

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Dr Tahar Moulay -SAIDA Faculté de Science
Département de Biologie

MEMOIRE

Présenté par

Mlle ABIDI Chahrazed

Mlle LAMANE Nadia

En vue de l'obtention du
Diplôme de MASTER En Biochimie

Thème

**Étude in silico des mutations du gène RB provoquant la
maladie Rétinoblastome.**

Soutenu le : 11/07/2021

Devant le jury composé de

Président : SLIMANI Miloud	Professeur	Université SAIDA
Examineur : AMMAM Abdelkader	Maitre des conférences classe A	Université SAIDA
Examineur : BERROUKCHE Abd Elkrim	Professeur	Université SAIDA
Encadreur: BERBER Naima	Maitre des conférences classe A	Université SAIDA

Année Universitaire 2020/2021

Remerciements

Mes vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail en acceptant d'examiner ce mémoire et de l'enrichir par leurs suggestions.

*Mes remerciements les plus respectueux vont à **professeur Slimani** qui a bien voulu me faire l'honneur de présider le jury. Veuillez trouver ici l'expression de mes respectueuses considérations.*

*A mon examinateur **professeur Berroukeche** c'est pour moi un grand honneur que vous acceptiez de siéger parmi cet honorable jury, qu'il me soit permis de vous exprimer ma reconnaissance et mon grand estime .ce travail est pour moi l'occasion de vous témoigner ma profonde gratitude .*

*Je désire aussi remercier mon examinateur **Monsieur Ammam** qui m'a fourni les outils nécessaires à la réussite de mes études universitaires*

*Mes vifs remerciements à mon encadreur **Madame Berber**, Vous avez bien voulu me confier ce travail riche d'intérêt et me guider à chaque étape de sa réalisation. Vous m'avez toujours réservé le meilleur accueil, malgré vos obligations professionnelles. Vos encouragements inlassables, votre confiance, votre gentillesse, votre patience méritent toute admiration. Je saisis cette occasion pour vous exprimer ma profonde gratitude tout en vous témoignant mon respect.*

Mes remerciements s'étendent également à l'ensemble des enseignants du département de biologie pour la formation d'excellence qu'ils m'ont dispensé durant les années de spécialité.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué au succès de mon stage et qui m'ont aidée lors de la rédaction de ce mémoire.

À tous ces intervenants, je présente mes remerciements, mon respect et ma gratitude.

Dédicace

À ma mère adorée qui a rejoint les cieux trop tôt, beaucoup trop tôt...

À votre âme qui m'a quitté sans avoir le fruit de son éducation l'âme noble qui

M'a toujours entourée comme une lumière qui m'éclaire le chemin.

Repose ma mère en paix

A mon très cher père,

Pour tout l'amour dont vous m'avez entouré, pour tout ce que vous avez fait

Pour moi.

Que dieu le tout puissant, vous préserve et vous procure sante et longue vie

Afin que je puisse à mon tour vous combler.

A tous mes frères et sœurs, en témoignage de mon amour et ma profonde admiration ; que

dieu vous protège et vous prête bonne santé et longue vie.

A mon binôme adoré Nadia LAMANE.

A tous mes maitres.

À tous le personnel de l'université Dr Moulay Taher.

À tous ceux qui ont participé à ma formation.

À mes très chers amis.

Que dieu vous bénisse.

Une spéciale dédicace à la promotion 2020-2021 Master en Biochimie.

*Je dédie ce Modest travail à l'âme de mon père adoré,
Même si tu n'as jamais quitté mes pensées, tu me manques
Considérablement en ce moment précis, j'ai tant souhaité que tu sois présent à mes côtés,
repose en paix cher père...
À l'être le plus chers de ma vie, ma mère.
À mes chers frère et sœurs.
À mes tantes.
À mon binôme et Ma belle Chahrazed ABIDI.
À tous les membres de ma famille.
Et tout personne qui porte le nom LAMANE et YAHLALI (merci pour tout).*

Résumé

Le rétinoblastome est une tumeur rare qui touche la rétine du jeune enfant. L'inactivation bi-allélique du gène rétinoblastome 1 (*RBI*) est à l'origine du développement tumoral. Ce dernier est un antioncogène de 200Kb, composé de 27 exons et code pour un messager de 4,7Kb. Il est localisé sur le chromosome 13q14.2.

L'objectif de cette étude a été de contribuer à la compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine du déficit de la protéine pRb. Ainsi les effets délétères de trois mutations en utilisant un protocole d'étude *in silico* constituée de différents logiciels (ESE Finder, HSF, I-Mutant 2.0, Polyphen-2, Align GVGD, Project HOPE). La modélisation moléculaire des structures 3D a été réalisée par le logiciel Swiss Pdb Viewer.

L'analyse *in silico* nous a permis de déterminer l'effet délétère de trois mutations délétères : une mutation intronique qui siège au niveau de l'intron 12 qui est responsable de l'abolition du site donneur d'épissage, ce qui va entraîner le saut d'exon 12. La deuxième mutation de type faux sens se trouve au niveau de l'exon 19, elle est prédite comme étant un polymorphisme. La troisième mutation de type faux sens touche l'exon 20, elle est responsable d'un changement de conformation de la protéine pRB et elle a un autre effet sur le site d'épissage, causant son altération, ce qui va engendrer le saut d'exon 20.

A long terme ces résultats pourront contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires responsables du développement du rétinoblastome permettant ainsi le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Mots clés: Rétinoblastome ; RB1 ; *in silico* ; protéine pRb ; structure 3D.

Abstract

Retinoblastoma is a rare tumor that affects the retina of young children. The biallelic inactivation of the retinoblastoma gene 1 (RB1) is at the origin of the tumor development. It's an oncogene of 200Kb, with 27 exons and encodes a messenger 4,7Kb. It is located on chromosome 13q14.2.

The objective of this study was to understand the molecular mechanisms underlying the deficit in the pRb protein. And the deleterious effects of three mutations identified in a subsequent study were predicted using an in silico study consists of different software protocol based on analytical methods (ESE Finder, HSF, I-Mutant 2.0, Polyphen-2, Align GVGD, Project HOPE). Molecular modeling of 3D structures was conducted by the Swiss Pdb Viewer.

In silico analysis helped us identify three deleterious mutations: an intronic mutation who sits at the intron 12, which is responsible for the abolition of the splice site, which will lead to exon 12 skipping. The second type mutation type missense is located in exon 19; it is predicted to be a polymorphism. The third mutation type missense is located in exon 20; it's responsible for a change in conformation of the protein pRb and has a different effect on the splicing site, causing spoilage, which will cause exon 20 skipping.

Hereafter these results could contribute to a better understanding of the molecular mechanisms responsible for the development of retinoblastoma enabling the development of newer therapeutic strategies.

Keywords: Retinoblastoma; RB1; in silico; protein pRb; structure 3D.

ملخص

الورم الأرومي الشبكي هو ورم نادر يصيب شبكية العين لدى الأطفال الصغار. يعد تثبيط الأليات الثنائية لجين الورم الأرومي الشبكي 1 (RB1) مسؤولاً عن تطور الورم. هذا الأخير عبارة عن جين مضاد مكون من 200 قاعدة كيلوباز ، ويتألف من 27 إكسونات ورموز لمرسول يبلغ 4.7 كيلوباز. يقع على الكروموسوم q14.213.

كان الهدف من هذه الدراسة هو المساهمة في فهم الآليات الجزيئية وراء نقص البروتين pRb. وبالتالي ، فإن التأثيرات الضارة لثلاث طفرات باستخدام بروتوكول دراسة في السيليكو يتكون من برامج مختلفة (ESE Finder و HSF و I-Mutant 2.0 و Polyphen-2 و Align GVGD و Project HOPE). تم إجراء النمذجة الجزيئية للهياكل ثلاثية الأبعاد بواسطة برنامج Swiss Pdb Viewer.

سمح لنا التحليل في السيليكو بتحديد التأثير الضار لثلاث طفرات ضارة: طفرة داخلية التي تقع على مستوى القطعة الغير دالة 12 المسؤولة عن إلغاء موقع لصق المتبرع ، والذي سيؤدي إلى تخطي القطعة الدالة 12 . الطفرة لثنائية ذات الاتجاه الخاطئ في القطعة الدالة 19 ، ومن المتوقع أن تكون تعدد الأشكال. تؤثر طفرة الحاسة الزائفة الثالثة على القطعة الدالة 20 ، وهي مسؤولة عن تغيير في تكوين بروتين pRB ولها تأثير آخر على موقع لصق ، مما يتسبب في تغييره ، والذي سيولد قفزة القطعة الدالة في 20.

على المدى الطويل ، قد تساهم هذه النتائج في فهم أفضل للآليات الجزيئية المسؤولة عن تطور الورم الأرومي الشبكي ، مما يسمح بتطوير استراتيجيات علاجية جديدة.

الكلمات الرئيسية: ورم أرومي شبكي ؛ RB1 ؛ في السيليكو بروتين pRb هيكل ثلاثي الأبعاد.

Table des matières

Remerciements	2
Dédicace	3
Résumé	5
Liste Des Tableaux	10
Liste des figures	11
Liste des abréviations	13
Avant-propos	15
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	17
1 Définition et épidémiologie.....	18
1.1 Rappel anatomique.....	18
2 Aspect clinique.....	20
2.1 Signes cliniques.....	20
2.2 Diagnostic du rétinoblastome.....	21
2.3 Traitement du rétinoblastome.....	21
3 Aspect génétique du rétinoblastome.....	22
3.1 Aspect cytogénétique.....	22
3.2 Aspect moléculaire.....	23
3.2.1 L'hypothèse de Knudson.....	23
3.2.2 Le gène RB1 et rétinoblastome.....	24
BUT DE L'ETUDE	31
POPULATION D'ETUDE ET METHODE	33
1 Population d'étude:.....	34
2 Méthodes :.....	34
2.1 Analyse in silico des mutations exoniques.....	34
2.1.1 Logiciel I-mutant 2.0.....	34
2.1.2 Logiciel polyphen-2.....	36
2.1.3 Logiciel Align Grantham Variation Grantham Deviation (Aligne-GVGD).....	38
2.1.4 Project HOPE.....	39
2.1.5 Logiciel Swiss-PdbViewer.....	40
2.2 Analyse in silico des mutations affectant les régions introniques.....	41

RESULTATS ET DISCUSSION	43
1 Analyse de la mutation exonique c.1903 G>C (p.Ala635Pro).....	44
1.1 Résultat obtenu par le logiciel I-Mutant 2.0.....	44
1.2 Résultats obtenus par le logiciel Polyphen-2	45
1.3 Résultat obtenu par le logiciel Align-GVGD	46
1.4 Résultat obtenu par Project HOPE	46
1.5 Discussion de la mutation exonique c.1903 G>C (p.Ala635Pro)	48
2 Analyse de la mutation exonique c. 1961 T>A (p.Val654Gln)	49
2.1 Résultat obtenu par le logiciel I-Mutant 2.0.....	49
2.2 Résultats obtenus par le logiciel Polyphen-2	49
2.3 Résultat obtenu par le logiciel Aligne-GVGD	51
2.4 Résultat obtenu par Project HOPE	51
2.5 Résultat obtenu par le logiciel swiss Pdb viewer	53
2.6 Discussion de la mutation exonique c. 1961 T>A (p.Val654Gln)	55
3 Analyse de la mutation intronique c.1215+1 G>A	56
3.1 Résultat obtenu par le logiciel HSF.....	56
3.2 Résultat obtenu par le logiciel ESE Finder	57
3.3 Discussion de la mutation intronique c.1215+1 G>A	57
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	59
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE	61

Liste Des Tableaux

Tableau1 : Liste des mutations identifiées chez les patients atteints d'un rétinoblastome dans la population Algérienne.

Tableau2 : Les propriétés physicochimiques des deux aa Alanine et proline.

Tableau3 : Les propriétés physicochimiques des deux aa valine et glutamine.

Tableau4: Résultat de l'analyse de la mutation c.1215+1 G>A par HSF.

Liste des figures

Figure 1 : Premiers signes cliniques du rétinoblastome : leucocorie (A) et strabisme (B).

Figure 2 : Hypothèse des deux hits de Knudson. La survenue de deux événements mutationnels (en jaune) dans le cas d'un cancer sporadique nécessite plus de temps que dans les cas héréditaires où une mutation germinale (en rouge) est déjà présente.

Figure 3 : Schéma montrant la localisation du gène RB1 sur le Segment 13q14 du chromosome 13.

Figure 4 : location des domaines en fonction de la séquence des 928 acides aminés.

Figure 5 : Structure cristallographique de la protéine pRb.

Figure 6 : Rôle de la protéine pRb dans le contrôle de la transition de la phase G1 vers la phase S.

Figure 7 : In put data dans le logiciel I mutant 2.0.

Figure 8 : In put data dans le logiciel PolyPhen-2.

Figure 9 : In put data dans le logiciel Aligne-GVGD.

Figure 10 : Résultat obtenu par le logiciel I-Mutant 2.0 pour la mutation c.1903G>C (p.Ala635pro).

Figure 11 : Résultat obtenu par le logiciel PolyPhen-2 pour la mutation c.1903G>C (p.Ala635pro).

Figure 12 : Résultat obtenu par Align GVGD pour la mutation c.1903G>C.

Figure 13 : Les structures schématiques de l'Alanine et la Proline.

Figure 14 : Capture superposée des deux structures 3D du pRb sauvage et mutée.

Figure 15 : Résultat obtenu par le logiciel I-Mutant 2.0 pour la mutation c. 1961 T>A (p.Val654Gln).

Figure 16 : Résultat obtenu par le logiciel PolyPhen-2 pour la mutation c. 1961 T>A (p.Val654Gln).

Figure 17 : Résultat obtenu par Align GVGD pour la mutation c.1961T>A.

Figure18 : Les structures schématiques de la valine et la glutamine.

Figure 19: Capture superposée des deux structures 3D de la protéine pRb sauvage et mutée.

Figure 20 : Structures 3D des deux protéines pRB normale (A) et mutée (B).

Figure21 : Représentation des interactions de l'aa valine 654 avec les quatre aa au niveau de la protéine native et l'aa glutamine 654 avec les quatre aa au niveau de protéine mutée.

Figure 22 : Capture superposée des deux structures 3D de la protéine pRb sauvage représenté en vert et mutée en rouge.

Figure23 : Résultat de l'analyse de la mutation c.1215+1 G>A par HSF.

Figure 24 : Distribution des protéines SR dans la séquence de référence du gène RB1 et la séquence mutée (c.1215 + 1G>A).

