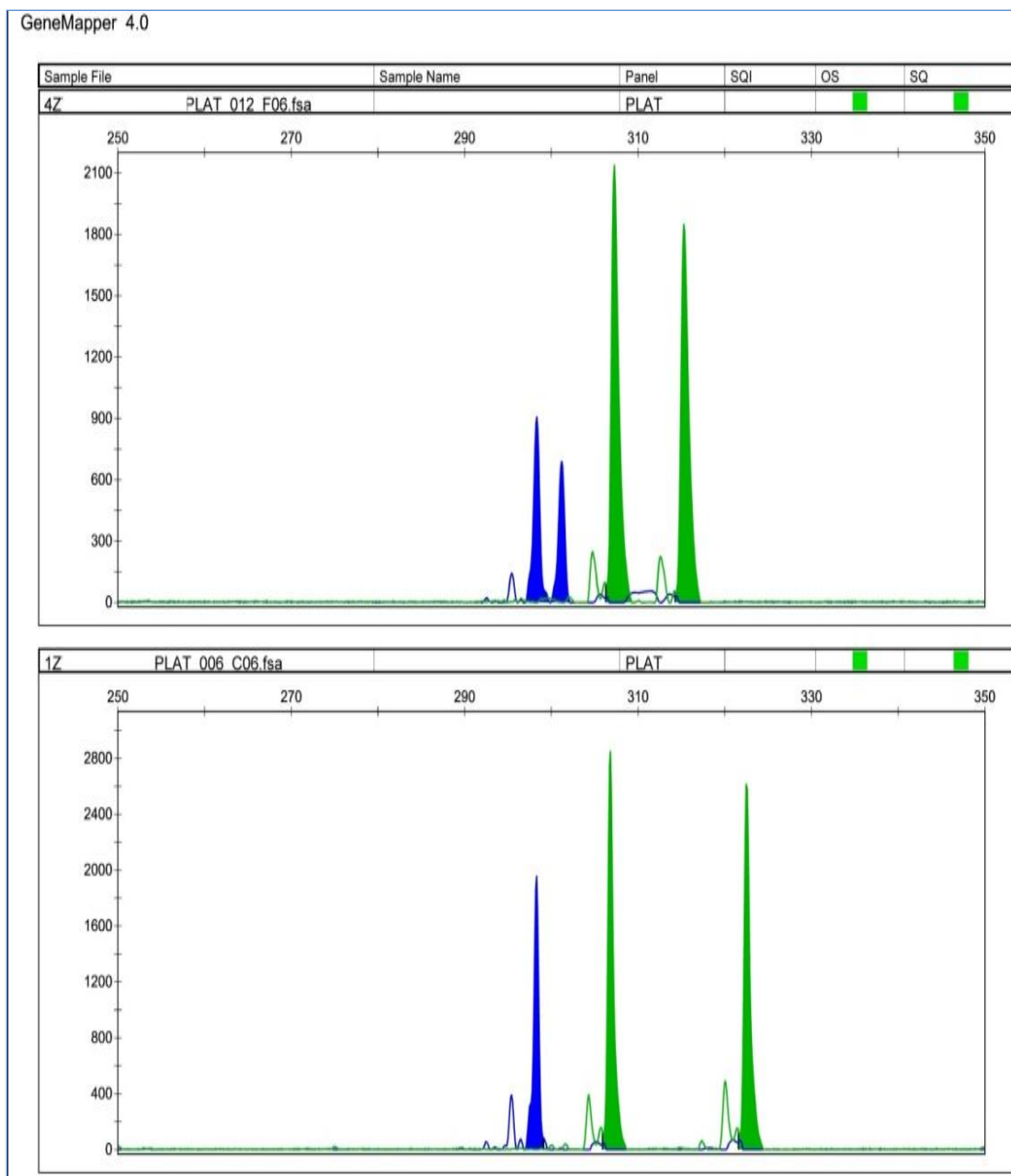


Figure 39. Electrophorégramme de la patiente (1TIPLAT006C06) ne présentant qu'un seul pic suggérant ou une homozygotie ou un allèle muté ou un allèle pré-muté

Tableau 11. Taille de la bande amplifiée de la patiente (1TIPLAT006C06)

GeneMapper 4.0					
		Sample File Name	Size	Area	Data Point
1	■	4ZTEMOINNormalBZPLAT_012_F06.fsa	298.32	7910	3689
2	■	4ZTEMOINNormalBZPLAT_012_F06.fsa	301.2	5816	3718
3	■	4ZTEMOINNormalBZPLAT_012_F06.fsa	307.28	21567	3779
4	■	4ZTEMOINNormalBZPLAT_012_F06.fsa	315.28	19447	3859
5	■	1PLAT_006_C06.fsa	298.3	13752	3666

II.3- Études familiales

Les études familiales traitent les individus de même famille de façon à détecter la transmission préférentielle d'allèles chez des personnes apparentés. Parmi les différents types d'études familiales, on distinguera celles reposant sur des pedigrees (ou lignées familiales) plus ou moins larges de celles fondées sur des familles nucléaires (les deux parents et au moins un enfant) qui peuvent se réduire au cas des trios (les deux parents et un seul enfant).

II.3.1- Famille 1

Famille nucléaire (Figure 40) constituée de 4 membres, le propositus (individu II1) âgé de 15 ans a été diagnostiqué (AUT), avec des signes cliniques comprenant une stéréotypie gestuelle avec balancement du corps et battement des mains, absence du langage, des troubles de l'attention et une angoisse de l'inconnu. Son jeune frère (individu II2) âgé de 9 ans montre des signes d'hyperactivité extrêmes (ne reste pas en place) avec des crises de mutisme prolongé.

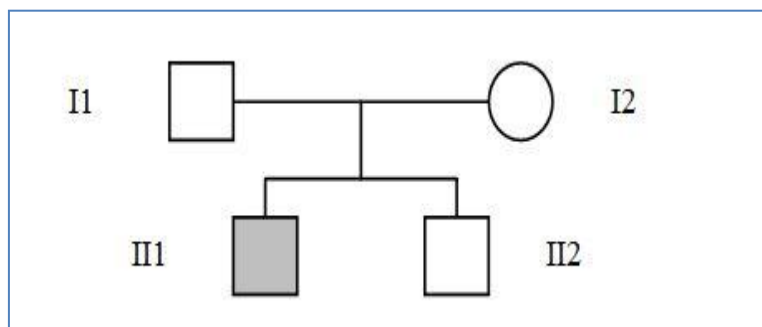


Figure 40. Pedigree de la famille 1

Au niveau de cette famille, seul le profil électrophorétique de la mère (16BASPLAT004B02) âgée de 40 ans est plus ou moins problématique avec la révélation d'une bande de 328.38 pb qui rentre dans la zone intermédiaire (325-355 pb). (Figure 41, Tableau 12)

Ce type de profil électrophorétique est une indication pour une recherche moléculaire plus approfondie. Pour définir le statut de cette malade, une hybridation moléculaire a donc été effectuée.

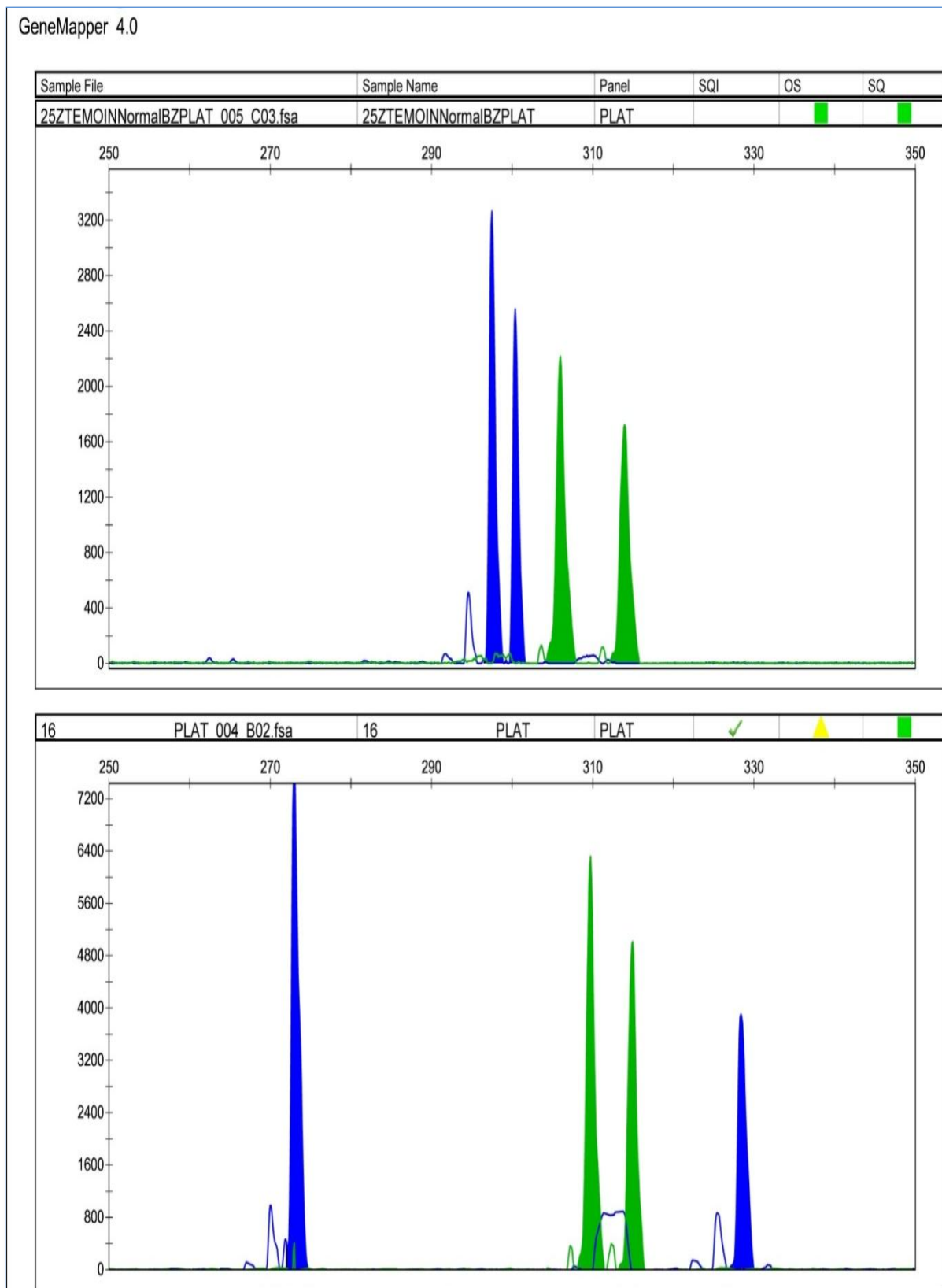


Figure 41. Electrophorégramme de l'individu I2 (16BASPLAT004B02)

Tableau 12. Taille des différentes bandes amplifiées de l'individu I2 (16BASPLAT004B02)

Applied Biosystems GeneMapper 4.0					
		Sample File Name	Size	Area	Data Point
1	■	25ZTEMOINNormalBZPLAT_005_C03.fsa	297.5	29894	3841
2	■	25ZTEMOINNormalBZPLAT_005_C03.fsa	300.38	22566	3871
3	■	25ZTEMOINNormalBZPLAT_005_C03.fsa	305.98	29976	3930
4	■	25ZTEMOINNormalBZPLAT_005_C03.fsa	313.96	25102	4014
5	■	16 PLAT_004_B02.fsa	273.07	85631	3648
6	■	16 PLAT_004_B02.fsa	328.38	49003	4229

II.4- Familles 2 et 3 (Figure 42)

Une étude de transmission préférentielle d'allèles chez des personnes apparentés peut de la même façon être menée sur la base de fratries (sans les parents), ce qui porte le nom d'étude de paires de germains ou sib-pairs.

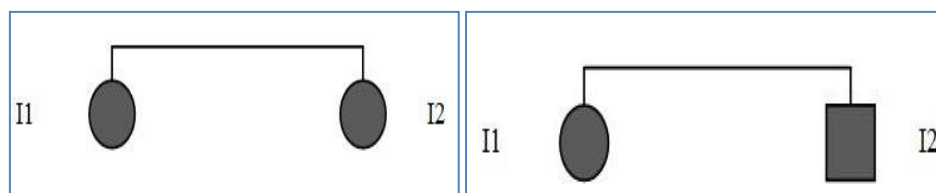


Figure 42. Sib-pairs des familles 2 et 3

Les profils électrophorétiques ne montrent aucune particularité, les bandes révélées ont une taille comprise entre 293 et 302 pb.

II.5- Famille 4 (Figure 43)

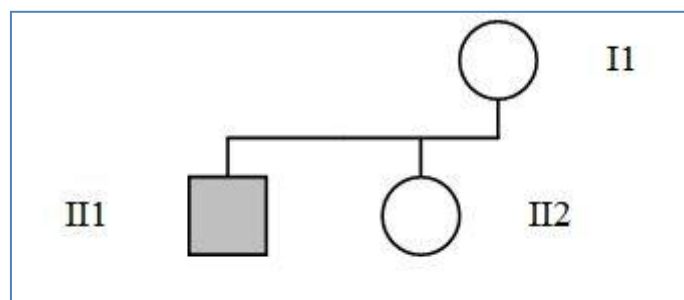


Figure 43. Trio de la famille 4

L'identification des membres de la famille 4 comprend en plus des initiales, le sexe référé par **M** ou **F** et l'identité binaire du pedigree (**II**, **III** et **II2**).

***Cas 2MKCEIII007D05**

Patient de sexe masculin âgé de 4 ans, le tableau clinique comprend un retard de langage, un retard psychomoteur et des troubles du comportement associés à des troubles de l'attention et à des signes autistiques.

Le patient présente une morphologie faciale caractéristique du syndrome de l'X fragile avec un visage allongé et des oreilles décollées. Le troisième signe de la triade, la macroorchidie, ne peut être déterminé.

L'électrophorégramme du patient met en évidence l'absence de pic suggérant la présence d'un allèle trop long (muté ou prémuté) donc non amplifié. (Figure 44 ; Tableau 13)

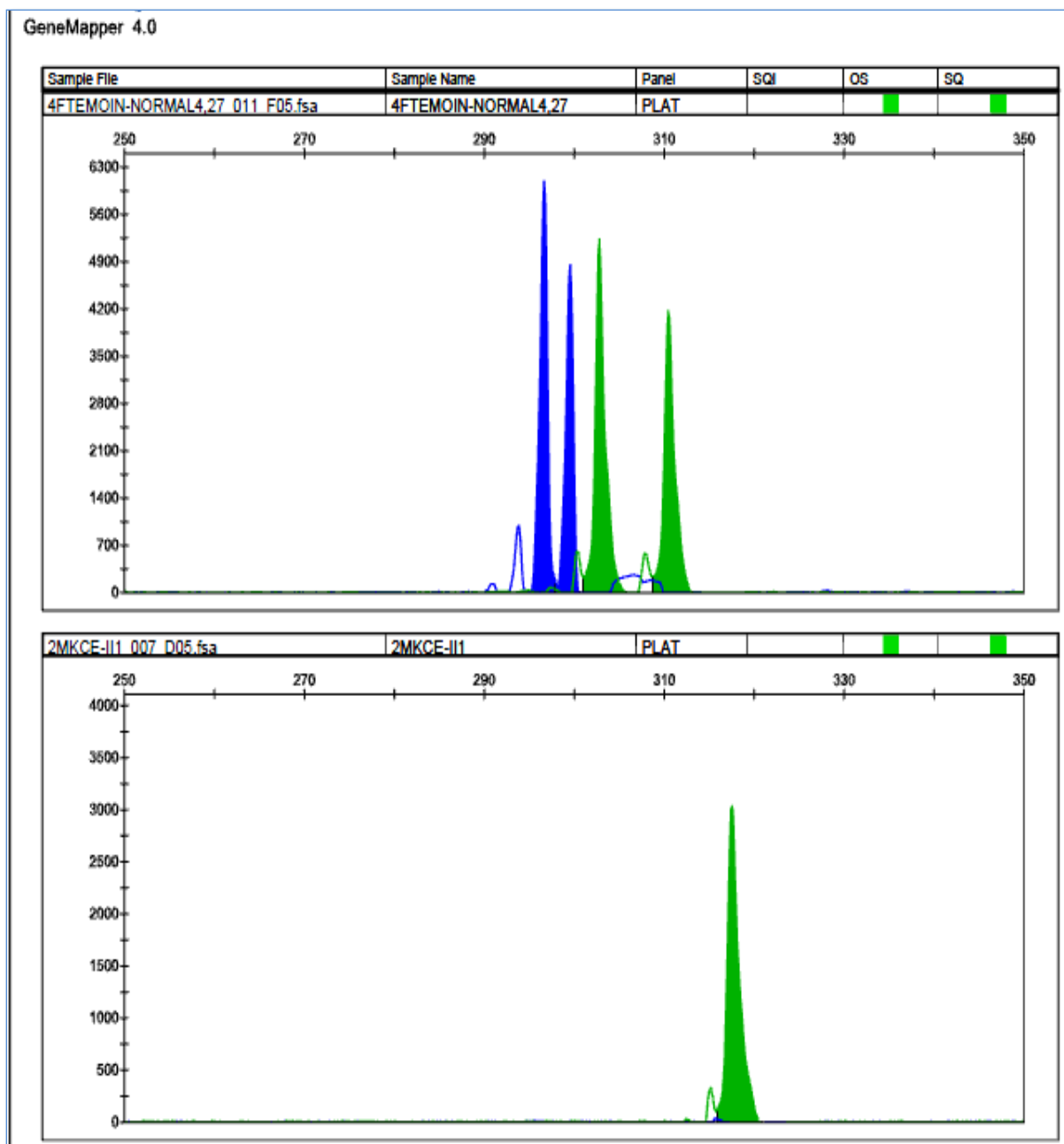


Figure 44. Electrophorégramme du patient (2MKCEIII007D05) ne présentant pas de pic suggérant la présence d'un allèle non amplifié

Tableau 13. Taille des différentes bandes amplifiées du patient (2MKCEIII007D05)

		Sample File Name	Size	Area	Data Point
1	■	4FTEMOIN-NORMAL4,27_011_F05.fsa	206.64	52408	3304
2	■	4FTEMOIN-NORMAL4,27_011_F05.fsa	299.54	40317	3329
3	■	4FTEMOIN-NORMAL4,27_011_F05.fsa	302.78	57166	3357
4	■	4FTEMOIN-NORMAL4,27_011_F05.fsa	310.44	48632	3423
5	■	2MKCE-III_007_D05.fsa	317.53	40056	3483

A la suite de ces résultats, une étude en cascade a été conduite sur la mère du probant (1FKMLII005C05) et sur sa jeune sœur (3FKLII2009E05).

***Cas 1FKMLII005C05**

Individu de sexe féminin, âgée de 32 ans et qui présente un phénotype normal avec néanmoins une tendance dépressive. Il faut noter la présence d'antécédents familiaux liés au retard mental et au 'spectre autistique' (oncle, neveux) caractéristique d'une transmission liée à l'X. Le profil présente un pic unique d'une taille de 296.52 pb suggérant la présence d'une prémutation. (Figure 45)

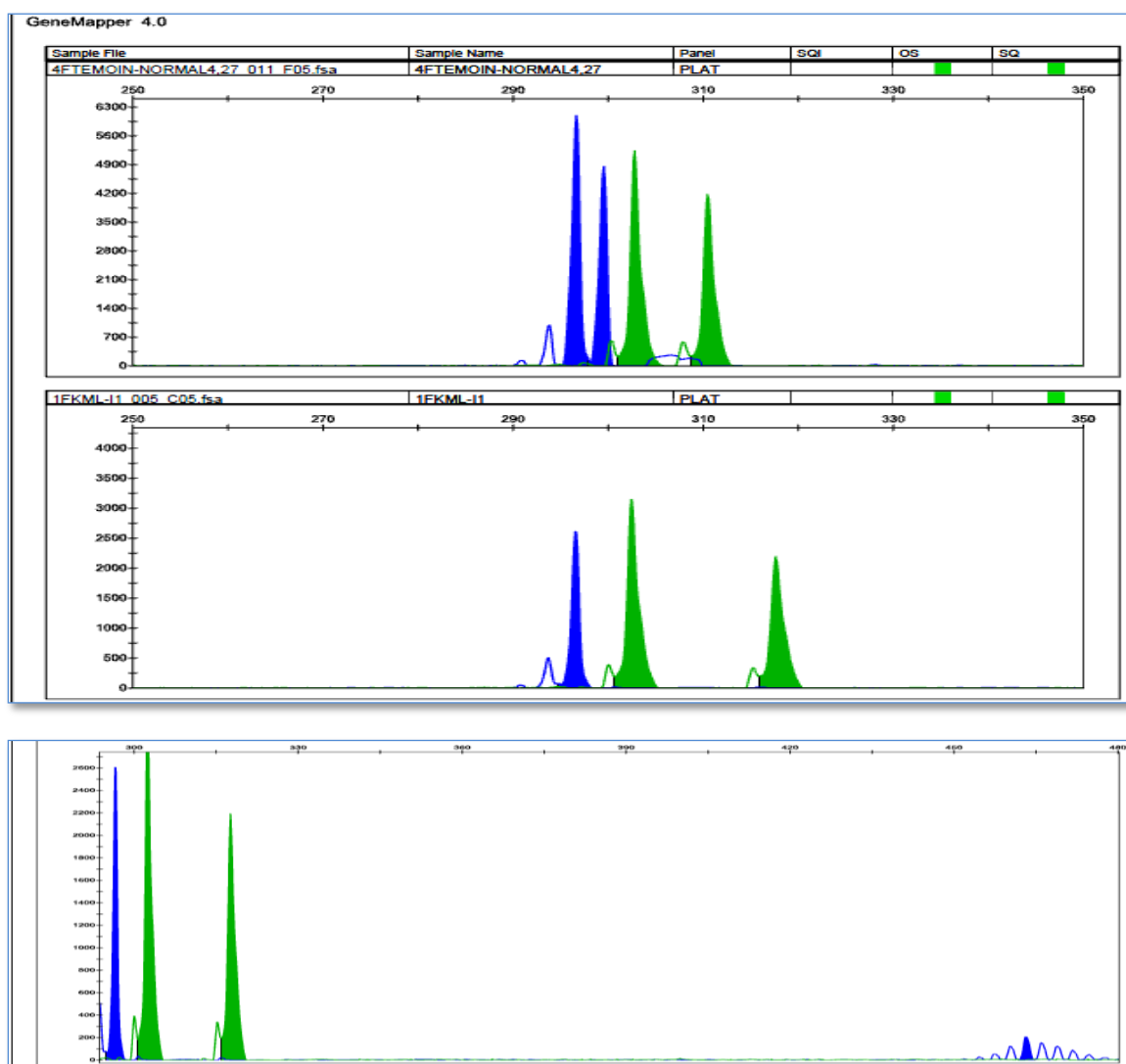


Figure 45. a. Electrophorégramme de l'individu (1FKMLII005C05) présentant un pic suggérant la présence d'un allèle prémuté
b. Zoom de l'électrophorégramme présentant le profil électrophorétique de l'allèle prémuté

*Cas 3FKLII2009E05

Individu de sexe féminin, âgée de 3 ans et ne présentant aucun signe particulier. Le profil électrophorétique présente un pic unique d'une taille de 296.51 pb suggérant la présence d'une prémutation. (Figure 46)

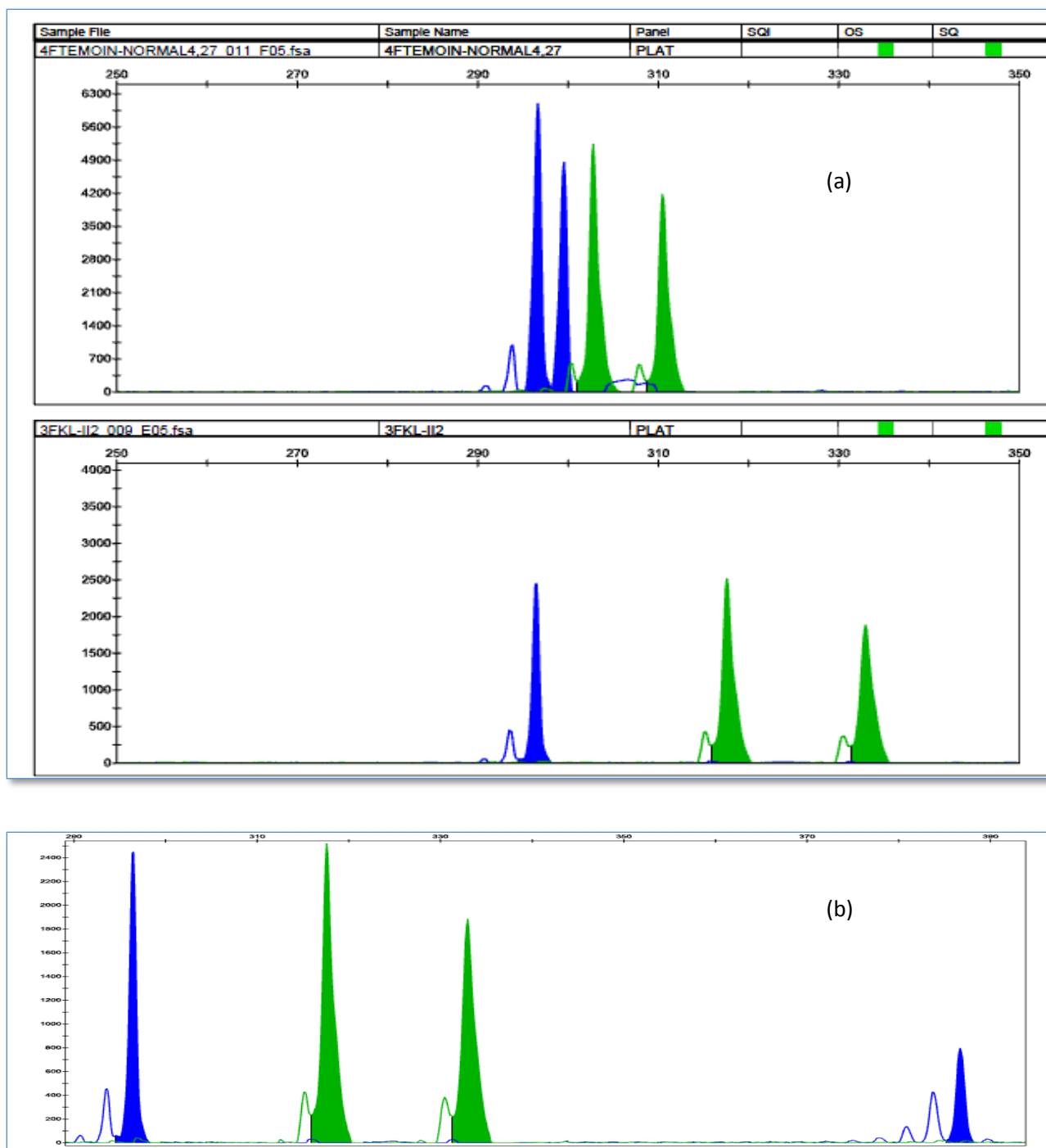


Figure 46. a. Electrophorégramme de l'individu (3FKLII2009E05) présentant un pic suggérant la présence d'un allèle prémuté
b. Zoom de l'électrophorégramme présentant le profil électrophorétique de l'allèle prémuté

La comparaison entre les zooms électrophorétiques des membres de la famille 4, avec ceux d'un panel de témoins mutés et prémutés de sexe masculin pour le patient II1, et de témoins mutés et prémutés de sexes féminins pour les individus I1 et II2 (Figure 47) ; ont confirmé la présence d'une mutation dynamique au sein de cette famille.

