



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**THÈSE**  
pour obtenir le grade de

**DOCTEUR EN MÉDECINE**

Présentée et soutenue publiquement  
dans le cadre du troisième cycle de Médecine Spécialisée

par  
**Laëtitia LAMBERT**

le 23 novembre 2007

**ETIOLOGIE MOLECULAIRE DU SYNDROME DE RETT :  
RECHERCHE DE NOUVEAUX MECANISMES  
MUTATIONNELS AFFECTANT LES GENES  
*MECP2 ET CDKL5***

**Examineurs de la thèse :**

|                |                     |           |
|----------------|---------------------|-----------|
| M. P. MONIN    | Professeur          | Président |
| M. B. JONVEAUX | Professeur          | Juge      |
| M. P. LEHEUP   | Professeur          | Juge      |
| M. E. RAFFO    | Docteur en médecine | Juge      |
| M. C. PHILIPPE | Docteur en sciences | Juge      |

**FACULTÉ DE MÉDECINE DE NANCY**

-----

**Président de l'Université : Professeur Jean-Pierre FINANCE**

**Doyen de la Faculté de Médecine : Professeur Patrick NETTER**

**Vice-Doyen de la Faculté de Médecine : Professeur Henry COUDANE**

**Assesseurs :**

du 1<sup>er</sup> Cycle :

**M. le Professeur François ALLA**

du 2<sup>ème</sup> Cycle :

**M. le Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI**

du 3<sup>ème</sup> Cycle :

**M. le Professeur Marc BRAUN**

de la Vie Facultaire :

**M. le Professeur Bruno LEHEUP**

**DOYENS HONORAIRES**

Professeur Adrien DUPREZ – Professeur Jean-Bernard DUREUX

Professeur Jacques ROLAND

=====

**PROFESSEURS HONORAIRES**

Jean LOCHARD – René HERBEUVAL – Gabriel FAIVRE – Jean-Marie FOLIGUET

Guy RAUBER – Paul SADOUL – Raoul SENAULT

Jacques LACOSTE – Jean BEUREY – Jean SOMMELET – Pierre HARTEMANN – Emile de LAVERGNE

Augusta TREHEUX – Michel MANCIAUX – Paul GUILLEMIN – Pierre PAYSANT

Jean-Claude BURDIN – Claude CHARDOT – Jean-Bernard DUREUX – Jean DUHEILLE –

Jean-Marie GILGENKRANTZ – Simone GILGENKRANTZ

Pierre ALEXANDRE – Robert FRISCH – Michel PIERSON – Jacques ROBERT

Gérard DEBRY – Michel WAYOFF – François CHERRIER – Oliéro GUERCI

Gilbert PÉRCEBOIS – Claude PERRIN – Jean PREVOT – Jean FLOQUET

Alain GAUCHER – Michel LAXENAIRE – Michel BOULANGE – Michel DUC – Claude HURIET – Pierre

LANDES

Alain LARCAN – Gérard VAILLANT – Daniel ANTHOINÉ – Pierre GAUCHER – René-Jean ROYER

Hubert UFFHOLTZ – Jacques LECLERE – Francine NABET – Jacques BORRELLY

Michel RENARD – Jean-Pierre DESCHAMPS – Pierre NABET – Marie-Claire LAXENAIRE – Adrien

DUPREZ – Paul VERT –

Bernard LEGRAS – Pierre MATHIEU – Jean-Marie POLU – Antoine RASPILLER – Gilbert THIBAUT

Michel WEBER – Gérard FIEVE – Daniel SCHMITT – Colette VIDAILHET – Alain BERTRAND – Hubert

GERARD

Jean-Pierre NICOLAS – Francis PENIN – Michel STRICKER – Daniel BURNEL – Michel VIDAILHET –

Claude BURLET –

Jean-Pierre DELAGOUTTE – Jean-Pierre MALLIÉ – Danièle SOMMELET – Professeur Luc PICARD

Professeur Guy PETIET

=====

**PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS**

**PRATICIENS HOSPITALIERS**

(Disciplines du Conseil National des Universités)

**42<sup>ème</sup> Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Anatomie)**

Professeur Jacques ROLAND – Professeur Gilles GROSDIDIER

Professeur Pierre LASCOMBES – Professeur Marc BRAUN

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Cytologie et histologie)**

Professeur Bernard FOLIGUET

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Anatomie et cytologie pathologiques)**

Professeur François PLENAT – Professeur Jean-Michel VIGNAUD

-----

**43<sup>ème</sup> Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDICALE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Biophysique et médecine nucléaire)**

Professeur Gilles KARCHER – Professeur Pierre-Yves MARIE – Professeur Pierre OLIVIER

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Radiologie et imagerie médicale)**

Professeur Luc PICARD – Professeur Denis REGENT – Professeur Michel CLAUDON  
Professeur Serge BRACARD – Professeur Alain BLUM – Professeur Jacques FELBLINGER  
Professeur René ANXIONNAT

-----

**44<sup>ème</sup> Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Biochimie et biologie moléculaire)**

Professeur Jean-Louis GUÉANT – Professeur Jean-Luc OLIVIER – Professeur Bernard NAMOUR

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Physiologie)**

Professeur Jean-Pierre CRANCE

Professeur François MARCHAL – Professeur Philippe HAOUZI

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Biologie Cellulaire (type mixte : biologique))**

Professeur Ali DALLOUL

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Nutrition)**

Professeur Olivier ZIEGLER

-----

**45<sup>ème</sup> Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Bactériologie – virologie ; hygiène hospitalière)**

Professeur Alain LOZNIEWSKI

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Parasitologie et mycologie)**

Professeur Bernard FORTIER

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Maladies infectieuses ; maladies tropicales)**

Professeur Thierry MAY – Professeur Christian RABAUD

-----

**46<sup>ème</sup> Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Épidémiologie, économie de la santé et prévention)**

Professeur Philippe HARTEMANN – Professeur Serge BRIANÇON

Professeur Francis GUILLEMIN – Professeur Denis ZMIROU-NAVIER – Professeur François ALLA

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Médecine et santé au travail)**

Professeur Guy PETIET – Professeur Christophe PARIS

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Médecine légale et droit de la santé)**

Professeur Henry COUDANE

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication)**

Professeur François KOHLER – Professeur Éliane ALBUISSON

-----

**47<sup>ème</sup> Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Hématologie ; transfusion)**

Professeur Christian JANOT – Professeur Thomas LECOMPTE – Professeur Pierre BORDIGONI

Professeur Pierre LEDERLIN – Professeur Jean-François STOLTZ – Professeur Pierre FEUGIER

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Cancérologie ; radiothérapie)**

Professeur François GUILLEMIN – Professeur Thierry CONROY

Professeur Pierre BEY – Professeur Didier PEIFFERT – Professeur Frédéric MARCHAL

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Immunologie)**

Professeur Gilbert FAURE – Professeur Marie-Christine BENE

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Génétique)**

Professeur Philippe JONVEAUX – Professeur Bruno LEHEUP

-----

**48<sup>ème</sup> Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE,  
PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (*Anesthésiologie et réanimation chirurgicale*)**

Professeur Claude MEISTELMAN – Professeur Dan LONGROIS – Professeur Hervé BOUAZIZ  
Professeur Paul-Michel MERTES

**2<sup>ème</sup> sous-section : (*Réanimation médicale*)**

Professeur Henri LAMBERT – Professeur Alain GERARD  
Professeur Pierre-Édouard BOLLAERT – Professeur Bruno LÉVY

**3<sup>ème</sup> sous-section : (*Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique*)**

Professeur Patrick NETTER – Professeur Pierre GILLET

**4<sup>ème</sup> sous-section : (*Thérapeutique*)**

Professeur François PAILLE – Professeur Gérard GAY – Professeur Faiez ZANNAD

-----

**49<sup>ème</sup> Section : PATHOLOGIE NERVEUSE ET MUSCULAIRE, PATHOLOGIE MENTALE,  
HANDICAP et RÉÉDUCATION**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (*Neurologie*)**

Professeur Gérard BARROCHE – Professeur Hervé VESPIGNANI  
Professeur Xavier DUCROCQ

**2<sup>ème</sup> sous-section : (*Neurochirurgie*)**

Professeur Jean-Claude MARCHAL – Professeur Jean AUQUE  
Professeur Thierry CIVIT

**3<sup>ème</sup> sous-section : (*Psychiatrie d'adultes*)**

Professeur Jean-Pierre KAHN – Professeur Raymund SCHWAN

**4<sup>ème</sup> sous-section : (*Pédopsychiatrie*)**

Professeur Daniel SIBERTIN-BLANC

**5<sup>ème</sup> sous-section : (*Médecine physique et de réadaptation*)**

Professeur Jean-Marie ANDRE – Professeur Jean PAYSANT

-----

**50<sup>ème</sup> Section : PATHOLOGIE OSTÉO-ARTICULAIRE, DERMATOLOGIE et CHIRURGIE  
PLASTIQUE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (*Rhumatologie*)**

Professeur Jacques POUREL – Professeur Isabelle VALCKENAERE – Professeur Damien LOEUILLE  
**2<sup>ème</sup> sous-section : (*Chirurgie orthopédique et traumatologique*)**

Professeur Daniel MOLE

Professeur Didier MAINARD – Professeur François SIRVEAUX – Professeur Laurent GALOIS

**3<sup>ème</sup> sous-section : (*Dermato-vénéréologie*)**

Professeur Jean-Luc SCHMUTZ – Professeur Annick BARBAUD

**4<sup>ème</sup> sous-section : (*Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique*)**

Professeur François DAP

-----

**51<sup>ème</sup> Section : PATHOLOGIE CARDIORESPIRATOIRE et VASCULAIRE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (*Pneumologie*)**

Professeur Yves MARTINET – Professeur Jean-François CHABOT – Professeur Ari CHAOUAT

**2<sup>ème</sup> sous-section : (*Cardiologie*)**

Professeur Etienne ALIOT – Professeur Yves JUILLIERE – Professeur Nicolas SADOUL  
Professeur Christian de CHILLOU

**3<sup>ème</sup> sous-section : (*Chirurgie thoracique et cardiovasculaire*)**

Professeur Jean-Pierre VILLEMOT

Professeur Jean-Pierre CARTEAUX – Professeur Loïc MACE

**4<sup>ème</sup> sous-section : (*Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire*)**

-----

**52<sup>ème</sup> Section : MALADIES DES APPAREILS DIGESTIF et URINAIRE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Gastroentérologie ; hépatologie)**

Professeur Marc-André BIGARD

Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie digestive)**

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Néphrologie)**

Professeur Michèle KESSLER – Professeur Dominique HESTIN (Mme) – Professeur Luc FRIMAT

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Urologie)**

Professeur Philippe MANGIN – Professeur Jacques HUBERT – Professeur Luc CORMIER

-----

**53<sup>ème</sup> Section : MÉDECINE INTERNE, GÉRIATRIE et CHIRURGIE GÉNÉRALE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Médecine interne)**

Professeur Denise MONERET-VAUTRIN – Professeur Denis WAHL

Professeur Jean-Dominique DE KORWIN – Professeur Pierre KAMINSKY

Professeur Athanase BENETOS - Professeur Gisèle KANNY – Professeur Abdelouahab BELLOU

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie générale)**

Professeur Patrick BOISSEL – Professeur Laurent BRESLER

Professeur Laurent BRUNAUD – Professeur Ahmet AYAV

-----

**54<sup>ème</sup> Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNÉCOLOGIE-OBSTÉTRIQUE, ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Pédiatrie)**

Professeur Pierre MONIN

Professeur Jean-Michel HASCOET – Professeur Pascal CHASTAGNER – Professeur François FEILLET –

Professeur Cyril SCHWEITZER

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie infantile)**

Professeur Michel SCHMITT – Professeur Gilles DAUTEL – Professeur Pierre JOURNEAU

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale)**

Professeur Michel SCHWEITZER – Professeur Jean-Louis BOUTROY

Professeur Philippe JUDLIN – Professeur Patricia BARBARINO – Professeur Bruno DEVAL

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Endocrinologie et maladies métaboliques)**

Professeur Georges WERYHA – Professeur Marc KLEIN – Professeur Bruno GUERCI

-----

**55<sup>ème</sup> Section : PATHOLOGIE DE LA TÊTE ET DU COU**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Oto-rhino-laryngologie)**

Professeur Claude SIMON – Professeur Roger JANKOWSKI

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Ophtalmologie)**

Professeur Jean-Luc GEORGE – Professeur Jean-Paul BERROD – Professeur Karine ANGIOI-DUPREZ

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie)**

Professeur Jean-François CHASSAGNE

=====

**PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS**

**64<sup>ème</sup> Section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE**

Professeur Sandrine BOSCHI-MULLER

=====

# MAÎTRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

## 42<sup>ème</sup> Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1<sup>ère</sup> sous-section : *(Anatomie)*

Docteur Bruno GRIGNON – Docteur Thierry HAUMONT

2<sup>ème</sup> sous-section : *(Cytologie et histologie)*

Docteur Edouard BARRAT

Docteur Françoise TOUATI – Docteur Chantal KOHLER

3<sup>ème</sup> sous-section : *(Anatomie et cytologie pathologiques)*

Docteur Béatrice MARIE

Docteur Laurent ANTUNES

-----

## 43<sup>ème</sup> Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDICALE

1<sup>ère</sup> sous-section : *(Biophysique et médecine nucléaire)*

Docteur Marie-Hélène LAURENS – Docteur Jean-Claude MAYER

Docteur Pierre THOUVENOT – Docteur Jean-Marie ESCANYE – Docteur Amar NAOUN

-----

## 44<sup>ème</sup> Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION

1<sup>ère</sup> sous-section : *(Biochimie et biologie moléculaire)*

Docteur Jean STRACZEK – Docteur Sophie FREMONT

Docteur Isabelle GASTIN – Docteur Marc MERTEN – Docteur Catherine MALAPLATE-ARMAND

2<sup>ème</sup> sous-section : *(Physiologie)*

Docteur Gérard ETHEVENOT – Docteur Nicole LEMAU de TALANCE – Docteur Christian BEYAERT

Docteur Bruno CHENUUEL

4<sup>ème</sup> sous-section : *(Nutrition)*

Docteur Didier QUILLIOT – Docteur Rosa-Maria RODRIGUEZ-GUEANT

-----

## 45<sup>ème</sup> Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE

1<sup>ère</sup> sous-section : *(Bactériologie – Virologie ; hygiène hospitalière)*

Docteur Francine MORY – Docteur Christine LION

Docteur Michèle DAILLOUX – Docteur Véronique VENARD

2<sup>ème</sup> sous-section : *(Parasitologie et mycologie)*

Docteur Marie-France BIAVA – Docteur Nelly CONTET-AUDONNEAU – Docteur Marie MACHOUART

-----

## 46<sup>ème</sup> Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ

1<sup>ère</sup> sous-section : *(Epidémiologie, économie de la santé et prévention)*

Docteur Alexis HAUTEMANIÈRE

4<sup>ème</sup> sous-section : *(Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication)*

Docteur Pierre GILLOIS

-----

## 47<sup>ème</sup> Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE

1<sup>ère</sup> sous-section : *(Hématologie ; transfusion)*

Docteur François SCHOONEMAN

2<sup>ème</sup> sous-section : *(Cancérologie ; radiothérapie : cancérologie (type mixte : biologique))*

Docteur Lina BEZDETAYE épouse BOLOTINE

3<sup>ème</sup> sous-section : *(Immunologie)*

Docteur Anne KENNEL – Docteur Marcelo DE CARVALHO BITTENCOURT

4<sup>ème</sup> sous-section : *(Génétique)*

Docteur Christophe PHILIPPE

-----

**48<sup>ème</sup> Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE,  
PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Anesthésiologie et réanimation chirurgicale)**

Docteur Jacqueline HELMER – Docteur Gérard AUDIBERT

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique)**

Docteur Françoise LAPICQUE – Docteur Marie-José ROYER-MORROT – Docteur Nicolas GAMBIER

-----

**50<sup>ème</sup> Section : RHUMATOLOGIE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Rhumatologie)**

Docteur Anne-Christine RAT

-----

**54<sup>ème</sup> Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNÉCOLOGIE-  
OBSTÉTRIQUE,**

**ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION**

**5<sup>ème</sup> sous-section : (Biologie et médecine du développement et de la reproduction)**

Docteur Jean-Louis CORDONNIER

=====

## **MAÎTRES DE CONFÉRENCES**

**5<sup>ème</sup> section : SCIENCE ÉCONOMIE GÉNÉRALE**

Monsieur Vincent LHUILLIER

-----

**40<sup>ème</sup> section : SCIENCES DU MÉDICAMENT**

Monsieur Jean-François COLLIN

-----

**60<sup>ème</sup> section : MÉCANIQUE, GÉNIE MÉCANIQUE ET GÉNIE CIVILE**

Monsieur Alain DURAND

-----

**61<sup>ème</sup> section : GÉNIE INFORMATIQUE, AUTOMATIQUE ET TRAITEMENT DU SIGNAL**

Monsieur Jean REBSTOCK – Monsieur Walter BLONDEL

**64<sup>ème</sup> section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE**

Mademoiselle Marie-Claire LANHERS

Monsieur Franck DALIGAULT

-----

**65<sup>ème</sup> section : BIOLOGIE CELLULAIRE**

Mademoiselle Françoise DREYFUSS – Monsieur Jean-Louis GELLY

Madame Ketsia HESS – Monsieur Pierre TANKOSIC – Monsieur Hervé MEMBRE – Monsieur Christophe NEMOS

Madame Natalia DE ISLA

-----

**66<sup>ème</sup> section : PHYSIOLOGIE**

Monsieur Nguyen TRAN

-----

**67<sup>ème</sup> section : BIOLOGIE DES POPULATIONS ET ÉCOLOGIE**

Madame Nadine MUSSE



=====

## **MAÎTRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS**

### **Médecine Générale**

Professeur associé Alain AUBREGE  
Docteur Francis RAPHAEL  
Docteur Jean-Marc BOIVIN  
Docteur Jean-Louis ADAM  
Docteur Elisabeth STEYER

=====

## **PROFESSEURS ÉMÉRITES**

Professeur Michel BOULANGE – Professeur Alain LARCAN - Professeur Daniel ANTHOINE  
Professeur Paul VERT - Professeur Pierre MATHIEU - Professeur Gilbert THIBAUT  
Mme le Professeur Colette VIDAILHET – Professeur Alain BERTRAND - Professeur Jean-Pierre NICOLAS  
Professeur Michel VIDAILHET – Professeur Marie-Claire LAXENAIRE - Professeur Jean-Marie  
GILGENKRANTZ  
Mme le Professeur Simone GILGENKRANTZ - Professeur Jean-Pierre DELAGOUTTE – Professeur Danièle  
SOMMELET Professeur Luc PICARD - Professeur Guy PETIET

=====

## **DOCTEURS HONORIS CAUSA**

Professeur Norman SHUMWAY (1972)  
*Université de Stanford, Californie (U.S.A)*  
Professeur Paul MICHIELSEN (1979)  
*Université Catholique, Louvain (Belgique)*  
Professeur Charles A. BERRY (1982)  
*Centre de Médecine Préventive, Houston (U.S.A)*  
Professeur Pierre-Marie GALETTI (1982)  
*Brown University, Providence (U.S.A)*  
Professeur Mamish Nisbet MUNRO (1982)  
*Massachusetts Institute of Technology (U.S.A)*  
Professeur Mildred T. STAHLMAN (1982)  
*Wanderbilt University, Nashville (U.S.A)*  
Harry J. BUNCKE (1989)  
*Université de Californie, San Francisco (U.S.A)*

Professeur Théodore H. SCHIEBLER (1989)  
*Institut d'Anatomie de Würzburg (R.F.A)*  
Professeur Maria DELIVORIA-PAPADOPOULOS (1996)  
*Université de Pennsylvanie (U.S.A)*  
Professeur Mashaki KASHIWARA (1996)  
*Research Institute for Mathematical Sciences de Kyoto (JAPON)*  
Professeur Ralph GRÄSBECK (1996)  
*Université d'Helsinki (FINLANDE)*  
Professeur James STEICHEN (1997)  
*Université d'Indianapolis (U.S.A)*  
Professeur Duong Quang TRUNG (1997)  
*Centre Universitaire de Formation et de Perfectionnement des  
Professionnels de Santé d'Hô Chi Minh-Ville (VIËTNAM)*

## **A notre Maître et Président de Thèse**

Monsieur le Professeur Pierre MONIN  
Professeur de Pédiatrie

Nous vous exprimons toute notre gratitude pour la confiance constante que vous nous avez témoignée pendant notre internat de pédiatrie, ainsi que pour vos enseignements.

Nous vous remercions pour votre soutien précieux et votre encouragement pour la réalisation de notre projet de M2R en Sciences de la Vie et de la Santé.

C'est un grand honneur pour nous que vous ayez accepté la présidence de notre thèse.

## **À notre Maître et Juge**

Monsieur le Professeur Philippe JONVEAUX  
Professeur de Génétique

Nous vous remercions de l'honneur que vous nous faites en jugeant notre travail.

Nous tenons également à vous remercier pour vos enseignements de génétique en premier cycle des études médicales, pour la confiance dont vous avez fait montre en nous proposant ce passionnant sujet de travail de thèse, et pour vos encouragements chaleureux durant notre collaboration dans votre service.

## **À notre Maître et Juge**

Monsieur le Professeur Bruno LEHEUP  
Professeur de Génétique  
Chevalier dans l'Ordre des Palmes Académiques

C'est un honneur que vous nous faites en acceptant de juger notre travail.

Notre goût et notre curiosité pour la génétique ont trouvé leur source en vos enseignements en premier cycle des études médicales, et nous ont dirigé vers ce travail de thèse.

Nous vous exprimons notre sincère gratitude et notre profond respect.

## **À notre Juge**

Monsieur le Docteur Emmanuel RAFFO  
Docteur en Médecine

Nous vous remercions de l'honneur que vous nous faites en jugeant notre travail.

C'est grâce à vous que notre intérêt pour la neurologie pédiatrique s'est affirmé. Votre sympathie et votre disponibilité, notamment lors de la réalisation de travaux communs présentés en congrès, ont été pour nous un soutien précieux. Merci pour vos judicieux conseils et enseignements au quotidien, qui ont permis l'acquisition de nombreuses connaissances cliniques et théoriques.

Nous vous témoignons un profond respect et une grande reconnaissance.

## **À notre Juge**

Monsieur le Docteur Christophe PHILIPPE  
Docteur en Sciences

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter la direction de notre travail.

Nous vous remercions pour votre inaltérable patience lors de notre collaboration, qui a été un formidable enrichissement professionnel et théorique. Vos connaissances nous ont été extrêmement précieuses dans ce domaine où nous sommes novices.

Nous tenons également à vous remercier pour votre aide inconditionnelle lors de ce travail.

## **A toutes les personnes qui ont permis la réalisation de ce travail**

A toute l'équipe du laboratoire de génétique médicale du CHU de Nancy, pour son accueil et sa disponibilité.

A Aline Saunier qui m'a gentiment tout appris pour ce travail, du maniement de la pipette à l'utilisation du logiciel de bioinformatique (et le 3130 !!!), sans se départir jamais de sa bonne humeur.

A Carole, Christelle, Evelyne, Fanny, Ilham, Myriam, l'ambiance de la « pièce des chercheurs » va tellement me manquer !

A Virginie pour sa patience et son aide lors de la mise en forme de ce travail.

A Saliha qui m'a initiée aux joies de la quantification relative et du 7500.

A Fred, qui m'a toujours aidée quel que soit le problème.

## **À toutes les personnes qui m'ont aidée avant et pendant l'internat**

À Madame Mouge, qui m'a appris à lire.

À toutes les personnes que j'ai rencontrées pendant mon internat de pédiatrie, médecins, infirmières, puéricultrices et auxiliaires de puériculture, et qui ont pris part à notre apprentissage.

Et plus particulièrement :

À Jean-Marc, pour ses conseils lors de mon stage en néonatalogie et notre travail sur les septicémies néonatales à Candida.

À Ludovic, pour sa gentillesse légendaire, avoir la chance de travailler à tes côtés est un véritable enrichissement.

À Dominique, la première à m'avoir accueillie très cordialement en consultation de neurologie pédiatrique lors de mon externat, merci pour votre gentillesse indéfectible.

À Catherine, pour sa sympathie en toute circonstance, j'espère que nous travaillerons encore longtemps ensemble.

À Cyril et Marie-Christine, pour leurs conseils et leur gentillesse.



## **À toute ma famille**

À Sébastien, mon amour.

À Raphaël, mon petit garçon adoré.

