



HAL
open science

Contribution à l'identification de nouveaux gènes impliqués dans la Déficience intellectuelle liée au Sexe(X-LID) par séquençage à haut débit de l'exome du chromosome X avec la technologie SOLiD

Habib Bouazzi

► **To cite this version:**

Habib Bouazzi. Contribution à l'identification de nouveaux gènes impliqués dans la Déficience intellectuelle liée au Sexe(X-LID) par séquençage à haut débit de l'exome du chromosome X avec la technologie SOLiD. Génétique. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT: 2016US-PCB009 . tel-01584476

HAL Id: tel-01584476

<https://theses.hal.science/tel-01584476>

Submitted on 8 Sep 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

Ecole doctorale : ED 562 BioSPC

Laboratoire de génétique moléculaire Unité Inserm U781

Thèse de doctorat de Science de la vie et de la santé

Spécialité : Génétique moléculaire des maladies du développement

Contribution à l'identification de nouveaux gènes impliqués dans la Déficience intellectuelle liée au Sexe(X-LID) par séquençage à haut débit de l'exome du chromosome X avec la technologie SOLiD

Dirigé par : Professeur **Arnold MUNNICH**

Présentée et soutenue publiquement Par :

Habib BOUAZZI

Le : 24 Mars 2016

Membres du Jury

Professeur Arnold MUNNICH

Professeur François VIALARD

Professeur Catherine BADENS

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma reconnaissance et ma sincère gratitude à mon directeur de thèse, le Professeur Arnold Munnich pour m'avoir accueilli au sein de son unité et dirigé l'ensemble de ma mission avec rigueur, bienveillance et exigence, sans qui ces travaux n'auraient pas pu voir le jour. Je le remercie de m'avoir fait connaître l'immense domaine de la génétique et de m'avoir apporté son attention et son soutien pendant le déroulement de ma thèse.

J'exprime également ma gratitude aux différents membres de mon jury de thèse :

Mes deux rapporteurs, le professeur Céline Badens de la Faculté de médecine de l'université Aix Marseille et le Professeur François Vialard de l'Université de Versailles ST- Quentin- en -Yvelines.

Je suis également reconnaissant pour le temps et le travail accordés par la directrice du centre des langues, Madame Karine Debbasch de l'université Paris Descartes pour la relecture de ce manuscrit.

J'exprime ma gratitude envers mon collègue Soufiane BOUAZIZ qui a été une aide importante pendant sa collaboration avec l'équipe d'Anne Marie dans notre service. Je lui suis gré de m'avoir formé aux techniques de séquençage et sa disponibilité au quotidien et pour ses nombreux conseils techniques et scientifiques.

J'adresse mes sincères remerciements à toute l'équipe de la génétique des maladies rares (Chercheurs, ingénieurs, médecins et techniciens) du troisième étage de la tour Lavoisier avant son déménagement à l'institut IMAGINE pour sa gentillesse, sa générosité, sa confiance et ses conseils, au personnel de la banque d'ADN et les membres de la plateforme génomique et bio-informatique pour leur disponibilité et pour avoir répondu à mes questions.

Je remercie Docteur Christine Bole pour ses explications sur le séquençage à haut débit. Je tiens à remercier les secrétaires des

cliniciens généticiens du 2^{ème} étage de la tour Lavoisier de m'avoir aidé pour la récupération des dossiers cliniques des patients X-LID.

J'exprime ma profonde gratitude aux familles des patients sans lesquelles ce travail n'aurait pas pu se dérouler.

Je remercie particulièrement Docteur Monique LACHKAR, psychiatre à l'IME AMALTHEE pour son aide à recueillir les resultats d'analyses biologiques des patients qu'elle suivait et chez qui nous avons identifié la cause de leur maladie et publier la nouvelle mutation qui a été identifiée.

Je tiens à remercier Docteur Carlos Trujillo et Docteur Mohammad Khalid Alwasiyah de JEDDAH pour leur échange scientifique. Je remercie aussi Docteur Seema Thakur du Fortis Hospital à New Delhi et Docteur Gitan Lesca des Hospices de Lyon pour leur collaboration.

Je remercie tout particulièrement l'équipe médicale du premier étage de l'Hôpital privé ESTREE II à Stains (Ile de France) où je travaille de m'avoir encouragé pendant le déroulement de ma thèse. Je tiens à remercier Docteur Karim Bengaoua le médecin coordinateur de notre service pour sa gentillesse ses conseils pendant les moments les plus durs de ma thèse.

Je remercie Docteur Bili de notre équipe médicale pour son humanisme, sa gentillesse et son attention qu'elle portait à l'avancement de mes travaux de recherche.

Je remercie mes collègues de l'équipe de garde et l'équipe du jour du laboratoire BIOLAM pour l'intérêt qui portaient à ma thèse.

Je tiens à remercier particulièrement Docteur Mohamed DHAHRI pour son soutien et ses conseils tout au long de mes travaux de thèse.

Mes remerciements à tous ceux qui ont apporté à ce projet une précieuse contribution.

Je pense particulièrement à ma mère pour la force et la présence indéfectible dont elle a fait preuve jusqu'à ce qu'elle m'ait quitté suite à un AVC au milieu du déroulement des travaux de ma thèse, à mon père pour la leçon de courage, d'optimisme et de persévérance qu'il m'a enseignée et qui attendait cette thèse avec impatience.

Pour finir, j'exprime ma gratitude et mes remerciements pour mon épouse Nadia, mes enfants Maroa, Mohamed, Fatima et Youssef de m'avoir soutenu et surtout la patience dont ils ont fait preuve à mon égard durant mes études de recherche.

RESUMÉ DE THÈSE

La Déficience Intellectuelle liée au chromosome X (X-LID), anciennement appelée RMLX (retard mental lié au chromosome X) est une pathologie fréquente (3 % de la population) et handicapante. Cette déficience se manifeste par la réduction de la capacité à comprendre les informations nouvelles ou complexes, des difficultés d'acquisition de nouvelles compétences et l'échec dans la gestion de sa vie en toute autonomie ; celle-ci est souvent accompagnée par un dysmorphisme corporel. Cette pathologie s'installe dès l'enfance (avant l'âge de 18 ans) et a des répercussions sur le développement de l'individu (QI<70). La pathogénie de la déficience intellectuelle reste obscure et dans 50 % des cas, la cause n'est pas connue.

Dix pour-cent (10 %) des cas de la déficience intellectuelle seraient liés à des gènes localisés sur le chromosome X, avec une mutation transmise par les mères et affectant principalement les garçons. Parmi les 931 gènes du chromosome X, seulement 114 gènes ont été identifiés comme gènes de déficience intellectuelle. Le dernier (le gène SSR4) fut caractérisé en mars 2014.

À l'heure des technologies du séquençage de haut débit, le laboratoire de génétique moléculaire de l'hôpital Necker de Paris s'est doté d'une plateforme d'identification de mutation génétique humaine par séquençage à haut débit permettant le diagnostic des maladies rares.

L'objectif de mon travail de thèse était d'appliquer l'approche du séquençage à très haut débit (technique SOLiD) dans l'identification de nouveaux gènes de la déficience intellectuelle liée au chromosome X chez des familles ayant des garçons atteints de déficience intellectuelle non-syndromique, d'identifier les mutations des gènes qui sont déjà connus et d'en discuter la corrélation génotype-phénotype. L'approche que j'ai utilisée dans cette étude est le diagnostic génétique par séquençage à haut débit de l'exome du chromosome X de vingt sujets appartenant à dix familles (X-LID) françaises. La procédure consiste à capturer l'exome du chromosome X des patients atteints, à l'enrichir par la technologie Rain-Dance, puis à le séquencer dans notre plateforme avec un séquenceur à haut débit de la technologie SOLiD5500 afin d'analyser les résultats et pour ne retenir que les nouvelles mutations et commenter leur pouvoir pathogène.

Cette étude a mis en évidence de nouvelles mutations dans 21 gènes, dont neuf gènes ne sont pas encore décrits parmi les gènes X-LID et a révélé l'importance de l'hétérogénéité génétique tout en relevant la possibilité de l'effet des charges mutationnelles et le rôle gènes modificateurs. Certaines nouvelles mutations, nous les avons identifiées dans des gènes connus pour leur implication dans la déficience intellectuelle et les avons publiées durant les études doctorales. Pour confirmer la causalité des nouveaux gènes ayant muté chez les familles atteintes, des études fonctionnelles supplémentaires in vivo doivent être appliquées tout en suivant les publications sur le même sujet afin de comparer avec des cas similaires.

ABSTRACT

X linked Intellectual deficiency (X - LID); formerly X-LMR (X Linked Mental Retardation) is a common pathology (3 % of the population). Intellectual Deficiency (ID) is the most frequent cause of serious handicap in children and young adults. Defining features of ID include an overall intelligence quotient (IQ) of less than 70 together with associated functional deficits in adaptive behavior (such as daily living, social and communication skills), which manifest before 18 years of age. ID pathogenesis remains obscure and 50% of cases have no known cause.

Ten percent of the intellectual intellectual deficiency would be related to genes located on the X chromosome, and subsequently inherited by affected boys. Among the 931 genes of the X chromosome, only 114 genes have been identified as X-LID genes. The last (SSR4 gene) was characterized in March 2014.

At the time of the Next Generation Sequencing (NGS), the laboratory of molecular genetics of Necker hospital in Paris is equipped with a platform for the identification of human genetic mutation by high-throughput sequencing for the diagnosis of rare diseases. The objective of my thesis work was to seek new genes for X linked intellectual deficiency in families with non-syndromic cognitive disorder affected boys and to identify mutations in the genes that are already known and to discuss the genotype, phenotype correlation. The approach that I have used in this study is genetic diagnosis by high-throughput sequencing of chromosome X exomes of 20 subjects belonging to ten X-LID French families. The procedure is to capture and enrich the exome of the X chromosome of patients, then to sequence it in our platform with a high throughput sequencer of SOLid technology then analyze the results and retain that new mutations to discuss their pathogenicity. This study has highlighted new mutations in 21 genes, including nine that are not yet described among the X-LID genes.

Some new mutations, we identified in genes known through their involvement in cognitive impairment were published during my doctoral studies. To confirm causality of new genes that were found mutated in families, additional studies in vivo must be applied while following the literature to make comparisons with similar cases.

Key words: intellectual deficiency, syndromic and non-syndromic, inactivation, sequencing, exome, mutation, IQ

LISTE DES PUBLICATIONS

1

Clinical Case Reports

Open Access

Clin Case Rep. 2015 Jul; 3(7): 604–609. PMID: PMC4527805
Published online 2015 May 26. doi: [10.1002/ccr3.301](https://doi.org/10.1002/ccr3.301)

Nonsyndromic X-linked intellectual deficiency in three brothers with a novel *MED12* missense mutation [c.5922G>T (p.Glu1974His)]

[Habib Bouazzi](#)¹, [Gaetan Lesca](#)², [Carlos Trujillo](#)³, [Mohammad Khalid Alwasiyah](#)⁴ and [Arnold Munnich](#)⁵

2



Journal of Case Reports and Studies
Volume 3 | Issue 6
ISSN: 2348-9820

Research Article Open Access

Non-Syndromic X Linked Intellectual Disability in Two Brothers with A Novel *NLGN4X* Gene Splicing Mutation (NC_018934.2: g. 1202C>A)

Bouazzi H¹, Bouaziz S², Alwasiyah MK³, Trujillo C⁴ and Munnich A¹

¹Hôpital Necker - Enfants Malades, Medical Genetics Laboratory, Paris Descartes University, France

3



Bouazzi et al., J Clin Case Rep 2015, 5:12
<http://dx.doi.org/10.4172/2165-7920.1000656>

Clinical Case Reports

Research Article Open Access

Characterization of Clinical and Neurocognitive Features in a Family with a Novel *OGT* Gene Missense Mutation [c. 1193G>A/ (p. Ala319Thr)]

[Habib Bouazzi](#)^{*}, [Soufiane Bouaziz](#), [Mohammad.Khalid Alwasiyah](#), [Carlos Trujillo](#) and [Arnold Munnich](#)

University Hospital Necker Children, France

4

Indian Journal of Medical Research

Accepted (IJMR-170-14)

Novel missense mutation (p.His2247Pro) within ATRX gene segregates with intellectual disability without alpha thalassemia in three related males confirms the extended phenotypic spectrum of ATRX syndrome

[Habib Bouazzi](#)¹, [* Seema Thakur](#)², [Carlos Trujillo](#)³, [Mohammad Khalid Alwasiyah](#)⁴ and [Arnold Munnich](#)⁵

7

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	2
RESUMÉ DE THÈSE.....	5
ABSTRACT	6
LISTE DES PUBLICATIONS.....	7
TABLE DES MATIÈRES	8
INDEX DES FIGURES.....	11
INDEX DES TABLEAUX.....	12
ABRÉVIATIONS.....	13
I- INTRODUCTION.....	14
A. La Déficience Intellectuelle.....	14
1. Définition et terminologie.....	14
2. Classification.....	14
3. Prévalence	15
4. Étiologie des déficiences intellectuelles.....	16
a. Les Causes génétiques de la DI.....	16
a.1) Les anomalies chromosomiques	16
a.2) Les causes génétiques non chromosomiques	18
b. Les causes environnementales de la Déficience Intellectuelle	19
5. Le diagnostic de la déficience intellectuelle.....	20
6. La transmission de la déficience intellectuelle.....	22
a. Formes autosomiques dominantes.....	22
b. Formes autosomiques récessives.....	22
B. La déficience intellectuelle liée au sexe (X-LID)	23
1. Historique	23
2. Prévalence	24
3. L'expression de la DI chez les femmes conductrices.....	25
4. La Déficience Intellectuelle Syndromique (IDX)	25
5. La Déficience Intellectuelle non Syndromique (IDX).....	27
6. De la DI non syndromique à la DI Syndromique.....	29
C. L'inactivation du chromosome X chez la femme	29
1. L'inactivation est un phénomène physiologique	29
2. Le centre de l'inactivation du chromosome X (XiC)	30
3. Le transcrit spécifique inactif du chromosome X (Xist).....	32
4. Le Biais d'inactivation du chromosome X.....	32
D. Le séquençage du génome.....	33
1. Le séquençage classique (technique de Sanger).....	33
2. Séquençage à haut débit ou Next Generation Sequencing(NGS)	36
3. Enrichissement du génome par l'approche Rain-dance	38
4. La technologie de séquençage SOLiD (olid-seq 5500).....	38
II- LES OBJECTIFS DE MES TRAVAUX	40
III- Matériels et méthodes.....	42

A.	Les familles X-LID.....	42
B.	Étude clinique.....	43
C.	Les examens complémentaires et génétiques.....	43
1.	Examen radiologique.....	44
2.	Bilan métabolique.....	44
3.	Liaison génétique et séquençage.....	44
D.	L'inactivation du chromosome X.....	45
E.	Préparation des échantillons pour séquençage à haut débit(NGS).....	45
F.	Choix des critères de l'ADN pour enrichissement avec Rain-Dance.....	45
G.	Séquençage à haut débit (NSG).....	49
1.	Enrichissement de l'exome du chromosome X.....	49
2.	Préparation des matrices pour la phase du séquençage NGS.....	50
3.	Réaction de séquençage NGS.....	51
4.	Reconstitution de la séquence à partir des codes couleurs.....	53
5.	Etude des variants in SILICO.....	54
6.	La stratégie de validation des nouvelles mutations.....	54
IV-	Résultats.....	55
A.	Tableau clinique des patients.....	55
B.	Les arbres généalogiques des dix familles.....	57
C.	Examens Radiologiques.....	58
D.	Étude du biais d'inactivation du chromosome X.....	58
E.	Étude de la liaison génétique.....	59
F.	Analyse cytogénétique.....	59
G.	Résultats du séquençage à haut débit.....	60
1.	Étude des variants de la famille BH3 (Article-1).....	62
a.	Le variant du gène <i>MAGEB3</i>	63
b.	Le variant du gène <i>DGAT2L6</i>	64
c.	Le variant du gène <i>MAP7D3</i>	64
d.	Le variant du gène <i>ATRX</i>	64
e.	Conclusion préliminaire.....	65
2.	Etude des variants de la famille BH5 (Article-2/Article-3).....	65
a.	Le variant du gène <i>MED12</i>	66
b.	Le variant du gène <i>OGT</i>	67
c.	Le variant du gène <i>SSR4</i>	67
d.	Conclusion préliminaire.....	68
3.	Etude de la famille BH9 (Article-4).....	68
a.	Le variant du gène <i>NLGN4X</i>	69
b.	Le variant du gène <i>PDHA1</i>	70
c.	Conclusion préliminaire.....	70
4.	Prédiction fonctionnelle des nouvelles mutations.....	70
V-	DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	72
A.	L'apport du séquençage de l'exome du chromosome X dans le diagnostic et le dénombrement de nouveaux gènes de la déficience intellectuelle.....	72
B.	Le diagnostic génétique : Plus de deux décennies d'efforts.....	73
1.	Diagnostic par la stratégie d'exclusion génique.....	74
a.	La famille BH2.....	74
b.	La famille BH3.....	75
b.1)	Les gènes candidats.....	75
b.2)	Mutation du gène <i>ATRX</i> : corrélation génotype/phénotype.....	75
c.	La famille BH5.....	77

d. La famille BH6.....	80
e. La famille BH8.....	80
f. La famille BH9.....	80
g. La famille BH10.....	81
2. L'hétérogénéité génétique.....	81
C. La variabilité phénotypique : expressivité et gènes modificateurs.....	82
D. Le conseil génétique face à la déficience intellectuelle.....	82
E. Les difficultés et les obstacles face aux travaux de recherche.....	83
F. Les avantages du séquençage de nouvelle génération.....	84
G. Les inconvénients et les limites des nouvelles technologies de séquençage.....	85
VI- CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	87
VII- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	88
VIII- ANNEXES.....	96

INDEX DES FIGURES

FIGURE 1 : LES PROPORTIONS DES DIFFERENTES FORMES DE LA DEFICIENCE INTELLECTUELLE EN EUROPE	16
FIGURE 2 : DISTRIBUTION DES FACTEURS DE L'ENVIRONNEMENT DANS LA DEFICIENCE INTELLECTUELLE.....	19
FIGURE 3: DISTRIBUTION DE LA QI DANS UNE POPULATION GENERALE.....	21
FIGURE 4: LISTE ET LOCALISATION DES GENES X-LID SYNDROMIQUE.....	26
FIGURE 5: LOCALISATION ET LISTE DES GENE X-LID NON SYNDROMIQUES	28
FIGURE 6: SEQUENÇAGE PAR LA METHODE DE SANGER	34
FIGURE 7 : ANALYSE ELECTROPHORETIQUE DE L'ADN POUR ENRICHISSEMENT	48
FIGURE 8: LA CONSTRUCTION DE LA BIBLIOTHEQUE D'AMPLICON PAR RAIN-DANCE.....	49
FIGURE 9: PREPARATION DES MATRICES POUR SEQUENÇAGE NGS	50
FIGURE 10: ENCODAGE DES BASES PENDANT LA REACTION DE SEQUECE SOLID	51
FIGURE 11: UNITE FONCTIONNELLE DU SEQUENÇAGE SOLID	52
FIGURE 12: LES CYCLES DU SEQUENÇAGE SOLID.....	52
FIGURE 13: LES CYCLES LIGATION, DETECTION ET CLIVAGE DES SONDAS NGS	53
FIGURE 14: RECONSTITUTION DE LA SEQUENCE D'ADN PAR CODE COULEUR	53
FIGURE 15 : SEGREGATION DES MUTATIONS DANS LA FAMILLE BH3.....	63
FIGURE 16: SEGREGATION DES MUTATIONS DE LA FAMILLE BH5	66
FIGURE 17: LES MUTATIONS A EFFET X-LID AU NIVEAU DU GENE MED12 . * SOURCE : BOUAZZI <i>ET AL</i> 2015 ..	67
FIGURE 18 : ARBRE GENEALOGIQUE DE LA FAMILLE BH9 ET SEGREGATION DE LA MUTATION NLGN4X	69
FIGURE 19: MUTATION A PREDICTION PATHOGENIQUE AU NIVEAU D'UN SITE D'EPISSAGE (NLGN4X)	70
FIGURE 20 : EXTRACTION D'ADN	96
FIGURE 21 : LA MEDUSE D'ADN	96
FIGURE 26: PHOTOGRAPHIE DU PROFIL DE MIGRATION DU PRODUIT DE PCR POUR DES GENES CANDIDATS CHEZ DES SUJETS ATTEINTS DELA DEFICIENCE INTELLECTUELLE.....	98

INDEX DES TABLEAUX

TABLEAU 1: CLASSIFICATION DES DIFFERENTS TYPES DE LA DEFICIENCE INTELLECTUELLE.....	15
TABLEAU 2: LISTE DES GENES X-LID	24
TABLEAU 3 : CHOIX DES SUJETS CANDIDATS POUR SEQUENÇAGE A HAUT DEBIT.....	42
TABLEAU 4: PROPRIETES DE L'ADN ENVOYE POUR ENRICHISSEMENT AUX ETATS-UNIS.....	47
TABLEAU 5: LE TABLEAU CLINIQUE DES PATIENTS X-LID	56
TABLEAU 6: RESULTATS RADIOLOGIQUE	58
TABLEAU 7 : PROFIL DE L'INACTIVATION DU CHROMOSOME X CHEZ LES DIX FAMILLES.....	58
TABLEAU 8 : ÉTUDE DE LA SEGREGATION DES MARQUEURS CHEZ LES DIX FAMILLES.....	59
TABLEAU 9 : LES GENES MUTES RETENUS PAR SEQUENÇAGE A HAUT DEBIT	61
TABLEAU 10: PREDICTION FONCTIONNELLE DES MUTATIONS.....	71
TABLEAU 11: LES GENES CANDIDATS ET LEUR IMPLICATION DANS LA DI	73
TABLEAU 12: TABLEAU COMPARATIF DE LA PHENOTYPE DES PATIENTS AYANT LE GENE ATRX MUTE.....	76
TABLEAU 13: LES CARACTERISTIQUES DES DIFFERENTS SYNDROMES DE DI CAUSEES PAR L'ALTERATION DU GENE MED12.....	79

ABRÉVIATIONS

ABI : Applied Biosystem technology
ARN :Acide Ribo-Nucléique
ATRX: Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-linked
BAC: Bacterial Artificial Chromosome
CGH: Comparative Genomic Hybridization
CMV: Cyto –Megalo- Virus
CNV: Copy Number Variation
DI : Déficience Intellectuelle
DI-AR : Déficience Intellectuelle Autosomique Récessive
DI: Déficience Intellectuelle
DIRX : Déficience Intellectuelle Récessive liéé à l’X
DASS: Direction Départementale d’Affaires Sanitaires et Sociales
DMS: Diagnostic Medical System
EDTA: Ethylene-Diamine-Tetraacetic- Acid
EEG: Electro-Encéphalo-Gramme
FG: Opitz-Kaveggia syndrome

FISH: Fluorescent In-Situ Hybridation
FMR: Fragility Mental Retardation (gene)
HIV: Human Immunodeficiency Virus
IRM: Imagerie par Resonance Magnétique
LOD: Logarithm of the ODDS
LG: Lujan Syndrome
MGS: Mammalian Genome Sequencing
NGS: Next Generation Sequencing
OGT: O-linked N-acetyl-Glucosamine Transferase
PCR: Polymerase Chain Reaction
QI: Quotient Intellectuel
RDT: Rain-Dance_ Technologie
RM: la déficience intellectuel
X-LID:la déficience intellectuelle Lié à l’X
RNA: Ribo-Nucleic-Acid
SIFT: Sorting Intolerant From Tolerant
SNP: Single Nucleotide Polymorphism
SOLiD: *Sequencing* by Oligonucleotide Ligation and Detection
UCSC: University of California, Santa Cruz
UDP: Uridine Di-Phosphate
UTR: UN-Translated Region
YAC: Yeast Artificial Chromosome

A. La Déficience Intellectuelle

1. Définition et terminologie

Les termes utilisés pour décrire les sujets présentant un trouble neuropsychiatrique associé à une atteinte cognitive sont variables. On qualifiait autrefois ces individus d'idiots, de retardés mentaux et de débiles. La dénomination « retard mental », devenue obsolète, est désormais remplacée par « déficience intellectuelle », terme qui recouvre plusieurs dizaines de syndromes (Curie *et al.*, 2008). La déficience intellectuelle (DI) se définit par la réduction de la capacité à comprendre des informations nouvelles ou complexes, à acquérir de nouvelles compétences et à gérer sa vie en toute autonomie. Elle s'installe dès l'enfance et a des répercussions sur le développement de l'individu (American Association on Mental Retardation (<http://www.aamr.org>). Selon certains, cette affection est encore largement considérée comme un problème socioculturel (Salvador-Carulla and Bertelli, 2008) et ils rencontrent encore des difficultés pour définir une terminologie appropriée afin de caractériser les troubles persistants, notamment dans le domaine clinique et dans le cadre de la recherche.

2. Classification

Les différentes classes de déficience intellectuelle sont basées sur la notion de quotient intellectuel (QI), un paramètre psychométrique défini par le rapport entre l'âge « mental » que donne le résultat du test sur l'âge réel, multiplié par 100 (Mayer *et al.*, 2007). La déficience intellectuelle est classée de la forme profonde à la forme légère (Tableau 1)

Tableau 1: Classification des différents types de la déficience intellectuelle

Terminologie(DI)	Quotient Intellectuel (QI)
Déficience Intellectuelle profonde	≤20
Déficience Intellectuelle sévère	20-40
Déficience Intellectuelle modérée	40-50
Déficience Intellectuelle légère	50-70

3. Prévalence

La déficience intellectuelle figure parmi les premiers problèmes socioculturels dans les pays développés occidentaux (Honeycutt *et al.*, 2003). Au-delà de l'Occident, il s'agit d'une pathologie répandue parmi enfants et adultes à travers le monde entier. Elle est présente chez 3% des nouveau-nés de la population générale (Curie *et al.*, 2008), et a de très sérieuses conséquences sur les facultés d'adaptation à l'environnement.

La prévalence de la déficience intellectuelle n'est pas facile à évaluer à cause de la variabilité de sa définition d'une communauté à l'autre, du fait de la non-normalisation des critères diagnostiques, de la présence de biais dans la majorité des études et de prise en considération de la déficience intellectuelle légère.

Dans les pays sous-développés, la prévalence de la DI est deux à trois fois plus élevée que dans les pays industrialisés (Roeleveld et Zielhuis, 1997).

À Lahore en Inde par exemple, en 2005, l'incidence cumulée globale de la DI sévère pour 100 naissances était de 1,1. Elle était d'une valeur de 2,2 dans les bidonvilles périurbains, mais plus faible (0,4) dans le groupe de la classe moyenne supérieure. La prévalence globale de la DI légère parmi les enfants de 6 à 10 ans était de 6,2 %, de 10,5% dans les bidonvilles périurbains et de 1,3% dans le groupe constitué par la classe moyenne supérieure (Gustavson, 2005). En revanche, en Grande-Bretagne, 2% des enfants de 7 à 14 ans ont un QI ≤ 70 ; 0.5% d'entre eux sont sévèrement atteints (QI<50), et 1.5% présentent une DI moyenne ou modérée (Aicardi, 1998). Selon l'étude d'Aicardi, ces différents types de déficience intellectuelle se répartissent dans la population générale selon les proportions présentées dans le diagramme suivant :

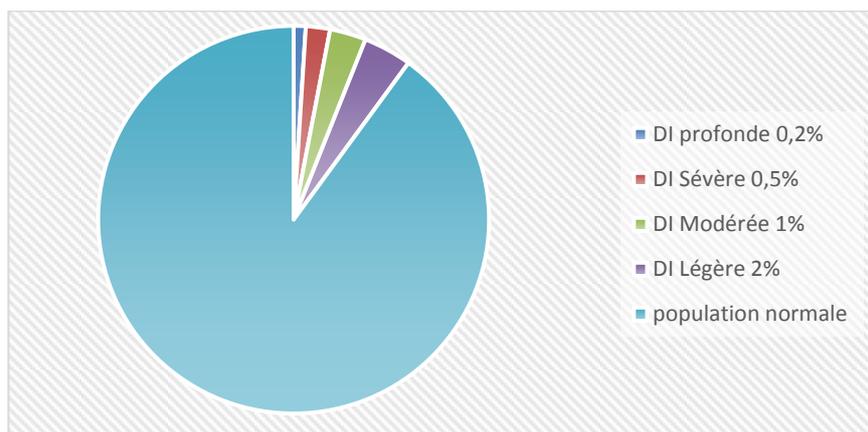


Figure 1 : les proportions des différentes formes de la déficience intellectuelle en Europe

4. Étiologie des déficiences intellectuelles

Les études épidémiologiques montrent que la DI a des origines diverses. Elle peut être dû à des facteurs hétérogènes, environnementaux et génétiques (Moser, 2004; Stern *et al.*, 1969). Cependant, malgré les progrès réalisés en matière de diagnostic, les causes de la DI restent inconnues dans 1/3 à 2/3 des cas (Des Portes *et al.*, 2002).

a. Les Causes génétiques de la DI

a.1) Les anomalies chromosomiques

Les aberrations chromosomiques comptent parmi les principales étiologies de la déficience intellectuelle. En effet, 10% des causes génétiques de la DI sont d'origine chromosomique (Friedman *et al.*, 2006). Ces aberrations se manifestent par des anomalies chromosomiques de nombres comme la trisomie, ou par des anomalies de structures microscopiques et/ou sub- microscopiques.

La détection des anomalies chromosomiques microscopiques se réalise facilement par les techniques de cytogénétique classique dont l'outil principal, le caryotype, donne une image générale du capital chromosomique d'un sujet en un seul test.

Le caryotype standard a fait son apparition dans les années 1970, et il permet d'observer les chromosomes au stade métaphase.

Le caryotype à haute résolution (1000 bandes) fit son apparition en 1976, et il permet l'observation des chromosomes au stade pro métaphase.

En 1959, la découverte de la première anomalie chromosomique fut la trisomie 21 par l'équipe française de Jérôme Lejeune (Lejeune, 1963). Cette anomalie a été ensuite qualifiée

comme le facteur le plus fréquent des anomalies chromosomiques de la DI d'origine chromosomique (Besser *et al.*, 2007). Certaines études rapportent que la trisomie 21 représente une fréquence de 12% chez les sujets atteints de DI (Abel et Hannigan, 1995).

Mis à part la trisomie 21, d'autres aberrations chromosomiques microscopiques liées à la déficience intellectuelle ont été rapportées, mais sont de moindre fréquence. En effet dans une étude effectuée sur 36 325 déficients idiopathiques en Allemagne, 4,6% résultent d'aberrations chromosomiques autres que la trisomie 21 (Ropers, 2010), et les anomalies balancées, type translocation et inversion, n'en représentent que 1% (Fantes *et al.*, 2008).

Certaines anomalies chromosomiques sont souvent mal diagnostiquées par les techniques de cytogénétique classique, surtout si la taille de la région chromosomique qui subit le réarrangement est inférieure à 5MB. Ces réarrangements contribuent significativement à la déficience intellectuelle (Vissers *et al.*, 2010) et comptent pour environ 5% des cas de DI idiopathique (Roeleveld et Zielhuis, 1997). En revanche, elles sont rapportées chez 15% des patients atteints de DI sévère (Leonard and Wen, 2002).

Les délétions sub-microscopiques et les micro duplications non détectées par les techniques cytogénétiques conventionnelles forment de nouvelles causes de la déficience intellectuelle (Ropers, 2010). Elles sont facilement identifiables par les techniques moléculaires notamment la FISH et la MLPA, qui ont montré que les réarrangements microscopiques des régions sub-télomériques peuvent se produire dans 5% des sujets atteints de DI (Vries *et al.*, 2003).

La FISH (Hybridation In situ en Fluorescence) se fonde sur l'hybridation d'une sonde connue et marquée à une région d'ADN des chromosomes en métaphase ou en interphase. Elle s'applique suite à l'examen clinique des patients ayant des syndromes cliniquement identifiables tels que le syndrome de Prader Willi, Williams Beuren, Miller, Dieken, Di-George pour les quels l'haplo-insuffisance d'un certain nombre de gènes est directement impliquée dans la pathologie cognitive (Goldenberg et Saugier-Veber, 2010).

La FISH est une technique résolutive, mais elle ne permet pas l'étude globale du génome. Cet obstacle a été largement dépassé suite à l'arrivée des puces ultra-résolutives, qui ont marqué l'ère de l'analyse pan-génomique avec un pouvoir résolutif plus élevé, permettant une étude complète du génome des patients. En effet avec les nouvelles puces qui comptent cent mille à 2 millions d'oligos, on a pu atteindre une résolution record de l'ordre de 10kb. À

ce stade, des CNV sont apparus associés à des pathologies de DI chez 15% des sujets atteints de la DI idiopathique et ayant un caryotype normal (Friedman *et al.*, 2006; Jaillard *et al.*, 2010). Ces CNV ont été identifiés comme la cause principale de plusieurs déficiences intellectuelles spécifiques (Mefford *et al.*, 2009).

a.2) Les causes génétiques non chromosomiques

Les causes génétiques non chromosomiques se résument dans les mutations sous toutes leurs formes (délétion, insertion, duplication et substitution).

La première étiologie génétique de la déficience intellectuelle est celui de l’X fragile (Turner *et al.*, 1996). Elle est classée en deuxième position après la trisomie 21 (OMIM 190685) sur l’échelle des causes de la DI (Rousseau *et al.*, 1995).

Sur le plan clinique, ce syndrome est caractérisé par une croissance somatique normale, une face longue avec une mâchoire saillante, une déficience intellectuelle et une macro-orchidie chez la plupart des enfants pubères. Sa prévalence chez les sujets ayant des difficultés pour lire sans signes cliniques spécifiques est de 2 à 10% (Slaney *et al.*, 1995). Son incidence dans la population générale masculine est de 1/1000. Elle est de 1/4000 chez les sujets féminins (Rousseau *et al.*, 1995)

L’X fragile se manifeste génétiquement par l’expansion du triplet CGG, normalement présent dans la région distale du chromosome X sous forme de microsatellite d’une moyenne de 30 répétitions siégeant au niveau du gène FMR1. Les sujets masculins au stade de pré-mutation présentent un nombre de répétitions inférieur à 200 avec un phénotype normal. Ils transmettent l’allèle à leurs filles tout en le gardant stable durant la spermatogenèse. Cette expansion, une fois héritée par la femme, échappe à la stabilité et tend vers une mutation complète durant l’ovogenèse (plus de 200 copies). Dans ces conditions, le gène FMR1 diminue son activité et sa transcription s’effondre, ce qui explique pourquoi les garçons descendants d’une femme conductrice sont souvent affectés, alors que les filles sont de phénotype normal et ne subissent que la prémutation (Rousseau *et al.*, 1994).

Les facteurs mono géniques associés à l’altération de certaines chaînes métaboliques représentent une cause génétique classique de la déficience intellectuelle, notamment la phénylcétonurie et la déficience des glycoprotéines en carbohydrates qui sont causées par

des mutations monogéniques et qui sont souvent associées à un dysmorphisme et une DI (Teraishi *et al.*, 2013).

b. Les causes environnementales de la Déficience Intellectuelle

Les causes environnementales représentent 15% des étiologies de la déficience intellectuelle. Elles interviennent pendant la période prénatale, périnatale et postnatale (figure 2).

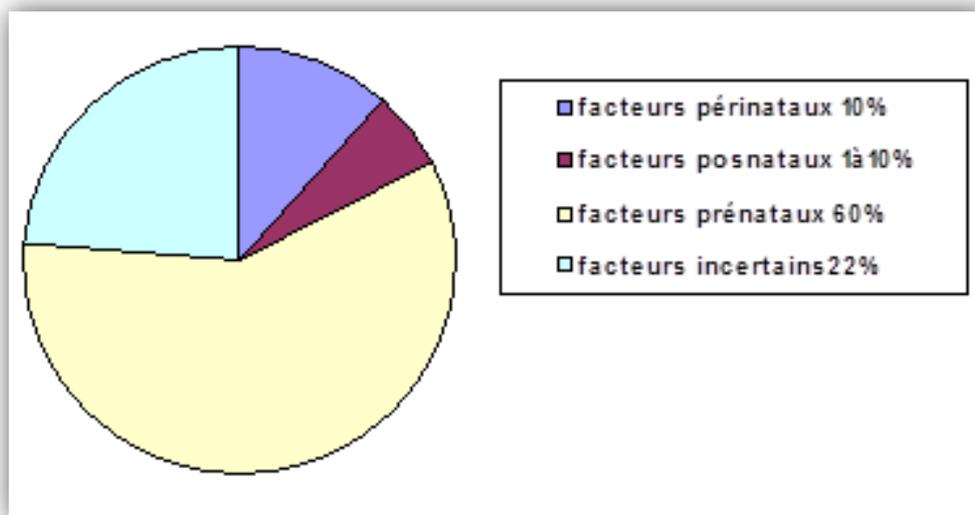


Figure 2 : Distribution des facteurs de l'environnement dans la déficience intellectuelle.

La période prénatale : Les facteurs prénataux semblent être de loin l'étiologie la plus fréquente dans la DI, représentant entre 60% et 75% des cas (Ahuja et Thapar, 2005).

Le rôle de l'infection fœtale par le cytomégalo virus ou la toxoplasmose pendant la grossesse a par ailleurs été confirmé dans la déficience intellectuelle sévère (Stern *et al.*, 1969; Vial-Courmont *et al.*, 1999).

Pendant la vie intra-utérine, une malnutrition et un faible poids sont souvent associés à une fréquence élevée de la déficience intellectuelle, ce qui n'est pas le cas pour une grossesse normale et un poids habituel (Sabel *et al.*, 1976).

L'alcoolisme est une cause importante de la DI légère associée à un poids faible à la naissance, une microcéphalie, une atrophie du disque optique et une hyperactivité (Aicardi, 1998).

La période périnatale : Les facteurs périnataux comptent pour 10% dans la DI (Aicardi, 1998). L'élément étiologique principal est la souffrance cérébrale du nouveau-né, due à l'exposition

aux toxines. Il a été rapporté que la DI d'origine périnatale n'est jamais isolée, mais souvent associée à une paralysie cérébrale et à des épisodes de crises épileptiques ultérieures (Perlman, 1997).

-La période postnatale : Pendant cette période, les principaux facteurs de la DI sont les infections, les traumatismes crâniens, l'hypoxie, et l'absence de stimulations environnementales.

Les facteurs postnataux représentent 1% à 10% des causes de la DI, et toute atteinte anatomique à l'intégrité du cerveau peut déclencher une DI (Yoshida *et al.*2004).

5. Le diagnostic de la déficience intellectuelle

Une DI peut être détectée chez tout enfant, en fonction de certains indices fournis par l'examen clinique, comme les lésions de la peau, les anomalies du squelette, la présence d'un syndrome neuro-cutané, un retard de langage, une dysmorphie, un tempérament difficile à gérer, une hypotonie générale ou des extrémités, la maladresse et l'incapacité générale à réaliser des actes courants.

Dans son parcours de diagnostic, le clinicien a pour mission de mettre en œuvre les moyens nécessaires pour assurer un dépistage précoce des DI, la recherche de leurs causes et leur prise en charge, incluant l'accompagnement de la famille.

La recherche de la cause de la DI est un enjeu majeur pour le pronostic et le conseil génétique, et dans quelques cas pour une thérapie (si elle est possible), bien que plusieurs facteurs se réunissent et rendent la solution très difficile.

Pour diagnostiquer la DI, les cliniciens appliquent la notion de quotient intellectuel (QI), calculé à l'aide du test de WISC (Wechsler Intelligence Scale for Children) et du test de WAIS (Wechsler for Adult Intelligence Scale). En général, les compétences motrices et verbales sont évaluées séparément, puis combinées pour constituer un score complet.

Dans une population globale, les résultats sont ajustés pour produire une distribution normale avec une moyenne de 100 et une déviation standard (DS) de 15 (Ropers, 2010).

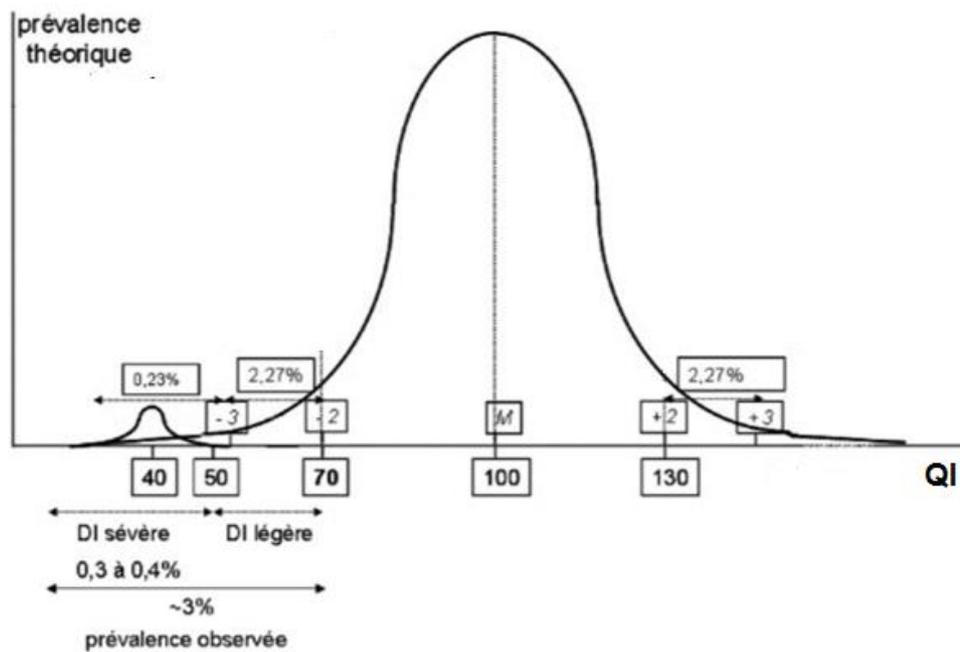


Figure 3: Distribution de la QI dans une population générale

Certaines bases de données, y compris London Dysmorphic Data Base et Possum Data Base, aident le clinicien à établir son diagnostic en se fondant sur des photos des sujets atteints.

