

Analyse génétique de six familles Algériennes avec retard mental non spécifique autosomique récessif

Nadia Guessibia^{1,2}, Nouredine Sarrai³, Nassima Methari⁴, Bachir Ridouh⁴, Habiba Chaabouni Bouhamed¹

¹ Laboratoire de Génétique Humaine Université Tunis El Manar, Faculté de médecine Tunis, Tunisie.

² Université Mouloud Maamri, Tizi-Ouzou Algérie.

³ Hôpital El Affroun Blida ; Algérie. - ⁴ CHU Frantz Fanon. Blida ; Algérie.

N. Guessibia, N. Sarrai, N. Methari, B. Ridouh, H. Chaabouni Bouhamed

N. Guessibia, N. Sarrai, N. Methari, B. Ridouh, H. Chaabouni Bouhamed

Analyse génétique de six familles Algériennes avec retard mental non spécifique autosomique récessif

Linkage analysis of six Algerian families with autosomal recessive non specific mental retardation

LA TUNISIE MEDICALE - 2011 ; Vol 89 (n°05) : 466 - 470

LA TUNISIE MEDICALE - 2011 ; Vol 89 (n°05) : 466 - 470

R É S U M É

Prérequis : Le retard mental est le handicap majeur le plus fréquent, 1 à 3% dans la population générale. Les progrès récents en cytogénétique et en biologie moléculaire ont permis d'identifier de nombreux gènes responsables du retard mental, notamment dans les formes autosomiques.

But : Rechercher une liaison génétique aux loci impliqués dans le retard mental non spécifique transmis en autosomique récessif dans des familles Algériennes avec plusieurs membres atteints de cette pathologie.

Méthodes : L'étude a concerné 34 individus dont 15 malades, appartenant à six familles algériennes consanguines. Les patients sont atteints d'un retard mental non spécifique de transmission autosomique récessive. Une étude de liaison génétique a été réalisée pour 4 loci connus: 3p25-pter ; 4q24-q25, 19p13.12 et 1p21.1-p13. Le génotypage a été réalisé sur un analyseur automatique à ADN et l'analyse effectuée grâce au programme Gene Mapper software.

Résultats : l'étude réalisée a permis d'exclure l'ensemble de ces locus pour 3 familles, néanmoins la liaison d'une famille au locus 1p21.1-p13.3 est possible.

Conclusion : L'étude de liaison de 4 familles Algériennes avec retard mental autosomique récessif qui montre l'absence de liaison pour 3 loci connus, confirme l'hétérogénéité génétique de cette pathologie et nous incite à poursuivre la recherche de gènes grâce à ces familles informatives.

S U M M A R Y

Background: Mental retardation is one of the most frequent major handicap, with a 1-3 % frequency in the general population. The recent progress of molecular biology and cytogenetic allowed to identify new genes for non syndromic autosomal recessive mental retardation.

Aim: To seek a genetic linkage to the loci implied in the nonspecific mental retardation transmitted into autosomal recessive (ARNSMR) in Algerian families with several affected members and to make the Genetic analysis of ARNSMR for 4 known loci: 3p25-pter; 4q24-q25, 19p13.12 and 1p21.1-p13.

Methods: The study concerned 34 individuals including 15 patients, belonging to six consanguineous Algerian families. Genotyping was made using polymorphic microsatellite markers and the analysis carried out thanks to the program Gene Mapper software. Statistical analyses were validated using the Fast Link programme of the Easy linkage software (V4:00 betas).

Results: The study carried out made it possible to exclude linkage of all loci for 3 families, nevertheless the linkage of one family to the locus 1p21.1-p13.3 remains possible.

Conclusion: The absence of linkage of 4 Algerian families with autosomal recessive mental retardation to 3 well known loci, confirms the genetic heterogeneity of mental retardation. We have to pursue research of candidate genes by whole genome scan.