À mes parents, à qui je dois absolument tout. Vous avez toujours été présents pour moi, dans les moments heureux comme dans ceux plus difficiles. Vous avoir à mes côtés lors de l'aboutissement de mes (longues !) études est une grande joie, vous m'avez toujours encouragée et laissée libre de mes choix personnels et professionnels, votre amour est mon moteur.

À ma sœur, toujours zen dans mes moments de stress, et qui m'a supportée jusque-là ! Je te souhaite tout le bonheur possible.

À Mireille, Gilles et Emmanuelle.

## **À tous mes proches**

À Aurélie, amie de toujours, pour toujours j'espère, et Sylvain.

À mon alter ego, Aurélie, merci pour tous ces moments passés en ta charmante compagnie, et Alexis.

À Hélène et Florent, longue vie à vous deux !

Aux « copines de promo », Amandine, Julie, Emilie, merci pour tout !

À mes aînées splendides : Solène et Frédérique.

À Frédérique Stone, Alexandre et Audrey, Laëtitia, Nicolas et Camille.

## SERMENT

*"Au moment d'être admise à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité. Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux. Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité. J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences. Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.*

*Admise dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me sont confiés. Reçue à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs. Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.*

*Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.*

*J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.*

*Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonorée et méprisée si j'y manque".*

# TABLE DES MATIERES

|   |           |
|---|-----------|
| <b>TABLE DES MATIERES .....</b>   | <b>19</b> |
| <b>Liste des abréviations.....</b>  | <b>21</b> |
| <b>Introduction.....</b>  | <b>22</b> |
| I) Le syndrome de Rett.....   | 22        |
| I.1) Clinique .....   | 22        |
| I.2) Evolution du syndrome de Rett .....  | 24        |
| I.3) Les variants du syndrome de Rett.....  | 24        |
| I.4) Pathologie moléculaire du syndrome de Rett .....   | 24        |
| I.4.1) MECP2 .....  | 24        |
| I.4.2) CDKL5 .....  | 26        |
| II) Hypothèse de travail.....   | 28        |
| II.1) Recherche de grands réarrangements génomiques affectant le locus CDKL5 .....  | 28        |
| II.2) Quantification de l'expression de MECP2 .....   | 29        |
| III) Objectifs des travaux de thèse.....  | 29        |
| <b>Matériel et méthodes.....</b>  | <b>30</b> |
| I) Patientes.....   | 30        |
| I.1) Choix des patientes.....   | 30        |
| I.1.1) Protocole QMPSF pour le gène CDKL5 .....   | 30        |
| I.1.2) Protocole de quantification des transcrits de MECP2.....   | 30        |
| II) Extraction des acides nucléiques.....   | 30        |
| II.1) Extraction de l'ADN génomique total.....  | 30        |
| II.2) Extraction des ARN totaux.....  | 31        |
| II.3) Dosage par spectrophotométrie .....   | 31        |
| II.4) Contrôle qualitatif des acides nucléiques .....   | 31        |
| III) Analyse du gène CDKL5 par QMPSF .....  | 32        |
| III.1) Amorces utilisées pour les PCR multiplex.....  | 33        |
| III.2) PCR multiplexes semi quantitatives.....  | 35        |
| III.3) Contrôle des produits de PCR multiplex.....  | 35        |
| III.4) Séparation des produits de PCR par électrophorèse capillaire.....  | 35        |
| III.5) Analyse des données .....  | 35        |
| IV) Quantification relative des transcrits du gène MECP2 .....  | 37        |
| IV.1) Réaction de transcription inverse.....  | 37        |
| IV.2) PCR quantitative .....  | 37        |
| IV.2.1) Amorces utilisées pour la qPCR .....  | 37        |
| IV.2.2) Contrôle de l'efficacité et de la spécificité de la PCR .....   | 38        |
| IV.2.3) PCR quantitative .....  | 38        |
| V) Etude de l'inactivation de l'X .....   | 39        |
| <b>Résultats.....</b>   | <b>40</b> |
| I) Analyse du gène CDKL5 par QM-PSF .....   | 40        |
| I.1) Choix du gène témoin interne.....  | 40        |
| I.2) Choix des amorces.....   | 40        |
| I.3) Mise au point de la QMPSF CDKL5.....   | 41        |
| I.3.1) Répartition des amorces dans les mélanges réactionnels des 3 PCR multiplex .....   | 41        |
| I.3.2) Premiers résultats pour les PCR multiplex n°1 et n°3 .....   | 42        |
| I.3.3) Premiers résultats pour la PCR multiplex n°2 .....   | 43        |
| I.3.4) Changement de la répartition des amplicons au sein des 3 PCR multiplex .....   | 43        |
| I.4) Application du protocole de QMPSF pour la recherche de RGT dans le gène CDKL5.....   | 47        |
| I.5) Mise en évidence d'un remaniement de grande taille dans le gène CDKL5 .....  | 48        |
| II) Quantification relative des transcrits du gène MECP2.....   | 49        |
| II.1) Contrôle des ARN totaux .....   | 51        |
| II.2) Choix des endogènes.....  | 51        |
| II.2.1) Contrôle de l'efficacité et de la spécificité des PCR .....   | 52        |
| II.2.1.1 - Efficacité .....   | 52        |
| II.2.1.2 - Spécificité.....   | 53        |
| II.2.2) Utilisation de deux endogènes pour l'analyse par RT-qPCR.....   | 54        |
| II.3) Quantification des transcrits du gène MECP2 par qPCR .....  | 54        |
| II.3.1) Etude du niveau de transcription du gène MECP2 chez des témoins normaux.....  | 54        |
| II.3.2) Etude du niveau de transcription du gène MECP2 chez des patientes Rett porteuses d'une mutation délétère du gène MECP2..... | 55        |

|  |           |
|--|-----------|
| II.3.3) Etude du niveau de transcription du gène MECP2 chez des patientes Rett sans mutation connue du gène MECP2 .....  | 56        |
| II.3.3.1) Quantification des transcrits MECP2_e1/e2 des ARN totaux extraits de sang frais .....  | 56        |
| II.3.3.2) Quantification des transcrits MECP2_e1/e2 et comparaison des niveaux de transcription du gène MECP2 sur des ARN totaux extraits de sang frais ou extraits de LB..... | 57        |
| <b>Discussion</b> .....  | <b>59</b> |
| I) Analyse du gène CDKL5 par QM-PSF .....  | 59        |
| II) Quantification relative des transcrits du gène MECP2.....  | 60        |
| <b>Conclusion</b> .....  | <b>64</b> |
| <b>Bibliographie</b> .....   | <b>65</b> |

## LISTE DES ABREVIATIONS

aa : acide aminé  
ADN : Acide DésoxyriboNucléique  
ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire  
ARN : Acide RiboNucléique  
ARNm : Acide RiboNucléique messenger  
*BDNF* : Brain-Derived Neurotrophic Factor  
BET : Bromure d'ETHidium  
*BRC1* : Breast Cancer 1  
*CDKL5* : Cyclin-Dependent Kinase-Like 5  
CSP : Codon Stop Prématgré  
Ct : Cycle threshold  
6-FAM : 6 carboxyfluorescéine  
*FXD 1* : FXD domain-containing transport regulator 1  
DGGE : Denaturation Gradient Gel Electrophoresis  
DHOS : Direction de l'Hospitalisation et de l'Organisation des Soins  
DHPLC : Denaturing High Performance Liquid Chromatography  
*DLX5* : Distal-Less homeobox 5  
*DMD* : Dystrophie Musculaire de Duchenne  
DMSO : DiMéthyl SulfOxyde  
*ESD* : esteraseD/formylglutathione hydrolase  
F : Forward  
LB : Lignée lymphoblastoïde  
MBD : Methyl Binding Domain  
*MECP2* : Methyl – CpG – Binding Protein 2  
MeCP2\_e1 (ou MeCP2B) et MeCP2\_e2 (ou MeCP2A) : isoformes protéiques de la protéine MeCP2  
MLPA : Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification  
NMD : nonsense-mediated mRNA decay  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
QMPSF : Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescent fragments  
qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction  
R : Reverse  
RGT : Réarrangement Génomique de grande Taille  
RT-PCR : Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction  
TBE : Tris Borate EDTA  
TRD : Transcriptional Repression Domain  
UA : Unité Arbitraire  
UTR : UnTranslated Region

# INTRODUCTION

## I) Le syndrome de Rett

Le syndrome de Rett (RTT, OMIM #312750) est une maladie génétique pan-éthnique de transmission dominante liée au chromosome X qui touche quasi exclusivement les filles. La description princeps est celle du professeur Andreas Rett, un neuropédiatre autrichien, en 1966 [1]. Le syndrome de Rett survient à une fréquence d'environ 1/10000-1/15000 naissances féminines, soit environ 40 à 60 nouveaux cas par an en France. Cette pathologie constitue ainsi la deuxième cause de retard mental chez les filles après la trisomie 21.

### I.1) Clinique

Le syndrome de Rett est une maladie neurologique dont les critères de diagnostic, pour une forme classique, sont les suivants :

- stéréotypies manuelles de torsion/pression,
- troubles de la communication et retrait social,
- troubles du langage,
- période pré- et périnatale normale et développement psychomoteur normal jusqu'à 6-15 mois,
- régression conduisant à un retard psychomoteur important,
- périmètre crânien normal à la naissance puis ralentissement de la croissance céphalique entre 6 mois et 4 ans,
- perte de l'utilisation volontaire des mains entre 6 et 30 mois,
- apparition d'une apraxie de la marche et d'une apraxie/ataxie du tronc entre 1 et 4 ans.

Il est bien entendu nécessaire d'éliminer toute autre cause possible (infection, traumatisme, désordre métabolique) à ce tableau neurologique, en particulier ante ou périnatale (souffrance cérébrale néonatale).

Ces signes sont évalués dans une fiche de renseignements cliniques permettant d'établir un score clinique.

## Fiche de renseignements cliniques <sup>(1)</sup>

### Syndrome de Rett

|  |                |                |
|--|----------------|----------------|
| Période anténatale et périnatale normale                       | <b>oui = 1</b> | <b>non</b>     |
| Périmètre crânien normal à la naissance                        | <b>oui = 1</b> | <b>non</b>     |
| Infléchissement de la croissance du PC                         | <b>oui = 1</b> | <b>non</b>     |
| Microcéphalie le jour de la demande                            | <b>oui</b>     | <b>non</b>     |
| Utilisation volontaire des mains                               |                |                |
| Jamais acquise   | <b>oui = 1</b> | <b>non</b>     |
| Acquise <u>puis perdue</u>                                     | <b>oui = 2</b> | <b>non</b>     |
| Présente le jour de la demande                                 | <b>oui</b>     | <b>non</b>     |
| Mouvements stéréotypés des mains                               | <b>oui = 1</b> | <b>non</b>     |
| Développement psychomoteur normal<br>Jusqu'à 6 mois            | <b>oui = 1</b> | <b>non</b>     |
| Retard sévère du développement psychomoteur <b>oui = 1</b>     | <b>non</b>     |                |
| Tenue assise acquise   | <b>oui</b>     | <b>non</b>     |
| Marche acquise   | <b>oui</b>     | <b>non = 1</b> |
| Trouble de la communication, traits autistiques <b>oui = 1</b> | <b>non</b>     |                |
| Développement du langage                                       |                |                |
| Jamais acquis  | <b>oui = 1</b> | <b>non</b>     |
| Acquis <u>puis perdu</u>                                       | <b>oui = 2</b> | <b>non</b>     |
| Epilepsie <sup>(2)</sup>                                       | <b>oui</b>     | <b>non</b>     |
| Sévérité    +            ++           +++                      |                |                |
| Age de la première crise convulsive :                          |                |                |
| Troubles respiratoires (apnées, hyperventilation) <b>oui</b>   | <b>non</b>     |                |
| Troubles vasomoteurs des extrémités                            | <b>oui</b>     | <b>non</b>     |
| Spasticité <b>oui</b>  | <b>non</b>     |                |
| Scoliose <b>oui</b>  | <b>non</b>     |                |

(1) Huppke et al. Indication for genetic testing: A checklist for Rett syndrome *J.Pediatr*( 2003) ; 142 :332-5

#### **Fig. 1: Fiche de renseignements cliniques**

Cette fiche permet de transcrire les éléments phénotypiques en score, guidant la stratégie diagnostique : l'étude de *MECP2* est réalisée pour toute patiente dont le score clinique est supérieur ou égal à 4. Un syndrome de Rett est considéré comme typique si le score est supérieur à 8. L'étude de *CDKL5* est réalisée s'il existe une épilepsie sévère et précoce (avant l'âge de 8 semaines).



## **I.2) Evolution du syndrome de Rett**

Le syndrome de Rett est caractérisé par un profil évolutif en quatre phases après un développement initial apparemment normal de 6 à 18 mois :

- stagnation du développement, d'apparition précoce, entre 6 et 36 mois,
- régression rapide entre 1 et 4 ans,
- stabilisation apparente des signes cliniques, entre 2 et 10 ans,
- évolution tardive après 10-15 ans.

## **I.3) Les variants du syndrome de Rett**

Il existe cinq formes cliniques variantes du syndrome de Rett :

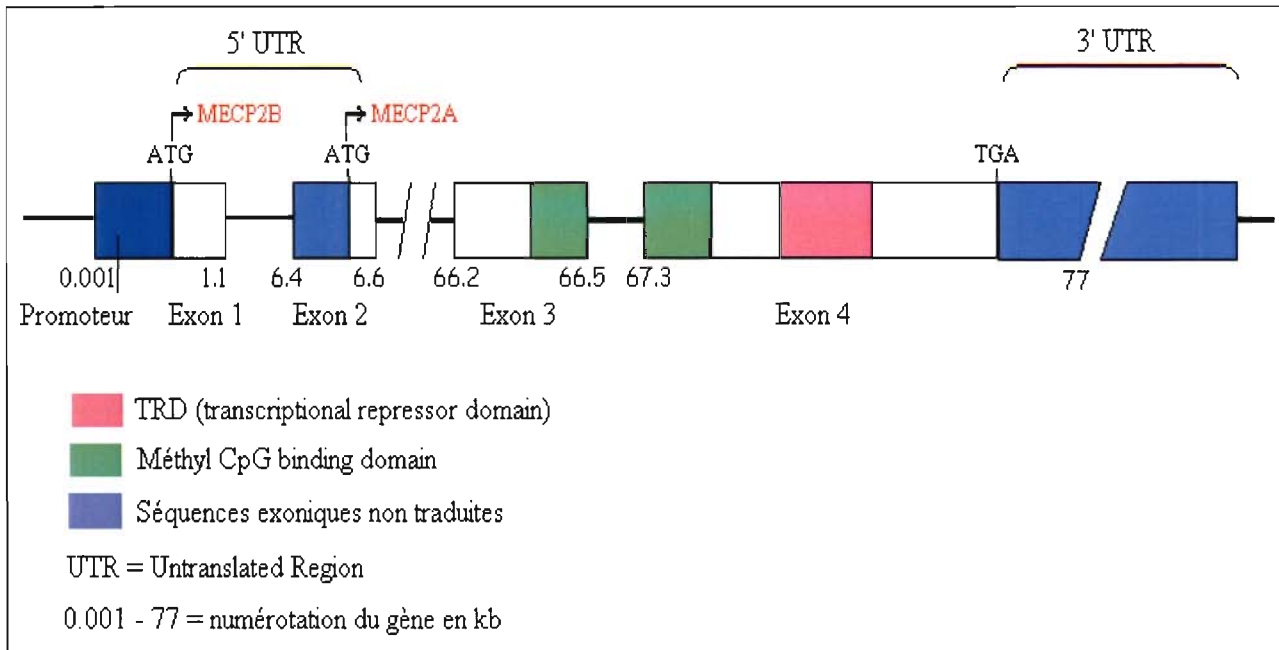
- régression psychomotrice plus précoce ou plus tardive (forme fruste),
- préservation du langage et de la communication,
- préservation de l'utilisation volontaire des mains,
- préservation du tonus postural voire de la marche avec croissance céphalique normale,
- épilepsie sévère précoce de caractère inaugural, aussi appelée forme variante Hanefeld [2].

## **I.4) Pathologie moléculaire du syndrome de Rett**

L'étiologie du syndrome de Rett est restée inconnue jusqu'en 1999. En effet, l'incertitude du diagnostic clinique couplée au petit nombre (<1%) et à la petite taille des fratries dans les cas familiaux a constitué un obstacle majeur à une localisation génétique précise du locus responsable du syndrome de Rett sur le chromosome X. Le gène *MECP2* (Methyl – CpG – Binding Protein 2) a été le premier à être impliqué dans cette maladie [3].

### I.4.1) MECP2

Responsable de 80% à 90% des formes typiques de syndrome de Rett, *MECP2* est localisé dans la région q28 du chromosome X [3] [4] [5]. Ce gène est constitué de 4 exons, un épissage alternatif génère deux isoformes protéiques : MeCP\_e1 (ou MeCP2B) de 498 aa, et MeCP2\_e2 (ou MeCP2A) de 486 aa [6].



**Fig. 2 : Structure génomique du gène *MECP2*.**

Un épissage alternatif génère deux transcrits :

- MECP2A (*MECP2\_e2*) comprenant les exons 1 à 4, avec utilisation du codon ATG de l'exon 2 pour la traduction,
- MECP2B (*MECP2\_e1*) comprenant les exons 1, 3,4 (saut de l'exon 2) avec utilisation du codon ATG de l'exon 1.

L'isoforme *MeCP2\_e1* est la protéine majoritaire dans le cerveau. Les protéines *MeCP2\_e1/e2* sont capables de se lier par leur domaine MBD (Methyl Binding Domain) à des dinucléotides 5'-CpG-3' méthylés pour ensuite recruter, grâce au TRD (Transcriptional Repression Domain), des co-répresseurs de la transcription (histones déacétylases, *sin3A* et complexe SWI/SNF) impliqués dans la compaction de l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) en hétérochromatine. Initialement, la protéine *MeCP2* était considérée comme un répresseur global de la transcription, des études récentes montrent qu'il s'agit plus probablement d'un répresseur fort de la transcription régulant spécifiquement l'expression d'un nombre limité de gènes dans les neurones post-mitotiques : *xHairy2a* chez le xénope, *Bdnf* (Brain-Derived Neurotrophic Factor) chez la souris et le rat, *DLX5* (Distal-Less homeoboX 5) et *FXYD1* (FXYD domain-containing transport regulator 1) [7] chez la souris et dans l'espèce humaine.

La protéine *MeCP2* joue un rôle dans la maturation des neurones post-mitotiques. Chez les malades comme chez les modèles murins *Mecp2* <sup>-/-</sup>, on observe une anomalie du développement (arbres dendritiques anormalement pauvres dans le cortex préfrontal, synaptogenèse anormale) et de la maturation (absence de différenciation) des neurones [8]. Par ailleurs, une surexpression (environ deux fois la quantité normale) de *Mecp2* est pathogène chez la souris, entraînant des anomalies neurologiques progressives, distinctes de celles observées chez les souris *Mecp2* <sup>-/-</sup>. Ceci suggère que des duplications complètes de *MECP2* (ou des mutations gain de fonction) pourraient expliquer certains troubles du comportement ou désordres neurologiques liés à l'X dans l'espèce humaine [9].

Le gène *MECP2* est caractérisé par une grande hétérogénéité allélique, en effet tous les types de mutations ont été décrits chez des filles atteintes du syndrome de Rett [10]. La grande

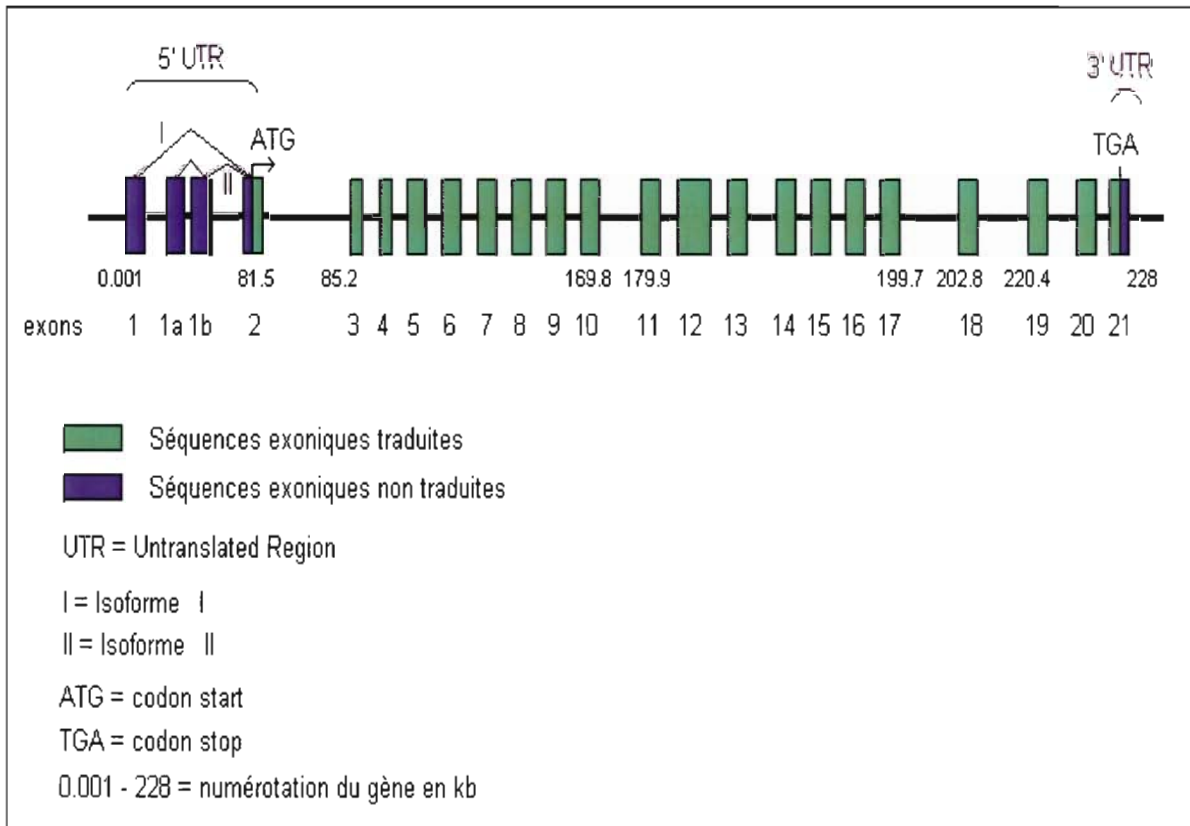
hétérogénéité des phénotypes cliniques associés aux mutations dans le gène *MECP2* s'explique en partie par le type de mutation (mutations non sens associées à un phénotype plus sévères que mutations faux-sens), par la localisation dans des domaines fonctionnels de la protéine (faux-sens dans le MBD plus sévère que dans le TRD), et par le profil d'inactivation du chromosome X porteur de l'allèle muté dans les tissus concernés (cerveau). Des mutations dans le gène *MECP2* ne sont pas uniquement rencontrées chez des patientes atteintes de syndrome de Rett, elles ont également été décrites associées à des phénotypes aussi divers que des encéphalopathies néonatales sévères chez les garçons, des retards mentaux liés à l'X non syndromiques, de rares cas d'autisme, et des syndromes d'Angelman-like [5].

Chez les patientes Rett, la grande majorité des mutations délétères (88,5 %) affecte l'exon 4, l'exon 3 est le siège d'environ 8% des allèles délétères alors qu'aucune altération n'affecte l'exon 2 de *MECP2*. En ce qui concerne l'exon 1, spécifique du transcrite *MECP2\_e1*, seules quelques mutations (0.5 à 1%) ont été décrites chez des filles présentant un syndrome de Rett [11]. Les mutations ponctuelles représentent la grande majorité des altérations de *MECP2*, 8 mutations ponctuelles (correspondant à des transitions C>T aux niveaux de dinucléotides CpG) ont une fréquence relative supérieure à 3% : c.502C>T (p.Arg168X), c.808C>T (p.Arg270X), c.473C>T (p.Thr158Met), c.763C>T (p.Arg255X), c.916C>T (p.Arg306Cys), c.880C>T (p.Arg294X), c.397C>T (p.Arg133Cys), c.316C>T (p.Arg106Trp). Ces 8 mutations représentent 58,5% de l'ensemble des allèles délétères. 12% des allèles pathologiques sont des délétions de 20 à 500 bases affectant l'extrémité 3' (deletion prone region) du gène *MECP2*. Enfin, des grands réarrangements du gène *MECP2* touchant un ou plusieurs exons correspondent au moins à 5% des allèles délétères [12] [13].