Dans le monde occidental, la DI, avec ou sans anomalies congénitales, représente le mobile principal pour consulter un clinicien généticien afin d'obtenir un diagnostic et des conseils. Cependant, avec les examens cliniques approfondis, l'analyse des caryotypes de haute résolution et la recherche des désordres métaboliques, les cliniciens ne parviennent à établir des diagnostics étiologiques que dans 40% des cas de patients souffrant d'un retard de développement inexpliqué (Rauch *et al.*, 2006).

Malgré les progrès réalisés en matière de diagnostic ces dernières années, les causes de la DI restent inconnues dans 1/3 à 2/3 des cas (Des-Portes *et al.*, 2002). Ces proportions ont été revues à la baisse suite à l'augmentation du niveau de résolution des techniques de cytogénétique qui a permis d'identifier des anomalies auparavant invisibles. En effet, l'évolution des techniques de la cytogénétique moléculaire notamment le CGH-arry dans les années 2000 et la révolution que le séquençage à haut débit des exomes-Next generation Sequencing), ont rendu le diagnostic des DI sûr et plus facile.

6. La transmission de la déficience intellectuelle

a. Formes autosomiques dominantes

La transmission dominante de la déficience intellectuelle est mal connue en raison de son expressivité variable et de sa pénétrance incomplète. La prévalence de cette forme reste aujourd'hui difficile à estimer (Ropers, 2008) et peu de gènes impliqués dans cette forme ont été identifiés.

Les affections neurocutanées, dont la sclérose tubéreuse et la neurofibromatose de type I, sont des maladies géniques à transmission dominante associées à la DI souvent sévère dans le cas de la première, et légère dans le cas de la seconde.

b. Formes autosomiques récessives

L'hétérogénéité génétique et la variabilité des signes cliniques ainsi que la taille (souvent réduite) des fratries étudiées ont longtemps freiné l'étude et l'identification des gènes en cause dans les déficiences intellectuelles de forme autosomique et récessive.

Ces gènes autosomiques ont été largement ignorés et, pour dépasser ces limites, les généticiens ont adopté l'approche d'étude des fratries issues des mariages consanguins en appliquant la stratégie de la ségrégation des marqueurs et la liaison génétique. Mais en raison des efforts coordonnés et du fait de l'avènement du séquençage à haut débit de l'ADN, qui a révolutionné le séquençage, nous avons assisté à une accélération considérable de la procédure d'identification des gènes impliqués dans les déficiences intellectuelles à transmission récessive.

Cette forme de transmission a présenté un risque de récurrence élevé, notamment au sein des populations ayant une consanguinité parentale fréquente. En effet La déficience intellectuelle autosomique récessive (DI-AR) est la forme la plus commune de la DI (Bell *et al.*, 2011; Ropers, 2008).

Parmi les syndromes de la DI qui sont transmis sous forme récessive, nous trouvons (le syndrome de Joubert, le syndrome d'Angelman, le syndrome de Smith-Lemli Opitz, le syndrome Dubowitz, etc.)

Dans le cas de la DI récessive liée à l'X (DIRX), les femmes hétérozygotes ne sont pas atteintes mais peuvent transmettre la maladie, elles sont alors dites conductrices de la maladie et la pathologie ne se manifeste que chez les sujets de sexe masculin (XY) qui ne possèdent qu'une seule copie du gène (sujets hémizygotés).

B. La déficience intellectuelle liée au sexe (X-LID)

1. Historique

Depuis les observations de Lionel Penrose en 1938 concernant le nombre plus élevé de la DI chez les garçons que chez les filles, plusieurs études ont été lancées pour élucider l'origine de cette constatation.

Suite à l'observation de la fréquence de la déficience intellectuelle qui a été plus forte chez les sujets masculins (Lehrke, 1972; Raymond, 2006), l'attention des chercheurs s'est rapidement fixée sur le lien entre certaines formes de déficience intellectuelle et le chromosome X.

Des études européennes ont montré que les institutions spécialisées dans le suivi des déficients intellectuels connaissent une sur-représentation de garçons et cela a constitué un argument fort à l'appui des hypothèses en faveur de l'implication de gènes localisés sur le chromosome X dans la pathologie de la déficience intellectuelle (Chelly *et al.*, 2006). Dès lors, plusieurs méthodes conventionnelles appliquées à la recherche de nouveaux gènes X-LID ont été fondées sur l'analyse de la liaison génétique ainsi que sur l'étude de l'homozygotie. L'approche utilisée, était la recombinaison des marqueurs génétiques au sein des familles présentant des sujets atteints de DI. Ainsi, par exemple, entre l'année 2002 et 2004, des mutations pathologiques ont été identifiées dans 15 gènes (du chromosome X) associés à 18 formes de DI syndromiques (Ropers et Hamel, 2005).

Les résultats des études de liaison ont montré qu'il existe un nombre important de gènes cartographiés sur le chromosome X qui sont impliqués dans la déficience intellectuelle héritée sous sa forme mendélienne.

Il a été démontré aussi que le chromosome X présente des loci qui, à l'état muté, conduisent à la DI et à certaines formes d'autisme (Ross *et al.*, 2005)

Ces pathologies sont qualifiées de X-LID (X-Linked Intellectual Deficiency), définie comme une affection monogénique des aptitudes intellectuelles qui touche principalement les garçons (Chelly et Mandel, 2001).

Les progrès de la technologie de séquençage durant les dix dernières années et l'apparition des séquenceurs de nouvelles générations ont accéléré les recherches sur les gènes impliqués dans la DI liée au sexe. Ainsi, jusqu'à 2014, 114 gènes impliqués dans la déficience intellectuelle ont été découverts (tableau 2), et plus récemment le 115^{ème}

gène(SSR4) a été identifié sachant que j'ai signalé la possibilité de sa causalité une année avant tout en l'archivant avec un autre gène dans le centre des données scientifiques(DRYAD). Je détaillerai ces données plus loin dans les parties résultats et discussion.

Ces découvertes ont été rendues possibles par la collaboration internationale entre EURO-MRX (<http://www.euomrx.com>) et le consortium IGOLD.

Tableau 2: Liste des gènes X-LID

ABCD1	FANCB	MBTPS2	RPL10
ACSL4	FGD1	MECP2	RPS6KA3
AFF2	FLNA	MED12	SHROOM4
AGTR2	FMR1	MID1	SLC16A2
AIFM1	FRMPD4	MTM1	SLC9A6
AP1S2	FTSJ1	NAA10	SMC1A
ARHGEF6	GDI1	NDP	SMS
ARHGEF9	GK	NDUFA1	SOX3
ARX	GPC3	NHS	SRPX2
ATP6AP2	GRIA3	NLGN3	SYN1
ATP7A	GSPT2	NLGN4X	SYP
ATRX	HCCS	NSDHL	TAF1
BCOR	HCFC1	OCRL	THOC2
BRWD3	HDAC8	OFD1	TIMM8A
CASK	HPRT1	OGT	TSPAN7
CCDC22	HSD17B10	OPHN1	UBE2A
CDK16	HUWE1	OTC	UPF3B
CDKL5	IDS	PAK3	USP9X
CLCN4	IGBP1	PCDH19	WDR13
CLIC2	IL1RAPL1	PHF6	ZC4H2
CNKSR2	IQSEC2	PHF8	ZCCHC12
CUL4B	KDM5C	PLP1	ZDHHC15
DCX	KIAA2022	PORCN	ZDHHC9
DKC1	KLF8	PQB1	ZMYM3
DLG3	L1CAM	PRPS1	ZNF41
DMD	LAMP2	PTCHD1	ZNF81
EBP	LAS1L	RAB39B	ZNF711
FIF2S3	MAGT1	RAB40AL	
FAAH2	MAOA	RBM10	

Source : Greenwood 2014

2. Prévalence

Selon Opitz JM (Opitz *et al.*, 1986), la prévalence des X-LID dans les deux sexes serait de l'ordre de 1/296, soit 3,3/1 000 naissances. Chez les garçons, les gènes liés au chromosome X sont responsables de la DI dans 10 à 12% des cas (Ropers, 2010).

Les études montrent que 28,5% de la déficience intellectuelle sévère (QI entre 20-40) et 50% des DI légers (QI entre 50-70) sont liés au chromosome X (Ropers and Hamel, 2005).

L'étude de nombreuses familles ayant des femmes conductrices de la DI a montré que 42% des sujets de la cohorte sont atteints par des mutations touchant plus de 90 gènes du

chromosome X responsables de la DI (De Brouwer *et al.*, 2007). Cependant, ce pourcentage est certainement sous-estimé car les gènes la DI n'ont pas encore tous été découverts, et d'autre part les techniques utilisées ne ciblent pas toutes les régions du chromosome X.

3. L'expression de la DI chez les femmes conductrices

Certains DI ont une transmission dominante liée à l'X, mais avec une pénétrance incomplète. Ceci a été remarqué chez les femmes vectrices présentant des signes cliniques de DI.

Cette constatation, en apparence surprenante, s'explique par l'inactivation non aléatoire du chromosome X (mécanisme sera détaillé plus loin dans cette introduction). En effet, nous assistons au maintien du chromosome X muté et porteur de l'allèle de la déficience intellectuelle actif et à l'inactivation du chromosome sain. Ce phénomène s'identifie facilement et rapidement par des moyens de diagnostic moléculaire et enzymatique à la disposition de tous les laboratoires de diagnostic génétique.

Pour ce qui est de DI observée chez les filles, il a été rapporté que certaines DI liées au sexe ne s'expriment qu'à l'état hétérozygote (Turner *et al.*, 1980), comme l'incontinentia pigmenti, l'hypoplasie dermique en aire de Goltz, le syndrome de Rett et le syndrome d'Aicardi. Toutes ces pathologies suggèrent qu'à l'origine il s'agirait d'une mutation dominante létale chez les garçons et observée uniquement chez les filles.

4. La Déficience Intellectuelle Syndromique (IDXS)

La forme syndromique de la déficience intellectuelle se caractérise par des anomalies neuromusculaires, métaboliques ou physiques. Elle s'accompagne toujours de signes cliniques caractéristiques, lesquels présentent un atout pour l'investigation génétique et la détermination du mécanisme moléculaire sous-jacent. La déficience intellectuelle est donc associée à un signe clinique aisément reconnaissable, révélé par les examens complémentaires, biologiques, radiologiques et cytogénétiques. Ainsi les signes cliniques de la déficience intellectuelle syndromique sont-ils actuellement mieux connus, et de nombreux gènes en cause sont identifiés et localisés (figure 4) Dans cette forme pathologique, le conseil génétique et le diagnostic prénatal sont par conséquent facilement établis.

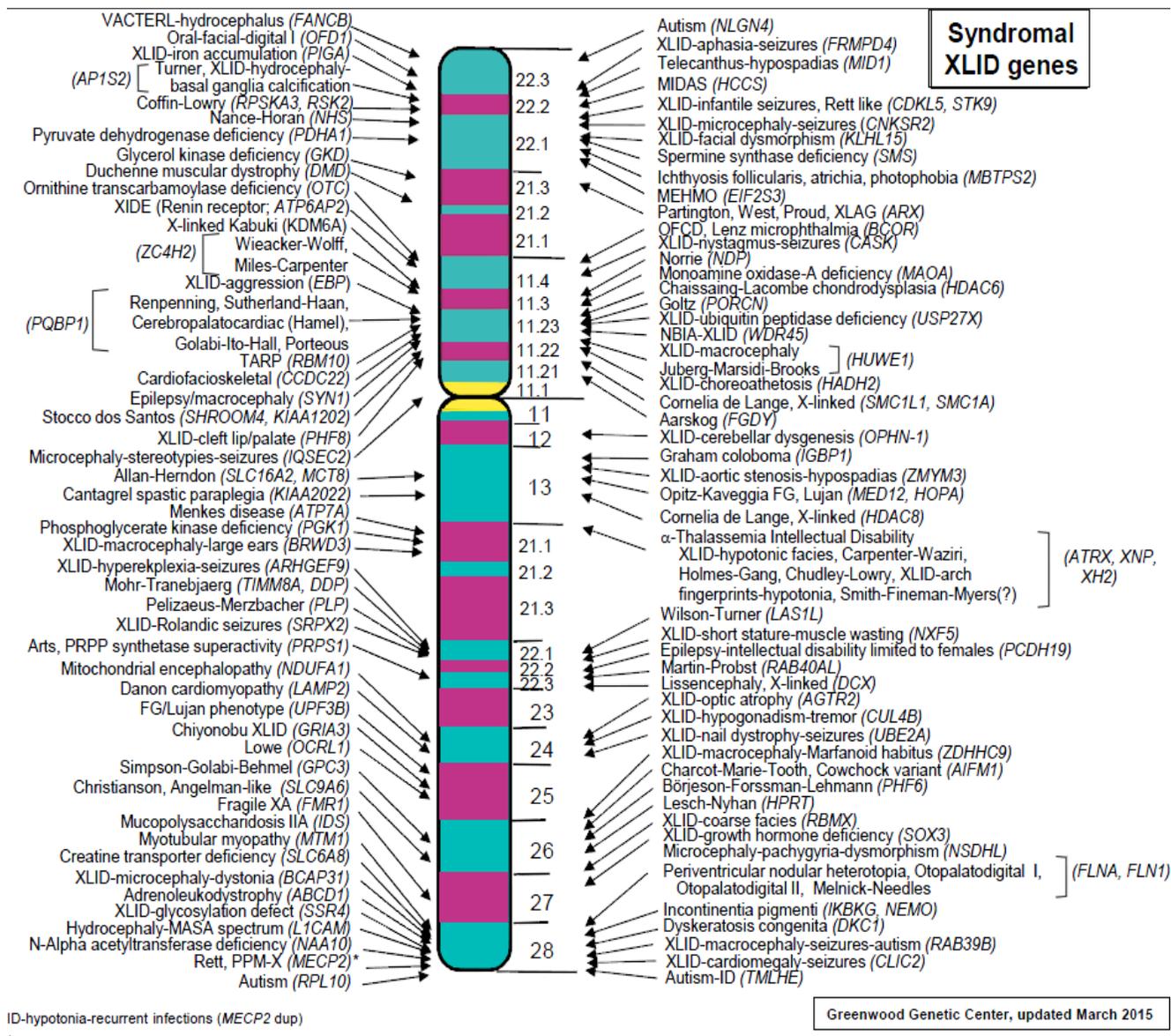


Figure 4: liste et localisation des gènes X-LID syndromique

5. La Déficience Intellectuelle non Syndromique (IDX)

Dans cette forme d'affection, la déficience intellectuelle est isolée et les signes cliniques ne sont pas spécifiques, par opposition aux déficiences intellectuelles syndromiques liées à l'X ou spécifiques (IDXs), dont le signe principal (la déficience intellectuelle) se trouve toujours associé à d'autres symptômes, physiques, neurologiques et/ou psychiatriques.

Dans la forme non syndromique, la déficience intellectuelle est le seul trait reconnaissable, alors que le mécanisme moléculaire est beaucoup plus compliqué, car les différentes atteintes génétiques ne sont pas cliniquement distinguables, de sorte que nous ne pouvons pas les classer. Le seul signe qui se manifeste est la déficience cognitive.

Sur le plan clinique, le diagnostic de la déficience intellectuelle non syndromique ne peut être évoqué, que devant des situations de récurrence familiale caractéristique de liaison au chromosome X. Ainsi, le clinicien généticien doit chercher une telle récurrence devant toute déficience intellectuelle fixe, isolée et inexplicée d'un garçon.

Cette forme est souvent caractérisée par une différence, d'un sujet atteint à l'autre, concernant l'histoire naturelle, la sévérité et la présentation du déficit intellectuel. Ces difficultés empêchent la mise en commun des données provenant de familles non apparentées, et rendent le diagnostic très difficile.

Sur le plan physiopathologique, il a été rapporté que la majorité des gènes de la DI non syndromique sont exprimés dans le cerveau et interviennent dans la dynamique du cytosquelette et le contrôle du développement des neurones (Ropers et Hamel, 2005).

Pendant longtemps, les formes non syndromiques ont été estimées plus nombreuses que les formes syndromiques (Fishburn *et al.*, 1983). Toutefois des études récentes ont montré que les formes syndromiques sont plus fréquentes (Maria *et al.*, 2013).

Dans ses études, Ropers rapporte que chez 125 familles présentant des déficiences intellectuelles non syndromiques, il existe trois différentes régions sous forme de clusters de

mutations au niveau du chromosome X, dont le locus Xp11 (figure 5) présente à lui seul, un pourcentage de 30% de ces mutations. L'étude de l'expression de 50 gènes de cette région a permis la découverte de 5 gènes impliqués dans la DI non syndromiques liée à l'X [*PQBP1*, *FTSJ1*, *ZNF41*, *JARID1C*, ET *PHF8*] (Ropers and Hamel, 2005).

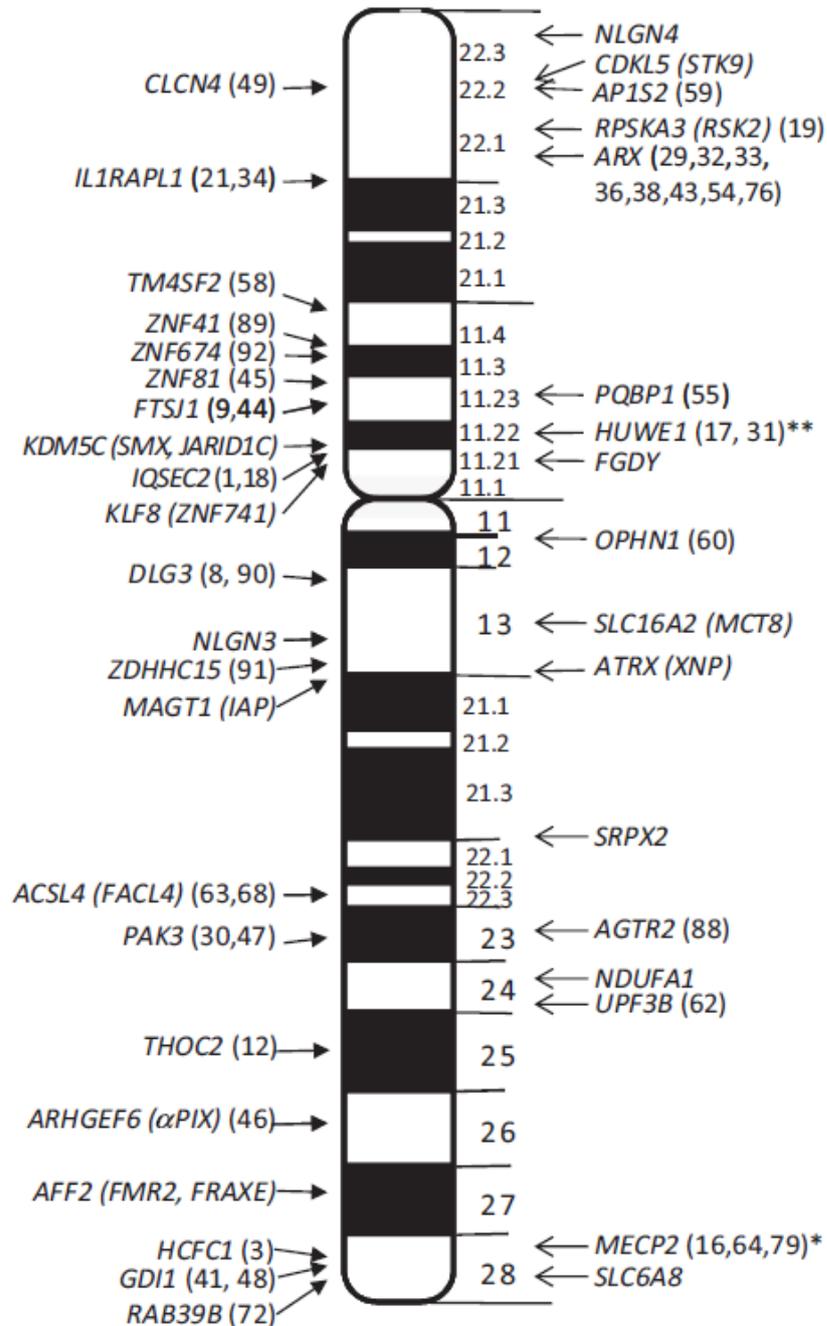


Figure 5: Localisation et liste des gene X-LID non syndromiques

Source : American journal of Medical Genetic 2012

6. De la DI non syndromique à la DI Syndromique

Malgré les efforts qui ont été développés dans le but de préciser la nature de la déficience intellectuelle, la limite entre syndromique et non syndromique n'est pas toujours claire, et il est souvent impossible de différencier les deux formes. Des gènes définis au début de leur découverte comme non syndromiques se trouvent ensuite impliqués dans des formes de syndromes bien définis, comme le gène OPHN1 qui est associé à l'ataxie, l'épilepsie et l'hypoplasie cérébelleuse (Bisgaard *et al.*, 2009).

Les signes caractéristiques de la face et les testicules volumineux chez les sujets XFS (sujets X fragile) n'apparaissent pas chez les tout jeunes garçons, mais à un âge tardif. Ce gène FMR peut donc être impliqué dans les deux formes de la DI. Ce syndrome, classé au début dans la catégorie non syndromique, devint plus tard la pathologie type de DI syndromique liée au chromosome X.

A la lumière des données actuelles et malgré l'évolution des innovations techniques dans le domaine de la génétique moléculaire, de nombreux efforts restent à fournir pour l'identification des gènes impliqués dans la déficience intellectuelle non syndromique.

C. L'inactivation du chromosome X chez la femme

Il a été confirmé que la déficience intellectuelle, comme plusieurs autres pathologies génétiques rares liées au sexe, peut être associée à un biais total d'inactivation du chromosome X (Tzschach *et al.*, 2015) et dans ce cas, une mutation délétère d'un gène responsable de la déficience intellectuelle liée à l'X se manifeste cliniquement si le chromosome transmis est celui qui porte la mutation et qui était inactif dans les cellules de la maman conductrice (Haas *et al.*, 2009). Robert M et son équipe ont démontré le lien entre l'état de l'inactivation de l'X (biais total) et la déficience intellectuelle chez la famille dont la mère est conductrice et possède un biais d'inactivation total (Plenge *et al.*, 2002).

1. L'inactivation est un phénomène physiologique

L'évolution des chromosomes sexuels pendant la vie placentaire des mammifères est associée au potentiel de la différence du dosage de l'expression des gènes dans les cellules

des deux sexes, mâle (XY) et femelle (XX). Durant les premiers stades de l'embryogenèse, les deux chromosomes X apportés par le spermatozoïde et l'ovule sont actifs (Grant et Chapman, 1988). Afin de permettre une égalité d'expression des gènes portés par le chromosome X, présents en double chez la femme et en un seul exemplaire chez l'homme, les cellules somatiques de la femme traitent différemment les deux chromosomes. Il en résulte l'inhibition de l'activité d'un des deux chromosomes. Ce mécanisme assure une compensation du dosage génique, égalise l'expression des gènes liés au chromosome X entre les deux sexes, protège le développement embryonnaire et assure la viabilité de l'organisme adulte (Lyon, 1989).

L'expression et l'activité concomitante des deux chromosomes X dans l'organisme sont létales pour la souris et handicapante pour l'homme (Heard *et al.*, 1997). Donc le mécanisme physiologique de l'extinction d'un des deux chromosomes X est défini par **l'inactivation de l'X** (XCI). Habituellement, l'inactivation, processus aléatoire, donne aux chromosomes paternels et maternels la même chance d'être inactivés dans chaque cellule. Par conséquent, les cellules somatiques des femmes sont des mosaïques de deux populations cellulaires ayant deux chromosomes X d'origines différentes, inactivés de manière alternative et aléatoire.

2. Le centre de l'inactivation du chromosome X (XiC)

Le processus de l'inactivation du chromosome X est commandé par l'activité d'un locus spécifique au niveau du locus Xq13, appelé centre d'inactivation du chromosome X (Xic), qui s'étend sur une longueur de 660 à 1 200 kb (Azofeifa *et al.*, 1995; Baader *et al.*, 1996). Ce centre abrite plusieurs gènes, tous réprimés, sauf un, qui échappe à l'inhibition et qui, paradoxalement, s'exprime au niveau du chromosome inactif en jouant le rôle de chef d'orchestre de la répression des gènes adjacents (Banzai *et al.*, 1995). L'inactivation du chromosome X dans les cellules somatiques est stable et héritable tout le long de la vie de l'organisme (Amrein et Axel, 1997). Dans les cellules germinales femelles, le chromosome X est réactivé et demeure actif dans l'ovocyte tout au long de la période de l'ovulation et de la fertilisation jusqu'au stade de l'implantation (Heard *et al.*, 1997).

Dans la lignée germinale mâle, le chromosome X se condense et s'inactive avant le commencement de la méiose (Vialard *et al.*, 2012). Il se réplique tardivement durant la phase S et s'apparie avec son partenaire Y en formant la vésicule sexuelle ou le corpuscule de Barr, souvent localisé en périphérie du nucléus (Antequera *et al.*, 1989). Cette inactivation durant la méiose chez le mâle pourrait empêcher l'initiation des événements de recombinaison non attendus au sein du chromosome unique (Ariel *et al.*, 1995).

Le chromosome X inactif est différent de celui qui est actif par le degré d'acétylation des histones et la méthylation de l'ADN. Les histones H2A, H3 et H4 sont moins acétylés au niveau des chromosomes X inactifs (Heard *et al.*, 1997). La méthylation de l'ADN des chromosomes inactifs est facilement transmissible d'une cellule à l'autre par le biais de l'activité de l'ADN methyl-transférase qui reconnaît et méthyle les sites riches en CpG hémi-méthylés après la réplication. Ces sites, généralement localisés au niveau des extrémités 5' des gènes, et qui sont riches en CpG, sont hyperméthylés au niveau du chromosome inactif et non méthylés au niveau des chromosomes X actifs (Heard *et al.*, 1997).

Malgré l'inactivation du chromosome X, quelques gènes échappent à cette régulation et se trouvent actifs au sein du chromosome inactivé. Ces gènes sont au nombre d'une vingtaine et se concentrent principalement au niveau des régions pseudo-autosomiques (Balhorn *et al.*, 1984; Ml and Dh, 1961). Ces gènes, qui contournent l'inactivation et restent actifs, ont une fonction homologue à celle des gènes portés par le chromosome Y (Belmont, 1996). Cette expression pourrait assurer l'équilibre du dosage d'expression génique entre le mâle et la femelle. Le résultat est donc une expression monoallélique de la majorité des gènes liés à l'X. Dans l'organisme, l'inactivation du chromosome X passe par trois stades (Heard *et al.*, 1997) :

- L'initiation, au cours de laquelle la cellule désigne quel chromosome doit être inactivé. Cela nécessite un locus spécifique qualifié de centre d'inactivation (Xic), point d'impact d'action moléculaire au stade précoce du développement jouant le rôle de détecteur du nombre des chromosomes X, de façon à ne laisser actif qu'un seul chromosome par cellule.
- La propagation de la vague d'inhibition longitudinalement tout le long du chromosome X à partir du centre d'inactivation (Xic), résultant d'une inactivation en cis de la majorité des gènes.

- Le stade de la maintenance de l'inactivation par transmission clonale d'une cellule à l'autre, successivement durant la division cellulaire.

3. Le transcrit spécifique inactif du chromosome X (Xist)

La découverte d'un transcrit non traduit ayant pour origine le chromosome X inactif, nommé « transcrit inactif spécifique de l'X » (X inactive specific transcript ou **Xist**), a permis de mieux comprendre le mécanisme moléculaire de l'inactivation. Ce produit est un ARN d'une longueur de 17 Kb (Balhorn *et al.*, 1984) et le rôle d'inactivation de ce centre a été mis en évidence par Penny et son équipe (Brockdorff *et al.*, 1991). En effet, la délétion de 7 kb du premier exon ainsi que d'une partie du promoteur interrompt l'inactivation de l'X qui porte ce centre, ce qui suggère que ce centre agit sur le chromosome en cis.

L'action du Xist est portée directement par son produit, qui agit en polymérisation de plusieurs copies (Boggs and Chinault, 1994). C'est un ARN fonctionnel. Il couvre l'hétérochromatine du corpuscule de Barr (Borsani *et al.*, 1991), et couvre en cis le chromosome qui contient son site de transcription d'une façon continue et extensive (Boyd and Fraser, 1990).

4. Le Biais d'inactivation du chromosome X

Avec ce processus physiologique d'inactivation, les femmes hétérozygotes se trouvent mosaïques pour l'expression des gènes du chromosome X. Une population cellulaire exprime les gènes du chromosome paternel, et une autre exprime les gènes du chromosome maternel. Chez la majorité des femmes, les deux populations cellulaires sont représentées par des proportions égales, et par conséquent, on établit un ratio relatif d'expression des gènes liés à l'X de ces deux lots cellulaires chez une femme donnée, que l'on qualifie de **biais d'inactivation** et que nous adopterons comme paramètre de diagnostic de DI dans ce projet de thèse. Une déviation du ratio s'observe chez 10% des femmes, et le biais peut devenir supérieur à 85%, d'où la rupture du ratio. On dit alors que le **biais est total** (Bertelsen *et al.*, 2011).

L'inactivation est aléatoire (Plenge *et al.*, 2002). Dans les conditions normales, le ratio d'inactivation est proche de 50/50. Elle s'installe pendant la vie embryonnaire, et touche à

la fois les X paternels et les X maternels en se transmettant de manière clonale entre les cellules. Une déviation du ratio de la moyenne attendue (50/50) dans une population féminine porteuse d'une anomalie génétique liée au chromosome X suggère que la mutation liée à l'X altère la viabilité ou la prolifération cellulaire (Lyon, 1968).

La déviation du ratio (l'apparition du biais d'inactivation total) est connue pour son influence sur les manifestations cliniques de nombreuses maladies génétiques liées au chromosome X (Orstavik, 2009).

D. Le séquençage du génome

1. Le séquençage classique (technique de Sanger)

Cette méthode a été développée par Frederick Sanger, prix Nobel de Chimie en 1980. Elle est basée sur la synthèse enzymatique d'un brin d'ADN complémentaire en utilisant le principe de l'arrêt aléatoire de la synthèse enzymatique par incorporation d'un nucléotide terminateur de chaîne.

L'ADN à séquencer est amplifié par clonage ou par Polymérase Chain Réaction (PCR). Cette technique utilise des didésoxyribonucléotides (ddNTP) qui ont un atome d'hydrogène à la place du groupement OH du carbone 3' du ribose correspondant. Ces nucléotides s'incorporent dans la chaîne de synthèse, mais bloquent toute polymérisation. L'enzyme libère donc la molécule incomplète et génère un grand nombre de fragments d'ADN de tailles différentes (figure 7) allant d'une base à 800 pb (Hall, 2007). C'est avec cette méthode enzymatique que les chercheurs ont abouti à la séquence complète du premier génome séquencé dans l'histoire de l'humanité (génomme du phage phi 174 en 1977) (Smith *et al.*, 1977). Cette réaction nécessite plusieurs facteurs :

- un brin court d'ADN pour amorcer la polymérisation, l'amorce marquée (dye-labeled primer).
- de l'ADN matrice amplifié.
- quatre réactions de séquençage menées en parallèle dans quatre compartiments distincts, contenant chacun un seul ddNTP (ddTTP, ddATP, ddCTP et ddGTP).
- les quatre nucléotides (dTTP,dATP,dCTP,dGTP).

Dans le cadre de son automatisation, la technique de Sanger bénéficie d'un système d'électrophorèse capillaire piloté par ordinateur. Les échantillons s'enchaînent et passent automatiquement par le biais des robots. Les ddNTP sont marqués par des fluorescents dont la lumière réfléchiée après excitation par un laser est captée par une cellule CCD (charge-coupled-device) ; ensuite, des logiciels analysent les signaux générés par les séquenceurs et les convertissent en fichiers analysables.

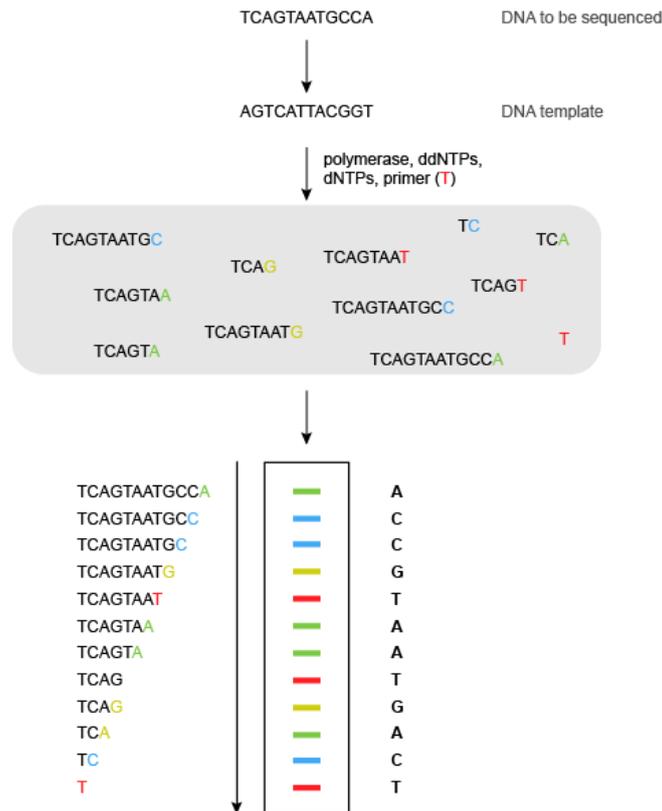


Figure 6: Séquençage par la méthode de Sanger

Source : <http://www.atdbio.com/content/20/Sequencing-forensic-analysis-and-genetic-analysis>

Le premier séquenceur automatique a été mis au point par Applied Biosystem ABI en 1987. Suivi par la mise au point du séquenceur capillaire utilise des capillaires de longueur différente (30 à 50 cm) et aux nombres pairs (2, 4, 8, 16, etc.) et ainsi le nombre de migrations simultanées se multiplie, ce qui permet de passer un grand nombre d'échantillons en même temps.

Les séquenceurs les plus modernes peuvent lire 384 échantillons en une seule fois (un run). Le run est l'ensemble des échantillons passés simultanément pendant un cycle de séquençage. Ces séquenceurs ont la capacité de passer jusqu'à 24 runs par jour. Le run doit contenir un nombre d'échantillons multiples et actuellement il y a des runs de 8, 16 et 24

capillaires. A titre d'exemple, le séquenceur ABI 3130XL, doté de 16 capillaires et d'une plaque de 96 puits, permet le séquençage d'environ 300 pb/puits pendant une durée de trois heures, soit 28,8 kb pour la plaque entière.

Avec l'automatisation, cette technique a contribué au séquençage du génome de plusieurs organismes, comme *Haemophilus influenzae* en 1995, *Saccharomyces cerevisiae* en 1996, *Escherichia coli* K-12 en 1998, *Arabidopsis thaliana* et *Drosophila melanogaster* en 2000, homme en 2001, souris en 2002, et rat en 2004.

Avec son automatisation, la technique de Sanger reste la méthode la plus utilisée dans les laboratoires et les milieux hospitaliers.

Le séquençage dans les années 2000 s'est basé sur les BAC et les YAC. La stratégie utilisée est le shotgun. C'est la technique du fusil à pompe qui consiste à séquencer le génome de façon aléatoire.

Dans cette approche, le génome est coupé physiquement ou biologiquement par des enzymes de restriction tout en générant des inserts de 2 à 10 kb. Le séquençage s'effectue après clonage et utilisation des amorces complémentaires aux extrémités connues du vecteur. Les fragments de 2 kb sont souvent séquencés complètement et sont assemblés par leurs régions identiques qui apparaissent lors du séquençage. Ces séquences se chevauchent et forment des contigs. Ainsi on parvient avec cette méthode à dépasser largement le débit de séquençage manuel, qui est au maximum de 300 nucléotides, pour atteindre avec les appareils les plus performants 1 000 à 1 100 nucléotides.

Cette technique de séquençage a évolué rapidement et la technique capillaire n'est plus le choix idéal pour l'appliquer dans le domaine du séquençage à haut débit qui dépasse largement les capacités de la technique automatisée de Sanger. Les limites de cette technique devant le programme du séquençage des génomes des organismes ont imposé la nécessité d'une nouvelle technologie pour le séquençage d'un nombre plus élevé de nucléotides. Les efforts récents ont tendu vers le développement de nouvelles méthodes.

2. Séquençage à haut débit ou Next Generation Sequencing(NGS)

En présence des 3,2 milliards de paires de base du génome humain et malgré l'innovation que le séquençage permet, nous restons loin de gagner le défi contre le temps et le coût du séquençage. Les séquenceurs de première génération à bas débit sont efficaces pour un nombre limité d'échantillons et une longueur définie de séquence.

La méthode de Sanger est considérée comme la première génération des séquenceurs, et les nouvelles méthodes sont baptisées Next Generation Sequencing (NGS). Elles ont révolutionné le séquençage par la combinaison des différentes étapes, leur grand débit et leur rapidité, tout en conservant les principes de préparation de la matrice, de l'enregistrement du signal, de l'alignement et finalement de l'assemblage.

Au cours des dernières années et dans le but de finaliser le séquençage du génome humain, plusieurs entreprises et établissements universitaires se sont inscrits dans la course du séquençage, comme Applied Biosystems, l'Université de Standford, Affymetrix, Microchip Biotechnologies, Solexa, 454 life science, et récemment Rain-Dance technology.

L'atout de ces entreprises réside dans le séquençage massif, rapide, de haut débit et à un moindre coût. Actuellement, NGS comprend trois principales méthodes de séquençage totalement différentes du principe du séquençage de Sanger. Ces trois méthodes sont fondées sur :

- la pyrosequencing (Roche technologie 454).
- le séquençage de terminaison réversible (technologie Solexa)
- le séquençage par ligature et détection (SOLiD), qui est l'approche que nous adoptons dans ce projet.

Les principales différences entre ces méthodes sont la longueur des oligos de synthèse, le nombre de lectures par cycle et les coûts par exome.

Ces différentes plateformes produisent différentes données et nécessitent différents protocoles d'étude.

Bien que la méthode de choix soit basée sur la question du diagnostic/recherche, toutes les méthodes de NGS sont en principe capables de détecter les mutations à l'échelle d'une base ainsi que les variations structurelles dans la molécule d'ADN.

L'approche du NGS cible les régions du génome tout en séquençant une partie définie ou le génome complet (pangénomique). La technique dans son principe général consiste à avoir le génome préalablement découpé en petits fragments d'ADN qui sont ensuite massivement séquencés en parallèle. Les fragments séquencés sont assemblés sous deux catégories : soit en contigs basés sur les chevauchements dans la séquence de lecture : c'est l'assemblage de novo (Roest Crollius, 2001) ; soit les fragments sont alignés à un génome de référence pour générer à la fin la séquence d'ADN étudiée (Lamoril et Ameziane, 2008). Dans ce dernier cas, seules les modifications de paires de bases par rapport à un génome de référence peuvent être identifiées et par conséquent cela peut conduire à l'identification des gènes de la maladie.

Ces nouvelles techniques ont révolutionné la génétique et contribué au séquençage du génome entier et à la découverte de nouveaux gènes pathologiques (Ng *et al.*, 2010). Les trois principaux instruments les plus répandus sur le marché sont Roche (454) GS FLX sequencer, Illumina genome analyser et Applied Biosystems SOLID sequencer.

Il existe un élément principal commun à ces trois technologies : la cellule fluide, qui constitue une chambre de réaction, contient un modèle nucléotidique attaché et les réactifs de la réaction de séquençage (Holt et Jones, 2008). Le NGS produit des séquences de lecture de 35 à 250 pb, à l'encontre des séquenceurs traditionnels (ABI3100), qui produisent des séquences de lecture de plus grande taille, atteignant les 800 pb.

Nous rappelons que seule une proportion de 1.5% des 3.3 milliards de paires de bases du génome humain est codante. Cette fraction du génome n'est pas figée, mais elle est distribuée sous formes d'exons sur toute la longueur du génome ce qui rend la tâche du séquençage de nouvelle génération (NGS) très difficile. Il va donc falloir penser à une stratégie de ciblage des régions utiles et d'intérêt qui sont faiblement représentés dans le génome.

Une approche d'enrichissement et de ciblage a montré son efficacité avec les techniques de séquençage à haut débit : la technique Rain-Dance basée sur la PCR multiplex améliorée. Nous l'adopterons dans notre étude de ce projet.

3. Enrichissement du génome par l'approche Rain-Dance

Durant les vingt dernières années, la PCR basée sur l'approche de multiplex était largement utilisée dans l'étape préséquençage des échantillons. Elle devient la technique de référence pour le séquençage massif en parallèle en conjonction avec la plateforme SOLiD. La technologie Rain-Dance utilise l'automate RDT 1000 pour l'enrichissement. Il est entièrement automatisé, et conçu pour amplifier des centaines de milliers de loci génomiques (figure 7) avec une grande spécificité et uniformité. C'est un système idéal pour les projets qui adoptent le séquençage futur (NGS). Il a la capacité de gérer jusqu'à 10 échantillons par jour et fonctionne avec tous les séquenceurs de nouvelle génération. C'est pour ces propriétés que nous l'avons choisi pour initier notre séquençage de l'exome du chromosome X.