Mots-clés

Retard mental ; autosomique récessif ; étude de liaison ; Algérie ; génotypage

Key- words

Mental retardation; autosomal recessive; linkage analysis; Algeria; genotypin

Le retard mental est défini par l'Association Américaine de Psychiatrie [1] comme "un fonctionnement intellectuel général significativement inférieur à la moyenne, qui s'accompagne de limitations significatives du fonctionnement adaptatif dans les secteurs d'aptitude, tel que l'autonomie, l'apprentissage scolaire, la vie sociale ; le tout doit survenir avant l'âge de 18 ans".

Le retard mental est défini par un quotient intellectuel (QI) <70, et il affecte de 2 à 3% de la population. Il peut résulter de multiples causes environnementales et génétiques [2].

Le retard mental peut représenter un symptôme dans un ensemble clinique complexe, il s'agit d'un retard mental syndromique (RMS) ou constituer la pathologie, et c'est le retard mental non syndromique ou non spécifique (RMNS). Parmi les causes génétiques, le retard mental non syndromique à transmission autosomique récessive (RMNS-AR) compte approximativement 25% de tous les patients avec un RMNS [3]. Bien que de nombreux gènes liés à l'X aient été identifiés comme étant une cause de RMNS [4, 5, 6], peu de loci autosomiques sont impliqués dans le RMNS-AR [7] et à ce jour 6 gènes ont été identifiés. Dans ce travail nous rapportons les résultats de l'analyse de liaison de 6 familles algériennes à 4 locus ; le locus du gène PRSS12, en 4q25-q26 ; le locus du gène CRBN en 3p26.2 ; le locus du gène CC2D1A en 19p13.12 et le locus MRT4 situé sur le bras court du chromosome 1 en 1p21.1-p13.3.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous avons recensé six familles Algériennes issues de la région nord-est du pays regroupant plusieurs membres porteurs d'un retard mental. Il s'agit de familles non apparentées et les branches étudiées comportaient chacune au moins deux patients atteints d'un retard mental non spécifique. Tous les patients sont nés de parents normaux et une consanguinité est présente dans cinq des six familles. Les 15 patients retenus pour l'étude ont été examinés. Il s'agit de 8 garçons et de 7 filles. L'âge des patients au moment de l'examen était compris entre 6 et 38 ans. Chez tous les patients nous n'avons pas noté de dysmorphie faciale spécifique ; leurs mensurations et en particulier le périmètre crânien étaient normaux. L'examen neurologique

était normal et aucun patient ne présentait de troubles psychiatriques. Les fonctions sensorielles étaient normales. Le quotient intellectuel était de moyen à sévère.

Les investigations biologiques ont été réalisées chez tous les patients : il s'agissait de l'étude du caryotype en bandes R (résolution 600 bandes) et d'un screening métabolique ; aucune anomalie n'avait été retrouvée.

Au moins un membre atteint de chaque famille a bénéficié d'un scanner cérébral qui n'avait pas décelé d'anomalie cérébrale dans tous les cas.

Un total de 34 individus, regroupant 6 couples de parents, 7 germains sains et les 15 patients ont été retenus pour cette étude. Un consentement a été obtenu auprès des germains adultes ainsi qu'auprès des parents pour eux-mêmes, les germains mineurs et les patients.

Etude des marqueurs polymorphes:

Un prélèvement de sang périphérique a été effectué pour toutes les personnes retenues dans l'étude et l'ADN a été extrait suivant le procédé de l'extraction à la protéinase K. Le contrôle de la qualité et de la quantité d'ADN a été réalisé grâce à un spectrophotomètre de nouvelle génération: Nano Drop ND_1000 (Nano Drop Technologies, Wilmington, DE, USA).

Les marqueurs utilisés sont des microsatellites sélectionnés à partir de la base de données du génome humain ENSEMBL (<http://www.ensembl.org>). Le choix des 10 marqueurs fluorescents utilisés s'est basé sur la connaissance des loci impliqués. Nous avons choisi deux marqueurs par locus pour les gènes identifiés : CRBN en 3p25-pter ; PRSS12 en 4q24-q25 et CC2D1A en 19p13.12 ; alors que pour le locus MRT4 en 1p21.1-p13.3, nous avons choisi quatre marqueurs.

La séquence des oligonucléotides correspondant à ces marqueurs ainsi que leurs tailles et le Tm sont résumés dans le tableau 1.