Les grands réarrangements ne sont pas détectés par des méthodes classiques de criblage (DHPLC pour Denaturing High Performance Liquid Chromatography, DGGE pour Denaturation Gradient Gel Electrophoresis, séquençage) et nécessitent donc la mise en œuvre d'une méthode d'analyse quantitative du gène *MECP2* (QMPSF pour Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescent fragments) au niveau génomique. La QMPSF est une technique permettant de déterminer le nombre de copie(s) d'un amplicon (un exon par exemple), cette approche a été initialement mise au point pour la recherche de grands réarrangements dans *BRCA1* (Breast Cancer 1) chez des femmes avec une prédisposition héréditaire aux cancers du sein et de l'ovaire [14]. Cette nouvelle approche a été développée spécifiquement pour le gène *MECP2* au laboratoire de génétique du CHU de Nancy, pouvant ainsi être appliquée en routine pour la recherche de grands réarrangements dès 2003. Dans notre cohorte de 155 patientes porteuses du syndrome de Rett avec une mutation délétère affectant *MECP2*, les grandes altérations détectables uniquement par QMPSF représentent 10.4 % des allèles délétères [10] [11] (et données non publiées).

#### I.4.2) CDKL5

Selon les études, des mutations délétères dans le gène *MECP2* sont retrouvées chez 80 à 95% des patientes Rett avec une forme typique et chez seulement 40 à 60% des formes variantes de Rett [5]. De nombreuses études menées avant et après l'implication de *MECP2* dans le syndrome de Rett ont évalué un grand nombre de gènes candidats fonctionnels ou positionnels pour cette pathologie, l'ensemble de ces gènes a été écarté faute de mutations délétères chez des patientes Rett. Récemment, le gène *CDKL5* (Cyclin-Dependent Kinase-Like 5) localisé en Xp22 a été impliqué dans des formes de spasmes infantiles syndromiques liés à l'X (ISSX ou syndrome de West) [15].



**Fig. 3 : Structure génomique du gène *CDKL5*.**

Un épissage alternatif génère deux transcrits : le transcrit I comprend l'exon 1 non codant et les exons 2 à 21, le transcrit II ne comprend pas l'exon 1, et comprend les exons 1A et 1B non codants et les exons 2 à 21.

Des mutations dans *CDKL5* ont été rapportées dans des formes atypiques rares de syndrome de Rett (dites forme Hanefeld), caractérisées par des convulsions précoces (apparaissant avant l'âge de 2 mois), le plus souvent de type spasme infantile [16] [17] [5].

Le criblage mutationnel du gène *CDKL5* par séquençage systématique est réalisé depuis 2005 au laboratoire de génétique de Nancy. L'analyse d'une première série de 40 patientes présentant un syndrome de Rett variant avec épilepsie de caractère inaugural a permis d'identifier deux mutations délétères (c.1311dupC et c.119C>T) chez trois patientes, confirmant ainsi l'implication de *CDKL5* dans l'étiologie du syndrome de Rett [18].

Récemment, trois remaniements génomiques de très grande taille (2,8 à 21 Mb) englobant *CDKL5* et des gènes contigus ont été rapportés [19] [20] et communication personnelle. Une délétion de 2,8 Mb en Xp22 est décrite chez un garçon, présentant une encéphalopathie sévère, une tétralogie de Fallot et une cataracte bilatérale congénitale [20]. Dans une autre publication, une famille comprenant plusieurs membres atteints a été étudiée, tous présentent un phénotype commun (hernie inguinale bilatérale dans l'enfance, dysmorphie, retard mental, et épilepsie à début anténatal pour l'un d'entre eux, cataracte unilatérale pour un autre), et sont porteurs d'une duplication de 8,5 Mb (communication personnelle). Plus récemment, une autre équipe a décrit une duplication de très grande taille (21 Mb) en Xpter comprenant le gène *CDKL5* (et

les gènes *NLGN4X* et *RPS6KA3*), chez un garçon présentant une dysmorphie, une hypotonie généralisée et un déficit des acquisitions psychomotrices (il n'y a pas de notion d'épilepsie pour ce cas mais le suivi clinique n'a pas pu être poursuivi par l'équipe)[19]. Ces phénotypes sont distincts de ceux observés en association avec une mutation ponctuelle de *CDKL5*, puisqu'il s'agit d'une duplication de *CDKL5*, augmentant donc la quantité de protéine, et aussi en raison des nombreux autres gènes impliqués dans ces remaniements de très grande taille.

Actuellement aucun remaniement partiel de *CDKL5* n'a été décrit, probablement car les approches développées jusqu'alors sont soit de type CGH (Comparative Genomic Hybridation) array, de résolution insuffisante pour ce type d'anomalie, soit de type séquençage.

## II) Hypothèse de travail

Le diagnostic moléculaire du syndrome de Rett est réalisé à Nancy depuis le début de l'année 2000, date à laquelle le gène *MECP2* a été impliqué dans cette pathologie neurologique [3]. Le laboratoire fait partie du réseau national « Retard Mental » comme laboratoire de référence pour le diagnostic moléculaire du syndrome de Rett, et est financé spécifiquement pour cette pathologie par la DHOS (Direction de l'Hospitalisation et de l'Organisation des Soins). Plus de 500 cas ont ainsi déjà été étudiés, dont environ 150 patientes présentant un syndrome de Rett typique. Malgré une stratégie de criblage mutationnel diversifiée comprenant un séquençage des exons et des bordures exon-intron des gènes *MECP2* et *CDKL5* ainsi que la recherche de grands réarrangements dans *MECP2* par QMPSF, l'étiologie génétique reste encore inconnue pour au moins 10% des cas de Rett typiques mais également pour une proportion beaucoup plus importante de Rett variants.

Il est probable que certaines mutations échappent encore à la stratégie actuelle de diagnostic moléculaire du laboratoire pour le syndrome de Rett. Il est donc nécessaire de développer des analyses complémentaires des gènes *MECP2* et *CDKL5* afin d'augmenter la sensibilité du diagnostic moléculaire devant une suspicion clinique de syndrome de Rett.

### II.1) Recherche de grands réarrangements génomiques affectant le locus *CDKL5*

Un premier criblage mutationnel par séquençage systématique de la totalité de la séquence codante chez 40 patientes a permis d'identifier une mutation ponctuelle délétère dans le gène *CDKL5* chez trois patientes présentant un syndrome de Rett avec épilepsie précoce [18]. Depuis, une trentaine de mutations délétères (toutes ponctuelles) ont été décrites dans la littérature : mutations non-sens, délétions ou duplications de quelques nucléotides entraînant un décalage du cadre de lecture, mutations affectant un site donneur ou accepteur d'épissage, mutations faux-sens dans la séquence correspondant au domaine Ser/Thr (Serine/Threonine) kinase. Selon les maladies génétiques, les RGT correspondent à une proportion plus ou moins importante des allèles pathologiques (jusqu'à 2/3 des cas pour le gène *DMD* (Dystrophie Musculaire de Duchenne) responsable des myopathies de Duchenne/Becker [21]. Il est probable qu'une proportion des allèles délétères du gène *CDKL5* soit également constituée de RGT détectables uniquement par une méthode de PCR quantitative sur ADN génomique.

## II.2) Quantification de l'expression de MECP2

Des altérations touchant des séquences régulatrices de la transcription telles que le promoteur ou les enhancers peuvent entraîner une haploinsuffisance par non transcription d'un des deux allèles. Des altérations diminuant la stabilité du messager (région 3' UTR, UnTranslated Region) peuvent également faire chuter la quantité d'ARNm (Acide RiboNucléique messenger) pour les transcrits *MeCP2\_e1/e2* et donc entraîner l'apparition d'un syndrome de Rett. La détection indirecte de ces anomalies nécessite **la mise en place d'une méthode de quantification des ARNm de MECP2** chez les patientes avec un syndrome de Rett typique sans altération de *MECP2* (et de *CDKL5* dans les formes avec épilepsie précoce).

## III) Objectifs des travaux de thèse

Mon travail a consisté en la mise en place de deux approches nouvelles pour la recherche d'allèles délétères dans les gènes *MECP2* et *CDKL5* chez des patientes avec un syndrome de Rett.

Le premier objectif est de développer un protocole de QMPSF permettant la détection de RGT touchant le locus *CDKL5*.

Le second objectif est de mettre en place une méthode de quantification relative des transcrits de *MECP2* par PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel à l'aide du SYBR® Green (SYBR Green) après normalisation avec deux endogènes [22].

La mise en place de nouvelles techniques d'analyse au niveau du génome (QMPSF pour *CDKL5*) et du transcriptome (transcription inverse [RT] et PCR quantitative [qPCR] en temps réel pour *MECP2*) devrait permettre d'augmenter la sensibilité de la stratégie de diagnostic moléculaire pour le syndrome de Rett dans ses formes typique et variante.

# MATERIEL ET METHODES

## I) Patientes

### I.1) Choix des patientes

Ces études entrent toutes deux dans le cadre du consentement initial donné par le représentant légal de la patiente puisqu'elles peuvent éventuellement aboutir à la définition étiologique de leur pathologie. Il n'était donc pas justifié de demander un nouveau consentement puisque l'objet de l'étude génétique restait le même (loi de bioéthique de juillet 1994).

#### I.1.1) Protocole QMPSF pour le gène CDKL5

Pour la mise au point de ce protocole de PCR semi-quantitative, nous avons sélectionné les patientes présentant un syndrome de Rett atypique (forme avec épilepsie inaugurale sévère précoce) qui, après criblage des gènes *MECP2* et *CDKL5* par la stratégie classique de diagnostic moléculaire réalisée par le laboratoire de génétique du CHU de Nancy, ne présentaient pas de mutations délétères dans ces deux gènes.

#### I.1.2) Protocole de quantification des transcrits de MECP2

Les patientes choisies comme témoins mutés sont porteuses de mutations connues du gène *MECP2* :

- affectant a priori la quantité de transcrits : grands réarrangements, codon stop prématuré (en relation avec le système de surveillance des ARNm, NMD),
- n'affectant pas a priori la quantité de transcrits : faux-sens, codon stop dans l'exon 4 du gène *MECP2*.

Les patientes à tester ont un phénotype Rett typique sans mutation délétère de *MECP2* ou de *CDKL5* mise en évidence par la stratégie actuelle de diagnostic moléculaire.

## II) Extraction des acides nucléiques

### II.1) Extraction de l'ADN génomique total

L'ADN a été extrait à partir du prélèvement sanguin sur EDTA avec les kits 8Lx Magtration® Genomic DNA (PSS) ou NucleonBACC3® (Amersham) selon les recommandations du fabricant. Le kit 8Lx Magtration® Genomic DNA (PSS) a été utilisé avec l'automate 8Lx BG20 Magtration® Genomic DNA, l'extraction a été réalisée grâce à des billes magnétiques. L'ADN extrait a été restitué dans un volume 1,4 mL de tampon d'élution. Le kit

NucleonBACC3® comprend une résine cationique colorée qui permet de fixer l'ADN de façon non covalente après une lyse des cellules et une déprotéinisation. L'ADN a ensuite été précipité par l'éthanol et suspendu de nouveau dans du tampon TE 10 :0.1 pH 8 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0.1mM pH8) dans un volume variant entre 50 et 250 µL. L'extraction de l'ADN de lymphoblastes (10 à 40.10<sup>6</sup> cellules) a été effectuée à l'aide du kit NucleonBACC3® selon le même protocole.

## **II.2) Extraction des ARN totaux**

La technique d'extraction des ARN totaux dépend du type de tube employé lors du prélèvement : extraction à l'aide de la solution TRIZOL® (TRIZOL Reagent, Invitrogen) sur un tube contenant de l'EDTA, extraction par le kit PAXgen™ Blood RNA kit (PreAnalytix) sur un tube PAXgene. Nous avons également extrait des ARN totaux à partir des lignées lymphoblastoïdes. Des lignées lymphoblastoïdes continues ont été établies à partir d'un prélèvement sanguin conditionné en tube contenant un anticoagulant, l'héparine-lithium. Les lymphocytes B ont été transformés en cellules lymphoblastoïdes sous l'action du virus Epstein-Barr [23]. La solution TRIZOL® a aussi été utilisée pour extraire l'ARN total à partir de 10 à 40.10<sup>6</sup> lymphoblastes.

## **II.3) Dosage par spectrophotométrie**

Le dosage de l'ADN a été réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre (NanoDrop ND-1000®) par mesure de la densité optique (DO) à 260 nm. Pour détecter une éventuelle contamination protéique, nous avons effectué une seconde mesure à 280 nm. Le rapport DO à 260nm comparé à DO à 280 nm doit être compris entre 1.7 et 2. Pour un rapport inférieur à 1.7, il existe une contamination protéique importante nécessitant une seconde extraction, de manière à supprimer cette contamination. Un rapport supérieur à 2 témoigne de la présence d'une quantité importante d'ARN pouvant être éliminé par un traitement à la ribonucléase A.

La concentration de l'ARN a été déterminée de la même manière : le rapport de DO à 260 nm comparé à DO à 280 nm doit être compris entre 1.6 et 1.9. Si le rapport est inférieur à 1.6, cela signifie qu'il y a une contamination de nature protéique. S'il est supérieur à 2.1, il signe un ARN dégradé.

## **II.4) Contrôle qualitatif des acides nucléiques**

La qualité des ADN a été évaluée par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8% dans du tampon TBE (Tris Borate 0.09 M, EDTA 0.002 M) 1X en présence de BET (bromure d'éthidium), à raison de 0,5mg/ml de gel. La séparation a été effectuée à 8V/cm, pendant 45 min. La révélation de l'ADN a été obtenue à l'aide du BET sur une table à UV. L'ADN non dégradé migre au même niveau que la bande 23 kb du marqueur de taille λ/Hind III en l'absence de smear.

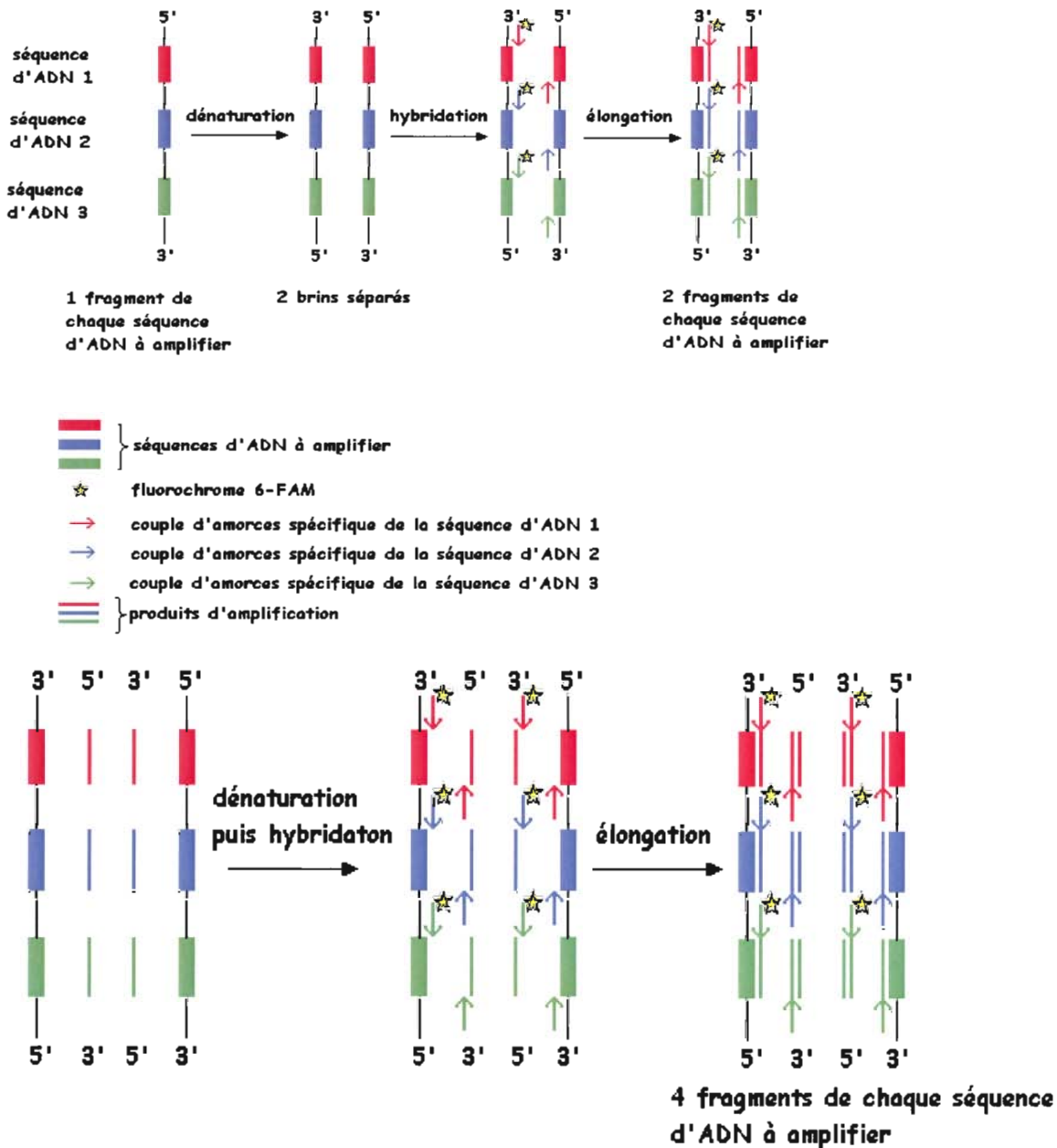
La qualité des ARN a été évaluée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,2% dans du tampon TBE 1X en présence de BET (0,5mg/ml de gel). La séparation a été effectuée à 6V/cm pendant 120 min. L'ARN est de bonne qualité si on observe 2 bandes distinctes ( l'une correspondant à l'ARN ribosomal 28 S deux fois plus intense que l'autre, correspondant à l'ARN ribosomal 18 S).



### III) Analyse du gène CDKL5 par QMPSF

La QMPSF permet la détection des RGT au sein d'un gène. La première étape est une PCR multiplex, et la seconde consiste en une analyse de fragments semi-quantitative. La PCR multiplex permet l'amplification conjointe de plusieurs régions génomiques d'intérêt (dans notre exemple, des exons) et d'un amplicon témoin dans un même tube.

Les produits de PCR sont séparés par électrophorèse capillaire. L'analyse des électrophorégrammes est semi-quantitative puisque la quantité des amplicons d'intérêt est évaluée par comparaison avec celle des amplicons correspondants chez un témoin normal (après ajustement des aires des pics de l'amplicon témoin interne de la patiente et du témoin normal).



**Fig. 4 : Principe de la PCR multiplex**

Dans cet exemple, 3 exons sont co-amplifiés (en haut 1er cycle de PCR, en bas 2nd cycle de PCR). 23 cycles de PCR sont réalisés pour rester dans la phase exponentielle d'amplification. Les amplicons ont des tailles différentes mais sont marqués par le même fluorochrome (6-FAM).

### III.1) Amorces utilisées pour les PCR multiplex

Les amorces sens (F pour Forward) ont été marquées en 5' par le fluorophore 6-carboxyfluorescein (6-FAM), les amorces antisens (R pour reverse) ne l'ont pas été. On leur a ajouté une rallonge de 10 pb : deux séquences ont été utilisées, l'une pour toutes les amorces F (5'-CGTTAGATAG-3'), l'autre pour toutes les séquences R (5'-GATAGGGTTA-3'), afin d'uniformiser les températures de fusion ( $T_m$ ). Nous avons choisi des couples grâce au logiciel DSI\_PCRbase sur le site de l'Université René Descartes, Paris Vème (<http://www.dsi.univ-paris5.fr/bio2/Oligo2lib.html>), de manière à amplifier chaque exon de *CDKL5*. Leurs séquences et leurs conditions d'utilisation dans ce protocole sont précisées dans le tableau I. Pour chaque exon de *CDKL5*, les couples d'amorces ont été testés en PCR simplex. Le contrôle de la quantité et de la spécificité des amplicons obtenus a été réalisé par électrophorèse sur gel d'agarose 2% (résultats non présentés).

| Mélange    | Gène                           | Exon | Orientation (5' -> 3')          |                                 | taille (pb)<br>amplicon        | concentration<br>( $\mu$ M)<br>finale |
|------------|--------------------------------|------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|
|            |                                |      | séquence sens F                 | séquence anti-sens R            |                                |                                       |
| 1          | CDKL5                          | 2    | CGTTAGATAGAAAGTCCACCAACCAGTG    | GATAGGGTTAACCTTCACCTACAACCCCAA  | 211                            | 0,4                                   |
|            |                                | 3    | CGTTAGATAGGCGTGCCCTTGATTGTTTAC  | GATAGGGTTAGTACATGCCACACGCAAAG   | 177                            | 0,4                                   |
|            |                                | 8    | CGTTAGATAGCCCATGCGAGAACAGTCATT  | GATAGGGTTAGTAAGAGTCTCTGGGACCGA  | 235                            | 0,56                                  |
|            |                                | 11   | CGTTAGATAGGAATTTACTGAAGTTGGACC  | GATAGGGTTATTGTAAGACCAACACTGCAT  | 221                            | 0,4                                   |
|            |                                | 12B  | CGTTAGATAGGCCAAAAGAAGCCAAGTCA   | GATAGGGTTAAGGTTGCTCACAGACTTGA   | 303                            | 0,4                                   |
|            |                                | 14   | CGTTAGATAGGGGCGAGTCAAGGCTACAGTA | GATAGGGTTAAAAGCTACCAACTCTCCTTG  | 265                            | 0,4                                   |
|            |                                | 20   | CGTTAGATAGCACTGTCACCTTGCTTCAG   | GATAGGGTACTAGAGTCTCTGCTTACCGG   | 311                            | 0,32                                  |
|            |                                | 21   | CGTTAGATAGGCTCAACGGTGAAGAGACA   | GATAGGGTACTCATGGTATGTCAGGAGCG   | 285                            | 0,4                                   |
| 3          | CDKL5                          | 1    | CGTTAGATAGGGGGCAGTTAGCAAAATAGGC | GATAGGGTTACGATGTAAGGGTAAGAAGGC  | 223                            | 0,4                                   |
|            |                                | 1AB  | CGTTAGATAGAGCTCTGAGTGAGTGGGGTG  | GATAGGGTTACGAAACTCCGCCTCAAAACA  | 344                            | 0,64                                  |
|            |                                | 7    | CGTTAGATAGCACTCCAGATATAAAACCAG  | GATAGGGTTAAAAGAATGTTCTCTACCAA   | 214                            | 0,8                                   |
|            |                                | 10   | CGTTAGATAGTCCCTTCTGCAACACTCACA  | GATAGGGTTAAGCAGGCTATGGTCACATG   | 265                            | 0,4                                   |
|            |                                | 15   | CGTTAGATAGTTCAGTGCCATCTCCACGTC  | GATAGGGTTAAGGACACTAAAAGCTCATCC  | 238                            | 0,32                                  |
|            |                                | 16   | CGTTAGATAGTAGGAACCTAGTGTATGCA   | GATAGGGTTAGCCAAGTGCAAAGTGTAAAG  | 298                            | 0,64                                  |
|            |                                | 18   | CGTTAGATAGCTTTCTTTCAGAGCCAGCCA  | GATAGGGTTAGCTGTTCCAGAGTAGGAAGGG | 320                            | 0,4                                   |
|            |                                | 2    | CDKL5                           | 4                               | CGTTAGATAGAGAATATACCCCCAGGCAAC | GATAGGGTTACCCACTTCTTCCACACTCTA        |
| 5          | CGTTAGATAGAAGCAGAAGGTGAAATTGGG |      |                                 | GATAGGGTTAAAAGAATCGGGCAAATGTGC  | 301                            | 0,24                                  |
| 6          | CGTTAGATAGTACGGGCTACCTAATTTGG  |      |                                 | GATAGGGTTAATCTCATACTCACCTCGATG  | 201                            | 0,24                                  |
| 9          | CGTTAGATAGGCGCTCCCTATGAAAAGTCC |      |                                 | GATAGGGTTACAGCAAACCTTTACCCGG    | 228                            | 0,24                                  |
| 13         | CGTTAGATAGGCTGGTTATGGTCTAGTTC  |      |                                 | GATAGGGTACTTATTTGTGGGAGACTGGG   | 312                            | 0,24                                  |
| 17         | CGTTAGATAGTAGGCTTCTCAGTGTGCTTA |      |                                 | GATAGGGTTAGAGGCTAAGTTTTCTTAGC   | 279                            | 0,24                                  |
| 19         | CGTTAGATAGACTCTGGTCAATGGGATGTG |      |                                 | GATAGGGTTATTTAGTAGTCTAGGGTGGT   | 268                            | (a)                                   |
| 1, 2, et 3 | MECP2                          |      |                                 | 4                               | CGTTAGATAGGAAAAGGTAGGCGACACATC | GATAGGGTTATTTCCAGGACTTTTCTCCAG        |

**Tableau I : Amorces utilisées pour les trois PCR multiplex du gène *CDKL5*.**

Séquences des couples d'amorces correspondants à chaque exon de *CDKL5* et à l'amplicon contrôle (exon 4 de *MECP2*), avec la taille attendue des amplicons et la concentration finale de chaque couple d'amorces dans le mélange réactionnel.