La technologie d'enrichissement de Rain-Dance utilise une approche physico-biologique qui implique la dynamique des microgouttelettes et leur fractionnement puis la fusion même. Sur le plan technique, on trouve dans chaque microgoutte jusqu'à cinq paires d'amorces et tous les réactifs nécessaires à la réaction en chaîne. C'est une PCR indépendante miniaturisée dans une goutte microfluidique mono moléculaire. L'ensemble des gouttes, qui se comptent par milliers, présente la totalité des régions du génome qui ont été ciblées et sont présentes en nombre suffisamment amplifié pour subir le séquençage.

4. La technologie de séquençage SOLiD (Solid-seq 5500)

C'est une technique basée sur la ligation et la détection de l'ADN par l'ADN ligase ou bien séquençage par Oligo-Ligation et Détection (**SOLiD**). Elle a été développée par l'équipe de George Church, publiée en 2005 et mise sur le marché en 2007, une année après le lancement de la technologie à haut débit Illumina.

En janvier 2010, Life Technology-Applied Biosystem a lancé sur le marché le séquenceur SOLID4 (500 000 dollars), qui vient après SOLID3 et atteint un débit de 100 giga bases par run. Le séquenceur SOLID 5500 est apparu début 2011 et a atteint un débit de séquençage de 180 Gb/run. C'est cet automate que nous adopterons dans notre étude de ce projet de thèse et dont je développerai le principe dans la section Matériels et méthodes de ce manuscrit.

II- LES OBJECTIFS DE MES TRAVAUX

La variation génétique joue un rôle majeur dans les maladies mendéliennes et non mendéliennes. Parmi les quelque 2 600 maladies mendéliennes qui ont été résolues, la grande majorité est causée par des mutations rares qui affectent la fonction des protéines individuelles. À chaque locus mendélien, environ 95 % des mutations pathogènes peuvent être généralement trouvées dans les régions codantes ou dans des sites d'épissage canonique (Cooper, 1995). Les gènes codants pour les protéines ne représentent qu'environ 1 % du génome humain, mais abritent 85 % des mutations ayant des effets importants liés à la maladie. Par conséquent, des stratégies efficaces pour le séquençage complet des régions codantes (exomes) doivent avoir le potentiel de contribuer à la compréhension des maladies génétiques rares (Choi *et al.*, 2009).

L'unité INSERM U781 dirigée par le professeur Arnold Munnich se donne pour objectif l'étude des mécanismes génétiques et environnementaux de certaines maladies héréditaires humaines, dans le but de contribuer à leur diagnostic précis, à l'optimisation de leur prise en charge, à leur prévention et si possible à leur traitement.

Avec 30 000 nouveaux cas de maladies génétiques par an en France, et 25 à 30 millions d'Européens atteints de maladies génétiques (A. Munnich 2003), ce réel problème de santé publique nécessite une synergie d'activités pour apporter une réponse et une solution qui commence par la localisation et l'identification du gène porteur de la mutation. À l'heure des technologies de séquençage massif, le laboratoire de génétique moléculaire de l'hôpital Necker de Paris est doté d'une plateforme d'identification de mutation humaine par séquençage à haut débit permettant un diagnostic des maladies rares.

L'objectif de mon travail de thèse était de chercher de nouveaux gènes de la déficience intellectuelle liée au chromosome X chez des familles ayant des garçons atteints de déficience intellectuelle non syndromique et d'identifier des mutations qui seraient à l'origine des phénotypes étudiés.

L'approche utilisée dans cette étude est le diagnostic génétique par séquençage à haut débit de l'exome du chromosome X des patients de dix familles.

La procédure consiste à capturer l'exome du chromosome X des patients atteints de la déficience intellectuelle et à l'enrichir par la technologie Rain-Dance, puis à le séquencer dans notre plateforme avec un séquenceur à haut débit de la technologie SOLiD5500.

L'analyse bio-informatique des variants trouvés à l'issue du séquençage massif implique l'utilisation d'un logiciel doté d'un ensemble de filtres qui évaluent la nouveauté de la variation par comparaison et filtrage contre les polymorphismes disponibles dans les banques de données publiques comme dbSNP, 1000 Genome Project et/ou ceux qui sont trouvés chez des sujets non atteints (contrôles). En effet, chaque variant trouvé dans un de ces filtres est écarté et considéré comme un allèle non causatif du phénotype étudié. Les variants candidats, dont le nombre est réduit grâce au système de filtre, sont ensuite analysés et confirmés par la technique de Sanger.

Dix familles X-LID ont été retenues pour subir le séquençage de l'exome du chromosome X, chaque famille étant représentée par deux cas index ou une mère et un cas index.

La localisation et l'identification des gènes rendent le conseil génétique possible et permettent chaque année à 350 couples à risque d'attendre sereinement l'enfant qu'ils espèrent dans le cadre du diagnostic prénatal et préimplantatoire.

Ces avancées permettent surtout d'envisager l'approche thérapeutique de ces maladies génétiques, comme par exemple la réexpression du gène centromérique homologue du gène SMN sur le chromosome 5q13 dans l'amyotrophie spinale, ou de donner une approche pharmacologique rationnelle du traitement de l'ataxie du Friedrich (3).

Les équipes du professeur Munnich ont pu identifier près d'une centaine de gènes responsables de plusieurs maladies génétiques, particulièrement l'achondroplasie, l'oncogène Ret, l'amyotrophie spinale, la paraplégie spatiale liée au sexe, ainsi que de nombreux gènes mitochondriaux. Elles ont récemment démontré que l'ataxie de Friedrich résulte d'une attaque des centres fer-soufre des mitochondries par une surcharge en fer et ont pu proposer un traitement curatif de la myocardopathie spécifique de cette affection.

III- Matériels et méthodes

A. Les familles X-LID

Parmi une centaine de familles X-LID, dix ayant au moins un garçon atteint de DI ont été retenues (BH1à BH10) (tableau 3). Les familles candidates ont été sélectionnées sur dossier après examen clinique, radiologique, biologique, cytogénétique et génétique.

Tableau 3 : Choix des sujets candidats pour séquençage à haut débit

Famille	Individu	Filiation	phénotype
BH1	BH1a	Fils	Atteint
	BH1b	demi-frère	Atteint
BH2	BH2a	Fils	Atteint
	BH2b	Fils	Atteint
BH3	BH3a	Maman	sans signes
	BH3b	Fils	Atteint
BH4	BH4a	Fils	Atteint
	BH4b	Fils	Atteint
BH5	BH5a	Fils	Atteint
	BH5b	Fils	Atteint
BH6	BH6a	Fils	Atteint
	BH6b	demi-frère	Atteint
BH7	BH7a	Fils	Atteint
	Bh7b	Fils	Atteint
BH8	BH8a	Fils	Atteint
	BH8b	Fils	Atteint
BH9	BH9a	Fils	Atteint
	BH9b	Fils	Atteint
BH10	BH10a	Fils	Atteint
	BH10b	Fils	Atteint

Avant la réalisation du séquençage de l'exome du chromosome X, les sujets sélectionnés ont subi un ensemble d'examen complémentaires pour une recherche étiologique de la déficience intellectuelle.

Les dix familles ont été étudiées par séquençage de l'exome du chromosome X. Les résultats ont été analysés en détail pour l'ensemble. **Néanmoins, nous nous sommes intéressés de plus près à trois familles, BH3, BH5 et BH9**, que nous détaillerons dans la partie résultat et discussions.

Les autres familles seront discutées et leurs arbres généalogiques seront portés dans cette section du chapitre <<resultat>>.

B. Étude clinique

La prise en charge de nos patients a commencé par l'anamnèse puis l'examen clinique dans une approche globale de l'enfant et de sa famille, et dans une relation de confiance. Le clinicien généticien décrit le phénotype de l'enfant et révèle les signes de dysmorphie s'ils sont présents. Les paramètres de croissances (poids, taille et PC) sont systématiquement notés.

Le clinicien établit un examen neurologique complet et demande des examens supplémentaires et complémentaires pour orienter le diagnostic.

La déficience intellectuelle et sa sévérité sont évaluées par la mesure du niveau des performances intellectuelles grâce à des tests psychométriques standardisés, dont le résultat est exprimé en quotient intellectuel (QI). Le choix des instruments de mesure et l'interprétation des résultats prennent en considération des facteurs qui limitent les performances aux tests (contexte socioculturel, langue maternelle, handicaps associés moteurs ou sensoriels, troubles de communication).

Les tests psychométriques les plus utilisés sont les échelles de Wechsler (WPPSI de trois à six ans, WISC-III de six à seize ans et WAIS-R, > 16 ans). Chez le nourrisson et le jeune enfant, on utilise couramment le test de Brunet-Lézine (0 à 6 ans).

C. Les examens complémentaires et génétiques

Les enfants des dix familles ont subi des examens radiologiques notamment des (IRM), biologiques de routine et métaboliques. Selon les signes d'appels et le degré de récurrence

de l'atteinte, le clinicien demande des études de liaison génétique et le séquençage de certains gènes connus pour leur implication dans la déficience intellectuelle.

Chaque enfant malade a bénéficié d'un examen cytogénétique impliquant un caryotype standard ou de haute résolution et un CGH-array dans le respect des règles de la bioéthique génétique française et après obtention du consentement parental.

1. Examen radiologique

L'imagerie cérébrale a été justifiée chez certains de nos patients par l'association de certains signes au constat de la déficience intellectuelle, entre autres l'existence d'une comitialité, de signes neurologiques, une micro ou macrocéphalie, un hypo ou hypertélorisme et toute régression d'acquisition.

Pour la mise en évidence des anomalies de la giration et les malformations des fosses postérieures et de la substance blanche, l'IRM a été préféré par rapport au scanner, car il fournit une information de meilleure qualité sur les lésions calcifiées du cerveau.

2. Bilan métabolique

Le bilan métabolique a été prescrit pour toute déficience accompagnée de régression motrice ou intellectuelle, d'épisodes aigus neurologiques ou de signes viscéraux associés.

3. Liaison génétique et séquençage

L'étude de liaison des marqueurs (microsatellites) à la pathologie a été réalisée pour toutes les familles sélectionnées tout en ciblant certains marqueurs génétiques au niveau des locus d'intérêt et suspectés d'avoir un lien avec la déficience intellectuelle non syndromique. La ségrégation de ces marqueurs a été étudiée par PCR et par une analyse de séquence à l'aide des séquenceurs 3500 et 3500xL (AB genetic analysers, Applied Biosystems).

Les locus des marqueurs qui ségrègent avec la déficience mentale ont été la cible du séquençage de certains gènes dont nous pensons qu'ils sont en lien avec le syndrome. Toutefois, pour une raison de coût et de limite de la technique appliquée (Sanger), seuls

quelques exons du gène ont fait l'objet de cette étude. De surcroît, les régions du promoteur et les sites d'épissage n'ont pas été inclus dans le séquençage.

D. L'inactivation du chromosome X

Cette étude a été réalisée pour l'ensemble des mères des enfants atteints. La méthode utilisée est celle de l'étude du polymorphisme des répétitions CAG du récepteur des androgènes au locus Xq11 et les répétitions CGG du locus FMR1 Xq27.3 (T. Kubota et al., 1999).

E. Préparation des échantillons pour séquençage à haut débit(NGS)

Les différentes familles (X-LID) candidates pour le séquençage à haut débit ont été convoquées pour prélèvement sanguin, et chaque individu a subi une prise de sang (deux tubes EDTA de 10 ml chacun). L'ADN a été extrait du sang périphérique à l'aide de la procédure standard basée sur la technique classique du phénol chloroforme (Kirby KS., 1957). Le protocole sera détaillé dans la section Annexes à la fin de ce manuscrit.

La pureté et la concentration de l'ADN ont été évaluées par le spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 V3-7 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). 1.5 ul de la solution sont déposés sur la surface de mesure. Après action du système de mesure, l'appareil affiche l'absorbance, la pureté et la concentration d'ADN (ng/ul). L'ADN absorbe à 260, tandis que les protéines absorbent à 280. Un ADN est pur si le rapport ($Ab_{260}/Ab_{280} > 1.8$).

(Ab, signifie Absorbance). La contamination par les sels est évaluée par le rapport Ab_{260}/Ab_{230} . Ce rapport doit être supérieur à 1.5. ($Ab_{260}/Ab_{230} > 1.5$).

F. Choix des critères de l'ADN pour enrichissement avec Rain-Dance

L'exome du chromosome X, qui est de l'ordre de 2,5 Mb, aurait besoin en moyenne de 12 000 amplicons différents de PCR pour qu'il soit séquencé avec l'approche NGS (Mondal *et al.*, 2011). Ces amplicons sont le produit de l'enrichissement par la technique Rain-Dance que nous avons choisie pour accomplir ce projet de thèse. Cette partie a été effectuée à l'étranger.

Il fallait envoyer aux États-Unis vingt échantillons correspondant à l'ensemble des sujets sélectionnés dans notre étude, et qui appartenaient aux dix familles X-LID. Chaque échantillon représente 5 ug d'ADN dans 40 ul d'eau déminéralisée.

Nous avons donc envoyé les vingt échantillons des dix familles sélectionnées (Tableau 4).

Tableau 4: Propriétés de l'ADN envoyé pour enrichissement aux Etats-Unis

Tube ID	Sample ID	DNA concentration ng/ul	Volume ul	Total Quantity ng	Method used to determine DNA concentration	Species	DNA Source	Method of DNA purification
1	BH1a	732	70	51240	Nanodrop	Human	Blood	Classic phenol-chloroforme
2	BH1b	293	70	20510	Nanodrop	Human	Blood	Classic phenol-chloroforme
3	BH2a	91	78	7098	Nanodrop	Human	Blood	Classic phenol-chloroforme
4	BH2b	135	70	9450	Nanodrop	Human	Blood	Classic phenol-chloroforme
5	BH3a	1040	26	27040	Nanodrop	Human	Blood	Classic phenol-chloroforme
6	BH3b	736	70	51520	Nanodrop	Human	Blood	Classic phenol-chloroforme
7	BH4a	881	70	61670	Nanodrop	Human	Blood	Classic phenol-chloroforme
8	BH4b	715	70	50050	Nanodrop	Human	Blood	Classic phenol-chloroforme
9	BH5a	131	70	9170	Nanodrop	Human	Blood	Classic phenol-chloroforme
10	BH5b	459	70	32130	Nanodrop	Human	Blood	Classic phenol-chloroforme
11	BH6a	184	70	12880	Nanodrop	Human	Blood	Classic phenol-chloroforme
12	BH6b	325	43	13975	Nanodrop	Human	Blood	Classic phenol-chloroforme
13	BH7a	451	70	31570	Nanodrop	Human	Blood	Classic phenol-chloroforme
14	BH7b	459	70	32130	Nanodrop	Human	Blood	Classic phenol-chloroforme
15	BH8a	488	70	34160	Nanodrop	Human	Blood	Classic phenol-chloroforme
16	BH8b	662	70	46340	Nanodrop	Human	Blood	Classic phenol-chloroforme
17	BH9a	661	70	46270	Nanodrop	Human	Blood	Classic phenol-chloroforme
18	BHb9	251	70	17570	Nanodrop	Human	Blood	Classic phenol-chloroforme
19	BH10a	257	70	17990	Nanodrop	Human	Blood	Classic phenol-chloroforme
20	BH10b	572	70	40040	Nanodrop	Human	Fibroblastes	Classic phenol-chloroforme

L'intégrité de l'ADN a été évaluée par la migration sur gel d'agarose 1 % en présence d'un marqueur de taille de 21kb, après migration électrophorétique pendant une heure sous 80V. L'ADN de bonne qualité doit apparaître avec un profil d'une seule bande supérieure ou égale à 10kb (figure 8). Un ADN sous forme de SMIR ou ayant plusieurs bandes de différentes tailles est considéré comme dégradé et n'est plus valable pour l'enrichissement et le séquençage à haut débit.

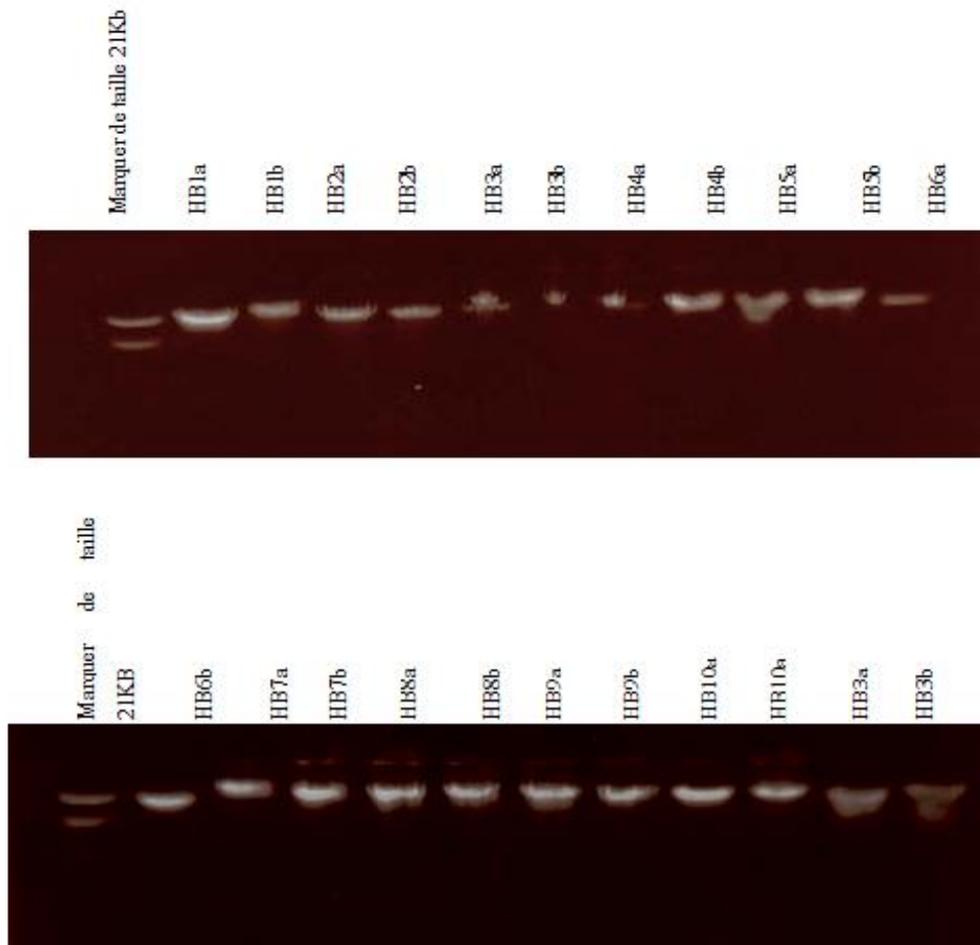


Figure 7 : Analyse électrophorétique de l'ADN pour enrichissement

L'ADN, une fois extrait, étudié et analysé, est conservé à 4° ou congelé à -20°. L'envoi pour enrichissement a été effectué dans un emballage en carboglace accompagné par les paramètres justifiant la pureté et l'état d'ADN.

G. Séquençage à haut débit (NSG)

1. Enrichissement de l'exome du chromosome X

L'exome du chromosome X, qui est de l'ordre de 2,5 Mb, aurait besoin en moyenne de 12 000 amplicons différents de PCR pour être impliqué dans le programme de séquençage massif (SOLiD5500).

L'enrichissement se fonde sur une approche physico-chimique qui implique la dynamique des microgouttelettes et leur fractionnement. En effet, 2.5 ug d'ADN génomique sont fragmentés pour générer des fragments entre 2 et 4 kb.

1 ug est mis en présence du mix PCR dans un volume total de 25 ul.

Ce tube est présenté à l'automate RDT1000 de la technologie Rain-Dance pour fusion avec les gouttes de primers, dont chacune renferme le primer forward et le primer reverse (5.2 uM). L'ensemble passe dans la zone de fusion de l'automate sur la puce microfluidique à un débit de 3 000 gouttelettes par seconde. Les gouttelettes de paires d'amorces sont de petite taille, elles se déplacent rapidement à travers les canaux jusqu'à ce qu'elles entrent en collision avec les gouttelettes matrices sous un champ induit. Les deux gouttelettes fusionnent pour produire une seule chambre à émulsion pour réaction PCR, et environ 1,5 millions de chambres seront générées (figure 8)

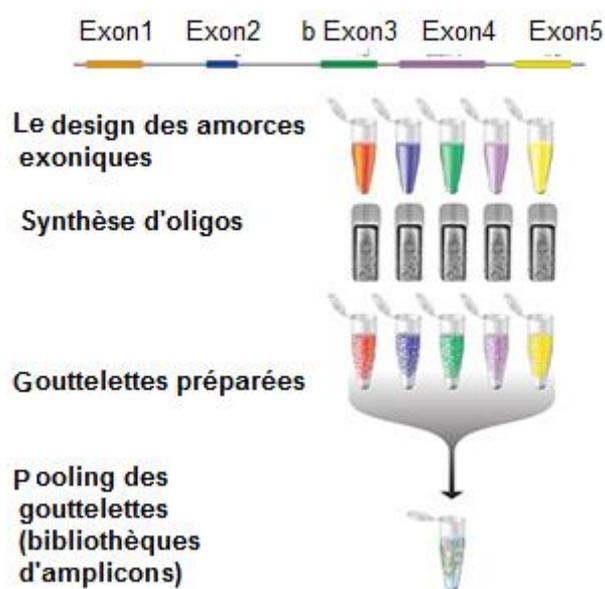


Figure 8: la construction de la bibliothèque d'amplicon par Rain-Dance

Les 1.5 millions de gouttes de PCR sont récupérées dans un tube de 200 ul, puis passées au thermocycler normal pour subir la réaction de polymérisation en chaîne classique. Ainsi, chaque goutte représente à elle seule une solution homogène d'un seul fragment d'ADN amplifié 2^n fois (n = nombre de cycles). L'ensemble des amplicons générés est ainsi purifié et présenté au séquenceur.

2. Préparation des matrices pour la phase du séquençage NGS

La bibliothèque de fragments d'ADN générés suite à l'enrichissement Rain-Dance est empaquetée selon les exigences de la technologie SOLiD. De chaque échantillon enrichi, une quantité du produit de PCR de 5 ug est stockée dans 100 ul d'eau nucléase free. L'ADN subit un cisaillement par sonification aux ultrasons pour générer des fragments d'une longueur de 150 à 180 pb puis est réparé de ses deux extrémités (end-repaired) afin d'ajouter par ligation deux adaptateurs P1 et P2 spécifiques à la technique SOLiD.

Des séquences nucléotidiques spécifiques appelées codes-barres sont ajoutées aux adaptateurs et sont séquencées avec l'ADN pour pouvoir attribuer le fragment à l'échantillon correspondant (figure 9).

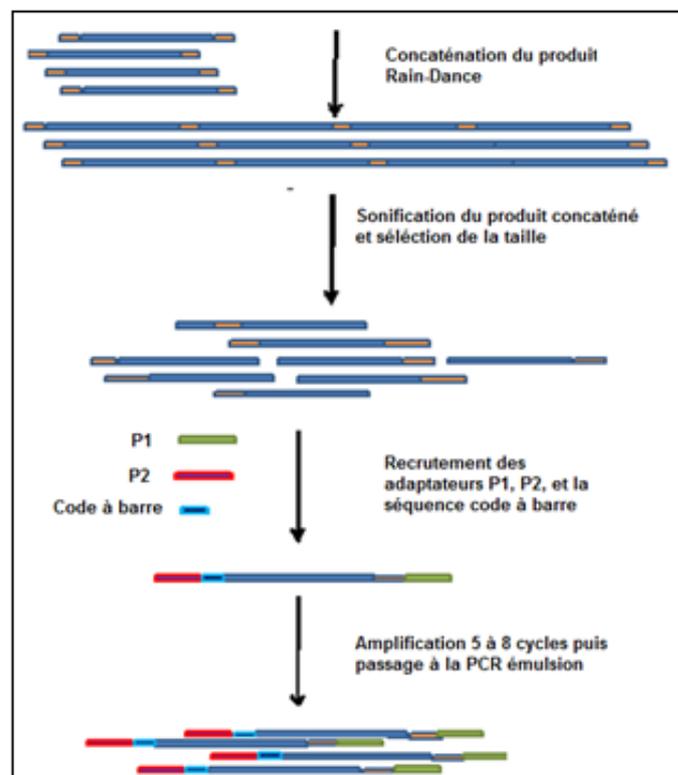


Figure 9: Préparation des matrices pour séquençage NGS

3. Réaction de séquençage NGS

La réaction de séquence dans la technologie SOLiD est basée sur la synthèse de séquences par ligation et non par polymérisation comme c'est le cas dans les techniques classiques. L'identification des nucléotides s'effectue avec la détection de la fluorescence de quatre fluorophores différents avec un encodage à deux bases : un fluorophore correspond à un enchaînement de deux bases.

Avec la technique SOLiD, on s'attend donc à avoir 16 combinaisons possibles ($2n = 16$), avec n le nombre de fluorophores qui est de 4. Le nombre 2 représente le nombre de bases encodées. Chacun des 4 fluorophores correspond à 4 dimères possibles.

L'élongation s'effectue par la lecture de courts fragments par une procédure de ligation cyclique et de détection des nucléotides grâce au système d'encodage.

Chaque sonde d'interrogation spécifique appelée pour hybridation est un octamer constitué de 3' vers 5' : de 2 bases spécifiques dites d'encodage suivies de trois nucléotides dégénérés (n), puis trois nucléotides universels (z) suivis d'un des quatre marqueurs fluorescents qui exprime la nature des deux premières bases (figure 10). Ses sondes spécifiques présentent un site de clivage (coupure) entre la 5^{ème} et la 6^{ème} base qui sera ciblé par une nucléase durant les cycles du séquençage.

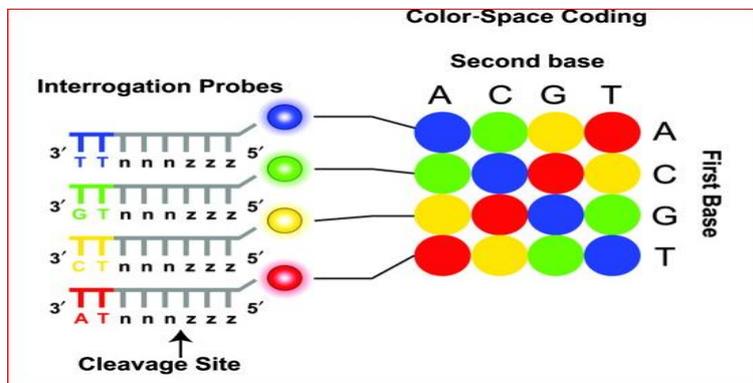


Figure 10: Encodage des bases pendant la réaction de séquence SOLiD

Le nombre de cycles de ligation dépend de la longueur des lectures à atteindre. Ainsi, pour séquencer 35 bases consécutives (un read de 35 bases), 7 cycles de ligations sont nécessaires ($35 \div 5 = 7$) ; le chiffre 5 représente la somme des deux bases d'encodage et les trois bases dégénérées obtenues à la suite du clivage de la sonde. Un read de 50 bases nécessite alors 10 cycles.

Le cycle commence par l'ajout d'un primer universel P2 en position (n) qui est complémentaire au primer P1 du brin matrice (figure 13).



Figure 11: Unité fonctionnelle du séquençage SOLiD

Un grand nombre de sondes d'interrogation octamériques et marquées comportant toutes les combinaisons possibles est ajouté automatiquement par le séquenceur. La compétition fait que seules les sondes complémentaires pourront s'hybrider et par la suite se lier.

Dans l'exemple de la figure 12, les deux premières bases interrogées sont A-T, le fluorophore couplé est rouge ; la lame est immédiatement scannée et l'image est analysée pour déterminer la nature et l'intensité de la fluorescence.

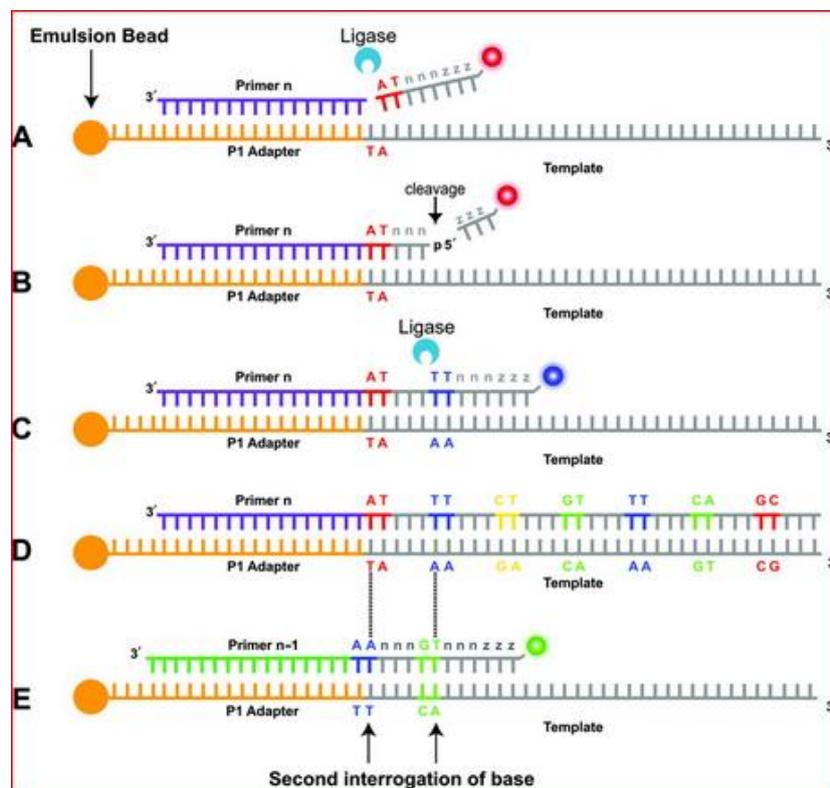


Figure 12: les cycles du séquençage SOLiD

Le clivage de la sonde s'effectue à l'aide d'une nucléase entre la 5^{ème} et la 6^{ème} base et l'extrémité 5' est phosphorylée pour que commence un nouveau cycle (figure 14). La synthèse continue jusqu'à la 25^{ème} base, ensuite le fragment synthétisé est dénaturé puis lavé et une deuxième série commence à la position n-1, puis n-2, n-3, n-4 du primer P2.

Durant les cinq cycles, chaque base se trouve interrogée deux fois par deux primers différents (figure 13). Ainsi la cinquième base du fragment à séquencer est analysée par l'amorce numéro deux du 2^{ème} cycle et l'amorce numéro un du 3^{ème} cycle. Cette double interrogation est fondamentale pour la précision de l'identification par le système SOLiD.

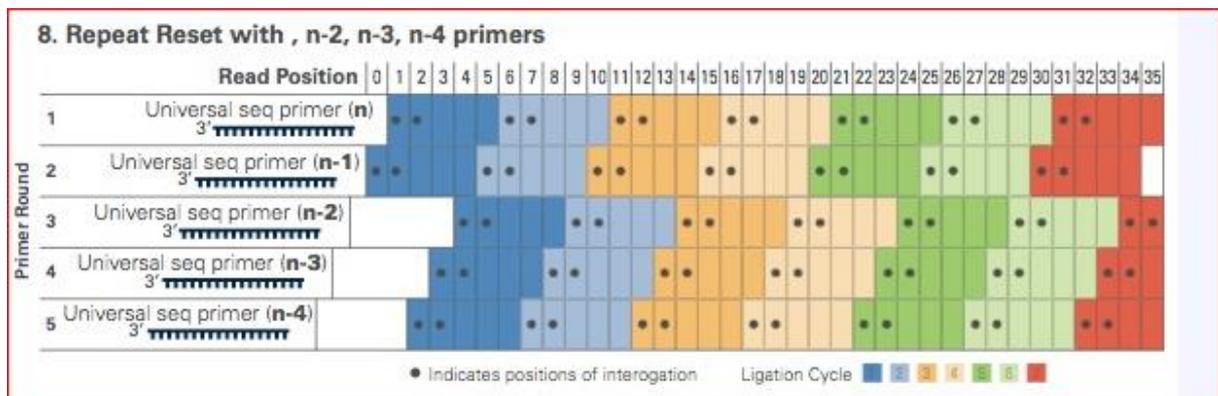


Figure 13: les cycles ligation, détection et clivage des sondes NGS

4. Reconstitution de la séquence à partir des codes couleurs

Dans l'exemple ci-dessus, les deux premières bases en position 1 et 2 de la sonde interrogée sont connues (respectivement T et A). Cette information donne le point de départ pour connaître toute la séquence à partir de l'algorithme du code couleur.

À chaque nouvelle ligation, la base est lue deux fois et les lacunes sont déterminées par les nouveaux oligos qui viennent s'attacher au primer. Le décalage de position de n à n-4 favorise la redondance de lecture des bases et limite très considérablement le risque d'erreur (Figure 14)

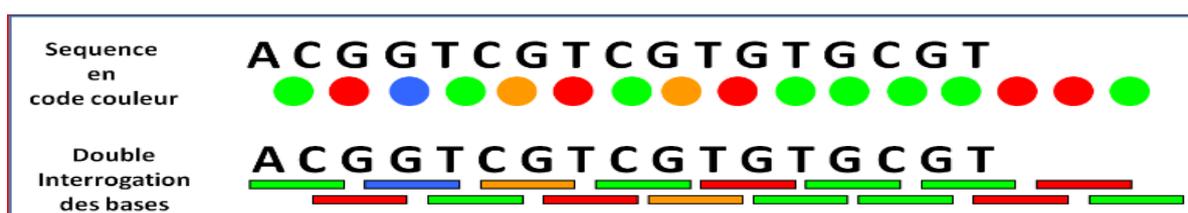


Figure 14: Reconstitution de la séquence d'ADN par code couleur

5. Etude des variants in SILICO

Le tri et l'appel des SNP/InDel ont été réalisés en utilisant les logiciels SAMTOOL et GATK. La nouveauté des variants a été évaluée en filtrant les variants contre un ensemble de polymorphismes qui sont disponibles dans des bases de données publiques telles que dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) 1000 génomes (<http://browser.1000genomes.org/index.html>), l'Exome Variant Server (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) et ExaC (<http://exac.broadinstitute.org/>).

Seuls des variants non-synonymes ou des variations affectant les sites d'épissage ont été analysés. Tous les variants de séquence ont été priorisés en marquant la conservation phylogénétique et l'impact fonctionnel (SIFT et Polyphen-2).

Les variants candidats ont été sélectionnés et confirmés par la méthode de Sanger à l'aide de l'analyseur génétique 3500XL (tableau 10). Une nouvelle mutation identifiée par NGS est obligatoirement confirmée par la méthode classique de Sanger. Un variant qui ne ségrège pas avec l'affection ou qui se trouve transmis aux sujets non atteints est considéré non informatif.

6. La stratégie de validation des nouvelles mutations

Après avoir analysé les résultats du séquençage à haut débit et la recherche de la présence d'un variant ou de variants différents, dans un même gène chez plusieurs patients apparentés, ces variants sont soumis à une étude bioinformatique de prédiction pour estimer leur pathogénicité. Ensuite ils sont confirmés et validés par reséquençage avec la technique de Sanger qui reste le seul outil de garantie dans ce domaine après avoir amplifié l'ADN par PCR (annexes)

IV- Résultats

A. Tableau clinique des patients

Les examens cliniques ont été effectués pour l'ensemble des patients X-LID par les cliniciens généticiens du service et les examens complémentaires ont été accomplis puis discutés en Staff.

Le principal signe que partagent tous les patients c'est la déficience intellectuelle non spécifique. Les signes cliniques associés sont détaillés dans le tableau 5.

Dans ce tableau, le symbole (+) représente la présence du signe et le (-) représente son absence.

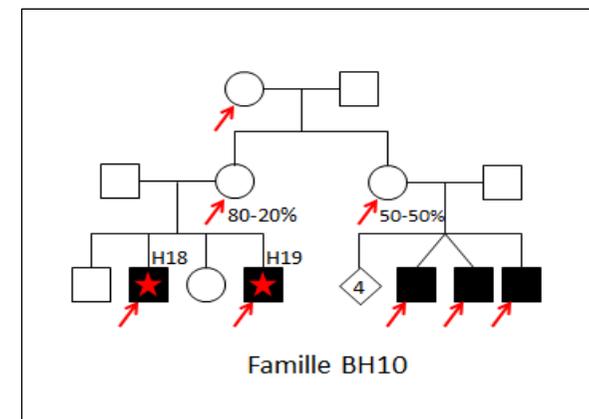
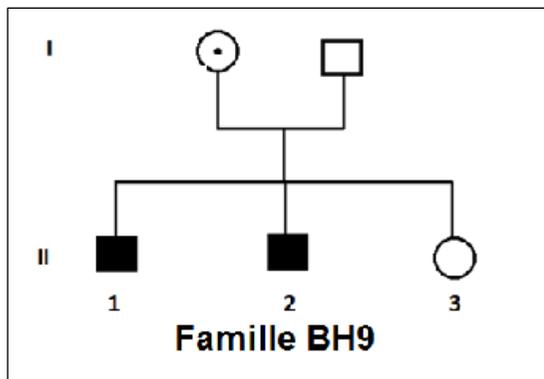
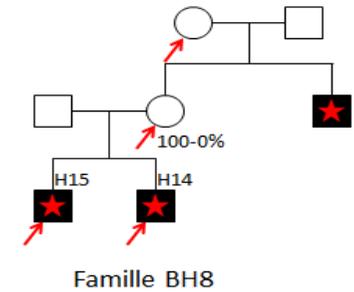
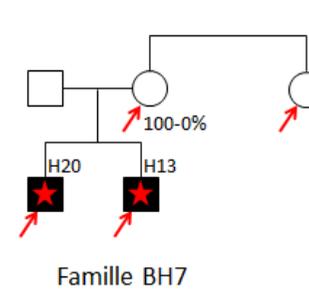
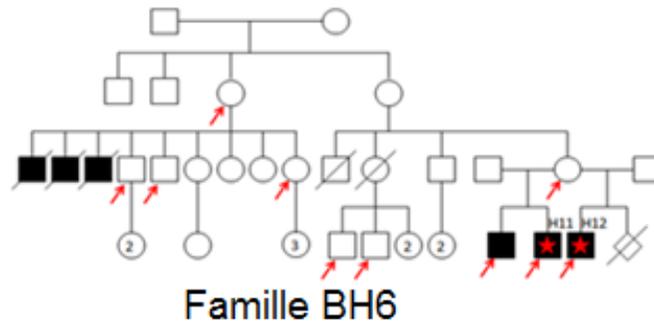
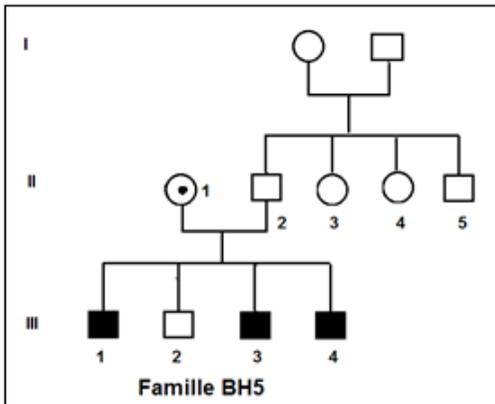
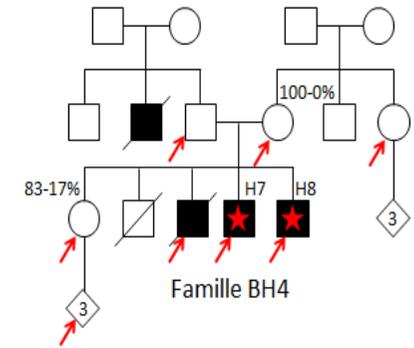
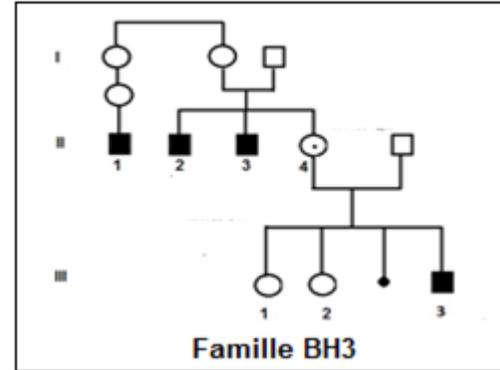
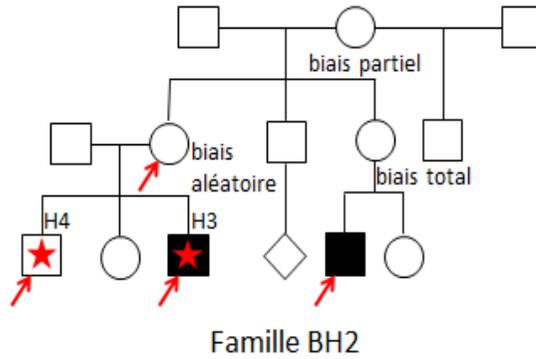
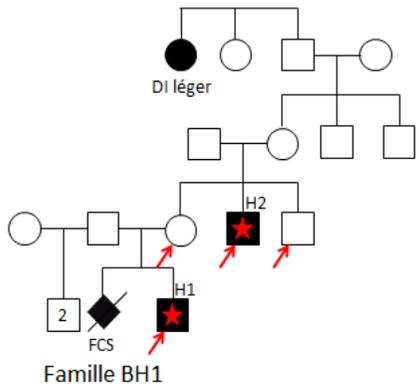
L'examen neurologique n'a rien révélé de particulier pour l'ensemble des patients des dix familles.

