



**HAL**  
open science

# Approche génétique des déficiences intellectuelles : Contributions physiopathologiques et corrélations génotypes-phénotypes

Orianne Philippe

► **To cite this version:**

Orianne Philippe. Approche génétique des déficiences intellectuelles : Contributions physiopathologiques et corrélations génotypes-phénotypes. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2012. Français. NNT : 2012PA05T042 . tel-00789412

**HAL Id: tel-00789412**

**<https://theses.hal.science/tel-00789412>**

Submitted on 18 Feb 2013

**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.

*Thèse de Doctorat de l'université Paris Descartes*

Ecole doctorale : GC2ID  
Spécialité : Génétique moléculaire des maladies du développement  
Labotoire d'accueil : Unité Inserm S\_U781

Présentée par Orianne PHILIPPE

*Approche génétique des déficiences intellectuelles  
Contributions physiopathologiques et corrélations génotypes-  
phénotypes*

Soutenue le 19 novembre 2012, devant le jury composé de :

Professeur Arnold MUNNICH  
Docteur Laurent VILLARD  
Docteur Barbara BARDONI  
Professeur Nathalie BODDAERT  
Professeur Loïc De PONTUAL  
Docteur Laurence COLLEAUX

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Directeur de thèse

*A mes parents*

*Pour votre soutien et votre présence  
Vous m'avez patiemment conduit et conseillé durant ce long  
parcours et grâce à vous je me réalise de jour en jour....*

# Sommaire

<b>Remerciements</b> .....	- 6 -
<b>Index des figures</b> .....	- 10 -
<b>Index des tables</b> .....	- 11 -
<b>Abréviations</b> .....	- 12 -
<b>Liste des publications</b> .....	- 13 -
<b>Introduction</b> .....	- 14 -
<b>1) Définitions et classifications des déficiences intellectuelles</b> .....	- 18 -
<b>2) Etiologie des déficiences intellectuelles</b> .....	- 20 -
2.1) Causes environnementales des DI.....	- 20 -
2.2) Causes génétiques des DI.....	- 22 -
2.2.1) Anomalies chromosomiques et DI.....	- 22 -
2.2.2) Formes monogéniques de DI.....	- 28 -
2.2.2.1) Transmission des formes autosomique dominante de DI.....	- 28 -
2.2.2.2) Déficiences intellectuelles liées au chromosome X.....	- 30 -
2.2.2.3) Formes autosomiques récessives des DI.....	- 36 -
<b>3) Objectifs des travaux</b> .....	- 41 -
<b>Partie 1 : Identification d'anomalies génétiques impliquées dans les déficiences intellectuelles autosomiques récessives</b> .....	- 43 -
<b>Chapitre 1) Evaluation de l'intérêt de combiner cartographie primaire et analyse transcriptomique pour identifier des gènes impliqués dans des DI-AR : preuve de concept</b> -	- 44 -
<b>Chapitre 2) Anomalies du complexe AP4 responsables d'une DI sévère et syndromique ...</b> -	- 48 -
1) Evaluation clinique des patients Ja (ID01) .....	- 48 -
2) Cartographie par autozygotie couplée à une étude transcriptomique .....	- 49 -
2.1) Cartographie par autozygotie de la famille Ja. ....	- 49 -
2.2) Analyse transcriptionnelle de la famille Ja. ....	- 50 -
3) Identification de mutations touchant les sous-unités du complexe AP4 .....	- 51 -
3.1) Etude de gènes candidats dans la famille Ja. ....	- 51 -
3.2) Autres mutations touchant le complexe AP4.....	- 54 -
3.3) Anomalies du complexe AP4 dans la littérature.....	- 55 -
4) Etude génétique de la famille Ta. ....	- 57 -
5) Discussion .....	- 61 -
5.1) Le point sur les différents complexes AP.....	- 61 -
5.2) Mutations rapportées dans les autres complexes AP.....	- 64 -
5.3) Protéines cargos du complexe AP4 : TARP et APP.....	- 65 -
6) Conclusions et perspectives .....	- 67 -
6.1) Conclusions de l'étude .....	- 67 -
6.2) Perspectives .....	- 68 -
<b>Article 1</b> .....	- 70 -
<b>Chapitre 3 : Contribution des anomalies de la voie NF-<math>\kappa</math>B à l'étiologie des déficiences intellectuelles : TRAPPC9 un nouvel acteur</b> .....	- 71 -
1) Evaluation clinique des patients .....	- 71 -
2) Cartographie par autozygotie et analyse transcriptomique.....	- 72 -
2.1) Cartographie par autozygotie de la famille BM.....	- 72 -
2.2) Analyse transcriptomique de la famille BM. ....	- 73 -
3) Fonctions de la protéine TRAPPC9 .....	- 75 -
3.1) Les voies NF- $\kappa$ B.....	- 75 -



3.2) TRAPPC9 : acteur des voies NF-κB .....	- 78 -
4) TRAPPC9 : conséquences fonctionnelles des mutations identifiées.....	- 78 -
4.1) Impact sur l'expression de TRAPPC9.....	- 78 -
4.2) Incidences sur la voie NF-κB. ....	- 79 -
4.2.1) Dégradation des protéines inhibitrice IκB-α.....	- 81 -
4.2.2) Quantification du gène cible BIRC3.....	- 81 -
5) Autres anomalies géniques de <i>TRAPPC9</i> .....	- 82 -
6) Discussion .....	- 85 -
6.1) TRAPPC9 : une sous-unité du complexe TRAPP .....	- 85 -
6.2) TRAPPC9, voies NF-κB et SNC.....	- 87 -
7) Conclusions et perspective .....	- 89 -
7.1) Conclusions de l'étude .....	- 89 -
7.2) TRAPPC9 spécifique du SNC ? .....	- 91 -
7.3) Perspectives .....	- 92 -
7.3.1) Tests fonctionnels complémentaires de la voie NF-κB.....	- 92 -
7.3.2) Test de sensibilité à l'apoptose. ....	- 92 -
7.3.3) Recherche de patients candidats. ....	- 94 -
<b>Article 2.....</b>	<b>- 95 -</b>
<b>Partie 2 : Constitution d'une cohorte de patients présentant une DI sévère avec dissociation des séquences T2/FLAIR pour les anomalies de la substance blanche .....</b>	<b>- 96 -</b>
<b>Chapitre 1) Recrutement d'une famille atteinte de déficience intellectuelle sévère et d'une dissociation T2/FLAIR : la famille San.....</b>	<b>- 97 -</b>
1) Description clinique de la famille San.....	- 97 -
2) Analyse de la séquence de <i>TRAPPC9</i> .....	- 98 -
3) Analyse de l'ADNc de <i>TRAPPC9</i> chez le patient San.....	- 99 -
4) Conséquence(s) fonctionnelle(s) de la surexpression de <i>TRAPPC9</i> chez le patient San.....	- 102 -
4.1) Analyse de l'expression de TRAPPC9 .....	- 102 -
4.2) Quantification de la transcription de <i>BIRC3</i> sous stimulation au TNFα.....	- 102 -
5) Conclusions et perspectives pour la famille San. ....	- 103 -
5.1) Conclusions de l'étude .....	- 103 -
5.2) Perspectives .....	- 104 -
<b>Chapitre 2) Corrélation génotype/phénotype d'une cohorte de patients avec dissociation T2/FLAIR .....</b>	<b>- 106 -</b>
1) Evaluations cliniques des patients recrutés sur la base d'une discordance T2/FLAIR.....	- 106 -
2) Le syndrome de la duplication <i>MECP2</i> .....	- 107 -
3) Analyse rétrospective de patients présentant une duplication <i>MECP2</i> .....	- 110 -
4) Duplication d' <i>IKBKG</i> chez les patients présentant une anomalie de la substance blanche.....	- 112 -
5) Réarrangements complexes du locus Xq28 : symptômes et IRM .....	- 112 -
6) Conséquences de la duplication <i>MECP2/IKBKG</i> .....	- 115 -
6.1) Quantification des transcrits <i>MECP2</i> et <i>IKBKG</i> chez le patient J.C .....	- 115 -
6.2) Quantification du transcrit <i>BIRC3</i> sous stimulation au TNFα.....	- 116 -
6.3) Impact de l'excès d' <i>IKBKG</i> sur l'activité de la voie NF-κB.....	- 116 -
7) Conclusions et perspectives .....	- 118 -
7.1) Conclusions de l'étude .....	- 118 -
7.2) Myélinisation du SNC : le point.....	- 119 -
7.2.1) Anomalies de la myéline.....	- 119 -
7.2.2) Mise en place de la myéline : SNC et SNP.....	- 120 -
7.3) Perspectives .....	- 121 -
<b>Article 3.....</b>	<b>- 124 -</b>
<b>Discussion et conclusions générales.....</b>	<b>- 125 -</b>
<b>1) Les stratégies utilisées .....</b>	<b>- 126 -</b>
1.1) La cartographie par autozygotie .....	- 126 -
1.2) Du locus au gène .....	- 127 -
1.2.1) Stratégie du gène candidat.....	- 127 -
1.2.2) Analyses transcriptomiques.....	- 127 -

1.2.3) Les nouvelles approches de séquençage à haut-débit .....	- 129 -
1.3) Identification de variants pathogènes et validations : <i>TRAPPC9</i> et complexe AP4.....	- 133 -
<b>2) Description clinique des patients : le point clé .....</b>	<b>- 134 -</b>
<b>3) Deux mécanismes physiopathologiques responsables de DI .....</b>	<b>- 135 -</b>
3.1) Trafic cellulaire des récepteurs au glutamate .....	- 135 -
3.1.1) Défaut de prise en charge du glutamate dans le SNC.....	- 135 -
3.1.2) Récepteurs au glutamate : le point.....	- 136 -
3.1.3) Complexe AP et plasticité synaptique .....	- 137 -
3.2) <i>TRAPPC9</i> : voie NF- $\kappa$ B, SNC et myélinisation.....	- 138 -
3.2.1) Importance de nos travaux : <i>TRAPPC9</i> et duplication <i>IKBK</i> G .....	- 138 -
3.2.2) Défauts de la voie NF- $\kappa$ B et pathologies humaines.....	- 139 -
3.2.3) NF- $\kappa$ B et SNC : le point .....	- 143 -
3.2.4) <i>TRAPPC9</i> : Voie nf- $\kappa$ B et Myéline.....	- 145 -
<b>4) Conclusions générales.....</b>	<b>- 146 -</b>
<b><i>Matériels et Méthodes</i> .....</b>	<b>- 148 -</b>
<b><i>Bibliographie</i> .....</b>	<b>- 158 -</b>

REMERCIEMENTS

*Les remerciements... la meilleure partie de la thèse ! Du moins, une partie qui m'est chère et par laquelle je souhaite remercier toutes les personnes ayant participé, de près ou de loin à ce travail, sans qu'il n'aurait pu aboutir, ainsi que toutes celles m'ayant soutenues.*

*Je souhaite tout d'abord remercier l'école doctorale GC2ID qui m'a accordé un financement pour mener à bien ces projets de recherche ainsi que Michèle PITTE secrétaire de l'école doctorale qui a su me guider pour toutes les démarches administratives de ces dernières années.*

*Je tiens à remercier le Professeur Arnold MUNNICH pour m'avoir accueilli au sein de son unité de génétique médicale, pour son soutien et pour m'avoir accordé sa confiance. Je souhaite aussi remercier vivement Laurence COLLEAUX, ma directrice de thèse pour m'avoir accompagné et guidé tout au long de ce travail. Les rebondissements scientifiques ont plutôt été positifs et nous ont conduits sur des projets totalement imprévisibles mais fort intéressants. Je garderai en mémoire la richesse et la variété de ces projets pour lesquels ça a été un vrai plaisir de travailler.*

*J'adresse mes sincères remerciements à l'ensemble des membres du jury. Merci à mes deux rapporteurs Docteur Laurent VILLARD et Docteur Barbara BARDONI, et aux examinateurs Professeur Nathalie BODDAERT et Professeur Loïc De-PONTUAL de me faire l'honneur de bien vouloir juger mon travail.*

*Merci aux enseignants qui m'ont accompagné et conseillé pendant ces trois années de monitorat, riche en apprentissage. Je pense tout particulièrement à Frédéric FUMERON et Chrystèle RACINE. Vous m'avez fait découvrir la passion de l'enseignement mais aussi combien ce métier est difficile.*

*J'ai eu la chance d'avoir rencontré des personnes géniales, au cours de ces quatre dernières années et autant que possible je vais essayer de n'oublier personne.*

*Je pense aussi à l'équipe des brancardiers de Necker, confronter à la dure réalité des hôpitaux à chaque instant et qui doivent faire preuve d'un mental d'acier.*

*Je n'oublie pas Bertrand que je ne remercierai jamais assez pour nous rendre la vie plus facile au quotidien et pour ses services qu'il est toujours prêt à rendre... Ne change rien, mis à part peut être tes compositions de tes sandwich parfois... inédites !*

*Merci aux secrétaires qui nous ont aussi beaucoup aidés dans nos nombreuses démarches de thésard, Nathalie LE ROUX et Monique !*

*Merci à toutes les équipes de Necker, ça a été un vrai plaisir de travailler avec vous ou à vos côtés ! Toutes ces équipes aux noms.... originaux : les Moux, avec la célèbre Anna, entre tes coups de gueule (souvent positifs) et tes précieux conseils, tu es une personne incontournable de ce labo ! L'Embryo, notamment à Alexandra pour tes conseils sur les micro-ARNs et ta bonne humeur ! Les Durs, Nabil et Emilie les jeunes parents de Necker qui m'ont apporté conseils et soutien... A Joyce, grâce aux nombreuses conversations que nous avons eu sur la thèse et l'après thèse, tu m'as fait découvrir le métier d'ARC, ce vers quoi je m'oriente... Je ne connais pas l'avenir, mais peut être m'as-tu mis sur la voie de mon destin... je te souhaite aussi plein de réussite, tu en veux et tu as beaucoup de mérite ! A la Mito et à Agnès en particulier pour ta sincérité.*

*J'adresse aussi de chaleureux remerciements à l'équipe de l'œil ! Nathalie et Michael, des supers collègues ! On s'est bien serré les coudes pour cette sacrée responsabilité que nous avons eu sur l'entretien des séquenceurs ! A Isa pour sa bonne humeur permanente ! A Franckounet des bois, une rencontre de courte durée mais j'en garde un très bon souvenir ! Merci à Lucas (Lucky pour les intimes) pour tous ces bons moments que tu nous as fait vivre, on s'est suivi pendant ces 4 années, on s'est confié, et j'ai découvert ce qu'est l'accent argentin (prononcé) ! J'adresse un énorme merci à Sylvain ! Pour tous tes conseils aussi bien scientifiques que personnels tout au long de ma thèse, pour tes précieuses relectures et ce que tu nous as apporté pour Josse !*

*J'adresse également un merci très chaleureux à l'équipe des IP ! A Asma et tes réflexions scientifiques sur la voie NF-κB, mais aussi pour la personne humaine que tu es. Merci à la petite jeunette Cindy, du haut de tes 22 ans tu es déjà une sacrée tite gonzesse pleine de maturité et j'ai beaucoup aimé te découvrir et connaître ! Merci à Jérémie (mon faux-frère), on est né le même jour, le même mois, la même année dans le même département... j'ai rencontré ta femme (géniale au passage)... j'ai suivi la naissance de tes deux filles Eléonore et Aelys... j'ai apprécié ta présence et nos petites conversations dans la salle BET, sur tout et rien, mais surtout sur les nombreux potins du labo (bon Cindy t'a un peu détrôné après) ! J'adresse un merci tout spécialement pour toi ma loute... et oui ça fait déjà 12 ans (oui oui 12 ans !!) que l'on se connaît et que l'on partage nos passions, notre métier, notre amitié. On en a parcouru du chemin ensemble et j'espère que nous nous suivrons encore longtemps (nous aussi on en a eu des conversations dans la salle BET) !*

*Enfin, un grand merci à mon équipe RM ! A Florence MOLINARI qui m'a formé au cours de mon M2. A Momo, un être au grand cœur avec qui j'ai eu plaisir à travailler. A Sarah avec qui je garde en mémoire de bons moments de rigolades et de confidences, et malgré ton départ au Canada, nous restons en contact, je tiens aussi à te remercier pour tes relectures, ton aide et le soutien que tu as su m'apporter à de nombreuses reprises ces dernières années. Un énorme merci à Hélène (Honey H (pour les intimes) !)... que dire pour résumer ces superbes moments de délires... GAGAA (Romama Ah Ah), Bip-bip, t'assure chaussures, tu gères fougères, tout petit (avec ton accent)... Et bien d'autres encore, mais aussi merci pour ton soutien, tes conseils et tes nombreux encouragements ! Je te souhaite un bel avenir, il a bien commencé... Merci aux nouvelles collègues Karine, Maeva et Giulia et à vos présences agréables, ça a été un plaisir de bosser avec vous ! Merci à Anne PHILIPPE pour tes précieux conseils sur mon manuscrit, pour ton savoir et ta douceur... t'écouter en réunion d'équipe est un vrai bonheur !*

*Merci aux autres personnes qui ont participé aux relectures et m'ont conseillé sur mon manuscrit Marlène RIO et Valérie MALAN.*

*Merci à Yves de Keyser, pour m'avoir conseillé, guidé pendant ces trois années de thèse. Très sincèrement tu as été mon second mentor et j'ai vraiment appris à travers nos nombreuses conversations scientifiques, certes, mais pas que... j'ai également découvert Win Delvoye ! et ça vaut le détour ! Merci encore...*

*Merci à mon groupe préféré de Morues, Julie, Laura, Marie et Tiama. Je suis très heureuse de vous avoir rencontrées il y a 5 ans maintenant, d'avoir fondé le clan des morues avec vous, d'avoir vécu à vos côtés des moments inoubliables, sans compter sur (tous) nos weekends morues free style que nous avons passé ces trois dernières années et qui ont toujours été une bouffée d'air frais, de légèreté et de bonheur... Merci pour tous ces supers instants !*

*Un grand merci à ma famille, ma grand-mère Rolande, mon oncle Olivier, mes tantes, mes cousines, mes cousins pour votre présence et pour tous ces bons moments familiaux passés en votre compagnie !*

*A mes grands-parents absents Edith, Christian et Jacques, j'aurais tant aimé que vous soyez là à mes côtés pour vivre l'aboutissement de ces longues années d'étude, mais aussi la naissance de mon fils, et tant d'autres moments... Vous me manquez...*

*Un gigantesque merci, bien sûr, à mes parents Véronique et Didier (Did !) pour leur aide, leur soutien, leurs encouragements, je n'y serais jamais arrivé sans vous... Un petit rab pour ma mère qui a réussi à « se taper » presque toute ma thèse pour relecture de français (Chapeau !) ! A petit fréro Maxime, entre nous on se comprend tellement bien, nos conversations peuvent durer trois heures pour au final pas beaucoup de contenu, juste parce que ça part dans tous les sens ! Tu me comprendras j'en suis sûre ! Merci pour tous ces moments d'insouciance ! T'es un frère génial !*

*Un merci tout particulier à Cyril, mon partenaire de vie, mon conjoint, mon pacsé, le père de mon enfant... Merci d'avoir été présent pour moi dans cette aventure pleine de rebondissements, d'avoir traversé les bons comme les mauvais moments... Merci pour tes conseils, ta présence, ton amour... Merci pour cette incroyable expérience que nous vivons, d'être parents, merci pour notre enfant, notre petite merveille, nous pouvons être fiers de nous !*

*Mes derniers remerciement vont à mon fils Josse... c'est bien malgré lui, celui qui a été au plus proche de moi pendant la fin de ce travail de doctorat, et pendant l'écriture du manuscrit. Merci d'avoir été un bébé agréable à vivre, de m'avoir donné autant de courage... Mais surtout merci d'être là et de m'apporter autant de bonheur !*

# INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Distribution gaussienne du QI dans la population général .....	- 19 -
Figure 2a : Représentation graphique des gènes impliqués dans les formes non- syndromiques de déficiences intellectuelles liées au chromosome X, et leur localisation génomique. ....	- 32 -
Figure 2b : Représentation graphique des gènes impliqués dans les formes syndromiques de déficiences intellectuelles liées au chromosome X, et leur localisation.....	- 34 -
Figure 3 : Représentation en diagramme de la localisation et de la fonction des protéines dont les mutations sont responsables de DI-LX.....	- 35 -
Figure 4 : Méthode de la cartographie par autozygotie .....	- 38 -
Figure 5 : Représentation des loci identifiés dans le cadre des formes autosomiques récessives de déficiences intellectuelles. ....	- 40 -
Figure 6 : Représentation graphique des résultats de la cartographie par autozygotie de la famille Ja. ....	- 49 -
Figure 7 : Arbre généalogique de la famille Ja montrant les bornes de la région du chromosome 1. ....	- 50 -
Figure 8 : Représentation graphique des données transcriptomiques au niveau de la région du chromosome 1 chez la patiente IV.2.....	- 51 -
Figure 9 : Représentation des quatre premiers complexes AP identifiés.....	- 54 -
Figure 10 : Anomalie à l'IRM d'un patient présentant une mutation d'AP4MI .....	- 56 -
Figure 11 : Description de la famille Ta.....	- 60 -
Figure 12 : Représentation du complexe AP2 dans son action.....	- 62 -
Figure 13 : Neurones de l'hippocampe chez une souris contrôle comparés à une souris AP-4 $\beta$ <sup>-/-</sup> .....	- 66 -
Figure 14 : Deux enfants de la famille BM atteints de DI .....	- 71 -
Figure 15 : Analyse génétique et transcriptomique de la famille BM.....	- 74 -
Figure 16 : Voies NF- $\kappa$ B principale et alternative .....	- 77 -
Figure 17 : voies de l'apoptose.....	- 80 -
Figure 18 : Quantification de l'ARNm BIRC3 sous stimulation au TNF $\alpha$ .....	- 82 -
Figure 19 : Les complexes TRAPP chez la levure et chez les mammifères.....	- 86 -
Figure 20 : Mutations de TRAPPC9.....	- 91 -
Figure 21 : Dissociation T2/FLAIR à l'IRM chez le patient San. ....	- 97 -
Figure 22 : Électrophoregrammes des exons 1 et 4 de TRAPPC9 chez la famille San. ....	- 99 -
Figure 23 : RACE-PCR du gène TRAPPC9 chez le patient San.....	- 100 -
Figure 24 : RT-PCR en temps réel réalisée sur le transcrit TRAPPC9 chez le patient San. ....	- 101 -
Figure 25 : Western Blot avec un anticorps dirigé contre la protéine TRAPPC9. ....	- 102 -
Figure 26 : Quantification de l'ARNm BIRC3 suite à une stimulation au TNF $\alpha$ chez le patient San.....	- 103 -
Figure 27 : IRM des patients J.C et L.P comparées à leurs contrôles respectifs.....	- 107 -
Figure 28 : IRM des patients J.C, L.P et V.L et de deux contrôles. ....	- 111 -
Figure 29 : Quantification des ARNm d'IKBKG et de MECP2 chez le patient J.C.....	- 115 -
Figure 30 : Quantification de l'ARNm BIRC3 suite à une stimulation au TNF $\alpha$ chez le patient J.C .....	- 116 -
Figure 31 : Quantification de la voie NF- $\kappa$ B après stimulation au TNF $\alpha$ (5h).....	- 118 -

## INDEX DES TABLES

<i>Table 1 : Caractéristiques développementales en fonction du niveau de déficience intellectuelle.....</i>	<i>- 19 -</i>
<i>Table 2 : Principaux syndromes avec DI, cliniquement reconnaissables, impliquant des anomalies de CNV récurrentes.....</i>	<i>- 24 -</i>
<i>Table 3 : Description clinique et génétique du syndrome d'Angelman et de Prader-Willi.....</i>	<i>- 27 -</i>
<i>Table 4 : Gènes identifiés dans les formes autosomiques dominantes de déficiences intellectuelles non spécifiques.....</i>	<i>- 30 -</i>
<i>Table 5 : Gènes impliqués dans les déficiences intellectuelles non syndromiques de forme autosomique récessive.....</i>	<i>- 39 -</i>
<i>Table 6 : Gènes candidats séquencés chez la famille Ja.....</i>	<i>- 53 -</i>
<i>Table 7 : Description clinique des patients mutés pour AP4B1.....</i>	<i>- 59 -</i>
<i>Table 8 : Ratios des 3 sondes de TRAPPC9 du patient BM et des 3 contrôles.....</i>	<i>- 74 -</i>
<i>Table 9 : Résumé des signes cliniques observés chez les patients mutés pour TRAPPC9.....</i>	<i>- 90 -</i>
<i>Table 10 : Nature et fréquence des différents signes cliniques observés chez les patients porteurs de la duplication MECP2.....</i>	<i>- 109 -</i>
<i>Table 11 : Gènes impliqués dans des désordres cognitifs et mis en évidence par l'approche de l'exome sur une cohorte de 138 familles.....</i>	<i>- 132 -</i>
<i>Table 12 : Description des pathologies de la voie NF-<math>\kappa</math>B.....</i>	<i>- 141 -</i>



## ABREVIATIONS

aa: acide amine  
ADN : Acide Desoxyribonucléique  
ADNc : ADN complémentaire  
AMPA : Récepteur AMPA  
ARN : Acide Ribonucléique  
ARNInc : ARN long non codant  
Ca: Calcium  
CGH-array: Comparative Genomic Hybridization-Array  
CNV : Copy Number Variant  
DD : Developmental Delay  
DI : Déficience intellectuelle  
DI-AD: forme autosomique dominante des déficiences intellectuelles  
DI-AR : Formes autosomiques récessives de déficiences intellectuelles.  
DI-LX : Forme liée au chromosome X de déficience intellectuelle  
DI-NS : Déficiences intellectuelles non syndromiques  
DI-S: Déficiences intellectuelles syndromiques  
DSM-IV : Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (version IV)  
EDTA : acide éthylène diamine tétracétique  
FAS : Fetal Alcohol Syndrome  
FISH : Fluorescent In Situ Hybridization  
HCl : Chlorure d'hydrogène  
IRM: Imagerie par Résonance Magnétique  
LTD : long term depression  
LTP: long term potentiation  
MBD : Methyl Binding Domain  
MgCl<sub>2</sub> : Chlorure de magnésium  
Mg : Magnésium  
MiR : microARN  
NaCl : Chlorure de Sodium  
NMDAR : Récepteur NMDA  
Nt : nucléotides  
OMIM : Online Mendelian Inheritance in Man  
PFA : paraformaldéhyde  
PSS : Phosphate Buffered Saline  
QI: quotient intellectuel  
RE: Reticulum Endoplasmique  
RT-PCR : reverse transcription-polymerase chain reaction  
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate  
SNC : système nerveux central  
SNP : single Nucleotide polymorphism  
TA : Température ambiante  
TED : trouble envahissant du développement  
TM : temperature melting  
TNF: Tumor Necrosis Factor  
TOC : troubles obsessionnels compulsifs  
TRAPP: Transport Protein Particle  
TSA : trouble du spectre autistique  
UTR : untranslated Region  
Xi : Chromosome X inactif.

## LISTE DES PUBLICATIONS

Article 1 - Abou Jamra R, **Philippe O**, Raas-Rothschild A, Eck SH, Graf E, Buchert R, Borck G, Ekici A, Brockschmidt FF, Nöthen MM, Munnich A, Strom TM, Reis A, Colleaux L. Adaptor protein complex 4 deficiency causes severe autosomal-recessive intellectual disability, progressive spastic paraplegia, shy character, and short stature. *Am J Hum Genet.* 2011 Jun 10;88(6):788-95. Epub 2011 May 27. PubMed PMID: 21620353; PubMed Central PMCID: PMC3113253.

Article 2 - **Philippe O**, Rio M, Carioux A, Plaza JM, Guigue P, Molinari F, Boddaert N, Bole-Feysot C, Nitschke P, Smahi A, Munnich A, Colleaux L. Combination of linkage mapping and microarray-expression analysis identifies NF-kappaB signaling defect as a cause of autosomal-recessive mental retardation. *Am J Hum Genet.* 2009 Dec;85(6):903-8. PubMed PMID: 20004764; PubMed Central PMCID: PMC2795800.

Article 3 – **Philippe O**, Rio M, Malan V, Van Esch H, Baujat G, Bahi-Buisson N, Valayannopoulos V, Gesny R, Bonnefont JP, Munnich A, Froyen G, Amiel J, Boddaert N, Colleaux L. NF-kB signalling requirement for brain myelin formation is shown by genotype/MRI phenotype correlations in patients with Xq28 duplications. *Eur J Hum Genet.* 2012 Jul 18 doi: 10.1038/ejhg.2012.140. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22805531.

**(En cours d'écriture) Adaptor-related protein complex 4, beta 1 subunit (AP4B1): a new player in autosomal recessive mental retardation syndrome**<sup>1</sup> Raas-Rothschild Annick, <sup>2</sup> Andrews Jamil, <sup>3</sup> Philippe Oriane, <sup>3</sup> Colleaux Laurence, <sup>4</sup> Jalas Chaim, <sup>1</sup> Bargal Ruth. <sup>1</sup> Monique and Jacques Roboh Department of Genetic Research and The Department of Human Genetics and Metabolic diseases, Hadassah Hebrew University Medical Center. Jerusalem, Israel. <sup>2</sup> Erwin-Green child development center; Pediatric department Saint-Vincent Hospital Nazareth; Ruth and Bruce Rappaport Faculty of medicine; Technion ; Haifa; Israel. <sup>3</sup> INSERM U781, Département de Génétique Fondation IMAGINE, Université Paris Descartes, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France. <sup>4</sup> Bonei Olam, Center for Rare Jewish Genetic Disorders, Brooklyn, NY, USA.

# INTRODUCTION

L'étymologie du mot génétique vient du terme grec « genno » qui signifie « donner naissance ». Elle est définie comme « une science de l'hérédité, qui concerne les gènes, et dont les premières lois ont été dégagées par Mendel en 1865<sup>1</sup> ». Aujourd'hui, la génétique est un outil incontournable dans de nombreux domaines biologiques et une étape essentielle dans le développement d'approches thérapeutiques des maladies génétiques. Depuis ces premières lois, 150 ans se sont écoulés et ont été ponctués d'évènements majeurs, pour en arriver à nos connaissances actuelles.

En effet, c'est dans les années 1860 que le moine et botaniste Johann Gregor Mendel (1822-1884) réalisa une série d'expériences sur des pois qui lui permit d'observer que certaines caractéristiques extérieures<sup>2</sup> sont transmises d'une plante mère à sa descendance tout en respectant une logique statistique. Ces résultats lui permirent de formuler l'hypothèse selon laquelle cette transmission se fait grâce à des « éléments biologiques » (que nous appelons actuellement gènes), et qu'il doit y avoir au moins deux exemplaires par « éléments ».

La molécule d'ADN<sup>3</sup> a été visualisée pour la première fois par le chimiste Friedrich Miescher (1844-1895) alors qu'il étudiait la structure des cellules en 1871. Il attribua le terme de « nucléine » à cette substance qu'il découvrit dans les noyaux cellulaires. Puis, c'est en 1882 que les premiers chromosomes furent identifiés par l'allemand Walter Flemming (1843-1905), qui rapporta également le fait que les chromosomes se partageaient en deux au cours de la division cellulaire (la mitose). Mais, ce n'est que 20 ans après que le lien fut établi entre les lois de Mendel et les chromosomes comme molécule porteuse de l'hérédité.

Les lois de Mendel ont ensuite été ardemment défendues par William Bateson (1861-1926) en Angleterre, notamment avec la parution de son ouvrage *Gregor Mendel's principle of heredity* en 1902. C'est également Bateson qui introduisit le terme de « génétique » en 1906. Il développa également les notions d' « allèle », d' « hétérozygote » et d' « homozygote ».

En 1909 apparût enfin le mot « gène » attribué par Wilhelm Johannsen (1857-1927) comme étant ces éléments internes à la cellule, hérités et transmis. Une année plus tard,

---

<sup>1</sup> Le petit Larousse, édition 1985

<sup>2</sup> *Introduction à l'analyse génétique*, 3<sup>ème</sup> édition ; Griffiths, Miller, Suzuki, Lewontin, Gelbart ; De Boeck University s.a ; 2002

<sup>3</sup> Toutes les abréviations de ce manuscrit sont détaillées dans la partie « Abréviations »

Thomas Hunt Morgan (1866-1945) révéla que le chromosome est le support des gènes et qu'il y a plusieurs gènes par chromosomes.

Il faudra ensuite attendre quelques années pour faire de nouvelles avancées dans le domaine de la génétique. Et c'est en 1953 que James Dewey Watson (1928) et Francis Harris Compton Crick (1916) publièrent la découverte de la structure spatiale de l'ADN, avec l'aide de Rosalind Franklin et Maurice Wilkins (Watson JD, Crick FHC, 1953<sup>4</sup>). Les quatre composants de l'ADN – l'adénine, la thymine, la cytosine et la guanine (A, T, C et G) sont alignés sur deux molécules qui tournent autour de leurs axes. Les liaisons entre ces molécules sont établies par formation de liaisons hydrogènes entre les paires A-T et C-G. Les scientifiques parlent désormais de « double hélice d'ADN ». Mais ce n'est que quarante ans plus tard que les microscopes les plus perfectionnés livreront la preuve visible du modèle élaboré par Watson et Crick. Cette découverte fut récompensée en 1962 par le prix Nobel de physiologie décerné aux deux chercheurs.

Le lien entre l'ADN, l'ARN et les protéines avaient déjà été établi : l'ADN est porteur d'une information permettant la production des protéines en passant par une étape indispensable, la transcription en ARN... Mais une question persistait : comment ? Crick apporta la clé de ce déchiffrement par la publication du code génétique et de ces 64 codons, en 1961 (Crick FHC, *et al.* 1961).

La première moitié du XX<sup>ème</sup> siècle permit de révéler la présence de l'ADN dans le noyau de chacune des cellules composant un organisme, et de le caractériser comme la molécule porteuse de l'hérédité se transmettant de génération en génération. La fin de ce siècle a également vu la découverte de techniques moléculaires remarquables. Ces avancées ont permis l'étude plus fine de la molécule d'ADN et ainsi la découverte d'anomalies pouvant se glisser au cœur de la séquence nucléotidique, susceptibles d'engendrer des pathologies.

Deux techniques révolutionnaires firent leurs apparitions. Le séquençage permettant la lecture de l'ADN - c'est-à-dire l'enchaînement des éléments A, C, G et T sur un simple brin d'ADN – qui fut possible grâce à deux techniques élaborées indépendamment par Walter Gilbert et Frederick Sanger en 1977 (Maxam AM, *et al.* 1977 ; Sanger F, *et al.* 1977). Cette découverte offrit

---

<sup>4</sup> Article en annexe

un prix Nobel aux deux co-fondateurs du séquençage, en 1980. La seconde technique fut l'amplification de l'ADN, appelée PCR pour *Polymerase Chain Reaction*. Bien que le principe de cette technique ait été élaboré en 1971 par le norvégien Kjell Kleppe, le concept devint réalité par le travail de Kary Bank Mullis, publié en 1986, qui fut récompensé en 1993 d'un prix Nobel pour sa réalisation (Mullis KB, *et al.* 1987).

La génétique apporte enfin de nombreuses réponses dans le domaine des maladies humaines jusque là incomprises et parfois jugées à mal. Ce fut le cas de la trisomie 21 découverte par Jérôme Lejeune et son équipe en 1958 (Lejeune J, *et al.* 1959). Ceux-ci démontrèrent la présence d'un chromosome supplémentaire sur la paire 21 du caryotype des malades présentant « un mongolisme », qui était à ce moment là, considéré comme une dégénérescence raciale. Ce fut les premiers pas de la génétique médicale. Puis c'est en 1985, qu'une des premières mutations génétiques humaines fut rapportée dans la littérature. Jane Gitschier et son équipe identifièrent deux mutations non-sens dans le gène du facteur VIII de coagulation impliquées dans l'hémophilie A (Gitschier J, *et al.* 1985). La génétique médicale a ensuite connu un essor considérable, notamment depuis le séquençage de la totalité du génome humain en 2001 (Lander ES, *et al.* 2001).

Dans le laboratoire du docteur Laurence Colleaux, nous étudions la génétique des pathologies du système nerveux central (SNC). Ce travail vise à mieux comprendre les bases physiopathologiques des déficiences intellectuelles (DI) et les processus développementaux permettant la mise en place du SNC au cours du développement. Ces résultats ont aussi pour objectif de fournir les éléments nécessaires à la prise en charge des familles par des généticiens qui leurs apporteront explications, soutien psychologique, et conseil génétique pour les grossesses ultérieures.

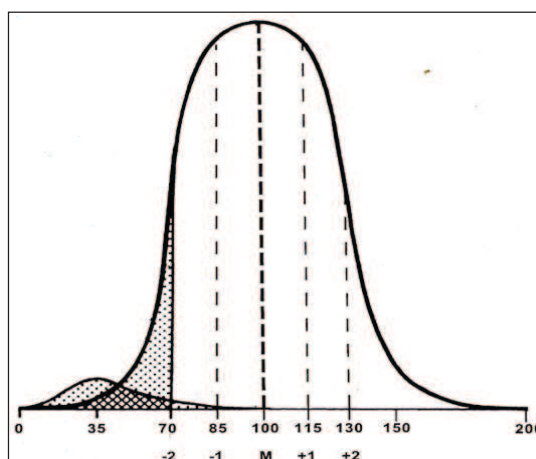
## **1) Définitions et classifications des déficiences intellectuelles**

La déficience intellectuelle (DI), précédemment connue sous le terme de retard mental (RM) (Salvador-Carulla L, *et al.* 2008), se définit par « une réduction significative des capacités à comprendre des informations nouvelles ou complexes, à l'apprentissage de nouvelles aptitudes, ..., avec une autonomie limitée, ..., qui débute avant l'âge adulte et qui persiste durant le développement. » (Department of Health, London, p14).

Les DI sont un problème de santé publique majeure et entraînent des coûts très importants pour la société. En Europe et aux Etats-Unis, chaque patient représente une dépense moyenne de 1 à 2 millions de dollars pour une prise en charge totale, médicale et institutionnelle. Cela en fait des maladies extrêmement coûteuses, plus coûteuses encore que le cancer (Ropers HH. 2010). De plus, les DI ont souvent été négligées par le public, car pendant longtemps, elles ont été considérées comme étant liées à l'éducation ou au niveau social des familles.

La DI est évaluée principalement par le quotient intellectuel (QI) qui s'établit grâce à des grilles standard d'évaluation adaptées à l'âge et au niveau de développement du patient. Ainsi, au cours des premières années de vie, lorsque l'enfant ne maîtrise pas totalement le langage, les cliniciens utilisent le test de Denver ou l'échelle de Brunet-Lezine. Ces grilles permettent d'estimer le quotient de développement (QD) de l'enfant afin d'évaluer si celui-ci présente un retard psychomoteur. Lorsque l'enfant est en mesure de s'exprimer, les médecins peuvent alors établir le QI grâce à d'autres tests cognitifs standardisés. Ces tests permettent aussi d'établir le QI verbal (échelle de Weschsler) ou encore le QI de performance. Le QI moyen de la population est fixé arbitrairement à 100 et se distribue dans la population selon une courbe gaussienne (figure 1).

Figure 1 : Distribution gaussienne du QI dans la population général



Le QI est considéré comme normal lorsque le score est de plus ou moins 30 par rapport à la moyenne (déviations standard de +2 ou -2). Ainsi les personnes présentant un QI inférieur à 70 sont considérées avec un retard intellectuel.

Les études épidémiologiques montrent que ces pathologies touchent environ 3% de la population générale (Ropers HH. 2010). La prévalence théorique des DI sévères (-3DS) est estimée à 0,23% de la population. Néanmoins, les résultats montrent une distribution bimodale du QI (voir figure 1) avec un pourcentage plus élevé de DI sévères (0,3%-0,4% de la population) (Cans C, *et al.* 1999) sans raison apparente. Selon le DSM-IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Retardation*, 4th Edn), les déficiences intellectuelles se classent en quatre catégories (table 1) (Daily DK, *et al.* 2000).

Table 1 : Caractéristiques développementales en fonction du niveau de déficience intellectuelle

DI légère ~ 70% des cas	DI modérée ~ 10 des cas	DI sévère ~ 10 des cas	DI profonde ~ 10 des cas
50<QI<70	35<QI<49	20<QI<34	QI<20
Capacité à acquérir des connaissances Nécessité d'une aide en mathématique et pour la lecture Interactions sociales possibles Intégration sociale fréquente Souvent autonome	Retard notable, comme le retard de langage Capacité à apprendre les notions d'hygiène et de sécurité Participation à des activités simples ou réalisation de tâches sous supervision Capacité à se déplacer seul dans des lieux familiers	Retard évident et marqué (langage, motricité et interactions sociales) Marche tardive ou absente Peu ou pas de langage Compréhension possible de certains mots et peut montrer une forme de réponse Entraînement possible à une certaine autonomie mais nécessité d'une assistance et une supervision dans toutes les tâches	Retard marqué dans tous les domaines Nécessité d'une assistance proche pour chacune des tâches quotidiennes Incapacité à être autonome

Tableau extrait de l'article de Daily DK, *et al.* 2000



D'autres tests sont également établis pour évaluer le niveau d'adaptation de l'enfant. C'est le cas du PEP-R (profil psycho éducatif – révisé) qui permet de définir le potentiel de départ de l'enfant avec ses forces et ses faiblesses pour ensuite établir un profil d'apprentissage adapté afin de développer les compétences émergentes. Il y a également le test de Vineland prenant en compte les capacités de la personne évaluée dans une situation structurée (ex : des situations de la vie quotidienne) dans le but de déterminer les capacités d'autonomie.

Les DI sont également classées en fonction de la présence d'autres signes cliniques associés ou non chez les patients. Deux classes de DI se distinguent : les DI non syndromiques (DI-NS), lorsque seul le retard intellectuel est noté ; et les DI syndromiques (DI-S), lorsque d'autres signes cliniques sont associés tels que la microcéphalie/macrocéphalie, des malformations congénitales (atteinte de différents organes), des anomalies du bilan métabolique, des anomalies radiologiques et/ou des dysmorphies faciales (Kaufman L, *et al.* 2010). Cependant, les examens cliniques étant de plus en plus poussés, il devient extrêmement rare de n'observer qu'un retard intellectuel isolé. Parfois les patients ont été diagnostiqués avec une DI-NS, mais lorsque les investigations cliniques sont approfondies, d'autres signes minimes apparaissent. C'est pourquoi, le terme de DI non spécifique a récemment fait son apparition. Ce terme regroupe les DI non-étiquetées pour lesquelles aucun signe clinique majeur n'est associé, empêchant l'identification d'un syndrome cliniquement reconnaissable. Il apparaît alors que les signes cliniques tels que la microcéphalie (de 0 à -2DS), les dysmorphies faciales mineures, ou encore les convulsions au cours de la petite enfance, ne sont pas des critères déterminants dans la définition d'une DI cliniquement reconnaissable ou syndromique.

## **2) Etiologie des déficiences intellectuelles**

### **2.1) Causes environnementales des DI**

Les causes environnementales représentent près de 15% de l'étiologie des DI. On distingue :

- Les causes prénatales : l'ingestion de drogue/d'alcool ou l'atteinte par certaines infections de la mère en période de grossesse.

Ainsi, les infections durant la grossesse (CMV, rubéole, toxoplasmose, HIV) sont responsables de 3 à 8 % des DI (Bower C. et al, 2000). De même, les intoxications pendant la grossesse (alcool, valproate de sodium) sont aussi responsables de DI syndromiques. Le syndrome de l'alcoolémie fœtale (FAS) entraîne des DI de modérée à sévère et la prévalence est estimée de 1 à 9 bébés touchés pour 1000 naissances (Sampson PD, *et al.* 1997 ; Spohr HL, *et al.* 2007). Cette atteinte, décrite en 1967 par deux français, entraîne un syndrome polymalformatif comprenant un retard de croissance et des anomalies psychomotrices (Lemoine P & Harousseau H, *et al.* 1968). Au début des années 1970, l'alcool a été reconnu comme une substance tératogène. Les nombreuses études réalisées sur le FAS montrent que l'éthanol libre est capable de passer la barrière placentaire pour affecter les cellules et tissus en cours de développement notamment au niveau du SNC. Un effet cytotoxique est constaté dans différentes régions du cerveau : les ganglions basaux, le corps calleux, le cervelet, l'hippocampe... L'éthanol empêcherait aussi la migration de cellules essentielles à la mise en place de l'encéphale et induirait des désorganisations tissulaires (Niccols A. 2007). D'autres études montrent que l'éthanol absorbé par le fœtus dès les premières semaines de vie pourrait même induire des aberrations chromosomiques létales. Bien que les campagnes de prévention redoublent d'année en année, le taux de nouveaux nés atteints d'un FAS reste important, notamment dans les pays développés.

- Les causes périnatales : complications de l'accouchement
- Les causes postnatales : infections du SNC (méningite, encéphalite,...) et asphyxies (noyades et séquelles postopératoires, traumatismes crâniens avec hémorragie cérébrale, déshydratation du nourrisson...) (Newell SJ, *et al.* 1987).

Néanmoins, il est important de situer ces causes dans un contexte socio-économique. En effet, dans les pays en voie de développement, la prévalence des DI dues aux causes environnementales sont deux à trois fois plus fréquentes que dans les pays industrialisés (Ropers, HH. 2010). Le manque de moyens et de prévention dans ces pays est aussi reflété par une mortalité infantile accrue. C'est ce que démontre cette étude menée au Pakistan révélant que la mortalité infantile touche environ 10% des naissances (Gustavson KH. 2005) tandis que la prévalence mondiale est proche de 5%. Dans les pays industrialisés, de nombreux procédés ont été développés dans la prévention des risques auprès des femmes enceintes, mais également

auprès du personnel médical qui améliore sans cesse la prise en charge des patientes (suivi de la grossesse, et accouchement) et des nouveau-nés.

## **2.2) Causes génétiques des DI**

### **2.2.1) Anomalies chromosomiques et DI**

Parmi les causes de DI, les anomalies chromosomiques sont la principale étiologie. Elles sont responsables de 10-20% des cas (McMullan DJ, *et al.* 2009 ; Koolen DA, *et al.* 2009 ; Morrow EM. 2010). Il s'agit essentiellement d'anomalies chromosomiques de nombre ou de structures déséquilibrées telles que des délétions, duplications, dérivés de translocations ou d'inversions péracentriques et paracentriques. Dans les années 2000, l'avènement de la technique de CGH-array a permis de doubler le nombre d'anomalies chromosomiques décelées chez les patients avec DI, en mettant en évidence des remaniements submicroscopiques non visibles sur caryotype. Ainsi, l'étude globale du génome par caryotype puis par CGH-array révèle environ 20-30% de déséquilibres génomiques considérés comme causals chez ces patients (Miller DT, *et al.* 2010).

En 1956, le nombre de chromosomes de l'espèce humaine a été établi. Cette découverte est à la base de l'étude du caryotype humain. C'est donc à ce moment là que la cytogénétique en tant que spécialisation de la génétique apparaît. En 1959, la découverte de la première anomalie chromosomique fut la trisomie 21 par l'équipe de Jérôme Lejeune (Lejeune J, *et al.* 1959).

Ces dernières années, la cytogénétique a connu un essor considérable notamment grâce à l'utilisation de méthodes de plus en plus résolutive. Les premiers caryotypes se réalisaient sur des chromosomes au stade métaphasique et étaient traités par un marquage au Giemsa. La nomination des bandes G et R (inverse des bandes G) fait son apparition dans les années 1970 et permet d'améliorer la détection d'anomalies chromosomiques. Enfin le caryotype à haute résolution se fit en 1976. Les chromosomes pouvaient être observés au stade prométaphasique, c'est-à-dire à un stade mitotique où ils sont moins condensés (Goldenberg A, *et al.* 2009 ; Yunis JJ, *et al.* 1976). La résolution du caryotype passa de 400 bandes analysables à mille, par génome haploïde.

Puis l'introduction d'outils de la biologie moléculaire a permis d'augmenter la détection d'anomalies chromosomiques. La cytogénétique moléculaire implique des techniques d'hybridation telles que la FISH et la CGH-array.

La FISH utilise des sondes de fragments génomiques, correspondant à une région chromosomique donnée, et pouvant être marquées afin d'obtenir un visuel après hybridation *in situ* sur des noyaux cellulaires en interphase ou en métaphase (Goldenberg A, *et al.* 2009). Les sondes ont une taille proche de 200 Kb et permettent la détection d'anomalies chromosomiques submicroscopiques non visibles sur le caryotype, même de haute résolution. Cependant, la FISH ne permet pas l'étude globale du génome. Elle est employée suite à un examen clinique détaillé permettant la reconnaissance d'un phénotype connu associé à une anomalie chromosomique spécifique, et s'utilise comme un outil de diagnostic. Elle se pratique également pour la confirmation d'un résultat obtenu préalablement par CGH-array.

Le principe de la technique de CGH array consiste à co-hybridiser la même quantité d'ADN d'un patient et d'un témoin, marqué chacun par un fluorochrome différent, sur une lame de verre sur laquelle sont déposées des séquences d'ADN (appelées sondes). L'ensemble du dispositif s'appelle «puce à ADN» ou *micro-array*. Après avoir hybridé les deux ADN sur la puce à ADN, un rapport de fluorescence est calculé au niveau de chaque sonde. Un traitement statistique des données est ensuite réalisé grâce à des logiciels dédiés et les résultats sont donnés sous forme de représentation graphique. L'existence d'un gain ou d'une perte d'un segment génomique chez le patient sera détectée par une variation du rapport de fluorescence dans un sens ou dans l'autre (si la puce contient la séquence d'ADN correspondant au segment génomique en déséquilibre). La résolution de cette technique a considérablement progressé et les dernières puces CGH présentent jusqu'à 2 millions de sondes permettant de visualiser des remaniements aussi petits que 10 Kb de taille (Ropers HH. 2010). Le terme de CNV (Copy Number Variant) apparaît avec la CGH-array. Plusieurs dizaine de syndromes ont été décrits à ce jour. La table 2 résume les principaux syndromes de DI causés par des CNV récurrents et cliniquement reconnaissables.

Table 2 : Principaux syndromes avec DI, cliniquement reconnaissables, impliquant des anomalies de CNV récurrentes

Syndrome	OMIM	Locus	CNV	Phenotype
1q21.1 délétion/duplication	612474/ 612475	1q21.1	Del/dup	Highly variable phenotype from asymptomatic to severe DD. Autism, schizophrenia, congenital heart abnormality, ligamentous laxity or joint hypermobility, hypotonia, seizures, cataracts. Deletions associated with reduced brain size; duplications associated with increased brain size
3q29 délétion/duplication	609425/ 611936	3q29	Del/dup	Variable. May include mild/moderate ID with mild dysmorphic facial features, including long and narrow face, short philtrum and high nasal bridge, autism, ataxia, chest-wall deformity, long, tapering fingers, microcephaly/Variable
5q14.3 délétion	600662	5q14.3	Délétion	Severe ID, seizures, hypotonia
8q23.1 délétion/duplication	600576	8q23.1	Del/dup	Congenital heart disease, congenital diaphragmatic hernia, DD and a characteristic behavior profile with hyperactivity and impulsiveness.//Variable, incl prominent forehead and arched eyebrows, adrenal insufficiency, tetralogy of Fallot, partial 2/3 syndactyly of the toes and cleft palate
9q34 délétion	610253	9q34.3	Délétion	Severe ID, hypotonia, brachy(micro) cephal, epileptic seizures, fl at face with hypertelorism, synophrys, anteverted nares, everted lower lip, carp mouth with macroglossia, and heart defects
15q11.2 BP1/BP2 microdélétion		15q11.2	délétion	DD/ID, epilepsy
15q12 duplication/triplication	608636	15q11.2- q13	duplication	ID, seizures, behavioral difficulties, including impaired social interactions and impaired use of nonverbal communication, impaired language development
15q13.3 délétion	118511	15q13.3	Del/dup	DD with mild/moderated learning disability, seizures, autism, Schizophrenia
15q24 délétion/duplication		15q24	Del/dup	Mild ID, growth retardation, microcephaly, digital abnormalities, hypospadias, and loose connective tissue. High anterior hairline, broad medial eyebrows, hypertelorism, downslanted palpebral fissures, broad nasal base, long smooth philtrum, and full lower lip/mild DD, hypotonia, tapering fingers, characteristic facial features, and prominent ears
16q11.2 délétion/duplication	611913	16q11.2	Del/dup	Susceptibility locus for autism (deletion)/ schizophrenia (duplication), global DD, behavioral problems, dysmorphism, Epilepsy and abnormal head size. Deletions associated with increased head size; duplications associated with reduced Head size
16q13.11 délétion/duplication		16q13.11	Del/dup	Risk factor for autism, ID, idiopathic generalized epilepsies//Variable
17q12.31 délétion/duplication	610443	17q21.31	Del/dup	Moderate DD/learning disability, neonatal hypotonia, poor feeding in infancy (often requiring naso-gastric feeding for a period), oromotor dyspraxia, epilepsy, heart defects (ASD, VSD), kidney/urological anomalies. Silvery depigmentation of strands of hair, with age there is an apparent coarsening of facial features, friendly/amiable behavior
22q13.3 del/Phelan-McDermid	606230	22q13.3	Délétion	Severe expressive language delay, behavioral disturbance, including hyperactivity and aggressive outbursts, hypotonia, ID/DD
22q13.3 délétion (Phelan-McDermid)	606232	22q13.3	Délétion	Neonatal hypotonia, global DD, normal to accelerated growth, absent to severely delayed speech, autistic behavior and minor dysmorphic features
Xq11.22-p11.23		Xq11.2	Délétion	ID, speech delay, and EEG anomalies
Angelman	105830	15q11-Q12	Mat, del, pat	Severe DD/ID, profound speech impairment, ataxic gait, excitable personality, and inappropriately happy effect, microcephaly, hypopigmentation and seizures
Aniridia, tumeurs de Wilms (WAGR)	607108	11q13	Délétion	Aniridia, decreased vision, cataract, glaucoma, Peter's anomaly, corneal clouding
Cri du chat	123450	5q15.2	Délétion	High-pitched monotonous cry, microcephaly, round face, hypertelorism, epicanthic folds, micrognathia, impaired growth, severe DD and learning disability
DGS/VCFS//duplication 22q11.2	188400/ 192430/ 608363	22q11.2	Del/dup	DD/ID, outflow tract heart defects, immune deficiency, transient/severe neonatal hypocalcaemia, velopharyngeal insufficiency, absence of thymus gland// Not a clinically recognizable syndrome, diagnosis follows molecular testing. DD/ID, delayed psychomotor development, growth retardation, and muscular hypotonia
DI-LX, microcéphalie, hypoplasie cérébelleuse	300749	Xp11.4	Délétion	Postnatal microcephaly, severe ID, and disproportionate pontine and cerebellar hypoplasia
Dyschondroostéose Leri-Weill	127300	Xpter- p22.32	Délétion	Short stature, mesomelic limb shortening, characteristic "Madelung" deformity of the forearms (bowing of the radius and restriction of

				pronation/supination of the forearm)
Greig céphalopoly-syndactylie	175700	7q13	Del/dup	Craniosynostosis, (poly)syndactyly, macrocephaly, scaphocephaly, high forehead, frontal bossing, hypertelorism, downslanting palpebral fissures, broad nasal root, normal intelligence
Hypoparathyroïdie, sensorineural, atteinte rénale	146255	10q14	Délétion	Hyperparathyroidism, sensorineural deafness, and renal dysplasia
Hypoplasie congénitale des surrénales et hypogonadisme/réversion sexuelle (sensible au dosage génique)	300200/ 300018	Xq21.3- p21.2	Del/dup	Failure to thrive, hypogonadotropic hypogonadism, cryptorchidism, hyperpigmentation, primary adrenocortical failure, adrenal insufficiency, hypoplastic adrenal glands, absence, delayed pubertal development and puberty//Gonadal dysgenesis, male-to-female sex reversal
Jacobsen	147791	11q23	Délétion	IUGR, ID, micro/macrocephaly, micrognathia, low set ears, diverse ocular manifestations (hypertelorism/ telecanthus, palpebral fissures), depressed nasal bridge, short nose, VSD, missing ribs, pectus excavatum, pylorus stenosis, genitourinary anomalies (hypospadias, hypoplastic female external genitalia), joint contractures, clinodactyly, brachydactyly, hypotonia
Langer-Giedion	190351	8q24.12	Délétion	Short stature, long fl at philtrum, protruding ears, pear-shaped nose, thin upper lip, short hands/feet, coneshaped epiphyses, severe brachydactyly, short metacarpals, short phalanges, sparse hair, multiple cartilaginous exostoses, laterally sparse eyebrow, ID.
Lissencéphalie	300067	Xq22.3-q23	Délétion	Classic lissencephaly with ID (males)/ subcortical band heterotopias (females); ID, delayed motor development, ataxia, dysarthria, limb spasticity, pachygyria/agyria, corpus callosum agenesis
Miller-Dieker/17p13.3	247200/ 613215	17q13.3	Del/dup	Lissencephaly, microcephaly, wrinkled skin over the glabella and frontal suture, prominent occiput, narrow forehead, downslanting fissures, small nose and chin, cardiac malformations, hypoplastic male external genitalia, growth retardation, and DD/ID with seizures and EEG abnormalities//Mild brain structural abnormalities, moderate to severe DD and failure to thrive, macrosomia, and pervasive developmental disorder, and facial dysmorphologies
Pelizaeus-Merzbacher	312080	Xq22.2	Del/dup	Hypomyelinative leukodystrophy, nystagmus, spastic quadriplegia, ataxia, and DD
Potocki-Shaffer	601224	11q11.2	Délétion	Foramina parietalia permagna, multiple exostoses, and in some cases, craniofacial dysostosis and ID.
Prader-Willi	176270	15q11.2- q12	Mat, del, pat	Moderate ID, postnatal hypotonia and feeding difficulties; failure to thrive in infancy; obesity due to insatiable appetite and food seeking/ hoarding, hypogonadotropic hypogonadism, sexual activity is uncommon and fertility is rare
Rein polykystique de l'enfance et Sclérose tubéreuse	600273	16p13.3- p13.12	Délétion	Tuberous sclerosis, renal cysts, liver cysts, and intracranial aneurysm
Rétinoblastome	180200	13q14.1- q14.2	Délétion	Retinoblastoma, retinal calcification, osteogenic sarcoma, pinealoma, leukemia, lymphoma, Ewing sarcoma, prominent eyebrows, broad nasal bridge, bulbous tip of the nose, large mouth with thin upper lip, and long philtrum
Rubinstein-Taybi	180849	16p13.3	Délétion	ID, broad thumbs and toes, congenital/juvenile glaucoma, cardiac anomalies and facial abnormalities
Saethre-Chotzen	601622	7p21	Délétion	Asymmetry of the face, craniosynostosis, small ears with long and prominent ear crus, syndactyly (often 3rd-4th toes and/or 2nd-3rd finger), DD
Smith Magenis/Potocki-Lupski	182290	17q11.2	Del/dup	DD, learning disability, behavioral disturbance (sleep disturbance and self-injurious behavior), infantile hypotonia, short stature, obesity with small hands and feet, facial characteristics, including fl at, square, rather heavy face./Infantile hypotonia, failure to thrive, ID, autistic features, sleep apnea, and structural cardiovascular anomalies
Sotos/5q35 duplication	606681	5q35	Del/dup	Macrocrania, dolichocephaly, prominent forehead, apparent hypertelorism, higharched palate, increased birth length and weight, excessive growth in childhood, disproportionately large hands and feet, hypotonia, DD and speech delay/short stature, microcephaly and speech delay
Syndrome de lubs	300260	Xq28	Dup/triplication	Recurrent infections, infantile hypotonia giving way to spasticity in childhood, severe ID, and lack of speech acquisition, gastroesophageal reflux, swallowing difficulties, facial hypotonia and excessive drooling, and inability or limited ability to walk

Syndrome des cellules nerveuses basales/gorlin-Goltz	109400	9q22.3	Délétion	Odontogenic keratocysts of jaws, skeletal anomalies, nevoid basal cell carcinoma
William-Beuren/duplication 7q.23	194050/609757	7q11.23	Del/dup	DD/ID, behavioral characteristics (anxiety, ADHD), overfriendliness, congenital heart disease (SVAS, supraaortic pulmonary stenosis), facial characteristics, including periorbital fullness, bulbous nasal tip, long philtrum, wide mouth, full lips, full cheeks and small widely spaced teeth//Mild growth retardation, subtle facial dysmorphism, including high and broad nose, short philtrum, severe expressive language delay (especially syntax and phonology)
Wolf-Hirschhorn	194190	4q16.3	Délétion	Low birth-weight and postnatal failure to thrive, microcephaly, DD, hypotonia, seizures, facial appearance with sagging everted lower eyelids, a "Greekhelmet" profile, a short nose and very short philtrum, iris colobomas
Yeux du chat	115470	22q11.2	Triplication (mosaïque)	Coloboma of the iris, anal atresia with fistula, downslanting palpebral fissures, preauricular tags and/or pits, frequent occurrence of heart and renal malformations, near-normal intellectual development

DD : Developmental Delay. Table réalisée à partir des articles de Vissers LE & Stankiewicz P. 2012

Les phénomènes de disomie uni-parentale font aussi partis des anomalies chromosomiques qui entraînent la perte ou le gain anormal d'expression génique. Elles expliquent certaines pathologies bien que la forme diploïde de l'allèle soit respectée. Ces anomalies sont liées à l'empreinte parentale.

L'empreinte parentale est un phénomène physiologique qui concernent un certain nombre de gènes chez les mammifères et qui conduit, dans des conditions normales, à l'expression d'une seule des deux copies parentales de chacun des gènes (soit la copie maternelle soit la copie paternelle). Elle résulte d'une marque épigénétique qui entraîne une répression génique : c'est la méthylation des îlots CpG. Chaque individu reçoit un chromosome de chaque paire en provenance de la mère et du père et certains d'entre eux sont associés à des empreintes parentales qui leurs sont propres (chromosomes 6, 7, 11, 14 et 15). Dans le cas d'une disomie, les deux chromosomes d'une même paire sont hérités d'un seul parent (l'embryon contient alors deux chromosomes paternels ou maternels au sein d'une même paire). Ainsi, l'empreinte parentale est apposée sur les deux chromosomes de la même manière entraînant une perte d'expression des gènes soumis à empreinte ; ou à l'inverse, une surexpression génique lorsque celle-ci est absente (Flint J, *et al.* 1996).

Deux syndromes connus reflètent ces anomalies d'empreinte : le syndrome d'Angelman (MIM : 105830) et de Prader-Willi (MIM : 176270) décrits en table 3. Le Prader-Willi est causé soit par une délétion paternelle ou par une disomie uni-parentale maternelle du locus 15q11-

q13 et entraîne la perte d'expression de certains gènes présents dans cette région. Le syndrome d'Angelman est la pathologie opposée du syndrome de Prader-Willi. Elle est causée soit par une délétion maternelle ou une disomie uni-parentale paternelle de ce même locus 15q11-q13.

Table 3 : Description clinique et génétique du syndrome d'Angelman et de Prader-Willi

	<b>Syndrome d'Angelman</b>	<b>Syndrome de Prader-Willi</b>
Clinique	Déficiência intellectuelle sévère Déficit important de la parole Ataxie cérébelleuse, accompagnée parfois d'une épilepsie Comportement : enfants d'apparence joyeuse, souriant en permanence et rigolant de façon inappropriée	Hypotonie natale Obésité (hyperphagie) Dysmorphie faciale (bouche éversée, petit front) Hypogonadisme (retard de puberté ; infertilité) Retard des acquisitions Comportement : TOC ; colères Petite taille Hypo pigmentation
Génétique	70% des cas : délétion maternelle du locus 15q11-q13 2% des cas : disomie uni parentale paternelle du chromosome 15 2-3 % ces cas : mutation d'empreinte parentale 25% des cas : Mutation du gène <i>UBE3A</i> (locus 15q11.2)	70% des cas : délétion paternelle : locus 15q11-q13 20-25% des cas : disomie uni parentale maternelle du chromosome 15 2-5% des cas : défaut d'empreinte parentale (mutation)
Références	Kishino T, <i>et al.</i> 1997	McAllister CJ, <i>et al.</i> 2011

D'autre part, bien que cela ne concerne pas les anomalies de dosage génique, il est intéressant de constater que les disomies uni-parentales peuvent également être à l'origine de maladies récessives, lorsqu'une mutation héritée de l'un des deux parents devient pathologique sous forme homozygote. Ce phénomène a notamment été décrit dans la mucoviscidose lorsqu'elle est engendrée par une microdélétion identifiée au niveau du chromosome 7, héritée de la mère, et retrouvée sous forme homozygote chez le patient (Spence JE, *et al.* 1988).

La recherche d'anomalies chromosomique utilisant la CGH array a également été largement employée dans des cohortes de patients atteints de pathologies supposées monogéniques (Kaufman L, *et al.* 2010). Le but est de déceler des anomalies chromosomiques récurrentes associées à un phénotype précis, afin d'identifier d'éventuel(s) gène(s) en cause. Cette stratégie a fait l'objet de nombreux résultats dans les pathologies dominantes. Ce fut notamment le cas pour le gène *CHD7* impliqué dans le syndrome de Charge (MIM : 214800) (Vissers LE, *et al.* 2004) ; le gène *TCF4* dans le syndrome de Pitt Hopkins (MIM : 610954) (Amiel J, *et al.* 2007) et plus récemment le gène *NFIX* impliqué soit dans un syndrome de Sotos-like (MIM : 117550) ou dans le syndrome du Marshall-Smith (MIM : 602435) (Malan, *et al.* 2010).



## 2.2.2) Formes monogéniques de DI

### *2.2.2.1) Transmission des formes autosomique dominante de DI*

La prévalence des formes autosomiques dominantes de DI (DI-AD) reste difficile à estimer actuellement (Ropers. 2008). En effet, la recherche de gènes impliqués dans les DI-AD est complexe, et le petit nombre de gènes identifiés dans ces pathologies ne rend compte que d'un faible pourcentage des DI d'ordre génétique. En revanche, le taux de réarrangements chromosomiques, à l'origine de lésions monoalléliques impliquées dans les DI, laisse supposer que le taux de mutations *de novo* responsables de DI-AD, serait similaire. Ce qui pourrait être estimé à 10-20% des causes des DI génétiques. Ainsi, les stratégies permettant l'identification de mutations dominantes sont limitées pour plusieurs raisons. Dans la majorité des cas, les DI-AD:

- ne sont pas familiales ; en effet, les personnes développant ces pathologies se marient rarement et n'ont généralement pas de descendance
- présentent une très grande hétérogénéité génétique (observation faite pour de nombreuses pathologies d'ordre génétique).

Le cumul de ces deux problèmes, hétérogénéité clinique et absence d'antécédents familiaux, rendent impossible l'étude d'association ou de liaison chez ces patients (Kaufman L, *et al.* 2010 ; Hamdan FF, *et al.* 2009 ; Ropers HH. 2010 ; Backx L, *et al.* 2010).

Pour s'affranchir de ces limites, deux approches sont utilisées. La première s'appuie sur l'étude d'anomalies chromosomiques révélées au préalable par CGH-array ou caryotype (cf partie 2.2.1 : anomalies chromosomiques impliquées dans les DI). La seconde porte sur l'étude de gènes candidats. C'est le cas des études menées par Hamdan FF et collaborateurs, qui ont été mises en place dans le centre Synapse to Disease Group (Montréal). Ils ont ainsi identifié deux patients avec une mutation dans *STXBP1*, par la réalisation d'un séquençage systématique de 5 gènes candidats (impliqués dans la neurotransmission : *STX1A*, *VAMP2*, *SNAP25*, *STXPB1/MUNC18-1* et *SYT1*) parmi une large cohorte de 94 patients, atteints de DI idiopathique, et dont le pédigrée suggère une transmission autosomique dominante (Hamdan FF, *et al.* 2009). Le travail du Synapse to Disease Group s'est poursuivi par une sélection de 197 gènes codants les sous-unités des récepteurs au glutamate et protéines partenaires au niveau de la synapse neuronale, lesquels ont été séquencés dans une cohorte de 95 individus. Les résultats ont révélé

des variants prédits pathogènes pour quatre nouveaux gènes : *KIF1A*, *GRIN1*, *CACNG2*, and *EPB41L1* (Hamdan FF, *et al.* 2011). Au total, ces deux stratégies ont permis l'identification de 9 gènes dont les mutations sont responsables de DI-AD non spécifiques (table 4).

Enfin, plus récemment, une troisième approche de recherche de gènes responsables de DI-AD est apparue et s'appuie sur le séquençage et l'analyse d'Exome. Ces études consistent à utiliser une technique de séquençage à haut débit employée suite à un enrichissement en séquences codantes du génome, soit environ 40 mégabases. Actuellement, la difficulté majeure de cette approche est l'analyse des données, compte-tenu du très grand nombre de variants identifiés pour chaque individu (entre 10 000 et 20 000) (Ng SB & Buckingham KJ, *et al.* 2010 ; Ng SB & Bigham AW, *et al.* 2010). Différents filtres sont alors appliqués pour trier au mieux l'ensemble de ces variants. Ainsi, les variations qui se situent dans les séquences intergéniques, dans les introns (hors sites d'épissage), et celles responsables d'un changement synonyme, sont éliminées. De même, les variants déjà répertoriés dans les banques de données, du type dbSNP ou 1000 Genomes, qui regroupent l'ensemble des variants préalablement séquencés chez des personnes dites saines, sont exclus des analyses tandis que les variants prédits pathogènes sont conservés (sites online de prédiction : Polyphen, Shift). Une autre limite de cette approche est la couverture du génome qui est encore incomplète et ne permet l'étude que de 80-90% de la totalité des séquences codantes.

Ce paradigme a été appliqué sur 10 trios de patients-parents où seuls les variants *de novo* ont été retenus, avant d'apposer différents filtres sélectifs. Les gènes candidats par leurs fonctions, ainsi que les variants non synonymes prédits pathogènes ont été conservés pour 6 d'entre-eux (9 variants identifiés au total). Cette étude confirme également que les mutations *de novo* sont fréquentes dans les DI-AD et a permis de caractériser l'étiologie pour 6 des 10 familles étudiées (Vissers LE & Ligt J, *et al.* 2010).

Table 4 : Gènes identifiés dans les formes autosomiques dominantes de déficiences intellectuelles non spécifiques

Gène	MIM	Locus	Type de mutation	Phénotype	Référence
<i>MBD5</i> ( <i>MRD1</i> )	611472	2q23.1	Délétion ; faux-sens	DI sévère ; Retard moteur ; hypo actif ; interactions sociales pauvres ; épilepsie possible	Wagenstaller J, <i>et al.</i> 2007
<i>DOCK8</i> ( <i>MRD2</i> )	611432	9p24.3	Délétion ; translocation	DI sévère ; Absence de langage ; épisodes de convulsion ; scoliose	Griggs BL, <i>et al.</i> 2008
<i>CDH15</i> ( <i>MRD3</i> )	114019	16q24.3	Faux-sens	Moyenne à sévère DI	Bhalla K, <i>et al.</i> 2008
<i>KIRREL3</i> ( <i>MRD4</i> )	607761	11q24.2	Faux-sens	Moyenne à sévère DI	Bhalla K, <i>et al.</i> 2008
<i>SYNGAP1</i> ( <i>MRD5</i> )	603384	6p21.32	Non-sens ; Fs-SP	DI modérée à sévère ; retard de langage important ; parfois strabisme ; parfois épilepsie.	Hamdan FF, <i>et al.</i> 2009
<i>STXBP1</i>	602926	9q34.11	Délétion ; non-sens	DI sévère ; Hypotonie ; épilepsies	Hamdan FF, <i>et al.</i> 2009
<i>DYNC1H1</i>	600112	14q32.31	Faux-sens	DI sévère (QI=50) ; légère microcéphalie ; légère dysmorphie faciale ; plagiocéphalie (garçon)	Vissers LE, <i>et al.</i> 2010
<i>YY1</i>	600013	14q32.2	Faux-sens	DI sévère (QI=50) ; légère microcéphalie ; légère dysmorphie faciale ; telecanthus (garçon)	Vissers LE, <i>et al.</i> 2010
<i>DEAF1</i>	602635	11p15.5	Faux-sens	DI profonde ; Absence totale de langage ; caractère joyeux ; petite taille	Vissers LE, <i>et al.</i> 2010
<i>CIC</i>	612082	19q13.2	Faux-sens	DI moyenne ; légère microcéphalie ; retard psychomoteur	Vissers LE, <i>et al.</i> 2010
<i>GRIN1</i>	138249	9q34.3	Faux-sens	DI modérée à sévère chez une patiente. DI associée avec une épilepsie chez un homme	Hamdan FF, <i>et al.</i> 2011
<i>KIF1A</i>	601255	2q37.3	Faux-sens	DI modérée, aucun signe spécifique. Ou neuropathie (MIM : 614213) Ou Paraplégie spastique (MIM : 610357).	Hamdan FF, <i>et al.</i> 2011
<i>CACNG2</i>	602911	22q12.3	Faux-sens	DI modérée.	Hamdan FF, <i>et al.</i> 2011
<i>EPB41L1</i>	602879	1p35.3	Faux-sens	DI sévère	Hamdan FF, <i>et al.</i> 2011

*MRD* : (Mental retardation autosomique dominant) acronyme utilisé par OMIM ; *Fs-SP* : mutation frameshift avec apparition d'un codon STOP prématuré ; *MIM* : référence du gène sur omim ; *ID gène* : identification du gène. Les gènes en bleus représentent ceux qui ont été identifiés par l'analyse d'exome dans des trios familiaux.