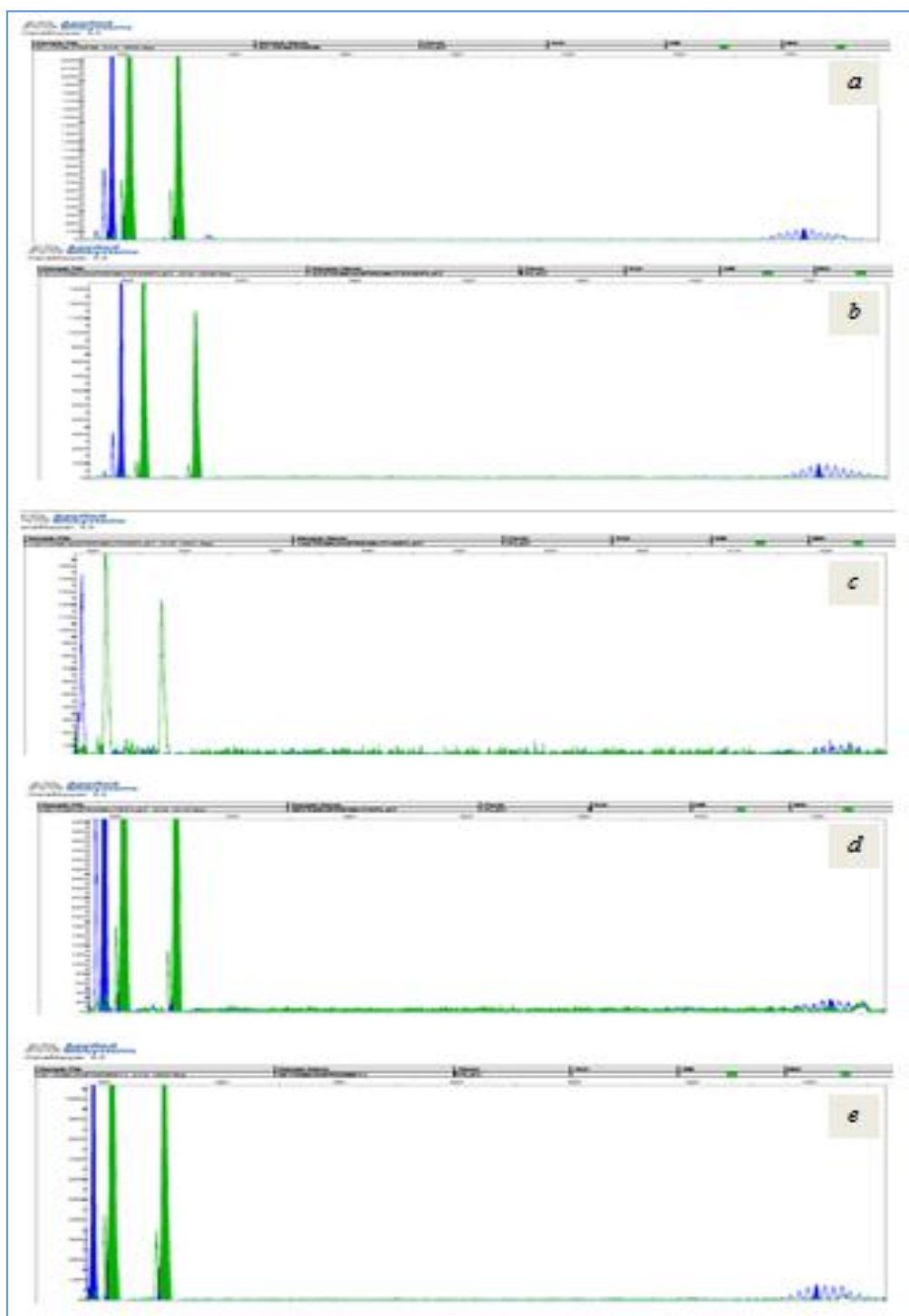


Figure 47. Zooms des électrophorégrammes de témoins prémuté(e)s (a, b et e), Zooms des électrophorégrammes de témoins muté(e)s (c et d)

III. Génotypage des patients au locus FRAXE

Le génotypage du locus FRAXE s'est effectués en même temps que celui du locus FRAXA par PCR multiplexe à l'aide d'amorces marquées (HEX) de façon à générer des produits de PCR fluorescents en vert. Les profils de migration générés sous forme d'électrophorégrammes sont analysés par un logiciel (GeneMapper v 4.0) comme ceux du locus FRAXA. Les allèles du locus FRAXE sont donc identifiés par leur taille (pb), ce qui permet d'obtenir la taille des allèles de chaque individu et par conséquent le nombre de répétition des triplets GCC au niveau du gène *FMR2* (Wang et al., 2003).

◆ Ainsi, un individu de sexe féminin est considéré comme hétérozygote normale lorsque son profil présente deux pics (un pour chaque chromosome X) avec une taille comprise entre 377 et 461 pb.

◆ Si le profil ne présente qu'un pic unique au niveau d'un individu de sexe féminin, cela peut suggérer l'homozygotie pour l'allèle analysé (le même allèle sur les deux chromosomes X) ou bien la présence d'un allèle prémuté (464, 971 pb) ou muté (supérieur à 974 pb) et donc non amplifié.

◆ Un individu de sexe masculin est considéré porteur de l'allèle normal lorsque son profil présente un pic unique avec une taille comprise entre 377 et 461 pb ; par contre l'absence de pic met en évidence la présence d'un allèle trop long pour être amplifier et donc la présence de mutation complète (supérieur à 974 pb).

Dans notre étude, l'analyse des fragments par génotypage a révélé différents profils électrophorétiques, correspondants à différents allèles représentés au niveau du tableau 14

Les résultats détaillés sont représentés au niveau de l'Annexe 9.

Tableau 14. Résultat du génotypage du locus *FMR2* effectué sur les 60 individus

N°	Sexe	N/P	Tailles allèles (pb)
1	F	TI	306.81/322.48
2	M	BAM	306.87
3	M	MTE	309.81
4	F	OJ	303.77/306.42
5	M	AL	306.64

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

6	F	ZM	301.93/304.43
7	M	GME	304.2
8	M	BA	305.1
9	F	KZ	309.89/328.35
10	M	BO	309.62
11	M	BA	309.67
12	F	BAS	309.73/314.94
13	M	BS	307.42
14	M	AJ	315.19
15	M	HSE	299.44
16	M	HA	304.15
17	M	MN	297.69
18	M	AN	305.43
19	M	BMA	308.63
20	F	BR	302.88/331.0
21	F	BJ	305.39/334.1
22	M	BI	300.33
23	M	MM	304.39
24	M	LSMC	305.56
25	M	DK	305.72
26	M	BDE	302.74
27	F	RI	297.57/302.53
28	F	AM	303.1/310.52
29	M	AMO	310.73
30	M	ZM	303.66
31	M	GAM	302.97
32	F	AMD	310/331
33	M	SAE	310.86

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

34	M	GYMI	308.16
35	M	HAE	303.49
36	M	MBHK	328.55
37	M	GLM	310.37
38	M	KC	317.53
39	F	KLM	302.44/317.62
40	K	KL	317.58/332.96
41	M	BAM	301.57
42	M	BRM	301.56
43	M	TS	281.3
44	M	BA	304.37
45	M	DH	304.66
46	M	OZE	304.56
47	F	RN	311.25/313.93
48	M	CH	294.42
49	M	SA	301.67
50	F	KA	294.11/301.67
51	F	ZLY	304.4/314.45
52	F	AR	301.79/319.6
53	M	KO	304.49
54	F	BM	301.44/303.99
55	M	MMA	309.6
56	M	BAN	317.48
57	M	LC	302.48
58	F	DW	310.2/335.89
59	M	BSE	305.14
60	M	NS	335.15

◆ La majorité des profils obtenus (91.66 %) présente des résultats conformes à la présence d'un allèle normal chez les individus de sexes masculins et à la présence de deux allèles normaux chez les individus de sexe féminin.

◆ Pour 8.33 % des cas, la présence de bandes de très petites tailles remet la question sur la taille minimale répertoriée dans la littérature. Sur les cinq cas retrouvés, deux individus (un de chaque sexe ; Figure 48) possèdent des allèles se rapprochant à 3pb près (297.69 et 297.57 pb) à celui de la littérature, alors que trois autres individus (deux de sexe masculin et un de sexe féminin ; Figure 49) possèdent des allèles de tailles encore plus petite (294.42, 294.11 et 281.3 pb).

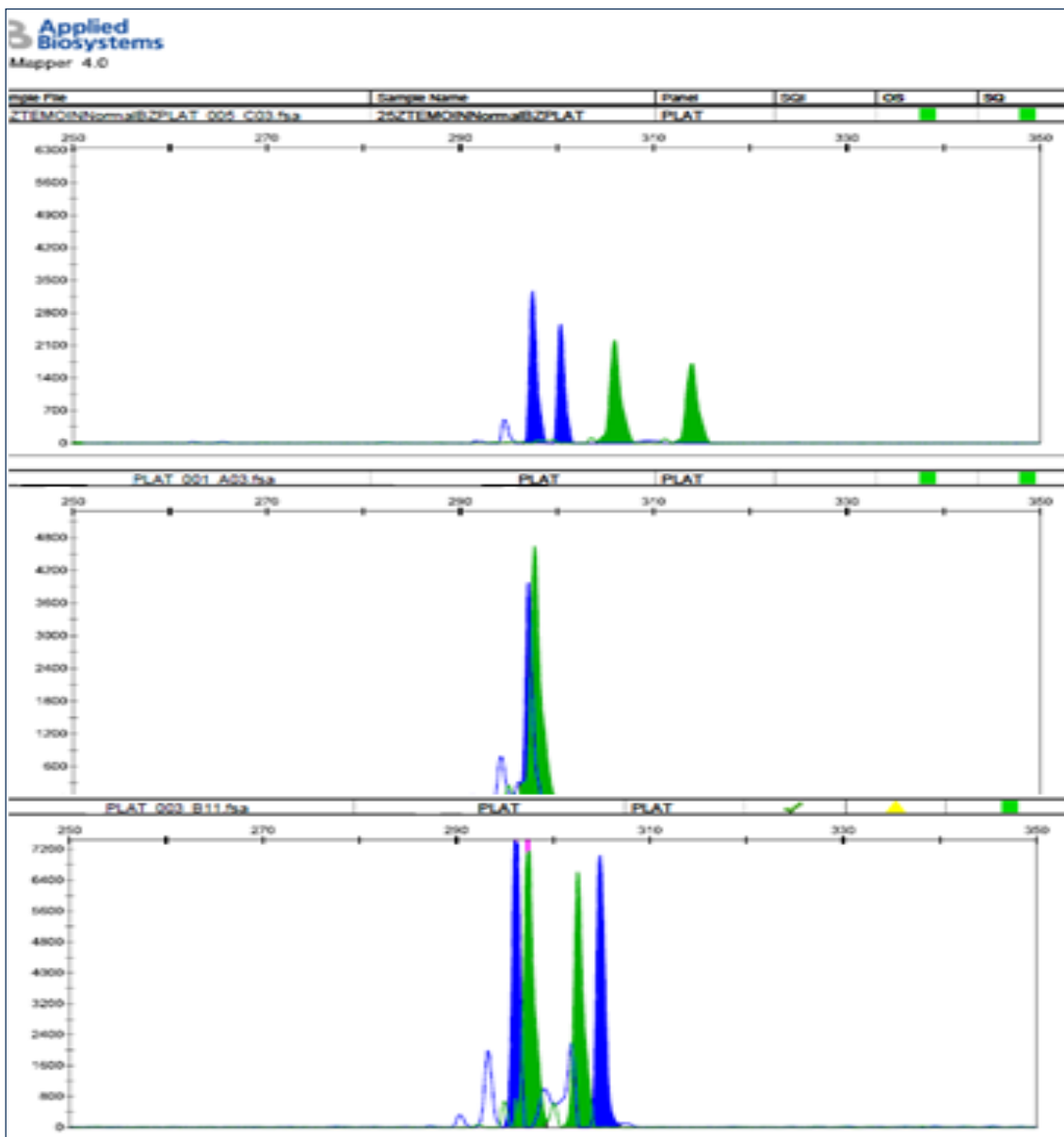


Figure 48. Electrophorégrammes représentant les allèles de 297.69 et 297.57 pb au niveau du locus FRAXE

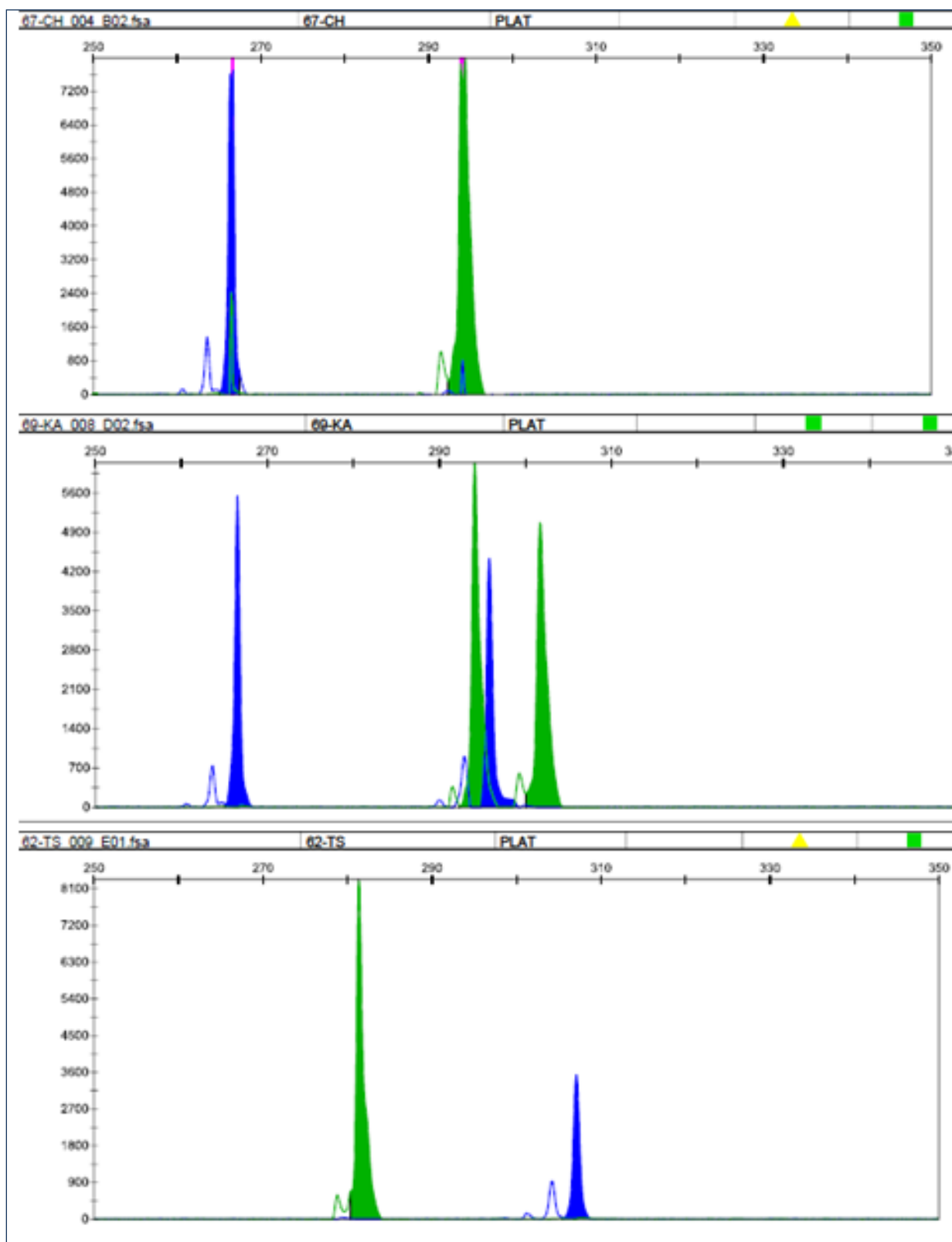


Figure 49. Electrophorégrammes représentant les allèles de 294.42, 294.11 et 281.3 pb au niveau du locus FRAXE

IV. Hybridation moléculaire par Southern-blot

Sur les 66 profils électrophorétiques effectués, 6 sont une indication pour le Southern-blot et cela afin de déterminer le statut des patients entre homozygotes, porteurs d'une prémutation ou porteurs d'une mutation complète en calculant la taille de la répétition CGG au niveau des chromosomes X de ces individus.

Il faut noter à ce stade que chaque individu de sexe masculin possède un seul chromosome X et que chaque individu de sexe féminin possède un chromosome X actif et un chromosome X inactif. Cette inactivation est le résultat de l'hyperméthylation de sites spécifiques par le phénomène de lyonisation, ce qui permet de respecter l'équilibre chromosomique au sein de l'espèce humaine.

IV.1- Blot Z01

La fiche d'identification du blot est représentée par la figure 50, sur ce gel ont été mis en parallèle avec des témoins (normale et mutée), l'ADN de la patiente (**1TIPLAT006C06**) ayant montré un pic unique et celui de la patiente (**16BAPLAT004B02**) ayant montré un pic d'une taille entrant dans la zone intermédiaire entre allèle normal et allèle prémuté.

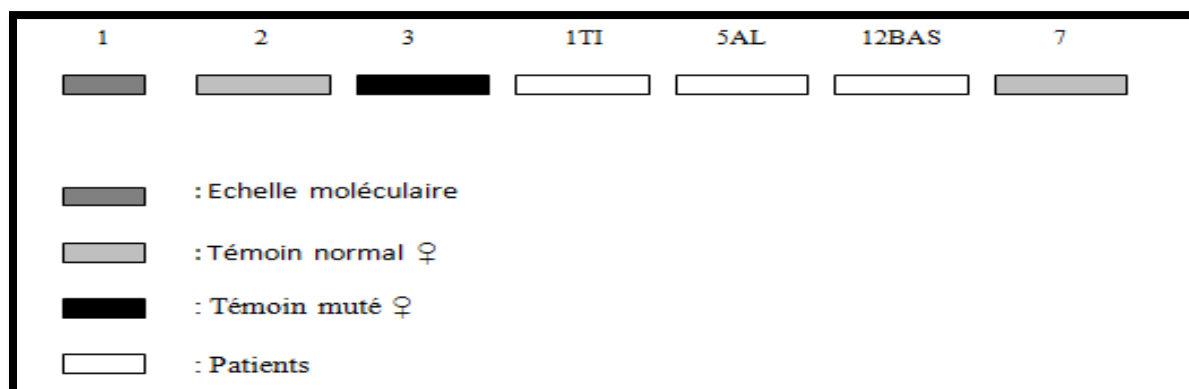


Figure 50. Fiche d'identification des dépôts du gel 1

1TI : 1TIPLAT006C06

12 BAS : 16BAPLAT004B02

IV.1.1- Migration sur gel d'agarose

La migration des différentes bandes d'ADN qui constituent l'échelle moléculaire (Tableau 15) est un indice sur la conformité de la migration des bandes à analyser, la courbe

de migration est portée sur un papier quadrillé semi-logarithmique à 3 modules pour représenter le profil de migration des fragments d'ADN de l'échelle moléculaire. (Figure 51)

Tableau 15. Distance de migration de l'échelle moléculaire du gel 1

Taille de la bande (Kb)	Distance de migration (cm)
12	6.7
11	6.9
10	7.2
09	7.5
08	7.9
07	8.6
06	9.4
05	10.4
04	12.0
03	14.5
02	18.9

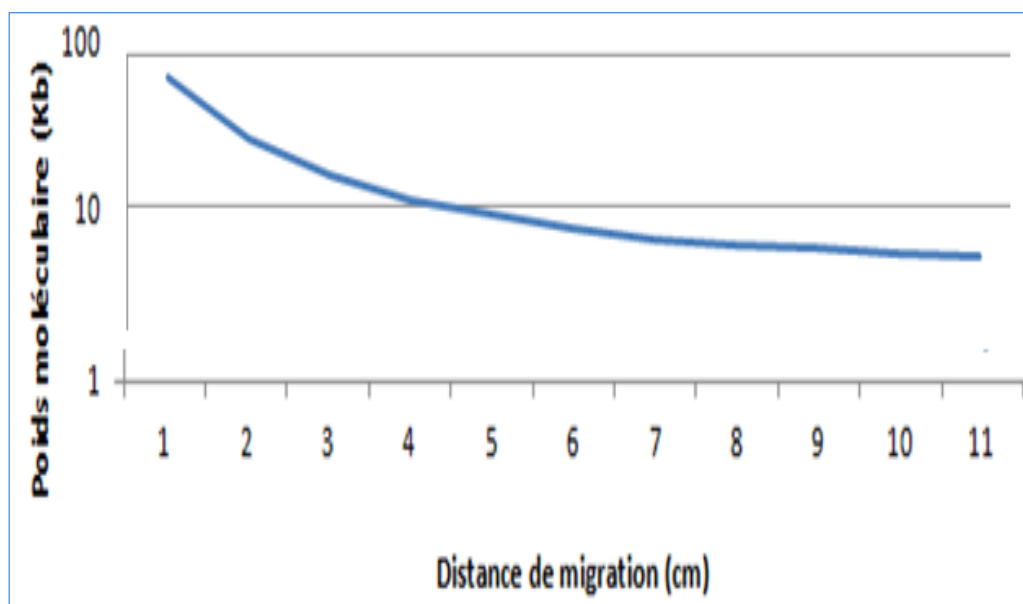


Figure 51. Courbe de migration de l'échelle moléculaire du gel 1

Après 10 jours d'exposition le film X-Ray est développé, le RFLP résultant de la double digestion de l'ADN par les enzymes de restrictions *EagI* et *EcoRI*, hybridé à la sonde *StB-12.3* est représenté au niveau de la figure 52.

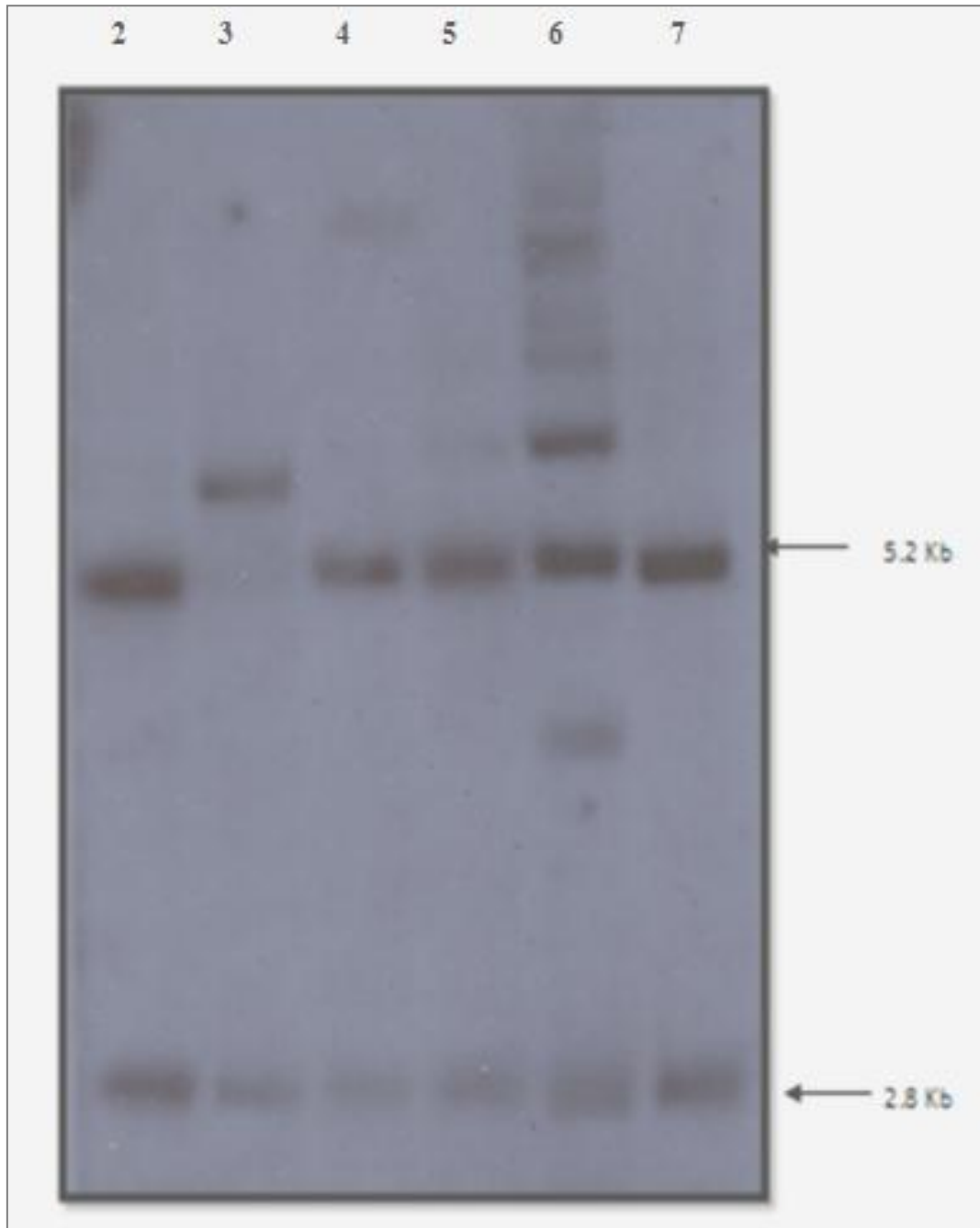


Figure 52. RFLP révélé par double digestion (*EagI* et *EcoRI*) et hybridation à la sonde *StB-12.3* du gel 1

Puits 2 et 7: Témoin Normale ♀

Puits 3 : Témoin mutée ♀

Puits 4: 1TIPLAT006C06

Puits 5: 5AL

Puits 6: 16BAPLAT004B02

IV.1.2- Interprétation des résultats du blot Z01

Le chromosome X actif des individus de sexe féminin (puits 2→7) donne un fragment de 2.8 Kb, résultant de la digestion simultanée par *EcoRI* et *EagI*, alors que le chromosome X inactif donne un fragment de 5.2 Kb résultant de la digestion par *EcoRI* uniquement, *EagI* ne coupe pas sur ce chromosome qui est hyperméthylé par lyonisation (Rifé et al., 2004).

*Pour la patiente (**1TIPLAT006C06**)

Le RFLP révèle la présence d'une bande normale correspondant au fragment de 5.8 Kb attestant ainsi la présence du même allèle (même taille donc même degré de répétition) sur les deux chromosomes X, confirmant ainsi l'état d'homozygotie pour ce locus chez cette patiente.

* Pour la patiente (**16BAPLAT004B02**)

Les bandes digérées de cette patiente, indépendamment du locus *FMRI*, présentent un RFLP qui met en évidence la présence de plusieurs sites polymorphes sur le chromosome X actif.

IV.2- Blot Z02

La fiche d'identification du blot est représentée par la figure 53, sur ce gel ont été mis en parallèle avec des témoins (normale, prémutée et muté) les échantillons correspondant aux membres de la famille 4.

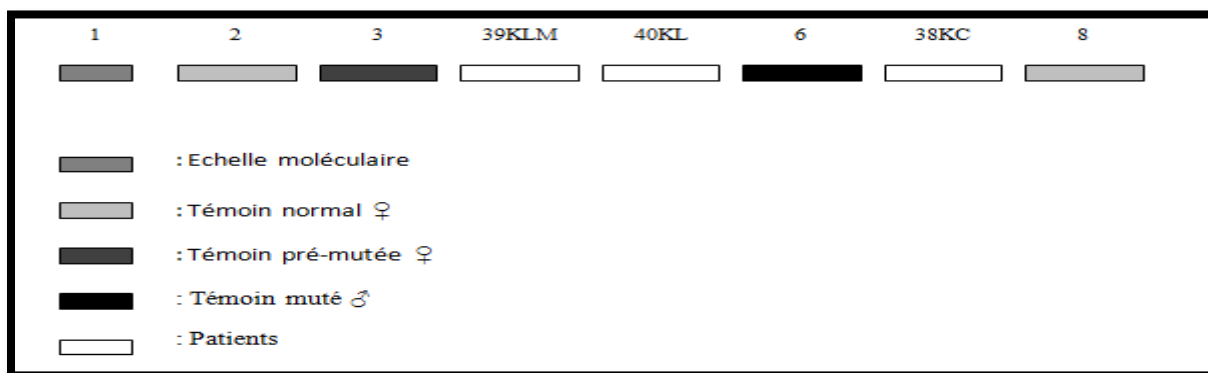


Figure 53. Fiche d'identification des dépôts du gel 2

39KLM : 1FKMLI1005C05

40KL : 3FKLII2009E05

38 KC : 2MKCEIII007D05

IV.2.1- Migration sur gel d'agarose

La distance de migration des fragments d'ADN de l'échelle moléculaire (Tableau 16) est portée sur un papier quadrillé semi-logarithmique à 3 modules pour représenter le profil de migration (Figure 54).

Tableau 16. Distance de migration de l'échelle moléculaire du gel 2

Taille de la bande (Kb)	Distance de migration (cm)
12	6.3
11	6.5
10	6.7
09	7.1
08	7.6
07	8.2
06	8.9
05	10
04	11.7
03	14.3
02	18.7

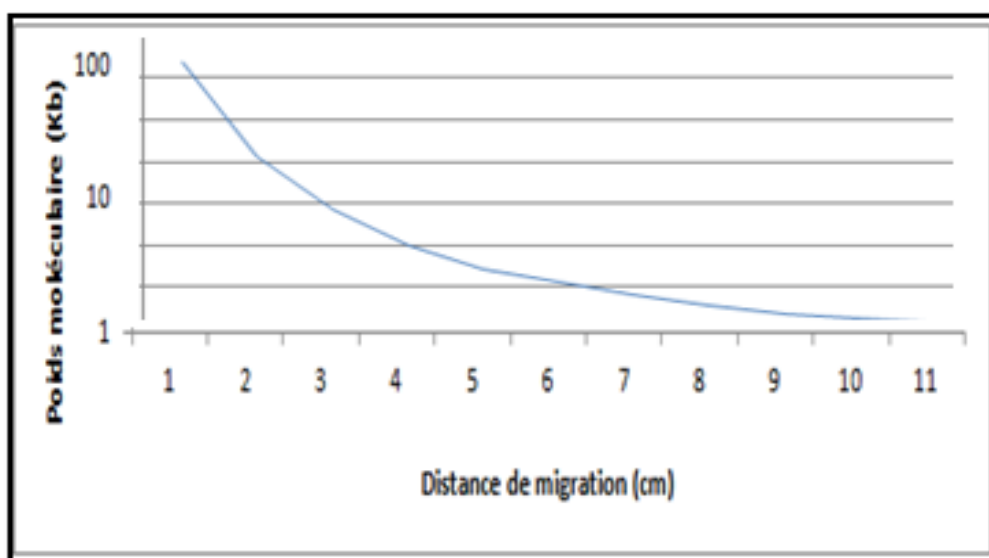


Figure 54. Courbe de migration de l'échelle moléculaire du gel 2

Après 12 jours d'exposition le film X-Ray est développé, le RFLP résultant de la double digestion de l'ADN par les enzymes de restrictions *EagI* et *EcoRI*, hybridé à la sonde *StB-12.3* est représenté au niveau de la figure 55.