L'amplification des marqueurs est réalisée par PCR (Réaction de Polymérisation en Chaîne). Toutes les réactions PCR ont été effectuées dans un aliquot de 50 µl contenant 100 ng d'ADN génomique, 5 µl de tampon 10X, un mix dNTPs (0.2mM chacun), 2.5 mM MgCl₂, 1 µM de chaque primer, Forward et Reverse, 0.5 UI de Taq polymérase (In vitro, Foster City,

Tableau 1 : Schéma des primers utilisés pour l'amplification des régions du génome étudiées par PCR

Locus	Taille	Amorce sens	Amorce anti-sens	Tm°C
D3S3525	119	GATTGGGACTTGTCAGC	GTGTAATCTCCTGTAGCAGAGTTC	55
D3S3050	227	TGGTGGTATGCATTTGTTCAG	ATCCCTGACTTCAAGTGCA	53
D4S597	222	CGGCACTAGTCACATACCTGTTTA	TGGATAACATAATCTGCAATTTGCCA	55
D4S2788	179	GCAATTGGGAGAGGAACTGA	ACAATCTGTTTCTGATTGCACA	53
D19S840	184	ATAGGCCAAGACTGTCTAAAACAA	GCCCTAACTGCTGTAAAGAGAACT	55
D19S994	276	CGTACACACACTCAGGCTTCA	CCCATCCTGCTGGATGTC	58
D1S429	213	GGTCAAACAGAGAGCAATTG	CAAACCTGCAGTATCTCTAAGG	55
D1S1166	205	CTTGGCCTACATTTATACTCT	AAGGTCAAATCCCTGTAACAA	53
D1S2726	276	CCACAAGTTGCAGGGTT	CTGGATGGATGCTCAAATAC	53
D1S187	83	AGGTGTGAGCTGTTCACATA	GCAAGACAGCTGCCTCATA	51

CA, USA). Les conditions de PCR étaient: 1 cycle à 95°C pendant 5 min, 30 cycles à 94°C pendant 30s, température de fusion spécifique pendant 30s, et 72°C pendant 30s, et un cycle final d'extension à 72°C pendant 7 min. Les réactions PCR ont été faites dans un thermocycleur Perkin Elmer System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA.2400). Une électrophorèse des produits d'amplification est effectuée dans un séquenceur capillaire ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, Foster City, USA) et analysés avec le programme Gene Mapper software (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Analyse statistique et étude de liaison

Informativité des marqueurs : Un marqueur est considéré informatif lorsque l'un au moins des deux parents a un génotype hétérozygote pour ce marqueur.

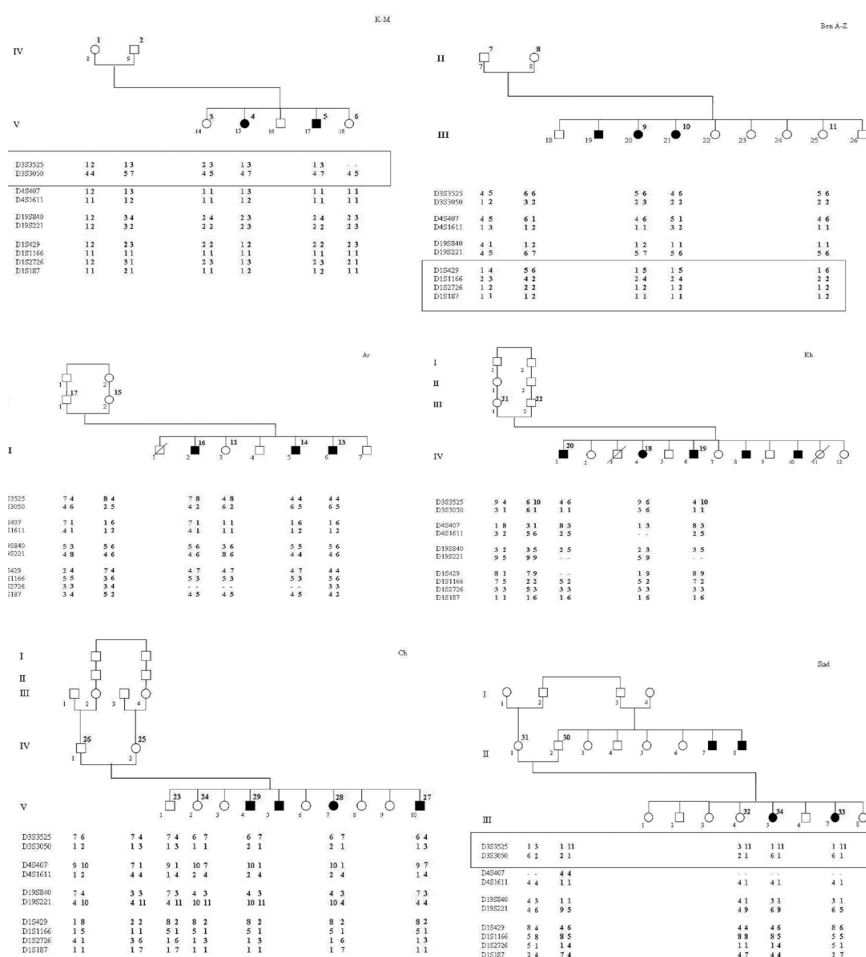
Analyse de liaison : L'analyse lod score est une méthode paramétrique basée sur le principe de vraisemblance pour estimer le taux de recombinaison et tester la liaison génétique entre deux loci en l'occurrence un locus marqueur et un locus de maladie (analyse deux points).