### 2.2.2.2) Déficiences intellectuelles liées au chromosome X

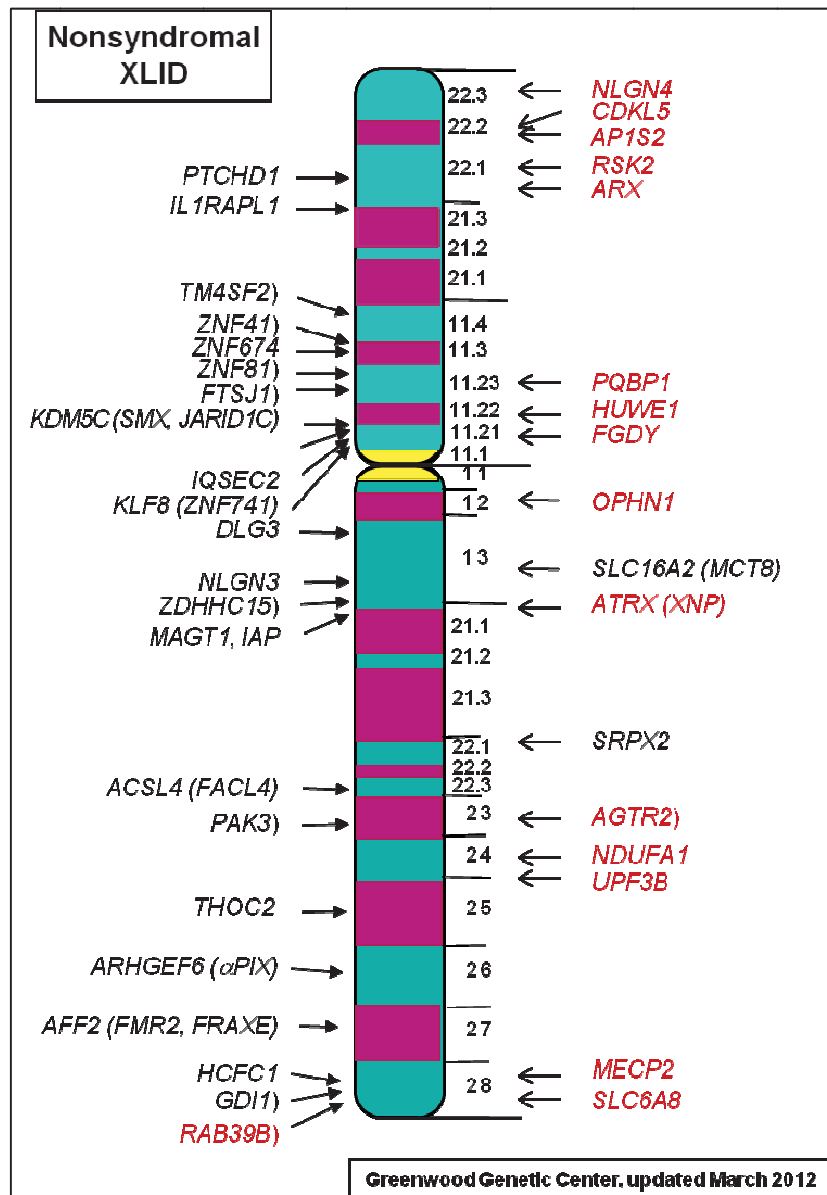
Parmi les DI génétiques, les formes liées au chromosome X (DI-LX) sont un groupe à part entière. Les DI-LX touchent exclusivement les garçons dans le cas d'une hérédité récessive, et les troubles sont plus modérés voire asymptomatiques chez les femmes vectrices/conductrices. L'étiologie des DI-LX avait été estimée à 20-25% des cas. Puis, ce chiffre a été réévalué à la baisse et les DI-LX représentent aujourd'hui 10 à 12% de l'étiologie génétique (Ropers HH. 2010 ; Gécz J, *et al.* 2009).

Les recherches concernant l'implication du chromosome X dans les DI ont débuté dans les années 1990, ce qui fut plus précoce que pour les autres formes de DI génétiques. Les observations selon lesquelles, les DI sont 1,4 fois plus fréquentes chez les hommes que chez les femmes ainsi que le caractère hémizygote de l'homme pour les gènes portés par le chromosome

X, ont fortement contribué à la détection des gènes impliqués dans les DI-LX (Ropers HH. 2010 ; Gécz J, *et al.* 2009). Ainsi, la première anomalie génétique identifiée dans ce groupe de pathologies, fut le syndrome de l’X fragile causé par une répétition anormale de la séquence CGG au niveau de la région 5’UTR du gène *FMR1*. Elle entraîne une absence d’expression de FMRP (Verkerk AJ, *et al.* 1991). A présent, plus de 100 gènes ont été associés aux DI-LX et sont représentés sur les figures 2a et 2b. Ces figures ont été réalisées grâce au site en ligne : <http://www.ggc.org/research/molecular-studies/xlid.html> qui recueille toutes les informations concernant les DI-LX, fournies grâce à des collaborations internationales telles que l’EURO-MRX (<http://www.euomrx.com>) et l’IGOLD Consortium. Ces deux consortiums ont permis une avancée considérable dans le démembrement génétique et dans la compréhension des bases moléculaires des DI-LX.

L’EURO-MRX est un consortium Européen établi en 1995 qui regroupe chercheurs et cliniciens. Cette collaboration a permis d’associer les données cliniques acquises dans une large cohorte de 600 familles multiplex (familles composés de plusieurs enfants) dans lesquelles ségrège une DI-LX, avec des données de cartographie génétique et de clonage positionnel. Le projet s’est ensuite poursuivi par un séquençage systématique de 90 gènes, sélectionnés sur le chromosome X (gènes précédemment associés à une DI-LX ou ayant une forte expression cérébrale), chez l’ensemble des individus de la cohorte. Les mutations causales ont été identifiées pour 42% des familles mais pour le reste des fratries, aucune étiologie n’a été établie (De Brouwer AP, *et al.* 2007).

Figure 2a : Représentation graphique des gènes impliqués dans les formes non- syndromiques de déficiences intellectuelles liées au chromosome X, et leur localisation génomique.



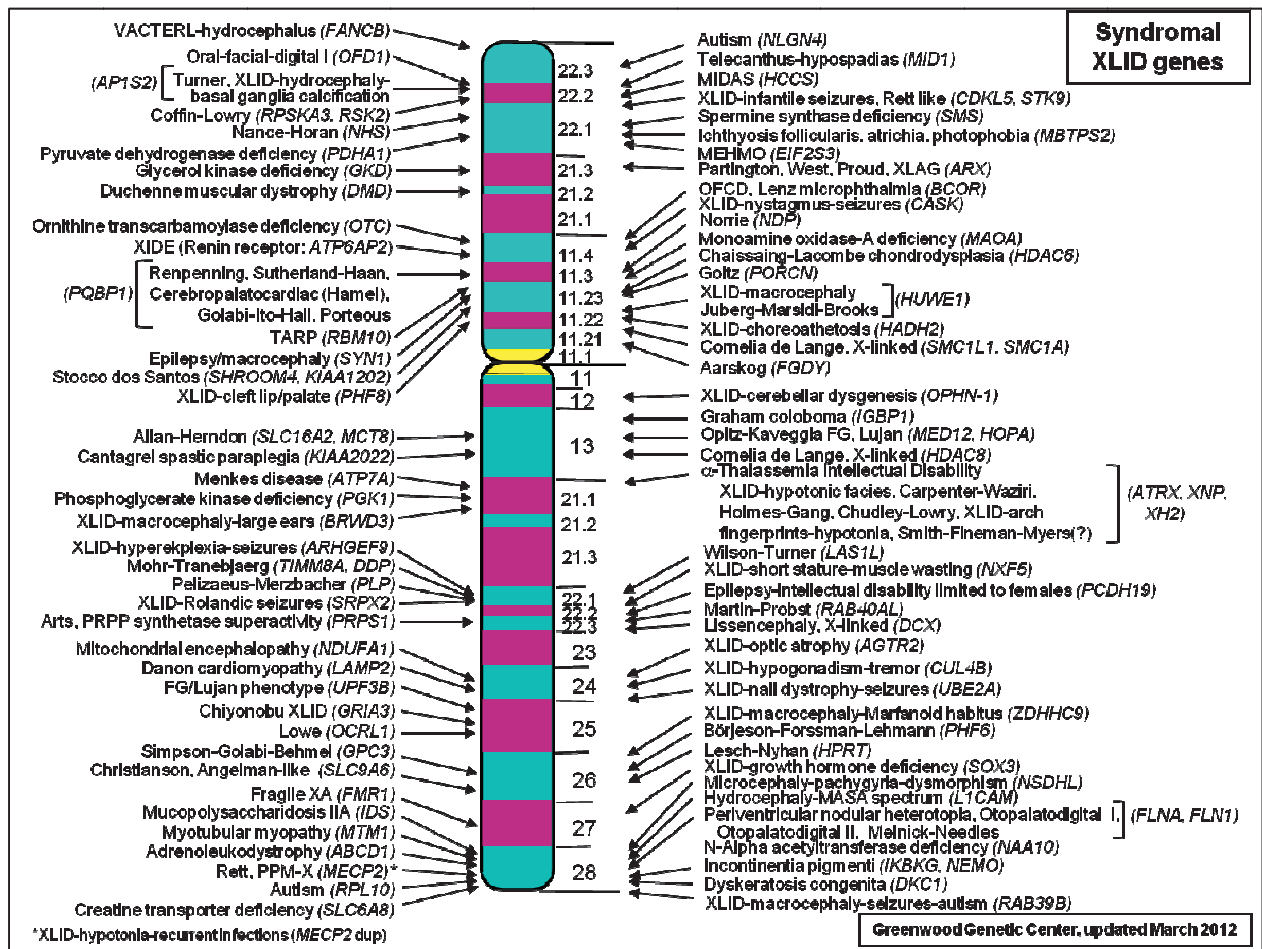
Rq : Les gènes écrits en rouge représentent des gènes qui ont été associés soit à des DI non syndromiques soit des DI syndromiques (phénotypes variables).

Le consortium IGOLD (International Genetics Learning Disabilities) fut le premier projet de séquençage à haut débit ciblé sur les séquences codantes du chromosome X. La séquence des exons a été déterminée pour 718 gènes connus (soit 1 Mb de séquence) puis séquencée dans une cohorte de 208 familles présentant une DI-LX. Ce projet couvre 75% de l'ensemble des régions codantes du chromosome X. Cependant, l'étiologie a été déterminée pour seulement

25% des familles participant à ce programme de recherche (Tarpey P, *et al.* 2009 ; Raymond FL, *et al.* 2009).

Ces résultats montrent que pour la majorité des familles, dont le pédigrée suggère une DI-LX, l'étiologie reste indéterminée lorsque l'étude se restreint aux séquences codantes du chromosome X. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cette observation. En effet, de nombreux variants pathogènes se situent dans les régions non codantes du génome, telles que les régions promotrices, les séquences régulatrices (enhancers/silencers), ou encore dans les introns (notamment les séquences liées aux processus d'épissage). D'autres anomalies non visibles par l'analyse des séquences codantes sont également celles touchant les marques épigénétiques (dérégulation des microARN, défaut de méthylation des îlots CpG ou encore une atteinte du code histone pouvant modifier la structure chromatinienne). Une autre raison évidente est le manque de couverture des séquences codantes des gènes du chromosome X. De plus, ces études ne rendent pas compte des réarrangements chromosomiques ou des CNV. Enfin, bien que l'étude des arbres généalogiques des familles laisse penser à une transmission liée à l'X, les anomalies génétiques pourraient aussi être portées par les autosomes.

Figure 2b : Représentation graphique des gènes impliqués dans les formes syndromiques de déficiences intellectuelles liées au chromosome X, et leur localisation.



L'ensemble de ces découvertes a permis de regrouper les protéines impliquées dans les DI-LX en différentes classes : par rapport à leurs fonctions ainsi que leurs localisations cellulaires. Comme le montre la figure 3, les fonctions des protéines responsables des DI-LX sont principalement impliquées dans le métabolisme (15%), la régulation de la transcription (22%), les composants de la membrane (15%) et la transduction des signaux (19%).

Figure 3 : Représentation en diagramme de la localisation et de la fonction des protéines dont les mutations sont responsables de DI-LX

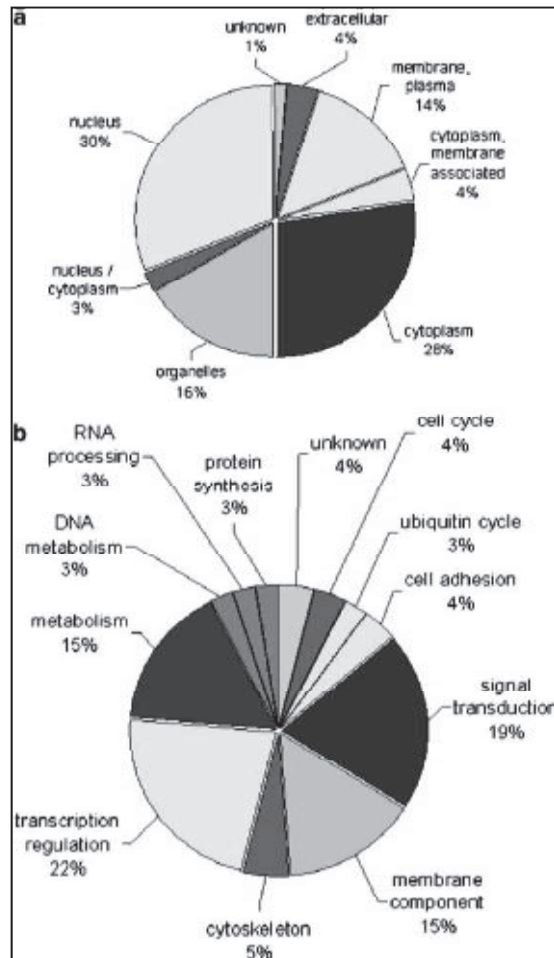


Illustration tirée de l'article de Chiurazzi P, *et al.* 2008; a) localisation des protéines codées par les gènes impliqués dans les DI-LX ; b) fonctions des protéines impliquées dans les DI-LX.

Plus de 90 gènes impliqués dans les DI-LX ont été identifiés et ont permis d'établir des relations génotypes/phénotypes. Cependant, ces pathologies restent extrêmement hétérogènes d'un point de vue clinique même lorsque l'on considère les patients ayant la même anomalie génique (Kaufman L, *et al.* 2010 ; Ham AL, *et al.* 2005). C'est pourquoi, dans de nombreux cas le diagnostic définitif n'est établi que lorsque le défaut moléculaire est identifié.

De façon intéressante, les données génomiques les plus récentes révèlent que le nombre de gènes sur le chromosome X est de 818 tandis que le génome entier compte près de 19 586 gènes. Ainsi, la totalité des gènes codés par le chromosome X représente 4% du génome humain. Or l'étiologie des DI-LX est de 10-12%. Ceci laisse supposer d'un enrichissement de gènes codant des protéines dont les fonctions sont impliquées dans la mise en place et/ou le développement



du SNC, sur le chromosome X. Cette observation peut également expliquer le fait que les hommes (hémizygotés pour les gènes du chromosome X) soient plus touchés par les DI (Gécz J, *et al.* 2009 ; Frints SG, *et al.* 2002). En effet, les femmes conductrices des pathologies récessives de DI-LX ont un second chromosome X, capable de compenser l'anomalie portée par le premier. Dans certains cas, un biais de l'inactivation du chromosome X est également constaté chez les femmes vectrices afin que seuls les gènes du chromosome X sain, soient exprimés. Il semble que le biais de l'inactivation du chromosome X concerne certaines classes de pathologies, notamment celles dont le phénotype est sévère. Ce phénomène est notamment observé dans l'Incontinentia Pigmenti (MIM 308300), maladie touchant exclusivement les femmes (décès *in utero* des garçons porteurs de la pathologie) chez qui le biais d'inactivation du chromosome X atteint des ratios supérieurs à 90 :10 (Martinez-Pomar N, *et al.* 2005). Une autre étude démontre que dans une cohorte de 90 femmes vectrices d'une DI-LX (parmi 20 DI-LX de nature différente) 50% d'entre elles montrent un biais de l'inactivation du chromosome X, contre seulement 10% dans une population de femmes contrôles (Plenge RM, *et al.* 2002).

Les progrès importants réalisés sur les DI-LX ont été possibles grâce à la facilité de discerner le mode de transmission des mutations, mais aussi grâce au large pédigrée des familles qui ont participé à ces programmes et qui permettent de réaliser des études de liaison très fiables. La stratégie de combiner ces études de liaisons avec une recherche de gènes candidats a largement fait ses preuves dans l'identification des gènes de DI-LX.

### 2.2.2.3) Formes autosomiques récessives des DI

Si l'identification des gènes responsables de DI-LX a connu un essor considérable, les progrès ont été nettement moins marqués dans la recherche des étiologies des formes autosomiques récessives de DI (DI-AR). L'extrême hétérogénéité génétique et clinique de ces pathologies et la taille souvent trop restreinte des fratries ont longtemps freiné l'identification de gènes associés aux DI-AR. De plus, l'aspect non syndromique ou non spécifique des DI rend souvent difficile le regroupement de plusieurs patients dans une même analyse. L'ensemble de ces facteurs empêche ainsi toute étude de liaison et les recherches doivent être pratiquées au sein de chacune des fratries (Kuss AW, *et al.* 2010 ; Ropers HH. 2010). Néanmoins, les DI-AR représenteraient à elles seules, environ 25% de l'étiologie génétique des DI (Rafiq MA, *et al.*

2010). L'investigation de ces pathologies participe donc fortement à la compréhension des bases physiopathologiques des DI.

Pour s'affranchir de ces limites, l'étude de familles consanguines multiplex est une approche de choix. Les mariages consanguins augmentent de façon importante le risque de développer une DI, ou toute autre anomalie congénitale, transmise sous forme récessive (Kuss AW, *et al.* 2010). La consanguinité augmente la probabilité qu'une variation génétique pathogène se retrouve sous forme homozygote chez les descendants à l'origine d'une pathologie.

La méthode de cartographie par autozygotie repose sur le principe qu'un ancêtre commun non malade soit porteur d'une mutation à l'état hétérozygote qu'il transmettra à sa descendance et ségrégera dans la famille. Suite à une union consanguine, le variant pathogène sera alors présent en double copies chez les malades, dits homozygotes par descendance (voir figure 4). Les malades sont porteurs homozygotes pour la mutation mais également pour les fragments de chromosome flanquants le locus morbide et les marqueurs génomiques proches (SNP : Single Nucleotide Polymorphism et marqueurs microsatellites). Plusieurs régions sont homozygotes par descendance, mais elles sont souvent différentes d'un individu atteint à l'autre. Cette stratégie a donc pour but d'identifier des régions homozygotes communes aux enfants atteints et génodifférentes des enfants sains (homozygotes sauvages ou hétérozygotes pour la mutation). L'efficacité de cette méthode dépend de deux paramètres importants : le nombre total d'enfants dans la famille (traduisant le nombre de méioses) et le degré de consanguinité : plus celui-ci est éloigné, plus le nombre de recombinaisons augmente et plus la région suspecte est réduite. L'étude se poursuit alors par l'analyse de gènes candidats qui consiste à étudier les gènes présents dans l'intervalle critique et dont le dysfonctionnement pourrait rendre compte du phénotype observé.

C'est grâce à cette stratégie que le premier gène impliqué dans une DI-AR non spécifique a été découvert en 2002 par le groupe de Laurence Colleaux (Molinari F, *et al.* 2002). Lorsque j'ai débuté ma thèse, cinq gènes de DI-AR non spécifiques avaient été identifiés, puis six autres l'ont été au cours de mon doctorat (table 5). La méthode alliant la cartographie par autozygotie et

une stratégie de recherche de gènes candidats s'est révélée être une stratégie puissante dans l'identification de gènes responsables de DI-AR car elle a permis la découverte des 8/11 gènes.

Trois gènes (*TECR*, *MANB1P1*, et *ST3GAL3*) récemment découverts ont été identifiés grâce à une nouvelle approche : l'association de la cartographie par autozygotie et du séquençage d'exome. Les résultats du séquençage à haut débit sont particulièrement étudiés au niveau du locus d'intérêt identifié par la cartographie par autozygotie (Caliskan M, *et al.* 2011 ; Rafiq MA, *et al.* 2011, Hu H, *et al.* 2011). D'autres stratégies apparaissent, comme l'équipe de Ropers et collaborateurs qui ont mis au point une approche innovante ayant permis la publication de 50 gènes candidats de DI-AR (Najmabadi H, *et al.* 2011). Ils ont combiné la cartographie par autozygotie à un séquençage à haut débit des séquences codantes présentes dans l'intervalle des loci candidats. Les résultats de cette étude sont détaillés dans la partie Discussion et conclusions générales de ce manuscrit.

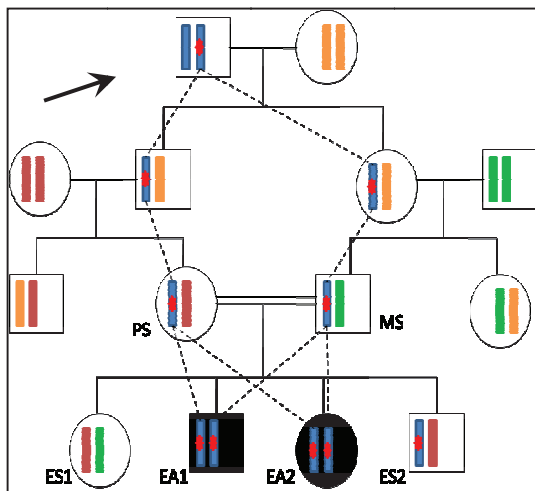


Figure 4 : Méthode de la cartographie par autozygotie

Méthode décrite pour la première fois en 1987 ayant largement fait ces preuves dans le domaine des pathologies récessives (Lander ES *et al.* Science 1987). Le principe stipule qu'une mutation présente sous forme hétérozygote chez un ancêtre commun (flèche) sain, ségrège dans la famille. Puis, au cours d'un mariage consanguin (PS et MS), les parents tous deux porteurs de la mutation hétérozygote transmettent la mutation à la descendance qui sera retrouvée à l'état homozygote, déclenchant ainsi une pathologie. Les enfants sains sont génodifférents des enfants atteints. L'analyse de liaison permet d'identifier ces régions homozygotes communes aux enfants atteints et différentes chez les enfants sains. Puis une stratégie de gènes candidats est employée pour définir le gène le plus probable de la région candidate.

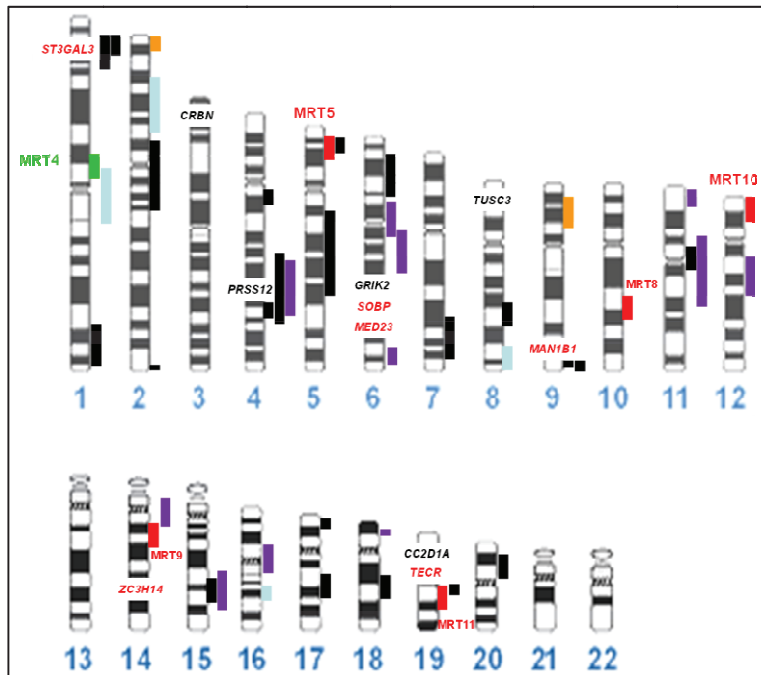
Table 5 : Gènes impliqués dans les déficiences intellectuelles non syndromiques de forme autosomique récessive.

Gènes	Locus	Phénotype	Fonction protéine	Références
<i>PRSS12</i> ( <i>MRT1</i> )	4q28.1	DI sévère (QI<50) ; non syndromique	Neurotrypsin : enzyme de la famille des sérines protéase capable de cliver l'agrine qui devient ligand activateur de synapses impliqué dans la formation des filopodes à l'origine des dendrites	Molinari F, <i>et al.</i> 2002 ; Matsumoto-Miyai K, <i>et al.</i> 2009
<i>CRBN</i> ( <i>MRT2</i> )	3q26.2	DI modérée (50<QI<70) ; non syndromique	Cerebelon : protéine impliquée dans la régulation négative du complexe AMPK par dephosphorylation de la sous-unité $\alpha$ ; Complexe intervenant dans les réactions au stress (ischémie hypoxique). Protéine précédemment associée à l'action d'une E3 ligase mais cette interaction reste à démontrer.	Higgins JJ, <i>et al.</i> 2004 ; Lee KM, <i>et al.</i> 2011
<i>CC2D1A</i> ( <i>MRT3</i> )	19p13.12	DI sévère avec absence de langage	CC2D1A/Freud-1 : Protéine impliquée dans l'activation de la voie principale NF- $\kappa$ B, dans la cascade d'activation impliquant TRAF2 (voie TNF). Action qui semble restreinte au SNC. Souris <i>Cc2d1a</i> <sup>-/-</sup> : mort postnatale suite à l'incapacité de respirer; implication de la protéine dans la maturation et dans le trafic vésiculaire au niveau de la synapse.	Basel-Vanagaite L, <i>et al.</i> 2005 Zhao M, <i>et al.</i> 2010 Zhao M, <i>et al.</i> 2011
<i>GRIK2</i> ( <i>MRT6</i> )	6q16.3-q21	DI modérée à sévère ; non syndromique	Glutamate receptor 6 gene (GLUR6) : les souris <i>Glur6</i> <sup>-/-</sup> présentent des anomalies du LTP (long-term potentiation) au niveau de l'hippocampe. Des études sur le rat montrent que GLUR6 est impliqué dans l'endocytose du récepteur Kainate au niveau de la synapse, participant à l'excitation de la fibre axonale.	Motazacker MM, <i>et al.</i> 2007 ; Contractor A, <i>et al.</i> 2001 ; Martin S, <i>et al.</i> 2007
<i>TUSC3</i> ( <i>MRT7</i> )	8q12	DI sévère sans autres signes distinctifs reportés	Tumor suppressor candidate 3: protéine pouvant être impliquée dans la N-glycosylation grâce à son interaction avec le complexe N-oligosaccharyl transferase. La glycosylation joue un rôle au niveau de la plasticité synaptique. Cependant l'implication de TUSC3 au niveau de la synapse reste à démontrer.	Molinari F, 2008 Garshasbi M, 2008 Khan MA, 2011
<i>TECR</i> ( <i>MRT14</i> )	19q13.12	Retard intellectuel modéré à sévère ; légères déficiences motrices	Trans-2,3-enoyl-CoA reductase : Glycoprotéine synaptique impliquée dans la synthèse de très longue chaîne d'acides gras. L'orthologue du gène <i>TECR</i> chez la souris est très fortement exprimé dans le cerveau.	Caliskan M, <i>et al.</i> 2011 ; Moon YA, <i>et al.</i> 2003
<i>SOBP</i>	6q21	DI non syndromique ou syndromique (protrusion maxillaire, strabisme, épilepsie, psychose, perte de l'audition)	Sine Oculis Binding protein ortholog : Zinc finger protéine impliquée dans la mise en place de la cochlée chez la souris. Forte expression de <i>Sobp</i> dans le système limbique de la souris (régulation de l'apprentissage, de la mémoire et des comportements affectifs).	Birk E, <i>et al.</i> 2010
<i>MAN1B1</i> ( <i>MRT15</i> )	9q34.3	DI sévère non syndromique ou syndromique (dysmorphie faciale ; épilepsie ; Clinodactylie*)	Mannosyl Oligosaccharide, alpha 1,2 mannosidase : protéine du réticulum endoplasmique faisant partie de la classe des mannosidases ; appartenant à la famille des glycosyl hydrolase. Participe à la sécrétion des glycoprotéines mal formées dirigées vers la dégradation	Rafiq MA, <i>et al.</i> 2011
<i>MED23</i>	6q23.2	DI moyenne à modérée, non syndromique	Mamalian Mediator 23 : présente au sein du complexe médiateur composé de 20 sous-unités. Complexe intervenant dans la transcription, comme un adaptateur dirigeant les facteurs de transcription au niveau des gènes cibles.	Hassimoto S & Boissel S, <i>et al.</i> 2011
<i>ZC3H14</i>	14q31.3	DI non spécifique	Zinc finger CCCH-type containing 14 isoform 1: protéine fortement exprimée dans les neurones de l'hippocampe et capable de réguler des ARNm en les liant au niveau de la queue poly(A)	Pak C & Garshasbi M, <i>et al.</i> 2011
<i>ST3GAL3</i>	1p34.1	DI non spécifique	B galactoside $\alpha$ 2,3 Sialyltransferase-III: cette enzyme est impliquée dans la transformation de l'acide Sialique et est localisée au niveau du Golgi tardif. Ce substrat participerait à des processus de communication cellulaire mais son rôle est mal défini. Son absence chez la souris est létal embryonnaire.	Najmabadi H, <i>et al.</i> 2007 Hu H, <i>et al.</i> 2011

Rq : Les gènes apparaissant en bleu ont été décrits dans la littérature après le début de mon doctorat (octobre 2008)

Enfin, il est important de noter que les DI-AR sont également d'une extrême hétérogénéité génétique comme le démontre la figure 5. Les régions liées à des DI-AR sont présentes sur la totalité du génome.

Figure 5 : Représentation des loci identifiés dans le cadre des formes autosomiques récessives de déficiences intellectuelles.



**MRT** : 7 Loci identifiés par Najmabadi H et collaborateur en 2007 et référencés sur OMIM.

**MRT**: 1 locus identifié chez une famille Turque par Uyguner O, *et al.* en 2007.

**MRT** : 27 loci identifiés très récemment par l'équipe de Kuss AW en 2010.

**MRT** : 3 loci identifiés par Rafiq MA, et collaborateurs en 2010

**MRT** : 11 loci publiés par Abou Jamra R. et collaborateurs en 2011.

**MRT** : 4 loci identifiés dans l'équipe de Laurence Colleaux (non publiés) chez des familles consanguines multiplex avec DI non syndromiques ou syndromiques

L'abréviation MRT est l'acronyme utilisé par OMIM pour désigner les retards

mentaux autosomiques récessifs. Les gènes ayant été impliqués dans des formes autosomiques récessives de déficiences intellectuelles non syndromiques sont également localisés sur cette figure (en noir : découverts avant le début de mon doctorat ; en rouge : découvert pendant la période de mon doctorat)

D'autre part, la majorité des gènes précédemment identifiés dans les DI-AR ont été retrouvés chez une unique famille, ou dans un unique village, dans le monde. C'est le cas de *PRSS12* qui a été corrélé à 3 familles présentant une DI, toutes issues du même village ; laissant supposer d'un effet fondateur de cette variation. Ce phénomène a également été observé pour *CC2D1A*. L'équipe de Lina Basel-Vanagaite a rapporté 9 familles, toutes issues du même village, présentant les mêmes symptômes, et toutes porteuses de la même mutation du gène *CC2D1A*.

Dans de rares cas, le gène causal a été identifié chez plusieurs familles indépendantes. Lorsque j'ai débuté mon doctorat, *TUSC3* était le seul gène associé à deux familles indépendantes. Concernant les gènes découverts récemment, seuls *MAN1B1* et *ST3GAL3* ont été corrélés à plusieurs familles d'origine différente. C'est pourquoi, à présent, dès lors qu'il y a recrutement d'une famille consanguine avec une DI non spécifique, des collaborations internationales se mettent en place afin d'organiser des dépistages systématiques des régions homozygotes au sein de ces familles. Ceci a pour but d'optimiser le recoupement avec les loci précédemment identifiés dans les DI-AR (Ropers. 2010).

### **3) Objectifs des travaux**

Malgré ces progrès technologiques et l'avancement de nos connaissances sur l'origine génétique des DI, l'étiologie de la maladie reste inconnue dans 50% des cas. Parmi ces cas idiopathiques, 25% des causes suivraient une transmission autosomique récessive. Mon travail de thèse a donc pour objectif de participer au décryptage des mécanismes moléculaires et physiopathologiques sous-tendant les formes autosomiques récessives de DI.

L'approche de cartographie par autozygotie s'est révélée extrêmement fructueuse pour localiser les régions contenant les gènes responsables de ces pathologies. Toutefois, elle conduit souvent à l'identification de régions candidates de grande taille (8-12 Mb), du fait de la petite taille des fratries étudiées. L'étude des nombreux gènes candidats localisés dans ces intervalles est coûteuse longue et fastidieuse. De plus, elle est le plus souvent restreinte aux régions codantes et sites consensus d'épissage. Les microremaniements à distance en 5' et 3' des gènes ainsi que les mutations introniques échappent au criblage.

L'objectif de mon travail de thèse était donc de tester l'intérêt de combiner l'approche de cartographie par autozygotie avec une étude d'expression génique. Cette stratégie a été appliquée chez deux familles multiplex et consanguines de notre cohorte pour lesquelles soit une biopsie cutanée soit une lignée lymphoblastoïde a été obtenue.

1 - La famille Ja est une famille de cinq enfants, dont trois présentent une DI sévère associée à une paraplégie spastique progressive, une petite taille et un caractère timide et amicale. Ce travail, réalisé en collaboration avec une équipe allemande, a permis d'identifier trois nouveaux gènes impliqués dans les DI-AR. De plus, il nous a permis de caractériser un nouveau syndrome cliniquement reconnaissable.

2 – La famille BM est composée de quatre garçons dont trois présentent un retard intellectuel sévère avec une absence quasi-totale de langage et une microcéphalie variable. L'étude clinique plus fine a permis de révéler une anomalie à l'IRM très rarement observée.

Cette particularité nous a conduits au recrutement de patients présentant ces mêmes caractéristiques. De façon très intéressante, ces recherches nous ont dirigés vers un autre projet dans lequel nous avons fait des corrélations génotypes/phénotypes sur la base de cette anomalie à l'IRM. Les résultats suggèrent un rôle clé de la signalisation NF- $\kappa$ B dans le développement cérébral, en particulier la myélinisation du système nerveux central, et le développement cognitif.

Ces chapitres sont ensuite discutés dans une dernière partie de discussion et conclusions générales.

PARTIE 1 : IDENTIFICATION D'ANOMALIES  
GENETIQUES IMPLIQUEES DANS LES  
DEFICIENCES INTELLECTUELLES  
AUTOSOMIQUES RECESSIVES



## **Chapitre 1) Evaluation de l'intérêt de combiner cartographie primaire et analyse transcriptomique pour identifier des gènes impliqués dans des DI-AR : preuve de concept**

La très grande majorité des familles consanguines de notre cohorte, résulte d'un mariage entre cousins du premier degré (cousins germains, CS : 1/16) ou du second degré (cousins issus de germains, CS : 1/64) entraînant un coefficient de consanguinité (CS) élevé chez la descendance. Le petit nombre de méioses entre l'ancêtre commun et les patients limite le nombre de recombinaisons alléliques et favorise la détection de régions homozygotes de grande taille pouvant contenir jusqu'à 200 gènes connus. La recherche de gènes candidats devient alors longue et fastidieuse car il faut étudier et analyser toutes les informations recueillies dans plusieurs banque de données (USCS ; Ensembl ; NCBI ; ExPASy ; HGNC ; GeneCards ; ...), gène par gène, sur leur fonction, leur implication ou non dans une pathologie et leurs territoires d'expression. De fait, cette recherche se limite souvent aux gènes les plus caractérisés à ce jour, et sous-estime les gènes prédits pour lesquels le manque d'information ne permet pas d'orienter le séquençage.

Pour s'affranchir de cette limite, nous avons testé l'intérêt de combiner la cartographie par autozygotie et l'étude d'une puce à expression de gènes (ou transcriptome) dont l'analyse est dirigée spécifiquement au niveau de la région d'intérêt. Le but est d'identifier des gènes dont l'expression est altérée chez les patients et qui sont localisés dans la région candidate. Ceci permet d'orienter le séquençage des gènes candidats.

Les études de liaison ont été réalisées par Christine Bole-Feysot et Mohammed Zarhrate travaillant à la plateforme génomique de la Fondation Imagine, sur des puces Affymetrix® 250K (250 000 SNP répartis sur tout le génome) à partir de l'ADN des familles (parents, enfants sains et atteints). Les études transcriptomiques sont également réalisées à la plateforme génomique de la Fondation Imagine à partir des ARN totaux extraits de cellules de patients et de contrôles. Les puces utilisées sont des puces Affymetrix® U133 plus 2.0 ; elles permettent l'étude de 47 000 transcrits dont certains sont définis à partir de gènes prédits. Les données générées par ces techniques sont ensuite traitées au service bioinformatique de Necker par Patrick Nitschke et Jean-Marc Plaza.

Cette stratégie a été validée en 2008 par deux études indépendantes. Une équipe a identifié le gène responsable d'une glomérulosclérose associée à une épilepsie dans une famille consanguine et multiplex (Berkovic SF, *et al.* 2008). Et un second article a révélé des mutations dans d'*IDH3* impliquées dans une rétinite pigmentaire (Hartong DT, *et al.* 2008).

Néanmoins, cette approche présente plusieurs limites:

- Il est nécessaire que la mutation causale de la pathologie altère la stabilité du transcrit du gène concerné. Les mutations capables d'induire cet effet sont les mutations conduisant à l'apparition d'un codon stop prématuré : non-sens, insertions/délétions de un ou plusieurs nucléotides entraînant un décalage du cadre de lecture, mutations d'épissage. L'analyse de la base de donnée HGMD (site online « Human Genome Mutation Database ») suggère que les mutations conduisant à l'apparition d'un codon STOP prématuré, représentent 40% des mutations responsables de maladies génétiques.
- Il faut également que le gène impliqué dans la pathologie soit exprimé dans le type cellulaire de notre étude (fibroblastes ou lignées lymphoblastoïdes). Les études précédentes sur les DI-AR indiquent que la grande majorité des gènes identifiés sont exprimés dans les fibroblastes.

Afin de valider cette stratégie, une étude pilote a été réalisée chez la famille Lef pour laquelle une mutation non-sens avait été identifiée dans *TUSC3*. Les résultats de cette étude ont également démontré la diminution du transcrit *TUSC3* par RT-PCR quantitative (Molinari F, *et al.* 2008).

Le transcriptome a été pratiqué chez un patient de la famille Lef, à partir d'ARNm extraits de fibroblastes, et comparé à celui de 3 contrôles indépendants. Chacun des individus est rapporté à un individu de référence C12, dans le but d'établir un ratio représentatif de l'expression génique pour chacune des sondes présentes sur la puce. Ainsi, un ratio de 1 correspond à un taux de transcrit équivalent entre l'individu testé et l'individu contrôle C12 ; un ratio inférieur à 1 révèle la diminution du transcrit et à l'inverse un ratio supérieur à 1 démontre une surexpression génique, chez le patient. Le résultat peut être renforcé si plusieurs sondes reconnaissent un même transcrit. En effet, lorsque le gène est de petite taille, il est fréquent

qu'une seule sonde soit capable de reconnaître son ARNm ; en revanche, si le gène est de grande taille plusieurs sondes peuvent s'hybrider au même transcrit.

Les données de notre étude pilote nous ont révélées plusieurs informations :

- 1) Les résultats de la puce à expression de gène montrent l'extrême variabilité de l'expression de nombreux gènes (~2 000), pour tous les individus analysés (patients et contrôles confondus). Cette approche doit donc impérativement être précédée d'une étude de liaison afin d'établir une/plusieurs région(s) candidate(s) permettant d'orienter les analyses transcriptomiques.
- 2) Pour l'étude pilote, le locus d'intérêt comprend 65 gènes connus (version Hg19 sur UCSC). Or les données transcriptomiques interprétables et significatives permettent l'analyse de 45 gènes dans la région d'intérêt, soit environ 70% de la région.
- 3) Enfin, la mutation non-sens identifiée dans *TUSC3* entraîne la diminution du ratio des deux sondes capables de reconnaître ce transcrit (voir tableau ci-dessus) tandis que le ratio est proche de 1 pour les 3 contrôles indépendants. De plus, c'est le seul gène de la région à montrer une sous-expression de cet ordre. Il est à noter que la normalisation et le traitement des données informatiques, à tendance à « lisser » le déclin de l'ARNm et minimiser le ratio. En effet, la RT-PCR en temps réel individuelle réalisée chez le patient Lef, montre une diminution du transcrit de 50 à 75% (en fonction du gène de référence utilisé). Ceci correspondrait à un ratio de 0,5 et 0,25 respectivement. Or les ratios établis par le transcriptome, pour ce même transcrit, sont proches de 0,7 (soit 30% de déclin de l'ARNm) (voir tableau ci-dessous).

Sonde	LEF/C12	Cont.1/C12	Cont.2/C12	Cont.3/C12	P value
209228_x_at	<b>0,7346</b>	1,0556	0,9801	0,9898	1,33e-19
213423_x_at	<b>0,7683</b>	1,0474	0,9698	0,9882	1,72e-21

Les sondes 209228\_x\_at et 213423\_x\_at sont spécifiques du gène *TUSC3*.

Cette étude préliminaire a révélé les limites de cette méthodologie, mais surtout elle a démontré l'intérêt de combiner cartographie par autozygotie et analyses transcriptomiques dans la détection de gènes responsables de DI-AR.

## **Chapitre 2) Anomalies du complexe AP4 responsables d'une DI sévère et syndromique**

Les parties 1-3 de ce chapitre ont fait l'objet de l'article : « *Adaptor protein complex 4 deficiency causes severe autosomal-recessive intellectual disability, progressive spastic paraplegia, shy character, and short stature* » (Abou Jamra R & Philippe O, *et al.* 2011).

La partie 4 de ce chapitre concerne un article en cours d'écriture du Dr Annick Raas-Rothschild « *Adaptor-related protein complex 4, beta 1 subunit (AP4B1): a new player in autosomal recessive mental retardation syndrome* ».

### **1) Evaluation clinique des patients Ja (ID01)**

La famille Ja est une famille arabo-israélienne composée de 5 enfants (trois filles et deux garçons), nés d'un mariage entre cousins issus de germains. Cette famille est suivie par la pédiatre Annick Raas-Rothschild, au centre hospitalo-universitaire d'Hadassah en Israël. Trois des cinq enfants, deux filles et un garçon, présentent des symptômes similaires : une DI sévère avec une absence de langage ; une microcéphalie et une symptomatologie neurologique alors qu'il existe une hypotonie à la naissance, les patients développent secondairement une hypertonie et une hyperréflexie, et une spasticité avec perte de la marche ; une petite taille et un comportement timide, enjoué et sympathique. Ils sont nés après une grossesse et un accouchement sans particularité. A l'examen, il existe des particularités morphologiques avec, un palais haut, une hyperlaxité des genoux marquée par un genu recurvatum et des pieds plats. Il n'y a pas d'épilepsie ni d'anomalie de la vision ni de l'audition ni de malformation associée, une lignée lymphoblastoïde a été établie à partir de l'individu IV.2 (fille atteinte) et de l'individu IV.3 (sœur saine) (Abou Jamra R & Philippe O, *et al.* 2011) ou figure 8 du manuscrit).

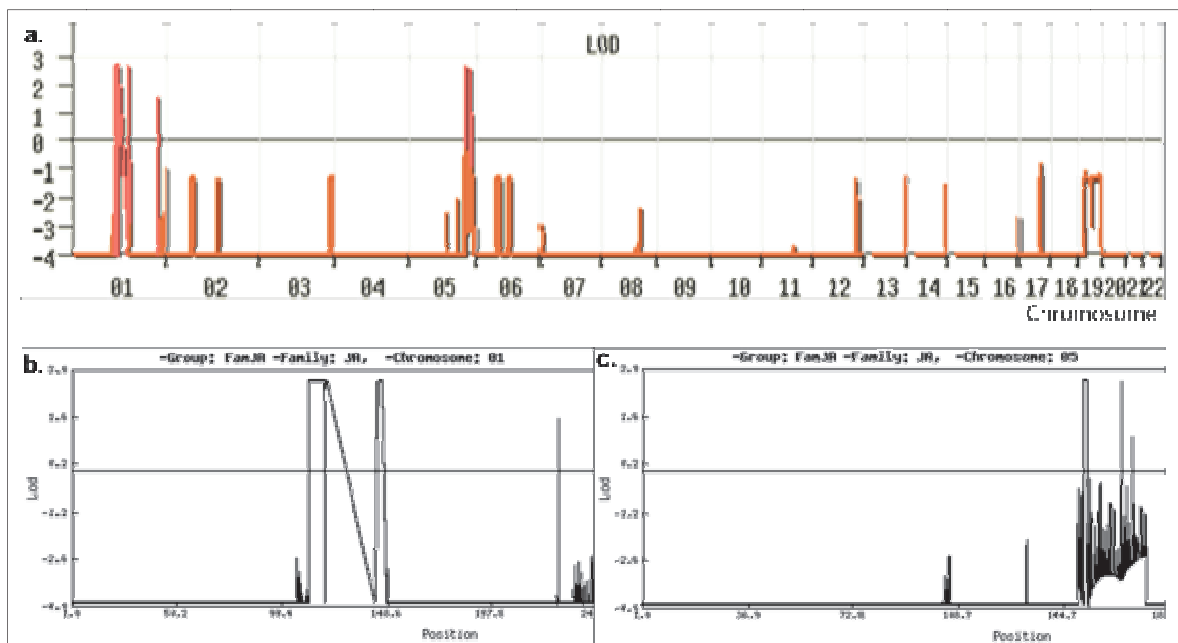
Nous n'avons pas obtenu de photographies des patients, ni d'images cérébrales par IRM ou scan. En revanche, une lignée lymphoblastoïde a été établie à partir de l'individu IV.2 (fille atteinte) et de l'individu IV.3 (sœur saine) (Abou Jamra R & Philippe O, *et al.* 2011) ou figure 7 du manuscrit). Nous avons donc entrepris d'appliquer notre stratégie d'étude à la famille Ja (ID01).

## 2) Cartographie par autozygotie couplée à une étude transcriptomique

### 2.1) Cartographie par autozygotie de la famille Ja.

Le tour du génome a mis en évidence deux régions homozygotes communes aux enfants malades et génodifférentes des enfants sains : une grande région sur le chromosome 1 (1p13.2-q21.2) et une sur le chromosome 5 (5q34) comme cela est indiqué en figure 6. Seules les régions de plus de 2 Mb et pour lesquelles le LOD score est supérieur à 2, ont été conservées pour la suite de l'étude.

Figure 6 : Représentation graphique des résultats de la cartographie par autozygotie de la famille Ja.

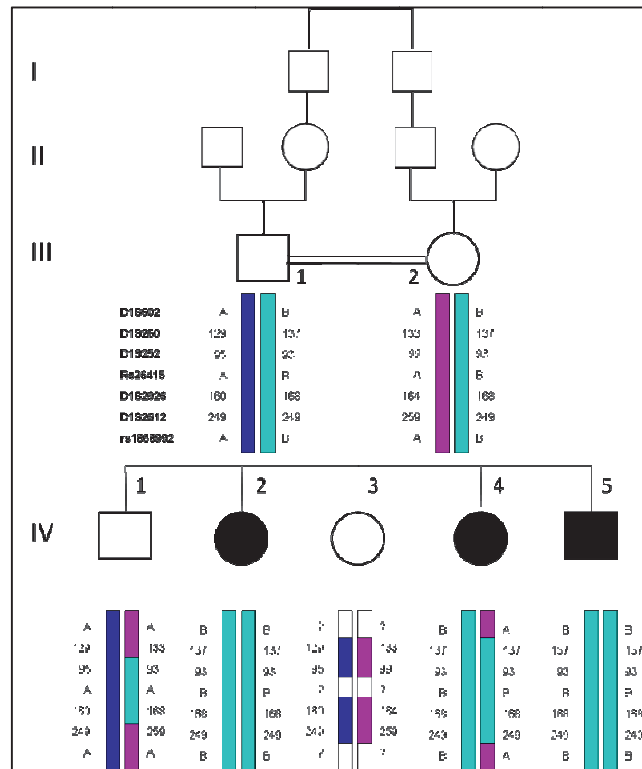


a. Représentation graphique des études de liaison de la famille Ja avec les régions candidates représentées en rouge. b. région candidate du chromosome 1 péri-centromérique. c. région candidate du chromosome 5 sur le bras long du chromosome. La ligne horizontale représente pour chaque graphique le LOD à 0.

Afin de confirmer ces résultats, des marqueurs microsatellites ont été analysés pour chacune des régions candidates dans le but de valider les résultats obtenus par l'étude de liaison. La région sur le chromosome 5 a été exclue car les marqueurs microsatellites analysés ont mis en évidence des recombinaisons, réduisant la taille de la région et la rendant moins pertinente pour la suite de l'étude. Les analyses transcriptomiques ont donc été dirigées spécifiquement sur la région du chromosome 1, bornée par les marqueurs D1S502;rs1868992

(voir figure 7). La région retenue est une région péri-centromérique de 37,4 Mb (version Hg19 de UCSC), dont la position est : chr1:112 309 397-148 174 732. Elle contient 146 gènes connus et est bornée par les gènes : *KCND3* et *MTMR11*.

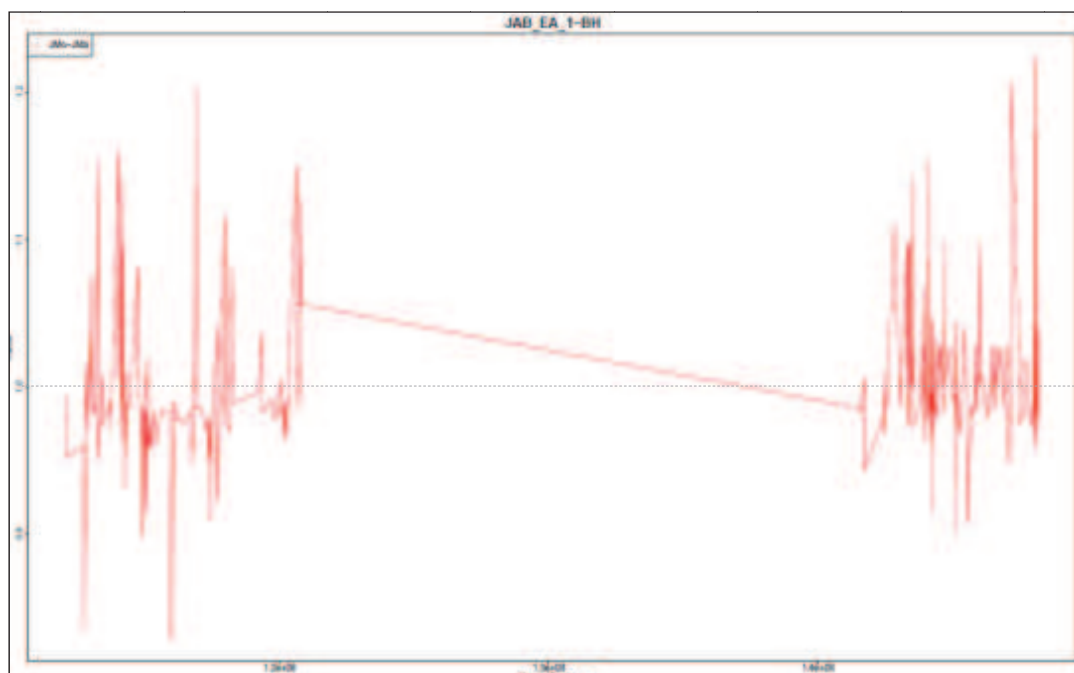
Figure 7 : Arbre généalogique de la famille Ja montrant les bornes de la région du chromosome 1.



## 2.2) Analyse transcriptionnelle de la famille Ja.

L'étude de l'expression génique a été réalisée à partir des deux lignées lymphoblastoïdes dérivées des sujets IV.2 et IV.3. Bien que l'analyse ait été pratiquée sur la totalité des transcrits, seule la région d'intérêt au niveau du chromosome 1 a été examinée, en première intention. Les résultats montrent que 66 gènes sont analysés par la puce au niveau du locus d'intérêt, soit seulement 45,5% de la totalité des gènes codés dans cet intervalle. Les résultats sont présentés sous forme schématique en figure 8 et révèle une forte instabilité des transcrits entre les deux sœurs, puisque le ratio des sondes est rarement proche de 1.

Figure 8 : Représentation graphique des données transcriptomiques au niveau de la région du chromosome 1 chez la patiente IV.2



En abscisse : Position génomique des transcrits sur le chromosome 1 ; en ordonnée : ratio établi pour chacune des sondes de la puce transcriptomique : IV.2 (EA)/IV.3 (ES). La ligne en pointillée représente un ratio de 1.

Nous avons tout de même tenté d'interpréter ces résultats et recherché les gènes pour lesquels le ratio des transcrits était le plus éloigné possible de 1. Cependant, les valeurs n'étaient soit pas significatives, soit une autre sonde du même gène contredisait les résultats. Nous avons donc conclu à partir de cette étude menée sur des lignées lymphoblastoïdes, que les données obtenues ne sont pas interprétables. Nous avons fait l'hypothèse qu'une telle observation peut être due aux conséquences de l'immortalisation des cellules par l'EBV (virus d'Epstein Barr) qui pourrait en modifier l'expression génique. De plus, le nombre de gènes analysables dans ce type cellulaire (45% des gènes totaux) semble nettement inférieur au nombre de gènes interprétables à partir de fibroblastes (70% dans notre étude pilote). Ainsi, nous avons poursuivi cette étude par une stratégie classique : l'étude de gènes candidats.

### **3) Identification de mutations touchant les sous-unités du complexe AP4**

#### **3.1) Etude de gènes candidats dans la famille Ja.**

L'étude de gènes candidats m'a conduit au séquençage de 10 gènes (table 6) avant d'identifier une insertion homozygote de 3 bases TAT dans l'exon 5 du gène *AP4B1* (MIM



607245). Cette insertion co-ségrège dans la famille Ja avec la pathologie et n'a pas été retrouvée parmi 796 chromosomes contrôles (Abou Jamra R & Philippe O, *et al.* 2011 : figure 1). Elle provoque un décalage du cadre de lecture et entraîne la substitution de l'acide aminé (aa) Glutamine 163 en Valine, suivie de l'apparition d'un codon stop prématuré à l'aa n+1 de la mutation (p.(Glu163ValfsX1). Les électrophorégrammes de la famille Ja démontrant l'insertion des trois nucléotides TAT sont présentés en figure 2.C de l'article. *AP4B1* a été analysé au cours de l'étude transcriptionnelle mais aucune des trois sondes capables de reconnaître le transcrit, ne montre de déclin.

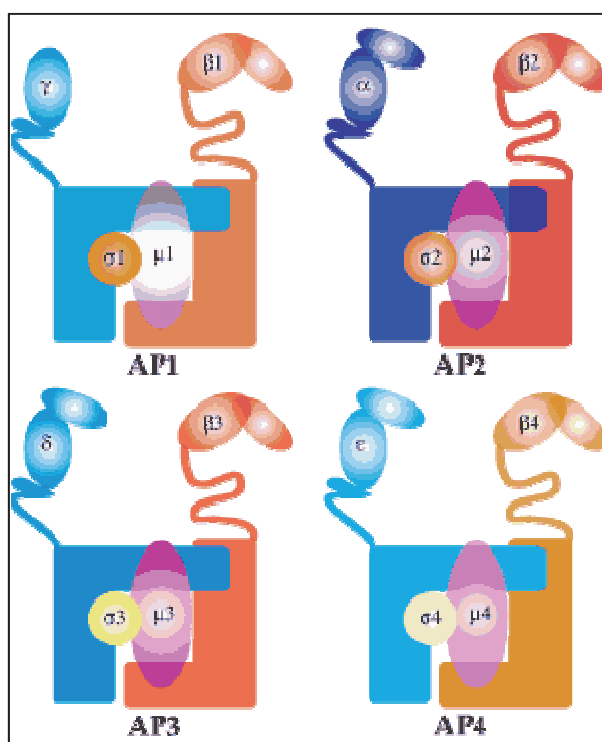
Bien que les données transcriptomiques n'aient pas révélées de sous-expression du transcrit *AP4B1* chez la patiente IV.2, nous l'avons quantifié par RT-PCR quantitative. L'analyse a été réalisée à partir d'ARN totaux extraits de fibroblastes, dont la biopsie cutanée a été obtenue au cours de l'étude. Les résultats montrent un effondrement du taux du transcrit *AP4B1* proche de 80% chez la patiente IV.2 comparé à 3 contrôles indépendants (Abou Jamra R & Philippe O, *et al.* 2011 : figure 1.B). Il est tout de même surprenant que ce résultat n'ait pas été visible sur les analyses transcriptomiques d'autant plus que le taux du transcrit est fortement atteint (80% de diminution). Nous suspectons à nouveau que l'immortalisation des lymphocytes par l'EBV pourrait modifier l'expression des gènes lymphocytaires. Afin de vérifier cette hypothèse, nous pourrions réitérer l'analyse du transcriptome à partir des ARN totaux extraits des fibroblastes de la patiente IV.2 afin de conclure sur la pertinence du transcriptome dans cette étude précise.

Table 6 : Gènes candidats séquencés chez la famille Ja.

Gène	Fonction/Rôle
<i>CAPZA1</i>	(F-actin capping protein alpha-1 subunit); protéine structurale impliquée dans la croissance et la maintenance cellulaire, dans l'organisation des structures de la cellule (actine); ubiquitaire et peu exprimée dans le cerveau; semble être impliquée dans le mouvement cellulaire Rq : Ce gène semble être un bon gène candidat car un groupe de gènes associés à des microcéphalies possèdent un domaine de liaison aux microtubules. Un lien semble être établi entre les protéines rapportées dans les microcéphalies et ayant un rôle dans la structure et le maintien du cytosquelette (Bond J, <i>et al.</i> 2006).
<i>CTTNBP2</i>	Gène prédit; un gène similaire chez le rat interagit avec un régulateur de l'actine du cytosquelette ; forte expression cérébrale. Rq : 1/3 sonde du transcriptome reconnaissant ce transcrit semble être diminuée de manière significative
<i>KCND3</i>	(potassium voltage-gated channel) Protéine présente au sein d'un complexe protéique impliqué dans la formation de pore à potassium. Ces canaux participent au potentiel d'action retrouvé soit dans le cœur ou dans les neurones ; protéine extrêmement conservée Rq : Protéine fortement exprimée dans différentes parties du cerveau. De plus, <i>KCND3</i> est le seul gène commun à deux régions identifiées dans une DI-AR: région de la famille Ja, et région identifiée chez une famille Turque (Uyguner O, <i>et al.</i> 2007).
<i>TSPAN2</i>	(Tetraspan 2): fait partie de la famille des tetraspanes, protéines transmembranaires impliquées dans la transduction de signaux; TSPAN2 jouerait un rôle dans la maturation des oligodendrocytes à un stade précoce et participe à la maturation de la glie mais également de la gaine de myéline
<i>MOV10</i>	Gène identifié à partir d'une banque d'ADNc de cerveau fœtal; protéine capable de fixer Argonaute 1 et Argonaute 2 impliquées dans le clivage des MicroARN Rq : Gène dont la fonction pourrait participer à la régulation de transcrits importants dans la mise en place du SNC, particulièrement au cours du développement; et particulièrement bien conservé dans l'évolution
<i>NHLH2</i>	Fortement exprimé dans le SNC et dont l'expression est restreinte à la petite enfance; participerait à la neurogénèse; souris KO (knock out) pour le gène <i>Nhlh2</i> : microcéphalie, infertilité; hypogonadisme et obésité
<i>PDE4DIP</i>	Domaine d'association des microtubules ainsi qu'un domaine "leucine Zipper" semblable par homologie à la centrosomine de la drosophile; expression ubiquitaire. Rq : Protéine qui semble participer à la mise en place du cytosquelette dans la cellule; classe de protéine également retrouvée dans les microcéphalies (Bond J, <i>et al.</i> 2006).
<i>SIKE</i>	SIKE interagit avec IKK-epsilon acteur de la voie NF-KB, dans la voie d'activation des interférons; fortement exprimée dans le cerveau, cœur, reins et placenta; bien conservée dans les espèces. Rq : La voie NF-KB a déjà été associée au cours de différentes études à des DI, majoritairement syndromiques
<i>SV2A</i>	Souris n'exprimant pas <i>Sv2a</i> : normales à la naissance, retard de croissance; crises convulsives; décès à 3 semaines; suggérant des déficits neuronaux et endocrinaux; Gène fortement exprimé dans le cerveau humain; s'exprime tout au long de la vie et participerait à la mise en place de la synapse et à la neurotransmission
<i>WDR3</i>	Protéine avec des répétitions du motif WD; impliquée dans divers processus cellulaires: cycle cellulaire, transduction de signal, apoptose, régulation génique; Protéine ubiquitaire mais aussi très exprimée dans le cerveau et le placenta

*AP4B1* code une des quatre sous-unités du complexe AP4 signifiant Adaptor Protein (AP) 4. Les complexes AP étaient jusque très récemment au nombre de quatre : AP1, AP2, AP3 et AP4, mais un cinquième complexe AP5 a été découvert fin 2011 (Hirst J, *et al.* 2011). Chaque complexe possède une fonction et une localisation qui lui est propre. Ils participent tous au trafic vésiculaire des protéines, par le biais des mécanismes d'endocytose et d'exocytose. Chaque complexe AP est composé de 4 sous-unités, appelées adaptines ; deux d'entre elles sont de haut poids moléculaire ( $\alpha/\gamma/\epsilon/\delta/\zeta$  et  $\beta 1$  à  $\beta 5$ ) et forment la charnière du complexe AP, et les deux autres adaptines de plus faible poids moléculaire ( $\mu 1$  à 5 et  $\sigma 1$  à 5) permettent le maintien des deux grosses sous-unités entre elles (voir figure 9).

Figure 9 : Représentation des quatre premiers complexes AP identifiés.



Représentation des 4 complexes AP et de leurs 4 sous-unités respectives. Le 5<sup>ème</sup> complexe AP découvert très récemment n'est pas présenté sur cette figure. Figure réalisée par les membres du laboratoire du Dr Harvey T. McMahon, Neurobiology Division, Laboratory of Molecular Biology, Cambridge (UK)

### 3.2) Autres mutations touchant le complexe AP4

En collaboration avec l'équipe allemande d'André Reis de l'université d'Erlangen, nous avons eu accès à une cohorte de 64 familles atteintes de DI-AR, multiplex et consanguines. Parmi celles-ci, deux familles (MR061 et MR071) présentent des symptômes cliniques similaires à la famille Ja. Cependant, le génotypage a révélé une liaison significative au locus 14q11-q12 (9,1 Mb) et 15q21.1 (32.9 Mb) respectivement ; tous deux différents de la région d'intérêt de la famille Ja. La famille MR061 a été analysée par un séquençage à haut débit, suite à un enrichissement en séquences codantes, par le biais d'une capture d'exon, soit 1.22% du génome total (SureSelect Human All Exon Kit, Agilent®). Les analyses ont particulièrement portées sur la région d'intérêt et ont permis l'identification d'une mutation non-sens d'AP4S1 (MIM 607243) codant la sous-unité Sigma du complexe AP4. L'étude de la région candidate 15q21.1 dans la famille MR071 a permis de localiser *AP4E1* (MIM 607244), un gène codant une autre sous-unité du complexe AP4 (Epsilon). Le séquençage direct de ce gène a montré une insertion de 4

nucléotides entraînant la modification d'un site d'épissage à la fin de l'exon 5 (Abou Jamra R & Philippe O, *et al.* 2011 : figure 2 et 3).

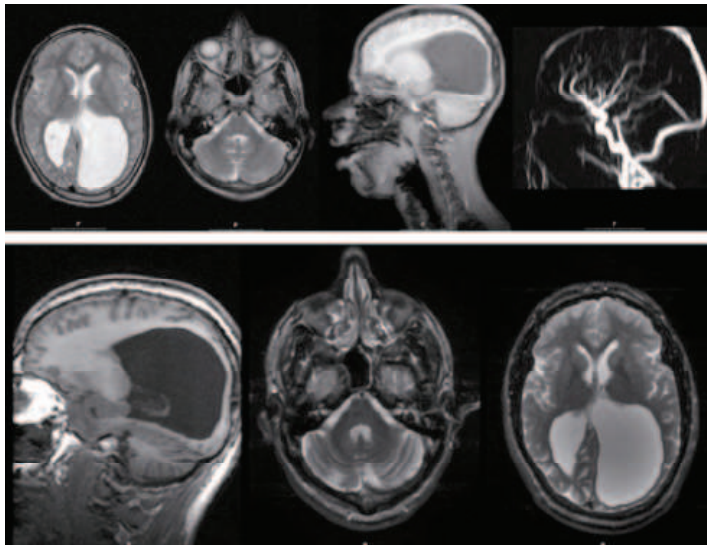
Ainsi, les trois mutations homozygotes rapportées dans l'article sont présentes au sein des gènes codant trois des quatre sous-unités du complexe AP4 (sous-unités Sigma, Beta et Epsilon) et conduisent à l'apparition d'une symptomatologie spécifique et similaire entre les trois familles (voir table 1 Abou Jamra R & Philippe O, *et al.* 2011). Ce syndrome est dénommé « syndrome AP4 » dans la suite de ce manuscrit.

### 3.3) Anomalies du complexe AP4 dans la littérature

Pendant que nous réalisons ce travail, deux autres articles ont également rapportés des mutations touchant les gènes codant pour des sous-unités du complexe AP4.

L'équipe de Grazia Mancini à Rotterdam a publié une mutation homozygote d'un site donneur d'épissage d'*AP4M1* (MIM 602296) (c.1137+1G→T) codant la sous unité Mu du complexe AP4 (Verkerk AJ, *et al.* 2009). Deux pathologies distinctes ségrégent dans cette famille : un syndrome d'artères tortueuses (MIM 208050) et une DI associée à une tétraplégie spastique. Le rapport clinique montre de nombreux signes similaires avec le tableau clinique des familles Ja (ID01), MR061 et MR071. Outre certains signes associés au syndrome d'artères tortueuses, les patients sont atteints d'une DI sévère avec hypotonie infantile, une hypertonie progressive, une absence de marche, un signe de Babinski, une absence de langage et des rires stéréotypiques. Les investigations métaboliques sont normales. Un examen anténatal (ultrason) montre une dilatation ventriculaire cérébrale à la 20<sup>ème</sup> semaine de grossesse chez une des patientes. Le scan cérébral réalisé chez un patient de 4 mois rapporte une ventriculomégalie et un élargissement des espaces subarachnoïdiens. L'IRM réalisée chez ce patient à l'âge de 15 ans démontre une atrophie cérébelleuse diffuse, un élargissement asymétrique des ventricules latéraux, un élargissement des cornes occipitales, un corps calleux fin et une perte de la substance blanche, mais une intensité normale de la substance blanche résiduelle (voir figure 10).

Figure 10 : Anomalie à l'IRM d'un patient présentant une mutation d'AP4M1



IRM conventionnelle réalisée à l'âge de 13 ans (image du haut) et à 21 ans (image du bas) chez le même patient atteint d'une DI associée à une tétraplégie spastique. La séquence montre une perte de la substance blanche diffuse mais asymétrique avec un élargissement massif des cornes occipitales. Les observations suggèrent également une hydrocéphalie passée. Il y a une absence de signes du syndrome d'artères tortueuses. La séquence révèle aussi une atrophie modérée du cervelet (Verkerk AJ, et al. 2009).

Au cours de cette même étude, les scientifiques ont recueilli des coupes de cerveau prélevées chez un patient porteur d'une mutation d'AP4M1 avec syndrome d'artères tortueuses et décédé des suites d'une pneumonie. L'analyse de ces coupes montre de larges ventricules, une atrophie sévère du corps calleux, une réduction de la myéline et une gliose de la substance blanche au niveau des hémisphères cérébraux. Enfin, un marquage par immunohistochimie démontre que le complexe AP4 interagit avec les récepteurs au glutamate GluR1 à GluR4, ainsi que le récepteur GluR $\delta$ 2 exprimé uniquement dans les cellules de Purkinje au niveau des synapses des neurones post-synaptiques. Le marquage spécifique du récepteur GluR $\delta$ 2 au niveau des cellules de Purkinje semble montrer un transport insuffisant des vésicules médiatrices du GluR $\delta$ 2. Les récepteurs sont anormalement accumulés au niveau de la zone périnucléaire de l'appareil de Golgi comparé à des neurones contrôles. Le marquage de la calbindine (protéine du cytosquelette) révèle également une anomalie morphologique de l'arborisation des dendrites des cellules de Purkinje, plus épaisse et de taille diminuée par rapport aux cellules de Purkinje contrôles (Verkerk AJ, et al. 2009).

Le second article rapporte une délétion à l'état homozygote emportant une partie du gène AP4E1 et du gène SPPL2A (MIM 608238). SPPL2A est peu caractérisé mais il pourrait avoir un rôle dans le système immunitaire inné et acquis. Les patients atteints sont nés à terme. Ils présentent une DI profonde associée à une hypotonie néonatale progressant vers une

tétraplégie spastique et une hyperréflexie, une dysmorphie faciale, une microcéphalie et des crises d'épilepsie. L'un des patients montrent également un nystagmus saccadé. Les images à l'IRM révèlent une ventriculomégalie, une atrophie cérébelleuse et corticale, une réduction du volume de l'hippocampe, une réduction diffuse de la substance blanche dans la région frontale et une réduction du corps calleux. L'EEG est anormal (Moreno-De-Luca A, et al. 2010).

Enfin, beaucoup plus récemment, un troisième article rapporte une microdélétion d'*AP4B1* chez une famille consanguine arabo-israélienne. La famille est composée de deux enfants, atteints d'un syndrome dont le tableau clinique est extrêmement proche des familles mutées pour les sous-unités du complexe AP4. Cette délétion d'une paire de base (c.664delC; p.L222fs) entraîne l'apparition d'un codon STOP prématuré au niveau de l'exon 5 et n'avait encore jamais été rapportée chez les autres patients atteints du syndrome AP4. Cette étude a également permis l'identification du locus SPG47 (*AP4B1*) à l'origine d'une paraplégie spastique (Bauer P, et al. 2012).

#### **4) Etude génétique de la famille Ta.**

La famille Ta est une famille arabo-israélienne suivie à l'hôpital Hadassah de Jérusalem par le Dr Annick Raas-Rothschild. Suite à une double union entre cousins germains, deux boucles de consanguinités sont présentes dans cette famille. Parmi les sept enfants de la descendance (figure 11.A, 11.B), quatre d'entre eux sont atteints d'un syndrome cliniquement similaire au syndrome AP4 décrit précédemment (voir table 7). L'IRM chez ces patients montre également une diminution de la substance blanche, associée à un corps calleux fin et une ventriculomégalie (table 7 et figure 11.C). Une analyse de cartographie par autozygotie a permis de localiser le gène morbide dans un intervalle de 1.9 Mb sur le chromosome 1 (1p13.2: rs12404563-rs2798469) contenant *AP4B1*. Le séquençage de ce gène a permis d'identifier une délétion de deux nucléotides AC au niveau de l'exon 7. Cette délétion entraîne un décalage du cadre de lecture et conduit à l'apparition d'un codon STOP prématuré, 30 aa plus loin [(NM\_006594.2(*AP4B1\_v001*):c.1159\_1160delAC) ; (M\_006594.2(*AP4B1\_i001*):p.(Thr387Argfs\*30)] (nomenclature établie par le site en ligne Mutalyzer (<http://www.mutalyzer.nl/2.0/nameGenerator>)).

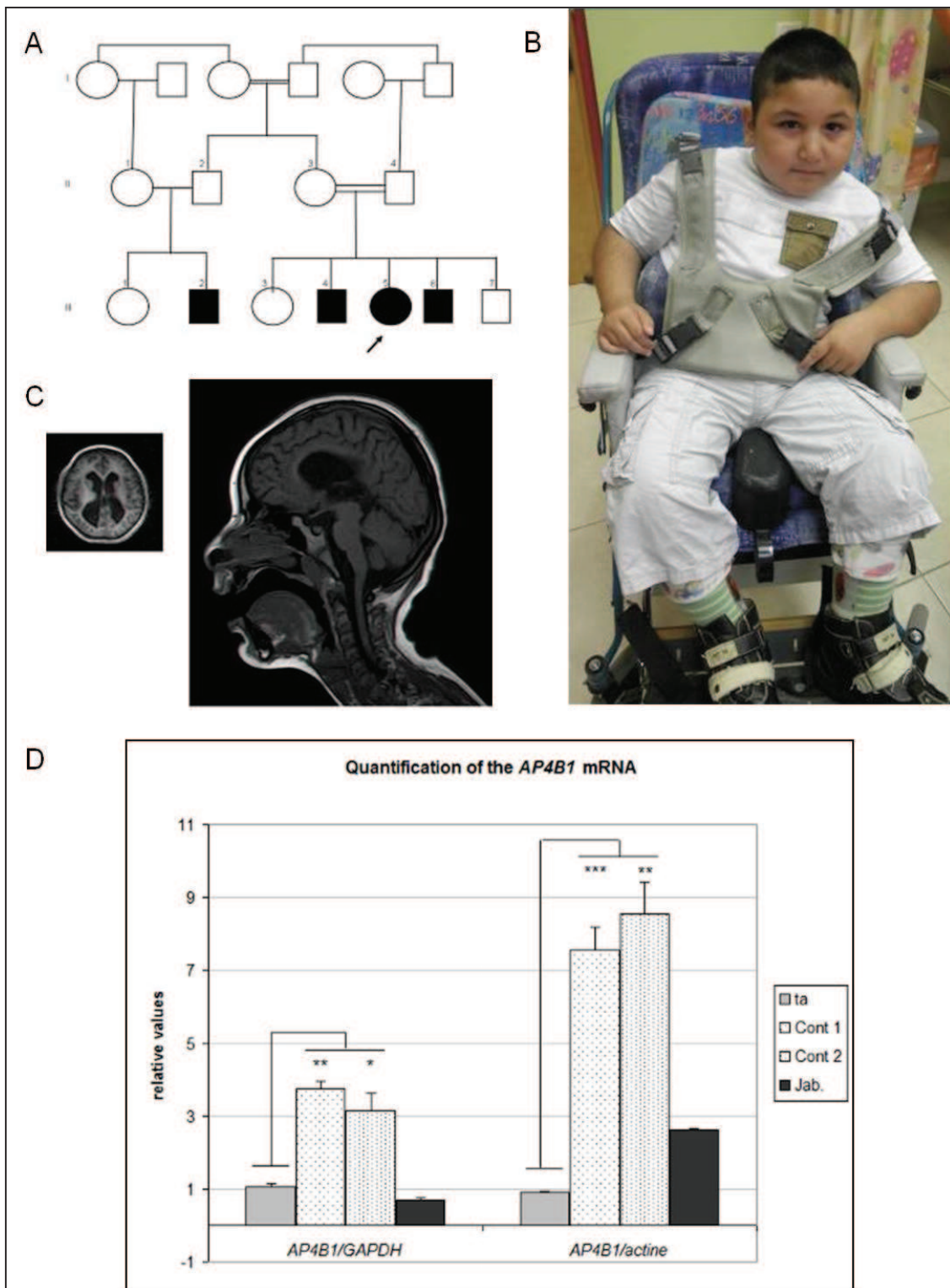
Enfin, une analyse par RT-PCR quantitative a démontré l'instabilité du transcrit *AP4B1* dans les fibroblastes d'un des sujets atteints de la famille Ta (figure 11.D). La diminution significative du taux de transcrit *AP4B1* chez la famille Ta, et chez la famille Ja, suggère un mécanisme de « Nonsense Mediated mRNA decay » ou NMD. Chez les eucaryotes, ce mécanisme de contrôle qualité vise à éliminer les ARNm qui comportent un codon stop prématuré, résultant soit d'une erreur de transcription, soit d'une mutation, soit encore d'une erreur d'épissage. Ceci permet d'éviter la synthèse de protéines tronquées ou mutantes dont le possible effet dominant négatif serait plus néfaste pour la cellule que l'absence complète de protéine (Holbrook JA, *et al.* 2004).

