

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة مولاي طاهر, سعيدة

Université Dr Tahar Moulay – SAIDA



Faculté des Sciences

Département de Biologie

قسم بيولوجيا

Mémoire pour l'obtention du Diplôme de Master

Spécialité : biochimie Appliquée

Thème

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

Présentée par

✚ Mlle MAOUCHE hadjer

✚ Mlle KHELFAOUI ouiame

Président BOUKAABAN Faiza

Examineur AMMAM Abdelkader

Encadreur BERBER Naima

Année Universitaire 2022 /2023

## ***Dédicace***

*Je dédie cet humble travail a*

*A mon père Mohammed et ma mère Fatiha*

*Que je leur dédie le fruit de leur éducation et sacrifices,*

*Et que le dieu les prête une longue vie et santé pour qu'ils puissent*

*Partager avec moi les bons moments.*

*A Mes sœurs*

*Khawla, Fatna, Fatima et son mari Abdel Rezek*

*Mes frères Ibrahim et nadir*

*A Ma binôme Haider et mon amie Wassila*

*Et a tous mes amis*

*Toute la famille Khelfaoui et chraite.*

***Ouiame***



***Dédicace***

*Je dédier ce travail*

*Ma mère Djamila et mon père Ahmed*

*Aujourd'hui Je suis la merci de leur patience et leur encouragement,*

*Leur soutien moral car ils toujours cru en moi*

*A Mes sœurs*

*Marwa et Fatima et mon frère Abdel Rezek*

*A mon fiancé Ibrahim*

*A Ma binôme oiouame et toute la famille de Maouche, daib et*

*Bouchocha*

*Et à une spéciale dédicace pour encadreur **berbère Naima.***

**Hadjer**

## **Remercîment**

*Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.*

*Nos vifs remerciements vont aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail.*

*Nous remercions notre encadreur Mme. berbère Naima qui nous a permis de réaliser ce travail et nous avoir fait bénéficié de son expérience, de ses précieux conseils, pour son soutien et son encouragement vraiment merci.*

*Nos remerciements les plus respectueux vont à BOUKAABAN Faiza qui a bien voulu nous faire l'honneur de présider le jury. Veuillez trouver ici Madame le témoignage de notre reconnaissance et notre respect le plus profond.*

*Nous remercions également AMMAM Abdelkader pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant d'examiner ce travail et de siéger parmi cet honorable jury. Veuillez accepter ce travail, en preuve de notre grand respect et de toutes nos profondes reconnaissances.*

*Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à tous les professeurs qui nous ont enseigné et qui par leurs compétences nous ont soutenu dans la poursuite de nos études.*

## Résumé

Le rétinoblastome est une tumeur chez les enfants d'âge 3 à 5 ans, qui est positionnée dans la rétine. Le Gène **RB1** est un antioncogène de 200 kb, qui contrôle la division des cellules et qu'il peut stopper en cas d'anomalie susceptible de provoquer un rétinoblastome, qui est localisé dans le chromosome 13 précisément à l'allèle **q14.2**.

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.

## ملخص

الورم الارومي الشبكي هو ورم يصيب الأطفال الذين تتراوح أعمارهم بين 3 و 5 سنوات ويقع في شبكية العين الجين RB1 هو جين مضاد 200 كيلو بايت ،والذي يتحكم في انقسام الخلايا ويمكن ان يوقفه في حالة حدوث شذوذ يحتمل ان يسبب الورم الارومي الشبكي الذي يقع في الكروموزوم 13 على وجه التحديد عند الاليل q14,2.

كان الهدف من هذه الدراسة هو المساهمة في فهم الآليات الجزيئية في أصل 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 تنفيذ النمذجة الجزيئية للهياكل ثلاثية الأبعاد بواسطة برنامج Swiss Pdb Viewer.

التي تقع على مستوى intronic سمح لنا التحليل في السيليكو بتحديد التأثير الضار لثلاث طفرات ضارة: طفرة الثانية طفرة نوع الخطأ في مستوى 12. exon المسؤولة عن إلغاء موقع مانح لصق ، والذي سيؤدي إلى قفزة 12 intron ، وهي مسؤولة عن exon 20 إكسون 19 ، ومن المتوقع أن تكون تعدد الأشكال. تؤثر الطفرة الثالثة من نوع الخطأ على exon 20. ولها تأثير آخر على موقع لصق ، مما يتسبب في تغييره ، والذي سيولد قفزة pRB تغيير في تكوين بروتين

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 المفتاحية: الورم الشبكي الارومي ؛ الجين RB1 ؛ بروتين pRb ؛ هيكل ثلاثي الأبعاد.



## **Abstract**

Retinoblastoma is a tumor in children aged 3 to 5 years that is positioned in the retina, Gene **RB1** is a 200 kb antioncogene that controls cell division, and can stop in the event of an abnormality likely to cause retinoblastoma that localized in chromosome 13 precisely at allele **q14.2**.

The objective of this study was to contribute to the understanding of the molecular mechanisms at the origin of the pRb protein deficiency. Thus the deleterious effects of three mutations using an in silico study protocol consisting of different software (ESE Finder, HSF, I-Mutant 2.0, Polyphen-2, Align GVGD, Project HOPE) The molecular modeling of the 3D structures was carried out by the Swiss Pdb Viewer software.

The in silico analysis enabled us to determine the deleterious effect of three deleterious mutations: an intronic mutation which sits at the level of intron 12 which is responsible for the abolition of the splice donor site, which will cause the jump of exon 12. The second missense type mutation is at the level of exon 19, it is predicted to be a polymorphism. The third missense type mutation affects exon 20, it is responsible for a change in the conformation of the pRB protein and it has another effect on the splice site, causing its alteration, which will generate the jump of exon 20.

In the long term, these results may contribute to a better understanding of the molecular mechanisms responsible for the development of retinoblastoma, thus allowing the development of new therapeutic strategies.

**Keywords :** Rétinoblastoma ; RB1 ; in silico ; protéine pRb ;3D structure

## Table des matières

Dédicace .....	I
Dédicace .....	II
<i>Remercîment</i> .....	III
Résumé .....	IV
ملخص .....	V
Abstract.....	VI
Liste de tableau.....	IX
Liste des figures.....	X
<i>Liste des abréviations</i> .....	XIII
Avant-propos .....	16
<b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	18
1 Définition et épidémiologie .....	19
1.1 Rappel anatomique .....	19
1.2 Classification .....	20
2 Aspect clinique .....	22
2.1 Signe clinique et symptôme .....	22
2.2 Diagnostique du rétinoblastome .....	23
2.3 Pronostic du rétinoblastome.....	24
2.4 Traitement de rétinoblastome localisé .....	24
3 Aspect génétique du rétinoblastome.....	25
3.1 Aspect cytogénétique .....	25
3.2 Aspect moléculaire .....	26
3.2.1 L'hypothèse de kundson.....	27
3.2.2 Le gène RB1 et rétinoblastome .....	28
3.2.2.1 Le gène RB1.....	28
3.2.2.2 La prottien BR1 .....	29
3.2.2.3 Le cycle cellulaire de protéine RB1 .....	30
3.2.2.4 la protéine Rb et contrôle de l'apoptose.....	31
<b>BUT D'ETUDE</b> .....	33



<b>POPULATION D'ETUDE ET METHODE</b> .....	35
1 Population d'étude.....	36
2 Méthodes .....	36
2.1 Analyse in silico des mutations exonique.....	37
2.1.1 Logiciel I -mutation 2,0.....	37
2.1.2 Logiciel polyphen-2 .....	39
2.1.3 Logiciel Align Grantham Variation Grantham Deviation (Align-GVGD).....	40
2.1.4 Project HOPE : .....	42
2.1.5 Logiciel Swiss-PdbViewer .....	43
2.2 Analyse in silico des mutations effectuant les régions intronique.....	45
<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b> .....	47
1 Analyse de la mutation exonique c.1903 G >C (p. Ala635pro) .....	48
1.1 Résultat obtenu par le logiciel I-Mutant 2.0 .....	48
1.2 Résultat obtenu par le logiciel polyphen-2 .....	48
1.3 Résultat obtenu par logiciel Align-GVGD .....	49
1.4 Résultat obtenu par logiciel <i>Project HOPE</i> .....	50
1.5 Discussion de la mutation exonique c.1903 G >C (p. Ala635pro).....	52
2 Analyse de la mutation exonique c1961 T> A (p. Val654Gln).....	53
2.1 Résultat obtenu par le logiciel I-Mutant 2.0 .....	53
2.2 Résultat obtenu par logiciel polyphen-2 .....	53
2.3 Résultat obtenu par logiciel Align-GVGD .....	54
2.4 Résultat obtenu par logiciel Project HOPE.....	55
2.5 Résultat obtenu par logiciel swiss pdb viewer .....	56
2.6 Discussion de la mutation exonique c1961 T> A (p. Val654Gln).....	60
3 Analyse de la mutation intronique c.1215 + 1G>A.....	60
3.1 Résultat obtenu par logiciel HSF .....	60
3.2 Résultat obtenu par logiciel ESE Finder .....	61
3.3 Discussions de la mutation intronique c.1215 + 1G>A .....	62
<b>CONCLUSION</b> .....	64
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	66

## *Liste de Tableau*

- Tableau 1** : Signifier les groupes des risques de rétinoblastome et leur stadification.....21
- Tableau 2** : Liste des Mutation du gène RB1 chez les patients algériens.....36
- Tableau 3** : Résumées les propriétés physicochimiques d'Alanine et valine.....51
- Tableau 4** : Résumées les propriétés physicochimiques de Valine et Glutamine.....56
- Tableau 5** : Résultat de l'analyse de la mutation c.1215+1 G>A obtenu par HSF.....59

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> :Signification de l'anatomie de la rétine de l'œil. ....	20
<b>Figure 2</b> : Premiers signes cliniques du rétinoblastome : leuco crié et strabisme. ....	23
<b>Figure3</b> :Notion de génétique moléculaire pour comprendre héréditaire et sporadique.....	26
<b>Figure 4</b> : L'hypothèse des deux hits de deux mutations proposées par kundson .....	27
<b>Figure5</b> : La localisation du gène RB1 sur la bande q14 dans le chromosome 13.....	28
<b>Figure 6</b> : Schéma qui représente location des domaines on fonction des 928 acide aminé.....	29
<b>Figure 7</b> : La structure 3D de la protéine RB1. ....	30
<b>Figure 8</b> : Schéma qui expliqué le rôle de protéine RB1dans la régulation de cycle cellulaire.....	31
<b>Figure 9</b> : Schéma qui expliqué la voix de p53 et pRb qui control l'apoptose.....	32
<b>Figure 10</b> : La page d'entrée de I-Mutant2.0.....	37
<b>Figure 11</b> : Insertion des data dans le logiciel I-Mutant 2.0.....	38
<b>Figure 12</b> : Insertion des data dans le logiciel polyphen-2.....	40
<b>Figure 13</b> : Détaillé la classification.....	41
<b>Figure 14</b> : Insertion des data dans le logiciel (Align-GVGD).....	41

<b>Figure 15</b> : Insertion des data dans le Project HOPE.....	42
<b>Figure 16</b> : La première fenêtre de logiciel Swiss-PdbViewer.....	44
<b>Figure 17</b> : La deuxième fenêtre principale de logiciel Swiss-PdbViewer.....	44
<b>Figure 18</b> : Exemple de fenêtres d'entrée et de sortie ESE Finder.....	46
<b>Figure 19</b> : Résultat obtenu par Le logiciel I-Mutant 2.0 de la mutation exonique c.1903 G>C (p. Ala635pro) .....	48
<b>Figure 20</b> : Résultat obtenu par logiciel polyphen-2de la mutation exonique c.1903 G >C (p. Ala635pro) .....	49
<b>Figure 21</b> : Résultat obtenu par logiciel Align-GVGD de la mutation exonique c.1903 G> C (p. Ala635pro) .....	50
<b>Figure 22</b> : Les structures schématiques de l'alanine et Proline.....	51
<b>Figure 23</b> : Schématisation superposée des deux structure 3Dde la pRb sauvage et mutée.....	52
<b>Figure 24</b> : Résultat obtenu par le logiciel I-Mutant 2.0 de la mutation exonique c1961 T> A (p. Val654Gln).....	53
<b>Figure 25</b> : Résultat obtenu par le logiciel polyphen-2 de la mutation exonique c1961 T> A (p. Val654Gln).....	54
<b>Figure 26</b> : Résultat obtenu par le logiciel Align-GVGD de la mutation exoniquec1961T>A (p. Val654Gln).....	54
<b>Figure 27</b> : Les structures schématiques de Valine et Glutamine.....	55
<b>Figure28</b> : La structure 3D de protéine Rb normale A et mutée B.....	57
<b>Figure29</b> : La structure 3D de protéine Rb mutée.....	58

**Figure 30** : Représentation des interactions de l'Aa valine 654 avec les quatre Aa au niveau de la protéine native (1) et l'Aa glutamine 654 avec les quatre Aa au niveau de protéine mutée (2).....59

**Figure 31**: Capture superposée des deux structures 3D de la protéine pRb sauvage et mutée.....59

**Figure 32** : Résultat de l'analyse de la mutation c.1215+1 G>A par HSF.....61

**Figure 33** : Distribution des protéine SR dans la séquence de référence du gène RB1 et la séquence mutée c.1215 + 1G>A.....62

## *Liste des abréviations*

**3D** : Tridimensionnel.

**Aa** : Acide aminée.

**ADN** : Acide Désoxyribo Nucléique.

**ADNc** : Acide Désoxyribo Nucléique Complémentaire.

**AlA** : Alanine.

**Val** : Valine.

**Algine GVGD** : Algine Grantham variation Grantham Deviation.

**ARNm** : Acide ribonucléique message.

**RB1** : Gène de rétinoblastome 1.

**pRb** : protéine Rb.

**Pb** : Paire de base.

**Projet de HOPE** : Have (y) Our Protein Explained.

**PDB**: Protein Data Bank.

**Polyphen -2**: Polymorfism Phenotyping -2.

**Pro** : Proline.

**Gln** : Glutamine.

**CDK** : Kinase dépendent des cyclines

**G0** : Phase de repo.

**G1** : Croissance de la cellule.

**HSF**: Human Splicing Fersion.

**IRM**: Image Resonance Magnatique.

**P53**: Protéine 53.

**CDS**: Coding DNA Sequence.

**CPG**: Cytosine -phosphate –Glutamine.

**DDG**: Delta Delta G.

**KB**: kilobase.

**ASF**: Alternative Splicing Factor.

**KDa** : Kilo dalton.

**P** : Bras court du chromosome.

**P** : Groupement phosphate.

**PP2A** : Protéine Phosphate 2A.

**M** : Mitose.

**S** : Phase de réplication de L'ADN.

**E2F** : Adenvirus Early region 2 factor, facteur de transcription.

**ESE** : Exonique Splicing Enhancer –Finder.

**SC35** : Splicingosomal Component 35.

***SRP40*** : SR Protein 40.

***SRP55*** : SR Protein 55.



# *Avant-propos*

Le cancer est une maladie provoquée par une transformation cellulaire anormales, par prolifèrent de façon excessive au sein d'un tissu normal de l'organisme et qui peut toucher d'autres organes format ainsi des métastases.

Le rétinoblastome est un cancer infantile le plus fréquent qui traduit par des tumeurs intra oculaires d'origine génétique qui apparaît chez les enfants avant l'âge de 5 ans environ 1 enfant sur 18 000, se forme dans la rétine de l'œil, Le gène muté responsable du développement de ce cancer est le gène suppresseur de tumeur Rétinoblastoma1 (**RB1**) qui situé sur le bras long du chromosome 13 sont nécessaires à son apparition. Ce gène est considéré comme premier modèle décrit de prédisposition génétique à un cancer.

Il existe sous forme héréditaire, avec un risque accru de bilatéralité, ou sporadique. Ce dernier été inspiré par la théorie de kundson [1].

En Algérie l'analyse et les études moléculaires du gène **RB1** à été réalisée par les équipes de recherche sous la supervision du A. M. Boubekour par lequel ils sont parvenus de deux nouvelles mutations jamais écrites antérieurement.

