



**UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH  
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES FES  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE**

**MEMOIRE DE FIN D'ETUDE  
PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME  
DE  
MASTER SCIENCES ET TECHNIQUES  
"BIOTECHNOLOGIE MICROBIENNE "**

**SOUTENUE LE 26-JUIN -2012**

**LE SYNDROME DE RETT  
GÈNE « METHYL-CPG-BINDING  
PROTEIN 2 »**

**Présenté par : ENNAMI Mounia**

**Encadré par : Pr. ELHOUARIE ABDALLAH  
Dr. OULDIM Karim**

**Soutenu le 26 Juin 2012 devant le jury composé de :**

PR. IRAQUI HOUSAINI Mohammed  
PR HAGGOURD Abdelatif  
DR CHAOUKI SANAE  
DR BENNIS SANAE  
PR ELHOUARI ABDALLAH  
DR OULDIM Karim

FST-Fès Examineur  
FST-Fès Examineur  
CHU- Fès Examinatrice  
CHU- FES Examinatrice  
FST- Fès Encadrant  
CHU-Fès Encadrant

# Remerciements

*Je tiens à présenter mon sincère remerciement à Mr. HOUARI Abdallah, professeur de virologie et la biologie moléculaire à la FST Fès, et Mr. OULDIM Karim Professeur agrégé de génétique médicale et d'oncogénétique CHU Fès, pour votre judicieux encadrement, vos conseils qu'ils m'ont prodigués et votre assistance précieuse pendant la rédaction de ce projet en se montrant avec une grande compétence, disponibilité et enthousiasme le plus vif et le plus sincère.*

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à tous les membres de jury qui assistent à la soutenance et évaluent les démarches de ce travail; Mr. IRAQUI Housaini Mohammed, Professeur de la biologie moléculaire à la FST Fès et Mr. HAGGOU Abdelatif, Professeur de la biologie moléculaire et responsable du master Biotechnologie Microbienne à la FST Fès, et Mme. CHAOUKI Sana, professeur agrégée de pédiatrie CHU Fès, et Mme. BENNIS Sanae professeur biologiste en unité de génétique médicale et d'oncogénétique CHU Fès, d'avoir bien voulu accepter d'examiner ce mémoire.*

*Enfin, je remercie tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin, chacun de sa manière, à accomplir ce travail et favoriser son aboutissement. Je les dis que leur amitié m'a honorée.*

# Dédicaces

*Tout d'abord, louange à Dieu seul qui m'a guidé sur le chemin droit tout au long du travail et m'a inspiré les bons pas et les justes réflexes.*

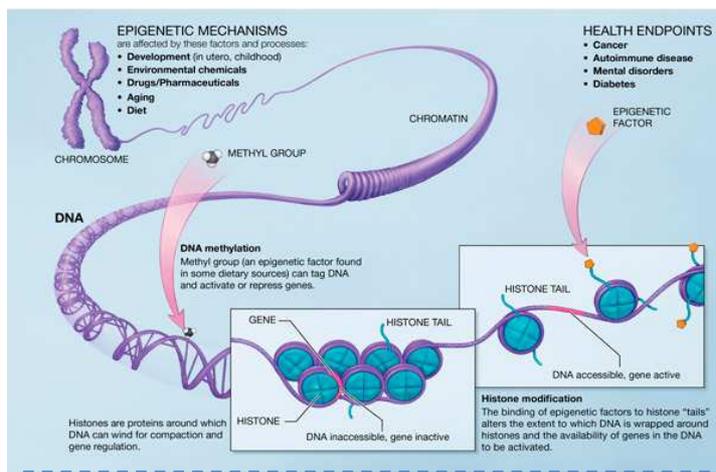
*A mes très chers parents qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour.*

*A ma chère sœur et mon cher frère : pour leur véritable et sincère amour Je leur souhaite, une vie pleine de succès avec beaucoup de bonheur.*

*A L'équipe de l'unité de génétique médicale et d'oncogénétique CHU Fès « ELouthmani Ihsane, ELhamdaoui Hasnae, Samri Imane, Bougnouch Laila, Hanane et Said » mes sincères remerciements pour la facilité de l'entr-aide du bon déroulement de mon stage.*

*A mes meilleurs amis « ELHANAFI Samira, BEKKALI HASSANI Kaoutar » à tous mes collègues « Sara, Fatima zahra, Meryem, Fatima zohra, Rachida et hassan »*

# AVANT PROPOS



**Fig 1 :** Différents niveaux d'organisation de la chromatine  
« Amandine C et al 2009 »

Les différents niveaux de compaction de l'ADN sont représentés de la forme la moins condensée qu'est la double hélice d'ADN libre, à sa forme la plus condensée qui est le chromosome métaphasique.

L'identité de chaque individu est contenue dans son génome. L'être humain possède un patrimoine d'environ 35 000 gènes, hérité de ses parents et porté par l'ADN. De ce génome qui est propre à chacun, est issu un organisme complexe composé de multiples tissus aux particularités uniques.

Ainsi, si nos quelques 10 000 milliards de cellules possèdent tous le même patrimoine génétique, la transcription d'un répertoire de gènes particulier à chaque type cellulaire leur donne une spécialisation phénotypique. C'est l'épigénome qui permet à une cellule d'adapter son programme génétique de manière appropriée. Et, tout comme le matériel génétique, l'information épigénétique doit être préservée ; son altération peut compromettre un retard mental.

Le retard mental concerne 3 % de la population. Ses causes sont très diverses et souvent mal identifiées.

D'importants travaux ont été réalisés ces dernières années pour identifier les causes génétiques des retards mentaux. Le décryptage des bases moléculaires, cytogénétiques ou métaboliques de ces retards mentaux dont près de la moitié ont une origine génétique permet le développement d'outils de diagnostique. Or poser un diagnostique précis peut permettre d'affiner la prise en charge et de préciser le pronostique. Par ailleurs, ces outils moléculaires et cytogénétiques permettront d'aider le conseil génétique qui vise à déterminer les risques de récurrence dans la famille. Sur le plan fondamental, la connaissance des bases moléculaires de ces retards mentaux d'origine génétique permet d'aborder la physiopathologie de ces affections, ce qui constitue la première étape avant la conception de stratégies thérapeutiques.