Table 7 : Description clinique des patients mutés pour AP4B1.

Mutation AP4B1	Famille Ta.				Famille Ja.		
	p.(Thr387Argfs*30)				p.Glu163_Valfs*1		
Sexe (patient)	M (III6)	M (III4)	F (III5)	M (III2)	F (IV.2)	F (IV.4)	M (IV.5)
âge d'évaluation	7.5	2	5,4	3,5	23	15	11
Périmètre crânien (cm)	-2.2 DS	-2 DS	-1 DS	-1.5 DS	- 2 DS	-2.5SD	-3SD
taille (cm)	112 (-2.2 DS)	92 (+1.5 DS)	105 (-2 DS)	94 (50th)	Petite	NA	NA
Poids (kg)	+1.5 DS	0 DS	17 (-1SD)	14.5	Surpoids	Surpoids	-
DI sévère	+	+	+	+	+	+	+
Langage	-	-	-	-	+	-	-
Rires stéréotypiques	+	+	+	+	+	+	+
Caractère amical et timide	+	+	+	+	+	+	-
Attraction musicale	+	+	+	+	NA	NA	NA
Hypotonie Néonatale	+	+	+	+	+	+	+
Hypertonie progressive	+	+	+	+	+	+	+
Hyperréflexie	+	+	+	+	+	+	+
Signe de Babinski	+	-	-	-	+	-	+
Spasticité	+	+	+	+	+	+	+
hypersalivation	+	+	+	+	-	-	+
Démarche	fauteuil roulant	fauteuil roulant	fauteuil roulant	fauteuil roulant	fauteuil roulant	+	fauteuil roulant
Convulsion	+	+	+	+	-	-	-
Hypertrichose*	+	+	+	+	NA	NA	NA
Tracheomalacie	+	+	+	+	NA	NA	NA
Bifrontal narrowing	+	+	+	+	NA	NA	NA
Supination limitation	+	+	+	NA	NA	NA	NA
Tendon d'Achilles court	+	+	+	+			
Ventriculomégalie prénatale	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA
IRM	Corps calleux fin; anomalies de la substance blanche; Ventriculomégalie	Corps calleux fin; anomalies de la substance blanche; Ventriculomégalie	NA	ventriculomégalie	NA	NA	NA



Figure 11 : Description de la famille Ta.



A : arbre généalogique de la famille Ta ; B : photographie du patient III.6 en fauteuil roulant ; C : IRM du patient III.6 montrant une ventriculomégalie, un corps calleux fin et une anomalie de la substance blanche périventriculaire ; D : PCR quantitative en temps réel montrant une diminution d'expression du transcrite *AP4B1* chez la famille Ta et chez la famille Ja, comparée à deux contrôles (test student de significativité : \*  $p=0,5$ , \*\*  $p=0,1$ , \*\*\*  $p<0,1$ ). Deux gènes de référence ont été utilisés : *GAPDH* et  $\beta$ -Actine.

L'étude approfondie des sept familles décrites ci-dessous permet d'affiner le phénotype du syndrome AP4. Cinq de ces familles sont décrites en table 1 de l'article 1, où sont résumées les données cliniques.

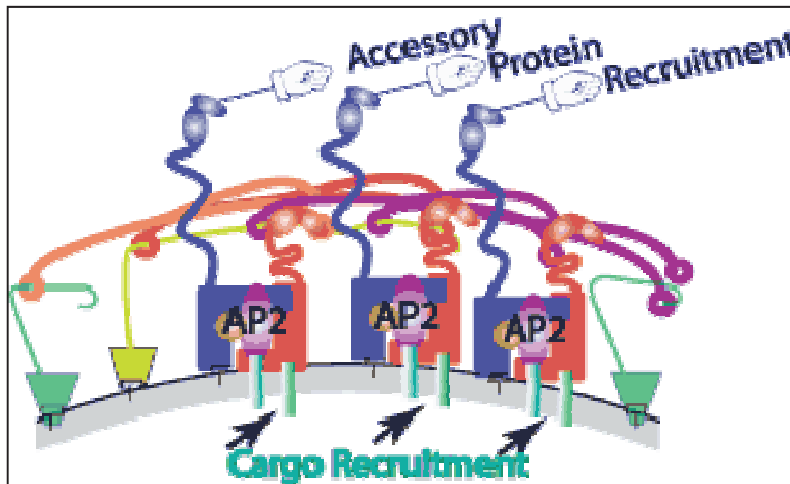
## **5) Discussion**

### **5.1) Le point sur les différents complexes AP**

Les complexes AP sont capables de se fixer sur la face externe des vésicules de transport recouvertes d'un manteau protéique (ex : la clathrine). Les deux sous-unités de haut poids moléculaire sont chacune munies d'un « appendice » ou « bras », dont l'un permet la fixation du complexe AP à la vésicule (sous-unité beta), et l'autre fixe la protéine cargo à transporter (sous-unité  $\gamma_1/\alpha_2/\delta_3/\epsilon_4/\zeta_5$ ). Ce mécanisme est illustré en figure 12. Bien que le complexe AP4 ait été identifié en 1999, ses spécificités de transport sont encore mal connues (Dell'Angelica EC, *et al.* 1999).

Les complexes AP1, AP2 et AP3 se lient aux vésicules recouvertes de clathrine. Le complexe AP4 a lui été associé à des vésicules recouvertes de protéines ARF couplées à des protéines G, formant un autre manteau protéique. AP1 et AP3 participent au transport des protéines membranaires présentes au niveau des vésicules sortantes du trans-Golgi et dirigées vers les endosomes. Puis les vésicules sont redirigées des endosomes vers la membrane externe de la cellule ; ce qui permet la localisation des protéines transmembranaires par exocytose. En revanche, AP2 a été décrit comme un acteur de l'endocytose et intervient dans l'entrée des protéines en provenance du milieu extracellulaire, ou dans le recyclage de protéines membranaires, par internalisation (Boehm M, *et al.* 2001 ; Hirst J, *et al.* 1999).

Figure 12 : Représentation du complexe AP2 dans son action



Complexe AP2 fixé sur la face externe d'une vésicule recouverte de clathrine. Le bras de la sous-unité  $\beta 2$  permet la fixation au manteau protéique. L'autre appendice, présent au niveau de la sous-unité  $\alpha 2$  (complexe AP2), fixe la protéine cargo à transporter. Figure réalisée par les membres du laboratoire du Dr Harvey T. McMahon, Neurobiology Division, Laboratory of Molecular Biology, Cambridge (UK).

Enfin, très récemment un 5<sup>ème</sup> complexe AP a été décrit dans la littérature : le complexe AP5 (Hirst J, *et al.* 2011), révolutionnant les connaissances dans le domaine du trafic membranaire.

L'équipe de Jennifer Hirst a rapporté une protéine C14orf108 (14q22.3) présentant des homologies avec les sous-unités Mu des adaptines des quatre autres complexes. Grâce à une technique de double hybride, ils ont également isolé une seconde protéine DKFZp761E198 (11q13.1). Celle-ci présente des homologies avec les protéines Beta des complexes AP. De même, la protéine DKFZp761E198 présente un bras caractéristique des sous-unités de haut poids moléculaire, bien qu'il soit de plus petite taille que les 4 autres. Le marquage de la protéine C14orf108 par immunofluorescence révèle une localisation cytosolique, en accord avec la localisation des complexes AP (Hirst J, *et al.* 2011).

Une autre étude menée dans le laboratoire de Franck Buchholz (Stabicki M, *et al.* 2010) a mis en évidence un assemblage de protéines comprenant DKFZp761E198, KIAA0415 (7p22.1), SPG11 (15q21.1), SPG15 (14q24.1) et C20orf29 (20p13). Des alignements de séquences révèlent que la protéine KIAA0415 présente des homologies avec les adaptines  $\alpha/\gamma/\delta/\epsilon$  bien qu'elle soit dépourvue de l'appendice nécessaire à la fixation des protéines cargos. Tandis que la protéine

C20orf29 semble être l'homologue de la petite sous unité Sigma. Ainsi, chacune des sous-unités du complexe AP5 est représentée :

- DKFZp761E198 (AP5B1, MIM 614367) : sous-unité Beta ( $\beta$ 5) / (11q13.1)
- C14orf108 : (AP5M1, MIM 614368) sous-unité Mu ( $\mu$ 5) / (14q22.3)
- C20orf29 : (AP5S1, MIM : 614825) sous-unité Sigma ( $\sigma$ 5) / (20p13)
- KIAA0415 : (AP5Z1, MIM: 613653) sous-unité Zeta ( $\zeta$ 5) / (7p22.1)

De façon intéressante, l'équipe de Jennifer Hirst a démontré par des études phylogéniques que le complexe AP3 serait le plus ancien des cinq complexes, suivi d'AP4, AP5 puis AP1 et AP2. Cependant, les complexes AP1 et AP2 auraient plus évolué que les autres complexes, les rendant indispensables pour la vie. Le complexe AP5 est aussi le complexe qui présente le moins de ressemblance avec les autres complexes AP. D'autre part le complexe AP4 et AP5 semble spécifique des organismes supérieurs puisqu'il n'est pas retrouvé chez les espèces telles que : *Drosophila Melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* ou *saccharomyces cerevisiae* (Boehm M, *et al.* 2001 ; Hirst J, *et al.* 2011).

Enfin, un dernier point abordé par ce travail, et directement lié à nos résultats sur AP4, est important. Les protéines SPG11\* (15q21.1, MIM 610844) et SPG15 (14q24.1, MIM 612012) seraient deux protéines cargos véhiculées par les complexe AP5. Des mutations récessives ont été mises en évidence dans des cas de paraplégies spastiques associées à des troubles neurologiques. Bien que certains points cliniques différent, les patients mutés pour *SPG11* (Stevanin G, *et al.* 2007 ; Del Bo R, *et al.* 2007 ; Hehr U, *et al.* 2007) et *SPG15* (Elleuch N, *et al.* 2007) montrent un phénotype similaire au syndrome AP4 ; à savoir : ils présentent une paraplégie spastique progressive apparaissant entre 10 et 19 ans et conduisant à une disparition totale de la marche, un corps calleux fin à l'IRM dans la majorité des cas, une neuropathie, une substance blanche anormale (hypomyélinisation), une atteinte des facultés mentales et des troubles de la vision.

---

\* SPG est l'acronyme de Spastic Paraplegia utilisé par OMIM.

Une étude a établi que 40% des patients atteints de paraplégie spastique associée à un corps calleux fin présentent des mutations de *SPG11* (Crimella C, *et al.* 2009). Une seconde étude menée sur une cohorte indépendante révèle également que la plus commune des formes de paraplégie spastique est causée par *SPG11* (18,4%), tandis que *SPG15* concerne 10,5% des familles (Boukhris A, *et al.* 2009).

## 5.2) Mutations rapportées dans les autres complexes AP

Le complexe AP5 pourrait donc avoir un rôle similaire au complexe AP4. Les symptômes mis en évidence par les défauts de *SPG15* et *SPG11*, protéines cargos du complexe AP5, conduisent à une pathologie ressemblante au syndrome AP4. Afin d'étayer cette hypothèse, un autre travail a révélé des mutations homozygotes récessives touchant la sous-unité  $\zeta$  (*KIAA0415*) impliquée dans une paraplégie spastique héréditaire SPG48 (Slabicki M, *et al.* 2010). Néanmoins, les signes cliniques semblent moins sévères car les symptômes débutent à un âge proche de 50 ans sans troubles neurologiques associés. Or, l'atteinte des protéines cargos (*SPG11* et *SPG15*) du complexe AP5 engendre un phénotype plus sévère puisque les symptômes débutent à un âge plus précoce (10-19 ans) et qu'une DI est également constatée. Une hypothèse pouvant expliquer cette observation est que les protéines *SPG11* et *SPG15* puissent avoir plusieurs transporteurs, dont le complexe AP5. Ainsi, un autre complexe protéique pourrait assurer, en partie, le transport des protéines cargos du complexe AP5 lorsque celui-ci est défectueux.

Des mutations touchant les complexes AP1 et AP3 ont aussi été rapportées dans la littérature. Les mutations d'*AP1S2* sont à l'origine d'une DI sévère et syndromique liée au chromosome X. Les patients développent une hydrocéphalie et des calcifications cérébrales au niveau des noyaux gris centraux (Saillour Y, *et al.* 2007 ; Borck G, *et al.* 2008). Par ailleurs, c'est grâce à l'association des mutations d'*AP1S2* avec une DI-LX que le choix du gène candidat s'est orienté sur *AP4B1* chez la famille Ja. Une autre mutation a été décrite dans *AP3B1* et est responsable d'un défaut plaquettaire associé à des troubles hémorragiques, une fibrose pulmonaire et un albinisme, mais aucune DI n'a été rapportée pour ce syndrome (Dell'Angelica EC, *et al.* 1999).

Certaines des sous-unités des complexes AP sont codées par différents gènes. C'est notamment le cas de la sous-unité beta d'AP3 (*AP3B1* et *AP3B2*), de la moyenne sous-unité mu

d'AP1 et d'AP3 ; (AP1M1, AP1M2 et AP3M1, AP3M2) et de la petite sous-unité sigma d'AP1 (AP1S1, AP1S2, et AP1S3). C'est pourquoi, la mutation homozygote rapportée dans la littérature d'*AP3B1* n'est pas létale car la sous-unité  $\beta$  du complexe AP3 est codée par deux gènes distincts (*AP3B1* : 5q14.1 et *AP3B2* : 15q25.2). Cette observation est également valable pour la sous-unité Sigma du complexe AP1 (*AP1S1* : 7q22.1 ; *AP1S2* : Xp22.2 et *AP1S3* : 2q36.1). Ainsi, chez les patients mutés pour *AP3B1* ou *AP1S2*, les complexes AP1 et AP3 ne sont pas totalement absents de l'organisme ; c'est pourquoi on peut supposer que ces deux mutations ne conduisent pas un phénotype létal. Ceci laisse penser que le complexe AP4 est moins indispensable pour la vie, que les trois autres complexes AP, mais qu'au contraire il semble jouer un rôle majeur dans les fonctions cognitives des organismes supérieurs et dans la mise en place du SNC.

### 5.3) Protéines cargos du complexe AP4 : TARP et APP

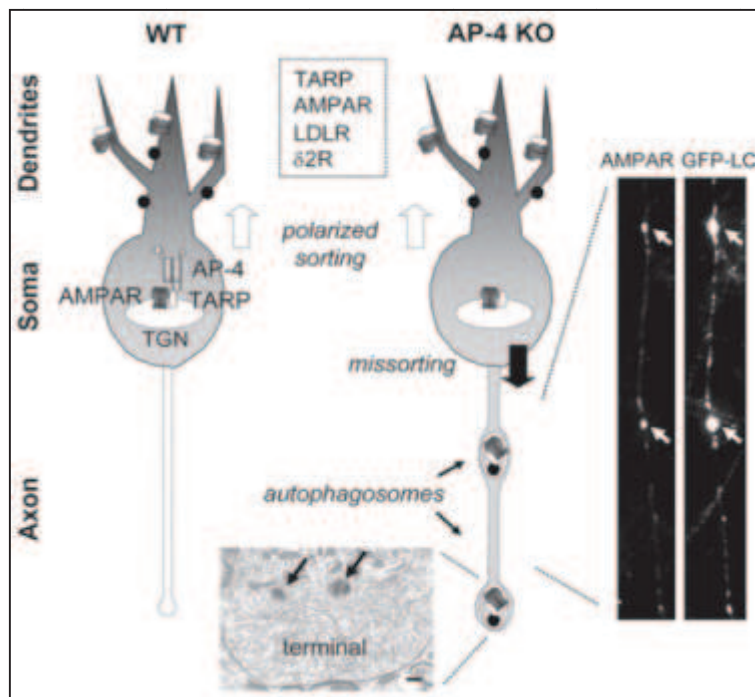
#### ***Transport de la TARP***

Une lignée de souris invalidée pour l'orthologue murin du gène *AP4B1* (*AP-4 $\beta$ <sup>-/-</sup>*) a été générée par l'équipe japonaise de Michisuke Yuzaki (Matsuda S, *et al.* 2008). Les souris sont fertiles, ne présentent pas d'anomalies anatomiques ni cérébrales visibles et ont une longévité normale. L'étude par immunohistochimie des neurones de l'hippocampe et des cellules de Purkinje montre une absence complète de complexe AP4. Ceci indique que, conformément à ce qui a été décrit pour les autres adaptines, l'absence d'une seule sous-unité du complexe AP4 est suffisante pour empêcher la formation du complexe AP4. Les souris *AP-4 $\beta$ <sup>-/-</sup>* sont donc totalement dépourvues du complexe AP4.

De manière intéressante, des structures ressemblant à des granules sont visualisées le long des axones des deux types neuronaux étudiés (cellules de Purkinje et neurones de l'hippocampe). Ces structures sont localisées au niveau de vésicules particulières appelées autophagosomes impliquées dans la dégradation des protéines. L'analyse de ces granules révèle la présence anormale de deux acteurs protéiques: les récepteurs AMPA et la protéine TARP. Les récepteurs AMPA (pour alpha-amino-3-hydroxy-5-méthylisozol-4-propionate) sont des récepteurs ionotropes du glutamate. Ils sont normalement localisés dans la densité post-synaptique des synapses glutamatergiques (voir figure 13). Les récepteurs AMPA font l'objet d'un trafic cellulaire intense : (exocytose, endocytose, mais aussi diffusion latérale à la

membrane). La régulation de la quantité de récepteurs AMPA à la synapse est responsable dans de nombreux cas des phénomènes de plasticité synaptique. Les TARP (transmembrane AMPA Receptor Regulatory Protein) sont une famille de protéines transmembranaires associées aux récepteurs AMPA. Outre leur rôle de chaperon facilitant le trafic des récepteurs AMPA lié à leur biosynthèse, ces protéines modifient les propriétés électrophysiologiques des récepteurs AMPA et leur ancrage à la surface membranaire (Payne HL, *et al.* 2008). Ces résultats suggèrent donc que le complexe AP4 pourrait participer à la régulation et à la distribution de certaines protéines cargos, notamment la TARP liée aux récepteurs AMPA, présentes au sein du réseau somato-dendritique de certains neurones cérébraux (Matsuda S, *et al.* 2008).

Figure 13 : Neurones de l'hippocampe chez une souris contrôle comparés à une souris  $AP-48^{-/-}$



Mécanisme observé dans les neurones de l'hippocampe et les cellules de Purkinje chez les souris WT (wild type) et  $AP-48^{-/-}$  (figure tirée de l'article de Matsuda S, *et al.* 2008)

L'étude sur la souris transgénique  $Ap48^{-/-}$  se poursuit dans le laboratoire de Shinji Mastuda par des expériences d'électrophysiologie et des analyses comportementales afin de mieux comprendre le rôle du complexe AP4 dans le développement et dans le fonctionnement cognitif.



### ***Transport de l'APP***

La protéine APP est une protéine fortement exprimée dans le cerveau capable d'être clivée par 3 secrétases (secrétase  $\alpha$ , secrétase  $\beta$  et la secrétase  $\gamma$ ). Les secrétases  $\alpha$  favorisent le clivage de l'APP en protéines sAPP- $\alpha$  participant à la plasticité synaptique (notamment au niveau des neurones cholinergiques). La secrétase  $\beta$  permet le clivage en deux produits : sAPP- $\beta$  et C99. sAPP- $\beta$  possède un rôle similaire à la sAPP- $\alpha$ . En revanche, le second produit C99 peut être clivé par la secrétase  $\gamma$  en différentes taille de protéines néfastes pour les cellules neuronales, nommées  $\beta$ -amyloïdes (A $\beta$ ). La forme A $\beta$ 42 est la forme la plus pathogène pour le neurone et est impliquée dans la formation d'agrégats protéiques retrouvés notamment dans la maladie d'Alzheimer (Zhang H, *et al.* 2011).

L'équipe de Burgos et collaborateurs a mis en évidence un motif YKFFE au sein de la protéine APP capable d'entrer en interaction avec la sous-unité Mu4 (*A4PM1*). Lorsque l'interaction entre le complexe AP4 et la protéine APP est abolie, celle-ci n'est plus localisée aux endosomes, contrairement aux cellules sauvages démontrant le transport d'APP du réseau trans-golgien vers les endosomes. Cette localisation anormale d'APP conduit à l'augmentation de la production de la secrétase  $\gamma$  et favorise le clivage d'APP sous sa forme pathogène A $\beta$ . De plus, une augmentation de la protéine Tau a également été constatée lorsque l'interaction Mu4/APP est abolie (Burgos PV, *et al.* 2010). Cette étude souligne, à nouveau, un des rôles du complexe AP4 dans le SNC, mais elle met également en avant le rôle du complexe AP4 dans le transport vésiculaire au départ du réseau trans-golgien vers les endosomes.

## **6) Conclusions et perspectives**

### **6.1) Conclusions de l'étude**

Les résultats de ces études ont donc conduit à la description d'un nouveau syndrome cliniquement reconnaissable : le syndrome AP4. Au total 7 familles ayant des anomalies des gènes codant une sous-unité du complexe AP4 ont été décrites. Ces différentes observations permettent de définir ce nouveau syndrome par l'association d'une DI profonde, d'une absence de langage, d'une petite taille, d'une hypotonie postnatale, d'une hypertonie progressive, d'une perte de la marche vers l'âge de 2,5 ans, d'une spasticité des membres inférieurs et d'un caractère timide, enjoué accompagné de rires stéréotypiques. D'autres signes cliniques peuvent



être associés dans certains cas : une hyperlaxité des articulations des membres inférieurs, des pieds-bots, des crises d'épilepsie, des anomalies dentaires et/ou du palais, une hypersalivation et un surpoids. De plus, les patients, pour lesquels une IRM a été réalisée, montrent une perte de la substance blanche, un corps calleux anormalement fin et une ventriculomégalie. Les différents signes cliniques sont résumés dans la table ci-dessous.

Signes cliniques	Patients
Microcéphalie	15/20
Petite taille	8/8
DI sévère	20/20
Absence de langage	19/20
Rires stéréotypiques	17/18
Caractère amical et timide	10/18
Hypotonie Néonatale	18/20
Hypertonie progressive	18/20
Hyperréflexie	15/15
Signe de Babinski	9/15
Spasticité	20/20
Absence démarche	17/20
Convulsion	8/20
IRM (corps calleux fin ; ventriculomégalie ; anomalie de la substance blanche)	10/10
Patients mutés AP4B1	9
Patients mutés AP4M1	5
Patients mutés AP4E1	4
Patients mutés AP4S1	3

Le complexe AP4 pourrait avoir un rôle dans le transport et le recyclage des récepteurs AMPA dans certains neurones post-synaptiques mais également dans le transport de la protéine APP. Ces acteurs protéiques ont un rôle primordial dans la plasticité synaptique. Ainsi de telles anomalies touchant le complexe AP4 pourraient expliquer le syndrome observé.

## 6.2) Perspectives

Une étude visant au criblage systématique des quatre sous-unités du complexe AP4 chez des patients atteints de paraplégie spastique apparaissant dans la jeune enfance et associée à une DI sévère doit maintenant être mise en place pour estimer la prévalence du syndrome AP4 dans une telle cohorte.

En collaboration avec le laboratoire du professeur Robinson à l'université de Cambridge en Angleterre, des travaux sont en cours sur les fibroblastes dérivés de patients de la famille Ja pour tenter d'identifier de nouvelles protéines cargo pouvant être fixées par le complexe AP4. Les protéines cargos peuvent être identifiées par des approches de doubles hybrides ou de co-immunoprécipitation suivies par une analyse des protéines extraites par spectrométrie de masse. Les différentes expériences peuvent être réalisées à partir de la protéine  $\epsilon 4$  (AP4E1) munie du bras capable de fixer les protéines cargos et servant de proie pour la capture des protéines partenaires du complexe AP4. Une fois ces différents acteurs identifiés, l'étude de la localisation de ces protéines pourra être entreprise chez les patients touchés par le syndrome AP4 afin d'évaluer l'impact de la défaillance du complexe AP4 dans la pathologie

ARTICLE 1

## Adaptor Protein Complex 4 Deficiency Causes Severe Autosomal-Recessive Intellectual Disability, Progressive Spastic Paraplegia, Shy Character, and Short Stature

Rami Abou Jamra,<sup>1,8,\*</sup> Orianne Philippe,<sup>2,8</sup> Annick Raas-Rothschild,<sup>3</sup> Sebastian H. Eck,<sup>4</sup> Elisabeth Graf,<sup>4</sup> Rebecca Buchert,<sup>1</sup> Guntram Borck,<sup>2</sup> Arif Ekici,<sup>1</sup> Felix F. Brockschmidt,<sup>5,6</sup> Markus M. Nöthen,<sup>5,6</sup> Arnold Munnich,<sup>2</sup> Tim M. Strom,<sup>4,7</sup> Andre Reis,<sup>1,9</sup> and Laurence Colleaux<sup>2,9,\*</sup>

Intellectual disability inherited in an autosomal-recessive fashion represents an important fraction of severe cognitive-dysfunction disorders. Yet, the extreme heterogeneity of these conditions markedly hampers gene identification. Here, we report on eight affected individuals who were from three consanguineous families and presented with severe intellectual disability, absent speech, shy character, stereotypic laughter, muscular hypotonia that progressed to spastic paraplegia, microcephaly, foot deformity, decreased muscle mass of the lower limbs, inability to walk, and growth retardation. Using a combination of autozygosity mapping and either Sanger sequencing of candidate genes or next-generation exome sequencing, we identified one mutation in each of three genes encoding adaptor protein complex 4 (AP4) subunits: a nonsense mutation in *AP4S1* (NM\_007077.3: c.124C>T, p.Arg42\*), a frameshift mutation in *AP4B1* (NM\_006594.2: c.487\_488insTAT, p.Glu163\_Ser739delinsVal), and a splice mutation in *AP4E1* (NM\_007347.3: c.542+1\_542+4delGTAA, r.421\_542del, p.Glu181Glyfs\*20). Adaptor protein complexes (AP1-4) are ubiquitously expressed, evolutionarily conserved heterotetrameric complexes that mediate different types of vesicle formation and the selection of cargo molecules for inclusion into these vesicles. Interestingly, two mutations affecting *AP4M1* and *AP4E1* have recently been found to cause cerebral palsy associated with severe intellectual disability. Combined with previous observations, these results support the hypothesis that AP4-complex-mediated trafficking plays a crucial role in brain development and functioning and demonstrate the existence of a clinically recognizable syndrome due to deficiency of the AP4 complex.

With a worldwide prevalence of around 2%, early-onset cognitive impairment, commonly referred to as intellectual disability (ID), is the most frequent cause of severe disability and a leading socioeconomic healthcare problem in Western countries.<sup>1</sup> For the last two decades, remarkable progress has been made in the elucidation of ID conditions. About 30% percent of severe ID cases have been ascribed to chromosomal imbalances.<sup>2</sup> Defects in X-linked genes account for about 10% of male ID cases.<sup>3</sup> Yet despite these recent advances, the cause of ID remains unexplained in the majority of cases, and this leaves families without accurate diagnosis or genetic counseling. In particular, very little is known about the autosomal-recessive forms of ID (ARID). The broad genetic heterogeneity of ARID precludes any possibility of pooling families, and the scarcity of large pedigrees suitable for linkage analyses have hitherto hampered identification of the genes responsible for most of these cases. This problem has been successfully circumvented by the use of autozygosity mapping in large consanguineous families; in nonspecific ARID ten genes have been identified so far.<sup>1,4–12</sup> Nevertheless, mutations in each of these genes only account for one

or very few families, suggesting that many genes remain to be identified.

Here, we present linkage analyses, mutation discovery, and clinical characterization of a recognizable ARID syndrome in eight affected individuals from three consanguineous families.

Family ID01 is a sibship of three affected and two healthy siblings born to healthy parents, who are second cousins of Israeli–Arab descent (Figure 1A and Table 1). Pregnancy and delivery were unremarkable in all three affected cases. At birth all three siblings presented with microcephaly and muscular hypotonia, which later developed to hypertonia. At the time of examination, a clinical assessment showed hyperreflexia, spastic paraplegia, and an inability to walk unaided. All affected individuals revealed a severe cognitive deficit, marked speech delay, and adaptive impairment. Furthermore, they presented with microcephaly, a high palate, mildly remarkable facial gestalt with a wide nasal bridge, short stature, hyperlaxity, genu recurvatum, pes planus, and a waddling gait. All three affected individuals had stereotypic laughter and markedly shy character. None of the patients had seizures, vision or

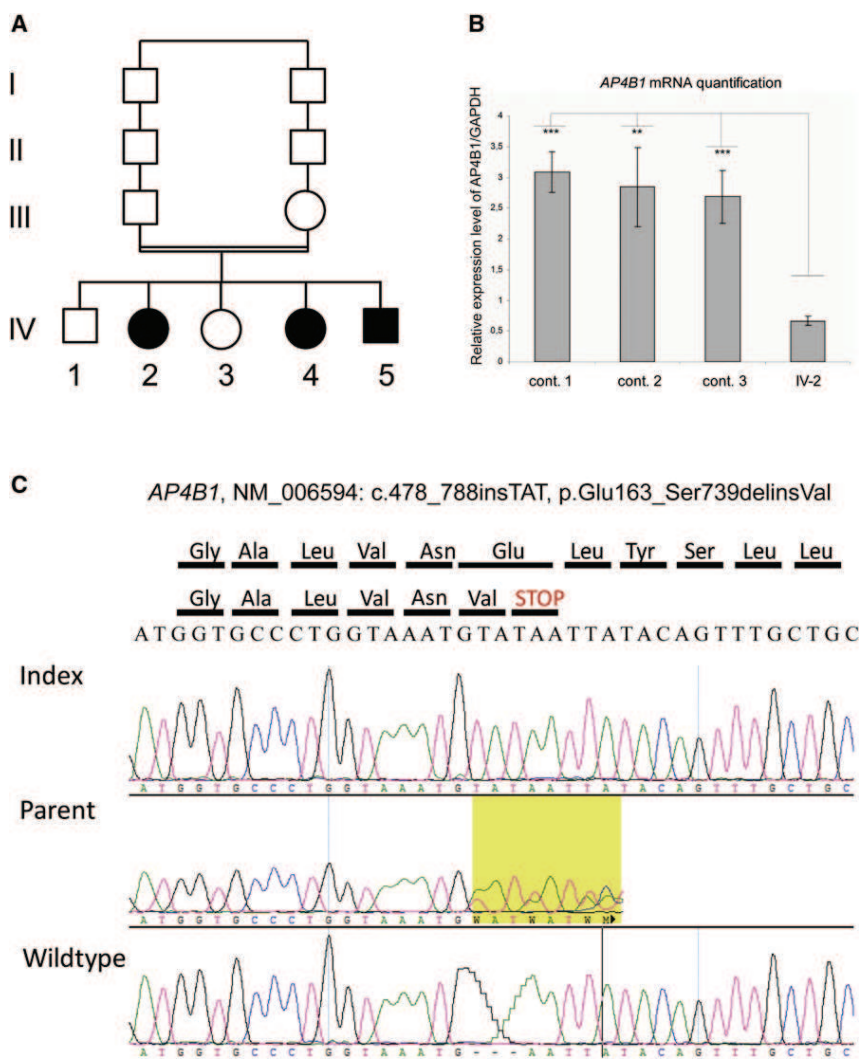
<sup>1</sup>Institute of Human Genetics, University of Erlangen, D-91054 Erlangen, Germany; <sup>2</sup>INSERM U781, Fondation IMAGINE, Département de Génétique and Département de Radiologie Pédiatrique, Université Paris Descartes, Hôpital Necker-Enfants Malades, 75015 Paris, France; <sup>3</sup>Department of Human Genetics and Metabolic Diseases, Hadassah Hebrew University Medical Center, 91120 Jerusalem, Israel; <sup>4</sup>Institute of Human Genetics, Helmholtz Center Munich, German Research Center for Environmental Health, D-85764 Neuherberg, Germany; <sup>5</sup>Department of Genomics, Life and Brain Center, University of Bonn, D-53127 Bonn, Germany; <sup>6</sup>Institute of Human Genetics, University of Bonn, D-53127 Bonn, Germany; <sup>7</sup>Institute of Human Genetics, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, D-80634 München, Germany

<sup>8</sup>These authors contributed equally to this work

<sup>9</sup>These authors contributed equally to this work

\*Correspondence: rami.aboujamra@uk-erlangen.de (R.A.J.), laurence.colleaux@inserm.fr (L.C.)

DOI 10.1016/j.ajhg.2011.04.019. ©2011 by The American Society of Human Genetics. All rights reserved.



**Figure 1. Genetic Analysis of Family ID01**

(A) Pedigree of the family.

(B) Electrophoregrams illustrating the c.487\_488insTAT, p.Glu163\_Ser739delinsVal variant in exon 5 of *AP4B1*. Data are shown for homozygous affected individuals, heterozygous healthy parents, and homozygous wild-type healthy siblings.

(C) Quantitative RT-PCR analysis of *AP4B1* mRNA. *AP4B1* expression in fibroblast cells from three controls and from patient IV-2.

Data are normalized to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*). Means  $\pm$  standard deviation are given ( $n = 3$  independent experiments). \*\*\*p value of  $< 0.01$  (Student's test) for the difference of expression. \*\*p value of  $< 0.05$  (Student's test) for the difference of expression.

hearing impairments, or any anomalies of inner organs (Table 1).

Family MR061 is composed of three nuclear families from middle Syria; the families have one affected child each: the index, V-14, his nephew VI-3, and his cousin once removed V-28 (Figure 2). Pregnancy, delivery, and neonatal period were unremarkable. Affected individuals sat at age one and walked at age two to four but lost their ability to walk six to 24 months later. At the time of examination, clinical assessment showed muscular hypertonia, especially of lower limbs; contractures; talipes equinovarus; weak and decreased muscle mass of the shanks; and a clinical suspicion of peripheral neuropathy. All affected individuals revealed a severe cognitive deficit and absent speech and could only express basic needs (i.e., thirst, hunger, and strangury). Further, they presented with microcephaly (VI-3 and V-28); mild facial dysmorphisms, including a prominent and bulbous nose, a wide mouth, and coarse features; short stature; and mild spasticity in flexion of upper limbs, which could be used only for simple tasks (e.g., holding a bottle of water). Similar to the former

family, all affected individuals were markedly shy, amicable, and calm and kept smiling or laughing for no obvious reason but did not have laughter bursts. None of the patients had seizures, a hearing impairment, or any anomalies of inner organs (Table 1). The nephew of the index, VI-3, has an unclassified vision impairment. In addition, V-9 and VI-7 presented with moderate intellectual disability, could walk and speak, and did not have growth retardation and thus presented clinically with a different form of disability.

Family MR071 is composed of two nuclear families who are from the north of Syria and had one affected child each: the index, III-5, and his cousin, III-11 (Figures 3A and 3B). The pregnancy and birth were unremarkable in both cases. The parents reported muscular hypotonia in the neonatal period; this later developed to muscular hypertonia, especially of the lower limbs. At the time of examination, clinical assessment revealed contractures; talipes equinovarus; and decreased muscle mass of the shanks; together these findings resembled peripheral neuropathy. All affected individuals presented with a severe cognitive deficit and absent speech. Furthermore, they had microcephaly; short stature; and a mildly remarkable facial gestalt that included a prominent and bulbous nose, a wide mouth, and coarse features. Individual III-11 had epilepsy. Both patients showed a shy, amicable, and calm character. They smiled or laughed for no obvious reason but did not have laughter bursts. None of the patients had vision or hearing impairments or any anomalies of inner organs (Table 1). In this family one other cousin, III-1, presented clinically with a different form of

**Table 1. Clinical Findings in Patients with Mutation in Distinct AP4 Subunits**

Family	This Report						Moreno-De-Luca et al. <sup>32</sup>			Verkerk et al. <sup>37</sup>					
	ID01	MR061		MR071											
Patient	IV-2	IV-4	IV-5	V-14	V-28	VI-3	III-5	III-11	IV-4	IV-5	IV-1	IV-3	IV-4	IV-5	IV-6
AP4 subunit disrupted	B1	B1	B1	S1	S1	S1	E1	E1	E1	E1	M1	M1	M1	M1	M1
Sex	F	F	M	M	F	M	M	F	F	M	F	M	F	M	M
Age at evaluation (years)	23	15	11	22	20	18	11	6	23	22	24	23	22	1.5	21
Severe ID	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Normal speech	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA
Stereotypic laughter	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	NA
Shy character	+	+	-	+	+	+	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Neonatal hypotonia	+	+	+	+	NA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Progressing to hypertonia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NA
Hyperreflexia	+	+	+	+	NA	+	NA	NA	+	+	+	+	+	+	NA
Babinski sign	+	-	+	NA	NA	NA	NA	NA	+	+	+	+	+	+	NA
Spasticity	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NA
Drooling	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	NA
Walk independently (years)	2.5	2.5	2.5	2	2	2.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ambulation	wheelchair	+	wheelchair	-	-	-	crawling	crawling	-	-	-	-	-	-	NA
Foot deformity	-	-	-	+	+	+	+	+	NA	NA	-	+	-	-	-
Head circumference	-2 SD	-2.5 SD	-3 SD	-1 SD	-4 SD	-2 SD	-3 SD	-4 SD	-3 SD	-3 SD	-1 SD	0 SD	-2 SD	NA	-2.5 SD
Height (cm)	↓	↓	↓	145	130	140	125	105	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Epilepsy	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Sphincter control	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	NA
Eye evaluation	normal	normal	normal	normal	normal	amblyopia	normal	normal	normal	normal	NA	normal	NA	NA	POD
Hearing evaluation	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	NA	NA	NA	NA	NA
Overweight	+	+	normal	normal	normal	normal	normal	normal	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

The following abbreviations are used: F, female; M, male, NA, not available POD, pale optic disc. The following symbols are used: +, present; -, absent; ↓, short stature, but not exactly measured.

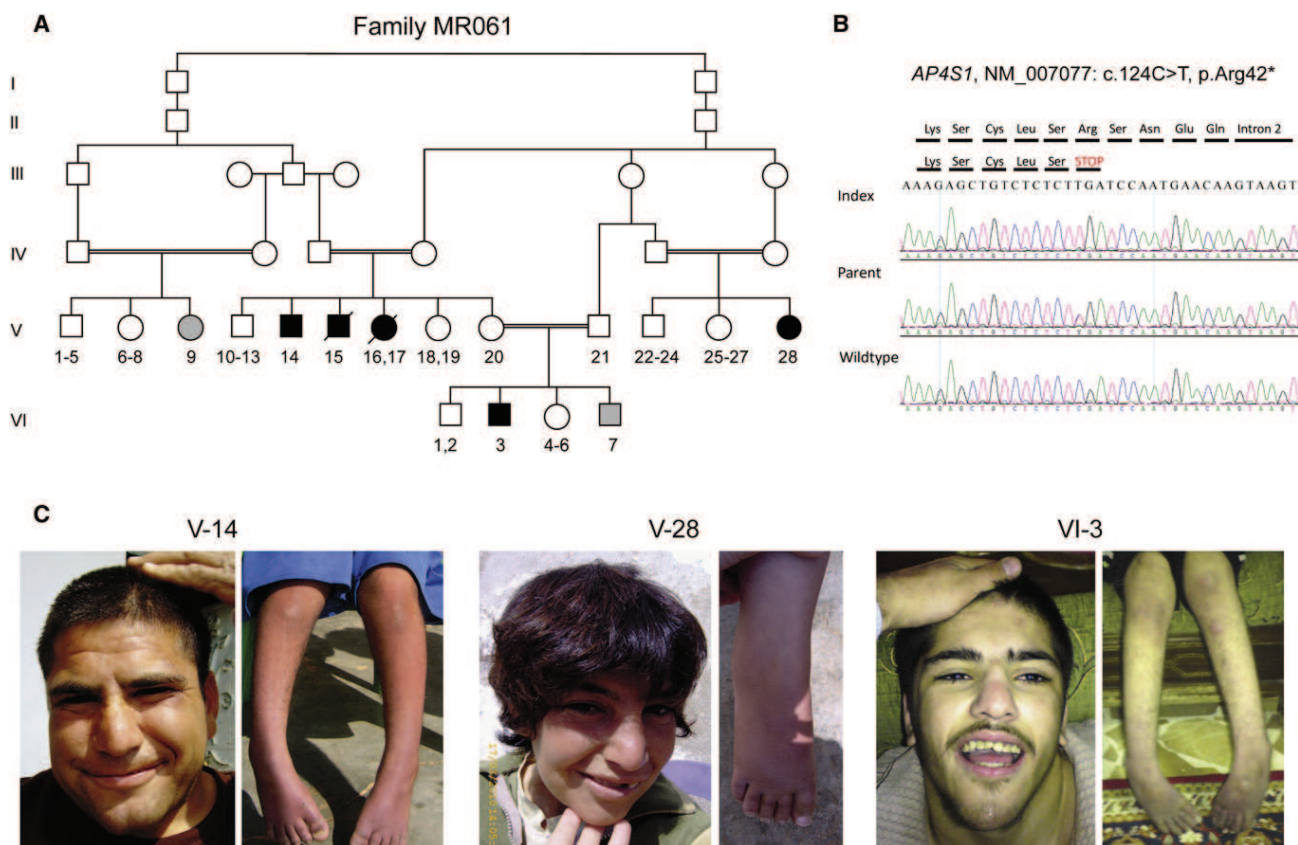
disability. She had mild ID, could walk and speak, and did not have growth retardation.

Chromosome analysis and metabolic screening (including plasma amino acid, lactate, carnitine and urinary oligosaccharides, mucopolysaccharidoses, and organic acids) as well as biochemical screening for GM1 Gangliosidosis, Tay Sachs, and Krabbe diseases were all normal. No brain magnetic resonance imaging was available for any of the patients.

All procedures followed in this study were approved by the local ethical committee at the contributing Universities and proper informed consent was obtained. Additional

consent was obtained from parents of affected persons whose photographs are presented in this work. Blood samples were collected from all affected and most unaffected siblings and parents. Blood lymphoblasts (families MR061 and MR071) and skin fibroblasts (patient IV-2 of family ID01) were cultured. Genomic DNA was extracted by standard methods and analyzed with the Affymetrix GeneChip Mapping 250K array (family ID01) or 6.0 array (families MR061 and MR071) (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Analysis did not reveal pathogenic deletions or duplications. Mendelian segregation was calculated with PedCheck software and was confirmed in all instances.<sup>13-15</sup>





**Figure 2. Genetic Analysis of Family MR061**

(A) Pedigree of family; arrows indicate index. Family MR061 is large with multiple affected individuals with variable phenotypes. Grey symbols denote individuals in whom clinical presentation is markedly different and who have no *AP4S1* mutation (heterogeneity within the family).

(B) Electropherograms illustrating the mutation in exon 2 of *AP4S1*.

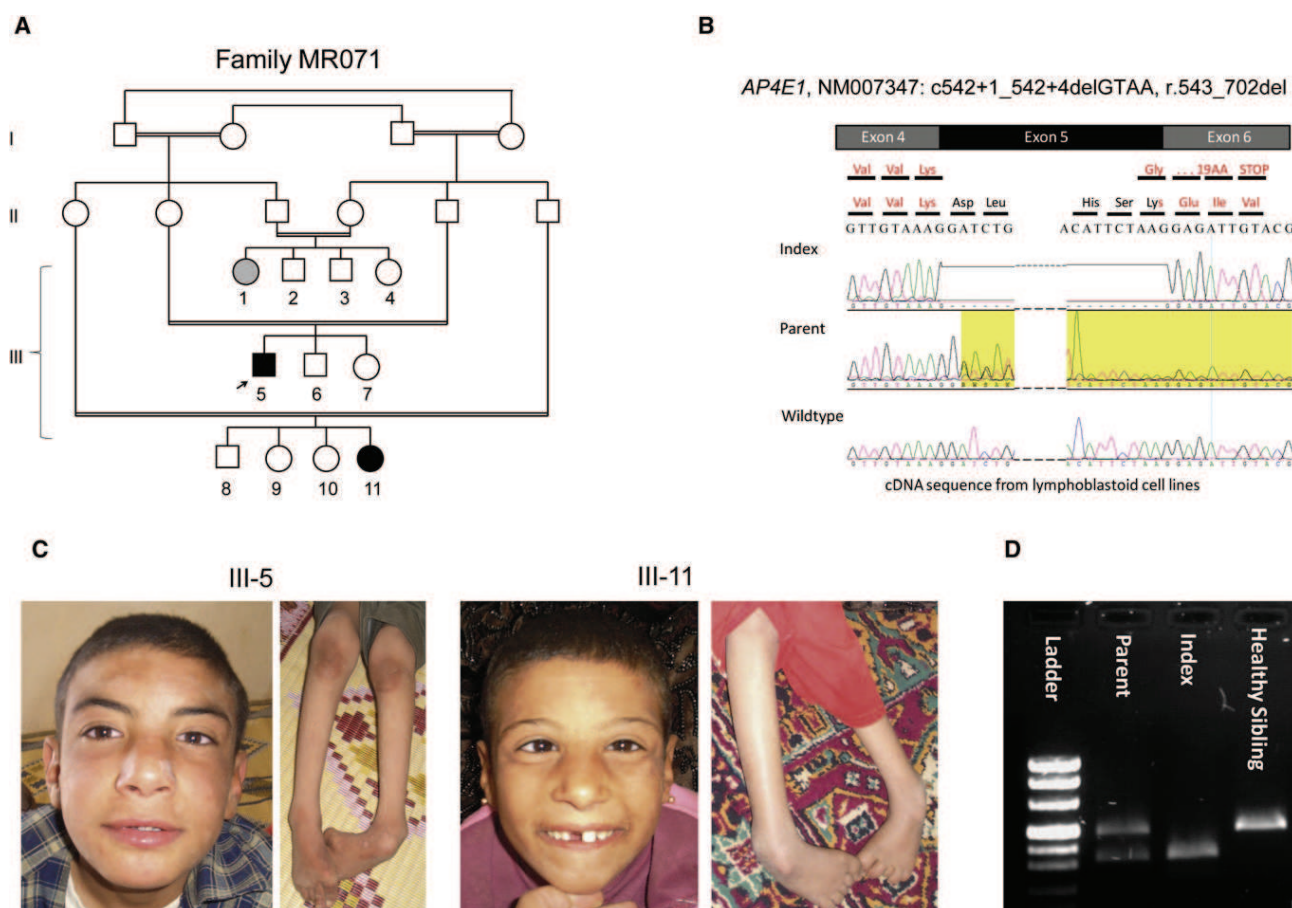
(C) Facial appearance of affected individuals with discreet remarkable facial gestalt, including a prominent and bulbous nose, a wide mouth, and coarse features and photographs of lower limbs with foot deformity and decreased muscle mass of the shanks.

We performed linkage analysis with ALLEGRO under an autosomal-recessive mode of inheritance with 99% penetrance and a disease allele frequency of 0.001 by using the EasyLinkage interface software.<sup>14–16</sup> Multipoint linkage analysis resulted in significant linkage peaks at 1p13.2-q21.2 for family ID01, at 14q11-q12 for MR061,<sup>17</sup> and at 15q21.1-q25.1 for MR071. Further genotype and haplotype analyses confirmed homozygosity by descent and defined critical intervals of 34 Mb, 9.1 Mb, and 32.9 Mb, respectively (Table S1, available online). Individuals from families MR061 and MR071, who presented with a clinically distinct form of ID, neither showed linkage to the above-mentioned regions nor, in the case of individuals V-9 and VI-7, showed a common locus. This means that in families MR061 and MR071 three and two different ID disorders exist, respectively.

After prioritizing genes according to their expression in the brain and their putative role in the central nervous system, we screened eight genes mapping to 1p13.1-q21.2 in family ID01 by using direct sequencing of all coding exons and exon-intron junctions. We identified a 3 bp homozygous insertion (NM\_006594.2:

c.487\_488insTAT) within exon 5 of *AP4B1* (encoding the  $\beta$  subunit of the adaptor complex 4 [MIM 607245]) (Figure 1B). This variant cosegregated with the disease and was not present in NCBI dbSNP (build 131) or detected in any of 796 control chromosomes, including 160 chromosomes from individuals of Israeli-Arab origin. This frameshift mutation (p.Glu163\_Ser739delinsVal) was predicted to cause premature termination of translation. Quantitative real-time PCR with the  $\Delta$ CT method showed significantly less *AP4B1* transcript in patient skin fibroblasts than in three controls ( $p = 0.0084$ – $0.013$  with Student's test, Figure 1C). These results suggest that the primary effect of this frameshift mutation is nonsense-mediated decay.

DNA from individual V-14 of family MR061 was enriched with the SureSelect Human All Exon Kit, which targets approximately 38 Mb, that is 1.22%, of the human genome (Agilent, Santa Clara, Ca, USA). Sequencing was carried out on an Illumina Genome Analyzer Iix (Illumina, San Diego, CA, USA) as 54 bp or 76 bp paired-end runs. Image analysis and base calling were performed with the Genome Analyzer Pipeline version 1.5 with default



**Figure 3. Genetic Analysis of Family MR071**

(A) Pedigree of family MR071.

(B) Representative sequence traces from cDNA showing skipping of exon 5.

(C) Facial appearance of affected individuals includes discreet remarkable facial gestalt with prominent and bulbous nose, wide mouth, and coarse features. Also shown are photographs of the lower limbs with foot deformity and decreased muscle mass of the shanks.

(D) RT-PCR products of mRNA from homozygous affected individuals, heterozygous healthy parents, and homozygous wild-type healthy siblings; the expected size from the normal *AP4E1* allele (512 bp) as well as a smaller band corresponding to aberrant splicing of the mutated allele with skipping of exon 5 (389 bp) is shown.

parameters. We performed read alignment with BWA (v 0.5.8) by using the default parameters<sup>18</sup> with the human genome assembly hg19 (GRCh37) as reference. Single-nucleotide variants and small insertions and deletions (indels) were detected with SAMtools (v 0.1.7).<sup>19</sup> Variant annotation was performed with custom Perl scripts integrating data from dbSNP (v131) and the UCSC Genome Browser knownGene track. Additionally, we compared variants to 80 sequenced exomes in an in-house database to identify further common variants that are not present in dbSNP. We captured 26,037 variants; 6,655 variants were coding and homozygous, 345 of those were not annotated, and 139 of those were nonsynonymous. Only two variants were located in the linked region on chromosome 14: a missense variant in the last exon of *SLC22A17* (NM\_020372.2: c.1429G>A, p.Val477Met) and a nonsense variant in the first coding exon of *AP4S1* (NM\_007077.3: c.124C>T, p.Arg42\*). In silico analysis with MutationTaster<sup>20</sup> and PolyPhen<sup>21</sup> indicated a high probability

for a pathogenic effect for both variants. The variants were also absent in 740 Syrian control chromosomes and cosegregated with the affected status within the family. Both *SLC22A17* (highly expressed in the brain and belonging to the organic cation transporter family [MIM 611461]) and *AP4S1* (encoding the small subunit of the adaptor complex 4, MIM [607243]) are thus good a priori candidates for ID. Because the clinical presentation of affected persons with mutations in the different AP4 subunits shows high similarity (Table 1), we assume that the *AP4S1* mutation, which truncates the protein at its very beginning, is the main determinant of the phenotype in this family, although we cannot exclude an additional effect of the *SLC22A17* or other variant in the linked region.

Finally, we tested homozygosity at the four loci coding for the subunits B1, E1, S1, and M1 of the AP4 complex by genotyping cohorts of 22 French and 62 Syrian<sup>17</sup> ARID families with Affymetrix GeneChip Mapping 6.0,



Affymetrix GeneChip 250K (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) or Illumina 610K arrays (Illumina, San Diego, CA, USA). One Syrian family (MR071) showed linkage to chromosome 15 containing *AP4E1*. Direct sequencing of this gene (encoding the  $\epsilon$  subunit of the adaptor complex 4 [MIM 607244]) identified a homozygous splice-donor site mutation in intron 5 (NM\_007347.3, c.542+1\_542+4delGTAA) (Figure 3). This variant cosegregated with the phenotype, was not present in dbSNP build 131, and was absent in 740 control chromosomes from healthy individuals of Syrian descent. This mutation was predicted to abolish the intron 5 splice-donor site. Consistently, analysis of *AP4E1* transcript from patient lymphoblastoid cell lines revealed skipping of exon 5 (Figure 3). This deletion was predicted to cause a frameshift and a premature termination of translation in exon 6 (NM\_007347.3: r.421\_542del, p.Glu181Glyfs\*20). In an additional Syrian family, an individual who had a homozygous 11 bp deletion in intron 11 of *AP4E1* (c.1346+44\_1346+54delGCAGTGACTTT) was identified. In silico analysis indicated that this deletion is not pathogenic and it was present in 20% of 320 control chromosomes from healthy individuals of Syrian descent. No additional, not annotated variants were identified.

Adaptor protein complexes (AP1, AP2, AP3, and AP4) play a key role in signal-mediated trafficking of integral membrane proteins. They mediate different types of vesicle formation and the selection of cargo molecules for inclusion into these vesicles. These evolutionarily conserved heterotetrameric complexes share a common structural organization and are composed of four subunits: two large subunits or adaptins (~100 kD;  $\alpha$ - $\epsilon$ / $\beta$ 1-4), one medium (~50 kD;  $\mu$ 1-4), and one small subunit (~17 kD;  $\sigma$ 1-4).<sup>22</sup> AP1-3 complexes are widely distributed among eukaryotes from yeast to humans. By contrast, the AP4 complex is absent in organisms such as *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, and *Drosophila melanogaster*.<sup>23</sup> Moreover, although AP1, AP2, and AP3 complexes have been shown to be associated with clathrin vesicles, the AP4 complex functions independently of clathrin and is preferentially linked to membranes regulated by the small GTPase ARF, another coat-vesicle protein.<sup>24-26</sup>

As shown in Figure S1, expression analysis of *AP4B1*, *AP4E1*, and *AP4S1* transcript levels by quantitative RT-PCR in various adult and fetal tissues revealed ubiquitous expression in all fetal and adult brain structures tested. It has been suggested that the AP4 complex is involved in various sorting processes. In HeLa cells, the  $\mu$ 4 subunit interacts with the cytoplasmic tyrosine motif of lysosomal cargo proteins such as the lysosome-associated membrane protein 2 and mediates their direct transport to lysosomes without passing via the plasma membrane. In Madin-Darby canine kidney cells (MDCK), the  $\mu$ 4 subunit interacts with different cargo proteins destined for the basolateral membrane. In the brain, the AP4 complex has been involved in the transport of amyloid precursor protein (APP) from the trans-Golgi network to early endo-

somes.<sup>27</sup> Ap4b1-deficient mice were fertile, exhibited no anatomical brain abnormalities, and had normal life spans, body weight, and grip power. They exhibited no ataxia but a significantly poorer rotorod performance than wild-type mice did. There was no information about learning ability of the Ap4b1-deficient mice. Analysis of those mice demonstrated that Ap4 mediates the trans-Golgi network to the postsynaptic somatodendritic domain transport of d2 and  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) glutamate receptors in both cerebellar Purkinje cells and hippocampal neurons.<sup>28</sup> We thus propose that motor disturbances observed in patients with mutations in the AP4 complex might be because of cerebellar dysfunction caused by mislocalization of glutamate receptors. Similarly, defective AMPA receptor sorting might impact synaptic plasticity in hippocampal neurons and cause ID.

Mutations in other AP complexes have already been linked to human disorders. Mutations of *AP1S2* (encoding the  $\sigma$  small subunit of the adaptor complex 1 [MIM 300629]) cause an X-linked intellectual disability syndrome associating muscular hypotonia, delayed walking, speech delay, aggressive behavior, brain calcifications, and elevated cerebrospinal fluid protein levels (MIM 300630).<sup>29,30</sup> Mutations in *AP3B1* (encoding the  $\beta$  subunit of the adaptor complex 3 [MIM 603401]) cause Hermansky-Pudlak syndrome type 2 (HPS [MIM 608233]), a disease characterized by hypopigmentation of the eyes and skin, prolonged bleeding, and lysosomal ceroid storage.<sup>27</sup>

Interestingly, homozygosity for a splice-donor site mutation in *AP4M1* (encoding the  $\mu$  subunit of the AP4 complex [MIM 602296]) was found to be associated with an autosomal-recessive spastic tetraplegia with intellectual disability and white matter anomalies (MIM 612936).<sup>31</sup> Moreover, a 192-kb-long deletion encompassing *SPPL2A* (MIM 608238) and *AP4E1* (MIM 607244) was also found to be associated with autosomal-recessive cerebral palsy, microcephaly, and intellectual disability (no MIM number has been assigned).<sup>32</sup> Patients carrying mutations in *AP4M1* and *AP4E1* share many clinical features with those patients described in our study (Table 1). Primarily, all patients had an infantile muscular hypotonia that progressed to spasticity, hypertonia, and paralysis and became unable to walk. They presented with a severe ID, absent or markedly delayed speech, stereotypic laughter, and growth retardation. In addition to those common symptoms, several other features were observed in some of the patients: microcephaly, epilepsy, waddling gait, joint hyperlaxity (in patients with *AP4B1* mutation), and feet deformity (Table 1). Yet, despite this phenotypic variability, our data suggest that disruption of any of the four AP4 subunits causes a clinically recognizable AP4-deficiency syndrome. This was also supported by the fact that three other individuals in families MR061 and MR071 have a clinical phenotype of ID different from the AP4 syndrome and consistently do not carry the familial mutations homozygously. Heterozygous carriers of the mutations have no ID.

In conclusion, our findings illustrate the power of combining systematic autozygosity mapping with large-scale sequencing for unraveling the molecular bases of autosomal-recessive ID. More importantly, they suggest the existence of a clinically recognizable AP4-deficiency syndrome characterized by the association of severe ID, growth retardation, stereotypic laughter, progressive spasticity, and inability to walk. Finally, this study provides further support to the hypothesis of a crucial role of AP4-mediated trafficking in brain development and functioning.

### Supplemental Data

Supplemental Data include one figure and one table and can be found with this article online at <http://www.cell.com/AJHG/>.

### Acknowledgments

We are grateful to the families for their participation in the study. We also thank Angelika Diem, Petra Rothe, Bianca Schmick, and Anna Benet-Pagès for the excellent technical support. This study was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Agence Nationale de la Recherche (ANR-08-MNP-010), the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur, the German Intellectual disability Network (MRNET) through a grant from the German Ministry of Research and Education to A. Reis and T. Strom (01GS08160 and 01GR0804-4), the European Commission 7th Framework Program, Project N. 261123, GEUVADIS, and by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) (AB393/1-2).

Received: March 31, 2011

Revised: April 21, 2011

Accepted: April 26, 2011

Published online: May 26, 2011

### Web Resources

The URLs for data presented herein are as follows:

Ensembl Genome Browser, <http://www.ensembl.org/>

GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>

National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.omim.org>

### References

1. Ropers, H.H. (2010). Genetics of early onset cognitive impairment. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* *11*, 161–187.
2. Rauch, A., Hoyer, J., Guth, S., Zweier, C., Kraus, C., Becker, C., Zenker, M., Hüffmeier, U., Thiel, C., Rüschemdorf, F., et al. (2006). Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am. J. Med. Genet. A.* *140*, 2063–2074.
3. Ropers, H.H., and Hamel, B.C. (2005). X-linked mental retardation. *Nat. Rev. Genet.* *6*, 46–57.
4. Çalışkan, M., Chong, J.X., Uricchio, L., Anderson, R., Chen, P., Sougnez, C., Garimella, K., Gabriel, S.B., dePristo, M.A., Shakir, K., et al. (2011). Exome sequencing reveals a novel mutation for autosomal recessive non-syndromic mental retardation in the *TECR* gene on chromosome 19p13. *Hum. Mol. Genet.* *20*, 1285–1289.
5. Garshasbi, M., Hadavi, V., Habibi, H., Kahrizi, K., Kariminejad, R., Behjati, F., Tzschach, A., Najmabadi, H., Ropers, H.H., and Kuss, A.W. (2008). A defect in the *TUSC3* gene is associated with autosomal recessive mental retardation. *Am. J. Hum. Genet.* *82*, 1158–1164.
6. Higgins, J.J., Pucilowska, J., Lombardi, R.Q., and Rooney, J.P. (2004). A mutation in a novel ATP-dependent Lon protease gene in a kindred with mild mental retardation. *Neurology* *63*, 1927–1931.
7. Mir, A., Kaufman, L., Noor, A., Motazacker, M.M., Jamil, T., Azam, M., Kahrizi, K., Rafiq, M.A., Weksberg, R., Nasr, T., et al. (2009). Identification of mutations in *TRAPP9*, which encodes the NIK- and IKK-beta-binding protein, in nonsyndromic autosomal-recessive mental retardation. *Am. J. Hum. Genet.* *85*, 909–915.
8. Mochida, G.H., Mahajnah, M., Hill, A.D., Basel-Vanagaite, L., Gleason, D., Hill, R.S., Bodell, A., Crosier, M., Straussberg, R., and Walsh, C.A. (2009). A truncating mutation of *TRAPPC9* is associated with autosomal-recessive intellectual disability and postnatal microcephaly. *Am. J. Hum. Genet.* *85*, 897–902.
9. Molinari, F., Foulquier, F., Tarpey, P.S., Morelle, W., Boissel, S., Teague, J., Edkins, S., Futreal, P.A., Stratton, M.R., Turner, G., et al. (2008). Oligosaccharyltransferase-subunit mutations in nonsyndromic mental retardation. *Am. J. Hum. Genet.* *82*, 1150–1157.
10. Molinari, F., Rio, M., Meskenaite, V., Encha-Razavi, F., Augé, J., Bacq, D., Briault, S., Vekemans, M., Munnich, A., Attié-Bitach, T., et al. (2002). Truncating neurotrypsin mutation in autosomal recessive nonsyndromic mental retardation. *Science* *298*, 1779–1781.
11. Motazacker, M.M., Rost, B.R., Hucho, T., Garshasbi, M., Kahrizi, K., Ullmann, R., Abedini, S.S., Nieh, S.E., Amini, S.H., Goswami, C., et al. (2007). A defect in the ionotropic glutamate receptor 6 gene (*GRIK2*) is associated with autosomal recessive mental retardation. *Am. J. Hum. Genet.* *81*, 792–798.
12. Philippe, O., Rio, M., Carioux, A., Plaza, J.M., Guigues, P., Molinari, F., Bodaert, N., Bole-Feysot, C., Nitschke, P., Smahi, A., et al. (2009). Combination of linkage mapping and microarray-expression analysis identifies NF-kappaB signaling defect as a cause of autosomal-recessive mental retardation. *Am. J. Hum. Genet.* *85*, 903–908.
13. O'Connell, J.R., and Weeks, D.E. (1998). PedCheck: A program for identification of genotype incompatibilities in linkage analysis. *Am. J. Hum. Genet.* *63*, 259–266.
14. Hoffmann, K., and Lindner, T.H. (2005). easyLINKAGE-Plus—automated linkage analyses using large-scale SNP data. *Bioinformatics* *21*, 3565–3567.
15. Lindner, T.H., and Hoffmann, K. (2005). easyLINKAGE: A PERL script for easy and automated two-/multi-point linkage analyses. *Bioinformatics* *21*, 405–407.
16. Gudbjartsson, D.F., Thorvaldsson, T., Kong, A., Gunnarsson, G., and Ingólfssdóttir, A. (2005). Allegro version 2. *Nat. Genet.* *37*, 1015–1016.
17. Abou Jamra, R., Wohlfart, S., Zweier, M., Uebe, S., Priebe, L., Ekici, A., Giesebrecht, S., Abboud, A., Al-Khateeb, M., Fakher, M., et al. (2011). Homozygosity mapping in 64 Syrian consanguineous families with non-specific intellectual disability reveals 11 novel loci and high heterogeneity. *Eur. J. Hum. Genet.*, in press.

18. Li, H., and Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754–1760.
19. Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., and Durbin, R.; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078–2079.
20. Seelow, D., Schuelke, M., Hildebrandt, F., and Nürnberg, P. (2009). HomozygosityMapper—an interactive approach to homozygosity mapping. *Nucleic Acids Res.* 37 (Web Server issue), W593–599.
21. Adzhubei, I.A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V.E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A.S., and Sunyaev, S.R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods* 7, 248–249.
22. Boehm, M., and Bonifacino, J.S. (2002). Genetic analyses of adaptin function from yeast to mammals. *Gene* 286, 175–186.
23. Boehm, M., Aguilar, R.C., and Bonifacino, J.S. (2001). Functional and physical interactions of the adaptor protein complex AP-4 with ADP-ribosylation factors (ARFs). *EMBO J.* 20, 6265–6276.
24. Dell’Angelica, E.C., Mullins, C., and Bonifacino, J.S. (1999). AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors. *J. Biol. Chem.* 274, 7278–7285.
25. Hirst, J., Bright, N.A., Rous, B., and Robinson, M.S. (1999). Characterization of a fourth adaptor-related protein complex. *Mol. Biol. Cell* 10, 2787–2802.
26. Wang, X., and Kilimann, M.W. (1997). Identification of two new mu-adaptin-related proteins, mu-ARP1 and mu-ARP2. *FEBS Lett.* 402, 57–61.
27. Burgos, P.V., Mardones, G.A., Rojas, A.L., daSilva, L.L., Prabhu, Y., Hurley, J.H., and Bonifacino, J.S. (2010). Sorting of the Alzheimer’s disease amyloid precursor protein mediated by the AP-4 complex. *Dev. Cell* 18, 425–436.
28. Matsuda, S., Miura, E., Matsuda, K., Kakegawa, W., Kohda, K., Watanabe, M., and Yuzaki, M. (2008). Accumulation of AMPA receptors in autophagosomes in neuronal axons lacking adaptor protein AP-4. *Neuron* 57, 730–745.
29. Borck, G., Mollà-Herman, A., Boddaert, N., Encha-Razavi, F., Philippe, A., Robel, L., Desguerre, I., Brunelle, F., Benmerah, A., Munnich, A., and Colleaux, L. (2008). Clinical, cellular, and neuropathological consequences of AP1S2 mutations: Further delineation of a recognizable X-linked mental retardation syndrome. *Hum. Mutat.* 29, 966–974.
30. Tarpey, P.S., Stevens, C., Teague, J., Edkins, S., O’Meara, S., Avis, T., Barthorpe, S., Buck, G., Butler, A., Cole, J., et al. (2006). Mutations in the gene encoding the Sigma 2 subunit of the adaptor protein 1 complex, AP1S2, cause X-linked mental retardation. *Am. J. Hum. Genet.* 79, 1119–1124.
31. Verkerk, A.J., Schot, R., Dumee, B., Schellekens, K., Swagemakers, S., Bertoli-Avella, A.M., Lequin, M.H., Dudink, J., Govaert, P., van Zwol, A.L., et al. (2009). Mutation in the AP4M1 gene provides a model for neuroaxonal injury in cerebral palsy. *Am. J. Hum. Genet.* 85, 40–52.
32. Moreno-De-Luca, A., Helmers, S.L., Mao, H., Burns, T.G., Melton, A.M., Schmidt, K.R., Fernhoff, P.M., Ledbetter, D.H., and Martin, C.L. (2011). Adaptor protein complex-4 (AP-4) deficiency causes a novel autosomal recessive cerebral palsy syndrome with microcephaly and intellectual disability. *J. Med. Genet.* 48, 141–144.

### **Chapitre 3 : Contribution des anomalies de la voie NF- $\kappa$ B à l'étiologie des déficiences intellectuelles : TRAPPC9 un nouvel acteur**

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication: « *Combination of linkage mapping and microarray-expression analysis identifies NF-kappaB signaling defect as a cause of autosomal-recessive mental retardation* » (Philippe O, *et al.* 2009).

#### **1) Evaluation clinique des patients**

La famille BM, d'origine Tunisienne et suivie par le Docteur Marlène Rio à l'hôpital Necker Enfants-Malades, est composée de quatre garçons issus d'un mariage entre cousins issus de germains (Philippe O, *et al.* 2009: figure 1.A). Trois d'entre eux sont atteints d'une DI sévère (QI=35) associée à une microcéphalie variable, une légère dysmorphie faciale, un cou court, une obésité tronculaire tendant à disparaître avec la croissance et un retard psychomoteur mais sans anomalies motrices persistantes (figure 14). Les trois garçons ont un caractère joyeux et l'un d'entre eux présente une hyperactivité. Les signes cliniques associés à la DI de ces patients sont peu spécifiques et n'évoquent pas de syndrome connu, rendant difficile le recrutement de patients susceptibles d'être atteints de la même maladie.

Figure 14 : Deux enfants de la famille BM atteints de DI



Cependant, les images des IRM cérébrales de deux enfants de la famille BM montrent des signaux particuliers rarement observés chez des patients atteints de DI. En effet, différentes séquences à l'IRM sont utilisées pour la lecture des images : la séquence T1, T2 et FLAIR. Ces séquences permettent d'observer des images avec différentes intensités de signaux en fonction des tissus observés (graisse, os, substance grise, substance blanche, etc.). La séquence FLAIR est une séquence en inversion-récupération pondérée T2 sur laquelle on a « supprimé » le signal de l'eau libre (et donc du liquide céphalo-rachidien), qui apparaît alors en hyposignal par rapport aux images en T2. Cette séquence est très utilisée dans l'exploration cérébrale. A l'exception des sujets très jeunes dont l'âge est inférieur à 2 ans, une concordance est observée entre les anomalies cérébrales observées en FLAIR et celles des séquences T1 et T2. Or chez les enfants de la famille BM, l'IRM révèle des hypersignaux de la substance blanche uniquement présents sur la séquence FLAIR alors que la séquence T2 apparaît normale. Cette observation suggère un défaut atypique de la substance blanche (Philippe O, *et al.* 2009 : figure 1.B). Aucune autre anomalie n'a été rapportée chez les enfants de la famille BM pour les séquences T2 et FLAIR lorsqu'ils sont comparés à des individus contrôles de même âge et de même sexe.

## **2) Cartographie par autozygotie et analyse transcriptomique**

### **2.1) Cartographie par autozygotie de la famille BM.**

Une étude de liaison a été réalisée par génotypage sur puce Affymetrix® GeneChip Mapping 10K array a permis de mettre en évidence deux régions chromosomiques candidates uniques d'une taille supérieure à 2 Mb et statistiquement significatives compte tenu du lien de parenté des parents.

La première région candidate est localisée sur le chromosome 8q24.21-q24.3, entre les marqueurs rs2395855 et rs1397380. Cette région de 12,16 Mb dont le LOD score maximal calculé est de 3,13, comprend environ 34 gènes connus (GRCh37/hg19, UCSC). La seconde, dont la taille est de 29,89 Mb, est bornée par les marqueurs rs982833 et rs750841 en Xq25-q28 avec un LOD score maximale de 0,9 et compte 186 gènes caractérisés (Philippe O, *et al.* 2009 : figure 2.B).

Dans un deuxième temps, des marqueurs microsatellites hautement polymorphes ont été analysés afin de compléter les travaux de cartographie réalisés. Cette étude a permis de confirmer les deux régions d'homozygotie mais n'a cependant pas permis de réduire l'intervalle des deux loci identifiés par l'étude de liaison ni de les exclure. C'est pourquoi, l'étude transcriptomique réalisée dans un second temps a été pratiquée sur les deux régions critiques.

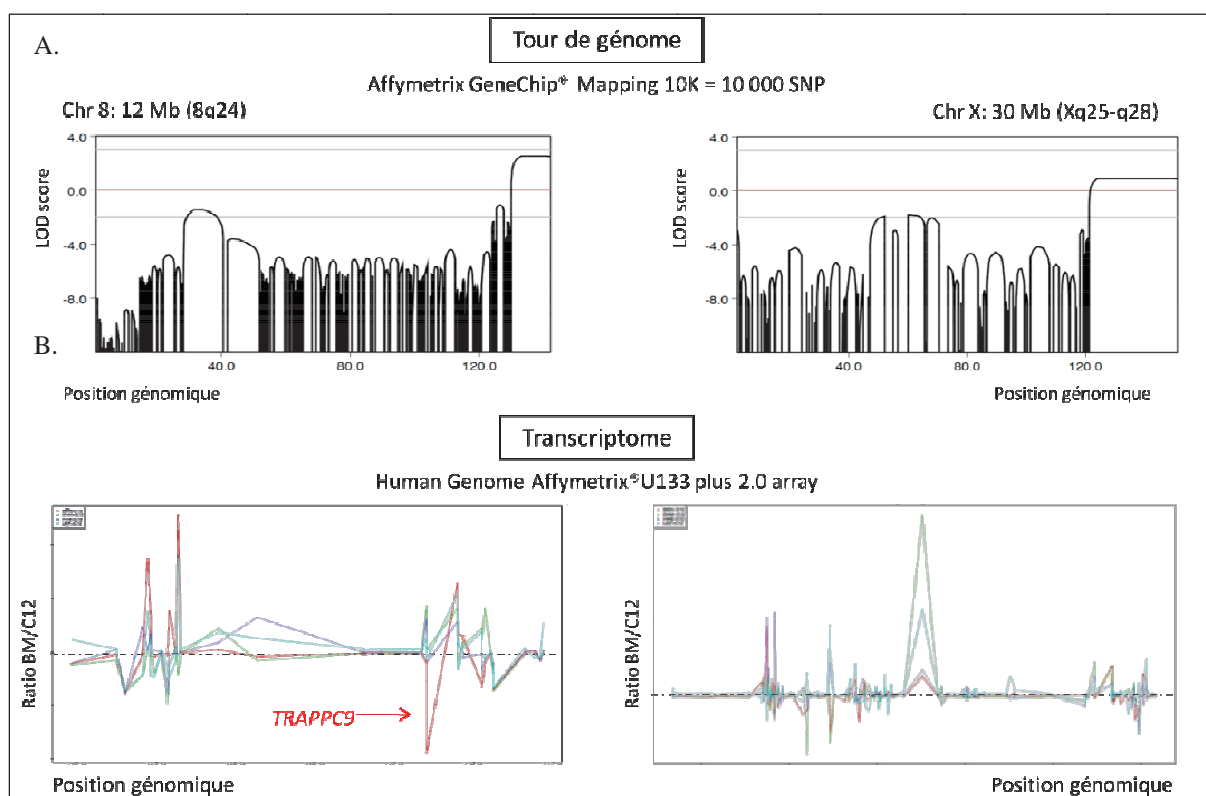
## 2.2) Analyse transcriptomique de la famille BM.