(a) : l'exon 19 ne fait partie d'aucun mélange à ce stade de l'étude

(b) : le couple d'amorces pour l'exon 4 de *MECP2* est ajouté à 0.4  $\mu$ M (PCR multiplex 1 et 2) et 0.24  $\mu$ M (PCR multiplex 3).

### III.2) PCR multiplexes semi quantitatives

Les amplicons ont été répartis en trois mélanges.

La composition de chaque mélange réactionnel dans un volume final de 25 µL était la suivante:

- 150 ng d'ADN génomique total
- Tampon Thermoprime 1X
- MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM
- dNTP 0,1mM
- mélange d'amorces F et R (tableau I)
- 2,5 U d'enzyme Taq Thermoprime.
- DMSO (DiMéthyl SulfOxyde) 5% uniquement pour le mélange 3.

Le programme utilisé pour la PCR était le suivant : dénaturation initiale pendant 5 min à 95°C, 23 cycles de PCR : dénaturation 30 sec à 95°C, hybridation 30 sec à 58°C pour le mélange 1 et 56°C pour les mélanges 2 et 3, extension 30 sec à 72°C puis extension finale pendant 7 min à 72°C.

### III.3) Contrôle des produits de PCR multiplex

Ce contrôle a été réalisé par électrophorèse sur gel d'agarose à 3% dans du tampon TBE 1X, sur 10µL d'amplifiat. La séparation a été effectuée à 9V/cm pendant 45 min. La sensibilité importante du système de détection des produits de PCR marqués par un fluorochrome (laser/caméra CDD) a rendu cette étape nécessaire pour évaluer le facteur de dilution des produits de PCR à tester, et ainsi éviter toute saturation des signaux rendant l'analyse quantitative impossible après électrophorèse capillaire.

### III.4) Séparation des produits de PCR par électrophorèse capillaire

1 µL de produits de PCR purs ou dilués (au ½ ou 1/5) a été mélangé avec 12 µL de formamide déionisée et 0,5µL de marqueur de taille (Rox 400 HD®, Applied Biosystems). Le mélange a été dénaturé 2 min à 95°C avant d'être séparé par électrophorèse capillaire sur l'analyseur génétique ABI 3130 (Applied Biosystems). L'intensité de la fluorescence émise est proportionnelle à la quantité de produits de PCR, elle-même proportionnelle à la quantité de cibles dans l'ADN génomique à tester.

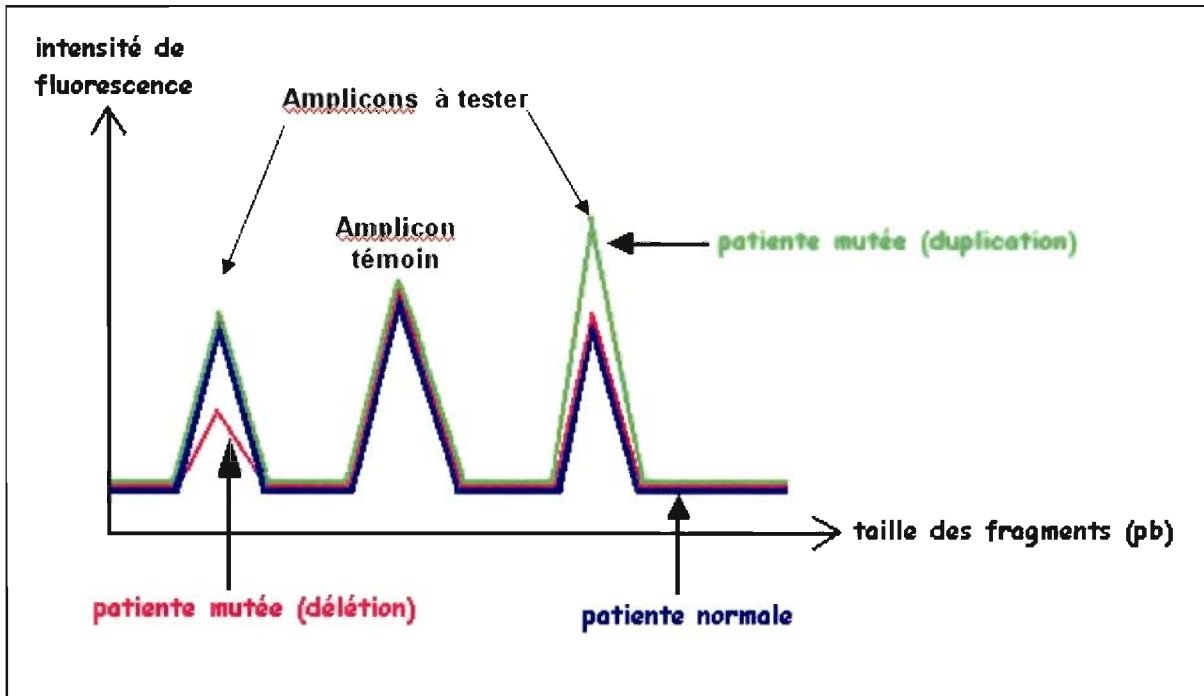
### III.5) Analyse des données

L'analyse des tailles et des aires des pics a été effectuée à l'aide des logiciels Genescan Analysis v 3.7® et Genemapper v 4.0®. L'amplicon contrôle (exon 4 du gène *MECP2*) ainsi qu'un témoin ADN génomique (femme normale) amplifié dans chaque série, ont été utilisés afin de mettre en évidence d'éventuels RGT. Ainsi, les aires des pics correspondants à chaque amplicon de *CDKL5* ont été comparées à celle de l'amplicon contrôle par le calcul des ratios, ceci a été réalisé pour l'ADN à étudier et pour le témoin normal.

D'où les calculs suivants :

- Pour l'ADN à étudier : aire du pic étudié (Pi)/aire du pic du témoin interne (Pr)
- Pour le témoin normal : aire du pic étudié (Ci)/aire du pic du témoin interne (Cr)

Puis, les deux rapports obtenus ont été comparés entre eux selon le calcul du ratio  $(P_i/P_r)/(C_i/C_r)$ . En l'absence de RGT, le ratio était compris entre 0.8 et 1.2. Un ratio proche de 0.5 faisait suspecter une délétion, un ratio proche de 1.5 évoquait une duplication.



**Fig. 5 : Mise en évidence de RGT par QMPSF**

Dans cet exemple théorique, les premier et troisième pics correspondent aux amplicons (exons de *CDKL5* dans notre cas) à quantifier.

Le second pic correspond au témoin interne permettant la normalisation des hauteurs des pics pour un même amplicon entre la patiente et le témoin normal (exon 4 de *MECP2*).

La superposition des 3 électrophorégrammes met en évidence une délétion à l'état hétérozygote du premier amplicon (profil rouge) et une duplication à l'état hétérozygote du troisième amplicon (profil vert)

Tout RGT détecté par ce protocole de QMPSF a été étudié par une technique de quantification génomique alternative, la MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification). Cette technique a été réalisée après notre travail, au laboratoire de génétique du CHU de Nancy, à l'aide du kit SALSA MLPA kit P189 *CDKL5*®, conformément aux recommandations du fournisseur (MRC-Holland).

## IV) Quantification relative des transcrits du gène *MECP2*

L'étude quantitative de l'expression de *MECP2* est possible à partir des ARN totaux rétrotranscrits en ADNc (Acide DésoxyriboNucléique complémentaire). Le SYBR Green est une molécule qui a la propriété de s'intercaler entre les paires de bases d'un ADN double brin et de devenir fluorescente une fois intercalée. La quantification des ADNc d'intérêt est réalisable par PCR en temps réel, à l'aide du SYBR Green, grâce à une technologie permettant la mesure de la fluorescence émise par les produits de PCR à chaque cycle (en fin d'élongation) de PCR. La PCR en temps réel à partir d'ADNc permet la quantification d'un transcrite cible (ici *MECP2\_e1* et *MECP2\_e2*) dans un échantillon grâce à la mesure des Ct (Cycle threshold), qui sont inversement proportionnels à la quantité initiale de cibles présentes dans cet échantillon. Nous avons opté pour une quantification relative en utilisant un standard interne ou endogène (gènes *ESD* [esterase D/*formylglutathione hydrolase*] ou  $\beta$  *actine*).

### IV.1) Réaction de transcription inverse

La transcription inverse a été réalisée en deux étapes à partir d'1 µg d'ARN totaux extraits de sang frais ou de LB à l'aide du kit Reverse transcriptase Superscript® II (Invitrogen) contenant l'enzyme SuperScript® II RT-PCR (de type MMLV : Moloney Murine Leukemia Virus) selon le protocole du fabricant.

### IV.2) PCR quantitative

#### IV.2.1) Amorces utilisées pour la qPCR

| Transcrit             | Orientation<br>séquence sens F | Exon | Orientation<br>séquence anti-sens R | Exon         |
|-----------------------|--------------------------------|------|-------------------------------------|--------------|
| <i>MECP2_e2</i>       | GAC CAG CTC CAA CAG GAT TC     | 2    | GAG GTC CTG GTC TTC TGA CTT TTC     | 3            |
| <i>MECP2_e1</i>       | CGC CGA GCG GAG GA             | 1    | TGG TCT TCT GAC TTT TCT TCC AGT     | jonction 1-3 |
| $\beta$ <i>actine</i> | CAC CCT GAA GTA CCC CAT CG     | 2    | TGC CAG ATT TTC TCC ATG TCG         | 2            |
| <i>ESD</i>            | CGG CGG CCA TCT TGA G          | 1    | ATT CTA CGG TGG CGG AGT GA          | jonction 1-2 |

#### **Tableau II : Amorces utilisées pour le protocole de qPCR des transcrits de *MECP2*.**

Séquences des couples d'amorces pour l'amplification des transcrits de *MECP2*, et des transcrits des endogènes *ESD* et  $\beta$  *actine*, ainsi que leur position au niveau exonique.

A partir des ADNc totaux, quatre ADNc d'intérêt ont été quantifiés : ADNc cibles du gène *MECP2* (soit deux transcrits *MECP2\_e1* et *MECP2\_e2*) et ADNc des deux gènes de référence *ESD* et  $\beta$  *actine*. Ces quatre amplifications spécifiques ont été réalisées avec les couples d'amorces suivants : *MECP2*-« 2F » et *MECP2*-« 3R » pour *MECP2\_e2*, *MECP2*-« 1F » et *MECP2*-« 1-3R » (à la jonction des exons 1 et 3, caractéristique de ce transcrite) pour *MECP2\_e1*, *ESD*-F (dans l'exon 1) et R (à la jonction des exons 1 et 2) pour *ESD*,  $\beta$  *actine*-F et R (dans l'exon 2) pour  $\beta$  *actine*. Ces amorces ont été choisies à l'aide du logiciel Primer Express® (Applied Biosystems), de manière à générer des amplicons de taille compatibles avec la technologie de qPCR, tout en évitant la formation de dimères d'amorces.

#### IV.2.2) Contrôle de l'efficacité et de la spécificité de la PCR

Pour pouvoir réaliser une quantification relative basée sur la méthode d'analyse des  $\Delta\Delta Ct$  [24], il est nécessaire de contrôler au préalable l'efficacité et la spécificité des différentes PCR pour les transcrits cibles et les transcrits des endogènes, en réalisant une plaque d'efficacité pour construire une courbe d'étalonnage à l'aide de cinq dilutions en série. Nous avons utilisé les conditions de PCR suivantes, dans un volume final de 25  $\mu L$  : 5  $\mu L$  d'ADNc totaux purs ou dilués, 0,4  $\mu M$  du couple d'amorces spécifique du transcrit à amplifier, 12,5  $\mu L$  de solution *Power MasterMix SYBR Green* contenant l'enzyme *AmpliTaq Gold® DNA Polymerase LD* (Applied Biosystems). La quantité d'ADNc apportée variait selon une dilution en série de manière à obtenir 5 quantités différentes, correspondant à 125 ng, 12,5 ng, 1,25 ng, 0,25 ng, et 0,125 ng d'ARN totaux rétrotranscrits. Après une activation enzymatique de 10 min à 50°C et une dénaturation de 10 min à 95°C, 40 cycles ont été réalisés comprenant chacun 15 sec à 95°C et 1min à 60°C. Le couple d'amorce choisi pour chaque transcrit doit être spécifique, c'est-à-dire que lors de la PCR seul le transcrit d'intérêt doit être amplifié. Pour vérifier ce paramètre nous avons réalisé une étape de dissociation à la fin de la PCR (15 sec à 95°C, refroidissement rapide jusqu'à 60°C, puis ascension progressive lente de la température jusqu'à 95°C), permettant d'obtenir une courbe de fusion du/des produit(s) de PCR. Cette courbe correspond à la dérivée de l'équation  $y = f(x)$ , où  $y$  est la quantité de fluorescence émise par le SYBR Green et  $x$  la température des produits de PCR analysés. L'amplification est spécifique si cette courbe ne comporte qu'un seul pic. La température pour laquelle la valeur  $-d(\text{Fluorescence})/dT$  s'annule correspond au  $T_m$  de l'amplicon.

#### IV.2.3) PCR quantitative

Nous avons utilisé les conditions de PCR suivantes, dans un volume final de 25  $\mu L$  : 5  $\mu L$  d'ADNc totaux (correspondant à 12,5 ng d'ARN totaux rétrotranscrits), 0,4  $\mu M$  du couple d'amorces spécifique du transcrit à amplifier, 12,5  $\mu L$  de solution *Power MasterMix SYBR Green* (Applied Biosystems). Pour chaque transcrit et chaque échantillon, la PCR a été réalisée simultanément trois fois. Après une activation enzymatique de 10 min à 50°C et une dénaturation de 5 min à 95°C, 40 cycles ont été réalisés comprenant chacun 15 sec à 95°C et 1min à 60°C. L'analyse des résultats a été effectuée avec le logiciel 7500 Fast System v1.3.1 (Applied Biosystems). Tout d'abord nous avons vérifié l'homogénéité des courbes de PCR pour un même échantillon et un même transcrit (puisque la réaction est réalisée en triplicat) pour valider les données d'analyse. Ensuite nous avons choisi les paramètres d'analyse : choix de l'ADNc désigné comme témoin normal (appelé calibrateur) et choix de l'endogène. Puis les paramètres suivants ont été calculés par le logiciel : moyenne des trois  $C_t$  mesurés pour la même réaction de PCR de la patiente,  $\Delta C_t$  (par soustraction entre le  $C_t$  moyen du transcrit cible de la patiente et le  $C_t$  moyen de l'endogène de la patiente) et son écart-type,  $\Delta\Delta C_t$  (par soustraction entre le  $\Delta C_t$  de la patiente et le  $\Delta C_t$  du calibrateur). La quantification du transcrit chez la patiente a été exprimée relativement à la quantification du même transcrit chez le calibrateur, par un ratio (RQ) utilisant le paramètre  $\Delta\Delta C_t$  dans l'équation suivante :

$$RQ = 2^{-(\Delta\Delta C_t)}$$

Un intervalle de confiance de 95% a également été calculé pour ce ratio (RQ min/max), grâce à un test de Student.

## V) Etude de l'inactivation de l'X

Le profil d'inactivation du chromosome X a été étudié par amplification du locus *HUMARA* situé en Xq13. Si le locus *HUMARA* était non informatif (patiente homozygote), nous étudions alors l'inactivation au locus *FMRI*.

1 µg d'ADN génomique total a été digéré par 20 U d'enzyme HpaII pendant quatre heures à 37°C. L'enzyme HpaII a alors été inactivé pendant 20 min à 80°C. L'enzyme HpaII est sensible à la méthylation, il ne digère l'ADN que si la séquence de son site (CCGG) n'est pas méthylée. Deux réactions de PCR ont été réalisées en parallèle avec 100 ng d'ADN natif ou 200 ng d'ADN digéré, dans les conditions suivantes : tampon Thermoprime 1X, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTP 0,1 µM, 0,8 µM d'amorces fluorescentes spécifiques du locus *HUMARA* ou *FMRI* (amorce sens marquée en 5' par le fluorophore HEX pour le locus *HUMARA*, par le fluorophore 6 FAM pour le locus *FMRI*), 2,5 U de Taq Thermoprime polymérase, pour un volume total de 25 µL.

| Gène          | Orientation (5'→3')                |                                 | concentration finale (en µM) |
|---------------|------------------------------------|---------------------------------|------------------------------|
|               | séquence sens F                    | séquence anti-sens R            |                              |
| <i>HUMARA</i> | TCC AGA ATC TGT TCC AGA GAG CGT GC | GCT GTG AAG GTT GCT GTT CCT CAT | 0,8                          |
| <i>FMRI</i>   | GTC AGG CGC TCA GCT CCG TTT        | GCG CTC GAG GCC CAG CCG         | 0,8                          |

### **Tableau III : Amorces utilisées pour l'étude du profil d'inactivation de l'X.**

Séquences des couples d'amorces et concentrations finales des amorces au sein du mélange réactionnel pour la PCR.

En raison de la répétition de triplets (CAG pour *HUMARA* et CGG pour *FMRI*), la taille de l'amplicon est variable d'un allèle à l'autre.

Après une dénaturation initiale de 5 min à 95°C, 30 cycles de PCR ont été effectués comprenant chacun : 30 sec à 95°C, 30 sec à 59°C, 45 sec à 72°C, suivis d'une élongation finale de 7 min à 72°C. Les qualités et quantités des produits de PCR (250 à 300 pb) ont été vérifiées sur un gel d'agarose à 2%. Selon leur intensité, les produits de PCR ont été plus ou moins dilués dans de l'eau milliQ. 1 µL de produits de PCR dilués a été mélangé avec 12 µL de formamide déionisée et 0,5 µL de marqueur de taille (Rox 400 HD, Applied Biosystems). Le mélange a été dénaturé 2 min à 95°C avant d'être séparé par électrophorèse capillaire sur l'analyseur génétique ABI 310 (Applied Biosystems). L'analyse des tailles et des aires des pics a été effectuée à l'aide des logiciels Genescan Analysis v3.7® et Genotyper v. 2.5®.



# RESULTATS

## I) Analyse du gène *CDKL5* par QM-PSF

Pour cette étude, nous avons sélectionné 41 patientes présentant un syndrome de Rett atypique (forme variante avec épilepsie précoce), qui, après criblage des gènes *MECP2* et *CDKL5* par la stratégie classique de diagnostic moléculaire (séquençage pour les deux gènes *MECP2* et *CDKL5*, et QMPSF pour le gène *MECP2*) réalisée par le laboratoire de génétique du CHU de Nancy, ne présentaient pas de mutations délétères dans l'un de ces deux gènes. Toutes ces patientes ont présenté une première crise épileptique précoce (entre 3 semaines de vie et l'âge de 17 mois), le plus souvent avant l'âge de 3 mois. Cette épilepsie est inaugurale. Dans notre série, diverses présentations cliniques ont été observées, la plus fréquente étant le spasme infantile, isolé ou dans le cadre nosologique de syndrome de West. Quelle que soit la présentation clinique, l'épilepsie est sévère, souvent pharmacorésistante, avec nécessité d'une bi ou trithérapie anti-épileptique. Les éléments cliniques du syndrome de Rett varient également d'une patiente à l'autre : délai d'apparition des premiers signes plus ou moins long, présence ou non de stéréotypies manuelles, de traits autistiques ou de microcéphalie. Pour toutes ces patientes une stagnation puis une régression psychomotrice ont été observées.

### I.1) Choix du gène témoin interne

*CDKL5*, localisé sur le chromosome X, est présent en deux copies chez les femmes et une seule chez les hommes hémizygotés. Pour éviter tout problème d'interprétation des ratios (confusion possible sur le sexe de l'individu à tester, ou encore rares garçons avec une formule chromosomique 47, XXY) nous avons choisi un amplicon témoin interne pour un gène également porté par l'X. Les patientes d'intérêt ont nécessairement été testées au préalable par QMPSF pour le gène *MECP2*, on sait donc que ce gène n'est pas porteur de RGT. Nous avons donc retenu comme amplicon contrôle une partie de l'exon 4 du gène *MECP2*.

### I.2) Choix des amorces

Nous avons sélectionné des couples d'amorces pour ce protocole de PCR quantitative grâce au logiciel DSI\_PCRbase, disponible en ligne sur le site de l'Université René Descartes, Paris Vème (<http://www.dsi.univ-paris5.fr/bio2/Oligo2lib.html>). Chaque couple encadre un exon de *CDKL5*, et permet d'obtenir des produits de PCR avec des tailles compatibles avec la technique (comprises entre 150 et 350 pb). L'écart de taille minimal entre les différents amplicons au sein d'un même mélange doit être de 10 pb.

De plus, nous avons choisi pour chacun des exons de *CDKL5* de placer les amorces dans la région analysée lors du criblage mutationnel initial par séquençage systématique des exons et des bordures exon/intron du gène *CDKL5*. Ceci permet d'éviter de méconnaître un SNP (Single Nucleotid Polymorphism) dans le site de fixation d'une amorce, qui entrainerait une non ou une sous-amplification artéfactuelle d'un allèle, faisant conclure à tort à une délétion à l'état hétérozygote d'un exon de *CDKL5*.

Les exons du gène *CDKL5* étant de petite taille (entre 35 et 226 pb), les couples d'amorces sont en grande partie introniques. Seul l'exon 12 est suffisamment grand (965 pb) pour que les amorces soient purement exoniques, amplifiant un fragment de 303 pb au centre de l'exon. Nous avons également intégré à l'étude les exons 1A et 1B du gène *CDKL5*, compris dans la séquence génomique entre l'exon 1 et l'exon 2. Ces 2 exons sont petits (38 et 49 pb), et proches (122 pb), ce qui a permis de les amplifier tous deux au sein d'un même amplicon composite (appelé exon 1AB) grâce à une amorce F en 5' de l'exon 1A et une amorce R en 3' de l'exon 1B. Les exons 1, 1A, 1B sont non codants, et un épissage alternatif génère 2 transcrits : l'un comprend l'exon 1, l'autre les exons 1A et 1B.

### **I.3) Mise au point de la QMPSF *CDKL5***

#### I.3.1) Répartition des amorces dans les mélanges réactionnels des 3 PCR multiplex

Chaque couple d'amorces a tout d'abord été testé séparément. La qualité des produits de PCR a ensuite été contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose. Tous les amplicons ont bien été amplifiés en PCR simplex, sauf celui correspondant à l'exon 1, riche en GC (résultats non présentés). L'exon 1 a été amplifié lorsqu'on a ajouté 5% de DMSO au mélange réactionnel. Tous les couples étaient spécifiques : un seul fragment, de taille attendue, a été visualisé lors du contrôle sur gel d'agarose. L'intensité des produits de PCR était optimale lorsque le  $T_m$  était compris entre 56 et 58°C. Un  $T_m$  homogène permet d'envisager tout type de combinaison des différents amplicons lors de la mise au point des PCR multiplex.

Pour pouvoir quantifier le nombre de copies de chacun des exons co-amplifiés lors d'une PCR multiplex il est nécessaire que l'électrophorogramme ait les caractéristiques suivantes :

- les produits de PCR co-amplifiés doivent avoir une intensité de fluorescence proche : une trop grande différence entre les amplicons de *CDKL5* et le pic contrôle d'un même mélange peut fausser les ratios : risque de faux positifs ou faux négatifs.
- un produit de PCR doit avoir une hauteur minimale de 500 UA (Unité Arbitraire) pour pouvoir être représentatif.
- Les produits de PCR doivent avoir un même aspect : un seul pic d'intensité maximale.