# Présentation du lieu de stage

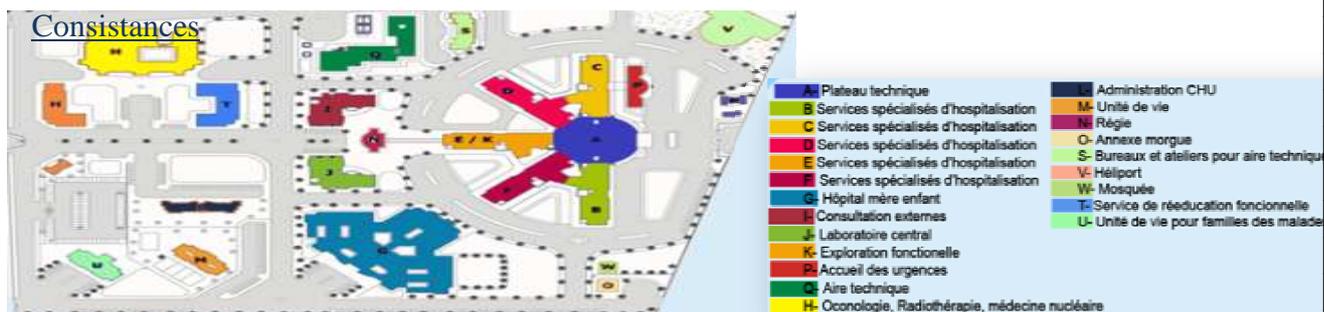
## ☞ Centre Hospitalier Universitaire CHU :

Un centre hospitalier universitaire (CHU) est un hôpital lié à une université, l'hôpital est soit un service de l'université, soit l'hôpital est une entité distincte liée à l'université par une convention. Le CHU peut ainsi permettre la formation théorique et pratique des futurs professionnels médicaux, personnels paramédicaux, et chercheurs en sciences de la santé.

Le Maroc compte cinq CHU opérationnels et deux autres en projet (à Agadir et Tanger) ;

- ✗ Centre Hospitalier Ibn Sina, à Rabat affilié à la Faculté de médecine et de pharmacie de Rabat ➡ Capacité : 2 535 lits ;
- ✗ CHU Ibn Rochd, à Casablanca affilié à la Faculté de médecine et de pharmacie de Casablanca ➡ Capacité : 1 560 lits ;
- ✗ CHU Mohammed VI, à Marrakech affilié à la Faculté de médecine et de pharmacie de Marrakech ➡ Capacité : 915 lits ;
- ✗ CHU d'Oujda, à Oujda affilié à la Faculté de médecine et de pharmacie d'Oujda ;
- ✗ CHU Hassan II, à Fès affilié à la Faculté de médecine et de pharmacie de Fès

## ☞ Centre Hospitalier Universitaire Hassan II :



Le complexe hospitalo-universitaire est construit sur deux tranches :

### \* 1<sup>ère</sup> tranche :

- ☞ Hôpital des spécialités (ABCDEF) ;
- ☞ Hôpital mère et enfant (G) ;
- ☞ Consultations Externes (I) ;
- ☞ Laboratoire central (J).

\* 2ème tranche :

- ☞ Centre d'Oncologie ;
- ☞ Centre de médecine nucléaire ;
- ☞ Hôpital Oncologie et médecine nucléaire.

Capacité litière : 880 Lits  
Surface couverte : 78 102 m<sup>2</sup>  
Assiette foncière : 12 ha  
Coût global : 1 200 Millions D H.

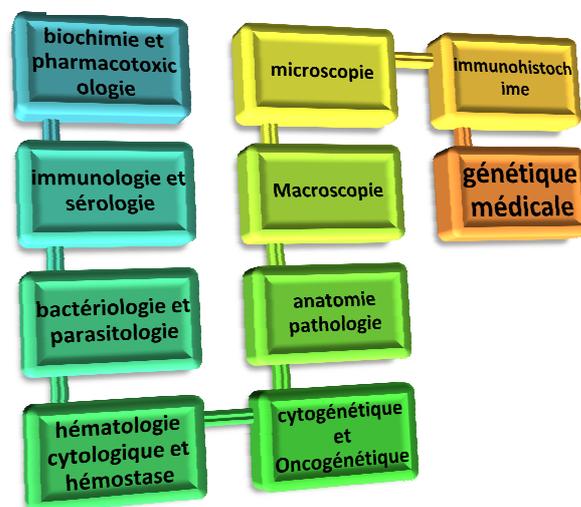


☞ *Laboratoire central l'analyses médicales*

- ☞ Superficie : 2458 m<sup>2</sup> ;
- ☞ 03 niveaux
- ☞ RDC : Accueil ;
- ☞ Salles des prélèvements ;
- ☞ Locaux administratifs.



Présentation des spécialités



L'unité de génétique médicale et d'oncogénétique est subdivisé en trois disciplines (Clinique, cytogénétique et moléculaire). Elle assure des activités variées qui comprennent:

- Génétique clinique (activité clinique) :
  - ☞ Consultation de génétique (au centre du diagnostic) ;
  - ☞ Conseil génétique (au centre du diagnostic) ;
  - ☞ Consultation d'oncogénétique (au centre du diagnostic) ;
  - ☞ Avis du médecin généticien dans les services cliniques.
- Génétique chromosomique (analyse des chromosomes) :
  - ☞ Cytogénétique classique (caryotype) ;

Cytogénétique moléculaire (FISH : Hybridation In Situ en Fluorescence) ;

- ☞ Génétique moléculaire (analyse des gènes : PCR, électrophorèse, séquençage...).

# Table de matière

Remerciements

Dédicaces

Avant propos

Présentation du lieu de stage

## **PARTIE I: INTRODUCTION GENETALE**

### **Chapitre I: PRÉSENTATION CLINIQUE DU SYNDROME DE RETT**

1. Historique .....	1
2. Maladies génétiques liées au chromosome X .....	1
2.1. Caractéristique du chromosome X.....	2
2.2. Gènes localisées sur le chromosome X .....	2
3. Définition du syndrome de Rett.....	4
4. Epidémiologie.....	4
5. Critères de diagnostiques.....	5
5.1. Syndrome de Rett atypique .....	5
5.1.1. Les six critères principaux .....	5
5.1.2. Les onze critères secondaires .....	5
5.1.3. Autres : troubles comportementaux fréquemment observés à certaines périodes de la maladie mais non spécifiques.....	6
5.2. Syndrome de Rett typique.....	6
5.2.1. Les critères nécessaires sont .....	6
5.2.2. Les critères d'appui au diagnostique comprennent .....	7
5.2.3. Les critères d'exclusion ont été définis. Ils correspondent à .....	7
6. Evolution .....	7
6.1. Stagnation d'apparition précoce .....	7
6.2. Régression « destruction » rapide .....	8
6.3. Stabilisation apparente .....	8
6.4. Détérioration motrice tardive .....	8

