

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH  
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE  
FES



Année 2014

Thèse N° 087/14

# L'ETUDE MOLECULAIRE DU SYNDROME DE RETT ( A propos de 08 cas)

THESE

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 18/06/2014

PAR

**M. BENZYANE ABDELMAJID**

Né le 19 Février 1987 à Errachidia

POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN MEDECINE

**MOTS-CLES :**

Les gènes MECP2 - Le séquençage-PCR - Les mutations du gène MECP2

**JURY**

M. HIDA MOUSTAPHA.....	PRESIDENT
Professeur de Pédiatrie	
M. OULDIM KARIM.....	RAPPORTEUR
Professeur agrégé de Génétique	
Mme. CHAOUKI SANA.....	} JUGES
Professeur de Pédiatrie	
M. AALOUANE RACHID.....	
Professeur agrégé de Psychiatrie	

# Sommaire

INTRODUCTION.....	5
PARTIE THEORIQUE.....	7
1-Présentation générale du syndrome de Rett.....	8
1-1-Historique.....	8
1-2-Maladies génétiques liées au chromosome X.....	9
1-3-Définition du syndrome de Rett.....	13
1-4-Epidémiologie.....	13
1-5- Diagnostic.....	14
1-5-1-Syndrome de Rett typique.....	15
1-5-2-Syndrome de Rett atypique.....	17
1-6-Examens complémentaires.....	18
1-6-1-Examens neurologiques.....	18
1-6-2-Examens neuroradiologiques :.....	20
1-6-3-Examens biologiques.....	22
1-6-4-Examens anatomopathologiques.....	24
1-6-Evolution.....	27
1-7-Diagnostic différentiel.....	31
1-7-1-L'AUTISME INFANTILE.....	31
1-7-2-LA CEROIDE LIPOFUSCINOSE INFANTILE.....	34
1-7-4-SYNDROME D'ANGELMAN.....	35
1-7-5-LA SCLEROSE TUBEREUSE :.....	36
1-7-6-UN PROCESSUS TOXIQUE <<ENCEPHALITIQUE>>.....	36
1-7-7-DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL EN FONCTION DES STADES EVOLUTIFS DE LA MALADIE.....	36
1-8-Traitement.....	37
1-8-1 Traitement curatif.....	37

1-8-2 Traitement symptomatique .....	37
2-Présentation génétique du syndrome due Rett.....	40
2-1-Profil d'inactivation du chromosome X.....	40
2-2-Implication de MECP2 dans la différenciation et la maturation neuronale ..	41
2-3-Structure et régulation de l'expression de MECP2 .....	42
2-3-1-Structure de MeCP2 .....	42
2-3-2- Identification de MeCP2 et de ses isoformes .....	44
2-3-3-Domains associés à la fonction de MeCP2 .....	46
2-3-4-Régulation de l'expression de MeCP2 .....	50
2-4-Fonction biologique de MECP2 .....	51
2-4-1- Répression de la transcription .....	51
2-5-Différentes mutations de MECP2.....	56
2-6- Les gènes ciblés.....	57
2-6-1-Identification de gènes cibles par approche globale .....	57
2-6-2-Gènes soumis a l'empreinte génétique parentale .....	58
2-6-3- Gene du Brain-derived neurotrophic factor .....	60
2-6-4- Les gènes de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrenalien.....	62
<b>PARTIE PRATIQUE.....</b>	<b>64</b>
<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>65</b>
1-Matériels.....	66
2-Méthodes.....	67
A-Prélèvement des patientes.....	67
B- Extraction d'ADN génomique sur suspension cellulaire.....	68
1-Extraction d'ADN par SEL .....	68
2-Extraction d'ADN par KIT commercialisé :.....	68
C-Dosage d'ADN extrait .....	69
D-Amplification des séquences nucléotidiques par réaction en chaîne par polymérisation (PCR) :.....	69
a-Principe de la PCR: .....	69

b–Les réactifs de la PCR .....	70
c–Principe de l'amplification d'ADN par la technique PCR:.....	71
d– Limites de la PCR : .....	73
E– Migration du produit PCR par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%.....	74
F–Séquençage de l'ADN: .....	75
<b>RESULTATS .....</b>	<b>78</b>
I–Résultat de l'étude cliniques des patientes.....	79
II –Résultats d'extraction d'ADN :.....	81
III –Résultats de dosage d'ADN par nanDrop:.....	81
IV –Résultats de PCR – séquençage: .....	82
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>85</b>
1–Facteurs épidémiologiques.....	86
1–1–Prévalence :.....	86
1–2–Sexe.....	87
1–3–L'histoire familiale.....	88
2–Manifestations cliniques .....	89
3–Formes cliniques :.....	96
4–Etude moléculaire : .....	96
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>100</b>
<b>RESUME .....</b>	<b>102</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>106</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>122</b>

## ABREVIATIONS

<b>ADN</b>	: Acide Désoxyribonucléique
<b>ARN</b>	: Acide Ribonucléique
<b>ATCD</b>	: antécédent
<b>Bdnf</b>	: Brain-derived neurotrophic factor
<b>CTD <math>\alpha</math></b>	: C-terminal Domain $\alpha$
<b>CTD <math>\beta</math></b>	: C-terminal Domain $\beta$
<b>dNTP</b>	: deoxynucleotide triphosphate
<b>Exo</b>	: Exonucléase
<b>EDTA</b>	: Ethylène Diamine Tétracétique acide
<b>FBP11</b>	: Forming Binding Protein 11
<b>HDAC</b>	: Histones Désacétylases
<b>HMGD1</b>	: High Mobility Group protein-like Domain 1
<b>HMGD2</b>	: High Mobility Group protein-like Domain 2
<b>HTM</b>	: Histone Méthyltransférase
<b>IPA</b>	: isopropanol
<b>Lys</b>	: lysine
<b>MBD</b>	: Methyl-CpG Binding Domain
<b>MeCP2</b>	: Methyl-CpG-binding Protein 2
<b>PCR</b>	: Polymerase Chain Reaction
<b>PM</b>	: Psychomoteur
<b>RMN</b>	: Résonance Magnétique Nucléaire
<b>SAP</b>	: Phosphatase alcaline de crevette
<b>Sd</b>	: Syndrome
<b>SLB</b>	: Solution de la Lyse des globules Blanc
<b>Taq</b>	: Thermus Aquaticus polymerase
<b>Tm</b>	: Température d'hybridation des amorces
<b>TRD</b>	: Domaine de Répression de la Transcription
<b>VCN</b>	: vitesses de conduction nerveuse

# INTRODUCTION

Le syndrome de Rett est une maladie d'origine génétique causée dans près de 80% des cas typiques et 30% des formes atypiques par des mutations dans le gène MECP2 localisé en Xq28 qui est un répresseur de la transcription. La perte de la fonction de la protéine MeCP2 pourrait entraîner une surexpression de certains gènes, qui serait dommageable pour le développement du système nerveux central.

Cliniquement on note un développement quasi normal lors de la première année suivi d'une régression psychomotrice rapide avec perte de l'utilisation volontaire des mains et retrait social. Une décélération de la croissance du périmètre crânien s'observe parallèlement et correspond à une atrophie cérébrale diffuse, affectant la substance grise. Les patients évoluent ensuite vers un tableau de polyhandicap souvent compliqué d'épilepsie puis de l'apparition d'une scoliose.

Il n'y a pas de traitement à visée étiologique. Il est néanmoins important de proposer un traitement symptomatique ainsi qu'une prise en charge éducative adaptée.

Nous rapportons une étude réalisée chez 8 patientes âgées entre 2 et 11 ans, adressées pour régression psychomotrice, microcéphalie et mouvements stéréotypés des mains. L'analyse moléculaire de l'ADN de ces patientes vise à mettre en évidence la présence des mutations délétères du gène MECP2.

# PARTIE THEORIQUE



# 1-Présentation générale du syndrome de Rett

## 1-1-Historique

En 1966, le Docteur ANDREAS Rett de Vienne a décrit dans la littérature autrichienne (Wiener Medizinische Wochenschrift) un nouveau syndrome chez 22 filles dont les caractéristiques étaient les suivantes : hyperammoniémie, hypomimie, alalie, mouvements stéréotypés des bras et des mains, hyperéflexie, hypertonie spastique, apraxie de la marche, tendance aux crises convulsives, retard mental important, limitation au sexe féminin et progression de la maladie.

Cependant, ce syndrome est resté méconnu dans les autres pays jusqu'en 1977, lorsque Rett a décrit ce syndrome en anglais dans le <<Handbook of Clinical Neurology>> comme << une atrophie cérébrale associée à une hyperammoniémie>>. (1)

Il fut ensuite oublié presque partout pour être découvert à nouveau par plusieurs auteurs d'abord en Suède et au Japon, puis au Portugal et en France dans les années 70-80. Et ce n'est qu'en 1983 que la publication d'une série importante de 35 patientes Suédoises, Françaises et portugaises dans une grande revue de neurologie américaine (HAGBERG et col, 1983) ; fait connaître le syndrome de Rett sur la scène internationale.(2)

La description de 1983 était très proche de celle qu'avait donnée Rett, dix-sept ans plus tôt. Elle en différait principalement par le fait que l'hyper-ammoniémie à laquelle Rett donna tant d'importance, n'était pas présente chez les 35 patientes étudiées. De surcroît, il apparaissait rapidement que l'hyper-ammoniémie était le plus souvent le résultat d'un artéfact et que même dans les quelques cas où elle était confirmée, elle reste très modeste et sans doute contingente.

Du coup, le syndrome de Rett passait de la catégorie des maladies métaboliques à celles des encéphalopathies progressives avec démence et autisme, ce qui ouvrait

des perspectives toutes nouvelles du fait de l'intérêt qui s'attache aux maladies dégénératives et aux causes organiques des comportements autistiques.

Par un nouveau changement de point de vue, le syndrome de Rett apparait plutôt actuellement comme le résultat d'un trouble global du développement cérébral, que comme une maladie dégénérative proprement dite. (3)



**Figure 1** : Andreas Rett 1924-1997

## **1-2-Maladies génétiques liées au chromosome X**

Chaque cellule de l'être humain contient 46 chromosomes, regroupés en 23 paires. La 23ème paire est constituée des chromosomes dits sexuels (gonosomes): les hommes possèdent un chromosome X et un chromosome Y (XY), et les femmes, deux chromosomes X (XX).

Les maladies dont le gène est localisé sur le chromosome X se transmettent le plus souvent sur un mode dit "récessif lié à l'X". Dans ce cas, la maladie se manifeste chez les sujets de sexe masculin (XY), qui possèdent une seule copie mutée du gène,

alors que les femmes (XX) porteuses du gène muté sur un des deux chromosomes X sont cliniquement saines, mais conductrices de la maladie.

Seuls les garçons sont donc atteints dans la lignée maternelle. Il n'y a jamais de transmission père-fils.

Comme le montre la figure 2, ce couple a une probabilité égale d'avoir :

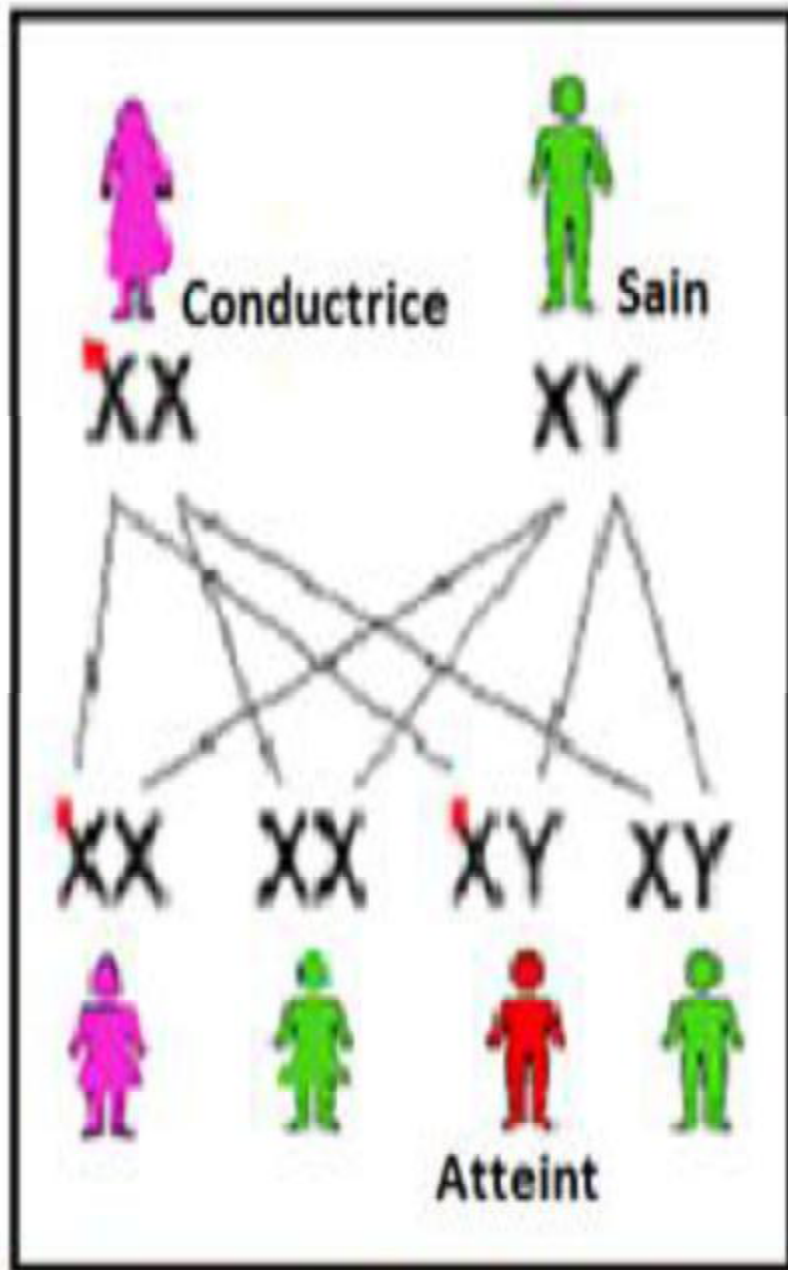
- \* une fille porteuse du gène anormal (conductrice)
- \* une fille non porteuse du gène anormal (non conductrice)
- \* un garçon porteur du gène anormal (atteint)
- \* un garçon non porteur du gène anormal (sain)

Ce risque est le même à chaque grossesse. Le fait qu'ils aient déjà des enfants (atteints ou sains) ne changent en rien cette éventualité.

#### Caractéristique du chromosome X

- ✗ Nombre de paires de base : 154 824 264 ;
- ✗ Nombre de gènes : 931 ;
- ✗ Nombre de gènes connus : 766 ;
- ✗ Nombre de pseudo gènes : 380 ;
- ✗ Nombre de variations des nucléotides (polymorphismes nucléotidiques) : 320 997

De nombreux gènes situés sur le chromosome X sont en cause dans des retards mentaux, ce qui pourrait expliquer, entre autres, qu'il y ait d'avantage de garçons porteurs d'un handicap mental que de filles. (4)



*Fig. 2: Mode de transmission de la maladie*

Tableau 1 : Gènes localisés sur le chromosome X

<i>Gènes</i>	<i>Nom</i>	<i>Locus</i>	<i>Nom des syndromes associés</i>
Retards mentaux syndromiques			
<b>FMR1</b>		<i>Xq27.3</i>	<i>Syndrome de l'X fragile (site FRAXA)</i>
<b>ARX</b>		<i>Xp22.1</i>	<i>Syndrome de Partington, syndrome XLAG (X-linked lissencephaly with abnormal genitalia) ou syndrome de Berry-Kravis, Syndrome de Proud, Spasmes infantiles liés à l'X (syndrome de West)</i>
<b>ARX</b>		<i>Xp22.1</i>	<i>Syndrome de Partington, syndrome XLAG (X-linked lissencephaly with abnormal genitalia) ou syndrome de Berry-Kravis, Syndrome de Proud, Spasmes infantiles liés à l'X (syndrome de West)</i>
<b>MECP2</b>		<i>Xq28</i>	<i>Syndrome de Rett, PPM-X (psychosis, pyramidal signs, macroorchidism), Retard mental avec spasticité (Meloni)</i>
<b>CDKL5</b>	<i>STK9</i>	<i>Xp22</i>	<i>Syndrome de Rett variant, Crises partielles précoces +/- Spasmes infantiles (syndrome de West) ISSX</i>
<b>PQBP1</b>		<i>Xp11.2 3</i>	<i>Renpenning syndrome, Sutherland syndrome, Golabi-Ito-Hall syndrome</i>
<b>XNP</b>		<i>Xq13.3</i>	<i>Syndrome ATR-X (alpha thalassémie RM lié à l'X) Syndrome de Juberg-Marsidi, Syndrome de Chudley-Lowry, Syndrome de Smith-Fineman-Myers, Syndrome de Carpenter-Waziri, Syndrome de Holmes-Gang, Syndrome de Martinez</i>
<b>JARID1C/ SMCX</b>		<i>Xp11.2 2</i>	<i>Microcéphalie</i>
<b>DCX</b>		<i>Xq23</i>	<i>Syndrome SCLH (subcortical laminar heterotopia), XLIS</i>
<b>PHN1</b>		<i>Xq12</i>	<i>Retard mental lié à l'X avec hypoplasie cérébelleuse</i>
<b>PHF8</b>		<i>Xp11.2 2</i>	<i>Syndrome de Siderius-Hamel</i>
<b>HF6</b>			<i>Sd de Börjesson, Forssman, Lehmann</i>

### **1-3-Définition du syndrome de Rett**

Le syndrome de Rett est une maladie génétique qui se caractérise chez les filles par un trouble grave et global du développement du système nerveux central. Le syndrome de Rett existe dans les différentes parties du monde. La prévalence en Europe serait d'environ 1 / 15 000 filles, actuellement il est remarquable que la même statistique est valable au nord d'Afrique. La maladie a une évolution caractéristique dans les formes typiques, Après un développement quasi normal lors de la 1ère année, on note une régression rapide survenant entre 1-3 ans. Elle s'accompagne d'une perte de l'utilisation volontaire des mains associée à un retrait social. (5)

Une décélération de la croissance du périmètre crânien s'observe parallèlement et correspond à une atrophie cérébrale diffuse, affectant surtout la substance grise. Les fillettes évoluent ensuite dans un tableau de polyhandicap souvent compliqué d'épilepsie puis de l'apparition d'une scoliose. Des formes variantes, de sévérité variable, ont été décrites. Le syndrome est en rapport avec une mutation du gène MECP2 (methyl-CpG-binding protein 2) situé sur le bras long du chromosome X, dans la région Xq28. Des mutations du gène MECP2 ont été rapportées dans le cadre d'encéphalopathies du garçon mais ne correspondent pas au même tableau. Les critères nécessaires au diagnostic sont basés sur la clinique. Il n'y a pas de traitement à visée étiologique. Il est néanmoins important de proposer un traitement symptomatique (anti-épileptiques, prise en charge spécifique de la scoliose, apports nutritifs (en particulier calciques),...etc.) quand il est nécessaire, ainsi qu'une prise en charge éducative adaptée. (6) (7)

### **1-4-Epidémiologie**

Le syndrome de Rett ayant été d'abord exclusivement diagnostiqué chez les filles, il fut largement présumé que les mutations de MECP2 étaient probablement létales in utero pour les garçons en raison d'un mécanisme de dominance lié à l'X.

Aujourd'hui, il est clair que des garçons peuvent également être porteurs de telles mutations et développer des pathologies neurologiques dont le phénotype varie en fonction du site et de la nature de la mutation. (8)(9)

Certains de ces garçons développent de sévères encéphalopathies néonatales et meurent au cours de leurs deux premières années de vie. Dans ce cas, ces enfants sont porteurs des mêmes mutations que celles observées chez les filles atteintes de syndrome de Rett mais développent un phénotype plus sévère. (10)(11)

D'autres présentent des symptômes très similaires à ceux rencontrés dans les cas classiques de Rett, symptômes qui résultent d'un mosaïsme pour des mutations somatiques de MECP2 ou de mutations sur l'un des deux chromosomes X dans le cas d'un syndrome de Klinefelter (caryotype 47XXY).(12)(13)

Enfin, des mutations de MECP2, non décrites à ce jour chez les filles atteintes de Rett, provoqueraient chez des garçons des désordres neurologiques et/ou psychiatriques. (12)

## **1-5- Diagnostic**

Le diagnostic de syndrome de Rett s'évoque en premier lieu à partir de plusieurs signes cliniques. Pour cela, des critères cliniques très stricts ont été définis

Pour porter ce diagnostic, il faut au moins 4 à 6 critères cliniques principaux, des critères secondaires et un profil évolutif caractéristique avec exclusion de certains diagnostics différentiels. (5)

Le syndrome de Rett est causé, dans près de 80% des cas typiques et 30% des formes atypiques, par des mutations du gène MECP2 localisé en Xq28 du chromosome X. (13)

Cependant, le syndrome de Rett n'est pas synonyme de mutations dans le gène MECP2 car on peut avoir un syndrome de Rett sans mutation dans le gène MECP2. Aussi on peut avoir des garçons qui naissent avec des mutations dans le gène MECP2

où aucun d'eux ne présente le syndrome de Rett classique tout en subissant à de très graves handicaps. (8)

Le syndrome de Rett se présente sous 3 formes plus fréquentes :

- ✘ Forme typique du syndrome de Rett ;
- ✘ Forme atypique du syndrome de Rett avec préservation du langage ;
- ✘ Forme avec apparition retardée de la maladie

### ***1-5-1-Syndrome de Rett typique***

**Les critères nécessaires sont :**

- ↳ Une période pré et périnatale apparemment normale
- ↳ Un développement psychomoteur apparemment normal jusqu'à l'âge de six mois
- ↳ Un périmètre crânien normal à la naissance
- ↳ Un ralentissement de la croissance céphalique (entre six mois et quatre ans)
- ↳ Une perte de l'utilisation volontaire des mains (entre six et trente mois) associée à des troubles de la communication et à un retrait social
- ↳ Une absence de développement du langage ou le développement d'un langage rudimentaire, associé à un retard psychomoteur sévère
- ↳ Des stéréotypies manuelles de torsion/pression, battement/tapotement, frottement/mouvement de lavage
- ↳ Une apparition d'une apraxie de la marche et d'une apraxie/ataxie du tronc entre un et quatre ans
- ↳ Un diagnostic ferme en attente jusqu'à deux à cinq ans d'âge.



**Les critères d'appui au diagnostique comprennent :**

- ↳ Un dysfonctionnement respiratoire avec des épisodes d'apnée pendant la veille, d'hyperventilation intermittente, d'épisodes de blocage de la respiration, d'expulsion forcée d'air ou de salive
- ↳ Des anomalies électro-encéphalographiques
- ↳ Une épilepsie
- ↳ Une spasticité, souvent associée à une atrophie musculaire et à une dystonie
- ↳ Des troubles vasomoteurs
- ↳ Une scoliose
- ↳ Un retard de croissance
- ↳ Des pieds hypotrophiques
- ↳ Un raccourcissement fréquent du 4<sup>ème</sup> métacarpien et/ou métatarsien, à rechercher par des radiographies des extrémités.

**Les critères d'exclusion ont été définis. Ils correspondent à :**

- ↳ Un retard de croissance intra-utérine
- ↳ Une viscéromégalie ou des signes d'une maladie de surcharge
- ↳ Des rétinopathies ou une atrophie optique
- ↳ Une microcéphalie congénitale
- ↳ Des signes évocateurs de lésions cérébrales, acquises en période périnatale
- ↳ Des signes d'une maladie métabolique identifiable ou d'une maladie neurologique progressive
- ↳ Une maladie neurologique acquise à la suite d'une infection ou d'un traumatisme crânien sévère. (5)

### ***1-5-2-Syndrome de Rett atypique***

Les critères d'inclusion : ils doivent inclure au moins trois des six critères principaux et au moins cinq des onze critères secondaires. (5)

#### **Les six critères principaux**

- ↪ Absence ou diminution de l'habilité manuelle
- ↪ Perte du babillage
- ↪ Perte des capacités de communication
- ↪ Ralentissement de la croissance du périmètre crânien
- ↪ Stéréotypies manuelles
- ↪ Profil évolutif du Syndrome de Rett: une période de régression suivie d'une récupération de l'interaction, contrastant avec une lente régression neuro-motrice.

#### **Les onze critères secondaires**

- ↪ Irrégularités du rythme respiratoire
- ↪ Grincement des dents
- ↪ Scoliose/cyphose
- ↪ Atrophie musculaire des membres inférieurs
- ↪ Pieds froids et violacés
- ↪ Ballonnements abdominaux
- ↪ Marche anormale
- ↪ Troubles du sommeil
- ↪ Regard particulièrement intense et spécifique au Syndrome de Rett
- ↪ Indifférence à la douleur
- ↪ Accès de rires / hurlements. (5)

## 1-6-Examens complémentaires

### *1-6-1-Examens neurologiques*

#### 1-6-1-1-L'électroencéphalogramme(EEG) :

- Après l'âge de 2 ans, les EEG sont presque toujours anormaux. (2, 14,15)
- L'activité de fond est lente et mal organisée. Des pointes ondes ou polypointes, isolées ou survenant en décharges soutenues, généralisées ou focales, sont fréquentes à la veille, elles s'aggravent au cours du sommeil où elles peuvent aller jusqu'à prendre l'aspect d'une activité continue.
- Selon certains auteurs, le contraste entre un tracé de veille pauvre lente et monotone, et un tracé de sommeil riche en activité paroxystique est un élément suggestif du diagnostic.
- L'évolution des signes de l'EEG est assez curieuse, et il semble qu'il existe différents stades évolutifs qui se succèdent (16) :
  - De 2 à 4 ans : une activité alpha occipitale,
  - De 3 à 10 ans : des grapho-éléments épileptique, avec parallèlement dès l'âge de 5 ans, une activité thêta monorythmique d'abord focalisée (centrale), puis diffuse, puis tardivement centro-pariétale,(17)
  - Après 10 ans : on observe une diminution générale de l'activité épileptiforme, et un ralentissement plus accentué des rythmes de fonds.

#### 1-6-1-2-L'électromyogramme et les vitesses de conduction nerveuse:

- ❖ En ce qui concerne l'électromyogramme, Rett décrit en 1977 des changements communs à toutes ses patientes à un stade avancé de la maladie :
  - Un degré important d'atrophie du muscle quadriceps ;
  - Une hyperexcitabilité spastique de l'adducteur et de la zone antérieure du tibia ;
  - Une atteinte des neurones périphériques.

Au début de la maladie, les lésions existent à un degré moindre.

Ceci lui suggère que le tableau clinique est causé à la fois par des lésions des neurones centraux et périphériques. (1)

- ❖ Dans l'étude des patientes françaises, portugaises et suédoises (2,18) :
- L'EMG réalisé chez 10 patientes françaises a donné :
  - ✓ Des résultats normaux chez 8 patientes ;
  - ✓ Des signes discrets de dénervation aux membres inférieurs chez 2 autres, âgées de plus de 6 ans.
  - ✓ Il n'a pas été réalisé chez des enfants de plus de 15 ans.
- Les VCN étudiées chez 6 françaises et 6 suédoises à des stades précoces de la maladie, étaient normales.
- ❖ D'autres études (19, 20,21) ont retrouvé des résultats normaux chez toutes les patientes examinées.