Liste des abréviations

3D : tridimensionnelle.

Aa : Acide aminée.

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique.

ADNc: Acide Désoxyribo Nucléique complémentaire.

ALA : Alanine.

Align GVGD: Align Grantham Variation Grantham Deviation.

ARNm : Acide ribonucléique messenger.

ASF: Alternative Splicing Factor.

CDK : Kinases dépendentes des cyclines.

CDS: Coding DNA Sequence.

CpG : Cytosine-phosphate-Guanine.

DDG: DeltaDeltaG

E2F: Adenovirus Early region 2 factor; facteur de transcription.

ESE Finder: Exonic Splicing Enhancer-finder.

Gln : Glutamine.

G0 : phase de repos.

G1 : croissance de la cellule.

HSF: Human Splicing Finder Version.

IRM : Imagerie résonance magnétique.

KB : Kilobase.

KDa : Kilodalton.

M : mitose.

mm : millimètre

P : Bras court du chromosome.

P : groupement phosphate.

Pb : paire de base.

PP2A : Protéine Phosphatase 2A.

P53 : protéine 53.

PDB: protéin Data Bank.

Project HOPE: Have (y) Our Protein Explained.

PolyPhen-2: Polymorphism Phenotyping-2.

pRb: protéine Rb.

RB1 : gène du rétinoblastome 1.

Pro : Proline.

S : phase de réplication de l'ADN.

SIFT: Sorting Intolerant From Tolerant.

SF2: Splicing Factor 2.

SC35: Spliceosomal Component 35.

SRp 40 : SR protein 40.

SRp55 : SR protein 55.

Val : Valine.

Avant-propos

Le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération cellulaire anormalement importante au sein d'un tissu normal de l'organisme et qui peut toucher d'autres organes formant ainsi des métastases.

Le rétinoblastome est une tumeur cancéreuse de l'œil assez rare qui touche les cellules de la rétine. Il affecte les nourrissons et les jeunes enfants avant l'âge de cinq ans [1]. Le gène muté responsable du développement de ce cancer est le gène suppresseur de tumeur Rétinoblastomal (RB1). Ce gène est considéré comme premier modèle décrit de prédisposition génétique à un cancer.

Le rétinoblastome se présente sous deux formes : sporadique et héréditaire. Cette différence de présentations cliniques et familiales a été inspirée par la théorie de Knudson [2].

Plusieurs équipes de recherche se sont intéressées à l'étude du gène RB1 dans plusieurs populations. En Algérie, l'étude moléculaire du gène RB1 a été réalisée par Madame Boubekeur.A. Cette étude, première du genre dans la population Algérienne, a permis de mettre en évidence deux nouvelles mutations jamais décrites auparavant [3].

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressées à l'étude in silico des fonctionnalités des mutations du gène RB1 mises en évidence par Madame Boubekeur.A au niveau protéique par l'utilisation de différents logiciels de prédiction et de modélisation moléculaire en 3D. Les effets délétères des mutations sur l'épissage, la structure/fonction de la protéine pRb ont été prédits en utilisant plusieurs logiciels de prédiction : I-Mutant 2.0, Polyphen-2, Align GVGD, et Project HOPE. Par la suite, les structures 3D des protéines contenant ces mutations ont été construites par modélisation moléculaire en utilisant le logiciel Swiss Pdb Viewer.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1 Définition et épidémiologie

Le rétinoblastome est considéré comme une tumeur hautement maligne des cancers intraoculaires [4]. Il représente environ 5% de tous les cancers pédiatriques avec une incidence de 1/15.000 à 1/20.000 naissances vivantes [5]. Il s'agit d'une tumeur d'origine neuro-épithéliale qui affecte les nourrissons et les jeunes enfants avant l'âge de cinq ans [6].

Dans les circonstances normales, une population de cellules impliquées dans le développement de l'œil appelées « rétinoblastes » arrêtent leurs croissances et se différencient en cellules rétiniennes nerveuses et photo-réceptrices responsables de la transformation de l'influx lumineux en influx nerveux [7]. Dans le cas du rétinoblastome, ces rétinoblastes ne peuvent pas se différencier et donc continuent à se diviser formant ainsi la tumeur de la rétine [8].

En absence de traitement, cette tumeur est responsable d'un décollement de la rétine qui détruit progressivement la vision. Elle risque par la suite de se développer vers l'orbite, le nerf optique et le cerveau, voir de se disséminer dans l'organisme ce qui conduit à une métastase mettant la vie de l'enfant en péril.

1.1 Rappel anatomique

La topographie de la rétine est variable selon les régions tant au niveau de la structure des neurones que de la vascularisation.

La rétine : est la membrane la plus profonde du globe oculaire, transparente s'étendant de la papille jusqu'à l'oraserrata, richement vascularisée.

On lui distingue 2 zones topographiques: la rétine centrale et la rétine périphérique [9].

La rétine centrale : de 5-6 mm de diamètre située au pôle postérieur entre les branches temporales supérieures et inférieures de l'artère centrale de la rétine englobant la papille et la région maculaire.

La rétine périphérique : elle est subdivisée en 4 zones par Duke-Elder

- Périphérie proche qui prolonge la région centrale de 1.5 mm.

- Périphérie moyenne mesure 3 mm.

- Périphérie éloignée étendue de 9-10 mm en temporal et 16 mm en nasal.

- L'oraserrata, l'extrême périphérie, de 2.1 mm en temporal et 0.8 mm en nasal. Le festonnement de l'oraserrata marque la fin de la rétine en périphérie.

Le nerf optique : comprend 3 portions :

- La portion préliminaire débute par la papille et se termine à distance du canal scléral.
- La portion laminaire est située au niveau de la lame criblée.
- La portion rétro laminaire, c'est le début de myélinisation des fibres optiques et le point de départ du nerf optique qui est entouré de ses gaines méningées : la pie mère, la dure mère qui se continue avec la sclère et entre les deux se trouve l'espace sous-arachnoïdien dont le cul de sac se situe juste en arrière de la lame criblée. Cet espace est directement en contact avec le cerveau et la moelle épinière par l'intermédiaire du liquide céphalorachidien.

La vascularisation de la rétine provient de 2 réseaux avec une ligne de partage dans la couche nucléaire interne.

La circulation rétinienne vascularise la couche des fibres optiques jusqu'au 2/3 interne de la couche nucléaire interne.

La vascularisation choroïdienne assure l'irrigation du reste des couches externes jusqu'à l'épithélium pigmenté. La région maculaire dépourvue de vaisseaux rétiens est prise en charge par la vascularisation choroïdienne.

2 Aspect clinique

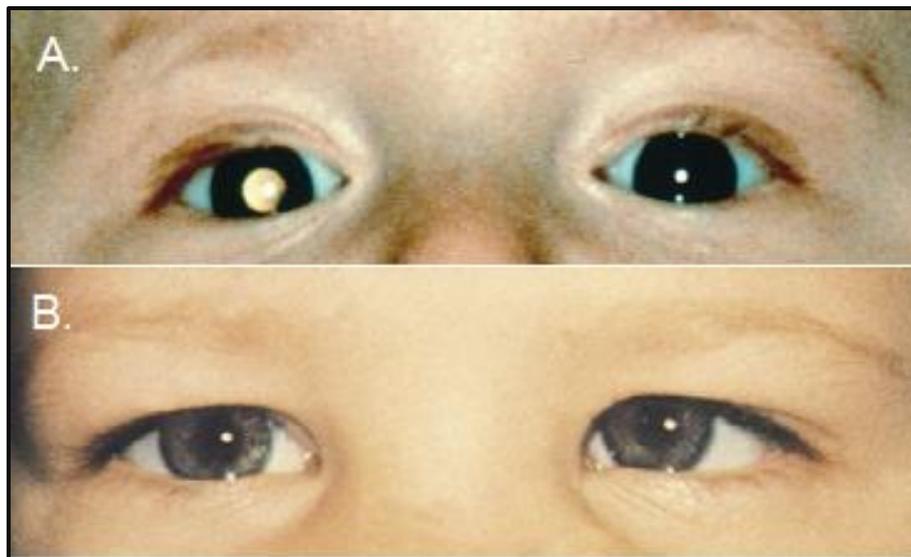
2.1 Signes cliniques

La leucocorie et le strabisme sont les signes révélateurs les plus fréquents du rétinoblastome. Ces signes doivent impérativement faire pratiquer un examen du fond d'œil après dilatation.

La leucocorie ou reflet blanc dans la pupille est visible au début que sous certains éclairages et dans certaines directions du regard [5]. Elle deviendra par la suite permanente.

Le strabisme est un signe d'appel précoce permettant parfois de faire le diagnostic de petites tumeurs se développant dans la région musculaire [10].

D'autres signes plus tardifs sont également retrouvés tels que : la buphtalmie,



l'hétérochromie irienne, le pseudohypopion [11].

Figure1: Premiers signes cliniques du rétinoblastome : leucocorie (A) et strabisme (B) [5].

2.2 Diagnostic du rétinoblastome

Le diagnostic du rétinoblastome repose essentiellement sur un examen du fond d'œil sous anesthésie générale. Ce dernier est complété par une échographie oculaire, une Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) et/ou une tomodensitométrie [5].

Le rétinoblastome endophytique apparaît comme une tumeur blanche richement vascularisée se développant vers la cavité vitréenne avec de nombreux flocons blanchâtres flottant dans le vitré [12]. Les formes exophytiques se présentent sous forme d'un décollement de la rétine derrière lequel on aperçoit les masses saillantes parfois calcifiées en partie blanches avec dilatation angiomateuse des vaisseaux.

Deux tiers des cas de rétinoblastome diagnostiqués correspondent à des tumeurs unilatérales et le tiers restant à des tumeurs bilatérales. L'âge médian du diagnostic des formes unilatérales est de 2 ans et de moins de 12 mois pour les formes bilatérales [5].

2.3 Traitement du rétinoblastome

Dans le cas d'un rétinoblastome unilatéral, l'énucléation est réalisée chez 80% des patients [2]. L'absence d'envahissement du nerf optique ou des enveloppes oculaires permet d'éviter un traitement adjuvant. Le recours à la radiothérapie en cas d'envahissement est aujourd'hui évité en raison des risques de séquelles liées à l'irradiation. Une chimiothérapie associée à une curiethérapie orbitale est préférée.

Chez les patients avec un rétinoblastome bilatéral, le traitement conservateur de l'œil est privilégié et repose sur la chimiothérapie, la radiothérapie, la photocoagulation, la cryothérapie ou la protonthérapie [13]. Toutefois, un traitement conservateur de l'œil est également envisagé si la tumeur est unilatérale, petite, et épargnant la macula.

3 Aspect génétique du rétinoblastome

3.1 Aspect cytogénétique

En 1983, Godbout et Cavenee apportent la preuve incontournable que l'oncogenèse du rétinoblastome suit un mode autosomique dominant dont la pénétrance est de 90% et 10% un mode récessif sous la forme d'une perte d'hétérozygotie dans la tumeur [14].

L'identification des remaniements du chromosome 13 chez des patients atteints du rétinoblastome a permis de suggérer que le gène de prédisposition au rétinoblastome est localisé dans cette région chromosomique 13q14 [15]. Chez 5 à 10% des enfants atteints de rétinoblastome, il est possible de mettre en évidence, par l'étude du caryotype sanguin, une délétion chromosomique constitutionnelle et éventuellement transmissible touchant la bande 13q14 [16].

Trois mécanismes distincts d'inactivation sont recensés dans le cadre de réarrangements chromosomiques [17]. De façon prépondérante, le gène peut être physiquement délété chaque fois que la bande 13q14 est manquante, beaucoup plus rarement, on observe une cassure génique en cas de translocations autosomiques balancées ou d'inversions péri ou para-centriques du chromosome 13. Enfin, il existe quelques cas de

délétions fonctionnelles après translocation du bras long du chromosome 13 sur le chromosome X inactivé chez des patients de sexe féminin.

Dans 25 % des cas environ, le remaniement chromosomique est hérité d'un des parents [17]. Dans les autres cas (75 %), ces aberrations chromosomiques sont dites de novo en vertu d'une analyse caryotypique parentale normale (90 %) [18].

3.2 Aspect moléculaire

L'identification du gène RB1 en 1986 a permis de valider le modèle de Knudson sur le plan moléculaire. Par la suite, de nombreux gènes suppresseurs de tumeurs ont été rapidement identifiés par une approche classique de clonage positionnel dans les formes familiales de rétinoblastome [19].

Les altérations moléculaires à l'origine de la transformation cancéreuse, observées dans une tumeur quel que soit son type, peuvent être classées en trois catégories : activation des proto-oncogènes; inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs ou inactivation des gènes de réparation de l'ADN [20].

3.2.1 L'hypothèse de Knudson

Knudson a proposé en 1971 un modèle mathématique qui rendait compte de la fréquence élevée des formes bilatérales de rétinoblastome, survenant dans les premiers mois de vie dans les cas familiaux, et, de la plus grande fréquence des formes unilatérales avec un diagnostic plus tardif dans les cas sporadiques [20]. Dans ce modèle, un rétinoblastome se développerait à partir d'une cellule rétinienne après la survenue de deux mutations dans le

tissu cible. L'accumulation de ces deux événements est nécessaire mais possiblement non suffisante au développement tumoral. Dans les formes bilatérales, la première mutation serait constitutionnelle (mutation germinale), présente dans toutes les cellules de l'organisme, alors que la deuxième mutation serait acquise durant la vie fœtale ou au cours des premiers mois de vie (figure 2). Bien que la probabilité que deux mutations surviennent dans une même cellule soit très faible, l'apparition d'une seule mutation au sein d'un tissu n'est pas un événement rare. Si la première mutation est déjà présente dans l'ensemble des cellules de la rétine, le développement d'un rétinoblastome (lié à l'apparition de la deuxième mutation) est soumis à la probabilité qu'une mutation apparaisse sur le deuxième gène cible.