### **Chapitre II : PRÉSENTATION GÉNÉTIQUE DU SYNDROME DE RETT**

1. Profil d'Inactivation du Chromosome X.....	9
2. Implication de MeCP2 dans la différenciation et la maturation neuronale.....	10
3. Fonction et structure de MeCP2.....	10
3.1. Structure de MeCP2 .....	10
3.2. Identification de MeCP2 et de ses isoformes.....	11
3.3. Domaines associés à la fonction de MeCP2.....	13
3.3.1. MBD methyl-CpG binding domain.....	13
3.3.2. TRD methyl-CpG binding domain .....	14
3.4. Régulation de l'expression de MeCP2 .....	15
4. Fonctions biologiques de MeCP2.....	16
4.1. Répression de la transcription.....	16
4.1.1. Répression par dé-acétylation des Histones dépendante.....	16
4.1.2. Répression par Méthylation des histones dépendante.....	17
4.1.3. Autre type de répression de la transcription .....	18
5. Différentes mutations de MECP2.....	19

6. Identification de gènes ciblés par la protéine MeCP2.....	20
Conclusion.....	21

## **PARTIE II : MATERIEL & METHODES**

Prélèvement des patients .....	22
1-1. Choix et description des patients prélevés .....	22
2. Préparation des prélèvements au laboratoire.....	23
2-1.l'extraction d'ADN génomique sur suspension cellulaire .....	23
2-1-1*Extraction d'ADN par SEL .....	23
a. Lyse des globules rouges.....	24
b. Lyse des globules blancs.....	24
c. Dénaturation et précipitation des protéines et impuretés.....	24
d. Précipitation et lavage de l'ADN.....	24
2-1-2* Extraction d'ADN par KIT commercialisé .....	25
a .La fixation d'ADN.....	25
b .La digestion par protéase .....	27
c. Lavage d'ADN .....	27
d. L'éluion d'ADN .....	28
2-2 Dosage d'ADN extrait.....	28
2-3 Amplification des séquences nucléotidiques par réaction en chaîne par polymérisation (PCR) .....	29
2-3-1 Principe de la PCR.....	29
2-3-2 Les réactifs de la PCR.....	29
2-3-3 Principe de l'amplification d'ADN par la technique PCR.....	31
2-3-4 Limites de la PCR .....	32
Amplification par PCR du gène MECP2.....	33
1 Conservation des réactifs .....	33
2 Préparation des réactifs secondaires.....	33
2-1dNTP 2,5 mM .....	33
2-2 Préparation des ADN .....	34
2-3 Préparation des amorces .....	34
3 Préparation du mélange réactionnel de PCR.....	36
3-1Procédure .....	36.
4 Réaction d'amplification par PCR .....	37
4-1Procédure .....	37
5 Visualisation du produit PCR par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% : .....	40
5-1Principe .....	40
5-2 Protocole expérimental.....	40
6 Séquençage de l'ADN.....	41
6-1 Principe .....	41
6-2 Protocole expérimental .....	41
1 Purification d'ADNpar ExoSAP .....	42
2 Préparation des amorces (Forward et Revers) .....	42
3 Réaction de séquence .....	43
4 Purification du produit de réaction de séquence .....	44
5 Chargement du séquenceur.....	44

## **PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSIONS**

1 Résultats de dosage d'ADN par NanDrop.....	45
2 Résultats de la mise au point de PCR.....	46

<i>1 Design des amorces.....</i>	<i>46</i>
<i>2 Optimisation de la réaction de PCR .....</i>	<i>47</i>
<i>2-1 Protocole initial utilisé.....</i>	<i>47</i>
<i>2-2 Optimisation de Température d'hybridation .....</i>	<i>47</i>
<i>2-3 Concentration d'ADN.....</i>	<i>49</i>
<i>2-4 Concentration des dNTPs.....</i>	<i>49</i>
<i>2-5 Essai de la PCR sans étape .....</i>	<i>50</i>
<i>3- PCR pour l'exon 4 avec les amorces 4C, 4D et en fixant la concentration d'ADN entre 50 et 100 ng.....</i>	<i>50</i>
<i>3-1 PCR pour l'exon 4 amorce 4C.....</i>	<i>50</i>
<i>3 Résultats de séquençage.....</i>	<i>51</i>
<i>Unité de génétique médicale et d'oncogénétique CHU Fès .....</i>	<i>51</i>
<i>Laboratoire de Génétique Humaine CHU de Nancy-Brabois .....</i>	<i>53</i>

*Première partie:  
Introduction générale*

## Chapitre I: PRÉSENTATION CLINIQUE DU SYNDROME DE RETT

### 1°) Historique

Le syndrome de Rett est une maladie d'origine génétique se traduisant par un trouble grave du développement du système nerveux central. La maladie doit son nom au neuropédiatre autrichien Adreas Rett (1924-1997), qui en fit la première description en 1966. Mais c'est un article de 1983 qui a attiré l'attention des psychiatres et neurologues sur ce trouble, que l'on assimilait à tort à l'autisme.

### 2°) Maladies génétiques liées au chromosome X

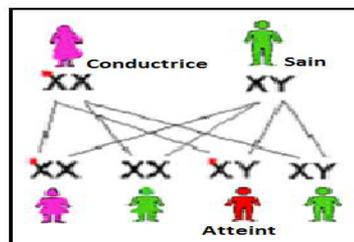
Chaque cellule de l'être humain contient 46 chromosomes, regroupés en 23 paires. La 23ème paire est constituée des chromosomes dits sexuels (gonosomes): les hommes présentent un chromosome X et un chromosome Y (XY), les femmes deux chromosomes X (XX).

Les maladies dont le gène est localisé sur le chromosome X se transmettent le plus souvent sur un mode dit "récessif lié à l'X". Dans ce cas, la maladie se manifeste chez les sujets de sexe masculin (XY), qui possèdent une seule copie mutée du gène, alors que les femmes (XX) porteuses du gène muté sur un des deux chromosomes X sont cliniquement saines, mais conductrices de la maladie.