Les examens de spécialité, notamment l'examen ophtalmologique et cardiaque, ne sont demandés que si une anomalie liée à ces deux disciplines a été révélée, ou si la déficience intellectuelle fait penser à un syndrome qui implique obligatoirement des atteintes organiques spécifiques.

Tableau 5: Le tableau clinique des patients X-LID

Familles	BH1	BH2	BH3	BH4	BH5	BH6	BH7	BH8	BH9	BH10
Signes cliniques										
Déficience intellectuelle	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Quotient intellectuel	60	55	35	25	30	60	40	45	50	35
Troubles du comportement	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Stereotypie	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Retard d'acquisition	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Absence de langue	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+
Hypotonie	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
Macrocéphalie	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Microcéphalie	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Agénésie du corps calleux	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Convulsion	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Epilepsie	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Surdité	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Automutilation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grande taille	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Retard statural	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Poid	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
Hypertélorisme/télécanthus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Strabisme	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Blépharophimosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Malformation anales	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Constipation	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
Hypogonadisme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gynécomastie	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fentes palpebrale	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Voix Hypernasale	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Micrognathie/rétrognathie	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Visage long et étroit	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Visage triangulaire	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Grand front	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-
Long philtrum	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Efacement frontale de cheveux	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Hypoplasie maxillaire	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Racine du nez haut	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Bouche étroite	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Bouche ouverte	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Encombrement dentaire	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Oreilles mal plantées	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-
Absence de Plis palmaires	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Anomalie du squelette	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Syndactylie	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Polydactylie	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mince habitus	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Pied plat	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-

B. Les arbres généalogiques des dix familles



C. Examens Radiologiques

L'IRM est l'examen de première intention à demander devant une déficience intellectuelle. Tous les patients ont bénéficié de cette étude et les résultats sont détaillés dans le tableau 6.

Tableau 6: Resultats radiologique

Familles	BH1	BH2	BH3	BH4	BH5	BH6	BH7	BH8	BH9	BH10
Résultats IRM	Substance blanche légèrement altérée	IRM normal	gliose temporale avec anomalie de la substance blanche périventriculaire. Calcification diffuse au scanner	IRM normal	IRM normal	Atrophie cerebelleux				

L'IRM était normale dans 70 % des cas (7 familles sur 10) et dans 30 % des cas elle a révélé des anomalies qualifiées de légères par les radiologues.

D. Étude du biais d'inactivation du chromosome X

L'étude de l'inactivation du chromosome X au niveau du locus du récepteur des androgènes chez les mères des dix familles sélectionnées était aléatoire dans 80% des cas, comme l'indique le tableau 8 récapitulatif ci-dessous.

Tableau 7 : Profil de l'inactivation du chromosome X chez les dix familles

Famille	BH1	BH2	BH3	BH4	BH5	BH6	BH7	BH8	BH9	BH10
Biais d'inactivation de l'X	Partiel	Partiel	Partiel	Partiel	Partiel	Partiel	<u>Total</u>	Partiel	<u>Total</u>	Partiel

Seules les familles BH7 et BH9 présentent une inactivation totalement biaisée soit un pourcentage de 20% des mamans qui présentent un pattern d'inactivation complet.

E. Étude de la liaison génétique

L'étude de la liaison génétique a été effectuée avant mon arrivée au service. Les membres des 10 familles ont tous bénéficié de cet examen.

Le chromosome X était la cible, et les locus interrogés ont été choisis par rapport aux critères cliniques. Pour certaines familles, nous avons pu localiser des marqueurs du même allèle maternel, qui ségrégent en haplotype et qui ne sont hérités que par les sujets atteints. Les gènes (quelques exons) associés à ces marqueurs ont été séquencés par la méthode de Sanger : le résultat était négatif pour tous les exons étudiés (tableau 8)

Tableau 8 : Étude de la ségrégation des marqueurs chez les dix familles

Familles	Gènes étudiés	Ségrégation Compatibilité	Séquençage
BH1	JARID1C, NEUROLOGIN3, OPHN1	Non informatif	
BH2	KIAA1202, SLC6A8, PAK3	Non informatif	
BH3	Neurologine 4, STK9, ARX, IL1RAPL1, TM4SF2, ZNF674, ZNF41, FTSJ1, PQBP1, KIAA1202, JARID1C, OPHN1, DLG3, NEURÔLEGIN3, XNP(ATRX), ACLC4, PAK3, AGTR2, ARHGEF6, SLC6A8, GDI1	OPHN1 DLG3 NEUROLOGIN3	négatif
	Neurologine 4, STK9, ARX, IL1RAPL1, TM4SF2, ZNF41, , PQBP1, JARID1C, OPHN1, DLG3, NEURÔLEGIN3, XNP(ATRX), ACLC4, PAK3, AGTR2, ARHGEF6, SLC6A8, GDI1	ARX, RAPL1 TM4SF2, ZNF41, , PQBP1, , JARID1C	négatif
BH5	PQBP1 OPHN1, PAK3	PQBP1	négatif
BH6	Neurologine 4, STK9, ARX, IL1RAPL1, ZNF674, ZNF41, FTSJ1, PQBP1, JARID1C, TM4SF2 ? OPHN1, DLG3, NEURÔLEGIN3, ACLC4, PAK3, AGTR2, ARHGEF6, SLC6A8 ? ATRX	ZNF41, FTSJ1, PQBP1 JARID1C, DGL3, OPHN1, NEUROLOGINE3, ATRX	négatif
BH7	ARX, IL1RAPL1, PQBP1	Non informatif	
BH8	XNP, PAK3, AGTR2	Non informatif	
BH9	NLG3, NLGN4	NLGN4	négatif
BH10	OPHN1, DLG3, ACLC4, NEUROLOGIN3	Non informatif	

F. Analyse cytogénétique

les patients des dix familles qui ont été sélectionnées ont bénéficié d'une analyse cytogénétique constitutionnelle (caryotype standard) et aucune anomalie de nombre et ou de structure n'a été détectée. L'étude par cytogénétique moléculaire (FISH et CGH-array) n'a révélé aucune anomalie chez les sujets atteints.

G. Résultats du séquençage à haut débit

À l'issue du séquençage à haut débit des exomes, une moyenne de 300 variants tous types confondus (insertion, délétion, substitution et duplication) a été générée par patient. L'application des filtres in SILICO et le ciblage des variants non synonymes ont considérablement réduit le nombre de variants candidats.

Seuls des variants non-synonymes ou des variations affectant les sites d'épissage ont été analysés. Tous les variants de séquence ont été priorisés en marquant la conservation phylogénétique et l'impact fonctionnel (SIFT et Polyphen-2)

Les gènes candidats ont été validés par la méthode de Sanger, qui confirme la mutation et facilite l'étude de sa ségrégation par un simple séquençage du gène en question chez toutes les générations de la famille dont nous disposons de l'ADN.

Dans certains cas, les filtres de l'analyse in SILICO retiennent des variants chez les sujets atteints, alors que pendant l'étude de la validation de ces mutations, nous constatons qu'elles sont présentes aussi chez les sujets non atteints. Dans ce cas, nous considérons que le résultat est non informatif

Au total, au sein des dix familles nous avons retenu 21 gènes candidats présentant des variants non synonymes et non présents chez les sujets normaux.

Dans le tableau 9 ci-dessous, nous détaillons la nature du variant, le gène correspondant, la localisation du variant sur le chromosome X, sa localisation au niveau du cDNA et son impact sur le produit de la traduction (protéine).

Nous présentons aussi le résultat de l'étude de la ségrégation des variants chez tous les membres des familles (tableau 9)

La prédiction des conséquences de ces variants sur l'état fonctionnel des gènes a été étudiée par différents programmes bio-informatiques de prédiction, notamment Polyphen-2, SIFT, et Splice Mutation Finder.

Tableau 9 : Les gènes mutés retenus par séquençage à haut débit

FAMILLE	GENE (candidat)	MUTATION (position) Chromosome- cDNA- Protéine	Exon	CONFIRMATION (Sanger)	SEGREGATION
BH1	Non informatif	Non informatif			
BH2	<i>LONRF3</i>	118123399 - c.1088G>A - S363N	4	+	Non compatible
	<i>MAGEB16</i>	358220737 - c.424A>T - I 142F	2	+	Non compatible
BH3	<i>MAGEB3</i>	30254849 - c.808C>T - R270C	5	+	Non Compatible
	<i>DGAT2L6</i>	69419698 - c.233T>A - L78Q	3	+	Compatible
	<i>ATRX</i>	76778839 - c.6855T>G - H2247P	31	+	compatible
	<i>MAP7D3</i>	135310846 - c.1823G>A - R608C	9	+	compatible
BH4	Non informatives	Non informatives			
BH5	<i>MED12</i>	70357671- c.5922G>T - Q1974H	41	+	Compatible
	<i>OGT</i>	70775834 - c.925G>A - A309T	8	+	compatible
	<i>SSR4</i>	153062002 - c.181G>A -V61I	2	+	compatible
BH6	<i>ATP7A</i>	77269100 - c.3670G>A	19	+	Compatible
	<i>USP9X</i>	40982720 - 158-4G>T	Intron1	+	Non compatible
	<i>USP26</i>	132160736 - c.1513G>T - V1505F	Exon unique	+	Non compatible
BH7	Non informatif	Non informatif			
BH8	<i>AMOT</i>	1120222297 – c.(3082-3084)dup-(p.P1028)dup	12	+	Compatible confirmée, mère homozygote
	<i>DMD</i>	32482764 - c.3191A>G - K1064R	26	+	Ségrégation non compatible (oncle)
	<i>KIAA2022</i>	73964209 – c.186delC	3	+	Ségrégation compatible
	<i>PLP2</i>	49029769 - c.284A>G - Y95C	3	+	Ségrégation non compatible (oncle)
BH9	<i>NLGN4X</i>	g.1202C>A	Site d'épissage	+	Compatible
	<i>PDHA1</i>	c.(1572_1573) insCAT	Insertion UTR3'	+	Compatible
BH10	<i>PQBP1</i>	48755821 - c.29G>C - R10P	2b	+	Variant compatible
	<i>TLR8</i>	12937890 - c.731G>A - G244Q	2	+	Variant compatible
	<i>SPANXN4</i>	142121813 – c.86-88del/K29del	2	+	Variant compatible

Les nouveaux variants que nous avons validés comptent 18 mutations de substitution (dont 16 exoniques, une au niveau d'un site d'épissage, et une intronique), une duplication au niveau d'une région codante, deux délétions et une mutation d'insertion.

1. Étude des variants de la famille BH3 (Article-1)

Cette étude a fait l'objet d'une publication d'un article dont je suis le premier auteur. Accepté par Indian Journal of Medical research (annexe-IJMR-170-14).

Novel missense mutation (p.His2247Pro) within ATRX gene segregates with intellectual disability without alpha thalassemia in three related males confirms the extended phenotypic spectrum of ATRX syndrome

*Habib Bouazzi¹, * Seema Thakur², Carlos Trujillo³, Mohammad Khalid Alwasiyah⁴ and Arnold Munnich⁵*

Il s'agit d'une famille de deux filles et un jeune garçon âgé de 3 ans et demi (figure 15) présentant une hypotonie axiale importante sans syndrome pyramidal ni déficit neurologique. Il manifeste un enfoncement de l'étage moyen de la face avec un grand front, des narines antéversées, un léger prognathisme, des troubles du comportement avec en particulier des stéréotypies, une grande hypotonie axiale, des mensurations tout à fait conservées avec une tendance au surpoids, et une hyperventilation.

Le garçon II-4 présente un important retard d'acquisition avec absence complète de langage. La radiologie montre un élargissement du polygone de sustentation sans syndrome cérébelleux. Les réflexes ostéotendineux sont présents et symétriques.

Dans l'anamnèse familiale, on note que deux frères de la mère, I-1 et I-2, sont atteints de déficience intellectuelle (figure 15).

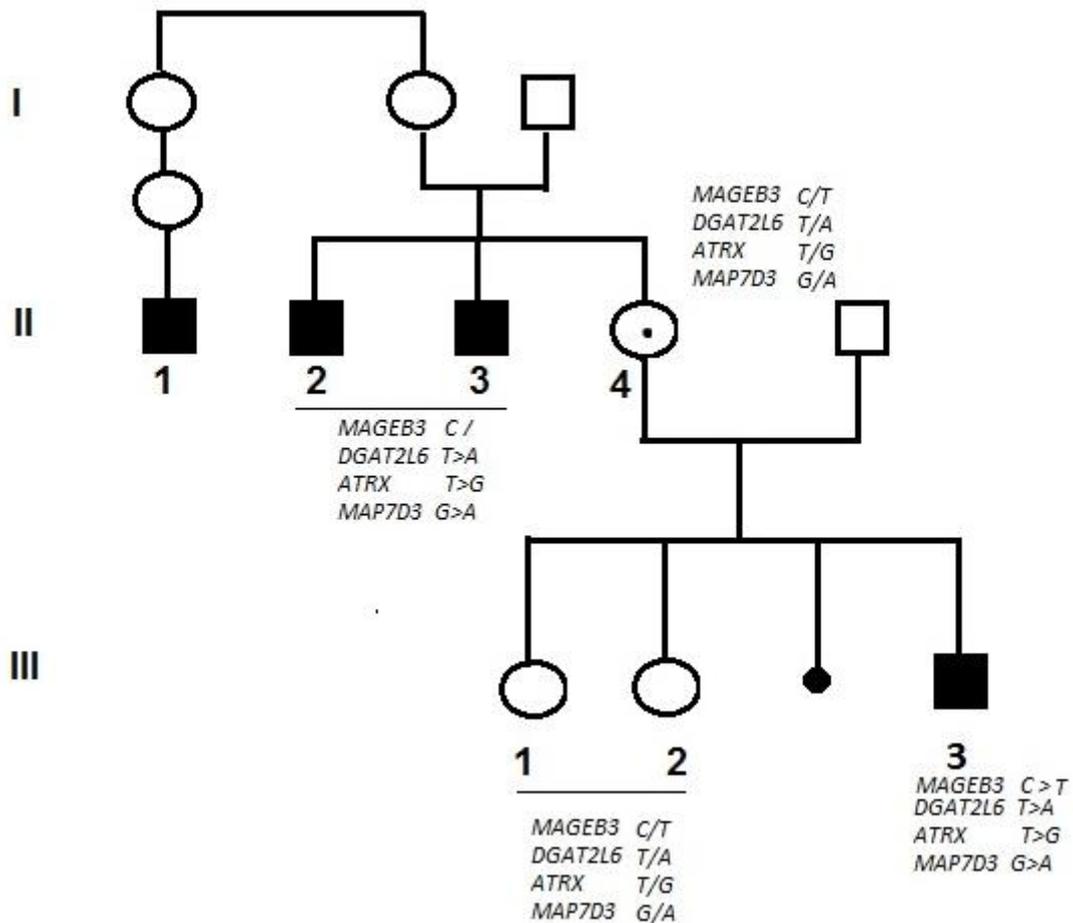


Figure 15 : ségrégation des mutations dans la famille BH3

a. Le variant du gène *MAGEB3*

Ce variant se situe au niveau du 5^{ème} exon du gène *MAGEB3* du locus Xp21.3, il correspond au 808^{ème} nucléotide du cDNA (NM_002365). Cette mutation n'est pas encore décrite dans les bases de données. Nous l'avons validée par la technique de Sanger. Elle résulte en un remplacement de l'acide aminé Arginine (R), qui est basique et chargé en positif 270, par la cystéine (C), qui est un acide aminé neutre (R270C). Cette mutation c. 808C>T, présente en hétérozygote chez la maman, est héritée par le fils atteint : toutefois, elle est absente chez les deux frères de la maman qui sont néanmoins déficients intellectuels.

Ce gène, appartenant à la famille B des antigènes des mélanomes (Chung *et al.*, 2010), s'exprime principalement dans les testicules, et sa fonction n'a pas encore été élucidée. Dans la littérature, nous n'avons pas trouvé d'indication sur sa causalité dans la déficience intellectuelle.

b. Le variant du gène *DGAT2L6*

Le variant c.233T>A (NM_198512) du gène *DGAT2L6* (Diacylglycerol O-acyltransferase 2-like protein 6) se traduit par une mutation faux sens avec remplacement d'un acide aminé hydrophobe en position 78 (la leucine) par un acide aminé chargé à fonction basique (la glutamine), L78Q. Cette mutation présente chez la maman en hétérozygote, n'a pas été décrite dans les bases de données et elle ségrège avec le phénotype pathologique de tous les sujets atteints.

Le gène *DGAT2L6* n'est pas connu pour son implication dans la déficience intellectuelle. Son produit intervient essentiellement dans la catalyse du transfert d'un groupement acyl d'un donneur à un accepteur dans le processus du métabolisme lipidique (Holmes, 2010).

c. Le variant du gène *MAP7D3*.

Le gène *MAP7D3*: MAP7 domain-containing protein 3 appartient à la famille des *MAP7* (Mitogen activating protein7). Le variant c.1823G>A (NM_001173516) induit une mutation faux sens (R608C) non décrite dans la littérature. La mutation portée par la maman non symptomatique ségrège avec le phénotype anormal. Ce gène ne compte pas parmi les gènes X-LID découverts jusqu'à présent, il code pour une protéine associée aux microtubules, et son rôle, c'est de promouvoir la stabilité et l'assemblage microtubulaire (Yadav *et al.*, 2014).

d. Le variant du gène *ATRX*

Cette mutation faux sens a fait l'objet d'un article dont je suis le premier auteur, acceptée le 16 Janvier 2015 par le Indian Journal of Medical research sous la référence IJMR_170_14 (Annexes).

Le nouveau variant c.6740T>G (NM_138270) du gène *ATRX* n'est pas décrit dans les bases de données. Nous l'avons identifié dans l'exon 31. Il s'agit d'une mutation faux sens (H2247P) adjacente à celle identifiée par Seema Thakur (p.Leu2240Phe) dans une famille où

ségrége une déficience intellectuelle liée à l’X (Thakur *et al.*, 2011) et dont les phénotypes des sujets atteints sont comparables à ceux exprimés par les patients de notre famille BH3

e. Conclusion préliminaire

L’étude de la ségrégation des variants par la méthode classique de séquençage de Sanger montre que notre cas index a hérité de sa mère hétérozygote quatre gènes mutés (*MAGEB3*, *MAP7D3*, *DGAT2L6* et *ATRX*). Ces mutations sont toutes nouvellement identifiées et sont présentes chez tous les sujets atteints de cette famille, sauf pour le gène *MAGEB3*, qui a été trouvé non altéré chez les oncles du côté maternel malgré leur syndrome qui exprime le même phénotype que le patient III-3 (figure 15). Parmi ces quatre gènes, l’*ATRX* est le gène le plus connu pour son implication dans la DI. Quant aux autres gènes, nous n’avons pas une connaissance parfaite de leur rôle biologique dans le développement mental, notamment les gènes *MAP7D3* et *DGAT2L6*.

2. Etude des variants de la famille BH5 (Article-2/Article-3)

Cette étude a fait l’objet de deux publications dont je suis le premier auteur. Un article a été publié par le journal (Clinical case Reports) en mai 2015, et le second, il a été accepté par Biomedical Journals en novembre 2015 (annexe-Ref : 15-1932)

- Non-syndromic X-linked intellectual deficiency in three brothers with a novel ***MED12*** missense mutation [c.5922G>T (p.Glu1974His)].(Annexes)

Habib Bouazzi¹, Gaetan Lesca², Carlos Trujillo³, Mohammad Khalid Alwasiyah⁴ and Arnold Munnich⁵
DOI: 10.1002/ccr3.301

- Characterization of clinical and neuro-cognitive features in a family with a novel OGT gene missense mutation c.955G>A/ (p.Ala319Thr) (Annexes)

Habib.Bouazzi¹, Soufiane Bouaziz², Mohammad Khalid Alwasiyah³, Carlos Trujillo⁴, and Arnold Munnich⁵

La famille BH5 est composée d’une fratrie de quatre enfants dont trois sont atteints (figure 16) . La mère présente un biais d’inactivation du chromosome X aléatoire (tableau 7) et elle est symptomatique avec un retard de langage. Les enfants atteints présentent un tableau clinique comparable, comprenant une déficience intellectuelle, un retard de langage, un trouble du comportement, un retard d’acquisition et une légère dysmorphie faciale.

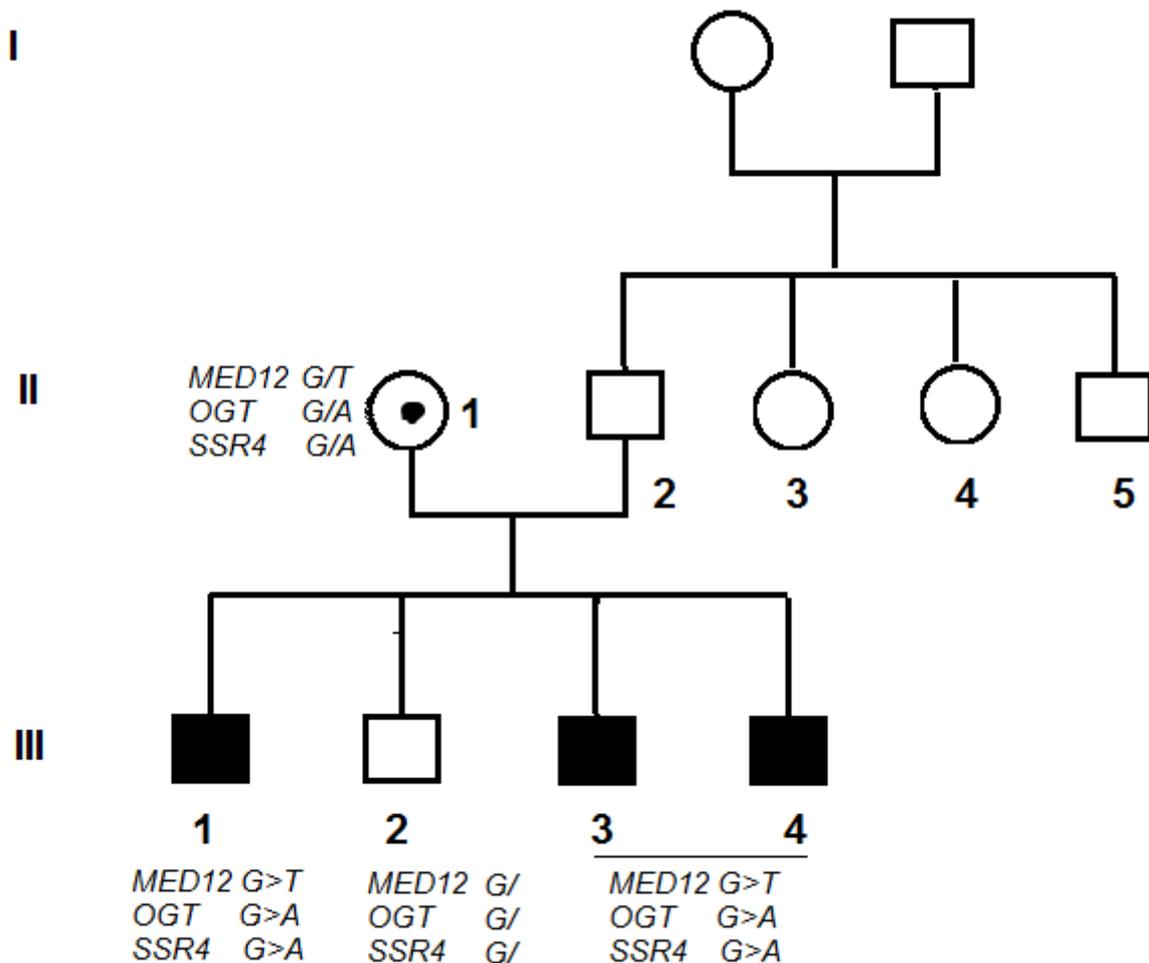


Figure 16: Ségrégation des mutations de la famille BH5

La maman a été identifiée hétérozygote pour les trois mutations des trois gènes (*MED12*, *OGT*, et *SSR4*). Tous les enfants atteints ont hérité les allèles mutés des trois gènes ; quant à l'enfant non atteint, il n'a hérité aucune de ces trois mutations.

a. Le variant du gène *MED12*

Il s'agit d'une mutation au niveau de l'exon 41 du gène *MED12* (c.5922G>T). C'est une mutation faux sens (p.Q1974H), non décrite dans la littérature (figure 16), présente chez la mère en hétérozygote et héritée par tous les sujets atteints. Le gène *MED12* a été décrit comme impliqué dans la déficience intellectuelle liée à l'X (Graham *et al.*, 2008; Tarpey *et al.*, 2009). Il code pour la sous unité 12 qui fait partie d'un complexe de protéines engagées dans la régulation de la majorité des gènes ARN polymérase II-dépendants (Bouazzi *et al.*,

2015). Le tableau clinique des patients de cette famille est comparable à celui rapporté par Lesca dans son étude d'une famille de dix sujets atteints de DI non syndromique. Ces sujets présentent une mutation de changement de cadre de lecture avec un codon stop (p.Ser1967Glnfsx84) du gène *MED12* (Lesca *et al.*, 2013). Cette mutation a été localisée au niveau du même exon 41, là où nous, nous avons identifié la mutation faux sens p.Glu1974His (figure 17).

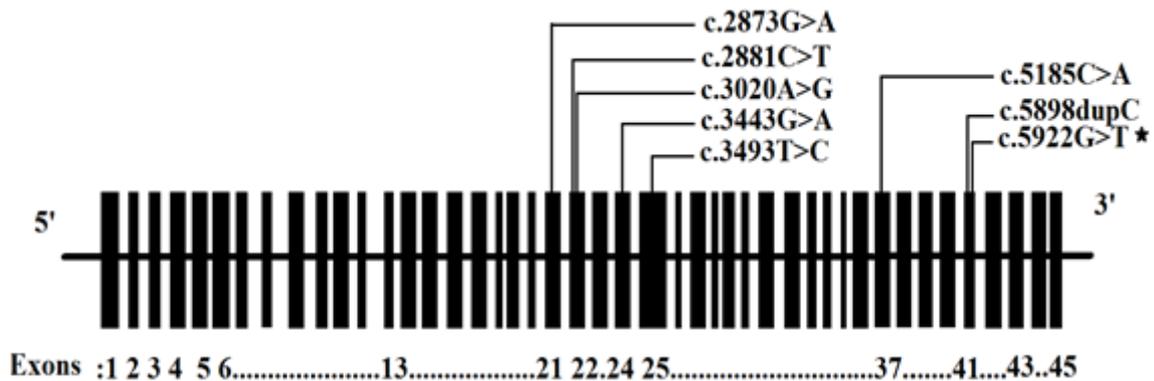


Figure 17: les mutations à effet X-LID au niveau du gène *MED12* . * Source : Bouazzi *et al* 2015

b. Le variant du gène *OGT*

Le variant (c.1193G>A) induit une mutation faux-sens p.A319T. Cette mutation, comme celle du gène *MED12*, a été transmise par la maman conductrice à tous les enfants atteints. L'enfant sain a été épargné.

Le gène *OGT* est connu pour son implication dans le diabète (Dong *et al.*, 2011; Kötzler and Withers, 2015). Sa causalité dans le développement de la DI n'a été démontrée que récemment, mais il fait désormais partie de l'ensemble des gènes X-LID (tableau 2)

c. Le variant du gène *SSR4*

Le variant de ce gène (c.181G>A) ségrège avec le phénotype pathologique des patients de la famille BH5. IL n'a pas été décrit auparavant. C'est une nouvelle mutation faux-sens (V61I). Le gène *SSR4* a été identifié en mars 2014 comme le 115^{ème} gène X-LID du fait qu'il a été trouvé muté chez un garçon présentant un déficit de glycosylation et une déficience intellectuelle (Losfeld *et al.*, 2014; Yadav *et al.*, 2014).

d. Conclusion préliminaire

Le séquençage à haut débit de l'exome du chromosome X des sujets atteints de la famille BH5 a révélé que tous ont hérité de trois mutations nouvelles touchant respectivement trois gènes différents (*MED12*, *OGT*, et *SSR4*). Ces gènes sont adjacents. Ils sont transmis sous une forme de déséquilibre de liaison et sont tous connus pour leur implication dans la DI, néanmoins le phénotype des patients de cette famille nous a orienté vers la causalité du gène *MED12* sans exclure l'effet de l'hétérogénéité génétique (Bouazzi et al., 2015).

3. Etude de la famille BH9 (Article-4)

Cette étude a fait l'objet d'une publication d'un article dans le journal : Journal of Case Reports and Studies dont je suis premier auteur (Annexes)

Non-syndromic X linked Intellectual disability in two brothers with a novel NLGN4X gene splicing mutation (NC_018934.2: g.1202C>A) (Journal of Case reports and studies) 2015

Bouazzi H^{*1}, Bouaziz S², Alwasiyah MK³, Trujillo C⁴ and Munnich A¹

BH9 est une famille ayant une fratrie de trois enfants (figure 18), dont deux sont atteints et un bien portant. Les parents ne sont pas apparentés et sans antécédents particuliers. Les enfants malades présentent des difficultés d'apprentissage associées à des hallucinations visuelles sans étiologie identifiée. Les premières difficultés sont apparues lors de la scolarisation, pendant laquelle ils n'ont acquis ni la lecture ni l'écriture et montré de grandes difficultés de mémorisation (ils ne connaissent pas leur date de naissance ni leur nom de famille, ne peuvent pas se situer dans la semaine). Toutefois, ils ne présentent pas de trouble du sommeil, ni de l'alimentation, ni du comportement ni décalage de langage. L'enfant II-1 (figure 19), il est facilement angoissé, surtout dans des situations d'échec. Il n'a pas de réelle difficulté motrice, mais on décèle des difficultés dans la motricité fine. Après séquençage de l'exome et épreuve de validation, nous avons retenu deux variants : g.1202C>A (IVS3+8C>A) et c.(1572_1573)insCAT, qui correspondent respectivement aux gènes *NLGN4X* et *PDHA*.

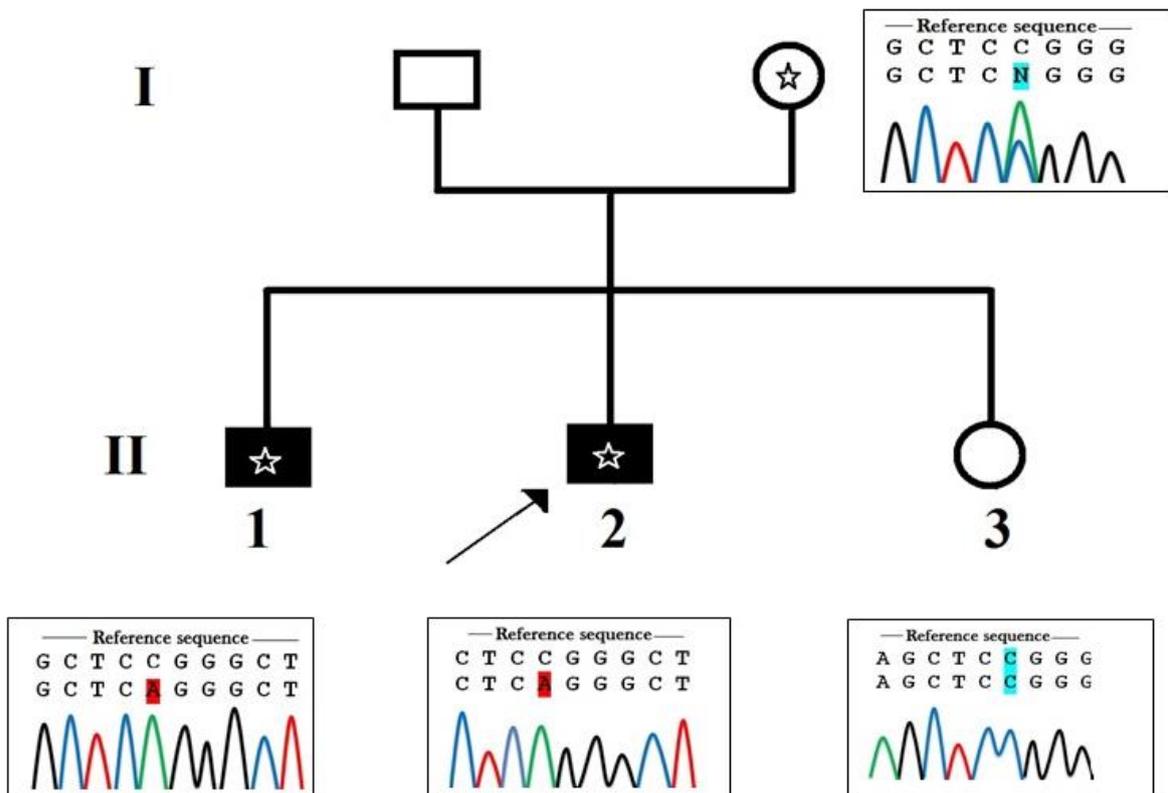


Figure 18 : Arbre généalogique de la famille BH9 et ségrégation de la mutation NLGN4X

a. Le variant du gène *NLGN4X*

C'est une mutation confirmée, que nous avons identifiée dans un site d'épissage dans la région 3' du gène entre les deux exons : exon 2 et exon3 (figure 20). Dans l'état de régulation normale de la transcription, ces deux exons doivent être épissés alternativement afin de ne pas participer au produit final du gène.

Cette mutation (g.1202C>A) est nouvellement identifiée au niveau d'un site d'épissage du gène *NLGN4X*. La mère, qui a un biais d'inactivation complet du chromosome X, est hétérozygote, les deux frères atteints présentent la mutation. Quant à la sœur, II-3, nous avons pu lui confirmer l'absence de cette mutation dans son gène.

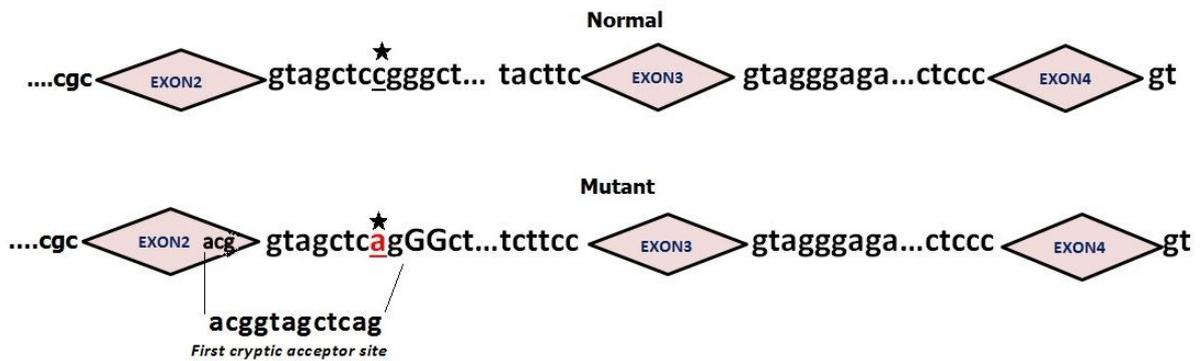


Figure 19: mutation à prédiction pathogénique au niveau d'un site d'épissage (NLGN4X)

Source : Bouazzi *et al* 2015.

b. Le variant du gène PDHA1

C'est une mutation d'insertion d'un triplé CAT dans la région UTR3' : c.(1572_1573)insCAT (GenBank accession number NM_001173454). C'est un variant qui a été déjà rapporté dans la littérature et qui n'a pas été décrit comme pathogène. La mère est hétérozygote et les enfants y compris la sœur ont tous trois hérité de l'haplotype altéré.

c. Conclusion préliminaire

Les deux mutations portées par les sujets atteints de la fratrie de la famille BH9 sont extra exoniques. Toutefois, leur localisation n'exclut pas le pouvoir pathogène qu'elles pourraient induire, au moins pour celle qui a été identifiée au niveau du gène NLGN4. Cette mutation (IVS3+8C>A) a affecté un site d'épissage qui pourrait altérer le processus du splicing et par conséquent elle favorise un phénotype pathologique. La mutation d'insertion du gène PDHA1 a été considérée comme non pathogène.

4. Prédiction fonctionnelle des nouvelles mutations

Les mutations candidates validées par la technique de Sanger, sont toutes mises sous études bio-informatique par des programmes de prédiction fonctionnelle et pathologique (tableau 10). Ainsi, les résultats de ces programmes de prédictions, nous ont aidé à établir des stratégies pour poursuivre l'étude des variants. En effet, une mutation qualifiée altérante et endommageante serait prioritaire, du point de vue étude sur une mutation de prédiction bénigne.

Tableau 10: prédiction fonctionnelle des mutations

Proteine	Mutation	Prédiction Polyphen	Score	Spécificité
DGAT2L6	L78Q	Damaging	0.971	0.96
ATRX	H2247P	Damaging	0.9	0.94
MAP7D3	R608C	Damaging	1	1
MED12	Q1974H	Damaging	1	1
OGT	A319T	Damaging	1	1
SSR4	V61I	Binign	0.01	0.77
ATP7A	E1235F	Damaging	1	1
PQBP1	R10P	Damaging	1	1
TLR8	G244Q	Damaging	1	1
AMOT	p.P(1028)dup	Damaging	0.9	0.8
KIAA2022	c.183delCp.Arg62GlufsTer22		Loss of function (lionel Van Maldergem et al)	
NLGN4X	g. 1202C>A /Splicing		<i>predicted to change the splicing process</i>	
PDHA1	c.(1572_1573) insCAT	UTR3'	Non damaging	
SPANXN4	K29del	Damaging	0.9	0.82

V- DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

A. L'apport du séquençage de l'exome du chromosome X dans le diagnostic et le dénombrement de nouveaux gènes de la déficience intellectuelle

Dans notre étude des dix familles X-LID, le séquençage du chromosome X par ciblage de son exome a apporté une moyenne de 300 variants par exome et par patient, d'où l'utilité d'appliquer la stratégie des filtres pour réduire ce nombre et ne retenir que les variants non synonymes non encore connus dans les bases de données.

A l'issue du séquençage à haut débit, 21 gènes ont été retenus comme candidats pour l'étude étiologique de la déficience intellectuelle non spécifique (tableau 9).

Deux familles parmi la cohorte ont présenté de nouvelles mutations qui ne sont pas partagées par les sujets apparentés et atteints. En effet, nous avons identifié des mutations différentes au sein des sujets de la même fratrie. Ces familles ne sont pas informatives et leur étude a été interrompue. Ce qui a réduit le nombre des gènes candidats à 19 (tableau 11).

Dans le paquet de gènes candidats, certains ne sont pas connus pour leur implication dans la déficience intellectuelle et acquièrent donc un intérêt d'étude majeur, notamment dans la perspective de la découverte de nouveaux gènes du trouble cognitif. Toutefois, nous avons identifié plusieurs nouvelles mutations au sein de nombreux gènes qui sont connus pour leur effet causatif direct dans la déficience intellectuelle. Ces mutations pourraient construire le point de départ d'un diagnostic génétique de l'affection du patient.

Cependant, comme nous allons le voir plus loin dans cette discussion, malgré tous les outils techniques et les examens cliniques mis en œuvre pour élucider l'étiologie de cette pathologie, nous avons constaté que le nombre de gènes et de mutations nouvellement identifiées dans ce projet de thèse, a apporté plus de questions que de réponses, et établir

un diagnostic définitif reste une tâche délicate. Toutefois, avec l'approche NGS, nous avons pu apporter un diagnostic génétique pour au moins quatre familles (BH3, BH4, BH5 et BH9) qui ont du attendre plus de deux décennies pour enfin obtenir un diagnostic.

Tableau 11: Les gènes candidats et leur implication dans la DI

GENE	IMPLICATION DANS LA DI	MUTATION	NOUVEAUTE
<i>MAGEB3</i>	Non connue	Substitution c.808C>T	Nouvelle
<i>DGAT2L5</i>	Non connue	Substitution c.233T>A	Nouvelle
<i>ATRX</i>	Connue	Substitution c.6855T>G	Nouvelle
<i>MAP7D3</i>	Non connue	Substitution c.1823G>A	Nouvelle
<i>MED12</i>	Connue	Substitution c.5922G>T	Nouvelle
<i>OGT</i>	Non connue	Substitution c.955G>A	Nouvelle
<i>SSR4</i>	Découverte récente	Substitution c.181G>A	Nouvelle
<i>NLGN4X</i>	Connue	Substitution Epissage	Nouvelle
<i>PDHA1</i>	Non connue	Insertion triplet CAT	Déjà décrite
<i>ATP7A</i>	Connue	Substitution c.3670G>A	Nouvelle
<i>USP9X</i>	Connue	Substitution 158-4G>T	Nouvelle
<i>USP26</i>	Non connue	Substitution c.151G>T	Nouvelle
<i>AMOT</i>	Non connue	3082-3084dup-(1028)dup	Nouvelle
<i>DMD</i>	Connue	Substitution c.3191A>G	Nouvelle
<i>KIAA2022</i>	Connue	Délétion 183del	Nouvelle
<i>PLP2</i>	Non connue	Substitution c.284A>G	Nouvelle
<i>PQBP1</i>	Connue	Substitution c.29G>C	Nouvelle
<i>TLR8</i>	Non connue	Substitution c.731G>A	Nouvelle
<i>SPANX4</i>	Non connue	Délétion 86-88del/K29del	Nouvelle

B. Le diagnostic génétique : Plus de deux décennies d'efforts.

Nos patients étaient suivis dans notre service depuis les années 2000, et le lien entre déficience intellectuelle et sexe du patient a été établi.

Les cliniciens se sont interrogé sur la possibilité d'étiqueter les syndromes présentés par les cas index, toutefois, le seul signe constant était la déficience intellectuelle. De fait, nous avons classé ces déficiences intellectuelles parmi les non syndromiques.