Compte tenu du nombre important de gènes (220) compris dans l'intervalle de ces deux loci, la mise en place d'une analyse par une puce à expression a semblé pertinente. L'étude transcriptomique (Affymetrix® U133Plus2 array) a été réalisée à partir des ARN totaux extraits de fibroblastes du patient V.I, comparée à 3 contrôles indépendants, sous l'hypothèse d'un mRNA decay consécutif à la mutation. L'analyse du transcriptome a été restreinte aux seules deux régions chromosomiques candidates dont les résultats sont présentés sous forme de ratio, sonde par sonde.

Au sein de la région du locus 8q24.21-q24.3, 30 transcrits ont été couverts par la puce, ce qui correspond à une couverture de 88% des gènes de la région. Au niveau du locus Xq25-q28, 135 transcrits ont été analysés, soit 84% des gènes de la région. Les résultats de l'analyse transcriptomique orientaient sur un gène candidat, en révélant une diminution significative d'un unique transcrit au sein des deux intervalles retenus : le gène *TRAPPC9* au locus 8q24.21-q24.3 (voir figure 15 et table 8).



Figure 15 : Analyse génétique et transcriptomique de la famille BM



A : Représentations graphiques des LOD score sur la totalité des loci 8q24.21-q24.3 et Xq25-q28. La ligne rouge marque le LOD score à  $\theta=0$ . B : Représentation graphique des données du transcriptome. La courbe rouge représente les ratios du patient BM/C12 et les trois autres celles des trois contrôles (ramenés sur le même individu de référence C12). La ligne en pointillé indique un ratio de 1.

Table 8 : Ratios des 3 sondes de *TRAPPC9* du patient BM et des 3 contrôles

Sondes	BM/C12	Cont.1/C12	Cont.2/C12	Cont.3/C12	P value
221836_s_at	0,6226	1,0079	0,9626	0,9738	4.0447e-14
56829_at	0,8881	1,0190	1,0156	0,9999	0.0764
221672_s_at	0,9588	1,1757	1,1232	1,0508	1

Trois sondes de la puce transcriptomique sont complémentaires du transcrit *TRAPPC9*. Bien que seules 2 sondes sur trois, montrent une baisse significative de l'expression de *TRAPPC9*, nous avons orienté notre analyse sur ce gène comme pouvant rendre compte de la DI des individus atteints de la famille BM. Dans un premier temps, nous avons confirmé par RT-PCR en temps réel, l'instabilité du transcrit *TRAPPC9* (Philippe O, *et al.* 2009 : figure 2.B). Les résultats révèlent un effondrement de l'expression relative du transcrit *TRAPPC9* proche de 90%. Le séquençage direct des 23 exons et des jonctions intron-exon de *TRAPPC9* a permis de mettre en

évidence la substitution d'un nucléotide C vers T, à l'état homozygote, conduisant à l'apparition d'un codon stop prématuré au niveau de l'exon 9: (NM\_031466.5(TRAPPC9\_v001): c.1708C>T ; NM\_031466.5(TRAPPC9\_i001): p.(Arg570\*) annotation établie par le site Mutalyzer 2.0). La variation ségrège avec la maladie dans la famille BM et n'a pas été retrouvée parmi 1120 chromosomes contrôles.

### **3) Fonctions de la protéine TRAPPC9**

Initialement décrite sous le nom de NIBP signifiant « NIK and IKK $\beta$  Binding Protein », la protéine TRAPPC9 est capable d'interagir avec les protéines NIK (MAP3K14, MIM 604655) et IKK $\beta$  (IKBKB, MIM 603258), deux acteurs majeurs de la voie NF- $\kappa$ B (Hu *et al.* 2005).

#### **3.1) Les voies NF- $\kappa$ B**

Chez les vertébrés, la famille NF- $\kappa$ B est composée de cinq facteurs de transcription: NFKB1 (ou p50 et son précurseur P105, MIM 164011), NFKB2 (ou P52 et son précurseur P100, MIM 164012), REL (ou c-REL, MIM 164910), RELA (ou p65, MIM 164014) et RELB (MIM 604758). Ces protéines s'assemblent sous différentes formes d'homo- et d'hétérodimères dans le cytoplasme. Les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B possèdent un domaine commun nommé REL, représenté par 300 aa en partie N-ter qui contient les séquences de fixation à l'ADN, de dimérisation, de localisation nucléaire et de fixation aux protéines inhibitrices I $\kappa$ B. Les cinq membres de la famille NF- $\kappa$ B sont classés en deux sous-groupes : les NF $\kappa$ B et les protéines REL. Les NF $\kappa$ B (p105 et p100) contiennent un domaine I $\kappa$ B-*like* en C-ter qui sera hydrolysé par le protéasome (lieu de dégradation des protéines) pour former les protéines matures p50 et p52 (Courtois G, *et al.* 2006). Les REL sont matures et sont retenues dans le cytoplasme par les protéines inhibitrices I $\kappa$ B. Après activation de la voie NF- $\kappa$ B par différents stimuli extracellulaires, les dimères NF- $\kappa$ B sont capables de transloquer la membrane nucléaire et ainsi moduler l'expression de plusieurs centaines de gènes cibles. Cette activation est régulée par deux voies : la voie principale et la voie alternative NF- $\kappa$ B (Courtois G, *et al.* 2006).

La voie principale ou encore voie canonique est représentée principalement par le dimère RELA/p50. Ce dimère est maintenu sous forme inactive dans le cytoplasme grâce aux protéines inhibitrices I $\kappa$ B (Inhibitors of  $\kappa$ B) représentées par : NFKBIA (ou I $\kappa$ B- $\alpha$ , MIM 164008),

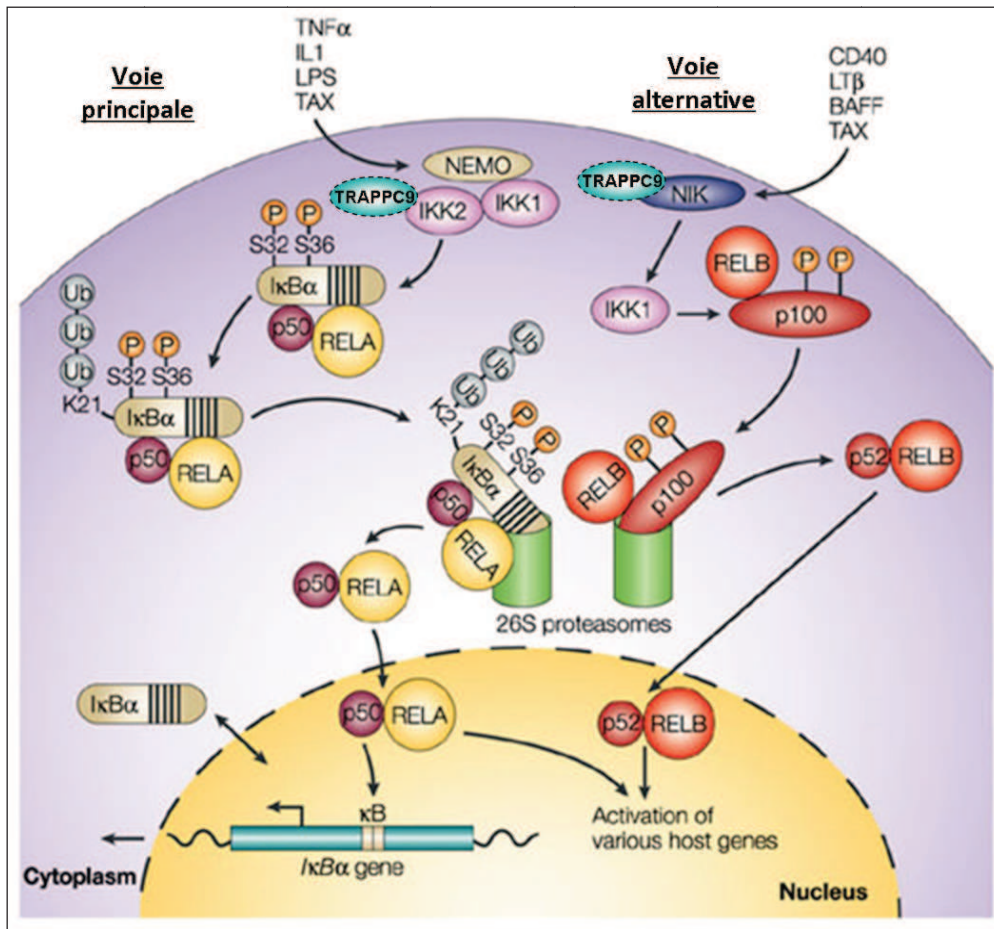


NFKBIB (ou I $\kappa$ B- $\beta$ , MIM 604495), NFKBIE (ou I $\kappa$ B- $\epsilon$ , MIM 604548), NFKBID (ou I $\kappa$ B- $\delta$ ), NFKBIZ (ou I $\kappa$ B- $\zeta$ , MIM 608004) ou encore N4BP2 (ou Bcl-3, MIM 109560) (Memet S, *et al.* 2006 ; Courtois G, *et al.* 2006). L'activation de la voie canonique par différents stimuli (cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-1), lipopolysaccharides bactériens (LPS), virus, etc.) induit la phosphorylation des I $\kappa$ B qui sont ensuite ubiquitinées pour être finalement transportées vers le protéasome où elles sont dégradées. La phosphorylation des I $\kappa$ B est induite par le complexe IKK (I $\kappa$ B kinases) composé de trois protéines : CHUK (ou IKK1/IKK $\alpha$ , MIM 600664), IKBKB (ou IKK2/IKK $\beta$ , MIM 603258) et la sous-unité régulatrice IKBKG (ou NEMO/IKK $\gamma$ , MIM 300248). Lorsque les protéines I $\kappa$ B sont dégradées, le dimère de facteurs de transcription NF- $\kappa$ B libre est alors capable de transloquer au noyau (figure 16).

La voie alternative ou non-canonique est également activée par des signaux du milieu extérieur qui entraînent une protéolyse partielle d'un des dimères NF- $\kappa$ B présent dans le cytoplasme. Les facteurs de transcription préférentiellement retrouvés au niveau de la voie alternative sont : p100/RELB. La protéine p100 peut être hydrolysée afin de former le facteur de transcription actif p52. L'acteur essentiel de cette activation est la protéine NIK (NF- $\kappa$ B inducing Kinase) qui est capable d'activer les protéines IKKs en aval (dimère d'IKK1 pour la voie alternative) pour permettre la phosphorylation du précurseur p100. La dégradation partielle du précurseur conduit à la formation du dimère p52/RELB. Sous cette forme-ci, le dimère est actif et est capable de transloquer dans le noyau afin d'activer la transcription des gènes cibles (figure 16) (Courtois G, *et al.* 2006 ; Hayden MS, *et al.* 2004).

L'activation des IKKs par la voie classique/NEMO-dépendante ou alternative/NEMO-indépendante se traduit par l'activation de dimères NF- $\kappa$ B différents et donc par la transcription de gènes cibles différents (Sun SC, *et al.* 2011 ; Chen LF, *et al.* 2004 ; Jacque E, 2006).

Figure 16 : Voies NF- $\kappa$ B principale et alternative



La protéine TRAPPC9 a été ajoutée à la voie alternative et principale de NF- $\kappa$ B selon les résultats des travaux de Hu WH, *et al.* 2005. Image modifiée de Chen LF, *et al.* 2004.

La voie NF- $\kappa$ B est impliquée dans de nombreux processus biologiques tels que les mécanismes inflammatoires, les réactions immunitaires, l'apoptose ou encore le cycle et la survie cellulaire. Mais de nombreuses études tendent à démontrer l'importance de la voie NF- $\kappa$ B dans le SNC (Hayden MS, *et al.* 2004 ; Sun SC, *et al.* 2011) lesquelles sont détaillées dans la partie discussion de ce chapitre.

Outre ces observations, les modèles animaux ont révélé l'importance de la voie NF- $\kappa$ B, dans son ensemble dans la survie cellulaire. En effet, les souris dont la protéine p65 a été totalement inactivée meurent *in utero* des suites d'une apoptose du tissu hépatique au stade E15-16 (Beg *et al.* 1995). La fonction de la voie NF- $\kappa$ B est donc essentielle au développement de l'organisme au cours de la vie utérine.

### 3.2) TRAPPC9 : acteur des voies NF-κB

Les travaux de l'équipe de HU Wen-hui réalisés sur des lignées cellulaires HEK293T ont démontré que TRAPPC9 joue un rôle dans la régulation de la voie NF-κB. En effet, il a été mis en évidence que TRAPPC9 interagit avec IKK2 et NIK (figure 17) suggérant un rôle de TRAPPC9 dans la voie principale et alternative de la voie NF-κB. De plus, la surexpression de *TRAPPC9* dans ces cellules stimule la réponse de la voie NF-κB lorsqu'elle est activée. Cette activation s'accompagne d'une augmentation de la dégradation des protéines inhibitrices IκB dans le cytoplasme et d'une activité transcriptionnelle plus importante des gènes cibles des facteurs de transcription NFκB dans le noyau. Inversement, l'inactivation de TRAPPC9 conduit à une répression de la voie NF-κB lorsque celle-ci est stimulée. Ces résultats indiquent que TRAPPC9 participe à l'action de la voie NF-κB et agirait comme un « catalyseur » ou un « adaptateur » mais ne semble pas indispensable à son activité.

Enfin, les cellules PC12, issues de tumeurs neuroendocriniennes de rat, ont la capacité de se différencier et de former des neurites lorsqu'elles sont stimulées par le facteur de croissance neuronal NGF (Nerve Growth factor). Les cellules PC12 invalidées pour TRAPPC9 sont incapables de former des neurites sous l'action du NGF révélant une implication certaine de TRAPPC9 dans le développement de cellules neurales (Hu WH, *et al.* 2005).

Ces résultats sont en faveur d'un rôle important de TRAPPC9 dans la voie NF-κB et suggèrent également son implication dans la maturation des cellules neuronales notamment pour la formation des neurites.

## **4) TRAPPC9 : conséquences fonctionnelles des mutations identifiées**

### 4.1) Impact sur l'expression de TRAPPC9.

Dans un premier temps, nous avons étudié les conséquences de la variation nucléotidique identifiée, c.1708C>T p. Arg570X, sur l'expression de *TRAPPC9* dans les cellules fibroblastiques des patients BM. L'anticorps anti-TRAPPC9 utilisé pour cette expérience (voir matériels et méthodes) a été initialement généré par l'équipe de Hu Wen-Hui, et dont les résultats ont déjà fait l'objet d'une publication. Le peptide composé de la séquence VYNPMPFELRVENMGLLTSGVEF, couvrant la jonction entre les exons 12 et 13, a été utilisé pour la

conception d'anticorps polyclonaux chez le lapin. Cette étude permet de savoir si TRAPPC9 est présente ou absente dans sa totalité mais ne permet pas d'évaluer la traduction éventuelle d'une forme tronquée de la protéine puisque la mutation non-sens se situe au niveau de l'exon 9 de TRAPPC9. Les protéines totales issues d'une lignée fibroblastique du patient V.1 de la famille BM ont été soumises à un Western Blot. Les résultats présentés en figure 3.A de l'article montrent une absence totale de la protéine native dans les extraits protéiques des patient alors que pour les deux lignées contrôles, une bande à 140 kDa correspondant à TRAPPC9, est bien observée.

Toutefois, nous ne pouvons pas écarter l'hypothèse de la production d'une forme tronquée de TRAPPC9. Néanmoins, et d'après nos résultats montrant une réelle diminution du transcrit *TRAPPC9*, nous suspectons que la mutation tronquante p. Arg570X a pour conséquence une dégradation de l'ARNm conduisant à la perte d'expression de TRAPPC9, par le biais du mécanisme de Non-sens Mediated mRNA Decay (NMD).

#### 4.2) Incidences sur la voie NF- $\kappa$ B.

TRAPPC9 ayant un rôle dans l'activation de la voie NF- $\kappa$ B, nous avons estimé qu'un défaut de la protéine pourrait entraîner des anomalies du fonctionnement de la voie NF- $\kappa$ B. Le ligand TNF $\alpha$  capable de se fixer sur les récepteurs TNFR (TNFRSF1A (ou TNFR1) MIM 191190 ; et TNFRSF1B (ou TNFR2) MIM 191191), est non seulement un puissant activateur de la voie NF- $\kappa$ B mais il joue également un rôle dans les mécanismes d'apoptose.

L'apoptose est une mort cellulaire programmée et inévitable, faisant partie de l'homéostasie du développement de l'animal. Elle intervient dans de nombreux évènements biologiques tels la morphogénèse, le renouvellement cellulaire, la destruction de cellules défectueuses,... L'équilibre de la balance apoptotique est crucial pour assurer le bon fonctionnement de l'organisme (Schultz DR, *et al.* 2003 ; Weinlich R, *et al.* 2011). L'apoptose concerne deux voies dont les signaux conduisent à l'activation des caspases : la voie intrinsèque faisant intervenir la famille des protéines BCL-2 ainsi que la perméabilisation de la membrane mitochondriale (Weinlich R, *et al.* 2011) ; et la voie extrinsèque initiée par la fixation des ligands (TNF $\alpha$ ) sur les TNFR (Gyrd-Hansen M, *et al.* 2010) (figure 17). Les caspases sont des protéases à cystéine dont les formes matures des protéines sont responsables de l'arrêt de la réplication

cellulaire, de la fragmentation nucléaire et des protéines du cytosquelette et conduisent à la formation de corps apoptotiques pouvant être soumis à la phagocytose par les cellules spécialisées (Schultz DR, *et al.* 2003). Cette seconde voie est également capable d'activer par le biais de la voie canonique NF-κB, les IAPs (Inhibitors of Apoptosis) (Darding M, *et al.* 2012) (figure 17). Les IAPs sont au nombre de trois : c-IAP1 (*BIRC2*, MIM : 601712) ; c-IAP2 (*BIRC3*, MIM : 601721) et XIAP (MIM : 300079). Deux d'entre eux, *BIRC3* et *XIAP*, sont des gènes cibles de la voie NF-κB (Stehlik C, *et al.* 1998 ; Turner DJ, *et al.* 2007). De plus, l'activation de la voie principale NF-κB par la fixation du TNFα au TNFR1 (impliqué dans l'apoptose) est principalement liée à la dégradation des protéines inhibitrices IκB-α (Weinlich R, *et al.* 2011). Enfin, l'apoptose joue un rôle clé et déterminant dans la mise en place du SNC (Yeo W, *et al.* 2004), lequel est plus détaillé dans la partie discussion de ce chapitre.

Figure 17 : voies de l'apoptose

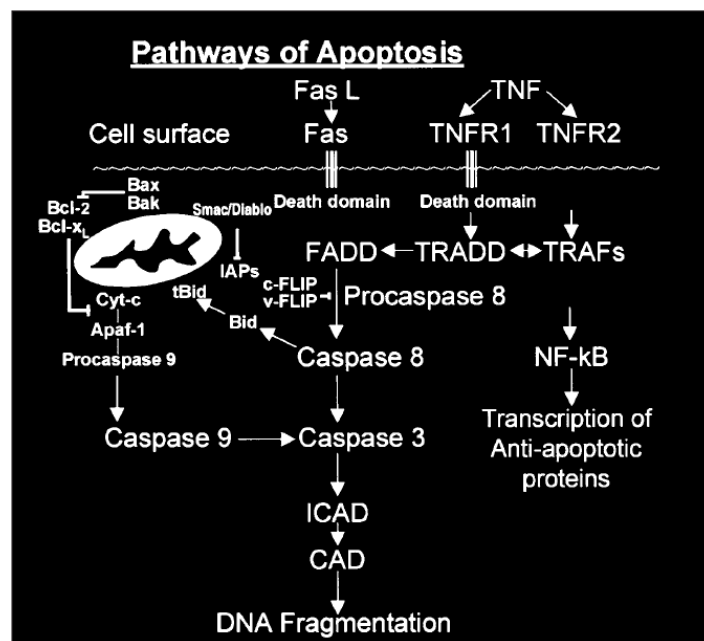


Image extraite de l'article Schultz et al, 2003.

C'est pourquoi nous avons mis en place une série d'expériences visant à suivre la dégradation des protéines inhibitrices IκB-α ainsi que la quantification d'un IAP régulé par la voie NF-κB sous l'effet d'une stimulation par le TNFα, chez le patient V-1 de la famille BM.

#### 4.2.1) Dégradation des protéines inhibitrice I $\kappa$ B- $\alpha$

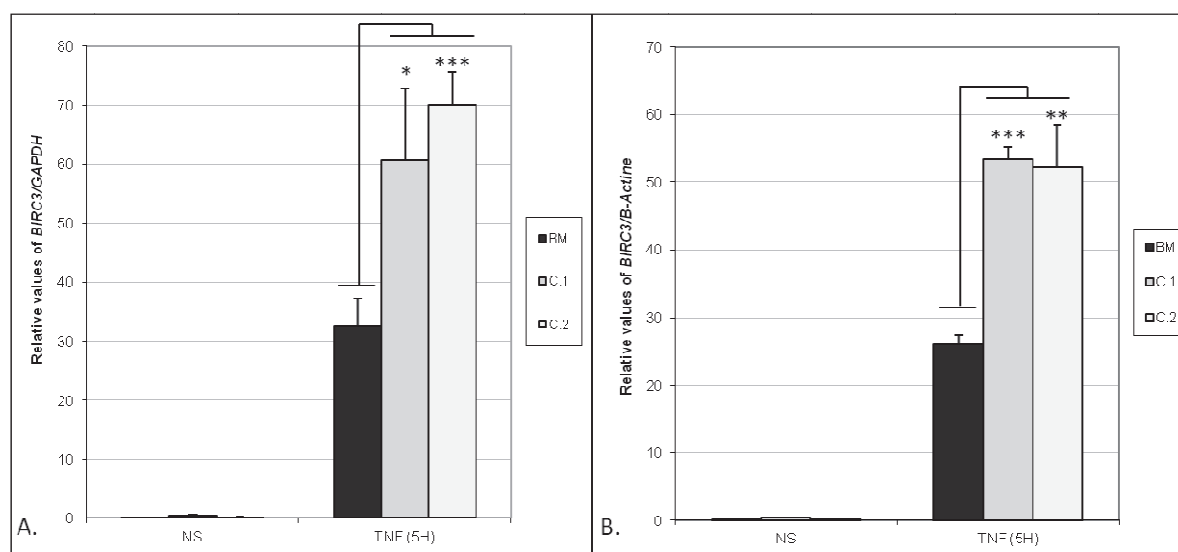
Les cellules fibroblastiques du patient BM ont été cultivées dans des puits de culture puis elles ont été soumises à une cinétique de stimulation par le TNF $\alpha$  (voir matériels et méthodes) à différents temps compris entre 0 et 60 min. Après avoir stoppé la stimulation aux différents temps, les protéines totales de chaque puits ont été extraites et soumises à un Western-blot dont l'anticorps est dirigé contre la protéine I $\kappa$ B- $\alpha$ , afin de suivre l'évolution de sa dégradation.

Les résultats, présentés en figure 3.B de l'article, ont mis en évidence un retard de la dégradation de l'inhibiteur I $\kappa$ B- $\alpha$  dans les fibroblastes du patient V.1 de la famille BM à t=10 et 20 minutes alors qu'elle est quasi complète dans les fibroblastes contrôles. Ces résultats suggèrent un retard, voire une diminution, de la transduction du signal de la voie principale NF- $\kappa$ B dans les cellules du patient BM. De plus, d'après les travaux de Hu WH et collaborateurs, TRAPPC9 est en amont des protéines I $\kappa$ B puisque qu'elle serait associée à IKK2. L'absence de la forme native de TRAPPC9 dans la voie NF- $\kappa$ B pourrait donc expliquer le retard de dégradation d'I $\kappa$ B- $\alpha$  observé au cours de ces travaux.

#### 4.2.2) Quantification du gène cible BIRC3.

Les cellules fibroblastiques du patient BM ont ensuite été soumises à une stimulation par le TNF $\alpha$  pendant 5h. Le transcrite *BIRC3*, régulé par la voie NF- $\kappa$ B en réponse au TNF $\alpha$ , a ensuite été quantifié à partir des extraits d'ARN totaux du patient BM, par RT-PCR quantitative (voir matériels et méthodes). Les résultats présentés en figures 18 montrent une réponse significativement diminuée (proche de 50%) du patient BM comparée à deux contrôles indépendants. De fait, ce résultat corrobore l'observation précédente : la mutation tronquante p.R570X de TRAPPC9 semble entraîner une perte partielle d'activité de la voie NF- $\kappa$ B.

Figure 18 : Quantification de l'ARNm BIRC3 sous stimulation au TNF $\alpha$ .



La colonne en noir représente la quantité d'ARNm BIRC3 chez le patient BM, lorsque les cellules ne sont pas stimulées (NS) et lorsqu'elles sont stimulées pendant 5 heures (TNF (5h)). Les colonnes grises claires sont les données mesurées chez deux contrôles indépendants. Cette expérience a été réalisée par rapport à deux gènes de référence : GAPDH (graphique A), et la β-actine (graphique B). La Pvalue est représentée par \* (P=0,5), \*\* (P<0,5) et \*\*\* (p<0,1). Chaque point de PCR quantitative est la moyenne d'un triplicat et les Pvalues sont établis à partir de trois expériences indépendantes.

## 5) Autres anomalies géniques de TRAPPC9

En parallèle de nos travaux, plusieurs équipes de recherche ont simultanément rapporté des anomalies de TRAPPC9 chez des familles indépendantes.

***A truncating Mutation of TRAPPC9 Is Associated With Autosomal-Recessive Intellectual Disability and Postnatal Microcephaly.*** L'équipe de Christopher Walsh a mis en évidence une mutation homozygote non-sens dans l'exon 7 (c.1423C→T [p.R475X]) de TRAPPC9, chez une famille arabo-israélienne. La famille est composée de 3 filles toutes atteintes d'une DI sévère ; d'une absence presque complète du langage ; elles présentent une microcéphalie variable à la naissance, ne sont pas autonomes mais ne montrent pas d'anomalies motrices. L'IRM réalisée en séquence T1 révèle un corps calleux fin et un volume réduit de substance blanche. Ces observations n'ont pas été décrites chez la famille BM. Cependant, aucune donnée d'analyse concernant les séquences T2 et FLAIR, n'est disponible. Le western blot réalisé à partir des fibroblastes de ces patientes utilisant un anticorps dirigé contre TRAPPC9, montre également une absence de TRAPPC9 sous sa forme native, chez les patientes (Mochida GH, *et al.* 2009).

***Identification of Mutation in TRAPPC9, Which Encodes the NIK- and IKK-β-Binding Protein, in Nonsyndromic Autosomal-Recessive Mental Retardation.*** Cet article décrit deux

familles consanguines indépendantes dans lesquelles ségrége une DI : l'une originaire du Pakistan (MR2019) et l'autre d'Iran (M001).

Deux boucles de consanguinité sont observées chez la famille MR2019, dont la descendance se compose de 11 enfants dont 5 atteints. Les enfants les plus jeunes présentent un surpoids qui tend à disparaître avec l'âge. La marche est acquise tardivement mais aucun autre signe moteur n'est rapporté. Les patientes prononcent quelques mots, ne sont pas autonomes et sont considérées avec une DI sévère. Les images cérébrales montrent une diminution de la substance blanche, un corps calleux fin et un volume réduit du cervelet. Les cliniciens ayant suivi cette famille suggèrent une dégénération progressive de la substance blanche. Cette famille est également liée à la mutation c.1423C→T [p.R475X] décrite ci-dessus.

La famille M001 est une large famille composée de 7 boucles de consanguinité. Parmi la descendance, quatre enfants présentent une DI sévère non syndromique. Une délétion homozygote de 4 pb a été révélée dans l'exon 14 de *TRAPPC9* (c.2311-2314 delTGTT) entraînant la formation d'un codon STOP prématuré (Mir A, *et al.* 2009).

***A Homozygous Deletion of 8q24.3 Including the NIBP Gene Associated With Severe Developmental Delay, Dysgenesis of the Corpus Callosum, and Dysmorphic Facial Features.***

Cette famille consanguine venant des Philippines est composée d'une fille atteinte d'une DI profonde. Les signes cliniques associés sont multiples : impossibilité de s'asseoir et de se mettre debout, une dysmorphie faciale importante avec notamment un nez large aux narines antéversées, un philtrum court, une large bouche et mâchoire, une absence de langage, une dystrophie rétinienne, des troubles auditifs et des membres inférieurs spastiques. Les images à l'IRM révèlent une sévère hypoplasie du corps calleux, un retard important de la myélinisation, un 4<sup>ème</sup> ventricule inférieur ouvert, une perte progressive du vermis et du volume cérébrale au cours de la croissance ainsi qu'une diminution importante de la substance blanche. L'étude par CGH-array a permis d'identifier une délétion homozygote au locus 8q24.3 emportant les exons 18-22 de *TRAPPC9*, présente sous forme hétérozygote chez les deux parents ; et une délétion hétérozygote du gène *SPOCK3* au locus 4q32.3, héritée de la mère. Le phénotype observé chez la patiente Philippine est beaucoup plus sévère que les phénotypes précédemment caractérisés chez les patients ayant des mutations de *TRAPPC9*. *SPOCK3* pourrait participer à l'aggravation du



phénotype, bien qu'aucun signe clinique n'ait été visible chez la mère de la patiente (Koifman A, *et al.* 2010).

**Homozygosity mapping in 64 Syrian consanguineous families with non-specific intellectual disability reveals 11 novel loci and high heterogeneity.** Un article paru récemment rapporte une mutation homozygote dans *TRAPPC9*, mise en évidence au cours de l'analyse d'études de liaison réalisées chez 64 familles consanguines d'origine Syrienne (Abou Jamra R, *et al.* 2011). Cette famille, au large pédigrée, est représentée par deux boucles de consanguinité. La première montre deux jumeaux et un frère atteint ; et la seconde, des jumelles ainsi qu'un frère malade. Les symptômes sont sévères et décrivent une marche acquise tardivement (entre 5 et 7 ans), une absence totale de langage, peu ou pas de compréhension de phrases simples, une hypotonie musculaire en période néonatale, des mouvements stéréotypiques et une microcéphalie très marquée. Enfin, un nouvel élément clinique est décrit chez cette famille syrienne : une perte des dents et une perte importante de poids est notée chez les sœurs jumelles, débutant à l'âge de 20 ans. La mutation identifiée entraîne la variation protéique p.R475X déjà identifiée précédemment.

***TRAPPC9*-related autosomal recessive intellectual disability: report of a new mutation and clinical phenotype.** Un dernier article décrit le cas d'une famille européenne originaire du sud de l'Italie, dont le couple ne présente pas de lien de parenté connu. Les parents sains ont eu deux filles présentant différents troubles : une hypotonie néonatale, une marche acquise tardivement (18 mois et 36 mois), une microcéphalie marquée (10th centile), l'une des deux sœurs a été atteinte de convulsions entre 19-26 mois, elles présentent des dysmorphies faciales (brachycéphalie, hypertélorisme, visage rond, ...), une absence de langage, un caractère amical, une obésité à l'âge de l'examen (pour l'une âgée de 5 ans (97th centile) et l'autre âgée de 3,5 ans (90th centile), et chez l'une des sœurs une clinodactylie du 5<sup>ème</sup> doigt est notée. Les IRM pratiquées en séquence T2 démontrent un volume réduit de la substance blanche, un corps calleux fin, et un volume réduit du cervelet (Marangi G, *et al.* 2012). Les deux sœurs présentent une mutation homozygote du site accepteur de l'épissage de l'exon 18 de *TRAPPC9*, c.2851-2852A→C, entraînant un saut de l'exon 18. Cette mutation n'avait encore jamais été identifiée à ce jour. Les parents sont tous deux porteurs hétérozygotes pour la mutation bien qu'ils ne soient à priori pas apparentés.

## **6) Discussion**

L'un des rôles de TRAPPC9 réside dans une fonction liée à la voie NF- $\kappa$ B bien que la fonction *in vivo* de cette protéine n'ait pas été clairement établie. TRAPPC9 possède également un domaine d'homologie avec une sous-unité du complexe TRAPP. La fonction éventuelle de TRAPPC9 au sein du complexe TRAPP est discutée en première partie de discussion. Une deuxième partie discute l'implication de TRAPPC9 dans la voie NF- $\kappa$ B et de son importance dans le SNC.

### **6.1) TRAPPC9 : une sous-unité du complexe TRAPP**

TRAPPC9 possède un domaine d'homologie avec la protéine trs120 identifiée chez la levure *Saccharomyces Cerevisiae*, comme une sous-unité du complexe TRAPP<sup>II</sup>. Les complexes TRAPP (Transport Protein Particle) sont au nombre de trois chez la levure et participent au trafic membranaire. Ils interviennent notamment dans le transport de particules du réticulum endoplasmique (RE) vers l'appareil de Golgi ; des endosomes précoces vers les endosomes tardifs et appareil de golgi ; et également des endosomes tardifs aux autophagosomes. En revanche, chez les mammifères, un seul complexe TRAPP a été identifié. Il correspond au complexe TRAPP<sup>II</sup> chez la levure par les homologies des sous-unités qui le composent. Chez les mammifères, ce complexe participe également au trafic membranaire, dans la voie sécrétrice et dans le trafic des protéines sortantes de l'appareil de Golgi (voir figure 19) (Barrowman J, *et al.* 2010).

Figure 19 : Les complexes TRAPP chez la levure et chez les mammifères

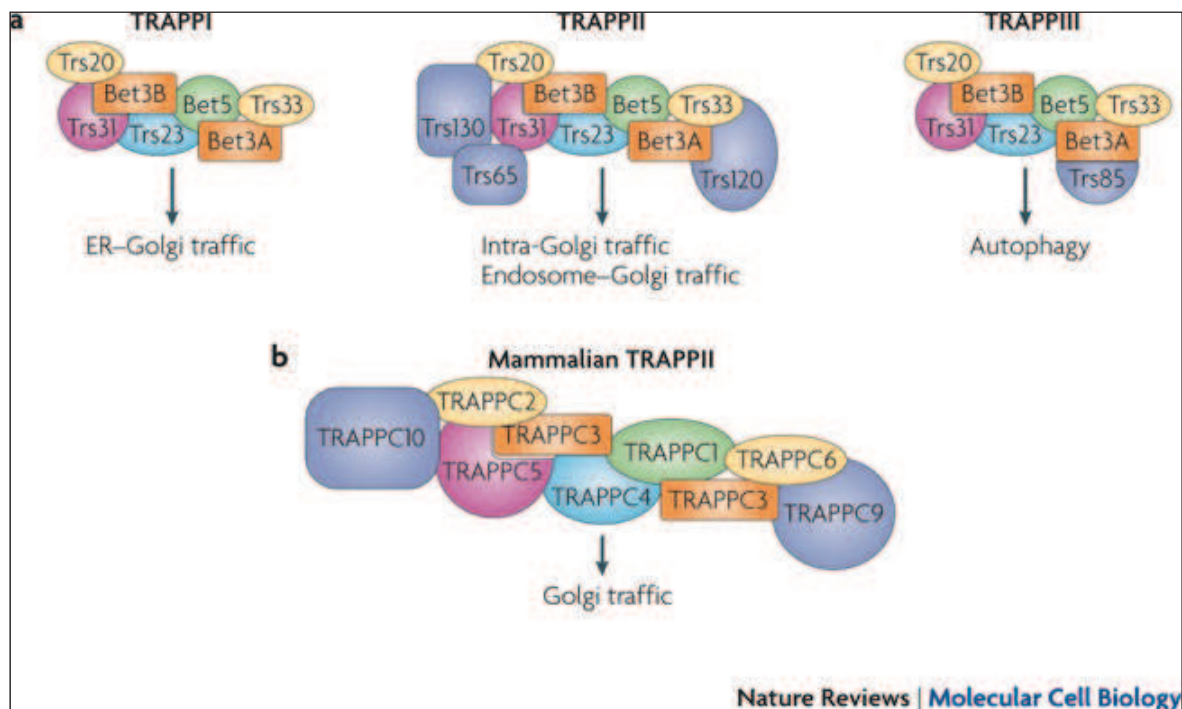


Image extraite de l'article de Barrowman J, *et al.* 2010. Partie a : complexes TRAPP identifiés chez la levure : TRAPPI, TRAPPII et TRAPPIII et leurs rôles dans le trafic cellulaire. Partie b : complexe TRAPPII, retrouvé chez les mammifères par homologie des sous-unités qui le compose, avec les sous-unités du complexe TRAPPII présent chez la levure.

De façon intéressante, plusieurs mutations responsables de maladies génétiques humaines ont été identifiées dans certaines sous-unités du complexe TRAPPII. Des mutations dans la sous unité TRAPPC2 (l'orthologue de la sous-unité Trs20) sont à l'origine d'une dysplasie spondiloepiphysale (MIM 313400). Ce trouble est lié au chromosome X et entraîne l'apparition d'une petite taille et d'anomalies osseuses responsables d'ostéo-arthrite (Gedeon AK, *et al.* 1999). Des mutations caractérisées au sein de la sous-unité TRAPPC6A (homologue de la sous-unité Trs33) conduisent à un mosaïcisme de dépigmentation de la peau (Gwynn B, *et al.* 2006). Enfin, le gène codant la sous-unité TRAPPC10 (Trs130) est un gène candidat de l'holoprosencephalie avec épilepsie, mis en évidence par des études de liaison (Yamakawa K, *et al.* 1995). De plus, TRAPPC10 est capable d'interagir avec la protéine Syndecan-2 (SDC2). SDC2 a été identifiée au cours de l'étude par CGH-array d'une translocation t(X;8)(p22.13;q22.1) chez une patiente atteinte d'autisme associé à des exostoses (Ishikawa-Brush Y, *et al.* 1997). La sous-unité TRAPPC10 pourrait donc avoir un rôle également dans le SNC.

Aucun lien n'a cependant été établi entre le complexe TRAPP II et la voie NF- $\kappa$ B. L'orthologue Trs120, chez la levure, est indispensable pour sa survie cellulaire (Barrowman J, *et al.* 2010) tandis que l'absence de TRAPPC9 chez l'Homme ne conduit pas à un phénotype létal. Sa fonction semble être principalement localisée au niveau du SNC de part le phénotype observé chez la famille BM, restreint au SNC. L'absence de TRAPPC9 dans les cellules HEK293T montre une réelle diminution de l'activité de la voie NF- $\kappa$ B. En revanche, aucune expérience n'a mis en évidence d'anomalie du trafic membranaire lié à un défaut du complexe TRAPP II, ni son impact sur l'assemblage de ce complexe. Une hypothèse stipule que TRAPPC9 aurait pu acquérir de nouvelles fonctions au cours de l'évolution : elle pourrait participer au trafic vésiculaire par le biais du complexe TRAPP II et participer à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B dans le SNC. Cette hypothèse est soutenue entre autre, par le fait que la voie NF- $\kappa$ B soit complètement absente chez la levure et ait été acquis au cours de l'évolution dans les organismes supérieurs (Barrowman J, *et al.* 2010). En revanche, le complexe TRAPP II, chez les mammifères, semble avoir perdu de son importance au cours de l'évolution. Cette idée est également soutenue par le fait que deux complexes TRAPP (TRAPP I et TRAPP III) soient absents chez les mammifères, ce qui sous entend que le trafic cellulaire soit assuré par d'autres complexes protéiques (Barrowman J, *et al.* 2010).

Néanmoins, il serait intéressant de tester l'interaction protéique de TRAPPC9 avec les autres sous-unités du complexe TRAPP II. Il faudrait ensuite pouvoir déterminer les protéines véhiculées par le complexe TRAPP dans les cellules humaines, et étudier l'impact de l'absence de TRAPPC9 sur la localisation des protéines transportées par ce complexe TRAPP II.

## 6.2) TRAPPC9, voies NF- $\kappa$ B et SNC

L'équipe de Wu a démontré l'implication de TRAPPC9 dans la voie NF- $\kappa$ B comme un activateur de la voie, bien qu'il ne soit pas essentiel à son fonctionnement. Nous avons également confirmé, grâce aux cellules de patients déficientes pour TRAPPC9 sous sa forme native, qu'un retard de la voie NF- $\kappa$ B est constaté lorsque celle-ci est activée.

Comme nous l'avons mentionné, la voie NF- $\kappa$ B est impliquée dans de nombreux processus biologiques. Mais, de nombreuses études chez la souris ou sur des modèles cellulaires soutiennent l'hypothèse selon laquelle la voie NF- $\kappa$ B semble jouer un rôle crucial dans le SNC notamment au cours du développement, et dans lequel TRAPPC9 pourrait avoir une importance capitale.

En effet, il a été démontré que la stimulation des cellules souches neurales humaines par le TNF $\alpha$  induit leur prolifération, laquelle est associée à une augmentation drastique des protéines activatrices de la voie NF- $\kappa$ B : IKK1, IKK2, cycline D1, ainsi qu'à une élévation de l'activité transcriptionnelle de la voie NF- $\kappa$ B. Les deux sources principales de cellules souches du cerveau adulte se situent au niveau de la zone subgranulaire de l'hippocampe et de la zone subventriculaire. L'hippocampe est, par ailleurs, une zone cérébrale connue pour son rôle dans la plasticité synaptique. Ces sources de cellules souches cérébrales interviennent également dans une forme de plasticité structurale et suggère la mise en place d'une neurogénèse au cours de la vie adulte. La voie NF- $\kappa$ B pourrait donc participer dans la mise en place de ces processus cérébraux (Widera D, *et al.* 2006).

Comme cela a été évoqué dans la description des voies NF- $\kappa$ B (sous partie 3.1), le phénotype des souris dépourvues de la protéine p65 est létal embryonnaire. En revanche, les souris n'exprimant ni le facteur de transcription p65 ni le *Tnfr1*, sont viables mais elles ont des anomalies de la mémoire spatiale notées au cours du test du radial arm maze/labyrinthe à bras radiaux (Rosenfeld ME, *et al.* 2000 ; Meffert MK, *et al.* 2003). Ces observations suggèrent donc le rôle de la voie NF- $\kappa$ B dans la mémoire spatiale. Les souris double KO (knock out) p65/TNFR1 sont viables car en l'absence du récepteur principal du TNF $\alpha$  les cellules de l'organisme sont moins soumises à l'apoptose induite par le TNF $\alpha$ , au cours du développement.

Par ailleurs, il a été mis en évidence que le développement embryonnaire des souris IKK1<sup>-/-</sup>/IKK2<sup>-/-</sup> ne dépassait pas le stade E12. Cette létalité embryonnaire précoce serait induite par une activité apoptotique accrue au niveau des cellules du tube neural et de la moelle épinière. Ces observations évoquent le rôle important de la voie NF- $\kappa$ B dans les mécanismes de neuroprotection au cours du développement embryonnaire (Li Q, *et al.* 2000).

D'autre part, les souris transgéniques tTA/I $\kappa$ B $\alpha$ -AA dont l'activité de la voie principale NF- $\kappa$ B est diminuée grâce à l'expression d'un super-répresseur I $\kappa$ B $\alpha$  (protéine inhibitrice de la voie canonique NF- $\kappa$ B) sont particulièrement vulnérables aux attaques neurotoxiques. L'activité résiduelle de la voie principale NF- $\kappa$ B serait insuffisante à la protection des neurones corticaux au stade embryonnaire E16, lesquels dégènèrent par un mécanisme apoptotique (Bhakar AL, *et al.* 2002 ; Fridmacher V, *et al.* 2003). De plus, une diminution de la transmission synaptique au niveau de l'hippocampe ainsi que de la mémoire spatiale et un retard de la Long Term Potentiation et Depression (LTP, LTD) sont également observés chez cette lignée de souris (Kaltschmidt B, *et al.* 2006).

Enfin, les souris invalidées pour le facteur de transcription c-REL montrent un phénotype similaire associé à des anomalies du comportement : anxiété, peur et hyperactivité. L'absence de c-REL chez la souris induit également un effet cytotoxique des neurones de l'hippocampe suite à une stimulation à l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) ; interleukine qui en état physiologique promeut la survie neuronale (Memet S. 2006 ; Pizzi M, *et al.* 2002).

Ces résultats suggèrent le rôle majeur de la voie NF- $\kappa$ B dans les processus de prolifération de cellules souches neuronales, de plasticité synaptique, comportementaux (système limbique), d'apprentissage, de consolidation de la mémoire et dans les mécanismes de neuroprotection face au stress cellulaire et aux mécanismes apoptotiques. Un rôle similaire de la voie NF- $\kappa$ B est donc envisageable chez l'Homme et des anomalies génétiques ciblant l'un ou plusieurs des acteurs de cette voie (comme TRAPPC9) pourraient conduire à des anomalies du SNC et être à l'origine d'une DI.

## **7) Conclusions et perspective**

### **7.1) Conclusions de l'étude**

TRAPPC9 est le second gène associé à des DI-AR non spécifiques, identifié chez plusieurs familles d'origines géographiques différentes, après TUSC3. Les mutations caractérisées dans ce gène sont également différentes mais elles conduisent toutes à l'apparition d'un codon STOP prématuré. Les patients présentent tous une DI sévère, ils sont capables de prononcer quelques

mots, ne sont pas autonomes dans la vie de tous les jours, semblent présenter une obésité tronculaire dans la jeune enfance qui tend à disparaître avec la croissance. Ils ont une microcéphalie postnatale variable, une marche acquise tardivement mais ne présentent aucune autre anomalie motrice. Une des familles décrit une perte des dents et une perte de poids notable à l'âge de 20 ans. Ce phénotype qui pourtant semblait non spécifique trouve des points cliniques similaires entre toutes les familles et pourrait orienter sur un syndrome reconnaissable. C'est ce que suggère l'équipe de Morangi G (2012) par le recoupement réalisé entre les différentes familles touchées par des anomalies de TRAPPC9, et présenté en table 9 ci-dessous. L'ensemble des mutations décrites sont représentées en figure 20.

Table 9 : Résumé des signes cliniques observés chez les patients mutés pour TRAPPC9

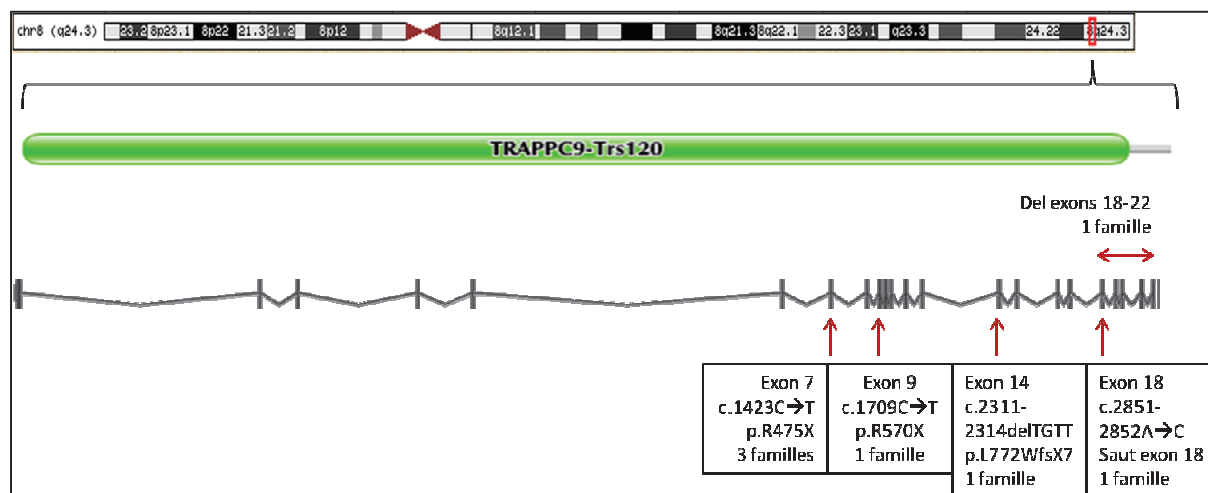
<b>Table 1 : summary of the clinical signs associated with TRAPPC9-related AR-ID</b>					
<i>Clinical sign</i>	<i>Literature patients</i>			<i>Total</i>	<i>%</i>
	<i>(22/5 kindreds)</i>	<i>Patient 1</i>	<i>Patient 2</i>		
Microcephaly	17/18	+	+	19/20	95
Obesity	4/6	+	+	6/8	75
<i>Brain abnormalities</i>	<i>7/7</i>	<i>+</i>	<i>+</i>	<i>9/9</i>	<i>100</i>
Thin corpus callosum	5	+	+	7/9	
Cerebellar hypoplasia	5	+	+	7/9	
Cerebral white/gray matter hypoplasia	5	+	+	7/9	
Multifocal white matter lesions	5	+	+	7/9	
Peculiar facial appearance <sup>a</sup>	9/18?	+	+		
Epilepsy	2/18	+	-	3/20	15

Abbreviations: Ar, autosomal recessive; ID, intellectual disability. <sup>a</sup>Insufficient literature data.

Tableau établi par l'équipe de Marangi G, *et al.* 2012

Les différentes images obtenues par IRM montrent des anomalies de la substance blanche et un corps calleux qui apparaît fin. Les séquences à l'IRM établies pour la famille BM montrent une dissociation T2/FLAIR retrouvée chez deux enfants de la famille. Cependant, les séquences FLAIR ne sont pas présentées pour les autres familles touchées par les anomalies de TRAPPC9. Il pourrait être intéressant de vérifier chez ces familles, si la séquence FLAIR montre des anomalies de la substance blanche non visibles sur la séquence T2, afin d'établir ou non la spécificité de ce signe clinique.

Figure 20 : Mutations de TRAPPC9



Le carré rouge sur le chromosome 8 montre la localisation génomique de *TRAPPC9* (USCS) ; le schéma représentant le domaine Trs120 (homologue de la sous-unité Trs120 chez la levure *S.Cerevisiae*) est extrait de la fiche descriptive de *TRAPPC9* sur le site Pfam ; le gène schématisé de *TRAPPC9* montrant ses 23 exons a été obtenu à partir du site Ensembl. Chacune des mutations de *TRAPPC9* rapportées à ce jour (Juin 2012) sont indiquées sur le schéma par des flèches rouges.

## 7.2) TRAPPC9 spécifique du SNC ?

TRAPPC9 participe à des voies de signalisation vitales pour l'organisme. Or les patients ayant des anomalies de ce gène présentent un phénotype restreint au SNC. Nous supposons donc que TRAPPC9 a un rôle primordial dans le SNC au cours du développement et qu'il existe des compensations de sa fonction dans le système périphérique de l'organisme.

D'autre part, les différentes images à l'IRM semblent démontrer l'importance de TRAPPC9 dans la formation de la substance blanche. La substance blanche apparaît plus claire sur des coupes tissulaires car elle est constituée majoritairement de neurones recouverts de myéline. La myéline est formée principalement de lipides et joue un rôle indispensable dans la transmission des messages nerveux conduits par les neurones du SNC, mais également du système nerveux périphérique (SNP).

Ainsi, l'anomalie de la substance blanche observée chez les patients présentant des mutations de *TRAPPC9*, suggère un défaut de la myéline restreint au SNC et l'implication de la voie NF-κB dans cette fonction.



### 7.3) Perspectives

#### *7.3.1) Tests fonctionnels complémentaires de la voie NF- $\kappa$ B.*

Les différents résultats de ces travaux soulignent un défaut de la voie principale NF- $\kappa$ B, lorsque TRAPPC9 est défectueuse voire absente. Toutefois, TRAPPC9 serait également capable de lier la protéine NIK, spécifique de la voie alternative NF- $\kappa$ B. Ainsi, ces résultats pourraient être complétés par des expériences fonctionnelles afin d'évaluer si un défaut de la voie alternative est également présent chez les patients BM (et autres patients mutés pour *TRAPPC9*).

Différentes expériences sur la voie alternative NF- $\kappa$ B pourraient être réalisées. Nous pourrions envisager de sélectionner des ligands spécifiques de la voie alternative ainsi que des gènes cibles, transcrits par les dimères NF- $\kappa$ B de cette voie. L'activité transcriptionnelle de la voie alternative pourrait être testée par quantification des gènes cibles transcrits suite à cette stimulation spécifique.

Il serait également intéressant d'identifier des gènes cibles qui ne sont pas atteints par l'absence de TRAPPC9 dans les cellules humaines. Ce pourrait être les gènes du système immunitaire puisque aucun des patients ne semblent présenter de déficience de l'immunité, or la voie NF- $\kappa$ B joue un rôle important dans le système immunitaire. TRAPPC9 aurait donc un rôle spécifique associée à certains stimuli du SNC.

D'autre part, des expériences d'immunocytochimie (IC) peuvent être réalisées dans le but de déceler des anomalies des différentes voies NF- $\kappa$ B. Il serait intéressant de visualiser le taux de facteurs de transcription présents dans le cytoplasme et dans le noyau cellulaire au cours d'une cinétique de stimulation par différents ligands (spécifiques de la voie principale ou alternative). De plus, les anticorps primaires peuvent être dirigés contre un facteur de transcription de la voie NF- $\kappa$ B principale (p65/Rel A) ou contre un facteur de transcription spécifique de la voie alternative (p52) afin d'étudier les deux voies séparément.

#### *7.3.2) Test de sensibilité à l'apoptose.*

Nous avons évoqué l'importance des mécanismes apoptotiques au cours du développement cérébral. En effet, de nombreuses études décrivent le rôle capital et essentiel de l'apoptose durant la mise en place du SNC. Au cours de l'embryogénèse, près de 50% des

neurones indifférenciés et doués de capacités prolifératives sont soumis à une mort cellulaire programmée : l'apoptose. Ce processus est primordial pour permettre la formation des connexions neurales (Yeo W, *et al.* 2004). De nombreux modèles animaux ont été générés dans le but d'étudier l'importance de l'apoptose au cours de la mise en place du SNC. La souris déficiente pour *Cpp32* (orthologue du gène *CASP3* humain, MIM 600636) montre des anomalies morphologiques du SNC : une hyperplasie cérébrale et une désorganisation de la mise en place des cellules du SNC. Les souris décèdent entre la 1<sup>ère</sup> et la 3<sup>ème</sup> semaine de vie (Kuida K, *et al.* 1996). De même, les souris dont le gène *Casp9* a été invalidé, entraînant une perte d'activité de la voie intrinsèque apoptotique (voie Apaf1/Caspase 9/Caspase 3), décèdent pour la plupart *in utero* de malformations cérébrales importantes. Les études histologiques révèlent un défaut du tube neural qui reste ouvert, une expansion du mésencéphale, une expansion proéminente des tissus cérébraux créant des exencéphalies, une masse de l'encéphale supérieure à la normale et irrégulière, une prolifération importante des cellules composant le prosencéphale, une sténose des ventricules cérébraux, ... Au vu des autres tissus de l'organisme qui semblent nettement moins atteints, la caspase 9 pourrait être spécifique de la régulation des cellules progénitrices neurales (Kuida K, *et al.* 1998).

Nous avons démontré au cours de cette étude, que les cellules de patients déficientes pour *TRAPPC9* ont un défaut de réponse au TNF $\alpha$ . Ce ligand est impliqué dans les processus liés à l'apoptose. Il existe un équilibre de réponse au sein de chaque cellule entre la voie pro-apoptotique et la voie anti-apoptotique. Or, le phénotype des patients BM pourrait orienter sur un déséquilibre de la balance entre ces deux voies de l'apoptose au niveau du SNC. Les conséquences d'un tel défaut entraîneraient une apoptose plus importante chez les patients atteints d'anomalies de *TRAPPC9*. Ainsi, un déséquilibre de l'apoptose au cours de la vie fœtale ou pendant la petite enfance pourrait avoir de lourdes conséquences sur la plasticité cérébrale. L'apoptose sur les cellules de patients peut être étudiée par le test TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling). Cela consiste à marquer les extrémités 3'OH libres de l'ADN lorsque celui-ci est dégradé par des nucléases au cours de l'apoptose. Ce marquage spécifique permet alors de quantifier les cellules apoptotiques chez le patient comparé à un contrôle lorsque celles-ci sont soumises à un stress extérieur (ex : le TNF $\alpha$ ).

### *7.3.3) Recherche de patients candidats.*

Afin de vérifier nos hypothèses, ainsi que d'évaluer le pourcentage des patients atteints par des anomalies géniques de *TRAPPC9*, nous avons entrepris un recrutement de patients candidats. Les cliniciens impliqués dans ces recherches se sont basés sur les signes cliniques établis chez les patients mutés pour *TRAPPC9*, en particulier les anomalies de substance blanche et la dissociation observée entre les images obtenues avec les séquences T2/FLAIR. Les résultats de cette étude sont présentés en partie 2 de ce manuscrit.

ARTICLE 2

# Combination of Linkage Mapping and Microarray-Expression Analysis Identifies NF- $\kappa$ B Signaling Defect as a Cause of Autosomal-Recessive Mental Retardation

Orianne Philippe,<sup>1</sup> Marlène Rio,<sup>1</sup> Astrid Carioux,<sup>2</sup> Jean-Marc Plaza,<sup>3</sup> Philippe Guigue,<sup>1</sup> Florence Molinari,<sup>1</sup> Nathalie Boddaert,<sup>1</sup> Christine Bole-Feysot,<sup>2</sup> Patrick Nitschke,<sup>3</sup> Asma Smahi,<sup>1</sup> Arnold Munnich,<sup>1</sup> and Laurence Colleaux<sup>1,\*</sup>

Autosomal-recessive inheritance accounts for nearly 25% of nonsyndromic mental retardation (MR), but the extreme heterogeneity of such conditions markedly hampers gene identification. Combining autozygosity mapping and RNA expression profiling in a consanguineous Tunisian family of three MR children with mild microcephaly and white-matter abnormalities identified the *TRAPPC9* gene, which encodes a NF- $\kappa$ B-inducing kinase (NIK) and I $\kappa$ B kinase complex  $\beta$  (IKK- $\beta$ ) binding protein, as a likely candidate. Sequencing analysis revealed a nonsense variant (c.1708C>T [p.R570X]) within exon 9 of this gene that is responsible for an undetectable level of TRAPPC9 protein in patient skin fibroblasts. Moreover, TNF- $\alpha$  stimulation assays showed a defect in I $\kappa$ B $\alpha$  degradation, suggesting impaired NF- $\kappa$ B signaling in patient cells. This study provides evidence of an NF- $\kappa$ B signaling defect in isolated MR.

Mental retardation (MR) is characterized by a broad range of cognitive-function deficits that significantly hamper adaptive capacities required for daily living, communication, social interaction and integration, self-direction, and work.<sup>1</sup> It is the most frequent handicap in children and young adults, affecting 2%–3% of the general population.<sup>2</sup> The severity of MR is commonly classified on the basis of the intelligence quotient (IQ), although other criteria have also been used. With the assumption of a population mean of 100 and a standard deviation of 15, MR is usually classified as “mild” when the IQ value ranges between 50 and 70 and as “severe” when the IQ value is below 50. Finally, MR is also subdivided into syndromic and nonsyndromic forms, depending on whether additional abnormalities are found on physical examination, laboratory investigation, or brain imaging.

These definitions hide a much more complex situation, and little is known about the biological bases of MR. Indeed, despite recent advances in cytogenetic and molecular genetic technologies, the cause of the mental handicap remains unexplained in 40% of the cases, leaving families with neither accurate diagnosis nor genetic counseling. Understanding the biological bases of these disorders is therefore a major challenge for the next years.

An autosomal-recessive mode of inheritance accounts for largely 25% of unexplained MR. Although X-linked MR has been extensively studied in the last decade, very little is known about the autosomal-recessive form of MR, which is far more common than X-linked forms. The broad genetic heterogeneity of autosomal-recessive MR (ARMR) has prevented researchers from pooling families, and the scarcity of large pedigrees has hitherto hampered the identification of disease genes. Yet, autozygosity mapping in

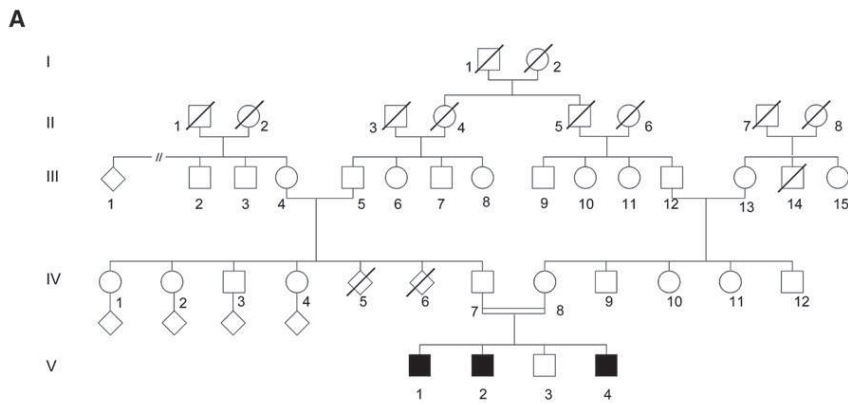
large consanguineous families has led to the identification of five genes responsible for nonsyndromic ARMR: *PRSS12*, on chromosome 4q26 (MIM 606709);<sup>3</sup> *CRBN*, on chromosome 3p26 (MIM 607417);<sup>4</sup> *CC2D1A*, on chromosome 19p13.12 (MIM 608443);<sup>5</sup> *GRIK2*, on chromosome 6q21 (MIM 611092);<sup>6</sup> and *TUSC3*, on chromosome 8p22 (MIM 611093).<sup>7,8</sup> Moreover, ten loci have been mapped, but each of these genes or loci accounts for only one or very few families, suggesting that many disease-causing genes remain to be characterized.<sup>9,10</sup>

We ascertained a sibship of three affected boys and one healthy boy born to healthy Tunisian parents who are first cousins (Figure 1A). Institutional ethical approval for research and written consent were obtained for all participants in the study. All patients were born within normal growth parameters after an unremarkable pregnancy and delivery. The neonatal period was uncomplicated. Developmental delay became obvious by the end of the first year, and a significant speech delay was noted thereafter. The older affected brother, patient V-1, was first examined at the age of 10 yrs. He was a friendly, severely mentally retarded patient with a developmental IQ estimated by standardized tests to be 34. Physical examination revealed a mild microcephaly (occipitofrontal circumference [OFC] 49.5 cm,  $-2$  standard deviations [SD]), truncular obesity, hypertelorism, short neck, and prominent upper central incisors. At 19 yrs of age, his height was 167 cm ( $-1$  SD) and OFC was 53 cm ( $-2$  SD). He showed mildly dysmorphic facial features, with short and smooth philtrum. Chromosome analysis, array-CGH testing at 1 Mb resolution, metabolic screening, and molecular testing for fragile X and FRAXE syndromes were all normal. Brain MRI was performed and showed unusual white-matter

<sup>1</sup>INSERM U781, Département de Génétique and Département de Radiologie Pédiatrique, Université Paris Descartes, Hôpital Necker-Enfants Malades, 75015 Paris, France; <sup>2</sup>Plateforme de Génomique de la Fondation Imagine, 75015 Paris, France; <sup>3</sup>Plateforme de Bioinformatique de l'Université Paris Descartes, 75015 Paris, France

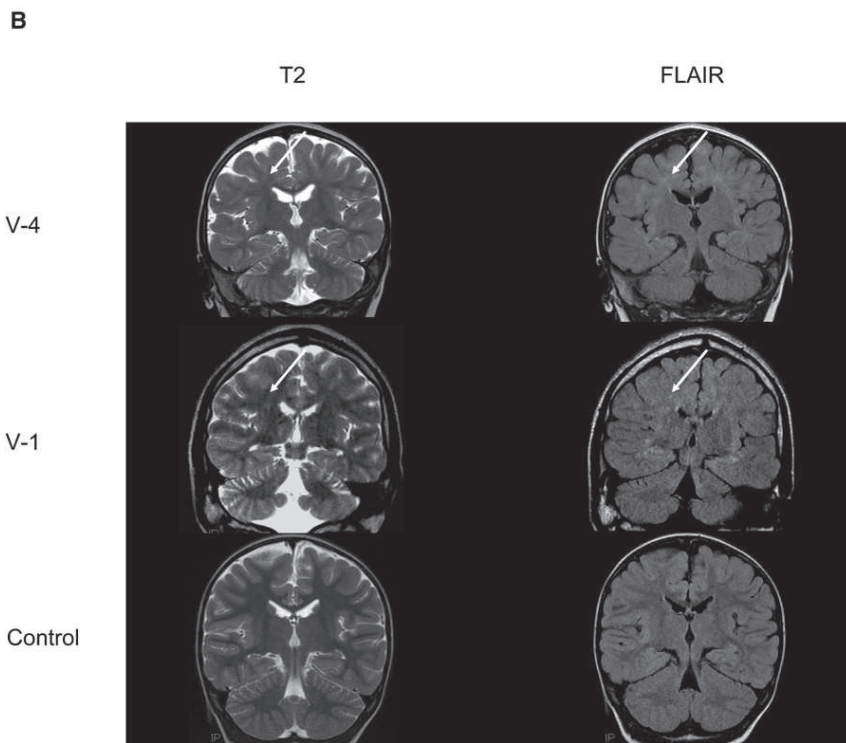
\*Correspondence: laurence.colleaux@inserm.fr

DOI 10.1016/j.ajhg.2009.11.007. ©2009 by The American Society of Human Genetics. All rights reserved.



**Figure 1. Pedigree of the Family and Brain MRI Features**

(A) Pedigree of the family. Shaded symbols indicate individuals presenting with MR. (B) Discordance between T2 and FLAIR sequences in patients V-1 and V-4. Coronal T2 weighted image (left) and coronal FLAIR image (right) of patient V-4 (upper panels) and patient V-1 (middle panel) at the level of the third ventricle demonstrate normal myelination on T2 sequence. By contrast, FLAIR sequence shows important white-matter abnormalities (white arrow) at the sus tentorial level compared to a normal control (lower panels).



abnormalities with discordance between T2 and FLAIR sequences (Figure 1B). Indeed, whereas normal myelination was observed on T2 sequence, FLAIR sequence showed important white-matter abnormalities when compared to a control. Patient V-2 had surgery for unilateral labial cleft. He walked at 17 mo of age. His speech was delayed, his first words being spoken at age 3. At the age of 7 yrs, his height was 122 cm (+0.5 SD), weight was 30 kg (+3 SD), and OFC was 49 cm (−1 SD). He presented with truncular obesity and mildly dysmorphic features including hypotelorism, short neck, and prominent upper central incisors. Happy disposition and hyperactivity were noted. When examined at age 15, he was observed to be a friendly, moderately mentally retarded patient with a slender posture. His height was 172 cm (+1 SD), weight was 50 kg (−1 SD), and OFC was 50 cm (< −3 SD). He had mildly dysmorphic facial features, with short and smooth philtrum and long and thin fingers.

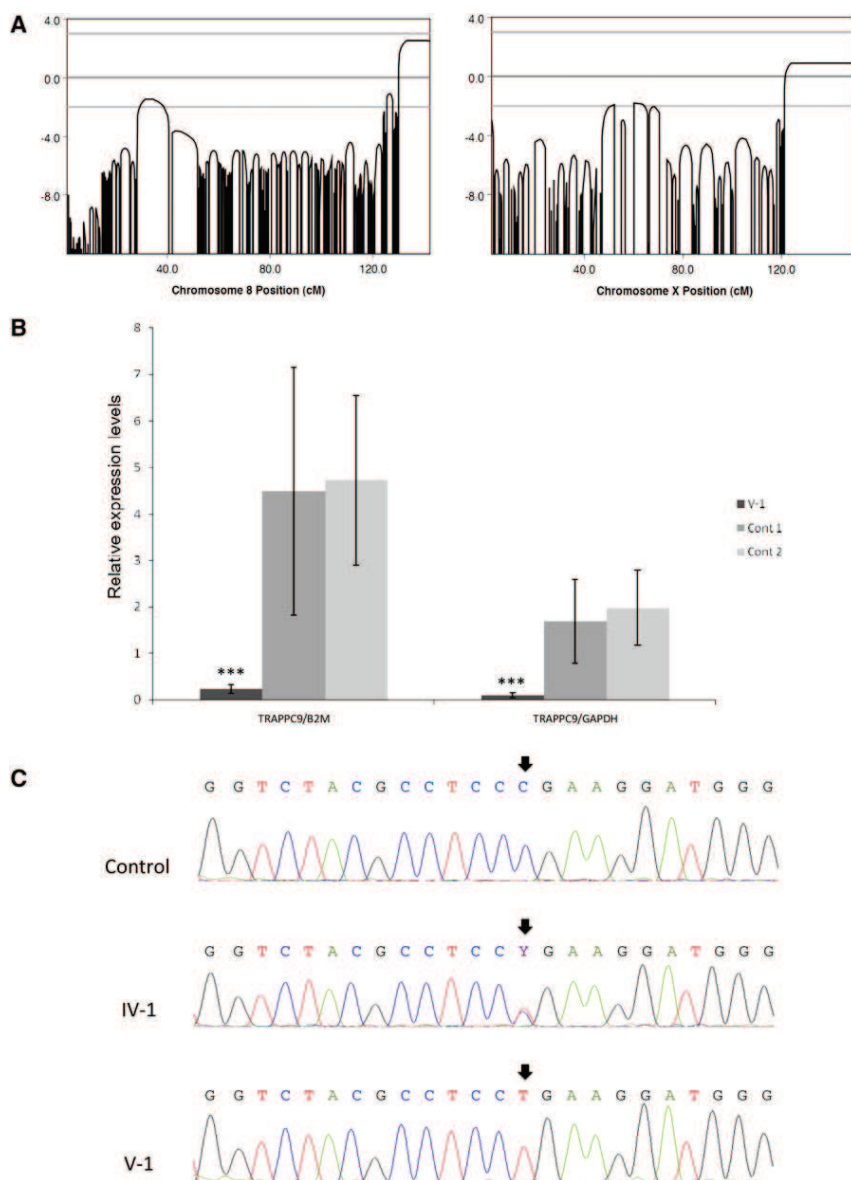
He understood simple commands and concrete tasks and communicated verbally, with a low vocabulary and simple sentence structures. The third affected child (patient V-4) had global developmental delay but was less severely affected than his brothers. When examined at the age of 4 yrs, he was able to communicate verbally with about twenty words, understood commands, and was able to performed simple tasks. A hyperactive behavior was noted. His height was 102 cm, weight was 22 kg (with truncular obesity), and OFC was 48.5 cm (−2 SD). Brain MRI showed white-matter abnormalities similar to those observed for patient V-1, with discordance between T2 and FLAIR sequences (Figure 1B). Finally, we investigated the X chromosome inactivation profile in the mother by methyl-sensitive PCR analysis and

observed that she showed a random X chromosome inactivation profile (58/42).

In conclusion, MR associated with mild microcephaly, myelination defect, and truncular obesity in the first year were consistent features in the three affected sibs.

Blood samples were collected from all affected and unaffected sibs and both parents, and skin fibroblasts were cultured from patient V-1. For genome-wide autozygosity screen, genomic DNA was extracted by standard methods and analyzed with the Affymetrix GeneChip Mapping 10K Array. Multipoint linkage analysis resulted in two significant linkage peaks on chromosomes 8 and X, respectively (Figure 2A). Further genotype and haplotype analyses confirmed homozygosity by descent and defined a 12 Mb critical interval between markers rs2395855 and rs1397380 on 8q24 (LOD scores 3.13) and a 30 Mb critical interval between markers rs982833 and rs750841 on Xq25-q28 (LOD scores 0.9) (Figure S1, available online).





**Figure 2. Genetic Analysis of the Family**  
(A) Results of the linkage analysis with the Merlin software. The y axis represents the LOD score and the x axis represents the genetic distance.

(B) Quantitative PCR analysis of *TRAPPC9* mRNA. *TRAPPC9* expression in fibroblast cells from two controls (black and gray bars) and patient V-1 is shown. Data are normalized to beta2 microglobuline (*B2M*) and Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*). Means  $\pm$  standard deviation are given (n = 5 independent experiments). \*\*\*Significance of difference with control values (Student's test), p < 0.01.

(C) Electrophoregrams illustrating the c.1708C>T variant in the *TRAPPC9* gene. Data are shown for a control, an affected child (V-1), and a healthy heterozygote parent (IV-1). The position of the single-nucleotide change is shown by a black arrow.