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

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

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



*Fig. 2: Mode de transmission de la maladie « wikipedia »*

Ce risque est le même à chaque grossesse. Le fait qu'ils aient déjà des enfants (atteints ou sains) ne changent en rien cette éventualité. (1)

### 2 .1. Caractéristique du chromosome X

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

### 2 .2. Gènes localisées sur le chromosome X

De nombreux gènes situés sur le chromosome X sont en cause dans des retards mentaux, ce qui pourrait expliquer, entre autres, qu'il y ait davantage de garçons porteurs d'un handicap mental que de filles. (2)

**Tableau 1 : Localisation des gènes sur le chromosome X «wikipedia »**

<i>Gènes</i>	<i>Locus</i>	<i>Nom des syndromes associés</i>
		Retards mentaux syndromiques
<i>FMR1</i>	Xq27.3	Syndrome de l’X fragile (site FRAXA)
<i>ARX</i>	Xp22.1	Syndrome de Partington, syndrome XLAG (X-linked lissencephaly with abnormal genitalia) ou syndrome de Berry-Kravis, Syndrome de Proud, Spasmes infantiles liés à l’X (syndrome de West)
<i>ARX</i>	Xp22.1	Syndrome de Partington, syndrome XLAG (X-linked lissencephaly with abnormal genitalia) ou syndrome de Berry-Kravis, Syndrome de Proud, Spasmes infantiles liés à l’X (syndrome de West)
<i>MECP2</i>	Xq28	Syndrome de Rett, PPM-X (psychosis,pyramidal signs, macroorchidism), Retard mental avec spasticité (Meloni)
<i>CDKL5</i>	Xp22	Syndrome de Rett variant, Crises partielles précoces +/- Spasmes infantiles (syndrome de West) ISSX
<i>PQBP1</i>	Xp11.23	Renpenning syndrome, Sutherland syndrome, Golabi-Ito-Hall syndrome
<i>XNP</i>	Xq13.3	Syndrome ATR-X (alpha thalassémie RM lié à l’X)Syndrome de Juberg-Marsidi, Syndrome de Chudley-Lowry,Syndrome de Smith-Fineman-Myers, Syndrome de Carpenter-Waziri, Syndrome de Holmes-Gang, Syndrome de Martinez
<i>JARID1C/ SMCX</i>	Xp11.22	Microcéphalie
<i>DCX</i>	Xq23	Syndrome SCLH (subcortical laminar heterotopia), XLIS
<i>PHN1</i>	Xq12	Retard mental lié à l’X avec hypoplasie cérébelleuse
<i>PHF8</i>	Xp11.22	Syndrome de Siderius-Hamel
<i>HF6</i>		Sd de Börjesson, Forssman, Lehmann

### 3°) Définition du syndrome de Rett

Le syndrome de Rett se caractérise, chez les filles, par un trouble grave et global du développement du système nerveux central. Le syndrome de Rett existe dans les différentes parties du monde. La prévalence en Europe serait d'environ 1/15 000 filles, actuellement il est remarquable que la même statistique est valable au nord d'Afrique. La maladie a une évolution caractéristique dans les formes typiques. Après un développement quasi normal lors de la 1ère année, on note une régression rapide survenant entre 1-3 ans. Elle s'accompagne d'une perte de l'utilisation volontaire des mains associée à un retrait social. Une décélération de la croissance du périmètre crânien s'observe parallèlement et correspond à une atrophie cérébrale diffuse, affectant surtout la substance grise. Les fillettes évoluent ensuite dans un tableau de polyhandicap souvent compliqué d'épilepsie puis de l'apparition d'une scoliose. Des formes variantes, de sévérité variable, ont été décrites. Le syndrome est en rapport avec une mutation du gène MECP2 (methyl-CpG-binding protein 2) situé sur le bras long du chromosome X, dans la région Xq28. Des mutations du gène MECP2 ont été rapportées dans le cadre d'encéphalopathies du garçon mais ne correspondent pas au même tableau. Les critères nécessaires au diagnostic sont basés sur la clinique. Il n'y a pas de traitement à visée étiologique. Il est néanmoins important de proposer un traitement symptomatique (anti-épileptiques, prise en charge spécifique de la scoliose, apports nutritifs - en particulier calciques - suffisants, etc.) quand il est nécessaire, ainsi qu'une prise en charge éducative adaptée. (3)

### 4°) Epidémiologie

Le syndrome de Rett touche quasi exclusivement les filles. Cependant des garçons porteurs d'une mutation dans MECP2 à l'état hémizygote peuvent présenter un syndrome de Rett classique avec un caryotype XY mais sont rares, car les mutations dans ce gène sont presque toujours de novo et le plus souvent d'origine paternelle ; si la mutation apparaît sur l'X chez le père, seules ses filles seront atteintes (les garçons reçoivent l'Y qui ne porte pas le gène MECP2). Ou bien le plus souvent une encéphalopathie épileptique néonatale sévère à la naissance et meurent avant l'âge de deux ans. Enfin, il est possible que des grossesses pour les garçons porteurs d'une mutation MECP2 n'arrivent pas à terme (fausses couches), il s'agit soit de garçons dont le caryotype est 47, XXY ou présentant des mutations post-conceptionnelles aboutissant à une mosaïque somatique.

## 5°) Critères de diagnostiques

Le syndrome de Rett est un concept clinique qui repose sur l'association de caractéristiques cliniques co-existante chez une même patiente, une séquence d'évolution particulière, et l'exclusion de certains diagnostics différentiels.

Le syndrome de Rett est causé, dans près de 80% des cas typiques et 30% des formes. Cependant, le syndrome de Rett n'est pas synonyme de mutations dans le gène MECP2 car on peut avoir un syndrome de Rett sans mutation dans le gène MECP2. Il en est de même pour les quelques garçons qui naissent avec des mutations dans le gène MECP2 où aucun ne présente le syndrome de Rett classique tout en subissant de très graves handicaps.

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

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

### 5.1. Syndrome de Rett atypique

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

#### \* 5.1.1. *Les six critères principaux*

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

#### \* 5.1.2. *Les onze critères secondaires*

- ↪ Irrégularités du rythme respiratoire
- ↪ Grincement de dents
- ↪ Scoliose/cyphose
- ↪ Atrophie musculaire des membres inférieurs
- ↪ Pieds froids et violacés
- ↪ Ballonnements abdominaux

- ↪ Marche anormale
- ↪ Troubles du sommeil
- ↪ Regard particulièrement intense et spécifique au Syndrome de Rett
- ↪ Indifférence à la douleur
- ↪ Accès de rires / hurlements.

\* 5.1.3. *Autres : troubles comportementaux fréquemment observés à certaines périodes de la maladie mais non spécifiques*

- ↪ irritabilité, agitation
- ↪ hurlements
- ↪ peur des agressions
- ↪ pleurs inconsolables
- ↪ regard fuyant (évitant de croiser le regard des autres)
- ↪ absence d'implication émotionnelle ou sociale
- ↪ pas de sujets d'intérêt en général
- ↪ refus marqué d'utiliser les comportements sociaux non verbaux.

## 5.2. Syndrome de Rett typique

\* 5.2.1. *Les critères nécessaires sont :*

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

\* 5.2.2. *Les critères d'appui au diagnostic comprennent :*

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

\* 5.2.3. *Les critères d'exclusion ont été définis. Ils correspondent à :*

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

## 6°) Evolution

Les différents signes permettant de suspecter le diagnostic par ailleurs dans un profil évolutif particulier caractéristique de l'affection. Ainsi différents stades évolutifs ont été identifiés

6.1. Stagnation d'apparition précoce : Le début a lieu entre 6 et 18 mois. Elle se caractérise par :

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

} La durée est de plusieurs mois.