#### **1-6-1-3-L'électrorétinogramme:**

A été trouvé normal quand il a été réalisé (19,20), sauf dans 2 cas :

- L'un rapporté par Budden en 1986, montrant une dystrophie des photorécepteurs généralisée, concernant les cônes et à un moindre degré les bâtonnets ;(22)
- L'autre rapporté par Naidu en 1986, montrant lui aussi une anomalie des photorécepteurs. (23)

#### **1-6-1-4-Potentiels évoqués :**

On rapporte des perturbations inconstantes et variables :

- Des potentiels évoqués visuels ;
- Des potentiels évoqués auditifs (augmentation de la latence de l'onde V et de l'intervalle III-V) ;(24)
- Des potentiels évoqués somesthésiques : en effet les patientes atteintes de syndrome de Rett ont des anomalies de la perception nociceptive :

☞ Dans certains cas, la réaction à la douleur est retardée, voir absente ;

☞ Mais d'autres patients ont un seuil de la douleur plutôt abaissé, ce qui requiert une attention particulière lors de la mise en place de l'analgésie pré ou postopératoire. (25)

#### **1-6-1-5-Enregistrements polygraphiques :**

Ils sont intéressants pour analyser les troubles respiratoires pendant le sommeil, le rythme respiratoire est régulier et la saturation en oxygène normale, alors qu'à la veille, on observe une alternance d'efforts respiratoires inefficaces et désordonnés, avec hypoxie, alternant avec des accès d'hyperventilation d'origine centrale. Fait essentiel, ces troubles par ailleurs inconstants ne surviennent qu'en dehors du sommeil ; ils sont indépendants des stimulus extérieurs et des fluctuations émotionnelles du sujet. (26, 27,28)

#### ***1-6-2-Examens neuroradiologiques :***

##### **1-6-2-1-Imagerie :**

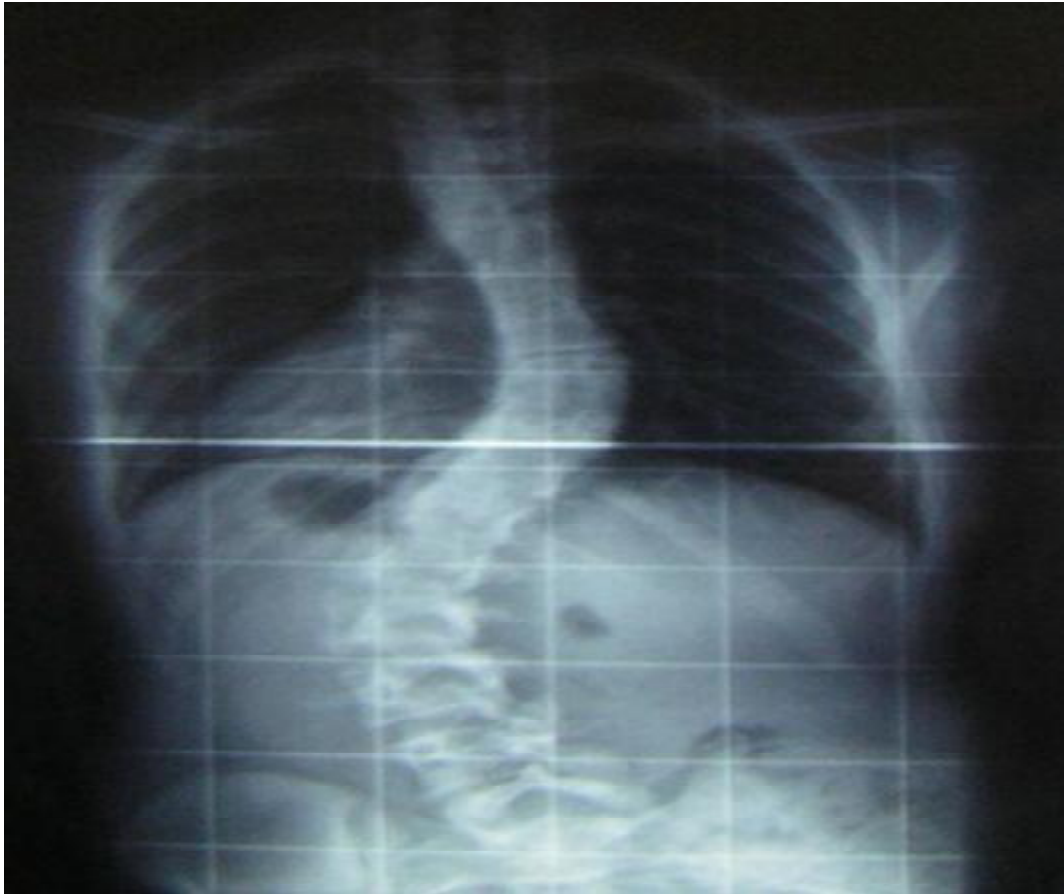
L'imagerie cérébrale par TDM ou IRM a peu d'intérêt. Normale au début, elle est perturbée de façon non spécifique dans les formes évoluées (atrophie cortico sous corticale plus ou moins marquée). (29)

##### **1-6-2-2-Gammagraphie :**

Bien que son apport au diagnostic soit très limité du fait du caractère très réduit du nombre de centres de soins qui peuvent en disposer, l'examen cérébral par gammagraphie à émission de positrons paraît constituer, en matière de diagnostic précoce, un moyen d'investigation très intéressant en révélant une hypoactivité progressive intéressante surtout les lobes frontaux. (30)

##### **1-6-2-2-Radiographie du rachis dorso-lombaire :**

Montre une scoliose dans les formes évoluées. (31)



**Figure 3** : Radiographie frontale d'une colonne scoliotique

### ***1-6-3-Examens biologiques***

Sur le plan biologique, les examens ont peu d'intérêt.

#### **1-6-3-1-Examens sanguins :**

- ❖ Numération formule sanguine normale.
- ❖ Electrolytes normaux.
- ❖ Fonction hépatique normale.
- ❖ Ammoniémie :

Rett (1977) a rapporté une hyperammoniémie dans ses premières descriptions (1). Mais plus tard, il a informé lui-même (communication personnelle 1982), que seulement 4 sur les 24 patientes connues de lui à cette époque avait une franche et constante hyperammoniémie.

Depuis, chez la plupart des patientes des séries rapportées, on ne trouve pas d'hyperammoniémie.

- ❖ Acides aminés normaux
- ❖ Une acidémie lactique a été rapportée par AL-Mateen.
- ❖ Philippart et shields (1986) aux U.S.A. chez 8 patientes sur les 10 étudiées (32); cependant, la plupart des auteurs retrouvent des taux d'acides organiques normaux.
- ❖ Enzymes lysosomiaux normaux.
- ❖ Cuivre et céruloplasmine normaux.

#### **1-6-3-2-Examens urinaires :**

- ❖ Acides aminés normaux.
- ❖ Acides organiques normaux.
- ❖ Mucopolysaccharides normaux.
- ❖ Oligosaccharides normaux.

### **1-6-3-3-Etude du liquide céphalo-rachidien :**

- ❖ Cellules, protéines normales.
- ❖ Electrophorèse des protides :
  - Normale ; (2,20)
  - Ou montrant des signes non spécifiques et habituellement modérés d'altération de la barrière. (2)

### **1-6-3-4-Des études particulières pouvant avoir un intérêt pathogénique ont été réalisées :**

#### **1-6-3-4-1-Etudes des neurotransmetteurs et de leurs métabolites :**

- ❖ Les études des neurotransmetteurs dans le plasma ont révélé des résultats normaux. (19,33)
- ❖ Les études des neurotransmetteurs et de leurs métabolites dans les urines ont donné des résultats discordants :
  - Bas dans l'étude de Nomura en 1994, alors qu'ils étaient élevés dans l'autisme infantile ;(34)
  - Tendance à être élevés (V'MA-DOPAC-SHLAA) dans l'étude de Riederer en 1985; (33)
  - Normaux dans l'étude de Goutières et Aicardi en 1985 (Sérotinine—5 HLAA). (19)

↪ Certains auteurs ont trouvé une diminution des concentrations des métabolites des neurotransmetteurs dans le liquide céphalo-rachidien (zoghbi et Percy 1985)( 20,21) :

- Diminution de la concentration de MHPG (metoxy hydroxy phenyl éthylène glycol, métabolite de la noradrénaline) ;
- Diminution de la concentration d'HVA (acide homovanilique, métabolite de la dopamine) ;



- Mais pas de différence significative des taux de 5 HIAA (acide 5 Hydroxy indole acétique, métabolite de la sérotonine).

D'autres auteurs ont trouvé une concentration normale de ces métabolites dans le LCR. (19, 23,35)

Des études récentes (2001) confirment des valeurs réduites de la dopamine, sérotonine, noradrénaline, et choline-acétyltransférase dans le cerveau. (36)

☞ En conclusion : les variations dans le LCR, des taux des métabolites de la noradrénaline, de la dopamine, et de la sérotonine, ne sont pas reproductibles d'un laboratoire à l'autre. Ils sont en général non modifiés ou diminués.

1-6-3-4-2-Etude des béta endorphines dans les LCR :

En 1987 puis 1988 Myer et collaborateurs ont mis en évidence, chez 40 parmi 45 filles atteintes de syndrome de Rett une élévation importante des béta endorphines du LCR.

Cependant, il est trop tôt pour préciser le caractère essentiel ou accessoire de cette anomalie biologique, et pour le considérer comme un éventuel marqueur, d'autant qu'elle manque de spécificité, étant élevée en particulier chez beaucoup d'épileptique non psychotique. Mais les perspectives thérapeutiques qu'elle laisse entrevoir, sont intéressantes.(16)

### ***1-6-4-Examens anatomopathologiques***

#### **1-6-4-1-Biopsie et autopsies du cerveau :**

La sévérité du tableau clinique contraste avec la discrétion des anomalies morphologiques du système nerveux observées lors des études nécropsiques. (16)

##### **1-6-4-1-1-Biopsie :**

Une biopsie de cerveau réalisée chez 2 patientes suédoises à un stade précoce de la maladie, et examinée en microscopie optique de routine, n'avait rien révélé (hagberg et coll ; 1983). (2)

### 1-6-4-1-2-Autopsie :

- ☞ Les cerveaux de 4 patientes des séries de Rett montraient une atrophie cérébrale diffuse, des altérations corticales non spécifiques avec légère perte neuronale et réaction astrogliale diffuse avec d'occasionnelles cellules d'Alzheimer type II like, et quelques altérations spongieuses dans la substance blanche cérébrale et cérébelleuse sans lésion de la myéline. Chez deux patientes plus âgées, décédées à l'âge de 11,5 et 12ans, respectivement, la zone compacte de la substantia nigra montrait des nombres normaux de neurones avec apparemment une teneur en mélanine réduite, indiquant une pigmentation insuffisante ou retardée (Rett, 1977–Jellinger, 1983).
- ☞ L'étude la plus importante a été rapportée par Jellinger en 1986 (37) et concerne l'autopsie de 8 patientes présentant un syndrome de Rett, décédées entre l'âge de 4 et 15ans. 4 de ces cas avaient déjà été mentionnés auparavant (Rett, 1977–Jellinger, 1983).

Cette étude a montré :

- Une diminution diffuse et progressive de la taille de cerveau avec diminution significative du poids du cerveau (de 13,8 à 33,8% par rapport au groupe témoin) ;
- Une légère atrophie corticale diffuse sans anomalie du développement à part une microdysgénésie occasionnelle (3 cas), mais augmentation de la quantité de lipofuschine neuronale et légère gliose astrocytaire occasionnelle ;
- Plus remarquable était la pigmentation insuffisante du locus Niger qui contenait beaucoup moins de neurones bien pigmentés pour l'âge (53–73%) et beaucoup moins de granules pigmentés par neurones, alors que le nombre total neurones nigrés et la sous structure triphasique de la neuro-mélanine était normaux pour l'âge. Il n'y avait pas d'anomalie dans

le locus coeruleus, le noyau basal de Meynert et le noyau du raphé dorsalis.

L'auteur souligne que les constatations neuropathologiques les plus importantes dans le syndrome de Rett sont la diminution de taille et de poids du cerveau, et la pigmentation insuffisante du locus Niger.

- ☞ HAGBERG (1988) a confirmé l'existence dans les formes évoluées : de lésion de la corne antérieure de la moelle (gliose de la substance blanche et grise, réduction de nombres des neurones, signes de dégénérescence axonale, pertes cellulaires au niveau des ganglions spinaux...) a été confirmée.(38)

Sur le plan biochimique, il n'a pu être démontré d'anomalie intéressant les gangliosides, les cérébrosides ou les phosphoglycériques cérébraux. Par contre, il semble qu'il existe une réduction de certains gangliosides complexes (GD1a et GD1b).

#### **1-6-4-2-Biopsies et autopsies des nerfs périphériques :**

- ☞ Une biopsie du nerf sural d'une patiente, examinée au microscope électronique, a montré :
  - Un excès évident d'éléments filamenteux dans l'axone qui peuvent représenter des neuro-filaments ou peut être des neuro-tubules ;
  - Une myéline intacte.

Ces résultats suggèrent une axonopathie épargnant la cellule de Schwann soutient la participation de la matière grise de façon diffuse (Percy et Zoghbi, 1985). (20,21)

- ☞ Une biopsie du nerf sural pratiquée chez une patiente de Budden (1986) s'est révélée normale.(22)

#### **1-6-4-3-Biopsies cutanées, conjonctivales et hépatiques :**

- ☞ Dans sa première série de 21 patientes, Rett avait pratiqué une biopsie de foie chez 8 patientes avec des résultats normaux. (1)

☞ Les biopsies de peau et de conjonctive pratiquées chez les patientes de Percy et Zoghbi (20,21) et de Naidu (23) étaient normales.

1-6-4-4-Signalons, dans certains cas :

La mise en évidence d'anomalies morphologiques des mitochondries, au niveau des biopsies musculaires ou nerveuses. (39)

## 1-6-Evolution

Le diagnostic de syndrome de Rett repose essentiellement sur l'association de plusieurs signes cliniques dans un contexte évolutive très caractéristique, Cette maladie entraîne des anomalies variables dans le temps, ce qui permet de décrire plusieurs phases évolutives.

Avant le début de la maladie, les fillettes ont un développement psychomoteur pratiquement **normal** avec acquisition de la marche et de la préhension volontaire fine (elles peuvent attraper des miettes, par exemple). Le périmètre crânien (mesure du tour de tête) est normal à la naissance. (5)

Survient ensuite la phase de **régression rapide** (entre l'âge de 1 à 4 ans), où les petites filles sont grognons, évitent le contact avec leurs proches, pleurent beaucoup donnant l'impression de souffrir. Dans cette phase, les médecins peuvent être amenés à évoquer le diagnostic d'autisme. Les enfants perdent aussi l'utilisation volontaire des mains et présentent des mouvements répétitifs des mains (stéréotypies manuelles) à type de torsion/pression, battement/tapotement et frottement/mouvement de lavage. On observe une absence de développement du langage ou le développement d'un langage rudimentaire, avec un retard psychomoteur important, des crises convulsives, une insomnie, des manifestations d'automutilation (les enfants peuvent se blesser elles-mêmes). Cette phase dure de quelques semaines à quelques mois. (5, 6,40)

Entre l'âge de 2 et 10 ans, la maladie semble **se stabiliser**. Les petites filles gardent une déficience intellectuelle sévère, des crises convulsives, des stéréotypies manuelles caractéristiques, des membres raides (spasticité), des troubles de l'équilibre (ataxie) et un dysfonctionnement respiratoire. Ces troubles respiratoires se caractérisent par la survenue des arrêts respiratoires (apnées) pendant les périodes d'éveil, de périodes d'accélération de la respiration (hyperventilation) intermittentes, de blocages de la respiration et d'expulsion forcée d'air ou de salive. En revanche, pendant cette période, les troubles autistiques ont tendance à régresser et le contact s'améliore avec l'entourage. Elles trouvent d'autres moyens de communication, le regard est plus intense, la mimique plus expressive. On note une diminution du périmètre crânien traduisant un ralentissement de la croissance cérébrale. Cette phase dure de quelques mois à quelques années.

Enfin, la dernière phase est celle de **l'évolution tardive**, après l'âge de 10–15 ans. Dans cette période, la diminution du volume musculaire (amyotrophie) et la raideur (spasticité) tendent à s'accroître ce qui augmente le handicap moteur et l'on peut observer une perte de la marche, avec nécessité d'utiliser un fauteuil roulant. Une déviation de la colonne vertébrale (scoliose) peut apparaître. Il n'y a habituellement toujours pas de langage. L'espérance de vie est probablement raccourcie mais il est difficile de faire un pronostic précis et un certain nombre de malades sont encore en vie à l'âge de 40 ans. (5,40)

A coté de cette forme habituelle décrite ci-dessus, il existe des formes avec des symptômes moins caractéristiques (formes atypiques). Il peut s'agir de formes plus sévères ou au contraire moins sévères, de formes présentes dès la naissance (formes congénitales) ou au contraire d'apparition tardive, de formes avec épilepsie précoce ou avec conservation du langage. Le diagnostic de ces formes atypiques peut actuellement être affirmé par la mise en évidence d'une anomalie dans le gène MECP2.

(6)

Généralement, on peut distinguer quatre phases évolutives du syndrome de Rett :

**Phase de Stagnation**: Le début a lieu entre 6 et 18 mois. Elle se caractérise

par :

- ☞ Un arrêt du développement PM (stagnation)
- ☞ Une diminution de l'intérêt pour les jeux
- ☞ Une hypotonie
- ☞ Un ralentissement de la croissance céphalique

La durée est plusieurs mois.

**Phase de régression rapide** : Le début survient entre 1 et 3 ans

- ☞ Une régression rapide, une détérioration du comportement
- ☞ Une perte de l'usage des mains
- ☞ Des crises convulsives
- ☞ Des stéréotypies manuelles
- ☞ Des manifestations autistiques
- ☞ Une perte du langage
- ☞ Une motricité maladroite
- ☞ Une insomnie
- ☞ Un comportement d'automutilation.

La durée s'étend de quelques semaines à quelques mois.

**Phase de stabilisation apparente** : Le début a lieu entre 2 et 10 ans.

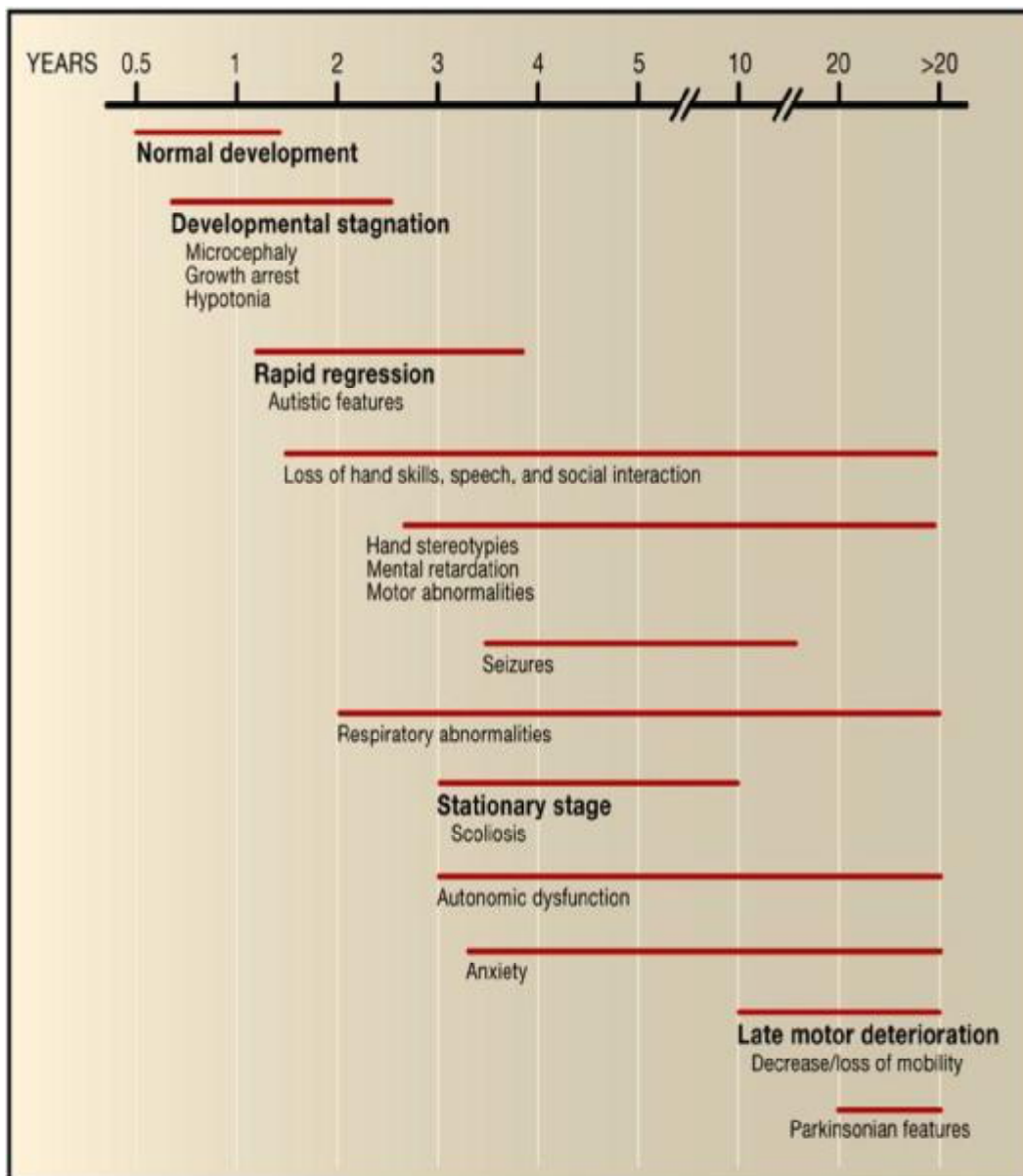
- ☞ Un retard mental sévère
- ☞ Une régression des traits autistiques
- ☞ Une amélioration du contact
- ☞ Des crises convulsives
- ☞ Des stéréotypies manuelles caractéristiques
- ☞ Une spasticité, une ataxie, une apraxie
- ☞ Un dysfonctionnement respiratoire.

La durée va de quelques mois à des années

**Phase de détérioration motrice tardive** : Le début survient après 10 ans.

- ☞ Une perte de la motricité (fauteuil roulant)
- ☞ Une scoliose, une atrophie musculaire, une rigidité
- ☞ Des syndromes pyramidaux et extrapyramidaux marqués
- ☞ Un retard de croissance
- ☞ Une absence de langage
- ☞ Une amélioration du contact visuel
- ☞ Une épilepsie moins sévère

La durée s'étale sur plusieurs années



**Figure 4** : Evolution clinique de syndrome de Rett

## 1-7-Diagnostic différentiel

Il se pose surtout au stade 2 d'HABERG avec :

### *1-7-1-L'AUTISME INFANTILE*

Le diagnostic différentiel évoqué en règle est celui d'autisme ou de psychose infantile (diagnostic porté chez 78% des patients), surtout au cours de la deuxième année de vie :

L'autisme infantile, dans sa << forme pure >> (sans déficience mentale sévère) tel qu'elle avait été décrite par L. Kauner en 1934, est relativement rare avec une prévalence de 4 à 5/10.000, et ne représente que 15% de la population des autistes.

Les formes associées à une déficience mentale sévère, sont beaucoup plus fréquentes avec une prévalence estimée à 20 /10.000, et représentent 75% de la population des autistes.

Il existe une importante prédominance masculine 3 garçons atteints pour une fille.

Il est actuellement considéré comme un trouble du développement débutant avant l'âge de 3 ans, incluant un retard ou une anomalie de fonctionnement des interactions sociales, du langage nécessaire à la communication, du jeu symbolique, et de l'imagination. (41)

Les critères diagnostiques sont constitués par trois types des troubles de comportements communs aux différentes variantes, comme nous le montre le tableau suivant :



**Tableau 2:** Critères diagnostiques du Trouble autistique DSM-IV (42)

**(1) Altération qualitative des interactions sociales, comme en témoignent au moins deux des éléments suivants :**

(a) altération marquée dans l'utilisation, pour réguler les interactions sociales, de comportements non verbaux multiples, tels que le contact oculaire, la mimique faciale, les postures corporelles, les gestes

(b) incapacité à établir des relations avec les pairs, correspondant au niveau du développement

(c) le sujet ne cherche pas spontanément à partager ses plaisirs, ses intérêts ou ses réussites avec d'autres personnes (p. ex. : il ne cherche pas à montrer, à désigner du doigt ou à apporter les objets qui l'intéressent)

(d) manque de réciprocité sociale ou émotionnelle

**(2) Altération qualitative de la communication, comme en témoigne au moins un des éléments suivants :**

(a) retard ou absence totale de développement du langage parlé (sans tentative de compensation par d'autres modes de communication, comme le geste ou la mimique)

(b) chez les sujets maîtrisant suffisamment le langage, incapacité marquée à engager ou à soutenir une conversation avec autrui

(c) usage stéréotypé et répétitif du langage ou langage idiosyncrasique

(d) absence d'un jeu de faire semblant varié et spontané, ou d'un jeu d'imitation sociale correspondant au niveau de développement

**(3) Caractère restreint, répétitif et stéréotypé des comportements, des intérêts et des activités, comme en témoigne au moins un des éléments suivants :**

(a) préoccupation circonscrite à un ou plusieurs centres d'intérêts stéréotypés et restreints, anormale soit dans son intensité, soit dans son orientation

(b) adhésion apparemment inflexible à des habitudes ou à des rituels spécifiques et non fonctionnels

(c) maniérismes moteurs stéréotypés et répétitifs (p. ex. : battements ou torsions des mains ou des doigts, mouvements complexes de tout le corps)

(d) préoccupations persistantes pour certaines parties des objets

**Un total de six (ou plus) parmi les éléments décrits en (1), (2) et (3), dont au moins deux de (1), un de (2) et un de (3)**

Certains syndromes cliniques sont communs aux deux syndromes (syndrome de Rett et syndrome autistique), et la distinction est difficile durant la deuxième et même la troisième année de vie : Le désintérêt pour le jeu ou/et les personnes, la perte des capacités interactives, du langage, de la fixation, et de la poursuite oculaire peuvent prêter à confusion. Pourtant dans l'autisme type kanner, le début est en général plus tardif, le langage est meilleur, l'utilisation des mains est conservée, le contact visuel est différent, le regard est instable, fugace ou focalisé. Par contre, les regards brillants et intenses des filles atteintes du syndrome de Rett, ne sont pas observés dans l'autisme ou dans les autres encéphalopathies (les filles cherchent le contact avec les yeux et ne le fuient pas).

Dans un stade ultérieur, le diagnostic clinique est en général assez aisé :

- Dans le syndrome de Rett, les stéréotypies sont très monomorphes, contrairement aux syndromes autistiques ;
- La régression porte à la fois sur les capacités intellectuelles et motrices, ces dernières fonctions étant respectées dans l'autisme ;
- L'apraxie, le bruxisme, les troubles respiratoires, l'ataxie, les troubles d'alimentation font en principe défaut dans l'autisme ;
- La croissance du crâne est normale dans l'autisme. (16)

Il existe toute fois des cas de diagnostic très difficile, au début surtout et même parfois en cours d'évolution, ce qui a pu faire suggérer à certains l'existence éventuelle d'un dénominateur commun. (43)

Dans une étude française, ils ont étudié la possibilité d'une mutation du gène MeCP2 dans sa région du codage et ses frontières intron-exon, chez 59 patientes autistes, 42 hommes et 17 femmes, avec et sans retard mental, aucune mutation ou polymorphisme n'étaient présents au niveau du gène MeCP2.

Tenant compte de la taille de cet échantillon (59 patientes), ils ont conclu que la mutation du gène MeCP2 responsable du syndrome de Rett, ne peut être à l'origine des cas autistiques. (44)

### ***1-7-2-LA CEROIDE LIPOFUSCINOSE INFANTILE***

C'est une maladie neurodégénérative, récessive autosomique, caractérisée par une accumulation principalement neuronale de lipopigments autofluorescents.

Le début a lieu entre 3 et 18 mois, marqué par une hypotonie, une microcéphalie constante, sévère et acquise. Les crises épileptiques apparaissent rapidement à type de secousses myoclonique puis se généralisent. La perte de l'usage des mains est semblable, et les stéréotypies manuelles sont présentes.

Mais, il existe une défaillance visuelle rapide avec une atrophie optique précoce et une dégénérescence maculaire conduisant à une cécité.

- L'électrorétinogramme est pratiquement toujours aboli avant 11 mois
- Les altérations électroencéphalographiques sont caractéristiques.
- Le diagnostic étant posé sur les anomalies ultrastructurales caractéristiques avec mise en évidence de corps granuleux osmophiles. (45)
- L'IRM montre une atrophie cérébrale et cérébelleuse sévère et précoce et un hyposignal très particulier du thalamus et des noyaux gris. L'atteinte de la substance blanche visualisée en T2 sous forme d'hypersignal est tout d'abord périventriculaire, puis s'étend en périphérie. (46)

### **1-7-3-UNE PHENYLACETONURIE NON-TRAITEE**

C'est une pathologie du métabolisme intermédiaire. La forme la plus typique est due à un déficit en phénylalanine-hydroxylase dont le gène est situé sur le chromosome 12, la transmission est autosomique récessive, la prévalence est de 1 / 10.000 naissances.

- La démence se développe plus précocement,
- L'habileté des mains est mieux préservée,
- Le schéma d'acides aminés fait le diagnostic. (47)

### ***1-7-4-SYNDROME D'ANGELMAN***

Le syndrome d'Angelman, décrit en 1965 est bien défini actuellement si l'on retient ses traits constants : rire facilement provoqué, ataxie, déficience mentale sévère, absence du langage, infléchissement progressif et modéré du périmètre crânien dans la première année de vie et épilepsie dans 90% des cas. Ces enfants paraissent normaux à la naissance, et un retard du développement s'affirme entre 6 et 9 mois.

La distinction entre les deux syndromes est difficile, ce dernier diffère du syndrome de Rett par :

- La présence d'une dysmorphie crânio-faciale très discrète, évoluant avec l'âge : elle comporte une brachycéphalie, une bouche large, les yeux enfoncés et plus tard une mâchoire inférieure proéminente et pointue.(photo)
- Une micro délétion de la région 15q11q.q12 sur le chromosome maternel est trouvée dans 65% de cas.



**Figure 5** :Syndrome d'Angelman : discrète dysmorphie faciale et sourire facile

**1-7-5-LA SCLEROSE TUBEREUSE :**

- Il n'existe pas de microcéphalie acquise ;
- Des tâches pigmentées sont notés ;
- Les crises motrices mineures sont très importantes.

**1-7-6-UN PROCESSUS TOXIQUE <<ENCEPHALITIQUE>>**

- plus aigu ;
- L'agent nocif est retrouvé
- L'EEG est suggestif.

**1-7-7-DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL EN FONCTION DES STADES EVOLUTIFS DE LA**

**MALADIE (16) :**

Stades évolutifs (d'après d'Haberg et Witt-Engstrom)	Diagnostic différentiel
<b>Phase de stagnation</b> Début : 6-18 mois Durée : quelque mois	Les hypotonies
<b>Phase de régression rapide</b> Début : 1-3ans Durée : quelques semaines ou mois	Autisme Psychose infantile Encéphalopathies épileptiques Sclérose tubéreuse de Bourneville Maladies neurométabolique : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Déficit en OCT</li> <li>• Phénylcétonurie</li> <li>• <i>céroidolipofuscino</i> +++</li> </ul>
<b>Phase de stabilisation</b> Début : 2-10 ans Durée : quelque mois à plusieurs années	Dégénérescence spino-cérébelleuse IMOC de type diplégie ataxique Leucodystrophies et maladies de surcharge Dystrophie neuro-axonale Syndrome de Lennox Gastaut Syndrome d'Angelman
<b>Phase de détérioration tardive</b> Début : 10 ans et au-delà Durée : plusieurs années	Maladies dégénératives

**OCT** : ornithine transcarbamylase

**IMOC** : infirmité motrice cerebrale

## **1-8-Traitement**

### ***1-8-1 Traitement curatif***

Il n'existe pas actuellement de traitement curatif de syndrome de Rett, mais il est très important de mettre en place une prise en charge symptomatique de la maladie. (5,48)

### ***1-8-2 Traitement symptomatique***

Une prise en charge médicale doit être mise en place pour l'épilepsie, les troubles orthopédique comme la scoliose et les troubles respiratoire. Enfin, une prise en charge paramédicale et éducative est absolument nécessaire.