Dans ces conditions incertaines, nous avons mis en œuvre tous les moyens cliniques et techniques pour parvenir à établir un diagnostic, néanmoins les limites des moyens du

diagnostic, notamment la génétique et la cytogénétique, ont joué un rôle défavorable devant l'avancement des études.

Au fil des années, chaque fois qu'une nouvelle technique est validée pour la pratique diagnostique, nous l'appliquons dans nos études. Ainsi, avec le caryotype qui représentait l'examen classique à demander par le clinicien, nous avons appliqué toutes les techniques de la génétique et la cytogénétique notamment la FISH, le CGA-array, la cartographie par liaison génétique et le séquençage par l'approche de Sanger. Mais chaque fois on se heurte à des difficultés techniques nous empêchant d'apporter une réponse à nos patients. C'était un parcours difficile et laborieux pour les équipes médicales ainsi que pour les patients.

La mise au point d'outils moléculaires nouveaux dans le domaine de la génétique devrait permettre d'améliorer considérablement la détection des anomalies sous-jacentes de ces déficiences non syndromiques. Ainsi l'application de la technique innovante du séquençage à haut débit (NGS) dans ce projet de thèse a révélé et apporté ce que les techniques précédentes n'ont pas pu identifier et mettre en évidence.

1. Diagnostic par la stratégie d'exclusion génique

Le séquençage des exomes des familles BH1, BH4, et BH7 n'a pas apporté de variants informatifs. C'est la raison pour laquelle nous avons montré plus d'intérêt pour les autres familles.

a. La famille BH2

La maman et le fils atteint ont été inclus dans le programme de séquençage de l'exome du chromosome X. Pour cette famille, deux gènes ont été retenus comme candidats (le gène *LONRF3* et le gène *MAGEB16*). Toutefois, pendant l'étude de la ségrégation des mutations, nous avons constaté que le frère normal a hérité des mêmes mutations que celles qui ont été identifiées chez son frère malade. Par conséquent nous avons conclu que ces deux gènes ne peuvent pas être la cause du phénotype du sujet atteint.

b. La famille BH3

b.1) Les gènes candidats

Cette famille (figure 15) compte quatre sujets atteints pour lesquels quatre gènes candidats ont été retenus (*MAGEB3*, *DGAT2L6*, *ATRX*, *MAP7D3*).

L'étude de la ségrégation des mutations a révélé qu'un garçon atteint a hérité l'allèle normal du gène *MAGEB3*. Donc la mutation de ce gène ne peut pas être la cause de la déficience intellectuelle des patients de la famille BH3.

Les trois mutations des trois gènes (*ATRX*, *DGAT2L6*, *MAP7D3*) dont la maman BH3 (II-4) est hétérozygote, ont été confirmées chez tous les sujets atteints. Toutefois, les deux gènes *DGAT2L6* et *MAP7D3* ne sont pas connus pour leur implication dans la déficience intellectuelle. C'est pour cette raison que nous avons porté plus d'intérêt pour la mutation du gène *ATRX* qui est par ailleurs le gène le plus connu pour son rôle X-LID.

b.2) Mutation du gène ATRX : corrélation génotype/phénotype

Dans la famille BH3 (figure 15), la mère est hétérozygote et conductrice de la mutation c.6740A>C (p.H2247P) du gène *ATRX*. Son profil d'inactivation du chromosome X est aléatoire. Cette mutation a été transmise à l'enfant BH3 (III-3) et a été identifiée chez ses deux frères atteints. Le gène *ATRX* est le plus connu pour son implication dans la DI (Badens *et al.*, 2006; Guillén-Navarro and Glóver-López, 2006). Le produit de ce gène est impliqué dans la régulation de la transcription et le remodelage de la chromatine. Il est requis pour la réplication de l'ADN. La protéine se lie à des séquences répétées de l'ADN tandem dans les télomères et l'euchromatine et stabilise la liaison entre la chromatine et les nucléosomes (Ratnakumar *et al.*, 2012)

La localisation de la mutation faux sens que nous avons identifiée au niveau du gène *ATRX* fait appel à une étude ultérieure qui a été menée par une équipe indienne sur une famille ayant deux garçons X-LID. Cette équipe a démontré que le phénotype des patients a été causé par une mutation faux sens du gène *ATRX* (Thakur *et al.*, 2011). Cette mutation c.6718C>T (p.Leu2240F) a été localisée dans l'exon 31, qui intervient dans la fonction hélicase de la protéine. Il s'agit du même exon qui a été muté chez les patients de la famille BH3 de ce projet de thèse. Le tableau clinique des patients de l'étude de (Thakur *et al.*) est comparable à celui des patients de la famille BH3 (tableau 12)

Tableau 12: tableau comparatif de la phénotype des patients ayant le gène ATRX muté

	Thakur et al study 2011	Our study
	Mutations	
	c.6718C>T p.Leu2240Phe	c.6740A>C p.His2247Pro
	Exons	
	31	31
Intellectual deficiency	+	+
Behavioral disorders	+	+
Alpha thalassaemia	+	-
No language	+	+
Hypotonia	+	+
Hepatosplenomegaly	+	-
Brisk reflexes	+	+
Small stature	Not cited	+
X skewed inactivation	+	-
Affected females	-	-
<i>gastroesophageal reflux</i>	Not cited	+
Cryptorchidism	+	-
Hypertelorism/telecanthus	+	+
Microcephaly	+	-
Camptodactyly	+	-
Polydactyly	-	-
Micrognathia/retrognathia	-	-
Prognathism	+	+
Long narrow face	-	-
Triangular face	-	-
Tall prominent forehead	+	+
Facial coarsening	-	-
frontal hair upsweep	-	-
Thick alae nasi	-	-
High nasal root	+	+
High narrow palate	+	-
Dental crowding	+	-
Maxillary hypoplasia	+	+
Open mouth	+	+
Small ears	-	-
Horizontal palmar creases	-	-
Syndactyly	-	-
Polydactyly	-	-

Les patients ont en commun un déficit intellectuel, un retard du développement, un trouble de comportement et une dysmorphie faciale caractérisée par un enfoncement de l'étage moyen, un grand front, des narines antéversées et un prognathisme avec bavage continu.

Avec toutes ces données ainsi qu'avec la prédiction du programme Polyphen-2 qui qualifie la mutation de hautement pathogène (tableau 10), nous avons pensé à l'implication directe de cette mutation dans les caractéristiques cliniques des patients de cette famille, et dès lors nous avons opté pour une possibilité de corrélation phénotype/ génotype (Bouazzi *et al* 2015)

c. La famille BH5

Chez la famille BH5 (figure 16), tous les sujets atteints ont hérité de leur maman hétérozygote trois mutations faux sens (Q1974H, A319T et V61I) qui sont localisées respectivement au niveau des gènes *MED12*, *OGT* et *SSR4*. Le gène *MED12* est connu pour son implication directe dans la DI (Bouazzi *et al.*, 2015), toutefois *OGT* et *SRR* n'ont été caractérisés parmi les gènes X-LID qu'en 2014, bien que nous fussions les premiers à les avoir signalés en 2013 dans un manuscrit qui n'a pas été accepté pour publication et que nous l'avons déposé au centre des données scientifiques (Dryad).

Le gène *SSR4*, il code pour un signal de séquence de la protéine récepteur appelée unité delta de la protéine associée à la translocation (TRAP delta). Cette dernière appartient à un complexe impliqué dans la translocation des protéines à travers la membrane du réticulum endoplasmique (Hartmann *et al.*, 1993; Wang and Dobberstein, 1999). La protéine a un rôle dans la N-glycosylation, et sa mutation cause une DI associée à des crises épileptiques (Losfeld *et al.*, 2014). Dans notre étude, ni les signes cliniques des patients ni la prédiction fonctionnelle n'ont été en faveur de la sélection de ce gène comme cause de la pathologie de la famille BH5 (tableaux 5 et 10). Toutefois, nous n'avons pas d'arguments suffisants pour l'exclure.

Le gène *MED12*, il code pour la sous-unité transcriptionnelle 12, qui fait partie d'un complexe de protéines impliquées dans la régulation de la majorité des gènes ARN polymérase II dépendants (Shin *et al.*, 2008; Tutter *et al.*, 2009). Classiquement, les mutations du *MED12* sont impliquées dans des anomalies du développement ainsi que dans le cancer (Ding *et al.*, 2008; McGuire *et al.*, 2012) ; néanmoins, jusqu'à l'achèvement de ce manuscrit, seulement sept mutations pathogènes causant la DI ont été identifiées, et la notre fut la huitième (Bouazzi *et al.*, 2015).

Les patients dont ce gène est muté présentent un tableau clinique qui peut varier selon la mutation (Graham and Schwartz, 2013; Isidor et al., 2014; Lesca *et al.*, 2013).

Toutefois, malgré la variabilité clinique, les patients partagent un « tronc commun » de signes, dont la DI, le trouble du comportement et la dysmorphie. Ce « tronc commun » de signes cliniques est retrouvé dans la famille BH5. Cependant ni la dysgénésie du corps calleux, qui est un critère important dans le LS/FGS, ni les malformations congénitales, telle l'imperforation de l'anus communément définie dans le FGS, n'ont été retrouvées dans la famille BH5. Néanmoins, le patient (III-3) de la famille BH5 (figure 16), souffrait de constipation chronique. Ce signe a été signalé dans les syndromes de FG (OMIM 305450) et OSMBK (OMIM 249620) ainsi que chez la cohorte de patients qui a été étudiée par l'équipe de Lesca à l'Hopital de Lyon. Cette équipe a rapporté une mutation (c.5898dupC, p.Ser1967Glnfsx84) causative de DI (Lesca *et al.*, 2013). Cette mutation a été localisée dans le même exon du même gène (*MED12*) que nous portons candidat pour expliquer le phénotype pathologique des patients de la famille BH5. De surcroit, le phénotype rapporté par Lesca (tableau 13) se superpose avec le phénotype de nos patients.

La prédiction fonctionnelle de la mutation que nous avons identifiée a été qualifiée de hautement pathologique par le programme Polyphen-2 (score 1, spécificité 1).

En considérant toutes ces données, nous avons pensé que le phénotype des sujets atteints de la famille BH5 pourrait être expliqué par la mutation qui ségrège avec la déficience intellectuelle

Tableau 13: les caractéristiques des différents syndromes de DI causées par l'altération du gène MED12

Major clinical features	FG syndrome	Lujan syndrome	OSMKB	Lesca et al (2013)	Present study
	Mutations				
	p.Gly958Glu p.Arg961Trp	p.Asn1007Ser	p.Arg1148His p.Ser1165Pro p.his1729Asn	Non syndromic p.Ser1967Glnfsx84	p.Gln1974His ^(*)
	Exons				
	21, 22	22	24, 25, 37	41	41
Intellectual disability	+	+	+	+	+
Behavioral disorders	+	+	+	+	+
No language	-	-	+	+	+
Hypernasal voice	-	+	-	-	-
Hypotonia	+	+	+	-	-
Macrocephaly	+	+	-	-	-
Agenesis of corpus callosum	+	+	-	-	-
Tall stature	-	+	-	-	-
X skewed inactivation	-	-	-	-	-
Affected females	-	-	-	+	+
Anal anomalies	+	-	-	-	-
Constipation	+	-	+	-	-
Hypertelorism/telecanthus	-	-	-	-	-
Strabismus	+	+	+	-	-
Blepharophimosis	-	-	+	-	-
Downslanting palpebrae	+	+	+	-	-
Micrognathia/retrognathia	+	+	+	-	-
long narrow face	-	+	-	+	+
Triangular face	-	-	+	-	-
Tall prominent forehead	+	+	+	+	+
Facial coarsening	-	-	+	-	-
frontal hair upsweep	+	-	-	-	-
Thick alae nasi	-	-	+	-	-
High nasal root	-	+	-	+	+
High narrow palate	+	+	+	-	-
Dental crowding	+	+	-	-	-
Maxillary hypoplasia	+	+	-	+	+
Open mouth	+	+	+	+	+
Small ears	+	-	+	-	-
Horizontal palmar creases	+	-	-	-	-
Syndactyly	+	-	-	-	-
Polydactyly	-	-	-	-	-
Thin habitus	-	-	-	+	+

Source : (Bouazzi habib et al). Clinical case reports 2015

Le gène **OGT**, il code pour O-linked N-acétylglucosamine transférase. C'est le troisième gène retenu comme candidat chez la famille BH5, à cause de sa mutation faux sens (p.A309T) qui ségrège avec la DI. Il est connu pour son implication dans l'apoptose, le diabète et la maladie d'Alzheimer (Fiordaliso *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2009) et Il a été récemment ajouté aux gènes X-LID par l'association Greenwood (tableau 2). Toutefois, son implication dans la DI reste à démontrer car nous n'avons pas trouvé dans la littérature d'études qui confirment sa causalité et sommes les premiers à avoir supposé un possible

effet délétère sur le développement cognitif (Bouazzi *et al.*, 2015), sans pouvoir le confirmer par des études fonctionnelles *in vitro*.

d. La famille BH6

Trois gènes candidats ont été retenus pour cette famille (*ATP7A*, *USP9X* et *USP26*). Seuls les gènes *ATP7A* et *USP9X* sont connus comme gènes X-LID. Quant au gène *USP26*, il n'est pas connu pour son implication dans la DI, et nous avons pu l'exclure ainsi que le gène *USP9X* parce que leurs mutations respectives p.V1505F et IVS1-4G>T ne ségrégent pas avec le phénotype pathologique des patients. Seule la mutation faux sens du gène *ATP7A* (p.E1235F) elle ségrège avec le phénotype et elle pourrait être la cause de la DI de cette famille.

e. La famille BH8

Quatre gènes candidats ont été retenus (*AMOT*, *DMD*, *KIAA2022* et *PLP2*). Nous avons exclu *DMD* et *PLP2* du fait de leur ségrégation non compatible. Jusqu'à présent, aucune étude n'avait rapporté l'implication du gène *AMOT* dans la DI. En revanche, le gène *KIAA2022* dont la mutation tronquante c.186delC ségrège avec la DI, il est connu pour son rôle dans le développement neuronal et le fonctionnement du cerveau (Van Maldergem *et al.*, 2013). Ensemble, le phénotype identique des trois patients de cette famille, la mutation tronquante p.R62GlufsX22 qui a été transmise par la maman conductrice pour tous les enfants atteints et le rôle de ce gène, suggèrent que *KIAA2020* est causatif dans les membres atteints.

f. La famille BH9

Deux nouvelles mutations non codantes ont été identifiées pour cette famille. La première (NC_018934.2 : g1202C > A) a été localisée au niveau d'un site d'épissage du gène *NLGN4X*. En revanche la deuxième c. (1572-1573) insCAT a été identifiée au niveau de la région 3'UTR du gène *PDHA1*. Les deux mutations ségrégent avec les signes cliniques des patients ; toutefois, le variant du triplet CAT a déjà été décrit et considéré comme dénué d'effet pathogène (ENSEMBL-rs144356124). Quant à la mutation g.1202C > A du gène *NLGN4X*, sa prédiction par le programme Human Splicing Finder est en faveur d'un effacement du site d'épissage habituel et la création d'autres sites cryptiques. Ensemble, la

constatation de prédiction, la ségrégation de la mutation avec les signes cliniques pathologiques et l'implication du gène dans la déficience intellectuelle suggèrent que la cause du désordre cognitif des patients de la famille BH9 est la mutation g.1202 C > A du gène NLGN4X (Bouazzi *et al.*, 2015).

g. La famille BH10

Nous avons retenu trois gènes candidats pour cette famille (*PQBP1*, *TLR8* et *SPANXN4*), dont les mutations sont respectivement (p.R10P, pG244Q, et pK29del). Ces mutations sont nouvelles, elles ségrègent avec le phénotype pathologique et sont absentes chez les sujets sains. Le seul gène connu pour son implication dans la DI est *PQBP1* (OMIM309500). Quant au gène *TLR8*, il exerce un rôle sur le système immunitaire et n'est pas connu pour son implication dans la déficience intellectuelle. Le gène *SPANXN4*, pour sa part, il appartient à un cluster de gènes SPANX codant pour des antigènes spécifiques du cancer des testicules et n'a pas été étiqueté parmi les gènes X-LID. En tenant compte du tableau clinique des patients et de la ségrégation de la mutation prédite délétère du gène *PQBP1* nous avons suggéré que le syndrome des patients de la famille B10 pourrait être expliqué par la mutation du gène *PQBP1*.

2. L'hétérogénéité génétique

Une hétérogénéité intergénique correspond au fait que des mutations dans des gènes différents peuvent conduire à une même maladie. Dans ces conditions, deux individus atteints de la même maladie peuvent être affectés dans des gènes différents. De même ces gènes peuvent agir en synergie pour aboutir à la même pathologie. Dans ce mécanisme, la maladie peut être polyallélique, comme elle peut résulter de différentes mutations altérant un même gène, comme dans le cas de l'Hétérozygotie composite.

Comme nous l'avons signalé dans la section « Résultat » de ce manuscrit de thèse, tous les enfants atteints ont hérité du côté maternel plus d'un gène muté. Souvent, la plupart des gènes mutés dans une famille donnée sont connus pour leur implication dans la DI. C'est notamment pour la famille BH5, ayant une fratrie de quatre enfants dont trois

déficients intellectuels chez qui nous avons identifié trois mutations non-alléliques touchant trois gènes différents (*MED12*, *SSR4*, et *OGT*). Ces gènes sont tous connus pour leur implication dans la DI, et malgré notre diagnostic qui a suggéré la causalité du gène *MED12* pour le phénotype des garçons de cette famille, un effet synergique des deux autres gènes ne peut pas être exclu. De même, les familles ayant des enfants malades et chez qui nous avons identifié des mutations dans des gènes non connus pour leur effet XLID (familles BH2 et BH6), ces gènes pourraient avoir un effet cognitif qui reste à démontrer par des études fonctionnelles in vitro. Par ailleurs, les enfants atteints de la famille BH3 ont hérité une mutation causale du gène *ATRX*, mais ils ont hérité aussi des allèles mutés de deux autres gènes qui ne sont pas connus pour leur effet X-LID (*DGAT2L6* et *MAP7D3*).

Dans notre étude, l'hétérogénéité génétique si elle existe serait polygénique, car nous n'avons identifié aucune mutation hétéro composite.

C. La variabilité phénotypique : expressivité et gènes modificateurs

L'étude clinique des sujets malades qui appartiennent à une même fratrie et qui présentent les mêmes mutations pathologiques a révélé une variabilité du phénotype pathologique d'un enfant à l'autre.

Le phénotype peut être plus ou moins sévère selon les individus. Ces sujets, bien qu'ils partagent les mêmes mutations, ils ont présenté des signes plus au moins différents, notamment dans le cas des familles BH5 et BH9 où leurs enfants malades présentent des déficiences intellectuelles de degré variable (légère à sévère) et des signes associés plus au moins divergents. Il y a alors une expressivité variable des gènes délétères. Cette variabilité pourrait être expliquée par la présence des gènes modificateurs (Feingold, 2000), tout comme elle pourrait être due à l'interaction avec des facteurs environnementaux (Bussy and Des Portes, 2008).

D. Le conseil génétique face à la déficience intellectuelle

Le conseil génétique est un processus par lequel les malades ou les parents présentant un risque de maladie héréditaire sont conseillés et informés de la nature et des conséquences de cette maladie, de la probabilité de la développer ou de la transmettre à leur descendance, et des options qui se présentent à eux en matière de planification familiale, et d'organisation dans la vie courante de manière à prévenir la maladie ou améliorer leur situation. Dans notre cas, la mutation transmissible, n'est pas sporadique, plutôt elle est véhiculée par les mamans conductrices. Donc le risque d'avoir un garçon atteint est de $\frac{1}{4}$ à chaque grossesse. Le couple a le même risque d'avoir une fille porteuse de l'allèle muté causant la déficience intellectuelle, d'où le rôle primordial du généticien pour poser le diagnostic en premier temps et de donner conseil devant une transmission délétère inéluctable.

Toutes les familles que nous avons étudiées ont bénéficié du conseil génétique lors de la consultation, ainsi que pendant le rendu du résultat. Dans une telle situation pathologique, seuls les parents en âge de procréation ont été aptes à prendre une décision en ce qui concerne leur future progéniture.

E. Les difficultés et les obstacles face aux travaux de recherche.

Parmi les difficultés rencontrées pendant la réalisation de mes travaux de thèse, je cite la taille des familles sélectionnées. En effet, nous n'avons pas pu élargir les études pour couvrir plusieurs générations afin d'établir la ségrégation des mutations et de rétrécir enfin le nombre des gènes candidats.

Dans ce projet de thèse, le séquençage de l'exome du chromosome X de chaque individu a identifié environ 350 nouveaux variants qui pourraient introduire des changements dans la fonction de la protéine. Reconnaître des mutations fonctionnelles parmi ces variants pose un véritable défi qui se manifeste principalement par la difficulté de décider quel variant pourrait contribuer au phénotype étudié.

La possible implication d'une éventuelle hétérogénéité génétique a compliqué le fait de conclure sur la causalité d'un gène particulier.

La vie privée des familles concernées, ainsi que leur région de résidence relativement loin du centre d'étude, ont constitué un facteur qui a parfois rendu le contact difficile.

Parmi les gènes candidats que nous avons retenus, deux gènes (*OGT* et *SSR4*) ont été confirmés ultérieurement par d'autres équipes comme gènes X-LID. Nous aurions pu le faire avant, mais le temps et parfois les moyens matériels n'ont pas été en faveur de cet événement.

F. Les avantages du séquençage de nouvelle génération

La transition du séquençage classique au séquençage de nouvelle génération a représenté une révolution extraordinaire. Ces méthodes de séquençage ont dépassé l'ère des puces et sont devenues de plus en plus accessibles dans les laboratoires de diagnostic. Pendant la phase de démarrage de cette technologie, le champ d'action était limité au niveau du séquençage et du déchiffrement du génome entier afin d'identifier ses variants normaux et pathologiques. Une nouvelle génération de séquenceurs d'ADN a ensuite pu rapidement et à moindre coût, séquencer des milliards de séquences de base et transformer la science génomique. Cette activité est actuellement orientée vers la compréhension du fonctionnement du génome ainsi que de ses manifestations pathologiques tout en ouvrant plusieurs portes dans le domaine des sciences de la vie et de la médecine.

En effet, les nouvelles automates du NGS, notamment la technique SOLiD que nous avons adoptée dans les travaux de ma thèse, sont en train de devenir une technologie de choix pour accomplir une variété de tests à base de séquençage. Parmi ces tests, nous citons l'étude de l'expression génique (RNA-Seq) qui détermine quelle quantité et quel type d'ARN s'expriment dans une cellule (Ozsolak and Milos, 2011).

L'approche NGS est largement appliquée dans l'identification de gènes précédemment inconnus ainsi que les variants d'épissage alternatif (Nagalakshmi et al., 2008).

La technologie NGS a aussi le pouvoir d'identifier sélectivement les transcrits qui sont fixés aux ribosomes qui sont en cours de traduction. C'est un moyen très fréquemment utilisé dans le but d'étudier l'interaction protéine-ADN (ChIP-Seq), un test durant lequel des fragments d'ADN immuno-précipités liés aux protéines sont séquencés, révélant l'interaction entre les facteurs de transcription et les éléments régulateurs au niveau de la séquence de l'ADN (Johnson *et al.*, 2007).

En oncologie, cette méthode a été utilisée dans le séquençage du génome entier de cellules tumorales aboutissant à la découverte de mutations initiatrices du cancer précédemment non identifiées (Ley *et al.*, 2008), faisant ainsi progresser, entre autres, notre connaissance de la structure de la chromatine, de la microbiologie et de la méta génomique. Par ailleurs, le next generation sequencing (NGS) nous a aidé à avoir une meilleure compréhension du génome humain qui abrite des variations normales et pathologiques, et a facilité le diagnostic et l'établissement d'un conseil génétique plus performant.

G. Les inconvénients et les limites des nouvelles technologies de séquençage

Malgré les avantages de la technologie du séquençage à haut débit, cette approche reste une invention toute récente, et comme toute nouvelle technique, il reste de nombreuses zones d'ombre en ce qui concerne son application. Les biais techniques ne sont pour le moment qu'au début de leur caractérisation et nous manquons encore de recul sur les capacités de ces outils à quantifier précisément les mécanismes biologiques complexes comme la méthylation de l'ADN, l'épissage alternatif, les sites de fixation à l'ADN des facteurs de transcription et la conformation chromatinienne. Le séquençage à haut débit produit un nombre très important de données dont la gestion n'est pas totalement maîtrisée, et encore moins automatisée. Les résultats générés se chiffrent aujourd'hui en téraoctets, et la question de savoir quoi garder et pendant combien de temps se pose de façon cruciale. Des questions importantes se posent également sur le traitement des résultats obtenus. Si par exemple dans le cas des puces à ADN on dispose de plus de 15 ans de recul technologique et de méthodologies statistiques bien déterminées pour corriger les données brutes et obtenir des résultats fiables, ce n'est pas du tout le cas en ce qui concerne

les résultats du séquençage à haut débit. Les questions de normalisation ne sont pas tranchées, et les modèles statistiques à appliquer aux données ne sont toujours pas déterminés sans ambiguïtés.

Sur le plan technique, la diminution de la fiabilité du séquençage au niveau des extrémités de lecture présente un obstacle pour aboutir à un séquençage complet. En effet, il y a un phénomène de déphasage qui correspond à l'extension incomplète ou à l'addition de multiples nucléotides au segment séquencé. Ainsi, plus il y a d'accumulation de décalages, plus le bruit de fond devient fort et plus le risque d'erreur à l'interprétation est élevé.

Sur le plan matériel, malgré un débit de séquençage en nette augmentation et une diminution constante des coûts de séquençage à haut débit (NGS), le séquençage complet de l'exome d'un chromosome n'est pas encore accessible à la majorité des laboratoires de génétique. C'est particulièrement vrai dans le cas des études sur les maladies complexes, où de grands ensembles d'échantillons sont souvent nécessaires pour obtenir une puissance statistique suffisante.

Pour terminer, dans le domaine du séquençage du génome des patients, des questions éthiques importantes se posent. Il est maintenant possible d'accéder au génome complet d'un individu. Tous les aspects éthiques de ces outils doivent donc être envisagés, et surtout débattus pour offrir une réponse appropriée.

VI- CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Il a été confirmé que plus d'hommes que de femmes sont touchés par la déficience intellectuelle. De nombreux gènes du chromosome X ont été identifiés chez les sujets affectés par cette pathologie. Le nombre de ces gènes a connu une augmentation significative durant les cinq dernières années grâce à l'apparition des nouvelles méthodes de séquençage, parmi lesquelles figure la technique SOLiD. Cette méthode nous a permis d'identifier plusieurs nouvelles mutations causales et d'apporter un diagnostic génétique pour la majorité des familles, après deux décennies d'attente.

Certaines de ces mutations ont fait l'œuvre de quatre publications. Quelques mutations prédites pathogènes ont été identifiées dans des gènes qui ne sont pas connus pour leur effet X-LID. Afin de confirmer leur causalité, l'ensemble de ces gènes candidats doit être impliqué dans des études fonctionnelles in vitro et nous devons interroger plus de cas similaires dans la littérature et si c'est possible les faire impliquer ces gènes candidats dans un programme de collaboration européen afin de permettre leur étude. Nous apprenons alors que ce manuscrit arrive à la fin de sa relecture que sept nouveaux gènes X-LID viennent d'être identifiés. (Hu et al., 2015). Certes plus de nouveaux gènes seront identifiés en revanche moins de solutions thérapeutiques sont apportées. Toutefois actuellement nous assistons à l'émergence d'une nouvelle science représentée par la neuro-technologie et la technologie cognitive.(Geelen, 2012). Cette science a pour objectif de modeler l'activité du cerveau par interposition d'interfaces entre les neurones, d'établir l'extension de la cognition et d'améliorer la neuro-informatique. Parmi les résultats préliminaires de cette technologie, nous citons la connexion plus directe au cerveau humain, la modification de l'humeur, et la régulation des schémas de pensée et de l'information cérébrale. Cette nouvelle discipline pourrait représenter une ouverture vers l'intelligence artificielle qui pourrait avec la thérapie génique et cellulaire apporter une solution curative futur pour la déficience intellectuelle.

VII- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abel, E.L., Hannigan, J.H., 1995. Maternal risk factors in fetal alcohol syndrome: Provocative and permissive influences. *Neurotoxicol. Teratol.* 17, 445–462.
- AHUJA, A.S., THAPAR, A., 2005. GENETICS OF MENTAL RETARDATION. *Indian J Med Sci* 59, 407–419.
- Aicardi, J., 1998. The etiology of developmental delay, in: *Seminars in Pediatric Neurology*. pp. 15–20.
- Amrein, H., Axel, R., 1997. Genes Expressed in Neurons of Adult Male *Drosophila*. *Cell* 88, 459–469.
- Antequera, F., Macleod, D., Bird, A.P., 1989. Specific protection of methylated CpGs in mammalian nuclei. *Cell* 58, 509–517.
- Ariel, M., Robinson, E., McCarrey, J.R., Cedar, H., 1995. Gamete-specific methylation correlates with imprinting of the murine *Xist* gene. *Nat. Genet.* 9, 312–315.
- Azofeifa, J., Voit, T., Hubner, C., Cremer, M., 1995. X-chromosome methylation in manifesting and healthy carriers of dystrophinopathies: concordance of activation ratios among first degree female relatives and skewed inactivation as cause of the affected phenotypes. *Hum. Genet.* 96, 167–176.
- Baader, S.L., Schilling, M.L., Rosengarten, B., Pretsch, W., Teutsch, H.F., Oberdick, J., Schilling, K., 1996. Purkinje Cell Lineage and the Topographic Organization of the Cerebellar Cortex: A View from X Inactivation Mosaics. *Dev. Biol.* 174, 393–406.
- Badens, C., Lacoste, C., Philip, N., Martini, N., Courier, S., Giuliano, F., Verloes, A., Munnich, A., Leheup, B., Burglen, L., Odent, S., Van Esch, H., Levy, N., 2006. Mutations in PHD-like domain of the *ATRX* gene correlate with severe psychomotor impairment and severe urogenital abnormalities in patients with *ATRX* syndrome. *Clin. Genet.* 70, 57–62.
- Balhorn, R., Weston, S., Thomas, C., Wyrobek, A.J., 1984. DNA packaging in mouse spermatids: Synthesis of protamine variants and four transition proteins. *Exp. Cell Res.* 150, 298–308.
- Banerjee, S., Riordan, M., Bhat, M.A., 2014. Genetic aspects of autism spectrum disorders: insights from animal models. *Front. Cell. Neurosci.* 8.
- Banzai, M., Omoe, K., Ishikawa, H., Endo, A., 1995. Viability, development and incidence of chromosome anomalies of preimplantation embryos from XO mice. *Cytogenet. Genome Res.* 70, 273–277.
- Bell, C.J., Dinwiddie, D.L., Miller, N.A., Hateley, S.L., Ganusova, E.E., Mudge, J., Langley, R.J., Zhang, L., Lee, C.C., Schilkey, F.D., Sheth, V., Woodward, J.E., Peckham, H.E., Schroth, G.P., Kim, R.W., Kingsmore, S.F., 2011. Carrier Testing for Severe Childhood Recessive Diseases by Next-Generation Sequencing. *Sci. Transl. Med.* 3, 65ra4–65ra4.
- Belmont, J.W., 1996. Genetic control of X inactivation and processes leading to X-inactivation skewing. *Am. J. Hum. Genet.* 58, 1101–1108.
- Bertelsen, B., Tümer, Z., Ravn, K., 2011. Three New Loci for Determining X Chromosome Inactivation Patterns. *J. Mol. Diagn.* 13, 537–540.
- Besser, L.M., Shin, M., Kucik, J.E., Correa, A., 2007. Prevalence of down syndrome among children and adolescents in metropolitan Atlanta. *Birt. Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* 79, 765–774.
- Bisgaard, A.-M., Kirchhoff, M., Nielsen, J., Kibæk, M., Lund, A., Schwartz, M., Christensen, E., 2009. Chromosomal deletion unmasking a recessive disease: 22q13 deletion syndrome and metachromatic leukodystrophy. *Clin. Genet.* 75, 175–179.
- Blennow, K., Zetterberg, H., 2015. The past and the future of Alzheimer's disease CSF biomarkers—a journey toward validated biochemical tests covering the whole spectrum of molecular events. *Front. Neurosci.* 9.

- Blomberg, M.A., 1997. Dynamic Glycosylation of Nuclear and Cytosolic Proteins. Cloning and characterization of a unique o-glcnaC transferase with multiple tetratricopeptide repeats. *J. Biol. Chem.* 272, 9308–9315.
- Boggs, B.A., Chinault, A.C., 1994. Analysis of replication timing properties of human X-chromosomal loci by fluorescence in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 6083–6087.
- Borsani, G., Tonlorenzi, R., Simmler, M.C., Dandolo, L., Arnaud, D., Capra, V., Grompe, M., Pizzuti, A., Muzny, D., Lawrence, C., Willard, H.F., Avner, P., Ballabio, A., 1991. Characterization of a murine gene expressed from the inactive X chromosome. *Nature* 351, 325–329.
- Bouazzi, H., Bouaziz, S., Alwasayah, M.K., Trujillo, C., Munnich, A., 2015. Characterization of clinical and neuro-cognitive features in a family with a novel OGT gene missense mutation c. 1193G>A/ (p. Ala319Thr). *J. Clin. Case Rep.* Acceptée NOV 2015.
- Bouazzi, H., Bouaziz, S., Alwasayah, M.K., Trujillo, C., Munnich, A., 2015b. Non-Syndromic-X-Linked-Intellectual-Disability-in-Two-Brothers-with-A-Novel-NLGN4X. *J. Case Rep. Stud.* Volume 3 | Issue 6 . On line.
- Bouazzi, H., Lesca, G., Trujillo, C., Alwasayah, M.K., Munnich, A., 2015. Nonsyndromic X-linked intellectual deficiency in three brothers with a novel *MED12* missense mutation [c.5922G>T (p.Glu1974His)]. *Clin. Case Rep.* 3(7): 604–609
- Boyd, Y., Fraser, N.J., 1990. Methylation patterns at the hypervariable X-chromosome locus DXS255 (M27β): Correlation with X-inactivation status. *Genomics* 7, 182–187.
- Bradley, E.A., Summers, J.A., Wood, H.L., Bryson, S.E., 2004. Comparing Rates of Psychiatric and Behavior Disorders in Adolescents and Young Adults with Severe Intellectual Disability with and without Autism - Springer. *J. Autism Dev. Disord.* 151–161.
- Brockdorff, N., Ashworth, A., Kay, G.F., Cooper, P., Smith, S., McCabe, V.M., Norris, D.P., Penny, G.D., Patel, D., Rastan, S., 1991. Conservation of position and exclusive expression of mouse Xist from the inactive X chromosome. *Nature* 351, 329–331.
- Bullen, J., Balsbaugh, J., Chanda, D., Shabanowitz, J., Hunt, D., Hart, G., 2014. Crosstalk between two essential nutrient-sensiti... [J Biol Chem. 2014] - PubMed - NCBI. *J Biol Chem.*
- Bussy, G., des Portes, V., 2008. Définition du retard mental, épidémiologie, évaluation clinique. *Médecine Thérapeutique Pédiatrie* 11, 196–201.
- Caldwell, S.A., Jackson, S.R., Shahriari, K.S., Lynch, T.P., Sethi, G., Walker, S., Vosseller, K., Reginato, M.J., 2010. Nutrient sensor O-GlcNAc transferase regulates breast cancer tumorigenesis through targeting of the oncogenic transcription factor FoxM1. *Oncogene* 29, 2831–2842.
- Chelly, J., Khelifaoui, M., Francis, F., Chérif, B., Bienvenu, T., 2006. Genetics and pathophysiology of mental retardation. *Eur. J. Hum. Genet.* 14, 701–713.
- Chelly, J., Mandel, J.-L., 2001. Monogenic causes of X-linked mental retardation. *Nat. Rev. Genet.* 2, 669–680.
- Chih, B., Khan Afridi, S., Clark, L., Scheiffele, P., 2004. Disorder-associated mutations lead to functional inactivation of neuroligins. *Hum. Mol. Genet.* 1471–1477.
- Choi, M., Scholl, U.I., Ji, W., Liu, T., Tikhonova, I.R., Zumbo, P., Nayir, A., Bakkaloğlu, A., Özen, S., Sanjad, S., Nelson-Williams, C., Farhi, A., Mane, S., Lifton, R.P., 2009. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 19096–19101.
- Chung, F.-Y., Cheng, T.-L., Chang, H.-J., Chiu, H.-H., Huang, M.-Y., Chang, M.-S., Chen, C.-C., Yang, M.-J., Wang, J.-Y., Lin, S.-R., 2010. Differential gene expression profile of MAGE
- Cooper, D., 1995. The nature and mechanisms of human gene mutation. *Metab. Mol. Bases Inher. Dis.* 259–291.
- Cukier, H.N., Dueker, N.D., Slifer, S.H., Lee, J.M., Whitehead, P.L., Lalanne, E., Leyva, N., Konidari, I., Gentry, R.C., Hulme, W.F., others, 2014. Exome sequencing of extended families with autism reveals genes shared across neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders. *Mol Autism* 5.

- Curie, A., Bussy, G., André, E., Ville, D., des Portes, V., 2008. Déficiences intellectuelles liées au chromosome X. *Médecine Thérapeutique Pédiatrie* 11, 218–223.
- Daoud, H., Bonnet-Brilhault, F., Védrine, S., Demattéi, M.-V., Vourc'h, N.B., Andres, C.R., 2009. Autism and Nonsyndromic Mental Retardation Associated with a De Novo Mutation in the NLGN4X Gene Promoter Causing an Increased Expression Level - *Biological Psychiatry. Biol. Psychiatry* 906–910.
- de Brouwer, A.P.M., Yntema, H.G., Kleefstra, T., Lugtenberg, D., Oudakker, A.R., de Vries, B.B.A., van Bokhoven, H., Van Esch, H., Frints, S.G.M., Froyen, G., Fryns, J.-P., Raynaud, M., Moizard, M.-P., Ronce, N., Bensalem, A., Moraine, C., Poirier, K., Castelnau, L., Saillour, Y., Bienvenu, T., Beldjord, C., des Portes, V., Chelly, J., Turner, G., Fullston, T., Gecz, J., Kuss, A.W., Tzschach, A., Jensen, L.R., Lenzner, S., Kalscheuer, V.M., Ropers, H.-H., Hamel, B.C.J., 2007. Mutation frequencies of X-linked mental retardation genes in families from the EuroMRX consortium. *Hum. Mutat.* 28, 207–208.
- Desarkar, P., Rajji, T.K., Ameis, S.H., Daskalakis, Z.J., 2015. Assessing and Stabilizing Aberrant Neuroplasticity in Autism Spectrum Disorder: The Potential Role of Transcranial Magnetic Stimulation. *Front. Psychiatry* 6.
- des portes.V, 2013. X-linked mental deficiency. *Handb Clin Neuro* 297–306.
- des Portes, V., Livet, M.O., Vallée, L., 2002. Démarche diagnostique devant une déficience mentale de l'enfant en 2002. *Arch. Pédiatrie* 9, 709–725.
- Ding, N., Zhou, H., Esteve, P.-O., Chin, H.G., Kim, S., Xu, X., Joseph, S.M., Friez, M.J., Schwartz, C.E., Pradhan, S., Boyer, T.G., 2008. Mediator Links Epigenetic Silencing of Neuronal Gene Expression with X-Linked Mental Retardation. *Mol. Cell* 31, 347–359.
- Dong, X., Li, Y., Chang, P., Tang, H., Hess, K.R., Abbruzzese, J.L., Li, D., 2011. Glucose metabolism gene variants modulate the risk of pancreatic cancer. *Cancer Prev. Res. Phila. Pa* 4, 758–766.
- Fantes, J.A., Boland, E., Ramsay, J., Donnai, D., Splitt, M., Goodship, J.A., Stewart, H., Whiteford, M., Gautier, P., Harewood, L., Holloway, S., Sharkey, F., Maher, E., van Heyningen, V., Clayton-Smith, J., Fitzpatrick, D.R., Black, G.C.M., 2008. FISH Mapping of De Novo Apparently Balanced Chromosome Rearrangements Identifies Characteristics Associated with Phenotypic Abnormality. *Am. J. Hum. Genet.* 82, 916–926.
- Fiordaliso, F., Leri, A., Cesselli, D., Limana, F., Safai, B., Nadal-Ginard, B., Anversa, P., Kajstura, J., 2001. Hyperglycemia Activates p53 and p53-Regulated Genes Leading to Myocyte Cell Death. *Diabetes* 50, 2363–2375.
- Fishburn, J., Turner, G., Daniel, A., Brookwell, R., Opitz, J.M., 1983. The diagnosis and frequency of X-linked conditions in a cohort of moderately retarded males with affected brothers. *Am. J. Med. Genet.* 14, 713–724.
- Friedman, J.M., Baross, Á., Delaney, A.D., Ally, A., Arbour, L., Asano, J., et al., 2006. Oligonucleotide Microarray Analysis of Genomic Imbalance in Children with Mental Retardation. *Am. J. Hum. Genet.* 79, 500–513.
- Geelen, J., 2012. Les neurotechnologies émergentes: Développements récents et incidences sur les politiques. *Horizons de politiques Canada*.
- Gibbons, R.J., McDowell, T.L., O'Rourke, D.M., Garrick, D., Higgs, D.R., 2000. Mutations in ATRX, encoding a SWI/SNF-like protein, cause diverse changes in the pattern of DNA methylation - *Nature Genetics. Nat. Genet.* 24 368 – 371.
- Gibbons, R.J., Wada, T., Fisher, C.A., Malik, N., Traeger-Synodinos, J., 2008. Mutations in the chromatin-associated protein ATRX. *Hum. Mutat.* 796–802.
- Goldenberg, A., Saugier-veber, P., 2010. [Genetics of mental retardation]. *Pathol. Biol. (Paris)* 58, 331–342.
- Graham, J.M., Schwartz, C.E., 2013. *MED 12* related disorders. *Am. J. Med. Genet. A.* 161, 2734–2740.
- Graham, J.M., Visootsak, J., Dykens, E., Huddleston, L., Clark, R.D., Jones, K.L., Moeschler, J.B., Opitz, J.M., Morford, J., Simensen, R., Rogers, R.C., Schwartz, C.E., Friez, M.J., Stevenson, R.E., 2008.