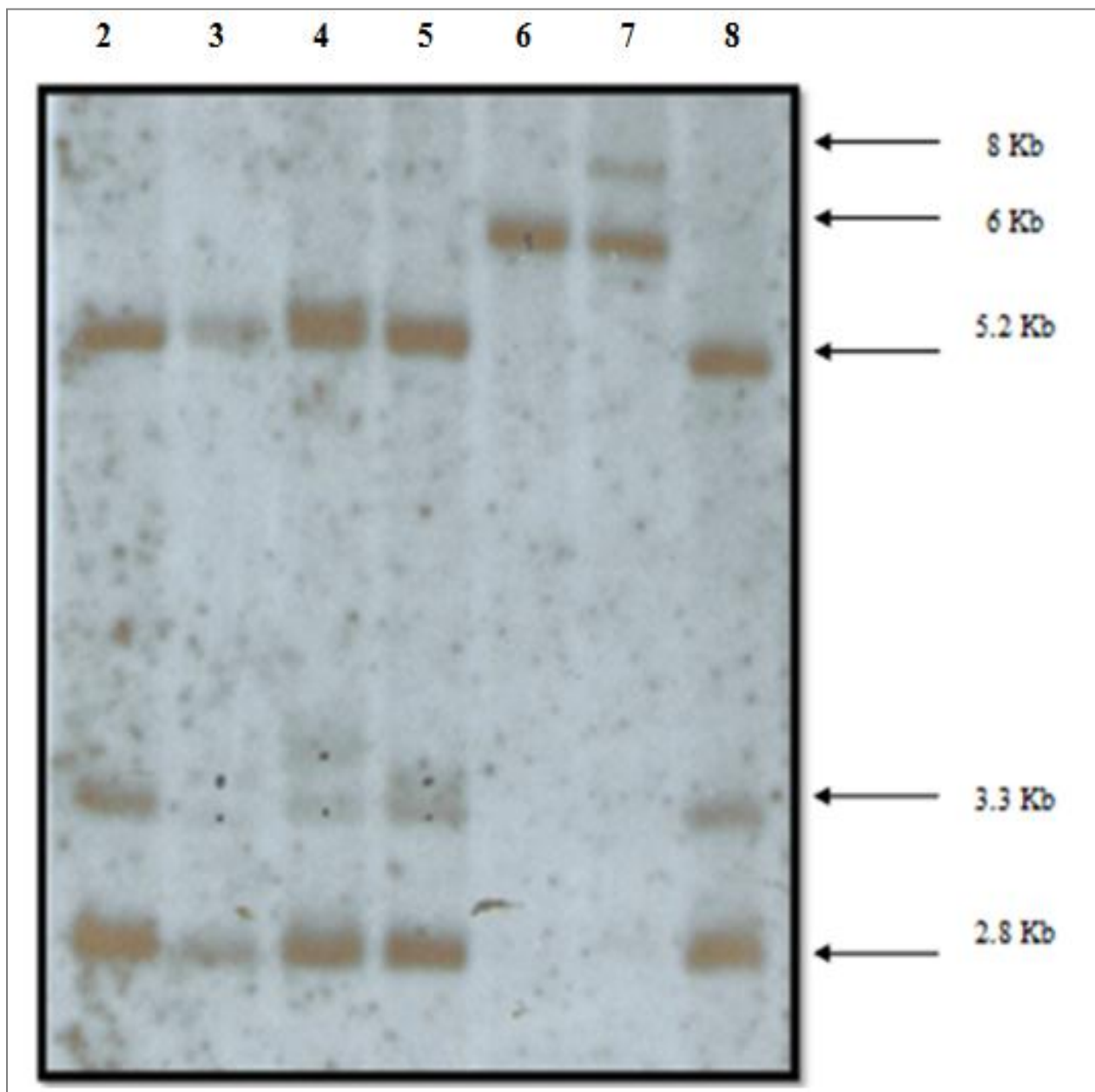


Figure 55. RFLP révélé par double digestion (*EagI* et *EcoRI*) et hybridation à la sonde *StB-12.3* du gel 2

Puits 2 et 8: Témoin Normale ♀

Puits 3: Témoin prémutée ♀

Puits 4: Mère (II)

Puits 5: Sœur (II2)

Puits 6: Témoin muté ♂

Puits 7: Patient (III1)

IV.2.2- Interprétation des RFLPs obtenus

La technique du Southern blot nous permet de révéler à la fois la présence de la mutation et l'état de la méthylation puisque *EagI* est incapable de couper l'ADN si le site de restriction riche en CpG est méthylé (Figure 56). Pour cette double digestion, *StB12.3* s'hybride avec l'ADN de témoins normaux, avec un fragment de 2.8 kb (*EcoRI-EagI*), correspondant au chromosome X actif. Chez les individus de sexe féminin, il y a également hybridation avec un fragment *EcoRI* supplémentaire de 5.2 kb, correspondant au chromosome X inactif méthylé. Le fragment de 2.8 kb est absent chez les males présentant une mutation X fragile, alors que les femmes porteuses de la mutation ont à la fois les fragments normaux (2.8 et 5.2 kb) et les fragments mutés. Les prémutations sont détectées sous forme de fragments *EcoRI-EagI* supérieur à 2.8 kb chez les hommes et détectées sur le chromosome X actif des femmes alors que des fragments *EcoRI* supérieurs à 2.8 et à 5.2 kb correspondent à une prémutation sur le chromosome X inactif. Les fragments correspondant à des mutations complètes ne sont pas digérés par *EagI* et apparaissent donc comme des bandes simples ou hétérogènes au-dessus de 5.2 kb. Les cas de mosaïque (bande supplémentaire correspondant à une prémutation et présente en proportion variable) peuvent apparaître sous forme d'un mélange de mutation complète (méthylée) et de prémutation non méthylée. Ceci est vérifié pour la plupart des cas de méthylation incomplète déjà reconnus chez les hommes avec le syndrome de l'X-fragile. La présence de bande partiellement non méthylée, plutôt homogène avec un accroissement de taille entre 600 à 10³ pb peut apparaître, ce schéma a été décrit comme "mosaïque de méthylation" (Rousseau et al., 1994).

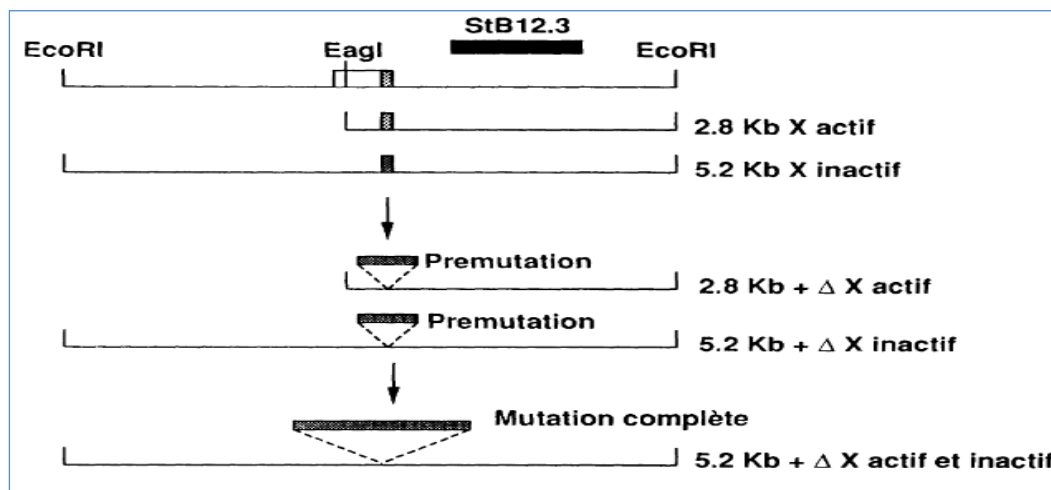


Figure 56. Représentation schématique de la double digestion *EcoRI* et *EagI* révélée par hybridation avec la sonde *StB12.3*

2.2.1- Interprétation des résultats du blot Z02

La famille 4 présentant le syndrome de l’X- fragile a été analysé par double digestion de l’ADN avec *EcoRI* et *EagI*. Le chromosome X actif (Figure 57) des individus de sexe féminin (puits 2, 3, 4, 6 et 8) donne un fragment de 2.8 Kb, résultant de la digestion simultanée par *EcoRI* et *EagI*, alors que le chromosome X inactif (puits 2 et 8) donne un fragment de 5.2 Kb résultant de la digestion par *EcoRI*, ce chromosome étant méthylé par lyonisation n’est pas digéré par *EagI*.

Les allèles non méthylés donnent une bande discrètement plus large pour les individus **II** et **II2** (puits 4 et 5), mettant ainsi en évidence la présence d’allèles prémutés.

Le chromosome X de l’individu **III** (puits 7) génère après digestion des bandes beaucoup plus larges (6 Kb et 8 Kb) mettant ainsi en évidence la présence de deux allèles mutés méthylés ou d’une mosaïque de méthylation.

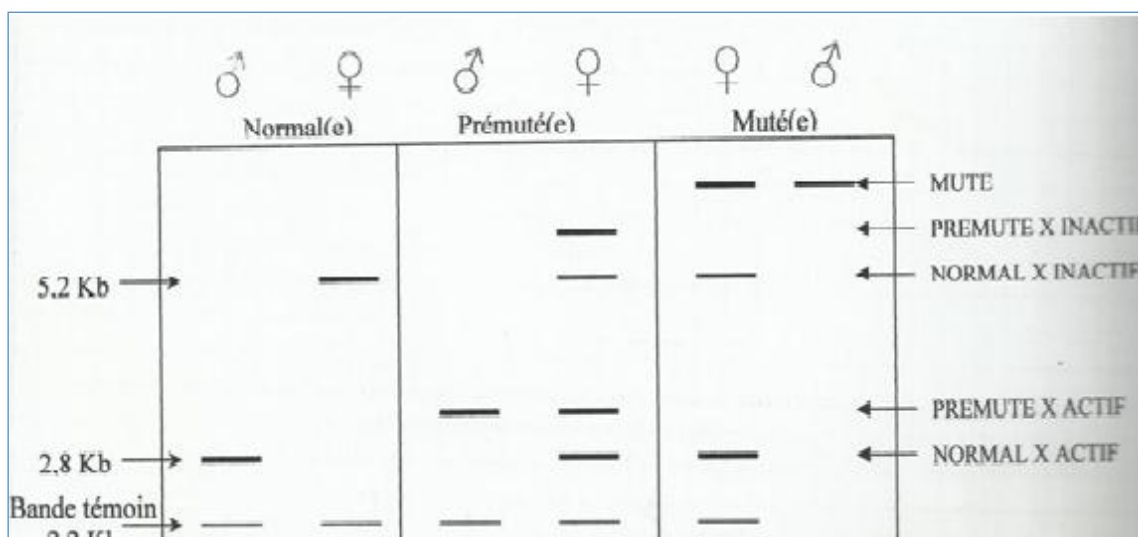


Figure 57. Représentation schématique des RFLPs révélés par hybridation avec la sonde StB12.3

2.2.2- Calcul de la taille des bandes des RFLPs

Pour évaluer la taille des bandes de chaque individu, il ne suffit pas de comparer la migration de la bande par rapport à celle des bandes de l’échelle moléculaire qui auraient éventuellement migrées sur plus ou moins la même distance.

En suivant le diagramme représentatif des différentes migrations possible, le calcul se fait à partir des valeurs A et B, mesurées à partir du gel (Figure 58) (Biancalana et al. , 2004).

Ces valeurs sont portées sur la courbe de migration des patients et témoins; (Figure 59) ce qui définit les valeurs A' et B', mesurées directement sur la courbe et cela pour obtenir la correspondance en paires de bases.

Le nombre de répétitions que les patients testés ont en plus par rapport à la bande normale, est obtenu grâce à la formule suivante : $(B' - A') \div 3$

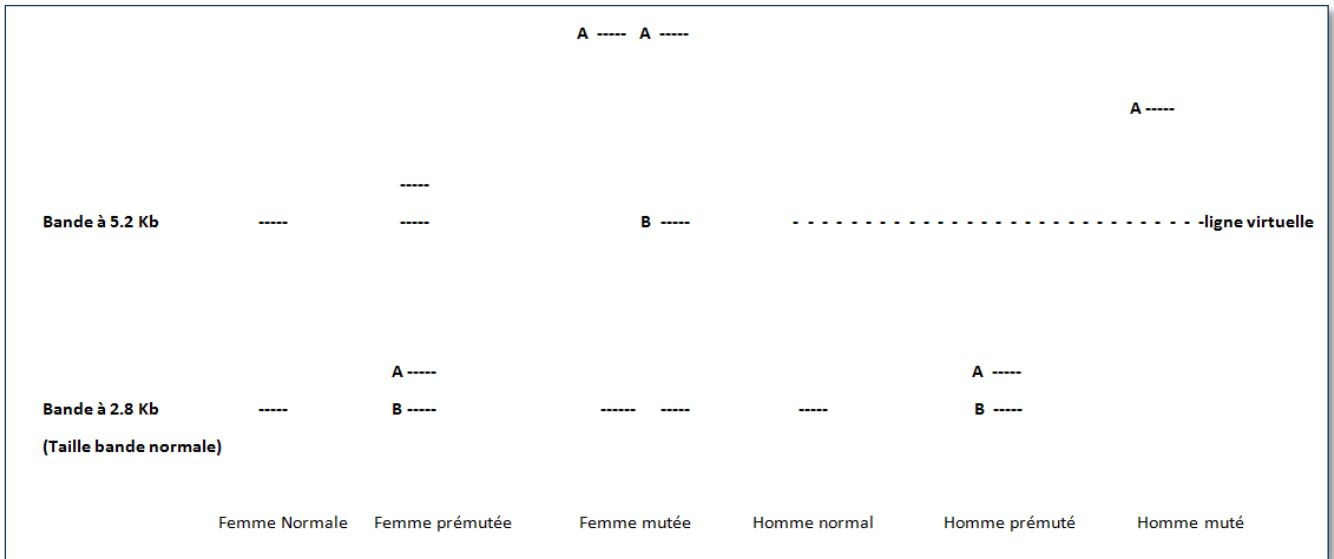


Figure 58. Représentation schématique des profils de migration pour le calcul de la taille des répétitions pour les différents statuts de XFRA

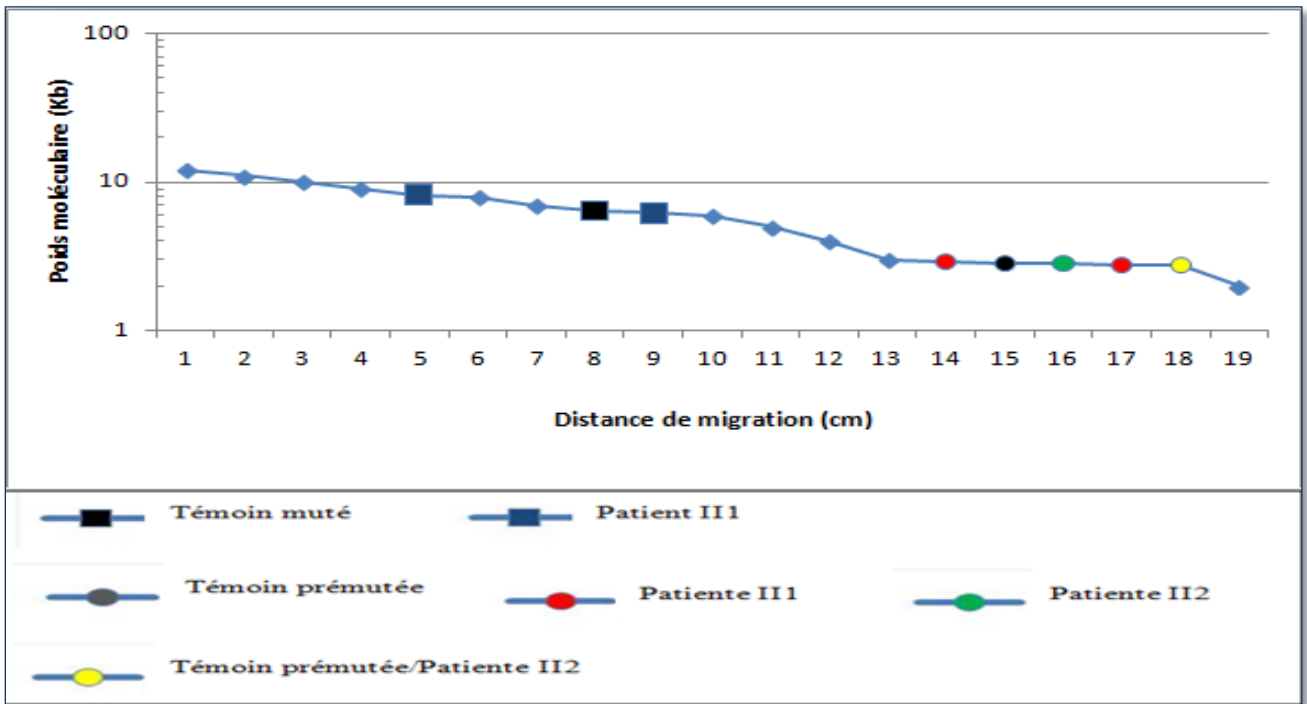


Figure 59. Courbe de migration des patients et témoins

2.2.3- Calcul des RFLPs des individus I1 et II2

La valeur A est mesurée par rapport au bas du gel, en positionnant la graduation 19.3 cm de la règle sur le bas du gel.

La valeur B est calculée de la même manière.

Pour l'individu I1:

$$A = 14.4 \text{ cm} \Rightarrow A' = 2.78 \text{ Kb}$$

$$B = 15.1 \text{ cm} \Rightarrow A' = 2.95 \text{ Kb}$$

$$B' - A' = 2.95 - 2.78 = 0.170 \text{ (Kb)} \div 3 = 0.057 \text{ Kb}$$

Donc il y a 57 répétitions de plus que la bande normale qui correspond à un allèle de 30 répétitions, donc l'allèle prémuté de cette patiente est de **87** répétitions.

Pour l'individu II2 :

$$A = 14.8 \text{ cm} \Rightarrow A' = 2.85 \text{ Kb}$$

$$B = 15.2 \text{ cm} \Rightarrow A' = 2.75 \text{ Kb}$$

$$B' - A' = 2.85 - 2.75 = 0.100 \text{ (Kb)} \div 3 = 0.033 \text{ Kb}$$

Donc il y a 33 répétitions de plus que la bande normale qui correspond à un allèle de 30 répétitions, donc l'allèle prémuté de cette patiente est de **63** répétitions.

Le nombre de répétition est passé de 87 à 63, ce qui met en évidence la survenue d'une contraction au cours de la méiose maternelle.

Lorsque le nombre de répétition dépasse le seuil critique (prémuation), il y a instabilité accrue de la forme allélique au niveau de la méiose maternelle, cette instabilité se manifeste par une augmentation du nombre de répétition plutôt que par sa diminution. La contraction est beaucoup plus rare que l'expansion lorsqu'il s'agit d'allèle instable ou prémuté.

2.2.3- Calcul du RFLP de l'individu III1

La valeur A est calculée de la même manière que décrite dans la section précédente, alors que la valeur B est calculée par rapport à une ligne virtuelle correspondant à la bande normale de 5.2 Kb.

Dans le cas mutation complète, le calcul se fait selon la formule suivante :

$$(A' - B') \div 3$$

En sachant que $B' = 5.2$ Kb et en sachant qu'il existe deux bandes A_1 et A_2 :

◆ $A_1 = 8.6$ cm $\Rightarrow A_1' = 6.2$ Kb;

$$A_1' - B' = 6.2 - 5.2 = 1 \text{ (Kb)} \div 3 = 0.333 \text{ Kb}$$

Donc il y a 333 répétitions de plus que la bande normale qui correspond à un allèle de 30 répétitions, donc un des allèles muté de ce patient est de **363** répétitions.

Le nombre de répétition est passé de 87 à 363, ce qui met en évidence l'instabilité méiotique de l'allèle prémuté au cours de la méiose maternelle.

◆ $A_2 = 8.4$ cm $\Rightarrow A_2' = 7.9$ Kb ;

$$A_2' - B' = 7.9 - 5.2 = 2.7 \text{ (Kb)} \div 3 = 0.900 \text{ Kb}$$

Donc il y a 900 répétitions de plus que la bande normale qui correspond à un allèle de 30 répétitions, donc un des allèles muté de ce patient est de **930** répétitions.

Le nombre de répétition est passé de 363 à 930, ce qui met en évidence l'instabilité de l'allèle muté au cours des divisions mitotiques.

Ces résultats sont en faveur de deux phénomènes d'expansion, l'un ayant eu lieu au cours de la méiose maternelle (stade pré-zygotique), et l'autre au cours des divisions mitotiques (stade post-zygotique) donnant ainsi naissance à un individu mosaïque. Vu l'instabilité de l'allèle muté, les cas de mosaïsme sont assez fréquents.

Les résultats générés à ce stade, sont illustrés au niveau de la figure 60 où le statut de chaque membre est représenté en accord avec la nomenclature internationale des caractères héréditaires à transmission liée au chromosome X.

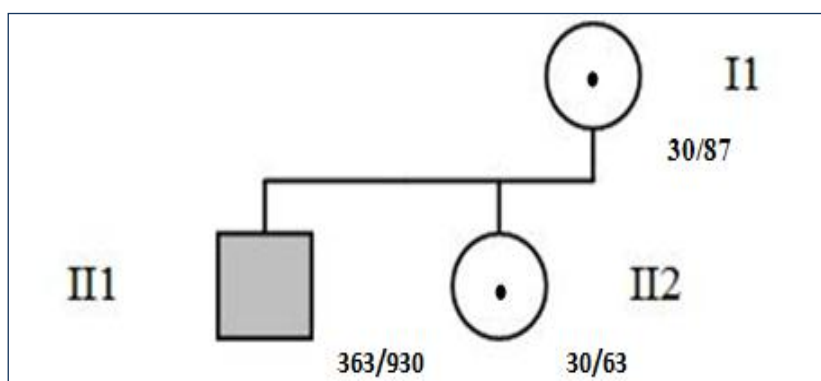


Figure 60. Pedigree de la famille 4 représentant le statut de vectrices « non atteintes » pour les individus II1 et II2, et le statut de porteur de mutations complètes pour le patient III1

V. Diagnostic moléculaire

A notre connaissance il s'agit de la première étude faite en Algérie sur des malades atteints de déficience mentale et sur des malades autistes dans le but de poser un diagnostic moléculaire, mettant ainsi en évidence une éventuelle étiologie génétique.

Sur l'ensemble des 60 personnes analysées, nous avons répertorié 1 cas de mutation complète XFRA suivie par la mise en évidence de deux cas de prémutation par une analyse en cascade.

La mutation XFRA a été retrouvée au niveau d'un patient diagnostiqué autiste (2.63 %) ce qui nous ramène au diagnostic différentiel entre ces deux pathologies (Hallmayer et al., 1994). Parallèlement à plusieurs autres études (*Annexe 10*), le nombre restreint de la population analysée n'interfère pas sur le résultat obtenu, car par opposition aux pathologies polygéniques où une étude sur cohorte est obligatoire, dans le cas de pathologies monogéniques l'analyse sur une population d'effectif réduit est informative, régit par la présence ou l'absence de l'allèle causal.

L'analyse moléculaire de la famille nucléaire (Famille 1) nous permet de maintenir l'hypothèse du modèle SMM qui suppose qu'à chaque variation est associée une diminution ou une augmentation d'une unité de répétition, en effet le degré de répétition passe de la mère de 23 répétitions à 22 répétitions chez ses deux fils.

VI. Distribution allélique des répétitions CGG (FRAXA) et GCC (FRAXE)

VI.1- Caractéristiques des patients étudiés

L'échantillon étudié est composé de 52 individus non apparentés, pour ne pas biaiser les résultats de la distribution allélique des deux loci, seuls les propositus ont été pris en compte pour les familles 1, 2 et 3.

Les membres de la famille 4 ont été éliminés de l'étude.

Parmi les individus analysés 14 sont de sexe féminin (28.8%) et 38 de sexe masculin (71.2%) amenant ainsi le nombre total de chromosomes étudiés à 66. (Tableau 17)

Tableau 17. Echantillonnage de la distribution des répétitions

FRAXA/FRAXE	Sexe féminin	Sexe masculin
Effectif total 52	14	38
Nombre total de chromosomes 66	28	38

VI.2- Polymorphisme allélique des répétitions CGG

Pour chaque chromosome analysé, la taille des bandes obtenues (pb) a été convertie au nombre de répétition correspondant conformément à la technique TAQ / PLATINUM.

La corrélation entre la taille de la bande en pb et le variant allélique donné en nombre de répétition pour le locus FRAXA débute sur une taille de 300 pb correspondant à un allèle de 4 répétitions, après chaque 3 pb est rajouté un degré de répétition de façon à avoir 303 pb qui correspond à 5 degré de répétition, 306 pb correspond à 6 degré de répétition etc... Cette correspondance a été assignée par séquençage de l'ADN génomique analysé.

Ceci nous a permis de mettre en évidence dans notre population d'étude, **17** formes alléliques allant du degré de répétition le plus faible (n=18) au degré de répétition le plus élevé (n=46). (Tableau 18)

Tableau 18. Variants alléliques du locus FRAXA

Variants alléliques	Taille des répétitions	Fréquences des répétitions	Fréquences alléliques	Pourcentage (%)
1	18	1	0.01	1.52
2	20	6	0.09	9.09
3	22	1	0.01	1.52
4	23	3	0.04	4.55
5	25	1	0.01	1.52
6	26	2	0.03	3.03
7	28	1	0.01	1.52
8	29	7	0.10	10.61
9	30	17	0.25	25.76
10	31	12	0.18	18.18
11	32	7	0.10	10.61
12	33	3	0.04	4.55
13	34	1	0.01	1.52
14	37	1	0.01	1.52
15	40	1	0.01	1.52
16	41	1	0.01	1.52
17	46	1	0.01	1.52

□

Le PIC (*Polymorphism Information Content*) du locus, a été calculé par la formule suivante (Read 1989) :

Pour un marqueur à (n) allèles :

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2 P_i^2 P_j^2$$

P_i = fréquence de l'allèle i

P_j = fréquence de l'allèle j

La fréquence allélique est déterminée par le rapport du nombre d'allèles variant sur le nombre d'allèles total.

La valeur du PIC est comprise entre 0 et 1 de telle façon que pour un locus strictement biallélique (n = 2), exemple d'un RSP (présence ou absence du site), le PIC est égal à 0.50. Par contre le PIC du VNTR à l'extrémité 3' du gène de l' α -globine (n=30) est plus ou moins égal à 0.90.

Dans notre étude, le PIC du locus FRAXA a été calculé par rapport aux fréquences alléliques retrouvées, ce qui nous a donné :

$$PIC_{FRAXA} = 0.62$$

Etant donné que nous étudions un locus microsatellite, nous aurions dû avoir un PIC plus élevé, car ces sites sont très polymorphes.

Ce résultat (relativement bas) est expliqué *in visu* par la présence de 17 variants sur 66 loci, parmi lesquels 4 variants (8, 9,10 et 11) représentant à eux seuls 65 % des formes alléliques totales.

La distribution des différentes formes alléliques de notre échantillon est représentée au niveau de la figure 61.