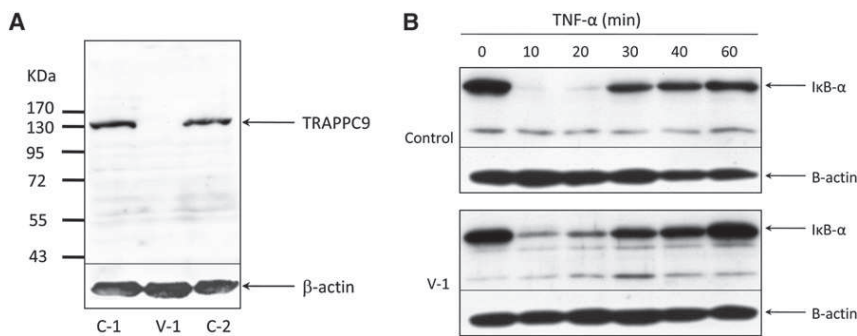
ray averaging (gcrma), and tests of significance were conducted with the local pooled error (LPE) test.<sup>11</sup>

Analysis was confined to the probe sets mapping to the two regions defined by genetic linkage analyses, and *TRAPPC9* (also known as *NIBP*, *NIK*, and *IKK- $\beta$  Binding Protein*, MIM 611966), located on chromosome 8q24, appeared as a good candidate. Indeed, it was significantly downregulated (40%) in the proband compared to controls (p =  $4.0 \times 10^{-14}$ ). A 90% *TRAPPC9* mRNA decay was confirmed by quantitative RT-PCR (Figure 2B), and subsequent mutational analyses identified a homozygote nonsense variant (c.1708C>T, p.R570X) within exon 9 of the gene (Figure 2C). This

No other genomic regions were consistent with linkage. Altogether these two regions encompassed 172 known genes (NCBI build 36.3), the majority of which are expressed in the brain. The coding sequence of 14 candidate genes on 8q24 and three candidate genes on Xq25-q28 (Table S1) was searched for variants at DNA and/or RNA levels, but no causative mutation was identified in any of these genes. Thus, to prioritize the remaining candidate genes for sequencing, we hypothesized that the disease-gene transcript could be downregulated in affected subjects. RNA was extracted from skin fibroblasts derived from patient V-1 and from three healthy gender-matched control fibroblasts and analyzed with Affymetrix U133 Plus2 array. Microarray analysis was performed with bioconductor packages for the R programming environment. Background subtraction, normalization, and probe summarization were done with GeneChip robust multiar-

variant cosegregated with the disease and was not found in 1120 control chromosomes, including 196 chromosomes from individuals of Tunisian origin, supporting the hypothesis that the p.R570X change is the disease-causing mutation. Homozygosity at the *TRAPPC9* locus was tested by genotyping with Affymetrix GeneChip Mapping 250K array in thirteen independent consanguineous MR patients. However, no patient was found to be compatible with linkage to this locus.

For the evaluation of the consequence of the c.1708C>T mutation on protein expression, immunoblots were then prepared with fibroblast cell lysates from the affected sib and two healthy controls and probed with a polyclonal anti-*TRAPPC9* antibody raised against the complete protein. Whereas *TRAPPC9* was clearly detectable in cell lysates from healthy controls as a single band, neither normal nor shortened protein was found in fibroblast cell



**Figure 3. Functional Consequences of the TRAPPC9 Mutation**

(A) Immunoblot analysis of TRAPPC9 protein. Lysates from controls (C1-2) and patient (V-1) fibroblasts were subjected to immunoblotting with a polyclonal anti- $\beta$ -actin antibody as a loading control (lower panel) and with a rabbit polyclonal anti-TRAPPC9 antibody (upper panel). Molecular weights are indicated on the left. TRAPPC9, shown as a 140 kD band in controls, is absent in the patient.

(B) Time-course analysis of TNF- $\alpha$ -induced I $\kappa$ B- $\alpha$  degradation as detected by immunoblot. Lysates were subjected to immunoblotting with a rabbit polyclonal anti-I $\kappa$ B- $\alpha$  antibody (upper panel) and with a rabbit polyclonal anti- $\beta$ -actin antibody (lower panel). I $\kappa$ B- $\alpha$  is shown as a 37 kD band. Results from one representative experiment are shown.

blotting with a polyclonal anti- $\beta$ -actin antibody as a loading control (lower panel) and with a rabbit polyclonal anti-I $\kappa$ B- $\alpha$  antibody (upper panel). I $\kappa$ B- $\alpha$  is shown as a 37 kD band. Results from one representative experiment are shown.

extracts from the patient (Figure 3A). Taken together, these results suggest that the mutation causes a nonsense-mediated mRNA decay.

TRAPPC9 has been originally identified as a protein that interacts with the nuclear factor kappaB (NF- $\kappa$ B)-inducing kinase (NIK) and I $\kappa$ B kinase complex  $\beta$  (IKK- $\beta$ ).<sup>12</sup> The NF- $\kappa$ B transcription factor (TF) is a ubiquitously expressed dimeric molecule that regulates the expression of a variety of genes and plays a key role in a number of cellular processes such as innate and adaptive immunity, cellular proliferation, apoptosis, and development. In mammals, the NF- $\kappa$ B family is composed of five related transcription factors: p50, p52, RelA, c-Rel, and RelB.<sup>13</sup> These proteins form homo- or heterodimers that are retained in the cytoplasm by interaction with inhibitory molecules (I $\kappa$ Bs).<sup>14</sup> Activation of NF- $\kappa$ B is mediated by both canonical and noncanonical signaling pathways.<sup>15–17</sup> The canonical pathway signals through activation of an I $\kappa$ B kinase (IKK) complex, composed of two catalytic subunits, IKK- $\alpha$  and IKK- $\beta$ , and a regulatory subunit, NF- $\kappa$ B essential modulator (NEMO)/IKK- $\gamma$ . Upon stimulation, this complex triggers phosphorylation of the I $\kappa$ Bs, leading to their ubiquitination and degradation through the proteasome pathway. Freed p50-RelA and p50-cRel dimers then migrate to the nucleus. The noncanonical pathway involves phosphorylation of IKK- $\alpha$  by NIK, which then triggers inducible processing of the p100, causing the release of a p52/RelB active heterodimer TF. On the basis of its interaction with NIK and IKK- $\beta$  proteins, a role in both canonical and non-canonical NF- $\kappa$ B pathways was proposed for TRAPPC9.<sup>12</sup>

To further evaluate the functional consequences of the p.R570X mutation on NF- $\kappa$ B signaling pathway, we analyzed the response of cultured skin fibroblasts of patient V-1 to TNF- $\alpha$ , a powerful activator of the NF- $\kappa$ B system. Cultured fibroblasts from controls and a patient were stimulated for various times with 10 ng/ml of TNF- $\alpha$ . The time course of degradation of the inhibitory protein I $\kappa$ B- $\alpha$  was then analyzed by immunoblotting. Figure 3B shows a slight decrease in the level of I $\kappa$ B- $\alpha$  after 10 and 20 min of TNF- $\alpha$  stimulation in patient skin fibroblasts, whereas I $\kappa$ B- $\alpha$  almost completely disappeared in fibroblasts

from two independent healthy controls. These results support the hypothesis of an impaired of NF- $\kappa$ B signaling in cells carrying the p.R570X mutation.

NF- $\kappa$ B activity and expression of several NF- $\kappa$ B target genes are altered in many chronic neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease,<sup>18</sup> Parkinson's disease, and Huntington's disease.<sup>19,20</sup> To our knowledge, this study provides the first evidence of a NF- $\kappa$ B signaling defect in an isolated cognitive deficit. How a TRAPPC9 mutation caused isolated MR remains questionable. Previous studies have demonstrated that knocking down TRAPPC9 expression prevented nerve growth factor-induced neuronal differentiation and suggested that TRAPPC9 might function as a downstream component of the NGF pathway.<sup>12</sup> Yet how absence of TRAPPC9 protein led to MR in our patient remains unexplained.

Cognitive dysfunction is generally regarded as the consequence of a defect in synapse formation and plasticity. Along these lines, it is worth remembering that subcellular distribution, DNA binding activity, and transcription of NF- $\kappa$ B are regulated by various forms of synaptic activity and that this TF plays an important role in the induction of synaptic plasticity and long-term-memory formation.<sup>21,22</sup> Inhibition of NF- $\kappa$ B blocked induction of long-term potentiation (LTP) in the hippocampus and amygdala.<sup>23,24</sup> Moreover, exposure to exogenous TNF- $\alpha$  inhibited induction of LTP, and the knockout of TNF receptors inhibited induction of long-term depression (LTD).<sup>23,25</sup> Finally, recent studies based on cell-restricted ablation of NF- $\kappa$ B subunits demonstrated the prominent role of neuronal NF- $\kappa$ B in memory and cognition and indicated that NF- $\kappa$ B activation is essential for long-term-memory formation, especially when hippocampus is involved.<sup>26</sup>

Impaired NF- $\kappa$ B signaling in glial cells may also play an important role in the pathogenesis of the disease, given that recent data suggest an active role of astrocytes and oligodendrocytes in synaptic transmission.<sup>27</sup> Constitutive TNF- $\alpha$  release by glial cells promoted upregulation of AMPA receptors and internalization of inhibitory GABA receptors in hippocampal neurons, thereby increasing synaptic strength.<sup>28,29</sup>



Finally, our study may shed light on the role of NF- $\kappa$ B in the myelination process in the CNS. Although NF- $\kappa$ B has been shown to orchestrate the axon myelination of peripheral neurons by Schwann cells,<sup>30</sup> whether it plays a similar critical role in the differentiation of oligodendrocytes remains to be established. The brain MRI observation of a myelination defect in our patients may provide further support to this hypothesis.

In conclusion, our study provides evidence that a NF- $\kappa$ B signaling defect may cause isolated cognitive deficit, expanding therefore the field of the pathophysiology of MR.

### Supplemental Data

Supplemental Data include two figures and one table and can be found with this article online at <http://www.cell.com/AJHG>.

### Acknowledgments

We are grateful to the patients for their participation in the study. We sincerely acknowledge Elodie Bal, Celine Cluzeau, Mohammed Zarhrate, and Sarah Boissel for technical assistance. This study was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Agence Nationale de la Recherche (ANR), the Fondation Lejeune, and the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur.

Received: October 8, 2009

Revised: November 5, 2009

Accepted: November 6, 2009

Published online: December 10, 2009

### Web Resources

The URLs for data presented herein are as follows:

Ensembl Genome Browser, <http://www.ensembl.org/>

GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>

National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>

### References

- American Psychiatric Association. (1994). DSM-IV: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder (Washington, D.C.: APA).
- Roeleveld, N., Zielhuis, G.A., and Gabreels, F. (1997). The prevalence of mental retardation: A critical review of recent literature. *Dev. Med. Child Neurol.* *39*, 125–132.
- Molinari, F., Rio, M., Meskenaite, V., Encha-Razavi, F., Auge, J., Bacq, D., Briault, S., Vekemans, M., Munnich, A., Attie-Bitach, T., et al. (2002). Truncating neurotrophin mutation in autosomal recessive nonsyndromic mental retardation. *Science* *298*, 1779–1781.
- Higgins, J.J., Pucilowska, J., Lombardi, R.Q., and Rooney, J.P. (2004). A mutation in a novel ATP-dependent Lon protease gene in a kindred with mild mental retardation. *Neurology* *63*, 1927–1931.
- Basel-Vanagaite, L., Attia, R., Yahav, M., Ferland, R.J., Anteki, L., Walsh, C.A., Olender, T., Straussberg, R., Magal, N., Taub, E., et al. (2006). The CC2D1A, a member of a new gene family with C2 domains, is involved in autosomal recessive nonsyndromic mental retardation. *J. Med. Genet.* *43*, 203–210.
- Motazacker, M.M., Rost, B.R., Hucho, T., Garshasbi, M., Kahrizi, K., Ullmann, R., Abedini, S.S., Nieh, S.E., Amini, S.H., Goswami, C., et al. (2007). A defect in the ionotropic glutamate receptor 6 gene (GRIK2) is associated with autosomal recessive mental retardation. *Am. J. Hum. Genet.* *81*, 792–798.
- Molinari, F., Foulquier, F., Tarpey, P.S., Morelle, W., Boissel, S., Teague, J., Edkins, S., Futreal, P.A., Stratton, M.R., Turner, G., et al. (2008). Oligosaccharyltransferase-subunit mutations in nonsyndromic mental retardation. *Am. J. Hum. Genet.* *82*, 1150–1157.
- Garshasbi, M., Hadavi, V., Habibi, H., Kahrizi, K., Kariminejad, R., Behjati, F., Tzschach, A., Najmabadi, H., Ropers, H.H., and Kuss, A.W. (2008). A defect in the TUSC3 gene is associated with autosomal recessive mental retardation. *Am. J. Hum. Genet.* *82*, 1158–1164.
- Najmabadi, H., Motazacker, M.M., Garshasbi, M., Kahrizi, K., Tzschach, A., Chen, W., Behjati, F., Hadavi, V., Nieh, S.E., Abedini, S.S., et al. (2007). Homozygosity mapping in consanguineous families reveals extreme heterogeneity of non-syndromic autosomal recessive mental retardation and identifies 8 novel gene loci. *Hum. Genet.* *121*, 43–48.
- Uyguner, O., Kayserili, H., Li, Y., Karaman, B., Nürnberg, G., Hennies, H., Becker, C., Nürnberg, P., Başaran, S., Apak, M.Y., et al. (2007). A new locus for autosomal recessive non-syndromic mental retardation maps to 1p21.1-p13.3. *Clin. Genet.* *71*, 212–219.
- Jain, N., Thatte, J., Braciale, T., Ley, K., O'Connell, M., and Lee, J.K. (2003). Local-pooled-error test for identifying differentially expressed genes with a small number of replicated microarrays. *Bioinformatics* *19*, 1945–1951.
- Hu, W.H., Pendergast, J.S., Mo, X.M., Brambilla, R., Bracchi-Ricard, V., Li, F., Walters, W.M., Blits, B., He, L., Schaal, S.M., and Bethea, J.R. (2005). NIBP, a novel NIK and IKK( $\beta$ )-binding protein that enhances NF-( $\kappa$ )B activation. *J. Biol. Chem.* *280*, 29233–29241.
- Moynagh, P.N. (2005). The NF- $\kappa$ B pathway. *J. Cell Sci.* *118*, 4589–4592.
- Ghosh, S., and Karin, M. (2002). Missing pieces in the NF- $\kappa$ B puzzle. *Cell* *109* (Suppl.), S81–S96.
- Tergaonkar, V. (2006). NF- $\kappa$ B pathway: A good signaling paradigm and therapeutic target. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *38*, 1647–1653.
- Gilmore, T.D. (2006). Introduction to NF- $\kappa$ B: Players, pathways, perspectives. *Oncogene* *25*, 6680–6684.
- Scheidereit, C. (2006). I $\kappa$ B kinase complexes: Gateways to NF- $\kappa$ B activation and transcription. *Oncogene* *25*, 6685–6705.
- Kaltschmidt, B., Uherek, M., Volk, B., Baeuerle, P.A., and Kaltschmidt, C. (1997). Transcription factor NF- $\kappa$ B is activated in primary neurons by amyloid beta peptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *94*, 2642–2647.
- Hunot, S., Brugg, B., Ricard, D., Michel, P.P., Muriel, M.P., Ruberg, M., Faucheux, B.A., Agid, Y., and Hirsch, E.C. (1997). Nuclear translocation of NF- $\kappa$ B is increased in dopaminergic neurons of patients with parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *94*, 7531–7536.
- Khoshnan, A., Ko, J., Watkin, E.E., Paige, L.A., Reinhart, P.H., and Patterson, P.H. (2004). Activation of the I $\kappa$ B

- kinase complex and nuclear factor-kappaB contributes to mutant huntingtin neurotoxicity. *J. Neurosci.* *24*, 7999–8008.
21. Memet, S. (2006). NF-kappaB functions in the nervous system: From development to disease. *Biochem. Pharmacol.* *72*, 1180–1195.
  22. Romano, A., Freudenthal, R., Merlo, E., and Routtenberg, A. (2006). Evolutionarily-conserved role of the NF-kappaB transcription factor in neural plasticity and memory. *Eur. J. Neurosci.* *24*, 1507–1516.
  23. Albeni, B.C., and Mattson, M.P. (2000). Evidence for the involvement of TNF and NF-kappaB in hippocampal synaptic plasticity. *Synapse* *35*, 151–159.
  24. Yeh, S.H., Lin, C.H., Lee, C.F., and Gean, P.W. (2002). A requirement of nuclear factor-kappaB activation in fear-potentiated startle. *J. Biol. Chem.* *277*, 46720–46729.
  25. Tancredi, V., D’Arcangelo, G., Grassi, F., Tarroni, P., Palmieri, G., Santoni, A., and Eusebi, F. (1992). Tumor necrosis factor alters synaptic transmission in rat hippocampal slices. *Neurosci. Lett.* *146*, 176–178.
  26. Kaltschmidt, B., Ndiaye, D., Korte, M., Pothion, S., Arbibe, L., Prullage, M., Pfeiffer, J., Lindecke, A., Staiger, V., Israel, A., et al. (2006). NF-kappaB regulates spatial memory formation and synaptic plasticity through protein kinase A/CREB signaling. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 2936–2946.
  27. Allen, N.J., and Barres, B.A. (2005). Signaling between glia and neurons: Focus on synaptic plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* *15*, 542–548.
  28. Beattie, E.C., Stellwagen, D., Morishita, W., Bresnahan, J.C., Ha, B.K., Von Zastrow, M., Beattie, M.S., and Malenka, R.C. (2002). Control of synaptic strength by glial TNFalpha. *Science* *295*, 2282–2285.
  29. Stellwagen, D., Beattie, E.C., Seo, J.Y., and Malenka, R.C. (2005). Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor-alpha. *J. Neurosci.* *25*, 3219–3228.
  30. Nickols, J.C., Valentine, W., Kanwal, S., and Carter, B.D. (2003). Activation of the transcription factor NF-kappaB in Schwann cells is required for peripheral myelin formation. *Nat. Neurosci.* *6*, 161–167.

PARTIE 2 : CONSTITUTION D'UNE COHORTE DE  
PATIENTS PRESENTANT UNE DI SEVERE AVEC  
DISSOCIATION DES SEQUENCES T2/FLAIR  
POUR LES ANOMALIES DE LA SUBSTANCE  
BLANCHE

Ces travaux sont le résultat d'une collaboration avec le Pr Nathalie BODDAERT du service de radiologie, le Dr Marlène RIO et le Pr Jeanne AMIEL du service génétique, le Dr Valérie MALAN du service de cytogénétique de l'hôpital Necker-Enfants Malades.

## **Chapitre 1) Recrutement d'une famille atteinte de déficience intellectuelle sévère et d'une dissociation T2/FLAIR : la famille San.**

### **1) Description clinique de la famille San**

La famille San est une famille non consanguine dont la mère est d'origine française et le père originaire du Portugal. Le couple a eu un enfant atteint d'une DI sévère, associée à une obésité tronculaire au moment de l'examen (3 ans), une microcéphalie modérée (-2 DS) et une discordance de l'anomalie de la substance blanche constatée sur la séquence FLAIR mais qui n'est pas visible en T2, sur les images de l'IRM (figure 21).

*Figure 21 : Dissociation T2/FLAIR à l'IRM chez le patient San.*

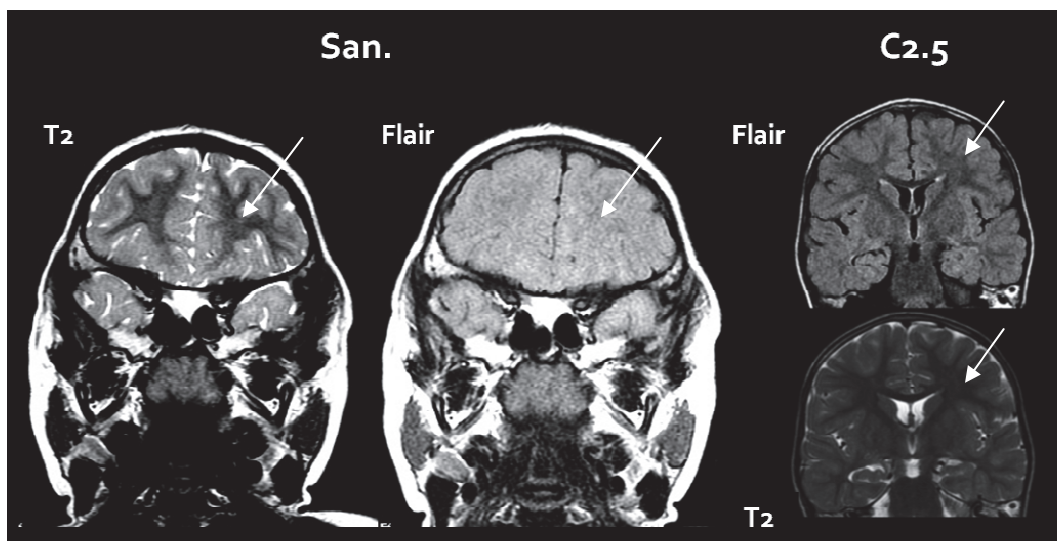


Image à l'IRM en pondération T2 et FLAIR en coupe frontale. Les deux images à gauche montrent une dissociation T2/FLAIR chez le patient San (flèche). Ce défaut n'est pas retrouvé chez le contrôle C2.5 (de même sexe, et de même âge).

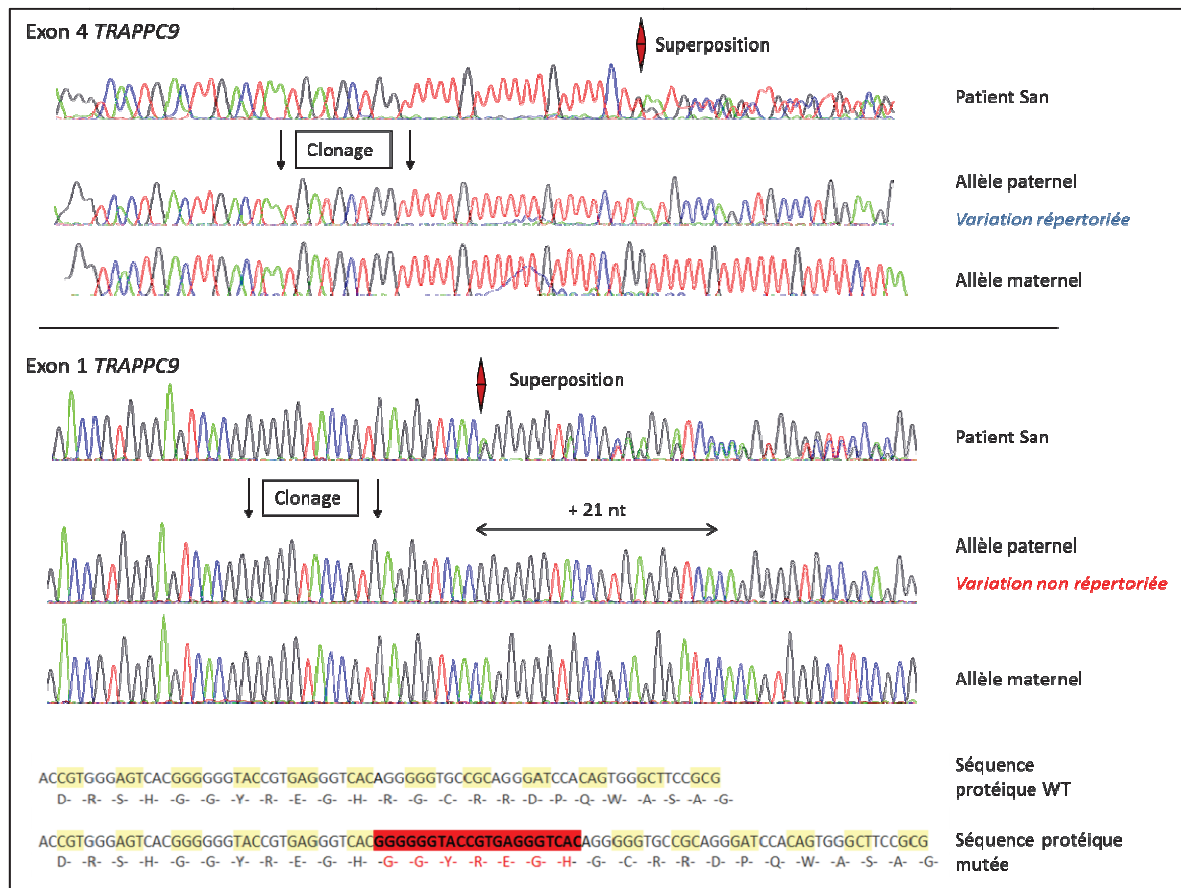
La dissociation T2/FLAIR peut être constatée chez les très jeunes enfants, traduisant une maturation incomplète de la myéline. Cependant, les images à l'IRM du contrôle masculin âgé de 2,5 ans ne montrent pas de dissociation entre les séquences T2/FLAIR, à cet âge et la myéline apparaît mature.

## **2) Analyse de la séquence de TRAPPC9**

Chez le patient San, les signes cliniques observés nous ont conduits à évoquer une anomalie *TRAPPC9*. Comme les parents ne présentent aucun lien de parenté, les résultats du séquençage ont été analysés sous l'hypothèse de mutations hétérozygotes composites.

Le séquençage direct de la totalité de la séquence codante et des jonctions introns-exons de *TRAPPC9* chez le patient San a montré l'existence de deux variations entraînant la superposition de deux séquences. Un clonage a été entrepris pour chacune d'elle afin d'établir la séquence de chacun des allèles (voir matériels et méthodes). Les résultats montrent une insertion de 21 nucléotides dans l'exon 1 de *TRAPPC9*, héritée du père (figure 22). Cette variation n'est répertoriée dans aucune base de données publique (dbSNP, 1000 Genomes, NHLBI Exome Sequencing Project). Le site Alamut version 2.0 a permis d'établir la nomenclature du variant au niveau génomique (NM\_031466.5 :c.166\_186dup) et l'impact sur la protéine (p.Gly56\_His62dup). Cette insertion entraîne une duplication exacte de 7 résidus : GGYRECH. La seconde variation est une délétion d'une séquence répétée intronique, dix nucléotides en amont du site accepteur de l'exon 4. Cette variation est répertoriée dans les banques de données. Elle est également héritée du père (voir figure 22). Basé sur ces critères, ce variant n'a pas été considéré comme pathogène.

Figure 22 : Électrophoregrammes des exons 1 et 4 de TRAPPC9 chez la famille San.



Le patient San montre deux superpositions de séquences dans l'exon 1 et 4 de TRAPPC9. La délétion précédant l'exon 4 est répertoriée et héritée du père tandis que l'insertion de 21 nts au sein de l'exon 1, héritée également du père, n'est pas répertoriée. Les séquences protéiques sauvages et mutées sont présentées dans le schéma.

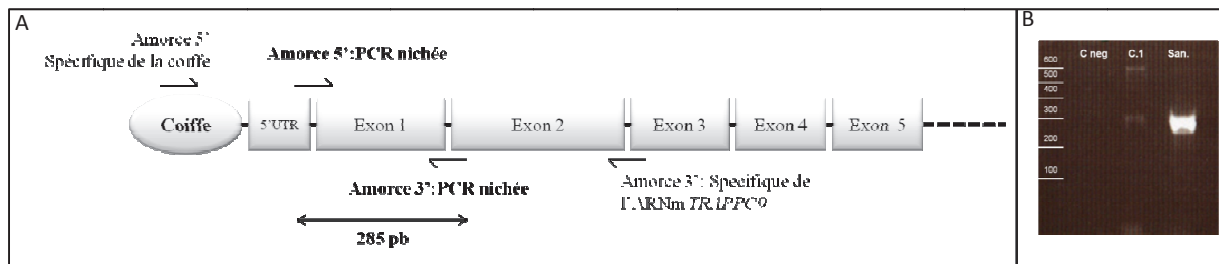
Pour poursuivre ce travail et tenter d'identifier une seconde variation, potentiellement pathogène et héritée de la mère, nous avons étendu notre analyse aux autres séquences importantes du gène : la séquence 5'UTR ; la séquence de polyadénylation du gène indispensable pour la stabilité de l'ARNm ; et une partie du promoteur comprenant la boîte TATA à l'origine de l'initiation de la transcription. Cependant, aucune autre anomalie génique n'a été identifiée chez ce patient. Mais, pour autant, nous ne pouvons pas exclure la présence d'une mutation dans les séquences introniques (ex : site de branchement essentiel au processus d'épissage) et régulatrices de TRAPPC9 (enhancer/silencer/ARN non codants, ...).

### **3) Analyse de l'ADNc de TRAPPC9 chez le patient San.**

Afin d'exclure des mutations touchant les séquences indispensables aux processus d'épissage, nous avons séquencé l'ADNc de TRAPPC9 obtenu après extraction et transcription

inverse des ARN totaux des fibroblastes du patient San. La partie 3' de l'ADNc de *TRAPPC9* a été séquencée directement selon un protocole classique de PCR et n'a révélé aucune anomalie. La partie 5' de l'ADNc, ne pouvant être étudiée par une RT-PCR classique, a été analysée par RACE-PCR (voir matériels et méthodes). Elle permet l'amplification des extrémités 5' des ARNm grâce à un couple d'amorces particuliers : l'amorce 5' (forward) se fixe au niveau de la coiffe des ARNm et l'amorce 3' est, quant à elle, spécifique du transcrite cible : ici *TRAPPC9*. Puis une seconde PCR nichée permet l'amplification spécifique de la séquence d'intérêt de l'ADNc (voir figure 23.A).

Figure 23 : RACE-PCR du gène *TRAPPC9* chez le patient San.



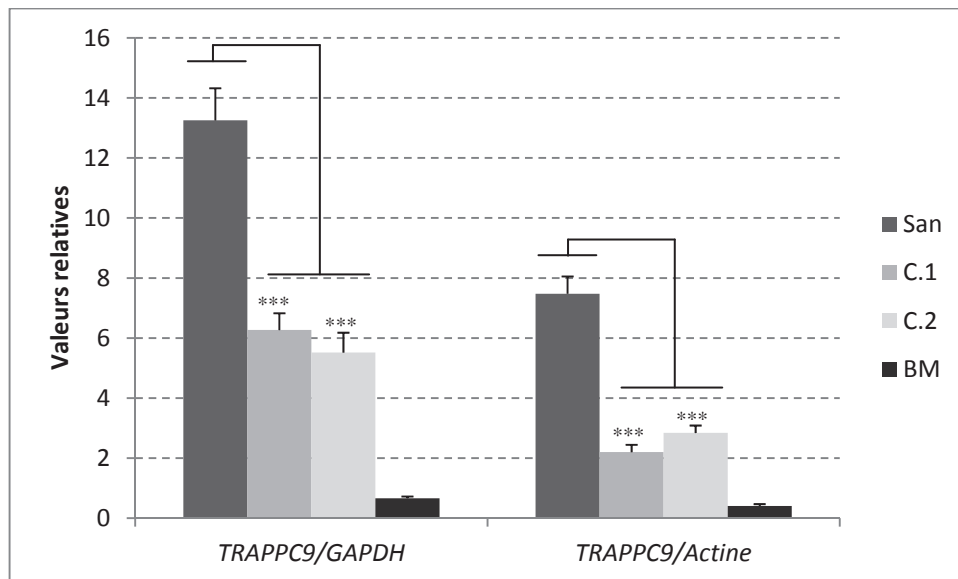
A : Représentation graphique de *TRAPPC9* et des couples d'amorces utilisés pour la RACE PCR ainsi que (B) la photographie du gel d'électrophorèse montrant les produits d'amplification issus de la RACE-PCR. C neg : contrôle négatif de la PCR nichée (sans ajout de produit de la 1<sup>ère</sup> PCR) ; C.1 : individus de référence pour la RACE-PCR ; San : Race-PCR réalisée chez le patient San.

Les résultats de cette étude nous ont permis de séquencer la totalité du transcrite *TRAPPC9* dont l'exon 1. Dans un premier temps, nous avons constaté que la quantité de transcrite est plus importante chez le patient que chez le contrôle (voir figure 23.B). Contrairement à ce que nous avons observé chez la famille BM, nos données suggèrent une surexpression *TRAPPC9* chez le patient San, par rapport au sujet contrôle.

Dans un second temps, le séquençage direct du produit de RT-PCR a révélé que seul l'allèle sauvage est présent suggérant une instabilité de l'ARNm porteur de l'insertion de 21 nt. Ce résultat est surprenant car cette insertion n'entraîne pas de décalage du cadre de lecture, et donc pas de formation de codon STOP prématuré provoquant la dégradation de l'ARNm par le mécanisme du NMD. On peut donc supposer que l'ARNm muté est dégradé par le biais d'un autre mécanisme de contrôle et/ou que l'allèle sauvage est anormalement surexprimé, masquant la séquence mutée.

Pour confirmer ce résultat de surexpression, nous avons réalisé une analyse de RT-PCR en temps réel à partir d'ARN totaux extraits des fibroblastes du patient San et deux sujets contrôles. Le patient BM a également été inclus comme référence de sous-expression de *TRAPPC9*. Les résultats sont présentés en figure 24.

Figure 24 : RT-PCR en temps réel réalisée sur le transcrit *TRAPPC9* chez le patient San.



RT-PCR quantitative réalisée à partir d'ARN totaux extraits du patient San, du patient BM et de deux contrôles masculins. Les résultats sont normalisés par rapport à deux gènes de références *GAPDH* et *β-Actine*. Un test student est pratiqué afin de calculer la pValue (\*\*\*) pValue <0,1)

Comme le montre ce graphique, la quantité de transcrit *TRAPPC9* est deux à trois fois plus importante chez le patient San comparée aux contrôles. La surexpression de *TRAPPC9* chez le patient San a donc été mise en évidence par RACE-PCR et par RT-PCR quantitative.

Nous n'avons pas obtenu de biopsies cutanées des parents pour tester si la surexpression de *TRAPPC9* est également observée chez le père porteur de l'insertion. Si elle n'est constatée que chez l'enfant, cela suggère la survenue d'un deuxième évènement génétique non identifié soit *de novo* soit hérité de la mère.

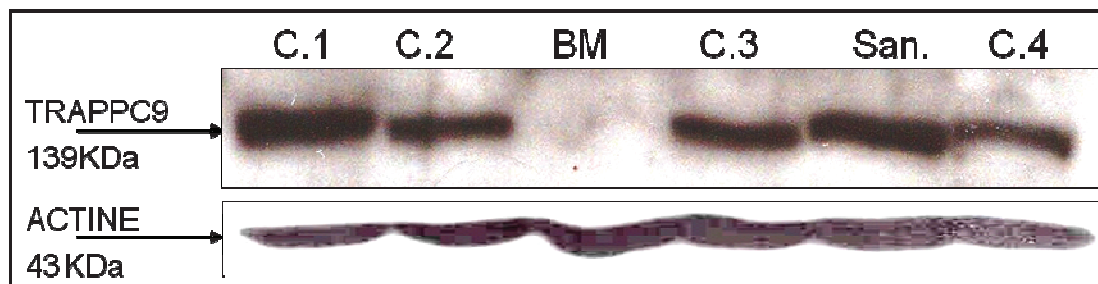


#### 4) Conséquence(s) fonctionnelle(s) de la surexpression de TRAPPC9 chez le patient San.

##### 4.1) Analyse de l'expression de TRAPPC9

Afin, d'évaluer l'effet de la surexpression du transcrit *TRAPPC9* sur la quantité de protéine correspondante, nous avons réalisé une analyse par Western blot (voir matériels et méthodes). Le patient BM a été ajouté comme témoin de l'absence de TRAPPC9. La quantification d'intensité des bandes TRAPPC9 normalisées avec la quantification d'intensité des bandes de la  $\beta$ -actine (non montré), ne révèlent pas un taux de TRAPPC9 supérieur chez le patient San comparées aux contrôles. Au vu des résultats présentés en figure 25, nous ne sommes donc pas en mesure de confirmer la surexpression protéique de TRAPPC9 chez le patient San, bien que le Western blot classique puisse ne pas rendre compte d'une surexpression mineure de la protéine.

Figure 25 : Western Blot avec un anticorps dirigé contre la protéine TRAPPC9.

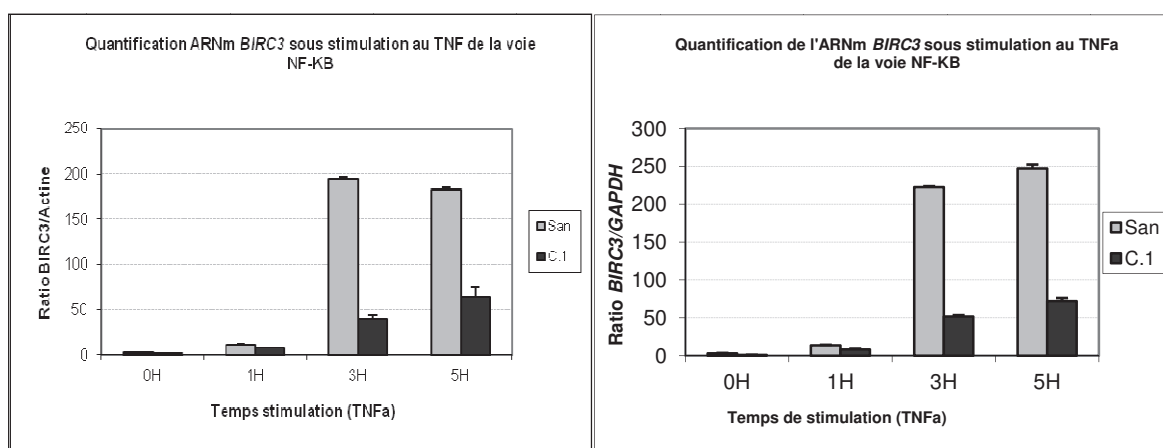


Quatre contrôles sont représentés (de même sexe et d'âge proche des deux patients San et BM), ainsi que le patient BM comme contrôle négatif de TRAPPC9 (139KDa). La protéine de référence utilisée est la  $\beta$ -Actine (43 KDa).

##### 4.2) Quantification de la transcription de *BIRC3* sous stimulation au $TNF\alpha$

Dans un second temps, nous avons testé l'effet de la surexpression de *TRAPPC9* sur la voie de signalisation NF- $\kappa$ B dans les cellules du patient San, en mesurant l'effet d'une stimulation par le  $TNF\alpha$  sur la transcription de *BIRC3*. Des fibroblastes dérivés du patient San et d'un contrôle ont été stimulés par le  $TNF\alpha$  pendant 0h, 1h, 3h et 5h ; puis l'ARNm *BIRC3* a été quantifié par RT-PCR en temps réel et rapporté à deux gènes de référence distincts. Trois expériences indépendantes ont été réalisées (voir figure 26).

Figure 26 : Quantification de l'ARNm *BIRC3* suite à une stimulation au TNF $\alpha$  chez le patient San.



RT-PCR quantitative réalisée à partir des ARN totaux extraits des fibroblastes du patient San et de son contrôle après avoir été soumis aux différents temps de stimulation par le TNF $\alpha$ . Chaque point a été normalisé grâce aux gènes de référence *GAPDH* et  *$\beta$ -Actine*. Les écarts types ont été calculés par rapport à trois expériences indépendantes.

Les graphiques montrent une quantité de transcrite *BIRC3* plus importante chez le patient San comparée au contrôle, et cela pour les 3 points de la cinétique de stimulation. Ces résultats suggèrent une suractivité de la voie NF- $\kappa$ B chez le patient. De plus, chez le contrôle, la cinétique de stimulation est progressive et proportionnelle. Or chez le patient San, la réponse à la stimulation au TNF $\alpha$  semble être anticipée puisque les taux de *BIRC3* sont similaires aux temps 3h et 5h. Ces résultats montrent une suractivité de la voie NF- $\kappa$ B lorsqu'elle est stimulée chez le patient San. Bien que la surexpression protéique de TRAPPC9 n'ait pas été validée par Western blot, ces résultats sont en faveur de sa surexpression.

Ces résultats mettent en évidence la surexpression du transcrite *TRAPPC9*, chez le patient San, associée à une anomalie de signalisation de la voie NF- $\kappa$ B, reflétant une suractivité de celle-ci.

## **5) Conclusions et perspectives pour la famille San.**

### **5.1) Conclusions de l'étude**

Le patient San présente un tableau clinique extrêmement proche de la famille BM, à savoir une DI sévère, associée à une microcéphalie modérée, une obésité tronculaire dans la

jeune enfance, une marche acquise tardivement (2 ans) mais sans défaut moteur persistant, et une dissociation T2/FLAIR de la substance blanche à l'imagerie.

Le séquençage de *TRAPPC9* a mis en évidence un variant non répertorié, hérité du père, correspondant à une insertion de 21 nts au niveau de l'exon 1. Bien que ce variant ne conduise pas à l'apparition d'un codon stop prématuré, l'ARNm muté n'est pas retrouvé au niveau transcriptionnel, suggérant que cet ARNm soit dégradé par un autre mécanisme que celui de « non-sens mediated mRNA decay » et/ou que l'allèle sauvage soit anormalement surexprimé, masquant la séquence mutée.

Le séquençage de l'allèle maternel n'a pas permis l'identification d'une variation rare potentiellement pathogène. Cependant, la quantification de l'ARNm de *TRAPPC9* démontre clairement chez le patient San, une surexpression de l'allèle maternel. Enfin, l'étude fonctionnelle de la voie NF- $\kappa$ B chez ce patient suggère une suractivité de cette voie après stimulation au TNF $\alpha$ .

## 5.2) Perspectives

L'ensemble de ces résultats supporte donc l'hypothèse d'une anomalie de la voie NF- $\kappa$ B chez ce patient mais l'implication d'une anomalie de *TRAPPC9* reste à démontrer. Seule l'analyse des fibroblastes des parents permettra de conclure définitivement sur ce point. En effet :

- soit l'un des deux parents présente également un défaut moléculaire de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B comparable à celle observée chez le patient. Dans ce cas, la surexpression de *TRAPPC9* serait probablement sans rapport avec la pathologie.
- Soit cette anomalie est *de novo*, suggérant l'existence d'un second évènement génétique, lié ou non au locus *TRAPPC9*, qu'il reste à identifier. Si un tel résultat était observé, cela démontrerait que la surexpression et la sous-expression de *TRAPPC9* conduisent au même phénotype.

Bien que nous ne puissions affirmer que *TRAPPC9* soit le gène causal, de nombreux arguments sont en faveur de son implication dans la pathologie de la famille San : un phénotype similaire à la famille BM (clinique et IRM), un variant rare non répertorié dans l'exon 1 de

*TRAPPC9* entraînant son instabilité transcriptionnelle, et une dérégulation de la voie NF- $\kappa$ B. Nous ne pouvons, cependant, pas exclure l'implication d'un autre gène chez la famille San. Les études complémentaires chez les deux parents sont à présent indispensables pour évaluer l'implication de *TRAPPC9* dans la pathologie du patient San et poursuivre les recherches dans ce sens.

## **Chapitre 2) Corrélation génotype/phénotype d'une cohorte de patients avec dissociation T2/FLAIR**

Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article 3 « *NF-κB signaling requirement for brain myelin formation is shown by genotype/MRI phenotype correlation in patients with Xq28 duplications* ». (Philippe O, et al. 2012-sous presse)

### **1) Evaluations cliniques des patients recrutés sur la base d'une discordance T2/FLAIR**

Le patient J.C est né à terme de parents sains et non consanguins. La grossesse ainsi que la naissance n'ont pas montré d'événements cliniques particuliers. L'examen réalisé à l'âge de 6 ans révèle une hypotonie, un reflux-gastro-oesophagien, de nombreuses infections pulmonaires, du type bronchiolites, associées à un déficit en IgM et IgG2, un retard de développement psychomoteur et intellectuel. Le patient a acquis la marche tardivement (26 mois), il ne prononce que quelques mots, montre peu d'interactions sociales et des mouvements stéréotypiques. A cet âge, la taille et le poids sont dans la moyenne. Il présente également une exotropie, des signes légers de dysmorphie faciale et une cyphose modérée. L'appareil génital est normal. Les images d'IRM en séquence FLAIR montrent des hypersignaux de la substance blanche périventriculaire et subcorticale comparées à un contrôle de même âge et de même sexe (figure 27). En revanche, l'analyse utilisant la séquence T2 n'a révélé aucune anomalie et suggère une discordance entre les séquences T2 et FLAIR similaire à celle observée dans la famille BM. Son frère, N.C, présente les mêmes symptômes cliniques et en particulier la même discordance entre séquence T2 et séquence FLAIR. L'analyse par CGH-array a mis en évidence, chez les deux frères, une microduplication Xq28 couvrant *MECP2*, confirmée ensuite par FISH, et héritée de la mère.

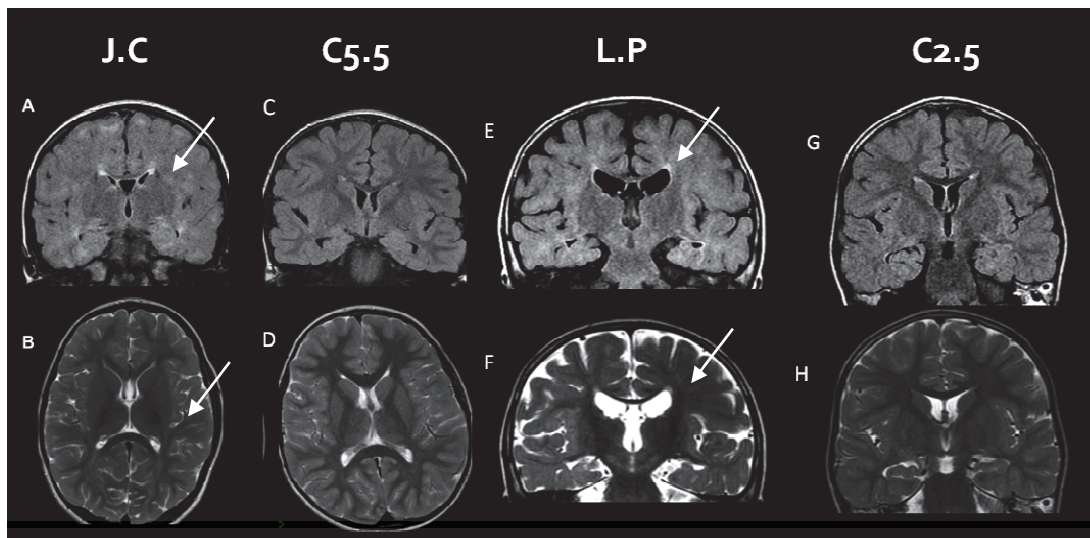
Le patient L.P est né à terme de parents sains et non consanguins après une grossesse et un accouchement sans anomalie. Peu après la naissance, le patient a présenté une hypotonie et un retard psychomoteur. La position assise a été acquise entre 16-18 mois et la marche à 27 mois. Quelques convulsions sont survenues au cours de la jeune enfance. Au cours de l'examen, à 27 mois, il présente une microcéphalie (-2,5 DS), une petite taille (taille : 80,5 cm ; -2,5 DS) et

une dysmorphie faciale modérée. L'IRM montre des anomalies de la myéline en séquence FLAIR mais des images normales en séquence T2. Le patient L.P présente également une dissociation T2/FLAIR (voir figure 27).

L'analyse cytogénétique de ce patient par CGH-array a identifié une duplication de 8,6 Mb de la région Xq27.3-q28 incluant *MECP2* et conséquence d'une translocation déséquilibrée  $t(X;8)(q27.3q28;qter)$  survenue *de novo*. Cette duplication a été confirmée par FISH et aucune perte de matériel du chromosome 8 n'a été décelée.

Ces deux patients sont donc porteurs d'une duplication *MECP2*.

Figure 27 : IRM des patients J.C et L.P comparées à leurs contrôles respectifs



IRM des deux patients et des contrôles. Les images en FLAIR (A) du patient J.C à 6,5 ans montre des hyperintensités de signaux de la substance blanche périventriculaire et subcorticale comparées à son contrôle de même âge en FLAIR (C). En revanche, l'image en T2 (B) ne montre pas de signes évidents d'anomalies comparée au contrôle (D). Le patient L.P montre des anomalies de la substance blanche en séquence FLAIR (E) absentes chez le contrôle de 2,5 ans (G). De la même manière aucune anomalie n'est visualisée en séquence T2 chez le patient L.P (F) et chez le contrôle (H). Les images B et D sont prises en coupe axiale, tandis que les autres images sont en coupe coronale.

## **2) Le syndrome de la duplication *MECP2***

Le syndrome causé par la duplication de la région Xq28, incluant *MECP2* (dup-*MECP2*) a été décrit pour la première fois en 2004 (Ariani F, *et al.* 2004). Il s'agit d'une maladie

neurodéveloppementale caractérisée par l'association d'une DI, d'une neuropathie progressive avec ataxie, d'une spasticité, d'une épilepsie et d'une sensibilité aux infections respiratoires.

L'analyse du locus Xq28 montre que cette duplication survient par recombinaison homologue non allélique entre diverses répétitions segmentaires (low copy repeats ou LCR). La dup-MECP2 n'est pas considérée comme un syndrome récurrent tels les syndromes de Smith-Magenis (MIM 182290), Potocki-Lupski (MIM 610883), ou del22q11.2 (délétion MIM 611867 ; duplication : 608363) car les points de cassure ne sont pas identiques d'un patient à l'autre et de ce fait, la taille de la région dupliquée peut être variable (Ramocki MB, *et al.* 2010).

Cent vingt patients porteurs d'une dup-MECP2, dont la taille varie de 0,2 à 8 Mb, ont été décrits dans la littérature. Les signes cliniques sont résumés en table 10. La région minimale de duplication comprend les gènes *MECP2* (MIM 300005) et *IRAK1* (MIM 300283).

*MECP2* (Methyl-CpG-Binding Protein 2) possède trois domaines protéiques importants pour sa fonction : le MBD (Methyl Binding Domain), le TRD (Transcriptional Repression Domain) et la partie c-terminale. Le MBD permet l'association de *MECP2* avec les dinucléotides méthylés CpG de l'ADN ; le TRD est impliqué dans des interactions protéines-protéines notamment avec les facteurs de remodelage de la chromatine ; et la partie c-terminale pourrait fixer l'ADN et des facteurs d'épissage de l'ARN. Certaines protéines ont été identifiées comme capables d'interagir avec *MECP2*, telles que les HDAC1 (Histone Deacetylase) (MIM 601241) et HDAC2 (MIM 605164) (Histones Déacétylases), SIN3A (un corépresseur des HDACs, MIM 607776), DNMT1 (DNA MethylTransferase 1, MIM 126375), TFIIB (GTF2B, MIM 189963) ou encore Brama (SMARCA2, MIM 600014) (intégré à la famille SWI/SNF du remodelage de la chromatine). Outre le lien établi entre les méthylations de l'ADN, les histones déacétylases et les facteurs de remodelage de la chromatine, tous ces acteurs protéiques interviennent dans la régulation négative de la transcription génique (Kramer JM, *et al.* 2009). *MECP2* agirait donc comme un répresseur de l'expression transcriptionnelle. Cependant, sa fonction est encore mal connue et les gènes régulés par *MECP2* ne sont pas identifiés dans leur totalité. Ainsi, ses mécanismes d'action dans le SNC restent inexpliqués. Des anomalies géniques de *MECP2* (mutations, amplifications) laissent donc supposer d'un défaut des marques épigénétiques de l'ADN, touchant certains gènes qui auraient un rôle dans le SNC.

*IRAK1*, quant à lui, est un gène codant pour un récepteur aux interleukines impliqué dans le système immunitaire. Son rôle dans le syndrome de la dup-MECP2 ne semble pas prédominant pour l'atteinte neurologique mais cependant, il pourrait y avoir un lien avec les infections récurrentes caractérisées chez les patients dup-MECP2.

D'autre part, le locus Xq28 contient de nombreux gènes impliqués dans des pathologies du SNC ou ayant une forte expression cérébrale : *SLC6A8* (MIM 300036), *L1CAM* (MIM 308840), *FLNA* (MIM 300017), *GDI1* (MIM 300104), *RPL10* (MIM 312173) ou encore *ATP6AP1* (MIM 300197) (Vandewalle J, *et al.* 2009). Il est donc vraisemblable que la variation d'expression clinique de ce syndrome soit liée à la variation de la taille de la duplication. Les hommes porteurs de la microduplication sont atteints de déficit intellectuel et de troubles autistiques. Dans la majorité des cas, les femmes conductrices présentent un biais de l'inactivation du chromosome X (85 à 100% d'inactivation) mais parfois elles peuvent présenter des symptômes neuropsychiatriques appartenant au spectre des troubles autistiques (Ramocki MB, *et al.* 2010 ; Van Esch H, *et al.* 2005).

Table 10 : Nature et fréquence des différents signes cliniques observés chez les patients porteurs de la duplication *MECP2*

<b>Phénotype</b>	<b>Pourcentage d'individus atteints</b>
<b>Déficiência intellectuelle</b>	<b>118/119 (99%)</b>
<b>Hypotonie</b>	<b>86/93 (92%)</b>
<b>Absence de langage</b>	<b>63/72 (88%)</b>
Absence de marche	20/71 (28%)
<b>Infections récurrentes</b>	<b>82/111 (94%)</b>
Anomalies de la respiration	6/18 (33%)
Mouvements stéréotypés des mains	15/33 (45%)
Traits autistiques	13/17 (76%)
Epilepsie	57/110 (52%)
Anomalies du système génito-urinaire	29/67 (43%)
Décès avant les 25 ans	25/66 (38%)
Spasticité	42/71 (59%)
Ataxie	20/37 (54%)
Reflux gastro-œsophagien	15/25 (60%)
Constipation	25/33 (76%)
<b>Dysmorphie faciale</b>	<b>41/41 (100%)</b>

Table établie à partir de l'article de Ramocki MB, *et al.* 2010.

La dysmorphie faciale est caractérisée par : une brachycéphalie, des yeux larges, une hypoplasie faciale, une ensellure nasale et des narines antéversées.



Peu de données d'IRM cérébrales sont disponibles chez ces patients. Quelques anomalies de la substance blanche sont mentionnées chez deux familles (Van Esch H, *et al.* 2005) mais aucune information n'est disponible quant à une éventuelle discordance entre les séquences T2/FLAIR.

### **3) Analyse rétrospective de patients présentant une duplication *MECP2***

Les IRM ont été entreprises chez des patients (V.L et H.T) pour lesquels les cliniciens avaient diagnostiqué une duplication *MECP2* au locus Xq28. Les séquences T1, T2 et FLAIR ont été pratiquées chez ces patients.

Le patient V.L suivi à l'Hôpital Necker-Enfants malades a été diagnostiqué avec une duplication du locus Xq28. Il est le second enfant d'un couple sain ne présentant pas de lien de parenté. Un syndrome lié à l'X ségrège dans la famille maternelle sur deux générations et compte 3 garçons atteints. Le patient est né à terme sans incidents cliniques rapportés. Il présente une hypotonie, une constipation chronique sévère, un retard moteur et intellectuel (marche acquise à 26 mois) associé à des interactions sociales limitées, une anxiété, des infections respiratoires fréquentes, et une épilepsie débutant à l'âge de 5 ans. La taille et le poids sont normaux tandis que le périmètre crânien est au 97th centile. Il est atteint d'ataxie, d'hypotonie et de spasticité. Le langage est limité à 10 mots environ. Une dysmorphie faciale est également rapportée (exotropie et petite bouche).

Enfin, le patient HT est suivi par l'équipe du Dr Hilde Van Esch à l'hôpital universitaire de Louvain en Belgique et a été précédemment décrit dans le papier de Bauters M et al, 2008. Il est né de parents sains non consanguins. L'histoire familiale ne mentionne pas de pathologie neurologique ou de malformations congénitales. A la naissance, le patient HT présente une hypotonie sévère et des difficultés à se nourrir. Il est atteint d'un retard moteur sévère (tenue assise à 2 ans et marche à 3,5 ans). Le langage est quasiment absent et il est capable de comprendre de simples commandes. Il présente des comportements répétitifs (frappe dans ses mains). Il est traité pour une épilepsie et des infections respiratoires récurrentes nécessitant un traitement antibiotique presque continu et des hospitalisations fréquentes. Au cours du dernier examen clinique, à l'âge de 7 ans, le patient HT nécessite une aide pour la marche, il reste très hypotonique du tronc et ne présente plus de spasticité des membres. Il peut établir un contact

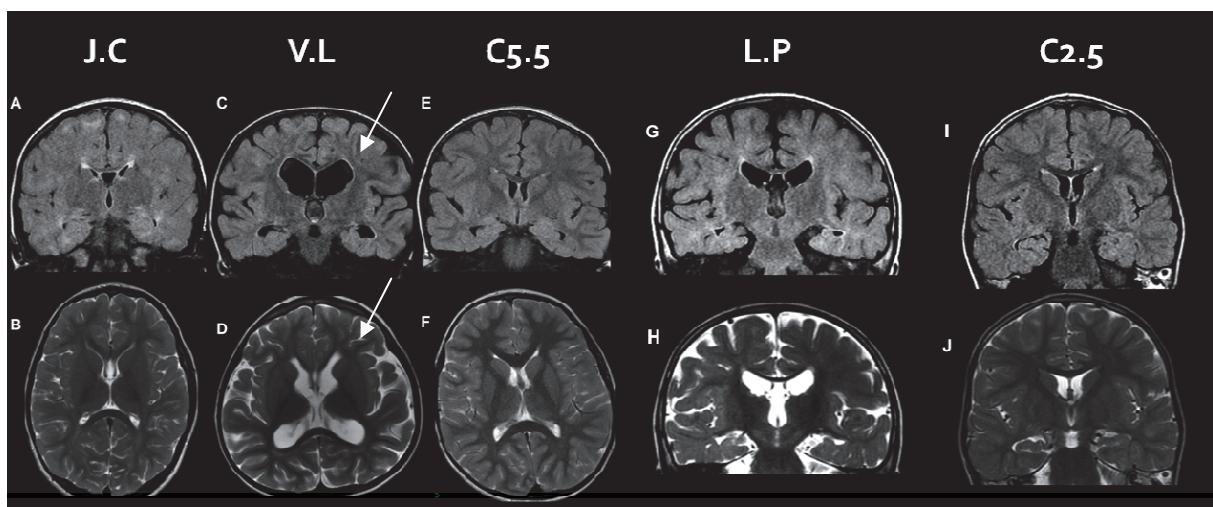
visuel et a un caractère amical. Ce patient présente également une duplication de la région chromosomique Xq28 incluant *MECP2*.

Comme cela est présenté en figure 28, aucun défaut n'est rapporté sur les IRM de ces deux patients V.L et H.T (les images radiologiques du patient H.T ne sont pas présentées dans ce manuscrit). La séquence FLAIR ne montre pas d'hypersignaux de la substance blanche et aucune anomalie cérébrale n'est décrite pour les deux séquences T2 et FLAIR de l'IRM. Or, les patient J.C et L.P, présentant eux-mêmes une duplication au locus Xq28, montrent une discordance T2/FLAIR d'un signal anormalement diffus de la substance blanche. Ce résultat surprenant, nous a conduits à émettre les hypothèses suivantes :

- Soit la dissociation T2/FLAIR est un critère variable de la duplication *MECP2* (signe non spécifique)
- Soit les anomalies radio-neurologiques sont corrélées à l'extension de la région dupliquée du locus Xq28 et impliquent la présence ou non, d'un gène ayant un rôle dans la formation de la substance blanche.

Nous avons donc entrepris de définir les bornes de la région et les gènes présents dans ce fragment dupliqué, pour les trois patients J.C, L.P et V.L. L'analyse moléculaire du patient HT est décrite dans l'article de Bauters M (2008).

Figure 28 : IRM des patients J.C, L.P et V.L et de deux contrôles.



L'IRM du patient V.L est représentée en T2 (C) et en FLAIR (D). Ce patient ne présente pas de dissociation entre la séquence T2 et la séquence FLAIR de l'IRM comparée aux patient J.C et L.P. L'image C du patient V.L est prise en coupe coronale et l'image D en coupe axiale.

#### **4) Duplication d'*IKBKG* chez les patients présentant une anomalie de la substance blanche**

L'étude chez la famille BM, présentant les mêmes caractéristiques à l'IRM que les patients J.C et L.P, montre qu'un défaut de TRAPPC9 entraîne une perte d'activité de la voie NF- $\kappa$ B pouvant être à l'origine d'une anomalie modérée de la substance blanche. Le gène *IKBKG* (*NEMO*), localisé 400kb en aval de *MECP2*, code la sous-unité régulatrice du complexe IKK (I $\kappa$ B kinase, voir figure 16), et joue un rôle primordial dans l'activation de la voie canonique NF- $\kappa$ B. C'est pourquoi, *IKBKG* nous a semblé être un bon candidat pour être impliqué dans les anomalies de substances blanches observées chez les patients JC et LP.

Les trois patients J.C, L.P et V.L ont été analysés par FISH au service de cytogénétique, par le Dr Valérie Malan. La sonde du BAC RP11-103M23 a permis de tester la présence ou non d'*IKBKG* dans les fragments chromosomiques dupliqués. De façon intéressante, *IKBKG* est inclus dans la duplication Xq28 des patients J.C et L.P, tandis que la duplication observée chez les patients V.L et HT ne couvre pas *IKBKG*.

Ces résultats suggèrent une corrélation entre la présence d'*IKBKG* au locus dupliqué et les anomalies de la substance blanche. Nous avons donc formulé l'hypothèse que la duplication d'*IKBKG* puisse conduire à une anomalie de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B comparable à celle observée chez les patients BM lorsque TRAPPC9 est absente.

#### **5) Réarrangements complexes du locus Xq28 : symptômes et IRM**

L'étude de Vandewalle et collaborateurs rapporte des amplifications du locus Xq28 incluant *IKBKG* mais sans *MECP2* (Vandewalle J, *et al.* 2009). Cet article décrit le cas de quatre familles d'origines ethniques différentes, sans lien de parenté, et ayant des enfants atteints de DI sévères. Les bornes de la région amplifiée sont similaires entre les quatre familles mais le nombre d'amplification de chacun des fragments varie. Ainsi, deux des familles présentent une triplification du locus (famille 1 et 3), une famille montre 5 copies de la région (famille 2) et la dernière famille possède une duplication du locus Xq28 (famille 4) (voir figure et tableau explicatifs ci-dessous).

Les IRM ont été réalisées pour trois des familles mais aucune dissociation T2/FLAIR de la substance blanche n'a été rapportée. Cependant, l'IRM d'un patient de la famille 1 (présenté dans l'article 3) a été réexaminée, et des anomalies de la substance blanche sont décrites sur les deux séquences T2 et FLAIR, ainsi qu'un corps calleux fin. Ces patients présentent des réarrangements complexes du locus Xq28 avec probablement trois copies du fragment comprenant *IKBKG*, et sans que *MECP2* ne soit amplifié.

Les IRM des patients de la famille 4 n'ont pas été pratiquées. Cet examen pourrait confirmer ou infirmer la corrélation entre la duplication d'*IKBKG* et les défauts de la substance constatés en séquence FLAIR mais absents de la séquence T2.

Cependant, comme cela a été rapporté par l'article de Del Gaudio et collaborateurs, plus le locus est répété, plus la sévérité de la pathologie est accentuée. Plusieurs études montrent que le nombre d'amplification participe à la sévérité du syndrome. Une triplification de *MECP2* a été rapportée dans la littérature et montre un phénotype extrêmement sévère comparé à une cohorte de patients atteints de dup-*MECP2*. La triplification du locus Xq28 incluant *MECP2* entraîne chez le patient une hydronéphrose, des dysmorphies faciales, une trachéomalacie, un retard développemental modéré à l'âge de l'examen (3 mois) et des pneumonies récurrentes (Del Gaudio D, *et al.* 2006). Une seconde famille composée de trois garçons, présentant un triplification du fragment chromosomique incluant *MECP2*, décrit un phénotype sévère avec une hypotonie néonatale, un retard développemental, une microcéphalie dans la jeune enfance (12 mois) qui évolue en macrocéphalie (notée à l'âge de 8 ans), une position assise acquise tardivement (2 ans), une marche à 3 ans, quelques mots sont prononcés, des convulsions généralisées apparaissent à l'âge de 8 ans et de nombreuses infections sévères des voies respiratoires sont constatées. Une perte des acquisitions est notée à l'âge de 8-10 ans avec une perte de la marche et de la mastication. Les trois garçons sont décédés des suites d'infections respiratoires (15 mois, 15 ans et 16 ans) (Tang SS, *et al.* 2011).

Ces études pourraient expliquer l'absence d'une discordance entre les séquences T2/FLAIR chez les patients des familles 1, 2 et 3 pour lesquelles l'amplification du locus Xq28 est supérieure à 2. En effet, la dissociation T2/FLAIR traduit sans doute une anomalie modérée de la substance blanche. Nous proposons que la présence d'un nombre supérieur de copie du gène

*IKBKG* (3 ou 5) puisse conduire à des anomalies plus sévères de la substance blanche observables sur l'ensemble des séquences utilisées en IRM. De plus, la séquence FLAIR n'est pas pratiquée en routine, ce qui limite l'estimation de la fréquence d'occurrence de la discordance T2/FLAIR. Néanmoins, ces observations confirment que la présence d'*IKBKG* dans le fragment amplifié pourrait être liée à des anomalies de la substance blanche dans le SNC.

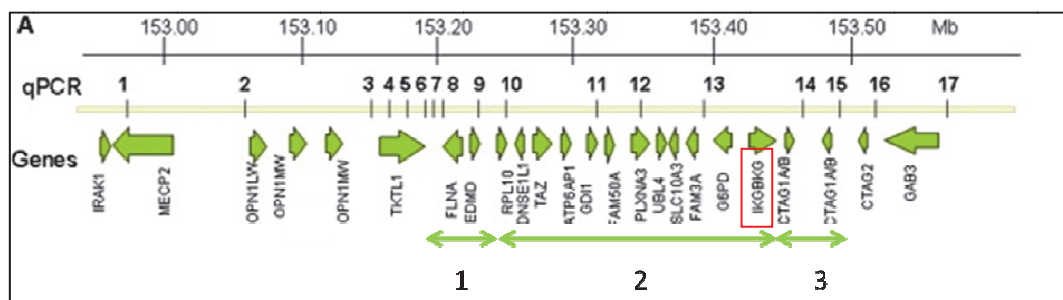


Image extraite de l'article de Vandewalle J, *et al.* 2009. Les doubles flèches numérotées 1, 2 et 3 montrent les fragments amplifiés du locus Xq28 chez les 4 familles décrites. Leurs nombres varient et sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Famille	Fgt 1	Fgt 2 ( <i>IKBKG</i> )	Fgt 3	Symptômes
Famille 1	2	3	2	Retard psychomoteur, anomalies des articulations, retard de langage, DI modéré à sévère, caractère timide et amical, surdité (+/-), hémiplegie (+/-), épilepsie (+/-) IRM : Elargissement du 4 <sup>ème</sup> ventricule, anomalies de la substance blanche, corps calleux fin
Famille 2	3	5	3	Impossibilité de se tenir assis et debout ; quelques mots prononcés, microcéphalie, hypotonie axiale ; hypertrophie musculaire ; dysmorphie faciale ; asymétrie du crâne et du thorax IRM : Malformation de Dandy-Walker ; hypoplasie du cervelet ; agénésies du corps calleux
Famille 3	2	3	2	Retard de langage ; microcéphalie ; difficultés psychomotrices ; difficultés d'apprentissage ; prononce quelques phrases courtes ; DI modéré (QI=58) IRM : Dilatation ventriculaire ; Magna Cisterna asymétrique et large
Famille 4	2	2	2	Retard psychomoteur ; assis à 12 mois, marche à 20 mois ; premiers mots à 2 ans ; brachycéphalie ; Hypertélorisme ; front large ; Epicantus inverstus ; philtrum court ; visage plat Absence d'IRM

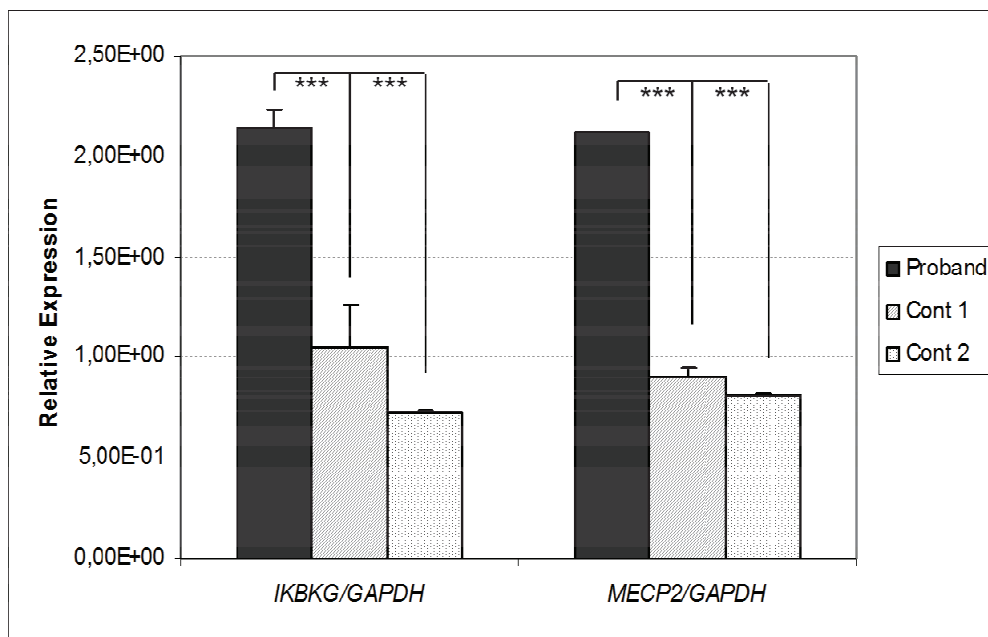
Table récapitulative des quatre familles décrites dans l'article de Vandewalle J, *et al.* 2009. Les fragments 1, 2 et 3 sont présentés dans la figure ci-dessus. Le chiffre mentionné à chaque famille pour chacun des fragments signale le nombre d'amplification du fragment estimé par CGH-array puis évalué par RT-PCR quantitative pour la famille 1.

## 6) Conséquences de la duplication MECP2/IKBKG

### 6.1) Quantification des transcrits MECP2 et IKBKG chez le patient J.C

Afin de poursuivre ce travail, nous avons dans un premier temps quantifié le taux des transcrits des gènes *MECP2* et *IKBKG*. Cette analyse a été réalisée à partir d'ARN totaux extraits de fibroblastes dérivés d'une biopsie cutanée du patient J.C. (voir figure 29).

Figure 29 : Quantification des ARNm d'*IKBKG* et de *MECP2* chez le patient J.C



La quantité des ARNm de *MECP2* et d'*IKBKG* a été établie par RT-PCR en temps réel. Le patient est comparé à deux contrôles indépendants. Ce résultat a été reproduit par trois expériences indépendantes. Le gène de référence pour les deux expériences est GAPDH. Un test student a été réalisé pour chaque contrôle et est inférieur à 0,01 (\*\*\*)

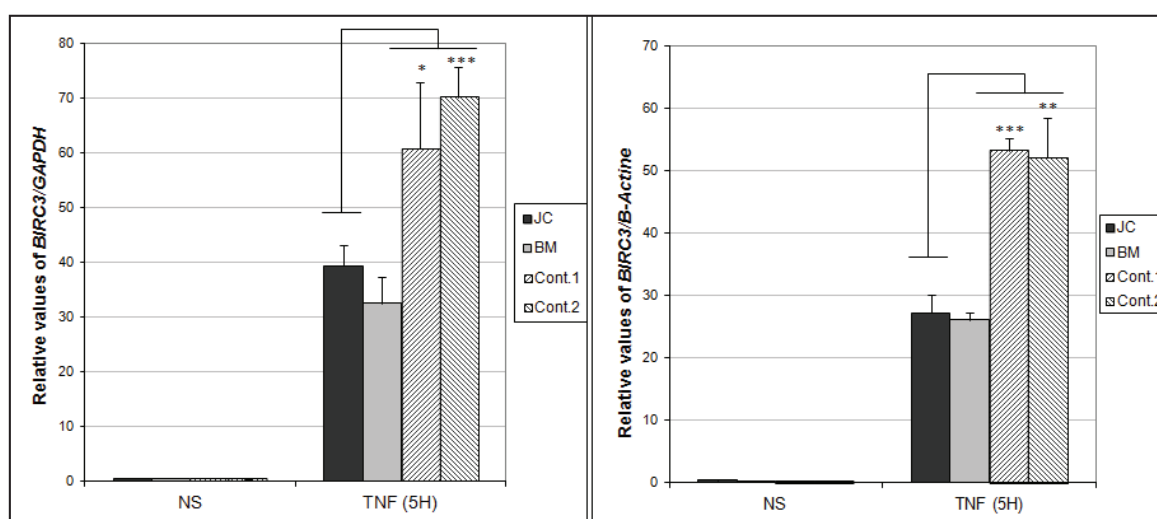
Le graphique démontre que la quantité de transcrits *IKBKG* et *MECP2* est doublée chez le patient par rapport aux deux contrôles (de même âge et de même sexe que le patient J.C).

Ainsi la duplication génomique de ces deux gènes conduit à leurs surexpressions chez le patient J.C. Cependant, la sensibilité des tests en Western blot utilisant un anticorps anti-*IKBKG*, ne nous a pas permis de corrélérer cette information au niveau protéique (résultats non présentés).

## 6.2) Quantification du transcrit *BIRC3* sous stimulation au TNF $\alpha$

Puis, nous avons souhaité déterminer les conséquences de la duplication d'*IKBKG* sur l'activité de la voie NF- $\kappa$ B par une expérience de quantification du transcrit *BIRC3* après stimulation au TNF $\alpha$  (selon le même procédé que les expériences réalisées précédemment chez la famille BM et la famille San). Nous avons également inclus le patient BM dans cette étude, afin de pouvoir comparer la réponse transcriptionnelle du gène cible de la voie NF- $\kappa$ B. Les résultats sont présentés en figure 30.

Figure 30 : Quantification de l'ARNm *BIRC3* suite à une stimulation au TNF $\alpha$  chez le patient J.C



RT-PCR en temps réel réalisée sur le transcrit *BIRC3* chez le patient J.C et BM comparée à deux contrôles de même sexe et de même âge. Cette expérience a été réalisée aux temps 0h et 5h de stimulation par le TNF $\alpha$ . Les valeurs sont présentées en quantité relative. Les astérisques représentent le test student qui atteste de la significativité de la différence entre le patient J.C et les deux contrôles, au temps 5h (\* :  $P=0,5$  ; \*\* :  $0,5 > P > 0,1$  ; et \*\*\* :  $P < 0,1$ )

Les graphiques présentés en figure 30 montrent une diminution du taux de transcription de *BIRC3* après stimulation au TNF $\alpha$ , chez le patient J.C. Ce résultat est semblable chez le patient BM et suggère que la surexpression d'*IKBKG* entraîne une diminution d'activité de la voie NF- $\kappa$ B. Nous avons voulu confirmer cette observation par une seconde approche.