La prise en charge de l'épilepsie est fondamentale puisque cette manifestation est très fréquente dans le syndrome de Rett, bien que sa fréquence exacte soit inconnue : elle toucherait 50 à 90% des fillettes ayant un syndrome de Rett, son diagnostic est difficile car il peut exister aussi dans le syndrome de Rett des mouvements anormaux non épileptiques.

De plus l'électroencéphalogramme est souvent normal entre les crises rendant difficile son interprétation. L'idéal serait de pouvoir réaliser plus souvent des enregistrements vidéo/EEG afin de disposer d'un enregistrement électroencéphalographique pendant la crise clinique afin de différencier les crises épileptiques et les mouvements anormaux non épileptiques.

Cette épilepsie peut revêtir toutes les formes. Elle peut être résistante aux médicaments antiépileptiques, les médicaments les plus souvent utilisés sont la carbamazépine, le lamotrigine et le valproate. Ces médicaments sont employés seuls ou en association. D'autres médicaments peuvent aussi être employés.ces informations ne peuvent être que d'ordre général et les spécialistes neuropédiatres ou les neurologues qui suivent les malades pourront prescrire un traitement adapté à chaque cas particulier. (6,49)

La prise en charge des troubles orthopédiques repose tout d'abord sur des mesures préventives afin de maintenir la mobilité des articulations et de lutter contre les rétractions musculo-tendineuses. ces mesures comportent surtout la kinésithérapie, la verticalisation et le maintien de la station assise en bonne position .on peut aussi avoir recours à des traitements luttant contre la spasticité tel que la toxine botulinique. si malgré tout, des réactions tendineuses s'installent, il peut être nécessaire de recourir à des interventions d'allongement tendineux surtout au niveau des adducteurs de hanche et des tendons d'achille. les réactions musculo-tendineuses peuvent retentir sur la hanche allant jusqu'à entraîner une luxation. Là encore, la chirurgie peut s'avérer nécessaire. Enfin, la déviation latérale de la colonne vertébrale (scoliose) est fréquente. Le traitement par corset est souvent peu efficace et une intervention chirurgicale est nécessaire si la scoliose continue à s'aggraver. L'intervention le plus souvent réalisée est celle en un seul temps avec une voie d'abord postérieure (ouverture au niveau du dos), une arthrodèse (blocage des vertèbres) et la pose de matériel (tiges).

La prise en charge des troubles respiratoires est difficile. Plusieurs médicaments ont été essayés mais aucun n'a véritablement fait ses preuves. Cependant même si ces troubles peuvent être graves, il faut savoir que ces anomalies du rythme respiratoire s'améliorent avec le temps. (49)

Il faut surveiller l'état nutritionnel car le surpoids ou à l'inverse, une certaine dénutrition n'est plus rare.

Il faut aussi Rechercher et traiter un éventuel reflux Gastro-œsophagien ou une constipation.

La prise en charge paramédicale et éducative est essentielle pour que les fillettes atteintes puissent exploiter au mieux leurs potentialités. Cette prise en charge repose sur la psychomotricité, la kinésithérapie et l'orthophonie. Un projet éducatif mis en

place avec l'établissement qui accueille l'enfant lui permettra de développer au mieux ses capacités. (6, 48,49)

Un soutien psychologique est indispensable aussi bien pour l'enfant malade que pour l'entourage, parents, frères et sœurs. (5,6)



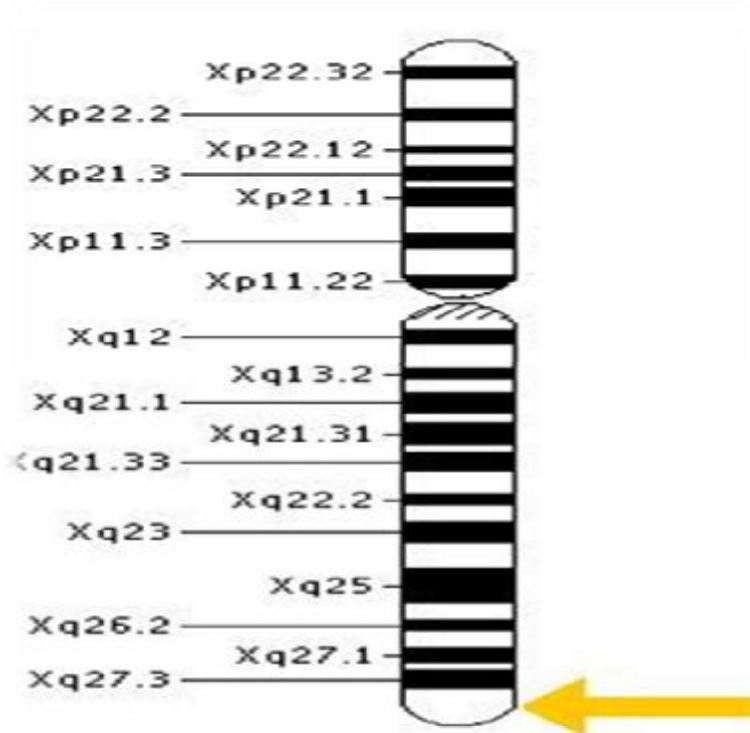
## **2-Présentation génétique du syndrome due Rett**

Dans la grande majorité des cas (99%), l'atteinte par le syndrome de Rett est sporadique ce qui explique qu'il n'y a qu'un malade par famille. Les parents d'une fillette malade n'encourent habituellement pas de risque d'avoir un autre enfant atteint. En effet, les parents ne sont pas eux mêmes porteurs de l'anomalie dans leur patrimoine génétique. Celle-ci s'est souvent produite accidentellement (mutation de novo) dans le chromosome X du spermatozoïde fécondant, dont est issue la fillette malade. Par conséquent, il n'existe pas de risque de récurrence pour un autre enfant dans la quasi-totalité des cas. (50,51)

### **2-1-Profil d'inactivation du chromosome X**

Le gène MECP2, s'étend sur 76 Kb d'ADN génomique, Le cadre de lecture a une taille de 1461 nucléotides ce qui correspond à une protéine MeCP2 de 497 acides aminés. Ce gène, localisé sur le chromosome X, a une expression ubiquitaire (Reichwald et al., 2000) , et soumis au mécanisme d'inactivation. Ce processus cellulaire normal de l'embryogenèse précoce assure dans chaque cellule mammifère femelle le passage de l'un des chromosomes X d'un état euchromatique actif vers un état hétérochromatique inactif. L'X aboutit donc à l'extinction transcriptionnelle des gènes sur l'un des deux chromosomes X et assure un dosage génétique équivalent entre mâles XY et femelles XX (55). Une fois établie, l'inactivation est stable et héritée de façon clonale au cours des divisions cellulaires. Chez les patientes atteintes du syndrome de Rett, l'inactivation aléatoire dans chacune de leurs cellules de l'un ou l'autre des deux chromosomes X signifie donc qu'en moyenne 50 % de leurs cellules ont inactivé l'X porteur de la mutation et expriment donc l'allèle sauvage, alors que 50 % ont inactivé l'X porteur de l'allèle sauvage et expriment donc une protéine mutée, tronquée ou instable et sont donc effectivement déficientes pour

l'expression de MeCP2. Les patientes Rett sont donc chimères pour l'expression des formes sauvages et mutées de MECP2. (50)



**Figure 6** : les différents gènes constituant le chromosome X humain

## **2-2-Implication de MECP2 dans la différenciation et la maturation neuronale**

La décélération de la croissance du périmètre crânien observée après la première année de vie correspond à une atrophie cérébrale diffuse, affectant surtout la substance grise. La constatation par ailleurs d'arbres dendritiques qui sont anormalement pauvres de certaines aires corticales ou leurs absence de spécification dans d'autres, ont fait évoquer un arrêt de désafférentations nécessaires à la poursuite d'un développement cérébral harmonieux. (52)

Chez les « filles Rett » explorées vers 2–3 ans, le mode de perfusion cérébrale est comparable à celui observé chez les nourrissons de 2–3 mois, c'est-à-dire on constate une hypo-perfusion dans les lobes frontaux et le tronc cérébral.

Par ailleurs, des études récentes ont objectivé une réduction de pigmentation du locus Niger ce qui est évocatrice d'anomalies de la voie dopaminergique, aussi une diminution du nombre des cellules appartenant au système cholinergique, La spectroscopie de RMN (résonance magnétique nucléaire) du proton montre une baisse du taux de N-acétylaspartate , mais les différentes études conduites sur les métabolites des neurotransmetteurs font objet de résultats contradictoires. (50)

## **2–3–Structure et régulation de l'expression de MECP2**

### ***2–3–1–Structure de MeCP2***

Le MECP2 (méthyl CpG binding protein 2) est un gène qui fournit des instructions pour la fabrication de son produit protéique qui est la MeCP2, cette dernière semble essentielle et importante pour le fonctionnement normal des cellules nerveuses où elle est présente à des niveaux élevés.

La protéine MeCP2 est susceptible d'être impliquée dans l'éteinte ("la répression" ou "faire taire") de plusieurs autres gènes. Cela empêche des gènes de fabriquer des protéines qui ne sont pas nécessaires. Des travaux récents ont montré que la MeCP2 peut également activer d'autres gènes. Le gène MECP2 est situé sur le bras long (q) du chromosome X dans la bande 28 "Xq28", à partir de 152 808 110 paire de base jusqu'à 152 878 611 paire de base.

Malgré que la protéine MeCP2 fait partie d'une famille de protéines à domaine méthyl-CpG-binding, mais elle possède des caractères différents qui peuvent la mettre en dehors du groupe. Elle dispose de deux domaines fonctionnels:

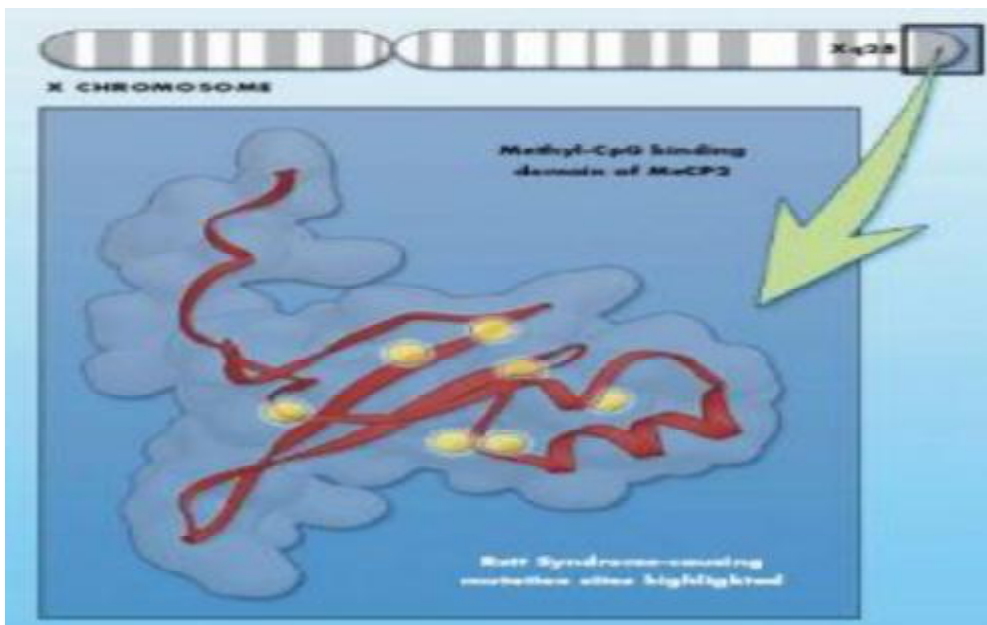
- ✎ un domaine méthyl-cytosine-liaison (MBD), composée de 85 acides aminés, forme un coin et se fixe à des sites méthylés CpG sur les brins d'ADN.

↪ un domaine de répression de la transcription (TRD), composée de 104 acides aminés, Cette région réagit ensuite avec Sin3A et HDAC (Les histones désacétylases). Cette association permet mieux la répression de la transcription grâce à la méthylation et à la dé-acétylation des histones.

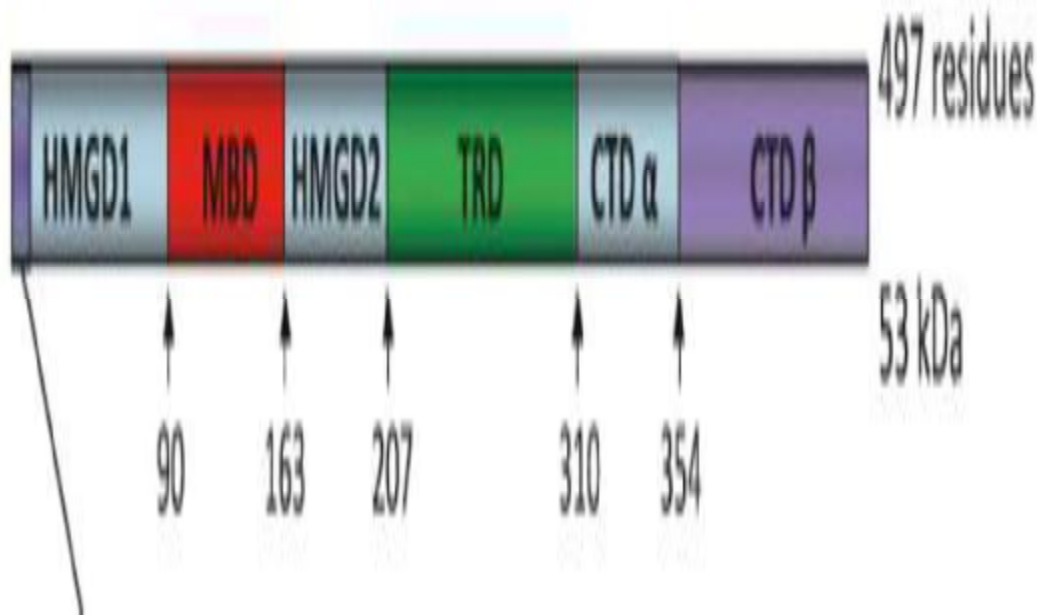
↪ HMGD1 : high mobility group protein-like domain 1  
↪ HMGD2: high mobility group protein-like domain 2 } Deux protéines à haut mobilité

↪ CTD  $\alpha$  : C-terminal domaine  $\alpha$

↪ CTD $\beta$  : C-terminal domaine  $\beta$  contient le domaine WW de liaison, qui est impliquée dans les interactions de facteurs d'épissage. (56)



**Figure 7** : Structure de MeCP2



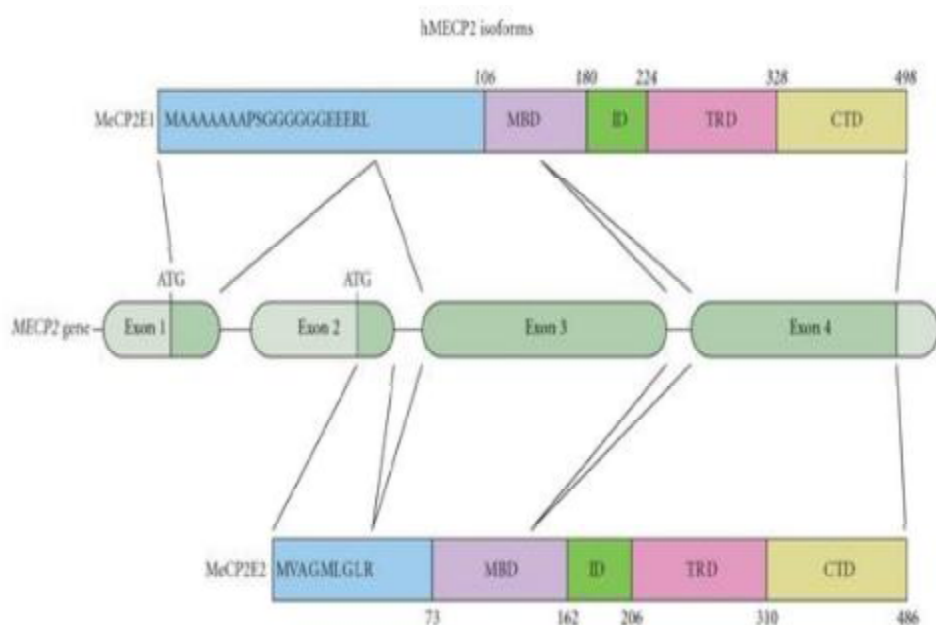
**Figure 8 :** Domaines de méthyl-CpG-binding protein 2

### ***2-3-2- Identification de MeCP2 et de ses isoformes***

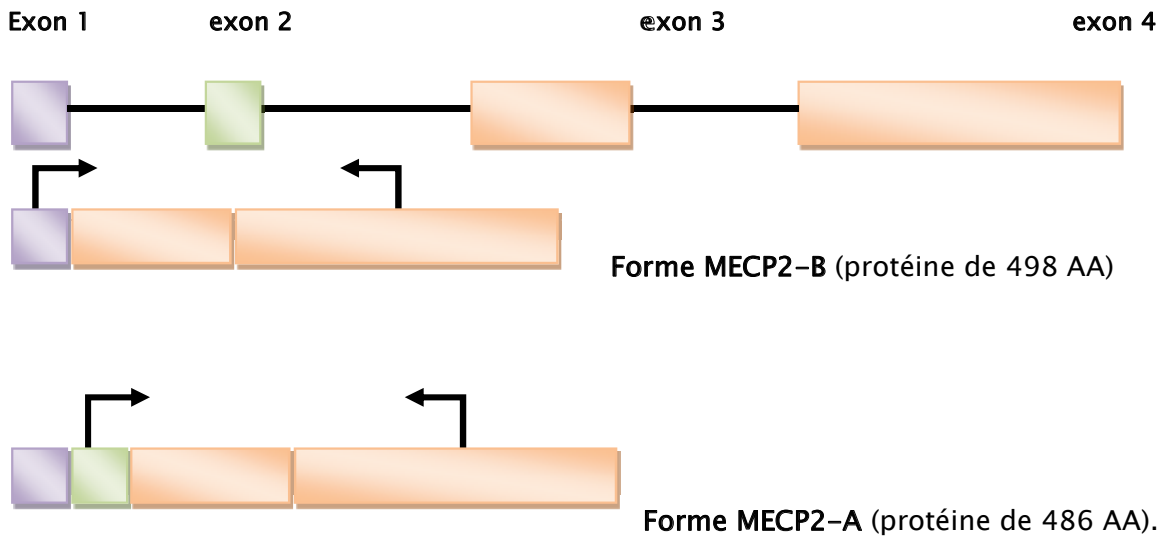
Le MeCP2, methyl-CpG binding protein 2, a initialement été identifiée, purifiée et séquencée par l'équipe du Dr Adrian Bird sur la base de sa capacité de liaison à des dinucléotides CpG méthylés (57,58). Son gène a ensuite pu être localisé sur le locus Xq28 et reconnu comme soumis au mécanisme d'inactivation du chromosome X (59).

Des sites de polyadénylation alternatifs donnent lieu à des variants d'ARN messenger qui diffèrent par leurs extrémités 3'UTR. Les deux transcrits majoritaires de 1,9 et 10 kb possèdent des demi-vies similaires mais des profils d'expression distincts au sein des tissus. Le transcrit de 10 kb prédomine durant la vie intra-utérine, alors que le transcrit de 1,9 kb est dominant dans le cerveau adulte. Des analyses d'hybridation in situ chez la souris ont montré que l'expression de l'ARN de Mecip2 est ubiquitaire dans l'embryon et détectée dans la quasi-totalité des neurones du cerveau post-natal, les niveaux les plus élevés étant mesurés dans le bulbe olfactif et l'hippocampe (60,61).

Le MECP2 a longtemps été considéré comme un gène à trois exons, chacun prenant part à la formation de la protéine. Cependant, en 2000, le séquençage et l'analyse bioinformatique détaillée des locus humains et murins a révélé l'existence d'un exon additionnel en 5' (61). Plus récemment encore, deux études parallèles ont montré l'existence d'un site d'épissage alternatif au niveau de l'exon 1 générant deux isoformes, appelées MeCP2A et MeCP2B chez l'homme (respectivement MeCP2b et MeCP2a chez la souris). La forme MeCP2A, initialement décrite, utilise comme codon initiateur l'ATG de l'exon 2 ; la forme MeCP2B utilise un ATG localisé dans l'exon 1, en exprime les 24 acides aminés mais exclut les 9 acides aminés initiaux codés par l'exon 2. Une des différences majeures entre ces deux isoformes est la présence de séquences répétées polyalanine et poly-glycine à l'extrémité N-terminale de la forme « longue » MeCP2B. Ces deux protéines sont distribuées de façon ubiquitaire dans l'organisme mais la forme B est exprimée de façon préférentielle dans le cerveau.



**Figure 9 :** Epissage alternatif des isoformes de MeCP2



**Figure 6** : Les deux isoformes de la protéine MeCP2 produites par épissage alternatif « Pelka et al., 2005 »

### *2-3-3-Domains associés à la fonction de MeCP2*

#### 2-3-3-1-MBD methyl-CpG binding domain

En générale il y a 5 gènes qui codent pour les protéines à MBD et qui sont localisés sur les chromosomes 18q21 pour MBD1 et MBD2, 19p13 pour MBD3 et 3q21-22 pour MBD4 (Hendrich et al., 1999a), et MECP2 sur chromosome Xq 2.8.

**Tableau 3** : Localisation chromosomique et structure des gènes humains codant les protéines à MBD

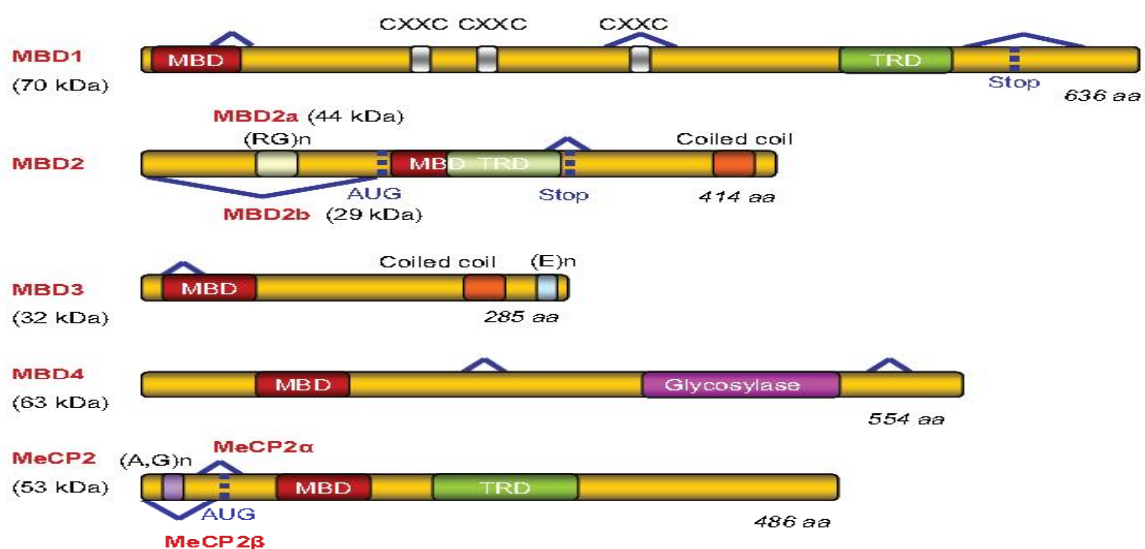
Gènes	MeCP2	MBD1	MBD2	MBD3	MBD4
Localisations chromosomiques	Xq28	18q21	18q21	19q13	3q21-22
Longueur (Kb)	60	14	50	7	11
Nombre d'exons	4	16	7	7	7

Il est important de noter que tous ces cinq gènes possèdent à leur extrémité 5' un îlot de CpG, ce qui permet de suggérer que leur régulation pourrait être soumise à un mécanisme méthylation-dépendant.

Les gènes des protéines à MBD Codent pour des différents isoformes et variantes protéiques, résultant d'épissages ou de sites de polyadénylation alternatifs.

Le MeCP2 est le membre fondateur de la famille des methyl-CpG binding protéines qui ont la spécificité de se lier à des dinucléotides CpG méthylés grâce à un domaine de liaison qui est le methyl-CpG binding domain (MBD). Le domaine MBD de MeCP2 est un peptide de 85 acides aminés capable de se lier à l'ADN et de reconnaître une seule paire de dinucléotides CpG symétriquement méthylés sur les deux brins de l'hélice ADN. La présence d'une séquence riche en A/T à proximité des nucléotides CpG méthylés (à une distance de 3 à 8 bases) augmente l'affinité de MeCP2 pour ses cibles (62,63).

La structure en solution du domaine MBD a été résolue par spectrométrie RMN et qui a révélé une structure en « coin » constituée d'un feuillet- $\beta$  antiparallèle à quatre brins (A, B, C et D) sur la face N-terminale et d'une hélice- $\alpha$  suivie d'un coude sur la face C-terminale. L'ensemble formé par la boucle flexible entre brins B et C, et les faces exposées des brins B, C et D constituent la surface de liaison à l'ADN méthylé. (64)



**Figure 11** : Différentes isoformes des protéines à MBD de mammifères

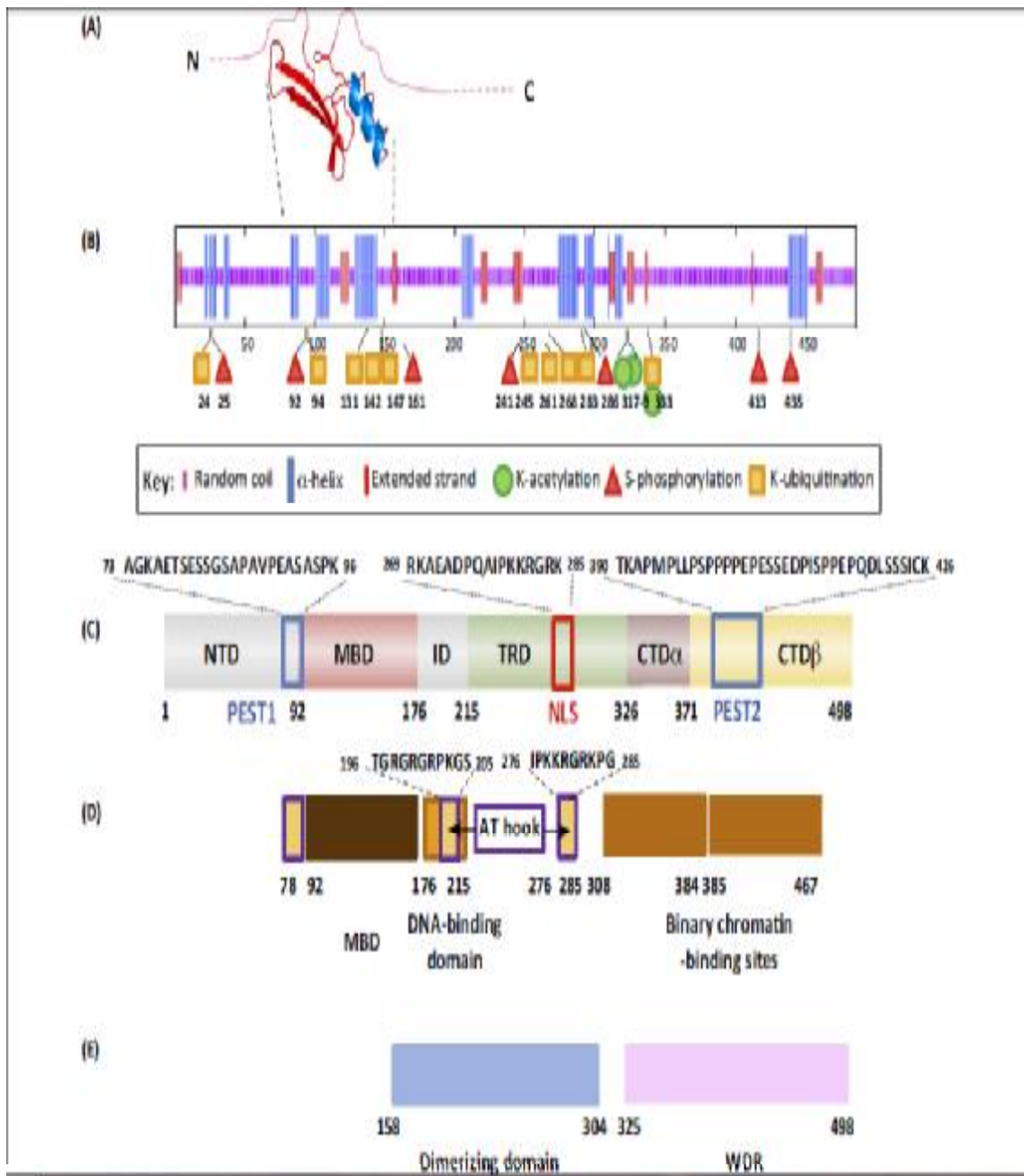


### 2-3-3-2-TRD methyl-CpG binding domain

Le MeCP2 contient également un domaine de répression de la transcription (TRD), localisé entre le résidu 207 à 310, Ce domaine est très basique (26 % de lysine et d'arginine) et riche en acides aminés neutres (12,5 % d'alanine, 10,5 % de valine et 8 % de proline). Le domaine TRD est le domaine minimal nécessaire à la répression de la transcription par MeCP2 in vitro et in vivo, il s'associe à des facteurs de co-répression ou à la machinerie transcriptionnelle basale et permet une action à distance (59). Le signal de localisation nucléaire de MeCP2 est localisé au sein du TRD, de résidu 255 à 271 (65).