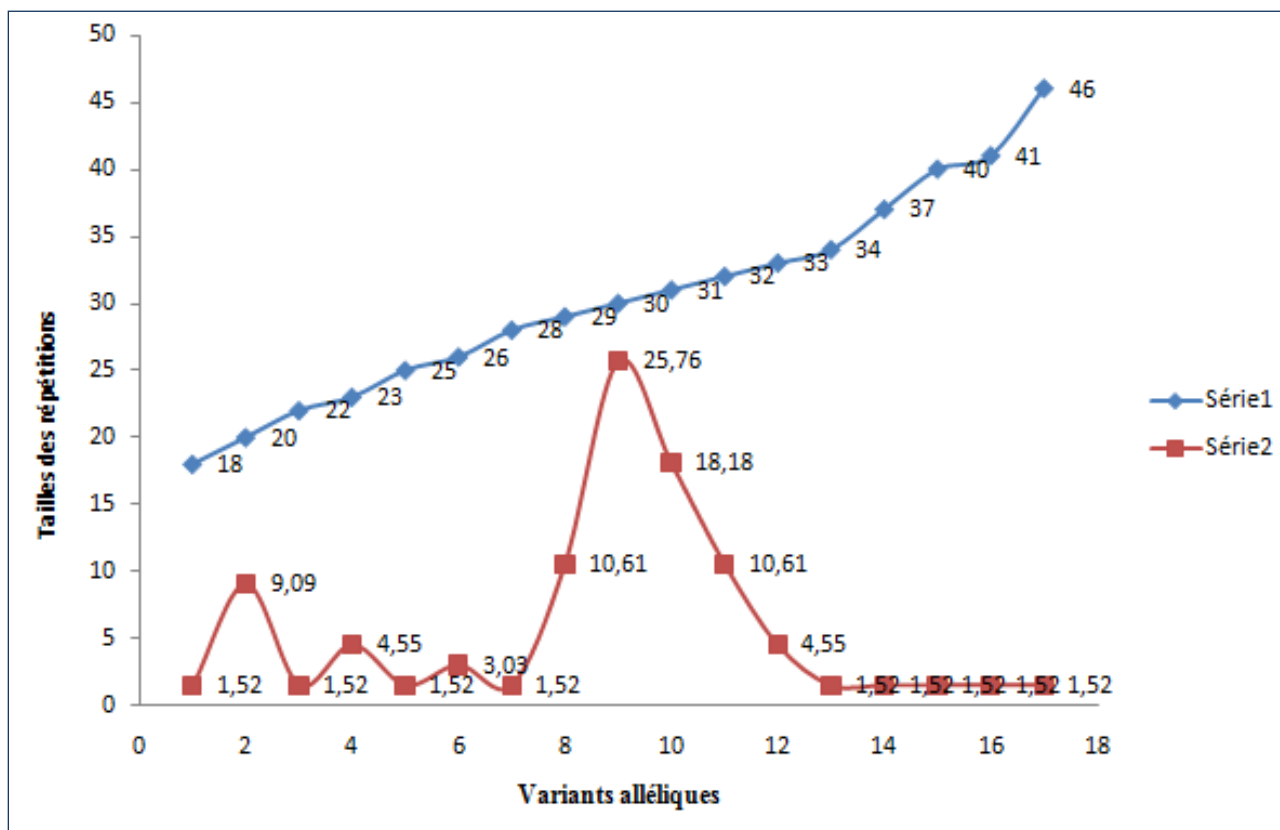


Figure 61. Distribution des différentes formes alléliques sur les 66 loci FRAXA

La série 1 (en bleu) représente les différents variants alléliques.

La série 2 (en rouge) représente le pourcentage de chaque variant.

Nous remarquons que la courbe obtenue est de type Gaussien impliquant par-là la présence d'un équilibre préprogrammé qui correspondrait à la taille optimale de ce microsatellite. Cette programmation ou « mémoire » du microsatellite a abouti à l'élaboration d'une théorie, dite du biais de mutation, qui envisage donc une taille optimale pour les locus microsatellites, vers laquelle les mutations seraient biaisées. Il y aurait donc plus d'expansions pour les microsatellites plus courts que cette taille, et plus de contractions (ou plus importantes) pour les plus longs (Whittaker et al., 2003, Vowles et Amos, 2006).

Lorsque nous comparons nos résultats à ceux obtenus au niveau d'autres populations (*Annexe II*), il semblerait que dans la majorité des ethnies étudiées, la taille optimale tourne autour de $n=30$ puisque sur les 22 ethnies étudiées, seule la distribution de la population japonaise a fait sortir les variants $n=27$ et $n=26$.

VI.3- Polymorphisme allélique des répétitions GCC

La corrélation entre la taille de la bande en pb et le variant allélique donné en nombre de répétition pour le locus FRAXE est différent de celui du FRAXA.

Elle débute sur une taille de 223 pb correspondant à un allèle de 6 répétitions, de la même façon après chaque 3 pb est rajouté un degré de répétition de façon à avoir 226 pb qui correspond à 7 degré de répétition, 229 pb correspond à 8 degré de répétition etc...

« 13 » formes alléliques ont été mises en évidence allant du degré de répétition le plus faible (n=2) au degré de répétition le plus élevé (n=16).

Les différentes formes alléliques, les fréquences alléliques et les pourcentages sont représentés au niveau du tableau 19.

Nous considérons les doublons n=2 comme variant allélique puisque retrouvés à 4.54 % dans notre population d'étude ; ainsi que les triplons n=3 retrouvé à 3.03 %. Et cela malgré que dans la littérature la taille minimale de répétition pour ce locus soit de 4 à 6 (Elbaz et al., 1998).

Tableau 19. Variants alléliques du locus FRAXE

Variant allélique	Taille des répétitions	Frequences des répétitions	Frequences alléliques	Pourcentage %
1	2	3	0.23	4.54
2	3	2	0.15	3.03
3	4	10	0.76	15.15
4	5	19	1.46	28.78
5	6	8	0.61	12.12
6	7	11	0.84	16.66
7	8	1	0.07	1.51
8	9	3	0.23	4.54
9	10	2	0.15	3.03
10	11	1	0.07	1.51
11	13	2	0.15	3.03
12	14	2	0.15	3.03
13	15	2	0.15	3.03

Le PIC du locus FRAXE fût calculé par rapport aux fréquences alléliques retrouvées, ce qui nous a donné :

$$PIC_{FRAXE} = 0.59$$

Ce résultat est expliqué par la présence, parmi les 13 variants sur les 66 loci, de 4 variants (3, 4, 5 et 6) qui représentent à eux seuls, 72.71% des formes alléliques totales.

A ce niveau des résultats, nous pouvons déjà déduire que le locus FRAXE est moins polymorphe que le locus FRAXA, ceci étant du partiellement à la présence d'un îlot CpG et d'une origine de réplication à proximité du locus FRAXA.

La distribution des différentes formes alléliques est représentée au niveau de la figure 62.

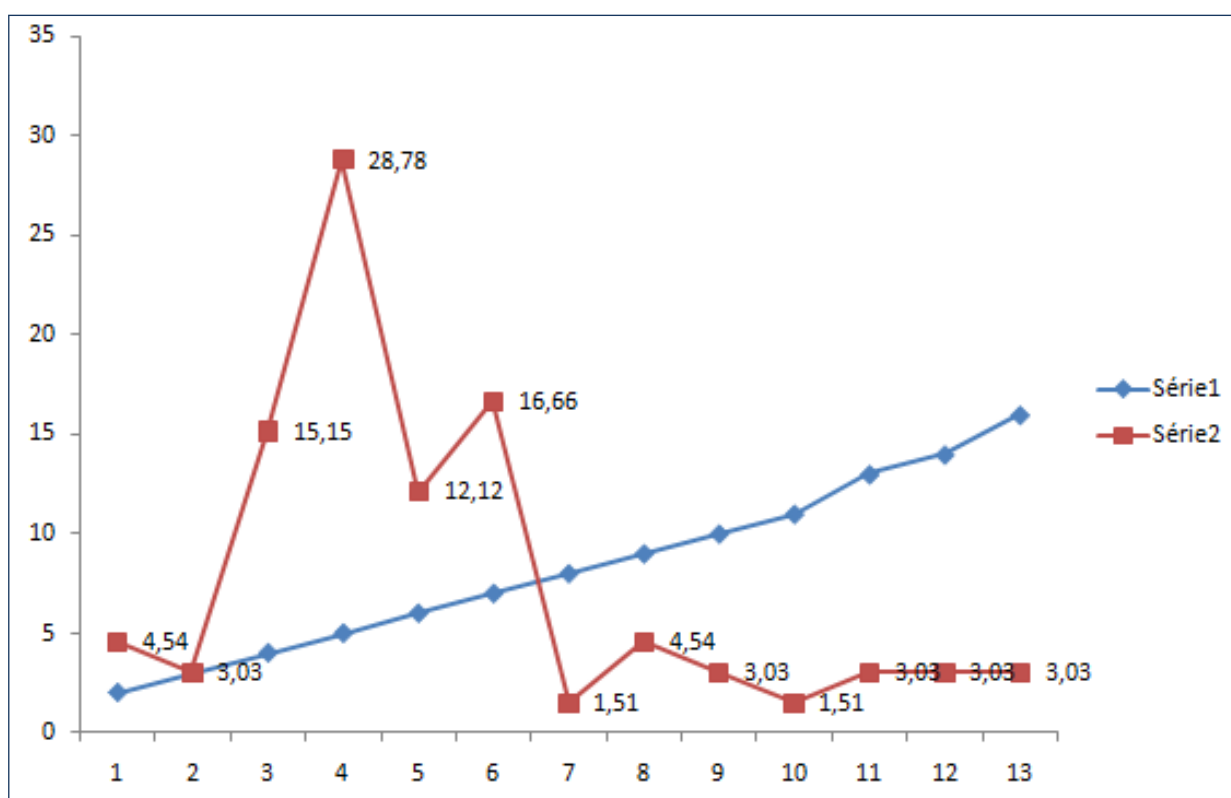


Figure 62. Distribution des différentes formes alléliques sur les 66 loci FRAXE

La série 1 (en bleu) représente les différents variants alléliques.

La série 2 (en rouge) représente le pourcentage de chaque variant.

Très peu d'étude ont été effectuée sur la distribution allélique de ce locus, nous remarquons l'absence de régularité dans notre distribution. Nous remarquons aussi l'apparition de deux variants alléliques n=2 et n=3 alors que ce microsatellite à comme répétition minimale n=6 dans certaines références et une répétition minimale n=4 dans d'autres études

bibliographiques sans aucun ordre chronologique apparent. Il aurait été intéressant à ce stade de faire le séquençage complet de la région chromosomique concernée pour mettre en évidence la présence d'un nombre si restreint de répétition, allant jusqu'à mettre en doute la taille minimale pour un microsatellite afin qu'il soit dynamique. Il est généralement admis que les microsatellites ont besoin d'une taille minimum, aux environs de huit nucléotides, pour pouvoir entrer en phase de développement (Buschiazzi et Gemmell, 2006), les séquences de taille plus petite étant considérées comme proto-microsatellites. Le développement peut-il débuter dès l'état de doublet ($n=2$) et qui est donc considéré comme un microsatellite à part entière.

Nous remarquons aussi que la courbe obtenue peine pour prendre la forme en cloche de type Gaussien impliquant par-là l'absence d'un certain équilibre. Bien que grossièrement, notre distribution fasse ressortir la taille $n=5$ (à 28.78 %) qui pourrait correspondre à la taille optimale de ce microsatellite, ce variant étant encadré par des variants à un pas ($n=4$ et $n=6$) à des pourcentages presque égaux (15.5 % et 12.12 %).

V.4- Hétérozygotie des loci FRAXA et FRAXE

Pour la suite de notre étude, étant donné que les loci sont localisés sur le chromosome X, les individus de sexe masculin étant hémizygotiques, ont été systématiquement éliminés ramenant ainsi l'effectif à un sous-groupe de 15 individus.

Nous avons analysé les données issues du génotypage pour vérifier s'il existe une relation entre certains variants de notre distribution. Pour cela un diagramme de dispersion ou nuage de points a été réalisé sur un fichier Excel avec un tableau à deux entrées où l'axe des abscisses représente un des locus chromosomique et l'axe des ordonnées le deuxième locus chromosomique. Les nuages de points représentent visuellement la corrélation de nos génotypes. Ils permettent de déterminer les tendances, les relations, les dispersions et les valeurs aberrantes. Les nuages de points représentent des observations faites avec des variables différentes ; ils peuvent donc prendre toutes sortes de formes. La densité des points est un bon indice de la force d'une corrélation. Lorsque les points sont très près les uns des autres, la corrélation est forte.

Pour le locus FRAXA (Figure 63) la corrélation semble assez forte puisque la plus grande partie des données gravitent sur la diagonale.

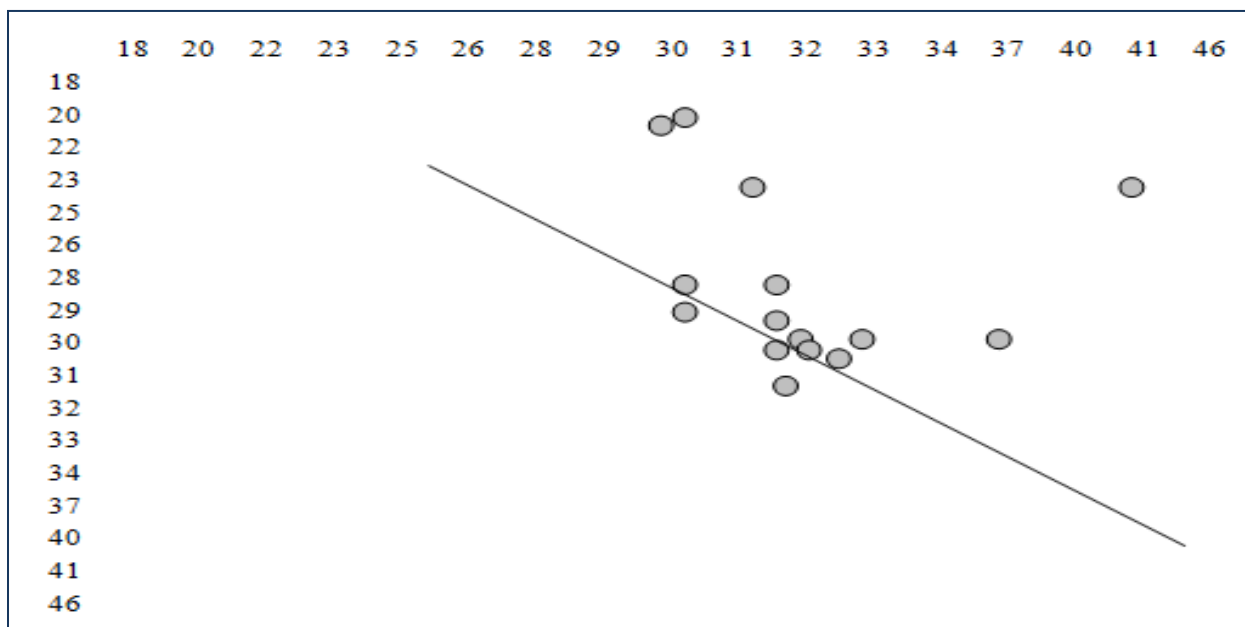


Figure 63. Diagramme de dispersion des variants FRAXA (♀)

Pour le locus FRAXE (Figure 64) la corrélation est pratiquement nulle puisque les données sont dispersées un peu partout dans le graphique.

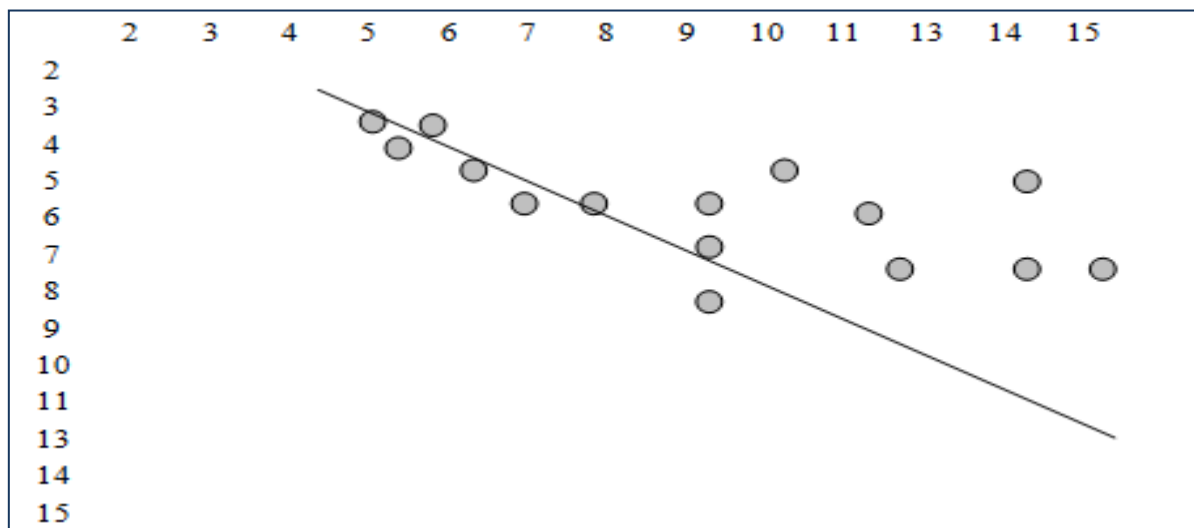


Figure 64. Diagramme de dispersion des variants FRAXE (♀)

Ces résultats sont plus ou moins parallèles avec ceux de la section précédente, il semblerait que d'un point de vue cycle de vie, les deux loci soient à un « âge » différent. Effectivement, le dynamisme du locus FRAXA semble être plus équilibré que celui du locus FRAXE, impliquant par-là que les microsatellites ayant atteint une certaine taille (et donc un certain âge) subissent des contractions, soit plus fréquentes, soit plus importantes d'où la dispersion

des variants alléliques, cela peut-il être le signe de la sénescence du microsatellite au locus FRAXE ?

DISCUSSION

L'ADN génomique humain représente de l'ordre de 3,3 milliards de paires de bases. Détecter une variation de séquence de l'ordre du nucléotide ou de quelques nucléotides parmi ces milliards de nucléotides a nécessité l'élaboration d'outils permettant de s'affranchir du « bruit de fond » généré par le reste du génome (Watson et al., 2009).

Différentes techniques de plus en plus pointues et de plus en plus rapides (Christofolini et al., 2009) ont été élaborées pour analyser une petite partie de ce génome telles que l'hybridation moléculaire entre ADN cible et sonde complémentaire par la méthode de Southern (1975) ou bien par amplification sélective de cette partie du génome de façon telle que le reste du génome devienne quantitativement négligeable par la méthode PCR (1985) (Kaplan et Delpech 2007).

Une fois isolée ou amplifiée, cette partie du génome peut être analysée par divers procédés pour la recherche d'éventuelles mutations.

Les mutations dynamiques correspondent à la dernière classe de mutations mise en évidence (1991), jusqu'à présent elles n'ont été identifiées qu'au niveau de l'espèce humaine (Kelkar et al., 2008). Ces mutations atypiques touchent des séquences bien spécifiques du génome humain, l'ADN hautement répété entre autres l'ADN microsatellite qui correspond à des motifs de très courtes tailles répété en tandem à localisation extra ou intragénique (Pasternak 2003 ; Karunasagar et al., 2005). Lorsque la mutation dynamique est à proximité d'un gène, l'instabilité allélique représentée par une amplification démesurée du motif de base, provoque des altérations qui se manifestent par l'apparition de signes cliniques spécifiques à une pathologie à étiologie génétique (de Brouwer et al., 2007 ; Read et Donnai, 2009).

L'une de ces pathologies, le syndrome de l'X Fragile (amplification du triplet CGG) est transmis comme un caractère dominant lié à l'X (Jin et Warren 2000). Le risque de transmission et de manifestation clinique varie suivant le type de mutation (prémuation ou mutation entière), le genre du patient et celui du parent porteur d'une expansion de triplet, et leur relation au sein de la famille. Les signes cliniques étant très subtiles, des diagnostics différentiels peuvent être la cause de la sous estimation de cette pathologie. Effectivement, 5 à 7 % d'enfants autistes sont en réalité atteints du syndrome de l'X Fragile (Garcia-Nonell et al., 2006 ; Nishimura et al., 2003).

Les hommes porteurs d'une mutation complète présentent un retard mental et ne se reproduisent pas (Merenstein et al., 1996). Les femmes hétérozygotes pour la mutation complète ont un risque de retard mental variable de 50 %. Elles transmettent la mutation complète à 50 % de leur descendance.

Une prémutation présente chez un homme est transmise à toutes ses filles et à aucun de ses fils. Les femmes porteuses d'une prémutation ou d'une mutation complète ont un risque de 50 % de transmettre l'allèle mutant. Le risque réel de présenter les symptômes liés à l'X-Fragile dépend du nombre de répétitions CGG et varie entre 10 % (60 à 69 répétitions) et 50 % (plus de 100 répétitions) pour les garçons (Sherman, 2006).

De plus les femmes porteuses de la prémutation présentent dans 16 % de cas une déficience ovarienne précoce (avant 40 ans) par rapport au 1% dans la population générale (Allingham-Hawkins et al., 1999), alors que les hommes porteurs d'une prémutation présentent à 20-30 % une FXTAS après l'âge de 50 ans (Hagerman et Hagerman, 2007). FXTAS se retrouve aussi au niveau d'individu de sexe féminin (Hagerman et al., 2004 ; Adams et al., 2007 ; Tassone et al., 2007)

Dans notre étude, nous avons analysé le locus FRAXA en parallèle avec le locus FRAXE, suivant en cela le protocole admis par la littérature (Murray et al., 1996 ; Pandley et Mittal 2002 ; Wang et al., 2003). Nous avons effectué le dépistage du gène *FMR1*, gène causale du syndrome de l'X Fragile sur 55 malades (17 déficients mentaux et 38 autistes). L'analyse par Southern blot avec la sonde *StB-12,3* après double digestion avec *EcoRI* et *EagI* chez un individu (III1 patient de la famille 4) a montré deux bandes de 6 et 8 kb correspondant à deux mutations complètes mosaïques. Le mosaïsme mis en évidence chez notre patient XFRA est due à l'instabilité somatique du triplet CGG au niveau des divisions postzygotiques. Ce phénomène est très fréquent avec des cas de mosaïsmes entre mutations complètes, de mosaïsmes entre délétion et amplification et de mosaïsmes entre formes intermédiaires (Grasso et al., 1999 ; Garcia Arocena et al., 2000 ; Genc et al., 2000 ; Fengler et al., 2002 ; Fan et al., 2005).

Le diagnostic clinique initial du probant a été par la suite redéfinie puisque diagnostiqué de part les signes cliniques comme autiste. L'analyse en cascade des membres de la famille ont montré que la mère (II) et la sœur (II2) sont respectivement porteuses de prémutations de 87 et 63 CGG. Permettant ainsi la détermination du statut de conductrice aussi bien pour la mère que pour la sœur de notre probant. Ces résultats nous ont conduis à rencontrer la mère pour une session de conseil génétique (Lacombe et al., 2006), afin de souligner le risque de transmission d'une mutation dynamique à la génération suivante, et le risque de présenter une insuffisance ovarienne précoce, condition qui est fortement liée à l'allèle prémuté de *FMR1* (Franke et al., 1998 ; Bussani et al., 2004 ; Gleicher et al., 2009 ; Chatterjee et al., 2009) .

Ainsi une amplification par PCR fluorescente est utile pour une évaluation fiable de des répétitions alléliques dans la gamme normale et prémutée. Etant donné que la mutation complète n'a pas réussi à amplifier, des résultats faussement positifs peuvent provenir d'inhibiteurs de polymérase (fonctionnant en parallèle d'un échantillon témoin normal) et des résultats faussement négatifs peuvent résulter de l'allèle amplification spécifique de l'allèle normal dans les hétérozygotes et mosaïque (Ameziane et al., 2006). Le problème de l'amplification spécifique d'allèle peut être surmonté par une nouvelle analyse par transfert de Southern de tous les échantillons mâles sans pic et des échantillons féminins avec un pic unique. Ainsi, l'utilité d'une PCR comme méthode de diagnostic a été limitée à une présélection d'allèles normaux et, pour cette raison, la caractérisation de mutations a été effectuée par hybridation moléculaire, un procédé qui permet d'identifier tous les fragments, y compris les prémutations et les mutations complètes (de Vries et al., 1997). Un RFLP normal ne signifie pas une absence de syndrome X fragile, bien que la principale cause de FXS soit l'expansion du triplet CGG, d'autres mutations peuvent également générer des FXS telles que des délétions dans le gène *FMR1* (de Boule et al., 1993 ; Zhong et al., 1996).

Ceci est la première étude sur la distribution des répétitions du gène *FMR1* dans la population Algérienne. Il est important pour le diagnostic du syndrome de l' X fragile de déterminer si l'intervalle de distribution des variants alléliques est similaire ou différent à d'autres populations, pour l'observation d'un même schéma de dynamisme associée à cette pathologie.

Très peu d'études sur l'aspect moléculaire de FXS ont été entreprises dans le monde arabe (*annexe 12*). Au niveau du Maghreb Arabe, la seule étude fut faite en Tunisie en 1997, sur une population de juifs tunisien mettent en évidence l'effet fondateur pour cette pathologie expliquant ainsi la haute prévalence de FXS au sein de la population juive (Falik-Zaccai et al., 1997).

Par contre au Moyen Orient, après des investigations moléculaires sur le terrain, le dépistage systématique du gène *FMR1* chez les enfants atteints de déficience mentale a été mis en place dans plusieurs pays, notamment l'Egypte (Meguide et al., 2007), le Liban (Zafatayeff et al., 1998), l'Arabie Saoudite (Iqbal et al., 2000 ; Al Husain et al., 2000), Bahrein (Al-Arrayed et Mohammed 1990), Oman (Jan 1992) ; et au Kuwait (Tayel et al., 1999 ; Bastaki et al., 2004).

Les résultats de notre étude sur la distribution des répétitions *FMR1* confirment les rapports précédents à savoir que le modèle des variants alléliques CGG est différent entre population et entre ethnies.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Malgré la récente révision de la prévalence, ce qui a réduit l'estimation de pas plus de 1 à 4000 hommes, le syndrome de l'X fragile reste probablement la cause la plus fréquente de retard mental hérité selon le model monogénique. Les caractéristiques cliniques sont subtiles, ce qui rend impossible le diagnostic clinique précoce et, donc le conseil génétique en temps opportun à la famille. En revanche la génétique moléculaire du diagnostic au sein des familles touchées a prouvé son efficacité au niveau d'autres populations de par le monde. Des résultats encourageants de dépistage systématique chez les personnes ayant des difficultés d'apprentissage, suivie par le dépistage de la famille, a été rapportée. Malgré le contexte assez particulier (identification d'une condition héréditaire au sein de la famille), l'expérience des familles touchées ainsi que les professionnels de la santé ont été favorable pour le dépistage de FXS.

Effectivement, il existe beaucoup de raisons en faveur de la mise en place du dépistage de FXS au sein des malades atteints de déficience mentale entre autre, le conseil génétique et une meilleure prise en charge thérapeutique. Une fois qu'un enfant est diagnostiqué pour la mutation complète ou pour la prémutation, le conseil génétique au sein de la famille devient primordial par rapport aux différents troubles associés au gène *FMR1* et qui peuvent se manifester chez les membres de la famille. Tels que des grands-parents ou des oncles qui peuvent avoir des problèmes de tremblements et d'ataxie suivie de démence, ou d'une tante atteinte d'une déficience ovarienne précoce avec une tendance dépressive.

Du fait du diagnostic différentiel entre le syndrome de l'X-Fragile et l'autisme, ce dépistage doit être élargi sur les personnes atteintes du trouble du spectre autistique ou autiste pour identifier les prémutations ou les mutations complètes.

Pour la mise en place du dépistage moléculaire du FXS au niveau de nos institutions hospitalo-universitaires, nous devons d'abord nous projeter dans un futur proche pour proposer des perspectives énoncées sous formes de question :

- Existe-t-il un test approprié pour le syndrome de l'X-Fragile ?
- Quelles est la répartition des variants alléliques *FMR1* au sein de la population Algérienne ?
- Quelle est la prévalence des mutations complètes et des prémutations dans les deux sexes au sein des différentes ethnies Algériennes ?
- Quelles sont les informations fiables, en termes de risque d'un enfant atteint, est disponible pour les femmes avec des prémutations entre 55 et 200 répétitions ?

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

- Quelles informations sont disponibles pour les femmes avec des allèles intermédiaires de 41 à 54-60 répétitions ?
- Combien de personnes touchées sont diagnostiqués ?
- Quelle est l'attitude des familles aux coûts et avantages d'un diagnostic moléculaire ?
- Quel est l'effet d'une prémutation sur la personne qui la porte ?
- Quelles sont les alternatives au dépistage de la population et sont-elles réalisables ?

Les programmes de dépistage systématique et les tests en cascade pourraient constituer des avantages pour les femmes les plus à risque. Un essai de dépistage systématique et les tests de cascade pour évaluer les avantages et les coûts d'une telle approche seraient basés sur la sensibilisation des secteurs concernés notamment ceux de la santé public et des services sociaux puisque la population concernée relève de leur compétence (pupille de l'état) et sur la compréhension collective au niveau de la population générale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abitbol, M., Menini C., Delezoide A.L., Rhyner T., Vekemans M., Mallet J. (1993) Nucleus basalis magnocellularis and hippocampus are the major sites of FMR-1 expression in the human fetal brain. *Nat Genet.* 4:147-53.

Adams, J. S., Adams P. E., Nguyen D., Brunberg J. A., Tassone F., Zhang W., Koldewyn K., Rivera S. M., Grigsby J., Zhang L., De Carli C., Hagerman P. J., Hagerman R. J. (2007) Volumetric brain changes in females with fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Neurology* 69 (9):851-859.