A laid de recherche de madame Boubekour nous sommes intéressées à l'étude in silico des fonctionnalités des mutations du gène **RB1** au niveau protéique par l'utilisation de différents logiciels de prédiction et de modélisation moléculaire en 3D [2]. Les effets délétères des mutations sur l'épissage, la structure/fonction de la **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 une tumeur maligne d'origine neuro-épithéliale Survenant chez les nourrissons et le jeune enfant avant l'âge de 5 ans, se développant à partir des cônes rétiniens intra oculaires d'œil [3], les tumeurs affectent les deux yeux (bilatéral) et dans l'autre cas un seul œil (unilatéral) [4]. Dans les formes bilatérales le rétinoblastome peut être deux forme héréditaire transmis par la famille et non héréditaire (sporadique). Le diagnostic se fait à un âge moyen de 2 ans pour les formes unilatérales et 1an pour les formes bilatérales [5]. Si le rétinoblastome limite à l'œil le cancer est très souvent guérissable pour raison de sa détection précoce et des traitements disponible mais si la maladie n'est pas traitée, elle peut se propager à d'autres parties du corps, où elle devient beaucoup plus difficile à traiter. Le rétinoblastome peut être par une qui modification (mutation) survenant dans un gène connu sous le nom de gène du rétinoblastome (**RB1**).

### 1.1 Rappel anatomique

#### ❖ L'anatomie de la rétine

Est une fin couche profonde de l'œil est destinée à recevoir les impressions lumineuses et à les transmettre au cerveau par le nerf optique. Elle est constituée par deux couches :

##### a. L'épithélium pigmentaire rétinien

Est formé par une couche unicellulaire de cellules hexagonales liées les unes aux autres par des jonctions cellulaires. Les cellules sont très pigmentées elles ont un rôle d'écran, métabolique (Transport de vitamine A vers les cellules visuelles), un rôle phagocytaire.

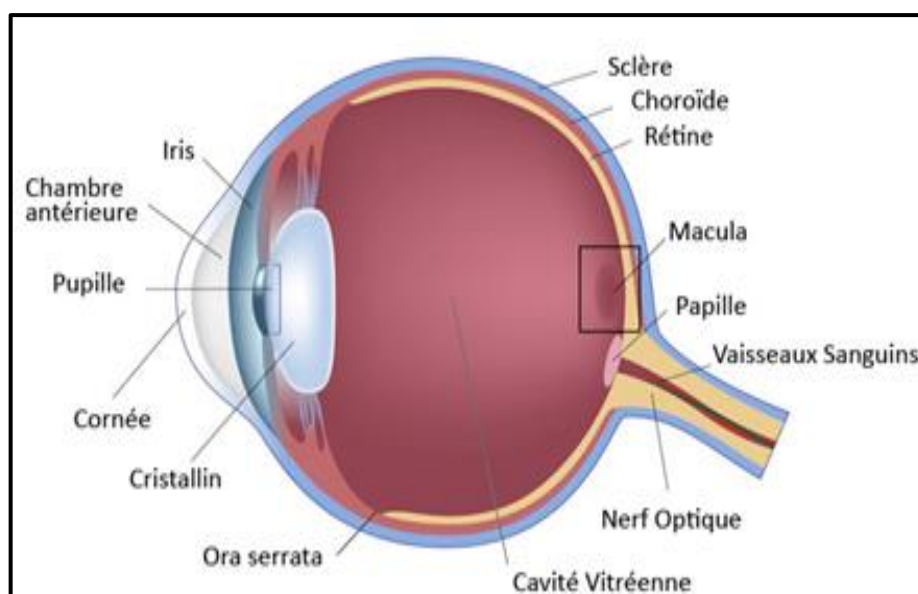
##### b. La Rétine neurosensorielle

Formée de plusieurs couches par l'articulation de trois cellules. Dans le sens radiaire il y a la cellule visuelle. Les cellules visuelles sont de deux sortes :

1/ les cellules à cônes essentiellement situées dans la macula et la zone péri maculaire et destinée à la vision centrale précise (lecture) et à la vision colorée.

2/ les cellules à bâtonnets : constituant essentiel de la rétine.

Les cellules visuelles sont articulées avec un premier neurone : La cellule bipolaire (appelée couche plexi forme externe) dites amarines au niveau de la synapse, articulée elle-même avec un second neurone, et la cellule ganglionnaire (plexi forme interne), dont le long axone va se diriger vers la papille, traverse le nerf optique et la bandelette jusqu'au corps genouillé externe. Elles sont-elles- même reliées latéralement entre elles par des éléments cellulaires horizontaux : cellules d'association dites horizontales au niveau de la synapse [6].

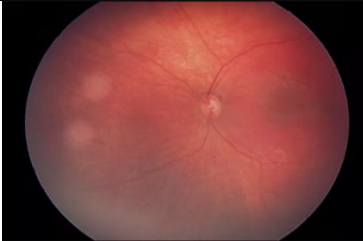

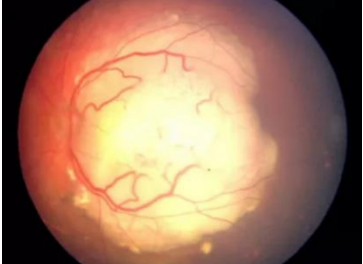
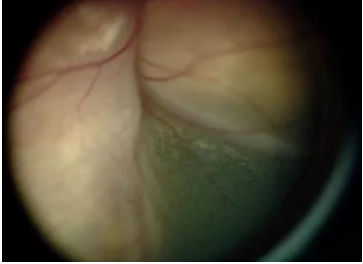
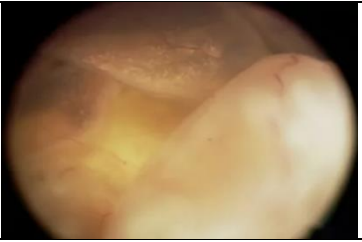


**Figure1** : Signification de l'anatomie de la rétine de l'œil.

## 1.2 Classification

Les tumeurs de l'œil sont classées du groupe A au E cette classification à l'aide d'un système de regroupement numéroté (groupe I à V), appelé « classification Reese-Ellsworth ». Cette classification donne La probabilité de sauver l'œil en fonction de la taille, de l'emplacement et de l'étendue de la tumeur à l'intérieur de l'œil [7].

**Tableaux 1 :** Signifier les groupes des risques de rétinoblastome et leur stadification.

Les Groupe de risque	Les caractérisation clinique	Les stadification
A Risque très faible	Petite tumeur située uniquement dans la rétine : éloignée des structures importantes	
B Risque faible	Tumeur plus grande et /ou située à proximité des structure importants	
C Risque modéré	Tumeur généralement bien définie avec une légère propagation ou un petit essaimage	
D Risque élevé	Grande tumeur ou mal définie avec essaimage important	
E Risque très Élevé	Très grande tumeur affectant la structure et la fonction oculaire ; risque accru de propagation	

## 2 Aspect clinique

### 2.1 Singe clinique et symptôme

Les parents peuvent remarquer des changements dans les yeux de l'enfant, ils doivent donc consulter un ophtalmologiste qui peut découvrir le rétinoblastome lors d'un examen oculaire.

Voici quelques-uns des signes de rétinoblastome :

- Une lueur blanche sur la pupille est la partie centrale de l'œil qui est généralement noire, qui peut être plus visible sur une photo lorsque le flash est utilisé chez un enfant atteint d'un rétinoblastome, le flash d'un appareil photo produit parfois un reflet blanc sur la pupille ou un « œil de chat » au lieu d'un reflet rouge (« œil rouge ») .

- Un œil mal aligné ou un « œil paresseux » (amblyopie). Un œil peut tourner vers l'extérieur ou vers l'intérieur (strabisme) lorsque l'enfant regarde droit devant lui. Il s'agit du deuxième signe le plus courant de rétinoblastome [8].

- Une iris colorée par une différente couleur (hétérochromie).

- Des problèmes de vision.

- Des yeux rouges ou irrités.

- Une douleur due à une pression accrue dans l'œil au fur et à mesure que la tumeur se développe.



**Figure 2 :** Premiers signes cliniques du rétinoblastome (leuco Corie et strabisme).

## 2.2 Diagnostique du rétinoblastome

Un diagnostic de rétinoblastome est établi à l'aide d'un examen oculaire sous anesthésie à l'aide de lumières spéciales et d'une lentille grossissante après dilatation des yeux. Cette procédure est effectuée lorsque l'enfant est endormi afin que le médecin puisse voir toute la rétine. Un appareil photo spécial prend des photos numériques de l'œil et de la tumeur.

Aucune biopsie n'est pratiquée pour diagnostiquer un rétinoblastome pour éviter la propagation des cellules cancéreuses [9].

Il y a plusieurs types de tests peuvent être utilisés pour diagnostiquer un rétinoblastome et en déterminer l'étendue. Ces tests incluent.

### Les éléments suivants :

- 1- Des antécédents médicaux, un examen physique et des examens sanguins pour savoir si le cancer est héréditaire ou non.
- 2- Des tests d'imagerie pour déterminer la taille de la tumeur et savoir si elle s'est propagée.
- 3- L'échographie ou ultraso graphie utilise des ondes sonores pour créer une image de l'œil et mettre en évidence la zone de la tumeur.
- 4- L'imagerie par résonance magnétique (IRM) réaliser des images détaillées de l'œil à l'aide d'ondes radio et d'aimants. Et généralement utilisé pour déterminer si la maladie s'est propagée à l'extérieur de l'œil jusqu'au cerveau.
- 5- La tomодensitométrie (scanner) utilise les rayons X pour créer des images en trois dimensions de l'œil et détecte les dépôts de calcium à l'intérieur d'une tumeur



### 2.3 Pronostic du rétinoblastome

L'étendue de la propagation de la maladie est ce qui détermine la capacité du traitement. Si la tumeur est confinée à l'œil, il existe une possibilité de traitement, mais si elle se propage à l'extérieur de l'œil, elle est dangereuse et difficile à traiter [10] , **Doit savoir :**

- ❖ Âge de l'enfant.
- ❖ L'atteinte d'un œil ou des deux yeux par le cancer.
- ❖ Le type de cancer : héréditaire ou non héréditaire .
- ❖ La taille de la tumeur et son emplacement.
- ❖ Le nombre de tumeurs ou la décomposition de la tumeur principale.
- ❖ La propagation du cancer en dehors de l'œil .
- ❖ L'impact de la tumeur sur la vision ou la fonction oculaire.

### 2.4 Traitement de rétinoblastome localisé

#### *1- Le chimiothérapie*

La chimiothérapie utilise des médicaments puissants pour tuer les cellules cancéreuses, ou empêcher de sa division et de produire davantage de cellules cancéreuses [10] :

- a) Chimiothérapie systémique : les médicaments sont administrés par voie orale ou par voie intraveineuse pour une propagation dans tout le corps.
- b) Chimiothérapie régionale : les médicaments peuvent être injectés autour de l'œil (injection péri oculaire) ou directement dans l'œil (injection intravitréenne) pour l'administration locale du traitement.

#### *2- Les thérapies focales*

Les thérapies focales sont souvent utilisées après l'utilisation d'une chimiothérapie pour réduire la tumeur. Si la tumeur est très petite, la thérapie focale seule peut suffire pour traiter le cancer.

- a) Thérapie lase : utilise une lumière à haute intensité (photo coagulation laser) ou la chaleur (thermothérapie) pour tuer les cellules cancéreuses.

- b) Cryothérapie : cette procédure utilise la congélation et la décongélation pour réduire la tumeur et tuer les cellules cancéreuses.
- c) Radiothérapie par plaque (curiethérapie) : un petit dispositif constitué d'une substance radioactive est placé à la surface de l'œil, directement au-dessus de l'endroit où se trouve la tumeur à l'intérieur de l'œil. Après une courte période, généralement 3 - 4 jours, le dispositif est retiré. Une intervention chirurgicale sous anesthésie est nécessaire pour placer et retirer le dispositif. Une fois le dispositif retiré, aucune radioactivité n'est laissée dans l'œil.

### ***3- Le Chirurgie***

L'œil est enlevé chirurgicalement si la maladie s'est propagée à la cavité orbitaire de l'œil ou les tissus entourant l'œil.

## **3 Aspect génétique du rétinoblastome**

### **3.1 Aspect cytogénétique**

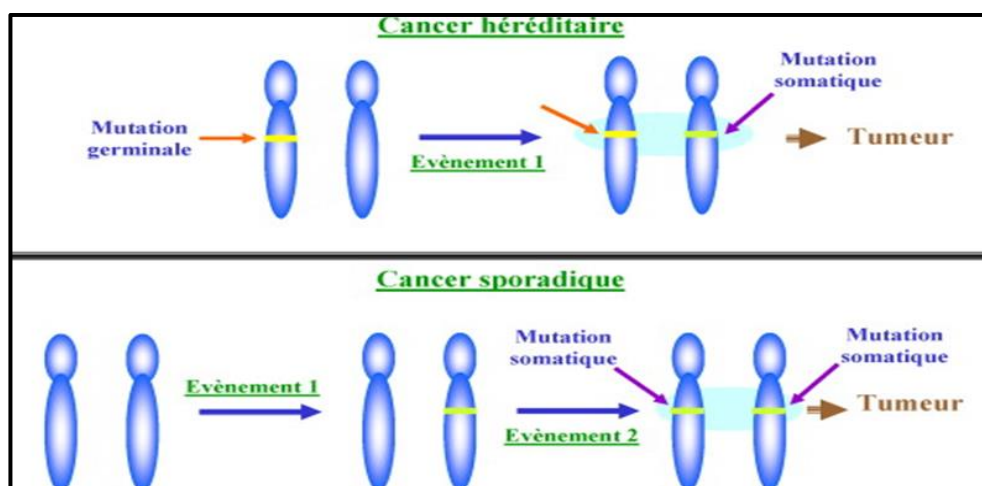
La cytogénétique est une science récente, née à la fin du 19<sup>ième</sup> siècle, et qui étudie les Chromosomes et leurs anomalies. Elle est basée sur l'observation et l'analyse des chromosomes des cellules en métaphase ou en prométaphase [1]. Ces anomalies chromosomiques peuvent être constitutionnelles ou acquises. La cytogénétique humaine, concerne particulièrement le processus d'apparition des anomalies chromosomiques de nombre ou de structure [11].

En 1983, Godbout et Cavane démontrent que l'oncogenèse du **Rb** suit un mode récessif du fait de la perte d'hétérozygotie observée dans la tumeur. Le gène du rétinoblastome est un anti oncogène situé sur le chromosome **13q14**, sa localisation et la mise en évidence de sa fonction d'anti oncogène a constitué une découverte majeure en oncologie, lorsque le gène Rb code pour une protéine de 928 acides aminés. pRB [12] est intact il empêche le développement des cellules cancéreuses même si un seul allèle est présent. L'oncogenèse du rétinoblastome procède de l'inactivation séquentielle des deux allèles au locus rétinoblastome 1 par deux mutations successives : M1 et M2 Le rétinoblastome unilatéral est habituellement non héréditaire, les deux mutations de nature somatique ciblent une seule et même cellule rétinienne la formation d'un rétinoblastome unilatéral et uni focal [13]. Mais il faut savoir que 15% des enfants porteurs d'un rétinoblastome unilatéral sont porteurs du gène et peuvent

le transmettre à leur descendance. Les formes bilatérales et/ou pluri focales sont d'origine génétique. La M1 prézygotique est transmise par voie germinale à partir d'un patient atteint ou non atteint avec pour corollaire une prédisposition tumorale frappant l'ensemble du tissu rétinien et la survenue d'un rétinoblastome bilatéral multifocal en fonction du nombre de M2, lorsqu'un allèle manque au niveau des cellules germinales toutes les cellules de l'organisme n'ont qu'un seul allèle et chaque fois qu'une cellule perd son deuxième allèle elle se transforme en cellule cancéreuse, c'est pour cela qu'il y a un risque plus élevé de développer un deuxième cancer après le rétinoblastome chez les enfants.