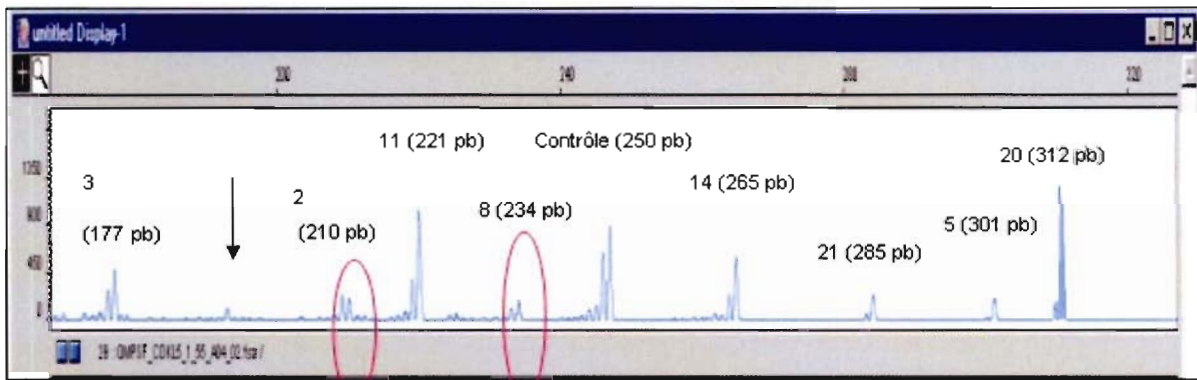
Une première répartition a été réalisée en trois mélanges, dictée uniquement par les tailles des amplicons : en effet les amplicons devaient différer d'un minimum 10 pb au sein d'un même mélange, pour que chaque amplicon soit bien individualisé lors de la séparation des produits de PCR par électrophorèse capillaire. Les premiers essais ont été effectués en concentrations équimolaires d'amorces (0,4 $\mu$ M de chaque amorce). La répartition était la suivante :

- PCR multiplex n°1 avec les exons 2 (210 pb), 3 (177 pb), 5 (301 pb), 8 (234 pb), 11 (221 pb), 14 (265 pb), 20 (312 pb), 21 (285 pb), et amplicon contrôle *MECP2* (250pb).
- PCR multiplex n°2 avec les exons 1 (223 pb), 4 (238 pb), 6 (201 pb), 16 (300 pb), 17 (279 pb), 19 (268 pb) et amplicon contrôle *MECP2* (250pb).
- PCR multiplex n°3 avec les exons 7 (214 pb), 9 (227 pb), 10 (264 pb), 12B (303 pb), 13 (313 pb), 15 (237 pb), 18 (323 pb), 1AB (341 pb), et amplicon contrôle *MECP2* (250pb).

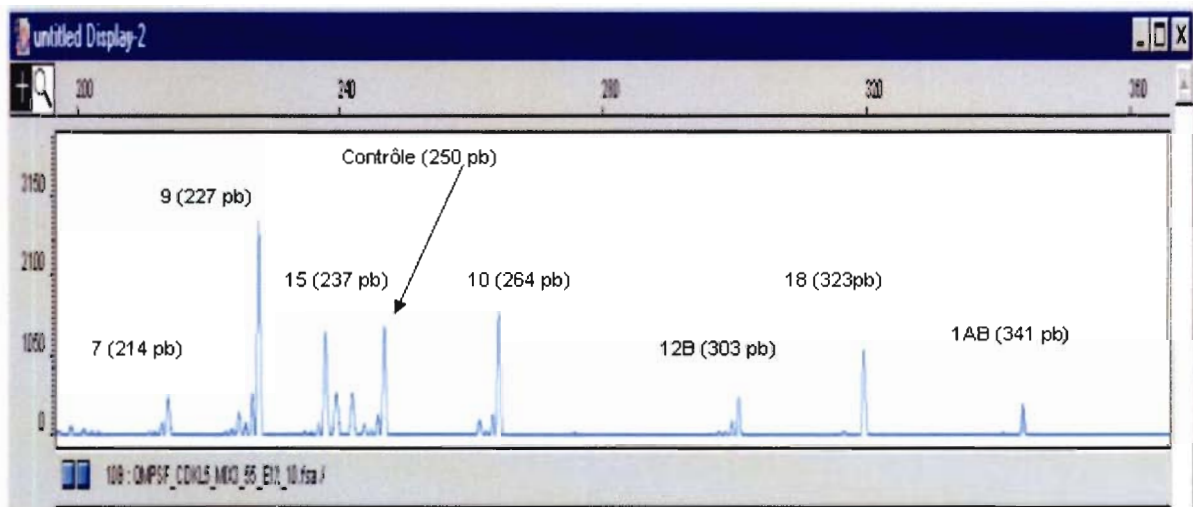
### I.3.2) Premiers résultats pour les PCR multiplex n°1 et n°3

Tous les amplicons ont été identifiés pour les PCR multiplex 1 et 3, cependant il existait de grandes disparités d'intensité de fluorescence entre les différents produits de PCR. Cette variabilité n'était pas compatible avec l'analyse ultérieure des électrophorégrammes.

**A**



**B**



**Fig.6 : Electrophorégrammes obtenus après analyse par électro-capillaire des produits de PCR multiplex du gène *CDKL5***

( $T_m=56^\circ\text{C}$ ,  $0.4 \mu\text{M}$  d'amorces pour l'ensemble des exons).

L'intensité de fluorescence (en UA) est sur l'axe des ordonnées et la taille des amplicons en pb est sur l'axe des abscisses. Chaque produit de PCR est annoté par un numéro faisant référence à l'exon de *CDKL5* amplifié, avec mention de la taille de l'amplicon entre parenthèses.

En A, PCR multiplex 1 : L'intensité des produits de PCR est très variable (très faible pour les exons 2, 8, 21 et 5). L'intensité du produit de PCR spécifique et du produit de PCR de taille n-1 est équivalente pour les exons 2 et 8 (pics cerclés). La flèche désigne un produit de PCR aspécifique.

En B, PCR multiplex 3 : L'intensité des produits de PCR est très variable (très faible pour les exons 7, 12B, 1AB).

Nous avons également observé des artéfacts correspondant à des produits aspécifiques pouvant apparaître lors du multiplexage (hybridation de 2 amorces n'appartenant pas au même couple). Pour le produit de PCR correspondant aux exons 2 ou 8 dans la PCR multiplex n°1 : il a été visualisé sous forme de deux pics d'intensités équivalentes, distants de 1 pb. Pour tous les exons nous avons observé des produits de PCR, d'intensité variable (parfois importante) de taille n-1, n-2, n-3, n-4 par rapport à celle du produit de PCR de taille attendue. Ceci était probablement dû à une purification incomplète au terme de l'étape de synthèse des amorces utilisées pour les PCR multiplex. Ce phénomène ne gêne pas l'analyse quantitative génomique à condition que l'intensité de ces pics reste faible, mais cela n'était pas le cas pour les amplicons des exons 2 et 8, ininterprétables.

Pour remédier aux problèmes évoqués ci-dessus, nous avons ajusté les concentrations des amorces dans les mélanges réactionnels des PCR multiplex n°1 et 3 dans le but d'homogénéiser l'intensité des produits de PCR.

### I.3.3) Premiers résultats pour la PCR multiplex n°2

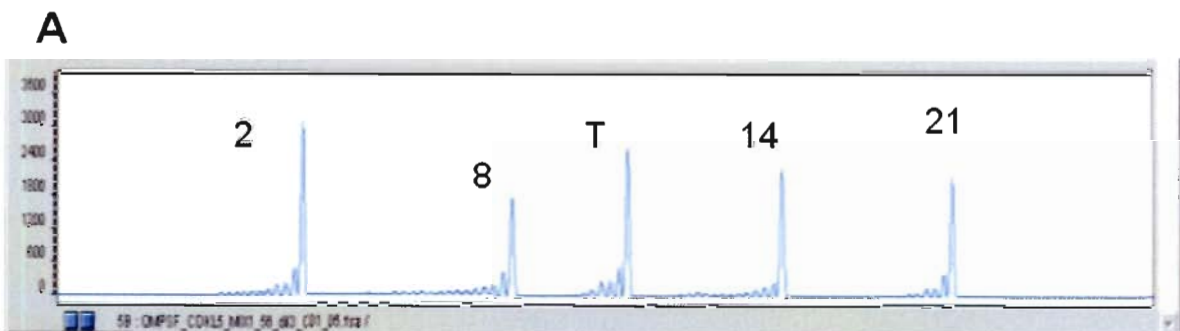
Aucun produit de PCR n'a été détecté par électrophorèse capillaire après la PCR multiplex n°2 (résultat non présenté). Nous avons modifié la composition du mélange réactionnel de PCR en faisant varier la concentration de  $MgCl_2$  (1,5 mM, 2,25 mM, 3,0 mM), et en ajoutant ou non du DMSO (puisque l'exon 1 était initialement dans cette PCR multiplex). Une amplification des exons 6 et 17 a alors été obtenue, ainsi qu'une très faible amplification de l'exon 1, et cela uniquement dans les conditions suivantes :  $MgCl_2$  1,5 mM, DMSO 5%.

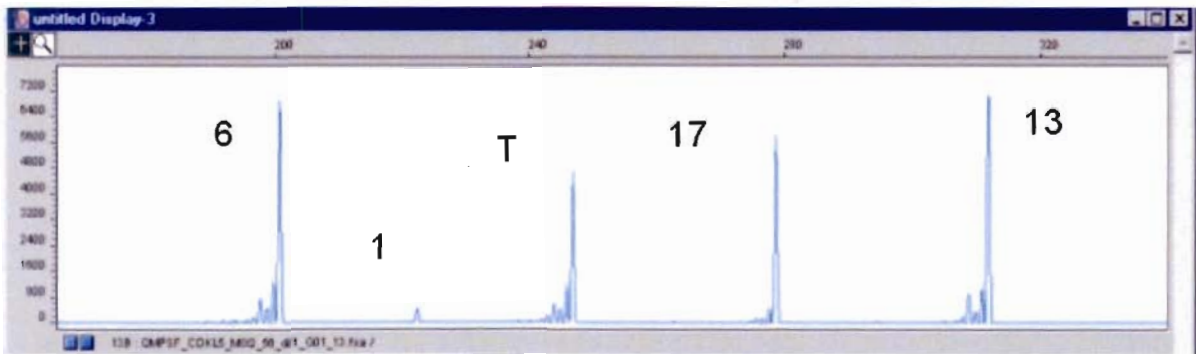
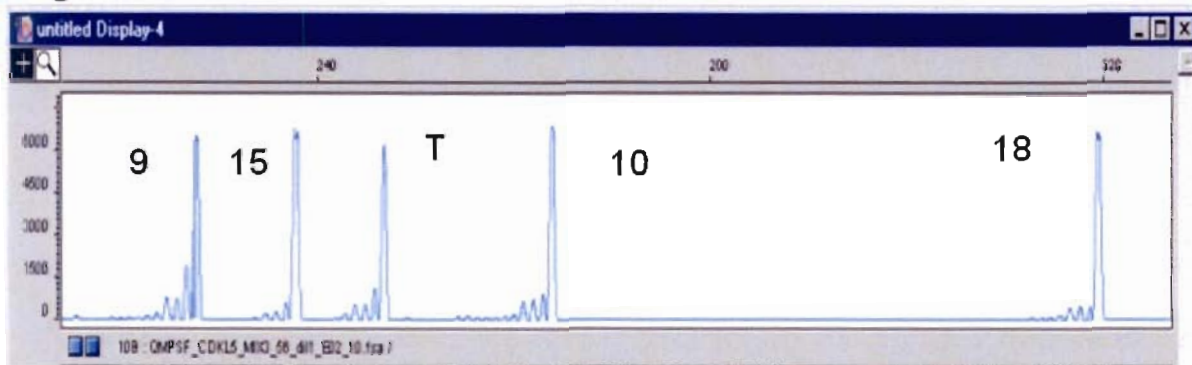
La répartition des exons dans les différentes PCR multiplex n'était pas satisfaisante au terme de ces essais. Nous avons observé une grande disparité des intensités des produits de PCR pour la PCR multiplex 1 et 3 malgré les variations des concentrations d'amorces. Nous avons même observé une extinction totale de l'amplification de certains amplicons lorsque l'on augmentait les concentrations d'autres couples d'amorces. Enfin nous observions toujours une absence d'amplification de la plupart des amplicons de la PCR multiplex 2 (résultats non présentés).

### I.3.4) Changement de la répartition des amplicons au sein des 3 PCR multiplex

A ce stade de la mise au point, nous avons décidé de revoir la distribution, en conservant les quatre amplicons les mieux amplifiés au sein de chaque PCR multiplex et l'amplicon contrôle, en concentrations d'amorces équimolaires (0.4 $\mu$ M) :

- QMPSF 1: exons 2, 8, 14, 21 et amplicon témoin,
- QMPSF 2 : exons 1, 6, 13,17 et amplicon témoin,
- QMPSF 3 : exons 9, 10, 15,18 et amplicon témoin.



**B****C**

**Fig. 7 : Electrophorégrammes des 3 PCR multiplex après changement de la répartition des exons**

(amorces à  $0.4\mu\text{M}$ ). L'intensité de fluorescence obtenue pour chacun des quatre amplicons de *CDKL5* et l'amplicon contrôle (T) est satisfaisante. L'intensité de fluorescence (en UA) est sur l'axe des ordonnées et la taille des amplicons en pb est sur l'axe des abscisses. Chaque produit de PCR est annoté par un numéro faisant référence à l'exon de *CDKL5* amplifié, avec mention de la taille de l'amplicon entre parenthèses.

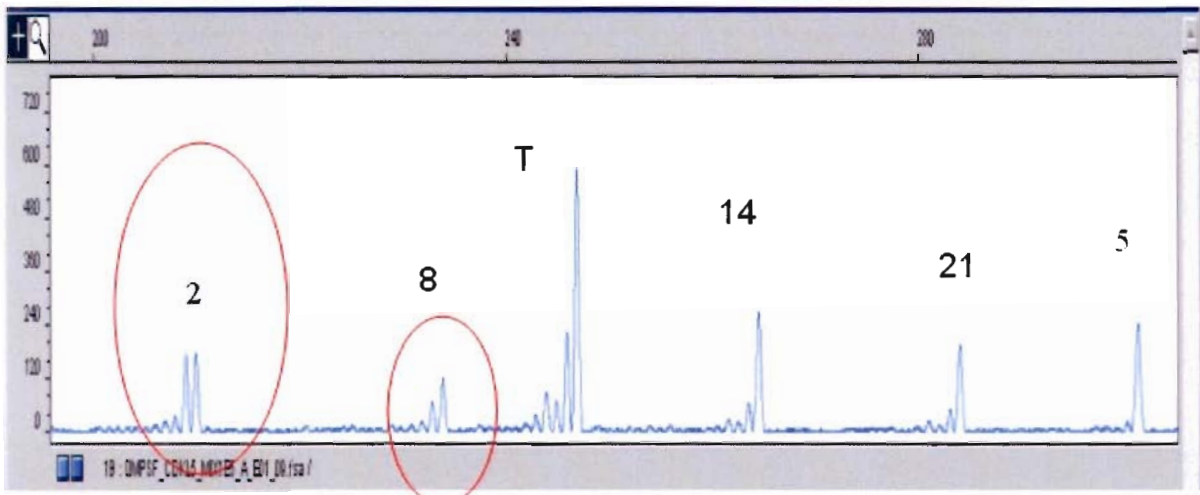
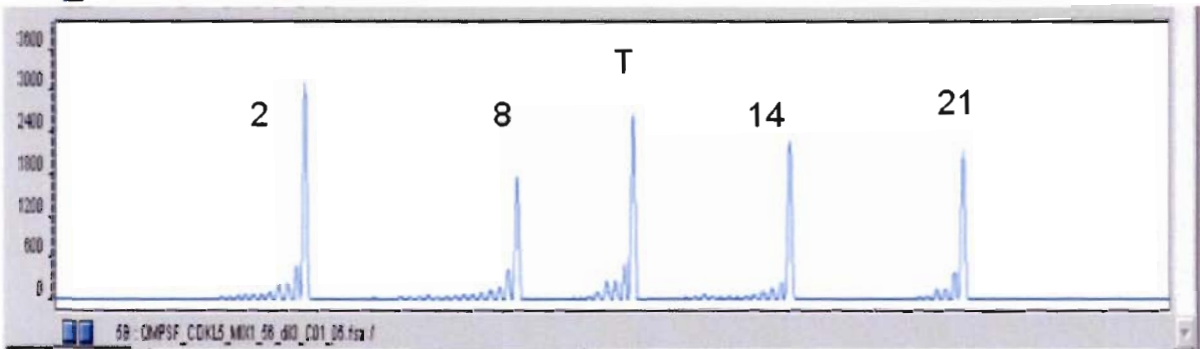
En A, Electrophorégramme de la PCR multiplex 1 : l'intensité de fluorescence obtenue pour chacun des 5 amplicons est équivalente.

En B : Electrophorégramme de la PCR multiplex 2 : les 5 pics attendus sont bien distincts. L'amplification de l'exon 1 est très inférieure à celle des autres exons.

En C : Electrophorégramme de la PCR multiplex 3 : les 5 produits de PCR attendus sont distincts et d'amplitude homogène.

Les électrophorégrammes obtenus étaient interprétables, nous avons alors ajouté les autres couples d'amorces un à un aux mélanges réactionnels, pour détecter les amplicons perturbants.

Par exemple, nous avons remarqué que l'exon 5 diminue les intensités de fluorescence des produits de PCR de taille attendue pour les exons 2 et 8 dans la PCR multiplex 1, ce qui les placent au même niveau de fluorescence que le produit de PCR de taille n-1.

**A****B**

**Fig. 8 : Electrophorégrammes obtenus par électrophorèse capillaire des produits de la PCR multiplex 1 ( $T_m=58^\circ\text{C}$ , toutes les amorces à  $0.4\mu\text{M}$ ).**

L'intensité de fluorescence (en UA) est sur l'axe des ordonnées et la taille des amplicons (en pb) est sur l'axe des abscisses. Chaque produit de PCR est annoté par un numéro faisant référence à l'exon de *CDKL5* amplifié. L'amplicon contrôle est signalé par la lettre T.

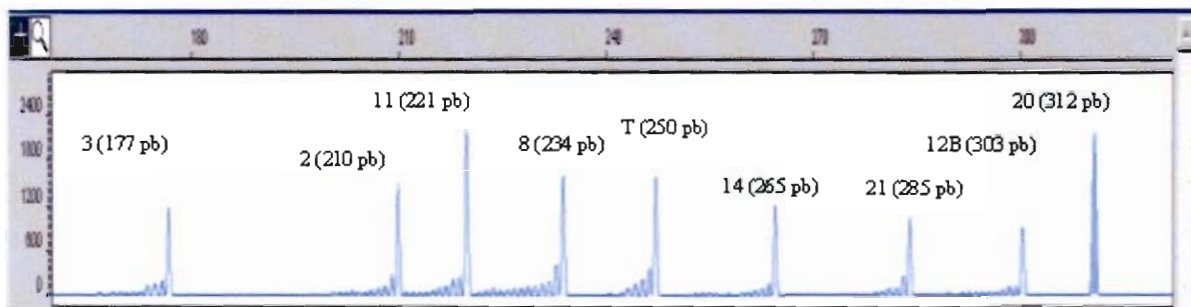
En A : Electrophorégramme obtenu lorsque le mélange réactionnel comprend les amorces des amplicons 2, 8, 14, 21, et 5 du gène *CDKL5* et l'amplicon contrôle. Les produits de PCR des exons 2 et 8 (cerclés de rouge) apparaissent sous forme de 2 pics, d'intensité équivalente, correspondant au produit de PCR de taille attendue et au produit de PCR de taille n-1.

En B : Electrophorégramme obtenu lorsque le mélange réactionnel comprend les amorces des amplicons 2, 8, 14, 21 du gène *CDKL5* et l'amplicon contrôle. **En l'absence de l'amplicon 5, les produits de PCR sont visualisés sous forme d'un pic unique d'intensité maximale, satisfaisant aux critères d'analyse.**

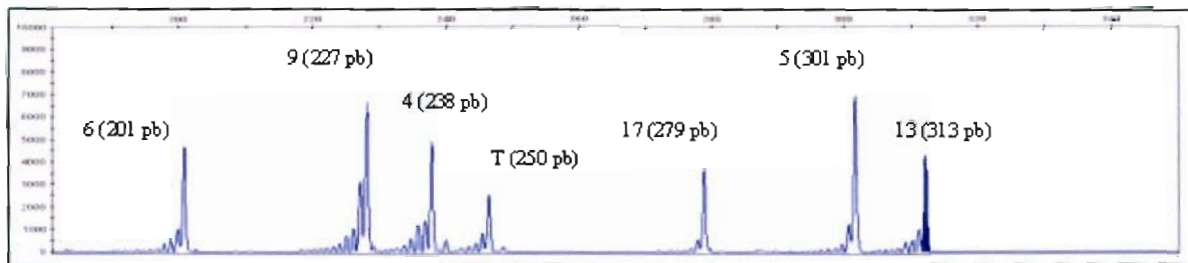
Aucun produit de PCR correspondant à l'exon 1 n'a été observé dans la PCR n°2. Cet amplicon a été intégré avec succès à la PCR multiplex n°3.

Au final, nous avons réussi à répartir efficacement les exons (à l'exception de l'exon 19) au sein de 3 PCR multiplex. Le  $T_m$  choisi pour les 3 mélanges était de  $56^\circ\text{C}$ . En raison de la présence d'un produit de PCR aspécifique (de forte intensité lors de l'électrophorèse sur gel d'agarose) dans le mélange 1, ce  $T_m$  a été augmenté à  $58^\circ\text{C}$ . L'augmentation de la température d'hybridation des amorces a ainsi permis de s'affranchir de ce produit aspécifique. Les électrophorégrammes obtenus après électrophorèse capillaire étaient compatibles avec une analyse quantitative.

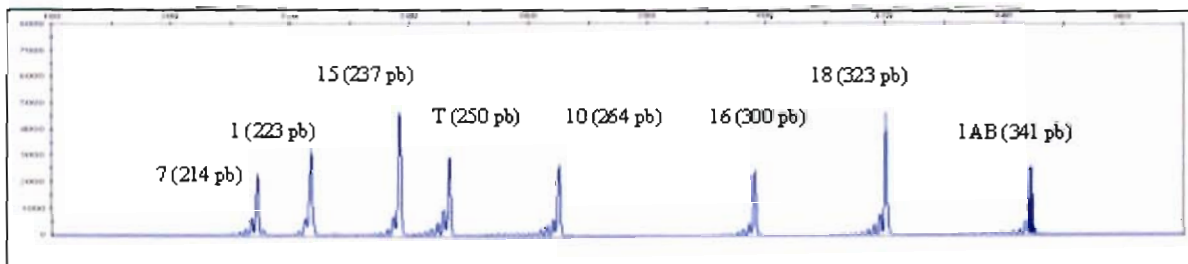
A



B



C



**Fig. 9 : Electrophorégrammes obtenus par électrophorèse capillaire des produits des 3 PCR multiplex au terme de la mise au point des mélanges d'amorces.**

Chaque produit de PCR est annoté par un numéro faisant référence à l'exon de *CDKL5* amplifié, avec mention de la taille de l'amplicon entre parenthèses. L'amplicon contrôle de *MECP2* est signalé par la lettre T.

En A, électrophorégramme de la PCR multiplex n°1

En B, électrophorégramme de la PCR multiplex n°2

En C, électrophorégramme de la PCR multiplex n°3

Tous les produits de PCR ont une intensité de fluorescence comparable, avec une amplitude suffisante pour l'analyse quantitative.

Les produits de PCR de taille n-1, n-2 sont visualisés mais ne gênent pas l'analyse. Aucun produit de PCR aspécifique n'est observé.

A ce stade de l'étude, l'exon 19 n'était intégré dans aucune PCR multiplex : son incorporation, à des concentrations d'amorces variées, entraînait systématiquement une extinction de plusieurs amplicons (par exemple, non amplification de l'exon 4 et de l'amplicon contrôle dans la PCR multiplex 2). Le protocole doit être complété en intégrant à l'une des 3 PCR multiplex l'amplicon correspondant à l'exon 19. Après avoir testé, sans résultat, diverses conditions de PCR, un autre couple d'amorces a été choisi : l'amorce F a été conservée, mais une autre amorce R (non marquée, donc moins coûteuse) a été utilisée, décalée de 9 bases en 3' par rapport à l'amorce précédemment utilisée. L'amplification était toujours de mauvaise qualité, avec extinction de l'amplification de l'amplicon contrôle, empêchant toute analyse ultérieure.

En 5' de cette région d'hybridation de l'amorce R la séquence génomique comporte un polyT, zone de polymorphisme, ce qui interdit un décalage de l'amorce R en 3'. Un autre couple d'amorces doit être choisi, en se déplaçant dans une zone intronique en amont et en aval de l'exon 19 de *CDKL5*.