### 2-3-3-3- Domaine WDR

Le MeCP2 contient un domaine (WDR) capable de se lier spécifiquement aux domaines WW de groupe II des facteurs d'épissage FBP11 (forming binding protein 11) et HYPC. La région WDR de MeCP2 (résidus 325 à 486 à l'extrémité C-terminale) contient en son centre une séquence riche en proline (376-405) et deux régions conservées CR1 et CR2 en C-terminal (66).



**Figure 12** : les différents domaines du MeCP2 humains

### *2-3-4-Régulation de l'expression de MeCP2*

Dans le système nerveux central, la MeCP2 est fortement exprimée dans la population neuronales, cependant il est absente dans les cellules gliales (microglie, oligodendrocytes et astrocytes) (67,68).

Le gène MECP2 contient plusieurs sites d'initiation de la transcription, contenus dans une région riche en résidus GC et en îlots CpG, mais aucune des boîtes canoniques TATA ou CAAT sont trouvées (69). Des expériences de gène rapporteur ont permis d'identifier la région minimale du promoteur de MeCP2 (-677/+56) suffisante pour réguler l'expression dynamique de MeCP2 spécifiquement aux neurones centraux. L'activité promotrice est présentée dans une séquence de 1 kb en amont du site d'initiation de la transcription et qui est composée d'un « coeur » (-179/-309) qui assure le niveau d'expression basal du gène, de deux éléments régulateurs positifs (-681/-847 et -847/-1071) et de deux éléments régulateurs négatifs (-309/-370 et -553/-681)(69).

Le locus de MECP2 contient trois régions qui pourraient renfermer des éléments régulateurs en Cis :

- ☞ un large intron 2 de 60 kb ;
- ☞ une région 3'UTR de 8,5 kb avec séquences hautement conservées et sites de polyadénylation;
- ☞ une région intergénique de 40 kb en amont de MECP2.

En réalisant des comparaisons de séquences inter-espèces et des essais de gènes rapporteurs, (Liu et al), ont identifié quatre « enhancers » deux « silencers » parmi 27 séquences conservées non codantes incluses dans la région de 210 kb entourant le locus de MECP2. Ces éléments sont capables d'agir à distance sur le promoteur de MECP2. L'un des enhancers et l'un des silencers sont localisés dans la région 3'UTR à environ 75 kb de MECP2, les deux autres enhancers sont à plus de 100 kb en aval de MECP2 (70).

## 2-4-Fonction biologique de MECP2

### *2-4-1- Répression de la transcription*

Dans les cellules eucaryotes, deux voies majeures contrôlent la répression de la transcription :

- \* les modifications de la chromatine
- \* la modulation des activateurs transcriptionnels.

Pour rendre l'ADN inaccessible aux activateurs transcriptionnels, les histones centrales des nucléosomes subissent à des modifications réversibles comme la méthylation ou la dé-acétylation qui constitue un mécanisme actif de répression génique, Alors que l'inverse, c'est à dire l'acétylation et la dé-méthylation contribue à l'activation de l'expression des gènes. Pour moduler spécifiquement l'expression de gènes cible, les enzymes de modification des histones doivent donc être recrutées sur leur lieu d'action soit par des activateurs, soit par des répresseurs transcriptionnels. Le MeCP2 participe dans ces mécanismes et joue ainsi un rôle de répresseur transcriptionnel.

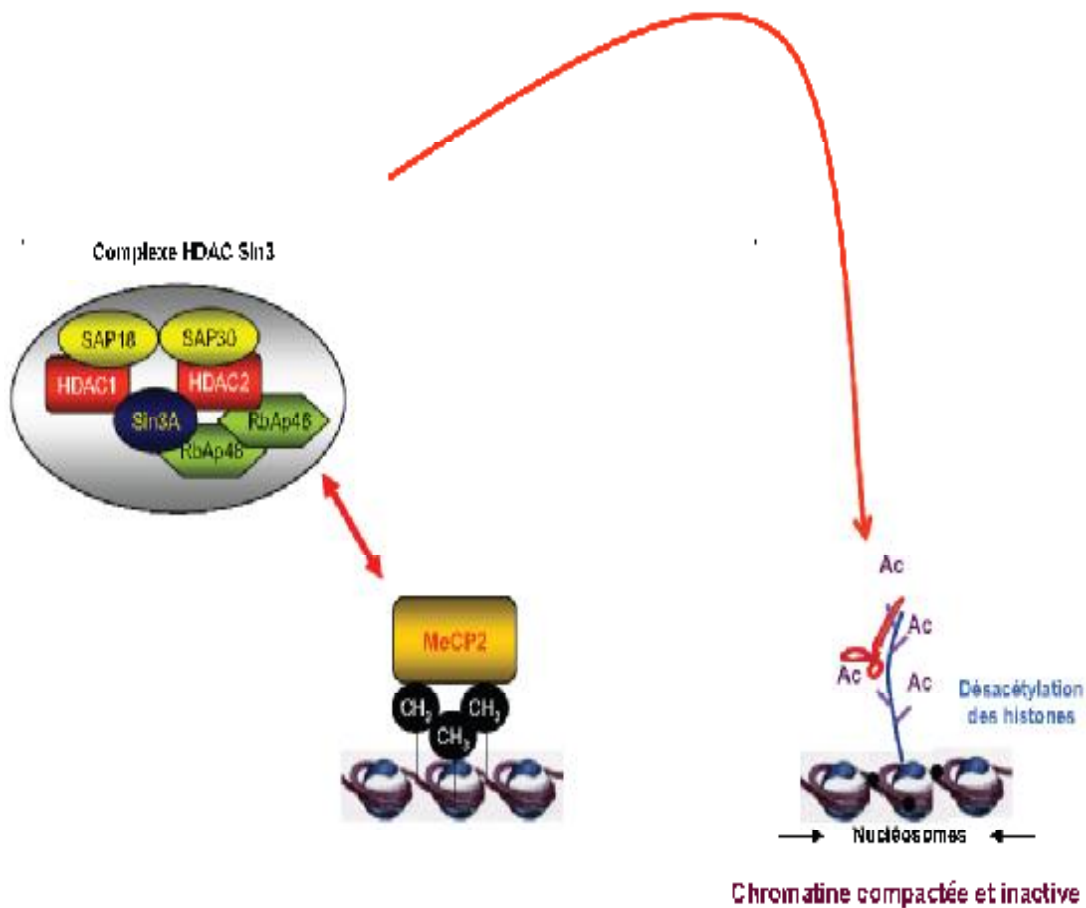
#### 2-4-1-1- Répression par dé-acétylation des Histones

En générale Le mécanisme d'action des dé-acétylases permet de retirer un groupement acétyl porté par un résidu lysine sur des histones composant le nucléosome. Cette conformation de l'ADN diminue l'accessibilité aux facteurs de transcription ou à d'autres protéines qui se lient à la chromatine, amenant en conséquence à une répression transcriptionnelle (71,72)

En ce qui concerne le mécanisme mettant en évidence le rôle de MeCP2 dans la répression transcriptionnelle, l'équipe du Dr Bird et celle du Dr Wolffe ont mis en évidence une interaction entre MeCP2 et le co-répresseur Sin3A, cette interaction directe est dépendante du domaine TRD et de la région située entre celui-ci et le domaine MBD de la protéine MeCP2 (72).

L'association de MeCP2 à l'ADN méthylé permet alors de recruter le complexe HDAC Sin3A qui contient 6 corépresseurs: les histones désacétylases de classe I et II (HDAC1 et HDAC2) et les sous-unités RbAp46, RbAp48, SAP18 et SAP30, qui interagissent avec les histones (71).

Le MeCP2 existe principalement sous forme libre, monomérique. Ces données suggèrent que MeCP2 n'est pas obligatoirement un membre du complexe répresseur Sin3A et pourrait alors s'engager dans d'autres interactions pour établir la répression transcriptionnelle.



**Figure 13** : Répression transcriptionnelle par interaction de MeCP2 et Sin3A des régions méthylées du génome

## 2-4-1-2-Répression par Méthylation des histones

La méthylation est un évènement clé des modifications post-traductionnelles des histones. Elle représente un mécanisme de régulation épigénétique important pour l'organisation de la structure chromatinienne et la répression de l'expression des gènes (73).

La MeCP2 est impliquée dans la répression génique via la méthylation des histones sur la lysines 9 (H3K9) et 27 des histones H3 et sur la lysine 20 des histones H4 qui participe également à la répression transcriptionnelle de nombreux gènes ayant leurs séquences activatrices méthylées (66). Des associations entre MeCP2 et des histones méthyltransférases (HMT) sur l'ADN méthylé entraîne la méthylation des lysines des histones, qui conduit à la compaction de la chromatine puis à la répression transcriptionnelle.

Des expériences de co-immuno-précipitation ont montré que MeCP2 interagit avec CoRest, partenaire du facteur séquence spécifique REST, l'HMT, et Suv39H1 au niveau de régions méthylées favorise la méthylation des lysines 9 (MeK9) d'histones H3.

L'analyse de la chromatine inactive montre que la répression induite par la MeCP2 conjointe des mécanismes de dé-acétylation et de méthylation des histones. Toutefois, à l'heure actuelle, aucune étude ne s'est intéressée à déterminer si le recrutement d'HDAC ou d'HMT par MeCP2 était simultané, exclusif ou successif (74,75).

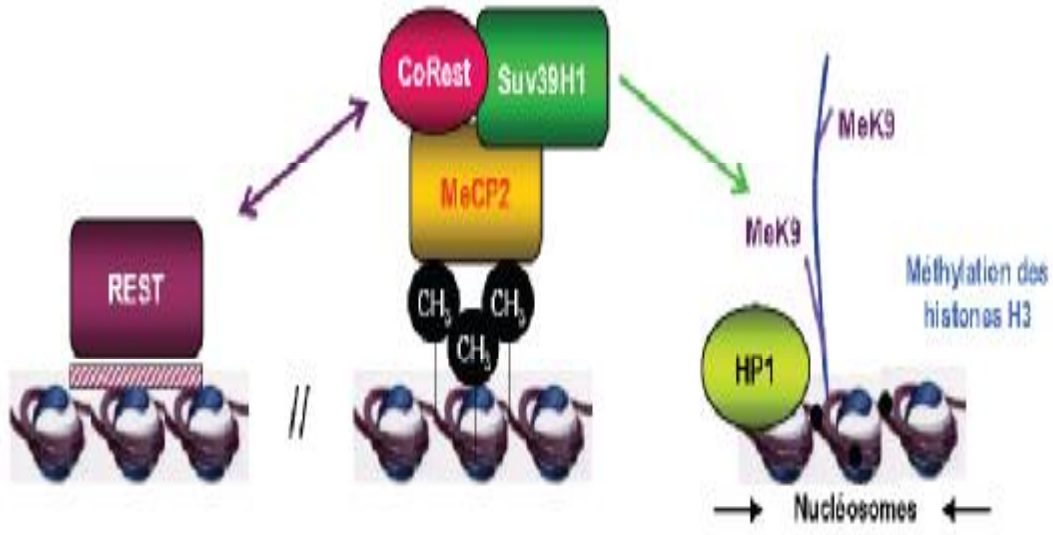
## 2-4-1-3-Modulation Directe de la Machinerie Transcriptionnelle

La MeCP2 peut également maintenir à l'état inactif un gène cible en interférant dans l'assemblage du complexe de pré-initiation de la transcription. En effet, MeCP2 interagit spécifiquement via son domaine TRD avec TFIIB, élément clé de la machinerie transcriptionnelle basale. Dans ce cas, l'activité répressive de MeCP2 ne nécessite ni le recrutement de co-facteurs, ni la formation d'un complexe multiprotéique (76).

#### 2-4-1-4- Autre type de répression de la transcription

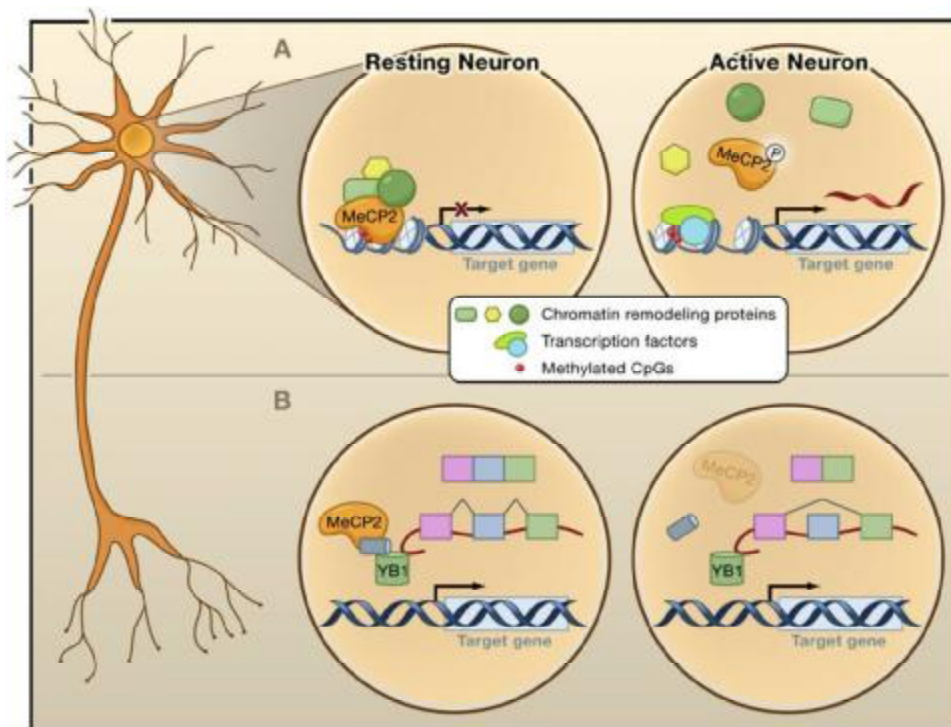
Une étude récente (Horike et al., 2005) montre cependant une situation sensiblement différente. En effet, la protéine MeCP2 pourrait être capable de réprimer la transcription de certains gènes non pas directement comme il est indiqué (dé-acétylation et Méthylation) mais plutôt en les plaçant dans une « boucle » d'ADN inactive. En fait, la protéine pourrait ne pas avoir le rôle simple que nous avons attribué initialement : se fixer en amont des gènes à réprimer et empêcher leur expression. Elle semble être capable de reconnaître certaines régions d'ADN spécifiques et contribuer à faire des boucles entre elles. La conséquence de cet isolement dans des boucles serait l'absence d'expression des gènes qui s'y trouvent.

Encore plus récemment, l'équipe d'Adrian Bird a démontré que la protéine MeCP2 a une répartition très large dans le noyau des neurones post-mitotiques et qu'elle pourrait y avoir un rôle de modulateur de l'expression des gènes en remplaçant l'histone «linker» H1 dans ces cellules. La MeCP2 aurait donc la capacité de moduler l'expression du programme génétique d'une cellule nerveuse via une modification globale de la structure chromatinienne (Skene et al. 2010).



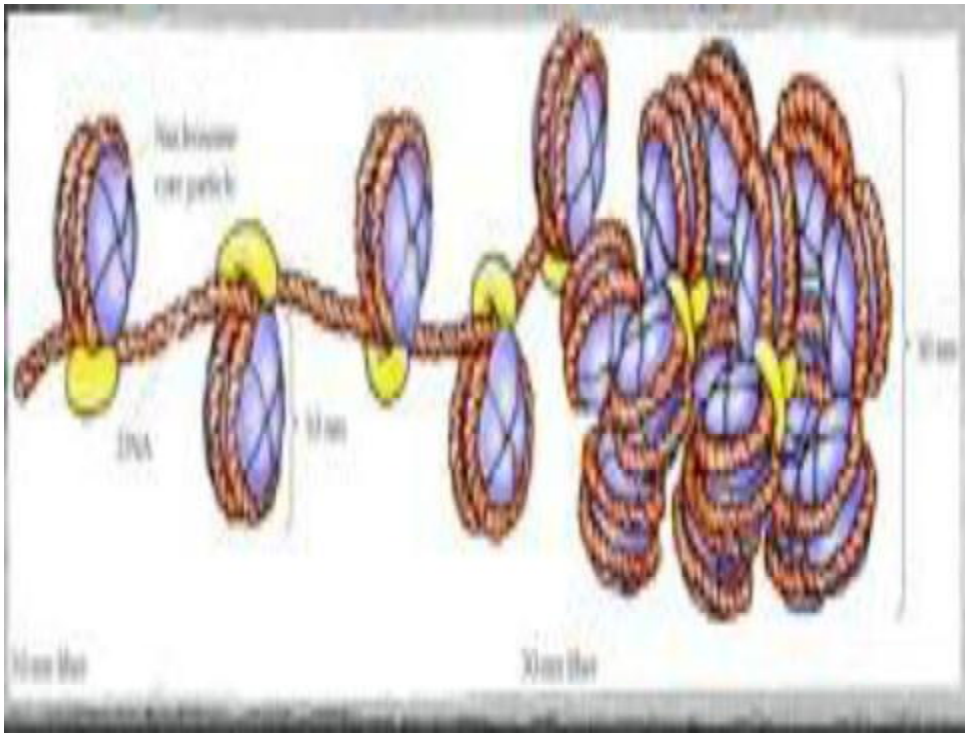
**Chromatine compactée et inactive**

**Figure14 :** Interaction de MeCP2 avec Suv39H1 au niveau des régions méthylées



**Figure15 :** mécanisme d'action de MeCP2





**Figure 16** : Organisation de la chromatine (remplacement de l'histone H1, en jaune)

## 2-5-Différentes mutations de MECP2

Les mutations les plus fréquentes sont retrouvées chez plus de 95% des filles atteintes d'un syndrome de Rett typique dans le gène MECP2. Tous les types de mutation sont présents dans ce gène :

- ✘ mutations faux-sens (remplacement d'un acide aminé par un autre dans la protéine MeCP2), par exemple T158M (thrénine en position 158 devient une méthionine) ;
- ✘ mutations non-sens (remplacement d'un acide aminé par un signal d'arrêt de la synthèse de la protéine MeCP2), par exemple R294X (arrêt de la synthèse de la protéine après l'arginine (R) en position 294) ;
- ✘ délétions ou insertions d'une ou de plusieurs base.

Les Mutations les plus fréquentes chez les patientes Françaises et Marocaines (Philippe et al. 2005) (77) :

☞ R168X (11.5%)	}	90.8% des mutations sont localisées <i>dans l'exon4</i> (20).
☞ R270X (9%)		
☞ R255X (8.7%)		
☞ T158M (8.3%)		
☞ R306C (6.8%)		
☞ R294X (5.9%)		
☞ R133C (4.2%)		

## **2-6- Les gènes ciblés**

### ***2-6-1-Identification de gènes cibles par approche globale***

Au regard de l'ensemble de ses propriétés biologiques, la fonction majeure de MeCP2 semble être de participer activement à la régulation de l'expression génique ; que ce soit quantitativement, via l'assemblage de complexes multiprotéiques répresseurs et la formation de structures chromatiniennes « inactives », ou qualitativement, via l'orientation du profil d'épissage de gènes cibles. Un défaut d'expression de MeCP2 devrait donc naturellement se traduire in vivo par une augmentation du niveau d'expression ou une expression inappropriée de ses gènes cibles (77).

Afin d'évaluer cette hypothèse, plusieurs équipes ont mené des études de transcriptome et de protéome pour mesurer les variations globales d'expression génique au sein des cellules déficientes pour MECP2/Mecp2. Des études menées sur des lignées lymphoblastiques issues de patientes souffrant du syndrome de Rett ont effectivement montré des altérations subtiles du niveau d'expression de divers gènes dans ces cellules (79,80). Pour certains d'entre eux, la liaison de MeCP2 sur leurs promoteurs dans des lignées cellulaires normales suggère que MeCP2 pourrait

contribuer de façon directe à leur répression. Cependant, les lignées cellulaires en culture présentant de plus hauts niveaux de méthylation des dinucléotides CpG que ceux observés dans des cultures primaires, la relevance de ces gènes comme cibles de MeCP2 reste encore à déterminer (81).

Des changements globaux des niveaux d'expression génique de tissus nerveux issus de patientes ou de souris déficientes pour MeCP2 ont également été mesurés par d'autres équipes. Mais ces différentes études ayant été menées sur des panels de gènes distincts et par des technologies différentes, leurs résultats ne peuvent être recoupsés (82,83). De plus, aucun gène candidat probant n'a pu être identifié par ce type d'approche ; certaines des variations observées affectant notamment des gènes dont les fonctions biologiques ne semblent pas immédiatement pertinentes dans la physiopathologie du syndrome de Rett. Ces approches globales d'analyse du profil transcriptionnel ou protéique ne sont donc pas des méthodes efficaces pour discerner les gènes cibles de MeCP2.

### ***2-6-2-Gènes soumis à l'empreinte génétique parentale***

Le mécanisme d'empreinte génétique parentale ou imprinting correspond à l'application de marqueurs épigénétiques sur certains loci au cours des stades terminaux de la gamétogenèse et permet de réprimer spécifiquement l'expression de gènes selon leur origine parentale (84). Les gènes soumis à un tel mécanisme sont généralement regroupés dans des régions chromosomiques et, entre autres caractéristiques, sont méthylés sur un seul de leurs allèles (85,86). Ce mécanisme étant particulièrement relevant dans le développement post-natal du système nerveux central, diverses équipes se sont appliquées à déterminer si MeCP2 pouvait être impliquée dans le maintien de la répression des gènes soumis à l'empreinte génétique parentale.

Chez des patientes affectées de RTT, l'expression monoallélique de plusieurs gènes soumis à l'imprinting est maintenue dans les cellules exprimant la protéine

mutée, bien qu'une interaction physique de MeCP2 aux allèles silencieux de certains de ces gènes ait été observée. C'est notamment le cas du gène H19 ; bien qu'il soit une cible directe de MeCP2 et que son niveau d'expression soit doublé dans les cellules déficientes pour *Mecp2*, la répression de l'allèle paternel, soumis à l'empreinte génétique, n'est pas levée en absence de MeCP2 (87).

Une approche de clonage et séquençage de fragments d'ADN après chromatine-immunoprécipitation a permis d'identifier le locus des gènes *Dlx5* et *Dlx6*, soumis à l'empreinte génétique parentale, comme cible de MeCP2 dans le cerveau murin (88,89). Au sein de ce locus, MeCP2 se lie à des séquences introniques méthylées et participe à la formation d'une boucle chromatinienne entre les deux gènes, responsable de leur répression.

Si la perte d'expression monoallélique de *DLX5* est observée dans 3 sur 4 des lignées lymphoblastiques issues de patientes RTT, elle est retrouvée dans 13 lignées contrôles sur 15 (90), ce qui suggère que les mutations de *MECP2* ne sont pas seules responsables de l'expression biallélique de *DLX5*. De plus, *Dlx5* n'est pas soumis à l'empreinte parentale dans le cerveau murin ; l'augmentation d'expression de *Dlx5* décrite dans le cerveau de souris déficientes pour *Mecp2* serait donc une conséquence de la perte de la boucle chromatinienne répressive plutôt que d'une perte du maintien de l'expression monoallélique.

Ces travaux mettent donc en lumière un autre mécanisme par lequel MeCP2 participerait à la régulation de l'expression des loci sujets à l'empreinte génétique parentale : une régulation à distance par formation de boucles chromatiniennes. Ce mécanisme est d'autant plus intéressant qu'il explique l'altération de l'expression de gènes non soumis à l'empreinte génétique mais localisés dans des loci qui, eux, le sont. C'est par exemple le cas de *GABRB3/Gabrb3*, situé dans le locus de *UBE3A/Ube3a*, soumis à l'empreinte génétique parentale, et qui est significativement

sous exprimé dans le cerveau de patients RTT et de souris déficientes pour *Mecp2* (91).

GABRB3 codant pour la sous-unité b du récepteur au GABA, son défaut d'expression pourrait expliquer le déficit de la transmission GABAergique inhibitrice observé dans le cerveau des souris déficientes pour *Mecp2* et les épisodes d'épilepsie chez les patients atteints du syndrome de Rett (92).

En plus des mécanismes cis-régulateurs, les gènes localisés dans les régions génomiques soumises à l'empreinte génétique parentale subissent des régulations en trans via une interaction entre allèles paternels et maternels. Ainsi, l'appariement des allèles homologues du locus GABRB3 est observé au cours du développement dans les neurones corticaux humains et dans des lignées en culture mais est absent chez les patients atteints de RTT. De plus, cet appariement peut être inhibé en culture en bloquant la liaison de MeCP2 (93). Ces résultats, qui demandent à être confirmés, suggèrent que MeCP2 participerait à l'établissement des interactions entre allèles homologues au sein de loci soumis à l'empreinte génétique.

### ***2-6-3- Gene du Brain-derived neurotrophic factor***

Deux équipes ont simultanément identifié le gène Brain-derived neurotrophic factor (*Bdnf*) comme une cible potentielle de MeCP2 (94,95). Le *Bdnf* est un facteur neurotrophique primordial pour la survie, la croissance et le maintien des neurones au cours du développement du système nerveux central. Impliqué dans l'apprentissage et la mémorisation, il a la capacité de moduler la plasticité synaptique en remodelant les connexions axonales et dendritiques. Le *Bdnf* est codé par un locus complexe contenant quatre promoteurs, dont l'un d'eux, situé en amont de l'exon III chez le rat, de l'exon IV chez la souris, est activé lors de la dépolarisation membranaire des neurones en culture (96,97). L'expression de *Bdnf*, contrôlée par ce promoteur et l'influx calcique lors de l'activation, est corrélée à la déméthylation d'éléments de réponse au calcium localisés en cis.

MeCP2, en complexe avec ses partenaires mSin3A et HDAC1, s'associe spécifiquement au promoteur de l'exon III/IV de Bdnf lorsque les neurones sont au repos. Après dépolarisation membranaire, MeCP2 est phosphorylée et se désassocie partiellement de ce promoteur, permettant ainsi le remodelage local de la chromatine et la transcription du gène (94,95).

L'influx calcique subséquent à la dépolarisation membranaire et certaines neurotrophines provoquent, via la voie CaMKII, la phosphorylation de MeCP2 sur la sérine 421 in vitro et in vivo. Par cette phosphorylation spécifique au cerveau, l'activité neuronale régule de façon dynamique l'implication et l'action de MeCP2 dans la formation du réseau dendritique, la maturation des épines dendritiques et la régulation des gènes dont l'expression dépend de l'activité. La rupture de ce processus chez les individus affectés de mutations de MeCP2 pourrait être à l'origine de la spécificité neurologique de la maladie (98).

Du déficit de Mecp2 dans les neurones résulte une augmentation d'un facteur 2 du niveau de transcrits de Bdnf, ce qui ne correspond toutefois pas à une « activation » du gène puisque dans des neurones activés ce niveau augmente de plus de 100 fois par rapport aux neurones au repos. Cette faible augmentation pourrait cependant suffire pour provoquer de subtils changements de la plasticité synaptique et contribuer ainsi au phénotype du syndrome de Rett. Par contre, aucune différence du niveau d'expression de Bdnf n'est observée après dépolarisation de cultures neuronales issues de souris déficientes pour Mecp2 ou sauvages (94,95).

Dans le cerveau de souris déficientes pour Mecp2, le niveau basal de BDNF est réduit et non augmenté, contrairement à ce qui est attendu. Cette observation surprenante laisse spéculer que, puisque l'expression de Bdnf est étroitement corrélée à l'activité neuronale, la diminution globale d'activité électrique des cerveaux déficients pour Mecp2 pourrait induire cette diminution marquée de l'expression de Bdnf et masquer ainsi la légère surexpression basale qu'induit le défaut de MeCP2 dans les neurones

au repos. Ce déficit d'activité neuronale pourrait également expliquer la plus grande proportion de BDNF dans le pool de vésicules synaptiques rapidement libérables (99).

Enfin, la démonstration d'un lien fonctionnel entre MeCP2 et BDNF *in vivo* provient du développement et de l'exploitation de modèles animaux. La délétion conditionnelle de *Bdnf* au sein de l'encéphale de souris *Mecp2<sup>-/y</sup>* exacerbe le phénotype pathologique de ces animaux et à l'inverse, la surexpression de *Bdnf* dans l'encéphale des souris *Mecp2<sup>-/y</sup>* annihile certains des symptômes normalement observés, comme la réduction de durée de vie, la diminution d'activité motrice ou encore la faible activité électrique des couches corticales. Ces résultats suggèrent donc une interaction fonctionnelle entre MeCP2 et BDNF dans le système nerveux central et la modulation par *Bdnf* de la progression de la maladie.