### 3.2 Aspect moléculaire

En 1986, elle est identifiée et caractérisée sur un plan structurel et fonctionnel par le modèle de Knudson. L'altération moléculaire la plus fréquente dans le rétinoblastome est l'inactivation bi-allélique du gène **RB1**. Dans les formes héréditaires (40 % des cas de rétinoblastome), les deux allèles de **RB1** sont déjà inactivés au niveau constitutionnel (toutes les cellules dès l'organisme présenteront cette altération de **RB1**). Un deuxième événement inactivant le second allèle de **RB1** au niveau somatique (dans les cellules de l'organe atteint) initiera le rétinoblastome. Les formes héréditaires sont la plupart du temps multifocales et bilatérales. Dans les formes sporadiques (60 % des cas), les deux événements conduisant à l'inactivation de **RB1** se produisent au niveau somatique, successivement dans la même cellule. La probabilité que ces deux événements se produisent est très faible, ce qui fait que les formes sporadiques sont majoritairement [14].



**Figure 3 :** Notion de génétique moléculaire pour comprendre héréditaire et sporadique

### 3.2.1 L'hypothèse de Knudson

L'hypothèse du « two-hit » a fourni un modèle unificateur pour comprendre le cancer qui survient chez les individus porteurs d'un « gène de susceptibilité » et les cancers qui se développent en raison de mutations induites au hasard dans des gènes par ailleurs normaux. Les gènes suppresseurs de tumeurs, en particulier, sont des cibles importantes pour la recherche sur la prévention du cancer, car ils fonctionnent normalement pour freiner la croissance cellulaire [15].

En 1971, Alfred Knudson en étudiant les différences entre les formes héréditaires et les formes sporadiques d'un cancer rare de l'enfant, le rétinoblastome, il postule que, à l'étape initiale de la carcinogénèse, la cellule à l'origine d'un rétinoblastome doit subir deux mutations. Dans le cas des tumeurs sporadiques, ces deux événements sont somatiques et surviennent au hasard, avec une probabilité très faible. Dans la forme familiale du rétinoblastome, une des deux mutations génétiques (mutation ou remaniement chromosomique) est constitutionnelle et transmissible. Pour une cellule rétinienne porteuse constitutionnellement d'une première mutation du gène **RB1** [16], une seule mutation somatique supplémentaire est suffisante pour que la tumeur se développe. La susceptibilité familiale est héritée d'un parent selon un mode dominant. Le phénotype cellulaire tumoral répond par contre à une hérédité récessive puisque deux événements mutationnels sont nécessaires (ceci est une bonne illustration du fait que récessivité ou dominance sont des propriétés des phénotypes et non des gènes ou des mutations).

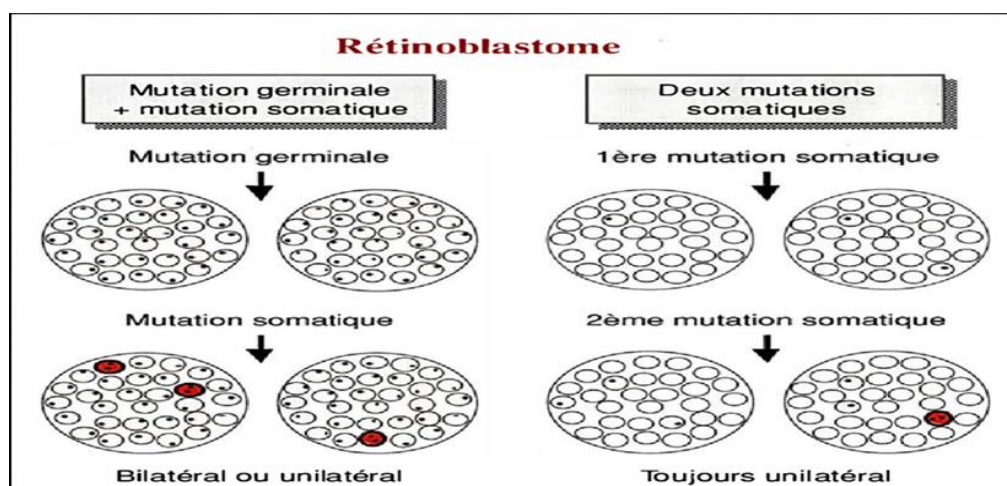
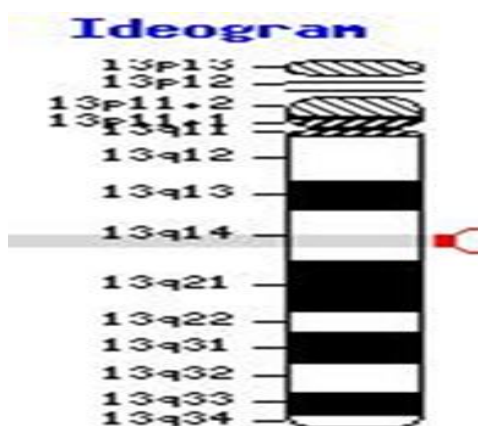


Figure 4 : L'hypothèse des de mutation proposé par Knudson.

### 3.2.2 Le gène **RB1** et rétinoblastome

#### 3.2.2.1 Le gène **RB1**

Un idéogramme est une représentation schématique du caryotype d'un organisme, ou dans ce cas un chromosome. Le gène **RB1** est situé sur le grand bras (q) du 13ème chromosome. Le 13ème chromosome est le 10ème plus petit des 23 chromosomes humains. Les transcrits du gène **RB1** sont codés en 27 exons couvrant environ 200 kb d'ADN génomique. Les exons individuels vont de 31 à 1889 pb de longueur. Dans le rétinoblastome, des délétions sont couramment observées dans les exons 13 à 17. La transcription de **RB** est initiée à plusieurs positions (protéine) produisant un ARNm de 4,7 kb et une lecture ouverte de 2,7 kb [17].



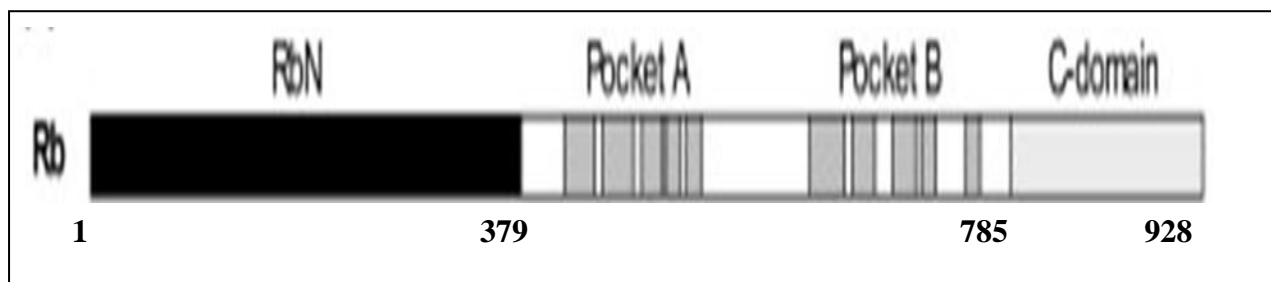
**Figure 5** : La localisation du gène **RB1** sur la bande q14 dans le chromosome 13.

Un motif "leucine-zipper" est un domaine fonctionnel tridimensionnel courant des protéines et exclusivement codé par l'exon 20. La transcription de **RB** est initiée à plusieurs positions et les séquences entourant les sites d'initiation (promoteur) riche en G + C. Une boîte TATA en amont typique n'est pas présente. La localisation de la région du promoteur **RB** a été réalisée en utilisant un système d'expression hétérologue, l'analyse de suppression a révélé qu'une région aussi petite que 70 pb est suffisante pour l'activité du promoteur **RB**, similaire au promoteur des incitations. Plusieurs répétitions directes et structures tige-boucle

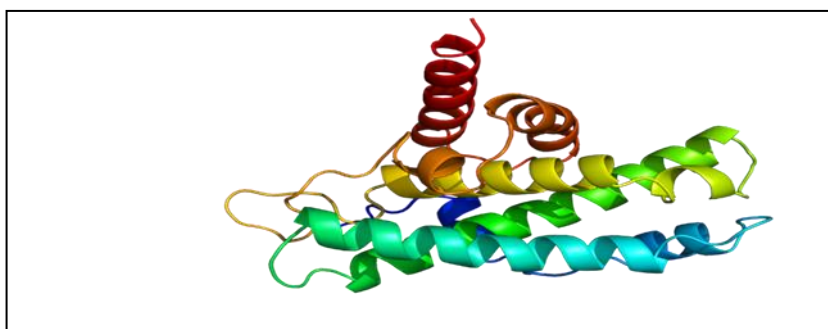
possibles se trouvent dans la région promotrice. Le premier au niveau de l'exon 1 au 139 -ème nucléotide, et le deuxième au 475 -ème nucléotide [18].

### 3.2.2.2 La prottien BR1

La protéine de susceptibilité au rétinoblastome (**RB**), elle est monomérique à un poids moléculaire de 105 KD, contient de 928 acides aminés, est plutôt instable et est hydrophile, joue un rôle clé dans la régulation de la progression du cycle cellulaire via des interactions impliquant la « poche » centrale et les régions C-terminales. Bien que le domaine N-terminal de Rb soit indispensable pour cette fonction, il est néanmoins fortement conservé et abrite des mutations faux-sens trouvées dans le rétinoblastome héréditaire, indiquant que la perturbation de sa fonction est oncogène. La structure cristalline du domaine RR N-terminal (RBN) révèle une entité globulaire formée de deux plis de type cycline reliés de manière rigide. La similitude de (RBN) avec les boîtes A et B du domaine de poche RB suggère que **RB** a évolué par duplication de domaine. L'analyse structurale et fonctionnelle donne un aperçu de l'oncogénicité des mutations dans (RBN) et identifie un site unique d'interaction protéique régulé par la phosphorylation [19].



**Figure 6** : Schéma qui représente location des domaines on fonction des 928 acide aminé.

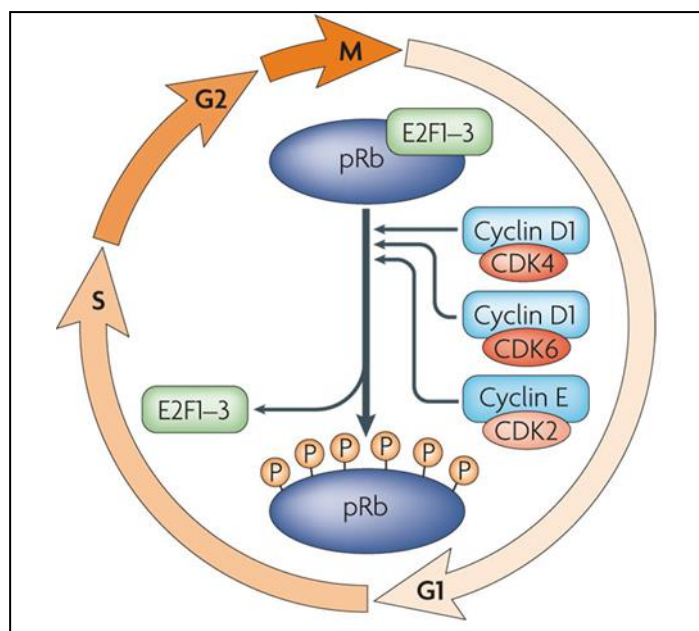


*Figure 7* : La structure 3D de la protéine **RB1**.

### 3.2.2.3 Le cycle cellulaire de protéine **RB1**

C'est un processus fondamental par lequel une cellule-mère donne deux cellules-filles identiques entre elles et à la cellule dont elles dérivent. Le cycle cellulaire est une série d'événements organisés et contrôlés aboutissant à 2 cellules filles sont identiques à la cellule mère (Cycle cellulaire = Interphase = G1 + S + G2 + mitose le cycle cellulaire) est contrôlé par au moins 6 complexes (Cycline/CDk) différents qui interviennent à des moments précis du cycle cellulaire [20].

Au début de phase de G1 le complexe (CyclineD/CDk4) et CDk6 phosphorylent et inactivent la protéine Rb (Rétinoblastome protéine), ce qui a pour effet de libérer les facteurs de transcription E2F qui contrôlent l'expression de gènes nécessaires pour la transition G1/S et pour la progression de S (synthèse des cyclines E et A, entre autres) ,croissance de la cellule (expression de facteurs de croissance comme IGF) ,vérification de l'ADN , Mise en place de la cohésive sur l'ADN, première séparation des centrosomes . Le complexe (Cycline/CDk2) responsable de la transition G1/S et phosphorylation de la protéine Rb. Puis dans la phase S le complexe (CyclineA/CDk2) activé et peut répliqué l'ADN et activé la transcription et la mise en place de la cohésine et duplication des centrosomes. Enfin le complexe (CyclineB/CDk1) dirige la transition G2/M par phosphorylation de nombreux substrats et conduit la progression de la mitose [21].



**Figure 8** : Schéma qui explique le rôle de protéine RB1 dans la régulation de cycle cellulaire.

#### 3.2.2.4 La protéine Rb et contrôle de l'apoptose

L'accumulation de mutations au niveau de gènes clés contrôlant les voies de prolifération et de survie cellulaire est très souvent associée à l'apparition d'un cancer broncho-pulmonaire. Les voies de signalisation des gènes suppresseurs de tumeurs p53 et du rétinoblastome (**Rb**) qui participent à l'ensemble de ces phénomènes sont impliquées dans le développement de ces tumeurs.

Le gène p53 est un gène suppresseur de tumeur qui code pour un facteur de transcription capable d'induire soit l'apoptose, soit l'arrêt en phase G1 et/ou G2 du cycle cellulaire. Son activité transcriptionnelle est induite par deux voies distinctes : le stress génotoxique (irradiation G et UV) ou non génotoxique (activation oncogénique). Le gène p53 est la cible de mutations directes par les carcinogènes du tabac dans 70% des tumeurs pulmonaires, le gène Rb est également la cible d'altérations génétiques dans de nombreux cancers dont 90% des cancers bronchiques à petites cellules. Il existe des interconnexions étroites entre les voies Rb et p53 [22].

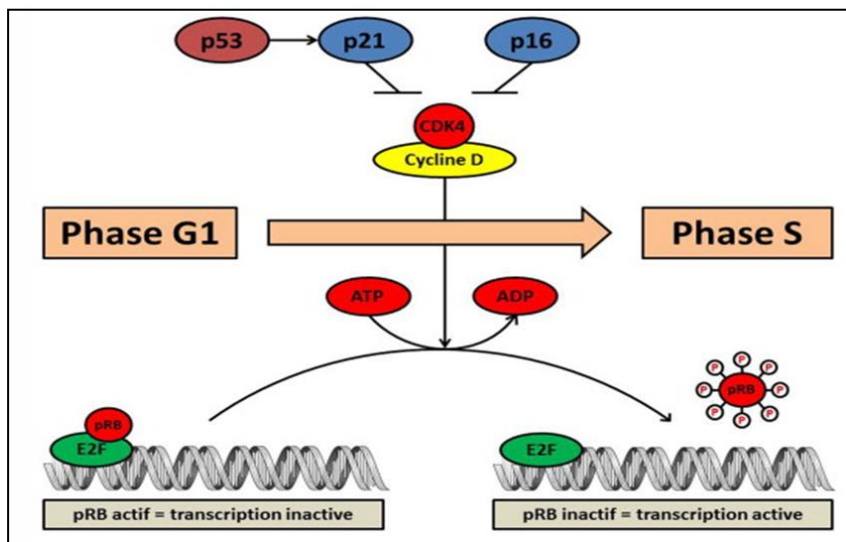
Voie **RB1** faire la régulation de la progression du cycle cellulaire des phases G1 aux phases S par la liaison du facteur de transcription E2F sous sa forme hypo phosphorylée et la



libération d'E2F. La phosphorylation de RB1 est pilotée par les cyclines D et E en conjonction avec les kinases dépendantes des cyclines (CDK).

Et la voie p53 joue un rôle important dans les mécanismes de réparation cellulaire, en réponse aux dommages à l'ADN, p53 induit p21 un inhibiteur de la kinase cycline-dépendante inhibant la phosphorylation de **RB1**, conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire.

L'induction de BAX par p53 en réponse à des dommages importants ou à un échec de réparation conduit à l'apoptose. p53 est stabilisé par CHK2 et MDM2 améliore la dégradation de p53 [23].



**Figure 9** : Schéma qui explique la voie de p53 et pRb qui contrôle l'apoptose.

# ***BUT D'ETUDE***

Rétinoblastome est une tumeur rare qui touche la rétine du jeune enfant .Le gène de susceptibilité au rétinoblastome (**RB1**) a été le premier gène suppresseur de tumeur à être défini moléculairement [17].