## 6.3) Impact de l'excès d'*IKBKG* sur l'activité de la voie NF- $\kappa$ B

Une gamme croissante de plasmide contenant l'ADNc d'*IKBKG* humain a été transfectée dans des cellules SH-SY5Y. La culture originale SK-N-SH de cette lignée cellulaire fut prélevée chez une patiente en 1970 à partir d'une biopsie faite au niveau d'un neuroblastome

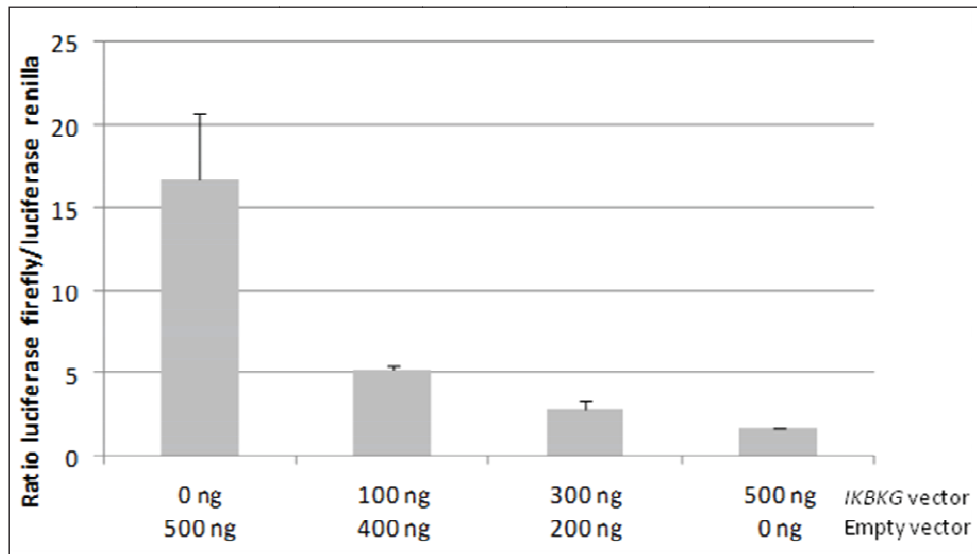
métastatique localisé dans la moelle osseuse. Deux types cellulaires se distinguaient, notamment par leurs morphologies : des cellules neuroblastiques-*like* et épithéliales-*like*. Les cellules neuroblastiques ont été sous-clonées trois fois de suite afin d'obtenir la lignée cellulaire la plus homogène possible : SH-SY5Y. Celles-ci possèdent des propriétés biochimiques neuronales et produisent des enzymes neuronales (Dopamine  $\beta$ -hydrolase, activité acétylcholinergique et glutamatergique) ; le traitement par le BDNF (Brain Derived-Neurotrophic Factor) et l'acide rétinoïque favorise la formation de neurites et la différenciation cellulaire (Biedler JL, *et al.* 1978). Cette lignée SH-SY5Y aux propriétés neuronales nous a donc semblé être un bon modèle cellulaire pour évaluer l'activité de la voie NF- $\kappa$ B *in vitro*.

Les cellules ont été co-transfectées avec d'une part un plasmide porteur du gène luciférase Firefly sous contrôle d'un promoteur NF- $\kappa$ B (contenant 6 sites de fixation aux facteurs de transcription NF- $\kappa$ B), et d'autre part un plasmide codant pour un gène luciférase Renilla sous contrôle du promoteur fort SV40. La production de la luciférase Firefly reflète l'activation de la voie NF- $\kappa$ B, tandis que la luciférase Renilla atteste de l'efficacité de transfection des plasmides dans les cellules SH-SY5Y. Les cellules ont ensuite été soumises à une stimulation par le TNF $\alpha$  (5h) et la réponse de la voie NF- $\kappa$ B a été quantifiée et normalisée grâce à une lecture de la production des deux types de luciférase par un luminomètre.

Les résultats de cette expérience sont présentés en figure 31 et montrent que la transfection d'une quantité croissante de plasmide d'expression *IKBKG* dans les cellules SH-SY5Y entraîne une diminution proportionnelle de la réponse de la voie NF- $\kappa$ B.



Figure 31 : Quantification de la voie NF- $\kappa$ B après stimulation au TNF $\alpha$  (5h)



Gamme croissante de vecteur *IKKKG*. Chaque colonne montre le ratio de luciférase Firefly/Luciférase Rénilla, pour chaque puits de la gamme. Ce résultat a été validé par trois expériences indépendantes permettant ainsi de calculer les écarts types.

Ces résultats supportent donc l'hypothèse selon laquelle la duplication d'*IKKKG* serait responsable de l'anomalie de signalisation NF- $\kappa$ B observé chez le patient JC, et dont les conséquences moléculaires sont similaires à l'absence de TRAPPC9 chez les patients BM.

## **7) Conclusions et perspectives**

### **7.1) Conclusions de l'étude**

Cette étude nous a permis de faire l'hypothèse d'une corrélation entre des anomalies de la substance blanche et l'amplification du locus Xq28 incluant la présence d'*IKKKG* (*NEMO*). Nos résultats démontrent aussi que la surexpression d'*IKKKG* entraîne une diminution de réponse de la voie NF- $\kappa$ B, de la même façon que chez les patients BM. Le déficit de TRAPPC9 et l'excès d'*IKKKG* provoque un défaut de réponse de la voie NF- $\kappa$ B, visualisé par quantification du gène cible *BIRC3* après stimulation au TNF $\alpha$ . Nos résultats supportent également l'hypothèse selon laquelle, la voie NF- $\kappa$ B aurait un rôle dans la formation et/ou le développement de la myéline au niveau du SNC.

## 7.2) Myélinisation du SNC : le point

### 7.2.1) Anomalies de la myéline

Certaines pathologies humaines sont décrites avec des anomalies de la myéline du SNC. Quelques unes d'entre elles rapportent des discordances à l'IRM entre un défaut de la substance blanche présent sur la séquence FLAIR mais qui n'est pas constaté sur la séquence T2. Elles sont rares et aucune ne rend compte d'un défaut de la voie NF-κB.

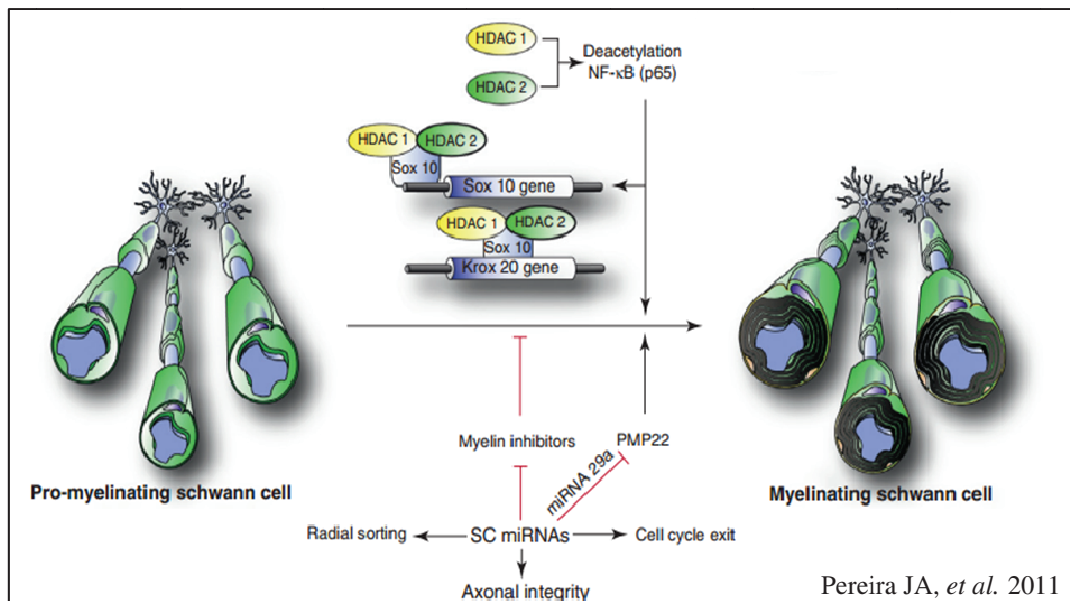
L'incontinentia Pigmenti (IP) est une maladie létale embryonnaire chez les sujets masculins et n'est décrite que chez la femme. Cette pathologie est engendrée par une délétion hétérozygote des exons 4-10 du gène *IKBKG* dans 80-90% des cas. Les signes cliniques sont extrêmement variables d'une patiente à l'autre, dû à l'inactivation aléatoire du chromosome X. Puis progressivement, au cours de la croissance, un biais d'inactivation du chromosome X est constaté. Certaines lésions sont irréversibles ou laissent des séquelles apparentes. Ainsi près de 30 à 40% des femmes atteintes d'IP montrent des atteintes neurologiques variables. Les anomalies observées par IRM révèlent souvent des troubles asymétriques: hypoplasies du corps calleux, atrophie de l'un ou des deux hémisphères cérébraux, atrophie de l'un ou des deux hémisphères du cervelet. Enfin des anomalies de la substance blanche sont également rapportées. Elles persistent dans le temps et sont visibles sur toutes les séquences de l'IRM (T1, T2 et FLAIR) (Pascual-Castroviejo I, *et al.* 1994 ; Woelfel NI, *et al.* 2005 ; Lou H, *et al.* 2007). L'IP est donc une pathologie qui renforce la corrélation entre les troubles de la voie canonique NF-κB avec des anomalies de la myéline du SNC.

Des anomalies d'hypomyélinisation sont également observées dans d'autres pathologies, telles que le syndrome Allan-Herndon-Dudley (AHD) (MIM : 300523), la maladie de Pelizaeus-Merzbacher (PMD) (MIM : 312080) ou encore le syndrome de la délétion du 18qter (MIM : 601803). A l'IRM, ce dernier syndrome montre une dissociation T2/FLAIR de la substance blanche semblable aux patients J.C, L.P et B.M. Ce syndrome de gènes contigus entraîne l'haploinsuffisance de plusieurs gènes dont *MBP* (Myelin Basic Protein). En revanche pour les deux pathologies, AHD et PMD, le défaut de la myéline est constaté sur toutes les séquences de l'IRM (Feenstra I, *et al.* 2007).

### 7.2.2) Mise en place de la myéline : SNC et SNP

La substance blanche cérébrale est composée de neurones recouverts de myéline. La myéline forme une gaine protectrice essentielle pour la conduction et la propagation de l'influx nerveux le long des axones des neurones. La myéline est mise en place dans le SNC par les oligodendrocytes, cellules gliales spécialisées, et dans le SNP (système nerveux périphérique) par les cellules de Schwann (Pereira JA, *et al.* 2011). Elle est composée majoritairement de lipides nommés sphingomyélines, donnant l'aspect blanc de la myéline, et de protéines. Les protéines majoritaires sont la MBP (Myelin Basic Protein) (MIM 159430) et de la PLP (Proteolipid Protein, MIM 300401). Ce sont les deux éléments de base qui représentent 85% des protéines de la myéline (Campagnoni AT, *et al.* 2001). Elle est retrouvée principalement au niveau de la partie interne du SNC enveloppé par le cortex qui est lui constitué de neurones arborisés non recouverts de myéline.

Les détériorations de la gaine myéline au niveau du SNP conduit à des scléroses, des leucodystrophies ou encore des neuropathies périphériques (Pereira JA, *et al.* 2011). Une cascade de réactions, incluant des mécanismes épigénétiques, est finement régulée et conduit au développement et à la maturation des cellules de Schwann. Ces mécanismes interviennent également dans la maintenance de la fonction de ces cellules spécialisées. Le facteur de transcription SOX10 (MIM 602229) joue un rôle crucial dans la myélinisation du SNP, car il permet le recrutement des histones déacétylases 1 (HDAC1, MIM 601241) et 2 (HDAC2, MIM 605164). Ces deux HDACs agissent sur plusieurs gènes impliqués dans le développement des cellules de Schwann comme SOX10 lui même, KROX20, p65, ... (voir figure ci-dessous) (Pereira JA, *et al.* 2011). Le double KO des *HDAC1* et *HDAC2* chez la souris (lignée murine dCKO), entraîne le décès 2 semaines après la naissance et montre un phénotype sévère de démyélinisation des nerfs périphériques dû à un arrêt du développement des cellules de Schwann. Chez les souris dCKO, une hyperacétylation du gène *p65* est constatée, ce qui entraîne sa surexpression favorisant la production d'inhibiteur de la myéline. Ceci conduit à une réduction significative des composants de la myéline : *Mbp*, *Mag* et *Mpz*. Ainsi, la repression du facteur de transcription p65 est nécessaire pour la différenciation des cellules de Schwann pour permettre la transcription des gènes codant les composants de la myéline (Chen Y, *et al.* 2011).



De façon intéressante, une seconde étude réalisée chez les souris dCKO, a mis en évidence le rôle similaire des *HDAC1* et *HDAC2* dans le SNP et dans le SNC, au niveau des oligodendrocytes. Les souris dCKO présentent une absence d'oligodendrocytes matures et montrent un phénotype de démyélinisation au niveau du SNC. Les études portées sur des cellules neuronales progénitrices corticales extraites des souris dCKO démontrent un arrêt de la voie  $\beta$ -Caténine, et a pour conséquence la répression de l'expression d'*Olig2*, gène essentiel à la maturation des oligodendrocytes. L'absence d'*Olig2* dans les oligodendrocytes empêche la différenciation cellulaire. Les cellules non différenciées ne peuvent alors plus assurer la mise en place de la myéline au niveau des axones des cellules neuronales (Ye F, *et al.* 2009). Bien que les mécanismes de différenciation des oligodendrocytes soient moins bien établis que pour les cellules de Schwann, l'implication de la voie NF- $\kappa$ B pourrait être envisageable également dans ce processus de maturation cellulaire, au niveau du SNC.

### 7.3) Perspectives

**Expression des gènes de la duplication.** Certains gènes ayant un rôle dans le SNC sont également présents dans la duplication *MECP2/NEMO*, tels que *GDI1*, *RPL10* ou *ATP6AP1*. Leurs niveaux d'expression pourraient être évalués par RT-PCR quantitative afin d'attester de leurs surexpressions. Ces gènes pourraient participer au phénotype des patients observés. Des mutations touchant *GDI1* sont associées à une DI-LX classée de modérée à sévère et non spécifique. Certaines femmes peuvent présenter des signes cliniques mineurs (MRX41,

MIM 300849) (D'adamo P, *et al.* 1997 ; D'adamo P, *et al.* 1998 ; Des portes V, *et al.* 1997 ; Bienvenu T, *et al.* 1998 ; Strobl Wildemann F, *et al.* 2011). *RPL10* est un gène de susceptibilité à l'autisme lié à l'X (AUTSX5, MIM 300847) touchant les hommes et pour lequel les femmes conductrices sont asymptomatiques. Les garçons atteints ont tous un score positif pour les tests de l'ADI-R (Autism Diagnostic Instrument-Revised) et de l'ADOS (Autism Diagnostic Observation Schedule), les QI varient entre 50 et 94 et un des patients est atteint d'une hémiplégié (Klauck S, *et al.* 2006 ; Chiocchetti A, *et al.* 2011). *ATP6AP1* est quant à lui un gène dont l'expression est élevée dans le cerveau et suggère son rôle au niveau du SNC (Vandewalle J, *et al.* 2009).

**Recrutement de patients.** Afin de vérifier les hypothèses établies au cours de cette étude, il serait intéressant de recruter d'autres patients présentant des duplications du locus Xq28, complétant les trois groupes de la cohorte :

- duplication *MECP2* sans *IKBKG*
- duplication *MECP2* et *IKBKG*
- et enfin des duplications *IKBKG* sans *MECP2*.

Une IRM serait pratiquée sur l'ensemble de ces groupes, pour les trois séquences T1, T2 et FLAIR, afin de renforcer le lien entre les anomalies de la voie NF-κB (duplication *IKBKG*) et les défauts de la myéline.

De plus, certains tests mis précédemment en place pour caractériser des défauts de la voie NF-κB pourraient être pratiqués pour chacun des sous-groupes. Ceci pourrait attester de la spécificité des défauts de réponse de la voie NF-κB chez les patients atteints de la duplication d'*IKBKG* (test de réponse au TNFα, suivi de la dégradation de l'inhibiteur IκB-α)

De la même façon que pour la famille BM, une caractérisation du défaut de la voie NF-κB pourrait être envisagée. Les gènes cibles touchés par un excès d'*IKBKG* dans les cellules pourraient être déterminés par un transcriptome ou par PCR en temps réel sous une stimulation spécifique de la voie principale NF-κB. Ainsi, le rapprochement pourrait se faire entre les défauts moléculaires de la famille BM et les patients atteints de la duplication *IKBKG*. Un test de

sensibilité à l'apoptose pourrait également être pratiqué chez les patients ayant une duplication d'*IKBK*G.

ARTICLE 3

ARTICLE

# NF- $\kappa$ B signalling requirement for brain myelin formation is shown by genotype/MRI phenotype correlations in patients with Xq28 duplications

Orianne Philippe<sup>1</sup>, Marlène Rio<sup>1</sup>, Valérie Malan<sup>1</sup>, Hilde Van Esch<sup>2</sup>, Geneviève Baujat<sup>1</sup>, Nadia Bahi-Buisson<sup>3</sup>, Vassili Valayannopoulos<sup>4</sup>, Roseline Gesny<sup>1</sup>, Jean-Paul Bonnefont<sup>1</sup>, Arnold Munnich<sup>1</sup>, Guy Froyen<sup>5</sup>, Jeanne Amiel<sup>1</sup>, Nathalie Boddaert<sup>1,3</sup> and Laurence Colleaux<sup>\*,1</sup>

One of the key signals regulating peripheral myelin formation by Schwann cell is the activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B. Yet, whether NF- $\kappa$ B exerts similar functions in central myelin formation by oligodendrocytes remains largely unknown. We previously reported white matter abnormalities with unusual discordance between T2 and FLAIR sequences in a patient with intellectual disability and defective NF- $\kappa$ B signalling. These observations prompted us to hypothesise that NF- $\kappa$ B signalling may have a role in the axon myelination process of central neurons. We report here on five male patients with Xq28 duplications encompassing *MECP2*, three of which presented white matter anomalies on brain MRI. Array-CGH and FISH analyses demonstrated that brain abnormalities correlate with additional copies of the *IKBKG*, a gene encoding a key regulator of NF- $\kappa$ B activation. Quantitative RT-PCR experiments and  $\kappa$ B-responsive reporter gene assays provide evidence that *IKBKG* overexpression causes impaired NF- $\kappa$ B signalling in skin fibroblasts derived from patients with white matter anomalies. These data further support the role of NF- $\kappa$ B signalling in astroglial cells for normal myelin formation of the central nervous system. *European Journal of Human Genetics* advance online publication, 18 July 2012; doi:10.1038/ejhg.2012.140

**Keywords:** NF- $\kappa$ B; myelin formation; central nervous system; genotype/phenotype correlations

## INTRODUCTION

NF- $\kappa$ B is a ubiquitously expressed dimeric molecule that regulates the expression of a variety of genes and has a key role in a number of cellular processes such as innate and adaptive immunity, cellular proliferation, apoptosis and development.<sup>1</sup> Inducible NF- $\kappa$ B activation depends on phosphorylation-induced proteosomal degradation of the inhibitor of NF- $\kappa$ B proteins, which retain inactive NF- $\kappa$ B dimers in the cytosol in unstimulated cells. The majority of the diverse signalling pathways that leads to NF- $\kappa$ B activation converge on the I $\kappa$ B kinase (IKK) complex, which is responsible for I $\kappa$ B phosphorylation, leading to its degradation and thus allowing nuclear translocation of the NF- $\kappa$ B complexes.

Myelin is an electrically insulating material that forms a layer, the myelin sheath, around the axon of a neuron. It is essential for the proper functioning of the nerve fibres in both the central nervous system (CNS) and the peripheral nervous system (PNS).<sup>2</sup> Peripheral myelin formation during development is initiated by specific signals from axons to Schwann cells, and compelling evidence demonstrated that NF- $\kappa$ B orchestrates this complex process. NF- $\kappa$ B activity in the sciatic nerve of the developing rodents reaches a peak during the period when Schwann cells were actively myelinating axons.<sup>3</sup> Moreover, blocking NF- $\kappa$ B activity impairs Schwann cell differentiation and myelination *in vitro*. Finally, the production of myelin is drastically reduced in the

neurons of the dorsal root ganglia cultured from mice lacking the p65 subunit of NF- $\kappa$ B.

In humans, myelination in the CNS is a long-lasting process that starts during the fourteenth week of foetal development with only little amounts of myelin at the time of birth.<sup>4,5</sup> The process of myelination accelerates during infancy and will be pursued until adolescence. Brain myelin formation during development is initiated by, as yet, poorly identified signals from axons to oligodendrocytes. Reports linking white matter anomalies, which consists mostly of axons, their myelin sheaths and supporting oligodendrocytes, to defective pathways may thus allow a deeper understanding of how CNS myelination is regulated.

We previously reported three brothers in which intellectual disability (ID) associated with mild microcephaly and truncular obesity resulted from the loss-of-function mutation (p.R570X) of the *TRAPPC9* gene (MIM 611966).<sup>6</sup> Interestingly, brain MRI in affected sibs showed white matter abnormalities with unusual discordance between T2 and FLAIR sequences (ie, normal myelin signal on T2 sequence while FLAIR sequence shows important white matter abnormalities at the sub-tentorial level). So far, a total of 24 patients from seven distinct families have been reported with AR-NSID linked to *TRAPPC9*.<sup>7–11</sup> In addition to microcephaly, obesity, early onset hypotonia and moderate-to-severe ID, white matter abnormalities is a constant finding in these patients.

<sup>1</sup>INSERM U781, Département de Génétique et de Radiologie Pédiatrique, Fondation IMAGINE, Université Paris Descartes, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France; <sup>2</sup>Center for Human Genetics, University Hospital Leuven, KU Leuven, Leuven, Belgium; <sup>3</sup>Service de Neurologie Pédiatrique, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Necker, Paris, France; <sup>4</sup>Reference Centre for Inherited Metabolic Diseases, Necker-Enfants/Malades Hospital, Paris, France; <sup>5</sup>Human Genome Laboratory, Center for Human Genetics, VIB, Leuven, Belgium

\*Correspondence: Dr L Colleaux, INSERM U781, Département de Génétique et de Radiologie Pédiatrique, Fondation IMAGINE, Université Paris Descartes, Hôpital Necker-Enfants Malades, Tour Lavoisier, 149 Rue de Sèvres, Paris 75015, France. Tel: +33 1 7119 6305; Fax: +33 1 4449 5150; E-mail: laurence.colleaux@inserm.fr

Received 12 March 2012; revised 23 May 2012; accepted 8 June 2012



*TRAPPC9* (also known as NIBP, NIK and IKK $\beta$  binding protein) encodes a protein involved in the NF- $\kappa$ B signalling pathway and in nerve growth factor-induced neuronal differentiation.<sup>12</sup> Consistently, impaired NF- $\kappa$ B signalling was observed in cultured skin fibroblasts of the index patient carrying the p.R570X *TRAPPC9* null mutation. These observations prompted us to hypothesise that NF- $\kappa$ B signalling may have a role in the axon myelination process of the central neurons. To further test this hypothesis, we investigated NF- $\kappa$ B signalling in patients carrying Xq28 duplications of different sizes and associated or not with white matter anomalies.

## PATIENTS AND METHODS

### Patients

Five patients carrying an Xq28 duplication are reported in this study. Institutional research ethic approval and written consent were obtained for all the participants in the study.

Patient 1 is the first child of healthy non-consanguineous parents, born after an uneventful pregnancy with birth weight (BW) 2710 g and Apgar score 10. Shortly after birth, the boy presented hypotonia with delayed psychomotor development; he sat at 16–18 months and did not walk at 27 months. At 17 months he developed tonic-clonic seizures. The clinical examination at 27 months showed: weight 12.4 kg (–0.5 DS), height 80.5 cm (–2.5 DS), occipitofrontal circumference 46.5 cm (–2.5 DS), mild dysmorphic features (open, carp-shaped mouth, epicanthal folds, anteverted nares, tapering fingers), cryptorchidism, bilateral pyramidal syndrome, speech delay, and drooling. At this age, coronal Flair images showed an important delay of myelination of the white matter compared with age-matched normal controls while the coronal T2 images of the same affected boy showed no evident abnormalities of the white matter compared with normal controls indicating discordance between the FLAIR and T2 sequences (Figures 1g–j).

Array-CGH identified a 8.6 Mb Xq27.3–q28 submicroscopic duplication caused by a *de novo* unbalanced translocation t(X;8)(q27.3–q28;qter) as further demonstrated by FISH analysis with the probe RP11-119A22. No loss of chromosome 8 material was detected (data not shown).

Patient 2 is the second child of healthy non-consanguineous parents. He was born at term with normal birth parameters after an uneventful pregnancy (BW: 3100g). He presented hypotonia, severe gastro-oesophageal reflux, bronchiolitis and pulmonary infections, which revealed an immunoglobulin deficit in IgM and IgG2, delayed motor and intellectual development (walked independently at 26 months of age) and poor social interactions. He was first seen at 6 years of age. Growth parameters and head circumference were within the normal range with weight on the 75th centile, height on the 50th centile and OFC on the 50th centile. He could speak some single words and remained hypotonic and ataxic with the absence of spasticity and presented stereotypic movements (hand flapping). Clinical examination showed exotropia, a small open mouth with drooling and slender hands and feet. He had a mild kyphosis. Genitalia were normal. Coronal Flair images showed an important and extensive hyperintensities of the periventricular and subcortical white matter compared with age-matched normal controls. On the other hand, the axial T2 of the same patient showed no obvious abnormalities compared with normal controls revealing discordance between the Flair and the T2 sequences (Figures 1a and b). Array-CGH identified an Xq28 microduplication subsequently confirmed by FISH analysis with the probe RP11-119M22 and inherited from the mother. His older brother had a similar clinical presentation with even more delayed motor skills due to spasticity and poorer social interactions. His brain MRI revealed similar Flair and T2 sequences discordance. He also carried the duplication as demonstrated by FISH analysis.

Patient 3 is the second child of healthy non-consanguineous parents. An undiagnosed X-linked ID syndrome segregated in the maternal family with three affected boys in two generations. He was born at term with normal birth parameters after an uneventful pregnancy (BW: 3125g; BL: 48 cm; OFC: 35 cm). He presented hypotonia, severe chronic constipation, delayed motor and intellectual development (walked independently at 26 months of age) with limited social interactions and anxiety, bronchiolitis and pulmonary infections from 1 year of age, and epilepsy from 5 years of age. He was first seen at

5.5 years. Head circumference was on the 97th centile while weight and height were on the 75th centile. He was hypotonic, ataxic and spastic. Language was limited to about 10 words. Clinical examination showed exotropia, a small mouth, slender hands and feet, brisk tendon reflexes and drooling. Genitalia and spine were normal. No abnormalities were noted on brain MRI in both FLAIR and T2 sequences (Figures 1c and d).

A *MECP2* duplication was clinically suspected and confirmed by FISH analysis with the probe RP11-119A22. The duplication was inherited from the mother.

Patient 4 was born after an uneventful pregnancy as the first child to healthy non-consanguineous parents. Family history was negative regarding congenital malformations and ID. At birth he was very hypotonic with feeding problems. His development was severely delayed, with sitting at the age of 2 years and walking with support at the age of 3 years and half. He did not develop any active speech but understands simple tasks. Repetitive behaviour and hand flapping when he is excited can be seen. At the age of 6 months he developed absence epilepsy responding well to Depakine. His major problems were the recurrent infections occurring since the first months of life, necessitating almost continuous antibiotic therapy, frequent hospitalisations and ventilation for 1 week at the age of 6 years because of a serious pneumonia. At the age of 7 years he walked again with support, his gait was broad based with eversion of the feet. He was still very hypotonic in the trunk and did not show any spasticity in the limbs. He made good eye contact with his care takers and had a happy character. Growth was normal. His face was hypotonic with tented upper lip and drooling. He could not feed himself. No abnormalities were noted on brain MRI in both FLAIR and T2 sequences.

X-chromosome array-CGH identified a small Xq28 microduplication in patient HT previously reported in the paper by Bauters *et al.*<sup>13</sup>

Patient 5 was reported previously as patient IV:2 from family 1 by Vandewalle *et al.*<sup>14</sup> Briefly, this patient presented with delayed psychomotor development, tiptoeing and mild atactic gait. Cognitive evaluation showed a moderate ID, with a total IQ of 50. He had normal social interaction, and no behavioural problems have been reported. Array-CGH revealed a 317-kb-long microduplication at Xq28, between 153.218 and 153.535 Mb.

### Neuroimaging methods

Anatomical MRI was performed with a 1.5-T (Signa General Electric Company, Fairfield, CT, USA) scanner using the following sequences: 3D T1-weighted FSPGR sequence, axial FSE T2-weighted imaging and coronal FLAIR sequences. Additional imaging sequences were occasionally obtained, including coronal T2 FSE or axial FLAIR sequences. The same paediatric neuroradiologist reviewed all brain images.

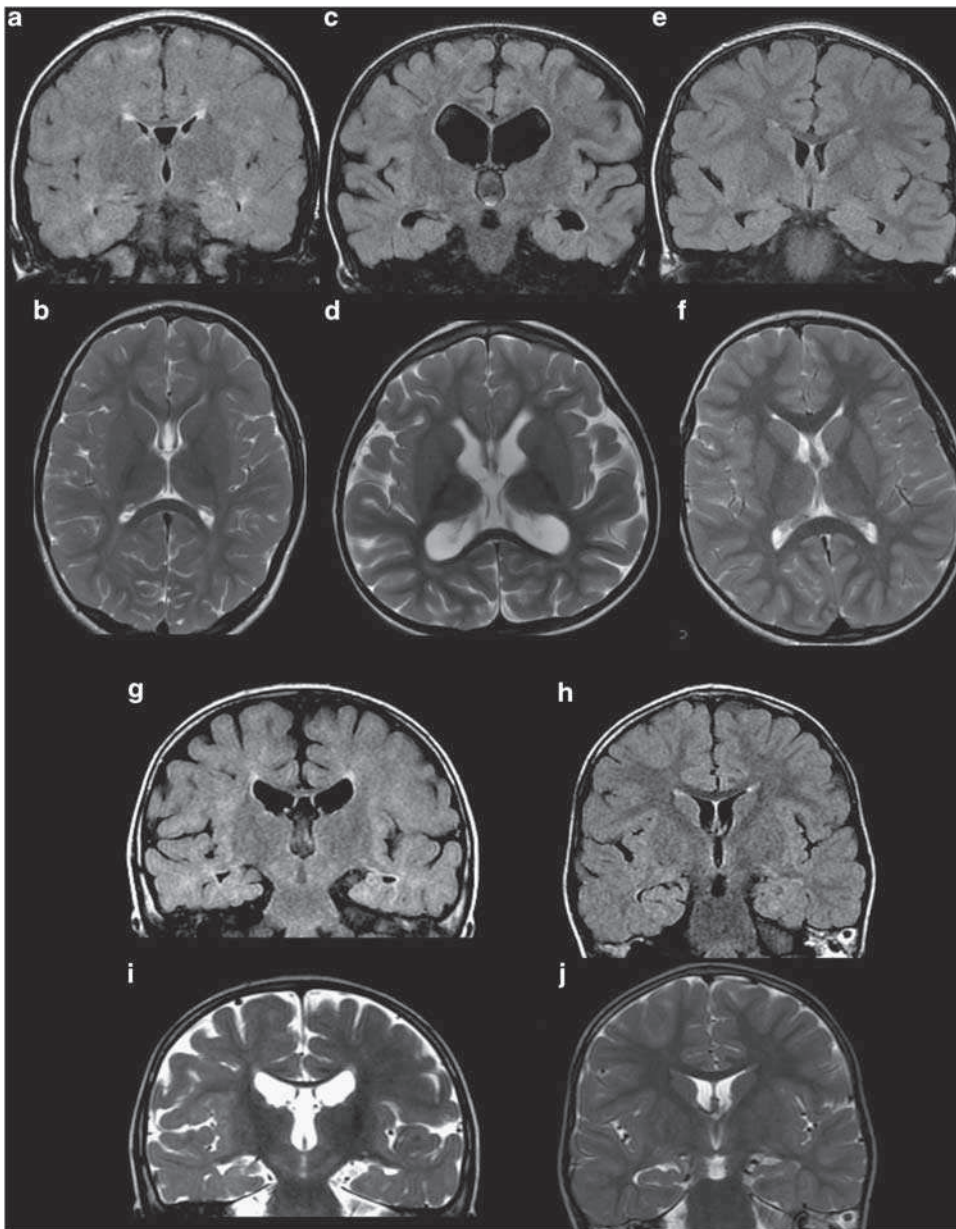
### Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) and stimulation assays

Reverse transcription was performed with the qSCRIPT cDNA SuperMix (QUANTA Biosciences, Gaithersburg, MD, USA) and the quantitative PCR with the KIT SYBR GREEN FASTMIX ROX (QUANTA Biosciences) on a 7300 Real-Time PCR System (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). The following primers were used: 5'-GAGCTCCGAGATGCCATC-3' and 5'-CTCAGCCATCTGCTGCTG-3' for *IKBK*; 5'-AGCCCGTGCAGCCATCAGC C-3' and 5'-CTTCCCAGGACTTTTCTCCA-3' for *MECP2*; 5'-GAGTCAACGG ATTTGGTCGT-3' and 5'-TTGATTTGGAGGGATCTCG-3' for *GAPDH*. *IKBK* and *MECP2* transcripts levels were normalised to *GAPDH* mRNA.

Stimulation with TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) was done on skin fibroblast cells from patient 2 and two independent controls who were sex and age-matched. TNF- $\alpha$  stimulation induces transcription of the *c-IAP2* target gene. The amount of *c-IAP2* transcript was evaluated by qRT-PCR using the following primers: 5'-GGTCTTCTTCATGAAAGAAATG-3' and 5'-CAGAAGATGTTTCAGAT CTACCAG-3'.

### Luciferase assays

Forty thousand SH-SY5H cells were co-transfected with 200 ng of a plasmid containing a  $\kappa$ B-luciferase firefly reporter gene under the control of six NF- $\kappa$ B promoter sites, 100 ng of a plasmid containing luciferase Renilla construct under the control of a SV40 promoter and an increase amount of human *IKBK* expression vector. The empty pcDNA3.1 vector was used to balance the transfected DNA concentration. The transfection was performed with Lipofectamine LTX and Plus Reagent (Life Technologies Corporation). Twenty-four



**Figure 1** Brain MRI of patients 1–3 and of age-matched controls. (a) Coronal Flair weighted images of patient 2 at 6.5 years show an important and extensive hyperintensities of the periventricular and subcortical white matter compared with a 5.5 year-old normal control (e). By contrast, the axial T2-weighted FSE images of the same boy (b) show no evident abnormalities compared with normal control (f). Coronal Flair (c) and axial T2 (d) weighted images of patient 3 show normal matter compared with same age normal control (e, f). Coronal Flair weighted FSE images of the patient 1 at 2.9 year-old (g) show an important delayed of myelination of the white matter compared with a 2.5 year-old normal control (h). By contrast, the coronal T2-weighted FSE images of the same patient (i) show no evident abnormalities of the white matter compared with normal control (j).

hours after transfection, cells were stimulated for 5 h with 10 ng/ml of TNF- $\alpha$  and luciferase activity was measured in a luminometer using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions.

## RESULTS

### IKBKG duplication in patients with white matter anomalies

Retrospective search for patients with cerebral MRI showing similar discordance between T2 and FLAIR sequences identified two patients originally diagnosed with a *MECP2* duplication syndrome (patients 1 and 2). About 120 affected males with *MECP2* gene duplication ranging from 0.3 to 8.0 Mb have been reported to date. Many children

exhibit delayed myelination of the cerebral white matter at the posterior part of the cerebral hemispheres, yet, these abnormalities are not constant features and data are not available regarding T2/FLAIR discordance.<sup>15–20</sup> We hypothesised that such neuroradiological variability might correlate with the variable extent of Xq28 duplication and abnormal expression of other(s) gene(s) located within the duplicated region.

Based on our previous results on *TRAPPC9* mutations, the gene encoding the inhibitor of kappa light polypeptide (*IKBKG*, MIM 300248, also known as NF- $\kappa$ B essential modulator) emerged as a strong candidate. Indeed, this gene, located 400 kb distal to *MECP2*, encodes the regulatory subunit of the IKK kinase complex.

To investigate whether *IKBK*G was duplicated we performed metaphase and interphase FISH analyses on leucocytes using the bacterial artificial chromosome clone RP11-103M23, which encompasses the *IKBK*G gene. Results demonstrated duplicated *IKBK*G in patients 1 and 2 but not in patients 3 and 4, suggesting a link between *IKBK*G duplication and white matter anomalies.

To further support our observations, we looked at the brain MRI of patient 5 who carries a recurrent 0.3 Mb-long Xq28 duplication identified in three X-Linked ID families and one sporadic ID patient.<sup>14</sup> The aneusomic chromosomal fragment includes 18 annotated genes including *IKBK*G. MRI showed white matter abnormal hyperintense signals on both FLAIR and T2-weighted sequences and thin corpus callosum.

### Effects of *IKBK*G duplication on gene expression

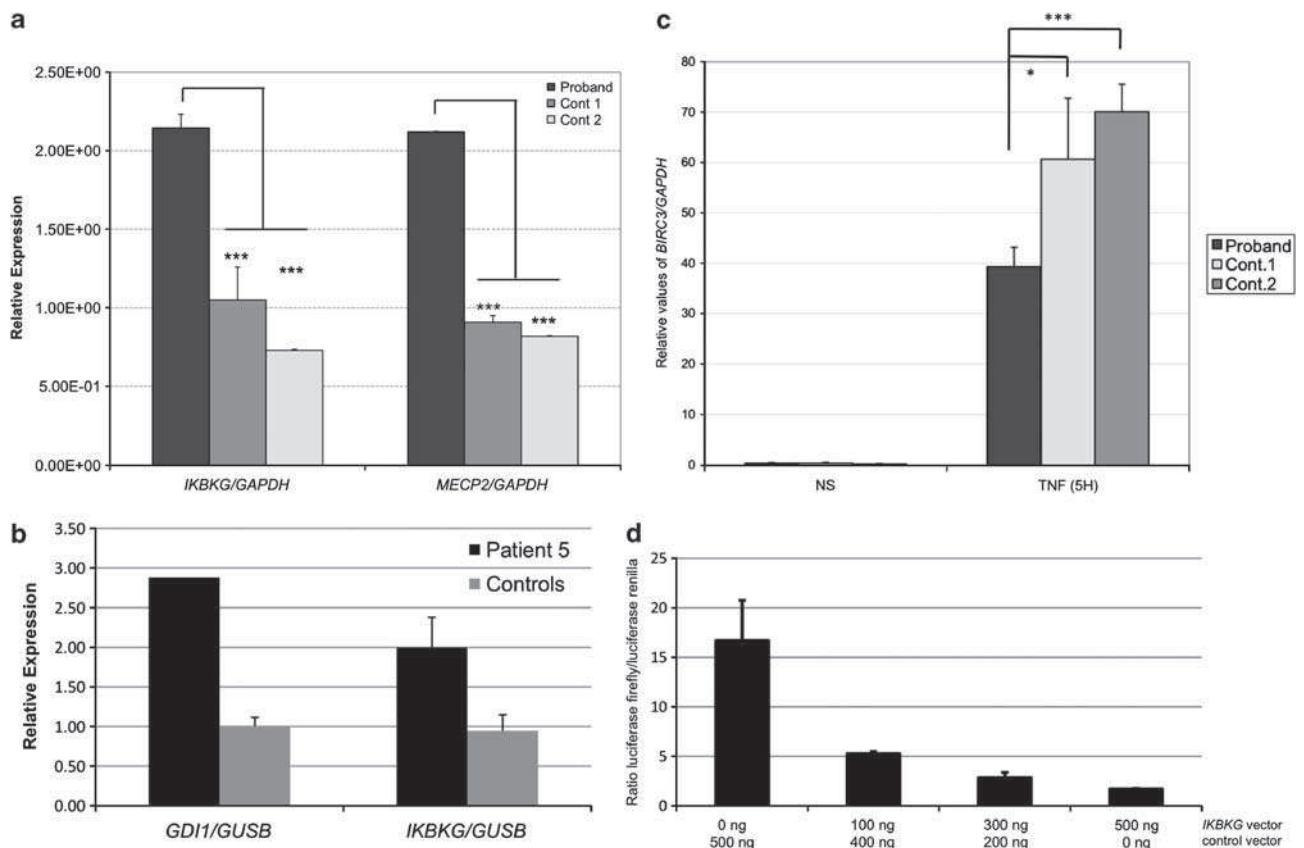
To evaluate the consequences of *IKBK*G duplication on the corresponding gene expression, we extracted and reverse transcribed RNA from cultured skin fibroblasts of patient 2. As expected, qRT-PCR demonstrated a two-fold overexpression of the *MECP2* transcript. In addition, these cells also displayed an increased level of the *IKBK*G transcript (Figure 2a). Similarly, an increased level of *IKBK*G

transcript was also observed in lymphoblastoid cell lines derived from patient 5 compared with controls (Figure 2b).

To confirm the pathogenic effect of *IKBK*G overexpression, we tested its impact on the induction of *c-IAP2* (also known as *BIRC3*) mRNA expression, an endogenous  $\kappa$ B-responsive gene, in response to TNF- $\alpha$ , a powerful activator of NF- $\kappa$ B signalling. Cultured fibroblasts from controls and patient 2 were TNF- $\alpha$  stimulated and *c-IAP2* mRNA expression was measured by qRT-PCR. TNF- $\alpha$  treatment of control cells resulted in a 40-fold increased in *c-IAP2* mRNA level as measured by qRT-PCR. By contrast, a 40% reduction of *c-IAP2* mRNA induction was observed in cells carrying the *IKBK*G duplication when compared with two gender-matched controls (Figure 2c). These results support the hypothesis of an impaired NF- $\kappa$ B signalling in cells carrying the *IKBK*G duplication.

Finally, SH-SY5H human neuroblastoma cells were co-transfected with a luciferase reporter gene under the control of NF- $\kappa$ B binding sites and increasing amounts of a *IKBK*G expression vector. We observed that increased amount of *IKBK*G expression vector resulted in dose-dependent inhibition of a TNF- $\alpha$  induced NF- $\kappa$ B activation (Figure 2d).

Taken together, these data demonstrate that *IKBK*G duplication results in a NF- $\kappa$ B signalling defect and is correlated with white matter anomalies.



**Figure 2** (a) qRT-PCR analysis of *IKBK*G and *MECP2* transcripts in fibroblast cells from two controls (grey bars) and patient 2 (black bars). Data are normalised to *GAPDH* mRNA. Means  $\pm$  SD are given ( $n=5$  independent experiments). \*\*\*Significance of difference with control values (Student's test),  $P<0.01$ . (b) RT-qPCR of *IKBK*G and *GDI1* transcripts in EBV-PBL cell lines from patient 5 (black bars) and three controls (grey bars). Normalised to *GUSB*. (c) Effect of *IKBK*G duplication on *c-IAP2* expression. Analysis of TNF- $\alpha$ -induced *c-IAP2* expression as detected by RT-PCR in skin fibroblast from patient 2. Data are normalised to *GAPDH*. Means  $\pm$  SD are given ( $n=3$  independent experiments). \*\*\*Significance of difference with control values  $P<0.01$  (Student's test) and \*significance of difference with control values  $P\leq 0.5$  (Student's test). (d) Overexpression of *IKBK*G inhibits NF- $\kappa$ B activation. SH-SY5H cells were co-transfected with a  $\kappa$ B-luciferase reporter construct under the control of IgK- $\kappa$ B sites and increasing amount of *IKBK*G expression vector. The empty pcDNA3.1 vector was used to balance the transfected DNA concentration. Twenty-four hours after transfection, the cells were stimulated for 5 h with 10 ng/ml of TNF- $\alpha$  and luciferase activity was measured. Overexpression of *IKBK*G causes significantly reduced luciferase activity.



## DISCUSSION

Axon myelination is essential for axonal insulation and saltatory conduction of action potentials in the vertebrate nervous system. The remarkable multi-layered myelin sheath structure is achieved by wrapping of the plasma membrane of specialized glial cells, oligodendrocytes in the CNS and Schwann Cells in the PNS, around large-calibre axons. Among the signalling pathways that orchestrate axonal ensheathment in the PNS via Schwann cell differentiation to a myelinating phenotype, NF- $\kappa$ B was shown to be crucial for insulating axons. By contrast, the role of NF- $\kappa$ B in mediating oligodendrocyte maturation, myelination, de- and remyelination in the CNS has been less investigated. A recent study highlighted IKK2-dependent NF- $\kappa$ B signalling as a key pathogenic pathway during toxic CNS demyelination in mice.<sup>21</sup> Yet, the exact contribution of astroglial NF- $\kappa$ B signalling to myelin formation during normal human CNS development remains largely unknown.

Our study supports the hypothesis of a correlation between cerebral white matter defects and impaired NF- $\kappa$ B signalling in humans. Taking into account our previous results on an autosomal recessive ID condition linked to *TRAPPC9* mutation,<sup>6</sup> these results strengthen the crucial role of NF- $\kappa$ B signalling for normal myelination process in the human CNS. Whether the MRI findings correspond to hypomyelination or dysmyelination remains unanswered. Reviewing a larger number of patients and regular MRI follow-up will be necessary to address this question.

Hypomyelination or myelination's arrest is observed in other Mendelian and chromosomal disorders such as Pelizaeus-Merzbacher disease (PMD, MIM 312080), Allan-Herndon-Dudley syndrome (AHDS, MIM 300523) and 18qter deletion syndrome. PMD is an X-linked disorder caused by mutation of the gene encoding the proteolipid protein (PLP), one of the major myelin proteins.<sup>22</sup> In this disorder, no or only a very little myelin is produced and high signal intensity is not restricted to FLAIR sequences alone, but also observed on T<sub>2</sub>-weighted images. AHDS is caused by mutations in a specific thyroid hormone transporter, the monocarboxylate transporter 8 (MCT8, SLC16A2). MRI imaging in these patients shows marked myelination delay that resembles the one observed in patient 1 and 2. Finally, reduction of cerebral white matter and delayed myelination are the main histopathological findings in 18q deletion syndrome and discordance between T2 and FLAIR sequences are often observed. White matter abnormalities observed in this contiguous gene syndrome likely result from the loss of the gene encoding the myelin basic protein (MBP), the second major myelin protein.<sup>23</sup>

Myelinogenesis requires dramatic changes in the pattern of gene expression in a highly coordinated manner. Expression of myelin-specific genes is controlled by several families of transcription factors. Interestingly, functional NF- $\kappa$ B cis-elements have been identified on *MBP* and *PLP* gene promoters and TNF- $\alpha$  was found to modulate *MBP* transcription through NF- $\kappa$ B in a human oligodendrogloma cell line.<sup>24</sup> Thus, impaired NF- $\kappa$ B signalling in the patients with *IKBKG* duplication could lead to misregulated *MBP* and/or *PLP* expression and myelination defect.

Beyond the demonstration that activation of NF- $\kappa$ B is an essential signal for the completion of myelination in CNS, these findings illustrate how brain MRI analysis can contribute to the understanding of pathophysiological mechanisms. Finally, they also suggest that it might be worth testing for NF- $\kappa$ B signalling integrity in patients with T2/Flair discordance.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the patients for their participation in the study. We sincerely acknowledge Elodie Bal for technical assistance and Sylvain Hanein for the gift of the SH-SY5 cell line. This study has been supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Agence Nationale de la Recherche (Grant NOANR-08-MNP-010) and the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur.

- 1 Israel A: The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; **2**: a000158.
- 2 Pereira JA, Lebrun-Julien F, Suter U: Molecular mechanisms regulating myelination in the peripheral nervous system. *Trends in Neurosciences* 2012; **35**: 123–134.
- 3 Nickols JC, Valentine W, Kanwal S, Carter BD: Activation of the transcription factor NF-kappaB in Schwann cells is required for peripheral myelin formation. *Nat Neurosci* 2003; **6**: 161–167.
- 4 Aggarwal S, Yurlova L, Simons M: Central nervous system myelin: structure, synthesis and assembly. *Trends in Cell Biology* 2011; **21**: 585–593.
- 5 Kremer D, Aktas O, Hartung H-P, Küry P: The complex world of oligodendroglial differentiation inhibitors. *Ann Neurol* 2011; **69**: 602–618.
- 6 Philippe O, Rio M, Carioux A *et al*: Combination of linkage mapping and microarray-expression analysis identifies NF-kappaB signaling defect as a cause of autosomal-recessive mental retardation. *Am J Hum Genet* 2009; **85**: 903–908.
- 7 Abou Jamra R, Wohlfart S, Zweier M *et al*: Homozygosity mapping in 64 Syrian consanguineous families with non-specific intellectual disability reveals 11 novel loci and high heterogeneity. *Eur J Hum Genet* 2011; **19**: 1161–1166.
- 8 Koifman A, Feigenbaum A, Bi W *et al*: A homozygous deletion of 8q24.3 including the NIBP gene associated with severe developmental delay, dysgenesis of the corpus callosum, and dysmorphic facial features. *Am J Med Genet A* 2010; **152A**: 1268–1272.
- 9 Marangi G, Leuzzi V, Manti F *et al*: TRAPPC9-related autosomal recessive intellectual disability: report of a new mutation and clinical phenotype. *Eur J Hum Genet* 2012; e-pub ahead of print 2 May 2012; doi:10.1038/ejhg.2012.79.
- 10 Mir A, Kaufman L, Noor A *et al*: Identification of mutations in TRAPPC9, which encodes the NIK- and IKK-beta-binding protein, in nonsyndromic autosomal-recessive mental retardation. *Am J Hum Genet* 2009; **85**: 909–915.
- 11 Mochida GH, Mahajnah M, Hill AD *et al*: A truncating mutation of TRAPPC9 is associated with autosomal-recessive intellectual disability and postnatal microcephaly. *Am J Hum Genet* 2009; **85**: 897–902.
- 12 Hu WH, Pendergast JS, Mo XM *et al*: NIBP, a novel NIK and IKK(beta)-binding protein that enhances NF-(kappa)B activation. *J Biol Chem* 2005; **280**: 29233–29241.
- 13 Bauters M, Van Esch H, Friez MJ *et al*: Nonrecurrent MECP2 duplications mediated by genomic architecture-driven DNA breaks and break-induced replication repair. *Genome Res* 2008; **18**: 847–858.
- 14 Vandewalle J, Van Esch H, Govaerts K *et al*: Dosage-dependent severity of the phenotype in patients with mental retardation due to a recurrent copy-number gain at Xq28 mediated by an unusual recombination. *Am J Hum Genet* 2009; **85**: 809–822.
- 15 Clayton-Smith J, Walters S, Hobson E *et al*: Xq28 duplication presenting with intestinal and bladder dysfunction and a distinctive facial appearance. *Eur J Hum Genet* 2009; **17**: 434–443.
- 16 Kirk EP, Malaty-Brevaud V, Martini N *et al*: The clinical variability of the MECP2 duplication syndrome: description of two families with duplications excluding L1CAM and FLNA. *Clin Genet* 2009; **75**: 301–303.
- 17 Lugtenberg D, Kleefstra T, Oudakker AR *et al*: Structural variation in Xq28: MECP2 duplications in 1% of patients with unexplained XLMR and in 2% of male patients with severe encephalopathy. *Eur J Hum Genet* 2009; **17**: 444–453.
- 18 Meins M, Lehmann J, Gerresheim F *et al*: Submicroscopic duplication in Xq28 causes increased expression of the MECP2 gene in a boy with severe mental retardation and features of Rett syndrome. *J Med Genet* 2005; **42**: e12.
- 19 Prescott TE, Rodningen OK, Bjornstad A, Stray-Pedersen A: Two brothers with a microduplication including the MECP2 gene: rapid head growth in infancy and resolution of susceptibility to infection. *Clin Dysmorphol* 2009; **18**: 78–82.
- 20 Velinov M, Novelli A, Gu H *et al*: De-novo 2.15 Mb terminal Xq duplication involving MECP2 but not L1CAM gene in a male patient with mental retardation. *Clin Dysmorphol* 2009; **18**: 9–12.
- 21 Raasch J, Zeller N, van Loo G *et al*: IkkappaB kinase 2 determines oligodendrocyte loss by non-cell-autonomous activation of NF-kappaB in the central nervous system. *Brain* 2011; **134**: 1184–1198.
- 22 Saugier-Verber P, Munnich A, Bonneau D *et al*: X-linked spastic paraplegia and Pelizaeus-Merzbacher disease are allelic disorders at the proteolipid protein locus. *Nat Genet* 1994; **6**: 257–262.
- 23 Gay CT, Hardies LJ, Rauch RA *et al*: Magnetic resonance imaging demonstrates incomplete myelination in 18q- syndrome: evidence for myelin basic protein haploinsufficiency. *Am J Med Genet* 1997; **74**: 422–431.
- 24 Huang CJ, Nazarian R, Lee J, Zhao PM, Espinosa-Jeffrey A, de Vellis J: Tumor necrosis factor modulates transcription of myelin basic protein gene through nuclear factor kappa B in a human oligodendrogloma cell line. *Int J Dev Neurosci* 2002; **20**: 289–296.

## DISCUSSION ET CONCLUSIONS GENERALES

Le déficit intellectuel concerne près de 3% de la population générale et est le handicap le plus fréquent de l'enfant et du jeune adulte. Toutefois, malgré les avancées importantes dans le domaine de la génétique médicale et de la biologie moléculaire, l'étiologie de la maladie reste inconnue pour près de 50% des cas.

L'objectif de ce travail de thèse était de contribuer à une meilleure compréhension des bases moléculaires et physiopathologiques des formes autosomiques récessives de DI. L'approche utilisant la cartographie par autozygotie a mené à l'identification de nouveaux gènes responsables de DI-AR (*TRAPPC9* et *AP4B1/AP4E1/AP4S1*). Mes résultats ont aussi permis de définir un nouveau syndrome : le syndrome AP4.

Ce travail illustre les forces et les limites de cette stratégie. Il nous a permis de proposer des hypothèses quant aux mécanismes physiopathologiques responsables des signes observés chez les patients et apporte de nouveaux éléments en faveur du rôle du complexe AP4 et de la voie NF- $\kappa$ B dans le SNC.

## **1) Les stratégies utilisées**

### **1.1) La cartographie par autozygotie**

La cartographie par autozygotie est la base des différentes stratégies utilisées au cours de ces travaux. Nos résultats attestent de son efficacité mais soulignent également ses limites:

- Lorsque le taux de consanguinité est élevé, comme c'est fréquemment le cas dans nos études (descendance issue de cousins germains ou de seconds cousins), la taille des régions peut être conséquente et/ou plusieurs régions peuvent être identifiées. Ce fut le cas notamment pour la famille BM pour laquelle deux régions candidates ont été définies. Dans certains cas, l'analyse de marqueurs microsatellite permet de réduire la taille et/ou le nombre des régions candidates mais ce ne fut pas le cas pour cette famille pour laquelle les deux régions ont donc été conservées pour la suite de l'étude. De plus, les régions de très grande taille sont parfois considérées comme meilleures candidates, mais de nombreux exemples démontrent que ce n'est pas toujours le cas.
- parfois, l'analyse de certaines familles consanguines ne permet pas d'identifier de région d'IBD. Plusieurs exemples, de mutations hétérozygotes composites dans un même gène, de mutations homozygotes dans un même gène mais distinctes d'un enfant à l'autre, ou

encore de loci différents ont été décrits dans la littérature (Benayoun L, *et al.* 2009; Ducroq D, *et al.* 2006; Laurier V, *et al.* 2006; Lezirovitz K, *et al.* 2008; Saadi A, *et al.* 2009).

- Enfin, l'hypothèse de pathologies polygéniques n'est pas à exclure.

Malgré ces limites, la cartographie par autozygotie reste une stratégie de choix dans l'analyse des familles consanguines atteintes de pathologies récessives.

## **1.2) Du locus au gène**

### **1.2.1) Stratégie du gène candidat**

La stratégie gène candidat a démontré son efficacité au cours des dernières années. Elle fait intervenir toutes les informations connues pour chaque gène et répertoriées dans les banques de données en ligne. La majorité des gènes humains est aujourd'hui bien caractérisée. De nombreux projets internationaux visent à construire des catalogues aussi complets que possible de modèles génétiques animaux. Ils sont de précieux outils pour orienter le choix des gènes à analyser.

C'est notamment grâce aux données de la littérature, concernant les pathologies liées à des défauts des complexes AP (en particulier *AP1S2* responsable d'une DI-LX), que le gène *AP4B1* a été considéré comme un bon gène candidat, dans la famille Ja. Cette approche reste cependant longue et fastidieuse et de nouvelles stratégies visant à orienter le choix des gènes candidats se développent.

### **1.2.2) Analyses transcriptomiques**

Pour les familles étudiées au cours de mon doctorat, nous avons souhaité optimiser la recherche de gènes candidats en combinant la cartographie par autozygotie à une analyse d'expression génique. Cette approche s'est révélée fructueuse mais plusieurs limites ont été déterminées :

1- le gène doit être exprimé dans le type cellulaire étudié (dans les lignées de fibroblastes, c'est souvent le cas pour la majorité des gènes de DI).

- 2- la variation pathogène doit conduire à l'apparition d'un codon de terminaison de traduction prématuré (PTC pour Premature Termination Codon) reconnu par le mécanisme du NMD.

Le NMD est un mécanisme complexe très conservé de la levure à l'homme qui permet le contrôle de l'intégrité des ARNm. Cependant, certains PTC échappent au NMD. Parmi ces exceptions, se trouvent les ARNm dont les PTC sont situés soit dans le dernier exon codant soit à moins de 55 nucléotides en amont de la dernière jonction exon-intron (Holbrook JA, *et al.* 2004 ; Bhuvanagiri M, *et al.* 2010).

D'autres exemples de PTC échappant au NMD ont été rapportés dans la littérature. Ainsi certaines mutations non-sens situées dans l'exon 1 du gène de la chaîne  $\beta$  de la globine échappent au mécanisme du NMD (Neu-Yilik G, *et al.* 2011). Cela se traduit par une accumulation de l'ARNm muté dans la cellule et entraîne une forme plus légère mais symptomatique de la  $\beta$ -thalassémie, qui est une pathologie récessive à l'exception de ce cas-là.

De même, l'équipe d'Asselta et collaborateurs a décrit des mutations non-sens homozygotes dans la chaîne  $A\alpha$  du fibrinogène échappant au mécanisme du NMD, bien qu'elles soient situées en amont des 55 nucléotides précédant la dernière jonction exon-intron (Asselta R, *et al.* 2001). A l'état homozygote, ces mutations causent l'afibrinogénémie (MIM : 202400), pathologie autosomique récessive entraînant des troubles de la coagulation. De même, notre équipe a démontré que le syndrome de Marshall-Smith était dû à des mutations dominantes négatives du gène *NFIX*, conséquence d'un échappement de mutations frameshift aux mécanismes de NMD (Malan V, *et al.* 2010).

Enfin, des processus d'édition de l'ARNm créant des PTC, ne sont pas reconnus par le NMD, sans que le mécanisme ne soit compris. C'est notamment le cas du gène *APOB* dont l'édition d'une cytosine en uracile crée un codon de terminaison. L'ARNm de l'*APOB* n'est pas dégradé et est traduit en une protéine plus courte appelée APOB48. La protéine initiale n'ayant pas été éditée se nomme APOB100. Ces deux protéines ont des fonctions distinctes et sont des tissus spécifiques (Chester A, *et al.* 2003). Ainsi, il existe des cas physiologiques de PTC qui échappent au NMD et qui sont avantageux pour la cellule puisque deux protéines résultent d'un même gène.



Outre ces exceptions, les études d'expression menées au cours de ces travaux ont révélé d'autres limites inhérentes à la technique.

- 1) Le traitement informatique des données issues de ces analyses diminue les variations du niveau des transcrits dans la cellule.
- 2) L'étude pan-génome de tous les transcrits présents sur la puce transcriptomique, chez un même individu, montre de fortes diminutions ou augmentations d'expression d'un grand nombre d'ARNm. Pour citer quelques chiffres extraits de l'étude de la famille BM, le nombre total de sondes interprétables est de 54 677. Parmi l'ensemble de ces sondes, 2 357 montrent un taux significativement diminué (soit 4,3% de l'ensemble des résultats) et 433 sont significativement augmentées (soit 0,80%) par rapport aux contrôles. Il est donc nécessaire de combiner cette approche à une étude de liaison pour limiter l'analyse des résultats au(x) locus(i) d'intérêt(s).
- 3) La diminution du transcrit n'est pas obligatoirement visible par l'analyse du transcriptome. C'est l'observation que nous avons faite pour la famille Ja qui pourtant remplissait toutes les conditions de réussite pour cette stratégie. Le gène *AP4B1* est exprimé dans les lymphocytes et présente une mutation non-sens pathogène à l'origine d'un NMD. Cependant, les résultats du transcriptome ne montraient aucune diminution significative pour le gène *AP4B1* chez la patiente Ja contrairement aux résultats de RT-PCR quantitative. Nous avons fait l'hypothèse que cette observation pourrait être due à l'immortalisation des cellules par l'EBv qui pourrait modifier le profil d'expression génique de ces cellules.

### 1.2.3) Les nouvelles approches de séquençage à haut-débit

Le premier projet de séquençage à haut-débit a été réalisé au cours du projet IGOLD qui consistait à la capture des séquences codantes de la quasi-totalité des gènes du chromosome X, soit 718 gènes. Les résultats visant à la recherche d'étiologie dans des DI-LX montrent que la mutation causale a été identifiée dans seulement 25% des familles. Les auteurs ont conclu que l'approche semble limitée et suggèrent la présence de mutations pathogéniques dans des

séquences non codantes. Ils soulèvent également l'importance de pouvoir distinguer les mutations pathogènes des variants rares, problème inhérent à l'augmentation de l'information apportée par le séquençage à haut débit (Raymond FL, *et al.* 2009).

Récemment, la révolution génomique a conduit au développement de nouveaux outils de séquençage à haut-débit. En effet, le séquençage de type « Sanger » (méthode des di-désoxynucléotides terminateurs) a permis les progrès de la génomique jusqu'en 2006 mais les applications restent limitées par le coût. Une nouvelle génération de séquenceurs à haut débit permet désormais de séquencer plusieurs giga bases d'ADN en quelques jours et à un coût très inférieur. Parallèlement au développement de ces technologies, des méthodes de «capture de séquences» par hybridation, permettant de cibler des régions d'intérêt, ont été mises au point. Ces deux techniques permettent donc le séquençage massif de tout ou partie d'un génome afin d'identifier les variations.

Si les régions régulatrices de l'ADN, les microARNs et autres éléments modulateurs suscitent aujourd'hui beaucoup d'intérêt, il n'en reste pas moins que la majorité des mutations impliquées dans des maladies génétiques mendéliennes a été décelée dans les régions codantes. L'exome, correspondant à l'ensemble des séquences codantes du génome soit 2% à 3% de notre ADN (environ 50 Mb), reste pertinent dans l'analyse d'identification de nouveaux gènes responsables de maladies génétiques. Cette révolution technique est devenu une stratégie incontournable dans l'identification de mutations à l'origine de maladies génétiques humaines, aussi bien récessives que dominantes (Ng SB & Buckingham KJ, *et al.* 2010).

Cependant, cette approche présente aussi des limites. Outre les problèmes techniques, la principale difficulté que pose ces approches de séquençage à haut débit est le traitement et l'analyse informatique posé par la quantité massive de données générées par ces technologies. L'exome de chaque individu comporte un très grand nombre de variants par rapport à la séquence humaine de référence. Ces variants doivent donc être filtrés sur la base de leur absence chez des individus sains (en excluant tous les SNP observés dans des bases de données tels que dbSNP, 1000 genomes ou NHLBI Exome Sequencing Project). Ces filtres permettent de réduire de façon importante le nombre de variants potentiellement pathogènes mais ne suffisent pas à identifier le variant causal pour chaque patient. D'autres stratégies d'analyses

sont ensuite élaborées en fonction des hypothèses cliniques établies au cours de l'étude : recherche de différents variants au sein d'un même gène, chez plusieurs individus présentant les mêmes signes cliniques ; analyse de trios parents/enfants pour identifier des variants survenus *de novo* dans le cas de maladies dominantes ; croisement des données d'exome et d'analyse de liaison dans le cas de grande fratrie et/ou de transmission sur le mode récessif.

L'étude Irano-allemande de Ropers HH, illustre bien les forces et les faiblesses de ce nouvel outil d'analyse dans le domaine des DI (Najmabadi H, *et al.* 2011). Leur travail a débuté par une étude de liaison utilisant la cartographie par autozygotie chez 138 familles consanguines atteintes de DI-AR, afin d'identifier les régions d'IBD. Dans un second temps, une puce de capture couvrant l'ensemble des régions candidates a été développée pour le séquençage de la totalité de ces régions chez le proband de chaque famille. Pour 78 de ces familles, l'analyse a permis d'identifier une variation prédite pathogène et pouvant expliquer la pathologie. Parmi les 78 familles, 26 d'entre elles correspondent à des mutations géniques précédemment identifiées et liées à des DI-AR principalement syndromiques (ex : *WDR62*, *SRD5A3*, *AHI*). Les 50 autres mutations identifiées à ce jour (voir table 11) fournissent donc une liste importante de nouveaux gènes candidats de DI-AR. Cependant, en l'absence d'autres patients liés à ces loci ou de toute analyse fonctionnelle, la pathogénicité de ces mutations reste non démontrée. Enfin, 37 familles présentent plusieurs mutations prédites pathogènes et ne permettent pas de savoir si c'est l'association de ces variations qui serait à l'origine des signes cliniques observés (maladies polygéniques) ou si c'est l'une d'entre elles qui serait le variant causal.

Table 11 : Gènes impliqués dans des désordres cognitifs et mis en évidence par l'approche de l'exome sur une cohorte de 138 familles

Family ID	Protein Change	Base Change	Clinical features	ID
8303971	KDM6B:P888S	chr17:7692993C>T	ID, facial dysmorphism, syndactyly, short toes	moderate
8307998	PMM2:Y106F	chr16:8807735A>T	ID, thin upper lip, flat nasal bridge, strabismus	mild
8500058	FASN:R1819W	chr17:77634477G>A	Non-syndromic	moderate
8500061	ELP2:R462L	chr18:31990536G>T	Non-syndromic	mild
8500306	COQ9:R27G	chr16:56042458C>G	ID, ASD, ataxia, cerebellar atrophy	moderate
8600005	DYRK4:H435P	chr12:4592128A>C	ID, foot deformities in two patients	severe
8600041	TH:R202H	chr11:2145711C>T	Compatible with known AR Segawa syndrome	severe
8600042	SLC2A1:V237M	chr1:43168009C>T	Non-syndromic	moderate
8600060	MAN1B1:R334C	chr9:139115361C>T	Non-syndromic	mild-moderate
8600162	PRKRA:S235T	chr2:179009198C>G	Non-syndromic	
8600277	NDST1:R709Q	chr5:149905222G>A	Non-syndromic	mild
8600486	NAGLU:R565Q	chr17:37949244G>A	ID, ASD, coarse facial features	severe
8700017	SRD5A3:Y169C	chr4:55925139A>G	Kahrizi syndrome	moderate-severe
8700136	DNAH14:R256Q	chr1:223223199G>A	Non-syndromic, ASD	mild
G001	C12orf57:M1V	chr12:6923546A>G	Non-syndromic	severe
G008	SURF1:W227R	chr9:135209194A>G	ID, ataxia, short stature, facial dysmorphisms	mild
M004	AP4M1:E193K	chr7:99539684G>A	ID, microcephaly, spastic paraplegia	severe
M007_L	MYBPC1:G29R	chr12:100535134G>A	Non-syndromic	moderate
M017N	VRK1:R133C	chr14:96388943C>T	Clinically compatible with ponto-cerebellar hypoplasia type 1	moderate-severe
M034	RGAG4:S112R	chrX:71267780G>T	Non-syndromic	moderate
M050	ERLIN2:R36K	chr8:37714705G>A	ID with paraplegia	severe
M061	KDM5A:R719G	chr12:302629G>C	ID with facial dysmorphism	moderate
M090	HSPG2:D2212N	chr1:22051870C>T	ID, facial dysmorphism and joint hypermotility	mild
M100	C8orf41:P367L	chr8:33480823G>A	Non-syndromic	moderate
M107	CA8:R237Q	chr8:61297790C>T	ID, ataxia	mild-moderate
M122	CABP2:R63Q	chr11:67046618C>T	Non-syndromic with ASD	severe
M124	C9orf100:R182W	chr9:35653319G>A	ID, microcephaly, short philtrum, spasticity in one affected	severe
M142	MED13L:R1416H	chr12:114908545C>T	Non-syndromic	mild
M144	COQ5:G118S	chr12:119444400C>T	Non-syndromic	severe
M146	KIR2DS4:G12A	chr19:60038346G>C	NR	
M149	INPP5D:R157Q	chr2:233698819G>A	Non-syndromic	moderate-severe
M157	RNF2:C384R	chr12:115758420T>C	Non-syndromic	mild-severe
M160	TMEM135:C228S	chr11:86694676G>C	ID, microcephaly, congenital cataract	moderate-severe
M165	HEXA:C58Y	chr15:70455195C>T	ID. Seizures	moderate
M173	ADK:H324R	chr10:76138142A>G	Non-syndromic, ASD	mild-moderate
M175	PRDM15:G124D	chr21:42171915C>T	ID, retinopathy	mild-severe
M177	TAF2:W649R	chr8:120864969A>G	ID, microcephaly, foot deformity	moderate-severe
M182	C11orf46:R236H	chr11:30314842G>A	Non-syndromic	moderate
M196	KCNJ14:R72H	chr19:53657008G>A	NR	moderate
M226	ASCC3:S1564P	chr6:101179884A>G	Non-syndromic	mild
M235	C14orf148:V269M	chr14:76942109C>T	ID, congenital cataract	moderate
M248	MRPS23:P59H	chr17:53281639G>T	Non-syndromic	moderate
M251	GON4L:D1522G	chr1:154001323T>C	ID, facial dysmorphism, malformed ears	severe
M254	AP4E1:V454fs	chr15:49029357-49029358ins2	ID, microcephaly, spastic paraplegia	moderate
M266_1	NKD2:R243C	chr5:1089439C>T	Non-syndromic	moderate
M266_2	ADRA2B:R440G	chr2:96144298G>C	Non-syndromic	moderate
M269	FREM2:Q178K	chr13:38160013C>A	ID with hearing loss and strabismus	mild
M305	SLC24A3:D8G	chr20:19141509A>G	Non-syndromic	severe
M324	BBS7:533del2aa	chr4:122973915-122973920del6	ID, polydactyly, obesity	severe

Table réalisée à partir des résultats obtenus par l'équipe de H Hilger Ropers (Najmabadi H, *et al.* 2011). Seuls les gènes prédits « Damaging » (c'est-à-dire dont le variant entraîne un impact négatif probable sur la fonction de la protéine concernée) par l'un ou les deux sites de prédiction (Polyphen et SIFT) ont été conservés. De plus, seuls les familles avec une seule variation pathogène sont représentées. NR : Non renseigné.

Toutes ces stratégies d'analyse de séquençage à haut-débit ont permis l'identification des causes de nombreuses maladies génétiques au cours des trois dernières années et en particulier dans le domaine des DI. Cependant, malgré la puissance de ce nouvel outil, la validation fonctionnelle des variants ainsi identifiés demeure une étape importante dans la compréhension de mécanismes physiopathologiques d'une maladie génétique.

### **1.3) Identification de variants pathogènes et validations : TRAPPC9 et complexe AP4**

Trois approches successives sont généralement utilisées pour tenter de valider les variants identifiés. La première consiste à s'assurer de l'absence du variant d'intérêt dans une large population de personnes saines et originaires de la même ethnie que les patients. La deuxième vise à corrélérer l'anomalie génétique identifiée avec une anomalie fonctionnelle de la protéine correspondante. Enfin, la troisième s'appuie sur le recrutement de patients présentant des signes cliniques similaires pour démontrer que d'autres mutations du même gène conduisent au même phénotype.

Au cours de ces travaux, de nouveaux gènes responsables de DI-AR ont été caractérisés. La cartographie par autozygotie suivie d'une stratégie du gène candidat a permis l'identification d'une mutation d'*AP4B1* tandis qu'en alliant cartographie par autozygotie et étude d'expression, nous avons identifié une mutation dans *TRAPPC9*. En plus des approches fonctionnelles que nous avons validées, ces résultats ont depuis été largement confirmés puisque d'autres patients liés à ces loci ont été rapportés dans la littérature.

En effet, six autres familles dans lesquelles ségrègent des mutations/microdélétion de *TRAPPC9* ont été décrites (Mochida GH, *et al.* 2009 ; Mir A, *et al.* 2009, Koifman A, *et al.* 2010, Abou Jamra R, *et al.* 2011 et Marangi G, *et al.* 2012). La comparaison de tous ces patients a permis de préciser le phénotype lié aux mutations de *TRAPPC9*. La pathologie touche aussi bien les hommes que les femmes et se manifeste par : une hypotonie néonatale, une marche acquise tardivement mais aucun défaut moteur n'est rapporté par la suite, une microcéphalie postnatale variable (absente à sévère (-4 DS)), un langage souvent inexistant ou restreint à quelques mots, une obésité tronculaire qui disparaît avec l'âge, une caractère amical mais parfois associé à des signes d'hyperactivité, une compréhension restreinte des commandes, des mouvements

stéréotypiques et une absence d'autonomie. Pour une famille, la perte de dents et une perte de poids à un âge proche de 20 ans sont rapportées et constituent de nouveaux éléments de diagnostic, s'ils sont confirmés par la suite chez d'autres patients. Les IRM révèlent un corps calleux fin, avec parfois un volume réduit du cervelet et des anomalies de la substance blanche.