- Behavior of 10 patients with FG Syndrome (Opitz-Kaveggia Syndrome) and the p.R961W Mutation in the MED12 Gene. *Am. J. Med. Genet. A.* 146A, 3011–3017.
- Guillén-Navarro, E., Glóver-López, G., 2006. [Monogenic causes of X-linked mental retardation]. *Rev. Neurol.* 42 Suppl 1, S45–49.
- Gustavson, K.-H., 2005. Prevalence and aetiology of congenital birth defects, infant mortality and mental retardation in Lahore, Pakistan: A prospective cohort study - Gustavson - 2007 - *Acta Paediatrica* - Wiley Online Library. *Acta Paediatr.* volume 94, 769–774.
- Haas, P.S., Roy, N.B.A., Gibbons, R.J., Deville, M.-A., Fisher, C., Schwabe, M., Bissé, E., van Dorselaer, A., Higgs, D.R., Lübbert, M., 2009. The role of X-inactivation in the gender bias of patients with acquired α -thalassaemia and myelodysplastic syndrome (ATMDS). *Br. J. Haematol.* 144, 538–545.
- Hall, N., 2007. Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. *J. Exp. Biol.* 210, 1518–1525. doi:10.1242/jeb.001370
- Hartmann, E., Görlich, D., Kostka, S., Otto, A., Kraft, R., Knespel, S., Bürger, E., Rapoport, T.A., Prehn, S., 1993. A tetrameric complex of membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Eur. J. Biochem.* 214, 375–381.
- Heard, E., Clerc, P., Avner, P., 1997. X-chromosome inactivation in mammals. *Annu. Rev. Genet.* 31, 571–610.
- Holmes, R.S., 2010. Comparative genomics and proteomics of vertebrate diacylglycerol acyltransferase (DGAT), acyl CoA wax alcohol acyltransferase (AWAT) and monoacylglycerol acyltransferase (MGAT). *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics* 5, 45–54.
- Holt, R.A., Jones, S.J.M., 2008. The new paradigm of flow cell sequencing. *Genome Res.* 18, 839–846. doi:10.1101/252751
- Honeycutt, A.A., Grosse, S.D., Dunlap, L.J., Schendel, D.E., Chen, H., Brann, E., Homsí, G. et al, 2003. ECONOMIC COSTS OF MENTAL RETARDATION, CEREBRAL PALSY, HEARING LOSS, AND VISION IMPAIRMENT. *Res. Soc. Sci. Disabil.* 3, 207–228.
- Howerton, C.L., Morgan, C.P., Fischer, D.B., Bale, T.L., 2013. O-GlcNAc transferase (OGT) as a placental biomarker of maternal stress and reprogramming of CNS gene transcription in development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 5169–5174.
- Hu, H., Haas, S.A., Chelly, J., Van Esch, H., Raynaud, M., de Brouwer, A.P.M., Weinert, S., Froyen, G., Frints, S.G.M., Laumonnier, F., others, 2015. X-exome sequencing of 405 unresolved families identifies seven novel intellectual disability genes. *Mol. Psychiatry.*
- Isidor, B., Lefebvre, T., Le Vaillant, C., Caillaud, G., Faivre, L., Jossic, F., Joubert, M., Winer, N., Le Caignec, C., Borck, G., Pelet, A., Amiel, J., Toutain, A., Ronce, N., Raynaud, M., Verloes, A., David, A., 2014. Blepharophimosis, short humeri, developmental delay and hirschsprung disease: Expanding the phenotypic spectrum of *MED12* mutations. *Am. J. Med. Genet. A.* 164, 1821–1825.
- Jaillard, S., Drunat, S., Bendavid, C., Aboura, A., Etcheverry, A., Journal, H., Delahaye, A., Pasquier, L., Bonneau, D., Toutain, A., Burglen, L., Guichet, A., Pipiras, E., Gilbert-Dussardier, B., Benzacken, B., Martin-Coignard, D., Henry, C., David, A., Lucas, J., Mosser, J., David, V., Odent, S., Verloes, A., Dubourg, C., 2010. Identification of gene copy number variations in patients with mental retardation using array-CGH: Novel syndromes in a large French series. *Eur. J. Med. Genet.* 53, 66–75.
- Jamain, S., Quach, H., Betancur, C., Råstam, M., Colineaux, C., Gillberg, I.C. et al, 2003. Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat. Genet.* 34, 27–29.
- Jessica E Rexach, Peter M Clark, Linda C Hsieh-Wilson, 2008. Chemical approaches to understanding : O- -GlcNAc glycosylation in the brain : Abstract : Nature Chemical Biology. *Nat. Chem. Biol.* 97–106.
- Johnson, D.S., Mortazavi, A., Myers, R.M., Wold, B., 2007. Genome-Wide Mapping of in Vivo Protein-DNA Interactions. *Science* 316, 1497–1502. doi:10.1126/science.1141319

- KIRBY KS., 1957. A new method for the isolation of ribonucleic acids from mammalian tissues. *Biochem J.* 66, 495–504.
- Kötzler, M.P., Withers, S.G., 2015. Proteolytic cleavage driven by glycosylation. *J. Biol. Chem.* jbc.C115.698696.
- Kou, Y., Betancur, C., Xu, H., Buxbaum, J.D., Ma'ayan, A., 2012. Network- and attribute-based classifiers can prioritize genes and pathways for autism spectrum disorders and intellectual disability. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* 160C, 130–142.
- Kubota Takeo, Nonoyama Shigeaki, Hidefumi, T., Mitsuo, M., Kiyoshi, I., Makiko, K., Keiko, W., Mitsunobu, S., 1999. A new assay for the analysis of X-chromosome inactivation based on methylation-specific PCR -Human Genetics Volume 104, Issue , p 49-55.
- Laczy, B., Fülöp, N., Onay-Besikci, A., Des Rosiers, C., Chatham, J.C., 2011. Acute Regulation of Cardiac Metabolism by the Hexosamine Biosynthesis Pathway and Protein O-GlcNAcylation. *PLoS ONE* 6, e18417.
- Lamoril, J., Ameziane, N., 2008. Les techniques de séquençage de l'ADN.pdf. *Immuno-Anal. Biol. Spéc.* 260–279.
- Latiff, Z.A., Omar, S.A.S., Lau, D., Wong, S.W., 2013. Alpha-thalassemia mental retardation syndrome: A case report of two affected siblings. *J. Pediatr. Neurol.* 11, 67–70.
- Laumonnier, F., Bonnet-Brilhault, F., Gomot, M., Blanc, R., David, A., Moizard, M.-P., Raynaud, M., Ronce, N., Lecomte, E., Calvas, P., others, 2004. X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the neuroligin family. *Am. J. Hum. Genet.* 74, 552–557.
- Lawson-Yuen, A., Saldivar, J.-S., Sommer, S., Picker, J., 2008. Familial deletion within NLGN4 associated with autism and Tourette syndrome...: Recherche rapide UNIVERSITE PARIS DESCARTES. *Eur. J. Hum. Genet.* 614–618.
- Lazarus, M.B., Nam, Y., Jiang, J., Sliz, P., Walker, S., 2011. Structure of human O-GlcNAc transferase and its complex with a peptide substrate. *Nature* 469, 564–567. Lee, J., Hong, Y., Hwang, Y., Kim, K., Seong, K., Ryu, H., 2012. ATRX induction by mutant huntingtin via Cdx2 modulates heterochromatin cond...: *Cell Death Differ.* 1109–1116.
- Lehrke, R., 1972. A theory of X-linkage of major intellectual traits. *Am. J. Ment. Defic.* 76, 611–619.
- Lejeune, J., 1963. Les caryotypes de la trisomie 21. *Pathol. Biol.* 1153–1158.
- Lesca, G., Moizard, M.-P., Bussy, G., Boggio, D., Hu, H., Haas, S.A., Ropers, H.-H., Kalscheuer, V.M., Des Portes, V., Labalme, A., Sanlaville, D., Edery, P., Raynaud, M., Lespinasse, J., 2013. Clinical and neurocognitive characterization of a family with a novel *MED12* gene frameshift mutation. *Am. J. Med. Genet. A.* 161, 3063–3071.
- Ley, T.J., Mardis, E.R., Ding, L., Fulton, B., McLellan, M.D., Chen, K et al., 2008. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukemia genome. *Nature* 456, 66–72.
- Liu, F., Shi, J., Tanimukai, H., Gu, J., Gu, J., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Gong, C.-X., 2009. Reduced O-GlcNAcylation links lower brain glucose metabolism and tau pathology in Alzheimer's disease. *Brain* 132, 1820–1832.
- Liu, Y., Du, Y., Liu, W., Yang, C., Liu, Y., Wang, H., Gong, X., 2013. Lack of Association between NLGN3, NLGN4, SHANK2 and SHANK3 Gene Variants and Autism Spectrum Disorder in a Chinese Population. *PLoS ONE* 8, e56639. doi:10.1371/journal.pone.0056639
- Liu, Y., Li, X., Yu, Y., Shi, J., Liang, Z., Run, X., Li, Y., Dai, C., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Liu, F., Gong, C.-X., 2012. Developmental Regulation of Protein O-GlcNAcylation, O-GlcNAc Transferase, and O-GlcNAcase in Mammalian Brain. *PLoS ONE* 7, e43724. doi:10.1371/journal.pone.0043724
- Losfeld, M.E., Ng, B.G., Kircher, M., Buckingham, K.J., Turner, E.H., Eroshkin, A., Smith, J.D., Shendure, J., Nickerson, D.A., Bamshad, M.J., University of Washington Center for Mendelian Genomics, Freeze, H.H., 2014. A new congenital disorder of glycosylation caused by a mutation in *SSR4*, the signal sequence receptor 4 protein of the TRAP complex. *Hum. Mol. Genet.* 23, 1602–1605.

- Lozano, L., Lara-Lemus, R., Alvarado-Vásquez, N., 2014. The mitochondrial O-linked N-acetylglucosamine transferase (mOGT) in the diabetic patient could be the initial trigger to develop Alzheimer disease. - PubMed - NCBI. *Exp. Gerontol. J.* 198–20.
- Lyon, M.F., 1989. X-chromosome inactivation as a system of gene dosage compensation to regulate gene expression. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 36, 119–130.
- Lyon, M.F., 1968. Chromosomal and Subchromosomal Inactivation. *Annu. Rev. Genet.* 2, 31–52.
- Marei, H.E.S., Ahmed, A.-E., Michetti, F., Pescatori, M., Pallini, R., Casalbore, P., Cenciarelli, C., Elhadidy, M., 2012. Gene Expression Profile of Adult Human Olfactory Bulb and Embryonic Neural Stem Cell Suggests Distinct Signaling Pathways and Epigenetic Control. *PLoS ONE* 7, e33542.
- Maria, P., Antona, V., Graziano, L., Consiglio, V., Salzano, E., Vecchio, D., Lauricella, S.A., Corsello, G., 2013. X-LINKED INTELLECTUAL DISABILITY. *Acta Medica* 29, 799.
- Mayer, C., Louet, E., Barbeau, M., Bonnot, O., Cohen, D., 2007. L'évaluation psychologique de l'enfant. *Médecine* 3, 359–363.
- McGuire, M.M., Yatsenko, A., Hoffner, L., Jones, M., Surti, U., Rajkovic, A., 2012. Whole Exome Sequencing in a Random Sample of North American Women with Leiomyomas Identifies MED12 Mutations in Majority of Uterine Leiomyomas. *PLoS ONE* 7.
- Mefford, H.C., Cooper, G.M., Zerr, T., Smith, J.D., Baker, C., Shafer, N., Thorland, E.C., Skinner, C., Schwartz, C.E., Nickerson, D.A., Eichler, E.E., 2009. A method for rapid, targeted CNV genotyping identifies rare variants associated with neurocognitive disease. *Genome Res.* 19, 1579–1585.
- MI, B., Dh, C., 1961. Correlations between sex chromatin and sex chromosomes. *Acta Cytol.* 6, 34–45.
- Mondal, K., Shetty, A.C., Patel, V., Cutler, D.J., Zwick, M.E., 2011. Targeted sequencing of the human X chromosome exome. *Genomics* 98, 260–265. doi:10.1016/j.ygeno.2011.04.004
- Moser, H.W., 2004. Genetic Causes of Mental Retardation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1038, 44–48.
- Nagalakshmi, U., Wang, Z., Waern, K., Shou, C., Raha, D., Gerstein, M., Snyder, M., 2008. The Transcriptional Landscape of the Yeast Genome Defined by RNA Sequencing. *Science* 320, 1344–1349.
- Ng, S.B., Buckingham, K.J., Lee, C., Bigham, A.W., Tabor, H.K., Dent, K.M., Huff, C.D., Shannon, P.T., Jabs, E.W., Nickerson, D.A., Shendure, J., Bamshad, M.J., 2010. Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nat. Genet.* 42, 30–35.
- O'Donnell, N., Zachara, N.E., Hart, G.W., Marth, J.D., 2004. Ogt-Dependent X-Chromosome-Linked Protein Glycosylation Is a Requisite Modification in Somatic Cell Function and Embryo Viability. *Mol. Cell. Biol.* 24, 1680–1690.
- Opitz, J.M., Holt, M.C., Spano, L.M., Reynolds, J.F., 1986. Bibliography on X-linked mental retardation and related subjects III (1986). *Am. J. Med. Genet.* 23, 69–99.
- Ørstavik, K.H., 2009. X chromosome inactivation in clinical practice. *Hum. Genet.* 126, 363–373.
- Ozsolak, F., Milos, P.M., 2011. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nat. Rev. Genet.* 12, 87–98.
- Perlman, J.M., 1997. Intrapartum Hypoxic-Ischemic Cerebral Injury and Subsequent Cerebral Palsy: Medicolegal Issues. *Pediatrics* 99, 851–859. doi:10.1542/peds.99.6.851
- Plenge, R.M., Stevenson, R.A., Lubs, H.A., Schwartz, C.E., Willard, H.F., 2002. Skewed X-Chromosome Inactivation Is a Common Feature of X-Linked Mental Retardation Disorders. *Am. J. Hum. Genet.* 71, 168–173.
- Ratnakumar, K., Duarte, L.F., LeRoy, G., Hasson, D., Smeets, D., Vardabasso, C., Bonisch, C., Zeng, T., Xiang, B., Zhang, D.Y., Li, H., Wang, X., Hake, S.B., Schermelleh, L., Garcia, B.A., Bernstein, E., 2012. ATRX-mediated chromatin association of histone variant macroH2A1 regulates -globin expression. *Genes Dev.* 26, 433–438.
- Rauch, A., Hoyer, J., Guth, S., Zweier, C., Kraus, C., Becker, C., Zenker, M., Hüffmeier, U., Thiel, C., Rüschemdorf, F., Nürnberg, P., Reis, A., Trautmann, U., 2006. Diagnostic yield of various

- genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am. J. Med. Genet. A.* 140A, 2063–2074. 6
- Raymond, F.L., 2006. X linked mental retardation: a clinical guide. *J. Med. Genet.* 43, 193–200.
- Roeleveld, N., Zielhuis, G.A., 1997. The prevalence of mental retardation: a critical review of recent literature. *Dev. Med. Child Neurol.* 39, 125–132.
- Roest Crolius, H., 2001. Le génome humain: une séquence pour le prix de deux?
- Ropers, H.H., 2010. Genetics of Early Onset Cognitive Impairment. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 11, 161–187. doi:10.1146/annurev-genom-082509-141640
- Ropers, H.H., 2008. Genetics of intellectual disability. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18, 241–250. Ropers, H.-H., Hamel, B.C.J., 2005. X-linked mental retardation. *Nat. Rev. Genet.* 6, 46–57. doi:10.1038/nrg1501
- Ross, M.T., Grafham, D.V., Coffey, A.J., Scherer, S., McLay, K., Muzny, D., Platzer, M., Howell, G.R., Burrows, C., Bird, C.P., 2005. The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature* 434, 325–337.
- Rousseau, F., Heitz, D., Tarleton, J., MacPherson, J., Malmgren, H., Dahl, N., et al, 1994. A Multicenter Study on Genotype-Phenotype Correlations in the Fragile X Syndrome, Using Direct Diagnosis with Probe StB12.3: The First 2,253 Cases. *Am. J. Hum. Genet.* 55, 225–237.
- Rousseau, F., Rouillard, P., Morel, M.-L., Khandjian, E.W., Morgan, K., 1995. Prevalence of carriers of premutation-size alleles of the FMRI gene—and implications for the population genetics of the fragile X syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 57, 1006.
- Sabel, K.-G., Olegård, R., Victorin, L., 1976. Remaining Sequelae With Modern Perinatal Care. *Pediatrics* 57, 652–658.
- Salvador-Carulla, L., Bertelli, M., 2008. “Mental Retardation” or “Intellectual Disability”: Time for a Conceptual Change. *Psychopathology* 41, 10–16.
- Shin, C.H., Chung, W.-S., Hong, S.-K., Ober, E.A., Verkade, H., Field, H.A., Huisken, J., Y. R. Stainier, D., 2008. Multiple roles for Med12 in vertebrate endoderm development. *Dev. Biol.* 317, 467–479.
- Smith, M., Brown, N.L., Air, G.M., Barrell, B.G., Coulson, A.R., Hutchison, C.A., Sanger, F., 1977. DNA sequence at the C termini of the overlapping genes A and B in bacteriophage ϕ X174. *Nature* 265, 702–705.
- Stern, H., Booth, J.C., Elek, S.D., Fleck, D.G., 1969. Microbial causes of mental retardation the role of prenatal infections with cytomegalovirus, rubella virus, and toxoplasma. *The Lancet* 294, 443–448.
- Sühs, K.-W., Skripuletz, T., Pul, R., Alvermann, S., Schwenkenbecher, P., Stangel, M., Müller-Vahl, K., 2015. Gilles de la Tourette syndrome is not linked to contactin-associated protein receptor 2 antibodies. *Mol. Brain* 8.
- Talebizadeh, Z., 2005. Novel splice isoforms for NLGN3 and NLGN4 with possible implications in autism. *J. Med. Genet.* 43, e21–e21.
- Tarpey, P.S., Smith, R., Pleasance, E., Whibley, A., Edkins, S., Hardy, C., et al., 2009. A systematic, large-scale resequencing screen of X-chromosome coding exons in mental retardation. *Nat. Genet.* 41, 535–543.
- Teraishi, T., Sasayama, D., Hori, H., Yamamoto, N., Fujii, T., Matsuo, J., Nagashima, A., Kinoshita, Y., Hattori, K., Ota, M., others, 2013. Possible association between common variants of the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene and memory performance in healthy adults. *Behav. Brain Funct.* 9, 30.
- Thakur, S., Ishrie, M., Saxena, R., Danda, S., Linda, R., Viswabandya, A., Verma, I.C., 2011. ATR-X syndrome in two siblings with a novel mutation (c.6718C>T mutation in exon 31). *Indian J. Med. Res.* 134, 483–486.
- Turner, G., Brookwell, R., Daniel, A., Selikowitz, M., Zilibowitz, M., 1980. Heterozygous Expression of X-Linked Mental Retardation and X-Chromosome Marker Fra(X)(Q27). *N. Engl. J. Med.* 303, 662–664.

- Turner, G., Webb, T., Wake, S., Robinson, H., 1996. Prevalence of fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 64, 196–197.
- Tutter, A.V., Kowalski, M.P., Baltus, G.A., Iourgenko, V., Labow, M., Li, E., Kadam, S., 2009. Role for Med12 in Regulation of Nanog and Nanog Target Genes. *J. Biol. Chem.* 284, 3709–3718.
- Tzschach, A., Grasshoff, U., Beck-Woedl, S., Dufke, C., Bauer, C., Kehrer, M., Evers, C., Moog, U., Oehl-Jaschkowitz, B., Di Donato, N., others, 2015. Next-generation sequencing in X-linked intellectual disability. *Eur. J. Hum. Genet.*
- Vialard, F., Bailly, M., Bouazzi, H., Albert, M., Pont, J.C., Mendes, V., Bergere, M., Gomes, D.M., de Mazancourt, P., Selva, J., 2012. The High Frequency of Sperm Aneuploidy in Klinefelter Patients and in Nonobstructive Azoospermia Is Due to Meiotic Errors in Euploid Spermatocytes. *J. Androl.* 33, 1352–1359.
- Vial-Courmont, M., Guérot-Boithias, C., Audibert, F., Grangeot-Keros, L., 1999. Infection materno-fœtale à cytomégalo-virus. *Médecine Thérapeutique Pédiatrie* 1, 489–98.
- Villard, L., Toutain, A., Lossi, A.M., Gecz, J., Houdayer, C., Moraine, C., Fontes, M., 1996. Splicing mutation in the ATR-X gene can lead to a dysmorphic mental retardation phenotype without alpha-thalassemia. *Am. J. Hum. Genet.* 58, 499–505.
- Vissers, L.E.L.M., Vries, B.B.A. de, Veltman, J.A., 2010. Genomic microarrays in mental retardation: from copy number variation to gene, from research to diagnosis. *J. Med. Genet.* 47, 289–297.
- Vosseller, K., Trinidad, J.C., Chalkley, R.J., Specht, C.G., Thalhammer, A., Lynn, A.J., Snedecor, J.O., Guan, S., Medzihradszky, K.F., Maltby, D.A., 2006. O-linked N-acetylglucosamine proteomics of postsynaptic density preparations using lectin weak affinity chromatography and mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* 5, 923–934.
- Vries, B.B.A.D., Winter, R., Schinzel, A., Ravenswaaij-Arts, C. van, 2003. Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes. *J. Med. Genet.* 40, 385–398. doi:10.1136/jmg.40.6.385
- Wang, L., Dobberstein, B., 1999. Oligomeric complexes involved in translocation of proteins across the membrane of the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* 457, 316–322.
- Warrier, V., Chakrabarti, B., Murphy, L., Chan, A., Craig, I., Mallya, U., Lakatošová, S., Rehnstrom, K., Peltonen, L., Wheelwright, S., others, 2015. A pooled genome-wide association study of Asperger Syndrome. *PloS One* 10.
- Wilkie, A.O., Zeitlin, H.C., Lindenbaum, R.H., Buckle, V.J., Fischel-Ghodsian, N., Chui, D.H., Gardner-Medwin, D., MacGillivray, M.H., Weatherall, D.J., Higgs, D.R., 1990. Clinical features and molecular analysis of the alpha thalassemia/mental retardation syndromes. II. Cases without detectable abnormality of the alpha globin complex. *Am. J. Hum. Genet.* 46, 1127.
- Yadav, S., Verma, P.J., Panda, D., 2014. C-Terminal Region of MAP7 Domain Containing Protein 3 (MAP7D3) Promotes Microtubule Polymerization by Binding at the C-Terminal Tail of Tubulin. *PLoS ONE* 9, e99539. doi:10.1371/journal.pone.0099539
- Yang, X., Ongusaha, P.P., Miles, P.D., Havstad, J.C., Zhang, F., So, W.V., Kudlow, J.E., Michell, R.H., Olefsky, J.M., Field, S.J., Evans, R.M., 2008. Phosphoinositide signalling links O-GlcNAc transferase to insulin resistance. *Nature* 451, 964–969. doi:10.1038/nature06668
- Yntema, H.G., Poppelaars, F.A., Derksen, E., Oudakker, A.R., Roosmalen, R., Bokhoven, H. van, 2002. Expanding phenotype of XNP mutations: Mild to moderate mental retardation. *Am. J. Med. Genet.* 243–247.
- Yoshida, A., SUGANO, T., MATSUI, T., ENDO, K., YAMADA, Y., n.d. Étude épidémiologique sur les causes du retard mental à Yokohama. *J. Disabil. Medico-Pedagogy* Vol.9.2004.
- Zeidan, Q., Hart, G.W., 2010. The intersections between O-GlcNAcylation and phosphorylation: implications for multiple signaling pathways. *J. Cell Sci.* 123, 13–22. doi:10.1242/jcs.053678

VIII- ANNEXES

Protocole de l'extraction de l'ADN

- Lysér le sang par la solution A du kit Nucléon.
- Centrifuger à 3000 rpm pendant 10 mn.
- Décanter le contenu du tube tout en laissant le culot à sa place.
- Ajouter le tampon TA (25ml) et homogénéiser le tube pour dissoudre le culot.
- Centrifuger 10mn à 3000 rpm et décanter de nouveau puis laisser sécher à l'air libre.
- Ajouter 2ml du tampon TB du kit Nucléon et dissoudre le culot - puis laisser agir à 56° 2 h.
- Au bout de deux heures, vortexer légèrement le tube pour compléter la lyse.
- Ajouter 500ul de perchlorate de sodium et mélanger par retournement plusieurs fois.
- Ajouter sous hotte l'équivalent du volume TB en chloroforme (2ml) puis homogénéiser par retournement du tube 10 fois. Ensuite centrifuger 10mn à 3000rpm.
- Après centrifugation, le tube se présente avec deux phases séparées par une couche semi solide. L'ADN se trouve dans la phase aqueuse supérieure.

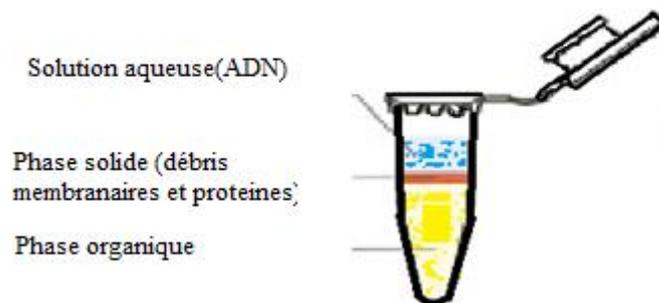


Figure 20 : Extraction d'ADN

- Récupérer la phase aqueuse et ajouter son double en volume d'éthanol absolu à -20°.
- Retourner jusqu'à obtention de la méduse.

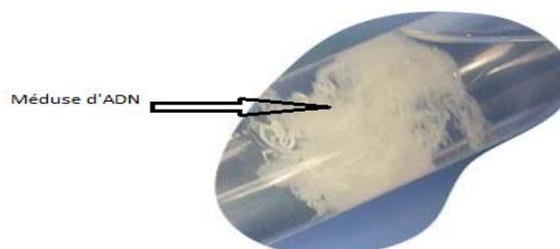


Figure 21 : La méduse d'ADN

- Récupérer la méduse et la rincer trois fois dans l'éthanol 70°.
- Centrifuger le tube, décanter l'éthanol et sécher la méduse.
- Ajouter 500 ul d'eau distillée nucléase free et mettre à 4°.

La PCR (Polymerase Chain Reaction)

C'est une technique de biologie moléculaire qui consiste à amplifier spécifiquement un fragment d'ADN 2ⁿ fois à l'aide d'un ADN polymérase résistant à la chaleur. Le nombre n représente le nombre de cycles, dont chacun comprend trois étapes :

- la dénaturation de l'acide nucléique,
- l'amplification,
- et l'élongation.

La T_m a été choisie selon le contenu des amorces en bases purique et pyrimidique.

$$T_m = 2(A + T) + 4(G + C)$$

Cette technique a été mise au point en 1985 par Kary Mullis, qui a obtenu pour ces travaux le prix Nobel de Chimie en 1993.

Protocole

200 ng d'ADN sont amplifiés dans 2.5 ul de tampon composé de 20 mM de Tris-HCl à pH8, 1.5 mM de MgCl₂ et 50 mM de KCl. 200 uM de désoxynucléotides et 1ul de chaque amorce à 10 uM sont ajoutés.

0.2 ul de taq polymérase (5U/ul) sont ajoutées à la fin dans un volume final d'eau pure de 25 ul. Un témoin négatif sans ADN est lancé en parallèle pour s'assurer de la spécificité et de la non contamination de la réaction.

L'ensemble est placé dans un thermocycleur 2700 AB et chaque cycle comprend :

5 mn de dénaturation à 95°.

30sec de dénaturation à 94°.

30sec d'hybridation à la température T_m (55° à 62°)

30sec de synthèse à 72°.

} un cycle(n fois)

7mn d'élongation à 72°

Le produit de la PCR est visualisé sur un gel d'agarose à 2 % après ajout d'un agent intercalant (le bromure d'éthidium) et la migration en parallèle d'un marqueur de taille 1Kb (Fig 25).



Figure 22: photographie du profil de migration du produit de PCR pour des gènes candidats chez des sujets atteints de la déficience intellectuelle.

Purification du produit de PCR

Le séquençage par la méthode de Sanger automatisée nécessite de purifier le produit de la PCR pour se débarrasser de l'excès des nucléotides et des amorces.

Protocole

2 ul d'ExoSAP IT 78250 (40ul) sont ajoutés à 4 ul de produit de PCR.

Le tube est placé dans un thermocycleur à 37 ° pour activation de l'enzyme pendant 15 mn.

La réaction est arrêtée par augmentation de la température à 80° pendant 15 mn.

Réaction de séquence

protocole

Cette réaction est réalisée sur un produit de PCR pur séparé en deux tubes de volumes égaux. Un tube pour la réaction sens en 5' et un tube pour la réaction anti-sens en 3'. Il s'agit d'une réaction de séquençage par terminateur de chaîne (des didésoxynucléotides). Ainsi chaque tube contient 3ul. A ce volume on ajoute :

0.5ul de kit Big Dye.

1 ul d'amorces à 2mM.

0.5 ul de tampon X5.

Ajouter de l'eau distillée jusqu'au volume 10ul (qsq10ul)

L'ensemble est placé dans un thermocycleur sous le programme suivant :

- * 5 mn à 96°
 - * 20 sec à 96°
 - * 20 sec à la température $T_m(55^\circ)$
 - * 1 mn 30 sec à 60°
- } 30 cycles
- * Une élongation 4 mn à 60°
 - * 15° jusqu'à récupération.

Cette réaction est ensuite purifiée par le kit Agencourt CleanSEQ System Dye Terminator Remova (Beckman-Coulter) et passée au séquenceur ABI prism 3130.

Les réactions passent par des capillaires remplis de polymère POP7 dans un champ électrique et les fragments sont séparés en fonction de leur taille. Les séquences les plus courtes migrent plus rapidement. Ainsi, une cellule détecte le passage du premier fragment qui porte la première base fluorescente ajoutée durant la réaction de séquence. Un faisceau laser excite la base marquée et une fluorescence spécifique du nucléotide sera libérée et convertie en signaux électriques transférés par la suite à l'ordinateur et traités par le logiciel du séquenceur (Data collection software); le résultat est visualisé sous la forme d'un chromatogramme grâce au logiciel DNA Sequencing Analysis

Clinical Case Reports

Open Access

CASE REPORT

Nonsyndromic X-linked intellectual deficiency in three brothers with a novel *MED12* missense mutation [c.5922G>T (p.Glu1974His)]

Habib Bouazzi¹, Gaetan Lesca², Carlos Trujillo³, Mohammad Khalid Alwasayah⁴ & Arnold Munnich⁵¹Hôpital Necker - Enfants Malades INSERM U781, Laboratoire de génétique médicale. Tour Lavoisier - 3^{ème} étage, 149 rue de Sèvres - 75743 Paris Cedex 15, France²Service de Cytogénétique constitutionnelle, Groupement Hospitalier Est., 59 Boulevard Pinel, 69677 Bron Cedex, France³Genetics Unit, Erfan & Bagedo Hospital, P.O. Box 6519, Jeddah 21452, Saudi Arabia⁴Aziziah Maternity and Children Hospital, Jeddah, Saudi Arabia⁵Hôpital Necker - Enfants Malades, Unité INSERM 781, Laboratoire de génétique moléculaire, Tour Lavoisier - 2^{ème} étage, 149 rue de Sèvres - 75743 Paris Cedex 15, France**Correspondence**

Habib Bouazzi, Hôpital Necker - Enfants Malades INSERM U781, Laboratoire de génétique médicale. Tour Lavoisier - 3^{ème} étage, 149 rue de Sèvres - 75743 PARIS cedex 15, France. Tel: 00 33 1 44 49 49 56; Fax: 00 33 1 47 34 85 14; E-mail: habib.bouazzi@etu.parisdescartes.fr

Funding Information

No sources of funding were declared for this study.

Received: 27 March 2015; Accepted: 27 April 2015

Clinical Case Reports 2015; 3(7): 604–609

doi: 10.1002/ccr3.301

Correction added on 6 July 2015, after first online publication: author name "Gaetan Leska" has been corrected to "Gaetan Lesca".

Introduction

X-linked intellectual deficiency (XLID) is a widely heterogeneous group of genetic disorders that involves more than one hundred genes. *MED12* (Mediator of RNA polymerase II subunit 12) is a member of the mediator complex which is involved in the regulation of the majority of RNA polymerase II-dependent genes [1, 2]. *MED12* gene has been shown to cause syndromic and nonsyndromic forms of XLID [3]. So far, only seven different germline mutations of this gene have been reported in patients with X-linked intellectual deficiency (XLID), associated with various clinical features.

A common missense mutation – p.Asn1007Ser (c.3020A>G) was found in different families with Lujan

Key Clinical Message

X-linked intellectual deficiency (XLID) is a large group of genetic disorders. *MED12* gene causes syndromic and nonsyndromic forms of XLID. Only seven pathological mutations have been identified in this gene. Here, we report a novel mutation segregating with XLID phenotype. This mutation could be in favor of genotype–phenotype correlations.

Keywords

Intellectual deficiency, *MED12*, mutation, X-exome sequencing, X-Inactivation, X-linked.

syndrome (OMIM 309520), whereas two different missense mutations – p.Arg961Trp(c.2881C>T) and p.Gly958Glu (c.2873G>A) have been found in patients with Opitz-Kaveggia syndrome (OMIM 305450) [4, 5]. Those two syndromes are clinically distinct but they share some clinical aspects, including mild-to-moderate intellectual deficiency (ID), common behavioral patterns, some dysmorphic features, and dysgenesis of the corpus callosum which is frequently associated with these two syndromes [6]. Three different mutations p.Arg1148His(c.3443G>A), p.Ser1165-Pro(c.3493T>C), and p.His1729Asn(c.5185C>A) have been subsequently found to cause Ohdo syndrome, Maat-Kievit-Brunner type (OMIM 249620) [7] Which is characterized by ID and dysmorphic features including blepharophimosis, ptosis, small mouth, and a round face with character-

tic nose. In addition to these missense mutations, a single frameshift mutation – c.5898dupC – has been reported in the *MED12* gene, in a family including 10 male patients affected with severe to profound nonspecific ID [8].

Here, we report on a novel missense mutation of the *MED12* gene, identified through parallel sequencing of all X-chromosome exons, in three brothers with severe non-syndromic intellectual deficiency and mild dysmorphic features.

Patients and Methods

The family included three affected brothers with severe ID and one unaffected brother. All family members have been clinically evaluated. Cognitive assessment was achieved in patient II-1 and II-3 using the Wechsler Intelligence Scale Child version four (WISC-IV). Skeletal radiography and brain magnetic resonance imaging (MRI) was performed in patient II-3. Informed consent for genetic studies was obtained from parents, according to the French bioethics law.

DNA was extracted from peripheral blood using the standard procedure of phenol chloroform method [9]. Purity and concentration were assessed by NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer V3-7 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE). DNA from patients II-3 and II-4 was included in a next-generation sequencing project for XLID patients in our institute using SOLiD 5500 sequencer (Life technologies, Grand Island, NY). Five micrograms of DNA were enriched by micro droplet PCR procedure (Raindance technology, Billerica, MA) to target 11,575 exons. Sorting and calling of SNP/InDel were performed using SAMTOOL and GATK softwares. Novelty was assessed by filtering the variants against a set of polymorphisms that are available in public databases such as dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>), 1000 genomes (<http://browser.1000genomes.org/in-dex.html>), Exome Variant Server (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), and ExaC (<http://exac.broadinstitute.org/>). Only nonsynonymous variants or changes affecting splice sites were analyzed. All sequence variants were prioritized by scoring phylogenetic conservation and functional impact (SIFT and Polyphen-2). Candidate variants were selected and confirmed by Sanger sequencing, using the 3500XL Genetic analyzer and the Big Dye cycle sequencing Kit of Applied Biosystem technology. Forward (5′CAGCTCTTCCTACGGTTTGC3′) and reverse (5′ACTTTCAGGCACAGGCTTCC3′) primers were designed to amplify exon 41 of the *MED12* gene. On the other hand, exon 8 of the *OGT* gene was amplified by forward and reverse primers respectively (5′GCATTACAGCCATTAGGC3′/5′CTGCTTTCCTCTACTATCATG C3′).

X-chromosome inactivation study was carried out in patient I-2 (Mother), according to the method of methylation-sensitive PCR and fragment-length analysis of androgen-receptor CAG repeat polymorphism [10].

Results

Case report

Patient I-1

This 40-year-old female had been adopted during childhood. Family history is unknown. Language was delayed. She had no dysmorphism. She attended school until the age of 16. She has been performing odd jobs since then. She married a nonrelative husband. Three of her four children had developmental delay and ID.

Patient II-1

This male patient was the elder (Fig. 1), he was born at term, after a normal pregnancy. Birth weight was 3.7 kg (+0.7SD), birth height was 50 cm (mean), and birth head circumference was 37 cm (+1.63SD). Apgar score was 10 over 10 minutes. Early psychomotor development was delayed. Walking started after the age of two. At the age of 9 he was still incontinent. He could make a few short sentences. He could eat without help but needed help for the other daily tasks. He had very poor social interactions. He was restless and aggressive. He had severe myopia. At the age of 9, height was 123.5 cm (–1.33 SD), weight was 23 kg (–2 SD), Head circumference was 53 cm (mean). IQ was 40. Facial dysmorphic features included a long narrow face, a high forehead with frontal hair upsweep, a high nasal bridge, and a long philtrum. Fingers and toes were long and thin. The nails of the 5th toes were hypoplastic.

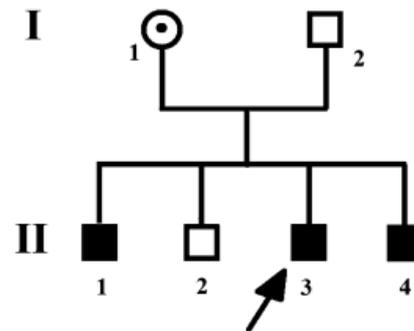


Figure 1. Pedigree of the family. Black symbols indicate intellectual deficiency due to the *MED12* mutation. The arrow shows the index case. Circle with a centered black dot represents symptomatic carrier female.

Patient II-2

This 12-year-old male was the second of a sibling of four (Fig. 1), he had normal psychomotor development and no dysmorphic features. He followed his schooling suitably.

Patient II-3

This male patient was the third of a sibling of four (Fig. 1), he was delivered at term, after a normal pregnancy. Birth weight was 3.36 kg (mean), birth height was 48 cm (-1 SD), and birth head circumference was 34 (-1 SD). Apgar score was 10 over 10 min. Head holding was acquired after the age of 6 months, sitting at 14 months, and walking at 36 months. At the age of 7 years, weight was 15.7 kg (-2.3 SD), height was 110 cm (-2 SD) and the head circumference was 51 cm (+1 SD). He was severe intellectually impaired with global IQ below 35. Language skills were limited to 10 words; he had problems and difficulties in performing routine daily living tasks. He had stereotypic movements of hands. He had no other abnormal neurological feature. Dysmorphic features included a long narrow face with a high forehead, frontal hair upsweep, mildly down-slanting palpebral fissures, flat malar area, high nasal bridge, a long philtrum, and a small mouth. He was myopic without strabismus (Fig. 2A,B). He had a clinodactyly of the fifth finger and a flat foot (Fig. 2C,D). He did not experience any seizure episode. An EEG recording was performed at 7 years old and was normal. Brain MRI, performed at the age of 10 years, and did not reveal any alteration (Fig. 2E,F). Metabolic and endocrine analyses were normal; karyotype and array-CGH did not show any pathogenic chromosomal imbalance.

Patient II-4

This male patient was born at term of an uneventful pregnancy. Apgar score was 10 over 10 min. Birth weight was 3.5 kg (mean), birth length was 53 cm (+1.5 SD), and birth head circumference was 35 cm (mean). Early psychomotor development was delayed. Walking was achieved at the age of four. He could repeat a few words. At that age 4 years, cognitive evaluation showed severe ID (performance IQ = 30). He was aggressive and restless. He had no obvious dysmorphic feature.

Molecular genetics

Sequencing of X-exome from patient II-4 and patient II-2 identified two missense variants that could be considered as potentially pathogenic according to our filters.

The first variant was a c.5922G>T substitution in exon 41 of the *MED12* gene (GenBank accession number: NM_005120) leading to the substitution of a highly conserved Glutamine to a Histidine (p.Gln1974His). This mutation was absent from public databases of control individuals (Exome Variant Server, 1000 genomes, dbSNP135, and ExaC) and in > in-house 200 X-exomes of index patients from other XLID families. This mutation was confirmed by Sanger sequencing in the three affected boys as well as in the mother but was absent in the unaffected brother. This substitution was predicted to be deleterious by SIFT (score: 0) and possibly damaging by Polyphen-2 (score: 0.642) softwares. Predictions with Mutation Taster were in favor of a disease-causing variant (p value: 1). X-chromosome inactivation pattern was not skewed in the mother (60%;40%).