Adams, S. A., K. J. Steenblock, S. N. Thibodeau, N. M. Lindor. (2008) Premutations in the FMR1 gene are uncommon in men undergoing genetic testing for spinocerebellar ataxia. *J Neurogenet* 22 (1):77-92.

Adinolfi, S., Ramos A., Martin S.R., Dal Piaz F., Pucci P., Bardoni B., Mandel J.L., Pastore A. (2003) The N-terminus of the Fragile X Mental Retardation Protein contains a novel domain involved in dimerisation and RNA-binding. *Biochemistry* 43, 10437–10444.

Admire, A., Shanks L., Danzl N., Wang M., Weier U., Stevens W., Hunt E., Weinert T. (2006) Cycles of chromosome instability are associated with a fragile site and are increased by defects in DNA replication and checkpoint controls in yeast. *Genes Dev* 20 (2):159-173.

Ahmad K. and Henikoff S. (2001) Centromeres Are Specialized Replication Domains in Heterochromatin *The Journal of Cell Biology, Volume 153, Number 1*, 101–109

Ahuja, A. S., A. Thapar, and M. J. Owen. (2005). Genetics of mental retardation. *Indian J Med Sci* 59 (9):407-417.

Al-Arrayed SS, Mohammed AM. (1990) Fragile X Syndrome in a Bahraini family. *Bahrain Med Bull.*; 12(2):84-90.

Al Husain M, M.A. Salih, O.K. Zaki, L. Al Othman, M.N. Al Nasser. (2000). A clinical study of mentally retarded children with fragile X syndrome in Saudi Arabia. *Ann Saudi Med*, 20,16-9.

Allingham-Hawkins, D.J., R. Babul-Hirji, D. Chitayat, et al. (1999). Fragile X prémutation is a significant risk factor for premature ovarian failure: the International Collaborative POF in Fragile X study preliminary data. *Am J Med Genet*: 83: 322–325.

Ameziane N., Bogard M., Lamoril J., (2006) *Principes de biologie moléculaire en biologie clinique* ELSEVIER.

An, M.C., Zhang, N., Scott, G., Montoro, D., Wittkop, T., Mooney, S., Melov, S., Ellerby, L.M. (2012). Genetic correction of Huntington's disease phenotypes in induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 11, 253–263.

An, M.C., O'Brien, R.N., Zhang, N., Patra, B.N., De La Cruz, M., Ray, A., Ellerby, L.M. (2014). Polyglutamine disease modeling: epitope based screen for homologous recombination using CRISPR/Cas9 system. *PLoS Curr.* 6.

Antar, L. N., R. Afroz, J. B. Dichtenberg, R. C. Carroll, G. J. Bassell. (2004). Metabotropic glutamate receptor activation regulates fragile X mental retardation protein and FMR1 mRNA localization differentially in dendrites and at synapses. *J. Neurosci.* 24, 2648–2655

Antar, L. N., Li, C., Zhang, H., Carroll, R. C., Bassell, G. J. (2006). Local functions for FMRP in axon growth cone motility and activity- dependent regulation of filopodia and spine synapses. *Mol. Cell Neurosci.* 32, 37–48.

Applied Biosystems 3500/3500XL Genetic Analyzer, (2011) User Bulletin: Protocols for the analysis of AmpFISTR® PCR Amplification, Kit PCR products and validation summary.

Arlt, M. F., A. M. Casper, and T. W. Glover. (2003). Common fragile sites. *Cytogenet Genome Res* 100 (1-4):92-100.

Ashley, C. T. and S. T. Warren. (1995), Trinucleotide repeats expansion and human disease. *Annu Rev Genet*; 29: 703-728.

Avitzour, M., Mor-Shaked, H., Yanovsky-Dagan, S., Aharoni, S., Altarescu, G., Renbaum, P., Eldar-Geva, T., Schonberger, O., Levy-Lahad, E., Epsztejn-Litman, S., Eiges, R. (2014). FMR1 epigenetic silencing commonly occurs in undifferentiated fragile X-affected embryonic stem cells. *Stem Cell Reports* 3, 699–706.

Aziz, M., E. Stathopulu, M. Callias, C. Taylor, J. Turk, B. Oostra, R. Willemsen, M. Patton. (2003). Clinical features of boys with fragile X premutations and intermediate alleles. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 121B (1):119-127.

Bacolla, A., J. E. Larson, J. R. Collins, J. Li, A. Milosavljevic, P. D. Stenson, D. N. Cooper, R. D. Wells. (2008). Abundance and length of simple repeats in vertebrate genomes are determined by their structural properties. *Genome Res* 18 (10):1545-1553.

Bardoni, B., Schenck, A., Mandel, J. L. (1999) A novel RNA-binding nuclear protein that interacts with the fragile X mental retardation (FMR1) protein. *Hum. Molec. Genet.* 8: 2557-2566.

Bar-Nur, O., Caspi, I., Benvenisty, N. (2012). Molecular analysis of FMR1 reactivation in fragile-X induced pluripotent stem cells and their neuronal derivatives. *J. Mol. Cell Biol.* 4, 180–183.

Bassell, G. J., and S. T. Warren. (2008). Fragile X syndrome: loss of local mRNA regulation alters synaptic development and function. *Neuron* 60 (2):201-214.

Bastaki, L. A., F. Hegazy, M. M. Al-Heneidi, N. Turki, A. S. Azab, K. K. Naguib. (2004). Fragile X syndrome: a clinico-genetic study of mentally retarded patients in Kuwait. *East Mediterr Health J* 10 (1-2):116-124.

Bear MF., Huber KM., Warren ST., (2004) The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Trends Neurosci.* 27(7):370-7.

Belmonte MK and Bourgeron T. (2006) Fragile X syndrome and autism at the intersection of genetic and neural networks. *Nature Neuroscience*, 9/10

Bennett, C. E., G. S. Conway, J. N. Macpherson, P. A. Jacobs, A. Murray. (2010). Intermediate sized CGG repeats are not a common cause of idiopathic premature ovarian failure. *Hum Reprod* 25 (5):1335-1338.

Berry-Kravis, E., Abrams, L., Coffey, S.M., Hall, D.A., Greco, C., Gane, L.W., Grigsby, J., Bourgeois, J.A., Finucane, B., Jacquemont, S. et al. (2007) Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome: clinical features, genetics, and testing guidelines. *Mov. Disord.*, 22, 2018– 2030.

Biancalana, V., C. Beldjord, A. Taillandier, S. Szpiro-Tapia, V. Cusin, F. Gerson, C. Philippe, J. L. Mandel. (2004). Five years of molecular diagnosis of Fragile X syndrome (1997-2001): a collaborative study reporting 95% of the activity in France. *Am J Med Genet A* 129A (3):218-224.

Biancalana V, Toft M, Le Ber I, Tison F, Scherrer E, Thibodeau S, Mandel JL, Brice A, Farrer MJ, Dürr A, (2005) *FMR1* Premutations Associated With Fragile X-Associated Tremor/Ataxia Syndrome In Multiple System Atrophy. *Arch. Neurol.*, 62, 962-966.

Blackburn E.H. (2001) Switching and Signaling Review at the Telomere. *Cell*, Vol. 106, 661–673

Bodega, B., S. Bione, L. Dalpra, D. Toniolo, F. Ornaghi, W. Vegetti, E. Ginelli, A. Marozzi. (2006). Influence of intermediate and uninterrupted *FMR1* CGG expansions in premature ovarian failure manifestation. *Hum Reprod* 21 (4):952-957.

Bole, M., L. Menon, M. R. Mihailescu. (2008). Fragile X mental retardation protein recognition of G quadruplex structure is sufficient for high affinity binding to RNA. *Mol Biosyst* 4 (12):1212-1219.

Bourne, J. N., and K. M. Harris. (2008). Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annu Rev Neurosci* 31:47-67.

Brouwer, J. R., R. Willemsen, B. A. Oostra. (2009). Microsatellite repeat instability and neurological disease. *Bioessays* 31 (1):71-83.

Brown, V., P. Jin, S. Ceman, J. C. Darnell, W. T. O'Donnell, S. A. Tenenbaum, X. Jin, Y. Feng, K. D. Wilkinson, J. D. Keene, R. B. Darnell, S. T. Warren. (2001). Microarray

identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. *Cell* 107 (4):477-487.

Burd CG. and Dreyfuss G. (1994) Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins *Science*. 265(5172):615-21.

Buschiazzo E., and Gemmell NJ. (2006) The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. *Bioessays*. 28(10):1040-50.

Bussani, C., L. Papi, R. Sestini, F. Baldinotti, S. Bucciantini, V. Bruni, G. Scarselli. (2004). Premature ovarian failure and fragile X premutation: a study on 45 women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 112 (2):189-191.

Chandler, S. P., P. Kansagra, M. C. Hirst. (2003). Fragile X (CGG)_n repeats induce a transcriptional repression in cis upon a linked promoter: evidence for a chromatin mediated effect. *BMC Mol Biol* 4:3.

Chatterjee, S., A. Maitra, S. Kadam, Z. Patel, J. Gokral, P. Meherji. 2009. CGG repeat sizing in the FMR1 gene in Indian women with premature ovarian failure. *Reprod Biomed Online* 19 (2):281-286.

Chelly, J. (2000) Recent advances in the genetics and physiopathology of X chromosomal mental retardation. *Arch Pediatr*. 7 Suppl 2:114s-118s.

Chelly, J., and J. L. Mandel. 2001. Monogenic causes of X-linked mental retardation. *Nat Rev Genet* 2 (9):669-680

Chelly, J., M. Khelifaoui, F. Francis, B. Cherif, T. Bienvenu. 2006. Genetics and pathophysiology of mental retardation. *Eur J Hum Genet* 14 (6):701-713.

Chen, L., S. W. Yun, J. Seto, W. Liu, M. Toth. (2003). The fragile X mental retardation protein binds and regulates a novel class of mRNAs containing U rich target sequences. *Neuroscience* 120 (4):1005-1017.

Chiurazzi, P., G. Destro-Bisol, M. Genuardi, B. A. Oostra, G. Spedini, G. Neri. (1996). Extended gene diversity at the FMR1 locus and neighbouring CA repeats in a sub-Saharan population. *Am J Med Genet* 64 (1):216-219.

Chiurazzi, P., M. G. Pomponi, A. Sharrock, J. Macpherson, S. Lormeau, M. L. Morel, F. Rousseau. (1999). DNA panel for interlaboratory standardization of haplotype studies on the fragile X syndrome and proposal for a new allele nomenclature. *Am J Med Genet* 83 (4):347-349.

Chiurazzi, P., C. E. Schwartz, J. Gecz, G. Neri. (2008). XLMR genes: update (2007). *Eur J Hum Genet* 16 (4):422-434.

Cho, S.W., Kim, S., Kim, Y., Kweon, J., Kim, H.S., Bae, S., Kim, J.S. (2014). Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res.* 24, 132–141.

Christofolini, D. M., E. M. Abbud, M. V. Lipay, S. S. Costa, A. M. Vianna-Morgante, F. T. Bellucco, S. I. Nogueira, L. D. Kulikowski, D. Brunoni, Y. Juliano, M. A. Ramos, M. I. Melaragno. (2009). Evaluation of clinical checklists for fragile X syndrome screening in Brazilian intellectually disabled males: proposal for a new screening tool. *J Intellect Disabil* 13 (3):239-248.

Coffee, B., F. Zhang, S. Ceman, S. T. Warren, D. Reines. (2002). Histone modifications depict an aberrantly heterochromatinized FMR1 gene in fragile x syndrome. *Am J Hum Genet* 71 (4):923-932.

Coffee, B., F. Zhang, S. T. Warren, D. Reines. (1999). Acetylated histones are associated with FMR1 in normal but not fragile X-syndrome cells. *Nat Genet* 22 (1):98-101.

Coffey SM, Cook K, Tartaglia N, Tassone F, Nguyen DV, Pan R, Bronsky HE, Yuhas J, Borodyanskaya M, Grigsby J, Doerflinger M, Hagerman PJ, Hagerman RJ, (2008). Expanded Clinical Phenotype of Women With the FMR1 Premutation. *Am J Med Genet, Part A* 146A, 1009–1016.

Cornish, K., V. Sudhalter, J. Turk. (2004). Attention and language in fragile X. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 10 (1):11-16.

Cornish, K. M., L. Li, C. S. Kogan, S. Jacquemont, J. Turk, A. Dalton, R. J. Hagerman, P. J. Hagerman. (2008). Age-dependent cognitive changes in carriers of the fragile X syndrome. *Cortex* 44 (6):628-636.

Crawford, D. C., J. M. Acuna, and S. L. Sherman. (2001). FMR1 and the fragile X syndrome: human genome epidemiology review. *Genet Med* 3 (5):359-371.

Crawford DC, Zhang F, Wilson B, Warren ST, Sherman SL, (2000). Fragile X CGG repeat structure among African-Americans: identification of a novel factor responsible for repeat instability. *Hum. Mol. Genet.*, 9, 12, 1759-1769.

Crawford, D. C., K. L. Meadows, J. L. Newman, L. F. Taft, D. L. Pettay, L. B. Gold, S. J. Hersey, E. F. Hinkle, M. L. Stanfield, P. Holmgren, M. Yeargin-Allsopp, C. Boyle, S. L. Sherman. (1999). Prevalence and phenotype consequence of FRAXA and FRAXE alleles in a large, ethnically diverse, special education-needs population. *Am J Hum Genet* 64 (2):495-507.

Cummings CJ and Zoghbi HY Trinucleotide repeats: mechanisms and pathophysiology. (2000) *Ann Rev Genomics Hum Genet*, 1, 281-328.

Dahl, C., K. Gronskov, L. A. Larsen, P. Guldborg, and K. Brondum-Nielsen. (2007). A homogeneous assay for analysis of FMR1 promoter methylation in patients with fragile X syndrome. *Clin Chem* 53 (4):790-793.

De Boule, K., A. J. Verkerk, E. Reyniers, L. Vits, J. Hendrickx, B. Van Roy, F. Van den Bos, E. de Graaff, B. A. Oostra, and P. J. Willems. (1993). A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nat Genet* 3 (1):31-35.

de Brouwer, A. P., H. G. Yntema, T. Kleefstra, D. Lugtenberg, A. R. Oudakker, B. B. de Vries, H. van Bokhoven, H. Van Esch, S. G. Frints, G. Froyen, J. P. Fryns, M. Raynaud, M. P. Moizard, N. Ronce, A. Bensalem, C. Moraine, K. Poirier, L. Castelnau, Y. Saillour, T. Bienvenu, C. Beldjord, V. des Portes, J. Chelly, G. Turner, T. Fullston, J. Gecz, A. W. Kuss, A. Tzsach, L. R. Jensen, S. Lenzner, V. M. Kalscheuer, H. H. Ropers, and B. C. Hamel. (2007). Mutation frequencies of X-linked mental retardation genes in families from the EuroMRX consortium. *Hum Mutat* 28 (2):207-208.

De Caro, J. J., C. Dominguez, and S. L. Sherman. (2008). Reproductive health of adolescent girls who carry the FMR1 premutation: expected phenotype based on current knowledge of fragile x-associated primary ovarian insufficiency. *Ann N Y Acad Sci* 1135:99-111.

de Vries, B. B., A. M. van den Ouweland, S. Mohkamsing, H. J. Duivenvoorden, E. Mol, K. Gelsema, M. van Rijn, D. J. Halley, L. A. Sandkuijl, B. A. Oostra, A. Tibben, and M. F. Niermeijer. (1997). Screening and diagnosis for the fragile X syndrome among the mentally retarded: an epidemiological and psychological survey. Collaborative Fragile X Study Group. *Am J Hum Genet* 61 (3):660-667.

Devys, D., Biancalana, V., Rousseau, F., Boue, J., Mandel, J. L., Oberle, I. (1992) Analysis of full fragile X mutations in fetal tissues and monozygotic twins indicate that abnormal methylation and somatic heterogeneity are established early in development. *Am. J. Med. Genet.* 43: 208-216.

Dobyns, W. B., A. Filauro, B. N. Tomson, A. S. Chan, A. W. Ho, N. T. Ting, J. C. Oosterwijk, C. Ober. (2004). Inheritance of most X-linked traits is not dominant or recessive, just X-linked. *Am J Med Genet A* 129A (2):136-143.

Eberhart, D. E., Malter, H. E., Feng, Y., Warren, S. T. (1996) The fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals. *Hum. Molec. Genet.* 5: 1083-1091.

Eichler, E. E., S. Richards, R. A. Gibbs, D. L. Nelson. (1993). Fine structure of the human FMR1 gene. *Hum Mol Genet* 2 (8):1147-1153.

Eiges, R., Urbach, A., Malcov, M., Frumkin, T., Schwartz, T., Amit, A., Yaron, Y., Eden, A., Yanuka, O., Benvenisty, N., Ben-Yosef, D. (2007). Developmental study of fragile X syndrome using human embryonic stem cells derived from preimplantation genetically diagnosed embryos. *Cell Stem Cell* 1, 568–577.

Elbaz, A., J. Suedois, M. Duquesnoy, C. Beldjord, C. Berchel, G. Merault. (1998). Prevalence of fragile-X syndrome and FRAXE among children with intellectual disability in a Caribbean island, Guadeloupe, French West Indies. *J Intellect Disabil Res* 42 (Pt 1):81- 89.

Falik-Zaccai TC, Shachak E, Yalon M, Lis Z, Borochowitz Z, Macpherson JN, Nelson DL, Eichler EE.(1997) Predisposition to the fragile X syndrome in Jews of Tunisian descent is due to the absence of AGG interruptions on a rare Mediterranean haplotype. *Am J Hum Genet.* ;60(1):103-12.

Fan, H., J. K. Booker, S. E. McCandless, V. Shashi, A. Fleming, R. A. Farber. (2005). Mosaicism for an FMR1 gene deletion in a fragile X female. *Am J Med Genet A* 136 (2):214-217.

Farzin, F., H. Perry, D. Hessel, D. Loesch, J. Cohen, S. Bacalman, L. Gane, F. Tassone, P. Hagerman, R. Hagerman. (2006). Autism spectrum disorders and attention deficit/hyperactivity disorder in boys with the fragile X premutation. *J Dev Behav Pediatr* 27 (2 Suppl):S137-144.

Feinberg, A. P. (2007). Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature* 447 (7143):433-440.

Feng, Y. (2002). Fragile X mental retardation: misregulation of protein synthesis in the developing brain? *Microsc Res Tech* 57 (3):145-147.

Fengler, S., S. Fuchs, R. König, J. Arnemann. (2002). Mosaicism for FMR1 and FMR2 deletion: a new case. *J Med Genet* 39 (3):200-201.

Ferrari, F., V. Mercaldo, G. Piccoli, C. Sala, S. Cannata, T. Achsel, C. Bagni. (2007). The fragile X mental retardation protein-RNP granules show an mGluR-dependent localization in the post-synaptic spines. *Mol Cell Neurosci* 34 (3):343-354.

Franke, P., M. Leboyer, M. Gansicke, O. Weiffenbach, V. Biancalana, P. Cornillet-Lefebvre, M. F. Croquette, U. Froster, S. G. Schwab, F. Poustka, M. Hautzinger, W. Maier. (1998). Genotype-phenotype relationship in female carriers of the premutation and full mutation of FMR-1. *Psychiatry Res* 80 (2):113-127.

Freudenreich, C. H. (2007). Chromosome fragility: molecular mechanisms and cellular consequences. *Front Biosci* 12:4911-4924.

Freudenreich, C. H., and M. Lahiri. (2004). Structure-forming CAG/CTG repeat sequences are sensitive to breakage in the absence of Mrc1 checkpoint function and S-phase checkpoint signaling: implications for trinucleotide repeat expansion diseases. *Cell Cycle* 3 (11):1370-1374.

Froyen, G., Bauters, M. Voet, T. Marynen, P. (2006). X-linked mental retardation and epigenetics. *J Cell Mol Med* 10 (4):808-825.

Fu, Y.H., Kuhl, D.P., Pizzuti, A., Pieretti, M., Sutcliffe, J.S., Richards, S., Verkerk, A.J., Holden, J.J., Fenwick, R.G., Jr., Warren, S.T., et al. (1991). Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* 67, 1047–1058.

Fu, Y., Foden, J.A., Khayter, C., Maeder, M.L., Reyon, D., Joung, J.K., and Sander, J.D. (2013). High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat. Biotechnol.* 31, 822–826.

Garber, K., Smith, K. T., Reines, D., Warren, S. T. (2006). Transcription, translation and fragile X syndrome. *Curr Opin Genet Dev* 16 (3):270-275.

Garber, K. B., Visootsak, J., Warren, S. T. (2008). Fragile X syndrome. *Eur J Hum Genet* 16 (6):666-672.

Garcia Arocena, D., Y. de Diego, B. A. Oostra, R. Willemsen, M. Mirta Rodriguez. (2000). A fragile X case with an amplification/deletion mosaic pattern. *Hum Genet* 106 (3):366- 369.

García-Nonell C, Rigau-Ratera E, Artigas-Pallarés J, (2006) Autism in fragile X syndrome. *Rev Neurol*, 42(2), S95-S98.

Genc, B., H. Muller-Hartmann, M. Zeschnigk, H. Deissler, B. Schmitz, F. Majewski, A. von Gontard, W. Doerfler. (2000). Methylation mosaicism of 5'-(CGG)(n)-3' repeats in fragile X, premutation and normal individuals. *Nucleic Acids Res* 28 (10):2141-2152.

Gelehrer T.D. and Collins F.S. (1992) Principes de génétique moléculaire et médicale. Edition Pradel, Paris.

Gheldof, N., T. M. Tabuchi, J. Dekker. (2006). The active FMR1 promoter is associated with a large domain of altered chromatin conformation with embedded local histone modifications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (33):12463-12468.

Gleicher, N., A. Weghofer, D. H. Barad. (2009). A pilot study of premature ovarian senescence: I. Correlation of triple CGG repeats on the FMR1 gene to ovarian reserve parameters FSH and anti-Mullerian hormone. *Fertil Steril* 91 (5):1700-1706.

Gold B, Radu D, Balanko A, Chiang CS, (2000). Diagnosis of Fragile X syndrome by Southern blot hybridization using a chemiluminescent probe: a laboratory protocol. *Mol Diagn*, 5, 69-78. 2829.

Hagerman R. J, Berry-Kravis E, Kaufmann WE, Ono MY, Tartaglia N, Lachiewicz A, Kronk R, Delahunty C, Hessel D, Visootsak J, Picker J, Gane L, Tranfaglia M, (2009) Advances in the treatment of fragile X syndrome. *Pediatrics*, 123, 378–390.

Hagerman, P. J., and R. J. Hagerman. (2007). Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome an older face of the fragile X gene. *Nat Clin Pract Neurol* 3 (2):107-112.

Hagerman, R. J. (2006). Lessons from fragile X regarding neurobiology, autism, and neurodegeneration. *J Dev Behav Pediatr* 27 (1):63-74.

Hagerman, R. J., B. R. Leavitt, F. Farzin, S. Jacquemont, C. M. Greco, J. A. Brunberg, F. Tassone, D. Hessel, S. W. Harris, L. Zhang, T. Jardini, L. W. Gane, J. Ferranti, L. Ruiz, M. A. Leehey, J. Grigsby, P. J. Hagerman. (2004). Fragile-X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS) in females with the FMR1 premutation. *Am J Hum Genet* 74 (5):1051-1056.

Hagerman, P. J., C. M. Greco, R. J. Hagerman. (2003). A cerebellar tremor/ataxia syndrome among fragile X premutation carriers. *Cytogenet Genome Res* 100 (1-4):206-212.

Hagerman R. (2002). The physical and behavioral phenotype. In: Hagerman R, Hagerman P, eds. *Fragile X syndrome: diagnosis, treatment, and research*. Ed 3. Baltimore: John Hopkins University Press: 3–109.

Hagerman, R. J., M. Leehey, W. Heinrichs, F. Tassone, R. Wilson, J. Hills, J. Grigsby, B. Gage, P. J. Hagerman. (2001). Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X. *Neurology* 57 (1):127-130.

Hallmayer J, Pintado E, Lotspeich L, Spiker D, McMahon W, Petersen PB, Nicholas P, Pingree C, Kraemer HC, Wong DL, Ritvo E, Lin A, Hebert J, Cavalli-Sforza LL, Ciaranello RD, (1994). Molecular Analysis and Test of Linkage between the *FMR1* Gene and Infantile Autism in Multiplex Families. *Am. J. Hum. Genet*, 55, 951-959.

Hammond LS, Macias MM, Tarleton JC, Shashidhar Pai G, (1997). Fragile X syndrome and deletions in FMR1: New case and review of the literature. *Am. J. Med. Genet.*, 72, 430–434.

Hardman, N., (1986) Structure and function of repetitive DNA in eukaryotes. *Biochem. J* 234, 1-11.

Hartl D.L. and Clarck A.G. (2007) *Principles of population genetics*. Fourth edition SINAUER, USA

Hatton, D. D., J. Sideris, M. Skinner, J. Mankowski, D. B. Bailey, Jr., J. Roberts, P. Mirrett. (2006). Autistic behavior in children with fragile X syndrome: prevalence, stability, and the impact of FMRP. *Am J Med Genet A* 140A (17):1804-1813.

Iqbal, M. A., N. Sakati, M. Nester, P. Ozand. (2000). Cytogenetic diagnosis of fragile X syndrome: study of 305 suspected cases in Saudi Arabia. *Ann Saudi Med* 20 (3-4):214- 217.

Jacquemont, S., R. J. Hagerman, M. Leehey, J. Grigsby, L. Zhang, J. A. Brunberg, C. Greco, V. Des Portes, T. Jardini, R. Levine, E. Berry-Kravis, W. T. Brown, S. Schaeffer, J. Kissel, F. Tassone, P. J. Hagerman. (2003). Fragile X premutation tremor/ataxia syndrome: molecular, clinical, and neuro-imaging correlates. *Am J Hum Genet* 72 (4):869-878.

Jacquemont, S., R. J. Hagerman, P. J. Hagerman, M. A. Leehey. (2007). Fragile-X syndrome and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome: two faces of FMR1. *Lancet Neurol* 6 (1):45-55.

Jacquemont S. (2011) Epigenetic Modification of the FMR1 Gene in Fragile X Syndrome Is Associated with Differential Response to the mGluR5 Antagonist AFQ056. *Science Translational Medicine* : Vol 3/64.

Jan A. (1992) Fragile X syndrome. *Oman Med J*.; 9(2):37-8

Jin, P., and S. T. Warren. (2000). Understanding the molecular basis of fragile X syndrome. *Hum Mol Genet* 9 (6):901-908.

Jorde L.B., Carey J.C., Bamshad M.J., White R.L., (2004) *Génétique médicale* ELSEVIER.

Kaplan J.C., et Delpech M., (2007) *Biologie moléculaire et médecine* FLAMMARION.

Karunasagar, A., L. Pandit, S. Kumar, I. Karunasagar. (2005). Use of methylation sensitive polymerase chain reaction for detection of fragile X full mutation and carrier state in males. *Indian J Med Res* 122 (5):429-433.

Kaufmann, W. E., R. Cortell, A. S. Kau, I. Bukelis, E. Tierney, R. M. Gray, C. Cox, G. T. Capone, P. Stanard. (2004). Autism spectrum disorder in fragile X syndrome: communication, social interaction, and specific behaviors. *Am J Med Genet A* 129A (3):225-234.

Kelkar, Y. D., S. Tyekucheva, F. Chiaromonte, K. D. Makova. (2008). The genome-wide determinants of human and chimpanzee microsatellite evolution. *Genome Res* 18 (1):30-38.

Khandjian, E. W., Corbin, F., Woerly, S., Rousseau, F. (1996) The fragile X mental retardation protein is associated with ribosomes. *Nature Genet.* 12: 91-93

Khaniani, M. S., P. Kalitsis, T. Burgess, H. R. Slater. (2008). An improved Diagnostic PCR Assay for identification of Cryptic Heterozygosity for CGG Triplet Repeat Alleles in the Fragile X Gene (FMR1). *Mol Cytogenet* 1:5.

Kiledjian M, and Dreyfuss G. (1992) Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box. *EMBO Journal.* ;11(7):2655–2664

Kimura M, and Ohta T. (1975) Distribution of allelic frequencies in a finite population under stepwise production of neutral alleles. *Proc Natl Acad Sci* 72:2761–2764

Kleefstra, T., and B. C. Hamel. (2005). X-linked mental retardation: further lumping, splitting and emerging phenotypes. *Clin Genet* 67 (6):451-467.

Klug W., Cummings M., Spencer C., (2006) *Génétique* 8^{ème} édition, PEARSON.

Kremer EJ., Pritchard M., Lynch M., Yu S., Holman K., Baker E., Warren ST, Schlessinger D., Sutherland GR., Richards RI. (1991) Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)n. *Science* 21. Vol. 252: 5013.