#### ***2-6-4- Les gènes de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien***

L'anxiété étant une composante importante du versant comportemental du syndrome de Rett, le groupe du Dr Huda Zoghbi s'est intéressé aux conséquences moléculaires du défaut de MeCP2 sur l'axe hypothalamohypophyso-surrénalien chez les souris *Mecp2<sup>308</sup>*. Des études comportementales chez ces souris ont souligné une plus grande propension à l'anxiété et une réponse physiologique au stress plus marquée, notamment au stress de contention, qui se traduit par une libération plus élevée de corticostérone dans le sang. Cette augmentation du taux de glucocorticoïdes et cette réponse comportementale altérée sont une conséquence probable d'une surexpression du gène *Crh* (corticotropin-releasing hormone) dans les noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus et dans l'amygdale centrale. Chez des animaux sauvages, le gène *Crh* est une cible directe de MeCP2 puisqu'elle se lie *in vivo* aux dinucléotides CpG méthylés de son promoteur. L'altération du contrôle du *Crh* chez les souris *Mecp2<sup>308</sup>* et la suractivation subséquente de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien pourraient donc contribuer au phénotype comportemental du syndrome de Rett mais également à la réduction du réseau dendritique, à la

diminution de la plasticité synaptique ou aux défauts de mémorisation observés dans le RTT analogues à ceux rencontrés lors d'expositions chroniques aux glucocorticoïdes (100).

Mais le niveau d'expression de Crh n'est pas la seule composante de cet axe et de la signalisation par les corticoïdes à être altérée lors de déficits en MeCP2. Les gènes Sgk (serum glucocorticoid-inducible kinase 1) et Fkbp5 (FK506-binding protein 51), gènes sensibles aux glucocorticoïdes et impliqués dans la réponse au stress, voient en effet leurs niveaux d'expression augmenter d'un facteur deux à trois dans le cerveau de souris *Mecp2*<sup>-/y</sup> (101). L'expression de ces gènes étant augmentée d'un facteur 1,5 chez des animaux sauvages traités de façon chronique par du cortisol, les niveaux de Sgk et Fkbp5 chez les souris *Mecp2*<sup>-/y</sup> correspondent donc à des niveaux habituellement induits par un stress soutenu.

La liaison directe de MeCP2 aux promoteurs de ces gènes s'effectue sur des sites distincts des régions modulées par le complexe « récepteur aux glucocorticoïdes-ligands », MeCP2 n'étant pas libérée lors de l'administration de corticostérone. Néanmoins, l'interaction de MeCP2 sur ses sites ne provoque pas l'extinction complète de ces gènes, suggérant une modulation de leur niveau d'expression basal plutôt qu'une stricte répression. Aux vues des rôles de Sgk et Fkbp5 dans les fonctions nerveuses, survie et excitabilité neuronale, modulation de la réponse aux stéroïdes ; et des effets délétères d'une exposition aux corticoïdes sur le développement cérébral, la perte de modulation de ces gènes par MeCP2, mimant des niveaux (102) comparables à un stress chronique, participerait à la pathogenèse du syndrome de Rett et expliquerait, du moins en partie, la similarité entre certains des symptômes observés chez des enfants RTT (épilepsie, anxiété, agitation) et les conséquences physiologiques de l'exposition aux glucocorticoïdes.



# PARTIE PRATIQUE

# MATERIEL ET METHODES

## **1-Matériels**

Il s'agit d'une étude rétrospective, portant sur 8 patientes (tableau 3) qui se sont présentées au laboratoire de génétique médicale et d'oncogénétique du CHU Hassan II de Fès, pour suspicion de syndrome de Rett durant une période de 3 ans, allant de Janvier 2010 au Décembre 2012.

**Tableau 4** : les patientes atteintes de syndrome de Rett

<b>N°</b>	<b>Age</b>	<b>Région</b>
P1	9 ans	Taza
P2	7 ans	Berkane
P3	7 ans	Berkane
P4	11 ans	Houcema
P5	4 ans	Fès
P6	5 ans	Fès
P7	1 an 6mois	Fès
P8	4 ans	Fès

### **Critères d'inclusion :**

Ont été inclus dans cette étude tous les patientes âgées entre 2 ans et 11 ans adressés pour suspicion de syndrome de Rett avec un score diagnostique de Huppke et al supérieur à 4.

### **1-Critères d'exclusion :**

Ont été exclus de cette étude tous les autres types de regroupement syndromique en dehors de syndrome de Rett ou avec un score diagnostique de Huppke et al inférieur à 4.

## **2-Méthodes**

L'étude moléculaire du syndrome de Rett est basée sur 4 étapes fondamentales qui sont :

- ↳ Prélèvement des patientes.
- ↳ Extraction d'ADN génomique sur suspension cellulaire.
- ↳ Dosage d'ADN extrait.
- ↳ Amplification des séquences nucléotidiques par réaction en chaîne par polymérisation(PCR).
- ↳ Migration du produit PCR par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%
- ↳ Réaction de séquence

### **A-Prélèvement des patientes.**

Chaque prélèvement est accompagné d'une fiche de consentement (voir annexe) libre et claire portant des renseignements et l'accord par une signature des parents.

L'étape de prélèvement influence directement sur la qualité des résultats analytiques obtenus, donc tout examen moléculaire ne peut être valablement interprété que s'il est effectué sur un patient correctement prélevé :

- ↳ Dans des conditions aseptiques ;
- ↳ On prélève 2 tubes à EDTA (Ethylène Diamine Tétracétique acide)
- ↳ Les tubes peuvent être conservés à +4°C ou -20°C pour utilisation ultérieure.

## **B- Extraction d'ADN génomique sur suspension cellulaire.**

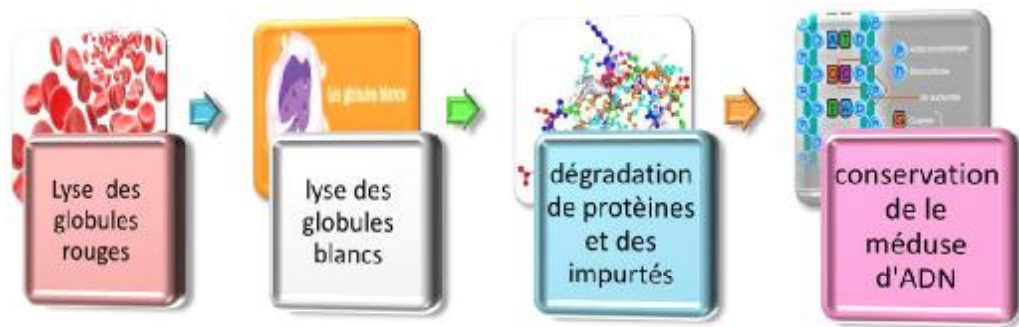
Pour détecter les différentes mutations présentant dans le gène responsable de syndrome de Rett, on est obligé de faire une extraction d'ADN à partir du sang prélevé.

L'extraction se fait selon 2 méthodes, soit par SEL ou par KIT commercialisé dont le but est d'avoir une quantité et qualité suffisante permettant son analyse.

### **1-Extraction d'ADN par SEL**

Extraction d'ADN par SEL se base sur 4 étapes essentielles:

- a-Lyse des globules rouges
- b-Lyse des globules blancs
- c-Dénaturation et précipitation des protéines et impuretés
- d-Précipitation et lavage de l'ADN



### **2-Extraction d'ADN par KIT commercialisé :**

Cette méthode d'extraction se base aussi sur 4 étapes essentielles:

- a-La fixation d'ADN
- b-La digestion par protéase
- C- Lavage d'ADN
- d-L'élution d'ADN



## C–Dosage d’ADN extrait

Le dosage d’ADN est très important car c’est un paramètre primordial pour la réussite de la PCR.



**Figure 17** : dosage d’ADN par NanoDrop

## D–Amplification des séquences nucléotidiques par réaction en chaîne par polymérisation (PCR) :

### a–Principe de la PCR:

La Polymérase Chain Réaction (PCR) est une méthode in vitro d'amplification des séquences spécifiques d'ADN. La première PCR a été décrite par K. Lepp et al. En 1971. Il a fallu ensuite attendre 1983 pour voir réapparaître la PCR dans les travaux de Kary Mullis qui on a décrit les principes ce qui lui a valu le prix Nobel en 1993. Tout le monde s'accorde à dire aujourd'hui que la PCR est parmi les techniques

biologiques les plus puissantes et utiles. La PCR est aujourd'hui une technique standard de laboratoire.

### **b-Les réactifs de la PCR**

La PCR permet d'amplifier une séquence spécifique d'ADN dans un mélange réactionnel approprié (Mix).

Le mélange contient:

- Taq (la *Thermus Aquaticus* polymerase) : c'est un enzyme permettant la synthèse des nouveaux brins d'ADN lors de l'amplification. C'est protéine de 94 kiloDaltons, isolée de la bactérie *Thermus Aquaticus*. La Taq polymerase est une ADN polymerase thermostable. Elle résiste à des températures répétées pouvant atteindre jusqu'à 95°C ;
- Les dNTP (deoxynucleotide triphosphate) : ce mélange contient les différentes bases A, T, G, C sous la forme ATP, TTP, CTP, GTP ;
- MgCl : les ions magnésium sont importants dans la PCR, ils influent sur l'activité enzymatique de la Taq,
- Les amorces ou oligonucléotides (primers) : ce sont des polymères nucléotidiques, de séquences spécifiques du gène à amplifier. Lors de la PCR, les amorces se fixent spécifiquement sur l'ADN dénaturé par chauffage et l'ADN compris entre les amorces est amplifié. Leur choix est très important, ils déterminent les caractéristiques de l'ADN amplifié (longueur, spécificité et nature).
- L'ADN matriciel : En théorie une copie ADN de la séquence recherchée est suffisante pour avoir une amplification, il faut cependant tenir compte de la probabilité de « rencontre » des molécules d'ADN matrice avec les amorces. Dans la pratique plusieurs copies sont nécessaires pour avoir un résultat correct, mais la mauvaise qualité et/ou une quantité trop importante d'ADN matrice peut conduire à une amplification aspécifique, voir à une inhibition

enzymatique. Il est possible d'expliquer cette inhibition par la présence de contaminants provenant de l'échantillon ou des réactifs utilisés dans les protocoles d'extraction d'ADN.

- Le tampon : Le tampon utilisé pour la réaction PCR sert à maintenir stable le pH du milieu réactionnel au niveau optimal pour la Taq polymérase (TrisHCl à pH basique 8,5 à 9). Il contient des cations bivalents  $Mg^{2+}$ , cofacteurs indispensables pour la réaction de polymérisation avec la Taq polymérase. La présence dans le milieu réactionnel des cations bivalents  $Mg^{2+}$  et de cations monovalents ( $K^+$  ou  $NH_4^+$ ) vont neutraliser les charges négatives des groupements phosphates au niveau de l'ADN et ainsi stabiliser les hybrides ADN/ADN. En pratique, la concentration en sel doit cependant rester compatible avec l'activité de l'ADN polymérase.
- Primers : les amorces qui permettent l'amplification spécifique du fragment d'intérêt (ADN).
- Eau pure : sert pour la dilution des réactifs de PCR et pour que le volume final soit entre 20 et 50 car la concentration élevée des réactifs peut inhiber la réaction d'amplification. on peut remplacer l'eau par TE (Tris-EDTA) mais dans les conditions purement stérile.

Une fois le Mix distribué dans les tubes appropriés, les échantillons d'ADN sont ajoutés individuellement. Leur mode de préparation est donné ci-après.

### **c-Principe de l'amplification d'ADN par la technique PCR:**

Cette technique d'amplification représente une révolution scientifique puisqu'elle permet d'obtenir quelques microgrammes d'une séquence à partir de quantités infimes d'ADN. La technique est basée sur les répétitions de réplication d'ADN à partir d'amorces spécifiques.

L'une des propriétés de toute les ADN polymérase est de ne pouvoir synthétiser le brin complémentaire qu'à partir d'une amorce. Cette propriété des ADN polymérase



a été utilisée pour amplifier, par réplication successive, les séquences désirées. Il suffit pour cela de choisir des amorces capables de s'hybrider spécifiquement à l'ADN et de réaliser les réplications qui assureront l'amplification de la séquence ciblée est doublé à chaque réplication, et son augmentation est exponentielle (Santoni et al., 2000).

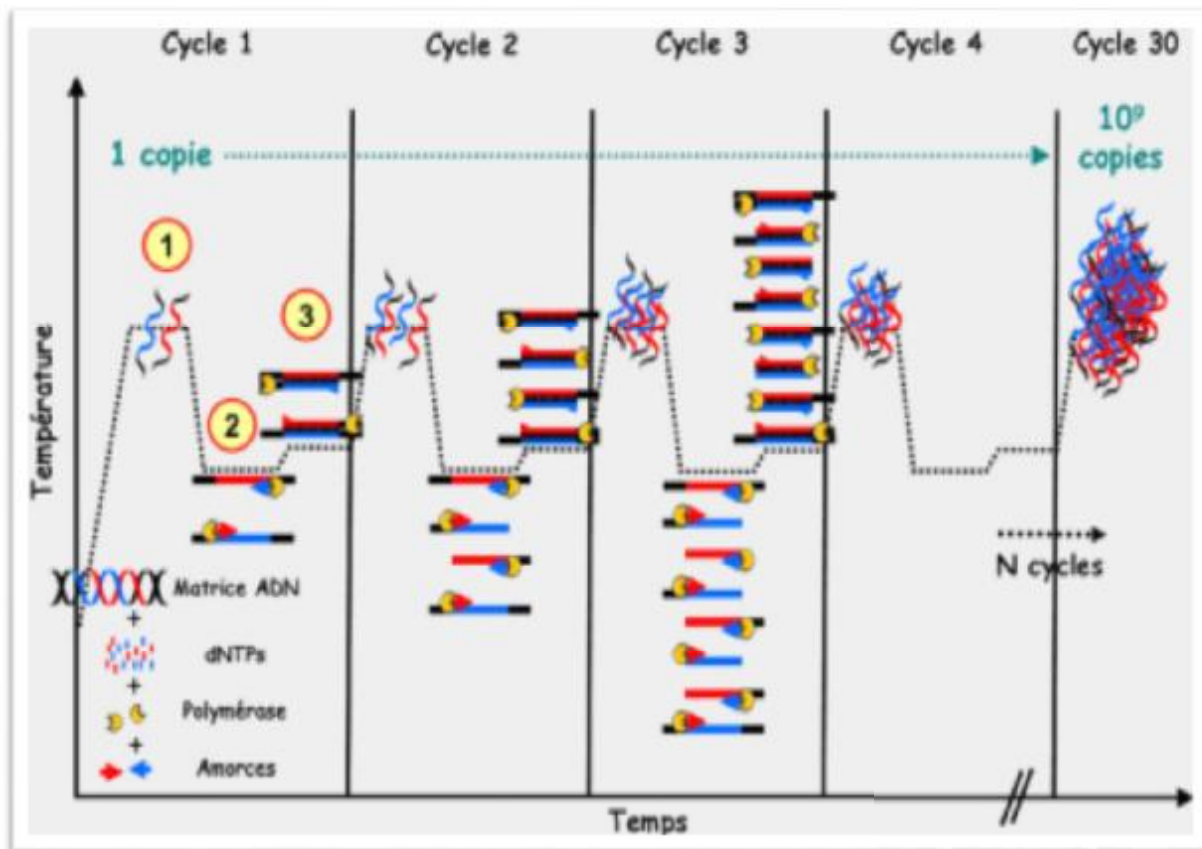
Après 30 cycles, on obtient en moyenne une amplification d'un million de copies. Si l'on est parti d'un picogramme de cible contenu dans un microgramme d'ADN génomique total, on récupère un microgramme de cible amplifiée.

Les étapes nécessaires pour doubler la quantité de l'ADN cible constituant un cycle sont:

- 📌 Phase 1 : Séparation des brins de l'échantillon d'ADN par chauffage entre 90°C et 95°C ;
- 📌 Phase 2: les amorces se fixent sur l'ADN monobrin à la température d'annealing ou d'hybridation requise (entre 55°C et 68°C) ;
- 📌 Phase 3 : La Taq polymérase va synthétiser le brin complémentaire à partir de l'amorce en utilisant les dNTP, ce qui permet de doubler l'ADN cible. Cette étape se déroule à 72°C.

Mais les différentes températures et cycles dépendent de chaque gène amplifié.

Chaque cycle ainsi répété permet d'aboutir à un ADN cible multiplié exponentiellement par  $2^n$  ( $n$ = nombre de cycles).



**Figure 18 :** cycles de PCR

#### **d- Limites de la PCR :**

La première limite est celle de la taille de la séquence que l'on souhaite amplifier. Il n'est guère possible, sauf cas très exceptionnel, d'amplifier des séquences dont la longueur est supérieure à 3 Kb, au dessous de 1,5 Kb, les amplifications sont difficiles à réaliser. La seconde limite est celle du nombre de copies d'ADN cible, ainsi que son extrême sensibilité de telle sorte qu'une très faible contamination de l'ADN peut engendrer des erreurs désastreuses des analyses, d'où la nécessité de l'établissement de deux contrôles, positif et négatif, lors des analyses (Lepenec, 1991).

## E- Migration du produit PCR par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%

Les produits de PCR sont visualisés sur le gel d'agarose à 2% en présence d'un marqueur de taille.

- \* La méthode nécessite en premier lieu la préparation de TAE « solution de migration » (voir annexe), A partir d'une solution mère (buffer TAE) on prend 100ml et on complète par 400 $\mu$ l d'eau distillée puis on agite.
- \* Par la suite, on prépare le gel d'agarose en utilisant 1g de poudre d'agarose, et 50ml de TAE, puis on porte le tout à ébullition deux fois pendant 30s séparé par agitation et on ajoute 2 $\mu$ l de BET (voir annexe) qui est un agent révélateur par sa fluorescence sous les UV et qui va s'intercaler entre les bases. Alors après cette préparation on coule le gel dans un moule spécifique à l'électrophorèse qu'on intègre un peigne pour former les puits.
- \* Enfin on mélange le produit de PCR avec solution de charge (voir annexe) qui a comme rôle la stabilisation de l'ADN au fond et on dépose le tout au niveau des puits de gel qui sera suivie par une migration pendant 45min dans 100V, 170mA et 9W.

Après cette migration au temps convenable on visualise les bandes d'ADN fluorescentes sous UV.

## **F-Séquençage de l'ADN:**

Notre étude à été mené essentiellement pour détecter les différentes mutations présentent dans le gène MECP2 et qui sont responsables du retard mental, alors dans la recherche au niveau de la biologie moléculaire cette étape est réalisée par le séquençage. Ce dernier a été inventé dans la deuxième moitié des années soixante-dix. Deux méthodes ont été développées indépendamment, l'une par l'équipe de Walter Gilbert, aux États-Unis, et l'autre par celle de Frederick Sanger, au Royaume-Uni. Cette dernier méthode, c'est-à-dire de Frederick Sanger, qui est utilisée chez nous patientes.

# FICHE D'EXPLOITATION DES DOSSIERS

## Identité :

Nom et prénom :

Sexe :

Date et lieu de naissance :

Nombre de fratrie :

Notion de cas similaire dans la famille :

Notion de consanguinité :

## Clinique :

Date d'apparition des symptômes :

Symptômes :

### **Les critères nécessaires sont :**

	OUI	NON
↳ Une période pré et périnatale apparemment normale :	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
↳ Un développement psychomoteur apparemment normal jusqu'à l'âge de six mois :	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
↳ Un périmètre crânien normal à ma naissance :	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
↳ Un ralentissement de la croissance céphalique (entre six mois et quatre ans) :	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
↳ Une perte de l'utilisation volontaire des mains (entre six et trente mois) associée à des troubles de la communication et à un retrait social :	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
↳ Une absence de développement du langage ou le développement d'un langage rudimentaire, associé à un retard psychomoteur sévère :	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
↳ Des stéréotypies manuelles de torsion/pression, battement/tapotement, frottement/mouvement de lavage :	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
↳ Une apparition d'une apraxie de la marche et d'une apraxie/ataxie du tronc entre un et quatre ans :	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
↳ Un diagnostic ferme en attente jusqu'à deux à cinq ans d'âge :	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**Les critères d'appui au diagnostique comprennent :**

	OUI	NON
↳ Des troubles respiratoires :	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
↳ Des anomalies électro-encéphalographiques :	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
↳ Une épilepsie :	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
↳ Une spasticité, souvent associée à une atrophie musculaire et à une dystonie :	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
↳ Des troubles vasomoteurs :	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
↳ Une scoliose :	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
↳ Un retard de croissance :	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
↳ Des pieds hypotrophiques :	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
↳ Un raccourcissement fréquent du 4 <sup>ème</sup> métacarpien et/ou métatarsien, à rechercher par des radiographies des extrémités :	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**Exploration génétique :**

Etude moléculaire :

# RESULTATS

## I-Résultat de l'étude cliniques des patientes

Tableau 5 : les symptômes cliniques rapportés par nos patientes

Symptomes Patientes	Age de début des symptômes	Trouble de la marche	Trouble du langage	Trouble d'utilisation des mains	Stéréotypie manuelle	Microcéphali e post-natal	autisme	Trouble respiratoire	Epilepsie	scoliose
P1	18 mois	Oui	Oui	Non	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Non
P2	12 mois	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Oui
P3	12 mois	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Oui
P4	10 mois	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Non
P5	16 mois	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Non
P6	12 mois	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Non
P7	14 mois	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Non	Non	Non
P8	18 mois	Oui	Oui	Non	Oui	Non	Non	Non	Non	Non



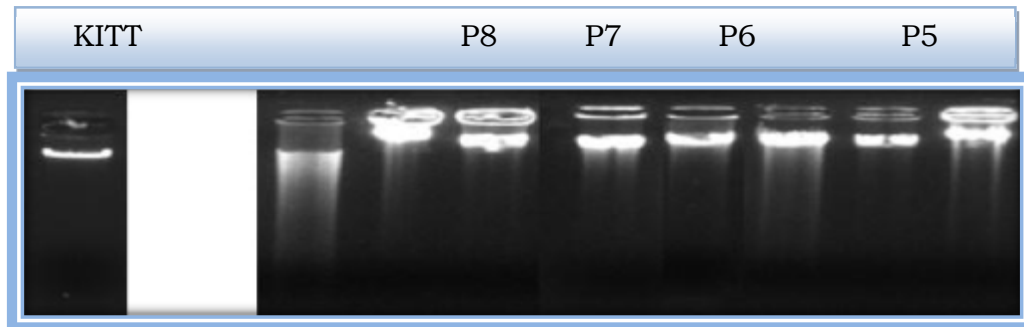
**Tableau 6:** évaluation de syndrome de Rett par le score de Huppke et al

Critères cliniques	Patientes avec mutation du gène MeCP2			Patientes sans mutation du gène MeCP2				
	P 4	P5	P6	P1	P2	P3	P7	P8
Une période pré et périnatale apparemment normale	1	1	1	1	1	1	1	1
Un développement psychomoteur apparemment normal jusqu'à l'âge de six mois	1	1	1	1	1	1	1	1
Un périmètre crânien normal à la naissance	1	1	1	1	1	1	1	1
Un ralentissement de la croissance céphalique	1	1	1	1	1	1	0	0
Une perte de l'utilisation volontaire des mains	1	1	1	0	1	1	1	1
Des stéréotypies manuelles	1	1	1	1	1	1	1	1
trouble de la communication et à un retrait social :	1	1	1	1	1	1	0	0
Trouble du langage	1	1	1	1	1	1	1	1
Trouble de la marche	1	1	1	1	1	1	1	1
Score	9	9	9	8	9	9	7	7

On constate que toute les patientes présentant une mutation du gène MeCP2 ont un score diagnostique de Huppke et al égale à 9.

## II –Résultats d'extraction d'ADN :

D'après cette migration par l'agarose à 2 % on peut constater que la bonne méthode d'extraction d'ADN est par KIT commercialisé afin d'obtenir un ADN pur et net sans impureté.



**Figure 19** : migration d'ADN pure par électrophorese

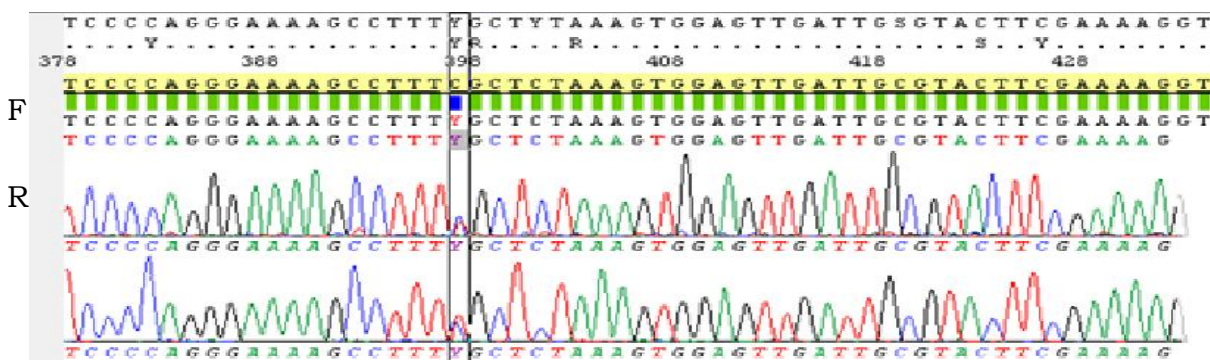
## III –Résultats de dosage d'ADN par nanDrop:

Toutes les ADN sont de très bonnes qualités.

## IV – Résultats de PCR – séquençage:

Le gène trouvé pour chaque patiente a été séquencé (figures 31, 3), puis chaque séquence a été comparée à celles déposées dans la banque des séquences du génome humain NCBI.

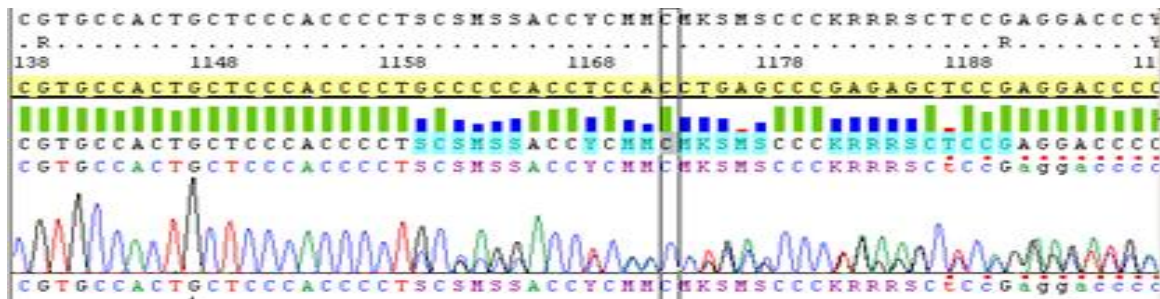
Patiente 4 : âgée de 10 ans et qui présente une mutation délétère c.397C>T à l'état hétérozygote dans l'exon 4 du gène MECP2.



**Figure 20** : Analyse de la séquence de l'exon 4 de gène MECP2 par l'amorce 4A (F,R) de la patiente 4 .

L'alignement de cette première partie d'exon 4 montre une mutation de substitution de paires de nucléotide de type transition 397C>T et par conséquent elle a engendré au niveau protéique un changement Arg133Cys.

Patiente 5 âgée de 4ans et qui présente une mutation délétère 1158\_1186 del à l'état hétérozygote dans l'exon 4 du gène MECP2.

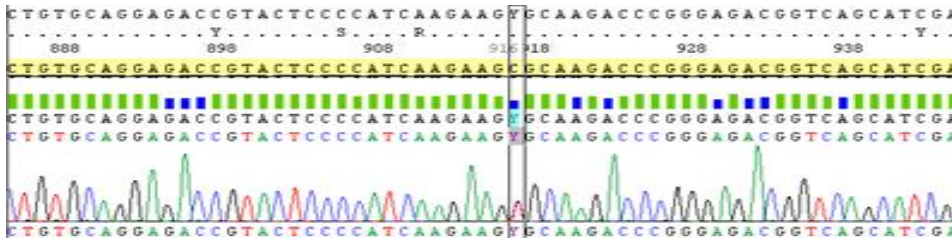


**Figure 21** : Analyse de la séquence de l'exon 4 de gène MeCP2 par l'amorce 4B (F, R) de la patiente 5.

L'alignement de cette partie d'exon 4 montre une mutation de délétion de paire de nucléotide. 1158\_1186del et par conséquent elle a engendré au niveau protéique un changement Pro387Arg.

**Patiente 6 :** âgée de 5ans, présente deux mutations 916C>T; 1208dupC dans l'exon 4 du gène MECP2.

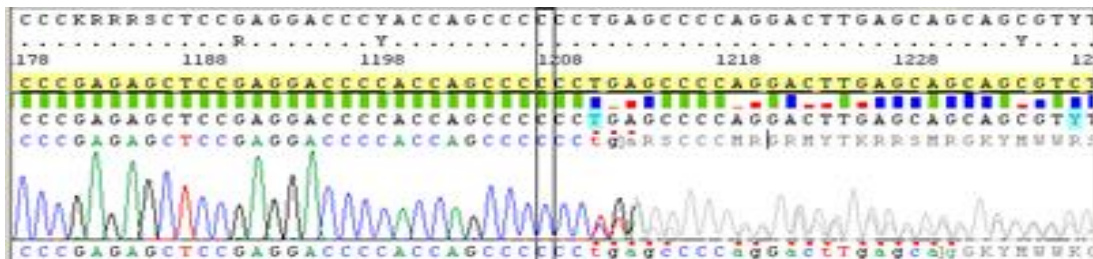
**Mutation 916C>T:**



**Figure 22 :** Analyse de la séquence de l'exon 4 de gène MECP2 par l'amorce 4B (F,R) de la patiente 6

L'alignement de cette partie d'exon 4 montre une mutation de substitution de paire de nucléotide de type transition 916C>T et par conséquence elle a engendré au niveau protéique un changement Arg306Cys

**Mutation 1208dupC :**



**Figure 23 :** Analyse de la séquence de l'exon 4 de gène MeCP2 par l'amorce 4B (F, R) du patient 6

# DISCUSSION

# 1-Facteurs épidémiologiques

## 1-1-Prévalence :

Même limité aux formes typiques, le syndrome de Rett est relativement fréquent, son incidence en Europe a été estimée à 1/15000 filles (HAGBERG, 1995). Elle est identique dans toutes les races et dans tous les pays.