The second variant was the c.955G>A/p.Ala319Thr of the *OGT* gene (GeneBank accession number: NM_181672.2).

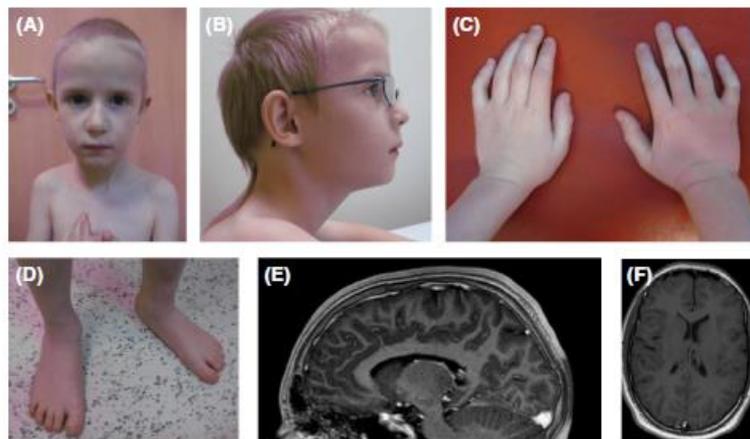


Figure 2. Photographs and brain MRI of patient II-3. (A, B): Facial features include long narrow face with a high forehead, frontal hair upsweep, mildly downslanting palpebral fissures, high nasal bridge, a long philtrum, and a small mouth. (C, D): Clinodactyly of the fifth finger of both hands and flat foot. (E, F): Midsagittal (E) and axial (F) brain MRI sections showing normal corpus callosum.

This variant has not been reported in public databases of control individuals (Exome Variant Server, 1000 genomes, dbSNP135, and ExaC data set) and in >200 X-exomes. In silico predictions are not in favor of a potentially pathogenic role. The *OGT* gene variant co-segregated with *MED12* mutation in the three affected males. It was not found in the nonaffected brother.

Discussion

X-exome sequencing applied to the XLID family reported here brought out two novel missense variants that could be considered as potentially pathogenic. The two variants (c.955G>A-*OGT*) and (c.5922G>T-*MED12*) were confirmed by Sanger sequencing. Both segregated concomitantly with the pathological phenotype of the three affected boys. The two genes are closely located on the X chromosome and are likely to be in Linkage Disequilibrium.

OGT encodes the O-Linked N-acetyl-Glucosamine transferase. It locates on the Xq13.1 band. It has been reported to regulate proteins involved in chromatin remodeling [11] and targets a wide range of intracellular proteins which protect cells from the damaging effects of metabolic stress [12]. Alteration of the *OGT* gene has been shown to play a role in several pathogenic processes which are involved in diabetes, in cancer, in neurodegenerative disorders as well as in autism [13]. Many proteins which are involved in neuronal communications, synaptic transmission, and synaptic plasticity are O-GlcNAcylated [14], suggesting an important role for this modification in brain function. Beyond the involvement of *OGT* in chronic human diseases including diabetes, cardiovascular disease, neurodegenerative disorders, and cancer [13, 15, 16]. O-GlcNAcylation was reported to modulate protein phosphorylation and regulates several cellular signaling and functions, mainly in the brain [17]. So far, in terms of brain disorder, the *OGT* gene has been cited only in Alzheimer's disease [18]. However, up to now, no mental disability involvement of this gene has been highlighted and no mutation of *OGT* has been reported, so far, to cause a monogenic disorder.

Despite the fact that we could not rule out a role for this mutation in the phenotype of the present family, we gave more consideration to the *MED12* variant.

MED12 is a part of a protein complex involved in the regulation of the majority of RNA polymerase II-dependent genes. It encodes mediator of RNA polymerase II transcription subunit 12 [1, 2]. *MED12* gene mutations alter cell-fate decisions and leads to a variety of pathologic conditions including developmental defects and cancer [19, 20]. Up to now seven different pathological mutations (Fig. 3) have been reported within *MED12* gene and have been associated with ID and a wide clinical variability [6, 8, 21]. Despite clinical variability, patients shared a common core of clinical features, including ID, behavior disorder, and some dysmorphic features. Patients from the family reported here also share these common features (Table 1). However, neither corpus callosum dysgenesis which is a major criterion for LS/FGS nor congenital malformations such as imperforate anus that were commonly delineated in FGS were noticed in the present family. Likewise, blepharophimosis which is constant in X-linked Ohdo syndrome was not detected in this study. Nevertheless, patient (II-3) of this family had a chronic constipation. Severe constipation was reported in FG and OSMBK syndromes (one patient with OSMBK syndrome had Hirshprung disease), and in one patient of the family that was studied by Lesca et al. [8, 21, 22].

On a molecular level, the *MED12* C-terminal region harboring all pathological missense mutations found to date interacts with GLI3 protein a Sonic Hedgehog (SHH) signaling effector [23]. It was suggested that mutations disrupt the gene-specific association of *MED12* with a second Mediator subunit, CDK8, identified to be a suppressor of GLI3 transactivation activity. Dysregulated GLI3-dependent SHH signaling contributes to phenotypes of individuals with cognitive impairment by modulating the specification of neuronal cell fates and further reveals a basis for the gene-specific manifestation of pathogenic mutations in a global transcriptional coregulator [3].

OGT gene and *MED12* are adjacent, both are muted and they segregate concomitantly in all infected patients, they may have significant effects on neurodevelopment.

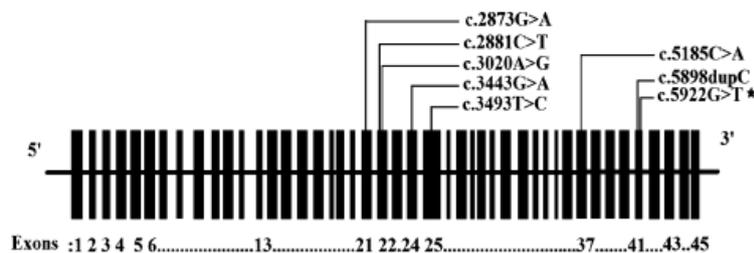


Figure 3. Schematic representation of *MED12* cDNA. The boxes represent the 45 exons. They are numbered from 1 to 45. The position and type of all mutations involved in Intellectual Deficiency which are collected from literature are shown in the upper part. The novel mutation described in this study is shown by an asterisk (*).

Table 1. Comparison of the clinical features of the patients with different mutations of the *MED12* gene.

	FG syndrome Mutations	Lujan syndrome	OSMKB	Lesca et al. [8]	Present study
	p.Gly958Glu p.Arg961Trp Exons	p.Asn1007Ser	p.Arg1148His p.Ser1165Pro p.his1729Asn	Non syndromic ^a p.Ser1967Glnfsx84	p.Gln1974His
Major clinical features	21, 22	22	24, 25, 37	41	41
Intellectual disability	+	+	+	+	+
Behavioral disorders	+	+	+	+	+
No language	–	–	+	+	+
Hypemasal voice hypotonia	–	+	–	–	–
Macrocephaly	+	+	–	–	–
Agenesis of corpus callosum	+	+	–	–	–
Tall stature	–	+	–	–	–
X skewed inactivation	–	–	–	–	–
Affected females	–	–	–	+	+
Anal anomalies	+	–	–	–	–
Constipation	+	–	+	–	–
Hypertelorism/telecanthus	–	–	–	–	–
Strabismus	+	+	+	–	–
Blepharophimosis	–	–	+	–	–
Downslanting palpebrae	+	+	+	–	–
Micrognathia/retrognathia	+	+	+	–	–
Long narrow face	–	+	–	+	+
Triangular face	–	–	+	–	–
Tall prominent forehead	+	+	+	+	+
Facial coarsening	–	–	+	–	–
Frontal hair upsweep	+	–	–	–	–
Thick alae nasi	–	–	+	–	–
High nasal root	–	+	–	+	+
High narrow palate	+	+	+	–	–
Dental crowding	+	+	–	–	–
Maxillary hypoplasia	+	+	–	+	+
Open mouth	+	+	+	+	+
Small ears	+	–	+	–	–
Horizontal palmar creases	+	–	–	–	–
Syndactyly	+	–	–	–	–
Polydactyly	–	–	–	–	–
Thin habitus	–	–	–	+	+

^aLesca et al. [8].

The c.5898dupC, reported by Lesca et al. was located in the same exon as the mutations found in the present study [8]. It had been found in a family including 10 males affected with severe to profound XLID and with cognitive impairment in a high proportion of heterozygous females. The phenotype of those patients was very similar to that of the present family and patients were considered as having nonspecific XLID. Another feature shared by these two families is the presence of intellectually impaired heterozygous females. This was not reported in families with previously reported missense *MED12* mutations, in which males usually had milder intellectual impairment.

Conclusion

The involvement of the *MED12* gene in intellectual disability has been confirmed. There are few pathological mutations known in this gene. So far only seven mutations have been identified. Our novel missense variant (c5922G>T) was the eighth. It segregates with the pathological phenotype in all affected patients. Although the number of *MED12* mutations reported to date is too limited to draw any definite genotype–phenotype correlations, mutations in different regions might cause more severe cognitive impairment or more pronounced dysmorphic features.

Acknowledgments

We are grateful to patients. We thank the team of the Necher University Hospital High-throughput sequencing platform for the technical support in performing X-exome sequencing. This work was supported by the Imagine Foundation (Necker Hospital) and by INSERM U781. We specially appreciated the clinical and genetic supervision of Valerie Cormier-Daire and Jean Paul Bonnefont. We thank the Physician Doctor Mohand Ousaid Sidali from Pi erre et Marie Curie University (Paris VI) for his help in patients' photo development.

Conflict of Interest

None declared.

References

- Shin, C. H., W.-S. Chung, S.-K. Hong, E. A. Ober, H. Verkade, H. A. Field, et al. 2008. Multiple roles for Med12 in vertebrate endoderm development. *Dev. Biol.* 317:467–479.
- Tutter, A. V., M. P. Kowalski, G. A. Baltus, V. Iourgenko, M. Labow, E. Li, et al. 2009. Role for Med12 in regulation of nanog and nanog target genes. *J. Biol. Chem.* 284:3709–3718.
- Zhou, H., J. M. Spaeth, N. H. Kim, X. Xu, M. J. Friez, C. E. Schwartz, et al. 2012. MED12 mutations link intellectual disability syndromes with dysregulated GLI3-dependent Sonic Hedgehog signaling. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 109:19763–19768.
- Rishg, H., J. M. Graham, R. D. Clark, R. C. Rogers, J. M. Opitz, J. B. Moeschler, et al. 2007. A recurrent mutation in MED12 leading to R961W causes Opitz-Kaveggia syndrome. *Nat. Genet.* 39:451–453.
- Tarpey, P. S., R. Smith, E. Pleasance, A. Whibley, S. Edkins, C. Hardy, et al. 2009. A systematic, large-scale resequencing screen of X-chromosome coding exons in mental retardation. *Nat. Genet.* 41:535–543.
- Graham, J. M., and C. E. Schwartz. 2013. *MED12* related disorders. *Am. J. Med. Genet. A* 161:2734–2740.
- Vulto-van Silfhout, A. T., B. B. A. de Vries, B. W. M. van Bon, A. Hoischen, M. Ruitkamp-Versteeg, C. Gilissen, et al. 2013. Report: mutations in MED12 cause X-linked ohdo syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 92:401–406.
- Lesca, G., M.-P. Moizard, G. Bussy, D. Boggio, H. Hu, S. A. Haas, et al. 2013. Clinical and neurocognitive characterization of a family with a novel *MED12* gene frameshift mutation. *Am. J. Med. Genet. A* 161:3063–3071.
- Kirby, K. S. 1957. A new method for the isolation of ribonucleic acids from mammalian tissues. *Biochem J.* 66:495–504.
- Kubota, T., N. Shigeaki, T. Hidefumi, M. Mitsuo, I. Kiyoshi, K. Makiko, et al. 1999. A new assay for the analysis of X-chromosome inactivation based on methylation-specific PCR – Springer. *Hum. Genet.* 104:49–55.
- Howerton, C. L., C. P. Morgan, D. B. Fischer, and T. L. Bale. 2013. O-GlcNAc transferase (OGT) as a placental biomarker of maternal stress and reprogramming of CNS gene transcription in development. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 110:5169–5174.
- Bullen, J., J. Balsbaugh, D. Chanda, J. Shabanowitz, D. Hunt, and G. Hart. 2014. Crosstalk between two essential nutrient-sensitive enzymes: O-GlcNAc transferase (OGT) and AMP-activated protein kinase (AMPK). *J. Biol. Chem.* 289:10592–10606.
- Yang, X., P. P. Ongusaha, P. D. Miles, J. C. Havstad, F. Zhang, W. V. So, et al. 2008. Phosphoinositide signalling links O-GlcNAc transferase to insulin resistance. *Nature* 451:964–969.
- Zeidan, Q., and G. W. Hart. 2010. The intersections between O-GlcNAcylation and phosphorylation: implications for multiple signaling pathways. *J. Cell Sci.* 123:13–22.
- Laczy, B., N. F ul op, A. Onay-Besikci, C. Des Rosiers, and J. C. Chatham. 2011. Acute regulation of cardiac metabolism by the hexosamine biosynthesis pathway and protein O-GlcNAcylation. *PLoS ONE* 6:e18417.
- Caldwell, S. A., S. R. Jackson, K. S. Shahriari, T. P. Lynch, G. Sethi, S. Walker, et al. 2010. Nutrient sensor O-GlcNAc transferase regulates breast cancer tumorigenesis through targeting of the oncogenic transcription factor FoxM1. *Oncogene* 29:2831–2842.
- Liu, Y., X. Li, Y. Yu, J. Shi, Z. Liang, X. Run, et al. 2012. Developmental regulation of protein O-GlcNAcylation, O-GlcNAc transferase, and O-GlcNAcase in mammalian brain. *PLoS ONE* 7:e43724.
- Lazarus, M. B., Y. Nam, J. Jiang, P. Sliz, and S. Walker. 2011. Structure of human O-GlcNAc transferase and its complex with a peptide substrate. *Nature* 469:564–567.
- Ding, N., H. Zhou, P.-O. Esteve, H. G. Chin, S. Kim, X. Xu, et al. 2008. Mediator links epigenetic silencing of neuronal gene expression with X-linked mental retardation. *Mol. Cell* 31:347–359.
- McGuire, M. M., A. Yatsenko, L. Hoffner, M. Jones, U. Surti, and A. Rajkovic. 2012. Whole exome sequencing in a random sample of north american women with leiomyomas identifies MED12 mutations in majority of uterine leiomyomas. *PLoS ONE* 7:e33251.
- Isidor, B., T. Lefebvre, C. Le Vaillant, G. Caillaud, L. Faivre, F. Jossic, et al. 2014. Blepharophimosis, short humeri, developmental delay and hirschsprung disease: expanding the phenotypic spectrum of *MED12* mutations. *Am. J. Med. Genet. A* 164:1821–1825.
- Graham, J. M., R. D. Clark, J. B. Moeschler, and R. C. Rogers. 2010. Behavioral features in young adults with FG syndrome (Opitz-Kaveggia Syndrome). *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* 154C:477–485.
- Zhou, H., S. Kim, S. Ishii, and T. G. Boyer. 2006. Mediator modulates Gli3-dependent sonic hedgehog signaling. *Mol. Cell. Biol.* 26:8667–8682.



Non-Syndromic X Linked Intellectual Disability in Two Brothers with A Novel *NLGN4X* Gene Splicing Mutation (NC_018934.2: g. 1202C>A)

Bouazzi H¹, Bouaziz S², Alwasayah MK³, Trujillo C⁴ and Munnich A¹

¹Hôpital Necker - Enfants Malades, Medical Genetics Laboratory, Paris Descartes University, France

²Research Unit: Epidemiology, Etiology of Congenital Malformations and Therapeutics, Monastir Faculty of Medicine, Tunisian Republic

³Azizah Maternity and Children Hospital, Jeddah, Saudi Arabia

⁴Genetics Unit, Erfan and Bagedo Hospital, Jeddah, Saudi Arabia

*Corresponding author: Bouazzi H, Hôpital Necker - Enfants Malades, Medical Genetics Laboratory, Paris Descartes University, Tour Lavoisier - 3rd floor, 149 rue de Sèvres - 75743 PARIS cedex 15, France, Fax: 00 33 1 47 34 85 14, Tel: 00 33 1 44 49 49 56, E- mail: habib.bouazzi@etu.parisdescartes.fr

Citation: Bouazzi H, Bouaziz S, Alwasayah MK, Trujillo C, Munnich A (2015) Non-Syndromic X Linked Intellectual Disability in Two Brothers with A Novel *NLGN4X* Gene Splicing Mutation (NC_018934.2: g. 1202C>A). *J Case Rep Stud* 3(6): 604. doi: 10.15744/2348-9820.3.604

Received Date: October 23, 2015 **Accepted Date:** December 12, 2015 **Published Date:** December 15, 2015

Abstract

X-linked Intellectual Disability (XLID) is an extremely heterogeneous disorder for which many of the causative genes are still unknown. So far, more than one hundred genes of the X chromosome have been found to be altered in males manifesting intellectual disability (ID). *NLGN4X* is an XLID gene, which has been found, involved in autism and Asperger syndrome involving causative coding mutations. Up to now a few pathological mutations in the promoter and the 5' UTR have been identified. Here we report a non-syndromic X linked Intellectual disability in two brothers with a novel *NLGN4X* splicing mutation predicted to have a pathogenic effect by the activation of an exonic cryptic acceptor site, with presence of one or more cryptic branch point(s). This mutation g.1202C>A (Genbank accession number NC_018934.2) was identified through X exome sequencing. It was confirmed by Sanger sequencing. The mother was heterozygous with a skewed X inactivation pattern (100%). She is not affected. This variant was predicted to change the splicing process leading to potential alteration of the mRNA. This mutation segregates with the pathological phenotype in all the affected males. However, it was absent in the non-affected daughter, we suggest that it could be in favor of genotype- phenotype correlation. This study also confirms the efficiency of X exome sequencing for identifying specific genetic conditions not clinically suspected.

Keywords: Autism; Exome sequencing; Intellectual disability; X- inactivation; Mutation

Abbreviations: *NLGN4X*: Neurologin; ID: Intellectual Disability; XLID: Chromosome X Linked Intellectual Disability

Introduction

X-linked intellectual disability (XLID) is a widely heterogeneous group of genetic disorders that involves more than one hundred genes [1]. Neurologin 4 (*NLGN4*) is a member of a cell adhesion protein family expressed in postsynaptic neurons that interact with neuroligins expressed in presynaptic neurons [2]. Neurologin appears to play a role in the maturation and function of neuronal cells [3]. *NLGN4* is an X-linked intellectual disability (ID) gene and it was reported to be altered in Autism spectrum disorder (ASD) which is a condition that affects social interaction, communication, interests and behavior. It includes Asperger syndrome and childhood autism [4]. Mutations in the X-linked *NLGN4* gene are a potential cause of (ASD), and mutations have been reported in several patients with autism (OMIM:605309), Asperger syndrome (OMIM:300497), and intellectual disability [5].

Splicing mutations within *NLGN4X* gene has been confirmed to produce autistic phenotypes [6]. One previous study has reported a lack of one exon within *NLGN4X* mRNA in a patient belonging to an autistic cohort with a splicing mutation [7]. One more pathological mutation (-335 G>A) was reported to be linked to non syndromic Intellectual disability and ASD [8].

In this study, we report on a novel *NLGN4X* gene splicing mutation g.1202C>A (Genbank accession number NC_018934.2), between exon 2 and exon 3 respectively (ENSE00001222767/ENSE00002217675- ENSEMBL database) identified through parallel sequencing of all X chromosome exons and predicted by Human Splicing Finder (HSF) to result in activation of an exonic cryptic acceptor site, with presence of one or more cryptic branch point(s) leading to potential alteration of the splicing process. This Splice mutation may lead to potentially abnormal neurologin in the causation of (ID) and associated signs in our two patients.

Material and Methods

The family included two affected brothers with moderate (ID) and one unaffected sister. All family members have been clinically evaluated. Cognitive assessment was achieved in patient II-1 and II-2 using the Wechsler Intelligence Scale Child version four (WISC-IV). Brain magnetic resonance imaging (MRI) was performed in patient II-2. Informed consent for genetic studies was obtained from parents, according to the French bioethics law.

Karyotype and CGH array were performed in both affected brothers.

DNA was extracted from peripheral blood using the standard procedure of phenol chloroform method [9]. Purity and concentration were assessed by NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer V3-7 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). DNA from patients II-I and II-II was included in a next generation sequencing project for XLID patients in our institute using SOLiD 5500 sequencer (Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Five micrograms of DNA were enriched by micro droplet PCR procedure (Raindance technology, Billerica, MA, USA) to target 11,575 exons.

Sorting and calling of SNP/InDel were performed using SAMTOOL and GATK softwares. Novelty was assessed by filtering the variants against a set of polymorphisms that are available in public databases such as dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>), 1000 genomes (<http://browser.1000genomes.org/in-dex.html>), Exome Variant Server (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), and ExaC (<http://exac.broadinstitute.org/>). Only non-synonymous variants or changes affecting splice sites were analyzed. All sequence variants were prioritized by scoring phylogenetic conservation and functional impact (SIFT, Polyphen-2, Splicing Mutation Finder and Mutation taster). Candidate variants were selected and confirmed by Sanger sequencing, using the 3500XL Genetic analyzer and the Big Dye cycle sequencing Kit of Applied Biosystem technology. Forward (5'-GGGTGATGCACGAAATAACG-3') and reverse (5'-AAGCGGGCAGTTCAGAGATG-3') primers were designed to amplify the UTR 5' region of the NLGN4X gene. X-chromosome inactivation study was carried out in patient I-2 (Mother), according to the method of methylation-sensitive PCR and fragment-length analysis of androgen-receptor CAG repeat polymorphism [10].

Results

Case Report

Patient II-1: This male patient was the child in this family (Figure 1). He has a mild intellectual disability. He was born at term, after a normal pregnancy. Birth length was 51 cm (mean), birth weight was 3.5 kg (+0.5SD), and birth head circumference was 35 cm (mean). Apgar score was 10 over 10 minutes. His early psychomotor development was delayed. Started walking at 18 months. At the age of 9 he has a dyspraxia with learning difficulties associated with visual hallucinations. He had great difficulties of morization memorization. He did not know his date of birth or the surname of his grandparents nor the time situation; however, he could do his daily tasks alone. He did not experience any seizure episode. An EEG was performed at 7 years old and was normal. Brain MRI, performed at the age of 7 years, and did not reveal any alteration. He had no facial dysmorphic features. His intellectual quotient (IQ) was 50. He has been treated with Ritalin for dyspraxia and being followed in a French speech and behavior rehabilitation center. CGH-array and karyotype studies were normal.

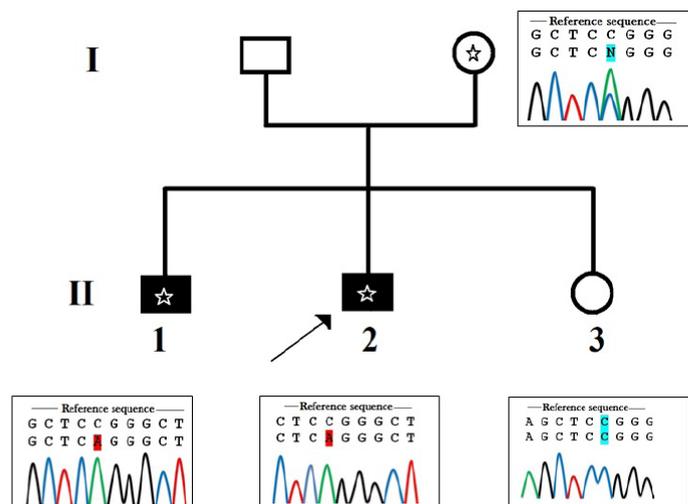


Figure 1: Pedigree of the family. Black symbols indicate intellectual disability. Asterix indicates the presence of the mutation g.1202>A. The arrow shows the index case. A circle with an Asterix represents the carrier female. Sanger sequencing electrophoresis profile shows that the daughter hasn't inherited the mutation; she is homozygous (C/C). The mother is heterozygous (C/A) and both affected boys have inherited the muted allele (A) from their mother

Patient II-2: This 10-years –old male (index case) was the second of a sibling of three (Figure 1), born to unrelated young parents. He was born at term after a normal pregnancy. Birth weight was 3.6kg (+0.7SD), birth length was 52cm (mean), and birth head circumference was 35.5cm (mean). Apgar score was 10 over 10 minutes. There have been no difficulties in the neonatal period and psychomotor acquisitions were done in time without any language delay. His first neuro-cognitive difficulties appeared during schooling. At eight years old, he did not acquire reading, nor writing, he had severe dyslexia associated with impairment of semantic processing. He had great difficulties of memorization (He did not know his date of birth or the surname of his grandparents nor the time situation). He was easily distressed, mainly in situations of failure. He had an attention deficit-hyperactivity disorder and panic and rage attacks involving agitation and impulsiveness associated with failure in concentration. He presented a dyscalculia and a spatial visual disorder without any signs of dyspraxia. Otherwise his neurological exam was normal and his intellectual quotient (IQ) was assessed for 55. Besides that he has no behavior disorder and no insomnia. His feeding was normal. He had no significant dysmorphic features (Figure 2AB). At 10- years- old, his weight was 33 Kg (mean), height 136 Cm (mean). MRI was performed at 8- years- old and did not reveal any alteration. Metabolic and endocrine analysis was normal. Karyotype and array-CGH did not show any pathogenic chromosomal imbalance.



Figure 2AB: Photographs of patient II-2, the index case. 2A, 2B respectively profile and face photos, the patient has a mild intellectual disability associated with attention deficit-hyperactivity disorder and a failure in memorization. He has no significant dysmorphism

Molecular genetics

Sequencing of X-exome from patient II-1 and patient II-2 identified one splicing variant in *NLGN4X* gene that could be considered as potentially pathogenic according to our filters. There were no more other predicted pathological mutations of X-linked genes identified in two affected brothers.

The variant was a g.1202C>A substitution within the splicing site of intron 2 between exon 2 and exon 3 of *LGN4X* gene (GenBank accession number NC_018934.2) leading to the substitution of a Cytosine to an Adenine (IVS2+8C>A). This mutation was absent from public databases of control individuals (Exome Variant Server, 1000genomes, dbSNP135, and ExaC) and in > in-house 200 X-exomes of index patients from other X-LID families. This mutation was confirmed by Sanger sequencing in the two affected boys as well as in the mother, but it was not studied in the unaffected sister. This substitution was predicted by Human Splicing Finder software (HSF) to result in the activation of an exonic cryptic acceptor site, with presence of one or more cryptic branch point(s) leading to potential alteration of the splicing process. Predictions with Mutation Taster were in favor of a change of a splice site. X-chromosome inactivation pattern was completely skewed in the mother (100%) who was heterozygous and asymptomatic.

Discussion

X-exome sequencing applied to the X-LID family reported here brought out novel variant occurs in the late exonic positions in *NLGN4X* gene (NC_018934.2:g.1202C>A)-Genbank/ (IVS2+8C>A)- ENSEMBL. This splice site mutation could be considered as potentially pathogenic. It was confirmed by Sanger sequencing. It segregated with the pathological phenotype of the two affected boys.

NLGN4X gene encodes a protein which belongs to a family of neuronal cell surface proteins [11]. It acts as splice site-specific ligands for beta-neurexins and may be involved in the formation and remodeling of central nervous system synapses [12]. Mutations in this gene have been associated with autism (OMIM300495), Asperger syndrome (OMIM300497) and Tourette syndrome (OMIM 137580) [3].

So far several pathological mutations have been reported within *NLGN4X* gene and have been associated with (ID) and a wide clinical variability [13,14].

The alteration of *NLGN4X* gene in Autism is characterized by impairments in reciprocal social interaction and communication, restricted and stereotyped patterns of interests and activities, and the presence of developmental abnormalities by 3 years of age. Most individuals with autism also manifest moderate to mild intellectual disability [15].

NLGN4X was reported to be altered in Asperger syndrome which involves features similar to autism. Affected individuals exhibit qualitative impairment in social interaction, as manifest by impairment in the use of non-verbal behaviors such as eye-to-eye gaze, facial expression, body postures and gestures, failure to develop appropriate peer relationships, and lack of social sharing or reciprocity. Patients also exhibit restricted, repetitive and stereotyped patterns of behavior, interests and activities, including abnormal preoccupation with certain activities and inflexible adherence to routines or rituals. Despite this similarity, Asperger syndrome is distinguished from autism by the higher cognitive abilities and a more normal and timely development of language and communicative phrases [16].

Previous studies have reported that pathological mutations within this gene were identified and found associated with Tourette syndrome involving neurobehavioral disorder characterized particularly by motor and vocal tics and associated with behavioral abnormalities. Tics are sudden, brief, intermittent, involuntary or semi-voluntary movements (motor tics) or sounds (phonic or vocal tics) [17].

Despite the heterogeneity of clinical features associated with the alteration of *NLGN4X* gene in these different syndromes, most patients shared a common core of clinical features represented by moderate to mild (ID) and behavior disorder. However neither social interaction impairment which is a common criterion for Autism nor stereotypy that was commonly delineated in Asperger syndrome was noticed in our present family. Likewise motor and vocal tics which are constant in Tourette syndrome were not detected in this study. Nevertheless, patient II-2 of this family had attention deficit-hyperactivity disorder and panic and rage attacks. These signs were reported in Asperger syndrome. The mild intellectual disability of our patients was shared with most patients of previous studies that have reported causative *NLGN4X* gene mutations.

Alterations in *NLGN4X* gene were confirmed to cause a wide heterogeneous pathological features [18]. Patients of this study inherited a novel *NLGN4X* gene splicing mutation (g.1202C>A) from an asymptomatic mother. The X-inactivation pattern of the mother was completely skewed (100%). The mutation segregates with the pathological phenotype and was predicted to result in activation of an exonic cryptic acceptor site (ACGGTAGCTCAG) with presence of one or more cryptic branch point(s) (Figure 3) leading to potential alteration of the splicing process. The proximity of this mutation from exon 2 and its location in the splicing donor site (IVS2+8C>A) may lead to a failure in the normal splicing process and then to an abnormal *NLGN4X* transcript, thus an expression of a pathological phenotype.

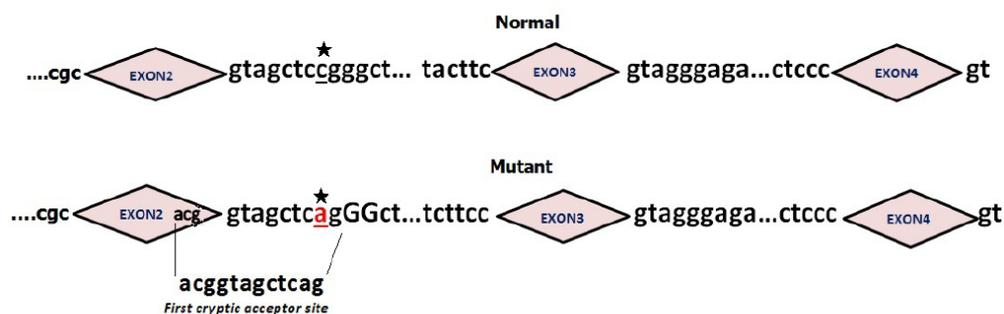


Figure 3: The novel mutation NC_018934.2 g. 1202C>A (IVS2+8C>A) indicated by an asterisk results in a new splice site (ACGGTAGCTCAG) between exon2 and exon3 of the *NLGN4X* gene (Ensembl sequence reference: ENSG00000146938). This mutation occurs in the promoter region and it is predicted to be pathogenic by altering the normal splicing process

In the normal splicing process, exon2 and exon3 are situated in the 5'UTR (untranslated region) within a regulatory promoter sequence. Therefore, we thought that the new mutation could lead to a failure of this process and we suggest that this variant could be the cause of the pathological phenotype. However to confirm this suggestion, additional function studies should be performed. The assessment of mRNA quality could help to confirm the effect of this mutation. Expanded sequencing for more related members of this family would give more details about the inheritance of the pathology. The study of X inactivation pattern in the sister II-3 (Figure 1) would be helpful to strengthen our suggestions.

Conclusion

The involvement of the *NLGN4X* gene in intellectual disability has been confirmed. There are several pathological mutations known in this gene. Our substitution splicing mutation (g.1202C>A) segregates with the pathological phenotype in all affected patients and predictions were in favor of pathological effect. Although functional assessments of *NLGN4X* gene were not performed in this study, this result could bring further insight about the phenotypic spectrum of *NLGN4X* mutations and suggests that mutations in different regions of the gene might cause variable phenotypes. However, more additional studies are required to confirm the genotype-phenotype correlation.

Acknowledgment

We are grateful to the patients. We thank the team of the Necker University Hospital High-throughput sequencing platform for the technical support in performing X-exome sequencing. This work was supported by the Imagine Foundation (Necker Hospital) and by INSERM U781. We especially appreciated the clinical criticism and advices of Doctor Karim Bengaoua from the ESTREE private hospital.

References

1. Bouazzi H, Leska G, Trujillo C, Alwasayah MK, Munnich A (2015) Nonsyndromic X-linked intellectual disability in three brothers with a novel MED12 missense mutation [c.5922G>T (p.Glu1974His)]. *Clin Case Rep* 3: 604-9.
2. Liu Y, Du Y, Liu W, Yang C, Liu Y, et al. (2013) Lack of association between NLGN3, NLGN4, SHANK2 and SHANK3 gene variants and autism spectrum disorder in a Chinese population. *PLoS One* 8: 10.1371/journal.pone.0056639.
3. Lawson-Yuen A, Saldivar JS, Sommer S, Picker J (2008) Familial deletion within NLGN4 associated with autism and Tourette syndrome. *Eur J Hum Genet* 16: 614-8.
4. Desarkar P, Rajji TK, Ameis SH, Daskalakis ZJ (2015) Assessing and Stabilizing Aberrant Neuroplasticity in Autism Spectrum Disorder: The Potential Role of Transcranial Magnetic Stimulation. *Front Psychiatry* 6: 10.3389/fpsy.2015.00124.
5. Laumonier F, Bonnet-Brilhault F, Gomot M, Blanc R, David A, et al. (2004) X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the neuroligin family. *Am J Hum Genet* 74: 552-7.
6. Jamain S, Quach H, Betancur C, Råstam M, Colinaux C, et al. (2003) Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat Genet* 34: 27-9.
7. Talebizadeh Z, Lam DY, Theodoro MF, Bittel DC, Lushington GH, et al. (2006) Novel splice isoforms for NLGN3 and NLGN4 with possible implications in autism. *J Med Genet* 43: e21.
8. Daoud H, Bonnet-Brilhault F, Védrine S, Demattéi MV, Vourc'h P, et al. (2009) Autism and nonsyndromic mental retardation associated with a de novo mutation in the NLGN4X gene promoter causing an increased expression level. *Biol Psychiatry* 66: 906-10.
9. Kirby KS (1956) A new method for the isolation of ribonucleic acids from mammalian tissues. *Biochem J* 64: 405-8.
10. Kubota T, Nonoyama S, Tonoki H, Masuno M, Imaizumi K, et al. (1999) A new assay for the analysis of X-chromosome inactivation based on methylation-specific PCR. *Hum Genet* 104: 49-55.
11. Marei HE, Ahmed AE, Michetti F, Pescatori M, Pallini R, et al. (2012) Gene expression profile of adult human olfactory bulb and embryonic neural stem cell suggests distinct signaling pathways and epigenetic control. *PLoS One* 7: 10.1371/journal.pone.0033542.
12. Banerjee S, Riordan M, Bhat MA (2014) Genetic aspects of autism spectrum disorders: insights from animal models. *Front Cell Neurosci* 8: 10.3389/fnecel.2014.00058.
13. Cukier HN, Dueker ND, Slifer SH, Lee JM, Whitehead PL, et al. (2014) Exome sequencing of extended families with autism reveals genes shared across neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders. *Mol Autism* 5: 1.
14. Kou Y, Betancur C, Xu H, Buxbaum JD, Máayan A (2012) Network- and attribute-based classifiers can prioritize genes and pathways for autism spectrum disorders and intellectual disability. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 160C: 130-42.
15. Bradley EA, Summers JA, Wood HL, Bryson SE (2004) Comparing rates of psychiatric and behavior disorders in adolescents and young adults with severe intellectual disability with and without autism. *J Autism Dev Disord* 34: 151-61.
16. Warrier V, Chakrabarti B, Murphy L, Chan A, Craig I, et al. (2015) A Pooled Genome-Wide Association Study of Asperger Syndrome. *PLoS One* 10: 10.1371/journal.pone.0131202.
17. Sühs K-W, Skripuletz T, Pul R, Alvermann S, Schwenkenbecher P, et al. (2015) Gilles de la Tourette syndrome is not linked to contactin-associated protein receptor 2 antibodies. *Mol Brain* 8: 10.1186/s13041-015-0154-6.
18. Chih B, Afridi SK, Clark L, Scheiffele P (2004) Disorder-associated mutations lead to functional inactivation of neuroligins. *Hum Mol Genet* 13: 1471-7.

Submit your next manuscript to Annex Publishers and benefit from:

- ▶ Easy online submission process
- ▶ Rapid peer review process
- ▶ Online article availability soon after acceptance for Publication
- ▶ Open access: articles available free online
- ▶ More accessibility of the articles to the readers/researchers within the field
- ▶ Better discount on subsequent article submission

Submit your manuscript at
<http://www.annexpublishers.com/paper-submission.php>



Characterization of Clinical and Neurocognitive Features in a Family with a Novel *OGT* Gene Missense Mutation [c. 1193G>A/ (p. Ala319Thr)]

Habib Bouazzi*, Soufiane Bouaziz, Mohammad.Khalid Alwasiyah, Carlos Trujillo and Arnold Munnich

University Hospital Necker Children, France

Abstract

X-Linked Intellectual Disability (XLID) is an extremely heterogeneous disorder for which many of the causative genes are still unknown. So far, more than one hundred genes of the X chromosome have been found to alter in males manifesting intellectual disability. *OGT* (O-linked N-acetyl-Glucosamine-Transferase) gene is well known to be involved in endocrine alterations by the resistance of insulin in muscles and adipocytes and therefore the initiation of diabetes. It is reported to be involved also in cancer, brain development, and neurodegenerative diseases. However, its implication in chromosome X-Linked Intellectual Disability (XLID) has not been pinpointed until now. In this study, we consider a family of three brothers having a non-syndromic intellectual disability and developmental delay while developing a genetic diagnosis. In the present study, clinical investigations, and medical exams were performed according to the French bioethics law. We performed X-exome sequencing in two patients. Sanger sequencing was accomplished to confirm novel mutations. X-chromosome inactivation was executed in the mother. Affected boys had a severe intellectual disability and mild dysmorphic features. The heterozygous mother had mild cognitive impairment. Her X-chromosome inactivation pattern was not skewed. We identified a novel missense mutation (c. 1193G>A) in the *OGT* gene. This mutation was inherited by the affected males, and it segregated with the abnormal phenotype. It was predicted to be damaging by SIFT (score 0). The mother was heterozygous and the only normal son was not mutated. The pathological phenotype of our patients might be linked to the new missense mutation, however, more similar clinical cases and functional studies are required to conclude the correlation between the genotype and the phenotype.

Keywords: Intellectual disability; *OGT* gene; X exome sequencing; Sanger sequencing; X inactivation; X linked intellectual disability

Introduction

Intellectual disability is a serious and lifelong problem that places heavy demands on society and on the public health services. It is defined by an intellectual quotient (IQ) <70 [1]. A proportion of 3% of the population has an intellectual disability [2] and 10% of intellectual disability in boys is caused by X-linked genes [3]. X-Linked Intellectual Disability (XLID) involves almost 100 genes identified to date and more than 200 syndromes [4,5]. The O-Linked N-acetyl-Glucosamine transferase gene (*OGT*) locates on the Xq13.1 band; it has been reported to regulate proteins involved in chromatin remodeling [6] and target a wide range of intracellular proteins which protect cells from the damaging effects of metabolic stress [7]. Alteration of the *OGT* gene has been linked to diabetes, cancer and neurodegenerative syndromes, including autism and Alzheimer's disease [8,9]. Despite these investigations, no study has examined the possibility of *OGT* being directly involved in intellectual disability. Here we report a novel missense mutation within the *OGT* gene c.1193G>A (Genbank accession number: NM_181672) in a family of three brothers with intellectual disability, and a symptomatic heterozygous mother whose only healthy second son is not mutated in *OGT* gene (Figure 1). This mutation is predicted to be deleterious by SIFT. It was absent from public databases of control individuals (Exome Variant Server, 1000 genomes, dbSNP135, and ExaC) and in > in-house 200 X-exomes of index patients from other XLID families. In this study, we are discussing the pathogenicity of this mutation, we discuss also whether *OGT* could be the cause of the phenotype and therefore, whether *OGT* could be a candidate as new X-Linked intellectual disability gene (XLID).