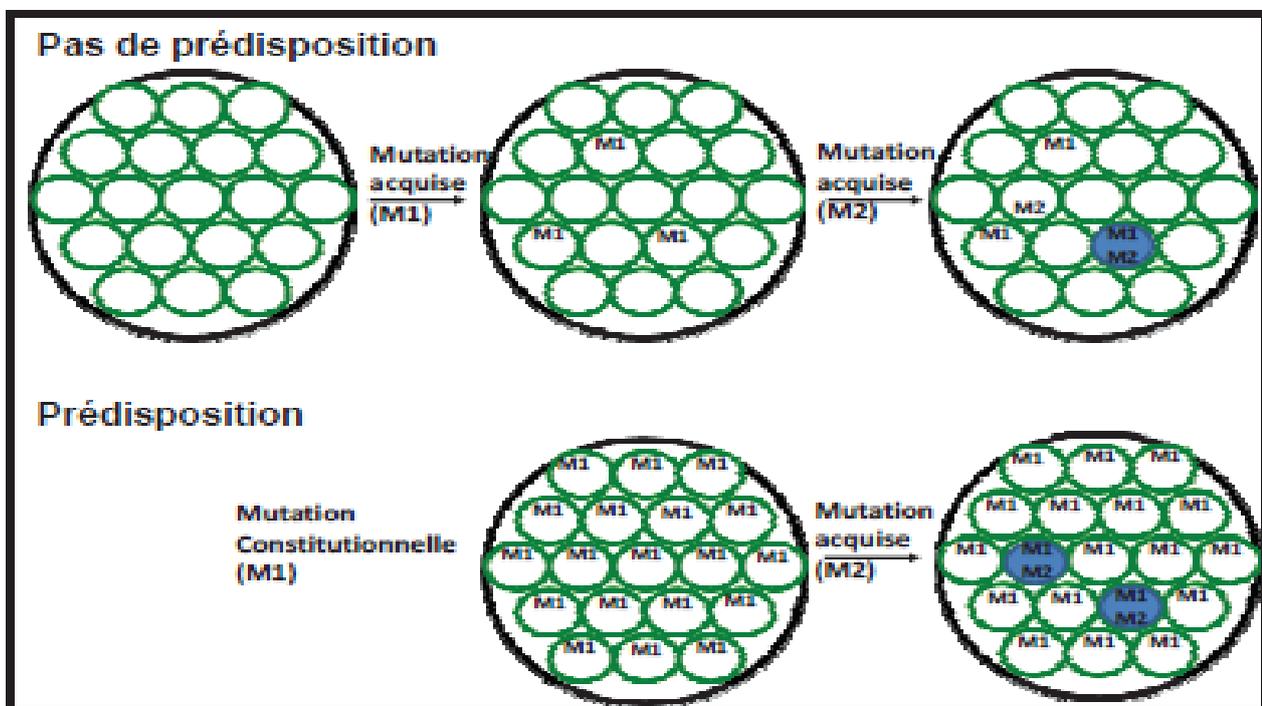


Figure 2 : Ici sont schématisées des rétines (grands cercles) et des cellules rétiniennes (petits cercles). Les tissus prédisposés portent la première mutation (M1) inactivant le premier allèle dans toutes les cellules. L'apparition d'une deuxième mutation (M2) inactivant le deuxième allèle d'un gène suppresseur de tumeur initie le développement d'un rétinoblastome (cercle bleu).

3.2.2 Le gène RB1 et rétinoblastome

3.2.2.1 Le gène RB1

Le gène du rétinoblastome (Figure3) est le premier parmi une trentaine de gènes suppresseurs de tumeur identifié et cloné [21] [22].

Il a été découvert pour la 1ère fois en 1986 et localisé sur la bande q14 du chromosome 13 [21] [23].

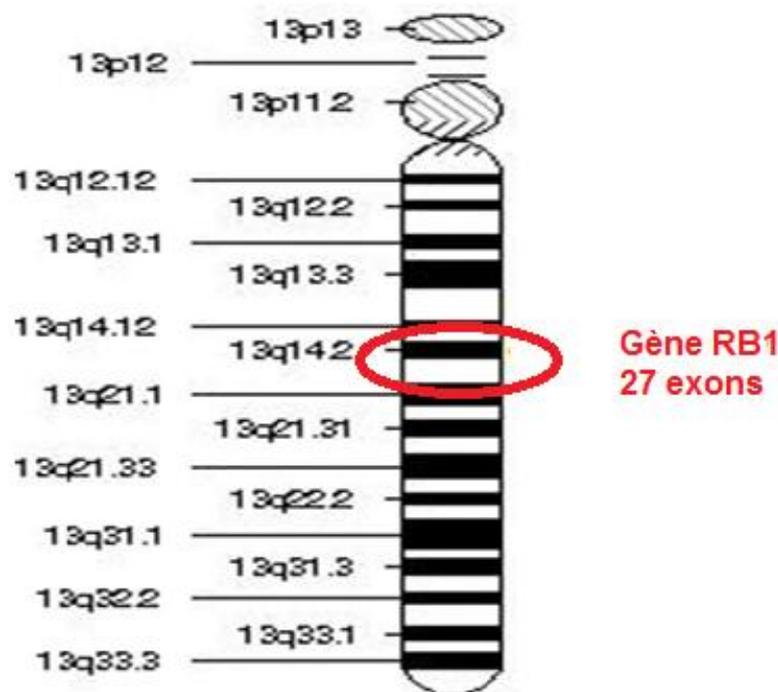


Figure 3: Schéma montrant la localisation du gène RB1 sur le segment 13q14 du chromosome 13[24].

Le gène RB1 comporte 26 introns et un cadre ouvert de lecture de 2,7 kb qui code pour une protéine nucléaire de 110 KD. Le RB1 est transcrit en un ARNm de 4 772 paires de base (Tavtigian SV) [25]. La région codante pour Coding DNA Sequence (CDS) a une taille de 2787 pb codant pour 928 acides aminés (aa) [26].

Des protéines régulatrices ayant une forme « Leucine zipper » ou en « Doigt de zinc » ont été trouvées aptes à se fixer au niveau des régions du gène RB1. Par ailleurs, l'analyse de la région promotrice montre la présence d'éléments caractéristiques des gènes de « ménage » [27]. Il existe plusieurs sites d'initiation de la transcription dans une région

riche en GC. Deux codons d'initiation potentiels pour la traduction ont été retrouvés. Le premier au niveau de l'exon 1 au 139^{ème} nucléotide, et le deuxième au 475^{ème} nucléotide. La région nécessaire pour l'activation promotrice est d'environ 70 pb[28].

3.2.2.2 La protéine pRB

La protéine du rétinoblastome (pRB) est une protéine de séquestration qui exerce un contrôle négatif du cycle cellulaire. Cette fonction est essentielle dans les organismes pluricellulaires pour éviter la formation de tumeurs malignes qui mettraient en péril l'organisme, ce qui permet de qualifier cette protéine de « suppresseur de tumeur ».

Son nom vient de son étroite collaboration dans un cancer ophtalmologique pédiatrique : le rétinoblastome. Cette protéine monomérique a un poids moléculaire de 105 KD, est plutôt instable et est hydrophile. Son gène est le RB1 situé sur le chromosome 13 humain.

Chez l'être humain pRB est une protéine de 928 acides aminés et comporte 3 domaines

- pRB_A : Site de liaison de la cycline,
- pRB_B : Domaine de liaison. Site d'interaction avec des protéines virales,
- pRB_C : Domaine carboxyle-terminal. Site de liaison requis pour lier la protéine E2F. Site de phosphorylation des CDK4 et CDK6.

Les mutations affectant la fonction biologique de pRB sont généralement des mutations ponctuelles d'une seule paire de bases menant à une mutation non-sens [29]. Ces mutations empêchent la protéine de séquestrer correctement le complexe E2F/DP. Si ce complexe n'est pas correctement séquestré, le facteur de transcription E2F peut toujours faire continuer le cycle cellulaire. Puisque pRB est une protéine monomérique, il est nécessaire d'avoir les 2 allèles du gène RB1 muté pour voir se manifester la condition pathologique.

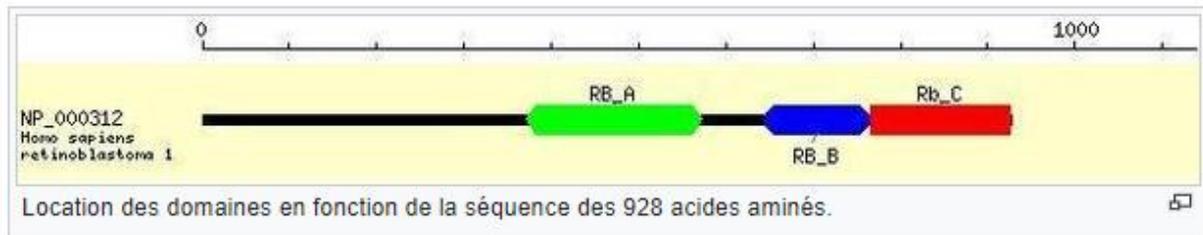


Figure4 : location des domaines en fonction de la séquence des 928 acides aminés

3.2.2.3 La structure 3D de la protéine pRb

La protéine pRb contient les domaines N-terminaux (RbN) et de poche et plusieurs régions intrinsèquement désordonnées : le lieu interdomaine entre les deux domaines repliés indépendamment (RbIDL), la grande boucle dans le domaine de poche (RbPL) et le domaine C-terminal (RbC). Les structures des domaines isolés ont été déterminées ; cependant, les interactions inter-domaines et leur pertinence pour la fonction Rb sont moins bien caractérisées [30]

Architecture de domaine de la protéine Rb. Les deux domaines structurés, RbN et la poche, sont respectivement colorés en or et en bleu. Les séquences désordonnées, y compris RbIDL, RbPL et RbC, ne sont pas colorées. Les sites consensus Cdk conservés sont indiqués.

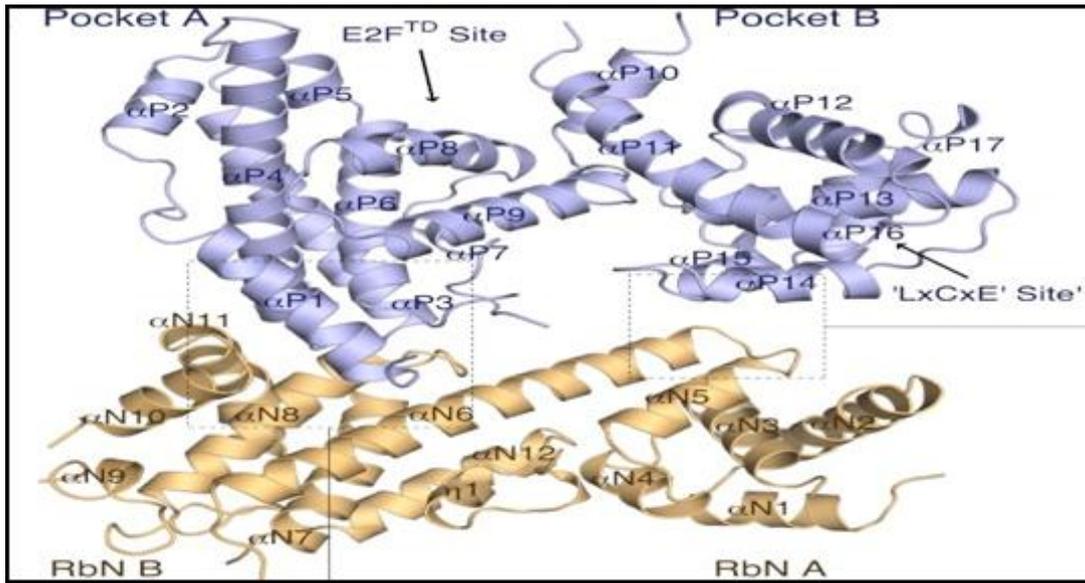


Figure 5: Structure cristallographique de la protéine pRb [31].

3.2.2.4 La protéine pRB et le cycle cellulaire

Au début de G1, la cellule contient le complexe Cycline D / Cdk 4 qui, une fois activé, initie la phosphorylation de la protéine pRb. Phosphorylée, la protéine pRb libère E2F qui sert alors de facteur de transcription du gène de la cycline E. La fonction essentielle de la Cycline D / Cdk4 est donc d'activer, au début de la phase G1 (G1 précoce), la transcription du gène de la cycline E intervenant dans la phase suivante du cycle.

Une fois activé, le complexe Cycline D / Cdk4 peut phosphoryler la protéine Rb. Ceci permet alors la libération par cette dernière du facteur de transcription E2F. Une fois libéré, E2F se fixe sur l'ADN, activant l'expression de gènes codant pour des protéines nécessaires au déroulement de la phase S [32].

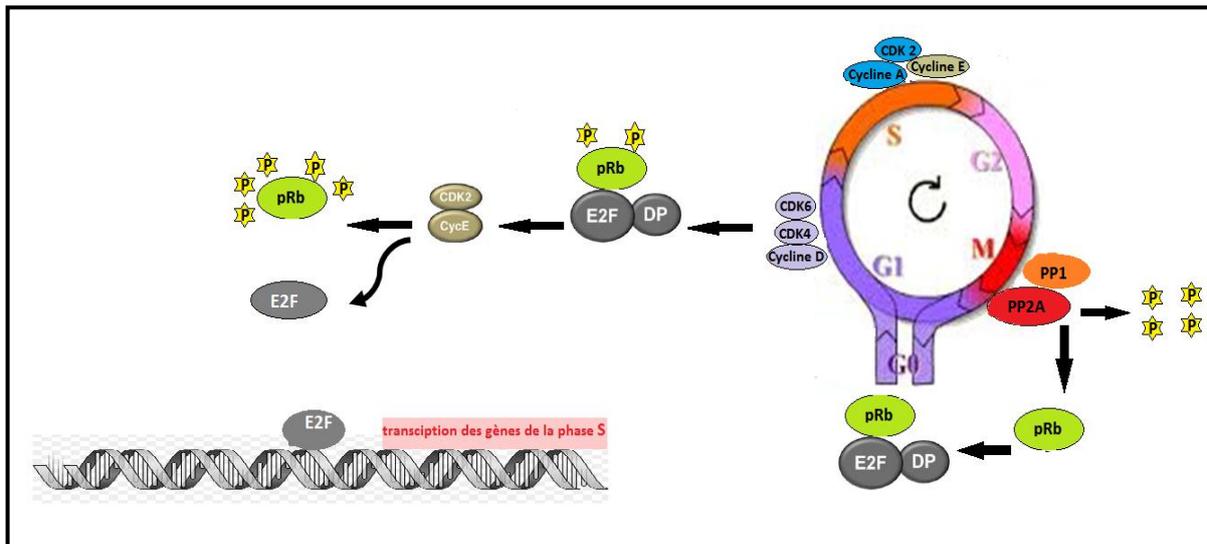


Figure 6 : Rôle de la protéine pRb dans le contrôle de la transition de la phase G1 vers la phase S [33].