De même le rôle des anomalies du complexes AP4 dans l'étiologie des paraplégies spastiques héréditaires a été largement démontré. Deux nouvelles familles mutées pour les gènes *AP4M1* et *AP4E1* ont été publiées récemment (Najmabadi H, *et al.* 2011). A ce jour, neuf familles ont donc été liées à un défaut du complexe AP4. L'ensemble de ces données cliniques permet aussi de préciser la description du syndrome AP4. Les patients présentent une hypotonie néonatale qui évolue en hypertonie musculaire, conduisant à une spasticité des membres inférieurs ; les signes de Babinski ; la marche est souvent acquise normalement puis tend à disparaître vers l'âge de 2,5 ans (les patients sont le plus souvent en fauteuil roulant) ; le langage est majoritairement absent et la compréhension est limitée. Certains sont atteints d'épilepsie. La diminution de la taille est souvent rapportée. Leurs caractères sont décrits comme joyeux, amicaux, timides accompagnés de rires stéréotypiques sans raison apparente.

## **2) Description clinique des patients : le point clé**

Ces travaux mettent une fois de plus en lumière, l'importance de la description clinique dans la recherche d'étiologies des DI.

Dans la première partie de ce manuscrit, nous avons montré que le phénotype décrit chez la famille Ja a permis le recrutement d'autres patients pouvant confirmer l'association d'une déficience du complexe AP4 et d'un ensemble de symptômes précis. Ceci a également permis d'affiner la description clinique du syndrome AP4 et ouvre des perspectives importantes pour le conseil génétique.

Dans la seconde partie de ce manuscrit, nous avons recruté une cohorte de patients basée sur un signe rarement observé à l'IRM : la discordance des anomalies de la substance blanche observées entre les séquences T2 et FLAIR. Ce travail a permis d'établir un lien entre des anomalies de la myéline et des défauts de la voie de signalisation NF-κB.

### **3) Deux mécanismes physiopathologiques responsables de DI**

Les résultats présentés dans ce manuscrit ainsi que l'accroissement de nos connaissances sur l'étiologie des DI d'ordre génétique semblent montrer que des mécanismes moléculaires sont communs entre plusieurs de ces pathologies.

#### **3.1) Trafic cellulaire des récepteurs au glutamate**

Le trafic cellulaire impliqué dans la mise en place des récepteurs au glutamate joue un rôle prépondérant dans la plasticité synaptique. Cette classe de protéines constitue donc de bons gènes candidats pour les DI.

##### **3.1.1) Défaut de prise en charge du glutamate dans le SNC**

En effet, de nombreux gènes précédemment identifiés dans des DI, démontrent l'importance des acteurs protéiques impliqués dans des complexes prenant en charge le glutamate dans le SNC.

*SYNGAP1* (MIM 603384) code pour une Ras-GTPase-Activating Protein spécifique des synapses de l'excitation neuronale. Elle fait partie des protéines présentes à la densité post-synaptique des neurones glutamatergiques (Chen HJ, *et al.* 1998). *SYNGAP1* pourrait participer à la régulation du trafic des récepteurs AMPA, à l'excitation neuronale et au *silencing* de la synapse. En effet, *SYNGAP1* régule négativement les Ras protéines exprimées au niveau des axones et des cônes de croissance neuronaux et sa surexpression bloque l'expansion de neurites dans des cellules granulaires murines (Rumbaugh G, *et al.* 2006). Des mutations hétérozygotes ont été associées à une DI-AD (MRD5, MIM : 603384) (Hamdan FF, *et al.* 2009).

*GRIK2* code la protéine GluR6, une sous-unité du récepteur Kainate au glutamate, neurotransmetteur essentiel à la plasticité synaptique (Contractor A, *et al.* 2001). Des anomalies géniques de *GRIK2* sont liées à une DI-AR (MRT6, MIM : 611092).

Des mutations de *CACNG2* (MIM 602911) ont été associées à une DI-AD (MRD10, MIM 614256) non syndromique (Hamdan FF, *et al.* 2011). *CACNG2*, connue également sous le nom de Stargazine, aurait un rôle dans deux fonctions du SNC : elle fait partie de la famille des TARPes et

participe donc au trafic cellulaire des récepteurs AMPA (notamment dans leurs localisations membranaires); et elle aurait des propriétés favorisant l'ouverture de canaux ioniques membranaires au niveau de la synapse (Tomita S, *et al.* 2004 ; Tomita S, *et al.* 2005). De façon intéressante, CACNG2 co-immunoprécipite avec MAGI2 (MIM 602911) dont le gène a été associé à une forme de DI avec spasmes infantiles (Deng F, *et al.* 2006 ; Marshall CR, *et al.* 2008).

Enfin, le gène *GRIN1* (MIM 138249) impliqué dans une DI-AD (MRD8, MIM : 614254), code une sous-unité du récepteur au glutamate NMDA : NMDAR1 (Hamdan FF, *et al.* 2011).

Ces études soulignent l'importance des acteurs protéiques prenant en charge le glutamate dans le SNC dans l'étiologie des DI. Nos travaux sur la déficience du complexe AP4 suggèrent l'importance du rôle du trafic vésiculaire, impliqué dans le transport des récepteurs au glutamate au sein du neurone post-synaptique et jouant un rôle dans la plasticité cérébrale.

### 3.1.2) Récepteurs au glutamate : le point

Le glutamate est le principal neurotransmetteur exciteur du cerveau des vertébrés. Il est impliqué dans différents aspects de son développement (neurogénèse, migration cellulaire, synaptogenèse) et participe à de nombreuses fonctions cérébrales (mémoire, apprentissage). Le glutamate peut néanmoins être neurotoxique et contribuer à des maladies neurodégénératives et à l'épilepsie. La fonction physiologique ou pathologique du glutamate est déterminée par le profil spatio-temporel de sa concentration au sein de l'espace extracellulaire. Celui-ci est contrôlé par des transporteurs membranaires localisés au niveau des neurones et des cellules gliales dont la principale fonction est de recapter et transporter le glutamate du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire où le glutamate pourra à nouveau être utilisé pour la neurotransmission ou catabolisé. Trois familles de récepteurs sont capables de fixer le glutamate relargué dans la fente synaptique: les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate), les récepteurs AMPA (amino-3-hydroxy-5-méthyl-4- isoxazole propionique) et les récepteurs au kainate. Ce sont tous trois des canaux ioniques transmembranaires mais aux fonctions distinctes. Lorsque le glutamate se lie à l'un de ces récepteurs-canaux, ceux-ci laissent entrer des cations (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>). L'entrée de charges positives, active alors les canaux sodiques voltage-dépendants qui déclenchent la décharge d'un potentiel d'action (Payne HL, *et al.* 2008).



Les propriétés fonctionnelles qui distinguent ces récepteurs leur font jouer un rôle différent dans la potentialisation à long terme (LTP), un processus de renforcement durable de l'efficacité de connexions synaptiques ayant été stimulées de façon répétée et soutenue, base de la plasticité synaptique.

Les récepteurs NMDA, du fait de leur forte perméabilité au calcium, sont essentiels à l'induction de la LTP, mais ne sont pas sujets à potentialisation (Tomita S, *et al.* 2005 ; Zorumski CF, *et al.* 2012). Les récepteurs AMPA sont quant à eux, les cibles principales de la plasticité : leur nombre s'accroît dans la zone post-synaptique, entraînant une augmentation du signal post-synaptique. Les processus mis en jeu sont complexes et font intervenir phosphorylation par la calmoduline kinase II, exocytose et stabilisation des récepteurs AMPA par des protéines d'ancrage au niveau post-synaptique (Payne HL, *et al.* 2008 ; Molnar E, *et al.* 2011).

Le trafic des AMPAR est, par ailleurs, régulé en grande partie par la famille des TARPs (Transmembrane AMPAR Regulatory Protein) composée principalement par les Stargazines  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$ ,  $\gamma 4$  et  $\gamma 8$ . Elles sont capables d'entrer en interaction avec la partie C-ter cytosolique des sous-unités composant les AMPAR. Les TARPs ont un rôle dans le trafic des AMPAR mais assurent également un contrôle des propriétés biophysiques de leurs canaux ioniques (Payne HL, *et al.* 2008 ; Tomita S, *et al.* 2005). De plus, les gènes codant pour les sous-unités des AMPAR sont particulièrement exprimés au niveau de l'hippocampe (impliqué dans la plasticité synaptique), le cortex et le cervelet (Moriyoshi K, *et al.* 1991).

Enfin, les récepteurs au Kainate, présents dans la densité post-synaptique, ont un rôle indépendant à l'activation des NMDAR et pourrait participer à la LTP au niveau de l'hippocampe (Contador A, *et al.* 2001) ainsi qu'à la dépolarisation membranaire impliquée dans l'influx nerveux neuronal (Tomita S, *et al.* 2005). Le récepteur au Kainate aurait également un rôle dans les neurones pré-synaptiques notamment dans la régulation du relargage des neurotransmetteurs dans la fente synaptique (Contador A, *et al.* 2001).

### 3.1.3) Complexe AP et plasticité synaptique

Le syndrome AP4 a permis de mettre en évidence quatre gènes impliqués dans le trafic cellulaire : *AP4M1*, *AP4E1*, *AP4S1* et *AP4B1*. Un défaut du trafic neuronal a été démontré chez la

souris *AP-4B*<sup>-/-</sup>, notamment dans le recyclage et la mise en place des récepteurs AMPA au niveau de la synapse. En effet, chez les souris *AP-4B*<sup>-/-</sup>, l'absence du complexe AP4 engendre une anomalie de transport de la TARP (intermédiaire protéique entre le complexe AP4 et les AMPAR) qui se retrouve anormalement accumulée, associée aux AMPAR, au niveau des autophagosomes, lieux de dégradation des protéines (voir figure 13).

Dans la même famille de protéine, le gène *AP1S2* (sous-unité sigma), dont la protéine est intégrée au complexe AP1, a été identifié chez plusieurs familles atteintes de DI-LX. Le complexe AP1 est indispensable pour la vie. Il participe au transport de protéines en sortie du trans-Golgi vers les endosomes précoces. La sous-unité Sigma peut être codée par trois gènes distincts ( $\sigma 1$ ,  $\sigma 2$  et  $\sigma 3$ ). Chez la souris, l'inactivation du gène  $\sigma 1$  est létale embryonnaire. En revanche l'abolition du gène  $\sigma 2$  n'entraîne pas de décès *in utero* et les souris sont viables et fertiles. L'absence de la protéine  $\sigma 2$  (orthologue du gène *AP1S2* humain) montre des anomalies motrices chez les souris et un défaut de la mémoire spatiale. Au niveau moléculaire, des anomalies de recyclage des vésicules synaptiques des neurones de l'hippocampe ont été notifiées. Ces vésicules ont un rôle essentiel dans la plasticité synaptique car elles permettent l'internalisation de neurotransmetteurs en provenance de la synapse. Leur recyclage est indispensable pour leur bon fonctionnement (Glyvuk N, *et al.* 2010). Des anomalies génétiques liées au gène *AP1S2* ont été rapportées chez huit familles indépendantes dans des cas de DI-LX (ou dans un cas le syndrome de Fried) (Tarpey PS, *et al.* 2006 ; Saillour Y, *et al.* 2007 ; Borck G, *et al.* 2008 ; Ballarati L, *et al.* 2011).

Ces études mettent en exergue l'importance du trafic cellulaire, au niveau du neurone post-synaptique, des récepteurs au glutamate dans la plasticité synaptique et donc son implication dans les DI.

## **3.2) TRAPPC9 : voie NF- $\kappa$ B, SNC et myélinisation**

### **3.2.1) Importance de nos travaux : TRAPPC9 et duplication *IKBKG***

Au cours de ces travaux nous avons mis en évidence deux anomalies génétiques touchant des acteurs de la voie NF- $\kappa$ B, associées à des anomalies de la substance blanche et une DI sévère : une mutation non-sens de *TRAPPC9* et une duplication du locus Xq28 incluant *IKBKG*.

Nos résultats démontrent qu'une anomalie de TRAPPC9 et que la duplication *IKBKG* conduisent à un défaut moléculaire similaire : un retard de transcription du gène cible *BIRC3* de la voie NF- $\kappa$ B. De plus, nous avons mis en évidence qu'une gamme croissante d'*IKBKG* dans des cellules neuronales humaines (lignée SH-SY5Y) entraîne une diminution de réponse de la voie NF- $\kappa$ B activée, confirmant le lien entre surexpression d'*IKBKG* et répression de la voie NF- $\kappa$ B.

*IKBKG* est une protéine essentielle de la voie NF- $\kappa$ B puisqu'elle correspond à la sous-unité régulatrice du complexe IKK (I $\kappa$ B kinase) impliqué dans la phosphorylation des protéines inhibitrice I $\kappa$ B et retenant les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B dans le cytoplasme. TRAPPC9 a été identifiée plus récemment (2005) sur la base de ses interactions avec les protéines NIK et IKK $\beta$ , suggérant son rôle dans les deux voies, canonique et alternative, NF- $\kappa$ B (Hu WH, *et al.* 2005).

Néanmoins, le rôle de TRAPPC9 n'est pas clairement établi et elle pourrait également avoir une fonction dans le complexe TRAPP $\text{II}$  impliqué dans le trafic membranaire. Comme nous l'avons souligné, TRAPP $\text{II}$  est un complexe multimérique impliqué dans le transport intracellulaire de protéines. Cependant, aucune étude n'a clairement identifié son importance dans l'assemblage et la fonction du complexe TRAPP $\text{II}$ . Une hypothèse stipule que le complexe TRAPP $\text{II}$  aurait perdu de son importance au cours de l'évolution chez les mammifères et ses mécanismes d'action seraient compensés par d'autres complexes protéiques (Barrowman J, *et al.* 2010).

L'équipe de Hu (Hu WH, *et al.* 2005) a identifié le rôle de TRAPPC9 dans l'activation de la voie NF- $\kappa$ B mais a montré qu'elle n'est pas indispensable à son fonctionnement. Les résultats de nos travaux corroborent l'implication de TRAPPC9 dans le fonctionnement de la voie NF- $\kappa$ B, mais laissent aussi supposer d'un rôle au niveau du SNC et plus spécifiquement dans la myélinisation. TRAPPC9 aurait donc acquis une double compétence au cours de l'évolution : être une sous-unité du complexe TRAPP $\text{II}$  et participer à l'action de la voie NF- $\kappa$ B.

### 3.2.2) Défauts de la voie NF- $\kappa$ B et pathologies humaines

Il existe de nombreuses maladies génétiques dues à des anomalies d'un des acteurs de la voie NF- $\kappa$ B. La plupart d'entre elles entraînent de sévères anomalies du système immunitaire et un défaut majeur des annexes ectodermiques. La dysplasie ectodermique anhidrotique avec

déficience immunitaire (EDA-ID, MIM 300291) est causée par des mutations faux-sens d'*IKBKG* et touche exclusivement les hommes. Les patients sont atteints d'infections récurrentes et présentent une baisse de réponse des interleukines IL-1, IL-18, Lipopolisaccarides (LPS), CD40, etc. Le défaut des annexes ectodermiques se manifeste par des anomalies des follicules pileux, des glandes sudoripares et dentaires (Courtois G, *et al.* 2006) (voir table 12 ci-dessous).

Les autres pathologies de la voie NF- $\kappa$ B sont:

- des anomalies géniques d'*I $\kappa$ B- $\alpha$*  (NFKBIA) : maladie génétique autosomique dominante, entraînant une absence de phosphorylation d'*I $\kappa$ B- $\alpha$*  et se traduisant par des signes cliniques similaires à ceux observés dans l'EDA-ID

- des anomalies du gène *IRAK4* (12q12 ; MIM 606883) ; autosomique récessif : *IRAK4* (IL-1 associated Kinase) est capable de phosphoryler, *IRAK1* (MIM 300283) qui une fois activé par la phosphorylation s'associe avec TRAF6 (TNF Receptor-Associated Factor, MIM 602355) et cible l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. Les patients sont particulièrement sensibles aux infections bactériennes

- des anomalies du gène *CYLD* (16q12.1 ; MIM 605018) : à l'origine de Cylindromatosis (MIM 132700) une pathologie génétique autosomique dominante rare caractérisée par des tumeurs bénignes des follicules pileux. *CYLD* code une protéine suppresseur de tumeur et régule négativement la voie NF- $\kappa$ B par son action au niveau de l'ubiquitination d'*IKBKG* et TRAF2 (MIM 601895).

Table 12 : Description des pathologies de la voie NF-κB

<b>Pathology</b>	<b>Phenotype</b>	<b>Gene</b> <b>(chromosome)</b>	<b>Mutations</b>
Incontinentia pigmenti MIM:3008300	Skin inflammation	<i>NEMO</i>	Genomic rearrangement (70-80%)
	Missing and deformed teeth	(Chr. X)	Stop or frameshift mutations generating large NEMO deletions
	Retinal vessels detachment CNS dysfunctions		Rare missense mutations (see Figure 1)
EDA-ID MIM:300291	Recurring infections	<i>NEMO</i>	Short truncations affecting the ZF
	Impaired development of skin adnexes	(Chr. X)	Missense mutations in various domains of NEMO (see Figure 1)
OL-EDA-ID MIM:300301	Same as EDA-ID plus Increased bone mass Impaired function of lymphatic vessels	<i>NEMO</i> (Chr. X)	Addition of 27 aa at the C-ter of NEMO (see Figure 1)
Immunodeficiency (without EDA) MIM:300584	Recurring infections	<i>NEMO</i> (Chr. X)	Missense mutations Short truncation of the N-ter of NEMO (see Figure 1)
EDA-ID(T) MIM:612132	Same as EDA-ID plus impaired T-cell proliferation	<i>IKBA</i> (Chr. 14)	Heterozygous missense mutation abolishing IκBα phosphorylation by IKK
Immunodeficiency MIM:607676	Recurring infections	<i>IRAK-4</i> (Chr. 12)	Missense/nonsense mutations and microdeletions (1-2 nuc) affecting the kinase domain
Cylindromatosis/MFT MIM:132700	Tumors developing at skin adnexes	<i>CYLD</i> (Chr. 16)	Stop or frameshift mutations deleting the catalytic domain Rare missense mutations (see Figure 2)

Abbreviations: aa, amino acids; Chr., chromosome; CNS, central nervous system; C-ter, C terminus; EDA-ID, anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency; IKK, IκB kinase; IRAK, interleukin-1R-associated kinase; MFT, multiple familial trichoepithelioma; NEMO, NF-κB essential modulator; NF-κB, nuclear factor-kappa B; N-ter, N terminus; nuc, nucleotides; OL-EDA-ID, EDA-ID with osteopetrosis and lymphedema; ZF, zinc finger.

Tableau extrait de l'article de Courtois G, *et al.* 2006

Enfin, l'IP, précédemment décrit dans ce manuscrit, à une incidence de 1/10000 à 1/100000 naissances. La majorité des patients (85%) présente la même anomalie génique, à savoir une délétion des exons 4-10 d'*IKBKKG*. Pour les autres anomalies, elles concernent des mutations non-sens ou frameshift d'*IKBKKG*. Elle est létale chez les garçons et d'expressivité variable chez les femmes. Ces patientes peuvent ainsi présenter: une dermatose, des réactions inflammatoires sévères, une hyperpigmentation de la peau par une accumulation de mélanine, une perte des follicules pileux primaires, une atteinte ophtalmologique (atteinte des vaisseaux rétiniens), une atteinte odontologique (absence ou anomalie des dents), et plus rarement (30-50%), des troubles neurologique (convulsions, retard développemental et mental). Les patientes sont sujettes à des infections bactériennes et virales récurrentes et les cellules des patientes sont plus sensibles à l'apoptose que des cellules contrôles (Sebban H, *et al.* 2006 ; Smahi S, *et al.* 2000). Comme nous l'avons évoqué, l'IRM des patientes atteintes des troubles neurologiques, montrent des lésions cérébrales éparses, des signaux d'hyperintensité en T2 principalement de la substance blanche périventriculaire et subcorticale (Meuwissen ME, *et al.* 2012).

Les patients mutés pour *TRAPPC9* ne montrent pas de signes récurrents d'infections bactériennes ou virales, cependant une des familles est décrite avec une perte des dents survenant à l'âge de 20 ans. En revanche, les patients, présentant une duplication du locus Xq28 avec *IKBKG*, sont tous atteints d'infections récurrentes du système respiratoire (bronchites, bronchiolites). L'implication de la voie NF- $\kappa$ B dans ces pathologies pourrait donc expliquer ces symptômes communs.

D'autre part, *CC2D1A/Freud1* a également été associé à une DI non syndromique chez neuf familles d'un même village (Basel-Vanagaite L, *et al.* 2003). L'équipe de Zhao (Zhao M, *et al.* 2010) a démontré le rôle de *CC2D1A* comme un activateur de la voie NF- $\kappa$ B. La surexpression de *CC2D1A* dans des cellules humaines favoriserait l'activation de la voie NF- $\kappa$ B par :

- 1- une augmentation intracellulaire de l'Ubc13 (Ubiquitine Conjugated Enzyme impliquée dans l'ubiquitination des protéines I $\kappa$ Bs, UBE2N, MIM 603679) qui favoriserait la dégradation des I $\kappa$ B,
- 2- la surexpression de TRAF2 (TNF associated Receptor 2, MIM 601895) capable de fixer le TNF et d'activer la voie NF- $\kappa$ B,
- 3- la surexpression de la protéine TAK1 (Ubiquitine dependant Kinase, MAP3K7, MIM 602614) impliquée dans la phosphorylation des IKK suite à une ubiquitination et permettant l'activation de ce complexe en vu de la phosphorylation des protéines inhibitrices I $\kappa$ B,
- 4- la mise en place du complexe IKK.

De plus, la *CYLD* est une protéine capable de réguler négativement la voie NF- $\kappa$ B qui est réprimée par *CC2D1A*. Ces données suggèrent donc une implication de la voie NF- $\kappa$ B dans la DI-NS (Zhao M, *et al.* 2010). Cette même équipe a généré une souris KO pour *Cc2d1a*. La souris décède peu de temps après la naissance suite à une incapacité à respirer. L'analyse histologique de ces souris montre un enrichissement de la protéine *Cc2d1a* au niveau des synapstosomes. Ainsi, elle pourrait participer à la maturation de la synapse au cours du développement du neurone, en ayant un rôle dans l'endocytose de vésicules synaptiques. Cependant, les auteurs n'ont pas mis en évidence de défaut de signalisation de la voie NF- $\kappa$ B chez la souris *Cc2d1a*<sup>-/-</sup> mais n'excluent pas sa participation dans l'endocytose synaptique (Zhao M, *et al.* 2011). Bien

que les mécanismes physiopathologiques chez les patients mutés pour *CC2D1A* ne soient pas clairement établis, *CC2D1A* fut le premier gène qui orienta l'implication de la voie NF- $\kappa$ B dans une DI-NS.

### 3.2.3) NF- $\kappa$ B et SNC : le point

Les patients mutés pour TRAPPC9 ont un phénotype restreint au SNC, ce qui semble attester de la spécificité d'action de TRAPPC9 dans l'organisme. De plus, l'équipe de Hu a mis en évidence le rôle essentiel de TRAPPC9 dans la formation de neurites au cours de la différenciation des cellules PC12 (Hu WH, *et al.* 2005). Comme nous l'avons précédemment évoqué, les nombreux modèles animaux décrits dans la littérature pour lesquels un ou plusieurs acteurs de la voie NF- $\kappa$ B ont été abolis (p50 ; p65/TNFR1 ; p65/TNF ; c-Rel ; IKK1/IKK2) montrent tous des anomalies du système nerveux central (voir partie 1, chapitre 3, paragraphe 6.2). Le défaut majeur rapporté chez ces modèles animaux est la perte de la neuroprotection et une augmentation de l'apoptose dans le tube neural, la moelle épinière et les neurones de l'hippocampe (Mémet S, *et al.* 2006). Ces informations suggèrent à nouveau, l'importance de la voie NF- $\kappa$ B dans le SNC. D'autres études laissent entrevoir l'implication et les mécanismes d'action de la voie NF- $\kappa$ B dans la plasticité synaptique et la protection cellulaire du SNC.

Tout d'abord, de nombreux stimuli spécifiques du SNC semblent également activer la voie NF- $\kappa$ B, tels que le TNF $\alpha$  et l'oxyde nitrique. De façon intéressante, le TNF $\alpha$ , cytokine activatrice de la voie NF- $\kappa$ B, induit une exocytose des récepteurs AMPA à la surface des cellules pyramidales de l'hippocampe. Il semble que le TNF $\alpha$  soit produit de manière constitutive pour assurer le maintien de l'exocytose des récepteurs AMPA via la PI3 (Phosphoinositide 3) kinase. Parallèlement, une endocytose des récepteurs GABA $_A$  est constatée, ce qui favorise l'activation de la synapse. Cette cytokine régule l'homéostasie neuronale mais peut aussi produire dans certains cas, une excitotoxicité à l'origine de dommages cellulaires. Ces mécanismes finement régulés peuvent donc intervenir aussi bien dans les maladies neurodégénératives que dans les processus de protection neuronale (Albensi BC, *et al.* 2000 ; Stellwagen D, *et al.* 2005). Bien que le lien avec l'activation de la voie NF- $\kappa$ B n'ait pas été clairement établi, il est tout à fait envisageable, puisque le TNF $\alpha$  est un ligand important de la voie NF- $\kappa$ B. L'oxyde nitrique quant à lui, est produit suite à un passage d'éthanol dans l'organisme. Il serait capable d'induire la voie

NF- $\kappa$ B en vue d'une neuroprotection contre les atteintes de l'alcool (Bonthius DJ, *et al.* 2008). D'autres messagers tels que le NGF, le glutamate, les agonistes des récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluR5), la dépolarisation de la membrane neuronale, l'activité synaptique, les peptides  $\beta$ -amyloïde ou encore les N-CAM (Neural Cell Adhesion Molecule) permettent d'activer la voie NF- $\kappa$ B au niveau du SNC. Ces nombreux activateurs spécifiques du SNC sont en faveur d'une action de la voie NF- $\kappa$ B dans le SNC (Hayden MS & Ghosh S, *et al.* 2008).

Dans le neurone, la forme majoritaire de complexes trimériques est p65/p50/I $\kappa$ B $\alpha$ . Mais d'autres complexes existent et pourraient dépendre de l'état cellulaire, du développement du neurone, ou de leurs localisations cérébrales. La voie NF- $\kappa$ B participe notamment à la régulation de l'apoptose par la production de gènes anti-apoptotiques (IAPs, Bcl-2, BCL-XL) assurant une protection et favorisant la survie cellulaire. Cependant, ce mécanisme semble bien plus complexe en réalité. Dans les coupes d'hippocampes de rat, la voie NF- $\kappa$ B a un rôle protecteur contre l'apoptose, mais en revanche dans les cellules gliales (microglie et astrocytes), elle semble favoriser une neurotoxicité à l'origine de la mort cellulaire, par la production de cytokines pro-inflammatoires, de stress oxydatif ou encore d'une excitotoxicité. Ces processus de mort/survie cellulaire semblent être cellulaire-dépendant, en accordant une protection supérieure aux neurones de l'hippocampe plutôt qu'à certaines cellules gliales (Mattson MP, *et al.* 2006).

D'autre part, des maladies neurodégénératives révèlent une forte activité de la voie NF- $\kappa$ B au niveau des lésions cérébrales. Chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, le facteur p65 est augmenté dans les neurones et astrocytes présentant des plaques amyloïdes. Sur des modèles animaux, l'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B augmente la mort neuronale lorsque les cellules sont soumises au peptide  $\beta$ -amyloïde (Mattson MP, *et al.* 2006). Une observation similaire a été faite dans les neurones dopaminergiques de la substance noire des patients atteints de la maladie de Parkinson. L'augmentation de p65 pourrait jouer un rôle protecteur contre la dégénération neuronale. L'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B chez les rats augmente la vulnérabilité des neurones dopaminergiques à la Neurotoxin-6-Hydroxydopamine (une neurotoxine spécifique des neurones dopaminergiques et noradrénergiques) (Mattson MP, *et al.* 2006). Enfin, dans la maladie d'Huntington (MIM : 143100), les neurones du striatum, région lésée du cerveau à l'origine d'une motricité fortement perturbée, sont plus sensibles à la mitochondrial toxin 3 nitropropionic acid (neurotoxine spécifique des neurones du striatum



utilisée pour reproduire chez l'animal les symptômes de la maladie d'huntington) chez les souris  $p50^{-/-}$ , comparés à des souris contrôles (Mattson MP, *et al.* 2006).

### 3.2.4) TRAPPC9 : Voie nf-κB et Myéline

Comme cela a été évoqué dans l'IP, des anomalies de la substance blanche sont associées à des réarrangements chromosomiques d'*IKBKG* ; les patients BM associent une mutation non-sens de TRAPPC9 avec une discordance des anomalies de la substance blanche sur les séquences T2 et FLAIR ; enfin, les patients présentant une duplication du locus Xq28 incluant *IKBKG* révèlent également des anomalies de la substance blanche à l'IRM. L'ensemble de ces données suggère un lien plus que probable entre une dysfonction de la voie NF-κB et des anomalies de la myéline.

Nous avons également mentionné que de nombreux facteurs régulent la production des acteurs de la myéline. Les HDAC1 et HDAC2 ont un rôle essentiel dans la maturation des cellules de Schwann dans le SNP par le changement de conformation de la chromatine au niveau du gène *p65* et module son expression. Dans le SNC, les HDAC1 et HDAC2 agiraient sur l'expression d'*Olig2* facteur nécessaire à la différenciation des oligodendrocytes, mais aucun lien n'a été établi entre l'expression d'*Olig2* et la voie NF-κB (Chen Y, *et al.* 2011). Néanmoins, et de par l'importance que semble avoir la voie NF-κB au sein du SNC, la voie NF-κB semble liée à des mécanismes de régulation de la mise en place de la myéline.

D'autre part, la sclérose en plaque (Multiple Sclerosis (MS), MIM 126200) est un syndrome neurologique progressif inflammatoire, montrant une démyélinisation du SNC probablement d'origine auto-immun médiée par les cellules T. Le plus souvent, les patients souffrent d'une perte de la mobilité qui s'accompagne par la suite de déficits cognitifs. L'IRM de ces patients révèle en premier lieu des lésions périventriculaires de la substance blanche, suivies de lésions du corps calleux, puis de la moelle épinière de la région cervicale progressant vers des lésions de la région thoracique (Achiron A, *et al.* 2012). Bien que l'étiologie de cette pathologie ne soit pas précisément caractérisée, plusieurs études démontrent une implication importante de la voie NF-κB dans la pathologie (Huang CJ, *et al.* 2002). Chez les patients atteints de MS, les analyses révèlent un lien entre la sévérité de la maladie et un taux élevé du TNFα dans les cellules T, mais également dans le liquide céphalorachidien des patients MS. La voie NF-κB est

fortement active au niveau des sites d'inflammation du cerveau, dans les oligodendrocytes, la microglie et les macrophages chez les patients MS. Il apparaît que l'activation des voies NF- $\kappa$ B active la production des gènes *MPB* et *PLP* et protège les oligodendrocytes de la destruction cellulaire (Huang CJ, *et al.* 2002). De plus, le clonage du promoteur du gène humain *MBP* montre de nombreux éléments *cis* parmi lesquels se trouve un site de fixation au NF $\kappa$ B1 (p105/p50) dans la région 5' flanquante du gène.

Ces études mettent en avant la présence de la voie NF- $\kappa$ B dans les axones, les dendrites et les terminaisons synaptiques. Elle est capable de générer des signaux induisant la production de neurotransmetteurs, des facteurs neurotrophiques ou encore des cytokines. Son rôle est cependant complexe et varie d'un type cellulaire à l'autre. D'autre part, nos résultats orientent sur une fonction spécifique de la voie NF- $\kappa$ B dans le SNC, notamment dans la mise en place et/ou la maturation et/ou la maintenance de la myéline. Le discernement de ces mécanismes est néanmoins essentiel à la compréhension des bases physiopathologiques des DI afin d'envisager la mise en place d'actions thérapeutiques futures (Mattson MP, *et al.* 2006).

#### **4) Conclusions générales**

Ce manuscrit montre différentes approches ayant permis la découverte de nouveaux gènes impliqués dans les DI-AR : la cartographie par autozygotie soit couplée à la recherche de gènes candidats, soit suivie d'une approche transcriptomique. Bien que la stratégie de cartographie par autozygotie ait été élaborée il y a 25 ans (Lander ES *et al.* Science 1987), elle reste une stratégie puissante dans le démantèlement de l'étiologie des pathologies récessives et permet l'identification du locus morbide. Aujourd'hui, de nouvelles techniques révolutionnaires apparaissent, notamment l'exome qui permet le séquençage de toutes les séquences codantes du génome humain en un temps record et à un coût abordable. Néanmoins, l'information à traiter devient démesurée et l'orientation d'une fenêtre de recherche grâce à la cartographie par autozygotie reste pertinente.

Ces nombreuses approches novatrices augmenteront de façon considérable la connaissance sur l'étiologie des maladies monogéniques humaines. Outre l'aide précieuse

apportée aux familles pour le conseil génétique, chaque gène aura alors une fonction étiquetée, et de nombreuses corrélations phénotype/génotype pourront être faites. Les recoupements entre les gènes impliqués dans les déficiences intellectuelles et les grandes voies de signalisation vont se poursuivre. Au cours de ces travaux, nous avons incriminé deux processus moléculaires responsables de DI: l'importance de la voie NF- $\kappa$ B dans le fonctionnement de la myélinisation au niveau du SNC , et les déficiences du complexes AP4 associées au recyclage des récepteurs AMPA au niveau du neurone post-synaptique. Ces deux mécanismes ouvrent la voie vers d'autres gènes candidats et participent à la compréhension des bases physiopathologiques des DI. Puis, dans un futur proche, les études s'orienteront alors sur le moyen de corriger ces mécanismes défectueux et la recherche de thérapies sera alors envisageable.

## MATERIELS ET METHODES

1) <i>Extraction d'ADN (leucocytes, Fibroblastes)</i> .....	- 149 -
2) <i>Extraction d'ARN et transcription inverse</i> .....	- 149 -
3) <i>Génotypage des marqueurs polymorphes (analyse de liaison)</i> .....	- 150 -
4) <i>CGH-array</i> .....	- 150 -
5) <i>FISH</i> .....	- 150 -
6) <i>Choix et génotypage de marqueurs microsatellites</i> .....	- 150 -
7) <i>Etude d'expression : transcriptome</i> .....	- 151 -
8) <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i> .....	- 151 -
9) <i>Séquençage des gènes candidats</i> .....	- 153 -
10) <i>PCR en temps réel</i> .....	- 153 -
11) <i>RACE-PCR</i> .....	- 154 -
12) <i>Transformation bactérienne et extraction plasmidique</i> .....	- 154 -
13) <i>Clonage</i> .....	- 155 -
14) <i>Culture de fibroblastes in vitro</i> .....	- 155 -
15) <i>Western Blot</i> .....	- 155 -
16) <i>Stimulation TNF<math>\alpha</math> et dégradation de l'I<math>\kappa</math>B-<math>\alpha</math></i> .....	- 156 -
17) <i>Production de luciférase firefly sous contrôle d'un promoteur NF-<math>\kappa</math>B suite à une stimulation au TNF<math>\alpha</math></i> .....	- 157 -

## 1) Extraction d'ADN (leucocytes, Fibroblastes)

L'ADN génomique peut être extrait à partir de leucocytes recueillis au cours d'une prise de sang, ou à partir de fibroblastes cultivés *in vitro*, suite à une biopsie axillaire de peau profonde.

- Prise de sang : des prélèvements de 5 à 15mL de sang sont recueillis sur EDTA. Les érythrocytes sont ensuite lysés par une solution hypotonique (tris-HCL pH 7,6mM ; NaCl 10mM ; MgCl<sup>2</sup> 5mM) pendant 5 min dans la glace. Une centrifugation (10min à 2500 rpm) permet d'obtenir un culot de globules blancs qui sera ensuite lavé par la même solution de lyse. Une seconde centrifugation permet de reformer le culot afin d'initier l'extraction d'ADN.
- Biopsie de peau : Les cellules fibroblastiques cultivées *in vitro* adhèrent sur le fond plastique de la flasque de culture pour ainsi se multiplier. Il faut donc, dans un premier temps, « décoller » du support plastique, par l'action de la trypsine (Trypsine 0,05%, EDTA avec indicateur de pH, Lifetech®) pendant 2-3 min à 37°C. Une fois en suspension, les cellules sont reprises dans du milieu de culture avec sérum, pour stopper l'action de la trypsine, puis elles sont transférées dans un tube de 50mL. Une centrifugation permet ensuite d'obtenir un culot cellulaire de fibroblastes, qui sera lavé une fois par du DPBS 1X (DPBS 1X, pH 7.4, without Mg, Ca and phenol red, Lifetech®).

Le culot de cellules (lymphocytes/fibroblastes) est repris dans 10mL de solution de lyse (tris-HCL pH 7,6 à 10mM ; NaCl 50mM ; EDTA 10mM ; SDS 0,2%) supplémenté avec 100µL de protéinase K à 5mg/mL. Le tout est incubé à 37°C sur la nuit. Un volume de phénol (saturé, prêt à emploi), équivalent au volume du lysat (10mL) est ajouté, puis mis à agitation pendant 10min, et enfin centrifugé 10 min à 2500 rpm. La phase organique (inférieure) est éliminée car elle contient toutes les protéines sériques, tandis que la phase supérieure, contenant l'ADN, est conservée. Un lavage par du chloroforme-isoamylique 24:1 est ensuite réalisé (volume à volume, suivi d'une agitation et d'une centrifugation qui permet à nouveau de récupérer la phase supérieure avec l'ADN). L'ADN est précipité par l'ajout de 2 volumes (1 vol = vol de la phase supérieure prélevée) d'éthanol absolu froid (conservé à -20°C) afin de permettre la récupération de l'ADN sous forme d'une « méduse ». L'ADN est ensuite lavé 2 fois à l'éthanol 70% puis séché et repris dans 0,5 à 1mL d'eau stérile/TE filtré (tris HCl 10mM ; EDTA pH7,6 à 1mM). La concentration en ADN est ensuite déterminée par mesure de l'absorbance à la longueur d'onde 260 nm au spectromètre Nanodrop.

## 2) Extraction d'ARN et transcription inverse

Les ARNs totaux sont extraits en utilisant le kit PureLink® Total RNA Blood Purification Kit (Lifetech®). Une action par la transcriptase inverse (enzyme virale permettant de passer de l'ARN simple brin à l'ADNc double brin) est ensuite pratiquée pour l'obtention des ADNc (qSCRIPT cDNA supermix, Quanta®). La quantité d'ARN est fixée à 450ng/réaction dans un volume final de 16µL/réaction (diluée dans de l'eau pure stérile), à laquelle est ajoutée 4µL de supermix qSCRIPT. Puis des incubations à différentes températures se succèdent, dans un thermocycler : 5min à 25°C, 30min à 42°C et 5min à 4°C.

### 3) Génotypage des marqueurs polymorphes (analyse de liaison)

Le génotypage de marqueurs SNPs a été réalisé à la plateforme Génomique de la Fondation IMAGINE (Hôpital Necker-Enfants-Malades) sur puce *Affymetrix* GeneChip® Human Mapping 250K array, qui permet l'analyse d'environ 250 000 SNPs, répartis sur l'ensemble du génome. Le traitement informatique est pratiqué à la plateforme information de la fondation IMAGINE sur le site de Necker.

### 4) CGH-array

Le principe de cette technique est basé sur une hybridation génomique comparative où un ADN test et un ADN contrôle, tous deux marqués par un fluorochrome différent (cyanine 3 et 5), sont hybridés sur une puce CGH-array. Deux expériences indépendantes sont réalisées, dans lesquelles le fluorophore est inversé entre le patient et le contrôle, permettant de prendre en compte la variabilité due au marquage. Cette technique permet de déceler d'éventuels gains ou pertes de matériel génomique par une perturbation du ratio de fluorescence des deux fluorochromes. Les puces utilisées sont les puces Agilent® 244K (soit 244000 oligonucléotides de 50 à 60 bases) ou des puces Affymetrix® Genome-Wide Human SNP array 6.0. (1,8 millions de marqueurs dont 906600 SNP et 946000 sondes).

### 5) FISH

La technique de FISH (*fluorescent in situ hybridization*) utilise des sondes particulières, spécifiques de la région à tester et qui, couplées à un fluorochrome, vont s'hybrider sur des chromosomes en métaphase. Cette méthode permet donc de confirmer d'éventuelles anomalies chromosomiques décelées par CGH-array ou parfois d'établir un diagnostic clinique au vu d'un tableau clinique spécifique. Une observation au microscope à fluorescence est ensuite pratiquée afin de visualiser l'hybridation de la sonde sur les chromosomes (les techniques de FISH sont réalisées au service cytogénétique de l'Hôpital Necker-Enfants malades, dans le service du professeur Vekemans).

### 6) Choix et génotypage de marqueurs microsatellites

Le génotypage de marqueurs microsatellites polymorphes peut être une stratégie utilisée dans la confirmation, ou pour la réduction éventuelle des tailles, des régions homozygotes identifiées suite à une analyse de liaison. Une PCR est réalisée à partir de 4µL d'ADN d'un patient (25 ng/mL) et utilisant des amorces couplées à un fluorochrome spécifique (FAM : fluorescence bleue, NED : fluorescence jaune et HEX : fluorescence verte ; 1µL d'amorce Forward et Reverse dosée à 10mM). Au cours d'une seconde étape, 1µL de réaction de PCR, précédemment réalisée, est ajouté à 18µL de formamide/eau et à 0,25µL du marqueur ROX 400 HD (lifetech®, ref : 402985). Ce marqueur ROX est composé de fragments de différentes tailles tous couplés à un fluorochrome rouge, et permet la calibration et l'analyse de la taille des fragments amplifiés. Après dénaturation (3 min à 96°C), les échantillons sont ensuite analysés par un séquenceur automatique ABI PRISM3130 (Applied Biosystems/Lifetech). Les données sont ensuite collectées et analysées à l'aide de deux logiciels GENSCAN 3.7 puis GENOTYPER 2.5 (Applied Biosystems/Lifetech) qui permettent d'assigner une taille précise au fragment amplifié par comparaison au marqueur de taille (ROX), taille révélant le nombre de répétitions de di-nucléotides (CA le plus souvent) au sein du microsatellite.

## 7) Etude d'expression : transcriptome

Cette étude est réalisée à partir des ARN totaux extraits de cellules (fibroblastes) de patients et de contrôles. L'analyse a été pratiquée sur une puce Affymetrix GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 à la plateforme génomique de la fondation Imagine. Sur cette puce, sont fixées 54 000 sondes, composées de 25pb complémentaires et spécifiques d'un transcrit humain. Près de 38 500 gènes humains sont analysés (parfois plusieurs sondes reconnaissent un même transcrit). Un individu de référence identique est également analysé en parallèle de chaque couple patient/contrôle qui sera utilisé pour le calcul des ratios sonde à sonde (ex : sonde1 : niveau d'expression Patient (ou contrôle)/niveau d'expression Individu de référence). Puis les ratios déterminés pour chacune des sondes du patient sont comparés aux ratios calculés chez le contrôle. Nous avons retenus les différences entre le ratio patient et le ratio du contrôle, de plus de 10%. Le traitement informatique du bruit de fond, la normalisation et le résumé de l'ensemble des sondes utilise le logiciel GeneChip Robust Multiarray Averaging (gcrma), tandis que les tests de significativité sont établis grâce au logiciel LPE (Local Pooled Error).

## 8) Polymerase Chain Reaction (PCR)

La PCR s'effectue dans un thermocycler 2700 ou 9700 (Applied Biosystem). Classiquement, la dénaturation (5min à 95°C) est suivi de 30-35 cycles d'amplification (30sec à 95°C (dénaturation), 30 sec à 55-65°C (TM : hybridation des amorces sur l'ADN), 30 sec à 72°C (élongation)) pour finir ensuite, sur une étape de 5 min à 72°C. Les deux kits de PCR les plus utilisés pour ces travaux sont le kit GoTaq (promega M8305) et ReadyMix® Taq PCR reaction with MgCl2 (Sigma, P4600).

Les différents couples d'amorces utilisés dans ce manuscrit sont présentés ci-dessous :

### Amorces ADNc *TRAPPC9*

ARN_NIBP_1F	AAAGTCGGGAGTGCCATGGTG
ARN_NIBP_1R	CTTGTAATGTCTGCTGCTGTGTG
ARN_NIBP_2F	CAACTACGAGGACTGCCAG
ARN_NIBP_2R	GAGGGCACCTGGATCAATG
ARN_NIBP_3F	GAAGAGTGGAGCTCGGAGG
ARN_NIBP_3R	CATCTTTCTTTTCTGATCCG
ARN_NIBP_4F	GATTCAGCAGAGGCACGCAC
ARN_NIBP_4R	GGTAACCGTTCACAGTAATCG
ARN_NIBP_5F	CTTCGAGTTGAAAACATGGGG
ARN_NIBP_5R	CTCCAGGGTCTTCACGTG
ARN_NIBP_6F	GATGATGGAATCAGTGTGAGTG
ARN_NIBP_6R	GTAGTTGTGCACGCCGTTT
ARN_NIBP_7F	CAGTGGGATGTGCTGGTGGA
ARN_NIBP_7R	CTTGGGATTTCCTCTGCTTC

### Amorces génomiques *TRAPPC9*

TRAPPC9_1_F	CCTGTCGCCTCTTTGGAAC
TRAPPC9_1_R	GAGGAAAGCTTCTGCACCTG
TRAPPC9_2_F	GACCTGTTGATGCCACGGC
TRAPPC9_2_R	CCTTGCTGCAATGAAATTCTG
TRAPPC9_3_F	AGTGCTTTCTGGGTGGGAG
TRAPPC9_3_R	ACCGCACCCAGCCTCTC
TRAPPC9_4_F	TGGCATTTCCAAATAATCCAC
TRAPPC9_4_R	GGCAACAGTGCAAGACTCTG
TRAPPC9_5_F	AACATACTGTTCTCAGAAATTGC
TRAPPC9_5_R	CCACCAATCAATCATCAAGC
TRAPPC9_6_F	CAGTAGGGCATATTTAAGTTTTGTC
TRAPPC9_6_R	AAGAGACACTGCAGCATTACAC

TRAPPC9_7_F	GAATGTGACAGAAACATCTGAACTC
TRAPPC9_7_R	TGAATCAATTCCGTAAGAAGCTGG
TRAPPC9_8_F	TCTCCTTGATTCTCCTCGATTG
TRAPPC9_8_R	AACCACGATGTCTGCCACTC
TRAPPC9_9_F	CCGTATTTCCCTGTACCCTCTCC
TRAPPC9_9_R	GGGTTTACATGAACCAGCATC
TRAPPC9_10_F	AATGAAAGCCAGCCACTTTG
TRAPPC9_10_R	TAGAGGACGGTGTCCCAGAG
TRAPPC9_11_F	CCTGAAACCACGCTAACCAG
TRAPPC9_11_R	AAGCCATTGGAAATCAGGTG
TRAPPC9_12_F	AAATTGCCAGAGGAATAATTGG
TRAPPC9_12_R	GATGTGTGCCCTCAGACATTAAG
TRAPPC9_13_F	CATTTGGAAGTGGAGCACACAC
TRAPPC9_13_R	CATGCAAGGGTTCAGCAGAC
TRAPPC9_14_F	TGAAGAGGAGCCCCGTACTC
TRAPPC9_14_R	GAATTACAGGCTCTTTGTGCC
TRAPPC9_15_F	GAAGCCCAGATTTCCCTAGCC
TRAPPC9_15_R	CCCTCGCCTGACTTCTACTG
TRAPPC9_16_F	TGGTAAGTCCCATACTGCCTC
TRAPPC9_16_R	AGGCATCAAGGGATGGG
TRAPPC9_17_F	CAACAAACCCCAAAACCAAG
TRAPPC9_17_R	GTGCTTCAGAAACGGCTTTG
TRAPPC9_18_F	AAGCCGCTTGCCCTCTG
TRAPPC9_18_R	TCTGAACGTAGTGTGTTGAGAC
TRAPPC9_19_F	GGAAAGTCATTCCCTCTTTGGC
TRAPPC9_19_R	TATCTCCACACCCTCCCAAG
TRAPPC9_20_F	GTGCTGATTCTCCAACAGCC
TRAPPC9_20_R	CTTAGAGGTTGGAACCCTGG
TRAPPC9_21_F	GTTCTTCTGTCCCTGGGC
TRAPPC9_21_R	TGCATTTGGAGAAAAGGAGC
TRAPPC9_22_F	AATGAATCAGCGAGTGGGTG
TRAPPC9_22_R	ACATATGCTGACCCCAAAGC
TRAPPC9_23_F	AGGATTCCTGGTGGCTTTG
TRAPPC9_23_R	CCAGGCAGGGTCACCTC

#### Amorces génomiques AP4B1

AP4B1_Ex1-F	GAAGGAGCCCTCGAGTTACC
AP4B1_Ex1-R	AGAGACTGGGGCTAGTGAGC
AP4B1_Ex2-F	AGAAGGAGCCCTCGAGTTAC
AP4B1_Ex2-R	CAGAGAGACTGGGGCTAGTG
AP4B1_Ex3-F	CCCTCCATTGTAAGTTGGG
AP4B1_Ex3-R	TTTCCCAGTATTAAGGAGC
AP4B1_Ex4-F	GGCTGAGGTATGTCAAATTAG
AP4B1_Ex4-R	TCTACCAAAGCCACACAATC
AP4B1_Ex5-F	CCTGGAGCTATTACTCTGGC
AP4B1_Ex5-R	AAGATCCCACAAGGTAGCAG
AP4B1_Ex6-F	CATGGAAATGGTCCTAATTTTG
AP4B1_Ex6-R	AACCACAGTTTTCTTGCTGG
AP4B1_Ex7-F	AGATGATTTTAGATTGAGGTGC
AP4B1_Ex7-R	TGTTTTGAGCACTACTATAGGC
AP4B1_Ex8-F	AGATTCCTGCCTACCTGGAG
AP4B1_Ex8-R	GCAGGGTTTCAAGCATTCTC
AP4B1_Ex9-F	TAAGCGAAAAGCAAAACCAG
AP4B1_Ex9-R	ACGTGACTCACCAAACAATG
AP4B1_Ex10-F	GTTGGCACAAGAGTAGGAGG
AP4B1_Ex10-R	TCTTCAGGAATCAAGGGTCC



## 9) Séquençage des gènes candidats

Cette technique se base sur la méthode proposée par Sanger et repose sur l'utilisation de di-deoxyribonucléotides (ddNTP) dépourvus de groupement hydroxyle en 3'. Ces nucléotides particuliers sont incorporés au cours de la synthèse de l'ADN et bloquent l'élongation. L'incorporation de ces ddNTPs se fait de manière aléatoire et les brins synthétisés sont tous de tailles différentes. Les 4 types de ddNTP (ddATP, ddTTP, ddGTP et ddCTP) sont couplés à des fluorochromes de couleurs différentes et spécifiques de chaque base. Ainsi, chaque nucléotide composant la séquence d'intérêt est représenté de manière spécifique de par sa taille et de par la couleur de fluorochrome spécifique du dernier nucléotide de la séquence.

Après la PCR, les différents fragments amplifiés à séquencer sont purifiés avec l'ExoSAP-IT® (Amersham, USB) selon les recommandations du fournisseur. Dans un second temps, 3 à 4 µL de produit PCR purifié sont mélangés à 2 µL de tampon 5X, 0,5µL de Reaction mix (kit ABI Prism Big Dye® Terminator, *Applied biosystem*), 1µL d'amorce (forward OU reverse) à 2mM et de l'eau pure (QSP 10µL). La réaction s'effectue dans un thermocycler selon les conditions suivantes : 3 min à 96°C (dénaturation) ; puis 30 cycles comprenant 20 sec à 96°C (dénaturation), 20 sec au TM (température d'hybridation des amorces au brin d'ADN) et 1 min à 60°C (élongation). Les fragments obtenus sont à leurs tours purifiés grâce à des micro-colonnes de Sephadex® (Sephadex G – 50, SIGMA), puis déposés sur un séquenceur ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems/Lifetech). Enfin, les données sont extraites et analysées grâce au logiciel SEQUENCING ANALYSIS 5.2 (Applied Biosystems/Lifetech).

## 10) PCR en temps réel

La PCR en temps réel ou PCR quantitative permet de suivre l'amplification des produits de PCR au cours du temps, c'est-à-dire à chaque cycle de PCR (ou CT). Pour chacune des expériences pratiquées, un CT est retenu lorsque la quantité de produit atteint un seuil de référence (déterminé au cours de la phase exponentielle de la courbe des quantités de produit de PCR). La PCR quantitative fait appel à l'utilisation d'un fluorochrome capable d'être incorporé au produit de PCR au cours de l'étape d'élongation (présent dans le SyberGreen ou au niveau de la sonde Taqman) et permettant de quantifier la quantité de fluorescence proportionnelle à la quantité de produit de PCR. La PCR quantitative est réalisée suite à une transcription inverse afin d'obtenir les ADNc de chaque transcrite présent dans les cellules de l'étude et permettant d'entreprendre la PCR.

Le protocole appliqué est le suivant : après une culture cellulaire de fibroblastes (voir culture de fibroblastes), les cellules sont prélevées sous forme d'un culot cellulaire. Une étape d'extraction d'ARN est pratiquée afin d'obtenir les ARN totaux (PureLink™ de Lifetech : 12183018A). Puis une transcription inverse (RT) est réalisée grâce au kit qScript™ cDNA Super mix (Quanta : 95048) selon les recommandations du constructeur : 4µL de qScript cDNA Super Mix ; 2µg d'ARN totaux (volume variable en fonction de concentration de départ) ; eau RNase/DNase free (QSP : 20µL). Le cycle de RT se fait en trois étapes : 5 min à 25°C ; 30 min à 42°C et 5 min à 85°C (attente sur 4°C). Dans ce manuscrit, un mix de SYBR®Green est utilisé (PerfeCta™ SYBER® Green FastMix™, ROX de la marque QUANTA : 95073) selon le protocole suivant : 10µL de PerfeCta SYBR Green FastMix, ROX ; 1µL d'amorces Forward + Reverse à 10mM ; 50ng de cDNA (volume variable) ; eau RNase/DNase free (QSP 20µL). Grâce à la caractéristique du FastMix, les cycles de PCR peuvent être de courte durée : 95°C pendant 5 min (dénaturation) ; puis 40 cycles de PCR en 2 temps : 5 sec à 95°C (dénaturation) et 30 sec à 60°C (hybridation des amorces et élongation) et pour finir, un cycle de « Dissociation Stage ». Pour chaque échantillon un ou deux ARN de références sont utilisés (β-Actine, GAPDH ou B2M). La PCR quantitative est pratiquée sur un appareil AB-7300 (Lifetech) et les résultats sont analysés avec le logiciel dédié à la machine Taqman 7300 (Lifetech).

Amorces de PCR quantitative utilisées dans ce manuscrit :

AP4B1-qPCR_F	CTGAAGTAGATGGTGCCCTG
AP4B1-qPCR_R	CACCATCTCTTAAATCGAATGTC
TRAPPC9-F	TGGCATTTCCAAATAATCCAC
TRAPPC9-R	ACCGCACCCAGCCTCTC
MECP2-F	AGCCCGTGCAGCCATCAGCC
MECP2-R	CTTCCCAGGACTTTTCTCCA
IKBKG-F	GAGCTCCGAGATGCCATC
IKBKG-R	CTCAGCCATCTGCTGCTG
BIRC3-F	GGTTCTTCTTCATGAAAGAAATG
BIRC3-R	CAGAAGATGTTTCAGATCTACCAG
GAPDH-F	GAGTCAACGGATTTGGTCGT
GAPDH-R	TTGATTTTGGAGGGATCTCG
b-Act-F	CAATGAAGATCAAGATCATTGC
b-Act-R	CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAG

### 11) RACE-PCR

La RACE-PCR est une méthode similaire à la transcription inverse et a été conçue pour l'analyse des extrémités des ARN (5' et 3'). Le principe de cette technique consiste à utiliser des amorces reconnaissant les extrémités de l'ARNm (la coiffe en Forward ou la queue poly A en Reverse) et des amorces spécifiques de l'ARNm cible en Reverse ou en Forward. Le kit utilisé est le SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit de la marque Clontech (ref : 634923). Pour la transcription inverse de la partie 5' de l'ARNm de *TRAPPC9* réalisée chez la famille LS, l'amorce spécifique de la coiffe est utilisée en forward et l'amorce Reverse est spécifique de l'ARNm *TRAPPC9* et couvre la jonction entre l'exon 1 et 2 (TRAPPC9-RACE-R : GAAGGACTGGGACTTCAAATG). Le protocole suivi est celui du fournisseur.

### 12) Transformation bactérienne et extraction plasmidique

1. Préparer 50µL de bactéries compétentes (One Shot TOP10 Escherichia Coli ; Invitrogen C4040-06) + 1µL d'ADN plasmidique à 100ng/µL (sous cette forme l'ADN est capable de passer les pores de la membrane plasmique bactérienne).
2. Laisser la préparation 30 minutes dans la glace, et faire chauffer un bain-marie à 42°C
3. Plonger 30 seconde exactement la préparation bactéries + plasmides dans le bain à 42°C (choc thermique favorisant l'ouverture des pores de la membrane bactérienne pour l'entrée d'un plasmide)
4. Ajouter 500µL de SOC medium et laisser agiter 1h à 37°C
5. Procéder à un étalement de la solution bactérienne sur une boîte de pétri recouverte de LB (Luria Bertani ou Lysogeny Broth) agar supplémenté avec un antibiotique de sélection. Laisser une nuit à l'étuve à 37°C.
6. Sélectionner un clone de bactéries qui sera ensuite cultivé dans 1mL de SOC avec antibiotique de sélection pendant 1h à 37°C et sous agitation. Lorsque la pré-culture se termine, transvaser le tout dans 50-100mL de LB liquide avec l'antibiotique de sélection. Laisser toute la nuit à 37°C sous agitation.
7. Transvaser le lendemain dans des tubes de 50mL et centrifuger pendant 30 min à 5000 rpm afin d'obtenir un culot de bactéries. Procéder à l'extraction des plasmides grâce au kit Qiagen (QIAfilter Plasmid Purification, QIAGEN, référence:12263) afin d'obtenir un culot de plasmides déshydratés

8. Reprendre les plasmides dans volume (variable selon la concentration désirée) d'eau stérile. Et doser.

### 13) Clonage

Le plasmide PcDNA 3.3-topo® est désigné pour produire une grande quantité de transgène. Dans un premier temps, le fragment à cloner est amplifié par PCR puis inséré dans le vecteur plasmidique. Dans un second temps, une transformation bactérienne est réalisée pour insérer le vecteur dans des bactéries compétentes One Shot® TOP10 (30 sec à 42°C). Les bactéries sont ensuite cultivées sur gélose Agar avec l'antibiotique de sélection : l'ampicilline. Les clones bactériens produits sont ensuite prélevés directement pour la PCR et séquençage. Les modalités de protocoles du clonage respectent les instructions du constructeur. Le kit de clonage utilisé est le pcDNA 3.3 TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen/Lifetech : 45-1124).

### 14) Culture de fibroblastes *in vitro*

Les fibroblastes sont extraits à partir d'une biopsie axillaire de peau profonde. La biopsie est découpée en fins morceaux qui sont déposés dans une T25. Après adhésion (3-4h à l'étuve), du milieu complet (milieu+sérum+antibiotiques) est ajouté. Afin de favoriser la sortie des fibroblastes de la biopsie, du milieu Opti-MEM® (Lifetech : 51985042) avec 5% de sérum de veau foetal (Lifetech : 10099141) et 1% d'antibiotiques Pénicilline/Streptomycine (Lifetech : 15070063) est utilisé. Le milieu est changé tous les deux jours. Après quelques semaines, les fibroblastes colonisent le fond de la T25. Lorsque suffisamment de cellules sont présentes, une action par la trypsine est réalisée (Lifetech : 25200056) afin de « décoller » les cellules et de les passer dans une (voire deux) T75.

La culture s'entretient par des changements de milieux réguliers (tous les deux jours environ) et passages réguliers (dès que la T75 est à confluence). Le milieu RPMI (Lifetech : 61870044) complet peut être également utilisé au quotidien.

Le culot cellulaire s'obtient par une action de la trypsine : 2 lavages au PBS (élimination du sérum présent sur les cellules), suivis par un traitement à la trypsine (1 à 2 mL de trypsine à laisser agir pendant 5 min à 37°C) ; puis un volume de 5-10mL de milieu complet (avec sérum) est ajouté pour stopper l'action de l'enzyme. Une centrifugation à 1500 rpm pendant 5 min est réalisée afin d'obtenir un culot cellulaire. Après avoir éliminé le surnageant, le culot cellulaire peut être utilisé immédiatement ou stocké à -80°C puis à -160°C (azote liquide).

### 15) Western Blot

Le western blot se pratique pour la détection et la quantification de protéines présentes dans des cellules en culture type fibroblaste. De nombreuses étapes se succèdent :

Extraction de protéines : A partir d'un culot cellulaire, les protéines sont extraites grâce à un tampon d'extraction appelé EBC (pour 500mL : 12,5mL de Tris 2M, PH8 ; 17mL de NaCl 5M ; 2,5mL de NP40 ; 25mL de NaF 1M) auquel il faut ajouter une pastille d'inhibiteurs de protéases (Roche, réf : 04693116001) pour 50mL d'EBC. La lyse cellulaire se réalise pendant 30 min dans la glace (4°C). Après une brève centrifugation, le surnageant est prélevé, dépourvu de débris cellulaires.

Préparation du gel de Running (2 gels à 10%) : 4mL d'eau ; 2,13mL d'acrylamide à 40% ; 2,13mL de LTB 4X ; 167 µL d'APS à 10% et 2,13 µL de Temed. Après avoir assemblé les plaques entre elles puis les avoir fixées sur leur support, un gel de 4mL est coulé entre les plaques (2mm). Une attente de 15-20min est nécessaire pour la polymérisation.

Préparation du gel de Stacking (2 gels) : 4,13mL d'eau ; 0,8mL d'acrylamide à 40% ; 1,6mL d'UTB 4X, 167 µL d'APS 10% et 2,13µL de Temed. Il s'agit de faire couler le gel de stacking sur le dessus du gel de running jusqu'à la limite des plaques, puis d'insérer immédiatement les peignes pour la formation des puits, avant la polymérisation du gel.

Préparation et dépôt des protéines et migration : il faut ensuite procéder au dépôt de ~40µg de protéines extraites dans un volume total de dépôt de 20µL dont 10µL de tampon de Laemmli. Les échantillons sont dénaturés juste avant le dépôt par un chauffage à 96°C pendant 10min. Le marqueur de poids moléculaire est également ajouté dans un puits du gel. Le tampon de migration est utilisé pour remplir totalement la cuve de migration puis la migration se fait pendant 1h-1h30 à 150V.

Tampon de migration (10X pour 1L final) : 30,3g de tris ; 144g de glycine, 50mL de SDS à 20% et eau (QSP 1L).

Transfert : La préparation du « sandwich » se réalise en respectant l'ordre suivant : plaque noire, papier whatmann, gel de migration, membrane de PVDF (Biorad, référence : 162-0177), papier Whatmann et plaque blanche. Le « sandwich » est placé dans la cuve en parallèle d'un bloc de glace afin que le transfert se réalise à froid. La cuve est remplie par du tampon de transfert. Laisser transférer pendant 1h à 100V.

Tampon de transfert (10X pour 2L) : 12,1g de tris ; 57,6g de glycine et eau (QSP 2L)

Blocage de la membrane : La membrane de PVDF avec les protéines est saturée par la solution de blocage, pendant 1h à température ambiante sous faible agitation.

Solution de blocage : PBST0,2 (PBS + 0,2% de tween) + 5% de protéines de lait (Régilait).

Hybridation anticorps primaire : la solution de blocage est diluée au 10<sup>ème</sup> avec du PBST0,2 puis l'anticorps primaire capable de reconnaître la protéine d'intérêt est ajouté (dilution : 1/200<sup>ème</sup> à 1/2000<sup>ème</sup>). 4mL de solution d'anticorps primaire sont déposés dans un sachet plastique soudé contenant la membrane de PVDF bloquée + protéines. L'hybridation se réalise sur la nuit à 4°C sous faible agitation. Puis, trois lavages de PBST 0,2% pendant 10 min sont pratiqués, sous agitation rapide.

Hybridation anticorps secondaire : la solution de blocage est diluée au 10<sup>ème</sup> puis l'anticorps secondaire est ajouté (dilution : 1/10 000<sup>ème</sup> à 1/20 000<sup>ème</sup>). L'anticorps secondaire est couplé à une HRP (Horseradish Peroxydase) et est capable de reconnaître les anticorps primaires. L'hybridation se fait pendant 1h à température ambiante sous faible agitation. Puis, trois lavages de PBST 0,2% pendant 10 min sont réalisés.

Révélation : L'ECL<sup>TM</sup> (GE healthcare, RPN2132) est déposée sur la membrane posée sur une surface plane. L'ECL<sup>TM</sup> contient le substrat de la HRP, du peroxyde et un produit lumigen PS-3, qui permet la production d'un produit lumineux qui sera ensuite révélé grâce à un film photographique (Amersham Hyperfilm ECL 18\*24cm ref 28906837 GE Healthcare). L'exposition se fait dans une cassette à l'abri de la lumière, en déposant un film radiographique sur membrane de PVDF. Différentes expositions peuvent être pratiquées : allant de 5 sec à 5 min ; le film radiographique est ensuite placé dans le révélateur (ACFA, référence : CAWO CAWOMAT 2000 IR).

Anticorps primaire polyclonal anti-TRAPPC9 (Rabbit) : ProteinTech Group (ref : 16014-1-AP), dilution 1/1500<sup>ème</sup>

Anticorps primaire polyclonal anti-IκB (Rabbit) : SantaCruz (ref : sc-371), dilution 1/1000<sup>ème</sup>

Anticorps primaire polyclonal anti-NEMO (Rabbit) : , dilution au 1/1000<sup>ème</sup>

Anticorps secondaire Donkey anti Rabbit IgG-HRP: SantaCruz : sc2313, dilution 1/20000<sup>ème</sup>

Anticorps secondaire Donkey anti Mouse IgG-HRP: SantaCruz : sc2314, Dilution 1/10000<sup>ème</sup>

## 16) Stimulation TNFα et dégradation de l'IκB-α

- Les cellules doivent êtreensemencées dans T25 ou boîte de pétri (en fonction de la quantité de protéines souhaitée). La stimulation peut se faire lorsque les cellules sont à 80% de confluence.
- Vider le milieu et ajouter du milieu supplémenté en TNFα (10ng/mL) sur les cellules. Afin de procéder à une cinétique de stimulation (0min-10min-20min-30min-40min-60min), il faut déposer le milieu avec TNF sur chaque boîte et stopper la stimulation au temps voulu. Pour stopper la réaction, il faut : aspirer le milieu, ajouter 5mL de PBS froid (4°C) et gratter les cellules. Les cellules avec le D-PBS sont ensuite transférées dans un tube 15mL et mises

immédiatement en glace pour conserver une température de 4°C, qui neutralise l'action du TNF mais aussi des protéases.

- Lorsque toutes les stimulations ont été réalisées puis stoppées et conservées à 4°C, les tubes sont centrifugés à 4°C à 1500 rpm pendant 5min. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est conservé à 4°C.
- Procéder à la lyse cellulaire. Ajouter l'EBC+inhibiteur de protéase (IP) (20-80µL/stimulation). Vortexer puis laisser agir pendant 30min à 4°C (en vortexant de temps en temps). Lorsque le culot est dissout, centrifuger à vitesse basse, les tubes pour éliminer les débris cellulaires et prélever le surnageant.
- Doser la concentration en protéines du lysat cellulaire au Nanodrop, en utilisant l'EBC + IP comme blanc.
- Procéder au western blot dirigé contre la protéine IκB-α (voir partie western blot).

#### 17) Production de luciférase firefly sous contrôle d'un promoteur NF-κB suite à une stimulation au TNFα

- ensemencer une plaque 12 puits (~80 000 cellules/puits) avec des cellules SH-SY5Y (dérivées d'un neuroblastome humain) dans du milieu RPMI complet (2mL/puits). Laisser au moins 6h pour que les cellules adhèrent au plastique.
- Transfection : préparer un mix de plasmide comprenant 1µg de plasmide Igkluc (plasmide contenant le gène luciférase Firefly sous contrôle de six sites promoteurs de NF-κB) ; 500ng de Rénilla (plasmide contenant un gène luciférase Rénilla, luciférase de l'anémone de mer qui produit une luminescence à partir d'un substrat différent de la luciférase Firefly) sous contrôle d'un promoteur constitutif (promoteur T75) ; une gamme croissante d'un plasmide IKBKG sous contrôle d'un promoteur fort (0 à 500ng/puits) et une quantité variable de pcDNA (vecteur vide) afin de transfecter une quantité similaire de matériel génique par puits (500ng à 0). Pour chaque préparation, ajouter 1µL/puits de Plus Reagent dans 200µL de milieu, ainsi que le mix de plasmides. Laisser agir 15 min à TA. Puis ajouter 4µL/puits de lipofectamine LTX (Invitrogen, Lipofectamine plus Reagent, référence : 15338-100) et laisser à nouveau agir pendant 30 min à TA. Enfin déposer la totalité du mix préparé, goutte à goutte, dans chaque puits. Incuber à l'étuve sur la nuit pour la transfection.
- Procéder à deux lavages au D-PBS
- Stimulation au TNFα à 10ng/mL pendant 5h dans du milieu RPMI complet. Puis rincer au D-PBS.
- Procéder à une lyse des cellules dans chaque puits par du tampon d'extraction EBC pendant 30 min à 4°C. Après avoir centrifugé pour éliminer les débris cellulaires, les surnageants sont prélevés.
- Utiliser le kit promega Dual Luciferase® Reporter Assay System (E1910) pour la détection des deux types de luciférase produites (Firefly et Renilla). La lecture des deux types de luciférase est réalisée grâce à un luminomètre. Puis le ratio Luciférase Firefly (plasmide Igkluc)/Luciférase Rénilla (plasmide de référence) est calculé

BIBLIOGRAPHIE

## *Littérature Scientifique*

Abou Jamra R, Philippe O, Raas-Rothschild A, Eck SH, Graf E, Buchert R, Borck G, Ekici A, Brockschmidt FF, Nöthen MM, Munnich A, Strom TM, Reis A, Colleaux L. Adaptor protein complex 4 deficiency causes severe autosomal-recessive intellectual disability, progressive spastic paraplegia, shy character, and short stature. *Am J Hum Genet.* 2011 Jun 10;88(6):788-95. Epub 2011 May 27. PubMed PMID: 21620353; PubMed Central PMCID: PMC3113253.

Abou Jamra R, Wohlfart S, Zweier M, Uebe S, Priebe L, Ekici A, Giesebrecht S, Abboud A, Al Khateeb MA, Fakher M, Hamdan S, Ismael A, Muhammad S, Nöthen MM, Schumacher J, Reis A. Homozygosity mapping in 64 Syrian consanguineous families with non-specific intellectual disability reveals 11 novel loci and high heterogeneity. *Eur J Hum Genet.* 2011 Jun 1. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21629298.

Achiron A, Garty BZ, Menascu S, Magalashvili D, Dolev M, Ben-Zeev B, Pinhas-Hamiel O. Multiple sclerosis in Israeli children: incidence, an clinical, cerebrospinal fluid and magnetic resonance imaging findings. *Isr Med Assoc J.* 2012 Apr;14(4):234-9. PubMed PMID: 22675841.

Albensi BC, Mattson MP. Evidence for the involvement of TNF and NF-kappaB in hippocampal synaptic plasticity. *Synapse.* 2000 Feb;35(2):151-9. PubMed PMID: 10611641.

Amiel J, Rio M, de Pontual L, Redon R, Malan V, Boddaert N, Plouin P, Carter NP, Lyonnet S, Munnich A, Colleaux L. Mutations in TCF4, encoding a class I basic helix-loop-helix transcription factor, are responsible for Pitt-Hopkins syndrome, a severe epileptic encephalopathy associated with autonomic dysfunction. *Am J Hum Genet.* 2007 May;80(5):988-93. Epub 2007 Mar 23. PubMed PMID: 17436254; PubMed Central PMCID: PMC1852736.

Ariani F, Mari F, Pescucci C, Longo I, Bruttini M, Meloni I, Hayek G, Rocchi R, Zappella M, Renieri A. Real-time quantitative PCR as a routine method for screening large rearrangements in Rett syndrome: Report of one case of MECP2 deletion and one case of MECP2 duplication. *Hum Mutat.* 2004 Aug;24(2):172-7. PubMed PMID: 15241799.

Arnett HA, Mason J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, Ting JP. TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat Neurosci.* 2001 Nov;4(11):1116-22. PubMed PMID: 11600888.

Asselta R, Duga S, Spena S, Santagostino E, Peyvandi F, Piseddu G, Targhetta R, Malcovati M, Mannucci PM, Tenchini ML. Congenital afibrinogenemia: mutations leading to premature termination codons in fibrinogen A alpha-chain gene are not associated with the decay of the mutant mRNAs. *Blood.* 2001 Dec 15;98(13):3685-92. PubMed PMID: 11739173.

Backx L, Vermeesch J, Pijkels E, de Ravel T, Seuntjens E, Van Esch H. PPP2R2C, a gene disrupted in autosomal dominant intellectual disability. *Eur J Med Genet.* 2010 Sep-Oct;53(5):239-43. Epub 2010 Jun 23. PubMed PMID: 20601260.

Ballarati L, Cereda A, Caselli R, Maitz S, Russo S, Selicorni A, Larizza L, Giardino D. Deletion of the AP152 gene in a child with psychomotor delay and hypotonia. *Eur J Med Genet.* 2012 Feb;55(2):124-7. Epub 2011 Dec 17. PubMed PMID: 22210230.

Barrowman J, Bhandari D, Reinisch K, Ferro-Novick S. TRAPP complexes in membrane traffic: convergence through a common Rab. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010 Nov;11(11):759-63. PubMed PMID: 20966969.