Patients and Methods

The French family included three affected brothers with severe Intellectual Disability (ID) and one unaffected brother. All family members have been clinically evaluated in the medical genetics center of the Parisian university Necker hospital where they have been followed

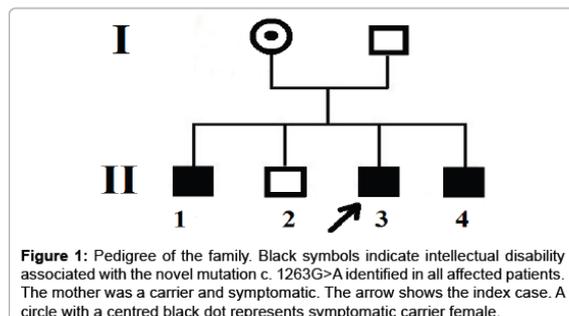


Figure 1: Pedigree of the family. Black symbols indicate intellectual disability associated with the novel mutation c. 1263G>A identified in all affected patients. The mother was a carrier and symptomatic. The arrow shows the index case. A circle with a centred black dot represents symptomatic carrier female.

since 2007. Cognitive assessment was achieved in patient (II-1) and (II-3) using the Wechsler Intelligence Scale Child version four (WISC-IV). Skeletal radiography and brain Magnetic Resonance Imaging (MRI) was performed in patient (II-3). Informed consent for genetic studies was obtained from parents, according to the French bioethics law.

DNA was extracted from peripheral blood using the standard procedure of phenol chloroform method [10]. Purity and concentration were assessed by NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer V3-7

*Corresponding author: Habib Bouazzi, University Hospital Necker Children, France, Tel: +33 1 44 49 40 00; E-mail: habib.bouazzi@etu.parisdescartes.fr

Received October 25, 2015; Accepted December 04, 2015; Published December 11, 2015

Citation: Bouazzi H, Bouaziz S, Alwasiyah MK, Trujillo C, Munnich A (2015) Characterization of Clinical and Neuro-Cognitive Features in a Family with a Novel *OGT* Gene Missense Mutation C. 1193G>A/ (P. Ala319Thr). J Clin Case Rep 5: 656. doi:10.4172/2165-7920.1000656

Copyright: © 2015 Bouazzi H, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Citation: Bouazzzi H, Bouaziz S, Alwasayah MK, Trujillo C, Munnich A (2015) Characterization of Clinical and Neur-Cognitive Features in a Family with a Novel *OGT* Gene Missense Mutation C. 1193G>A/ (P. Ala319Thr). *J Clin Case Rep* 5: 656. doi:10.4172/2165-7920.1000656

Page 2 of 4

(Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). DNA from patients (II-3) and (II-4) was included in a next generation sequencing project for XLID patients in our institute using SOLiD 5500 sequencer (Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Five micrograms of DNA were enriched by micro droplet PCR procedure (Raindance technology, Billerica, MA, USA) to target 11,575 exons. Sorting and calling of SNP/InDel were performed using SAMTOOL and GATK software's. Novelty was assessed by filtering the variants against a set of polymorphisms that are available in public databases such as dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>), 1000 genomes. Only non-synonymous variants or changes affecting splice sites were analyzed. All sequence variants were prioritized by scoring phylogenetic conservation and functional impact (SIFT and Polyphen-2). Candidate variants were selected and confirmed by Sanger sequencing, using the 3500XL Genetic analyzer and the Big Dye cycle sequencing Kit of Applied Biosystem technology. Forward (5'GCATTACCAGCCATTAGGC3') and reverse (5'CTGCTTTCCTCTACTATCATGC3') primers were designed to amplify exon 8 of the *OGT* gene.

X-chromosome inactivation study was carried out in the mother, according to the method of methylation-sensitive PCR and fragment-length analysis of androgen-receptor CAG repeat polymorphism [11]. Karyotype, microarray and Fragile X testing were performed in affected boys prior to exome sequencing.

Results

Case report

The mother: This 40-year-old female had been adopted during childhood. Family history is unknown. Language was delayed. She had no dysmorphism. She attended school until the age of 16. She has performed odd jobs since then. She married a non-relative husband. Three of her four children had developmental delay and ID.

Patient (II-1): This male patient was born at term, after a normal pregnancy. Birth weight was 3.7 kg (+0.7SD), birth height was 50 cm (mean), and birth head circumference was 37 cm (+1.63SD). Apgar score was 10 over 10 minutes. Early psychomotor development was delayed. Walking started after the age of two. At the age of 9 he was still incontinent. He could make a few short sentences. He could eat without help, but needed help for the other daily tasks. He had very poor social interactions. He was restless and aggressive. He had severe myopia. At the age of 9, height was 123.5 cm (-1.33SD), weight was 23 kg (-2SD), Head circumference was 53 cm (mean). IQ was 40. Facial dysmorphic features included a long narrow face, a high forehead with frontal hair upsweep, a high nasal bridge, and a long philtrum. Fingers and toes were long and thin. The nails of the 5th toes were hypoplastic.

Patient (II-2): This 12-year-old male had normal psychomotor development and no dysmorphic features. He followed his schooling suitably.

Patient (III): This male patient was delivered at term, after a normal pregnancy. Birth weight was 3.36 kg (mean), birth height was 48 cm (-1SD), and birth head circumference was 34 (-1SD). Apgar score was 10 over 10 minutes. Head holding was acquired after the age of 6 months, sitting at 14 months, and walking at 36 months. At the age of 7 years, weight was 15.7 kg (-2.3SD), height was 110 cm (-2SD) and the head circumference was 51 cm (+1SD). He was severely intellectually impaired with global IQ below 35. Language skills were limited to 10 words; he had problems and difficulties in performing routine daily living tasks. He had stereotypic movements of hands. He had no other abnormal neurological feature. Dysmorphic features included a long

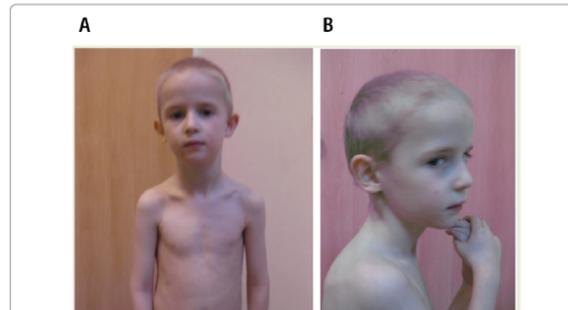


Figure 2: Respectively Facial and profile Photographs of patient II-3. Facial features include long narrow face with a high forehead, frontal hair upsweep, mildly downslanting palpebral fissures, a high nasal bridge, a long philtrum, a small mouth and stereotypic hand movements.

Human	SV AEAE DCYNTALRLC PTHADSL
Mutated sequence	SV AEAE DCYNTLRLC PTHADSL
M. Mulatta	SV AEAE DCYNTALRLC PTHADSL
F. Catus	SV AEAE DCYNTALRLC PTHADSL
M. Musculus	SV AEAE DCYNTALRLC PTHADSL
G. Gallus	SV AEAE ECYNTALRLC PTHADSL
T. Rubripes	NV SEAE ECYNTALRLC PTHADSL
D. Rerio	NV SEAE ECYNTALRLC PTHADSL
C. elegans	SV VEAE QCYN TAL ELC
X. Tropicalis	SV AEAE ECYNTALRLC PTHADSL

Figure 3: The *OGT* protein is highly conserved among all eukaryotes. Alanine in position 319 is well conserved among many species.

narrow face with a high forehead, frontal hair upsweep, mildly downslanting palpebral fissures, flat molar area, a high nasal bridge, a long philtrum, and a small mouth. He was myopic without strabismus (Figure 2a and 2b). His behavior disorders involved hands' stereotype movements and nocturnal awakening. He had a clinodactyly of the fifth finger and a flat foot (Figure 2b and 2c). Furthermore, he did not display any seizure episode. An EEG recording was performed at 7 years old and was normal. Brain MRI, performed at the age of 10 years, and did not reveal any alteration (Figure 3). Metabolic and endocrine analyses were normal. Glycaemia was 0.85 g/L. Lactate 78 mg/L. Insulin fasting was 11 mUI/L. Karyotype and array-CGH did not show any pathogenic chromosomal imbalance.

Patient (IV): This male patient was born at term of an uneventful pregnancy. Apgar score was 10 over 10 minutes. Birth weight was 3.5 kg (mean), birth length was 53 cm (+1.5SD), and birth head circumference was 35 cm (mean). Early psychomotor development was delayed. Walking was achieved at the age of four. He could repeat a few words. At the age 4, cognitive evaluation showed severe ID (performance IQ=30). He was aggressive and restless. He had no obvious dysmorphic features. Karyotype, microarray and X Fragile testing were normal in all the affected males.

Molecular Genetics

Sequencing of X-exome from patients (II-3) and (II-4) identified a single missense mutation (c.1193G>A, Genbank accession number: 181672) that could be considered as potentially pathogenic according

Citation: Bouazzzi H, Bouazzzi S, Alwasayah MK, Trujillo C, Munnich A (2015) Characterization of Clinical and Neur-Cognitive Features in a Family with a Novel *OGT* Gene Missense Mutation C. 1193G>A (P. Ala319Thr). *J Clin Case Rep* 5: 656. doi:10.4172/2165-7920.1000656

Page 3 of 4

to our filters. This mutation was absent from public databases of control individuals (Exome Variant Server, 1000 genome, dbSNP135, and ExaC) and in > in-house 200 X-exomes of index patients from other XLID families. This mutation was confirmed by Sanger sequencing in the three affected boys as well as in the mother, but was absent in the unaffected brother (Figure 1). This substitution was predicted to be deleterious by SIFT software (score: 0). Predictions with Mutation Taster were in favor of a disease-causing variant (p value: 1). X-chromosome inactivation pattern was not skewed in the mother (55%; 45%). The mutation results in a replacement of an Alanine by a threonine (p. Ala319Thr).

Discussion

The family that we studied has four children, three of whom have intellectual disability and one is normal. The mother has had a developmental delay. The clinical feature of our index case patient (II-3) is characterized by a long, narrow face, a high forehead with frontal hair upsweep, a high nasal bridge, and a long philtrum. Fingers and toes were long and thin. The nails of the 5th toes were hypoplastic. He has nocturnal awakenings, a limited speech, as well as difficulties in concentration; stereotypic movements and a delay in acquisitions. Both his skeletal radiography and brain imagery by magnetic resonance were normal, there was no corpus callosum dysgenesis. Neither endocrinological nor metabolic alterations were pointed out. Karyotype, microarray and X Fragile testing were normal in the mother and her affected child.

The *OGT* gene is highly conserved among all eukaryotes which have been examined [12]. Alanine in position 319 is well conserved among many species (Figure 3). *OGT* has been confirmed to be involved in diabetes by the resistance of insulin in adipose and muscle tissue [13]. It has been found to be more highly expressed in the brain than in other tissues [11-15]. Furthermore, many proteins involved in neuronal communications, synaptic transmission, and synaptic plasticity are O-GlcNAcylated [16], suggesting an important role for this modification in brain function. So far, in terms of brain affection, the *OGT* gene has been cited only in Alzheimer's Disease (AD) [9], which is a neurodegenerative alteration. The main signs of AD are characterized by cognitive decline. The initial signs are mostly episodic memory disorders or behavioral problems. It can sometimes be associated with neurological signs [17,18].

Studies suggest that *OGT* signals a key regulatory modification in the brain, contributing to transcriptional regulation, neuronal communication and neurodegenerative disease [19]. Beyond the involvement of *OGT* in chronic human diseases including diabetes, cardiovascular disease, neurodegenerative disorders, and cancer [13,20,21], O-GlcNAcylation was reported to modulate protein phosphorylation and regulates several cellular signaling and functions, mainly in the brain [15].

X-exome sequencing applied to this XLID family brought out one novel missense mutation within *OGT* gene. The mutation (c.955G>A) was confirmed by Sanger sequencing, it segregated with the pathological phenotype in the three affected boys. The healthy son inherited the non-altered allele. The mother was found heterozygous with an inactivation pattern of (55%-45%). This substitution was predicted to be deleterious by SIFT software (score: 0). Predictions with Mutation Taster were in favor of a disease-causing variant (p value: 1)

Up to now, no intellectual disability involvement of *OGT* gene has been highlighted, we are the first to identify a novel deleterious predicted missense mutation (c.1193G>A) in this gene in a family of three brothers with intellectual disability. The novel mutation in this study segregates with the pathological phenotype in all affected patients. *OGT*

gene has been reported to have a direct effect on neuronal development [22]. Although the number of *OGT* gene mutations reported to date has no involvement in Intellectual Disability (ID), in this study, we could suggest that the alteration of *OGT* gene might have an effect on the phenotype of our patients and there could be a genotype, phenotype correlation, however, functional studies with additional cases and large affected families are required to confirm this suggestion. Some limitations of this study involve the size of the family; we could study the transmission of the mutation on several generations, however the family size was limited. There were no similar cases in literature to compare with. Also the gene functional study was not carried out. These data tell us that it is too early to conclude and confirm on the causality of this gene.

Conclusion

The direct effect of *OGT* alteration of brain development has been strongly confirmed nevertheless so far this gene has not been attested to be related to mental disability. We are the first to report on a novel missense mutation within *OGT*, segregating with intellectual disability in a family of three affected brothers without endocrine anomalies. The phenotype of our patients could be linked to the new missense mutation of the *OGT* gene nevertheless, our single case cannot be generalized and despite evidence of *OGT* gene effect on neuronal physiology, and brain development, more studies with additional cases are warranted, to shed light on the cognitive role of the *OGT* gene.

References

- Aicardi J (1998) The etiology of developmental delay. *Semin Pediatr Neurol* 5: 15-20.
- Chelly J, Khelifaoui M, Francis F, Chérif B, Bienvenu T (2006) Genetics and pathophysiology of mental retardation. *Eur J Hum Genet* 14: 701-713.
- Ropers HH (2010) Genetics of early onset cognitive impairment. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 11: 161-187.
- Bouazzzi H, Lesca G, Trujillo C, Alwasayah MK, Munnich A (2015) Nonsyndromic X-linked intellectual deficiency in three brothers with a novel MED12 missense mutation [c.5922G>T (p.Glu1974His)]. *Clin Case Rep* 3: 604-609.
- des Portes V (2013) X-linked mental deficiency. *Handb Clin Neurol* 111: 297-306.
- Howerton CL, Morgan CP, Fischer DB, Bale TL (2013) O-GlcNAc transferase (*OGT*) as a placental biomarker of maternal stress and reprogramming of CNS gene transcription in development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 5169-5174.
- Bullen JW, Balsbaugh JL, Chanda D, Shabanowitz J, Hunt DF, et al. (2014) Cross-talk between two essential nutrient-sensitive enzymes: O-GlcNAc transferase (*OGT*) and AMP-activated protein kinase (AMPK). *J Biol Chem* 289: 10592-10606.
- Liu F, Shi J, Tanimukai H, Gu J, Gu J, et al. (2009) Reduced O-GlcNAcylation links lower brain glucose metabolism and tau pathology in Alzheimer's disease. *Brain* 132: 1820-1832.
- Lazarus MB, Nam Y, Jiang J, Sliz P, Walker S (2011) Structure of human O-GlcNAc transferase and its complex with a peptide substrate. *Nature* 469: 564-567.
- KIRBY KS (1956) A new method for the isolation of ribonucleic acids from mammalian tissues. *Biochem J* 1957: 495-504.
- Kubota T, Nonoyama S, Tonoki H, Masuno M, Imaizumi K, et al. (1999) A new assay for the analysis of X-chromosome inactivation based on methylation-specific PCR. *Hum Genet* 104: 49-55.
- Kreppel LK, Blomberg MA, Hart GW (1997) Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem* 272: 9308-9315.
- Yang X, Ongusaha PP, Miles PD, Havstad JC, Zhang F, et al. (2008) Phosphoinositide signalling links O-GlcNAc transferase to insulin resistance. *Nature* 451: 964-969.

Citation: Bouazzi H, Bouaziz S, Alwasayah MK, Trujillo C, Munnich A (2015) Characterization of Clinical and Neur-Cognitive Features in a Family with a Novel OGT Gene Missense Mutation C. 1193G>A/ (P. Ala319Thr). J Clin Case Rep 5: 656. doi:10.4172/2165-7920.1000656

Page 4 of 4

14. Vosseller K, Trinidad JC, Chalkley RJ, Specht CG, Thalhammer A, et al. (2006) O-linked N-acetylglucosamine proteomics of postsynaptic density preparations using lectin weak affinity chromatography and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 5: 923-934.
15. Liu Y, Li X, Yu Y, Shi J, Liang Z, et al. (2012) Developmental regulation of protein O-GlcNAcylation, O-GlcNAc transferase, and O-GlcNAcase in mammalian brain. *PLoS One* 7: e43724.
16. Zeidan Q, Hart GW (2010) The intersections between O-GlcNAcylation and phosphorylation: implications for multiple signaling pathways. *J Cell Sci* 123: 13-22.
17. Blennow K, Zetterberg H (2015) The past and the future of Alzheimer's disease CSF biomarkers-a journey toward validated biochemical tests covering the whole spectrum of molecular events. *Front Neurosci* 9: 345.
18. Lozano L, Lara-Lemus R, Alvarado-Vásquez N (2014) The mitochondrial O-linked N-acetylglucosamine transferase (mOGT) in the diabetic patient could be the initial trigger to develop Alzheimer disease. *Experimental Gerontology Journal* 198-120.
19. Rexach JE, Clark PM, Hsieh-Wilson LC (2008) Chemical approaches to understanding O-GlcNAc glycosylation in the brain. *Nat Chem Biol* 4: 97-106.
20. Laczky B, Fülöp N, Onay-Besikci A, Des Rosiers C, Chatham JC (2011) Acute regulation of cardiac metabolism by the hexosamine biosynthesis pathway and protein O-GlcNAcylation. *PLoS One* 6: e18417.
21. Caldwell SA, Jackson SR, Shahriari KS, Lynch TP, Sethi G, et al. (2010) Nutrient sensor O-GlcNAc transferase regulates breast cancer tumorigenesis through targeting of the oncogenic transcription factor FoxM1. *Oncogene* 29: 2831-2842.
22. O'Donnel N, Zachara NE, Hart GW, Marth JD (2004) Ogt-dependent X-chromosome-linked protein glycosylation is a requisite modification in somatic cell function and embryo viability. *Mol Cell Biol* 24: 1680-1690.

Citation: Bouazzi H, Bouaziz S, Alwasayah MK, Trujillo C, Munnich A (2015) Characterization of Clinical and Neur-Cognitive Features in a Family with a Novel OGT Gene Missense Mutation C. 1193G>A/ (P. Ala319Thr). J Clin Case Rep 5: 656. doi:10.4172/2165-7920.1000656

OMICS International: Publication Benefits & Features

Unique features:

- Increased global visibility of articles through worldwide distribution and indexing
- Showcasing recent research output in a timely and updated manner
- Special issues on the current trends of scientific research

Special features:

- 700 Open Access Journals
- 50,000 editorial team
- Rapid review process
- Quality and quick editorial, review and publication processing
- Indexing at Pubmed (partial), Scopus, EBSCO, Index Copernicus and Google Scholar etc
- Sharing Option: Social Networking Enabled
- Authors, Reviewers and Editors rewarded with online Scientific Credits
- Better discount for your subsequent articles

Submit your manuscript at: <http://www.omicsonline.org/submission>

Indian J Med Res 143, January 2016, pp 9-15

Novel *ATRX* gene damaging missense mutation c.6740A>C segregates with profound to severe intellectual deficiency without alpha thalassaemia

Habib Bouazzi¹, Seema Thakur², Carlos Trujillo³, Mohammad Khalid Alwasayah⁴ & Arnold Munnich⁵

^{1,5}Hôpital Necker - Enfants Malades. Laboratoire de génétique médicale, Paris, France, ²Department of Genet. & Fetal Medecine, Fortis Hospital, New Delhi, India, ³Erfan & Bagedo Hospital, Genetics Unit, Jeddah, Saudi Arabia & ⁴Aziziah Maternity & Children Hospital, Jeddah, Saudi Arabia

Received February 17, 2014

Background & objectives: *ATRX* is a recessive X-linked intellectual deficiency (X-LID) gene causing predominately alpha-thalassaemia with a wide and clinically heterogeneous spectrum of intellectual deficiency syndromes. Although alpha-thalassaemia is commonly present, some patients do not express this sign despite the *ATRX* gene being altered. Most pathological mutations have been localized in two different major domains, the helicase and the plant homeo-domain (PHD)-like domain. In this study we examined a family of three males having an X-linked mental deficiency and developmental delay, and tried to establish a genetic diagnosis while discussing and comparing the phenotype of our patients to those reported in the literature.

Methods: Three related males with intellectual deficiency underwent clinical investigations. We performed a karyotype analysis, CGH-array, linkage study, and X-exome sequencing in the index case to identify the genetic origin of this disorder. The X-inactivation study was carried out in the mother and Sanger sequencing was achieved in all family members to confirm the mutation.

Results: A novel *ATRX* gene missense mutation (p.His2247Pro) was identified in a family of two uncles and their nephew manifesting intellectual deficiency and specific facial features without alpha-thalassaemia. The mutation was confirmed by Sanger sequencing. It segregated with the pathological phenotype. The mother and her two daughters were found to be heterozygous.

Interpretation & conclusions: The novel mutation c.6740A>C was identified within the *ATRX* gene helicase domain and confirmed by Sanger sequencing in the three affected males as well as in the mother and her two daughters. This mutation was predicted to be damaging and deleterious. The novel mutation segregated with the phenotype without alpha-thalassaemia and with non-skewed X chromosome.

Key words Alpha thalassaemia - *ATRX* - exome sequencing - intellectual deficiency - X inactivation - novel mutation

Alpha-thalassaemia X-linked intellectual disability (ATRX) syndrome first described in 1990¹, is a rare disorder and only about 170 cases have been reported worldwide². Most mutations are gathered in the two major functional domains, the helicase and PHD (plant homeo domain)-like domain³ and are directly linked to ATRX syndrome which often occurs associated with intellectual deficiency, alpha thalassaemia, learning difficulties as well as characteristic facial appearances, hypotonia, and cryptorchidism^{4,5}. However, infrequent protein c-terminal truncation mutations are constantly associated with severe urogenital defects⁶. The clinical spectrum has been protracted to involve phenotypes without alpha thalassaemia⁷, or display a mild mental disability⁸ with non-skewed X-inactivation. In this study, we examined a family with three affected males.

Here we report a novel missense mutation (c.6740A>C) identified by X exome sequencing in exon 31 within the helicase domain of the *ATRX* gene in a family of three affected males in two generations (two brothers and their nephew) with a typical family pedigree of X-linked inheritance pattern and a clinical phenotype marked with intellectual disability, language impairment, prognathism, hypotonia, anteverted nares, large forehead, hypertelorism, open mouth, and a behavioural disorder associated with stereotypy.

Material & Methods

This study was conducted in the department of Molecular Genetics, Medical Genetics Center, Necker Hospital, Paris, France, during 2005-2012. The study was approved by the institutional ethics committee. Three males with severe intellectual deficiency were identified in two generations of the same family. The

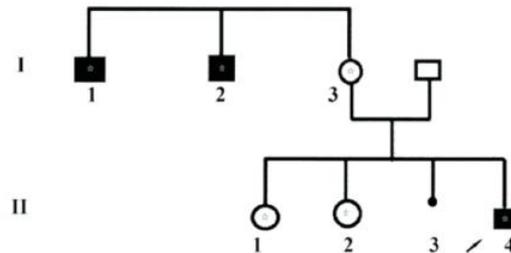


Fig. 1. Pedigree of the family with related affected males. Black boxes indicate intellectual deficiency due to *ATRX* gene mutation. The asterik means that the subject carries the mutation (c. 6740A>C) within the *ATRX* gene. In generation (I), three subjects carried the mutation. In generation (II) the index case is indicated by the arrow (II 4) and both sisters (II-1 and II-2) were heterozygous II-3 is an in utero foetal death (seven months of pregnancy).

proband; patient II-4 (Fig. 1) was the third sibling. He had two non-affected sisters. He had been followed in the Medical Genetics Center in Necker University Hospital of Paris since 2005. He was evaluated at the age of four years with complaints of developmental delay and dysmorphism. Pregnancy was normal. Delivery was at 38 wk of amenorrhoea. His birth weight was 3.76 kg, height 51 cm and head circumference was 34 cm. The mother reported that her son had feeding difficulties. His first smile was at the age of two months, head holding at four months, walked at three years. Till the age seven, speech was absent, and he did not achieve the normal milestones for his age. His weight was 17 kg (-2SD), height 110 cm (-2SD), head circumference was normal. Dysmorphism (Fig. 2 a-c) included a large forehead, hypertelorism, small nose, depressed nasal bridge, anteverted nares, tended upper lip, depressed nasal bridge, anteverted nares, tended upper



Fig. 2. Three photographs (a, b and c) of patient II-4, the images show the phenotype which involves a large forehead, hypertelorism, small nose, depressed nasal bridge, anteverted nares, tended upper lip and averted lower, an open mouth with drooling and a pragmatism.

lip and everted lower, an open mouth with drooling and a prognathism. He has severe hypotonia and stereotypic movements. He was friendly, not aggressive and did not recognize his parents. He needed help to eat and wash. His tendon reflexes were normal. There was no hepatosplenomegaly, no urogenital abnormalities. Electrocardiogram (ECG) was normal and there were no seizures. However, electroencephalogram (EEG) revealed wide slow curve of waking and sleeping.

His two maternal uncles (I-1, I-2), respectively 40 and 42 yr old) had a profound intellectual disability, speech was absent, at that age they were completely dependent upon others for personal care, they could eat alone, but needed help to wash. They were followed in an external center because of their age.

Magnetic resonance imaging (MRI) was performed for the proband (patient II-3) and no abnormalities were found. Serum lactate and ammonia were normal. Iron and magnesium in serum were also normal, however, a slight anaemia was revealed in the index case (proband) and haemoglobin level was 11.5g/100ml with 80 fl of mean corpuscular volume (MCV) indicating microcytosis. Brilliant cresyl blue staining of red blood cells performed in index case did not reveal Heinz bodies (precipitated HbH). This result was subsequently confirmed by HPLC study (Bio-Rad VII Dual Instrument 4, California, USA) and there was no specific peak of haemoglobin H (Fig. 3).

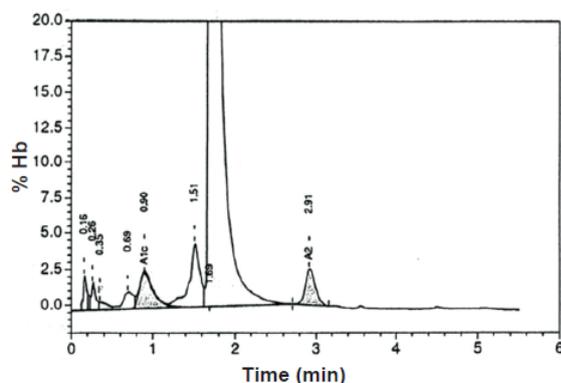


Fig. 3. Elution haemoglobin chromatogram of patient II-3 specimen on Bio-Rad Variant V HPLC System. Time (min) represents the retention time in minutes for each fraction to elute; % Hb represents the percentage of haemoglobin in the elution peak. The retention time for each fraction is shown with the peak. HbA₂ (2.6%) was eluted at a retention time of 2.91, HbF (0.5%) at a retention time of 0.35 min. The two earliest peaks of retention time 0.16 and 0.26 min correspond to HbA_{1a} and HbA_{1b}, respectively.

Haemoglobin A₂ level was 2.6 per cent, HbF was 0.5 per cent and HbA was 96.9 per cent.

Genetic analysis: DNA was extracted from peripheral blood of all family members, excluding the father using the standard procedure of phenol chloroform method⁹. Purity and concentration were assessed by NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer V3-7 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA). A high resolution karyotype and array-CGH (comparative genomic hybridization) were performed in patient II-3 which did not show any chromosomal anomaly. X-chromosome inactivation study was carried out in the mothers (I-3) according to the method of methylation-sensitive PCR and fragment-length analysis of androgen-receptor CAG repeat polymorphism¹⁰. Patient II-3 and his mother were then included in a next generation sequencing project for X-LID patients in our institute using SOLiD 5500 sequencer (Life technologies Grand Island, USA). DNA (5 µg for each patient) was enriched by micro droplet PCR procedure (Raindance technology, Billerica, Massachusetts, USA) to target 11575 exons. Sorting and calling of SNP/InDel were performed using SAMTOOL and GATK softwares (Bioinformatic Programs, USA). Novelty was assessed by filtering the variants against a set of polymorphisms that are available in public databases such as dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>), 1000 genomes (<http://browser.1000genomes.org/in-dex.html>), Exome Variant Server (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), and ExaC (<http://exac.broadinstitute.org/>). Only non-synonymous variants or changes affecting splice sites were analyzed. All sequence variants were prioritized by scoring phylogenetic conservation and functional impact (SIFT and Polyphen-2) and analyzed by Mutation Taster program (Charite-University Berlin, Germany, Europe). Candidate variants were selected and confirmed by Sanger sequencing¹¹, using the 3500XL Genetic analyzer¹² and the Big Dye cycle sequencing Kit of Applied Biosystem technology (Thermo-Fisher scientific, USA).

To sequence exon 31 of *ATRX* gene, forward (GGCTGGTGTACATGTTTGC) and reverse (GCTGAAACCAACCCATAAAGA) primers were designed by Primer3 program (Cambridge, Massachusetts, USA) an online tool to design and analyze primers for PCR, and then were procured from Eurogentec (Belgium, Europe) in Belgium. X-chromosome inactivation study was carried out in the mother¹⁰ (Fig. 1).

Table. Comparison of <i>ATRX</i> gene related disorders		
Major clinical features	Thakur <i>et al</i> ²	Our study
	Mutations	
	c.6718C>T p.Leu2240Phe	c.6740A>C p.His2247Pro
	Exons	
	31	31
Intellectual deficiency	+	+
Behavioural disorders	+	+
Alpha thalassaemia	+	-
No language	+	+
Hypotonia	+	+
Hepatosplenomegaly	+	-
Brisk reflexes	+	+
Small stature	Not cited	+
X-skewed inactivation	+	-
Affected females	-	-
Gastroesophageal reflux	Not cited	+
Cryptorchidism	+	-
Hypertelorism/ telecanthus	+	+
Microcephaly	+	-
Camptodactyly	+	-
Polydactyly	-	-
Micrognathia/ retrognathia	-	-
Prognathism	+	+
Long narrow face	-	-
Triangular face	-	-
Tall prominent forehead	+	+
Facial coarsening	-	-
Frontal hair upsweep	-	-
Thick alae nasi	-	-
High nasal root	+	+
High narrow palate	+	-
Dental crowding	+	-
Maxillary hypoplasia	+	+
Open mouth	+	+
Small ears	-	-
Horizontal palmar creases	-	-
Syndactyly	-	-
Polydactyly	-	-

Results & Discussion

Karyotypes of three patients (I-1, I-2 and II-4) were 46, XY. The high resolution karyotype and the CGH revealed no chromosome aberrations. Inactivation affected 60 and 40 per cent of X-chromosomes. Sequencing of X-exome from patient II-3 and his mother identified a single nucleotide substitution in exon 31 of the *ATRX* gene (Genbank accession number NG_008838) resulting in a substitution of an adenine (A) by a cytosine (c.6740A>C), and led to the substitution of a conserved histidine to a proline (p.His2247Pro). This mutation was not detected in any of the public databases (such as Exome Variant Server, 1000 genomes, dbSNP135) and in >200 X-exomes of index patients from other XLID families. This mutation was confirmed by Sanger sequencing in the three affected males as well as in the mother and her two daughters. This mutation was predicted to be possibly damaging by polyphen-2 with a score of 0.906 (sensitivity: 0.82; specificity: 0.94). It was predicted to be deleterious by SIFT and could affect protein function with a score of 0.02. Predictions with MutationTaster were in favour of a disease causing variant.

There were three affected males in the two generations of the affected family. All females were healthy and heterozygous. Our linkage analysis (not shown) localized the morbid gene in a locus of the X-chromosome (Xq13.1-Xq21.1). The study of this region by Sanger sequencing did not cover the entire length of *ATRX* gene. Only N-terminal region was involved. The absence of clinical signs such as alpha-thalassaemia or urogenital abnormalities had deterred us from going further in *ATRX* gene exploration, and the C terminal region was not analysed.

Linkage study and Sanger sequencing are limited, tedious and often yield false negative results. Therefore, we performed a high throughput X exome sequencing of patient II-3 and his mother that revealed a new variant which was confirmed by Sanger sequencing. Exome sequencing based on next generation technique is a tool for Mendelian disease gene discovery, revealing rare disease-related variants¹³. This technique revealed a substitution of an adenine by a cytosine (c.6740A>C) resulting in a novel missense mutation (p.His2247Pro). This mutation was

found in all affected males, the mother and her two daughters who were heterozygous and asymptomatic. The mother X-chromosome inactivation pattern was not skewed. Heterozygous young sisters have a risk to transmit the genetic disorder to their offspring.

Clinical features of patient II-3 included intellectual deficiency, language delay, prognathism, a severe hypotonia, anteverted nares, large forehead, hypertelorism and a behaviour disorder associated with stereotypy. These signs largely overlap with those reported in *ATRX* related pathological mutations¹⁴ and those reported by Thakur *et al*² who reported a missense mutation c.6718C>T(p.Leu2240Phe) related to the *ATRX* syndrome in the same exon and seven amino acids upstream the mutation similar to this study [c.6740A>C(p.His2247Pro)].

ATRX syndrome is mainly identified by intellectual deficiency, and alpha-thalassaemia⁸. Urogenital abnormality is a common presentation, however, it is not as common as alpha, thalassaemia¹⁵. Usually pathological mutations in the *ATRX* gene are associated with a large and clinically heterogeneous spectrum of X-linked mental deficiency syndromes¹⁶. However, with the advent of next generation sequencing, mutations have been identified resulting in less severe phenotypes lacking one or more of *ATRX* syndrome phenotypic features¹⁷. In this present study, the diagnosis of HbH performed in patient II-3 was based on the haemoglobin H inclusion body stain (brilliant cresyl blue) and the high performance liquid chromatography. The chromatograph showed no early peak at a retention time of less than one minute. Peaks at retention time 0.16 and 0.26 min represented HbA1a and HbA1b, respectively. The fractions HbA₂ and HbF were normal.

In the literature, 90 missense/nonsense pathological mutations within the *ATRX* gene have been reported to date¹⁸. Four of them are located in exon 31 (p.Leu2240Phe, p.Ile2248Thr, p.His2254pro and p. Arg2271Gly). These are pathological and are related to *ATRX* syndrome. Our missense mutation (p.His2247Pro) is the fifth. It is a novel mutation which has not been reported until now. We identified it in exon 31 of *ATRX* gene, adjacent to the known pathological mutation (p.Ile2248Thr) described by Gibbons and colleagues⁶. They reported that the mutation was

associated with intellectual deficiency as well as asplenia⁶. Moreover, Leahy and his team¹⁹ mentioned that the missense mutation (p.Arg2271Gly) in exon 31 was linked to the *ATRX* syndrome. The mutation (p.Leu2240Phe) reported by Thakur *et al*² segregated with similar phenotype compared with our case (Table). Besides, *ATRX* alteration has been reported in intellectual disability, without thalassaemia¹⁶. Tarpey and colleagues²⁰ have reported a case of mental deficiency syndrome without alpha-thalassaemia caused by the mutation (His>Pro) within the exon we studied but at a different position (p.His2254Pro). They described a mentally retarded case with behaviour disorder²⁰.

In the present study, the new mutation was on an exon which belonged to helicase domain where approximately 41 per cent of *ATRX* syndrome causative mutations have been described³ and segregates with the pathological phenotype. We could suggest that the alteration of *ATRX* gene might have an effect on the phenotype of our patients and there could be a genotype-phenotype correlation, however, functional studies with additional cases and large number of affected families are required to confirm this finding.

The limitation of this study included the absence of *ATRX* protein function assessment. Proteomic study should be performed to better understand the effect of the mutation on the protein.

In conclusion, our study describes a novel missense mutation of the *ATRX* gene helicase domain, carried by three affected males of the two generations of the same family and segregated with intellectual deficiency, dysmorphism and behaviour disorder without alpha-thalassaemia and with non-skewed X-chromosome inactivation. The large heterogeneous clinical signs spectrum associated with *ATRX* mutations suggests that this gene has different modes of action in different tissues. Consequently, this novel mutation c.6740A>C may alter *ATRX* gene function and causes variable clinical features.

Acknowledgment

Authors acknowledge the Necker high throughput sequencing platform team for the technical support in performing X-exome sequencing. This work was supported by the Imaging Foundation (Necker Hospital) and INSERM institution Unity 781.

Conflicts of Interest: None.

References

1. Wilkie AO, Zeitlin HC, Lindenbaum RH, Buckle VJ, Fischel-Ghodsian N, Chui DH, *et al.* Clinical features and molecular analysis of the alpha thalassemia/mental retardation syndromes. II. Cases without detectable abnormality of the alpha globin complex. *Am J Hum Genet* 1990; 46 : 1127-40.
2. Thakur S, Ishrie M, Saxena R, Danda S, Linda R, Viswabandya A, *et al.* ATR-X syndrome in two siblings with a novel mutation (c.6718C>T mutation in exon 31). *Indian J Med Res* 2011; 134 : 483-6.
3. Badens C, Lacoste C, Philip N, Martini N, Courier S, Giuliano F, *et al.* Mutations in PHD-like domain of the *ATRX* gene correlate with severe psychomotor impairment and severe urogenital abnormalities in patients with ATRX syndrome. *Clin Genet* 2006; 70 : 57-62.
4. Latiff ZA, Omar SAS, Lau D, Wong SW. Alpha-thalassemia mental retardation syndrome: A case report of two affected siblings. *J Pediatr Neurol* 2013; 11 : 67-70.
5. Gibbons RJ, McDowell TL, O'Rourke DM, Garrick D, Higgs DR. Mutations in *ATRX*, encoding a SWI/SNF-like protein, cause diverse changes in the pattern of DNA methylation. *Nature Genet* 2000; 24 : 368-71.
6. Gibbons RJ, Wada T, Fisher CA, Malik N, Traeger-Synodinos J. Mutations in the chromatin-associated protein ATRX. *Hum Mutat* 2008; 29 : 796-802.
7. Villard L, Toutain A, Lossi AM, Gecz J, Houdayer C, Moraine C, *et al.* Splicing mutation in the *ATR-X* gene can lead to a dysmorphic mental retardation phenotype without alpha-thalassemia. *Am J Hum Genet* 1996; 58 : 499-505.
8. Yntema HG, Poppelaars FA, Derksen E, Oudakker AR, Roosmalen R, van Bokhoven H. Expanding phenotype of XNP mutations: Mild to moderate mental retardation. *Am J Med Genet* 2002; 110 : 243-7.
9. Kirby KS. A new method for the isolation of ribonucleic acids from mammalian tissues. *Biochem J* 1957; 66 : 495-504.
10. Kubota T, Nonoyama S, Wakui K, Tonoki H, Masuno M, Imaizumi K, *et al.* A new assay for the analysis of X-chromosome inactivation based on methylation-specific PCR. *Hum Genet* 1999; 104 : 49-55.
11. Bouazzi H, Bouaziz S, Alwasiyah MK, Trujillo C, Munnich A. Non-syndromic X linked intellectual disability in two brothers with a novel NLGN4X gene splicing mutation (NC_018934.2: g. 1202C>A). *J Case Rep Stud* 2015; 3 : 6.
12. Bouazzi H, Lesca G, Trujillo C, Alwasiyah MK, Munnich A. Nonsyndromic X-linked intellectual deficiency in three brothers with a novel *MED12* missense mutation [c.5922G>T (p.Glu1974His)]. *Clin Case Rep* 2015; 3 : 604-9.
13. Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, Tabor HK, Emond MJ, Nickerson DA, *et al.* Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet* 2011; 12 : 745-55.
14. Abidi FE, Cardoso C, Lossi A-M, Lowry RB, Depetris D, Mattéi M-G, *et al.* Mutation in the 5'alternatively spliced region of the XNP/*ATR-X* gene causes Chudley-Lowry syndrome. *Eur J Hum Genet* 2005; 13 : 176-83.
15. Gibbons R. Alpha thalassaemia-mental retardation, X linked. *Orphanet J Rare Dis* 2006; 1 : 15.
16. Jensen LR, Chen W, Moser B, Lipkowitz B, Schroeder C, Musante L, *et al.* Hybridisation-based resequencing of 17 X-linked intellectual disability genes in 135 patients reveals novel mutations in *ATRX*, *SLC6A8* and *PQBP*. *Eur J Hum Genet* 2011; 19 : 717-20.
17. Basehore M, Michaelson CR, Levy-lahad R, Sismani C, Bird L, Friez MJ. Alpha-thalassemia intellectual disability: variable phenotypic expression among males with a recurrent nonsense mutation – c.109C>T (p.R37X). *Clin Genet* 2015; 87 : 461-6.
18. HGMD mutation result. Available from: <http://hgmdtrial.biobase-international.com/hgmd/pro/everymut.php>, accessed on January 4, 2016.
19. Leahy R, Philip R, Gibbons RJ, Fisher C, Suri M, Reardon W. Asplenia in ATR-X syndrome: a second report. *Am J Med Genet* 2005; 139 : 37-9.
20. Tarpey PS, Smith R, Pleasance E, Whibley A, Edkins S, Hardy C, *et al.* A systematic, large-scale resequencing screen of X-chromosome coding exons in mental retardation. *Nat Genet* 2009; 41 : 535-43.

Reprint requests: Dr Habib Bouazzi, Hôpital Necker - Enfants Malades. Laboratoire de génétique médicale, Unité INSERM U781
Tour Lavoisier - 3ème étage, 149 rue de Sèvres 75743, Paris cedex 15, France
e-mail: habib.bouazzi@neuf.fr