D'autre part La bio-informatique consiste à conceptualiser la biologie en termes de macromolécules (au sens de la physico-chimie) puis à appliquer des techniques "informatiques" (issues de disciplines telles que les mathématiques appliquées, l'informatique et les statistiques) pour comprendre et organiser les informations associées à ces molécules [24].

Les analyses en bio-informatique se concentrent principalement sur trois types de grands ensembles de données disponibles en biologie moléculaire : les structures macromoléculaires, les séquences génomiques et les résultats d'expériences de génomique fonctionnelle. Des informations supplémentaires incluent le texte d'articles scientifiques et de réseaux d'interaction protéine-protéine. La bio-informatique utilise un large éventail de techniques de calcul, notamment l'alignement de séquences et de structures, la conception de bases de données et l'exploration de données, la géométrie macromoléculaire, la prédiction de la structure et de la fonction des protéines, la recherche de gènes [24].

Dans le but de contribuer à moléculaire et des mutations (la structure/fonction) de gène Rb1 du rétinoblastome à l'aide l'étude de Madame Boubekeur A [25]. Dans la population algérienne et en utilisant plusieurs logiciels de prédiction : I mutant 2.0, polyphen2, Align GVGD, Project HOPE, swiss Pdb.

***POPULATION  
D'ETUDE  
ET  
METHODE***

## 1 Population d'étude

Une mutation des deux allèles du gène **Rb** durant le développement rétinien normal est responsable de l'apparition du rétinoblastome.

La recherche de Madame Boubekeure mutations du gène Rb au niveau constitutionnel et tumoral dans la population algérienne reste difficile, cette étude a porté sur un échantillon de 21 patients atteints de rétinoblastome. Le promoteur et les 27 exons avec leurs séquences introniques, gène **Rb** ont été amplifiés et analysés par HPLC (chromatographie liquide à haute performance) suivie d'un séquençage [26]. Ces mutations sont résumées dans le tableau suivant.

**Tableau 2** : Liste des Mutation du gène **RB1** chez les patients algériens.

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 deux bases au niveau des gènes sont responsables de dysfonctionnements des protéines qui conduisant plusieurs pathologies. Ces variations peuvent survenir au niveau des exons ou introns et peuvent donc avoir des effets sur le processus d'épissage et sur la structure et la fonction de la protéine.

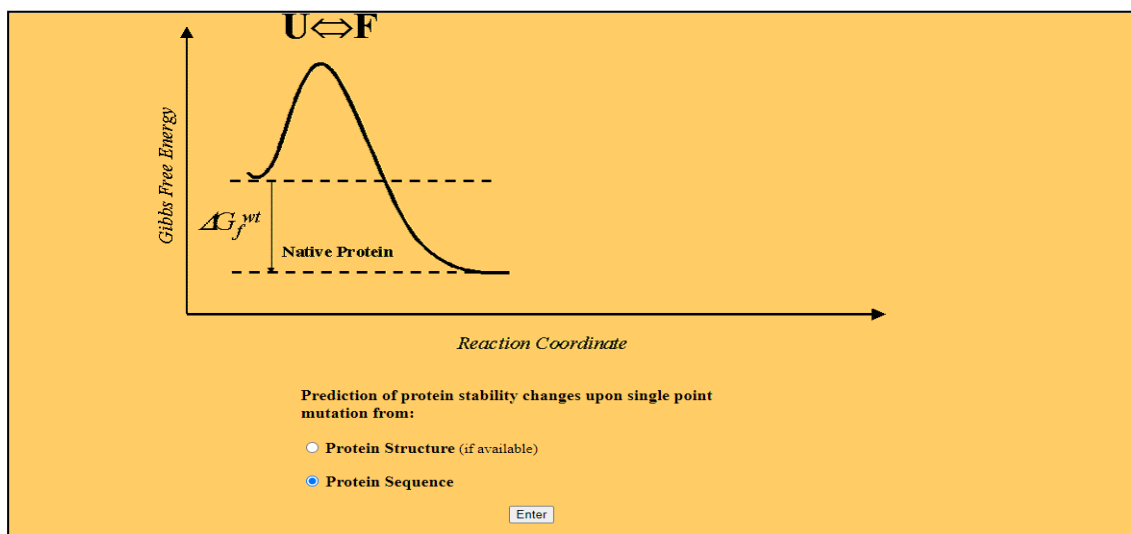
Analyse in silico des mutations exoniques de nombreux outils bio-informatiques in silico comme les logiciels pour la prédiction des effets des mutations sur la fonction des

protéines ont été développés et sont devenus importants pour leur priorisation pour la caractérisation expérimentale

## 2.1 Analyse in silico des mutations exonique

### 2.1.1 Logiciel I -mutation 2,0

I-Mutant2.0 est un outil pour la prédiction automatique des changements de stabilité des protéines lors de mutations ponctuelles à partir la structure ou la séquence de la protéine, notre interface web permet la sélection d'un mode prédictif qui nécessite le collage d'une séquence protéique dans un format brut. Sur la page Web I-Mutant 2.0 [27]. (<https://folding.biofold.org/i-mutant/i-mutant2.0.html>).



**Figure10** : La page d'entrée de I-Mutant2.0.

Et peut être utilisé comme un classificateur pour prédire le signe du changement de stabilité des protéines lors d'une mutation et comme estimateur de régression pour estimer la différence d'énergie libre  $\Delta\Delta G$  entre la protéine sauvage et mutée. Une valeur positive ( $\Delta\Delta G > 0$ ) implique une augmentation de la stabilité des protéines, par contre une valeur négative ( $\Delta\Delta G < 0$ ) suggère une mutation déstabilisante.

I-Mutant 2.0 a été formé pour accomplir quatre tâches différentes :

- 1) Prédiction de la direction des changements de stabilité de la protéine lors d'une mutation ponctuelle de la structure tertiaire de la protéine (une tâche de classification).
- 2) Prédiction de la valeur  $\Delta\Delta G$  des changements de stabilité de la protéine lors d'une mutation ponctuelle de la structure tertiaire de la protéine (une tâche d'approximation de la fonction).
- 3) Prédiction de la direction des changements de stabilité de la protéine lors d'une mutation ponctuelle uniquement à partir de la séquence de la protéine (une tâche de classification).
- 4) La prédiction de la valeur  $\Delta\Delta G$  de la stabilité de la protéine change lors d'une mutation ponctuelle uniquement à partir de la séquence protéique (une tâche d'approximation de la fonction).

Pour la tâche de classification et pour l'attribution des valeurs de  $\Delta\Delta G$ , nous adoptons essentiellement le même code d'entrée en identifiant deux marqueurs : l'un représente la stabilité accrue de la protéine ( $\Delta\Delta G > 0$ , le marqueur positive), l'autre est associé à la mutation déstabilisante ( $\Delta\Delta G < 0$ , le marqueur négative) [27].

The screenshot shows the I-Mutant 2.0 web interface. On the left is a navigation menu with links: [I-Mutant2.0 Help](#), [Details](#), [Tutorial](#), [Data Sets](#), [Download I-Mutant2.0](#), [Biocomputing Unit](#), [Contact us](#), and [Last Update 27/12/06](#). The main area is a form with the following fields:

- Protein Sequence:** A text area containing the sequence: `>sp|P06400|RB_HUMAN Retinoblastoma-associated protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RB1 PE=1 SV=2 MPPKTPRKTAATAAAAAAEPAPPPPPPEEDPEQDSGPEDLPLVRLFEFE ETEEPDF TAL CQKLKIPDHVRERAWLTHEKVSSVDGVLGGYIQKKELWGICIFIAAVDL DEMSFTFTEL QKNIEISVHKFFNLLKEIDTSTKVDNAMSRLLKKYDVL FALFSLKERTCE LIYLTQPSSS`
- Position:** Input field with value 635.
- New Residue:** Input field with value p.
- Temperature:** Input field with value 25.
- pH:** Input field with value 7.
- Prediction:** Radio buttons for  Free Energy change value (DDG) and  Sign of DDG.
- e-mail:** Input field.
- Submit** button.

**Figure11** : Insertion des data dans le logiciel I-Mutant 2.0.

### 2.1.2 Logiciel polyphen-2

PolyPhen-2 (polymorphisme phénotypique) est un outil automatique de prédiction de l'impact éventuel d'une substitution d'acide aminé sur la structure et la fonction d'une protéine humaine [28] (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>).

#### Hypothèses de substitution

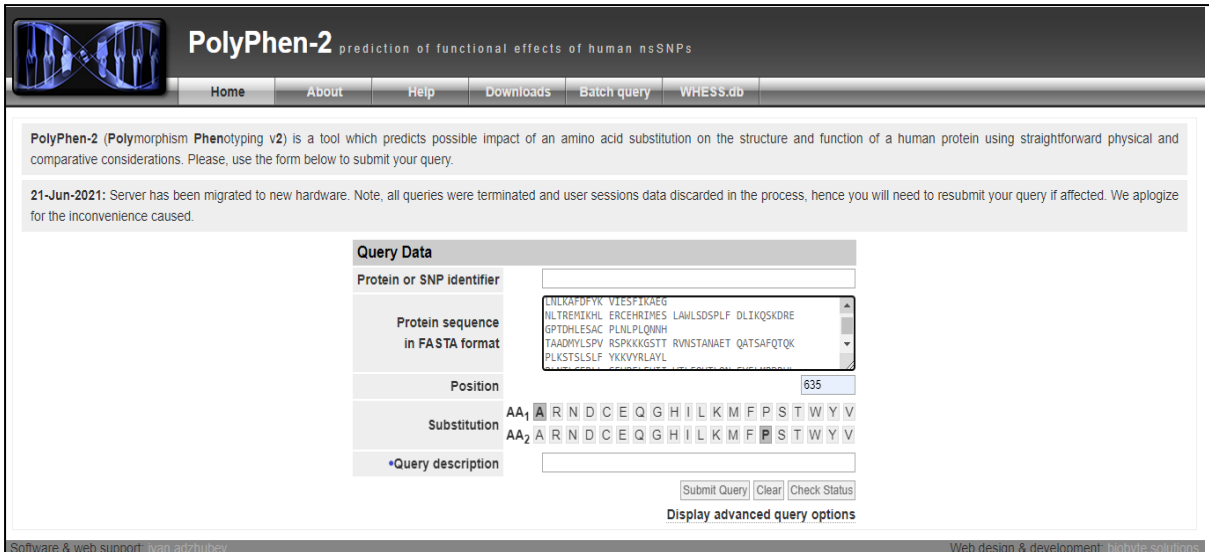
- Les variations d'acides aminés à des positions conservées sont plus susceptibles de provoquer des changements fonctionnels.
- Les variations d'acides aminés qui affectent les sites actifs, les sites d'interaction, la solubilité ou la stabilité d'une protéine qui affecter la structure de la protéine.
- Les changements dans la structure des protéines sont susceptibles de provoquer des changements dans la fonction des protéines, qui sont capable de provoquer des changements dans le phénotype.

PolyPhen-2 varie de 0,0 (toléré) à 1,0 (délétère). Les variantes avec des scores de 0,0 devraient être bénignes. Des valeurs plus proches de 1,0 sont prédites avec plus de confiance comme étant délétères [29].

#### Le score peut être interprété comme suit

- Les variantes avec des scores dans cette gamme sont censées être bénignes [0,0 -0,15].
- Les variantes avec des scores dans cette gamme peuvent être dommageables [0,15 - 0,1].
- Les variantes avec des scores dans cette gamme sont prédites avec plus de confiance comme étant dommageables [0,85 – 1,0] [30].





**PolyPhen-2** prediction of functional effects of human nsSNPs

Home About Help Downloads Batch query WHESs.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.

21-Jun-2021: Server has been migrated to new hardware. Note, all queries were terminated and user sessions data discarded in the process, hence you will need to resubmit your query if affected. We apologize for the inconvenience caused.

**Query Data**

Protein or SNP identifier

Protein sequence in FASTA format 

```
ENLKAFDPYK VIESPIKAEQ
NLTREMIKHL ERCEHRIMES LAWLSDSPLF DLIQSKDRE
GPDIHLESAC PLNLPLQNH
TAADIVLSPV RSPKIKGSTT RWIWTAMET QATSAFQTK
PLKSTLSLFL YKKVYRLAYL
```

Position

Substitution AA<sub>1</sub>

AA<sub>2</sub>

Query description

[Display advanced query options](#)

Software & web support: Ivan Adzhubei Web design & development: bobote solutions

**Figure 12 :** Insertion des data dans le logiciel polyphen-2.

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

Align-GVGD est un programme qui combine les caractéristiques biophysiques des séquences d'alignement multiple d'acides aminés et de protéines pour calculer la plage de variance présente à chaque position de l'alignement GV et prédire où les substitutions faux-sens dans les gènes [31] ([http://agvgd.hci.utah.edu/agvgd\\_input.php](http://agvgd.hci.utah.edu/agvgd_input.php)).

#### Deux mesures de distance et une note :

**GV** : Plage de variation.

**GD** : Distance d'une substitution faux-sens à partir du bord de la plage de variation.

Les résultats sont déterminés à partir de ces deux valeurs et sont répartis en sept classes :

**C0, C15, C25, C35, C45, C55, C65**

**[C0 - C25]** : Les classes qui n'affectent pas la fonction.

**[C35]** : La classe intermédiaire.

**[C45- C65]** : Les classes qui affectent la fonction.

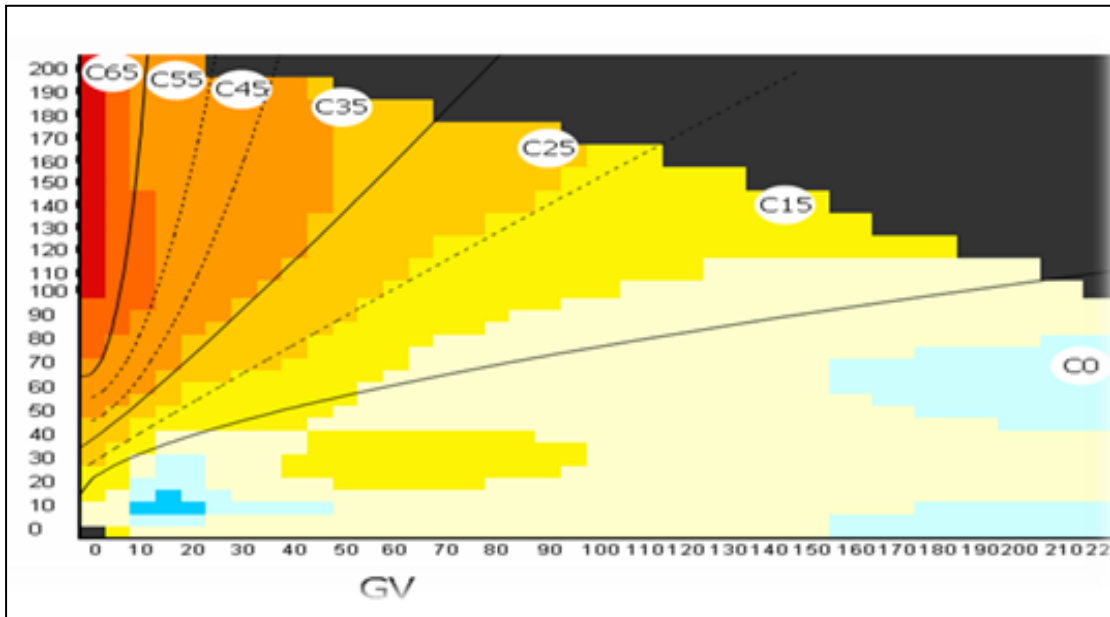


Figure 13 : Détaillé la classification.