6.2. Régression « destruction » rapide : Le début survient entre 1 et 3 ans

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

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

6.3. Stabilisation apparente : Le début a lieu 2 et 10 ans.

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

La durée va de quelques mois à des années

6.4. Détérioration motrice tardive : Le début survient après 10 ans.

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

La durée s'étale sur plusieurs années (4)

## Chapitre II : PRÉSENTATION GÉNÉTIQUE DU SYNDROME DE RETT

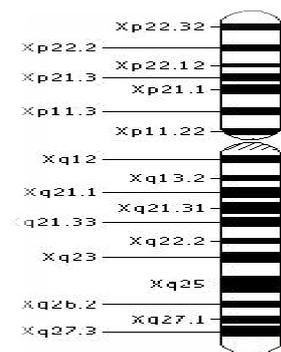
Dès sa description, il a été remarqué que le syndrome de Rett frappait dans la plupart des cas les filles ; par ailleurs, l'homogénéité de la maladie était compatible avec une affection génétique.

Plus récemment, à partir de formes familiales exceptionnelles, la région Xq 28 a été spécifiquement suspectée. Une stratégie de recherche type « gène candidat » a permis d'impliquer le gène MECP2. Il s'agit d'un gène répresseur ayant un rôle de régulation encore mal précisé. La perte de la fonction de la protéine MeCP2 pourrait entraîner une surexpression de certains gènes, qui serait dommageable pour le développement du système nerveux central. De nombreuses mutations ont été rapportées au sein du gène sans que l'on puisse établir clairement de corrélation phénotype-génotype.

### 1. Profil d'Inactivation du Chromosome X

Le gène MECP2, s'étend sur 76 Kb d'ADN génomique. Le cadre de lecture a une taille de 1461 nucléotides ce qui correspond à une protéine MeCP2 de 497 acides aminés. Ce gène a une expression ubiquitaire (Reichwald et al., 2000) localisé sur le chromosome X, est soumis au mécanisme d'inactivation. Ce processus cellulaire normal de l'embryogenèse précoce assure dans chaque cellule mammifère femelle le passage de l'un des chromosomes X d'un état euchromatique actif vers un état hétérochromatique inactif. L'X aboutit donc à l'extinction

transcriptionnelle des gènes sur l'un des deux chromosomes X et assure un dosage génétique équivalent entre mâles XY et femelles XX (5). Une fois établie, l'inactivation est stable et héritée de façon clonale au cours des divisions cellulaires. Chez les patientes atteintes du syndrome de Rett, l'inactivation aléatoire dans chacune de leurs cellules de l'un ou l'autre des deux chromosomes X signifie donc que, en moyenne, 50 % de leurs cellules ont inactivé l'X porteur de la mutation et expriment donc l'allèle sauvage, alors que 50 % ont inactivé l'X porteur de l'allèle sauvage et expriment donc une protéine mutée, tronquée ou instable et sont donc effectivement déficientes pour l'expression de MeCP2. Les patientes RTT sont donc chimères pour l'expression des formes sauvages et mutées de MECP2.



**Fig.3** les différents gènes constituant le chromosome X humain « wikipedia »

## 2. Implication de MeCP2 dans la différenciation et la maturation neuronale

La décélération de la croissance du périmètre crânien observée après la première année de vie correspond à une atrophie cérébrale diffuse importante, affectant surtout la substance grise. La constatation par ailleurs d'arbres dendritiques anormalement pauvre des certaines aires corticales, leur absence de spécification dans d'autres, ont fait évoquer un arrêt des afférentations nécessaires à la poursuite d'un développement cérébral harmonieux.

Chez les « filles Rett » explorées vers 2-3 ans, le pattern de perfusion est comparable à celui observé chez les nourrissons de 2-3 mois : hypo perfusion dans les lobes frontaux et le tronc cérébral.

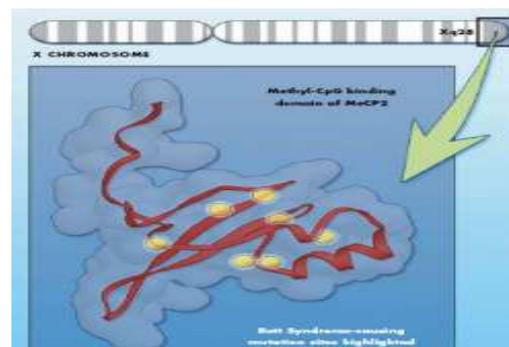
Par ailleurs, une réduction de pigmentation du locus niger évocatrice d'anomalies de la voie dopaminergique, une diminution du nombre des cellules appartenant au système cholinergique ont été remarquées. Mais les différentes études conduites sur les métabolites des neurotransmetteurs font état de résultats contradictoires. La spectroscopie de RMN (résonance magnétique nucléaire) du proton montre une baisse du taux de N-acétylaspartate (NAA).

La perte de la fonction de la protéine MeCP2 pourrait intervenir au niveau des neurotransmetteurs. (4)

## 3. Fonction et structure de MeCP2

### 3.1. Structure de MeCP2

MECP2 (méthyl CpG binding protein 2) responsable de syndrome de Rett ; est un gène qui fournit des instructions pour la fabrication de son produit protéique, MeCP2, cette dernière semble essentielle et importante pour le fonctionnement normal des cellules nerveuses, où il est présent à des niveaux élevés. La protéine MeCP2 est susceptible d'être impliqué dans d'éteindre ("la répression" ou "faire taire") plusieurs autres gènes. Cela empêche des gènes de fabriquer des protéines qui ne sont pas nécessaires. Des travaux récents ont montré que MeCP2 peut également activer d'autres gènes. Le gène MECP2 est situé sur le long (q) le bras du chromosome X dans la bande 28 "Xq28", à partir de 152 808 110 paire de base jusqu'à 152 878 611 paire de base.