Kruyer, H., Mila, M., Glover, G., Carbonell, P., Ballesta, F., Estivill, X. (1994) Fragile X syndrome and the (CGG)n mutation: two families with discordant MZ twins. *Am. J. Hum. Genet.* 54: 437-442.

Kunst, C. B., C. Zerylnick, L. Karickhoff, E. Eichler, J. Bullard, M. Chalifoux, J. J. Holden, A. Torroni, D. L. Nelson, S. T. Warren. (1996). FMR1 in global populations. *Am J Hum Genet* 58 (3):513-522.

Lacombe D., Lyonnet S., Briard M-L., (2006) *Prise en charge des maladies génétiques en pédiatrie* DOIN.

Lim, J.H., Booker, A.B. and Fallon, J.R. (2005) Regulating fragile X gene transcription in the brain and beyond. *J. Cell. Physiol.*, 10.1002.

Lugenbeel K.A., Peier A.M., Carson N.L., Chudley A.E., Nelson D.L. (1995) Intragenic loss of function mutations demonstrate the primary role of FMR1 in fragile X syndrome. *Nat Genet* 10, 483–485.

Lutz, R. E. (2007). Trinucleotide repeat disorders. *Semin Pediatr Neurol* 14 (1):26-33.

Malafosse A., (2000) *Le conseil génétique en psychiatrie* DOIN.

Mandel, J. L., and J. Chelly. (2004). Monogenic X-linked mental retardation: is it as frequent as currently estimated? The paradox of the ARX (Aristaless X) mutations. *Eur J Hum Genet* 12 (9):689-693.

Martin JP, Bell J, A pedigree of mental defect showing sex linkage. *J Neurol Psych*, 6, 1943, 154-157.

Meguid, N. A., E. R. Abdelraouf, A. A. Dardir, and M. K. El Awady. (2007). Prevalence of fragile X syndrome among school-age Egyptian males. Cairo, Egypt *World J Pediatr* 3 (4):271-275

Milá M, Castellví-Bel S, Sánchez A, Lázaro C, Villa M, Estivill X, (1996). Mosaicism for the fragile X syndrome full mutation and deletion within the CGG repeat of the *FMR1* gene. *J.Med.Genet.*, 33, 338-340.

Mirkin, S. M. (2006). DNA structures, repeat expansions and human hereditary disorders. *Curr Opin Struct Biol* 16 (3):351-358.

Moore, C. J., E. M. Daly, N. Schmitz, F. Tassone, C. Tysoe, R. J. Hagerman, P. J. Hagerman, R. G. Morris, K. C. Murphy, D. G. Murphy. (2004). A neuropsychological investigation of male premutation carriers of fragile X syndrome. *Neuropsychologia* 42 (14):1934-1947.

Mornet, E., C. Chateau, B. Simon-Bouy, J. L. Serre. (1998).The intermediate alleles of the fragile X CGG repeat in patients with mental retardation. *Clin Genet* 53 (3):200-201.

Murray, A., S. Youings, N. Dennis, L. Latsky, P. Linehan, N. McKechnie, J. Macpherson, M. Pound, P. Jacobs. (1996). Population screening at the FRAXA and FRAXE loci: molecular analyses of boys with learning difficulties and their mothers. *Hum Mol Genet* 5 (6):727-735.

Musco G, Stier G, Joseph C, Castiglione Morelli MA, Nilges M, Gibson TJ, Pastore A. (1996) Three-dimensional structure and stability of the KH domain: molecular insights into the fragile X syndrome. *Cell*. **85**(2):237–245.

Nakamoto, M., V. Nalavadi, M. P. Epstein, U. Narayanan, G. J. Bassell, S. T. Warren. (2007).Fragile X mental retardation protein deficiency leads to excessive mGluR5-dependent internalization of AMPA receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (39):15537-15542.

Napierala, M., A. Bacolla, R. D. Wells. (2005). Increased negative superhelical density in vivo enhances the genetic instability of triplet repeat sequences. *J Biol Chem* 280 (45):37366-37376.

Naumann, A., N. Hochstein, S. Weber, E. Fanning, W. Doerfler. (2009). A distinct DNA méthylation boundary in the 5'- upstream sequence of the FMR1 promoter binds nuclear proteins and is lost in fragile X syndrome. *Am J Hum Genet* 85 (5):606-616.

Nishimura, Y., C. L. Martin, A. Vazquez-Lopez, S. J. Spence, A. I. Alvarez-Retuerto, M. Sigman, C. Steindler, S. Pellegrini, N. C. Schanen, S. T. Warren, D. H. Geschwind. (2007). Genome-wide expression profiling of lymphoblastoid cell lines distinguishes different forms of autism and reveals shared pathways. *Hum Mol Genet* 16 (14):1682-1698.

Nolin SL, Brown WT, Glicksman A, Houck GE Jr, Gargano AD, Sullivan A, Biancalana V, Brøndum-Nielsen K, Hjalgrim H, Holinski-Feder E, Kooy F, Longshore J, Macpherson J, Mandel JL, Matthijs G, Rousseau F, Steinbach P, Väisänen ML, von Koskull H, Sherman SL, (2003). Expansion of the Fragile X CGG Repeat in Females with Premutation or Intermediate Alleles. *Am J Hum Genet*, 72, 454–464.

Nolin, S. L., F. A. Lewis, 3rd, L. L. Ye, G. E. Houck, Jr., A. E. Glicksman, P. Limprasert, S. Y. Li, N. Zhong, A. E. Ashley, E. Feingold, S. L. Sherman, W. T. Brown. (1996). Familial transmission of the FMR1 CGG repeat. *Am J Hum Genet* 59 (6):1252-1261.

Oberle, I., Rousseau, F., Heitz, D., Kretz, C., Devys, D., Hanauer, A., Boué, J., Bertheas, M. F., Mandel, J.L., (1991) Instability of a 550-Base Pair DNA Segment and Abnormal Methylation in Fragile X Syndrome. *Science* 252.5009 : 1097.

Pasternak J.J., (2003) *Génétique moléculaire humaine* de boeck.

Pearson, D. A., C. W. Santos, J. D. Roache, C. D. Casat, K. A. Loveland, D. Lachar, D. M. Lane, L. P. Faria, L. A. Cleveland. (2003). Treatment effects of methylphenidate on behavioral adjustment in children with mental retardation and ADHD. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 42 (2):209-216.

Pearson, C.E., Nichol Edamura, K., Cleary, J.D. (2005). Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. *Nat. Rev. Genet.* 6, 729–742.

Pembrey, M. E., A. J. Barnicoat, B. Carmichael, M. Bobrow, G. Turner. (2001). An assessment of screening strategies for fragile X syndrome in the UK. *Health Technol Assess* 5 (7):1-95.

Penagarikano O., Mülle JG., Warren ST. (2007) The Pathophysiology of Fragile X Syndrome. *Annu.Rev.Genomics Hum.Genet* 8:109-29

Pesso, R., M. Berkenstadt, H. Cuckle, E. Gak, L. Peleg, M. Frydman, G. Barkai. (2000). Screening for fragile X syndrome in women of reproductive age. *Prenat Diagn* 20 (8):611-614.

Pfeiffer, B. E., and K. M. Huber. (2007) Fragile X mental retardation protein induces synapse loss through acute postsynaptic translational regulation. *J Neurosci* 27 (12):3120-3130.

Pietrobono, R., E. Tabolacci, F. Zalfa, I. Zito, A. Terracciano, U. Moscato, C. Bagni, B. Oostra, P. Chiurazzi, G. Neri. (2005). Molecular dissection of the events leading to inactivation of the FMR1 gene. *Hum Mol Genet* 14 (2):267-277.

Raymond, F. L. (2006). X linked mental retardation: a clinical guide. *J Med Genet* 43 (3):193-200.

Read A. (1989) *Medical genetics an illustrated outline*, GOWER.

Read et Donnai, (2009) *Génétique médicale ; de la biologie à la pratique clinique*. Ed. de boeck.

Rifé, M., C. Badenas, J. Mallolas, L. Jimenez, R. Cervera, A. Maya, G. Glover, F. Rivera, M. Mila. (2003). Incidence of fragile X in 5,000 consecutive newborn males. *Genet Test* 7 (4):339-343.

Rifé M, Badenas C, Quintó LI, Puigoriol E, Tazón B, Rodriguez- Revenga L, Jiménez L, Sánchez A, Milà M, (2004) Analysis of CGG variation through 642 meioses in Fragile X families. *Molecular Human Reproduction*, 10(10), 773–776.

Rodwell C., and Aymé S., eds., “2014 Report on the State of the Art of Rare Disease Activities in Europe”, July 2014.

Ropers, H. H., and B. C. Hamel. (2005). X-linked mental retardation. *Nat Rev Genet* 6 (1):46-57.

Ropers, H. H., M. Hoeltzenbein, V. Kalscheuer, H. Yntema, B. Hamel, J. P. Fryns, J. Chelly, M. Partington, J. Gecz, C. Moraine. (2003). Nonsyndromic X-linked mental retardation: where are the missing mutations? *Trends Genet* 19 (6):316-320.

Rousseau F, Heitz D, Tarleton J, MacPherson J, Malmgren H, Dahl N, Barnicoat A, (1994). A multicenter study on genotype-phenotype correlations in the fragile x syndrome, using direct diagnosis with probe StB12.3: the first 2253 cases. *Am J Hum Genet*, 55(2), 225–237.

Roy-Engel A. M., Carroll M. L., Vogel E., Garber R. K., Nguyen S. V., Salem A. H., Batzer M. A. Deininger P. L. (2001) Alu Insertion Polymorphisms for the Study of Human Genomic Diversity *Genetics* 159: 279–290

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, (1989) eds. *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sammalkorpi, H., P. Alhopuro, R. Lehtonen, J. Tuimala, J. P. Mecklin, H. J. Jarvinen, J. Jiricny, A. Karhu, L. A. Aaltonen. (2007). Background mutation frequency in microsatellite unstable colorectal cancer. *Cancer Res* 67 (12):5691-5698.

Sherman SL, Jacobs PA, Morton NE, Froster-Iskenius U, Howard-Peebles PN, Nielsen KB, Partington MW, Sutherland GR, Turner G, Watson M. (1985) Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Hum Genet.* 69(4):289-99.

Sherman SL. (1996) Epidemiology. In Hagerman RJ, Cronister A, eds. *Fragile X Syndrome: Diagnosis, Treatment, and Research*. Baltimore, MD: John Hopkins University Press;165-192.

Sherman, S. L., F. Marsteller, A. J. Abramowitz, E. Scott, M. Leslie, and J. Bregman. (2002). Cognitive and behavioral performance among FMR1 high-repeat allele carriers surveyed from special education classes. *Am J Med Genet* 114 (4):458-465.

Singer M. and Berg P. (1992) *Gènes et genomes VIGOT*.

Siomi, M. C., Siomi, H., Sauer, W. H., Srinivasan, S., Nussbaum, R. L., Dreyfuss, G. (1995) FXR1, an autosomal homolog of the fragile X mental retardation gene. *EMBO J.* 14: 2401-2408.

Sittler, A., Devys, D., Weber, C., Mandel, J.-L. (1996) Alternative splicing of exon 14 determines nuclear or cytoplasmic localisation of fmr1 protein isoforms. *Hum. Molec. Genet.* 5: 95-102.

Strachan T. et Read A. (2012) *Génétique moléculaire humaine* 4^{ème} édition
LAVOISIER

Sullivan, A. K., D. C. Crawford, E. H. Scott, M. L. Leslie, S. L. Sherman. (2002). Paternally transmitted FMR1 alleles are less stable than maternally transmitted alleles in the common and intermediate size range. *Am J Hum Genet* 70 (6):1532-1544.

Sutherland, G. R. (1977). Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. *Science* 197 (4300):265-266.

Sutherland GR, and Ashforth PLC, (1979). X-linked mental retardation with macroorchidism and the fragile site at Xq27 or 28. *Hum Genet*, 48, 117-20.

Suzuki D.T., Griffiths A.J.E., Miller J.H., Lewontin R.C., (1986) *An introduction to genetic analysis* 3^{ème} édition, FREEMAN.

Tabolacci, E., Moscato, U., Zalfa, F., Bagni, C., Chiurazzi, P., Neri, G. (2008). Epigenetic analysis reveals a euchromatic configuration in the FMR1 unmethylated full mutations. *Eur. J. Hum. Genet.* 16, 1487–1498.

Tamanini, F., Kirkpatrick, L. L., Schonkeren, J., van Unen, L Bontekoe, C., Bakker, C., Nelson, D. L., Galjaard, H., Oostra, B. A., Hoogeveen, A. T. (2000) The fragile X-related proteins FXR1P and FXR2P contain a functional nucleolar-targeting signal equivalent to the HIV-1 regulatory proteins. *Hum. Molec. Genet.* 9: 1487-1493, 2000

Tassone, F., S. Coffey, and R. J. Hagerman, eds. (2007). *New developments in Fragile X -associated Tremor / Ataxia Syndrome (FXTAS)*. In *Fragile Sites: New Discoveries and Changing Perspectives*. I ed. New York: Nova Science Publishers.

Tassone, F., R. J. Hagerman, D. Z. Loesch, A. Lachiewicz, A. K. Taylor, P. J. Hagerman. (2000a). Fragile X males with unmethylated, full mutation trinucleotide repeat expansions have elevated levels of FMR1 messenger RNA. *Am J Med Genet* 94 (3):232-236.

Tassone, F., R. J. Hagerman, A. K. Taylor, L. W. Gane, T. E. Godfrey, P. J. Hagerman. (2000b). Elevated levels of FMR1 mRNA in carrier males: a new mechanism of involvement in the fragile-X syndrome. *Am J Hum Genet* 66 (1):6-15.

Tayel SM, Al-Naggar RL, Bastaki L, Ali FE, Al-Wadaani MA, Al-Awadi SA. (1999) Two-step fragile x-screening programme in mentally retarded males. *The Kuwait Medical Journal* : 31 (3): 257-262.

Tranfaglia MR, (2011),The Psychiatric Presentation of Fragile X: Evolution of the Diagnosis and Treatment of the Psychiatric Comorbidities of Fragile X Syndrome. *Dev Neurosci*, 33, 337–348.

Turner G, Daniel A, Frost M, (1980). X-linked mental retardation, macroorchidism, and the Xq27 fragile site. *Pediatr*, 96, 837-41.

Turner, B. M. (2002). Cellular memory and the histone code. *Cell* 111 (3):285-291.

Urbach, A., Bar-Nur, O., Daley, G.Q., Benvenisty, N. (2010). Differential modeling of fragile X syndrome by human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 6, 407–411.

Van Bokhoven, H., and J. M. Kramer. Disruption of the epigenetic code: an emerging mechanism in mental retardation. *Neurobiol Dis* 39 (1):3-12.

Vanderklish PW. and Edelman GM. (2002) Dendritic spines elongate after stimulation of group 1 metabotropic glutamate receptors in cultured hippocampal neurons. *PNAS* : vol. 99 no. 3 1639–1644.

Verkerk, A. J., M. Pieretti, J. S. Sutcliffe, Y. H. Fu, D. P. Kuhl, A. Pizzuti, O. Reiner, S. Richards, M. F. Victoria, F. P. Zhang, Eussen B.E., van Ommen GJB., Blonden LAJ., Riggins GJ., Chastain JL., Kunst JL., Galjaard, H., Caskey CT., Nelson DL., Oostra BA., Warren ST., (1991). Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 65 (5):905-914.

Verkerk A.J.M.H., de Graaff E., De Boule K., Eichler E.E., Konecki D.S., Reyniers E., Manca A., Poustka A., Willems P.J., Nelson D.L., Oostra B.A.(1993) Alternative splicing in the fragile X gene *FMR1*. *Hum. Mol. Genet.* 2 (4):399-404.

Vowles EJ., and Amos W. (2006) Quantifying ascertainment bias and species-specific length differences in human and chimpanzee microsatellites using genome sequences. *Mol Biol Evol.* (3):598-607.

Wang, Q., Y. Gu, J. M. Ferguson, Q. Chen, S. Boatwright, J. Gardiner, C. Below, J. Espinosa, D. L. Nelson, L. G. Shaffer. (2003). Cytogenetic analysis of obsessive-compulsive disorder (OCD): identification of a FRAXE fragile site. *Am J Med Genet A* 118A (1):25-28.

Wang Q, Green E, Bobrow M, Mathews CG, (1995). A rapid, nonradioactive screening test for fragile X mutations at the FRAXA and FRAXE loci. *J Med Genet*, 32(3), 170–173.

Watson J, Baker T, Bell S, Gann A, Levine M et Losick R. (2009) Biologie moléculaire du gene. Ed Pearson Education, Paris.

Whittaker J.C., Harbord RM., Boxall N., Mackay I., Dawson G., Sibly RM. (2003) Likelihood-Based Estimation of Microsatellite Mutation Rates. *Genetics* 164: 781–787

Willemsen, R., E. Mientjes, B. A. Oostra. (2005). FXTAS: a progressive neurologic syndrome associated with Fragile X premutation. *Curr Neurol Neurosci Rep* 5 (5):405-410.

Wolff, D. J., K. M. Gustashaw, V. Zurcher, L. Ko, W. White, L. Weiss, D. L. Van Dyke, S. Schwartz, H. F. Willard. (1997). Deletions in Xq26.3-q27.3 including FMR1 result in a severe phenotype in a male and variable phenotypes in females depending upon the X inactivation pattern. *Hum Genet* 100 (2):256-261.

Yaron, Y., and A. Orr-Urtreger. (2002). New genetic principles. *Clin Obstet Gynecol* 45 (3):593- 604; discussion 730-592.

Youngs, S. A., A. Murray, N. Dennis, S. Ennis, C. Lewis, N. McKechnie, M. Pound, A. Sharrock, P. Jacobs. (2000). FRAXA and FRAXE: the results of a five year survey. *J Med Genet* 37 (6):415-421.

Zalfa, F., S. Adinolfi, I. Napoli, E. Kuhn-Holsken, H. Urlaub, T. Achsel, A. Pastore, C. Bagni. (2005). Fragile X mental retardation protein (FMRP) binds specifically to the brain cytoplasmic RNAs BC1/BC200 via a novel RNA-binding motif. *J Biol Chem* 280 (39):33403-33410.

Zalfa, F., T. Achsel, C. Bagni. (2006). mRNPs, polysomes or granules: FMRP in neuronal protein synthesis. *Curr Opin Neurobiol* 16 (3):265-269.

Zeesman, S., L. Zwaigenbaum, D. T. Whelan, R. J. Hagerman, F. Tassone, S. A. Taylor. (2004). Paternal transmission of fragile X syndrome. *Am J Med Genet A* 129A (2):184-189.

Zeier Z, Kumar A, Bodhinathan K, Feller JA, Foster TC, Bloom DC, (2009). Fragile X mental retardation protein replacement restores hippocampal synaptic function in a mouse model of fragile X syndrome. *Gene Ther*, 16, 1122–1129.

Zhong, N., E. Kajanoja, B. Smits, J. Pietrofesa, D. Curley, D. Wang, W. Ju, S. Nolin, C. Dobkin, M. Ryyanen, W. T. Brown. (1996). Fragile X founder effects and new mutations in Finland. *Am J Med Genet* 64 (1):226-233.

Zuo, Y., G. Yang, E. Kwon, W. B. Gan. (2005). Long-term sensory deprivation prevents dendritic spine loss in primary somato-sensory cortex. *Nature* 436 (7048):261-265.

ANNEXES

NOM :

Prénom(s) :

Date de naissance :

Date de l'examen :

ANTÉCÉDENTS MÉDICAUX PERSONNELS

A - MALADIES :

1 - Rougeole, varicelle	OUI NON
2 - Scarlatine	OUI NON
3 - Oreillons	OUI NON
4 - Angines	OUI NON
5 - Otites	OUI NON
6 - Mastoïdite	OUI NON
7 - Troubles oculaires	OUI NON
8 - Port des lunettes	OUI NON
9 - Bronchite	OUI NON
10 - Pleurésie	OUI NON
11 - Pneumonie	OUI NON
12 - Asthme	OUI NON
13 - Tuberculose pulmonaire	OUI NON
14 - Tuberculose autre que pulmonaire (osseuse, cutanée)	OUI NON
15 - Maladie de cœur	OUI NON
16 - Hypertension	OUI NON
17 - Maladie des reins	OUI NON
18 - Maladies de l'estomac	OUI NON
19 - Maladies de l'intestin	OUI NON
20 - Maladie de foie - jaunisse	OUI NON

21 - Diabète	OUI NON
22 - Obésité	OUI NON
23 - Troubles endocriniens	OUI NON
24 - Urticaire - Eczéma	OUI NON
25 - Rhumatisme	OUI NON
26 - Méningite	OUI NON
27 - Encéphalite	OUI NON
28 - Paralysie (poliomyélite ou autre)	OUI NON
29 - Epilepsie	OUI NON
30 - Dépression nerveuse	OUI NON
31 - Asphyxie - intoxication au gaz	OUI NON
32 - Accidents de vaccination	OUI NON
33 - Autres maladies	OUI NON

B - BLESSURES ET INTERVENTIONS CHIRURGICALES

34 - Ablation des amygdales et végétations	OUI NON
35 - Appendicite	
36 - Péritonite	OUI NON
37 - Fracture d'un membre	OUI NON
38 - Fracture de la colonne vertébrale	OUI NON
39 - Fracture du crâne	OUI NON
40 - Autres fractures	OUI NON
41 - Traumatisme crânien sans fracture	OUI NON
42 - Luxations, foulures	OUI NON
43 - Brûlures	OUI NON
44 - Autres opérations (abcès, poumon, cœur, etc.)	OUI NON
45 - Hernie, phimosis, ovaire, etc.	OUI NON

C - RENSEIGNEMENTS SUR LA PUBERTE :

Pour les jeunes filles et les femmes :

- | | |
|---|---------|
| 46 - A quel âge avez-vous été réglée ? | (.....) |
| 47 - Avez-vous eu des troubles des règles (retard, avance, douleur) ? | OUI NON |
| 48 - Avez-vous suivi un traitement pour troubles des règles ? | OUI NON |
| 49 - Etes-vous enceinte actuellement ? | OUI NON |

Pour les garçons :

- 50- Puberté normale ?

D- RENSEIGNEMENTS SUR LA SANTE MENTALE :

51- Quotient intellectuel (QI) inférieur à 50-40 (RM modéré)	OUI	NON
- QI à 40-20 (RM grave)	OUI	NON
- QI inférieur à 20 (RM profond)	OUI	NON
52- Hyperactivité	OUI	NON
53- Absence totale de communication	OUI	NON
54- Impossibilité de suivre une scolarité « spécialisée »	OUI	NON
55- Agressivité	OUI	NON
56- Automutilation	OUI	NON
57- - Stéréotypie gestuelle :		
- balancement du corps	OUI	NON
- battement des mains	OUI	NON
58- Communication :		
- absence du langage	OUI	NON
- retard du langage (très restreint)	OUI	NON
59- Troubles :		
- de l'attention	OUI	NON
- regard fuyant	OUI	NON
60- Anxietés :		
- de la séparation	OUI	NON
- de l'imprévu et de l'inconnu	OUI	NON

Répondre aux questions suivantes d'après le comportement que votre enfant adopte **habituellement**.

Répondre à toutes les questions : Est-ce que votre enfant

- | | |
|---|-------------------|
| 1. aime se faire balancer ? | OUI |
| 2. est intéressé par les autres enfants ? | <u>OUI</u> |
| 3. aime grimper, les escaliers par exemple ? | OUI |
| 4. aime jouer au jeu de « coucou » ou à la cachette ? | OUI |
| 5. a déjà fait semblant, par exemple parler au téléphone, prendre soin d'une poupée ? | OUI |
| 6. utilise son index en pointant les objets pour demander des choses ? | OUI |
| 7. utilise son index pour vous montrer ce qui l'intéresse ? | <u>OUI</u> |
| 8. joue adéquatement avec les petits objets (p. ex. : autos, blocs), pas seulement les mettre dans sa bouche, les manipuler sans but précis ? | OUI |
| 9. vous amène parfois des objets pour vous montrer quelque chose ? | <u>OUI</u> |
| 10. vous regarde dans les yeux durant au moins deux secondes ? | OUI |
| 11. semble parfois hypersensible à certains sons (se bouche-t-il les oreilles) ? | NON |
| 12. vous sourit en voyant votre visage ou votre sourire ? | OUI |
| 13. vous imite (vous lui faites une grimace, votre enfant tente de faire la même chose) ? | <u>OUI</u> |
| 14. répond quand vous l'appellez par son prénom ? | <u>OUI</u> |
| 15. regarde un jouet que vous pointez à l'autre bout de la pièce ? | <u>OUI</u> |
| 16. marche ? | OUI |
| 17. porte attention à ce que vous regardez ? | OUI |
| 18. fait des mouvements inhabituels avec ses doigts près de son visage ? | NON |
| 19. a déjà essayé d'attirer votre attention sur ce qu'il fait ? | OUI |
| 20. vous a donné l'impression qu'il était sourd ? | NON |
| 21. comprend ce que les gens lui disent ? | OUI |
| 22. fixe le vide ou erre sans raison ? | NON |
| 23. regarde votre visage pour vérifier votre réaction quand il rencontre une situation inhabituelle ? | OUI |

Examen positif : en cas de réponse différente à :

- 2 éléments bleus (**éléments critiques**)
- ou à 3 éléments bleus **ou** noirs

CONSENTEMENT ÉCLAIRÉ
Participation à une recherche biomédicale

De : M., Mme

Nom :

Prénom :

Adresse :

.....

Dr m'a proposé de participer à une étude intitulée :

Mutation screening des gènes FMR1 et FMR2

Au niveau du Laboratoire de biochimie médicale et biologie moléculaire, Faculté de médecine, Clermont-Ferrand, France et l'investigatrice principale Mrs

J'ai reçu **oralement et par écrit** toutes les informations nécessaires pour comprendre l'intérêt et le déroulement de l'étude, les bénéfices attendus, les contraintes et les risques prévisibles.

J'ai pu poser toutes les questions nécessaires à la bonne compréhension de ces informations et j'ai reçu des réponses claires et précises.

J'ai disposé d'un délai de réflexion suffisant entre les informations reçues et ce consentement avant de prendre ma décision.

Interruption de la participation :

Sans justification et sans compromettre la qualité des soins qui me sont dispensés :

- Je suis libre de refuser de participer à cette étude,
- Je peux interrompre ma participation à tout moment, auquel cas j'en informerai le médecin qui me suit au cours de cette étude.

En foi de quoi, **j'accepte librement et volontairement de participer à cette recherche.**

Par ailleurs, je pourrai éventuellement être sorti(e) de l'étude par mon médecin s'il l'estime nécessaire.

Ma participation pourra également être interrompue en cas d'arrêt prématuré de l'étude.

Législation :

Mon consentement ne décharge pas les organisateurs de la recherche de leurs responsabilités à mon égard et je conserve tous mes droits garantis par :

UNESCO : *Déclaration universelle sur le génome humain et les droits de l'homme (1997).*

HUGO : *Déclaration sur la conduite de la recherche génétique (1996).*

Déclaration sur l'échantillonnage de l'ADN, contrôle et accès (1998).

OMS : *Proposition de directive internationale sur les problèmes éthiques dans la génétique médicale et les services génétiques (1997).*

Examen médical préalable :

J'ai été informé(e) que je bénéficierai d'un examen médical préalable à l'étude. Les résultats éventuels me seront communiqués directement par l'intermédiaire de mon médecin traitant.

Docteur.....

Adresse :

Recueil des données

Les données ayant trait à mon état de santé demeurent strictement confidentielles et ne peuvent être consultées que par le médecin qui me suit et ses collaborateurs, par des personnes mandatées par le promoteur et astreintes au secret professionnel.

J'ai bien été informé(e) que mes données personnelles seront rendues anonymes, avant d'être intégrées dans un rapport ou une publication scientifique.

Je conserve un exemplaire du présent formulaire de consentement.