<p><b>Multiple sequence alignment in FASTA format:*</b></p> <pre>&gt;sp P04637 P53_HUMAN - Homo sapiens (Human). SVP-SQKT-YQGSYGFR LGFL &gt;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><a href="#">(click here for more details)</a></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>SPYKISEGLPTPTKMTPRSRILVSI GESFG TSEKFQKINQMV CNSDRVLKRSAEGSNPPK PLKCLRFDIEGSD EADGSKHLPGESKFQK LAEMTSTRTRMQKQKM NDSMDTSNKEEK</pre> <p>OR</p> <p>Select one of our library alignments: <input type="text" value="--Select the gene--"/></p> <p><input type="text" value="-----Select the depth-----"/></p> <p><a href="#">(click here for more details)</a></p>
<p><b>Substitutions list:*</b></p> <pre>S96T S96P S96A</pre> <p><a href="#">(click here for more details)</a></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: <input type="text" value="A635p"/></p>

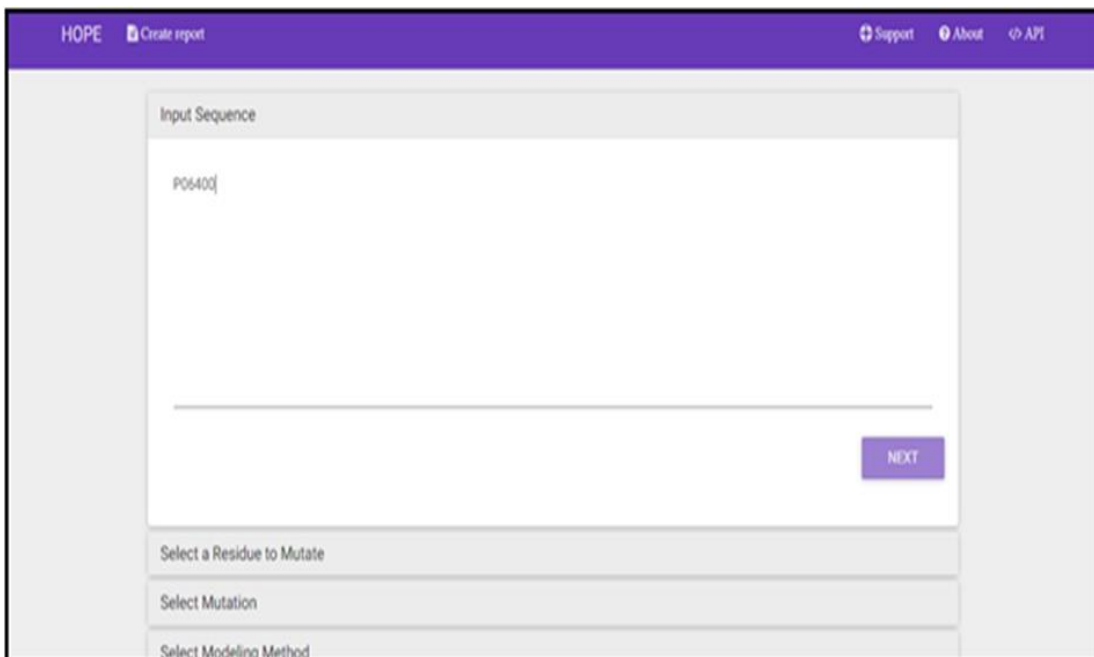
Figure 14 : Insertion des data dans logiciel (Align-GVGD).

### 2.1.4 Project HOPE

HOPE est un programme entièrement automatique qui analyse les effets structurels et fonctionnels des mutations ponctuelles. HOPE collecte des informations à partir d'un large éventail de sources d'informations, notamment des calculs sur les coordonnées 3D de la protéine à l'aide des services Web WHAT IF, des annotations de séquence de la base de données UniProt et des prédictions par les services DAS [32].

Les modèles d'homologie sont construits avec YASARA, Les données sont stockées dans une base de données et utilisées dans un schéma décisionnel pour identifier les effets d'une mutation sur la structure et la fonction 3D de la protéine, Nous avons testé HOPE en comparant sa sortie aux résultats de projets exécutés manuellement [33].

Dans tous les cas simples, HOPE s'est comporté comme un bio informaticien formé.  
(<http://www.cmbi.ru.nl/hope/input?3>)



The screenshot displays the HOPE web application interface. At the top, there is a purple header bar with the text 'HOPE' on the left, a 'Create report' button, and 'Support', 'About', and 'API' links on the right. The main content area is a light gray box. It features a large text input field labeled 'Input Sequence' containing the text 'P06400'. Below this field is a horizontal line and a purple 'NEXT' button. Underneath the input field, there are three smaller input fields: 'Select a Residue to Mutate', 'Select Mutation', and 'Select Modeling Method', each with a dropdown arrow.

**Figure 15 :** Insertion des data dans le Project HOPE.

### **Exemple de sortie de HOPE**

a) Explication de la méthode utilisée (structure, modélisation ou prévisions) et liens vers les bases de données pertinentes.

b) Texte et images qui expliquent les différences entre les résidus de type sauvage et mutant. Le texte est omis de cette figure pour plus de clarté.

c) Paragraphe du rapport expliquant l'effet de la mutation sur les contacts établis par le résidu, une liaison disulfure dans ce cas. Il contient un lien vers l'entrée wiki « cystéine » et

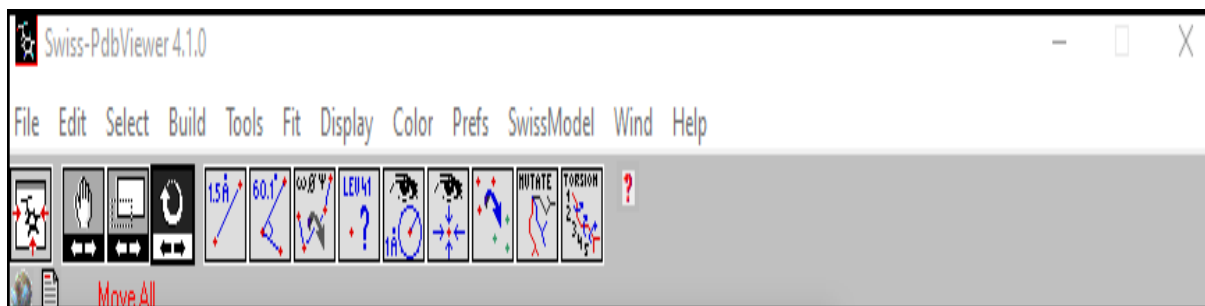
« liaison disulfure ».

d) Images/animations qui montrent l'effet de la mutation sur la structure.

#### **2.1.5 Logiciel Swiss-PdbViewer**

Swiss-Pdb Viewer (alias DeepView) est une application qui fournit une interface conviviale permettant d'analyser plusieurs protéines en même temps. Les protéines peuvent être superposées afin de déduire leurs alignements structuraux et de comparer leurs sites actifs ou toutes autres parties pertinentes [34]. Les mutations d'acides aminés, les liaisons H, les angles et les distances entre les atomes sont faciles à obtenir grâce à l'interface graphique et menu intuitive [35] <https://spdbv.unil.ch/refs.html>.

Swiss-Pdb Viewer (alias DeepView) est développé depuis 1994 par Nicolas Guex. Travailler avec ces deux programmes réduit considérablement la quantité de travail nécessaire pour générer des modèles, car il est possible d'enfiler une séquence primaire de protéine sur un modèle 3D et d'obtenir un retour immédiat sur la façon dont la protéine filetée sera acceptée par la structure de référence avant de la soumettre. Une requête pour construire les boucles manquantes et affiner le conditionnement de la side Chain [36].



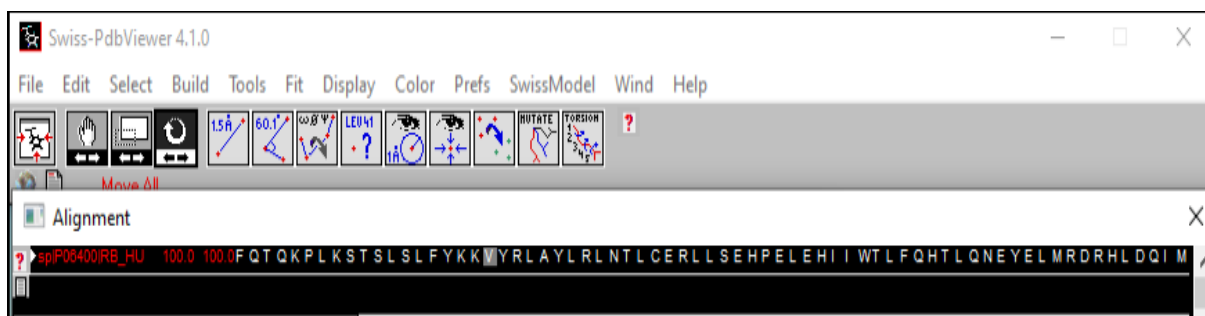
**Figure 16 :** La première fenêtre de logiciel Swiss-PdbViewer.

La première fenêtre En haut qui regroupe les outils de centrage et de mesure fréquemment utilisés, et où le logiciel fournit également des informations instantanées utiles sur les atomes. Cette fenêtre affiche des informations sur chaque couche (structures) chargées dans l'espace de travail et permet de modifier leurs préférences d'affichage individuelles [37].

Deuxième fenêtre principale au milieu qui manipuler vos molécules en temps réel, mesurer des distances et des angles, faire des mutations et comparer des structures. Utilisés, et où le logiciel fournit également des informations instantanées utiles sur les atomes. Cette fenêtre affiche des informations sur chaque couche (structures) chargées dans l'espace de travail et permet de modifier leurs préférences d'affichage individuelles [38].

Deuxième fenêtre principale au milieu qui manipuler vos molécules en temps réel, mesurer des distances et des angles, faire des mutations et comparer des structures.

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



**Figure 17 :** La deuxième fenêtre principale de logiciel Swiss-PdbViewer.

Cet écran se trouve une fenêtre qui montre l'alignement de vos protéines, donne quelques 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 effectuant les régions intronique**

Les mutations introniques sur l'efficacité de l'épissage a été prédit à l'aide des logiciels Human Splicing-Finder version (HSF), et Exonic Splicing Enhancer -Finder (ESE Finder).

Logiciel HSF prédit l'effet des mutations sur la signalisation d'épissage. Pour permettre l'identification de tous les signaux d'épissage [39] , y compris les sites d'épissage accepteurs et donneurs, les points de branchement et les signaux d'épissage auxiliaires (ESE et ESS) .

Le système Human Splicing Finder (HSF) combine 12 algorithmes différents pour identifier et prédire l'impact des mutations sur les modèles d'épissage, y compris les sites d'épissage accepteurs et donneurs, les points de ramification et les séquences auxiliaires connues pour améliorer ou réprimer l'épissage : Exonic Splicing Enhancers (ESE) et silencieux d'épissage exonique (ESS) [40].

Nous avons également développé de nouvelles matrices de poids de position pour évaluer la force de 5 et 3 sites d'épissage et points de ramification. Nous avons évalué l'efficacité du HSF à l'aide d'un ensemble de 83 mutations introniques et 35 mutations exoniques connues pour entraîner des défauts d'épissage. Nous avons montré que l'effet de la mutation était correctement prédit dans presque tous les cas.

Le logiciel ESE Finder facilite l'analyse rapide des séquences régulatrices activatrices d'épissage (ESE) [41].

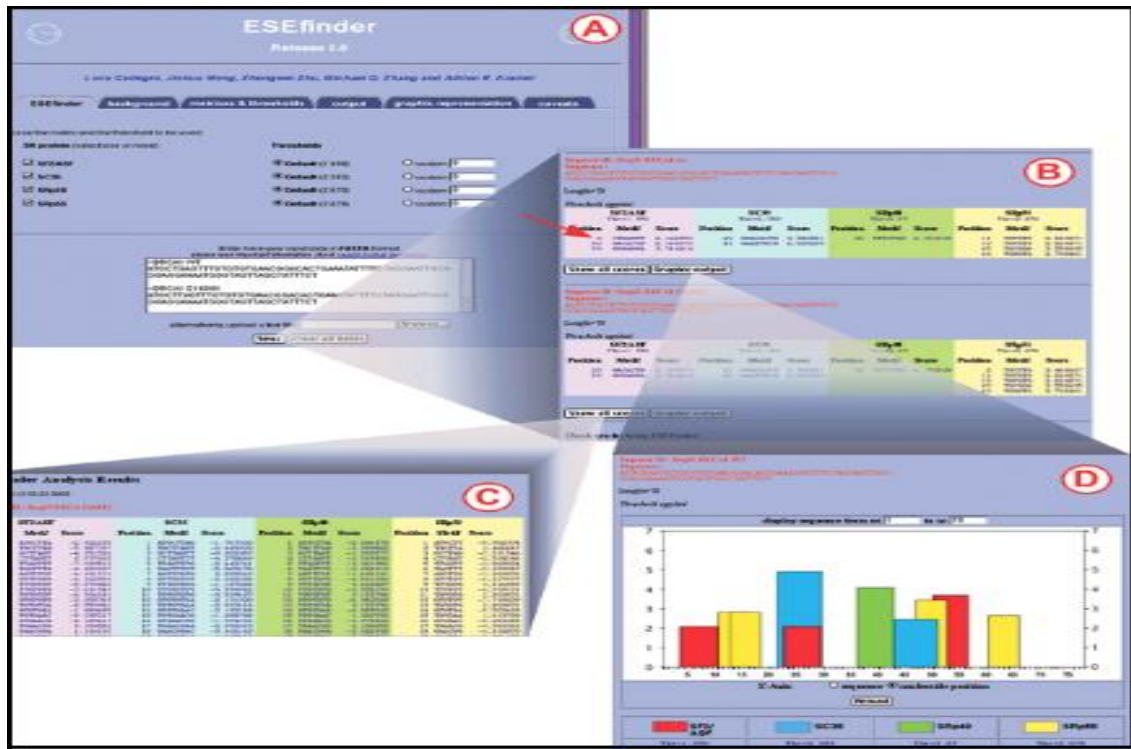


Figure 18: Exemple de fenêtres d'entrée et de sortie ESE Finder.

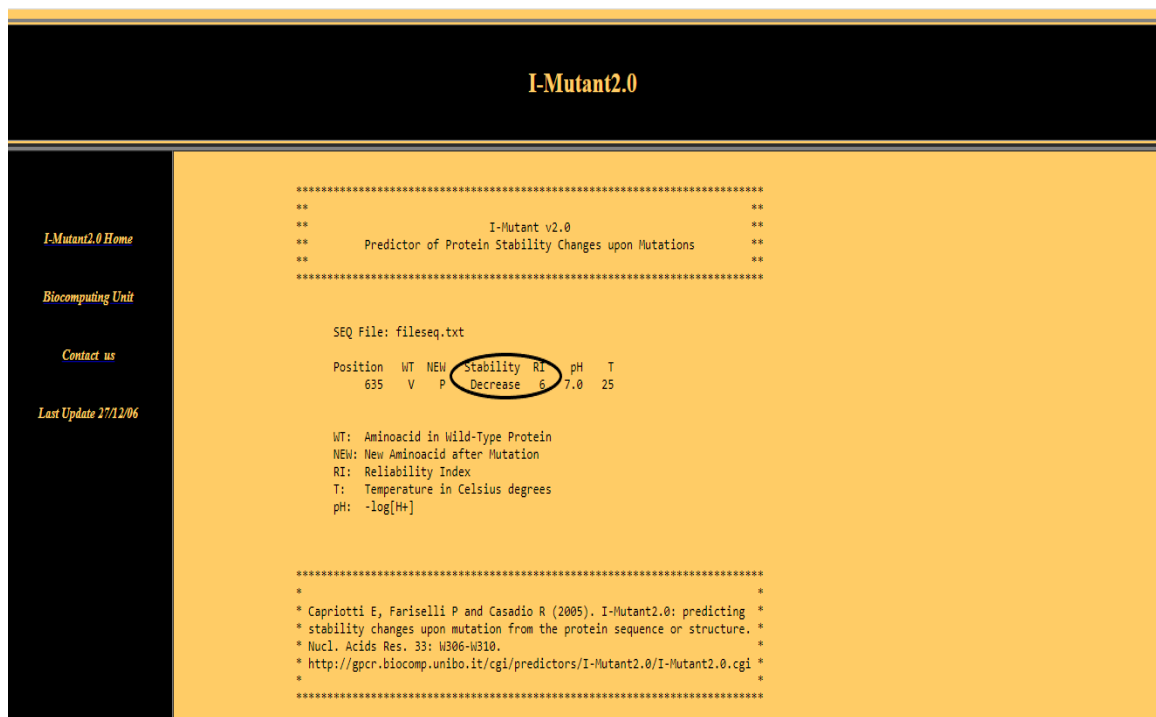
***RÉSULTATS***  
***ET***  
***DISCUSSION***



## 1 Analyse de la mutation exonique c.1903 G > C (p. Ala635pro)

### 1.1 Résultat obtenu par le logiciel I-Mutant 2.0

Le logiciel I-Mutant 2.0 donne l'estimation de la différence d'énergie libre  $\Delta\Delta G$  entre la protéine normale et mutée. L'analyse de la mutation exonique c.1903 G > C sur la stabilité de la protéine RB dans ce logiciel annoté dans la figure suit.