3.2.2.5 La protéine pRB et contrôle de l'apoptose

La protéine Rb régule l'apoptose via son interaction avec les protéines E2F et notamment E2F1. En effet, une surexpression d'E2F1 induit l'apoptose en activant la transcription des protéines codant pour p14Arf, p73, APAF-1 et la protéine pro-apoptotique SMAC [34]. La surexpression d'Arf stabilise la protéine p53 notamment en inhibant MDM2, membre de la famille des Murine-Double Minute, impliquée dans la dégradation de p53 [35] [36].

L'inhibition de Rb serait donc à l'origine de deux événements paradoxaux puisque l'accumulation des protéines E2F permet une entrée en phase S et promeut une prolifération cellulaire mais permet aussi une libération de protéines proapoptotiques. Un contrôle étroit

des membres de la famille E2F paraît donc essentiel dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. En conséquence, la situation du rétinoblastome où *RBI* est inactivé sur ces deux allèles, implique la participation d'événements complémentaires nécessaires au développement tumoral.

3.2.2.6 La protéine pRB et contrôle de la différenciation cellulaire

Les modèles murins ont permis de mettre en évidence le rôle de la protéine pRb dans le développement de la rétine embryonnaire [37]. Au cours du développement embryonnaire, la couche neuroblastique abrite les cellules progénitrices rétiniennes qui se divisent et/ou se différencient en cellules rétiniennes transitoires. A la naissance, les cellules progénitrices rétiniennes sont rares et les cellules rétiniennes transitoires migrent et se différencient en bâtonnets, cônes, cellules horizontales, cellules bipolaires, cellules de Müller, cellules amacriennes et en cellules ganglionnaires. La protéine pRb bloque la division des cellules rétiniennes transitoires et limiterait l'expansion des cellules progénitrices rétiniennes.

BUT DE L'ETUDE

Le rétinoblastome est une tumeur maligne touchant l'enfant dès son jeune âge. Ce type de cancer résulte de la transformation des rétinoblastes. Le rétinoblastome existe sous deux formes : sporadique et familiale.

Les progrès de la bio-informatique ont permis d'accélérer le taux de découverte et de réduire le besoin d'expériences de laboratoire coûteuses ou d'essais cliniques. L'évolution de cette discipline est actuellement indispensable au développement de la biologie moléculaire [38].

Dans le but de contribuer à l'étude moléculaire du rétinoblastome, nous nous sommes intéressées à l'étude in silico des fonctionnalités des mutations du gène RB1 mises en évidence par Madame Boubekeur.A dans la population Algérienne.

Les effets délétères des mutations sur l'épissage, la structure/fonction de la protéine pRb ont été prédits en utilisant plusieurs logiciels de prédiction : I mutant 2.0, polyphen-2, Align GVGD, project HOPE et swiss pdb , HSF et ESE Finder.

La connaissance des effets délétères des mutations pourra contribuer à la compréhension de la maladie ainsi qu'au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

POPULATION D'ETUDE ET METHODE

1 Population d'étude:

L'étude in silico a porté sur trois mutations identifiées chez des patients atteints d'un rétinoblastome dans la population Algérienne. Ces mutations ont été identifiées par Madame Boubekeur.A lors de la réalisation de sa thèse de doctorat. Ces mutations sont résumées dans le tableau 1.

Tableau1 : Liste des mutations identifiées chez les patients atteints d'un rétinoblastome dans la population Algérienne.

Exon/Intron	Type de mutation	ADNc	ADNg	Protéine
Exon 19	Faux sens	c. 1903 G>C	g. 157546 G>C	p.Ala635 pro
Exon 20	Faux sens	c. 1961 T>A	g. 160942 T>A	p.Val654Gln
Intron 12	Site donneur d'épissage	c. 1215+1 G>A	g. 70330 G>A	

2 Méthodes :

Les variations de bases au niveau des gènes sont responsables de dysfonctionnements des protéines concernées conduisant à l'apparition de plusieurs pathologies. Ces variations peuvent survenir au niveau des exons ou au niveau des introns et peuvent donc avoir des effets sur le processus d'épissage et/ou sur la structure/fonction de la protéine, ce qui mène à des conséquences complexes. Cela explique, la diversité des logiciels destinés à prédire les différents effets délétères des mutations étudiées.

2.1 Analyse in silico des mutations exoniques

2.1.1 Logiciel I-mutant 2.0

L'effet stabilisant ou déstabilisant des mutations faux-sens peut être évalué en utilisant le logiciel I-Mutant 2.0 (<http://folding.biofold.org/i-mutant/i-mutant2.0.html>).

I-Mutant 2.0 a été testé sur un ensemble de données provenant de ProTherm. Ce logiciel estime la différence d'énergie libre (Delta Delta G ; DDG) entre la protéine sauvage et mutée

[39]. Une valeur positive ($DDG > 0$) implique une augmentation de la stabilité des protéines, par contre une valeur négative ($DDG < 0$) suggère une mutation déstabilisante [39].

I-Mutant2.0 a été formé pour accomplir quatre tâches différentes :

- Prédiction de la direction des changements de stabilité de la protéine lors d'une mutation ponctuelle unique de la structure tertiaire de la protéine (une tâche de classification).
- La prédiction de la valeur DDG des changements de stabilité de la protéine lors d'une mutation ponctuelle unique de la structure tertiaire de la protéine (une tâche d'approximation de fonction).
- La prédiction de la direction des changements de stabilité de la protéine lors d'une mutation ponctuelle unique à partir de la séquence protéique (une tâche de classification).
- La prédiction de la valeur DDG des changements de stabilité de la protéine lors d'une mutation ponctuelle unique à partir de la séquence protéique (une tâche d'approximation de fonction).

Pour la tâche de classification et pour l'attribution des valeurs DDG , nous adoptons fondamentalement le même code d'entrée en identifiant deux étiquettes : l'une représente la stabilité accrue de la protéine ($DDG > 0$, l'étiquette est +), l'autre est associée à la mutation déstabilisante ($DDG < 0$, l'étiquette est -) [40].

I-Mutant2.0

Protein Sequence: GICKVKNIDLK
FKIIVTAYKDLPHAVQETFKRVLIKEEEYDSIIVFYNSVFMQRLKTNIL
QYASTRPPTLS
PIPHIPRSPYKFPSSPLRIPGGNIYISPLKSPYKISEGLPTPTKMTPRS
RILVSIGESFG
TSEKFQKINQMVCNSDRVLKRSAEGSNPPKPLKCLRFDIEGSDEADGSK
HLPGESKFQQK
LAEMTSTRTRMOKQKMNSMDSNKEEK

Position: 635

New Residue: p

Temperature: 25

pH: 7

Prediction: Free Energy change value (DDG)
 Sign of DDG

Figure 7: In put data dans le logiciel I mutant 2.0.

2.1.2 Logiciel polyphen-2

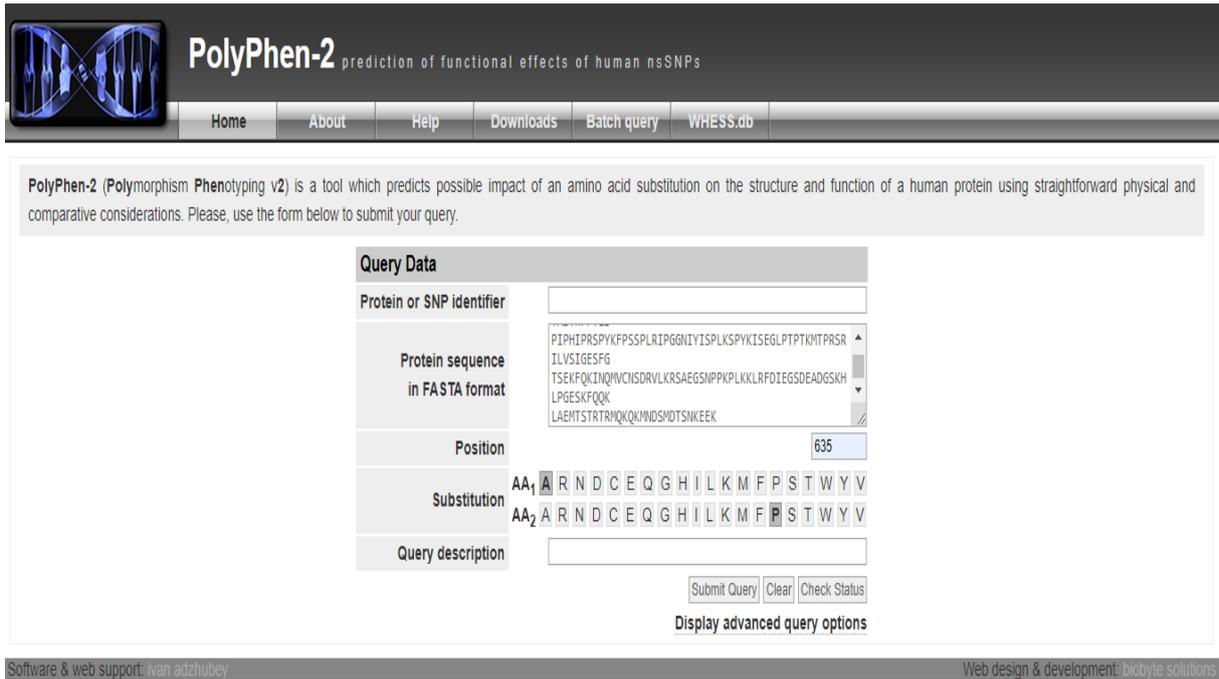
PolyPhen-2 [41] est un outil automatique de prédiction de l'impact possible d'une substitution d'acide aminé sur la structure et la fonction d'une protéine humaine. Les prédictions automatisées de ce type sont essentielles pour interpréter de grands ensembles de données de variantes génétiques rares, qui ont de nombreuses applications dans la recherche moderne en génétique humaine. Les utilisations dans les recherches récentes incluent l'identification d'allèles rares qui causent la maladie mendélienne [42], la recherche d'allèles potentiellement utilisables médicalement dans le génome d'un individu [43] et le profilage du spectre de variations rares découvert par séquençage de grandes populations [44].

PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) prédit l'influence d'une substitution d'aa sur la fonction protéique en se basant sur trois types d'informations issues des banques de donnée [45] [46] :

1. Les informations pour les substitutions connues à une position donnée, contenant les annotations de séquences.
2. L'alignement multiple.
3. Les informations structurales provenant de banque de données de structure PDB.

Les substitutions sont classées en trois niveaux :

- Probablement délétères (*probably damaging*) : La substitution devrait altérer la fonction et/ou la structure (> 2.0).
- Potentiellement délétères (*possibly damaging*) : La substitution pourrait altérer la fonction et/ou la structure (1.500-1.999).
- Bénigne (*benign*) : La substitution n'a pas d'effet sur la fonction et sur la structure de la protéine (0-0.999).



PolyPhen-2 prediction of functional effects of human nsSNPs

Home About Help Downloads Batch query WHES.S.db

PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2) is a tool which predicts possible impact of an amino acid substitution on the structure and function of a human protein using straightforward physical and comparative considerations. Please, use the form below to submit your query.

Query Data

Protein or SNP identifier:

Protein sequence in FASTA format:


```
PIPHIIPRSPYKFPSSPLRIPGGNIVISPLKSPYKISEGLPTTKMTPRSR
ILVSIIGESFG
TSEKFKQIKIQVNCISDRVLKRSAEGSNPPKLLKLRFDIEGSDAEGSKH
LPGESKFKQK
LAENTSTRTRMQKQKMHDSMOTSNIKEEK
```

Position:

Substitution:
 AA₁ A R N D C E Q G H I L K M F P S T W Y V
 AA₂ A R N D C E Q G H I L K M F **P** S T W Y V

Query description:

Submit Query Clear Check Status

Display advanced query options

Software & web support: ivan adzhubey Web design & development: biobyte solutions

Figure 8: In put data dans le logiciel PolyPhen-2

2.1.3 Logiciel Align Grantham Variation Grantham Deviation (Aligne-GVGD)

Align Grantham Variation Le logiciel « Align-GVGD » Grantham Déviation (http://agvgd.hci.utah.edu/agvgd_input.php) combine les caractéristiques biophysiques des acides aminés et des alignements de séquences multiples de protéines pour prédire l'effet de la substitution sur la fonction des protéines [47]. Align-GVGD prend en compte la variation biochimique à la position pertinente dans l'alignement de séquences multiples (variation de Grantham) et la différence biochimique entre les acides aminés de référence et variantes (déviation de Grantham).

Les résultats sont déterminés à partir de ces deux valeurs et sont répartis en sept classes : C0, C15, C25, C35, C45, C55, C65 [47].

- [C45-C65]: les classes qui affectent la fonction.
- [C35]: La classe intermédiaire.
- [C0-C25]: les classes qui n'affectent pas la fonction.

<p>Multiple sequence alignment in FASTA format:*</p> <pre>>sp P04637 P53_HUMAN - Homo sapiens (Human). SVP-SQKT-YQGSYGFR LGFL >sp P10360 P53_CHICKEN - Gallus gallus (Chicken). VVPSTEDYGGDFDFRVGFV</pre> <p>Please make sure that in your alignment '-' correspond to gaps and 'X' to unknown amino-acids because the results will be different.</p> <p>(click here for more details)</p>	<p>Select your file to upload: <input type="button" value="Choisir un fichier"/> Aucun fichier choisi</p> <p>OR</p> <p>Paste your alignment:</p> <pre>PYKISEGLPTPTKMTPRSRILVSI GESFG TSEKFQKINQ MVCNSDRVLKRS AEGSNPPKP LKCLRFDIEGSDEADGSKHLPGESKFQOK LAEMTSTRTRMQKQK MNDSDMTSNKEEK</pre> <p>OR</p> <p>Select one of our library alignments: (click here for more details)</p> <p>--Select the gene-- <input type="text"/></p> <p>-----Select the depth----- <input type="text"/></p>
<p>Substitutions list:*</p> <pre>S96T S96P S96A</pre> <p>(click here for more details)</p>	<p>Select your file to upload: <input type="button" value="Choisir un fichier"/> Aucun fichier choisi</p> <p>OR</p> <p>Paste your list of substitutions:</p> <pre>A635P</pre>
<p>E-mail (optional): <input type="text"/></p>	

Figure 9: In put data dans le logiciel Aligner-GVGD

2.1.4 Project HOPE

Est un serveur Web (<http://www.cmbi.ru.nl/hope/>) facile à utiliser qui analyse les effets structurels de votre mutation d'intérêt. Le serveur vous permet de soumettre une séquence protéique et la mutation. Le projet HOPE collectera et combinera ensuite les informations disponibles à partir d'une série de serveurs Web et de bases de données et produira un rapport de mutation complet avec des résultats, des chiffres et des animations.