La vraisemblance (L) du pedigree est calculée entre le locus de la maladie et le locus marqueur pour une valeur X du taux de recombinaison et pour $\theta = 0.5$, en se basant sur le nombre d'individus recombinants et non recombinants. Dans ce travail, nous avons utilisé le programme Fast Link du Linkage Plus software package (v4.00 beta).

RÉSULTATS

L'étude de la ségrégation du phénotype retard mental dans ces familles nous a permis de retenir le mode de transmission autosomique récessif dans les six familles. Les patients nés de parents normaux et apparentés sont également répartis entre les deux sexes. La lecture des génotypes effectués par le séquenceur nous a permis de déterminer pour chaque locus les haplotypes de chaque individu étudié dans chacune des six familles. Les résultats des haplotypes obtenus sont rapportés sur la figure 1.

Figure 1 : Répartition des haplotypes des 10 marqueurs chez les individus étudiés portés sur les généalogies des 6 familles. Fam 1 :M-K ; Fam2 :Ben A-Z ; Fam3 :Ar ; Fam4 :KH; Fam5:Ch; Fam6: Sad.



L'analyse des résultats a montré que tous les marqueurs étaient informatifs pour toutes les familles à l'exception des marqueurs du locus 4q25-q26 pour la famille 6.

L'analyse de la ségrégation des haplotypes a montré une exclusion de tous les locus pour les familles 3, 4 et 5.

Pour les familles 1 et 6 une exclusion ne peut être retenue pour le locus 3p26.2 et le calcul du lod score donne un $Z_{\max} = 1.46$ pour une valeur $\alpha = 0$.

Pour la famille 2, une liaison au locus 1p21.1-p13.3 ne peut être exclue étant donné la présence d'un haplotype commun chez les 2 patients et qui est différent de celui de leur germain sain. Le calcul du lod score donne un $Z_{\max} = 2.01$ pour une valeur $\alpha = 0$.