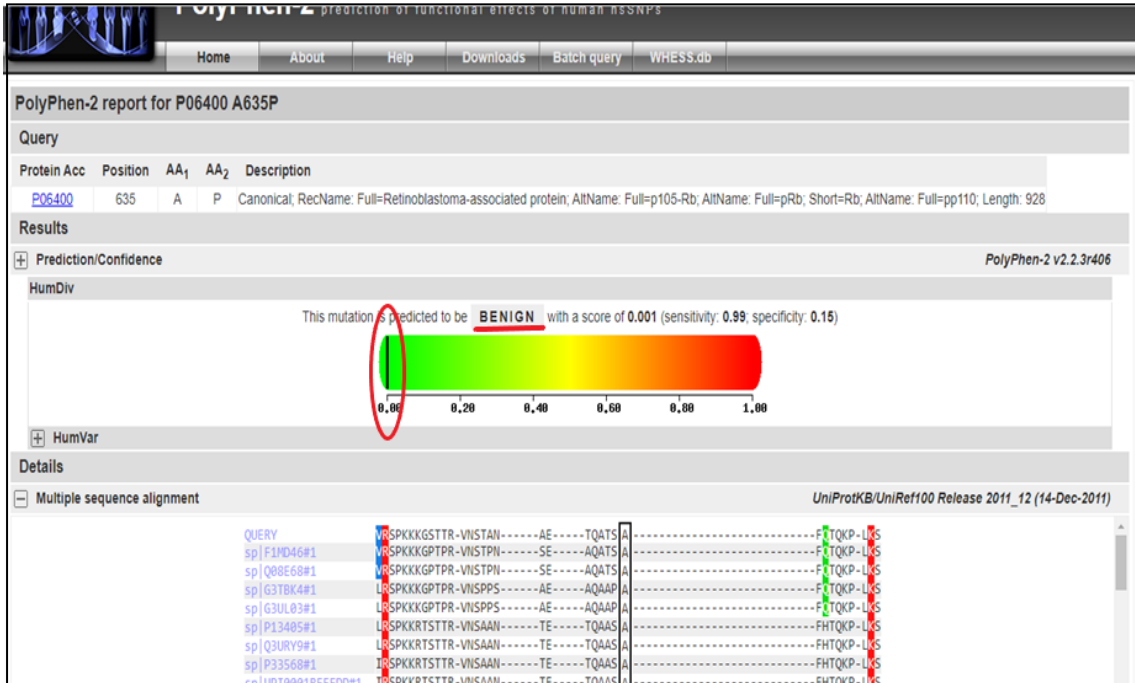


**Figure 19:** Résultat obtenu par logiciel I-Mutant 2.0 de la mutation exonique c.1903 G > C (p. Ala635pro).

Après l'analyse des résultats de ce logiciel la valeur  $\Delta\Delta G$  calculée est négative (**Stability Decrease**) on peut le dire la mutation analysée est évaluée comme déstabilisatrice de la protéine RB.

### 1.2 Résultat obtenu par le logiciel polyphen-2

On utilise le logiciel polyphen-2 pour la prédiction de l'impact de la mutation exonique c.1903 G > C (p. Ala635pro). La figure suivante comprend les résultats d'analyse.



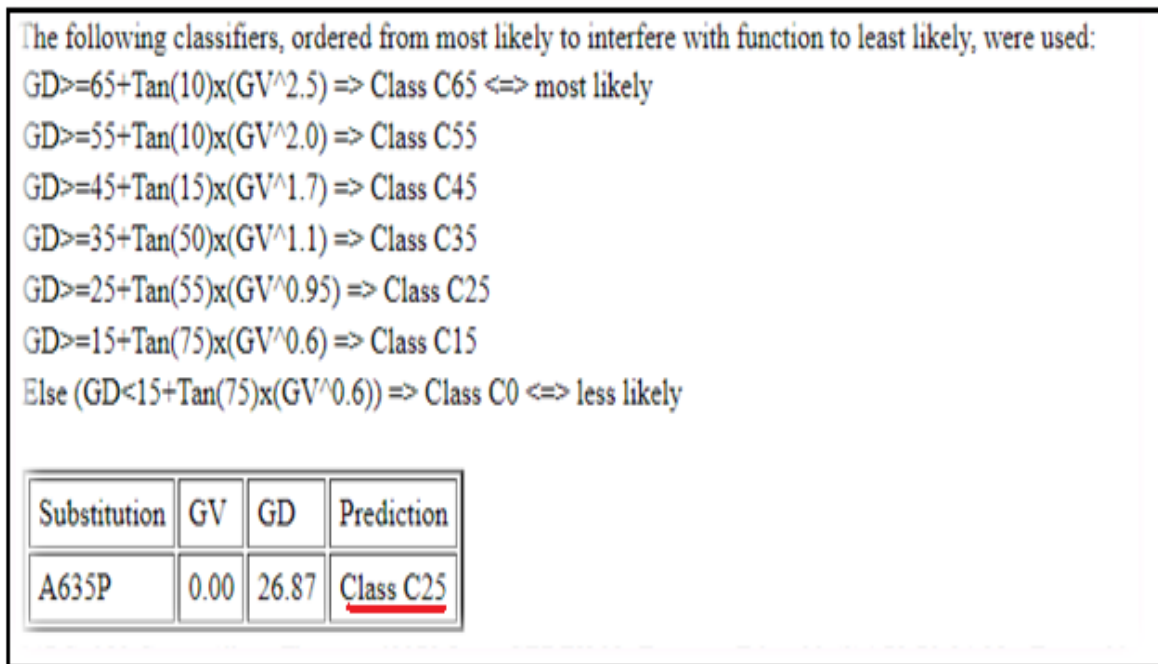
**Figure 20** : Résultat obtenu par logiciel polyphen-2 de la mutation exonique c.1903 G> C (p. Ala635pro).

Le résultat de la prédiction de l'effet de la mutation exonique c.1903 G> C (p. Ala635pro) sur la protéine **pRb** par ce logiciel comme (**BENIGN**), qui ne signifie pas d'impact sur la structure et fonction protéique. Le logiciel polyphen-2 obtenir aussi le résultat de multiple séquence alignement par la comparaison de la protéine **pRb** avec toutes les espèces enregistrées sur UniProtKB (the uniport knowledge base).

Ce dernier confirmé que la mutation varie entre plusieurs espèces et pas confiner dans une région conservée.

### 1.3 Résultat obtenu par logiciel Align-GVGD

Le logiciel Align-GVGD utilisé pour la prédiction de l'impact de substitution de la mutation exonique c.1903 G>C (p. Ala635pro) sur la protéine pRB. La figure suivante présenté attentivement le résultat de ce logiciel.

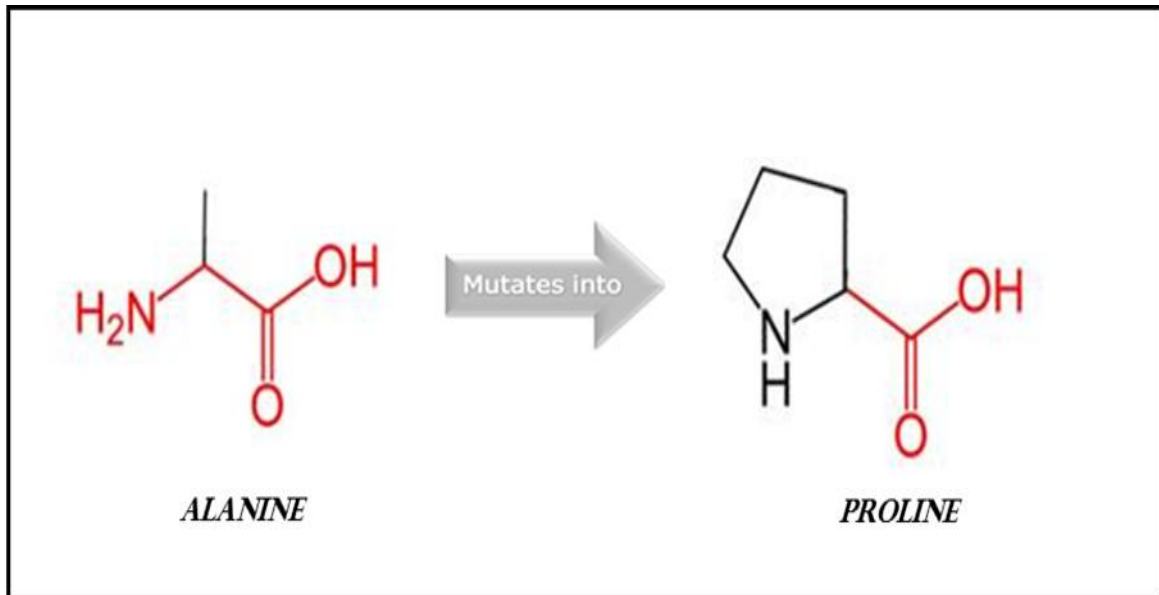


**Figure 21** : Résultat obtenu par le logiciel Align-GVGD de la mutation exonique c.1903 G>C (p. Ala635pro).

Après analyse de résultat nous concluons que le logiciel Align-GVGD permis de calculer la valeur de la variation de Grantham GV qui égale à 0.00 et la valeur d'écart de Grantham GD entre les sauvages et mutée qui égale 26.87. Alors ce logiciel a permis de prédire la mutation exonique c.1903 G>C (p. Ala635pro) correspond à la classe C25 qui indiquant cette Substitution n'affecté pas la fonction de la **pRb**.

#### 1.4 Résultat obtenu par logiciel *Project HOPE*

La mutation c1903 G>C résulte de remplacement de l'acide aminé Alanine en position 635 par l'Aa Proline (A635P), la figure ci-dessous montre les structures schématiques de l'acide aminé d'origine (Alanine) à gauche et du mutant (proline) à droite. Le squelette qui est le même pour chaque acide aminé, est coloré en rouge. La chaîne latérale, unique pour chaque acide aminé, est colorée en noir.

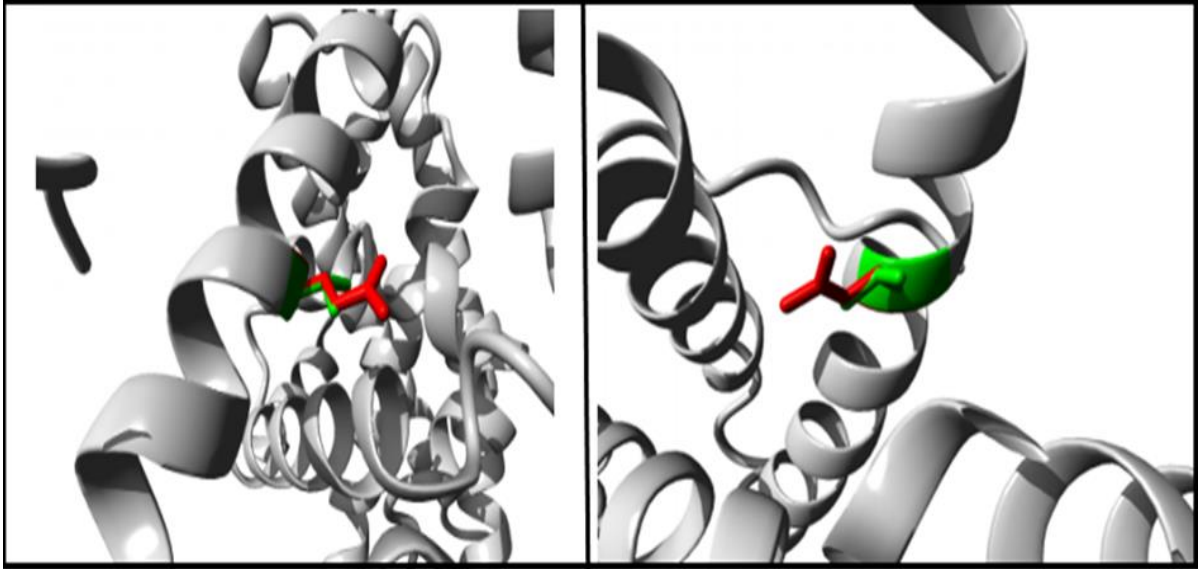


**Figure 22 :** Les structures schématiques de l'alanine et Proline.

**Tableau 3 :** Résumées les propriétés physicochimiques de Alanine et Valine.

Résidu	Le type	La taille	La charge	L'hydrophobicité
<b>Alanine</b>	Acide	89Da	Neutre	1,8
<b>Proline</b>	Neutre	115Da	Neutre	-1,6

Chaque acide aminé a sa propre taille, sa charge et sa valeur d'hydrophobicité. Le résidu original de type sauvage et le résidu mutant nouvellement introduit diffèrent souvent par ces propriétés. Le résidu mutant (Proline) est plus grand et plus hydrophobe que le résidu de type sauvage (Alanine). La différence de propriétés entre le type sauvage et la mutation peut facilement entraîner une perte d'interactions avec le ligand parce que la liaison au ligand est souvent importante pour la fonction de la protéine, cette fonction pourrait être perturbée par cette mutation.



**Figure23** : Schématisation superposée des deux structure 3Dde la **pRb** sauvage et mutée.

### 1.5 Discussion de la mutation exonique c.1903 G >C (p. Ala635pro)

Dans cette étude, nous sommes intéressées à l'étude *in silico* des fonctionnalités des mutations exonique c.1903 G>C (p. Ala635pro) du gène **RB1** au niveau protéique par l'utilisation de différents logiciels de Prédiction.

Les effets délétères des mutations sur la structure/fonction de la protéine pRb ont été prédits en utilisant plusieurs logiciels de prédiction : I-Mutant 2.0, Polyphen-2, Project HOPE, Align-GVGD.

Les résultats obtenus par le logiciel I-Mutant 2.0 et polyphen 2 sont en faveur d'un effet déstabilisant des mutations sur la protéine. L'analyse avec Align GVGD qui considérée cette mutation comme interférer moins probablement avec la fonction.

Les informations concernant les propriétés physico-chimiques des Aa suite à une mutation faux-sens ont été prédit par Project HOPE. Concernant la taille du résidu muté des trois variations est plus grande que le résidu sauvage.

Cette différence pourrait engendrer un changement de conformation de la protéine ce qui pourrait entraîner un changement au niveau de la structure et la fonction de la protéine.

Cette déférence peut avoir un impact seulement sur la structure de **pRb**. Alors la mutations exonique c.1903 G >C (p. Ala 635pro) a été considéré comme un polymorphisme sans aucun impact sur la fonction protéique.