Basel-Vanagaite L, Attia R, Yahav M, Ferland RJ, Anteki L, Walsh CA, Olender T, Straussberg R, Magal N, Taub E, Drasinover V, Alkelai A, Bercovich D, Rechavi G, Simon AJ, Shohat M. The CC2D1A, a member of a new gene family with C2 domains, is involved in autosomal recessive non-syndromic mental retardation. *J Med Genet.* 2006 Mar;43(3):203-10. Epub 2005 Jul 20. PubMed PMID: 16033914; PubMed Central PMCID: PMC2563235.

Bauer P, Leshinsky-Silver E, Blumkin L, Schlipf N, Schröder C, Schicks J, Lev D, Riess O, Lerman-Sagie T, Schöls L. Mutation in the AP4B1 gene cause hereditary spastic paraplegia type 47 (SPG47) . *Neurogenetics.* 2012 Feb;13(1):73-6. PubMed PMID: 22290197.

Bauters M, Van Esch H, Friez MJ, Boespflug-Tanguy O, Zenker M, Vianna-Morgante AM, Rosenberg C, Ignatius J, Raynaud M, Hollanders K, Govaerts K, Vandenreijt K, Niel F, Blanc P, Stevenson RE, Fryns JP, Marynen P, Schwartz CE, Froyen G. Nonrecurrent MECP2 duplications mediated by genomic architecture-driven DNA breaks and break-induced replication repair. *Genome Res.* 2008 Jun;18(6):847-58. Epub 2008 Apr 2. PubMed PMID: 18385275; PubMed Central PMCID: PMC2413152.

Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Ghosh S, Baltimore D. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature.* 1995 Jul 13;376(6536):167-70. PubMed PMID: 7603567.

Benayoun L, Spiegel R, Auslender N, Abbasi AH, Rizel L, Hujeirat Y, Salama I, Garzozzi HJ, Allon-Shalev S, Ben-Yosef T. Genetic heterogeneity in two consanguineous families segregating early onset retinal degeneration: the pitfalls of homozygosity mapping. *Am J Med Genet A.* 2009 Feb 15;149A(4):650-6. PubMed PMID: 19140180.



Berkovic SF, Dibbens LM, Oshlack A, Silver JD, Katerelos M, Vears DF, Lüllmann-Rauch R, Blanz J, Zhang KW, Stankovich J, Kalnins RM, Dowling JP, Andermann E, Andermann F, Faldini E, D'Hooge R, Vadlamudi L, Macdonell RA, Hodgson BL, Bayly MA, Savige J, Mulley JC, Smyth GK, Power DA, Saftig P, Bahlo M. Array-based gene discovery with three unrelated subjects shows SCARB2/LIMP-2 deficiency causes myoclonus epilepsy and glomerulosclerosis. *Am J Hum Genet.* 2008 Mar;82(3):673-84. Epub 2008 Feb 28. PubMed PMID: 18308289; PubMed Central PMCID: PMC2427287.

Bhakar AL, Tannis LL, Zeindler C, Russo MP, Jobin C, Park DS, MacPherson S, Barker PA. Constitutive nuclear factor-kappa B activity is required for central neuron survival. *J Neurosci.* 2002 Oct 1;22(19):8466-75. PubMed PMID: 12351721.

Bhalla K, Luo Y, Buchan T, Beachem MA, Guzauskas GF, Ladd S, Bratcher SJ, Schroer RJ, Balsamo J, DuPont BR, Lilien J, Srivastava AK. Alterations in CDH15 and KIRREL3 in patients with mild to severe intellectual disability. *Am J Hum Genet.* 2008 Dec;83(6):703-13. Epub 2008 Nov 13. PubMed PMID: 19012874; PubMed Central PMCID: PMC2668064.

Bhuvanagiri M, Schlitter AM, Hentze MW, Kulozik AE. NMD: RNA biology meets human genetic medicine. *Biochem J.* 2010 Sep 15;430(3):365-77. Review. PubMed PMID: 20795950.

Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res.* 1978 Nov;38(11 Pt 1):3751-7. PubMed PMID: 29704.

Bienvenu T, des Portes V, Saint Martin A, McDonell N, Billuart P, Carrié A, Vinet MC, Couvert P, Toniolo D, Ropers HH, Moraine C, van Bokhoven H, Fryns JP, Kahn A, Beldjord C, Chelly J. Non-specific X-linked semidominant mental retardation by mutations in a Rab GDP-dissociation inhibitor. *Hum Mol Genet.* 1998 Aug;7(8):1311-5. PubMed PMID: 9668174.

Birk E, Har-Zahav A, Manzini CM, Pasmanik-Chor M, Kornreich L, Walsh CA, Noben-Trauth K, Albin A, Simon AJ, Colleaux L, Morad Y, Rainshtein L, Tischfield DJ, Wang P, Magal N, Maya I, Shoshani N, Rechavi G, Gothelf D, Maydan G, Shohat M, Basel-Vanagaite L. SOBP is mutated in syndromic and nonsyndromic intellectual disability and is highly expressed in the brain limbic system. *Am J Hum Genet.* 2010 Nov 12;87(5):694-700. Epub 2010 Oct 28. PubMed PMID: 21035105; PubMed Central PMCID: PMC2978971.

Boehm M, Aguilar RC, Bonifacino JS. Functional and physical interactions of the adaptor protein complex AP-4 with ADP-ribosylation factors (ARFs). *EMBO J.* 2001 Nov 15;20(22):6265-76. PubMed PMID: 11707398; PubMed Central PMCID: PMC125733.

Boehm M, Bonifacino JS. Adaptins: the final recount. *Mol Biol Cell.* 2001 Oct;12(10):2907-20. PubMed PMID: 11598180; PubMed Central PMCID: PMC60144.

Bond J, Woods CG. Cytoskeletal genes regulating brain size. *Curr Opin Cell Biol.* 2006 Feb;18(1):95-101. Epub 2005 Dec 6. Review. PubMed PMID: 16337370.

Bonthius DJ, Luong T, Bonthius NE, Hostager BS, Karacay B. Nitric oxide utilizes NF-kappaB to signal its neuroprotective effect against alcohol toxicity. *Neuropharmacology.* 2009 Mar;56(3):716-31. Epub 2008 Dec 25. PubMed PMID: 19135070.

Borck G, Mollà-Herman A, Boddaert N, Encha-Razavi F, Philippe A, Robel L, Desguerre I, Brunelle F, Benmerah A, Munnich A, Colleaux L. Clinical, cellular, and neuropathological consequences of AP1S2 mutations: further delineation of a recognizable X-linked mental retardation syndrome. *Hum Mutat.* 2008 Jul;29(7):966-74. PubMed PMID: 18428203.

Boukhris A, Stevanin G, Feki I, Denora P, Elleuch N, Miladi MI, Goizet C, Truchetto J, Belal S, Brice A, Mhiri C. Tunisian hereditary spastic paraplegias: clinical variability supported by genetic heterogeneity. *Clin Genet.* 2009 Jun;75(6):527-36. Epub 2009 May 5. PubMed PMID: 19438933.

Bower C, Leonard H, Petterson B. Intellectual disability in Western Australia. *J Paediatr Child Health.* 2000 Jun;36(3):213-5. Review. PubMed PMID: 10849218.

Burgos PV, Mardones GA, Rojas AL, daSilva LL, Prabhu Y, Hurley JH, Bonifacino JS. Sorting of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein mediated by the AP-4 complex. *Dev Cell.* 2010 Mar 16;18(3):425-36. PubMed PMID: 20230749; PubMed Central PMCID: PMC2841041.

Çalışkan M, Chong JX, Uricchio L, Anderson R, Chen P, Sougnez C, Garimella K, Gabriel SB, dePristo MA, Shakir K, Matern D, Das S, Waggoner D, Nicolae DL, Ober C. Exome sequencing reveals a novel mutation for autosomal recessive non-syndromic mental retardation in the *TECR* gene on chromosome 19p13. *Hum Mol Genet.* 2011 Apr 1;20(7):1285-9. Epub 2011 Jan 6. PubMed PMID: 21212097; PubMed Central PMCID: PMC3115579.

Campagnoni AT, Skoff RP. The pathobiology of myelin mutants reveal novel biological functions of the MBP and PLP genes. *Brain Pathol.* 2001 Jan;11(1):74-91. Review. PubMed PMID: 11145205.

Cans C, Wilhelm L, Baille MF, du Mazaubrun C, Grandjean H, Rumeau-Rouquette C. Aetiological findings and associated factors in children with severe mental retardation. *Dev Med Child Neurol.* 1999 Apr;41(4):233-9. PubMed PMID: 10355806.



Chen HJ, Rojas-Soto M, Oguni A, Kennedy MB. A synaptic Ras-GTPase activating protein (p135 SynGAP) inhibited by CaM kinase II. *Neuron*. 1998 May;20(5):895-904. Erratum in: *Neuron* 2002 Jan 3;33(1):151. PubMed PMID: 9620694.

Chen LF, Greene WC. Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004 May;5(5):392-401. Review. PubMed PMID: 15122352.

Chen Y, Wang H, Yoon SO, Xu X, Hottiger MO, Svaren J, Nave KA, Kim HA, Olson EN, Lu QR. HDAC-mediated deacetylation of NF-kB is critical for Schwann cell myelination. *Nat Neurosci*. 2011 Apr;14(4):437-41. Epub 2011 Mar 20. PubMed PMID: 21423191; PubMed Central PMCID: PMC3074381.

Chester A, Somasekaram A, Tzimina M, Jarmuz A, Gisbourne J, O'Keefe R, Scott J, Navaratnam N. The apolipoprotein B mRNA editing complex performs a multifunctional cycle and suppresses nonsense-mediated decay. *EMBO J*. 2003 Aug 1;22(15):3971-82. PubMed PMID: 12881431; PubMed Central PMCID: PMC169042.

Chiocchetti A, Pakalapati G, Duketis E, Wiemann S, Poustka A, Poustka F, Klauck SM. Mutation and expression analyses of the ribosomal protein gene RPL10 in an extended German sample of patients with autism spectrum disorder. *Am J Med Genet A*. 2011 Jun;155A(6):1472-5. doi: 10.1002/ajmg.a.33977. Epub 2011 May 12. PubMed PMID: 21567917.

Chiurazzi P, Schwartz CE, Gecz J, Neri G. XLMR genes: update 2007. *Eur J Hum Genet*. 2008 Apr;16(4):422-34. Epub 2008 Jan 16. Review. PubMed PMID: 18197188.

Contractor A, Swanson G, Heinemann SF. Kainate receptors are involved in short- and long-term plasticity at mossy fiber synapses in the hippocampus. *Neuron*. 2001 Jan;29(1):209-16. PubMed PMID: 11182092.

Courtois G, Gilmore TD. Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene*. 2006 Oct 30;25(51):6831-43. Review. PubMed PMID: 17072331.

Courtois G, Smahi A. NF-kappaB-related genetic diseases. *Cell Death Differ*. 2006 May;13(5):843-51. Review. PubMed PMID: 16397577.

Crick FHC, Barnett L, Brenner S, Watts-Tobin RJ. General nature of the genetic code for proteins. *Nature* 192 : 1227-1232. 1961.

Crimella C, Arnoldi A, Crippa F, Mostacciolo ML, Boaretto F, Sironi M, D'Angelo MG, Manzoni S, Piccinini L, Turconi AC, Toscano A, Musumeci O, Benedetti S, Fazio R, Bresolin N, Daga A, Martinuzzi A, Bassi MT. Point mutations and a large intragenic deletion in SPG11 in complicated spastic paraplegia without thin corpus callosum. *J Med Genet*. 2009 May;46(5):345-51. Epub 2009 Feb 5. PubMed PMID: 19196735.

D'Adamo P, Fassone L, Gedeon A, Janssen EA, Bione S, Bolhuis PA, Barth PG, Wilson M, Haan E, Orstavik KH, Patton MA, Green AJ, Zammarchi E, Donati MA, Toniolo D. The X-linked gene G4.5 is responsible for different infantile dilated cardiomyopathies. *Am J Hum Genet*. 1997 Oct;61(4):862-7. PubMed PMID: 9382096; PubMed Central PMCID: PMC1715993.

D'Adamo P, Menegon A, Lo Nigro C, Grasso M, Gulisano M, Tamanini F, Bienvenu T, Gedeon AK, Oostra B, Wu SK, Tandon A, Valtorta F, Balch WE, Chelly J, Toniolo D. Mutations in GDI1 are responsible for X-linked non-specific mental retardation. *Nat Genet*. 1998 Jun;19(2):134-9. Erratum in: *Nat Genet* 1998 Jul;19(3):303. PubMed PMID: 9620768.

Daily DK, Ardinger HH, Holmes GE. Identification and evaluation of mental retardation. *Am Fam Physician*. 2000 Feb 15;61(4):1059-67, 1070. Review. Erratum in: *Am Fam Physician* 2000 Sep 1;62(5):961-3. PubMed PMID: 10706158.

Danckwardt S, Neu-Yilik G, Thermann R, Frede U, Hentze MW, Kulozik AE. Abnormally spliced beta-globin mRNAs: a single point mutation generates transcripts sensitive and insensitive to nonsense-mediated mRNA decay. *Blood*. 2002 Mar 1;99(5):1811-6. PubMed PMID: 11861299.

Darding M, Meier P. IAPs: guardians of RIPK1. *Cell Death Differ*. 2012 Jan;19(1):58-66. doi: 10.1038/cdd.2011.163. Epub 2011 Nov 18. Review. PubMed PMID: 22095281; PubMed Central PMCID: PMC3252837.

de Brouwer AP, Yntema HG, Kleefstra T, Lugtenberg D, Oudakker AR, de Vries BB, van Bokhoven H, Van Esch H, Frints SG, Froyen G, Fryns JP, Raynaud M, Moizard MP, Ronce N, Bensalem A, Moraine C, Poirier K, Castelnaud L, Saillour Y, Bienvenu T, Beldjord C, des Portes V, Chelly J, Turner G, Fullston T, Gecz J, Kuss AW, Tzschach A, Jensen LR, Lenzner S, Kalscheuer VM, Ropers HH, Hamel BC. Mutation frequencies of X-linked mental retardation genes in families from the EuroMRX consortium. *Hum Mutat*. 2007 Feb;28(2):207-8. PubMed PMID: 17221867.

Del Bo R, Di Fonzo A, Ghezzi S, Locatelli F, Stevanin G, Costa A, Corti S, Bresolin N, Comi GP. SPG11: a consistent clinical phenotype in a family with homozygous spatacsin truncating mutation. *Neurogenetics*. 2007 Nov;8(4):301-5. Epub 2007 Aug 24. PubMed PMID: 17717710.

del Gaudio D, Fang P, Scaglia F, Ward PA, Craigen WJ, Glaze DG, Neul JL, Patel A, Lee JA, Irons M, Berry SA, Pursley AA, Grebe TA, Freedenberg D, Martin RA, Hsich GE, Khera JR, Friedman NR, Zoghbi HY, Eng CM, Lupski JR, Beaudet AL, Cheung SW, Roa BB. Increased MECP2 gene copy number as the result of genomic duplication in neurodevelopmentally delayed males. *Genet Med*. 2006 Dec;8(12):784-92. PubMed PMID: 17172942.

Dell'Angelica EC, Mullins C, Bonifacino JS. AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors. *J Biol Chem*. 1999 Mar 12;274(11):7278-85. PubMed PMID: 10066790.

Dell'Angelica EC, Shotelersuk V, Aguilar RC, Gahl WA, Bonifacino JS. Altered trafficking of lysosomal proteins in Hermansky-Pudlak syndrome due to mutations in the beta 3A subunit of the AP-3 adaptor. *Mol Cell*. 1999 Jan;3(1):11-21. PubMed PMID: 10024875

Deng F, Price MG, Davis CF, Mori M, Burgess DL. Stargazin and other transmembrane AMPA receptor regulating proteins interact with synaptic scaffolding protein MAGI-2 in brain. *J Neurosci*. 2006 Jul 26;26(30):7875-84. PubMed PMID: 16870733.

des Portes V, Billuart P, Carrié A, Bachner L, Bienvenu T, Vinet MC, Beldjord C, Ponsot G, Kahn A, Boué J, Chelly J. A gene for dominant nonspecific X-linked mental retardation is located in Xq28. *Am J Hum Genet*. 1997 Apr;60(4):903-9. PubMed PMID: 9106537; PubMed Central PMCID: PMC1712488.

Ducroq D, Shalev S, Habib A, Munnich A, Kaplan J, Rozet JM. Three different ABCA4 mutations in the same large family with several consanguineous loops affected with autosomal recessive cone-rod dystrophy. *Eur J Hum Genet*. 2006 Dec;14(12):1269-73. Epub 2006 Aug 9. PubMed PMID: 16896346.

Elleuch N, Bouslam N, Hanein S, Lossos A, Hamri A, Klebe S, Meiner V, Birouk N, Lerer I, Grid D, Bacq D, Tazir M, Zelenika D, Argov Z, Durr A, Yahyaoui M, Benomar A, Brice A, Stevanin G. Refinement of the SPG15 candidate interval and phenotypic heterogeneity in three large Arab families. *Neurogenetics*. 2007 Nov;8(4):307-15. Epub 2007 Jul 28. PubMed PMID: 17661097.

Feenstra I, Vissers LE, Orsel M, van Kessel AG, Brunner HG, Veltman JA, van Ravenswaaij-Arts CM. Genotype-phenotype mapping of chromosome 18q deletions by high-resolution array CGH: an update of the phenotypic map. *Am J Med Genet A*. 2007 Aug 15;143A(16):1858-67. PubMed PMID: 17632778.

Flint J, Wilkie AO. The genetics of mental retardation. *Br Med Bull*. 1996 Jul;52(3):453-64. Review. PubMed PMID: 8949249.

Fridmacher V, Kaltschmidt B, Goudeau B, Ndiaye D, Rossi FM, Pfeiffer J, Kaltschmidt C, Israël A, Mémet S. Forebrain-specific neuronal inhibition of nuclear factor-kappaB activity leads to loss of neuroprotection. *J Neurosci*. 2003 Oct 15;23(28):9403-8. PubMed PMID: 14561868.

Frints SG, Froyen G, Marynen P, Fryns JP. X-linked mental retardation: vanishing boundaries between non-specific (MRX) and syndromic (MRXS) forms. *Clin Genet*. 2002 Dec;62(6):423-32. Review. PubMed PMID: 12485186.

Garshasbi M, Hadavi V, Habibi H, Kahrizi K, Kariminejad R, Behjati F, Tzschach A, Najmabadi H, Ropers HH, Kuss AW. A defect in the TUSC3 gene is associated with autosomal recessive mental retardation. *Am J Hum Genet*. 2008 May;82(5):1158-64. Epub 2008 May 1. PubMed PMID: 18452889; PubMed Central PMCID: PMC2651624.

Géczy J, Shoubridge C, Corbett M. The genetic landscape of intellectual disability arising from chromosome X. *Trends Genet*. 2009 Jul;25(7):308-16. Epub 2009 Jun 24. Review. PubMed PMID: 19556021.

Gedeon AK, Colley A, Jamieson R, Thompson EM, Rogers J, Sillence D, Tiller GE, Mulley JC, Géczy J. Identification of the gene (SEDL) causing X-linked spondyloepiphyseal dysplasia tarda. *Nat Genet*. 1999 Aug;22(4):400-4. PubMed PMID: 10431248.

Gitschier J, Wood WI, Tuddenham EG, Shuman MA, Goralka TM, Chen EY, Lawn RM. Detection and sequence of mutations in the factor VIII gene of haemophiliacs. *Nature*. 1985 May 30-Jun 5;315(6018):427-30. PubMed PMID: 2987704.

Glyvuk N, Tsytsyura Y, Geumann C, D'Hooge R, Hüve J, Kratzke M, Baltés J, Boening D, Klingauf J, Schu P. AP-1/sigma1B-adaptin mediates endosomal synaptic vesicle recycling, learning and memory. *EMBO J*. 2010 Apr 21;29(8):1318-30. Epub 2010 Mar 4. Erratum in: *EMBO J*. 2010 Jun 2;29(11):1941. Böning, Daniel [corrected to Boening, Daniel]. PubMed PMID: 20203623; PubMed Central PMCID: PMC2868567.

Goldenberg A, Saugier-Veber P. [Genetics of mental retardation]. *Pathol Biol (Paris)*. 2010 Oct;58(5):331-42. Epub 2009 Nov 25. Review. French. PubMed PMID: 19942372.

Griggs BL, Ladd S, Saul RA, DuPont BR, Srivastava AK. Dedicator of cytokinesis 8 is disrupted in two patients with mental retardation and developmental disabilities. *Genomics*. 2008 Feb;91(2):195-202. Epub 2007 Dec 3. PubMed PMID: 18060736; PubMed Central PMCID: PMC2245991.

Gwynn B, Smith RS, Rowe LB, Taylor BA, Peters LL. A mouse TRAPP-related protein is involved in pigmentation. *Genomics*. 2006 Aug;88(2):196-203. Epub 2006 May 12. PubMed PMID: 16697553.

Gyrd-Hansen M, Meier P. IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2010 Aug;10(8):561-74. Review. PubMed PMID: 20651737.

Ham AL, Kumar A, Deeter R, Schanen NC. Does genotype predict phenotype in Rett syndrome? *J Child Neurol*. 2005 Sep;20(9):768-78. Review. PubMed PMID: 16225834.

Hamdan FF, Gauthier J, Araki Y, Lin DT, Yoshizawa Y, Higashi K, Park AR, Spiegelman D, Dobrzaniecka S, Piton A, Tomitori H, Daoud H, Massicotte C, Henrion E, Diallo O; S2D Group, Shekarabi M, Marineau C, Shevell M, Maranda B, Mitchell G, Nadeau A, D'Anjou G, Vanasse M, Srour M, Lafrenière RG, Drapeau P, Lacaille JC, Kim E, Lee JR, Igarashi K, Haganir RL, Rouleau GA, Michaud JL. Excess of de novo deleterious mutations in genes associated with glutamatergic systems in nonsyndromic intellectual disability. *Am J Hum Genet*. 2011 Mar 11;88(3):306-16. Epub 2011 Mar 3. Erratum in: *Am J Hum Genet*. 2011 Apr 8;88(4):516. PubMed PMID: 21376300; PubMed Central PMCID: PMC3059427.

Hamdan FF, Piton A, Gauthier J, Lortie A, Dubeau F, Dobrzaniecka S, Spiegelman D, Noreau A, Pellerin S, Côté M, Henrion E, Fombonne E, Mottron L, Marineau C, Drapeau P, Lafrenière RG, Lacaille JC, Rouleau GA, Michaud JL. De novo STXBP1 mutations in mental retardation and nonsyndromic epilepsy. *Ann Neurol*. 2009 Jun;65(6):748-53. PubMed PMID: 19557857.

Hartong DT, Dange M, McGee TL, Berson EL, Dryja TP, Colman RF. Insights from retinitis pigmentosa into the roles of isocitrate dehydrogenases in the Krebs cycle. *Nat Genet*. 2008 Oct;40(10):1230-4. Epub 2008 Sep 21. PubMed PMID:18806796; PubMed Central PMCID: PMC2596605.

Hashimoto S, Boissel S, Zarhrate M, Rio M, Munnich A, Egly JM, Colleaux L. MED23 mutation links intellectual disability to dysregulation of immediate early gene expression. *Science*. 2011 Aug 26;333(6046):1161-3. PubMed PMID: 21868677.

Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*. 2008 Feb 8;132(3):344-62. Review. PubMed PMID: 18267068.

Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*. 2004 Sep 15;18(18):2195-224. Review. PubMed PMID: 15371334.

Hehr U, Bauer P, Winner B, Schule R, Olmez A, Koehler W, Uyanik G, Engel A, Lenz D, Seibel A, Hehr A, Ploetz S, Gamez J, Rolfs A, Weis J, Ringer TM, Bonin M, Schuierer G, Marienhagen J, Bogdahn U, Weber BH, Topaloglu H, Schols L, Riess O, Winkler J. Long-term course and mutational spectrum of spatacsin-linked spastic paraplegia. *Ann Neurol*. 2007 Dec;62(6):656-65. PubMed PMID: 18067136.

Higgins JJ, Pucilowska J, Lombardi RQ, Rooney JP. A mutation in a novel ATP-dependent Lon protease gene in a kindred with mild mental retardation. *Neurology*. 2004 Nov 23;63(10):1927-31. PubMed PMID: 15557513; PubMed Central PMCID: PMC1201536.

Hirst J, Barlow LD, Francisco GC, Sahlender DA, Seaman MN, Dacks JB, Robinson MS. The fifth adaptor protein complex. *PLoS Biol*. 2011 Oct;9(10):e1001170. Epub 2011 Oct 11. PubMed PMID: 22022230; PubMed Central PMCID: PMC3191125.

Hirst J, Bright NA, Rous B, Robinson MS. Characterization of a fourth adaptor-related protein complex. *Mol Biol Cell*. 1999 Aug;10(8):2787-802. PubMed PMID: 10436028; PubMed Central PMCID: PMC25515.

Holbrook JA, Neu-Yilik G, Hentze MW, Kulozik AE. Nonsense-mediated decay approaches the clinic. *Nat Genet*. 2004 Aug;36(8):801-8. Review. PubMed PMID:15284851.

Hu H, Eggers K, Chen W, Garshasbi M, Motazacker MM, Wrogemann K, Kahrizi K, Tzschach A, Hosseini M, Bahman I, Hucho T, Mühlhoff M, Gerardy-Schahn R, Najmabadi H, Ropers HH, Kuss AW. ST3GAL3 mutations impair the development of higher cognitive functions. *Am J Hum Genet*. 2011 Sep 9;89(3):407-14. doi: 10.1016/j.ajhg.2011.08.008. PubMed PMID: 21907012; PubMed Central PMCID: PMC3169827.

Hu WH, Pendergast JS, Mo XM, Brambilla R, Bracchi-Ricard V, Li F, Walters WM, Blits B, He L, Schaal SM, Bethea JR. NIBP, a novel NIK and IKK(beta)-binding protein that enhances NF-(kappa)B activation. *J Biol Chem*. 2005 Aug 12;280(32):29233-41. Epub 2005 Jun 10. PubMed PMID: 15951441.

Huang CJ, Nazarian R, Lee J, Zhao PM, Espinosa-Jeffrey A, de Vellis J. Tumor necrosis factor modulates transcription of myelin basic protein gene through nuclear factor kappa B in a human oligodendrogloma cell line. *Int J Dev Neurosci*. 2002 Jun-Aug;20(3-5):289-96. PubMed PMID: 12175864.

Ishikawa-Brush Y, Powell JF, Bolton P, Miller AP, Francis F, Willard HF, Lehrach H, Monaco AP. Autism and multiple exostoses associated with an X;8 translocation occurring within the GRPR gene and 3' to the SDC2 gene. *Hum Mol Genet*. 1997 Aug;6(8):1241-50. PubMed PMID: 9259269.

Jacque E, Baud V. [RelA, a new player in the regulation of RelB activity]. *Med Sci (Paris)*. 2006 Feb;22(2):113-4. French. PubMed PMID: 16457746.

Kaltschmidt B, Ndiaye D, Korte M, Pothion S, Arbibe L, Prüllage M, Pfeiffer J, Lindecke A, Staiger V, Israël A, Kaltschmidt C, Mémet S. NF-kappaB regulates spatial memory formation and synaptic plasticity through protein kinase A/CREB signaling. *Mol Cell Biol*. 2006 Apr;26(8):2936-46. PubMed PMID: 16581769; PubMed Central PMCID: PMC1446931.

Kaufman L, Ayub M, Vincent JB. The genetic basis of non-syndromic intellectual disability: a review. *J Neurodev Disord*. 2010 Dec;2(4):182-209. Epub 2010 Jul 29. PubMed PMID: 21124998; PubMed Central PMCID: PMC2974911.

Khan MA, Rafiq MA, Noor A, Ali N, Ali G, Vincent JB, Ansar M. A novel deletion mutation in the TUSC3 gene in a consanguineous Pakistani family with autosomal recessive nonsyndromic intellectual disability. *BMC Med Genet*. 2011 Apr 22;12:56. PubMed PMID: 21513506; PubMed Central PMCID: PMC3096909.

Kishino T, Lalande M, Wagstaff J. UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome. *Nat Genet*. 1997 Jan;15(1):70-3. Erratum in: *Nat Genet* 1997 Apr;15(4):411. PubMed PMID: 8988171.

Klauck SM, Felder B, Kolb-Kokocinski A, Schuster C, Chiochetti A, Schupp I, Wellenreuther R, Schmötzer G, Poustka F, Breitenbach-Koller L, Poustka A. Mutations in the ribosomal protein gene RPL10 suggest a novel modulating disease mechanism for autism. *Mol Psychiatry*. 2006 Dec;11(12):1073-84. Epub 2006 Aug 29. PubMed PMID: 16940977.

Koifman A, Feigenbaum A, Bi W, Shaffer LG, Rosenfeld J, Blaser S, Chitayat D. A homozygous deletion of 8q24.3 including the NIBP gene associated with severe developmental delay, dysgenesis of the corpus callosum, and dysmorphic facial features. *Am J Med Genet A*. 2010 May;152A(5):1268-72. PubMed PMID: 20425834.

Koolen DA, Pfundt R, de Leeuw N, Hehir-Kwa JY, Nillesen WM, Neefs I, Scheltinga I, Sistermans E, Smeets D, Brunner HG, van Kessel AG, Veltman JA, de Vries BB. Genomic microarrays in mental retardation: a practical workflow for diagnostic applications. *Hum Mutat*. 2009 Mar;30(3):283-92. Review. PubMed PMID: 19085936.

Kramer JM, van Bokhoven H. Genetic and epigenetic defects in mental retardation. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 Jan;41(1):96-107. Epub 2008 Aug 13. Review. PubMed PMID: 18765296.

Kuida K, Haydar TF, Kuan CY, Gu Y, Taya C, Karasuyama H, Su MS, Rakic P, Flavell RA. Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell*. 1998 Aug 7;94(3):325-37. PubMed PMID: 9708735.

Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan C, Yang D, Karasuyama H, Rakic P, Flavell RA. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature*. 1996 Nov 28;384(6607):368-72. PubMed PMID: 8934524.

Kuss AW, Garshasbi M, Kahrizi K, Tzschach A, Behjati F, Darvish H, Abbasi-Moheb L, Puettmann L, Zecha A, Weissmann R, Hu H, Mohseni M, Abedini SS, Rajab A, Hertzberg C, Wiczorek D, Ullmann R, Ghasemi-Firouzabadi S, Banihashemi S, Arzhanghi S, Hadavi V, Bahrami-Monajemi G, Kasiri M, Falah M, Nikuei P, Dehghan A, Sobhani M, Jamali P, Ropers HH, Najmabadi H. Autosomal recessive mental retardation: homozygosity mapping identifies 27 single linkage intervals, at least 14 novel loci and several mutation hotspots. *Hum Genet*. 2011 Feb;129(2):141-8. Epub 2010 Nov 10. PubMed PMID: 21063731.

Lander ES, Botstein D. Homozygosity mapping: a way to map human recessive traits with the DNA of inbred children. *Science*. 1987 Jun 19;236(4808):1567-70. PubMed PMID: 2884728.

Lander ES, Linton LM, Birren B, *et al*, Chen YJ; International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001 Feb 15;409(6822):860-921. Erratum in: *Nature* 2001 Aug 2;412(6846):565. *Nature* 2001 Jun 7;411(6838):720. Szustakowki, J [corrected to Szustakowski, J]. PubMed PMID: 11237011.

Laurier V, Stoetzel C, Muller J, Thibault C, Corbani S, Jalkh N, Salem N, Chouery E, Poch O, Licaire S, Danse JM, Amati-Bonneau P, Bonneau D, Mégarbané A, Mandel JL, Dollfus H. Pitfalls of homozygosity mapping: an extended consanguineous Bardet-Biedl syndrome family with two mutant genes (BBS2, BBS10), three mutations, but no triallelism. *Eur J Hum Genet*. 2006 Nov;14(11):1195-203. Epub 2006 Jul 5. PubMed PMID: 16823392.

Lee KM, Jo S, Kim H, Lee J, Park CS. Functional modulation of AMP-activated protein kinase by cereblon. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Mar;1813(3):448-55. Epub 2011 Jan 11. PubMed PMID: 21232561.

Lejeune J, Gautier M, et Turpin R. Les chromosomes humains en culture de tissus. *C. R. Acad. Sciences*, 26 janvier 1959.

Lemoine P, Harousseau H, Boteyru JP, Menuet JC. Les enfants des parents alcooliques: anomalies observées à propos de 127 cas. *Quest Medica* 1968 ;25 :476-82.

Lezirovitz K, Pardono E, de Mello Auricchio MT, de Carvalho E Silva FL, Lopes JJ, Abreu-Silva RS, Romanos J, Batissoco AC, Mingroni-Netto RC. Unexpected genetic heterogeneity in a large consanguineous Brazilian pedigree presenting deafness. *Eur J Hum Genet*. 2008 Jan;16(1):89-96. Epub 2007 Sep 12. Erratum in: *Eur J Hum Genet*. 2008 May;16(5):660. PubMed PMID: 17851452.

Lezirovitz K, Pardono E, de Mello Auricchio MT, de Carvalho E Silva FL, Lopes JJ, Abreu-Silva RS, Romanos J, Batissoco AC, Mingroni-Netto RC. Unexpected genetic heterogeneity in a large consanguineous Brazilian pedigree presenting deafness. *Eur J Hum Genet.* 2008 Jan;16(1):89-96. Epub 2007 Sep 12. Erratum in: *Eur J Hum Genet.* 2008 May;16(5):660. PubMed PMID: 17851452.

Li Q, Estepa G, Memet S, Israel A, Verma IM. Complete lack of NF-kappaB activity in IKK1 and IKK2 double-deficient mice: additional defect in neurulation. *Genes Dev.* 2000 Jul 15;14(14):1729-33. PubMed PMID: 10898787; PubMed Central PMCID: PMC316792.

Lou H, Zhang L, Xiao W, Zhang J, Zhang M. Nearly completely reversible brain abnormalities in a patient with incontinentia pigmenti. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2008 Mar;29(3):431-3. Epub 2007 Dec 7. PubMed PMID: 18065513.

Maggirwar SB, Sarmiere PD, Dewhurst S, Freeman RS. Nerve growth factor-dependent activation of NF-kappaB contributes to survival of sympathetic neurons. *J Neurosci.* 1998 Dec 15;18(24):10356-65. PubMed PMID: 9852573.

Malan V, Rajan D, Thomas S, Shaw AC, Louis Dit Picard H, Layet V, Till M, van Haeringen A, Mortier G, Nampoothiri S, Puseljic S, Legeai-Mallet L, Carter NP, Vekemans M, Munnich A, Hennekam RC, Colleaux L, Cormier-Daire V. Distinct effects of allelic NFIX mutations on nonsense-mediated mRNA decay engender either a Sotos-like or a Marshall-Smith syndrome. *Am J Hum Genet.* 2010 Aug 13;87(2):189-98. Epub 2010 Jul 30. PubMed PMID: 20673863; PubMed Central PMCID: PMC2917711.

Marangi G, Leuzzi V, Manti F, Lattante S, Orteschi D, Pecile V, Neri G, Zollino M. TRAPPC9-related autosomal recessive intellectual disability: report of a new mutation and clinical phenotype. *Eur J Hum Genet.* 2012 May 2. doi: 10.1038/ejhg.2012.79. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22549410.

Marshall CR, Young EJ, Pani AM, Freckmann ML, Lacassie Y, Howald C, Fitzgerald KK, Peippo M, Morris CA, Shane K, Priolo M, Morimoto M, Kondo I, Manguoglu E, Berker-Karauzum S, Edery P, Hobart HH, Mervis CB, Zuffardi O, Reymond A, Kaplan P, Tassabehji M, Gregg RG, Scherer SW, Osborne LR. Infantile spasms is associated with deletion of the MAGI2 gene on chromosome 7q11.23-q21.11. *Am J Hum Genet.* 2008 Jul;83(1):106-11. Epub 2008 Jun 19. PubMed PMID: 18565486; PubMed Central PMCID: PMC2443840.

Martin S, Nishimune A, Mellor JR, Henley JM. SUMOylation regulates kainate-receptor-mediated synaptic transmission. *Nature.* 2007 May 17;447(7142):321-5. Epub 2007 May 7. PubMed PMID: 17486098.

Martinez-Pomar N, Munoz-Saa I, Heine-Suner D, Martin A, Smahi A, Matamoros N. A new mutation in exon 7 of NEMO gene: late skewed X-chromosome inactivation in an incontinentia pigmenti female patient with immunodeficiency. *Hum Genet.* 2005 Dec;118(3-4):458-65. Epub 2005 Oct 14. PubMed PMID: 16228229.

Matsuda S, Miura E, Matsuda K, Kakegawa W, Kohda K, Watanabe M, Yuzaki M. Accumulation of AMPA receptors in autophagosomes in neuronal axons lacking adaptor protein AP-4. *Neuron.* 2008 Mar 13;57(5):730-45. PubMed PMID: 18341993.

Matsumoto-Miyai K, Sokolowska E, Zurlinden A, Gee CE, Lüscher D, Hettwer S, Wölfel J, Ladner AP, Ster J, Gerber U, Rülcke T, Kunz B, Sonderegger P. Coincident pre- and postsynaptic activation induces dendritic filopodia via neurotrophin-dependent agrin cleavage. *Cell.* 2009 Mar 20;136(6):1161-71. PubMed PMID: 19303856.

Mattson MP, Meffert MK. Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell Death Differ.* 2006 May;13(5):852-60. Review. PubMed PMID: 16397579.

Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Feb;74(2):560-4. PubMed PMID: 265521; PubMed Central PMCID: PMC392330.

McAllister CJ, Whittington JE, Holland AJ. Development of the eating behaviour in Prader-Willi Syndrome: advances in our understanding. *Int J Obes (Lond).* 2011 Feb;35(2):188-97. Epub 2010 Aug 3. Review. PubMed PMID: 20680019.

McMullan DJ, Bonin M, Hehir-Kwa JY, de Vries BB, Dufke A, Rattenberry E, Steehouwer M, Moruz L, Pfundt R, de Leeuw N, Riess A, Altug-Teber O, Enders H, Singer S, Grasshoff U, Walter M, Walker JM, Lamb CV, Davison EV, Brueton L, Riess O, Veltman JA. Molecular karyotyping of patients with unexplained mental retardation by SNP arrays: a multicenter study. *Hum Mutat.* 2009 Jul;30(7):1082-92. PubMed PMID: 19388127.

Meffert MK, Chang JM, Wiltgen BJ, Fanselow MS, Baltimore D. NF-kappa B functions in synaptic signaling and behavior. *Nat Neurosci.* 2003 Oct;6(10):1072-8. Epub 2003 Aug 31. Erratum in: *Nat Neurosci.* 2003 Dec;6(12):1329. PubMed PMID: 12947408.

Mémet S. NF-kappaB functions in the nervous system: from development to disease. *Biochem Pharmacol.* 2006 Oct 30;72(9):1180-95. Epub 2006 Sep 12. Review. PubMed PMID: 16997282.



Meuwissen ME, Mancini GM. Neurological findings in incontinentia pigmenti; a review. *Eur J Med Genet.* 2012 May;55(5):323-31. Epub 2012 May 4. PubMed PMID: 22564885.

Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler EE, Epstein CJ, Faucett WA, Feuk L, Friedman JM, Hamosh A, Jackson L, Kaminsky EB, Kok K, Krantz ID, Kuhn RM, Lee C, Ostell JM, Rosenberg C, Scherer SW, Spinner NB, Stavropoulos DJ, Tepperberg JH, Thorland EC, Vermeesch JR, Waggoner DJ, Watson MS, Martin CL, Ledbetter DH. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet.* 2010 May 14;86(5):749-64. Review. PubMed PMID: 20466091; PubMed Central PMCID: PMC2869000.

Mir A, Kaufman L, Noor A, Motazacker MM, Jamil T, Azam M, Kahrizi K, Rafiq MA, Weksberg R, Nasr T, Naeem F, Tzschach A, Kuss AW, Ishak GE, Doherty D, Ropers HH, Barkovich AJ, Najmabadi H, Ayub M, Vincent JB. Identification of mutations in TRAPPC9, which encodes the NIK- and IKK-beta-binding protein, in nonsyndromic autosomal-recessive mental retardation. *Am J Hum Genet.* 2009 Dec;85(6):909-15. PubMed PMID: 20004765; PubMed Central PMCID: PMC2790571.

Mochida GH, Mahajnah M, Hill AD, Basel-Vanagaite L, Gleason D, Hill RS, Bodell A, Crosier M, Straussberg R, Walsh CA. A truncating mutation of TRAPPC9 is associated with autosomal-recessive intellectual disability and postnatal microcephaly. *Am J Hum Genet.* 2009 Dec;85(6):897-902. PubMed PMID: 20004763; PubMed Central PMCID: PMC2790576.

Molinari F, Foulquier F, Tarpey PS, Morelle W, Boissel S, Teague J, Edkins S, Futreal PA, Stratton MR, Turner G, Matthijs G, Gecz J, Munnich A, Colleaux L. Oligosaccharyltransferase-subunit mutations in nonsyndromic mental retardation. *Am J Hum Genet.* 2008 May;82(5):1150-7. Epub 2008 May 1. PubMed PMID: 18455129; PubMed Central PMCID: PMC2427205.

Molinari F, Rio M, Meskenaitė V, Encha-Razavi F, Augé J, Bacq D, Briault S, Vekemans M, Munnich A, Attié-Bitach T, Sonderegger P, Colleaux L. Truncating neurotropsin mutation in autosomal recessive nonsyndromic mental retardation. *Science.* 2002 Nov 29;298(5599):1779-81. PubMed PMID: 12459588.

Molnár E. Long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Semin Cell Dev Biol.* 2011 Jul;22(5):506-13. Epub 2011 Jul 22. Review. PubMed PMID: 21807105.

Moon YA, Horton JD. Identification of two mammalian reductases involved in the two-carbon fatty acyl elongation cascade. *J Biol Chem.* 2003 Feb 28;278(9):7335-43. Epub 2002 Dec 13. PubMed PMID: 12482854.

Moreno-De-Luca A, Helmers SL, Mao H, Burns TG, Melton AM, Schmidt KR, Fernhoff PM, Ledbetter DH, Martin CL. Adaptor protein complex-4 (AP-4) deficiency causes a novel autosomal recessive cerebral palsy syndrome with microcephaly and intellectual disability. *J Med Genet.* 2011 Feb;48(2):141-4. Epub 2010 Oct 23. PubMed PMID: 20972249; PubMed Central PMCID: PMC3150730.

Moriyoshi K, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S. Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature.* 1991 Nov 7;354(6348):31-7. PubMed PMID: 1834949.

Morrow EM. Genomic copy number variation in disorders of cognitive development. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2010 Nov;49(11):1091-104. Review. PubMed PMID: 20970697; PubMed Central PMCID: PMC3137887.

Motazacker MM, Rost BR, Hucho T, Garshasbi M, Kahrizi K, Ullmann R, Abedini SS, Nieh SE, Amini SH, Goswami C, Tzschach A, Jensen LR, Schmitz D, Ropers HH, Najmabadi H, Kuss AW. A defect in the ionotropic glutamate receptor 6 gene (GRIK2) is associated with autosomal recessive mental retardation. *Am J Hum Genet.* 2007 Oct;81(4):792-8. Epub 2007 Aug 31. PubMed PMID: 17847003; PubMed Central PMCID: PMC2227928.

Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155:335-50. PubMed PMID: 3431465.

Najmabadi H, Hu H, Garshasbi M, Zemojtel T, Abedini SS, Chen W, Hosseini M, Behjati F, Haas S, Jamali P, Zecha A, Mohseni M, Püttmann L, Vahid LN, Jensen C, Moheb LA, Bienek M, Larti F, Mueller I, Weissmann R, Darvish H, Wrogemann K, Hadavi V, Lipkowitz B, Esmaeeli-Nieh S, Wiczorek D, Kariminejad R, Firouzabadi SG, Cohen M, Fattahi Z, Rost I, Mojahedi F, Hertzberg C, Dehghan A, Rajab A, Banavandi MJ, Hoffer J, Falah M, Musante L, Kalscheuer V, Ullmann R, Kuss AW, Tzschach A, Kahrizi K, Ropers HH. Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. *Nature.* 2011 Sep 21;478(7367):57-63. doi: 10.1038/nature10423. PubMed PMID: 21937992.

Najmabadi H, Motazacker MM, Garshasbi M, Kahrizi K, Tzschach A, Chen W, Behjati F, Hadavi V, Nieh SE, Abedini SS, Vazifehmand R, Firouzabadi SG, Jamali P, Falah M, Seifati SM, Grüters A, Lenzner S, Jensen LR, Rüschenhoff F, Kuss AW, Ropers HH. Homozygosity mapping in consanguineous families reveals extreme heterogeneity of non-syndromic autosomal recessive mental retardation and identifies 8 novel gene loci. *Hum Genet.* 2007 Mar;121(1):43-8. Epub 2006 Nov 21. PubMed PMID: 17120046.

Neu-Yilik G, Amthor B, Gehring NH, Bahri S, Paidassi H, Hentze MW, Kulozik AE. Mechanism of escape from nonsense-mediated mRNA decay of human beta-globin transcripts with nonsense mutations in the first exon. *RNA*. 2011 May;17(5):843-54. Epub 2011 Mar 9. PubMed PMID: 21389146; PubMed Central PMCID: PMC3078734.

Newell SJ, Green SH. Diagnostic classification of the aetiology of mental retardation in children. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1987 Jan 17;294(6565):163-6. PubMed PMID: 3109550; PubMed Central PMCID: PMC1245169.

Ng SB, Bigham AW, Buckingham KJ, Hannibal MC, McMillin MJ, Gildersleeve HI, Beck AE, Tabor HK, Cooper GM, Mefford HC, Lee C, Turner EH, Smith JD, Rieder MJ, Yoshiura K, Matsumoto N, Ohta T, Niikawa N, Nickerson DA, Bamshad MJ, Shendure J. Exome sequencing identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki syndrome. *Nat Genet*. 2010 Sep;42(9):790-3. Epub 2010 Aug 15. PubMed PMID: 20711175; PubMed Central PMCID: PMC2930028.

Ng SB, Buckingham KJ, Lee C, Bigham AW, Tabor HK, Dent KM, Huff CD, Shannon PT, Jabs EW, Nickerson DA, Shendure J, Bamshad MJ. Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nat Genet*. 2010 Jan;42(1):30-5. Epub 2009 Nov 13. PubMed PMID: 19915526; PubMed Central PMCID: PMC2847889.

Niccols A. Fetal alcohol syndrome and the developing socio-emotional brain. *Brain Cogn*. 2007 Oct;65(1):135-42. Epub 2007 Jul 31. Review. PubMed PMID: 17669569.

Pak C, Garshasbi M, Kahrizi K, Gross C, Apponi LH, Noto JJ, Kelly SM, Leung SW, Tzschach A, Behjati F, Abedini SS, Mohseni M, Jensen LR, Hu H, Huang B, Stahley SN, Liu G, Williams KR, Burdick S, Feng Y, Sanyal S, Bassell GJ, Ropers HH, Najmabadi H, Corbett AH, Moberg KH, Kuss AW. Mutation of the conserved polyadenosine RNA binding protein, ZC3H14/dNab2, impairs neural function in Drosophila and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jul 26;108(30):12390-5. Epub 2011 Jul 6. PubMed PMID: 21734151; PubMed Central PMCID: PMC3145741.

Pascual-Castroviejo I, Roche MC, Martínez Fernández V, Pérez-Romero M, Escudero RM, García-Peñas JJ, Sánchez M. Incontinentia pigmenti: MR demonstration of brain changes. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1994 Sep;15(8):1521-7. PubMed PMID: 7985573.

Payne HL. The role of transmembrane AMPA receptor regulatory proteins (TARPs) in neurotransmission and receptor trafficking (Review). *Mol Membr Biol*. 2008 May;25(4):353-62. Review. PubMed PMID: 18446621.

Pereira JA, Lebrun-Julien F, Suter U. Molecular mechanisms regulating myelination in the peripheral nervous system. *Trends Neurosci*. 2012 Feb;35(2):123-34. Epub 2011 Dec 21. Review. PubMed PMID: 22192173.

Philippe O, Rio M, Carioux A, Plaza JM, Guigue P, Molinari F, Boddaert N, Bole-Feysot C, Nitschke P, Smahi A, Munnich A, Colleaux L. Combination of linkage mapping and microarray-expression analysis identifies NF-kappaB signaling defect as a cause of autosomal-recessive mental retardation. *Am J Hum Genet*. 2009 Dec;85(6):903-8. PubMed PMID: 20004764; PubMed Central PMCID: PMC2795800.

Pizzi M, Goffi F, Boroni F, Benarese M, Perkins SE, Liou HC, Spano P. Opposing roles for NF-kappa B/Rel factors p65 and c-Rel in the modulation of neuron survival elicited by glutamate and interleukin-1beta. *J Biol Chem*. 2002 Jun 7;277(23):20717-23. Epub 2002 Mar 23. PubMed PMID: 11912207.

Pizzi M, Sarnico I, Boroni F, Benarese M, Steimberg N, Mazzoleni G, Dietz GP, Bähr M, Liou HC, Spano PF. NF-kappaB factor c-Rel mediates neuroprotection elicited by mGlu5 receptor agonists against amyloid beta-peptide toxicity. *Cell Death Differ*. 2005 Jul;12(7):761-72. PubMed PMID: 15818410.

Plenge RM, Stevenson RA, Lubs HA, Schwartz CE, Willard HF. Skewed X-chromosome inactivation is a common feature of X-linked mental retardation disorders. *Am J Hum Genet*. 2002 Jul;71(1):168-73. Epub 2002 May 30. PubMed PMID: 12068376; PubMed Central PMCID: PMC384975.

Qiu J, Grafe MR, Schmura SM, Glasgow JN, Kent TA, Rassin DK, Perez-Polo JR. Differential NF-kappa B regulation of bcl-x gene expression in hippocampus and basal forebrain in response to hypoxia. *J Neurosci Res*. 2001 May 1;64(3):223-34. PubMed PMID: 11319766.

Rafiq MA, Ansar M, Marshall CR, Noor A, Shaheen N, Mowjoodi A, Khan MA, Ali G, Amin-ud-Din M, Feuk L, Vincent JB, Scherer SW. Mapping of three novel loci for non-syndromic autosomal recessive mental retardation (NS-ARMR) in consanguineous families from Pakistan. *Clin Genet*. 2010 Nov;78(5):478-83. doi: 10.1111/j.1399-0004.2010.01405.x. PubMed PMID: 20345473.

Rafiq MA, Kuss AW, Puettmann L, Noor A, Ramiah A, Ali G, Hu H, Kerio NA, Xiang Y, Garshasbi M, Khan MA, Ishak GE, Weksberg R, Ullmann R, Tzschach A, Kahrizi K, Mahmood K, Naeem F, Ayub M, Moremen KW, Vincent JB, Ropers HH, Ansar M, Najmabadi H. Mutations in the Alpha 1,2-Mannosidase Gene, MAN1B1, Cause Autosomal-Recessive Intellectual Disability. *Am J Hum Genet*. 2011 Jul 15;89(1):176-82. PubMed PMID: 21763484.

Ramocki MB, Tavyev YJ, Peters SU. The MECP2 duplication syndrome. *Am J Med Genet A*. 2010 May;152A(5):1079-88. Review. PubMed PMID: 20425814; PubMed Central PMCID: PMC2861792.

Raymond FL, Whibley A, Stratton MR, Gecz J. Lessons learnt from large-scale exon re-sequencing of the X chromosome. *Hum Mol Genet*. 2009 Apr 15;18(R1):R60-4. Review. PubMed PMID: 19297402; PubMed Central PMCID: PMC2657946.

Yunis JJ. High resolution of human chromosomes. *Science*. 1976 Mar 26;191(4233):1268-70. PubMed PMID: 1257746.

Romão L, Inácio A, Santos S, Avila M, Faustino P, Pacheco P, Lavinha J. Nonsense mutations in the human beta-globin gene lead to unexpected levels of cytoplasmic mRNA accumulation. *Blood*. 2000 Oct 15;96(8):2895-901. PubMed PMID: 11023527.

Ropers HH. Genetics of early onset cognitive impairment. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2010 Sep 22;11:161-87. Review. PubMed PMID: 20822471.

Rosenfeld ME, Prichard L, Shiojiri N, Fausto N. Prevention of hepatic apoptosis and embryonic lethality in RelA/TNFR-1 double knockout mice. *Am J Pathol*. 2000 Mar;156(3):997-1007. PubMed PMID: 10702415; PubMed Central PMCID: PMC1876833.

Rumbaugh G, Adams JP, Kim JH, Haganir RL. SynGAP regulates synaptic strength and mitogen-activated protein kinases in cultured neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Mar 21;103(12):4344-51. Epub 2006 Mar 14. PubMed PMID: 16537406; PubMed Central PMCID: PMC1450173.

Saadi A, Borck G, Boddaert N, Chekkour MC, Imessaoudene B, Munnich A, Colleaux L, Chaouch M. Compound heterozygous ASPM mutations associated with microcephaly and simplified cortical gyration in a consanguineous Algerian family. *Eur J Med Genet*. 2009 Jul-Aug;52(4):180-4. Epub 2009 Mar 28. PubMed PMID: 19332161.

Saillour Y, Zanni G, Des Portes V, Heron D, Guibaud L, Iba-Zizen MT, Pedespan JL, Poirier K, Castelnaud L, Julien C, Franconnet C, Bonthron D, Porteous ME, Chelly J, Bienvu T. Mutations in the AP1S2 gene encoding the sigma 2 subunit of the adaptor protein 1 complex are associated with syndromic X-linked mental retardation with hydrocephalus and calcifications in basal ganglia. *J Med Genet*. 2007 Nov;44(11):739-44. Epub 2007 Jul 6. PubMed PMID: 17617514; PubMed Central PMCID: PMC2752185.

Salvador-Carulla L, Bertelli M. 'Mental retardation' or 'intellectual disability': time for a conceptual change. *Psychopathology*. 2008;41(1):10-6. Epub 2007 Oct 18. Review. PubMed PMID: 17952016.

Sampson PD, Streissguth AP, Bookstein FL, Little RE, Clarren SK, Dehaene P, Hanson JW, Graham JM Jr. Incidence of fetal alcohol syndrome and prevalence of alcohol-related neurodevelopmental disorder. *Teratology*. 1997 Nov;56(5):317-26. Review. PubMed PMID: 9451756.

Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PM, Smith M. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature*. 1977 Feb 24;265(5596):687-95. PubMed PMID: 870828.

Schütze S, Tchikov V, Schneider-Brachert W. Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Aug;9(8):655-62. Epub 2008 Jun 11. Review. PubMed PMID: 18545270.

Schultz DR, Harrington WJ Jr. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Semin Arthritis Rheum*. 2003 Jun;32(6):345-69. Review. PubMed PMID: 12833244.

Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, Månér S, Massa H, Walker M, Chi M, Navin N, Lucito R, Healy J, Hicks J, Ye K, Reiner A, Gilliam TC, Trask B, Patterson N, Zetterberg A, Wigler M. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science*. 2004 Jul 23;305(5683):525-8. PubMed PMID: 15273396.

Sebban H, Courtois G. NF-kappaB and inflammation in genetic disease. *Biochem Pharmacol*. 2006 Oct 30;72(9):1153-60. Epub 2006 Sep 11. Review. PubMed PMID: 16965764.

Słabicki M, Theis M, Krastev DB, Samsonov S, Mundwiller E, Junqueira M, Paszkowski-Rogacz M, Teyra J, Heninger AK, Poser I, Prieur F, Truchetto J, Confavreux C, Marelli C, Durr A, Camdessanche JP, Brice A, Shevchenko A, Pisabarro MT, Stevanin G, Buchholz F. A genome-scale DNA repair RNAi screen identifies SPG48 as a novel gene associated with hereditary spastic paraplegia. *PLoS Biol*. 2010 Jun 29;8(6):e1000408. PubMed PMID: 20613862; PubMed Central PMCID: PMC2893954.

Smahi A, Courtois G, Vabres P, Yamaoka S, Heuertz S, Munnich A, Israël A, Heiss NS, Klauck SM, Kioschis P, Wiemann S, Poustka A, Esposito T, Bardaro T, Gianfrancesco F, Ciccocicola A, D'Urso M, Woffendin H, Jakins T, Donnai D, Stewart H, Kenwrick SJ, Aradhya S, Yamagata T, Levy M, Lewis RA, Nelson DL. Genomic rearrangement in NEMO impairs NF-kappaB activation and is a cause of incontinentia pigmenti. The International Incontinentia Pigmenti (IP) Consortium. *Nature*. 2000 May 25;405(6785):466-72. PubMed PMID: 10839543.



Spence JE, Perciaccante RG, Greig GM, Willard HF, Ledbetter DH, Hejtmancik JF, Pollack MS, O'Brien WE, Beaudet *al.* Uniparental disomy as a mechanism for human genetic disease. *Am J Hum Genet.* 1988 Feb;42(2):217-26. PubMed PMID: 2893543; PubMed Central PMCID: PMC1715272.

Spohr HL, Willms J, Steinhausen HC. Fetal alcohol spectrum disorders in young adulthood. *J Pediatr.* 2007 Feb;150(2):175-9, 179.e1. PubMed PMID: 17236896.

Stehlik C, de Martin R, Kumabashiri I, Schmid JA, Binder BR, Lipp J. Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked *iap* gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *J Exp Med.* 1998 Jul 6;188(1):211-6. PubMed PMID: 9653098; PubMed Central PMCID: PMC2525542.

Stellwagen D, Beattie EC, Seo JY, Malenka RC. Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor-alpha. *J Neurosci.* 2005 Mar 23;25(12):3219-28. Erratum in: *J Neurosci.* 2005 Jun 1;25(22):1 p following 5454. PubMed PMID: 15788779.

Stevanin G, Santorelli FM, Azzedine H, Coutinho P, Chomilier J, Denora PS, Martin E, Ouvrard-Hernandez AM, Tessa A, Bouslam N, Lossos A, Charles P, Loureiro JL, Elleuch N, Confavreux C, Cruz VT, Ruberg M, Leguern E, Grid D, Tazir M, Fontaine B, Filla A, Bertini E, Durr A, Brice A. Mutations in SPG11, encoding spatacsin, are a major cause of spastic paraplegia with thin corpus callosum. *Nat Genet.* 2007 Mar;39(3):366-72. Epub 2007 Feb 18. PubMed PMID: 17322883.

Strobl-Wildemann G, Kalscheuer VM, Hu H, Wrogemann K, Ropers HH, Tzschach A. Novel GDI1 mutation in a large family with nonsyndromic X-linked intellectual disability. *Am J Med Genet A.* 2011 Dec;155A(12):3067-70. doi: 10.1002/ajmg.a.34291. Epub 2011 Oct 14. PubMed PMID: 22002931.

Sun SC. Non-canonical NF-kB signaling pathway. *Cell Res.* 2011 Jan;21(1):71-85. Epub 2010 Dec 21. Review. PubMed PMID: 21173796.

Tang SS, Fernandez D, Lazarou LP, Singh R, Fallon P. MECP2 triplication in 3 brothers - a rarely described cause of familial neurological regression in boys. *Eur J Paediatr Neurol.* 2012 Mar;16(2):209-12. Epub 2011 Aug 6. PubMed PMID: 21821449.

Tarpey PS, Smith R, Pleasance E, Whibley A, Edkins S, Hardy C, O'Meara S, Latimer C, Dicks E, Menzies A, Stephens P, Blow M, Greenman C, Xue Y, Tyler-Smith C, Thompson D, Gray K, Andrews J, Barthorpe S, Buck G, Cole J, Dunmore R, Jones D, Maddison M, Mironenko T, Turner R, Turrell K, Varian J, West S, Widaa S, Wray P, Teague J, Butler A, Jenkinson A, Jia M, Richardson D, Shepherd R, Wooster R, Tejada MI, Martinez F, Carvill G, Goliath R, de Brouwer AP, van Bokhoven H, Van Esch H, Chelly J, Raynaud M, Ropers HH, Abidi FE, Srivastava AK, Cox J, Luo Y, Mallya U, Moon J, Parnau J, Mohammed S, Tolmie JL, Shoubridge C, Corbett M, Gardner A, Haan E, Rujirabanjerd S, Shaw M, Vandeleur L, Fullston T, Easton DF, Boyle J, Partington M, Hackett A, Field M, Skinner C, Stevenson RE, Bobrow M, Turner G, Schwartz CE, Gecz J, Raymond FL, Futreal PA, Stratton MR. A systematic, large-scale resequencing screen of X-chromosome coding exons in mental retardation. *Nat Genet.* 2009 May;41(5):535-43. Epub 2009 Apr 19. PubMed PMID: 19377476; PubMed Central PMCID: PMC2872007.

Tarpey PS, Stevens C, Teague J, Edkins S, O'Meara S, Avis T, Barthorpe S, Buck G, Butler A, Cole J, Dicks E, Gray K, Halliday K, Harrison R, Hills K, Hinton J, Jones D, Menzies A, Mironenko T, Perry J, Raine K, Richardson D, Shepherd R, Small A, Tofts C, Varian J, West S, Widaa S, Yates A, Catford R, Butler J, Mallya U, Moon J, Luo Y, Dorkins H, Thompson D, Easton DF, Wooster R, Bobrow M, Carpenter N, Simensen RJ, Schwartz CE, Stevenson RE, Turner G, Partington M, Gecz J, Stratton MR, Futreal PA, Raymond FL. Mutations in the gene encoding the Sigma 2 subunit of the adaptor protein 1 complex, AP1S2, cause X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet.* 2006 Dec;79(6):1119-24. Epub 2006 Nov 1. PubMed PMID: 17186471; PubMed Central PMCID: PMC1698718.

Tomita S, Adesnik H, Sekiguchi M, Zhang W, Wada K, Howe JR, Nicoll RA, Brecht DS. Stargazin modulates AMPA receptor gating and trafficking by distinct domains. *Nature.* 2005 Jun 23;435(7045):1052-8. Epub 2005 Apr 27. PubMed PMID: 15858532.

Tomita S, Fukata M, Nicoll RA, Brecht DS. Dynamic interaction of stargazin-like TARPs with cycling AMPA receptors at synapses. *Science.* 2004 Mar 5;303(5663):1508-11. PubMed PMID: 15001777.

Turner DJ, Alaish SM, Zou T, Rao JN, Wang JY, Strauch ED. Bile salts induce resistance to apoptosis through NF-kappaB-mediated XIAP expression. *Ann Surg.* 2007 Mar;245(3):415-25. PubMed PMID: 17435549; PubMed Central PMCID: PMC1877019.

Uyguner O, Kayserili H, Li Y, Karaman B, Nürnberg G, Hennies H, Becker C, Nürnberg P, Başaran S, Apak MY, Wollnik B. A new locus for autosomal recessive non-syndromic mental retardation maps to 1p21.1-p13.3. *Clin Genet.* 2007 Mar;71(3):212-9. PubMed PMID: 17309643.

Van Esch H, Bauters M, Ignatius J, Jansen M, Raynaud M, Hollanders K, Lugtenberg D, Bienvenu T, Jensen LR, Gecz J, Moraine C, Marynen P, Fryns JP, Froyen G. Duplication of the MECP2 region is a frequent cause of severe mental retardation and progressive neurological symptoms in males. *Am J Hum Genet.* 2005 Sep;77(3):442-53. Epub 2005 Jul 29. PubMed PMID: 16080119; PubMed Central PMCID: PMC1226209.

Vandewalle J, Van Esch H, Govaerts K, Verbeeck J, Zweier C, Madrigal I, Mila M, Pijkels E, Fernandez I, Kohlhase J, Spaich C, Rauch A, Fryns JP, Marynen P, Froyen G. Dosage-dependent severity of the phenotype in patients with mental retardation due to a recurrent copy-number gain at Xq28 mediated by an unusual recombination. *Am J Hum Genet.* 2009 Dec;85(6):809-22. PubMed PMID: 20004760; PubMed Central PMCID: PMC2790561.

Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Reiner O, Richards S, Victoria MF, Zhang FP, *et al.* Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell.* 1991 May 31;65(5):905-14. PubMed PMID: 1710175.

Verkerk AJ, Schot R, Dumeé B, Schellekens K, Swagemakers S, Bertoli-Avella AM, Lequin MH, Dudink J, Govaert P, van Zwol AL, Hirst J, Wessels MW, Catsman-Berrevoets C, Verheijen FW, de Graaff E, de Coo IF, Kros JM, Willemsen R, Willems PJ, van der Spek PJ, Mancini GM. Mutation in the AP4M1 gene provides a model for neuroaxonal injury in cerebral palsy. *Am J Hum Genet.* 2009 Jul;85(1):40-52. Epub 2009 Jun 25. PubMed PMID: 19559397; PubMed Central PMCID: PMC2706965.

Vissers LE, de Ligt J, Gilissen C, Janssen I, Steehouwer M, de Vries P, van Lier B, Arts P, Wieskamp N, del Rosario M, van Bon BW, Hoischen A, de Vries BB, Brunner HG, Veltman JA. A de novo paradigm for mental retardation. *Nat Genet.* 2010 Dec;42(12):1109-12. Epub 2010 Nov 14. PubMed PMID: 21076407.

Vissers LE, Stankiewicz P. Microdeletion and microduplication syndromes. *Methods Mol Biol.* 2012;838:29-75. PubMed PMID: 22228006.

Vissers LE, van Ravenswaaij CM, Admiraal R, Hurst JA, de Vries BB, Janssen IM, van der Vliet WA, Huys EH, de Jong PJ, Hamel BC, Schoenmakers EF, Brunner HG, Veltman JA, van Kessel AG. Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. *Nat Genet.* 2004 Sep;36(9):955-7. Epub 2004 Aug 8. PubMed PMID: 15300250.

Wagenstaller J, Spranger S, Lorenz-Depiereux B, Kazmierczak B, Nathrath M, Wahl D, Heye B, Glaser D, Liebscher V, Meitinger T, Strom TM. Copy-number variations measured by single-nucleotide-polymorphism oligonucleotide arrays in patients with mental retardation. *Am J Hum Genet.* 2007 Oct;81(4):768-79. Epub 2007 Aug 28. PubMed PMID: 17847001; PubMed Central PMCID: PMC2227926.

Waston JD, Crick FHC. Molecular structure of Nucleic Acids. *Nature.* 1953

Weinlich R, Dillon CP, Green DR. Ripped to death. *Trends Cell Biol.* 2011 Nov;21(11):630-7. Epub 2011 Oct 4. Review. PubMed PMID: 21978761; PubMed Central PMCID: PMC3205316.

Weterings E, van Gent DC. The mechanism of non-homologous end-joining: a synopsis of synapsis. *DNA Repair (Amst).* 2004 Nov 2;3(11):1425-35. Review. PubMed PMID: 15380098.

Weterings E, van Gent DC. The mechanism of non-homologous end-joining: a synopsis of synapsis. *DNA Repair (Amst).* 2004 Nov 2;3(11):1425-35. Review. PubMed PMID: 15380098.

Widera D, Mikenberg I, Elvers M, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B. Tumor necrosis factor alpha triggers proliferation of adult neural stem cells via IKK/NF-kappaB signaling. *BMC Neurosci.* 2006 Sep 20;7:64. PubMed PMID: 16987412; PubMed Central PMCID: PMC1586209.

Woffendin H, Esposito T, Jakins T, Bardaro T, Stern MH, Kenrick S. Molecular analysis of the mature T cell proliferation-1 (MTCP-1) gene in Xq28-linked incontinentia pigmenti. *Eur J Hum Genet.* 2000 Apr;8(4):239-40. PubMed PMID: 10854103.

Wolf NI, Krämer N, Harting I, Seitz A, Ebinger F, Pöschl J, Rating D. Diffuse cortical necrosis in a neonate with incontinentia pigmenti and an encephalitis-like presentation. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2005 Jun-Jul;26(6):1580-2. PubMed PMID: 15956533.

Yamakawa K, Mitchell S, Hubert R, Chen XN, Colbern S, Huo YK, Gadowski C, Kim UJ, Korenberg JR. Isolation and characterization of a candidate gene for progressive myoclonus epilepsy on 21q22.3. *Hum Mol Genet.* 1995 Apr;4(4):709-16. PubMed PMID: 7633421.

Ye F, Chen Y, Hoang T, Montgomery RL, Zhao XH, Bu H, Hu T, Taketo MM, van Es JH, Clevers H, Hsieh J, Bassel-Duby R, Olson EN, Lu QR. HDAC1 and HDAC2 regulate oligodendrocyte differentiation by disrupting the beta-catenin-TCF interaction. *Nat Neurosci.* 2009 Jul;12(7):829-38. Epub 2009 Jun 7. PubMed PMID: 19503085; PubMed Central PMCID: PMC2701973.

Yeo W, Gautier J. Early neural cell death: dying to become neurons. *Dev Biol.* 2004 Oct 15;274(2):233-44. Review. PubMed PMID: 15385155.

Yunis JJ. High resolution of human chromosomes. *Science.* 1976 Mar 26;191(4233):1268-70. PubMed PMID: 1257746.

Zhang H, Ma Q, Zhang YW, Xu H. Proteolytic processing of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid precursor protein. *J Neurochem.* 2012 Jan;120 Suppl 1:9-21. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07519.x. Epub 2011 Nov 28. Review. PubMed PMID: 22122372; PubMed Central PMCID: PMC3254787.

Zhao M, Li XD, Chen Z. CC2D1A, a DM14 and C2 domain protein, activates NF-kappaB through the canonical pathway. J Biol Chem. 2010 Aug 6;285(32):24372-80. Epub 2010 Jun 7. PubMed PMID: 20529849; PubMed Central PMCID: PMC2915672.

Zhao M, Raingo J, Chen ZJ, Kavalali ET. Cc2d1a, a C2 domain containing protein linked to nonsyndromic mental retardation, controls functional maturation of central synapses. J Neurophysiol. 2011 Apr;105(4):1506-15. Epub 2011 Jan 27. PubMed PMID: 21273312; PubMed Central PMCID: PMC3075281.

Zorumski CF, Izumi Y. NMDA receptors and metaplasticity: mechanisms and possible roles in neuropsychiatric disorders. Neurosci Biobehav Rev. 2012 Mar;36(3):989-1000. Epub 2012 Jan 2. Review. PubMed PMID: 22230702; PubMed Central PMCID: PMC3288588.

### ***Ouvrage***

*Introduction à l'analyse génétique*, 3<sup>ème</sup> édition ; Griffiths, Miller, Suzuki, Lewontin, Gelbart ; De Boeck University s.a ; 2002

Department of Health. 2001. Valuing People : A New Strategie for Learning Disabilities for the 21st Century. Department of Health, London, p. 14)

### ***Site web***

Miles JH, *et al.* GeneReview [internet] ; Pmid : 20301615; Initial Posting: August 27, 2003; Last Update: April 13, 2010  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/books/NBK1442/?log\\$=disease5\\_name](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/books/NBK1442/?log$=disease5_name)

## Résumé

Les déficiences intellectuelles (DI) sont définies comme une réduction significative des capacités à comprendre des informations nouvelles ou complexes, à l'apprentissage de nouvelles aptitudes, avec une autonomie limitée et qui débute avant l'âge de 18 ans. Elles concernent près de 3% de la population et sont un handicap fréquent de l'enfant. Si 15% des DI sont attribuées à des causes environnementales et 20-30% à des anomalies chromosomiques, l'étiologie génétique de ces pathologies reste indéterminée pour environ 50% des patients.

Dans le laboratoire du docteur Laurence Colleaux, notre travail vise à mieux comprendre les bases physiopathologiques des DI et les processus développementaux, permettant la mise en place du système nerveux central au cours du développement. Ces résultats ont aussi pour objectifs de fournir les éléments nécessaires à la prise en charge des familles par des généticiens qui leur apporteront explications, soutien psychologique, et conseil génétique.

Les travaux présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans un projet de recherche porté sur l'analyse de familles multiplex et consanguines dans lesquelles ségrége une DI transmise sur le mode autosomique récessif. Pour la réalisation de ces projets, nous avons mis en place une stratégie innovante dans la détection de mutations à l'origine de DI-AR, en combinant une approche de cartographie par autozygotie et une étude transcriptomique.

La famille Ja présente une DI associée à une paraplégie spastique, une petite taille, une absence de langage, une perte de la marche vers l'âge de 2,5 ans et un caractère timide et enjoué. Une insertion de trois nucléotides entraînant l'apparition d'un codon stop prématuré dans le gène *AP4B1* a été révélée chez cette famille. Un syndrome similaire a été décrit chez deux familles indépendantes (MR061 et MR071) et rapporte les anomalies géniques situées dans les gènes *AP4S1* et *AP4E1*. Ces trois gènes codent tous pour des sous-unités du complexe Adaptor Protein 4 (AP4) qui joue un rôle dans le trafic vésiculaire, notamment des récepteurs AMPA et de la protéine APP (amyloid precursor protein) dans certains neurones cérébraux. Depuis ces découvertes, neuf familles ont été décrites avec des anomalies des sous-unités du complexe AP4 et ont permis la définition d'un syndrome cliniquement reconnaissable : le syndrome AP4.

Les enfants de la famille BM sont atteints d'une DI sévère non spécifique mais avec néanmoins une anomalie peu fréquente à l'IRM : une discordance de signaux traduisant des défauts de la substance blanche entre les séquences T2 et FLAIR. Une mutation non-sens a été identifiée dans *TRAPPC9*, gène codant pour une protéine associée à la voie NF-κB. Six autres familles ont également été rapportées avec des défauts géniques de *TRAPPC9*, ce qui en fait un gène majeur de DI non spécifique, à ce jour.

La dernière partie de ce manuscrit décrit le recrutement d'une cohorte de patients candidats pour *TRAPPC9*, atteints de DI sévères et présentant une dissociation T2/FLAIR à l'IRM. L'enfant atteint de la famille LS non consanguine, présente un tableau clinique similaire aux patients BM. Bien que la recherche de mutations hétérozygotes composites n'ait pas aboutie, *TRAPPC9* reste le meilleur candidat pour cette famille.

Les autres patients de la cohorte de dissociation T2/FLAIR ont permis d'établir des corrélations génotype-phénotype entre des défauts de la substance blanche visibles par IRM cérébrale et des duplications du locus Xq28 comprenant *IKBK*G (*NEMO*), acteur essentiel de la voie NF-κB. L'ensemble de ces résultats suggèrent l'importance de la voie NF-κB dans la mise en place et/ou la maturation et/ou la maintenance de la myéline au niveau du système nerveux central.