**Fig.4:** Structure de MeCP2 "Society for Neuroscience (2009) Brain Briefings - Rett Syndrome"

Malgré que la protéine MeCP2 fait partie d'une famille de protéines à domaine méthyl-CpG-binding, mais possède ses propres différences uniques qui aident le mettre en dehors du groupe. Il dispose de deux domaines fonctionnels:

- ↪ un domaine méthyl-cytosine-liaison (MBD), composée de 85 acides aminés, forme un coin et se fixe à des sites méthylés CpG sur les brins d'ADN
  - ↪ région réagit ensuite avec Sin3A HDAC (Les histones désacétylases) (Nan et al, 1998). Cette association permet mieux la répression de la transcription à la méthylation grâce à l'activité HDAC
  - ↪ HMGD1 : high mobility group protein-like domain 1
  - ↪ HMGD2: high mobility group protein-like domain 2
- } Deux protéines à haut mobilité
- ↪ CTD: C-terminal domaine  $\alpha$
  - ↪ CTD: C-terminal domaine  $\beta$  contient le domaine WW de liaison, qui est impliquée dans les interactions de facteurs d'épissage (6).



Fig.5 : Domaines de méthyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2) d'après Hite et al. (2009)

### 3.2. Identification de MeCP2 et de ses isoformes

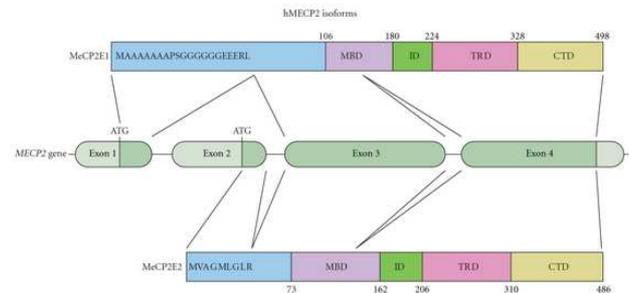
MeCP2, methyl-CpG binding protein 2, a initialement été identifiée, purifiée et séquencée par l'équipe du Dr Adrian Bird sur la base de sa capacité de liaison à des dinucléotides CpG méthylés (7,8), sa dégradation selon la méthode d'Edman a permis de générer des sondes utilisées pour identifier la séquence complète de son ADN complémentaire. Son gène a ensuite pu être localisé sur le locus Xq28 et reconnu comme soumis au mécanisme d'inactivation du chromosome X.

MECP2 a longtemps été considéré comme un gène à trois exons, chacun prenant part à la formation de la protéine. Cependant, en 2000, le séquençage et l'analyse bioinformatique détaillée des locus humains et murins a révélé l'existence d'un exon additionnel en 5' (8).

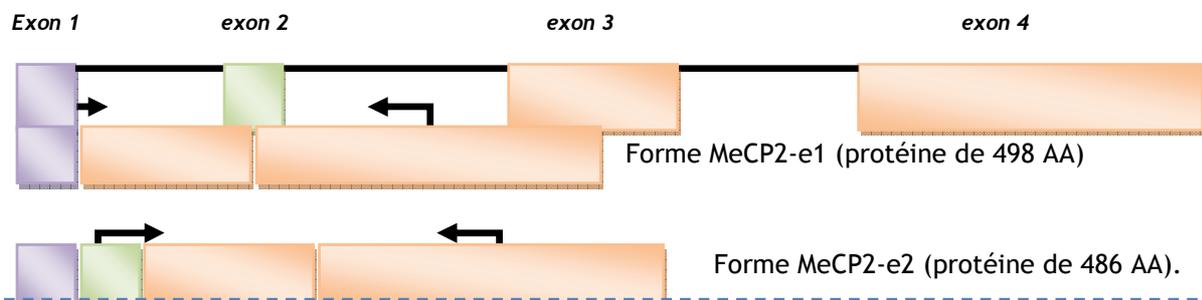
Plus récemment encore, deux études parallèles ont montré l'existence d'un site d'épissage alternatif au niveau de l'exon 1 générant deux isoformes, appelées MeCP2A et MeCP2B chez l'homme (9). La forme MeCP2A, (21 résidus, pI Acide=4,25 base) initialement décrite,

utilise comme codon initiateur l'ATG de l'exon 2, elle est plus abondante dans le cerveau des

humains; la forme MeCP2B (9 résidus, pI Acide = 9,5 base) utilise un ATG localisé dans l'exon 1, en exprime les 24 acides aminés mais exclut les 9 acides aminés initiaux codés par l'exon 2. Une des différences majeures entre ces deux isoformes est la présence de séquences répétées poly-alanine et poly-glycine à l'extrémité N-terminale de la forme « longue » MeCP2B. Ces deux protéines sont distribuées de façon ubiquitaire dans l'organisme mais la forme B est exprimée de façon préférentielle dans le cerveau.



**Fig.6 :** Épissage alternatif des isoformes de MeCP2



**Fig.7 :** Les deux isoformes de la protéine MeCP2 produites par épissage alternatif « Pelka et al., 2005 »

### 3.3. Domaines associés à la fonction de MeCP2

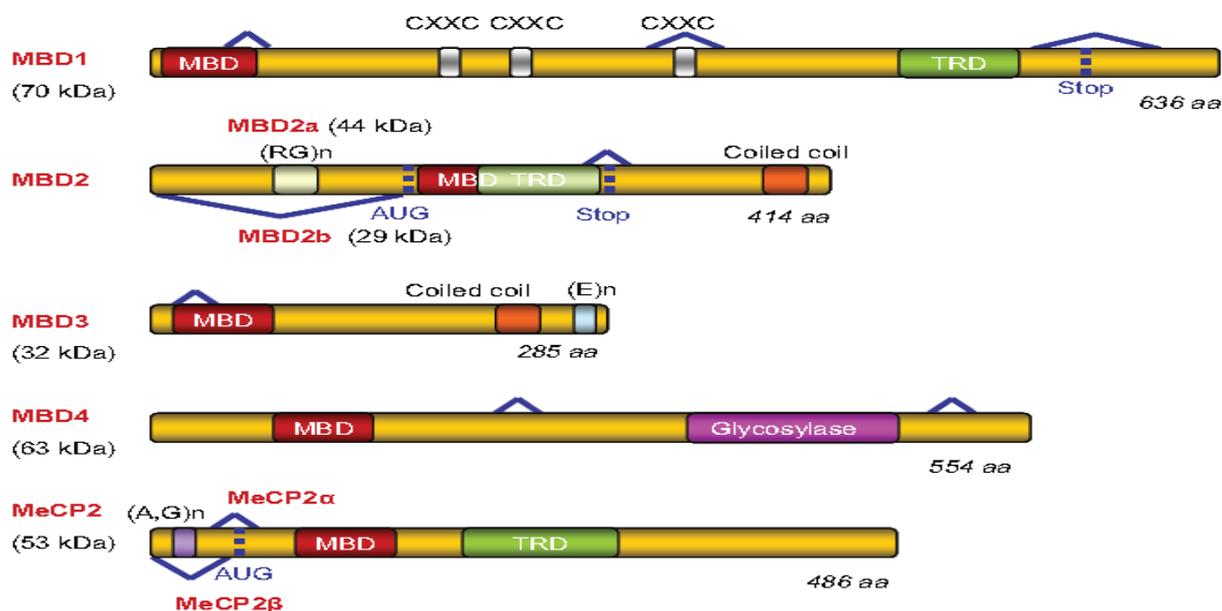
#### 3.3.1. MBD methyl-CpG binding domain

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

**Tableau 2 :** Localisation chromosomique et structure des gènes humains codant les protéines à MBD (Hendrich et al., 1999a; Kriaucionis and Bird, 2004).