Annexe 3. Consentement éclairé

<i>Partie à remplir par le tuteur légal</i>	<i>Partie à remplir par le médecin traitant</i>
Nom et Prénom du patient	Nom et Prénom du médecin
Signature du tuteur légal	Signature
Date et Lieu	Date et Lieu

Solution de Lyse 10X

545.7 g	Sucrose
25 ml	2M Tris-HCl pH 7.5 [315.2 g/l]
25 ml	1M Mg Cl 6H ₂ O [203.3 g/l]
50 ml	Triton 100X
900 ml	Eau distillée

Dilution au 1:10 avant utilisation

Tampon d'éluion 10X

5 ml	2M Tris-HCl pH 7.5 [315.2 g/l]
20 ml	0.5M EDTA pH 8.0 [186.1 g/l]
2 ml	5M NaCl [292.2 g/l]
73 ml	Eau distillée

Dilution au 1:10 avant utilisation

Protéinase K [10 mg/ml]

Perchlorate de Potassium [6M]

Phénol froid

Chloroforme

Éthanol froid (-70 °C) [70%]

SDS 10%

Annexe 5. Feuille de route détaillée du génotypage

X FRAGILE KIT PLATINUM FRAXA FRAXE

Invitrogen reçu le 01/08/08, ouvert le 08/10/08
lot 375926 pér OCT 09

Date:
Opérateur

Séquence des primers(Eurogentec)

FRAXA(Fu et al.1991)

PR156 FAM	AGC CCC GCA CTT CCA CCA CCA GCT CCT CCA	5 pmol/ul
PR155	GCT CAG CTC CGT TTC GGT TTC ACT TCC GGT	5 pmol/ul

FRAXE(Wang et al. 1995)

PR 134 HEX	GCG AGG AAG CGG CGG CAG TGG CAC TGG	20 pmol/ul
PR 135	CCT GTG AGT GTG TAA GTG TGT GAT GCT GCC G	20 pmol/ul

PRIMERS

Lieu : dans congélateur pièce PCR

PR156 solution fille à 100 pmol/ul dilution sol mère au 1/4 5ul amorce+ 15ul H2O

PR155 solution mère à **100** uM dans eauMilliQ

Mix primers 1: 5 ul PR155(100 pmol/ul)+5 ul PR156(100 pmol/ul)+90 ul H2O =STOCK à 5 pmol/ul

PR134 solution fille à 100 pmol/ul dilution sol mère au 1/4 5ul amorce+ 15ul H2O

PR135 solution mère à **100** uM dans eauMilliQ

Mix primers 2: 20 ul PR134(100 pmol/ul)+20 ul PR135(100 pmol/ul)+60 ul H2O =STOCK à 20 pmol/ul

Produit final	Référence	Volume ul 1X	Nombre éch	Volume ,,,,X
ADN(200 ng/ul)		1		
Tampon 10X PCR platinum(amplification)		2	8	16
Mix Primers 1		1,5	8	12
MgSO4(Kit platinum)		0,6	8	4,8
dNTP 2 mM(Promega)		2	8	16
PCR Enhancer(kIT PLATINUM)		8	8	64
Platinum Pfx ADN polymérase	INVITROGEN	0,3	8	2,4
Mix Primers 2		1	8	8
qsp 20 ul H2O (stérile Fresenius ou tube du Kit GC RICH)		4,6	8	36,8
		20 ul total		19 ul/tube

Appareil: TECHNE 200

Nom du programme: XFRAPLAT ou FRAXA

Programme:

3 mn 95°C	
15 sec 95°C	28 cycles
2 mn 64°C	
2 mn 72°C	
10 mn 72°C	
4°C	

SEQUENCEUR 3130:

			X n ech	
FORMAMIDE Hi-Di (Applied Biosystems)	ul	10	8	80
Standard ILS 600 (Promega)	ul	0,5	8	4
PCR	ul	1		

10 ul MIX + 2 ul PCR

Séquenceur 3130 :genescan polymère POP 7,projet fragment,capillaire 36,échelle 400HD

Analyse sur GENESCAN et GENOTYPER Taille attendue FRAXA Témoin Normal 274 et 297 pb)(couleur bleue)

FRAXE 300 et 303 pb(couleur verte)

Digestion de l'ADNg :

Tampon de digestion

BSA spermidine

EagI 10 UI/ μ l

EcoRI 10 UI/ μ l

Bleu d'arrêt [10 %]

Electrophorèse sur gel d'agarose :

Gel d'agarose [0.8 %] (1.6 g d'agarose dans 200 ml de TBE 1X)

TBE

BET

1Kb DNA Ladder (invitrogen[®]).

HCl [0.25 N]

NaOH [0.5 M]

NaCl [1.5 M]

Tris [0.5 M]

Membrane Hybond N⁺ (Amersham[®])

SSPE 20X

Papier Wattman[®]

Hybridation :

ADN spermatique de saumon

40% de formamide (65°C) Formamide Hi-Di TM Formamide hautement déionisé ou *high deionized formamide*

Sonde STB 12-3

Mélange dGTP, dATP et dTTP (Kit Nonaprimer)

Solution tampon (Kit Nonaprimer)

dCTP marqué au ³²P (Kit RadPrime DNA)

Klenow Fragment (Kit Nonaprimer).

Tampon stop (Kit Nonaprimer).

Sephadex

TE 1X

SSC 0.5

SDS 0.1%

Bandelette Stratagène[®]

Cassette Kodak[®]

Films X-ray

Echantillonnage primaire (RM)

N°	Sexe	Nom Prénom(s)	Age (ans)
1	F	TI	5
2	F	OJ	5
3	F	KZ	4
4	F	BR	7
5	F	BJ	13
6	M	ZM	8
7	M	GME	5
8	M	BA	20
9	M	AJ	11
10	M	BDE	4
11	M	BAM	6
12	M	MTE	8
13	M	GAM	4
14	M	BRM	8
15	M	AL	7

Echantillonnage primaire (AUT)

N°	Sexe	Nom Prénom(s)	Age (ans)
1	M	BO	15
2	M	HSE	6
3	M	HA	3
4	M	MN	5
5	M	AN	7
6	M	BMA	7
7	M	BI	7
8	M	MM	5
9	M	LSMC	7
10	M	DK	17
11	M	NS	4
12	M	ZM	7
13	M	BSE	-
14	M	SAE	-
15	M	GYMI	-
16	M	HAE	-
17	M	MBHK	-
18	M	GLM	-

N°	Sexe	Nom Prénom(s)	Age (ans)
19	M	KC	4
20	M	BAM	9
21	M	TS	-
22	M	BA	-
23	M	DH	-
24	M	OZE	2
25	M	LC	20
26	M	CH	15
27	M	SA	-
28	M	BAN	-
29	M	MMA	-
30	M	KO	12
31	F	BM	5
32	F	AR	-
33	F	ZLY	-
34	F	KA	-
35	F	DW	-
36	F	RN	13
37	F	AMD	4
38	F	RI	7

ECHANTILLON PRIMAIRE

55 MALADES + 5 INA = 60 INDIVIDUS

GENOTYPAGE :

60 INDIVIDUS (18 F + 42 M) \Rightarrow $(18 \times 2) + 42 = 78$ CHROMOSOMES

POLYMORPHISME :

52 INDIVIDUS (14 F + 38 M) \Rightarrow $(14 \times 2) + 38 = 66$ ALLELES

HETEROZYGOTIE :

15 INDIVIDUS (F) \Rightarrow 30 LOCI

Annexe 8. Résultats détaillés des répétitions CGG(FRAXA)

N°	Sexe	N/P	Cat	Identification PLAT 3031	Tailles allèles (pb)	Répétitions (CGG)
1	F	TI	RM	01 TI PLAT 006 C06	298.3/ 298.3	31/ 31
2	M	BAM	RM	02 BAM PLAT 008 D06	280.64	25
3	M	MTE	RM	03 MTE PLAT 010 E06	303.9	33
4	F	OJ	RM	07 OJ PLAT 001 A01	296.3/290.3	30/28
5	M	AL	RM	08 AL PLAT 003 B01	296.16	30
6	F	ZM	RM	09 ZM PLAT 005 C01	299.14/295.19	31/30
7	M	GME	RM	10 GME PLAT 007 D01	302.1	32
8	F	BA	RM	11 BA PLAT 009 E01	299.06	31
9	F	KZ	RM	12 KZ PLAT 011 F01	296.55/267.22	30/20
10	M	BO	AUT	19 BO PLAT 010 E02	272.69	22
11	M	BA	PNA	17 BA PLAT 006 C02	272.57	22
12	F	BAS	PNA	16 BAS PLAT 004 B02	328.38/273.07	41/23
13	M	BS	PNA	18 BS PLAT 008 D02	290.35	28
14	M	AJ	RM	20 AJ PLAT 012 F02	328.36	41
15	M	HSE	AUT	21 HS PLAT 014 G02	299.06	31
16	M	HA	AUT	22 HA PLAT 016 H02	296.12	30
17	M	MN	AUT	23 MN PLAT 001 A03	297.12	31
18	M	AN	AUT	24 AN PLAT 003 B03	343.82	46
19	M	BMA	AUT	28 BM PLAT 011 F03	297.7	31
20	F	BR	AUT	39 BR PLAT 012 F10	299.39/293.1	32/30
21	F	BJ	RM	30 BJ PLAT 015 H03	300.66/294.41	32/30

Annexe 8. Résultats détaillés des répétitions CGG(FRAXA)

22	M	BI	AUT	40 BI PLAT 014 G10	291.22	29
23	M	MM	AUT	41 MM PLAT 016 H10	324.9	40
24	M	LSMC	AUT	33 LS PLAT 006 C04	297.32	31
25	M	DK	AUT	34 DK PLAT 008 D04	297.65	31
26	M	BDE	RM	42 BDE PLAT 001 A11	302.13	32
27	F	RI	AUT	43 RI PLAT 003 B11	304.85/296.05	33/30
28	F	AM	RM	45 AM PLAT 007 D11	302.3/296.48	32/30
29	M	AMO	RM	44 AMO PLAT 005 C11	296.58	30
30	M	ZM	AUT	46 ZM PLAT 009 E11	284.48	26
31	M	GAM	RM	47 GAM PLAT 011 F11	302.48	32
32	F	AMD	AUT	48 AM PLAT 013 G11	299.32/296.47	31/30
33	M	SAE	AUT	49 SA PLAT 015 H11	293.31/ 296.21	29/ 30
34	M	GYMI	AUT	50 GYMI PLAT 002 A12	272.82/ 275.27	22/ 23
35	M	HAE	AUT	51 HA PLAT 004 B12	296.65	30
36	M	MBHK	AUT	52 MB PLAT 006 C12	258.11	18
37	M	GLM	AUT	53 GL PLAT 008 D12	293.9	29
38	M	KC	XFRA	2MKCE II1 PLAT 007 D05	FM	MQ363/930
39	F	KLM	PXFRA	1FKML I1 PLAT 005 C05	296.52/PM	30/ 87
40	F	KL	PXFRA	3FKL II2 PLAT 009 E05	296.51/PM	30/ 63
41	M	BAM	AUT	60 BA PLAT 005 C01	266.51	20
42	M	BRM	RM	61 BR PLAT 007 D01	301.34	32
43	M	TS	AUT	62 TS PLAT 009 E01	307.09	34
44	M	BA	AUT	63 BA PLAT 011F01	292.95	29
45	M	DH	AUT	64 DH PLAT 013 G01	295.76	30
46	M	OZE	AUT	65 OZ PLAT 015 H01	304.01	33
47	F	RN	AUT	66 RN PLAT 002 A02	298.67/275.33	31/23

Annexe 8. Résultats détaillés des répétitions CGG(FRAXA)

48	M	CH	AUT	67 CH PLAT 004 B02	266.69	20
49	M	SA	AUT	68 SA PLAT 006 C02	292.87	29
50	F	KA	AUT	69 KA PLAT 008 D02	295.77/266.5	30/20
51	F	ZLY	AUT	70 ZLY PLAT 010 E02	298.66/292.84	31/29
52	F	AR	AUT	71 AR PLAT 012 F02	301.45/295.79	32/30
53	M	KO	AUT	72 KO PLAT 014 G02	266.63	20
54	F	BM	AUT	73 BM PLAT 016 H02	315.76/295.68	37/30
55	M	MMA	AUT	74 MMA PLAT 001A03	293.57	29
56	M	BAN	AUT	75 BAN PLAT 003 B03	284.45	26
57	M	LC	AUT	76 LC PLAT 005 C03	275.68	23
58	F	DW	AUT	77 DW PLAT 007 D03	296.17/293.25	30/29
59	M	BSE	AUT	78 BS PLAT 009 E03	296.14	30
60	M	NS	AUT	79 NS PLAT 011 F03	266.48	20

*PNA : Parent non atteint ; XFRA : Syndrome de l'X-fragile ; FM : Mutation complète ; MQ : Mosaïque ;
PXFRA : Prémütée ; PM : Prémütation*

Annexe 9. Résultats détaillés des répétitions GCC (FRAXE)

N°	Sexe	N/P	Cat	Identification PLAT 3031	Tailles allèles pb	Répétitions GCC
1	F	TI	RM	01 TI PLAT 006 C06	306.81/322.48	6/11
2	M	BAM	RM	02 BAM PLAT 008 D06	306.87	6
3	M	MTE	RM	03 MTE PLAT 010 E06	309.81	7
4	F	OJ	RM	07 OJ PLAT 001 A01	306.42	5/6
5	M	AL	RM	08 AL PLAT 003 B01	306.64	6
6	F	ZM	RM	09 ZM PLAT 005 C01	304.43/301.93	5/4
7	M	GME	RM	10 GME PLAT 007 D01	304.2	5
8	F	BA	RM	11 BA PLAT 009 E01	305.1	5
9	F	KZ	RM	12 KZ PLAT 011 F01	309.89/328.35	7/13
10	M	BO	AUT	19 BO PLAT 010 E02	309.62	7
11	M	BA	-	17 BA PLAT 006 C02	309.67	7
12	F	BAS	-	16 BAS PLAT 004 B02	309.73/314.94	7/9
13	M	BS	-	18 BS PLAT 008 D02	307.42	6
14	M	AJ	RM	20 AJ PLAT 012 F02	315.19	9
15	M	HSE	AUT	21 HS PLAT 014 G02	299.44	4
16	M	HA	AUT	22 HA PLAT 016 H02	304.15	5
17	M	MN	AUT	23 MN PLAT 001 A03	297.69	4
18	M	AN	AUT	24 AN PLAT 003 B03	305.43	6
19	M	BMA	AUT	28 BM PLAT 011 F03	308.63	7
20	F	BR	AUT	39 BR PLAT 012 F10	302.88/331.0	5/14
21	F	BJ	RM	30 BJ PLAT 015 H03	305.39/334.1	6/15

Annexe 9. Résultats détaillés des répétitions GCC (FRAXE)

22	M	BI	AUT	40 BI PLAT 014 G10	300.33	4
23	M	MM	AUT	41 MM PLAT 016 H10	304.39	5
24	M	LSMC	AUT	33 LS PLAT 006 C04	305.56	6
25	M	DK	AUT	34 DK PLAT 008 D04	305.72	6
26	M	BDE	RM	42 BDE PLAT 001 A11	302.74	4
27	F	RI	AUT	43 RI PLAT 003 B11	297.57/302.53	4/5
28	F	AM	RM	45 AM PLAT 007 D11	303.1/310.52	5/7
29	M	AMO	RM	44 AMO PLAT 005 C11	310.73	7
30	M	ZM	AUT	46 ZM PLAT 009 E11	303.66	5
31	M	GAM	RM	47 GAM PLAT 011 F11	302.97	5
32	F	AMD	AUT	48 AM PLAT 013 G11	331.0	14/9
33	M	SAE	AUT	49 SA PLAT 015 H11	310.86/315.28	7/9
34	M	GYMI	AUT	50 GYMI PLAT 002 A12	302.45/308.16	6/5
35	M	HAE	AUT	51 HA PLAT 004 B12	303.49	5
36	M	MBHK	AUT	52 MB PLAT 006 C12	328.55	13
37	M	GLM	AUT	53 GL PLAT 008 D12	310.37	7
38	M	KC	XFRA	2MKCE II1 PLAT 007 D05	317.53	10
39	F	KLM	PXFRA	1FKML I1 PLAT 005 C05	302.44/317.62	4/10
40	F	KL	PXFRA	3FKL II2 PLAT 009 E05	317.58/332.96	10/15
41	M	BAM	AUT	60 BA PLAT 005 C01	301.57	4
42	M	BRM	RM	61 BR PLAT 007 D01	301.56	4
43	M	TS	AUT	62 TS PLAT 009 E01	281.3	2
44	M	BA	AUT	63 BA PLAT 011F01	304.37	5
45	M	DH	AUT	64 DH PLAT 013 G01	304.66	5
46	M	OZE	AUT	65 OZ PLAT 015 H01	304.56	5
47	F	RN	AUT	66 RN PLAT 002 A02	311.25/313.93	8/7

Annexe 9. Résultats détaillés des répétitions GCC (FRAXE)

48	M	CH	AUT	67 CH PLAT 004 B02	294.42	4
49	M	SA	AUT	68 SA PLAT 006 C02	301.67	4
50	F	KA	AUT	69 KA PLAT 008 D02	294.11/301.67	4
51	F	ZLY	AUT	70 ZLY PLAT 010 E02	304.4/314.45	9
52	F	AR	AUT	71 AR PLAT 012 F02	301.79/319.6	10
53	M	KO	AUT	72 KO PLAT 014 G02	304.49	5
54	F	BM	AUT	73 BM PLAT 016 H02	301.44/303.99	5/4
55	M	MMA	AUT	74 MMA PLAT 001A03	309.6	7
56	M	BAN	AUT	75 BAN PLAT 003 B03	317.48	10
57	M	LC	AUT	76 LC PLAT 005 C03	302.48	4
58	F	DW	AUT	77 DW PLAT 007 D03	310.2/335.89	16
59	M	BSE	AUT	78 BS PLAT 009 E03	305.14	6
60	M	NS	AUT	79 NS PLAT 011 F03	335.15	16

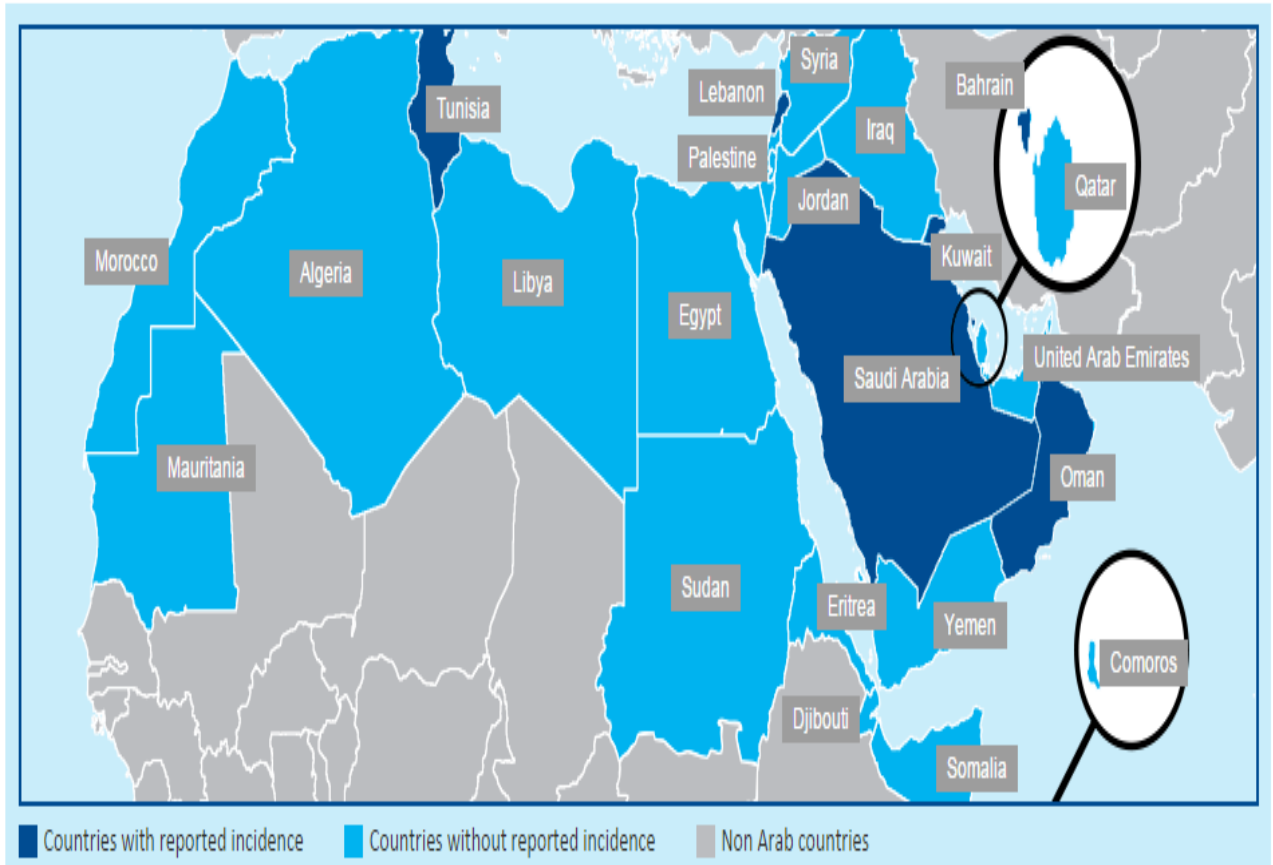
Annexe 10. Prévalences estimées de 47 études sur différentes ethnies

Estimated prevalence					
Country	Population	No. positive/ no. tested	General population	Targeted population	Reference
Australia ¹	SN	10/472	1/4350	2.1	(Turner et al., 1986; Turner et al., 1996)
Brazil	SN	0/83	–	–	(Mulatinho et al., 2000)
Brazil	SN	5/256	–	2.0	(Haddad et al., 1999)
Canada	GP	1/24,446	1/24,446	–	(Rousseau et al., 2007)
Chile	SN	4/214	–	1.9	(Aspálaga et al., 1998)
Croatia	SN	4/114	–	0.9–2.6	(Hecimovic et al., 2002)
Croatia	SN	14/81	–	17.3	(Hecimovic et al., 1998)
Estonia	GP, SN	14/516	1/27,115	2.7	(Puusepp et al., 2008)
Egypt	SN	34/200	–	5.9	(Behery, 2008)
France	SN	10/403	–	2.5	(Gerard et al., 1997)
Greece and Cyprus	CR	8/611	1/4246	1.3	(Patsalis et al., 1999)
Guadeloupe, FWI	IR	11/163	1/2359	6.7	(Elbaz et al., 1998)
India	SN	3/146	–	2.5	(Pandey et al., 2002)
India	CR	19/360	–	5.3	(Jain et al., 1998)
Israel ¹	GP	3/14,334	–	1.5	(Tolendano-Alhadeif et al., 2001)
Iran	GP, SN, CR	32/508	–	3.4–15.3	(Pouya et al., 2009)
India	SN	9/93	–	9.7	(Sharma et al., 2001)
Japan	GP	0/946	1/10,000	–	(Otsuka et al., 2010)
Japan	SN	2/256	–	0.8	(Namba et al., 1995)
Korea	SN	4/65	–	6.15	(Yim et al., 2008)
Kuwait	SN	11/182	–	–	(Bastaki et al., 2004)
Mexico	GP, SN	0/129	–	–	(Rosales-Reynoso et al., 2005)
Mexico	CR	2/53	–	3.8	(Gonzalez-del Angel et al., 2000)
Netherlands	CR	10/197	–	5.1	(van den Ouweland et al., 1994)
Netherlands	SN	9/866	1/6045	2.0–2.4	(de Vries et al., 1997)
Poland	GS, SN	6/201	–	3.0	(Mazurczak et al., 1996)
Saudi Arabia	SN	12/94	–	6.4	(Al Husain et al., 2000)
Spain	SN	8/92	–	8.7	(Arrieta et al., 1999)
Spain	GP	2/5000	1/2466	–	(Rife et al., 2003)
Spain	SN	11/182	–	6.0	(Mila et al., 1997)
Spain ²	GS, SN, CR	5/180	1/6200–1/8200	2.7	(Millan et al., 1999)
South Africa	SN	9/148	–	6.1	(Goldman et al., 1997; Goldman et al., 1998)
Tasmania	GP, SN	0/1253	–	–	(Mitchell et al., 2004)
Taiwan	GP	1/10,046	1/10,000	–	(Tzeng et al., 2005)
Taiwan	SN	4/206	–	1.9	(Tzeng et al., 2000)
Thailand	SN	5/94	–	5.3	(Ruangdaraganon et al., 2000)
Turkey	CR	5/166	–	3.0	(Tuncbilek et al., 1999)
Turkey	SN	14/120	–	11.7	(Demirhan et al., 2003)
Yugoslavia ⁴	SN	2/97	–	2.06	(Major et al., 2003)
United Kingdom ¹	GS	4/180	1/8918	2.2	(Jacobs et al., 1993)
United Kingdom	SN	1/138	–	0.7	(O'Dwyer et al., 1997)
United Kingdom	SN	4/103	1/4130	3.9	(Slaney et al., 1995)
United Kingdom	SN	20/3738	1/5530	0.5	(Youings et al., 2000; Murray et al., 1996)
USA	GS	7/2324	1/2545–1/3717	0.3–0.4	(Crawford et al., 2002)
USA	GP	7/36,124	1/5161	–	(Coffee et al., 2009)
USA	GP, GS, CR	1226/119,232	–	0.61–1.4	(Strom et al., 2007)
USA	CR	10/188	3.7	–	(Kaplan et al., 1994)

Annexe 11. Distribution des répétitions CGG sur différentes ethnies

Country (population)	Sample size	No. of CGG repeat variants (range)	Common repeat(s)	Reference
Brazil (African Brazilians)	255	26 (15–43)	30, 29	Mingroni-Netto et al. (2002)
Brazil (Ameridians)	46	26 (15–43)	30, 29	Mingroni-Netto et al. (2002)
Brazil (European Brazilians)	64	26 (15–43)	30, 20	Mingroni-Netto et al. (2002)
Cameroon (Bamileke, Bororo, and Sanga)	47	22 (22–41)	29, 30	Chiurazzi et al. (1996a)
Chile (European and Asian ancestry)	NR (192 X chrs screened)	19 (19–44)	30, 29	Jara et al. (1998)
China (Chinese ancestry)	177	16 (19–40)	29, 30	Zhou et al. (2006)
Croatia (European ancestry)	74	26 (20–45)	30, 31	Dokić et al. (2008)
Ghana (multi-ethnic)	350	23 (18–54)	30, 29	Peprah et al. (2010b)
India (multi-ethnic)	265	26 (19–50)	29, 28	Sharma et al. (2001)
India (multi-ethnic)	99	15 (19–40)	30, 29	Zhou et al. (2006)
Indonesia (multi-ethnic)	1069	32 (NR)	29, 30	Faradz et al. (2000)
Indonesia (Malay)	178	18 (19–40)	29, 30	Zhou et al. (2006)
Japan (Japanese ancestry)	946	24 (6–54)	27, 26	Otsuka et al. (2010)
Mexico (Mestizos)	207	23 (15–87)	32, 30	Barros-Nunez et al. (2008)
Mexico (Tarahumaras)	140	13 (15–87)	32, 30	Barros-Nunez et al. (2008)
Mexico (Huichols)	138	14 (19–87)	30, 29	Barros-Nunez et al. (2008)
Mexico (Western region)	129	23 (16–76)	32, 30	Rosales-Reynoso et al. (2005)
United Kingdom (multi-ethnic)	254	30 (13–49)	30, 29	Jacobs et al. (1993)
United States (African American)	213	32 (14–55)	30, 29	Crawford et al. (2000a)
United States (European ancestry)	200	39 (11–56)	30, 29	Crawford et al. (2000a)

Annexe 12. Syndrome de l'X-Fragile dans le monde arabe



PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Research Article



Mutation Screening and CGG-Repeat Distribution of the *FMR1* gene Among Mentally Retarded and Autistic Patients in Algeria

Aicha Zoubeida Benmostefa^{*1}, Dalila Satta², Nouredine Abadi³, Isabel Creveaux⁴

¹Laboratoire de Recherche en Biochimie et Toxicologie Environnementale, Dépt de Biochimie, Université Badji-Mokhtar, Annaba, Algeria.

²Département de Biologie Animale, Université Mentouri, Constantine, Algeria.

³Laboratoire de Biologie et Génétique Moléculaire, Centre Hospitalo-Universitaire Ben Badis, Constantine, Algeria.

⁴Laboratoire de Biochimie Médicale et Biologie Moléculaire, Faculté de Médecine, Clermont-Ferrand, France.

*Corresponding author's E-mail: zoubenmostefa@gmail.com

Accepted on: 07-09-2015; Finalized on: 31-01-2016.

ABSTRACT

Fragile X syndrome (FXS) is the leading cause of inherited mental retardation. The underlying molecular alteration consists of a CGG-repeat expansion within the *FMR1* gene. Therefore, searching for CGG expansion at the FXS locus among the mentally retarded should become a routine investigation in neuro-paediatric practice. This study was to establish a molecular diagnosis in Algerian patients exhibiting mental retardation with or without autistic features. It is important for the fragile X diagnosis to establish whether the range of allele distribution in Algerian patients are comparable to other populations, and if it is observed the same pattern of expansion associated with the disease. PCR was undertaken on 60 samples followed by Southern blot to analyze the CGG repeat number and methylation status. The molecular findings indicated in one young patient, diagnosed as autistic, mosaics mutations of 360 and 330 repetitions, while his mother was found carrying a premutated allele of 87 repetitions, and his two years old sister was found to have a contracted premutated allele of 63 repetitions of the CGG repeat. The distribution of the CGG repeats falls within the 30 repeats (17%), followed by a 31 repeat sizes (12%) instead of the 29 repeats as in the Caucasian population. The results of this study reconfirmed previous reports that the pattern of *FMR1* CGG repeat alleles is different regarding the racial/ethnic population studied. In conclusion, the detection of the FXS mutations has allowed us to offer more informed genetic counseling and reliable patient follow-up.

Keywords: autism, CGG repeats, *FMR1* gene, fragile X Syndrome, mental retardation.