Cet outil recueille l'information à partir d'un large éventail de bases de données. La base de données UniProt (<http://www.uniprot.org/>) est utilisée pour l'extraction de caractéristiques telles que l'emplacement de sites actifs, les domaines transmembranaires, la structure secondaire et les données expérimentales.

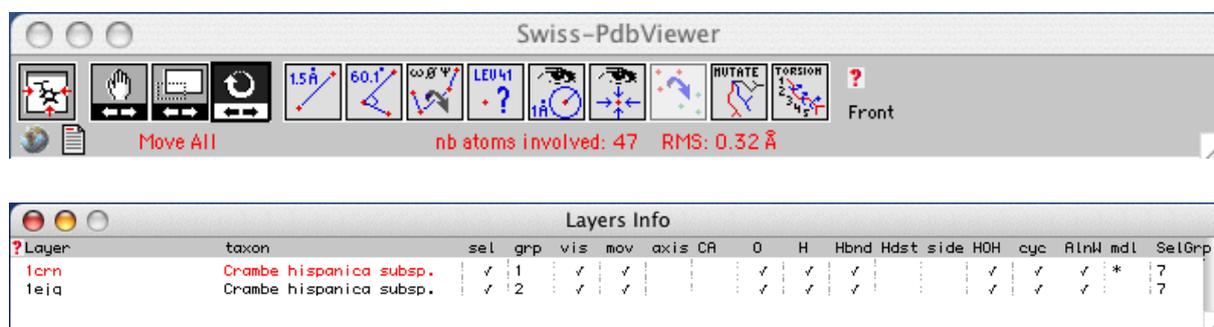
2.1.5 Logiciel Swiss-PdbViewer

Des mutations faux-sens ont été réalisées sur la structure aux rayons X décrite par PDB, .ID : 4ELJ [48] en utilisant le logiciel Swiss PDB Viewer ; Institut suisse de bio-informatique, Bâle, Suisse (<http://www.expasy.org/spdbv/>). Les résidus d'acides aminés dans la protéine native et mutante ont été réalisés par SWISS PDB viewer pour obtenir des structures modélisées [49].

Le logiciel Swiss-Pdb Viewer facilite l'analyse des interactions d'une protéine, l'analyse séquence-protéine-fonction et la comparaison entre les structures de protéines homologues.

Il permet d'effectuer plusieurs représentations comme : la substitution d'aa, la rotation d'une molécule dans l'espace, la mise en évidence de certaines liaisons, le calcul de la distance entre deux résidus, l'affichage en ruban, en bâtonnets et en boules.

L'espace de travail est divisé en plusieurs fenêtres

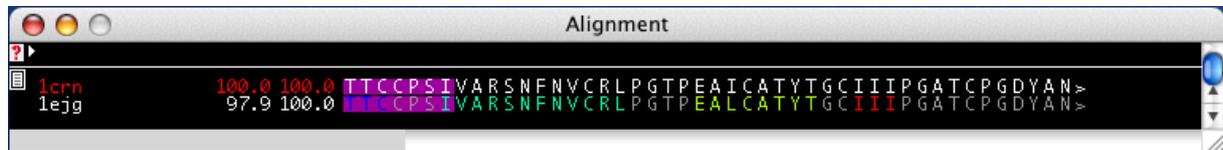


En haut, il y a la fenêtre de la barre d'outils, qui regroupe les outils de centrage et de mesure fréquemment utilisés, et également où le logiciel fournit des informations instantanées utiles sur les atomes.

La fenêtre suivante affiche des informations sur chaque couche (structures) chargée dans l'espace de travail et permet de modifier leurs préférences d'affichage individuelles.

Au milieu, il y a la fenêtre principale, où vous pouvez manipuler vos molécules en temps réel, mesurer les distances et les angles, faire des mutations et comparer des structures.

En bas de votre écran se trouve une fenêtre qui montre l'alignement de vos protéines, donne des informations de retour et permet d'enfiler une séquence sur une référence afin de soumettre une demande de modélisation d'homologie à Swiss-Model.



2.2 Analyse in silico des mutations affectant les régions introniques

L'influence des mutations introniques sur l'efficacité d'épissage a été prédite en utilisant les logiciels Human Splicing Finder Version 2.4.1 (HSF), (<http://www.umd.be/HSF/>) et Exonic Splicing Enhancer-finder (ESE Finder), (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE/>).

Le logiciel HSF permet de prédire les effets des mutations sur les signaux d'épissage [50]. En effet, ce logiciel permet en une seule requête d'évaluer l'impact potentiel des mutations sur les sites donneurs et accepteurs d'épissage ainsi de prédire les différents sites cryptiques d'une séquence donnée.

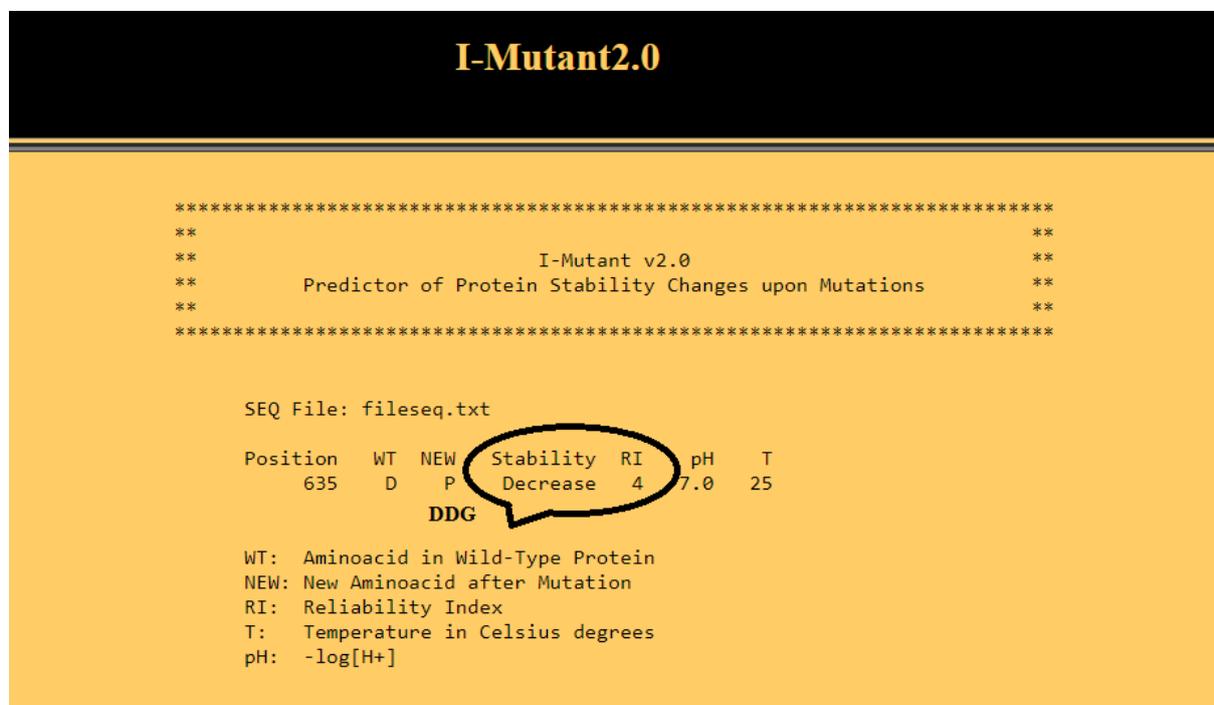
Le logiciel ESE Finder facilite l'analyse rapide des séquences régulatrices activatrices d'épissage (ESE) [51]. Ces séquences représentent les sites de fixation de plusieurs protéines riches en sérine impliquées dans le processus.

RESULTATS ET DISCUSSION

1 Analyse de la mutation exonique c.1903 G>C (p.Ala635Pro)

1.1 Résultat obtenu par le logiciel I-Mutant 2.0

L'analyse des effets de la mutation faux-sens c.1903 G>C sur la stabilité de la protéine pRb a été prédite par le logiciel I-Mutant 2.0. Le résultat obtenu par ce logiciel est représenté sur la figure10.



```

I-Mutant2.0

*****
**                                     **
**                               I-Mutant v2.0                               **
**       Predictor of Protein Stability Changes upon Mutations       **
**                                     **
*****

SEQ File: fileseq.txt

Position  WT  NEW  Stability  RI  pH  T
        635  D   P   Decrease  4  7.0  25
          DDG

WT: Aminoacid in Wild-Type Protein
NEW: New Aminoacid after Mutation
RI: Reliability Index
T: Temperature in Celsius degrees
pH: -log[H+]
    
```

Figure10:Résultat obtenu par le logiciel I-Mutant 2.0 pour la mutation c.1903G>C (p.Ala635pro).

Le logiciel I-Mutant 2.0 a permis de calculer la différence d'énergie (DDG) entre la protéine normale et mutée. La valeur DDG calculée pour cette mutation est négative, la mutation testée est considérée comme déstabilisante pour la structure de la protéine pRb.

1.2 Résultats obtenus par le logiciel Polyphen-2

La prédiction de l'impact de la mutation c.1903G>C(p.Ala635Pro) sur la protéine pRb par le logiciel PolyPhen-2 nous a permis d'avoir le résultat présenté sur la figure 11.

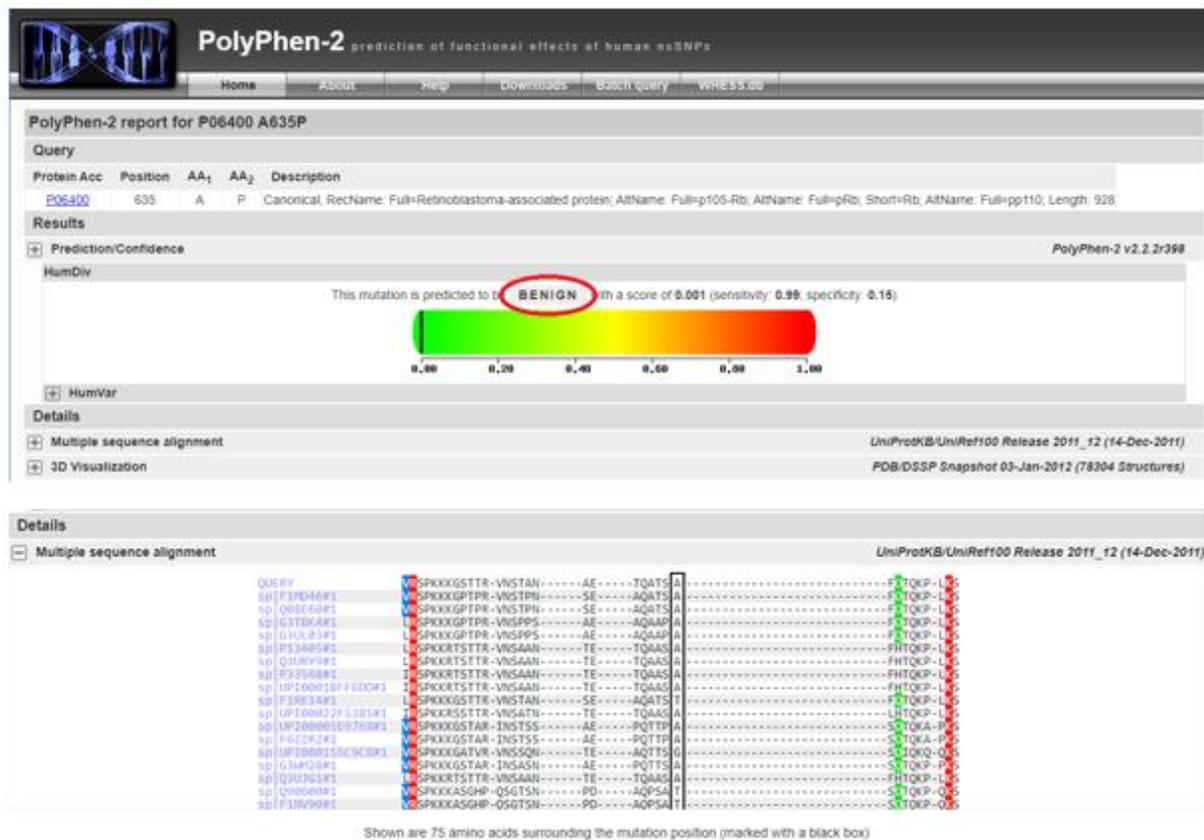


Figure11:Résultat obtenu par le logiciel PolyPhen-2 pour la mutation c.1903G>C (p.Ala635pro).

La mutation c.1903G>C a été prédite par le logiciel PolyPhen-2 comme bénigne (benign). Cela signifie que cette dernière n'a pas d'effet sur la structure et la fonction protéique. Ce logiciel a permis également d'obtenir le résultat d'alignement multiple par comparaison de la protéine pRb avec toutes les espèces enregistrées sur UniProKB, ce qui nous a permis de confirmer que la mutation ne siège pas dans une région conservée entre plusieurs espèces.

1.3 Résultat obtenu par le logiciel Align-GVGD

Le logiciel Align GVGD a également été utilisé afin de prédire les effets de la mutation c.1903G>C sur la protéine pRb. Le résultat obtenu par ce logiciel est présenté sur la figure12.

```
The following classifiers, ordered from most likely to interfere with fonction
least likely, were used:
GD>=65+Tan(10)x(GV^2.5) => Class C65 <=> most likely
GD>=55+Tan(10)x(GV^2.0) => Class C55
GD>=45+Tan(15)x(GV^1.7) => Class C45
GD>=35+Tan(50)x(GV^1.1) => Class C35
GD>=25+Tan(55)x(GV^0.95) => Class C25
GD>=15+Tan(75)x(GV^0.6) => Class C15
Else (GD<15+Tan(75)x(GV^0.6)) => Class C0 <=> less likely
```

Substitution	GV	GD	Prediction
A635P	215.31	0.00	Class C0

Figure12:Résultat obtenu par Align GVGD pour la mutation c.1903G>C.

Ce logiciel a permis de prédire que cette dernière correspond à la classe C0. La mutation c.1903G>C est prédite comme n'affectant pas la fonction du pRb.

1.4 Résultat obtenu par Project HOPE

La figure montre les structures schématiques de l'aa sauvage (à gauche) et le muté (à droite). La partie commune (squelette) entre les deux aa est de couleur rouge. Tandis que la chaîne latérale qui est unique pour chaque résidu est de couleur noire. Ces deux aa présentent des propriétés physico-chimiques particulières en raison de la nature de leurs chaînes latérales.