#### I.4) Application du protocole de QMPSF pour la recherche de RGT dans le gène *CDKL5*

41 patientes ne présentant pas de mutation délétère dans le gène *MECP2* ou *CDKL5* ont été testées. Nous avons contrôlé la qualité de l'ADN génomique pour chaque patiente par électrophorèse sur gel d'agarose (résultats non présentés) :

- L'ADN était totalement dégradé (smear) pour une patiente.
- Pour trois autres patientes, la bande observée était de faible intensité, mais il n'y avait pas de smear observé. L'analyse de *CDKL5* pour ces trois patientes était la suivante : absence de RGT pour la première, duplication des exons 7 et 16 pour les deux autres.
- Tous les autres ADN étaient de bonne qualité.

Le protocole de QMPSF du gène *CDKL5* a été appliqué et la recherche de RGT a été effectuée pour les 40 patientes dont l'ADN génomique n'était pas dégradé. Les électrophorégrammes des patientes ont été comparés à ceux de 2 témoins (femmes ne présentant pas de syndrome de Rett).

Les premières analyses du gène *CDKL5* par QMPSF ont donné les résultats suivants :

- absence de RGT pour 17 patientes,
- présence de RGT pour 23 patientes :
  - délétions partielles pour 13 patientes,
  - duplications partielles pour 9 patientes,
  - association d'une délétion et d'une duplication partielles pour 1 patiente.

Cependant, pour la plupart de ces 23 patientes, les résultats obtenus n'étaient pas cohérents. Par exemple, pour 3 patientes, nous détectons à la fois une duplication de l'exon 7 et de l'exon 16, sans modification quantitative des autres exons.

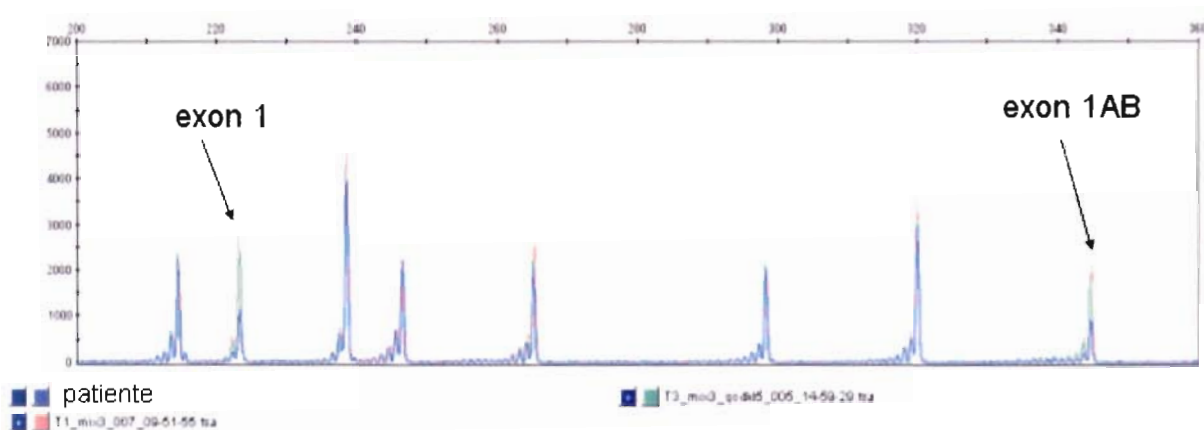
Pour une autre patiente, tous les exons semblaient dupliqués, avec des ratios compris entre 1.4 et 1.5, à l'exception des exons 1 (1.209), 1A (1.279), 20 (1,366) et 21 (1,156). L'ADN de cette patiente provenait d'un prélèvement sanguin récent (échantillon 1), extrait avec le kit NucleonBACC3®. Il était nécessaire de confirmer cette duplication potentielle des exons 2 à 20 par un second prélèvement sanguin. Un autre échantillon d'ADN de cette patiente était conservé en banque à -40°C depuis 2002, mais un contrôle sur gel d'agarose a montré que l'ADN de l'échantillon était dégradé. Nous avons demandé un nouveau prélèvement sanguin au médecin qui suit cette patiente. L'ADN de ce nouveau prélèvement sanguin (échantillon 2), non dégradé, extrait avec le kit NucleonBACC3®, a alors été analysé par la même technique : les ratios obtenus étaient strictement normaux. Devant ces résultats contradictoires, nous avons décidé de purifier l'ADN de l'échantillon 1, à l'aide du kit QIAamp DNA Blood Mini-Kit® (Qiagen). Après contrôle par électrophorèse sur gel d'agarose, l'ADN purifié de l'échantillon 1 était de bonne qualité. Les 3 PCR multiplex ont été réalisées avec cet ADN purifié, et après analyse, les ratios obtenus étaient également normaux, confirmant ainsi les résultats de l'analyse par QMPSF sur l'ADN de l'échantillon 2. Il n'y a donc pas de duplication partielle du locus *CDKL5* chez cette patiente.



Pour les 22 autres patientes dont l'ADN semblait également présenter un RGT, ce protocole de purification était donc intéressant pour s'affranchir des artéfacts. Pour 10 de ces patientes ce protocole de purification à l'aide du kit QIAamp DNA Blood Mini-Kit® (Qiagen) n'a pas été réalisable car la quantité d'ADN restant en banque était insuffisante. Pour les 12 patientes restantes, ce protocole de purification a été appliqué et le protocole de QMPSF a alors été réalisé une seconde fois, en utilisant l'ADN purifié.

Les secondes analyses du gène *CDKL5* par QMPSF ont donné les résultats suivants :

- absence de RGT pour 9 patientes
- délétions partielles portant sur les exons 7 et 16 pour 2 patientes, probablement artéfactuelles. Malgré la purification, l'ADN était toujours de mauvaise qualité. Un second échantillon d'ADN sera nécessaire pour exclure ce RGT.
- délétion des exons 1 et 1AB pour une patiente.



**Fig. 10 : Electrophorégrammes obtenus par électrophorèse capillaire des produits de la PCR multiplex n°3**

L'électrophorégramme de la patiente est en bleu, superposé à ceux des témoins femmes en rose et turquoise. Les pics observés se superposent parfaitement, sauf ceux correspondants aux exon 1 et 1AB : pour ces pics, l'aire sous l'électrophorégramme de la patiente est égale à la moitié des aires pour ces mêmes pics sous les électrophorégrammes des témoins. Ce ratio de 0,5 correspond à une délétion des exons 1 et 1AB.

### **I.5) Mise en évidence d'un remaniement de grande taille dans le gène *CDKL5***

Nous avons mis en évidence une délétion des 2 amplicons contigus, correspondant aux exons 1, 1A et 1B, chez une patiente porteuse d'un syndrome de Rett atypique, avec épilepsie inaugurale depuis l'âge de 3 semaines. Il s'agit donc probablement d'un véritable RGT, à mettre en relation avec la pathologie.

Il est nécessaire de confirmer cette délétion potentielle des exons 1, 1A et 1B par des techniques alternatives de quantification génomique. La MLPA réalisée avec l'ADN purifié a confirmé la délétion de l'exon 1 (dans le kit commercialisé, il n'y a pas de sondes correspondant aux exons 1A ou 1B). Nous comptons confirmer ce RGT par technique de PCR quantitative en temps réel (qPCR) avec analyse par la méthode des  $\Delta\Delta C_t$ .

## II) Quantification relative des transcrits du gène *MECP2*

Nous avons mis au point une méthode permettant d'évaluer le niveau de transcription du gène *MECP2* par quantification relative à l'aide du SYBR Green. Pour ce faire, nous avons testé l'efficacité de notre méthode à l'aide de témoins normaux et de témoins présentant une mutation à l'état hétérozygote dans le gène *MECP2*.

Nous avons par la suite appliqué notre protocole de qPCR pour rechercher, chez des patientes atteintes d'un syndrome de Rett typique, non porteuses d'une mutation délétère du gène *MECP2*, une variation du niveau de transcription de *MECP2\_e1* et *MECP2\_e2* pouvant indirectement indiquer une altération de la régulation de la transcription du gène *MECP2*.

Certaines de ces patientes porteuses d'un syndrome de Rett typique sont épileptiques, et même si cette épilepsie a débuté tardivement (par rapport aux patientes porteuses d'un syndrome de Rett variant forme Hanefeld), nous avons vérifié l'intégrité de la séquence génomique de *CDKL5* : aucune de ces patientes ne présente de mutation délétère du gène *CDKL5*.

Au total, nous disposons de l'ARNm total extrait de sang frais et conditionné en tube PAXgene ou EDTA pour huit patientes présentant un syndrome de Rett typique, non porteuses d'une mutation délétère du gène *MECP2*. Leur description phénotypique est présentée dans le tableau IV. Le syndrome de Rett est considéré comme typique lorsque le score clinique est égal ou supérieur à 8. La patiente P18 a été décrite comme porteuse d'un syndrome de Rett typique par les neuropédiatres qui ont adressé pour elle la demande de diagnostic moléculaire de syndrome de Rett. Cependant, certains items cotants dans la fiche clinique n'ayant pas été renseignés, les scores pour ces patientes sont inférieurs à 8, sans pour autant remettre en cause le diagnostic clinique de syndrome de Rett typique et l'inclusion de cette patiente dans notre étude.

**Tableau IV : description phénotypique des patientes incluses en protocole RTqPCR MECP2**

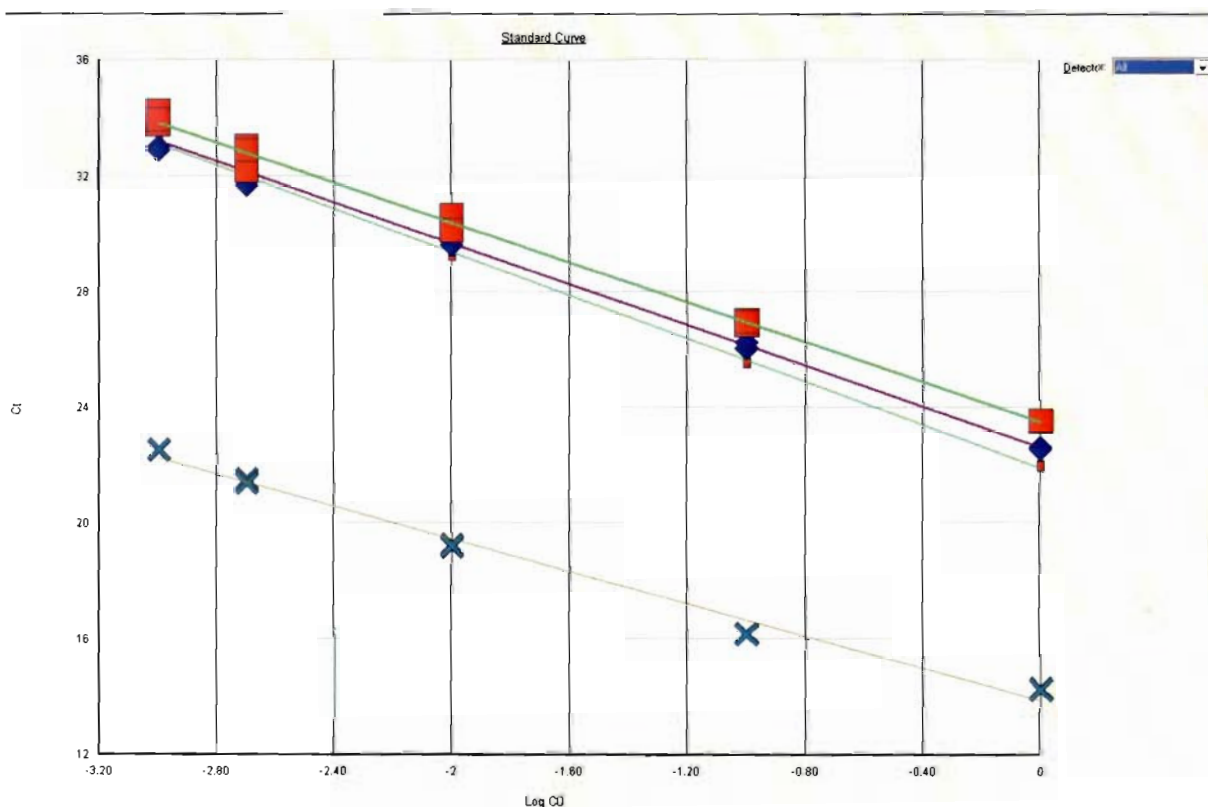
|  | Score     | P2      | P5            | P14             | P16           | P18 | P19           | P24     | P25 | P26     |
|--|-----------|---------|---------------|-----------------|---------------|-----|---------------|---------|-----|---------|
| Période anténatale et périnatale normale         | (Oui = 1) | 1       | 1             | 1               | 1             | 1   | 1             | 1       | 1   | Non     |
| Périmètre crânien normal à la naissance          | (Oui = 1) | 1       | 1             | 1               | 1             | 1   | 1             | 1       | 1   | 1       |
| Infléchissement de la croissance du PC           | (Oui = 1) | 1       | 1             | 1               | 1             | 1   | 1             | 1       | 1   | Non     |
| Microcéphalie présente                           |           | Oui     | Oui           | Oui             | Oui           | Oui | Oui           | -       | Oui | Non     |
| Utilisation volontaire des mains                 |           |         |               |                 |               |     |               |         |     |         |
| Jamais acquise                                   | (Oui = 1) | 1       | Non           | Non             | 1             | Non | Non           | Non     | Non | Non     |
| Acquise puis perdue                              | (Oui = 2) | Non     | 2             | 2               | -             | Non | Non           | 2       | 2   | 2       |
| Acquise  |           | Non     | Non           | Oui             | -             | Oui | Oui           | Non     | Non | Non     |
| Stéréotypies manuelles                           | (Oui = 1) | 1       | 1             | 1               | 1             | 1   | 1             | 1       | 1   | 1       |
| Développement psychomoteur normal jusqu'à 6 mois | (Oui = 1) | 1       | 1             | 1               | 1             | Non | 1             | 1       | 1   | 1       |
| Retard sévère du développement psychomoteur      | (Oui = 1) | 1       | 1             | 1               | 1             | 1   | 1             | 1       | 1   | 1       |
| Tenue assise acquise                             |           | Non     | Oui (15 mois) | Oui             | Oui (14 mois) | Oui | Oui           | Oui     | -   | Non     |
| Marche acquise                                   | (Non = 1) | 1       | 1             | Oui (difficile) | 1             | 1   | Oui (30 mois) | Oui     | 1   | 1       |
| Trouble de la communication, traits autistiques  | (Oui = 1) | 1       | Non           | 1               | 1             | 1   | 1             | 1       | 1   | 1       |
| Développement du langage                         |           |         |               |                 | -             |     |               |         |     |         |
| Jamais acquis                                    | (Oui = 1) | 1       | Non           | 1               | 1             | Non | 1             | 1       | Non | 1       |
| Acquis puis perdu                                | (Oui = 2) | Non     | 2             | Non             | -             | Non | Non           | Non     | 2   | Non     |
| Epilepsie  |           | Oui     | Non           | Oui             | Oui           | Non | Non           | Oui     | Non | Oui     |
| Sévérité   |           | ++      |               | +++             | +             |     |               | -       |     | ++      |
| Age de la première crise convulsive              |           | 12 mois |               | 11 mois         | 17 mois       |     |               | 12 mois |     | 3 jours |
| Troubles respiratoires                           |           | Oui     | Non           | Oui             | Oui           | Non | Oui           | Oui     | Oui | Non     |
| Troubles vasomoteurs des extrémités              |           | Oui     | -             | Oui             | Oui           | Non | Non           | Oui     | Non | Oui     |
| Spasticité                                       |           | Oui     | Oui           | -               | -             | -   | Non           | Non     | -   | -       |
| Scoliose   |           | Oui     | -             | -               | -             | -   | Non           | Non     | Oui | -       |
| Score Total                                      |           | 10      | 11            | 10              | 10            | 7   | 8             | 10      | 12  | 9       |

## II.1) Contrôle des ARN totaux

La qualité des ARN totaux étant essentielle pour une quantification relative optimale des transcrits de *MECP2*, tous les ARN ont été contrôlés par électrophorèse sur gel d'agarose. Tous les ARN étaient de bonne qualité sauf l'ARN issu de sang frais (tube PAXgene®) de la patiente P22, qui était dégradé (résultat non présenté). Le protocole de qPCR n'a alors été appliqué que pour 14 patientes Rett ne présentant pas de mutation délétère du gène *MECP2* ou *CDKL5* et dont l'ARN est de bonne qualité.

## II.2) Choix des endogènes

Après une revue de la littérature, nous avons choisi d'intégrer deux endogènes contrôles pour normaliser les résultats de ce protocole de RT- qPCR. La *β actine* est un endogène très utilisé dans les travaux de quantification. L'*ESD*, moins connu, est choisi comme second endogène en raison de la bonne reproductibilité de son amplification lors des mesures intra individuelles. De plus, son expression quantitative est peu variable d'un individu à l'autre [25]. Enfin, l'endogène *ESD* est particulièrement intéressant pour notre travail car son niveau de transcription est comparable à celui de notre gène cible *MECP2*. En effet les Ct pour le gène *ESD* varient entre 24 et 29 cycles alors que les Ct pour la *β actine* sont compris entre 16 et 22 cycles.



**Fig. 11 : Courbes d'efficacité de PCR pour les transcrits endogènes et cibles**

Comme pour la fig. 12, ce graphe montre les courbes  $Ct = f(\text{Log}_{10} \text{ quantité d'ARN})$ .

De bas en haut : *β actine* (croix vertes), *MECP2\_e2* (petits carrés rouges), *MECP2\_e1* (losanges bleus), *ESD* (grands carrés rouges).

## II.2.1) Contrôle de l'efficacité et de la spécificité des PCR

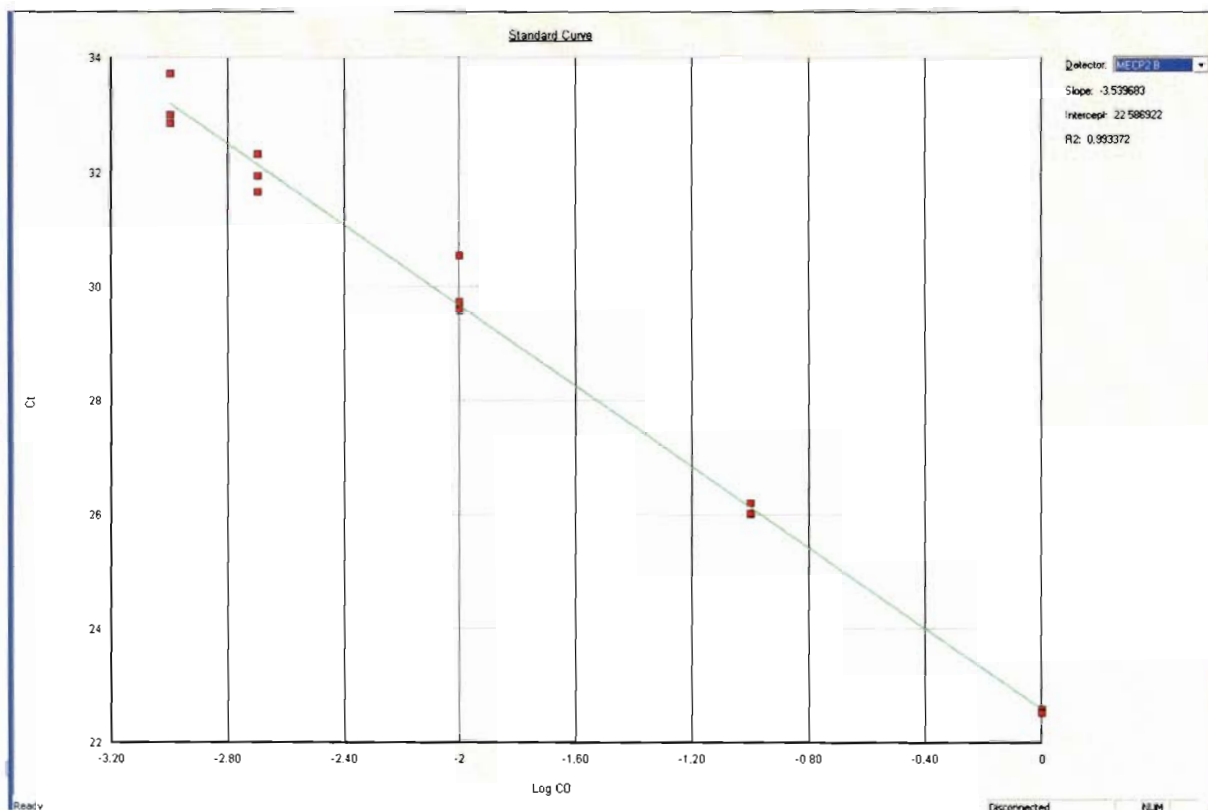
La mise au point d'une méthode de quantification relative par  $\Delta\Delta C_t$  nécessite la réalisation d'une courbe d'efficacité avec cinq quantités d'ADNc, pour vérifier que les endogènes choisis seront valides pour l'analyse des transcrits cibles. Deux paramètres ont été étudiés : l'efficacité et la spécificité des PCR.

### II.2.1.1 - Efficacité

L'efficacité de la PCR est calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{Efficacité} = (10^{1/a} - 1) \times 100$$

Dans cette équation, a est la pente de la droite d'efficacité. La droite d'efficacité est elle définie par une équation de type  $y = ax + b$  avec y pour les Ct et x pour le logarithme en base 10 de la concentration initiale en cibles.



**Fig. 12 : Courbe d'efficacité de la PCR pour l'ADNc de MECP2\_e1**

En ordonnée sont indiqués les Ct en fonction du Log10 de la quantité d'ARN initiale, en abscisse :

- Log CO = 0 pour ADNc non dilué 1/1 (correspondants à 125 ng d'ARN avant RT),
- Log CO = -1 pour ADNc dilué au 1/10 (correspondants à 12.5 ng d'ARN avant RT),
- Log CO = -2 pour ADNc dilué au 1/100 (correspondants à 1.25 ng d'ARN avant RT),
- Etc.

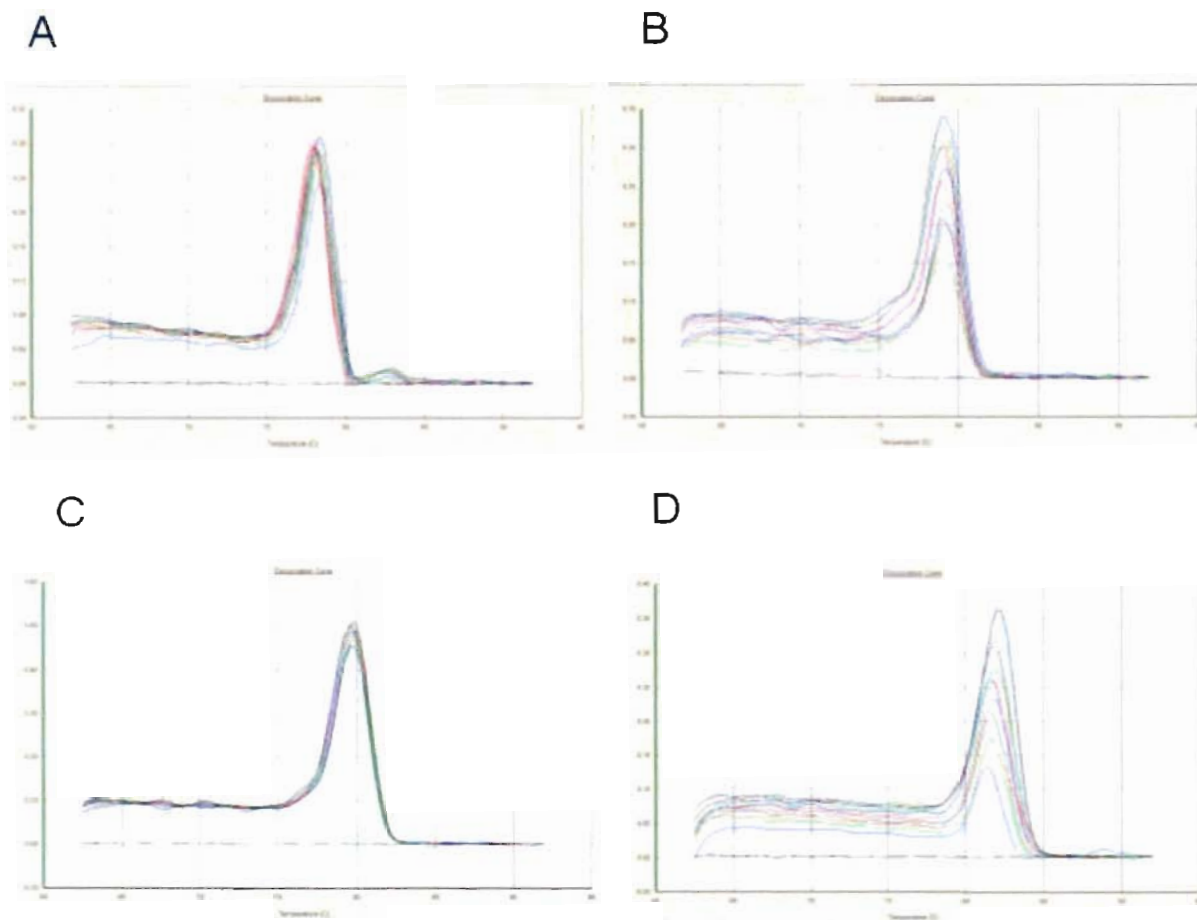
La pente (slope = -3.53) est utilisée pour le calcul de l'efficacité de la PCR (92% pour cet exemple).