En 1986, on évaluait à 8000, approximativement, le nombre d'enfants atteints de syndrome de Rett vivants aux Etats-Unis.

Des études épidémiologiques menées en Suède et en Ecosse, ont montré que l'incidence du syndrome est supérieure ou égale à celles de maladies comme la phénylcétonurie, qui sont acceptées comme représentant un problème de santé publique majeur.

Les filles atteintes ont une espérance de vie de plusieurs dizaines d'années, mais leur handicap est important : le syndrome de Rett serait responsable de 2 à 3% des handicaps profonds chez les filles (HAGBERG et WIHEMGERSTROM, 1987). Le coût humain et de santé publique est donc très lourd et justifie pleinement la poursuite et l'intensification des efforts de recherche.

Le syndrome de Rett reste méconnu en Afrique et aucune série n'a été publiée à notre connaissance, seulement 5 cas de petites filles originaires du sud tunisien, atteintes du syndrome de Rett dans sa forme typique.

Sa fréquence au Maroc est difficile à estimer en raison :

- Du nombre des diagnostics portés à torts ;
- La méconnaissance de cette maladie ;
- L'absence d'un registre national dont le rôle serait le recensement de tous les cas marocains.

## 1-2-Sexe

Le sexe des enfants ne figure pas parmi les critères de diagnostics (the Rett syndrome diagnostic criteria work group, 1988).

En effet, s'il est certain que l'atteinte des filles est très prééminente, si ce n'est exclusive, il paraît possible que le syndrome de Rett soit observé chez des garçons à caryotype normal.

Plusieurs cas ont été rapportés :

- Jusqu'au 1999, 9 cas de syndrome de Rett chez le garçon ont été identifiés dans le monde.
- Janvier MM (mars 1999) rapporte le cas d'un garçon atteint de syndrome de Rett originaire de l'Arabie Saoudite. Ce garçon remplissait l'ensemble des critères de diagnostic :
  - ☞ 7 sur 9 des critères nécessaires,
  - ☞ 6 sur 8 des critères d'appoints.
- 1 cas en Brésil, un garçon avec un caryotype XXY, et une mutation du gène MECP2.
- 2 cas en Australie :
  - ☞ Le premier garçon à caryotype normal (46, XY), remplissait tous les critères diagnostic, mais aucune mutation n'est détectée dans la région du codage du gène MECP2.
  - ☞ Le deuxième garçon avait aussi les particularités classiques de syndrome de Rett, cependant, l'analyse cytogénique du sang périphérique a révélé un caryotype (47, XXY(23)/ 46, XY(7)) évoquant un syndrome de Klinefelter, une mutation au niveau du gène MECP2 (T158M) a été identifiée.



Pour conclure, les garçons atteints de syndrome de Rett présente une hétérogénéité phénotypique, ils remplissent la plupart, mais pas l'ensemble des critères diagnostiques.

Des critères moins restrictifs sont nécessaires pour inclure cette variante, qui doit être considérée dans l'évaluation des garçons avec régression du développement mental idiopathique, comportement autistique, et perte de la manipulation manuelle.

### **1-3-L'histoire familiale**

Le syndrome de Rett est un trouble globale du développement mental qui survient de façon sporadique dans 99,5% des cas.

La mutation du gène MECP2 est identifiée approximativement dans 70-80% des cas sporadiques.

Cependant, de sévères cas familiaux ont été rapportés, ils représentent approximativement 0,5% des cas :

- 2 sœurs en Allemagne de l'ouest (Hanfeld 1985) ;
- 2 demi-sœurs nées d'une mère en suède (HAGBERG 1983) ;
- 2 jumelles monozygotes à l'USA (Coleman 1986) ;
- 4 familles en France (Villard.L 2001).

Le taux de consanguinité n'est pas augmenté.

Le sexe ratio dans la fratrie est normal dans la plus part des études.

En ce qui concerne les avortements spontanés et les mort-nés :

- Rett avait été frappé par le taux élevé d'avortement et de mort-nés chez les 22 patientes qu'il avait décrit initialement en 1996 ;
- HAGBERG (1983) chez les 35 patientes Suédoises, Françaises et Portugaises, rapporte peu d'avortements spontanés et aucune mort-né ;
- Killian (1986) sur une série de 220 cas ne retrouve pas d'augmentation du nombre des avortements spontanés et un taux faible de mort-nés 1%.

L'âge des parents à la naissance n'est pas augmenté.

## **2-Manifestations cliniques**

Le tableau clinique de syndrome de Rett est actuellement bien défini, il se caractérise par le groupement d'un certain nombre de signes de détériorations motrices et comportementales qui évoluent dans le temps.

Le diagnostic positif repose donc sur l'ensemble des critères << critères de Vienne>> précédemment définis, qui sont certes arbitraires mais présentent les caractéristiques de la grande majorité des cas diagnostiqués. Leur stricte application permet la constitution d'un groupe homogène, nécessaire pour les études de recherche.

Les formes atypiques doivent être étudiées et discutées avec le même intérêt, mais ne doivent pas venir<<contaminer>> le groupe principal.

La classification en 4 stades évolutifs, si elle a le mérite d'être didactique, elle ne correspond pas toujours à la réalité :

- Le début de la maladie peut être plus précoce dès les première mois de vie ; quelque fois il peut être subaigu, d'allure encéphalique ;
- La perte des acquisitions et le comportement autistiques de la phase de régression rapide peuvent n'être que partiels ;
- La date d'apparition des crises convulsives est variable
  - Le degré de détérioration mental varie d'un cas à l'autre, tout en restant, en règle, important.

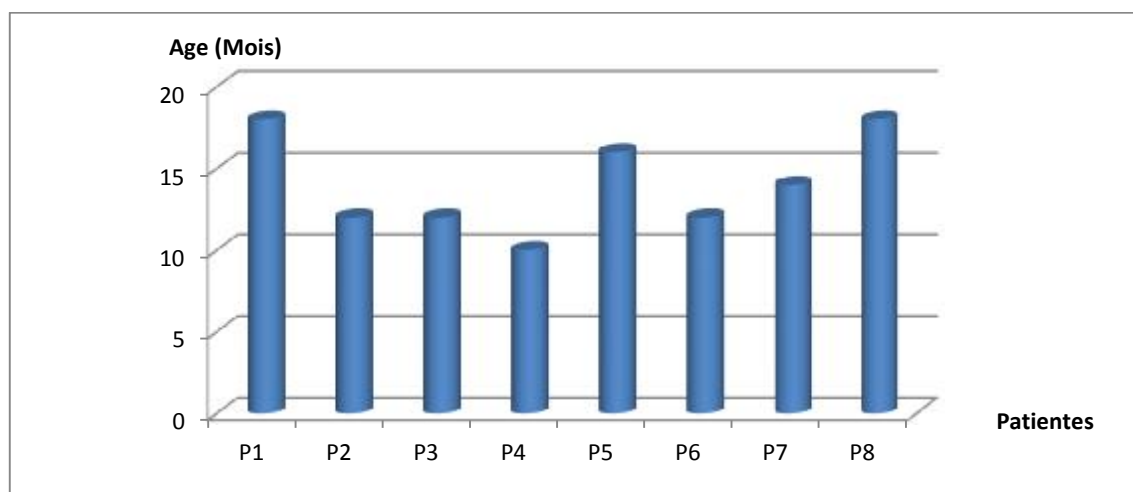
Notre étude concerne 8 cas de syndrome de Rett suivis en consultation de neuropédiatrie au CHU Hassan II de Fès. En comparant nos 8 cas entre eux et avec les données de la littérature, on peut noter les remarques suivantes :

- ☞ La période périnatale ainsi que le développement pendant les premiers mois de vie était normaux.

La même notion est rapportée par la littérature. Il est actuellement admis que ces fillettes bien qu'ayant un développement initial normal, sont en général plus <<plus calme>>, et moins actives que leurs frères et sœurs (kerr, 1995).

☞ Le début des troubles se situe entre 6 et 18 mois conformément à ce qui est décrit dans la littérature, précédé parfois par une stabilisation des acquisitions.

Patientes	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
Age de Début de la symptomatologie (mois)	18	12	12	10	16	12	14	18

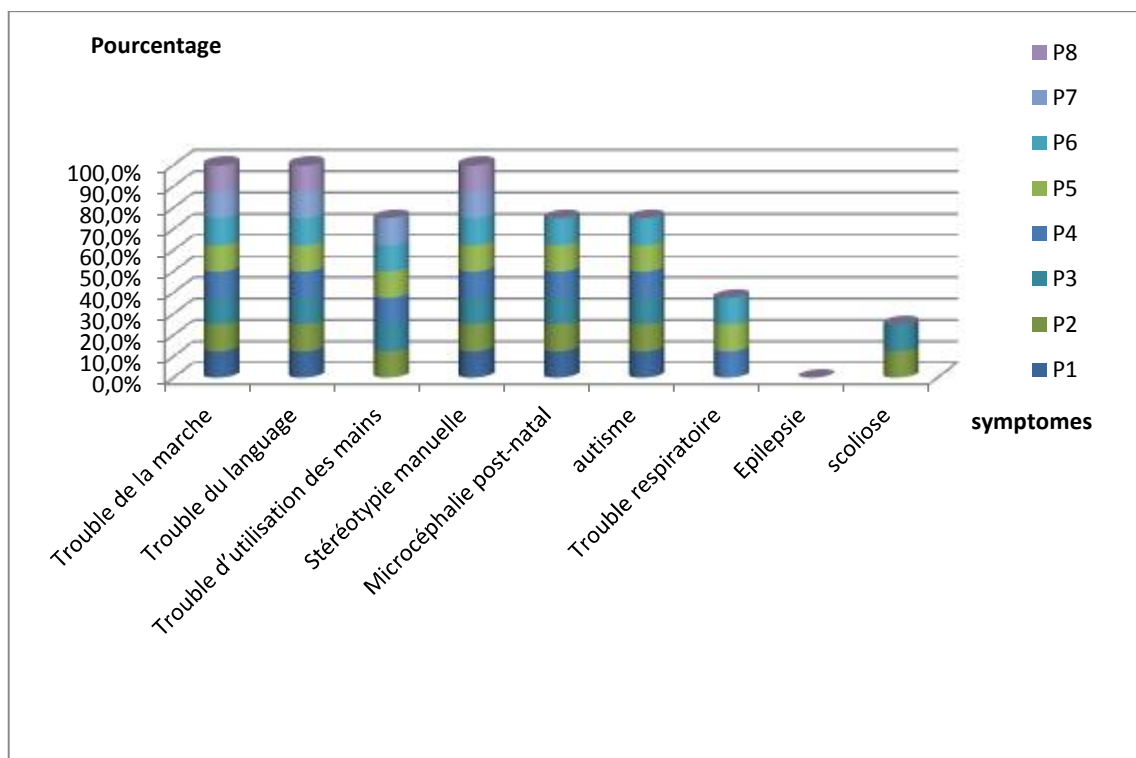


**Histogramme 1** : âge de début de la symptomatologie

L'histogramme 1 montre que l'âge moyen d'apparition de la symptomatologie chez nos patientes est de 14 mois.

Les signes inaugurant les plus fréquents sont la perte de l'utilisation des mains, une diminution des capacités intellectuelles et du début verbal, chez la plus part de nos patientes. Ceci concorde avec les données de la littérature (HAGBERG 1989 ; Kerr 1995)

☞ La plus part de nos patientes sont adressées pour régression psychomoteur, microcéphalie ou des mouvements stéréotypie des mains. L'évolution se fait ensuite vers un tableau de polyhandicap souvent compliqué d'épilepsie puis de l'apparition d'une scoliose (4).



**Histogramme 2** : pourcentage des symptômes rapportés par nos patientes

L'histogramme montre que :

☞ 100 % des patientes présentent des troubles de la marche, trouble du langage et des stéréotypies manuelles.

☞ Dans l'étude de Naidu (1986) à propos de 70 cas, la perte de l'utilité manuelle était évidente dès l'âge de 6 mois en plus de l'inattention dans 13 % des cas. Il précise aussi que la présence tardive (après 4 ans) de l'usage des mains de façon intermittente tel que : momentanément tenir un biberon, utiliser une cuillère ou feuilleter un livre, n'exclut pas le diagnostic si dans

l'ensemble l'utilité manuelle est limitée de façon importante chez ces enfants.

- ☞ Le trouble du langage est présent chez toutes les patientes, même pour ceux qui l'on acquit avant l'installation des troubles.

Il est de même pour les données de la littérature, la vocalisation est réduite à de rare grognements.

- ☞ Selon les données de la littérature, un bon nombre d'enfants peut se tenir debout et marcher avec soutien. Quelques enfants peuvent marcher seuls. Mais des anomalies de la démarche sont toujours notées : RETT considère qu'il s'agit d'une apraxie de la marche. Il décrit dans les stades précoces une marche à petits pas lents, plante de pied entièrement posée sur le sol et grands balancements de la partie supérieure du tronc vers le pied d'appui, puis avec développement du varus équin et une marche sur la pointe des pieds.

HAGBERG (1983), AICARDI (1986) et PIENUDA (1986) parlent de marche ataxique. La marche est à la fois instable et rigide.

Naidu (1986) reprend le terme d'apraxie de la marche, et il note que certains enfants progressivement deviennent peu désireux de marcher. Et chez d'autres enfants, un changement au niveau de la marche du sol, dans la texture ou la pente, provoque une hésitation à poursuivre la marche.

- ☞ 80 % des patientes présentes des troubles d'utilisation des mains, microcéphalie post-natal, et autisme.

- ☞ Dans l'étude de Naidu (1986) à propos de 70 cas, la perte de l'utilité manuelle était évidente dès l'âge de 6 mois en plus de l'inattention dans 13 % des cas. Il précise aussi que la présence tardive (après 4 ans) de l'usage des mains de façon intermittente tel que : momentanément tenir un biberon, utiliser une cuillère ou feuilleter un livre, n'exclut pas le diagnostic si dans

l'ensemble l'utilité manuelle est limitée de façon importante chez ces enfants.

☞ Selon les auteurs, la microcéphalie est constante et fait partie des critères obligatoires du diagnostic. HAGBERG rapporte que :

- Dans les formes typiques, le périmètre crânien étant normal à la naissance, se ralentie progressivement aboutissant à une microcéphalie acquise avec un périmètre crânien de  $-2DS$  à l'âge de 4 ans et allant jusqu'au  $-3DS$  à l'âge de 8ans. Le degré de la microcéphalie est fortement corrélée à l'âge auquel, un ralentissement de  $-1DS$  est décelé.
- Dans les formes atypiques, le périmètre crânien est dans les limites de la normal mais il est significativement au dessous de la limite supérieur ( $-0,8DS$  du grand périmètre).

☞ Des traits autistiques sont rapportés dans la littérature, parfois même on assimile à tort le syndrome de Rett à l'autisme.

☞ 37,5 % des patientes présentent des troubles respiratoires.

Une hyperventilation avec des blocages respiratoires est signalée chez les patientes 4,5 et 6.

Ces crises de tachypnée sont fréquemment retrouvées dans les différentes observations publiées. Ces troubles respiratoires ne surviennent qu'en état de veille, en particulier quand l'enfant est soumis à un stress émotionnel ou physique, ils sont caractérisés par la répétition de polypnées et d'apnée qui selon leur durée peuvent s'accompagner de cyanose et même de perte de connaissance.

☞ 25 % des patientes présentent une scoliose.

Selon Bassett et TOLO, la scoliose est présente chez les 2/3 des patientes atteintes de syndrome de Rett , dans une tranche d'âge entre 11 et 15ans. D'autres auteurs rapportent une fréquence entre 42 et 83%.

La scoliose est d'origine neurogénique, elle se développe précocement.

Selon l'étude de Bassett et TOLO dans 40% des cas avant l'âge de 11ans.

D'autres auteurs parlent d'un âge moyen entre 7 et 11ans. Harrison et Webb ont trouvé que 72% des scoliozes apparaissent avant l'âge de 8ans.

Ce qui est certain, c'est que plus l'enfant est proche de la maturité osseuse (phase de croissance), plus la probabilité d'atteinte scoliotique est élevée (83% à 15ans dans l'étude de Basset).

☞ Aucune de nos patientes ne rapportent la notion d'épilepsie.

Selon la plupart des auteurs, les crises épileptiques surviennent chez 75–80% des patientes.

Quand à Steffenburg (2001), sur une étude de 53 patientes atteintes de syndrome de Rett, il rapporte une fréquence plus élevée 94%, la moyenne d'âge de début est de 4ans, et les crises partielles sont les plus fréquentes.

Après l'adolescence, les crises ont tendance à devenir moins fréquentes et plus courtes. Ceci étant probablement dû à la désintégration progressive de l'activité bioélectrique du système nerveux centrale plutôt qu'au traitement anti-convulsivant.

Les crises épileptiques fréquentes sont associées au périmètre crânien le plus petit.

### L'évolution :

Il existe donc une très grande hétérogénéité sur le plan clinique, il en est de même sur le plan évolutif :

- Le degré d'invalidité à long terme est variable, certains enfants sont rapidement très handicapés, sur le plan moteur comme sur le plan intellectuel, avec très peu ou pas de vie relationnelle ; d'autres sont partiellement autonomes, arrivent à manipuler, voire à émettre quelques mots isolés, parfois associés ; 1 /3 des enfants ne marchent jamais ; d'autres sont autonomes encore à l'adolescence.
- Les stéréotypies s'atténuent habituellement après 6-8 ans, elles peuvent par ailleurs persister de façon impressionnante.

### L'espérance de vie

Dans les pays scandinaves, certaines femmes ont dépassé l'âge de 40ans.

La sémiologie clinique à l'âge adulte est encore mal définie, ce qui prédomine chez elles, sont les signes de spasticité et l'amyotrophie.

Certaines patientes de 30ans, ou plus toujours capable de marcher malgré la gravité du syndrome neurologique, mais la grande majorité d'entre elles sont confinées au fauteuil roulant. Jacobsen rapporte le cas d'une femme atteinte de syndrome de Rett qui a vécu jusqu'à l'âge de 60ans.

### La mortalité :

- L'incidence de la mort subite dans le syndrome de Rett est plus importante que celle de la population générale.
- Sa relation avec les troubles électro-cardiographiques (allongement de QT, et anomalies de l'onde T) est fortement suspectée.



### **3-Formes cliniques :**

Comme pour tout syndrome, de nombreuses variantes sont décrites.

Certaines ne doivent être admises qu'avec une grande prudence, compte tenu de non spécificité des signes cliniques pris isolément ou même en association. Le syndrome autistique, le déficit mental, les stéréotypies, et aussi les signes les plus inconstants du syndrome peuvent s'associer de façon variable et surtout atteindre des degrés variable.

Il y a donc une période, qui peut s'étaler sur plusieurs années, au cours de laquelle le diagnostic reste hésitant, et où une enquête étiologique approfondie est indiscutable, même si elle doit rester négative. C'est cette négativité, et l'évolution des signes dans le temps qui fait le diagnostic.

### **4-Etude moléculaire :**

L'objectif de ce travail est de diagnostiquer par biologie moléculaire le syndrome de Rett tout en étudiant les mutations présentes dans notre échantillon de population marocaine.

Pour ce fait la stratégie est de commencer par le séquençage des exons 4 puis 3, si le résultat est négatif, une étude des exons 1 et 2 sera réalisée.

Seulement trois de nos patientes présentent une mutation du gène MeCP2 :

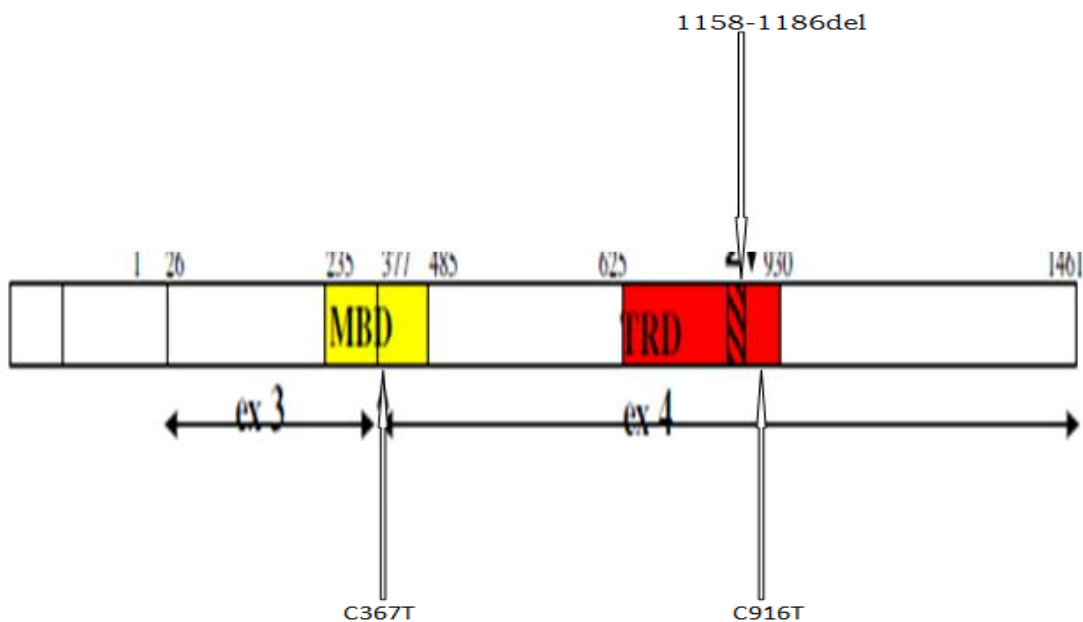
- ☞ la mutation 397C>T chez la patiente 4, C'est une mutation de faux-sens localisée au niveau de l'exon 4 précisément au niveau de la région MBD « domaine de liaison aux cytosines méthylées »
- ☞ la mutation 1158-1186del chez la patiente 5, C'est une mutation délétère localisée au niveau de l'exon 4 précisément au niveau de la région TRD « domaine de répression transcriptionnelle»

☞ la mutation 916C>T chez la patiente 6, C'est une mutation de faux-sens localisée au niveau de l'exon 4 précisément au niveau de la région TRD « domaine de répression transcriptionnelle»

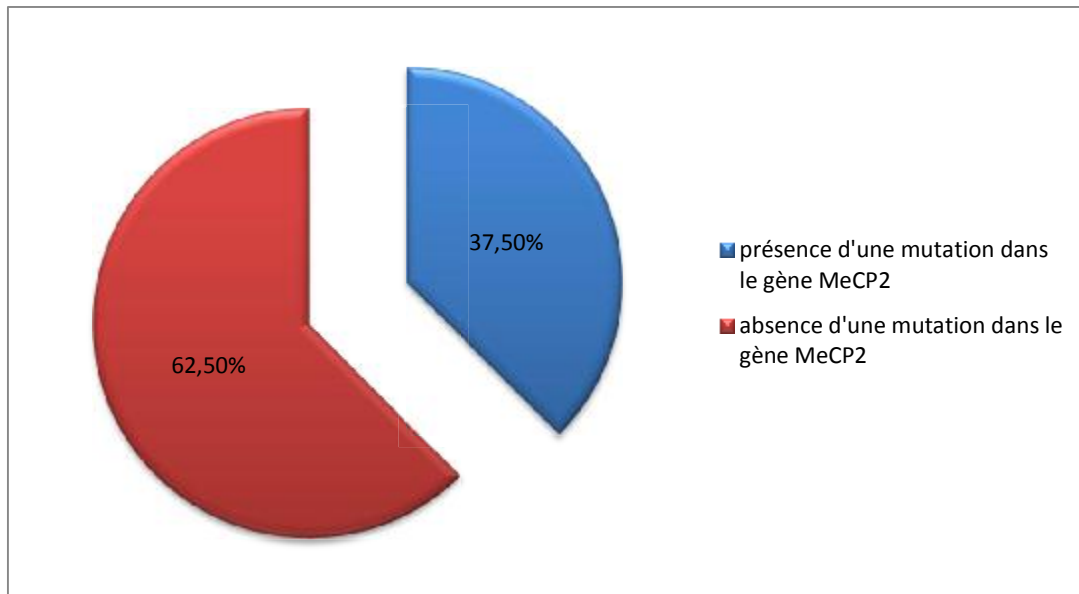
Cela fait 3 patients mutés sur 8 patients au total, dont un ayant deux mutations, ce qui représente un taux de couverture du syndrome de Rett de presque 38%.

**Tableau 7 : Les différentes mutations du gène MECP2**

Patiente	Nucléotide changé	Type de mutation	Domaine	Exon
P4	397C>T	Faux sens	MBD	Exon 4
P5	1158_1186del	Polymorphisme	TRD	Exon 4
P6	916C>T Arg306Cys	Faux-sens	TRD	Exon 4

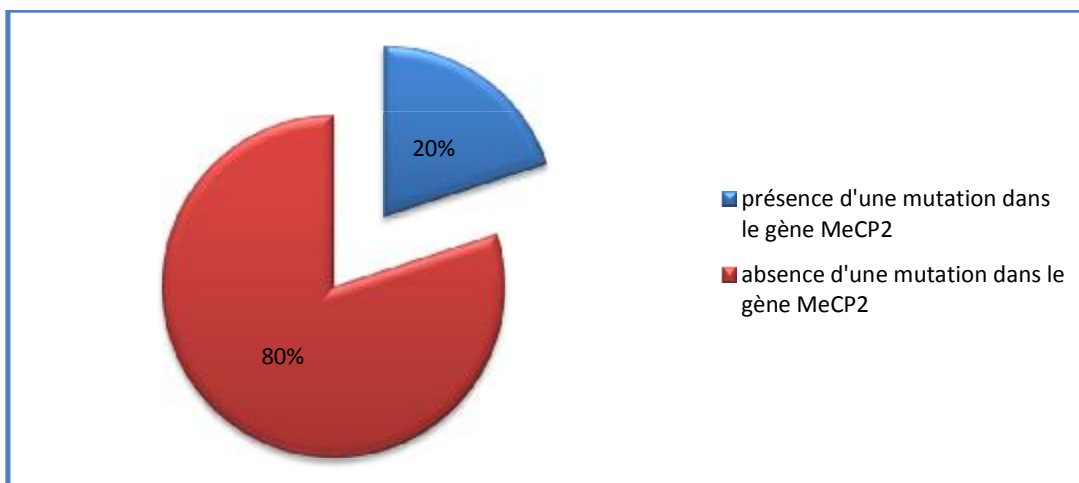


**Figure 24:** Localisation des différentes mutations du gène MeCP2 dans notre série

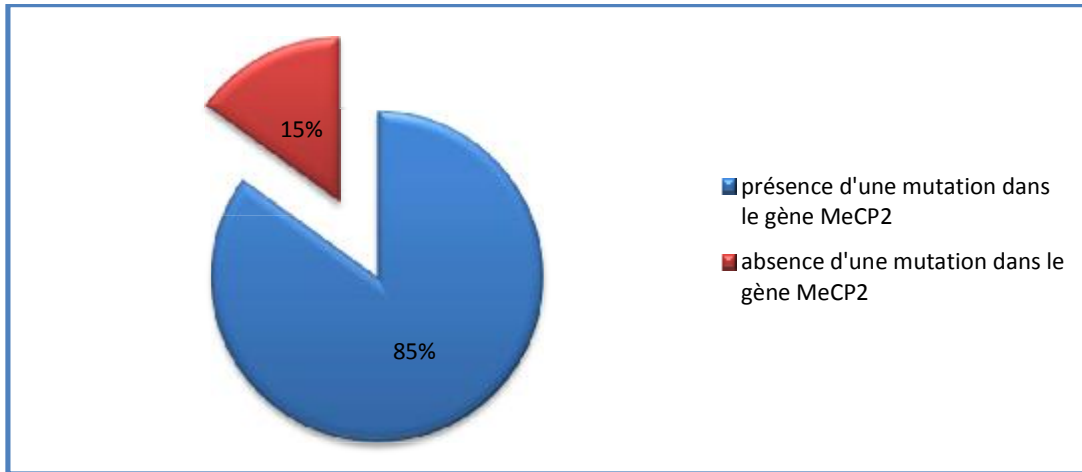


**Pourcentage des patientes présentant une mutation dans le gène MeCP2 dans notre étude**

En France en 1999, Amir et al. (Amir et al. 1999) ont mis en évidence 5 mutations dans le gène MECP2 chez 29 patientes étudiées, ce qui représentait un taux de couverture du syndrome de Rett d'environ 20%. Lors de la deuxième publication (Wan et al. 1999), le gène MECP2 fut incriminé dans 50% des cas. Aujourd'hui, les analyses le mettent en cause dans 80 à 85%, voir même 100% des cas (Auranen et al. 2001).



**Pourcentage des patientes présentant une mutation dans le gène MeCP2 en France en 1999 (Amir et Al)**



**Pourcentage des patientes présentant une mutation dans le gène MeCP2 en France en 2001 (Auranen et Al)**

Cette augmentation est à corrélérer fortement avec une sélection de plus en plus stricte des patientes présentant un syndrome de Rett typique.