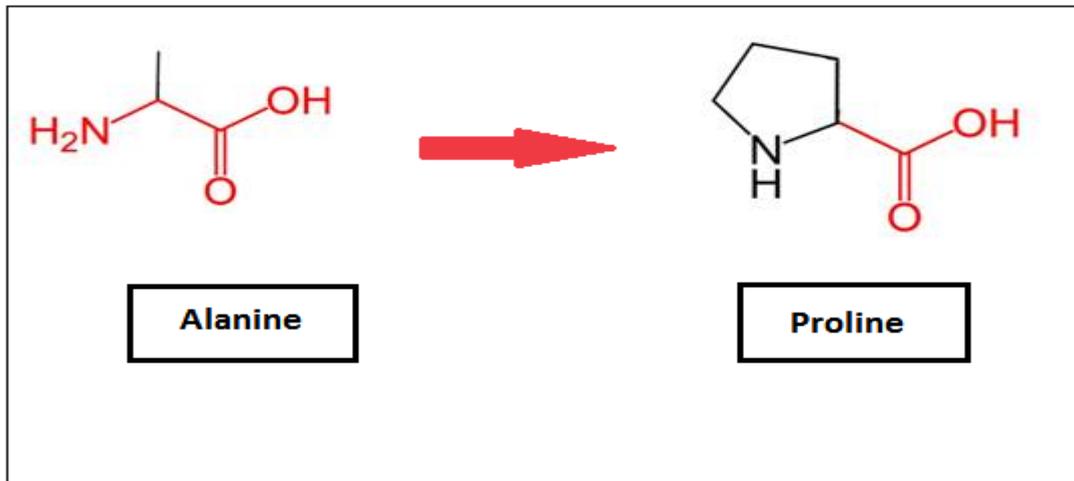


Figure13: Les structures schématiques de l'Alanine et la Proline.

Tableau2: Les propriétés physicochimiques des deux aa Alanine et proline.

Résidu	Type	Taille	Hydrophobicité	Charge
Alanine	Acide	89 Da	1.8	Neutre
Proline	Neutre	115 Da	-1.6	Neutre

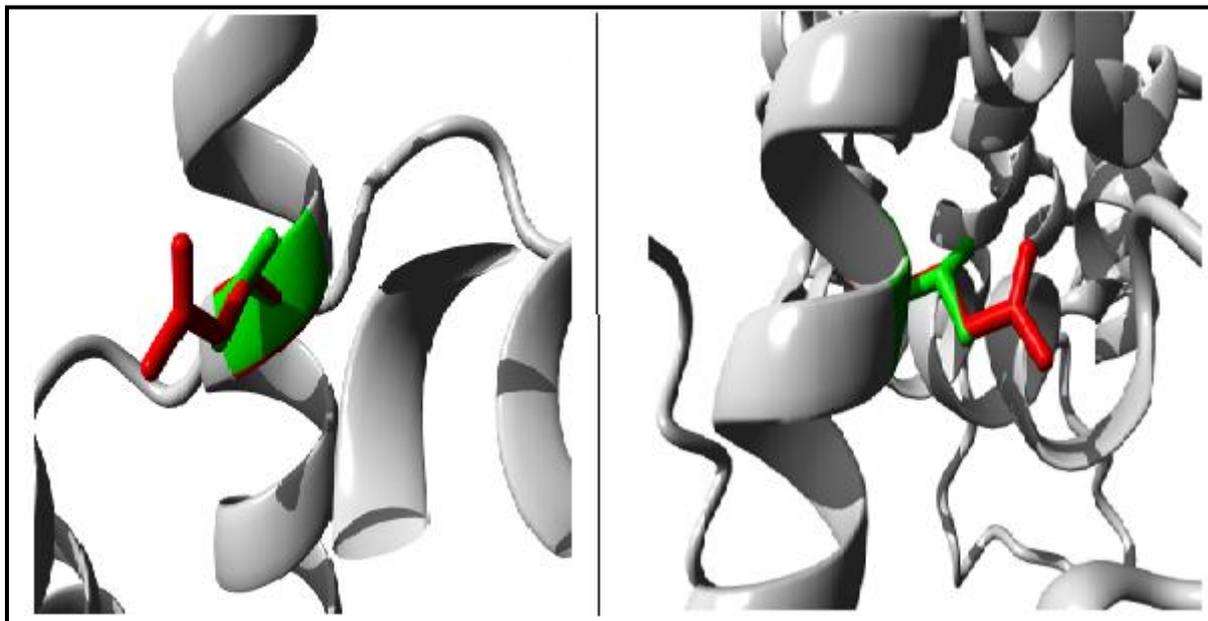


Figure14: Capture superposée des deux structures 3D de la protéine pRb sauvage et mutée.

1.5 Discussion de la mutation exonique c.1903 G>C (p.Ala635Pro)

Le caractère pathogène de la mutation faux sens c.1903G>C a été évalué par différents logiciels de prédiction *in silico*. Ainsi, Les effets délétères de cette mutation sur la stabilité ont été évalués par I-mutant 2.0. Tandis que les effets de cette dernière sur la fonction protéique ont été prédits par quatre logiciels différents (Polyphen, Align GVGD et Project HOPE).

Cette mutation a été prédite comme étant tolérée, bénigne et classée comme polymorphisme à l'aide des logiciels de prédiction, Polyphen2 et I Mutant2.0. L'analyse avec Align GVGD montre que cette mutation était considérée comme « interférer moins probablement avec la fonction ». Cependant, l'effet de substitution de l'acide aminé alanine par la proline a clairement montré l'augmentation de la taille et une diminution de l'hydrophobie de l'acide aminé muté. Cette différence peut avoir un impact sur la structure et non pas la fonction de pRb. La mutation faux-sens c.1903 G>C, (p.Ala635Pro) a été considérée comme un polymorphisme sans aucun impact sur la fonction protéique.

2 Analyse de la mutation exonique c. 1961 T>A (p.Val654Gln)

2.1 Résultat obtenu par le logiciel I-Mutant 2.0

L'analyse des effets de la mutation faux-sens c.1961 T>A sur la stabilité de la protéine pRb a été prédite par le logiciel I-Mutant 2.0. Le résultat obtenu par ce logiciel est représenté sur la figure15.

```

I-Mutant2.0

*****
**                                     **
**                               I-Mutant v2.0                               **
**       Predictor of Protein Stability Changes upon Mutations       **
**                                     **
*****

SEQ File: fileseq.txt

Position  WT  NEW  Stability  RI  pH  T
         654  A   Q   Decrease  8  7.0  25
          DDG

WT: Aminoacid in Wild-Type Protein
NEW: New Aminoacid after Mutation
RI: Reliability Index
T: Temperature in Celsius degrees
pH: -log[H+]
    
```

Figure15: Résultat obtenu par le logiciel I-Mutant 2.0 pour la mutation c. 1961 T>A (p.Val654Gln).

2.2 Résultats obtenus par le logiciel Polyphen-2

La prédiction de l'impact de la mutation c. 1961 T>A (p.Val654Gln) sur la protéine pRb par le logiciel PolyPhen-2 nous a permis d'avoir le résultat présenté sur la figure16.

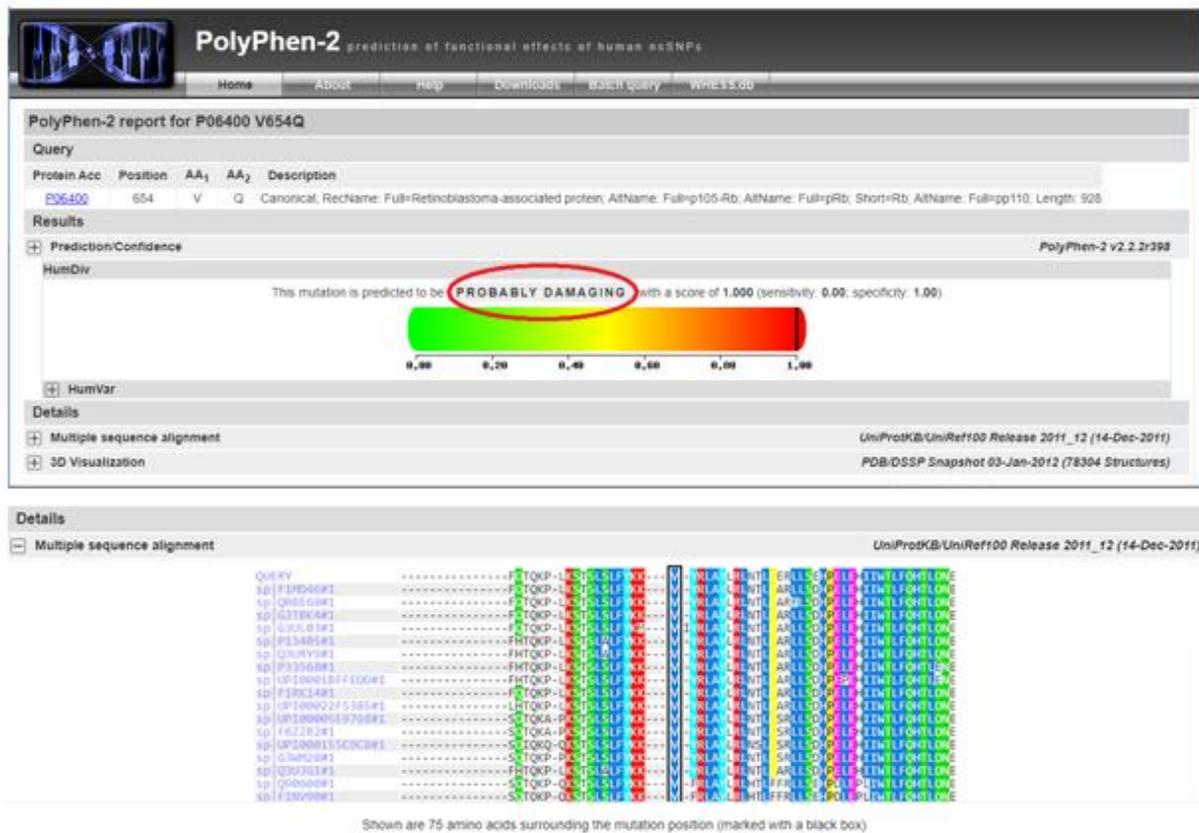


figure16: Résultat obtenu par le logiciel PolyPhen-2 pour la mutation c. 1961 T>A (p.Val654Gln).

2.3 Résultat obtenu par le logiciel Aligne-GVGD

Le logiciel Align GVGD a également été utilisé afin de prédire les effets de la mutation c.1961T>A sur la protéine pRb. Le résultat obtenu par ce logiciel est présenté sur la figure17.

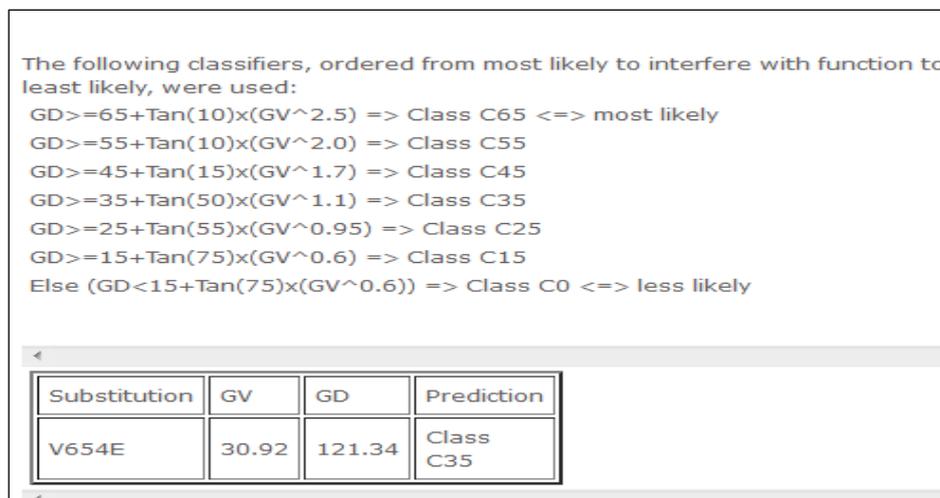


Figure17: Résultat obtenu par Align GVGD pour la mutation c.1961T>A.

Le résultat de l'analyse par le logiciel Align GVGD a prédit que c.1961T>A (p.Val654Gln) correspond à la classe C35. La classe C35 peut interférer avec la fonction de pRb. Pour la mutation c.1903 G>C (p.Ala635Pro) ce qui signifie que le site de substitution est situé dans une région non conservée entre les espèces analysées. Pour la mutation c.1961T>A (p.Val654Gln), la valeur GV est de 30,92, alors que la valeur de variation de (GD) sont de 121,34 cela signifie que la mutation est située dans la région conservée et le remplacement de la valine par une glutamine est prédit comme un changement.

2.4 Résultat obtenu par Project HOPE

La figure montre les structures schématiques de l'aa sauvage (à gauche) et le muté (à droite). La partie commune (squelette) entre les deux aa est de couleur rouge. Tandis que la chaîne latérale qui est unique pour chaque résidu est de couleur noire. Ces deux aa présentent des propriétés physico-chimiques particulières en raison de la nature de leurs chaînes latérales.

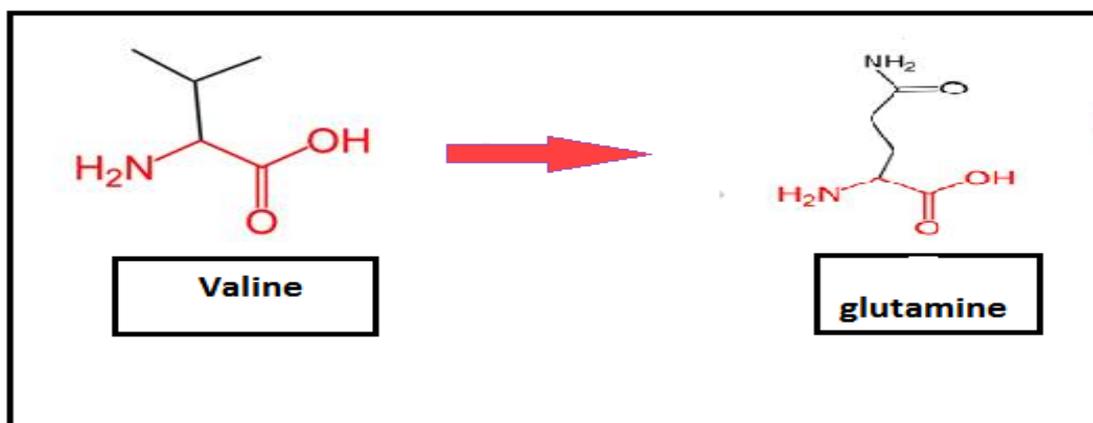


Figure18 : Les structures schématiques de la valine et la glutamine.