## 2 Analyse de la mutation exonique c1961 T > A (p. Val654Gln)

### 2.1 Résultat obtenu par le logiciel I-Mutant 2.0

L'analyse des effets de la mutation exonique c1961 T > A (p. Val654Gln) sur la stabilité de pRb par le logiciel I-Mutant 2.0 cela explique que la valeur  $\Delta\Delta G$  calculée est négative le résultat est représenté sur la figure suivante.

```

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

SEQ File: fileseq.txt

Position  WT  NEW  stability RI  pH  T
         654  E   Q   Decrease 4   7.0  25

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

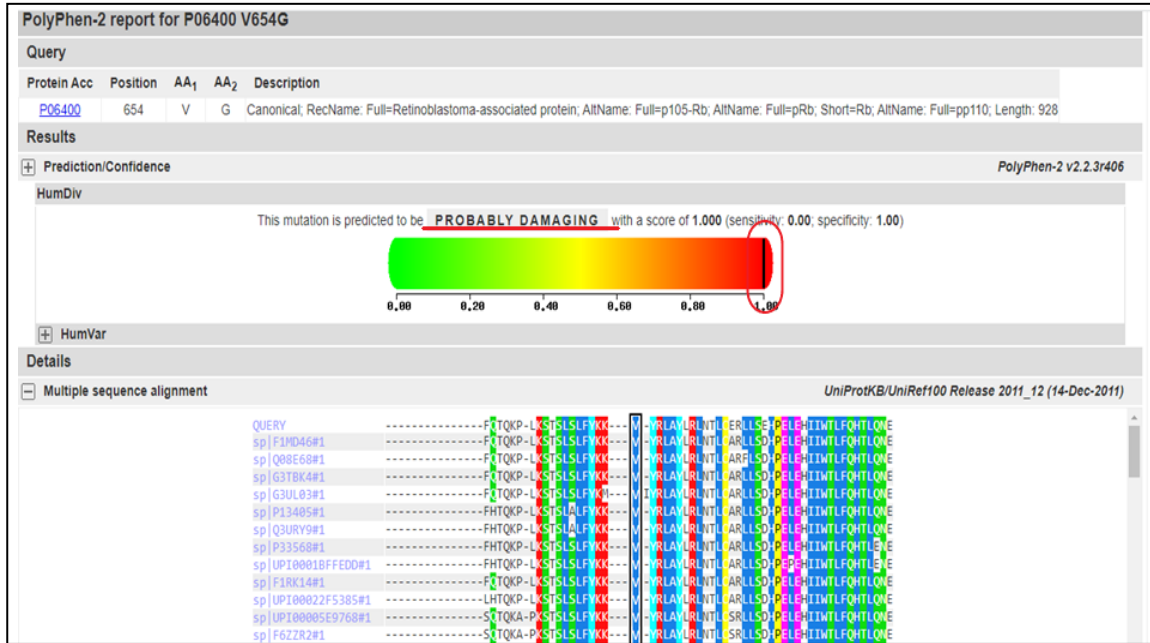
*****
* Capriotti E, Fariselli P and Casadio R (2005). I-Mutant2.0: predicting *
* stability changes upon mutation from the protein sequence or structure. *
* Nucl. Acids Res. 33: W306-W310. *
* http://gpcr.biocomp.unibo.it/cgi/predictors/I-Mutant2.0/I-Mutant2.0.cgi *
*****

```

**Figure 24:** Résultat obtenu par le logiciel I-Mutant 2.0 de la mutation exonique c1961 T >A (p. Val654Gln).

### 2.2 Résultat obtenu par logiciel polyphen-2

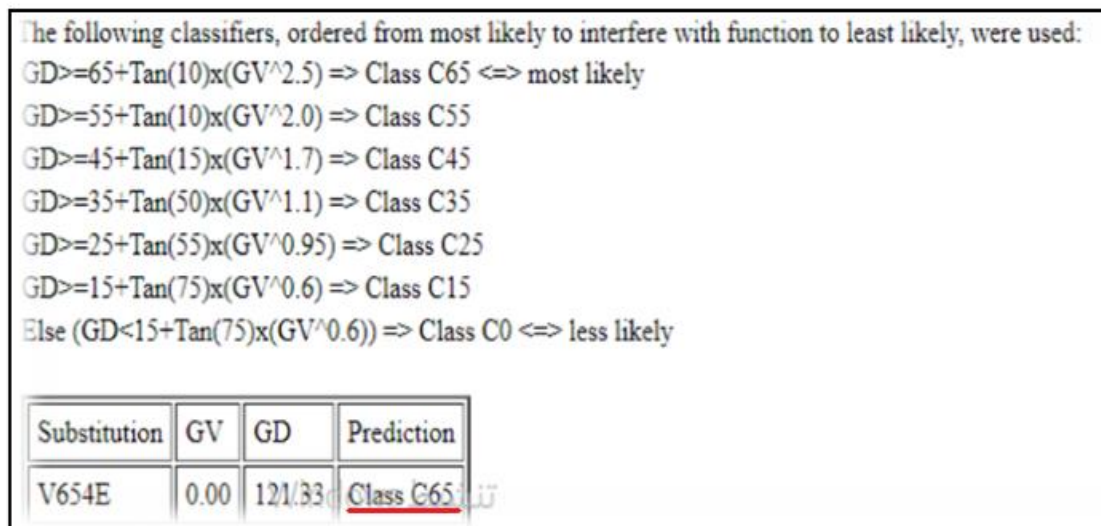
Le Résultat obtenu par le logiciel polyphen-2 prédit que la mutation exonique c1961 T >A impacte sur la structure et la fonction protéique à travers une signification suivante (**PROBABLY DAMAGING**).



**Figure 25 :** Résultat obtenu par le logiciel polyphen-2 de la mutation exonique c1961 T> A (p. Val654Gln).

### 2.3 Résultat obtenu par logiciel Align-GVGD

La figure suivante obtenu le résultat de l'analyse de de la mutation exonique c1961 T> A (P. Val654Gln) par logiciel Align-GVGD.

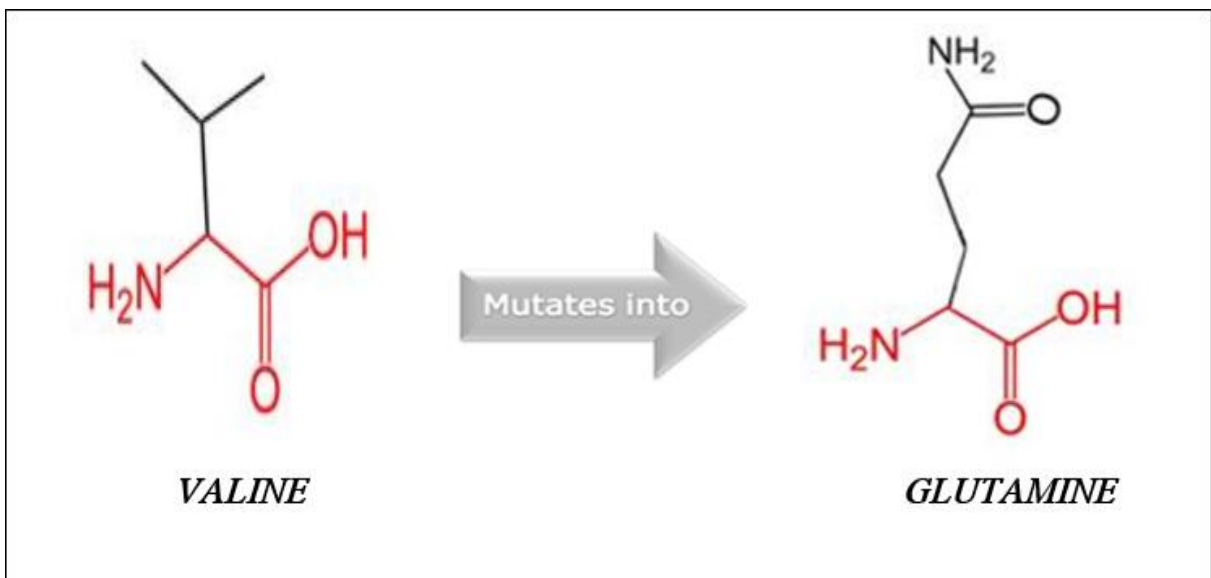


**Figure 26 :** Résultat obtenu par le logiciel Align-GVGD de la mutation exonique c1961 T>A (p. Val654Gln).

L'analyse de la mutation exonique c1961 T>A (p. Val654Gln) par ce logiciel donne les calculs des valeurs GV et GD (0.00,121.33) successivement, entre les sauvages et mutées, et classer la substitution dans la classe C65 qui correspond cette dernière affectent la fonction de la **pRb**.

#### 2.4 Résultat obtenu par logiciel Project HOPE

La mutation c1961 T>A résulte de remplacement de l'acide aminé Valine en position 654 par l'Aa Glutamine (V654Q), la figure ci-dessous montre les structures schématiques de l'acide aminé d'origine (Valine) à gauche et du mutant (Glutamine) à droite. Le squelette qui est le même pour chaque acide aminé, est coloré en rouge. La chaîne latérale unique pour chaque acide aminé, est colorée en noir.



**Figure 27 :** Les structures schématiques de Valine et Glutamine.

Valine est un acide aminé non polaire avec une chaîne latérale hydrophobe composée de trois atomes de carbone. Sa structure est relativement simple, avec un groupe méthyle (CH<sub>3</sub>) attaché à l'un des atomes de carbone de la chaîne latérale.

En revanche, la glutamine est un acide aminé polaire avec une chaîne latérale plus complexe qui contient un groupe amide (NH<sub>2</sub>) ainsi qu'un groupe carboxyle (COOH). Ces



groupes fonctionnels peuvent former des liaisons hydrogène avec d'autres molécules polaires, ce qui rend la glutamine plus soluble dans l'eau que la valine.

Ces différences structurelles peuvent affecter la fonction et la stabilité de la protéine par exemple, si la mutation remplace une valine par une glutamine dans une région clé de la protéine, cela peut perturber l'interaction de la protéine avec d'autres molécules ou altérer sa conformation globale.

**Tableau 4 :** Résumées les propriétés physicochimiques de Valine et Glutamine.

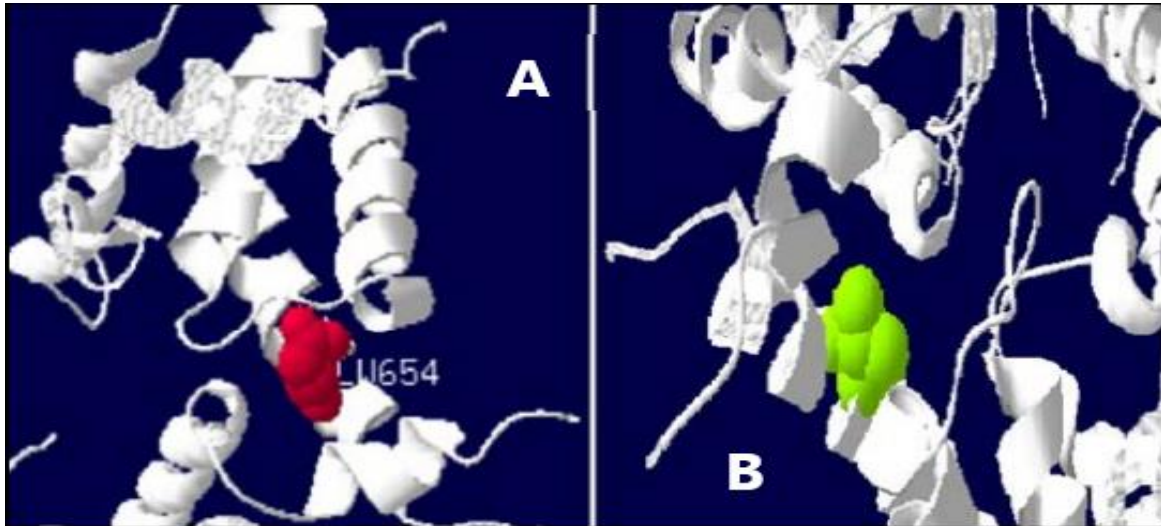
Résidu	Le type	La taille	La charge	L'hydrophobicité
<b>Valine</b>	Neutre	117Da	Positive	4,2
<b>Glutamine</b>	Neutre	146Da	Neutre	-3,5

Chaque acide aminé a sa propre taille, sa charge et sa valeur d'hydrophobicité. Le résidu original de type sauvage et le résidu mutant nouvellement introduit diffèrent souvent par ces Propriétés. Le résidu mutant (Glutamine) est plus grand et plus hydrophobique que le résidu de type sauvage (Valine). La différence de propriétés entre le type sauvage et la mutation peut facilement entraîner une perte d'interactions avec le ligand parce que la liaison au ligand est souvent importante pour la fonction de la protéine, cette fonction pourrait être perturbée par cette mutation.

### 2.5 Résultat obtenu par logiciel swiss pdb viewer

La mutation exonique c1961 T>A (p. Val654Gln) et une modification génétique qui affecte la structure d'une pRb, dans ce cas nous analysons les résultats de cette mutation à l'aide du logiciel swiss pdb viewer qui permet de visualiser en 3D la structure des protéines et prédire les effets de mutations sur leur fonction et leur stabilité.

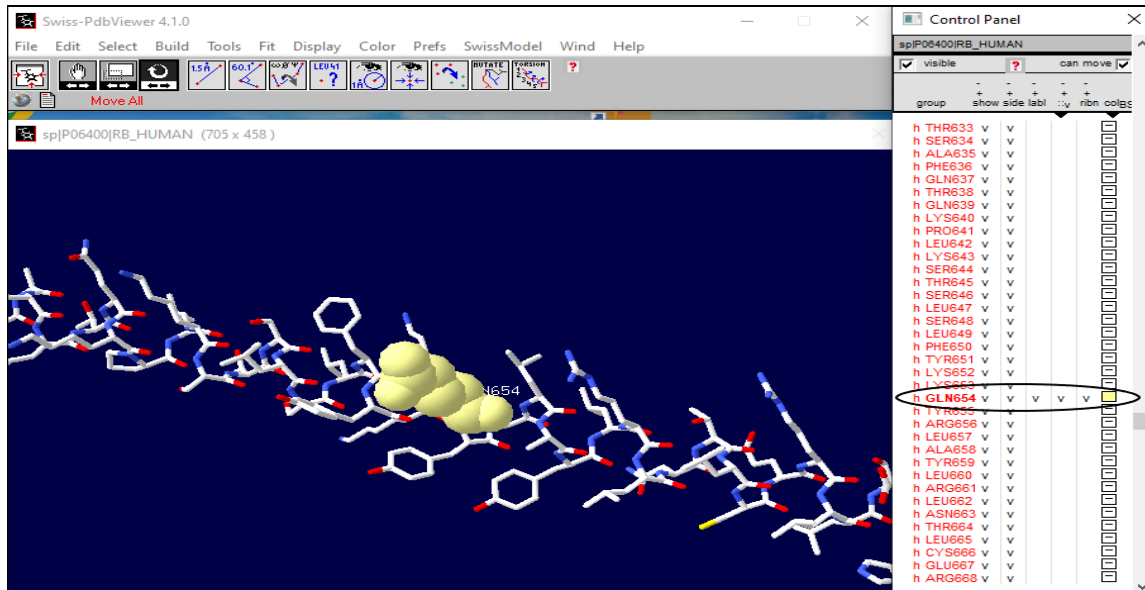
L'analyse de cette mutation peut fournir des informations importantes sur la façon dont elle affecte la protéine.



**Figure28** : La structure 3D de protéine **Rb** normale **A** et mutée **B**.

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 **pRb** est représentée cette figure. La substitution de La valine en position 654 en glutamine se trouve au niveau du domaine B.

Les résultats de la modélisation de cette protéine sur logiciel swiss pdb viewer donne la structure 3D dans la figure suivant.



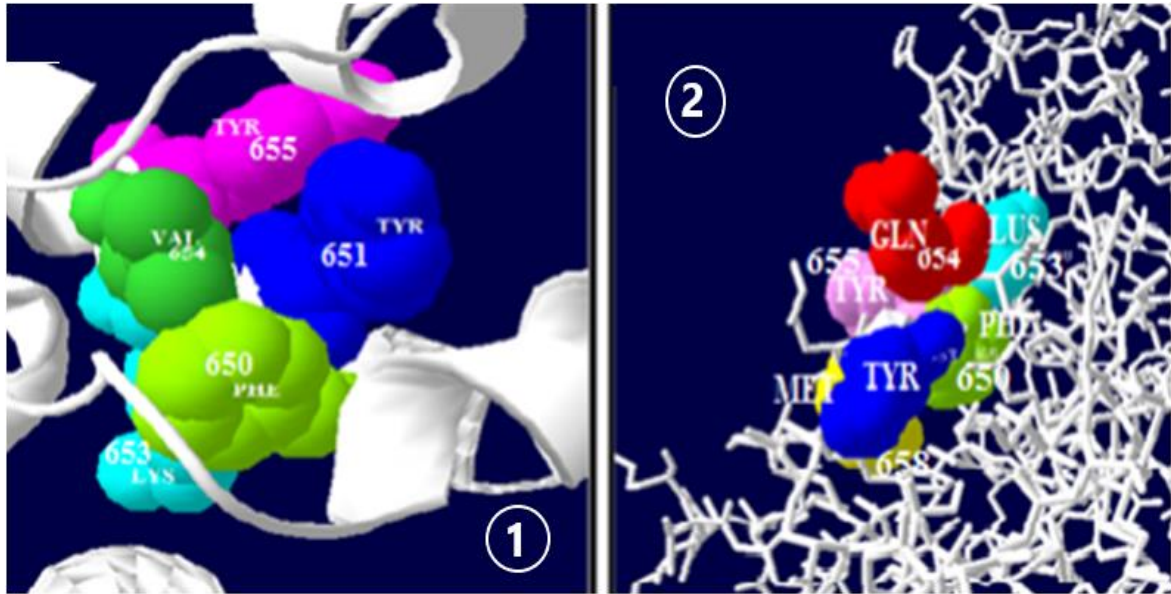
**Figure29** : La structure 3D de protéine **Rb** mutée.