# CONCLUSION

Le syndrome de Rett est une maladie d'origine génétique se traduisant par un trouble grave du développement du système nerveux central, survenant chez les filles. Il entraîne un polyhandicap avec déficience intellectuelle et infirmité motrice, assez souvent sévères. Son diagnostic repose essentiellement sur l'association de plusieurs signes cliniques, un profil évolutif caractéristique avec exclusion de certains diagnostics différentiels.

Sur le plan moléculaire, le syndrome de Rett est causé, dans près de 80% des cas typiques et 30% des formes atypiques, par des mutations du gène MECP2 localisé en Xq28 du chromosome X, il s'agit d'un gène répresseur ayant un rôle de régulation de la transcription encore mal précisé. La perte de la fonction de la protéine MeCP2 pourrait entraîner une surexpression de certains gènes, qui serait dommageable pour le développement du système nerveux central.

Le MeCP2 est donc une protéine multifonctionnelle capable de moduler de façon quantitative et qualitative l'expression génique et dont le défaut d'expression est à l'origine d'une pathologie lourde. Ses fonctions biologiques majeures sont désormais clairement identifiées mais pourtant, ses cibles génétiques sont imprécises et leur identification est encore une source de débat dans la littérature.

Dans cette étude, notre travail s'est focalisé sur la mise en évidence des mutations délétères du gène MECP2 et ceci pour une meilleure prise en charge des patients et de leurs familles dans le domaine neuropédiatrique.

# RESUME

## RESUME

Le syndrome de Rett est une maladie d'origine génétique causée dans près de 80% des cas typiques et 30% des formes atypiques par des mutations dans le gène MECP2 localisé en Xq28 qui est un répresseur de la transcription. La perte de la fonction de la protéine MeCP2 pourrait entraîner une surexpression de certains gènes, qui serait dommageable pour le développement du système nerveux central.

Ce travail rétrospectif colligé au laboratoire de génétique médicale et d'oncogénétique du CHU Hassan II de Fès portant sur 8 patientes âgées entre 2 et 11 ans, pour suspicion de syndrome de Rett durant une période de 3 ans, allant de Janvier 2010 au Décembre 2012. L'analyse moléculaire de l'ADN de ces patientes vise à mettre en évidence la présence des mutations délétères du gène MECP2.

Au terme de cette étude, nous avons noté les résultats suivants :

- ☞ Le diagnostic de syndrome de Rett repose essentiellement sur l'association de plusieurs signes cliniques dans un contexte évolutive très caractéristique.
- ☞ La plupart de nos patientes sont adressées pour régression psychomotrice, microcéphalie et mouvements stéréotypés des mains.
- ☞ L'exploration moléculaire vise à mettre en évidence des mutations délétères du gène MECP2.
- ☞ Dans notre série, seulement trois de nos patientes présentant une mutation du gène MeCP2 ce qui représentait un taux de couverture du syndrome de Rett d'environ 38 %.
- ☞ La présence d'une mutation du gène MECP2 permet une meilleure prise en charge des patients et de leurs familles dans le domaine neuropédiatrique.



## SUMMARY

Rett syndrome is a genetic disease caused nearly 80% in typical cases and 30% of atypical forms by mutations in the MECP2 gene located in Xq28, which is a transcriptional repressor. Loss the function of the MeCP2 protein could cause overexpression of certain genes, which would be detrimental to the development of the central nervous system.

This retrospective study compiled Laboratory of Medical Genetics and oncogenetic CHU Hassan II of Fez on 8 patients aged between 2 and 11 years on suspicion of Rett syndrome during a period of 3 years from January 2010 to December 2012. Molecular analysis of the DNA of these patients is to highlight the presence of deleterious mutations of the MECP2 gene.

At the end of this study, we found the following results:

- ☞ The diagnosis of Rett syndrome is mainly based on the combination of several clinical signs in a very characteristic evolutionary context.
- ☞ Most of our patients are referred for psychomotor regression, microcephaly and stereotypic hand movements.
- ☞ Molecular exploration aims to highlight deleterious mutations of the MECP2 gene.
- ☞ In our series, only three of our patients with a mutation in the MeCP2 gene representing a coverage rate of Rett syndrome by about 38%.
- ☞ The presence of a mutation in the MECP2 gene provides better support for patients and their families in the area neuropediatric.

## خلاصة

متلازمة ريت هو مرض وراثي يرجع سببه في 80 % من الحالات النموذجية و30 % الحالات الشاذة إلى وجود طفرة في الجينة MECP2 المتواجدة في Xq28 و التي هي قانع نسخي, يتسبب فقدان وظيفة البروتين في الزيادة من تعبير بعض الجينات والتي من شأنها ان تكون ضارة بتطور النظام العصبي المركزي.

هذه الدراسة هي عبارة عن عمل استعدادي مسجل بالمستشفى الجامعي الحسن الثاني بفاس بمصلحة الأمراض الوراثية, بصدد 8 حالات متلازمة ريت تتراوح أعمارهم بين 2 و 11 سنة و المسجلة خلال الفترة الممتدة بين 1 يناير 2010 إلى 30 دجنبر 2012 . الهدف من هذه الدراسة الجزئية للحمض النووي لهؤلاء المرضى هو إبراز وجود طفرات ضارة في الجينة MECP2 .  
بعد هذه الدراسة تمكنا من تسجيل النتائج التالية

:

يستند تشخيص متلازمة ريت أساسا على مزيج من عدة علامات سريرية في سياق تطوري مميز

أغلبية الحالات يتم إرسالها إما بسبب تخلف حركي-نفسى, صغر الرأس أو حركات اليد النمطية

الهدف من الدراسة الجزئية هي إبراز وجود طفرات ضارة في الجينة MECP2 .

من خلال السلسلة التي قمنا بدراستها وجدنا انه فقط 3 مرضى من أصل 8 هم اللذين لديهم طفرة في الجينة MECP2 و الذي يمثل 30% من معدل تغطية متلازمة ريت.

إبراز وجود طفرة في الجينة MECP2 يمكن من توفير دعم أفضل للمرضى و أسرهم في مجال الأمراض العصبية للأطفال .

# **BIBLIOGRAPHIE**

- (1) : RETT A. (1977)  
Cerebral atrophy associated with hyper ammoniaemia  
In Winken P.J., Bruyn G.W. (eds): Hand book of clinical Neurology, vol.29,  
Amsterdam, North Holland: 205–329
- (2) : HAGBERG B., ALCARDI J., DIAS K., RAMOS O. (1983)  
A progressive syndrome of autism, dementia, ataxia and loss of purposeful  
activity in girls: Rett's syndrome, description, report of 35 cases. Ann Neurol, 14, p:  
471–479.
- (3) : ARZIMANGOLOU A. (1993)  
Le syndrome de Rett : signes Clinique diagnostic  
In association française du syndrome de Rett, édition, une maladie génétique :  
le syndrome de Rett p : 17–32
- (4) : Académie vesaille, France
- (5) : Le syndrome de Rett. Encyclopédie orphane grand public.  
[www.orpha.net/data/patho/pub/fr/rett-FRfrPub91v01.pdf](http://www.orpha.net/data/patho/pub/fr/rett-FRfrPub91v01.pdf)/ mai 2006.
- (6) : Institut national de la santé et de la recherche médicale
- (7) : Développement d'une stratégie de criblage du gène MECP2 chez des patientes  
atteintes d'un syndrome de Rett. Professeur Philippe JONVEAUX 6 juin 2002.
- (8) : Schanen, C. 2001. Rethinking the fate of males with mutations in the gene  
that causes Rett syndrome. Brain Dev 23 Suppl 1:S144.
- (9) : Villard, L. 2007. MECP2 mutations in males. J Med Genet.
- (10) : Schanen, N. C., T. W. Kurczynski, D. Brunelle, M. M. Woodcock, L. S. t. Dure,  
and A. K. Percy. 1998. Neonatal encephalopathy in two boys in families with  
recurrent Rett syndrome. J Child Neurol 13:229.
- (11) : Lundvall, M., L. Samuelsson, and M. Kyllerman. 2006. Male Rett phenotypes  
in T158M and R294X. MeCP2-mutations. Neuropediatrics 37:296.

- (12) : Orrico, A., C. Lam, L. Galli, M. T. Dotti, G. Hayek, S. F. Tong, P. M. Poon, M. Zappella, A. Federico, and V. Sorrentino. 2000. MECP2 mutation in male patients with non-specific X-linked mental retardation. FEBS Lett 481:285.
- (13) : Kriaucionis S, Bird A. DNA methylation and Rett syndrome. Hum Mol Genet 2003; 12: 221–227.
- (14) : GLAZE D.G, FROST J.D,ZOGHBI H.Y, PERCY A.K. (1987)  
Rett's syndrome: correlation of electroencephalographic characteristics with clinical staging  
Arch Neurol, 44, p: 1053–56.
- (15) : NIEDERMEYER E., RETT A., RENNER H. (1986)  
Rett syndrome and the electroencephalogram  
Am. J.Med. Genet., 24, 195–199.
- (16) : ECHENNE B., AZAIS M. (1993)  
Le syndrome de Rett : régressions neurologiques et mentales  
Médecine Infantile, Vol.100,N 7,p : 549–554.
- (17) : ISHIZAKI A., INOUE Y., SASAKI H., FUKUVAMA Y. (1989)  
Longitudinal observation of electroencephalograms in the Rett syndrome  
Brain Dev, 11, p: 407–12.
- (18) : AICARDI J., RAMOS O. (1986)  
Le syndrome de Rett : autisme, démence et ataxie d'évolution progressive chez la fille.  
Neuropsychiatrie de l'enfance, 34 (5–6), 275–281.
- (19) : GOUTIERS F., AICARDI J. (1985)  
Rett syndrome : clinical presentation and laboratory investigations in 12 Further French patients.  
Brain Dev. 7: 305–306.

- (20) : PERCY A.K., ZOGHBI H., RICCARDI V.M. (1985)  
Rett syndrome: initial experience with an emerging clinical entity  
Brain Dev. 7: 300–304
- (21) : ZOGHBI H.Y., PERCY A.K., GLAZE D.G., BUTLER I.J., RICCARDI V.M. (1985)  
Reduction of biogenic amine levels in the Rett syndrome  
N.Engl.J. Med. 313: 921–924
- (22) : BUDDEN S.S. (1986)  
Rett syndrome: Studies of 13 affected girls  
Am.J.Med. Genet. 24: 61–72.
- (23) : NAIDU S., MURPHY M., MOSER H.W.,RETT A. (1986)  
Rett syndrome: Natural history in 70 Cases  
Am.J.Med. Genet. 24: 61–72
- (24) : BADER G.G., WITT-ENGERSTROM I., HAGBERG B. (1989)  
Neurophysiological findings in the Rett syndrome: visual and auditory  
brainstem, middle and late evoked reponses  
Brain Dev 1989, 11, 110–4
- (25) : LUPESCU R., AYMON C., CALACHE E., DUPEYRON J.P. (1999)  
Syndrome de Rett et anesthésie : à propos d’un cas  
Cath Anesthesiol 1999, 47 (4) : 243–246
- (26) : CIRIGNOTTA F., LUGARESI E., MONTAGNA P. (1986)  
Breathing impairment in Rett syndrome  
Am.J.Med. Genet. 24: 167–173.
- (27) : GLAZE D.G.,FORST J.D., ZOGHBI H.Y., PERCY A.K. (1987)  
Rett’s syndrome: characterization of respiratory patterns and sleep  
Ann Neuro, 1987, 21: 377–382

- (28) : LUGARESI E., CIRIGNOTTA F., MONTAGNA P. (1985)  
Breathing in the syndrome  
Brain Dev, 1985, 7: 329–333
- (29) : ARMSTRONG D. (1995)  
The neuropathology of Rett syndrome  
Neuropediatrics, 26: 100–104
- (30) : VOSHIKAWA H., FUEKI N. (1992)  
Cerebral Blood Flow and oxygen metabolism in the Rett syndrome  
Brain Dev, 14 (supplement): S69–S74
- (31) : LIDSTROM JAN. (1994)  
Scoliosis in Rett syndrome: clinical and biological aspects  
SPINE vol.19, N 14,p : 1632–1635.
- (32) : AL-MATEEN M., PHILIPPART M., SHIELDS D. (1986)  
A Commonly overlooked progressive encephalopathy in girls  
A.J.D.C. 140: 761–765
- (33) : RIEDERER P., BRUCKE T. (1985)  
Neurochemical aspects of the Rett syndrome  
Brain Dev. 7: 351–360
- (34) : NOMURA Y., SEGAMA M., HASEGAWA M. (1984)  
Rett syndrome clinical studies and pathophysiological consideration  
Brain Dev. 6: 475–486
- (35) : HARRIS J.C., WONG D.F. (1986)  
Positron emission tomographic study of D2 Dopamine receptor binding and  
CSF biogenic amine metabolites in Rett syndrome  
Am. J. Med. Genet. 24: 201–210.

- (36) : DUNN HG. ET AL. (2001)  
Rett syndrome: review of biological abnormalities  
Can.J. Neurol Sci. Feb, 28(1): 16–29
- (37) : JELLINGER K., SEITELBERGER F. (1986)  
Neuropathology of Rett syndrome  
Am.J. Med. 24: 259–288.
- (38) : OLFORDS A., HAGBERG B. (1988)  
Rett syndrome spinal cord neuropathology  
Pediatr Neurol, 4, p: 172–174
- (39) : COKER S.B., MELNYK A. (1991)  
Rett syndrome and mitochondrial enzyme deficiencies  
J.Child Neurol 1991, 6, p: 164–166
- (40) : Développement d'une stratégie de criblage du gène MECP2 chez des patientes atteintes d'un syndrome de Rett. Professeur Philippe JONVEAUX 6 juin 2002
- (41) : LIVET M.O. (1998)  
Autisme  
Neurologie pédiatrique (flammarion). 2eme édition, p :953–959
- (42) : AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION : DSM– IV:  
Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux, 4eme édition.  
Traduction française par J-D Gueffi et al  
Masson, Paris, 1996, p : 1056
- (43) : GILLBERG C. (1988)  
In the Borderline of autism and Rett syndrome : five case studies  
5<sup>th</sup> International conference on Rett syndrome: Vienne, 4–7 novembre 1988



- (44) : VOUREC'H P. ET AL. (2001)  
No mutations in the coding region of the Rett syndrome gene MECP2 in 59 autistic patients  
Eur J. Hum Genet, Jul, 9(7):556–8
- (45) : CHABROL B. (1998)  
Ceroïde lipofuscine  
Flammarion–Neurologie pédiatrique 2eme edition, p: 690–695
- (46) : SANNA–LEEAN V., RAILI R., ET AL. (1994)  
Early differential diagnostic of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis, Rett syndrome and Krabb disease by CT and MR AJNR AM.J. Neuradiol, 15 : 1443–1453.
- (47) : CHABROL B. (1998)  
Pathologies du métabolisme intermédiaire : phénylcétonurie  
Flammarion Neurologie pédiatrique, 2eme edition, p: 656–7
- (48) : <<Le Syndrome de Rett et ses implications pédagogiques>> Jeff Sigafoos et GailWoody Revue européenne de Handicap Mental.
- (49) : Paisey T.J.H., Whitney R.B. & Wainczak S.M. (1993). Case study: Noninvasive behavioral treatment of self-injurious hand stereotypy in a child with Rett syndrome. Behavioral Residential Treatment 8, ,133–145.
- (50) : : Professeuse Josette MANCINI « le syndrome de Rett » mars 2004.
- (51) : Développement d'une stratégie de criblage du gène MECP2 chez des patientes atteintes d'un syndrome de Rett. Professeuse Philippe JONVEAUX 6 juin 2002
- (52) : EXPLORATION DES ROLES IMMUNO–MODULATEURS DE MECP2 ET DE SON TRANSFERT INTERCELLULAIRE . Julie MIRALVES Le 19 Octobre 2007
- (53) : <<Le Syndrome de Rett et ses implications pédagogiques>> Jeff Sigafoos et GailWoody Revue européenne de Handicap Mental.

- (54) : Paisey T.J.H., Whitney R.B. & Wainczak S.M. (1993). Case study: Noninvasive behavioral treatment of self-injurious hand stereotypy in a child with Rett syndrome. *Behavioral Residential Treatment* 8, ,133–145.
- (55) : Lyon, M. F. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* 190:372.
- (56) : MeCP2: structure and function Nicholas L. Adkins and Philippe T. Georgel *Biochem. Cell Biol.* Downloaded from [www.nrcresearchpress.com](http://www.nrcresearchpress.com) by Laurentian University on 02/15/12.
- (57) : Lewis, J. D., R. R. Meehan, W. J. Henzel, I. Maurer-Fogy, P. Jeppesen, F. Klein, and A. Bird. 1992. Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell* 69:905.
- (58) : Meehan, R. R., J. D. Lewis, and A. P. Bird. 1992. Characterization of MeCP2, a vertebrate DNA binding protein with affinity for methylated DNA. *Nucleic Acids Res* 20:5085.
- (59) : Adler, D. A., N. A. Quaderi, S. D. Brown, V. M. Chapman, J. Moore, P. Tate, and C. M. Disteché. 1995 The X-linked methylated DNA binding protein, *Mecp2*, is subject to X inactivation in the mouse. *Mamm Genome* 6:491.
- (60) : Coy, J. F., Z. Sedlacek, D. Bachner, H. Delius, and A. Poustka. 1999. A complex pattern of evolutionary conservation and alternative polyadenylation within the long 3'-untranslated region of the methyl-CpG CpG binding protein 2 gene (*MeCP2*) suggests a regulatory role in gene expression. *Hum Mol Genet* 8:1253.
- (61) : Reichwald, K., J. Thiesen, T. Wiehe, J. Weitzel, W. A. Poustka, A. Rosenthal, M. Platzer, W. H. Stratling, and P. Kioschis. 2000. Comparative sequence analysis of the *MECP2*-locus in human and mouse reveals new transcribed regions. *Mamm Genome* 11:182.

- (62) : Nan, X., R. R. Meehan, and A. Bird. 1993. Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2. *Nucleic Acids Res* 21:4886.
- (63) : Klose, R. J., S. A. Sarraf, L. Schmiedeberg, S. M. McDermott, I. Stancheva, and A. P. Bird. 2005. DNA binding selectivity of MeCP2 due to a requirement for A/T sequences adjacent to methyl-CpG. *Mol Cell* 19:667.
- (64) : Wakefield, R. I., B. O. Smith, X. Nan, A. Free, A. Soteriou, D. Uhrin, A. P. Bird, and P. N. Barlow. 1999. The solution structure of the domain from MeCP2 that binds to methylated DNA. *J Mol Biol* 291:1055.
- (65) : Nan, X., P. Tate, E. Li, and A. Bird. 1996. DNA methylation specifies chromosomal localization of MeCP2. *Mol Cell Biol* 16:414.
- (66) : Buschdorf, J. P., and W. H. Stratling. 2004. A WW domain binding region in methyl-CpG-binding protein MeCP2: impact on Rett syndrome. *J Mol Med* 82:135.
- (67) : Shahbazian, M. D., B. Antalffy, D. L. Armstrong, and H. Y. Zoghbi. 2002. Insight into Rett syndrome: MeCP2 levels display tissue- and cell-specific differences and correlate with neuronal maturation. *Hum Mol Genet* 11:115.
- (68) : Jung, B. P., D. G. Jugloff, G. Zhang, R. Logan, S. Brown, and J. H. Eubanks. 2003. The expression of methyl CpG binding factor MeCP2 correlates with cellular differentiation in the developing rat brain and in cultured cells. *J Neurobiol* 55:86.
- (69) : Adachi, M., E. W. Keefer, and F. S. Jones. 2005. A segment of the *Mecp2* promoter is sufficient to drive expression in neurons. *Hum Mol Genet* 14:3709.
- (70) : Liu, J., and U. Francke. 2006. Identification of cis-regulatory elements for MECP2 expression. *Hum Mol Genet* 15:1769.

- (71) : Nan, X., H. H. Ng, C. A. Johnson, C. D. Laherty, B. M. Turner, R. N. Eisenman, and A. Bird. 1998. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393:386.
- (72) : Jones, P. L., G. J. Veenstra, P. A. Wade, D. Vermaak, S. U. Kass, N. Landsberger, J. Strouboulis, and A P. Wolffe. 1998. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 19:187.
- (73) : . Kouzarides, T. 2002. Histone methylation in transcriptional control. *Curr Opin Genet Dev* 12:198.
- (74) : Fuks, F., P. J. Hurd, D. Wolf, X. Nan, A. P. Bird, and T. Kouzarides. 2003. The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol Chem* 278:4035.
- (75) : Fuks, F., P. J. Hurd, R. Deplus, and T. Kouzarides. 2003. The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res* 31:2305.
- (76) : Kaludov, N. K., and A. P. Wolffe. 2000. MeCP2 driven transcriptional repression in vitro: selectivity for methylated DNA, action at a distance and contacts with the basal transcription machinery. *Nucleic Acids Res* 28:1921.
- (77) : [http://www.germaco.net/RettMecp2fonction\\_fr.html](http://www.germaco.net/RettMecp2fonction_fr.html) Spectrum and distribution of
- (78) : MECP2 mutations in 424 Rett syndrome patients: a molecular update.
- (79) : Willard, H. F., and B. D. Hendrich. 1999. Breaking the silence in Rett syndrome. *Nat Genet* 23:127.
- (80) : Ballestar, E., S. Ropero, M. Alaminos, J. Armstrong, F. Setien, R. Agrelo, M. F. Fraga, M. Herranz, S. Avila, M. Pineda, E. Monros, and M. Esteller. 2005. The impact of MECP2 mutations in the expression patterns of Rett syndrome patients. *Hum Genet* 116:91.

- (81) : Traynor, J., P. Agarwal, L. Lazzeroni, and U. Francke. 2002. Gene expression patterns vary in clonal cell cultures from Rett syndrome females with eight different MECP2 mutations. *BMC Med Genet* 3:12.
- (82) : Antequera, F., J. Boyes, and A. Bird. 1990. High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell* 62:503.
- (83) : Colantuoni, C., O. H. Jeon, K. Hyder, A. Chenchik, A. H. Khimani, V. Narayanan, E. P. Hoffman, W. E. Kaufmann, S. Naidu, and J. Pevsner. 2001. Gene expression profiling in postmortem Rett Syndrome brain: differential gene expression and patient classification. *Neurobiol Dis* 8:847.
- (84) : Tudor, M., S. Akbarian, R. Z. Chen, and R. Jaenisch. 2002. Transcriptional profiling of a mouse model for Rett syndrome reveals subtle transcriptional changes in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15536.
- (85) : Barlow, D. P. 1995. Gametic imprinting in mammals. *Science* 270:1610.
- (86) : Kitsberg, D., S. Selig, M. Brandeis, I. Simon, I. Keshet, D. J. Driscoll, R. D. Nicholls, and H. Cedar. 1993. Allele-specific replication timing of imprinted gene regions. *Nature* 364:459.
- (87) : Pauler, F. M., and D. P. Barlow. 2006. Imprinting mechanisms--it only takes two. *Genes Dev* 20:1203.
- (88) : Drewell, R. A., C. J. Goddard, J. O. Thomas, and M. A. Surani. 2002. Methylation-dependent silencing at the H19 imprinting control region by MeCP2. *Nucleic Acids Res* 30:1139.
- (89) : Bapat, S., and S. Galande. 2005. Association by guilt: identification of DLX5 as a target for MeCP2 provides a molecular link between genomic imprinting and Rett syndrome. *Bioessays* 27:676.
- (90) : Itaba-Matsumoto, N., S. Maegawa, H. Yamagata, I. Kondo, M. Oshimura, and E. Nanba. 2007. Imprinting status of paternally imprinted DLX5 gene in Japanese patients with Rett syndrome. *Brain Dev.*

- (91) : Okita, C., M. Meguro, H. Hoshiya, M. Haruta, Y. K. Sakamoto, and M. Oshimura. 2003. A new imprinted cluster on the human chromosome 7q21–q31, identified by human–mouse monochromosomal hybrids. *Genomics* 81:556.
- (92) : Samaco, R. C., A. Hogart, and J. M. LaSalle. 2005. Epigenetic overlap in autism–spectrum neurodevelopmental disorders: MECP2 deficiency causes reduced expression of UBE3A and GABRB3. *Hum Mol Genet* 14:483.
- (93) : Dani, V. S., Q. Chang, A. Maffei, G. G. Turrigiano, R. Jaenisch, and S. B. Nelson. 2005. Reduced cortical activity due to a shift in the balance between excitation and inhibition in a mouse model of Rett syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:12560.
- (94) : Thatcher, K. N., S. Peddada, D. H. Yasui, and J. M. LaSalle. 2005. Homologous pairing of 15q11–13 imprinted domains in brain is developmentally regulated but deficient in Rett and autism samples. *Hum Mol Genet* 14:785.
- (95) : Chen, W. G., Q. Chang, Y. Lin, A. Meissner, A. E. West, E. C. Griffith, R. Jaenisch, and M. E. Greenberg. 2003. Derepression of BDNF transcription involves calcium–dependent phosphorylation of MeCP2. *Science* 302:885.
- (96) : Martinowich, K., D. Hattori, H. Wu, S. Fouse, F. He, Y. Hu, G. Fan, and Y. E. Sun. 2003. DNA methylation–related chromatin remodeling in activity–dependent BDNF gene regulation. *Science* 302:890.
- (97) : Tao, X., S. Finkbeiner, D. B. Arnold, A. J. Shaywitz, and M. E. Greenberg. 1998. Ca<sup>2+</sup> influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor–dependent mechanism. *Neuron* 20:709.
- (98) : Chen, W. G., A. E. West, X. Tao, G. Corfas, M. N. Szentirmay, M. Sawadogo, C. Vinson, and M. E. Greenberg. 2003. Upstream stimulatory factors are mediators of Ca<sup>2+</sup>–responsive transcription in neurons. *J Neurosci* 23:2572.

- (99) : Zhou, Z., E. J. Hong, S. Cohen, W. N. Zhao, H. Y. Ho, L. Schmidt, W. G. Chen, Y. Lin, E. Savner, E. C. Griffith, L. Hu, J. A. Steen, C. J. Weitz, and M. E. Greenberg. 2006. Brain-specific phosphorylation of MeCP2 regulates activity-dependent Bdnf transcription, dendritic growth, and spine maturation. *Neuron* 52:255.
- (100) : Wang, H., S. A. Chan, M. Ogier, D. Hellard, Q. Wang, C. Smith, and D. M. Katz. 2006. Dysregulation of brain-derived neurotrophic factor expression and neurosecretory function in *Mecp2* null mice. *J Neurosci* 26:10911.
- (101) : McGill, B. E., S. F. Bundle, M. B. Yaylaoglu, J. P. Carson, C. Thaller, and H. Y. Zoghbi. 2006. Enhanced anxiety and stress-induced corticosterone release are associated with increased *Crh* expression in a mouse model of Rett syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:18267.
- (102) : Nuber, U. A., S. Kriaucionis, T. C. Roloff, J. Guy, J. Selfridge, C. Steinhoff, R. Schulz, B. Lipkowitz, H. H. Ropers, M. C. Holmes, and A. Bird. 2005. Up-regulation of glucocorticoid-regulated genes in a mouse model of Rett syndrome. *Hum Mol Genet* 14:2247.
- (103) : De Kloet, E. R., P. Rosenfeld, J. A. Van Eekelen, W. Sutanto, and S. Levine. 1988. Stress, glucocorticoids and development. *Prog Brain Res* 73:101.

# LISTE DE FIGURE

Figure1 : Andreas Rett 1924–1997

Figure2 : Mode de transmission de la maladie

Figure3 : Radiographie frontale d'une colonne scoliotique

Figure4 : Evolution clinique de syndrome de Rett

Figure5 : Syndrome d'Angelman, discrète dysmorphie faciale et sourire

Figure6 : Différents gènes constituant le chromosome X humain

Figure7 : Structure de MeCP2

Figure8 : Domaines de méthyl-CpG-binding protein 2

Figure9 : Epissage alternatif des isoformes de MeCP2

Figure10 : Les deux isoformes de la protéine MeCP2 produites par épissage alternatif

Figure11 : Différentes isoformes des protéines à MBD de mammifères

Figure12 : Les différents domaines du MECP2 humains

Figure13 : Répression transcriptionnelle par interaction de MeCP2 et Sin3A des régions méthylées du génome

Figure14 : Interaction de MeCP2 avec Suv39H1 au niveau des régions méthylées

Figure15 : Mécanisme d'action de MeCP2

Figure16 : Organisation de la chromatine (remplacement de l'histone H1, en jaune)

Figure17 : Dosage d'ADN par Nanodrop

Figure18 : Cycles de PCR

Figure19 : Migration d'ADN pure par électrophorèse

Figure20 : Analyse de la séquence de l'exon 4 de gène MECP2 par l'amorce 4A (F,R) de la patiente 4



Figure21 : Analyse de la séquence de l'exon 4 de gène MeCP2 par l'amorce 4B (F, R)  
de la patiente 5.

Figure22 : Analyse de la séquence de l'exon 4 de gène MECP2 par l'amorce 4B (F,R)  
de la patiente 6

Figure23 : Analyse de la séquence de l'exon 4 de gène MeCP2 par l'amorce 4B (F, R)  
du patient 6

Figure 24 : Localisation des différentes mutations du gène MeCP2 dans notre série

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Gènes localisés sur le chromosome X

Tableau 2 : critères diagnostiques du trouble autistique DSM- IV

Tableau 3 : Localisation chromosomiques et structure des gènes humains codant les protéines à MBD.