Tableau3: Les propriétés physicochimiques des deux aa valine et glutamine.

Résidu	Type	Taille	Hydrophobicité	Charge
valine	Neutre	117 Da	4.2	Positive
glutamine	Neutre	146 Da	-3.5	Neutre

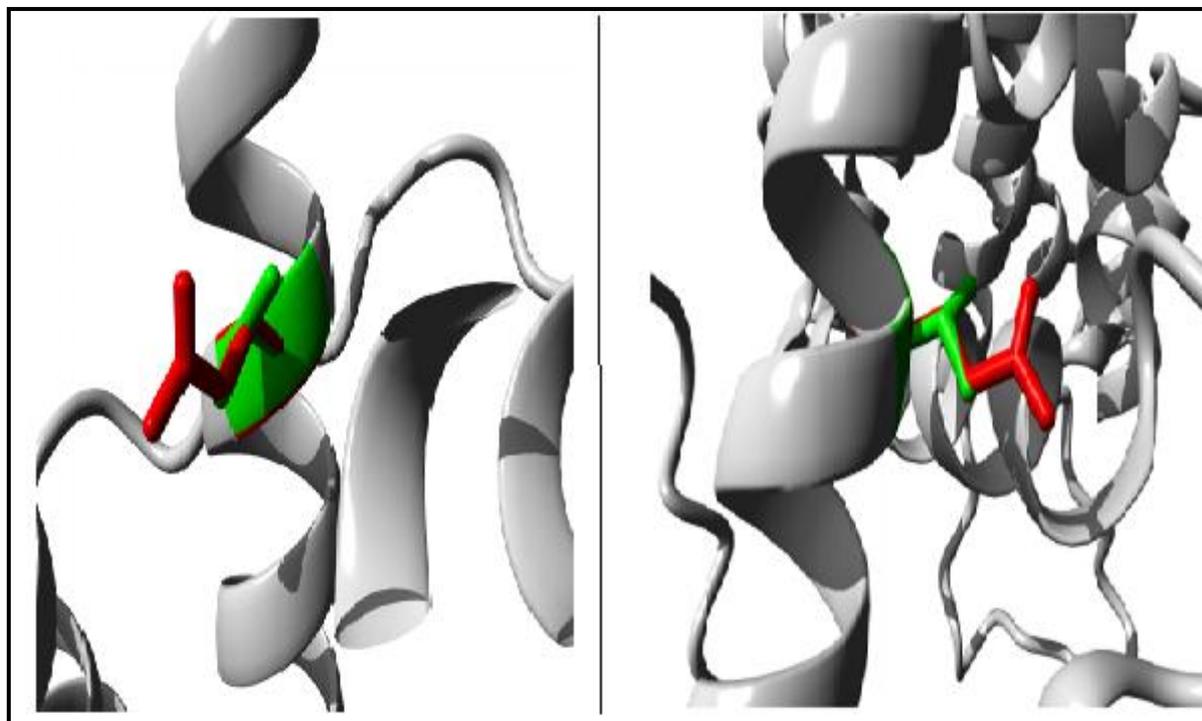


Figure 19: Capture superposée des deux structures 3D de la protéine pRb sauvage et mutée.

2.5 Résultat obtenu par le logiciel swiss Pdb viewer

Un des critères essentiels dans la détermination de la conséquence d'une nouvelle mutation est sa localisation dans la structure 3D. La localisation d'un résidu substitué au niveau de la protéine pRb est représentée sur la figure 20. La substitution de La valine en position 654 en glutamine se trouve au niveau du domaine B (figure 20).

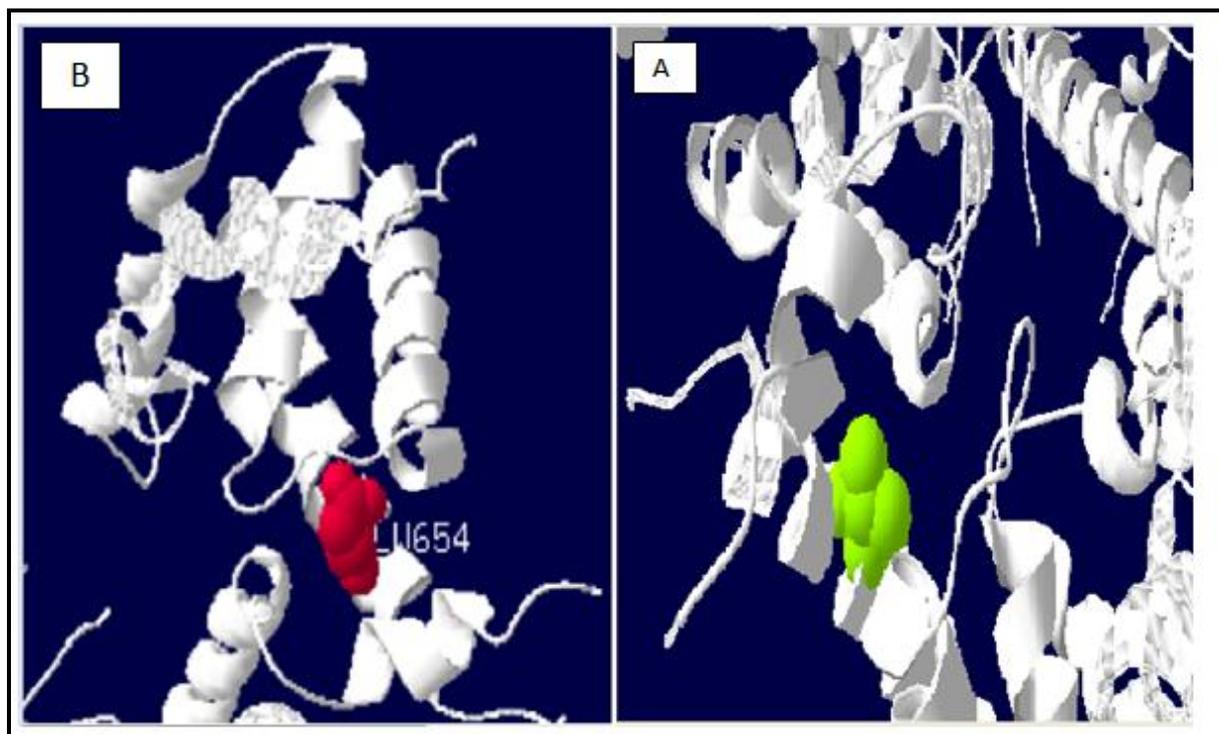


Figure 20: Structures 3D des deux protéines pRB normale (A) et mutée (B).

La modélisation de la protéine pRb ainsi que la comparaison de la protéine native et mutée par le logiciel Swiss pdb Viewer a permis d'obtenir les résultats suivants :

1. Une exposition différente des deux acides aminés. Cela peut-être du à leurs différences structurales qui font que chacun à une position bien spécifique.
2. La valine au niveau de la protéine native interagit avec quatre aa (phénylalanine 650; tyrosine 651; lysine 653; tyrosine 655) (figure 21.1). Par contre, l'aa glutamine interagit en plus de ces quatre aa avec l'aa méthionine en position 558 (Figure 21.2). Cette nouvelle interaction avec une liaison hydrogène pourrait entraîner un changement au niveau de la conformation de la protéine qui aura un impact sur sa structure ainsi que sa fonction.

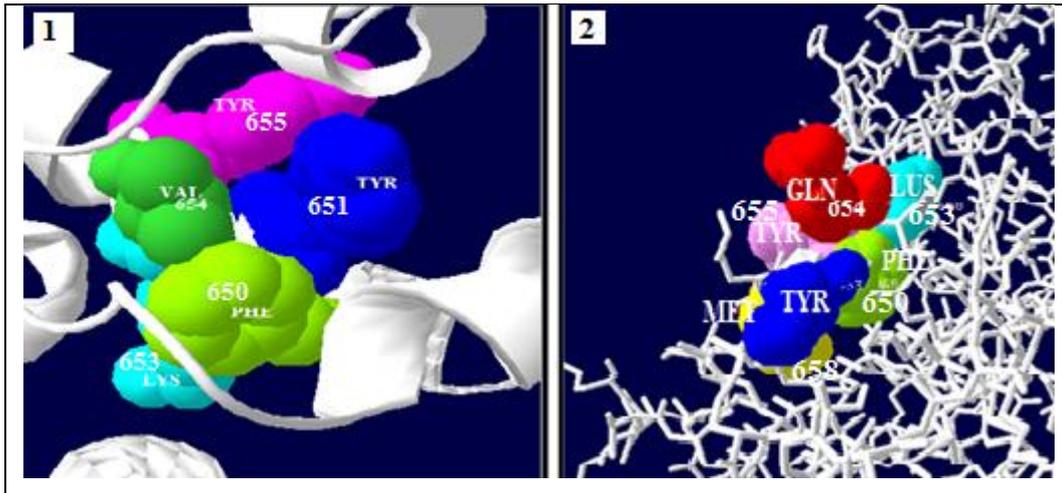


Figure 21 : Représentation des interactions de l'aa valine 654 avec les quatre aa au niveau de la protéine native et l'aa glutamine 654 avec les quatre aa au niveau de protéine mutée.

La superposition des deux aa native et mutée a été réalisée par le logiciel Swiss pdb Viewer (Figure 22). Ce résultat montre clairement la différence de la taille ce qui pourrait confirmer l'apparition de la nouvelle liaison hydrogène au niveau de la protéine mutée.

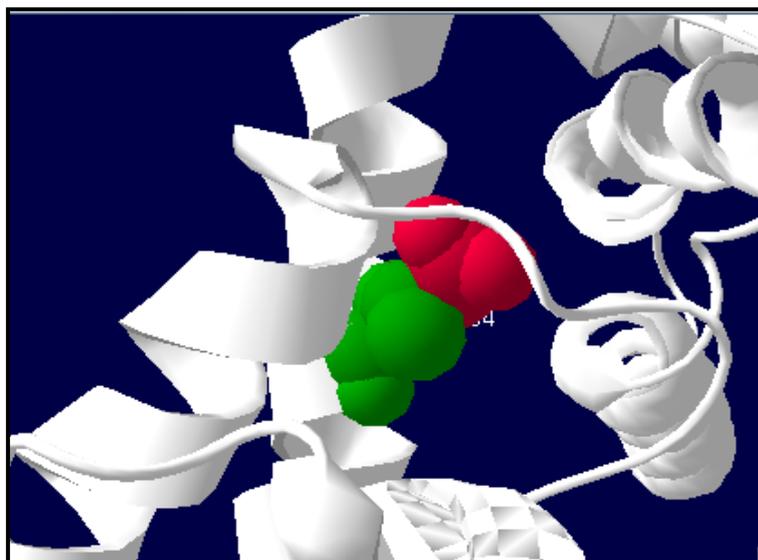


Figure 22 : Capture superposée des deux structures 3D de la protéine pRb sauvage représenté en vert et mutée en rouge.

2.6 Discussion de la mutation exonique. 1961 T>A (p.Val654Gln)

Les résultats obtenus par le logiciel I-Mutant 2.0 sont en faveur d'un effet déstabilisant de la mutation c.1961T>A sur la protéine pRb. De même, les logiciels (Polyphen2, Align GVGD) ont prédit des effets délétères de cette mutation sur la fonction de la protéine pRb. En effet, cette mutation siège dans une région conservée entre plusieurs espèces. Elle est considérée comme délétère et responsable de l'apparition du rétinoblastome. Cette dernière a un impact sur la fonction protéique car elle se trouve dans une région importante de la protéine pRb plus exactement au niveau du domaine B de la poche A/B. Elle possède un domaine de liaison à l'ADN de Zipper leucine codé par l'exon 20.

Les informations concernant la structure 3D et les propriétés physico-chimiques des aa suite à une mutation faux-sens ont été prédit par les logiciels Project HOPE. Concernant la taille, le résidu muté est plus grand (146 Da) que le résidu sauvage (117Da). Les valeurs d'hydrophobicités diffèrent également, le résidu muté est moins hydrophobe que le sauvage ce qui entraînerait une perte d'interaction. En effet, cette mutation est responsable de la perte des interactions hydrophobes dans le noyau de la protéine. Ces différences peuvent engendrer un changement de conformation de la protéine ce qui pourrait perturber la fonction de la protéine pRb. De plus la glutamine introduite par cette mutation est un résidu très rigide ce qui pourrait abolir la flexibilité requise de la protéine à cette position.

La modélisation de la protéine mutée par le logiciel Swiss pdb Viewer a permis l'identification d'une nouvelle liaison hydrogène au niveau de la protéine mutée contenant le substitue glutamine. Ce résultat peut entraîner un changement de conformation de la protéine. Ce qui provoquait l'inhibition de l'interaction entre cette protéine et le facteur de transcription E2F. Ce qui aura comme effet une prolifération incontrôlable des rétinoblastes et par conséquent le développement du rétinoblastome chez le patient présentant cette dernière.

3 Analyse de la mutation intronique c.1215+1 G>A

3.1 Résultat obtenu par le logiciel HSF

Le résultat de l'analyse de la mutation c.1215+1 G>A par le logiciel HSF est représenté sur la figure 23 et le tableau 4. Par comparaison entre la séquence normale et mutée du gène RB1, HSF a prédit l'abolition du site donneur d'épissage.



Figure 23 : Résultat de l'analyse de la mutation c.1215+1 G>A par HSF.

Sequence Position	cDNA Position	Splice site type	Motif	New splice site	Wild Type	Mutant	If cryptic site use, exon length variation	Variation (%)
113	c.1209	Acceptor	TTTTAACgtaagcc	ttttaacataagCC	76.14	76.21	NA	+0.09
117	c.1213	Donor	AACgtaagc	AACataagc	85.86	59.02	0	WT site broken -31.26

Tableau 4: Résultat de l'analyse de la mutation c.1215+1 G>A par HSF.

3.2 Résultat obtenu par le logiciel ESE Finder

L'analyse de la mutation c.1215 + 1G>A par le logiciel ESE Finder est montrée sur la Figure 24. La comparaison entre la séquence normale et mutée du gène RB1 par ESE Finder a prédit l'abolition du site de fixation des deux protéines SR.



Figure 24 : Distribution des protéines SR dans la séquence de référence du gène RB1 et la séquence mutée (c.1215 + 1G>A).