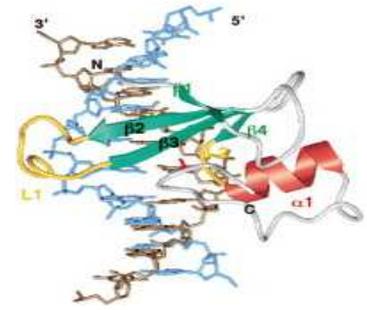
Gènes	MeCP2	MBD1	MBD2	MBD3	MBD4
Localisations chromosomique	Xq28	18q21	18q21	19q13	3q21-22
Longueur (Kb)	60	14	50	7	11
Nombre d'exons	4	16	7	7	7

Il est toutefois à noter qu'à leur extrémité 5', ces cinq gènes possèdent tous un îlot de CpG, suggérant que leur régulation pourrait être soumise à un mécanisme méthylation-dépendant. Les gènes des protéines à MBD codent différents isoformes et variant, qui résultent d'épissages ou de sites de polyadénylation alternatifs.



**Fig.8 :** Différentes isoformes des protéines à MBD de mammifères « Amandine C et al 2009 »

MeCP2 est le membre fondateur de la famille des methyl-CpG binding proteins qui ont la spécificité de se lier à des dinucléotides CpG méthylés grâce à un domaine de liaison conservé : le methyl-CpG de 85 acides aminés (peptide 78-162) nécessaire et suffisant pour permettre sa liaison à l'ADN in vitro et la reconnaissance d'une seule paire de nucléotides CpG symétriquement méthylés sur les deux brins de l'hélice ADN.



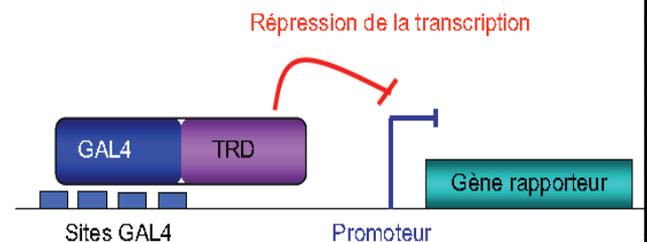
**Fig.9:** Structure du domaine MBD « NCBI »

La présence d'une séquence riche en A/T à proximité des dinucléotides CpG méthylés (à une distance de 3 à 8 bases)

augmente l'affinité de MeCP2 pour ses cibles (10). La structure en solution du domaine MBD a été résolue par spectrométrie RMN et a révélé une structure en « coin » constituée d'un feuillet-β antiparallèle à quatre brins (A, B, C et D) sur la face N-terminale et d'une hélice-α suivie d'un coude sur la face C-terminale. Ensemble, la boucle flexible entre brins B et C, et les faces exposées des brins B, C et D constituent la surface de liaison à l'ADN méthylé (11).

### 3.3.2. TRD methyl-CpG binding domain

MeCP2 contient également un domaine de répression de la transcription (TRD), localisé des résidus 207 à 310. Ce domaine est très basique (26 % de lysine et d'arginine) et riche en acides aminés neutres (12,5 % d'alanine, 10,5 % de valine et 8 % de proline). Le domaine TRD est le domaine minimal nécessaire à la répression de la transcription par MeCP2 in vitro et in vivo ; il s'associe à



**Fig.10 :** Principe du système de transcription GAL4 « Jorgensen et al. 2004 »

des facteurs de co-répression ou à la machinerie transcriptionnelle basale et permet une action à distance (12). Le signal de localisation nucléaire de MeCP2 est localisé au sein du TRD, des résidus 255 à 271.

Ces domaines ont été identifiés par des expériences de délétions et des systèmes de co-transfection GAL4 (une protéine activateur transcriptionnel codée par le gène Gal4) (Nan et al., 1997; Fujita et al., 1999; Ng et al., 2000; Boeke et al., 2000). Bien que les domaines TRD diffèrent totalement par leur séquence peptidique, ils remplissent des fonctions équivalentes. S'effectue par Réalisation dans des cellules en culture des co-transfections de vecteurs codant

le domaine potentiel, de la répression transcriptionnelle TRD, fusionné au domaine de liaison de l'ADN GAL4 ; et de vecteurs codant un gène rapporteur placé sous le contrôle d'un promoteur et contenant en amont des sites de liaison GAL4.

Enfin, MeCP2 contient un domaine (WDR) capable de se lier spécifiquement aux domaines WW de groupe II des facteurs d'épissage FBP11 (forming binding protein 11) et HYPC. La région WDR de MeCP2 (résidus 325 à 486 à l'extrémité C-terminale) contient en son centre une séquence riche en proline (376-405) et deux régions conservées CR1 et CR2 en C-terminal (13)

### 3.4. Régulation de l'expression de MeCP2

Dans le système nerveux central, MeCP2 est fortement exprimée dans les populations neuronales mais absence des cellules gliales (microglie, oligodendrocytes et astrocytes) (14).

Le gène MECP2 contient plusieurs sites d'initiation de la transcription, contenus dans une région riche en résidus GC et en îlots CpG, mais aucune des boîtes canoniques TATA ou CAAT (15). Des expériences de gène rapporteur ont permis d'identifier la région minimale du promoteur de *Mecp2* (-677/+56) suffisante pour réguler l'expression dynamique de MeCP2 spécifiquement aux neurones centraux. L'activité promotrice est présentée dans une séquence de 1 kb en amont du site d'initiation de la transcription et qui est composée d'un « coeur » (-179/-309) qui assure le niveau d'expression basal du gène, de deux éléments régulateurs positifs (-681/-847 et -847/-1071) et de deux éléments régulateurs négatifs (-309/-370 et -553/-681) (15).

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

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

En réalisant des comparaisons de séquences inter-espèces et des essais de gènes rapporteurs, (Liu et al), ont identifié quatre « enhancers » deux « silencers » parmi 27 séquences conservées non codantes incluses dans la région de 210 kb entourant le locus de MECP2. Ces éléments sont capables d'agir à distance sur le promoteur de MECP2.