INTRODUCTION

Fragile X syndrome (FXS) (OMIM n 300624) is the most common cause of inherited mental retardation and the second most common cause of genetically associated mental retardation following trisomy 21^{1,2}. FXS is caused by a dynamic mutation which involves an unstable expansion of a trinucleotide CGG repeat at the 5'-untranslated region (UTR) of the fragile X mental retardation 1 (*FMR1*) gene, located at Xq27.3^{3,4}. In the general population, individuals carry 6-52 CGG repeats and the triplet number is usually stably transmitted. Individuals carrying alleles 53-200 repeats are called premutated, the repeats are unstable through maternal transmission and tend to extend more often than contract^{3,5}. Affected individuals carry alleles > 200 repeats called full mutation which is generally associated with hypermethylation at the *FMR1* promoter and consequent transcriptional silencing⁶⁻⁹. The silencing of the *FMR1* gene leads to the deficiency of the fragile X mental retardation protein (FMRP) thus causes the classical FXS¹⁰. Moreover, there is a grey-zone with repeats between 45-55, these alleles called intermediate, are occasionally unstable and they are potential precursor of a premutation in subsequent generations¹¹. Size is not the only factor implicated in all instability. The number and position of AGG interspersions determining long uninterrupted CGG arrays at the 3' and 5' ends of the repeat¹², haplotype background and parental origin,

have been evoked as predisposing factors leading a common/intermediate allele to progress toward a mutation state^{13,14}.

The main clinical features in males are intellectual disability and behavioral problems including anxiety, aggression, hyperactivity, impulsivity, shyness, attention deficit disorder, and autism¹⁵⁻¹⁸ as well as macroorchidism, and a long narrow face with large averted ears¹⁹⁻²¹.

Numerous studies have found FXS in every ethnic group that has been evaluated with an incidence of 1 in 4500 males and 1 in 9000 females whereas the actual incidence of at-risk individuals is estimated at 1 in 1000 for males and 1 in 4000 for females²². The population-based prevalence study of full mutation of *FMR1* through DNA analysis was now estimated 1 in 4000 males and 1 in 8000 females²³.

Furthermore, there have been growing evidences of premutation-associated to clinical phenotypes such as milder forms of FXS including autistic features²⁴, developmental delay and latter phenotypes of fragile X-tremor ataxia syndrome in older premutated male carriers, and premature ovarian failure before the age of 40 in premutated females²⁵.

Considering the prevalence of full mutation and premutation as well as their consequences on children's



development and their latter phenotypes, the impact of FXS is thought to be much more enormous than what has earlier been thought.

There have been growing interests worldwide on the molecular diagnosis and clinical experiences on FXS. At present, polymerase chain reaction (PCR), and Southern blotting are considered as the golden standard for the diagnosis of FXS^{26,27}.

Although FXS has been identified in all the main ethnic groups, little is known about its prevalence with respect to ethnicity^{28,29}.

According to the literature and many reports, the screening of the FMR1 gene has never been conducted among MR (mentally retarded) patients neither on autistic patients in Algeria.

Therefore, this investigation is the first one done in the assessment of a molecular diagnosis on those specific patients.

MATERIALS AND METHODS

Patients and clinical assessments

Patients were recruited in three different psychiatric clinical practicing in Annaba (North-East of Algeria). Patients were recruited for participation if they were receiving special education services based on a cognitive disability (mental retardation or learning disability). This ongoing study was designed to collect families with one or more mental retarded (MR) offspring with or without autistic features. 55 patients were selected (15 females and 40 males), and 3 asymptomatic relatives (2 females and 1 male) for a total of 58 samples. The mean age of the sample was 08.46 ± 3.65 years and patients ranged from 02 to 20 years of age.

Dysmorphic features typical of the fragile X syndrome were not seen in any of the selected patients.

Collection of the samples was done according to the ethical of our laboratory guidelines. Legal representatives of all the patients gave their informed consent prior to molecular genetics research.

DNA samples

To study CGG transmission following FXS genotype, genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes (5 to 10 ml of whole blood) according to standard procedures³⁰.

Fluorescent PCR analysis

PCR amplification (TECHNE 200) was carried out on both loci FRAXA³ and FRAXE³¹. Briefly, 200 ng of genomic DNA were used in a total volume of 20 μ l, containing: 5 pM of each primer FRAXA (Eurogentec): forward (**FAM**) 5' AGC CCC GCA CTT CCA CCA CCA GCT CCT CCA 3' and reverse 5' GCT CAG CTC CGT TTC GGT TTC ACT TCC GGT 3' and 20 pM of each primer FRAXE (Eurogentec): forward (**HEX**) 5' GCG AGG AAG CGG CGG CAG TGG CAC TGG 3' and

reverse 5' CCT GTG AGT GTG TAA GTG TGT GAT GCT GCC G 3', and 200 μ M of each dNTP (Promega), 3% of MgSO₄ (Kit PLATINIUM[®]), 2 μ l of 10X PCR buffer, 40% of PCR enhancer (Kit PLATINIUM[®]) and 1.25 units of Platinum *pf*x DNA Polymerase.

Amplifications were initiated with a primary denaturation step at 95°C for 3 min, followed by 28 cycles of denaturation at 95°C for 15 sec, annealing at 64°C for 2 min and elongation at 72°C for 10 min. The final elongation was carried out at 72°C for 10 min.

Capillary electrophoresis

The PCR products (2 μ l) were mixed with 0.5 μ l size standard (ILS600, Promega) and 10 μ l deionized formamide (Hi-Di: Applied Biosystems) and heated for 5 min at 95°C. The DNA fragments were separated by automated capillary electrophoresis according to the manufacturer's instructions, in a polymer POP 7 3130 Genetic analyzer (Applied Biosystems) with a capacity of 16 samples per run.

Fragment analysis was performed with GenMapper v 4.0 software (Applied Biosystems).

Southern-blot

A total of 4 individuals (3 females and 1 male) were studied, 2 females and 1 male from one family case and 1 unrelated female, along with normal and premutated female controls. The protocol reported³² was followed with some modifications: 0.5 μ g of DNA were digested for 5 h at 37°C with 10 units of EagI (Biolabs) and 20 units of EcoRI (Biolabs) in a final volume of 40 μ l, including 1X Digestion Buffer and 100 μ g/ μ l BSA spermidine. 15 units of EagI and 20 units of EcoRI were added (after 5 h and 18 h); the final lap of digestion was left 8 h then stopped by the addition of 10% of blocking solution.

Electrophoreses was performed on a 0.8% Agarose gel overnight at 3.5 V/cm, and a molecular weight marker was run in parallel (2 Kb to 12 Kb). To dephosphorylate DNA fragments, gel was treated in 0.25 N HCl for 10 min. Denaturation was performed in 0.5 M NaOH and 1.5 M NaCl for 2 x 15 min, followed by neutralization in 0.5 M Tris-HCl and 0.5 M NaCl for 2 x 15 min, after which the gel was equilibrated in 20 X SSC for 10 min. All of the above steps were performed in room temperature with shaking. Upward capillary transfer of the DNA was performed overnight onto positively charged nylon membranes (HYBOND N⁺) in 20X SSPE. An StB12.3 probe (CREGEMES: Centre Régional de Génétique Médicale de Strasbourg), was radioactively labeled (Random Primed: InVitrogen). Pre-hybridization and hybridization were carried out in 40% formamide, 0.5X SSC, 0.1% SDS and 200 mg/ml of salmon sperm denatured DNA (10 min at 100°C) at 65°C for 1 and 16 h respectively, followed by the following washes: 0.5X SSC, 0.1% SDS for 4 x 15 min at 60°C.



(CGG) repetition distribution

In order to study the pattern of repeat size for the FMR1 gene in our Algerian panel, 66 chromosomes of unrelated individuals (28 from females and 38 from males) were analyzed and compared to published Caucasian and non-Caucasian distribution among MR patients and/or on normal population.

RESULTS AND DISCUSSION

The size of the fragments obtained by PCR and Southern-blot analyses and the classification of the alleles according to the degree of (CGG) repeats detected in males and females are shown in Table 1.

Fluorescent PCR analysis

PCR analysis of 60 individuals (19 females and 41 males) yielded the following results:

- i) Presence of two alleles of normal size (267-315 bp) in 11 females (78%);
- ii) one normal allele size (298 bp) in 1 female (5%);
- iii) one normal allele size (288-343bp) in 37 males (85%);
- iv) DNA sample was not amplified in 1 male (2%), and one normal allele size (295 bp) and the second premutated in 2 females (11%) from the same family (Fig.1).

Southern-blot

Southern-blot was carried out on samples showing one allele amplified in 3 females suggesting either they are normal homozygous or XFRA carriers, and on 1 autistic male, which DNA failed to amplify, suggesting a too large repeat to be amplified by PCR.

Patient (DM): Southern blot results showed that this patient is homozygous for the size of the CGG repeat.

Family (4): Southern blot results showed that the mother (I1), was a carrier of a premutation (Fig.2, 466 bp-fragments). The symptomatic proband DNA was not amplified, and thus he could be a carrier of a full mutation. His sister (II2) showed a unique band of 295 bp (normal allele size), suggesting homozygosity, but heterozygosity because of a full mutation cannot be ruled out, and thus, a Southern blot assay was carried out (Fig.2). The mother and the sister showed the typical Fragile-X-premutation carrier band pattern: 2.8 and 5.2 Kb bands denoted normal alleles of active and inactive X chromosome respectively, whereas 3.3 Kb bands indicated premutated allele. Therefore, the PCR results were confirmed in these cases.

The patient sister showed a contracted premutated allele of 63 (CGG) repeats while her mother showed a premutated allele of 87 (CGG) repeats.

The absence of the 2.8 Kb fragment and the presence of higher and different molecular weight bands in the patient (II1), denoted the presence of different full mutations (6 and 8 Kb), characteristic of a mosaic pattern.

(CGG) repeats distribution

Table 2 shows the distribution of allelic sizes in a total of 17 alleles, measured from 14 females and 38 males. Family members were discarded to avoid biasing results.

The number of trinucleotide repeats ranges from 18-46 CGG repeats (Tab.3).

Furthermore, we were able to characterize one allele with a repeat size of 46, which fall in the grey-zone (alleles between 45-55 CGG repeats).

Table 1: Patients and families with the corresponding CGG bands size

Individuals		Bands (bp)
Unrelated patients		
-	37 males	258.11-343.82
-	11 females	267.22-315.76
-	1 female (D.M.)	298.3
Families		
-	Family 1	
	Patient (male)	272.69
	Mother	273.38-328.38
	Brother	272.57
	Father	290.35
-	Family 2	
	Patient (female)	293-299
	Sister	294-300
-	Family 3	
	Patient (female)	296-302
	Brother	296
-	Family 4	
	Patient (male)	FM mosaic
	Mother	295.52/PM
	Sister	295.66/PM

FM, Full mutation PM, Premutation Bands in bold are in the grey zone

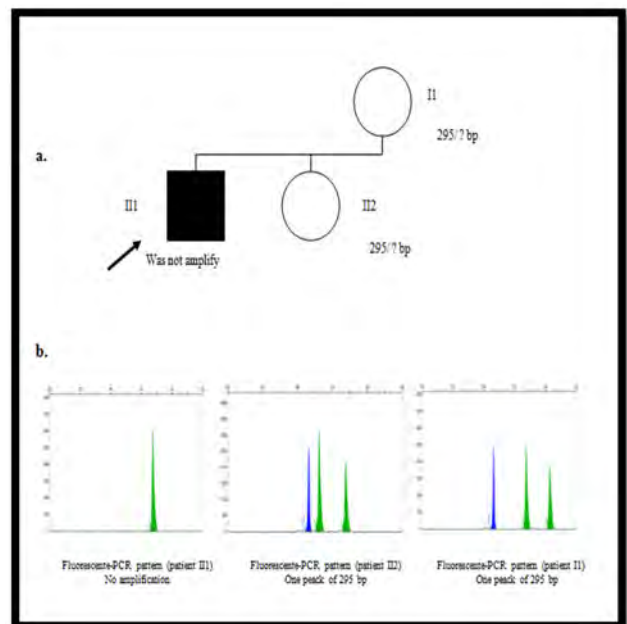


Figure 1: a-Pedigree of family (4) showing the molecular weight of PCR products with the corresponding (295 bp) normal alleles. b-Electrophoregrams of FRAXA (blue)/FRAXE (green) PCR products from family (4) members.

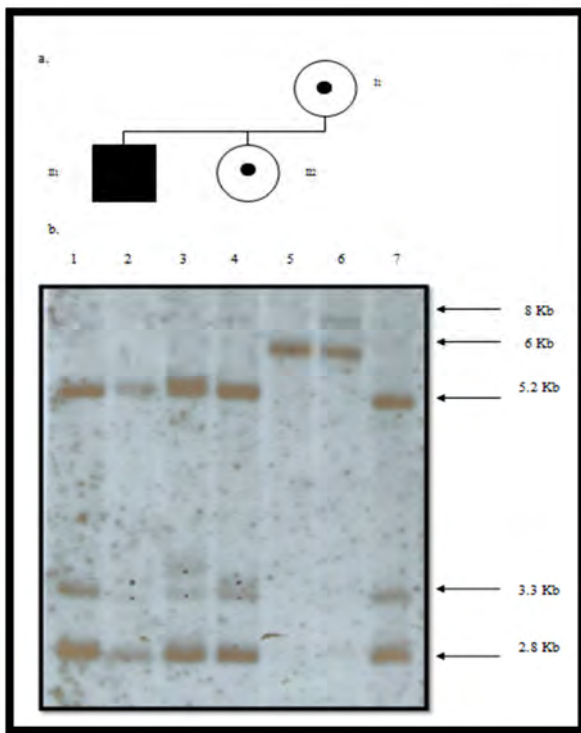


Figure 2: a. Pedigree of family (4) showing the carriers status of patients I1 and II2. b. Analysis of family (4) with StB12.3 hybridized to EcoRI/EagI double digest. Lanes 1 and 7: Normal control female showing two bands of 2.8 and 5.2 kb, Lane 2: Premutated control female, Lane 3: Mother (I1) showing the presence of one normal band of 2.8 Kb and one band from the premutated alleles, Lane 4: Sister (II2) showing the presence of one normal band of 2.8 Kb and one band from premutated allele, Lane 5: Mutated control male, Lane 6: Patient (II1) showing the presence of two bands of 6 and 8 Kb (full mutated alleles).

Table 2: Number of CGG repeats found in (66) analysed chromosomes

Number of repeats	Number of chromosomes
18	1
20	6
22	1
23	3
25	1
26	2
28	1
29	7
30	17
31	12
32	7
33	3
34	1
37	1
40	1
41	1
46	1
Total = 17	Total = 66

Table 3: Polymorphism distribution of the CGG repeats among (66) chromosomes

Sex	Frequency	Percentage	Cumulative Frequency	Cumulative Percentage
F	28	41.79	28	41.79
M	39	58.21	67	100.00

Repeats nb	Frequency	Percentage	Cumulative Frequency	Cumulative Percentage
18	1	1.52	1	1.52
20	6	9.09	7	10.61
22	1	1.52	8	12.12
23	3	4.55	11	16.67
25	1	1.52	12	18.18
26	2	3.03	14	21.21
28	1	1.52	15	22.73
29	7	10.61	22	33.33
30	17	25.76	39	59.09
31	12	18.18	51	77.27
32	7	10.61	58	87.88
33	3	4.55	61	92.42
34	1	1.52	62	93.94
37	1	1.52	63	95.45
40	1	1.52	64	96.97
41	1	1.52	65	98.48
46	1	1.52	66	100.00

Variable	Nb	Mean value	SD	Minimal	Maximal
Repeat Nb	66	29.4	5.0	18.0	46.0

Variable	Nb	Mean value	SD	Minimal	Maximal
Size	66	292.5	18.9	197.2	343.8

DISCUSSION

Fragile X syndrome is a very subtle dysmorphic syndrome and it is difficult to diagnose clinically³³. Mental retardation (MR) in fragile X syndrome males varies from mild to profound with most affected males being moderately to severely retarded³⁴. The phenotype is subtle in young children and the features become prominent as the child grows. Many of these features suggest the possibility of autism, 20% (ranging from 5 to 53%) FXMR patients had autistic features³⁵. Furthermore, FXS is one of the most prevalent genetic causes of autism spectrum disorder²⁰.

We conducted the FMR1 screening on 55 individuals (17 MR patients) and (38 autistic patients). Southern blot analysis with probe StB 12.3 after double digestion with EcoRI and EagI in one individual (patient II1 from family 4) showed two bands of 6 and 8 kb corresponding to two different FMR1 mosaic full mutations. The mosaic pattern showed by Southern blot in our XFRA patient may be due to germ line and somatic instability of the (CGG)_n repeats thus, the patient in this case had a milder phenotype compared to those with full mutation. The FXS clinical diagnosis of the proband was then redefined as he was first diagnosed as autistic because the strikingly similar behavior to that of individuals with autism, including pronounced social awkwardness, repetitive actions, language impairment and a restricted range of interests.

Analysis of the family members showed that the mother (patient I1) and the sister (patient II2) had premutations

(87 and 63 CGG repeats, respectively), thereby allowing the carrier status determination of both mother and sister, which led to a genetic counseling session, regarding the risk of passing a dynamic mutation to offspring, and to contract ovarian premature failure (POF), condition which is highly linked to premutated allele of FMR1²³.

Fluorescent PCR amplification is useful for reliable assessment of Fragile X (CGG)_n alleles in normal and premutation range. Since full mutation failed to amplify, false positive results may arise from polymerase inhibitors (running in parallel a normal control sample), and false negative results may arise from allele specific amplification of the normal allele in the heterozygotes and mosaic. The problem of allele specific amplification can be overcome by reanalysis by Southern blotting of all male samples without peaks and female samples with one peak.

Thus, the usefulness of PCR as a diagnostic method was restricted to prescreening for normal alleles and for this reason the characterization of mutations was performed by Southern blot assay, a method that can identify all the expanded fragments including premutations and full mutations³⁶.

A normal Southern pattern does not imply an absence of Fragile-X Syndrome. Although the main causes of FXS are expansion of (CGG)_n other mutations may also generate FXS such as deletions in the FMR1 gene^{37,38}.

This is the first study on the distribution of the FMR1 size repeats in the Algerian population. It is important for the fragile X diagnosis to establish whether the range of allele distribution is comparable to other populations, and if it is observed the same pattern of expansion associated with the disease.

Our mode of distribution falls within the 30 repeats (17%), followed by a 31 repeat sizes (12%) instead of the 29 repeats as in the Caucasian population³⁹. As in other studies, there is a characteristic pile up around 20 and 30 repeats, and a dip at 21 repeats³.

The results of this study reconfirmed previous reports that the pattern of FMR1 CGG repeat alleles is different regarding the racial/ethnic population studied.

CONCLUSION

There are many reasons to make the diagnosis of FXS including genetic counseling and improved treatment. Once a child is diagnosed with FXS or the fragile X premutation, a genetic counseling is important because a variety of problems that can occur in other family members, such as a grandparent or uncle that may have tremor, ataxia or dementia or an aunt with POF or a sibling with emotional difficulties. Therefore all individuals with autism or autism spectrum disorders need to have fragile X DNA testing to identify premutations or full mutations.

Acknowledgement: This study was supported by a grant from the Algerian Ministry of Higher Education (PNE: 213).

I would like to thank R. Clermont and A. Dion for their excellent technical assistance. I express also my gratitude to S. Labidi and Y. Krechiam for their help in collecting samples; to I. Ughetto for her help in handling the statistical data and to A. Boumendjel and Z. Kechrid for critical reading of the manuscript. I would like to thank all the patients whose participation made this study possible.

REFERENCES

1. Nygren AO, Lens SI, Carvalho R, Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification enables a rapid and reliable distinction between male FMR1 premutation and full-mutation alleles. *J.Mol Diagn*, 10(6), (2008), 496-501.
2. Tranfaglia MR, The Psychiatric Presentation of Fragile X: Evolution of the Diagnosis and Treatment of the Psychiatric Comorbidities of Fragile X Syndrome. *Dev Neurosci*, 33, 2011, 337–348.
3. Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, Verkerk AJ, Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell*, 67(6), 1991, 1047-58.
4. Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Reiner O, Richards S, Victoria MF, Zhang F, Eussen BE, van Ommen GB, Blonden LJ, Riggins GJ, Chastain JL, Kunst CB, Galjaard H, Caskey CT, Nelson DL, Oostra BA, Warren ST, Identification of a gene (*FMR-1*) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell*, 65(5), 1991, 905-14.
5. Tabolacci E, Moscato U, Zalfa F, Bagni C, Chiurazzi P, Neri G, Epigenetic analysis reveals a euchromatic configuration in the *FMR1* unmethylated full mutations. *European Journal of Human Genetics*, 16, 2008, 1487–1498.
6. Pieretti M, Zhang FP, Fu YH, Warren ST, Oostra BA, Caskey CT, Nelson DL, Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell*, 66, 1991, 817–822.
7. Zeier Z, Kumar A, Bodhinathan K, Feller JA, Foster TC, Bloom DC, Fragile X mental retardation protein replacement restores hippocampal synaptic function in a mouse model of fragile X syndrome. *Gene Ther*, 16, 2009, 1122–1129.
8. Hammond LS, Macias MM, Tarleton JC, Shashidhar Pai G, Fragile X syndrome and deletions in FMR1: New case and review of the literature. *Am. J. Med. Genet.*, 72, 1997, 430–434.
9. Sutcliffe JS, Nelson DL, Zhang F, Pieretti M, Caskey CT, Saxe D, Warren ST, DNA methylation represses FMR-1 transcription in fragile X syndrome. *Hum. Mol. Genet.* (1), 1992, 397–400.
10. Garber KB, Smith KT, Warren ST Transcription, translation and fragile X syndrome. *Current Opinion in Genetics and Development*, 16, 2006, 270–275.
11. Rife M, Badenas C, Quintó LI, Puigoriol E, Tazón B, Rodríguez-Revenga L, Jiménez L, Sánchez A, Milà M, Analysis of CGG variation through 642 meioses in Fragile X families. *Molecular Human Reproduction*, 10(10), 2004, 773–776.
12. Dombrowski C, Lévesque S, Morel ML, Rouillard P, Morgan K, Rousseau F, Premutation and intermediate-size FMR1 alleles in 10572 males from the general population: loss of an AGG interruption is a late event in the generation of fragile X syndrome alleles. *Hum Mol Genet*, 11(4), 2002, 371-378.
13. Nolin SL, Brown WT, Glicksman A, Houck GE Jr, Gargano AD, Sullivan A, Biancalana V, Brøndum-Nielsen K, Hjalgrim H, Holinski-



- Feder E, Kooy F, Longshore J, Macpherson J, Mandel JL, Matthijs G, Rousseau F, Steinbach P, Väisänen ML, von Koskull H, Sherman SL, Expansion of the Fragile X CGG Repeat in Females with Premutation or Intermediate Alleles. *Am J Hum Genet*, 72, 2003, 454–464.
14. Zhong N, Yang W, Dobkin K, Brown WT, Fragile X Gene Instability: Anchoring AGGs and Linked Microsatellites. *Am. J. Hum. Genet.*, 57, 1995, 351-361.
 15. Cummings CJ, Zoghbi HY Trinucleotide repeats: mechanisms and pathophysiology. *Ann Rev Genomics Hum Genet*, 1, 2000, 281-328.
 16. Farzin F, Perry H, Hessel D, Loesch D, Cohen J, Bacalman S, Gane L, Tassone F, Hagerman P, Hagerman R, Autism spectrum disorders and attention-deficit/hyperactivity disorder in boys with the fragile X syndrome. *J Dev Behav Pediatr.*, 27(2), 2006, 137-144.
 17. García-Nonell C, Rigau-Ratera E, Artigas-Pallarés J, Autism in fragile X syndrome. *Rev Neurol*, 42(2), 2006, S95-S98.
 18. Hagerman RJ, Berry-Kravis E, Kaufmann WE, Ono MY, Tartaglia N, Lachiewicz A, Kronk R, Delahunty C, Hessel D, Visoosak J, Picker J, Gane L, Tranfaglia M, Advances in the treatment of fragile X syndrome. *Pediatrics*, 123, 2009, 378–390.
 19. Martin JP, Bell J, A pedigree of mental defect showing sexlinkage. *J Neurol Psych*, 6, 1943, 154-157.
 20. Sutherland GR, Ashforth PLC, X-linked mental retardation with macro-orchidism and the fragile site at Xq27 or 28. *Hum Genet*, 48, 1979, 117-20.
 21. Turner G, Daniel A, Frost M, X-linked mental retardation, macro-orchidism, and the Xq27 fragile site. *Pediatr*, 96, 1980, 837-41.
 22. Warren ST, Sherman SL, (2001), The fragile X syndrome: in *The metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. Saiver CR, Beaudet AL, Sly WS and Valle D (eds.), 1257-1289, Mc Graw Hill, New York, USA.
 23. García-Alegria E, Ibáñez B, Minguez M, Poch M, Valiente A, Sanz-Parra A, Martínez-Bouzas C, Beristain E, Tejada MI, Analysis of FMR1 gene expression in female premutation carriers using robust segmented linear regression models. *RNA*, 13, 2007, 756–762.
 24. Boyle L, Kaufmann WE, The behavioural phenotype of FMR1 mutations. *Am J Med Part C Semin Med Genet*, 154C, 2010, 469-476.
 25. Biancalana V, Toft M, Le Ber I, Tison F, Scherrer E, Thibodeau S, Mandel JL, Brice A, Farrer MJ, Dürr A, FMR1 Premutations Associated With Fragile X-Associated Tremor/Ataxia Syndrome In Multiple System Atrophy. *Arch. Neurol.*, 62, 2005, 962-966.
 26. O'Connell CD, Atha DH, Jakupciak JP, Amos JA, Richie K, Standardization of PCR amplification for fragile X trinucleotide repeat measurements. *Clin Genet*, 61, 2002, 13-20.
 27. Gold B, Radu D, Balanko A, Chiang CS, Diagnosis of Fragile X syndrome by Southern blot hybridization using a chemiluminescent probe: a laboratory protocol. *Mol Diagn*, 5, 2000, 69-78.
 28. Crawford DC, Zhang F, Wilson B, Warren ST, Sherman SL, Fragile X CGG repeat structure among African-Americans: identification of a novel factor responsible for repeat instability. *Hum. Mol. Genet.*, 9, 12, 2000, 1759-1769.
 29. Crawford DC, Acüna JM, Sherman SL, FMR1 and the fragile X syndrome: human genome epidemiology review. *Genetics in Medicine*, 3(5), 2001, 359-371.
 30. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, (1989) eds. *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 31. Wang Q, Green E, Bobrow M, Mathews CG, A rapid, non-radioactive screening test for fragile X mutations at the FRAXA and FRAXE loci. *J Med Genet*, 32(3), 1995, 170–173.
 32. Milá M, Castellví-Bel S, Sánchez A, Lázaro C, Villa M, Estivill X, Mosaicism for the fragile X syndrome full mutation and deletion within the CGG repeat of the FMR1 gene. *J.Med.Genet.*, 33, 1996, 338-340.
 33. Garber KB, Visoosak J, Warren ST, Fragile X syndrome European. *J of Hum Genet*, 16, 2008, 666–672.
 34. Rousseau F, Heitz D, Tarleton J, MacPherson J, Malmgren H, Dahl N, Barnicoat A, A multicenter study on genotype-phenotype correlations in the fragile x syndrome, using direct diagnosis with probe StB12.3: the first 2253 cases. *Am J Hum Genet*, 55(2), 1994, 225–237.
 35. Hallmayer J, Pintado E, Lotspeich L, Spiker D, McMahon W, Petersen PB, Nicholas P, Pingree C, Kraemer HC, Wong DL, Ritvo E, Lin A, Hebert J, Cavalli-Sforza LL, Ciaranello RD, Molecular Analysis and Test of Linkage between the FMR1 Gene and Infantile Autism in Multiplex Families. *Am. J. Hum. Genet*, 55, 1994, 951-959.
 36. Florancia G, Irene S, Veronica F, Fragile-X mental retardation: molecular diagnosis in Argentine patients. *J Biochem Mol Biol*, 39(6), 2006, 766-773.
 37. Wells RD, Mutation spectra in Fragile X Syndrome Induced by deletions of CGG- CCG Repeats. *J.Biol.Chem.*, 284, 2008, 7407-7411.
 38. Coffey SM, Cook K, Tartaglia N, Tassone F, Nguyen DV, Pan R, Bronsky HE, Yuhas J, Borodyanskaya M, Grigsby J, Doerflinger M, Hagerman PJ, Hagerman RJ, Expanded Clinical Phenotype of Women With the FMR1 Premutation. *Am J Med Genet, Part A* 146A, 2008, 1009–1016.
 39. Kunst CB, Zerylnick C, Karickhoff L, Eichler E, Bullard J, Chalifoux M, Holden JJ, Torroni A, Nelson DL, Warren ST, FMR1 in global populations. *Am J Hum Genet*, 58(3), 1996, 513-22.

Source of Support: Nil, Conflict of Interest: None.