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.

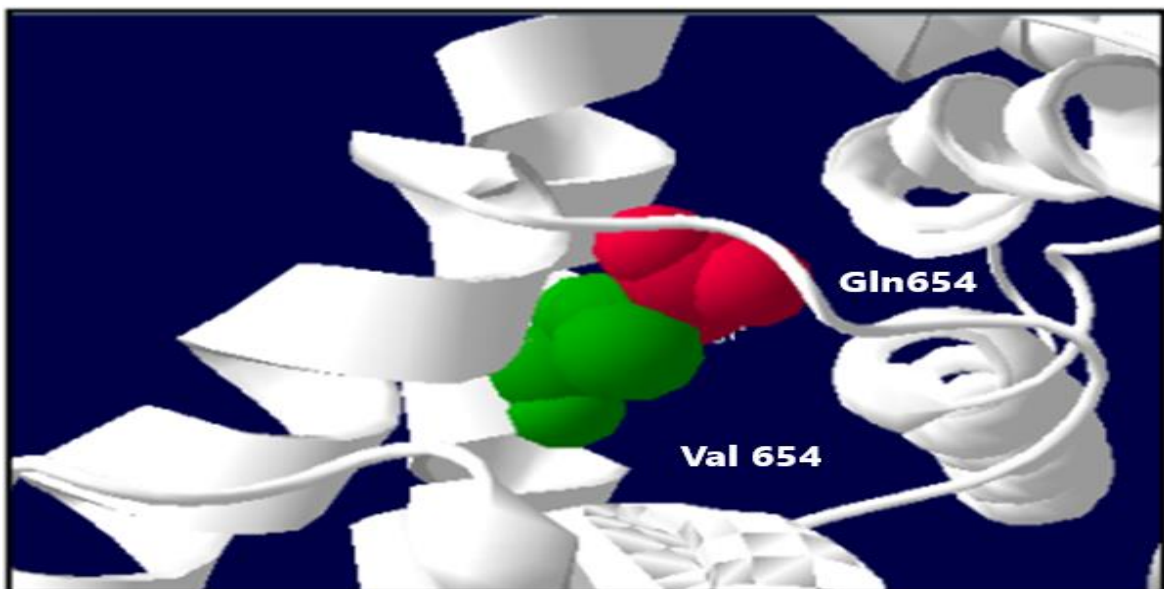
2. La valine au niveau de la protéine native interagit avec quatre Aa (Phénylalanine 650 ; Tyrosine 651 ; Lysine 653 ; Tyrosine 655) (**figure1**). Par contre, l'Aa Glutamine interagit en plus de quatre Aa avec la Méthionine en position 558 (**Figure2**).

Cette nouvelle interaction avec une liaison hydrogène pourrait entrainer un changement au niveau de la conformation de la protéine qui aura un impact sur sa structure ainsi que sa fonction.



**Figure 30 :** Représentation des interactions de l'Aa valine 654 avec les quatre Aa au niveau de la protéine native (1) et l'Aa glutamine 654 avec les quatre Aa au niveau de protéine mutée (2).

La superposition des deux Aa native et mutée a été réalisée par le logiciel Swiss pdb Viewer. Ce figure 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 31 :** Capture superposée des deux structures 3D de la protéine pRb sauvage et mutée.

## 2.6 Discussion de la mutation exonique c1961 T> A (p. Val654Gln)

Dans cette étude nous sommes intéressées à l'étude in silico des fonctionnalités des mutations exoniques c1961 T>A (p.Val654Gln) du gène RB1 au niveau protéique par l'utilisation de différents logiciels de Prédiction.

Les résultats obtenus par les trois premiers logiciels (I-Mutant 2.0, polyphen2.align GVG) qui sont favorables et prédisent l'effet déstabilisant et délétère de cette mutation sur la fonction de pRb.

En perturbant son domaine de liaison à l'ADN et en compromettant sa capacité à remplir son rôle dans la régulation de la croissance cellulaire. Ces résultats soulignent l'importance de la surveillance génétique pour détecter les mutations associées au rétinoblastome et d'autres maladies génétiques, et suggèrent que des interventions thérapeutiques ciblant la protéine **pRb** pourraient être bénéfiques pour les patients atteints de cette maladie.

Le logiciel Project HOPE analyse les conséquences de la mutation faux sens sur la structure et les propriétés physico-chimiques et les changements des acides aminés dans le cas de cette mutation. Le résidu muté est plus grand et moins hydrophobe que le sauvage, ces différences peuvent perturber la fonction de la protéine pRb en modifiant sa conformation et en abolissant sa flexibilité.

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

### 3.1 Résultat obtenu par logiciel HSF

Analyse de la mutation c.1215 + 1G>A par la comparaison entre les deux séquences sauvage et mutée de gène Rb1a à l'aide de ce logiciel. Le tableau suivant résume les résultats.

**Tableau 5** : Résultat de l'analyse de la mutation c.1215+1 G>A obtenu 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	TTTAAcGtaagcc	ttttaacataagCC	76.14	76.21	NA	+0.09
117	c.1213	Donor	AACgtaagc	AACataagc	85.86	59.02	0	WT site broken -31.26

**Figure 32** : Résultat de l'analyse de la mutation c.1215+1 G>A par HSF.

Logiciel HSF donné la prédiction de l'abolition du site donneur d'épissage et absence de l'activation de site cryptique dans cette région.

### 3.2 Résultat obtenu par logiciel ESE Finder

L'analyse de la mutation c.1215 + 1G>A à l'aide du ESE Finder est démontrée dans la figure suivant. Selon la comparaison entre la séquence normale et mutée du gène **RB1** par le ESE Finder, il a été prédit que la fixation des deux protéines SR, SRp40 et SRp55, serait abolie. Cette observation a une signification importante dans le contexte de la fonction du gène **RB1**.



**Figure 33 :** Distribution des protéines SR dans la séquence de référence du gène RB1 et la séquence mutée c.1215 + 1G>A.

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

L'analyse des effets de la mutation c.1215 + 1G>A sur l'épissage par les deux logiciels HSF et ESE Finder.

L'épissage est un processus crucial dans la régulation de l'expression génique et la production de protéines fonctionnelles. Les mutations qui affectent l'épissage peuvent entraîner des conséquences graves, telles que des maladies génétiques et des cancers.

Dans le cas de la mutation c.1215+1G>A, l'abolition du site donneur d'épissage et des sites de liaison de protéines SR entraîne un épissage aberrant de l'ARNm, conduisant à la production d'une protéine tronquée non fonctionnelle.

La conséquence de cette mutation est le saut de l'exon 12 en utilisant le site donneur d'épissage de l'exon 11 et le site accepteur d'épissage de l'exon 13. La mutation est située dans la boîte A de la poche **pRb** qui contient des séquences distinctes requises pour la liaison du médiateur de l'arrêt du cycle cellulaire induit par E2F et se lie directement à l'histone désacétylase1 (HDAC1), qui est requis pour plusieurs facteurs de remodelage de la chromatine qui participent à la répression transcriptionnelle des gènes cibles d'E2F, le saut de l'exon 12.

L'analyse a laide FSH prédite que la mutation provoque une abolition du site donneur d'épissage et ESE Finder prédite que ce dernier responsable de la suppression des sites de laissant des SRp40 et SRp55.



# ***CONCLUSION***

Cette étude a également permis d'identifier les nouvelles mutations dans le gène **RB1** chez des patients atteints de rétinoblastome en Algérie. Les résultats obtenus ont contribué à améliorer la compréhension de cette maladie héréditaire et à mieux caractériser les altérations génétiques responsables de son développement. Ces résultats pourraient également avoir des implications pour le développement de nouveaux traitements ciblant les voies de signalisation impliquées dans la progression du rétinoblastome.

La mutation exonique c.1903 G>C (p. Ala635pro) aux niveaux l'exon 19 qui considéré comme polymorphisme avec aucun effet sur la fonction de protéine. L'autre mutation exonique c.1961 T>A (p.Val654Gln) aux niveau l'exon 20 qui responsable d'un saut de l'exon 12 qui se traduit par une protéine non fonctionnelle. La mutation intronique c.1215+1 G>A aux niveaux l'exon 12 qui provoque l'abolition du site donneur d'épissage et des sites de liaison de protéines SR qui arête le cycle cellulaire qui induit par E2F.

En outre, cette étude souligne l'importance de la détection précoce du rétinoblastome chez les enfants, en particulier dans les régions où les ressources médicales sont limitées. La connaissance des mutations génétiques associées à la maladie peut permettre une meilleure surveillance des patients à risque et une prise en charge plus efficace de la maladie.

***RÉFÉRENCES  
BIBLIOGRAPHIQUE***

- [1] Castera, L., C. Dehainault, D. Michaux, L. Lumbroso-Le Rouic, et al. (2012). "Fine mapping of whole RB1 gene deletions in retinoblastoma patients confirms PCDH8 as a candidate gene for psychomotor delay " Eur J Hum Genet: accepté pour publication.
- [2] M. Boubekour A, Louhibi L, Mahmoudi K, et al (2017).Analyse du gene RB1 chez des patients atteints de rétinoblastome; Analysis of the RB1 gene in patients with retinoblastoma in the Algerian population . Université des Sciences et de la Technologie d’Oran USTO MB, JFMO page 2-8.
- [3] Mahmoudi K. Epidémiologie du rétinoblastome.(2012). Journée pédiatrique de Canastel.
- [4]Doz F, Brisse H, Stoppa-Lyonnet D, Pinkerton R, Polnman PN, Pieters R. Retinoblastoma.(2004).Edition Paediatric Oncology.P323.
- [5] Valverde J, Alonso J, Palacios I, Pestana A.(2005).RB1 gene mutation update, a meta-analysis based on 932 reported mutations available in a searchable database. BMC Genetics. 6 : 53-61.
- [6] M. Maka daiby.(2012). Etude retrospective du rétinoblastome intraoculaire. A propos de 32 cas. Universités Bamako. P 13-62.
- [7] Reese AB, Ellsworth R.(1963).The evaluation and current concept of retinoblastoma therapy. Trans Am Acad. Ophtalmo Otolaryngol.67 :164–72.
- [8] Beaverson K, Abramson DH, Lee TC .(2001).Retinoblastoma: Presentation and outcome. Xth International Congress of Ocular Oncology, Amsterdam,202.
- [9] (2018). Retinoblastoma ST. Jude children’s Research Hospital.
- [10] (2023). Société canadienne du cancer.
- [11] Maïga Assétou Yamadou Sidibé.(2022). Etude des caractéristiques épidémiologiques, cliniques et anatomopathologiques des rétinoblastomes à Bamako.p4.
- [12] Hunter T.(1997).Oncoprotein networks. Cell,88 :333-46.
- [13] Uma M Sachdeva, Joan M O’Brien. (2012).Understanding pRb: toward the necessary development of targeted treatments for retinoblastoma. J Clin Invest, 1 ;122(2) :425-34.

- [14] Radvanyi M, Golmard L, Matet A. (2022). Rétinoblastome – aspects moléculaires et cellulaires. *Oncologie Oculaire*.
- [15] Dr. Knudson. (August 9, 1922 – July 10, 2016). Knudson's "Two-Hit" Theory of Cancer Causation. Fox Chase Cancer Center Main Campus.
- [16] Andrew Read, Dian Donnai . (2008), *Génétique médicale de la biologie à la pratique clinique*, de Boek supérieur. P312 ,333 Cottman Avenue Philadelphia, P19111-2497.
- [17] Hong F D, Huang H J ,Young L J,Oro A, Bookstein R . (1989).Structure of the human retinoblastoma gene. *National Academy of Sciences*.
- [18] Sager R.(1986). Genetic suppression of tumor formation: a new frontier in cancer research. *Cancer Res. Apr;46(4 Pt 1):1573–1580*. [PubMed] [Google Scholar].
- [19] Hassler M , Singh S,Yue W W, Luczynski M , Lakbir M. (2007). Crystal Structure of the Retinoblastoma Protein N Domain Provides Insight into Tumor Suppression Molecular Cell Ligand Interaction, and Holoprotein Architecture, –ElsevierP371-385r.
- [20] Sept. (2022). *Les inhibiteurs du cycle cellulaire*. ArcagyGineco.
- [21] Sherr CJ.(1996).Cancer cell cycles, *Sciences* 274: 1672-1677.
- [22] Admunson SA et al .(1998). Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress., *Oncogene*, 17: 3287-3299.
- [23] Singh N, ... Dyson N. (2013).Retinoblastoma Protein (pRB), *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)*.
- [24] Luscomb NM, Greenbaum, Gerstein M .(2001). National Library of Médecins. What is bio-informatique? À proposed definition and overview of the field. PubMed.
- [25] Boubekeur A, Louhibi L, Mahmoudi K, Boudjema A, Mehtar N. (2017). Analyse du gène RB1 chez les patients atteints de rétinoblastome dans la population Algérienne. *Journal de la faculté de médecine d'Oran* p57.63.

- [26] Boubekour A, Louhibi L, Mahmoudi K, Boudjema A, Mehtar N . (2017). Screening RB1 Gene in Algerian Patients and Predicting the Pathogenicity of Variations by In Silico Analysis. Journal de la faculté de médecine d'Oran.
- [27] Emidio Capriotti, Piero Fariselli, RitaCasadio. (2005).I-Mutant2.0: predicting stability changes upon mutation from the protein sequence or structure. Nucleic Acids research.
- [28] Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. (2013). Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. CurrProtoc Hum Genet, Chapter 7: Unit7.20 ,PubMed PDF.
- [29] Ramensky V, Bork P, Sunyaev S. (2002). Human non-synonymous SNPs: server and survey. Nucleic Acids Res 30(17) :3894-3900 ,PubMed PDF.
- [30] Sunyaev SR, Eisenhaber F, Rodchenkov IV, Eisenhaber B, Tumanyan VG, Kuznetsov EN. (1999). PSIC: profile extraction from sequence alignments with position-specific counts of independent observations. ProteinT Eng 12(5) :387-394 PubMed PDF.
- [31] (2023). Huntsman Cancer Institue at the University of Utah.
- [32] Venselaar, H. T. A. te Beek, R. K. Kuipers, M. L. Hekkelman and G. (2010). Vriend. Protein structure analysis of mutations causing inheritable diseases. An e-Science approach with life scientist friendly interfaces. J BMC bioinformatics .11(1): 548.
- [33] Venselaar H, Te Beek TA, Kuipers RK, Hekkelman ML, Vriend G. (2010).BMC Bioinformatics.11:548. doi: 10.1186/1471-2105-11-548.
- [34] Nicolas Guex , Alexandre Diemand , Manuel C. Peitsch , & Torsten Schwede . (2019). MacOS Catalina.
- [35] Guex, N. and Peitsch, M.C. (1997).
- [36] SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling.Electrophoresis 18, 2714-2723.
- [37] Guex N, Peitsch MC, & Schwede T. (2009). Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: a historical perspective Electrophoresis, Suppl 1:S162-73.

[38] Schwede T, Kopp J , Guex N and Peitsch MC. (2003).SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server.Nucleic Acids Research 31:3381-3385.

[39] Desmet F O. Hamroun D. Lalande M. Collod-Beroud G. Claustres M. Beroud C.(2009).Nucleic Acids Research.

[40] Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang M Q, Krainer A R (2003).ESE finder: a web resource to identify exotic splicing enhancers. Nucleic Acid Research, 31(13): 3568-3571.

[41] Smith P J, Zhang C, Wang J, Chew S L, Zhang M Q. and Krainer A R. (2006).An increased specificity score matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers.Hum. Mol. Genet. 15(16): 2490-2508.