3.3 Discussion de la mutation intronique c.1215+1 G>A

L'impact de la mutation c.1215+1G>C sur l'épissage a été prédit à l'aide de deux logiciels de prédiction in silico HSF et ESE Finder.

Comme on le sait, l'épissage est le processus complexe avec lequel est produit un ARNm mature à partir du pré-ARNm. Cela nécessite l'épissage des sites donneur et accepteur [52]. L'épissage est catalysé par le « spliceosome », qui est constitué de nombreuses protéines [53]. Parmi celles-ci, on peut citer le facteur d'épissage se liant aux séquences familiales cis régulatrices : les protéines riches en acides aminés sérine et arginine, appelées protéines SR (riche en sérine) qui sont constituées de 50 à 300 résidus d'acides aminés. Il existe 9 types de protéines SR [54]. Cette protéine se lie aux séquences activatrices (SA) qui se situe dans les

exons et qui sont appelées « exonsplicing activateurs ». Ces protéines favorisent la reconnaissance des sites d'épissage et facilitent le recrutement des snRNP U1 et U2 (petites ribonucléoprotéines nucléaires) permettant par d'autres protéines l'élimination de l'intron et la ligature de l'exon [55].

L'analyse de la mutation c.1215+1G>C par HSF a prédit l'abolition du site donneur d'épissage. ESE finder prédit également que cette mutation est responsable de la suppression des sites de liaison des deux protéines SR.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans cette étude, nous avons contribué à la compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine du déficit de la protéine pRb. Ainsi, les effets délétères, des nouvelles mutations identifiées ont été évalués par plusieurs logiciels d'étude *in silico* et de modélisation moléculaire en 3D. Ces mutations correspondent à une mutation au niveau d'un site d'épissage de l'intron 12 (c.1215+1G>A) et deux mutations faux sens l'une au niveau de l'exon 19 (c.1903G>C) et l'autre au niveau de l'exon 20 (c.1961T>A).

La mutation c.1215+1G>A a été prédite comme responsable d'un saut de l'exon 12 qui se traduit par une protéine non fonctionnelle. D'autre part, la mutation c.1903G>C est considérée comme un polymorphisme sans aucun impact sur la fonction protéique. Tandis que la mutation c.1961T>A siège au niveau du domaine B qui est nécessaire à la protéine pRB pour inhiber le facteur de transcription E2F. Ces mutations peuvent entraîner un changement de conformation de la protéine pRb qui aura un impact sur sa fonction. Une étude fonctionnelle de la protéine reste nécessaire afin de déterminer l'impact de ces mutations.

Cette étude a permis de démontrer l'efficacité de l'utilisation associée de plusieurs outils prédictifs afin d'évaluer les effets délétères des nouvelles mutations. Ce protocole pourra être utilisé pour la prédiction des effets délétères des mutations responsables de plusieurs maladies génétiques.

Dans le rétinoblastome comme dans la plupart des cancers, la compréhension des mécanismes moléculaires associés aux différents dysfonctionnements de la protéine pRb est essentielle pour le diagnostic, le pronostic et au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Les études *in silico* permettent d'évaluer les effets des mutations sur la structure et la fonction de la protéine. Il est toutefois intéressant de réaliser des études fonctionnelles afin de confirmer ces résultats.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUE

- [1] : Bergerat J (1996) *Onco-hématologie*: Heures de France.
- [2] : Castéra L (2003). Etude des relations génotype/phénotype dans le rétinoblastome. Thèse pour l'obtention de grade de Docteur de l'université Paris Descartes Discipline Génétique présentée et soutenue le 22.11.2012 Version 1-25.
- [3] : Boubekour A, Louhibi L, Mahmoudi K, Boudjema A, Mehtar N (2012) [Molecular study of retinoblastoma in the Algerian population. Screening of Rb gene in constitutional and tumoral level]. *Bull Cancer***99**: 127-135
- [4] : Abramson DH, Scheffer AC (2004) Transpupillary Thermotherapy as Initial Treatment for Small Intraocular Retinoblastoma Technique and predictors of success *Ophthalmology*; 111: 984-991.
- [5]: Aerts I, Lumbroso-Le Rouic L, Gauthier-Villars M, Brisse H, Doz F, Desjardins L (2006). Retinoblastoma Orphanet. *Journal of Rare Diseases*, Page 1-11 1:31.
- [6]: Albert DM (1987), Historic review of retinoblastoma - *Ophthalmology* - June 1; 94(6); 654-62.
- [7]: Murphee AL (2005). Intraocular retinoblastoma: the case for a new group Classification. In *Ophthalmology clinics of North America*. Vol 18. Philadelphia: Elsevier Saunders; 41-53.
- [8]: Chial H (2008) Tumorsuppressor (TS) genes and the two-hit hypothesis *Nature education*
- [9] : Ducasse A, Arndt C(2011). Anatomie chirurgicale de la rétine et du vitré. Décollement de rétine. Société Française d'ophtalmologie. Rapport; Chapitre 2 : Pages 8 -13.
- [10] : Doz F(2006). Retinoblastoma: areview. *ArchPediatr*, Oct; 13 (10): 1329-37.
- [11] : Zografos L(2002). Tumeurs intraoculaires. Le rétinoblastome; Chapitre V, VI. Diagnostic, génétique, pathologie. Société française d'ophtalmologie et Masson, Paris .Pages 466-535.
- [12]: Stannard C, Sealy R, Hering E (2002). Postenucleation orbits in retinoblastoma: treatment with 125I brachytherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys***54**: 1446–1454

- [13]: Moll AC, Imhof SM, Kuik DJ et al (1996). High parental age is associated with sporadic hereditary retinoblastoma: the Dutch retinoblastoma register 1862–1994. *Hum Genet* 98:109–112.
- [14]: Godbout R, Dryja TP, Squire J, Gallie BL, Phillips RA (1983). Somatic inactivation of genes on chromosome 13 is a common event in retinoblastoma. . *Nature***304**: 451-453.
- [15]: lumieux (1989) C.L. Precise cytogenetic localisation of the RB locus at suddand 13q14.11by untrastructural detection after immunochemical chromosome binding *Am J Hum Gent***45(suppl)**.
- [16] : Zielinski B, Gratian S, Toedt G, Mendrzyk F, Stange DE, Radlwimmer B, Lohmann DR, Lichter P (2005) Detection of imbalances in retinoblastoma by matrix-based comparative genomique hybridization. *Chromosomes & cancer***43**:1045-1049.
- [17] :Munier E, Pescia G, Jotterand-Bellomo M, Balmer A, Gailloud C, Thonney F (1989) constitutional karyotype in retinoblastoma. Case report and review of literature. *Ophthalmic Paediatr Centre***33**: 129-149.
- [18] :Ejima Y, Sasaki MS, Kaneko A, Tanooka H (1988). Types, rates, origin and expressivity of chromosome mutations involving 13q14 in retinoblastoma patients. . *Hum Genet***79**: 118-123.
- [19]: Fearon, J. D. Forthcoming. Selection effects and deterrence. In *Deterrence debates*, edited by K. Oye .Ann Arbor: University of Michigan Press.
- [20]: Knudson, A. G., Jr. (1971). "Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma." *Proc Natl Acad Sci U S A***68** (4): 820-823.
- [21]: Dryja TP, Mukai S, Petersen R, Walton D, Yandell DW. Parental origin of mutations of the Retinoblastoma gene. *Nature* 1989; 339: 556-8.
- [22]: Murphree L, Triche TJ (2012): An epigenomic mechanism in retinoblastoma: the end of the story. *Genome Medicine*, 4:14.
- [23]: Lohmann DR, Gallie B, Dommering C and Gauthier-Villars M (2011). Clinical utility gene card for: Retinoblastoma. *European Journal of Human Genetics* 19.[24]: Dommering CJ, Mol BM, Moll AC et al. RB1 mutation spectrum in a comprehensive nationwide cohort of retinoblastoma patients. *J Med Genet*.2014 jun; 51 (6): 366-74.

- [25]: Tavgigian SV, Byrnes GB, Goldgar DE, Thomas A (2008). Classification of rare missense substitutions, using risk surfaces, with genetic- and molecular-epidemiology applications. *Hum Mutat***29**: 1342-1354
- [26]: Lohmann D (1999) RB1 (rétinoblastome). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol***3**: 137-138
- [27] : Blanquet V, Turleau C, Gross-Morand MS, Senamaud-Beaufort C, Doz F, Besmond C (1995). Spectrum of germline mutations in the RB1 gene: a study of 232 patients with hereditary and non hereditary retinoblastoma. *Hum Mol Genet***4**: 383-388.
- [28] : Hong FD, Huang HJ, To H, Young LJ, Oro A, Bookstein R, Lee EY, Lee WH (1989). Structure of the human retinoblastoma gene. *Proc Natl Acad Sci U S A***86**: 5502-5506.
- [29] :Abouzeid H, Munier F.L, Thonney F, Schorderet D.F (2007) Tennifer RB1 gene mutations in patients with retinoblastoma. *Molecular vision*. 2007; 13:17405; PMID 17960112 [archive].
- [30]: Lee JO, Russo AA, Pavletich NP 1998. Structure du domaine de poche suppresseur de tumeur rétinoblastome lié à un peptide du HPV E7. *Nature* 391: 859-865 [PubMed] [Google Scholar].
- [31]: Burke JR, Hura GL, Rubin SM (2012) Structures of inactive retinoblastoma protein reveal multiple mechanisms for cell cycle control. *Genes & Development***26**: 1156-1166.
- [32] : (<https://planet-vie.ens.fr/thematiques/cellules-et-molecules/cycle-cellulaire/la-regulation-du-cycle-cellulaire>).
- [33] : Rowland BD, Bernards R (2006). Re-evaluating cell-cycle regulation by E2Fs. *Cell*: cell.2006.2011.20192127:2871-2004.
- [34] : Du, W. and J. S. Searle (2009). "The rb pathway and cancer therapeutics." *Curr Drug Targets* **10**(7): 581-589.
- [35]: Laurie, N. A., S. L. Donovan, C. S. Shih, J. Zhang, et al. (2006). "Inactivation of the p53 pathway in retinoblastoma." *Nature* **444**(7115): 61-66.
- [36] : Brooks, C. L., M. Li and W. Gu (2007). "Mechanistic studies of MDM2-mediated ubiquitination in p53 regulation." *J Biol Chem***282**(31): 22804-22815.

[37] : Castéra L (2003). Etude des relations génotype/phénotype dans le rétinoblastome. Thèse pour l'obtention de grade de Docteur de l'université Paris Descartes Discipline Génétique présenté et soutenu le 22.11.2012 Version 1-25.

[38] : Luscombe NM, Greenbaum D, Gerstein M (2001) What is bioinformatics? A proposed definition and overview of the field. *Methods of information in medicine* 40: 346-358

[39] : Capriotti, E., Fariselli, P., Casadio, R. (2004). A neural network-based method for predicting protein stability changes upon single point mutations *Bioinformatics* 20:16–168.

[40] : Kabsch W., Sander C (1983). Dictionnaire de la structure secondaire des protéines: modèle de caractéristiques géométriques et liées à l'hydrogène. *Biopolymères*; **22** : 2577-2637. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)].

[41] : Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR (2010). L'invention concerne un procédé et un serveur pour prédire des mutations faux-sens dommageables. *Méthodes Nat*; 7 :248-249. [[Article PMC gratuit](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)].

[42] : Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, Tabor HK, Emond MJ, Nickerson DA, Shendure J (2011). Séquençage de l'exome comme outil de découverte des gènes de la maladie mendélienne. *Nat Rev Genet*; 12 :745-755. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)].

[43] : Ashley EA, Butte AJ, Wheeler MT, Chen R, Klein TE, Dewey FE, Dudley JT, Ormond KE, Pavlovic A, Morgan AA, Pushkarev D, Neff NF, Hudgins L, Gong L, Hodges LM, Berlin DS, Thorn CF, Sangkuhl K, Hebert JM, Woon M, Sagreiya H, Whaley R, Knowles JW, Chou MF, Thakuria JV, Rosenbaum AM, Zaranek AW, Church GM, Greely HT, Quake SR (2010). Altman RB. Évaluation clinique intégrant un génome personnel. *Lancette*; 375 :1525-1535. [[Article PMC gratuit](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)].

[44] : Tennessen JA, Bigham AW, O'Connor TD, Fu W, Kenny EE, Gravel S, McGee S, Do R, Liu X, Jun G, Kang HM, Jordan D, Leal SM, Gabriel S, Rieder MJ, Abecasis G, Altshuler D, Nickerson DA, Boerwinkle E, Sunyaev S, Bustamante CD, Bamshad MJ, Akey JM, Broad GO, Seattle GO au nom du NHLBI Exome Sequencing Project. Évolution et impact fonctionnel de la variation de codage rare du séquençage profond des exomes humains. *La science*. 2012 ; 337 :64-69. [[Article PMC gratuit](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

- [45] : Attwooll C, Denchi EL and Helin K . (2004). *EMBO J.*, **23**, 4709–4716.
- [46] : Shamil, A., Zoubeydi, T., Thomas, R. A., et al (2001). A profile of patients with substance use disorders and treatment outcomes: a 10 year retrospective study from the National Rehabilitation Centre Abu Dhabi. *International Journal of Prevention and Treatment of Substance Use Disorders*, 1, 76–88).
- [47] : Tavtigian SV, Byrnes GB, Goldgar DE, Thomas A (2008). Classification of rare missense substitutions, using risk surfaces, with genetic- and molecular-epidemiology applications. *Hum Mutat* 29: 1342-54.
- [48] : Burke JR, Hura GL, Rubin SM (2012). Structures of inactive retinoblastoma protein reveal multiple mechanisms for cell cycle control. *Genes Dev* 26: 1156-66.
- [49] : Guex N, Peitsch MC (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18: 2714-23.
- [50]: Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Bérout G, Claustres M, et al. (2009). Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res* 37: 1.
- [51] : Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR (2003) ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res* 31:3568-3571.
- [52]: Houdayer C, Stoppa-Lyonnet D (2005) [Transcriptional abnormalities and genetic testing]. *Med Sci (Paris)* 21: 170-174.
- [53] : Corcos L, Solier S (2005) [Alternative mRNA splicing, pathology and molecular therapeutics]. *Med Sci (Paris)* 21: 253-260.
- [54] : Liu H-X, Zhang M, Krainer AR (1998) .Identification of functional exonic splicing enhancer motifs recognized by individual SR proteins. *Genes Dev* 12: 1998-2012.
- [55] : Nilsen TW (2003). The spliceosome: the most complex macromolecular machine in the cell? *Bioessays* 25: 1147-1149.