Les efficacités des PCR pour les transcrits cibles et pour les endogènes doivent être comprises entre 80 et 120%, pour pouvoir appliquer la méthode des  $\Delta\Delta C_t$ , ce qui était le cas pour notre étude :

- efficacité de la PCR à partir des ADNc de MECP2\_e2 : 85%
- efficacité de la PCR à partir des ADNc de MECP2\_e1 : 92%
- efficacité de la PCR à partir des ADNc de  $\beta$  actine : 107%
- efficacité de la PCR à partir des ADNc de ESD : 95%.

### II.2.1.2 - Spécificité

La spécificité des amplifications des ADNc pour les transcrits cibles (MECP2\_e1 et MECP2\_e2) et pour les endogènes a été évaluée en réalisant une courbe de fusion en fin de PCR lors de la réalisation de la droite d'efficacité. Pour chacun des quatre amplicons testés, un  $T_m$  unique atteste d'une amplification spécifique et ce même avec de faible quantité d'ADNc cibles.



**Fig. 13 : Étude de la spécificité des PCR à l'aide des courbes de dissociation**

Pour chacun des 4 transcrits étudiés, la courbe de dissociation  $[-dF/dT=f(\text{température})]$  montre que la PCR est bien spécifique (un seul pic).

A : transcrits MECP2\_e2

B : transcrits MECP2\_e1

C : transcrits  $\beta$  actine

D : transcrits ESD

### III.2.2) Utilisation de deux endogènes pour l'analyse par RT-qPCR

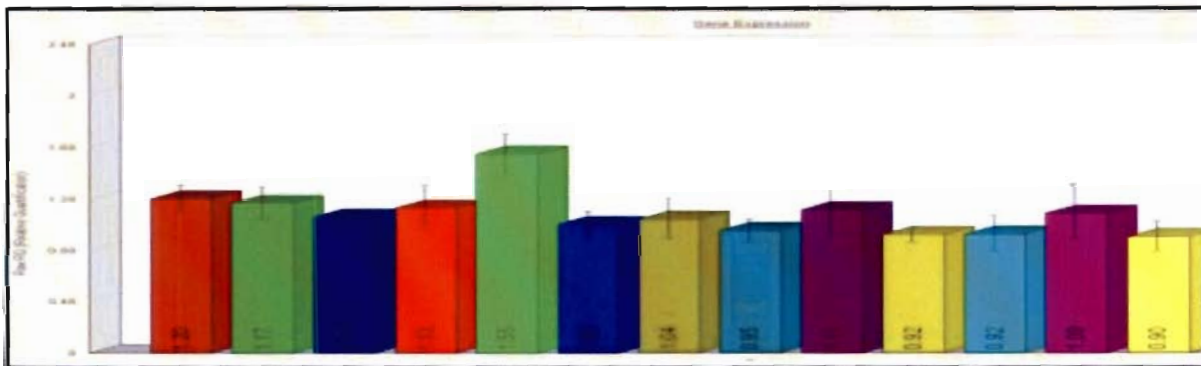
L'efficacité et la spécificité des deux endogènes étaient comparables et répondaient aux critères de validation de la technique, la quantification des transcrits des gènes *ESD* et *β actine* a été réalisée à chaque PCR quantitative en parallèle à l'étude des transcrits cibles *MECP2\_e1* et *MECP2\_e2*. L'analyse a été réalisée à chaque fois en double, d'abord avec pour endogène le transcrit de l'*ESD*, puis avec celui de la *β actine*. Les résultats ont toujours été comparables, et les valeurs numériques de RQ citées en II.3 sont celles obtenues lorsque l'endogène choisi était le transcrit du gène *ESD*.

## II.3) Quantification des transcrits du gène *MECP2* par qPCR

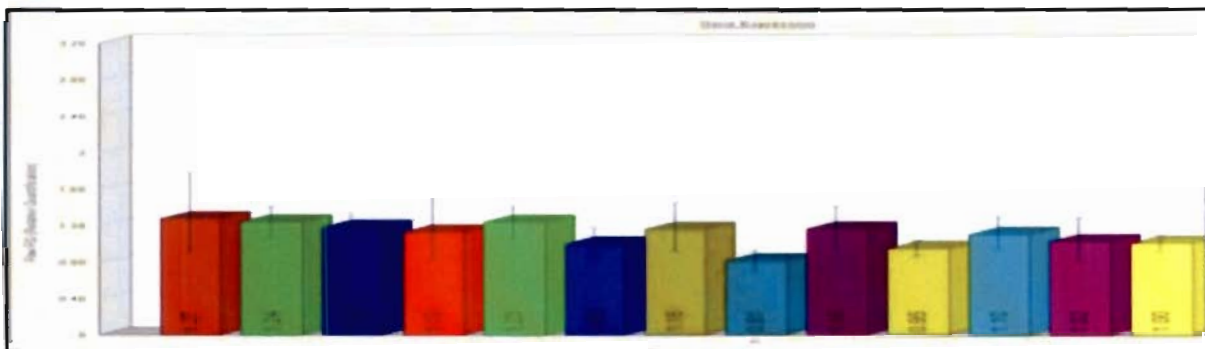
### II.3.1) Etude du niveau de transcription du gène *MECP2* chez des témoins normaux

La quantification des transcrits de *MECP2* sur des ARN totaux extraits de sang frais de témoins normaux (conditionnés en tubes PAXgene®) a été analysée avec pour calibrateur le témoin femme n°2 (F2) et pour endogène *ESD*. Les valeurs de RQ ( $RQ = 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ ) obtenues pour *MECP2\_e2* étaient comprises entre 0.92 et 1.55 chez les témoins sains. Pour *MECP2\_e1*, les quantités de transcrits variaient entre 0.81 et 1.27 fois la quantité retrouvée chez le calibrateur F2. Tous ces ratios étaient proches.

**A**



**B**



**Fig. 14 : Etude de la variabilité physiologique du taux des transcrits du gène *MECP2***

Résultats de la quantification relative des transcrits de *MECP2* sur des ARN totaux extraits de sang frais de témoins normaux.

**A** : *MECP2\_e2*

**B** : *MECP2\_e1*

Le calibrateur choisi est le témoin Femme n°2, l'endogène *ESD*.

De gauche à droite les histogrammes correspondent aux témoins femme (F) suivants : F1, F10, F11, F12, F14, F2, F3, F6, F7, F8, F9, F4, F5

Par la suite, nous avons, pour chaque quantification des transcrits issus de sang frais des patientes, intégré deux calibrateurs : l'ADNc de F2 (femme témoin n°2) et l'ADNc appelé « F pool » (un mélange comprenant 12,5 ng d'ADNc de chacune des 13 femmes témoins). Les valeurs numériques de RQ présentées en II.3 sont celles obtenues lorsque la quantification des transcrits MECP2\_e2 et MECP2\_e1 des patientes était analysée par rapport à l'endogène ESD en utilisant comme calibrateur le témoin « F pool ».

### II.3.2) Etude du niveau de transcription du gène MECP2 chez des patientes Rett porteuses d'une mutation délétère du gène MECP2

L'étude a porté uniquement sur des ARN totaux extraits de LB puisque nous ne disposions pas d'ARN totaux extraits de sang frais pour les patientes Rett porteuses d'une mutation délétère du gène MECP2. Les résultats de cette étude sont regroupés dans le tableau V.

| Patiente avec une mutation dans MECP2 | Mutation MECP2                                     |  |  | RQ   |          |          |
|---------------------------------------|--|--|--|--|----------|----------|
|                                       | Nature de la mutation à l'état hétérozygote (ADNc) | Effet a priori sur le taux de transcrits pour l'allèle muté du gène MECP2 <sup>(1)</sup> | Profil d'inactivation de l'X dans la LB <sup>(2)</sup> | Transcription de l'allèle muté dans la LB <sup>(3)</sup> | MECP2_e2 | MECP2_e1 |
| P 3                                   | c.1158_1200del43                                   | Faible : CSP en fin d'exon 4   | 78%-22%  | Oui : 50%  | 0,75     | 0,71     |
| P12                                   | c.1161_1172del12:1180_1196del17                    | Faible : CSP en fin d'exon 4   | 100%-0%  | Oui : 100%   | 0,87     | 0,27     |
| P4                                    | délétion : exons 3, 4, 3'UTR                       | Très important   | 94%-6%   | NA   | 2,53     | 1,45     |
| P8                                    | c.146C>G   | Important : CSP en position 49 (MECP2_e2) ou 6 (MECP2_e1)                                | 54%-46%  | Oui : 50%  | 1        | 0,52     |
| P9                                    | délétion : exon 3, début de l'exon 4               | Très important   | 53%-47%  | NA   | 1,43     | 1,39     |
| P13                                   | délétion totale                                    | Très important   | 100%-0%  | NA   | 1,66     | 0,66     |

**Tableau V : Quantification relative des transcrits MECP2\_e1/e2 et chez des patientes avec une mutation connue dans le gène MECP2**

- (1) En vert : mutation n'affectant pas a priori le taux des transcrits MECP2\_e1/e2 correspondants à l'allèle délétère.  
En rouge : mutation affectant a priori le taux des transcrits MECP2\_e1/2 correspondants à l'allèle délétère (NMD).
- (2) Les ARN totaux utilisés ont été extraits à partir de LB. L'étude du profil d'inactivation a été réalisée sur de l'ADN génomique extrait en parallèle à l'extraction des ARN totaux.
- (3) La transcription de l'allèle muté a été vérifiée par séquençage des produits de RT-PCR sur les ARN totaux de LB : 50% signifie que les transcrits mutés correspondent à 50% de l'ensemble des transcrits. Les résultats de ces analyses étaient déjà disponibles à mon arrivée au laboratoire (travail effectué par Aline SAUNIER).  
NA : non applicable

CSP : Codon Stop Préaturé



Les patientes P3 et P12 sont porteuses de mutations n'affectant pas a priori la quantité des transcrits *MECP2\_e1* et *MECP2\_e2*. Comme attendu pour la patiente P3, la quantité de transcrits de *MECP2* était quasi-normale, avec des RQ de 0.75 et 0.71. Pour la patiente P12, la quantité de transcrit *MECP2\_e1* était significativement abaissée. Ceci est à mettre en relation avec le profil biaisé de l'inactivation du chromosome X de la LB pour la patiente P12 : seul le chromosome X présentant la mutation de *MECP2* est actif.

Pour les patientes présentant des mutations affectant a priori la quantité de transcrits, les résultats sont de deux types :

- les LB des patientes P4 et P9 présentaient une quantité normale des deux transcrits *MECP2\_e1* et *MECP2\_e2*, sans que cela puisse être expliqué par une inactivation préférentielle du chromosome X porteur de l'allèle délétère de *MECP2* pour la patiente P9.
- les LB des patientes P8 et P13 présentaient une quantité normale de transcrits *MECP2\_e2*, et une quantité diminuée de transcrits *MECP2\_e1*.

Les résultats étaient discordants pour les deux transcrits alternatifs du gène *MECP2*, sans que cela puisse être rapporté à un biais du profil de l'inactivation du chromosome X.

### II.3.3) Etude du niveau de transcription du gène *MECP2* chez des patientes Rett sans mutation connue du gène *MECP2*

Nous avons appliqué notre protocole de qPCR pour évaluer le taux de transcrits *MECP2\_e1* et *MECP2\_e2* chez des patientes Rett typiques non porteuses d'une mutation délétère du gène *MECP2* (après séquençage complet de *MECP2* et recherche de RGT par QMPSF).

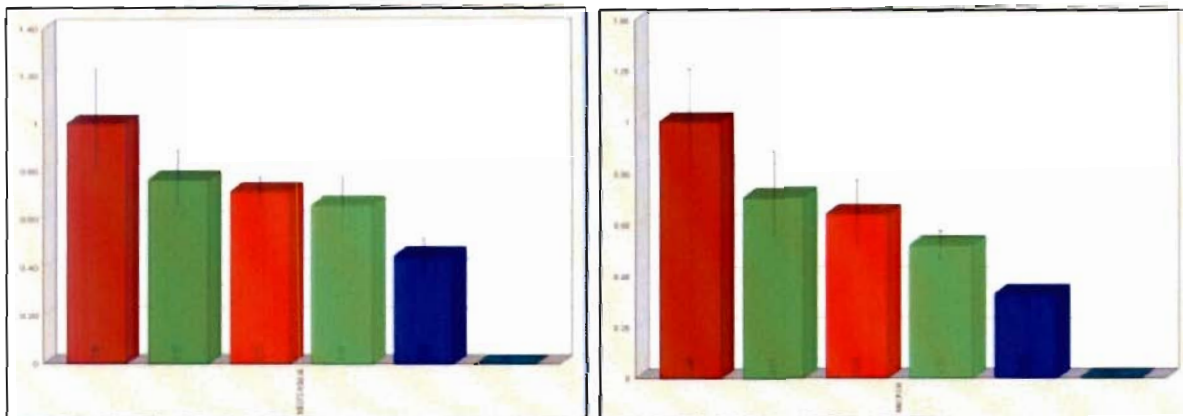
La quantification des transcrits a été réalisée pour 8 patientes. Pour 3 cas nous ne disposions que d'ARN totaux extraits de sang frais. Pour 5 patientes nous disposions à la fois d'ARN totaux extraits de sang frais et extraits de LB, ce qui nous a permis de comparer les résultats de quantification des transcrits de *MECP2* en fonction du matériel biologique de départ.

#### II.3.3.1) Quantification des transcrits *MECP2\_e1/e2* des ARN totaux extraits de sang frais

Les quantités des transcrits *MECP2\_e1* et *MECP2\_e2* étaient diminuées dans le sang des trois patientes P18, P19, P24 qui présentent toutes un profil d'inactivation aléatoire du chromosome X. Cette diminution est plus marquée pour la patiente P24.

## A MECP2A

## MECP2B



## B

| Patiente | RQ MECP2 A | RQ MECP2B | inactivation sang |
|----------|------------|-----------|-------------------|
| P18      | 0.72       | 0.64      | 43%-57%           |
| P19      | 0.66       | 0.52      | 57%-43%           |
| P24      | 0.45       | 0.33      | 57-43%            |

**Fig. 15** : Quantification relative des transcrits MECP2A ( $_e2$ )/B ( $_e1$ ) chez 3 patientes RTT sans mutation connue dans *MEPC2*

**A** : Histogrammes représentant les valeurs de RQ pour les 2 transcrits de *MECP2* des témoins « F pool » et F2 (deux premières colonnes) et des ARN totaux extraits de sang frais pour 3 patientes non mutées P18, P19, P24 (colonnes 3,4,5).

**B** : RQ pour les transcrits MECP2A ( $_e2$ )/B ( $_e1$ ) et profil d'inactivation de l'X. Profil d'inactivation de l'X analysé sur ADN génomique extrait sur sang frais en parallèle à l'extraction d'ARN.

- Calibrateur : ARN extraits de « F pool »
- Endogène : *ESD*

### II.3.3.2) Quantification des transcrits MECP2 $_e1/e2$ et comparaison des niveaux de transcription du gène MECP2 sur des ARN totaux extraits de sang frais ou extraits de LB.

Pour 5 patientes, nous avons pu comparer les résultats de la quantification des transcrits MECP2 $_e1$  et MECP2 $_e2$  dans le sang frais (PAXgene®) et dans une LB. Les résultats de cette analyse sont regroupés dans le tableau VI.

Au préalable nous avons établi les profils d'inactivation du chromosome X :

- inactivation aléatoire dans le sang frais et la LB pour P2
- inactivation biaisée dans le sang frais et la LB pour P5, P16 et P25
- différence d'inactivation : la patiente P14 avait un profil d'inactivation aléatoire in vivo (sang frais) alors que la LB lui correspondant présentait un profil totalement biaisé.

| Patiente<br>non mutée<br><i>MECP2/CDKL5</i> | ARN sang frais      |                |                | ARN LB              |                |                |
|---|---------------------|----------------|----------------|---------------------|----------------|----------------|
|   | Inactivation de l'X | RQ<br>MECP2_e2 | RQ<br>MECP2_e1 | Inactivation de l'X | RQ<br>MECP2_e2 | RQ<br>MECP2_e1 |
| P2  | 51%-49%             | 0.22           | 0.27           | 63%-37%             | 1.43           | 0.47           |
| P5  | 79%-21%             | 0.19           | 0.38           | 78%-22%             | 1.64           | 0.47           |
| P14   | 64%-36%             | 0.74           | 0.83           | 100%-0%             | 1.31           | 0.61           |
| P16   | 70%-30%             | 0.50           | 0.49           | 68%-32%             | 1.96           | 0.94           |
| P25   | 73%-27%             | 0.61           | 0.33           | 100%-0%             | 1.04           | 0.21           |

**Tableau VI : Comparaison des résultats de quantification des transcrits de *MECP2* avec des ARN extraits de sang frais ou de lymphoblastes.**

Pour 5 patientes, nous disposions à la fois de sang frais et d'une LB.

L'étude du profil d'inactivation de l'X a été réalisée sur le même échantillon biologique (prélèvement de sang ou culot de lymphoblastes) que celui utilisé pour l'extraction d'ARN totaux.

- Calibrateur : ARN extraits de « F pool »
- Endogène : *ESD*

Les résultats des quantifications du niveau de transcription du gène *MECP2* sur les deux types d'ARN totaux étaient discordants :

- Les valeurs de RQ des 2 transcrits mesurées sur les ARN extraits de sang frais étaient significativement inférieures à celles observées chez le témoin (calibrateur F pool) pour toutes les patientes (à l'exception du taux de transcrite *MECP2\_e1* de la patiente P14 qui est proche de la normale).
- A contrario les valeurs de RQ pour le transcrite *MECP2\_e2* mesurées dans les LB étaient normales et très variables pour toutes les patientes. Les valeurs de RQ de *MECP2\_e1* mesurées dans les LB étaient plus basses que celles du calibrateur « F pool » pour toutes les patientes (sauf P16).

Pour la patiente P14 avec une différence du profil d'inactivation de l'X entre le sang frais (aléatoire) et la LB (totalement biaisé), il n'y a pas eu de réajustement vers des RQ proches de la normale dans la LB, comme cela arrive lorsque l'X porteur de l'allèle muté est préférentiellement inactivé dans la LB.

Les résultats discordants obtenus avec des ARN extraits de sang frais ou de LB montrent bien qu'une LB n'est pas un bon modèle pour l'étude quantitative du transcriptome.

## DISCUSSION

### I) Analyse du gène *CDKL5* par QM-PSF

La mise au point d'une QMPSF est longue et minutieuse, et nécessite de nombreux essais pour réussir à obtenir une répartition des amplicons au sein d'un nombre le plus restreint possible de PCR multiplex, et une co-amplification homogène au sein de chaque PCR multiplex.

Au terme de nombreux essais, nous avons mis au point un protocole de recherche de RGT de *CDKL5* par QMPSF comportant 3 PCR multiplex avec intégration de la quasi totalité des exons de ce gène. Seule l'inclusion de l'amplicon correspondant à l'exon 19 reste problématique. Après avoir testé, sans résultat, diverses modifications du mélange réactionnel de la PCR, nous avons choisi de changer plutôt l'amorce R (non marquée par un fluorophore et donc moins onéreuse). Un nouveau couple d'amorces devra être choisi, cette fois en déplaçant la zone amplifiée dans les régions introniques entourant l'exon 19.

L'étude d'un panel de 40 patientes présentant un syndrome de Rett avec épilepsie sévère précoce a permis de mettre en évidence une délétion des exons 1, 1A et 1B dans le gène *CDKL5* pour une patiente présentant un syndrome de Rett atypique avec épilepsie depuis l'âge de 3 semaines. Avant notre étude aucun remaniement partiel de *CDKL5* n'avait été décrit, probablement car les approches développées jusqu'alors étaient soit de type séquençage, soit de type CGH (Comparative Genomic Hybridation) array, de résolution insuffisante pour ce type d'anomalie. Récemment, trois remaniements génomiques de très grande taille englobant *CDKL5* dans son intégralité et des gènes contigus ont été rapportés grâce à des études en CGH. Une délétion de 2,8 Mb en Xp22 est décrite chez un garçon, présentant une encéphalopathie sévère, une tétralogie de Fallot et une cataracte bilatérale congénitale [20]. Dans une autre publication, une famille comprenant plusieurs membres atteints a été étudiée, tous présentent un phénotype commun (hernie inguinale bilatérale dans l'enfance, dysmorphie, retard mental, et épilepsie à début anténatal pour l'un d'entre eux, cataracte unilatérale pour un autre), et sont porteurs d'une duplication de 8,5 Mb (communication personnelle). Plus récemment, une autre équipe a décrit une duplication de très grande taille (21 Mb) en Xpter comprenant le gène *CDKL5* (et les gènes *NLGN4X* et *RPS6KA3*), chez un garçon présentant une dysmorphie, une hypotonie généralisée et un déficit des acquisitions psychomotrices (il n'y a pas de notion d'épilepsie pour ce cas mais le suivi clinique n'a pas pu être poursuivi par l'équipe)[19]. Ces phénotypes sont distincts de ceux observés en association avec une mutation ponctuelle de *CDKL5*, puisqu'il s'agit ici d'une duplication du gène *CDKL5* dans son intégralité, augmentant donc la quantité de protéine, et aussi en raison des nombreux autres gènes impliqués dans ces RGT. La mise en évidence d'un RGT partiel par notre étude confirme l'intérêt de recourir dans le diagnostic moléculaire du syndrome de Rett à des méthodes de quantification génomique dans l'étude du gène *CDKL5*.

Ce résultat a été confirmé par la réalisation d'une deuxième technique de quantification génomique, la MLPA. Si une troisième technique, telle que la qPCR, met également en évidence cette délétion partielle en 5' du gène *CDKL5*, on pourra alors chercher à délimiter précisément l'étendue de cette délétion, sur les séquences génomiques en amont de l'exon 1 du gène *CDKL5* (et notamment sur la région promotrice du gène, voire sur les gènes en amont si ce RGT est important), mais aussi en 3', au sein de la séquence intronique entre les exons 1B et 2 de *CDKL5*.

La région délétée est dans la région 5'UTR du gène, le mécanisme en cause est probablement une haploinsuffisance. En effet, si cette délétion concerne aussi le promoteur du gène, l'allèle délété ne sera pas transcrit. Si le promoteur est intact, cette délétion de la région 5'UTR modifie probablement les mécanismes post-transcriptionnels (modification de la coiffe), entraînant ainsi une instabilité de l'ARNm résultant de l'allèle muté. Dans ces deux hypothèses, l'allèle normal est le seul à produire un ARNm stable, et la quantité de transcrit de *CDKL5* est alors diminuée de moitié. Nous allons chercher à prouver l'effet de ce RGT sur le plan transcriptomique, en développant une RT-qPCR pour quantifier les transcrits de *CDKL5* chez cette patiente.

Il est également intéressant de poursuivre cette recherche de RGT sur un plus grand nombre de patientes, de manière à établir la proportion exacte de ce type de mécanisme mutationnel touchant *CDKL5* chez les patientes présentant un syndrome de Rett variant. En effet, si l'on prend l'exemple du gène *MECP2*, les RGT représentent 10% des allèles délétères. Sachant que le criblage du gène *CDKL5* pour une série de 43 patientes a permis d'identifier 3 allèles délétères (avant la mise en place de notre protocole), il faudrait statistiquement tester au minimum 134 patientes pour détecter 10 allèles délétères, et donc espérer détecter 1 RGT dans le gène *CDKL5*. Dans ce panel de 43 patientes, nous avons mis en évidence 1 RGT et 3 allèles délétères, donc le RGT représente actuellement 25% des allèles délétères.