DISCUSSION

Le retard mental est une pathologie hétérogène tant sur le plan clinique que sur le plan génétique. Notre intérêt porte essentiellement sur le retard mental autosomique récessif non syndromique. L'évolution dans la connaissance des gènes responsables de cette forme héréditaire reste encore lente malgré les études réalisées à partir de familles consanguines. A ce jour 16 loci sont cernés dont 6 gènes identifiés (CRBN, CC2D1A, PRSS12, GRIK2, TUSC3 et TRAPPC9) [7-9]. Dans ce travail nous présentons les résultats de l'analyse de liaison à 4 locus de 6 familles Algériennes. Le locus du gène PRSS12, en 4q25-q26, décrit initialement dans une famille Algérienne [10] est exclu dans toutes nos familles étudiées ; ce gène code pour une protéine, la neurotrypsin fortement exprimée dans le cerveau ; elle joue un rôle principal dans le maintien de l'équilibre de certaines fonctions cognitives [11, 12]. Le second locus en 3p26.2 est décrit par Higgins dans une famille Américaine qui a permis également l'identification du gène CRBN et son implication dans le RMNS-AR [13, 14]. Ce gène code pour une protéine Cereblon qui intervient dans le contrôle du transport membranaire des ions Ca^{2+} et K^{+} , elle est fortement exprimée dans les divers tissus, cerveau en particulier [15]. Le gène CC2D1A est localisé sur le chromosome 19 en 19p13.12 chez une grande famille Arabo-israélienne [16, 17]. Aucune liaison n'est retenue pour nos familles étudiées. Le gène CC2D1A code pour une protéine de 950 aa qui intervient dans la régulation négative du récepteur 5-HT_{1A} de la basale des neurones [18], ce dernier contrôle la maturation dendritique dans l'hippocampe et la neurogenèse adulte [19]. Enfin, le quatrième locus est situé sur le bras court du chromosome 1, en 1p21.1-p13.3 décrit dans une grande famille consanguine Turque [20], malgré un faible lod score, une

liaison de la famille 2 à ce locus ne peut être complètement exclue. Trois autres gènes impliqués dans le RMNS-AR ont été récemment décrits. Il s'agit des gènes GRIK2, TUSC3 et TRAPPC9. Le gène GRIK2, localisé 6q16.1-q21 est identifié en 2007 chez une famille Iranienne [21]. Ce gène code pour une protéine GLUK16, une sous-unité de récepteurs kainate (KARs) hautement exprimés dans le cerveau ; elle jouerait le rôle d'un récepteur pour la glutamate, potentiel neurotransmetteur excitateur dans le système nerveux central située essentiellement au niveau de la membrane synaptique [22]. Le gène TUSC3 localisé en 8p22 est identifié en 2008 dans une famille Iranienne de RMNS-AR [8] et dans une famille française [23]. Ce gène code pour une protéine, la N33 qui constitue une unité du complexe enzymatique l'oligosaccharyltransférase, enzyme exprimée essentiellement au niveau du cerveau, le cœur, le pancréas, les testicules et la rate et qui contrôle certaines modifications post-traductionnelles comme la glycosylation, ultime étape qui confère à la protéine néo synthétisée une structure fonctionnelle. Le gène TRAPPC9 (trafficking protein particle complex 9), localisé en 8q24.3 est identifié dans quatre familles une Israélienne Arabe, une Tunisienne, une Pakistanaise et une Iranienne [24-26]. Ce gène exprimé dans les cellules du cortex cérébral, code pour une protéine NIKK and IKK-Beta-binding protein qui joue un rôle fondamental dans la bonne signalisation du NF-kappaB. Les familles étudiées proviennent d'une même région de l'Algérie sur un rayon de 100 Km environ, il s'agit de familles multiplex. La recherche d'une liaison à ces 4 locus décrits dans le RMNS-AR a permis d'exclure l'ensemble de ces locus pour 3 familles. Les marqueurs utilisés, pour la plupart intragéniques étaient informatifs.

Néanmoins la liaison d'une famille (famille2) au locus 1p21.1-p13.3 est possible malgré un lod score inférieur à 3; toutefois le séquençage du gène s'imposera dès son identification. Alors que pour les familles 1 et 6, la liaison au locus 3 reste peu probable étant donné le faible lod score et l'absence d'homozygotie au niveau de l'haplotype partagé par les patients malgré la présence d'une consanguinité dans ces deux branches. Pour les familles non liées, une étude par genome scan demeure le meilleur moyen qui nous aidera à définir la ou les régions candidates au niveau du génome impliquées dans la pathologie du RMNS-AR.

Remerciements

Nous remercions les patients et leurs familles pour avoir accepté de contribuer à ce travail.