Tableau 4 : Les patientes atteintes de syndrome de Rett

Tableau 5 : les symptômes cliniques rapportés par nos patientes

Tableau 6 : évaluation de syndrome de Rett par le score de Huppke et Al

Tableau 7 : Les différentes mutations du gène MECP2

# ANNEXES

# FICHE DE CONSENTEMENT

## FORMULAIRE DE RECUEIL DE CONSENTEMENT ECLAIRE

Participation à une recherche biomédicale

(Fait en 2 exemplaires : un exemplaire est remis à la personne, l'autre est conservé par l'investigateur)

De : Mr .....

Nom : .....

Prénom : .....

Adresse : .....

.....

Connu père, mère, tuteur, de l'enfant : .....

Age : .....

### Diagnostic en biologie moléculaire du syndrome de RETT (gène MECP2)

dont les promoteurs sont l'Unité de génétique médicale et d'oncogénétique du CHU Hassan II , FES ,MAROC et le **Laboratoire de génétique moléculaire, CHU de NANCY – Hôpital BRABOIS, FRANCE**

J'ai reçu **oralement et par écrit** toutes les informations nécessaires pour comprendre l'intérêt et le déroulement de l'étude, les bénéfices attendus, les contraintes et les risques prévisibles.

J'ai pu poser toutes les questions nécessaires à la bonne compréhension de ces informations et j'ai reçu des réponses claires et précises.

J'ai disposé d'un délai de réflexion suffisant entre les informations reçues et ce consentement avant de prendre ma décision.

### **Interruption de la participation :**

Sans justification et sans compromettre la qualité des soins qui sont dispensés à l'enfant :

- Je suis libre de refuser la participation de l'enfant à cette étude,
- Je peux interrompre sa participation à tout moment, auquel cas j'en informerai le médecin qui le suit au cours de cette étude, pour qu'il lui propose, le cas échéant, une prise en charge adaptée.

En foi de quoi, **j'accepte librement et volontairement que l'enfant sous ma responsabilité participe à cette recherche.**

Par ailleurs, l'enfant pourra éventuellement être sorti(e) de l'étude par le médecin s'il l'estime nécessaire.

### **Recueil des données :**

Les données ayant trait à l'état de santé de l'enfant, à ses habitudes de vie, à sa situation administrative, demeurent strictement confidentielles et ne peuvent être consultées que par le médecin qui le suit et ses collaborateurs, par des personnes mandatées par le promoteur et astreintes au secret professionnel et par des autorités mandatées par les autorités sanitaires et judiciaires.

### **En cas de prise de photos ou de films :**

Je donne mon accord pour que des photos ou des vidéos soient prises pour usage diagnostique.

J'ai bien été informé(e) que ses données personnelles seront rendues anonymes, avant d'être intégrées dans un rapport ou une publication scientifique.

### **Information :**

A ma demande, je peux obtenir toute information complémentaire auprès du Pr OULDIM KARIM.

Je serai informé(e) de toute nouvelle information, susceptible de modifier ma décision quant à mon accord pour la réalisation de cet examen.

Je serai informé(e) des résultats globaux de l'examen, à l'issue de celui-ci. Les prélèvements *sanguins* réalisés et inutilisés lors de cette *étude moléculaire du gène MECP2* seront conservés au DNathèque du CHU Hassan II, Fès, MAROC. Ces prélèvements pourront être utilisés pour des recherches futures portant sur le syndrome de RETT et ce dans le respect de la confidentialité.

J'ai bien été informé des conditions de conservation et d'utilisation des prélèvements et :

(Cocher la case correspondant à votre volonté)

- Je n'y suis pas opposé(e).
- J'y suis opposé(e).

Je conserve un exemplaire de cette information.

## Séquence de gène responsable de syndrome de Rett

### EXON 1 :

CAGCCATCAACAGCTGGAGGGGTCCGCCCTTTTCCCTGGCCGAAATGGACAGGAAATCTCGCCAATTGACGGCATCGCCGCTGAGACCTCCCCCTCCCCGTCCTCCCCGTCCCAGCCCGGCCATCACAGCCAATGACGGCGGGCTCGCAGCGGCGCCGAGGGCGGGGCGCGGGCGCGCAGGTGCAGCAGCGCGGGGCCGCAAGA  
GGGCGGGGCGCGCAGCTCGGCCGTGCGGGGTCCGAAAATCGGCGGGCGCGCGCTCCCTCCTCTCGGAGAGAGGGCTGTGGTCCCCGCCGTCCGAAAATGGCCGCCCGCCCGCCGCGCGGAGCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGACTGTGAGTGGGACCGCCGTGGCCGCGGGCGGGGACCCTTGCCGGGGGGCGGGGTCAGGGGCGGGACGTGGCGCGGGAGGGGCCCGGGGTCCGACGACACGGCTGGCGGATGGCGTCCCTCCTCTACCTCCCCCTCCCCGCCCGCCGGTGGCGACTCTCCCCTCGGCCCGTCACCCGTGCTCGCGGGTGACCGTCCCTCGGCGCCTCCCTGGAGCCGCCTTC

### EXON 2 :

TCTAACAAGCATGAATCTTTCTTTATTTTAGCACTGTGTGTTACGTGCCAGTAATTTGCAGCTTATCCTTTGTTCTAGCTAGGTAAGCTGGGAAATAGCCTAGTACTTTGTCTATGTGTTTATCTTCAAATGTCCCAAATAGCCCTGGGAAAAGGTTCGTGCAGCTCAATGGGGGCTTTCAACTTACAATTTTCTTTGTTTTAGGCTCCATAAAAA  
TACAGACTCACCAGTTCCTGCTTTGATGTGACATGTGACTCCCCAGAATACACCTTGCTTCTGTAGACCAGCTCCAACAGGATTCCATGGTAGCTGGGATGTTAGGGCTCAGGTAAGTAACCTTCTTTTTTTTTTTTTAGTATATGTCCTGGTTTGGCCATCTGTTTTTTTTTTTTTTTTAAAAAAGGAAAAGAGGAAAAAATATACTACTTTGGACAGTATAAAGTACCCCAAAGACTAAAGACATAACTGTGCCAACTGTGCCATATAATAAAAA  
AAAGTCACTTCCCTGAGCCCTGAAAGGTCAG

**EXON 3 :**

GTTGTCCTGGGGAAGGACATCAAGATCTGAGTGTATGATGGCCTGGGGCCTTGCATGTGGTGGGGGTCCAA  
GCCTGCCTCTGCTCACTTGTCTGCAGACTGGCATGTTCTCTGTGATACTTACATACTTGTTTAACACTTCAG  
GGAAGAAAAGTCAGAAGACCAGGACCTCCAGGGCCTCAAGGACAAAACCCTCAAGTTTAAAAAGGTGAAGA  
AAGATAAGAAAGAAGAGAAAAGAGGGCAAGCATGAGCCCGTGCAGCCATCAGCCACCCTCTGCTGAGCCC  
GCAGAGGCAGGCAAAAGCAGAGACATCAGAAGGGTCAGGCTCCGCCCCGGCTGTGCCGGAAGCTTCTGCCTC  
CCCCAAACAGCGGCGCTCCATCATCCGTGACCGGGGACCCATGTATGATGACCCACCCTGCC TGAAGGCT  
GGACACGGAAGCTTAAGCAAAGGAAATCTGGCCGCTCTGCTGGGAAGTATGATGTGTATTTGATCAA GTAAG  
TAAGAGCAACTCCTATCTCTACAGGGCAGGGAGGGCAGGACAAGGATCCCTCATGGAGCAGGAAAATGTA  
TGTGCCCA GGGTGGGGTCGGGGGGAACATAAACAATGAACACTGAGACCAGGTGTGCTTGAATGACCCGT  
TACAGAGGTCGCTGCCCT

**EXON 4 :**

cggcaggcagacgagt gagtggcttggtagcaggt cctcagggcagccagcagtgactctcgttcaatagtaacgtttgtagagcgtt  
gtcaccaccatccgctctgcctatctctgacattgctatggagagcctcaattgttctgtgtctttctgtttgtccccacag TCCCCAGGGA  
AAAGCCTTTCGCTCTAAAGTGGAGTTGATTGCGTACTTCGAAAAGGTAGGCGACACATCCCTGGACCCTAAT  
GATTTTGACTTCACGGTAACTGGGAGAGGGAGCCCCTCCCGCGAGAGCAGAAACCACCTAAGAAGCCCAA  
ATCTCCCAAAGCTCCAGGAACTGGCAGAGGCCGGGGACGCCCAAAGGGAGCGGCACCACGAGACCCAAGG  
CGGCCACGTCAGAGGGTGTGCAGGTGAAAAGGGTCTGGAGAAAAGTCTGGGAAGCTCCTTGTCAAGATG  
CCTTTTCAAACCTC GCCAGGGGGCAAGGCTGAGGGGGGTGGGGCCACCACATCCACCCAGGTCATGGTGAT  
CAAACGCCCCCGCAGGAAGCGAAAAGCTGAGGCCGACCCTCAGGCCATCCCAAGAAACGGGGCCGAAAGC  
CGGGGAGTGTGGTGGCAGCCGCTGCCGCCGAGGCCAAAAGAAAGCCGTGAAGGAGTCTTCTATCCGATCT  
GTGCAGGAGACCGTACTCCCCATCAAGAAGCGCAAGACCCGGGAGACGGTCAGCATCGAGGTCAAGGAAGT  
GGTGAAGCCCCTGCTGGTGTCCACCCTCGGTGAGAAGAGCGGGAAAGGACTGAAGACCTGTAAGAGCCCTG  
GGCGGAAAAGCAAGGAGAGCAGCCCCAAGGGGCGCAGCAGCAGCGCCTCCTCACCCCCAAGAAGGAGCA  
CCACCACCATCACCACCACTCAGAGTCCCCAAGGCCCCCGTGCCACTGCTCCCACCCCTGCCCCACCTCC  
ACCTGAGCCCGAGAGCTCCGAGGACCCCACCAGCCCCCTGAGCCCCAGGACTTGAGCAGCAGCGTCTGCA  
AAGAGGAGAAGATGCCCAGAGGAGGCTCACTGGAGAGCGACGGCTGCCCAAGGAGCCAGCTAAGACTCAG  
CCCGCGTTGCCACCGCCGCCACGGCCGAGAAAAGTACAAACACCGAGGGGAGGGAGAGCGCAAAGACAT  
TGTTTCATCCTCCAT  
GCCAAGGCCAAACAGAGAGGAGCCTGTGGACAGCCGGACGCCCGTGACCGAGAGAGTTAGCTGACTTTACA  
CGGAGCGGATTGCAAAGCAAACCAACAAGAATAAAGGCAGCTGTTGTCTTCTCCTTATGGGTAGGGCTCT  
GACAAAGCTTCCCATTAACTGAAATAAAAAATATTTTTTTTTCTTTCAGTAACTTAGAGTTTCGTGGCTTC  
AGGGTGGGAGTAGTTGGAGCATTGGGGATGTTTTTCTTACCGACAAGCACAGTCAGGTTGAAGACCTAACCA  
GGGGCAGAAGTAGCTTTGCACTTTTCTAAACTAGGCTCCTTCAACAAGGCTTGCTGCAGATACTACTGACCA  
GACAAGCTGTTGACCAGGCACCTCCCCTCCCGCCCAAACCTTTCCCCCATGTGGTCGTTAGAGACAGAGCGA  
CAGAGCAGTTGAGAGGACACTCCCCTTTTCGGTGCCATCAGTGCCCCGTCTACAGTCCCCCAGCTCCCCC  
ACCTCCCCACTCCCAACCACGTTGGGACAGGGAGGTGTGAGGCAGGAGAGACAGTTGGATTCTTTAGAGA  
AGATGGATATGACCAGTGGCTATGGCCTGTGCGATCCCACCCGTGGTGGCTCAAGTCTGGCCCCACACCAGC  
CCCAATCCAAAAGTGGCAAGGACGCTTACAGGACAGGAAAGTGGCACCTGTCTGCTCCAGCTCTGGCATG  
GCTAGGAGGGGGGAGTCCCTGAACTACTGGGTGTAGACTGGCCTGAACCACAGGAGAGGATGGCCAGGG  
TGAGGTGGCATGGTCCATTCTCAAGGGACGTCCTCCAACGGGTGGCGCTAGAGGCCATGGAGGCAGTAGGA  
CAAGGTGCAGGCAGGCTGGCCTGGGGTCAGGCCGGGAGAGCACAGCGGGGTGAGAGGGATTCTAATCAC  
TCAGAGCAGTCTGTGACTTAGTGGACAGGGGAGGGGGCAAAGGGGAGGAGAAGAAAATGTTCTTCCAGTT  
ACTTTCAAATTCCTTTAGGGACAGCTTAGAATTATTTGCACTATTGAGTCTTCATGTTCCCACTTCAAAC  
AAACAGATGCTCTGAGAGCAAACCTGGCTTGAATTGGTGACATTTAGTCCCTCAAGCCACCAGATGTGACAGT  
GTTGAGAACTACCTGGATTTGTATATACCTGCGCTTGTTTTAAAGTGGGCTCAGCACATAGGGTTCACAC  
GAAGCTCCGAAACTCTAAGTGGTGGTGAATTTATAAGGACTTCTGATTGGTTTCTTCTCCCTTCCA

TTTCTGCCTTTTGTTCATTTATCCTTTCACTTCTTTCCCTTCTCCATCCTCCTCCTCCTAGTTCATCCCTT  
CTCTTCCAGGCAGCCGCGGTGCCCAACCACACTTGTGGCTCCAGTCCCAGAACTCTGCCTGCCCTTTGTC  
CTCCTGCTGCCAGTACCAGCCCCACCCTGTTTTGAGCCCTGAGGAGGCCTTGGGCTCTGCTGAGTCCGACCT  
GGCCTGTCTGTGAAGAGCAAGAGAGCAGCAAGGTCTTGTCTCCTAGGTAGCCCCCTTTCCCTGGTAAGAA  
AAAGCAAAAGGCATTTCCCACCCTGAACAACGAGCCTTTTACCCTTCTACTCTAGAGAAGTGGACTGGAGG  
AGCTGGGCCCCGATTTGGTAGTTGAGGAAAGCACAGAGGCCTCCTGTGGCTGCCAGTCATCGAGTGGCCCA  
ACAGGGGCTCCATGCCAGCCGACCTTGACCTCACTCAGAAGTCCAGAGTCTAGCGTAGTGCAGCAGGGCAG  
TAGCGGTACCAATGCAGAACTCCCAAGACCCGAGCTGGGACCAGTACCTGGGTCCCAGCCCTTCTCTGCT  
CCCCCTTTTCCCTCGGAGTTCTTCTTGAATGGCAATGTTTTGCTTTTGCTCGATGCAGACAGGGGGCCAGAA  
CACCACACATTTCACTGTCTGTCTGGTCCATAGCTGTGGTGTAGGGGCTTAGAGGCATGGGCTTGTGTGGG  
TTTTTAATTGATCAGTTTTCATGTGGGATCCCATCTTTTAACTCTGTTCAGGAAGTCCATCTAGCTGCA  
TATCTTCATCATATTGGTATATCCTTTTCTGTGTTACAGAGATGTCTTATATCTAAATCTGTCCAAGTGA  
AAGTACCTTATCAAAGTAGCAAATGAGACAGCAGTCTTATGCTTCCAGAAACACCCACAGGCATGTCCCATG  
TGAGCTGCTGCCATGAACTGTCAAGTGTGTGTTGTCTTGTGTATTTTCAAGTATTGTCCCTGGCTTCTTACTA  
TGGTGTAAATCATGAAGGAGTGAAACATCATAGAACTGTCTAGCACTTCCCTGGCAGTCTTATGTGATCAGG  
AACCATAGTTGACAGTTCGAATCAGTAGCTTAAGAAAAACCGTGTGTTGCTCTTCTGGAATGGTTAGAAGT  
GAGGGAGTTTGGCCCGTCTGTTTGTAGAGTCTCATAGTTGGACTTTCTAGCATATATGTGTCCATTTCTTA  
TGCTGTAAAAGCAAGTCTGCAACCAAACTCCCATCAGCCCAATCCCTGATCCCTGATCCCTTCCACCTGCT  
CTGCTGATGACCCCCCAGCTTCACTTCTGACTCTTCCCCAGGAAGGGAAGGGGGTTCAGAAGAGAGGGTG  
AGTCTCCAGAACTCTTCTCCAAGGACAGAAGGCTCCTGCCCCATAGTGGCCTCGAACTCCTGGCACTAC  
CAAAGGACACTTATCCACGAGAGCGCAGCATCCGACCAGTTGTCACTGAGAAGATGTTTATTTTGGTCAGT  
TGGGTTTTTATGTATTATACTTAGTCAAATGTAATGTGGCTTCTGGAATCATTGTCCAGAGCTGCTTCCCCGT  
CACCTGGGCGTCATCTGGTCTGGTAAGAGGAGTGGTGGCCACCAGGCCCCCCCTGTCACCCATGACAGTT  
CATTAGGGCCGATGGGGCAGTCGTGGTGGGAACACAGCATTTCAGCGTCACTTTATTTTATTTCGGGCC  
CACCTGCAGTCCCTCAAAGAGGCAGTTGCCAGCCTCTTCCCTTCCAGTTTATTCCAGAGCTGCCAGTGG  
GGCCTGAGGCTCCTTAGGGTTTTCTCTATTTCCCCCTTCTTCTCATTCCCTCGTCTTCCCAAAGGCAT  
CACGAGTCAGTCGCCTTTCAGCAGGCAGCCTTGGCGGTTTATCGCCCTGGCAGGCAGGGGCCCTGCAGCTC  
TCATGCTGCCCTGCCTTGGGGTTCAGGTTGACAGGAGTTGGAGGAAAGCCTTAAGCTGCAGGATTCTCAC  
CAGCTGTGTCCGGCCAGTTTTGGGGTGTGACCTCAATTTCAATTTTGTCTGTACTTGAACATTATGAAGATG  
GGGGCTCTTTCAGTGAATTTGTGAACAGCAGAATTGACCGACAGCTTCCAGTACCCATGGGGCTAGGTCA  
TTAAGGCCACATCCACAGTCTCCCCACCCTTGTCCAGTTGTTAGTTACTACCTCCTCCTGACAATACTG  
TATGTGCTCGAGTCCCCCAGGTCTACCCCTCCCGGCCCTGCCTGCTGGTGGGCTTGTTCATAGCCAGTGGG  
ATTGCCGGTCTTGACAGCTCAGTGAGCTGGAGATACTTGGTTCACAGCCAGGCGTAGCACAGCTCCCTTCTG  
TTGATGCTGTATTCCCATATCAAAGACACAGGGACACCCAGAAACGCCACATCCCCAATCCATCAGTGC  
CAAAGTACCAACGGCCCCAGCTTCTCAGCTCGTGGATGGCGGAAGCTGCTACTCGTGAGCGCCAGTGGC  
GGTGCAGACAATCTTCTGTTGGGTGGCATCATTCCAGGCCCGAAGCATGAACAGTGCACCTGGGACAGGGA  
GCAGCCCCAAATTGTCACCTGCTTCTCTGCCAGCTTTTCAATTGCTGTGACAGTGTGGCGAAAGAGGGTAA  
TAACCAGACACAACTGCCAAGTTGGGTGGAGAAAGGAGTTTCTTTAGCTGACAGAATCTCTGAATTTTAAA  
TCACTTAGTAAGCGGCTCAAGCCCAGGAGGAGCAGAGGGATACGAGCGGAGTCCCCTGCGCGGGACCATC  
TGGAATTGGTTTAGCCCAAGTGGAGCCTGACAGCCAGAACTCTGTGTCCCCCGTCTAACCACAGCTCCTTTT  
CCAGAGCATTCCAGTCAGGCTCTCTGGGCTGACTGGGCCAGGGGAGTTACAGGTACCAGTTCTTTAAGAAG  
ATCTTTGGGCATATACATTTTTAGCCTGTGTCAATTGCCCAAATGGATTCTGTTTCAAGTTCACACCTGCAG  
ATTCTAGGACCTGTGTCTAGACTTCAGGGAGTCACTGTTTCTAGAGTTTCTACCATGGAGTGGGTCTGGA  
GGACCTGCCCGGTGGGGGGCAGAGCCCTGCTCCCTCCGGTCTTCTACTTCTCTCTGCTCTGACGGGA  
TTTGTGATTCTCTCCATTTTGGTGTCTTTCTCTTTTAGATATTGTATCAATCTTTAGAAAAGGCATAGTCTAC  
TTGTTATAAATCGTTAGGATACTGCCTCCCCCAGGGTCTAAAATTACATATTAGAGGGGAAAAGCTGAACAC  
TGAAGTCAGTCTCAACAATTTAGAAGGAAAACCTAGAAAACATTTGGCAGAAAATTACATTTGATGTTTTT  
GAATGAATACGAGCAAGCTTTTACAACAGTGTGATCTAAAATACTTAGCACTTGGCCTGAGATGCCTGGT



GAGCATTACAGGCAAGGGGAATCTGGAGGTAGCCGACCTGAGGACATGGCTTCTGAACCTGTCTTTGGGAG  
TGGTATGGAAGGTGGAGCGTTCACCAGTGACCTGGAAGGCCAGCACCACCCTCCTTCCCCTCTTCTCATC  
TTGACAGAGCCTGCCCCAGCGCTGACGTGTCAGGAAAACCCCAGGGAACTAGGAAGGCACTTCTGCCTGA  
GGGGCAGCCTGCCTTGCCACTCCTGCTCTGCTCGCCTCGGATCAGCTGAGCCTTCTGAGCTGGCCTCTCAC  
TGCCTCCCCAAGGCCCTGCCTGCCCTGTCAGGAGGCAGAAGGAAGCAGGTGTGAGGGCAGTGAAGGAG  
GGAGACAACCCCCAGCTCCCGCTCCGGGCTCCGACTTGTGCACAGGCAGAGCCCAGACCCTGGAGGAAAT  
CCTACCTTTGAATTCAAGAACATTTGGGGAATTTGGAAATCTCTTTGCCCCAAACCCCCATTCTGTCTTACC  
TTAATCAGGTCCTGCTCAGCAGTGAGAGCAGATGAGGTGAAAAGGCCAAGAGGTTTGGCTCCTGCCACTG  
ATAGCCCCCTCCCCGAGTGTGTGTCAAGTGGCAAAGCTGTTCTTCTGGTGACCCTGATTATATCCA  
GTAACACATAGACTGTGCGCATAGGCCTGCTTTGTCTCCTCTATCCTGGGCTTTTGTGTTTGTCTTTTAGTTTT  
GCTTTTAGTTTTTCTGTCCCTTTATTTAACGCACCGACTAGACACACAAAAGCAGTTGAATTTTTATATATAT  
ATCTGTATATTGCACAATTATAAACTCATTTTGTGTGGCTCCACACACACAAAAAAGACCTGTTAAAATT  
ATACCTGTTGCTTAATTACAATATTTCTGATAACCATAGCATAGGACAAGGGAAAATAAAAAAGAAAAAA  
AGAAAAAAAACGACAAATCTGTCTGCTGGTCACTTCTTCTGTCCAAGCAGATTCTGTGGTCTTTTCTCGCTT  
CTTTCAAGGGCTTCTGTGCCAGGTGAAGGAGGCTCCAGGCAGCACCAGGTTTTGCACTCTTGTCTTCC  
CGTGCTTGTGAAAGAGGTCCCAAGTTCTGGGTGCAGGAGCGCTCCCTTGACCTGCTGAAGTCCGGAACGTA  
GTCGGCACAGCCTGGTGCCTTCCACCTCTGGGAGCTGGAGTCCACTGGGGTGGCCTGACTCCCCAGTCC  
CCTTCCCGTGACCTGGTC

AGGGTGAGCCCATGTGGAGTCAGCCTCGCAGGCCTCCCTGCCAGTAGGGTCCGAGTGTGTTTCATCCTTCCC  
ACTCTGTGAGCCTGGGGGCTGGAGCGGAGACGGGAGGCCTGGCCTGTCTCGGAACCTGTGAGCTGCACCA  
GGTAGAACGCCAGGGACCCAGAATCATGTGCGTCAGTCCAAGGGTCCCCTCCAGGAGTAGTGAAGACTC  
CAGAAATGTCCTTTCTTCTCCCCATCCTACGAGTAATTGCATTTGCTTTTGAATTTCTAATGAGCAATAT  
CTGCTAGAGAGTTAGCTGTAACAGTTCTTTTTGATCATCTTTTTTTAATAATTAGAAACACCAAAAAATCC  
AGAAACTTGTCTTCCAAAGCAGAGAGCATTATAATCACCAGGGCCAAAAGCTTCCCTCCCTGCTGTCATTG  
CTTCTTCTGAGGCCTGAATCCAAAAGAAAAACAGCCATAGGCCCTTTCAGTGGCCGGGCTACCCGTGAGCCC  
TTCGGAGGACCAGGGCTGGGGCAGCCTCTGGGCCACATCCGGGGCCAGCTCCGGCGTGTGTTTCAAGTGT  
GCAGTGGGTGATGATGCTCTTCCACCCAGCCTGGGATAGGGGCAGAGGAGGGCAGGAGGCGTTGCCGC  
TGATGTTTGGCCGTGAACAGGTGGGTGTCTGCGTGCCTCACGTGCGTGTGTTTCTGACTGACATGAAATCGA  
CGCCCGAGTTAGCCTCACCCGGTGACCTCTAGCCCTGCCCGATGGAGCGGGGCCACCCGGTTCAGTGT  
TCTGGGGAGCTGGACAGTGGAGTGCAAAAGGCTTGCAGAACTGAAGCCTGCTCCTTCCCTGCTACCACGG  
CCTCCTTCCGTTTGAATTTGCTACTGCTTCAATCAATAACAGCCGCTCCAGAGTCAGTAGTCAATGAATAT  
GACCAAATATCACCAGGACTGTTACTCAATGTGTGCCGAGCCCTTGCCATGCTGGGCTCCCGTGTATCTGG  
ACACTGTAACGTGTGCTGTGTTTGTCCCTTCCCTTCTTCTTTGCCCTTACTTGTCTTTCTGGGGTTTTTC  
TGTTTGGGTTTTGGTTTTTTATTTCTCCTTTTGTGTTCCAAACATGAGGTTCTCTACTGGTCTCTTAA  
CTGTGGTGTGAGGCTTATATTTGTGTAATTTTGGTGGGTGAAAGGAATTTTGCTAAGTAAATCTCTCTGT  
GTTTGAAGTGAAGTCTGTATTGTAATATGTTTAAAGTAAATGTTCCAGAGACAAATATTTCTAGACACTTT  
TCTTTACAAAACAAAAGCATTCCGAGGGAGGGGGATGGTACTGAGATGAGAGGGGAGAGCTGAACAGATGA  
CCCCTGCCAGATCAGCCAGAAGCCACCCAAAGCAGTGGAGCCCAGGAGTCCCACTCCAAGCCAGCAAGCC  
GAATAGCTGATGTGTTGCCACTTCCAAGTCACTGCAAAACCAGGTTTTGTTCCGCCAGTGGATTCTGTTT  
TGCTTCCCCTCCCCCGAGATTATTACCACCATCCCGTGCTTTAAGGAAAGGCAAGATTGATGTTTCTTGA  
GGGGAGCCAGGAGGGGATGTGTGTGTGCAGAGCTGAAGAGCTGGGGAGAATGGGGCTGGGGCCACCCAAGC  
AGGAGGCTGGGACGCTCTGCTGTGGGCACAGGTCAAGGTAATGTTGGCAGATGCAGCTCTTCTGGACAGG  
CCAGGTGGTGGCATTCTCTCCAAGGTGTGCCCCGTGGGCATTACTGTTTAAAGACTTCCGTACATCC  
CACCCCATCCTCCAGGGCTCAACTGTGACATCTCTATTCCCACCCCTCCCCTTCCAGGGCAATAAAATG  
ACCATGGAGGGGGCTTCACTCTTGGCTGTACCCGATCGCCAGCAAACTTAGATGTGAGAAAACCCCT  
TCCCATTCCATGGCGAAAACATCTCCTTAGAAAAGCCATTACCCTCATTAGGCATGGTTTTGGGCTCCCAA  
ACACCTGACAGCCCCTCCCTCCTCTGAGAGGCGGAGAGTGCTGACTGTAGTGACCATTGCATGCCGGGTGCA  
GCATCTGGAAGAGCTAGGCAGGGTGTCTGCCCCCTCTGAGTTGAAGTCATGCTCCCCTGTGCCAGCCAGA

GGCCGAGAGCTATGGACAGCATTGCCAGTAACACAGGCCACCCTGTGCAGAAGGGAGCTGGCTCCAGCCTG  
GAAACCTGTCTGAGGTTGGGAGAGGTGCACTTGGGGCACAGGGAGAGGCCGGGACACACTTAGCTGGAGAT  
GTCTCTAAAAGCCCTGTATCGTATTCACCTTCAGTTTTTGTGTTTTGGGACAATTACTTTAGAAAATAAGTAG  
GTCGTTTTAAAAACAAAATTATTGATTGCTTTTTTGTAGTGTTTCAGAAAAAAGGTTCTTTGTGTATAGCCAA  
ATGACTGAAAGCACTGATATATTTAAAAACAAAAGGCAATTTATTAAGGAAATTTGTACCATTTTCAGTAAACC  
TGTCTGAATGTACCTGTATACGTTTCAAAAACACCCCCCCCCCACTGAATCCCTGTAACCTATTTATTATATA  
AAGAGTTTGCCTTATAAATTTacataaaaatgtccgtttggtcttttggtgtaaaaatcaagtgatttttcataaggttctttactattgga  
aaagatgggcagcacgcagttttattttttgtaagtttttaatacatgtgaaagcaaagaataactcagcatgcctttctaagtgacgcggttgc  
accttt