L'obtention d'un témoin muté (délétion ou duplication partielle) serait très intéressante, pour pouvoir valider les conditions techniques des PCR multiplex pour l'analyse de séries de patientes. Les résultats obtenus lors de l'étude de ce panel de patientes mettent en lumière l'importance de la qualité de l'ADN génomique et donc de la technique d'extraction utilisée. Lors de l'extraction d'ADN à l'aide du kit 8Lx Magstration® Genomic DNA (PSS), des billes magnétiques peuvent persister dans l'échantillon d'ADN, et perturber l'amplification de l'ADN génomique. Le recours à la purification de l'ADN génomique à l'aide du kit QIAamp® DNA Blood Mini-Kit (Qiagen) permet de rectifier cette anomalie.

Ce protocole de QMPSF est utilisable pour améliorer le diagnostic moléculaire des patientes présentant les critères cliniques d'éligibilité à l'étude de *CDKL5*. Cela entraînera un bénéfice direct pour les familles chez lesquelles l'étiologie génétique des encéphalopathies convulsivantes précoces sévères sera posée grâce à cette nouvelle approche. Néanmoins il est nécessaire d'être extrêmement vigilant sur l'analyse des résultats de la QMPSF. La bonne qualité des acides nucléiques testés est essentielle pour ne pas conclure à tort à un RGT (dû à un artefact technique, comme dans le cas de la patiente porteuse d'une duplication potentielle comprenant les exons 2 à 20). Tout doute doit faire poser la question d'une purification de l'ADN testé. L'analyse d'un ADN extrait à partir d'un second prélèvement sanguin indépendant est de toute façon absolument nécessaire, pour ne pas porter un diagnostic moléculaire erroné, qui, une fois établi, entraîne l'arrêt de toute autre investigation, notamment sur un autre gène. Les conséquences peuvent être dramatiques pour les familles concernées, plus particulièrement si se pose la question d'une récurrence possible. Dans le cas d'une nouvelle grossesse, un diagnostic prénatal peut être envisagé, à la recherche de l'anomalie identifiée dans *CDKL5* chez le cas probant.

## II) Quantification relative des transcrits du gène *MECP2*

Nous avons choisi d'utiliser une chimie reposant sur l'utilisation d'un agent intercalant, le SYBR® Green (Applied Biosystems) pour le protocole de quantification relative des transcrits du gène *MECP2*. Cette technologie a été préférée à celle basée sur l'utilisation de sondes TaqMan® (Applied Biosystems) plus onéreuse. En effet, avec la technologie TaqMan® chaque

couple d'amorces sélectionné doit être spécifiquement marqué lors de la synthèse en 5' (fluorophore) et en 3' (quencher).

L'utilisation de gènes endogène comme contrôles internes implique que ces gènes doivent être exprimés à un niveau constant chez un même individu dans le type cellulaire étudié (reproductibilité intraindividuelle) et si possible à un niveau semblable chez les différents individus (comparaison inter individuelle). *β actine* et *GAPDH* sont des endogènes très utilisés jusqu'alors dans les travaux de quantification de transcrits, mais d'autres travaux ont établis récemment leur très grande variabilité intraindividuelle, notamment en fonction du tissu étudié. D'autres endogènes sont proposés par les auteurs [25] [26] pour les travaux de quantification d'ARNm comme le gène de l'ARN 18S, le gène *ESD* (estérase D/formylglutathione hydrolase, gène situé sur le chromosome 13) et le gène *POLR2A* (polymerase RNA II polypeptide A). L'endogène *ESD* est particulièrement intéressant pour notre travail car, en plus d'être fiable, son niveau d'expression est comparable à celui des transcrits cibles (Ct variant entre 24 et 29), ce qui n'est pas le cas de la *β actine* (Ct variant entre 16 et 22).

La plus grande rigueur doit être observée lors de la réalisation de la technique (manipulation précautionneuse des ARN totaux très labiles, intégration systématique de contrôles internes « blancs » et contrôle de la qualité des ARN). Cette rigueur conditionne également l'analyse des résultats : utilisation des deux endogènes validés lors de l'établissement des courbes d'efficacité et de spécificité, comparaison des résultats obtenus avec l'un et l'autre des endogènes. Dans notre travail, les résultats sont homogènes quel que soit l'endogène utilisé. De même, nous avons systématiquement intégrés deux témoins normaux (témoin femme n°2 et témoin provenant d'un pool d'ADNc de 13 témoins femmes) pour pouvoir normaliser les résultats sur deux ADNc différents.

Ce protocole de quantification a été mené en parallèle sur les ARN totaux extraits de deux types de cellules différentes : les leucocytes circulants (sang frais) et les lymphoblastes. L'établissement d'une LB qui correspond à une lignée immortalisée est très intéressant car de nombreuses cellules peuvent être obtenues à partir d'un seul prélèvement sanguin, ce qui éviterait en pratique pédiatrique de devoir convoquer et faire déplacer l'enfant malade et ses parents, pour réaliser une nouvelle ponction veineuse, lorsque l'on désire poursuivre le diagnostic moléculaire par d'autres techniques. On peut en effet extraire les acides nucléiques et les protéines en quantités très importantes grâce à la lignée lymphoblastoïde, que l'on peut décongeler et remettre plusieurs fois en culture, de manière à obtenir le matériel nécessaire (ADN, ARN, protéines) aux études diagnostiques (du génome en techniques de cytogénétique et de biologie moléculaire, du transcriptome et du protéome), au lieu de prélever à nouveau l'enfant. Ce modèle semblait séduisant pour pouvoir étudier par plusieurs techniques, en plusieurs essais, le taux de transcrits *MECP2\_e1* et *MECP2\_e2* des patientes Rett sans mutation délétère connue dans le gène *MECP2* ou *CDKL5*. Les résultats de ce protocole de quantification démontrent qu'une LB n'est pas un modèle adapté à l'étude du transcriptome. Les profils d'inactivation du chromosome X pour une même patiente sont très souvent différents entre les leucocytes circulants et les lymphoblastes. Ceci suggère que le taux de transcrits du gène *MECP2* (porté par l'X) dans une LB ne reflète absolument pas la réalité physiologique. Comme le montre notre travail sur les LB de patientes porteuses d'une mutation délétère de *MECP2*, le taux de transcrits *MECP2\_e1* et *MECP2\_e2* n'est pas en accord avec le génotype (présence d'une mutation délétère diminuant a priori le taux de transcrits notamment en raison du système de surveillance des ARNm NMD). Le plus souvent la baisse escomptée n'a pas été observée. Pour ces ARN extraits de LB, les résultats de quantification sont à rapprocher des profils d'inactivation du chromosome X. En effet, une inactivation préférentielle de l'X porteur de l'allèle délétère peut expliquer des taux de transcrits normaux au sein d'une LB. Dans une lignée lymphoblastoïde, il existe une grande variation de

l'expression de *MECP2*, en raison de biais dûs à la transformation, à la culture des cellules, et aux niveaux de méthylation des îlots CpG au niveau des promoteurs des gènes. Tous ces facteurs conditionnent le taux de transcrits dans les LB de nos patientes Rett porteuses d'une mutation délétère de *MECP2*, les résultats de la quantification de transcrits sur ARN extraits de LB ne sont donc pas purement imputables à la seule mutation délétère du gène *MECP2*.

Nous nous sommes donc concentrés sur les études du niveau de transcription du gène *MECP2* sur les ARN extraits de sang frais, conditionné en tube PAXgene®. Ce type de conditionnement permet l'étude du transcriptome à un moment donné (steady state) : les réactifs contenus dans le tube figent la quantité des ARN totaux, en inhibant la dégradation des ARN, et en arrêtant toute synthèse d'ARN dans le sang après le prélèvement.

Nous avons observé une diminution clairement significative de la quantité des 2 transcrits de *MECP2* au sein des ARN totaux issus de sang frais de trois patientes non porteuses d'une mutation délétère connue de *MECP2*. Chez ces patientes l'inactivation du chromosome X au locus HUMARA était aléatoire, ce qui exclut l'hypothèse d'une diminution du taux de transcrits simplement due une inactivation préférentielle de l'allèle normal. Ces données ne permettent en aucun cas de conclure à une diminution de l'expression du gène *MECP2*, puisque pour l'instant nous ne disposons pas d'étude quantitative des protéines MeCP2 pour ces patientes, nécessaires pour établir une corrélation entre le niveau de transcription et le niveau d'expression du gène *MECP2*.

La quantification des transcrits de *MECP2* a été rapportée dans une publication récente [27]. Cette étude a elle aussi permis d'établir que la variabilité inter-individuelle du taux de transcrits des témoins non porteurs de syndrome de Rett est faible. Les résultats de l'étude de patientes porteuses d'un syndrome de Rett sans mutation délétère de *MECP2* décelée sont les suivants : diminution du taux de transcrits pour 3 des 5 patientes porteuses d'un syndrome de Rett typique, et pour 3 des 7 patientes porteuses d'un syndrome de Rett atypique étudiées. Pour 3 patientes le taux de transcrit est plus élevé que chez les témoins, ce qui appelle des investigations complémentaires.

Différentes hypothèses peuvent être formulées pour rendre compte de cette diminution significative du niveau de transcription du gène *MECP2* dans le sang circulant de patientes pour lesquelles aucune mutation délétère n'a été identifiée après séquençage et étude par QMPSF du gène *MECP2*. Tout d'abord, il pourrait exister une modification de certaines régions régulant l'expression de *MECP2*, non détectée par les techniques diagnostiques actuelles [28] :

- région promotrice du gène [29] (core promoter), localisée entre -179 et -309 pb à partir du codon d'initiation de la transcription du gène *MECP2* (nt 89330-89459 de gi : 22830571)
- régions « enhancer » [29] : région F11 (nt 15247-16009 de gi : 22830571) située en région 3'UTR de *MECP2*, régions F16 (nt 154922-155763 de gi : 22773272) et F17 (nt 137346-137692 de gi : 22773272) localisées en région intergénique entre les gènes *IRAK1* et *CXorf12*, et région F21 (nt 121266-122055 de gi : 22773272), située dans l'intron 1 du gène *HCFC1*.
- régions « silencer » [29] : F3 (nt 83668-84652 de gi : 22830571) située au sein de l'intron 1 de *MECP2*, et F13 (nt 13121-13891 de gi : 22830571) localisée en région 3'UTR de *MECP2*.

Une modification d'une de ces régions régulatrices, située même très à distance du gène cible, qui lui est intègre, peut suffire à entraîner une pathologie humaine. Le plus souvent le gène cible en question est un gène clé du développement. On peut citer comme exemple l'aniridie de type II avec iris hypoplasique (OMIM 106210), due à une expression diminuée du gène

*PAX6*. Une mutation délétère de la région régulatrice de *PAX6*, localisée dans le gène *ELP4*, à 200 kb de *PAX6*, alors que le gène *PAX6* est intègre, entraîne à elle seule une diminution de l'expression de *PAX6*, et la pathologie. Les études des modèles murins ont permis de mettre en évidence dans cette même région du gène *ELP4* des régions régulatrices spécifiques (enhancers) contrôlant des gènes impliqués dans le développement de la rétine et du cristallin. [29]. Les souris knockout pour cette région régulatrice de *PAX6* au sein d'*ELP4* développent une aniridie de type II. Lorsqu'on rétablit cette seule région régulatrice chez ces souris, la pathologie ne se développe pas : cette seule région régulatrice peut bien être à elle seule la cause de la pathologie.

Une autre hypothèse explicative à cette diminution de la transcription du gène *MECP2* serait l'existence d'une variation intronique au sein du gène *MECP2* dans une zone non explorée par le séquençage, entraînant un épissage anormal. Il existerait alors une synthèse de transcrits anormaux instables (dégradés par le NMD) ou à l'origine de protéines tronquées (CSP).

Enfin, une mutation délétère dans un gène codant une protéine régulant la transcription du gène *MECP2* pourrait également modifier la quantité des transcrits *MECP2\_e1* et *MECP2\_e2*.

Des études complémentaires sont donc nécessaires pour établir la cause de la diminution significative du taux de transcrits *MECP2\_e1* et *MECP2\_e2* chez les trois patientes Rett non porteuses de mutation délétère du gène *MECP2*, avec des résultats prometteurs en RT-qPCR. La région promotrice (localisée entre -179 et -309 pb à partir du codon d'initiation de la transcription du gène *MECP2*) a déjà été séquencée au laboratoire de génétique du CHU de Nancy pour toutes les patientes, et aucune mutation délétère n'a été décelée. Nous allons maintenant explorer l'intégrité des régions enhancers récemment impliquées dans la régulation de la transcription du gène *MECP2* [29], en mettant au point une technique de QMPSF spécifique pour ces régions.

De même, l'hypothèse d'un épissage anormal va être considérée. La diminution de synthèse des transcrits normaux *MECP2\_e1* et *MECP2\_e2*, objectivée par la RT-qPCR est alors une preuve indirecte de l'existence d'un transcrit anormal. Nous allons essayer de mettre en évidence ce transcrit anormal, certainement plus labile que les transcrits normaux, par une technique de RT-PCR : amplification des transcrits *MECP2\_e1* et *MECP2\_e2* dans leur globalité et analyse des produits de RT-PCR par électrophorèse sur gel d'agarose.



## CONCLUSION

Le syndrome de Rett (RTT, OMIM #312750) est une maladie génétique pan-éthnique de transmission dominante liée au chromosome X qui touche quasi exclusivement les filles. Le syndrome de Rett survient à une fréquence d'environ 1/10000-1/15000 naissances féminines, soit environ 40 à 60 nouveaux cas par an en France. Cette pathologie constitue ainsi la deuxième cause de retard mental chez les filles après la trisomie 21.

Malgré une stratégie de criblage mutationnel diversifiée comprenant un séquençage des exons et des bordures exon-intron des gènes *MECP2* et *CDKL5* ainsi que la recherche de grands réarrangements dans *MECP2* par QMPSF, l'étiologie génétique reste encore inconnue pour au moins 10% des cas de Rett typiques mais également pour une proportion beaucoup plus importante de Rett variants.

Il est probable que certaines mutations échappent encore à la stratégie actuelle de diagnostic moléculaire du laboratoire pour le syndrome de Rett. Il était donc nécessaire de développer des analyses complémentaires des gènes *MECP2* et *CDKL5* afin d'augmenter la sensibilité du diagnostic moléculaire devant une suspicion clinique de syndrome de Rett.

Au terme de nombreux essais, nous avons mis au point un protocole de recherche de RGT de *CDKL5* par QMPSF et l'étude d'un panel de 40 patientes présentant un syndrome de Rett avec épilepsie sévère précoce a permis de mettre en évidence une délétion des exons 1, 1A et 1B dans le gène *CDKL5* pour une patiente présentant un syndrome de Rett atypique avec épilepsie depuis l'âge de 3 semaines. Avant notre étude aucun remaniement partiel de *CDKL5* n'avait été décrit. Nous allons poursuivre l'étude de cette délétion, en définir les limites précises, et en étudier les répercussions sur la transcription du gène *CDKL5*.

Nous avons mis au point une technique de quantification relative (RT-qPCR) des transcrits *MECP2\_e1* et *MECP2\_e2* à l'aide du SYBRGreen® en utilisant la technique d'analyse des  $\Delta\Delta Ct$ . Nous avons ainsi pu étudier le taux de transcrits des patientes porteuses d'un syndrome de Rett typique sans mutation délétère des gènes *MECP2* et *CDKL5*. Pour trois patientes ce taux est significativement diminué, et nous allons poursuivre l'étude de ses patientes afin de chercher quels sont les mécanismes moléculaires qui entraînent cette anomalie de transcription. Désormais cette technique sera appliquée à chaque fois qu'aucune mutation délétère ne sera mise en évidence à l'issue de la stratégie de diagnostic moléculaire pour une patiente porteuse d'un syndrome de Rett typique.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Rett, A.,  
Über ein eigenartiges hirnatrophisches Syndrom bei hyperammonämie in Kindesalter.  
*[On a unusual brain atrophy syndrome in hyperammonemia in childhood]*.  
Wien Med Wochenschr, 1966. **116**(37): p. 723-6.
2. Hanefeld, F.,  
*The clinical pattern of the Rett syndrome*.  
Brain Dev, 1985. **7**(3): p. 320-5.
3. Amir, R.E., et al.,  
*Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2*.  
Nat Genet, 1999. **23**(2): p. 185-8.
4. Bourdon, V., et al.,  
*A detailed analysis of the MECP2 gene: prevalence of recurrent mutations and gross DNA rearrangements in Rett syndrome patients*.  
Hum Genet, 2001. **108**(1): p. 43-50.
5. Weaving, L.S., et al.,  
*Rett syndrome: clinical review and genetic update*.  
J Med Genet, 2005. **42**(1): p. 1-7.
6. Kriaucionis, S. and A. Bird,  
*The major form of MeCP2 has a novel N-terminus generated by alternative splicing*.  
Nucleic Acids Res, 2004. **32**(5): p. 1818-23.
7. Deng, V., et al.,  
*FXD1 is an MeCP2 target gene overexpressed in the brains of Rett syndrome patients and Mecp2-null mice*. Hum Mol Genet, 2007. **16**(6): p. 640-50.
8. Moretti, P. and H.Y. Zoghbi,  
*MeCP2 dysfunction in Rett syndrome and related disorders*.  
Curr Opin Genet Dev, 2006. **16**(3): p. 276-81.
9. Collins, A.L., et al.,  
*Mild overexpression of MeCP2 causes a progressive neurological disorder in mice*.  
Hum Mol Genet, 2004. **13**(21): p. 2679-89.
10. Philippe, C., et al.,  
*Spectrum and distribution of MECP2 mutations in 424 Rett syndrome patients: a molecular update*.  
Eur J Med Genet, 2006. **49**(1): p. 9-18.

11. Quenard, A., et al.,  
*Deleterious mutations in exon 1 of MECP2 in Rett syndrome.*  
Eur J Med Genet, 2006. **49**(4): p. 313-22.
12. Archer, H.L., et al.,  
*Gross rearrangements of the MECP2 gene are found in both classical and atypical Rett syndrome patients.*  
J Med Genet, 2006. **43**(5): p. 451-6.
13. Laccone, F., et al.,  
*Large deletions of the MECP2 gene detected by gene dosage analysis in patients with Rett syndrome.*  
Hum Mutat, 2004. **23**(3): p. 234-44.
14. Casilli, F., et al.,  
*Rapid detection of novel BRCA1 rearrangements in high-risk breast-ovarian cancer families using multiplex PCR of short fluorescent fragments.*  
Hum Mutat, 2002. **20**(3): p. 218-26.
15. Kalscheuer, V.M., et al.,  
*Disruption of the serine/threonine kinase 9 gene causes severe X-linked infantile spasms and mental retardation.* Am J Hum Genet, 2003. **72**(6): p. 1401-11.
16. Scala, E., et al.,  
*CDKL5/STK9 is mutated in Rett syndrome variant with infantile spasms.*  
J Med Genet, 2005. **42**(2): p. 103-7.
17. Tao, J., et al.,  
*Mutations in the X-linked cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5/STK9) gene are associated with severe neurodevelopmental retardation.*  
Am J Hum Genet, 2004. **75**(6): p. 1149-54.
18. BAHI-BUISSON, N., et al.,  
*Genotype influences epilepsy progression in patients with CDKL5 mutations.*  
Neurology, in press.
19. Froyen, G., et al.,  
*Detection of genomic copy number changes in patients with idiopathic mental retardation by high-resolution X-array-CGH: important role for increased gene dosage of XLMR genes.*  
Hum Mutat, 2007. **28**(10): p. 1034-42.
20. Van Esch, H., et al.,  
*Encephalopathy and bilateral cataract in a boy with an interstitial deletion of Xp22 comprising the CDKL5 and NHS genes.*  
Am J Med Genet A, 2007. **143**(4): p. 364-9.
21. Gatta, V., et al.,  
*Identification of deletions and duplications of the DMD gene in affected males and carrier females by multiple ligation probe amplification (MLPA).*  
Hum Genet, 2005. **117**(1): p. 92-8.

22. Van Esch, H., et al.,  
*Duplication of the MECP2 region is a frequent cause of severe mental retardation and progressive neurological symptoms in males.*  
Am J Hum Genet, 2005. **77**(3): p. 442-53.
23. Philippe, C.,  
*Cartographie physique de la région q21 du chromosome X humain,*  
in *Laboratoire de Génétique Médicale.* 1994, INPL: Nancy. p. 173.
24. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen,  
*Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.* Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
25. Saviozzi, S., et al.,  
*Selection of suitable reference genes for accurate normalization of gene expression profile studies in non-small cell lung cancer.*  
BMC Cancer, 2006. **6**: p. 200.
26. Zhu, L.J. and S.W. Altmann,  
*mRNA and 18S-RNA coapplication-reverse transcription for quantitative gene expression analysis.*  
Anal Biochem, 2005. **345**(1): p. 102-9.
27. Petel-Galil, Y., et al.,  
*Comprehensive diagnosis of Rett's syndrome relying on genetic, epigenetic and expression evidence of deficiency of the methyl-CpG-binding protein 2 gene: study of a cohort of Israeli patients.*  
J Med Genet, 2007. **44**(2): p. e56.
28. Cartegni, L., S.L. Chew, and A.R. Krainer,  
*Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing.* Nat Rev Genet, 2002. **3**(4): p. 285-98.
29. Liu, J. and U. Francke,  
*Identification of cis-regulatory elements for MECP2 expression.*  
Hum Mol Genet, 2006. **15**(11): p. 1769-82.

VU

**NANCY, le 16 octobre 2007**

Le Président de Thèse

**Professeur P. MONIN**

**NANCY, le 29 octobre 2007**

Le Doyen de la Faculté de Médecine  
Par délégation

**Professeur F. ALLA**

AUTORISE À SOUTENIR ET À IMPRIMER LA THÈSE

**NANCY, le 5 novembre 2007**

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY 1

**Professeur J.P. FINANCE**

---

## RÉSUMÉ DE LA THÈSE

Le syndrome de Rett est une maladie génétique de transmission dominante liée à l’X. Le diagnostic moléculaire est possible, les mutations du gène *MECP2* sont responsables de 90% des cas de RTT typiques. Un second locus, le gène *CDKL5*, a été impliqué chez des patientes avec un RTT atypique et épilepsie précoce. Notre stratégie actuelle de criblage mutationnel comprend le séquençage des gènes *MECP2/CDKL5* et la recherche de grands réarrangements de *MECP2*. Il se peut néanmoins que certaines mutations (grands réarrangements de *CDKL5*, mutations affectant la transcription de *MECP2*) échappent à cette stratégie de diagnostic moléculaire.

Le but de ce travail était de développer des stratégies nouvelles d’analyse des gènes *MECP2* et *CDKL5* pour augmenter la sensibilité du diagnostic moléculaire devant une suspicion de RTT.

Nous avons mis au point un protocole de QMPSF pour la recherche de grands réarrangements du gène *CDKL5*. Ce protocole a été appliqué à 40 patientes RTT avec épilepsie précoce. Nous avons détecté une délétion des exons 1, 1A, et 1B sur ce panel de 40 patientes.

Nous avons également mise en place une méthode de quantification relative des transcrits du gène *MECP2* par RT-qPCR. Ce protocole de quantification a été appliqué à des ARN totaux extraits de lymphoblastes ou de leucocytes. Les résultats obtenus sur les ARN extraits de lymphoblastes montrent qu’il existe une grande variabilité de transcription du gène *MECP2* dans ces lignées cellulaires qui ne constituent donc pas un bon modèle pour toute étude portant sur le transcriptome. L’application de ce protocole à des ARN extraits de sang frais montre une faible variabilité interindividuelle chez des témoins normaux. Nous avons donc quantifié le taux de transcrits de *MECP2* chez des patientes RTT typiques sans mutation connue dans *MECP2/CDKL5*. L’analyse d’une première série de 8 patientes montrent une baisse significative du taux de transcrits *MECP2A/B* dans 3 cas. Ces résultats préliminaires nécessitent des études complémentaires pour trouver la(es) cause(s) de la diminution du taux de transcrits chez ces patientes.

---

## TITRE EN ANGLAIS

Rett syndrome : implementation of novel diagnostic assays for characterization of new disease causing mutations affecting the *MECP2* and *CDKL5* genes.

---

## THÈSE DE MÉDECINE SPÉCIALISÉE – ANNÉE 2007

MOTS CLÉS : syndrome de Rett, *MECP2*, RT-qPCR, *CDKL5*, QMPSF.

---

## INTITULÉ ET ADRESSE DE L’UFR

Faculté de médecine de Nancy  
9, avenue de la forêt de Haye  
54505 VANDOEUVRE-LES-NANCY Cedex