Références

1. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 4th.Ed. Washington DC: The American Psychiatric Association 1994.
2. Shevell M, Ashwal S, Donley D, et al. Practice Committee of the Child Neurology Society. Practice parameter: evaluation of the child with global developmental delay: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology; Practice Committee of the Child Neurology Society. Neurology. 2003;60:367-80.
3. Rio M, Colleaux L, Sanlaville D, Borck G, Molinari F, Munnich A. Approches diagnostic chez les patients atteints de retard mental sévère et syndromique. Arch Pediatr. 2004 ;11:566-568.
4. Chelly J. Retards mentaux liés au chromosome X. Médecine/Sciences 2000; 16 :363-367.

5. Ropers HH, Hamel BC. X-Linked mental retardation. *Nat Rev Genet.* 2005;6:46-57. Review.
6. Ropers HH. X-linked mental retardation: many genes for a complex disorder. *Curr Opin Genet Dev.* 2006;16:260-9.
7. Basel-Vanagaite L. Genetics of autosomal recessive non-syndromic mental retardation: recent advances. *Clin Genet.* 2007;72:167-74.
8. Garshasbi M, Hadavi V, Habibi H, et al. A defect in the TuSC3 gene is associated with autosomal recessive mental retardation. *Am J Hum Genet* 2008;82: 1158-1164.
9. Rafiq MA, Ansar M, Marshall CR, et al. Mapping of three novel loci for non-syndromic autosomal recessive mental retardation (NS-ARMR) in consanguineous families from Pakistan. *Clin Genet.* 2010; 78: 478-83.
10. Molinari F, Rio M, Meskenaitė V, et al. Truncating neurotrypsin mutation in autosomal recessive non syndromic mental retardation. *Science* 2002; 298: 1779-81.
11. Didelot G, Molinari F, Tchenio P, et al. Tequila, a neurotrypsin ortholog, regulates long-term memory formation in *Drosophila*. *Science* 2006;313: 851-53.
12. Mitsui S, Yamaguchi N, Osako Y, Yuri K. Enzymatic properties and localization of motopsin (PRSS12), a protease whose absence causes mental retardation. *Brain Res* 2007; 1136: 1-12.
13. Higgins J, Rosen D, Loveless J, Clyman J, Grauy M. A gene for non syndromic mental retardation maps to chromosome 3p25-pter. *Neurology* 2000;55: 335-40.
14. Higgins J, Pucilowska J, Lombardi R, Rooney J. A mutation in a novel ATP-dependent Lon protease gene in a kindred with mild mental retardation. *Neurology* 2004;63:1927-1931.
15. Xin W, Xiaohua N, Peilin C, Xin C, Yaqiong S, Qihan W. Primary function analysis of human mental retardation gene CRBN. *Mol Bio Rep* 2008;35: 251-6.
16. Basel-Vanagaite L, Alkelai A, Straussberg R, et al. Mapping of a new locus for autosomal recessive non-syndromic mental retardation in the chromosomal region 19p13.12-p13.2: further genetic heterogeneity. *J Med Genet* 2003; 40:729-32.
17. Basel-Vanagaite L, Attia R, Yahav M, et al. 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; 43: 203-210.
18. Ou XM, Lemonde S, Jafar-Nejad H, et al. Freud-1: a neuronal calcium-regulated repressor of the 5-HT1A receptor gene. *J Neurosci* 2003; 23: 7415-7425.
19. Brezun JM, Daszuta A. Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats. *Neuroscience* 1999;89: 999-1002.
20. Uyguner O, Kayserili H, Li Y, et al. A new locus for autosomal recessive non-syndromic mental retardation maps to 1p21.1-p13.3. *Clin Genet* 2007; 71:212-19.
21. Motazacker MM, Rost BR, Hucho T, et al. A defect in the ionotropic glutamate receptor 6 gene (GRIK2) is associated with autosomal recessive mental retardation. *Am J Hum Genet.* 2007; 81:792-8.
22. Lerma J. Roles and rules of kainate receptors in synaptic transmission. *Nat Rev Neurosci* 2003;4: 481-95.
23. Molinari F, Foulquier F, Tarpey PS, et al. Oligosaccharyltransferase subunit mutations in non syndromic mental retardation. *Am J Hum Genet* 2008;82: 1150-57.
24. 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.
25. 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; 85:903-8.
26. 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; 85:909-15.