L'un des enhancers et l'un des silencers sont localisés dans la région 3'UTR à environ 75 kb de MECP2, les deux autres enhancers sont à plus de 100 kb en aval de MECP2 (16).

## 4. Fonctions biologiques de MeCP2

### 4.1. Répression de la transcription

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

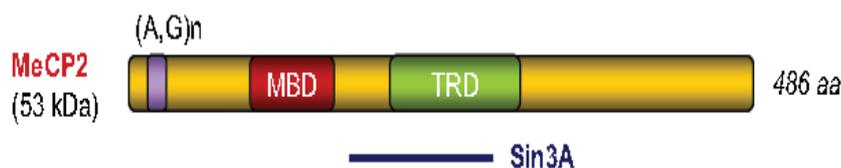
- \* les modifications de la chromatine
- \* la modulation des activateurs transcriptionnels.

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

#### *4.1.1. Répression par dé-acétylation des Histones dépendante*

En général Le mécanisme d'action des dé-acétylases permet de retirer un groupement acétyl porté par un résidu lysine sur des histones composant le nucléosome. Cette conformation de l'ADN diminue l'accessibilité aux facteurs de transcription ou à d'autres protéines qui se lient à la chromatine, amenant en conséquence à une répression transcriptionnelle (Wade, 2001; Yoshida et al. 2001)

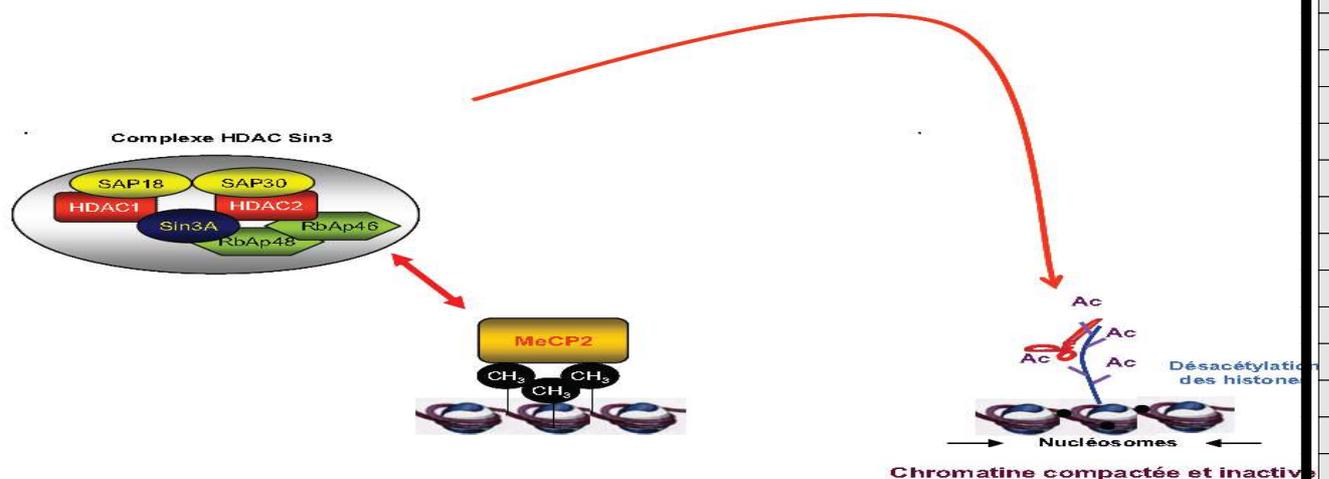
en ce qui concerne le mécanisme mettant en évidence le rôle de MeCP2 dans la répression transcriptionnelle, l'équipe du Dr Bird et celle du Dr Wolffe ont mis en évidence une interaction entre MeCP2 et le co-répresseur Sin3A, cette interaction directe est dépendante du domaine TRD et de la région située entre celui-ci et le domaine MBD de la protéine MeCP2 (**Fig.11**).



**Fig.11** : Domaine d'interaction entre MeCP2 et le co-répresseur Sin3A « Jones et al. 1998. »

L'association de MeCP2 à Sin3A permettrait alors de recruter le complexe HDAC Sin3, qui contient 6 corépresseurs: les histones désacétylases de classe I, HDAC1 et HDAC2, et les sous-unités RbAp46, RbAp48, SAP18 et SAP30, qui interagissent avec les histones (Zhang et al., 1997;Zhang et al., 1998;Zhang et al., 1999).

MeCP2 existe principalement sous forme libre, monomérique. Ces données suggèrent que MeCP2 n'est pas obligatoirement un membre du complexe répresseur Sin3 et pourrait alors s'engager dans d'autres interactions pour établir la répression transcriptionnelle. (17)



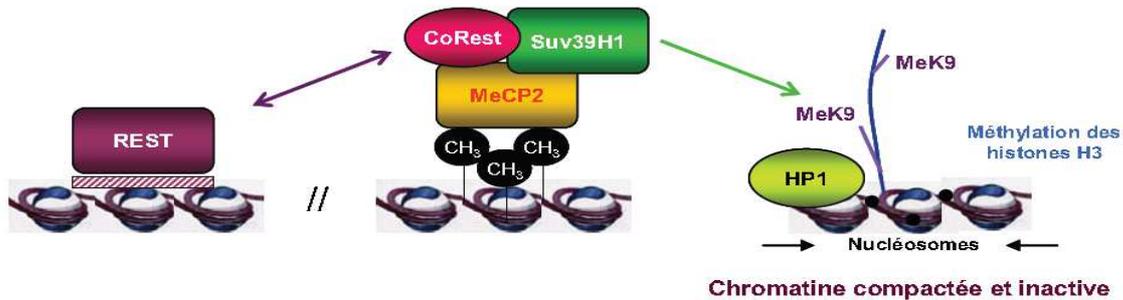
**Fig.12:** Répression transcriptionnelle par interaction de MeCP2 et Sin3A des régions méthylées du génome « Zhang et al., 1999 »

#### 4.1.2. Répression par Méthylation des histones dépendante

La méthylation est un évènement clé des modifications post-traductionnelles des histones. Elle représente un mécanisme de régulation épigénétique important pour l'organisation de la structure chromatinienne et la répression de l'expression des gènes (18).

MeCP2 est impliquée dans la répression génique via la méthylation des lysines 9 (H3K9) et 27 des histones H3 de plus les lysines 20 des histones H4 participe également à la répression transcriptionnelle de nombreux gènes ayant leurs séquences activatrices méthylées (19). Des associations entre MeCP2 et des histones méthyltransférases (HMT) sur l'ADN méthylé entraîne la méthylation des lysines des histones, qui conduit à la compaction de la chromatine puis à la répression transcriptionnelle.

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

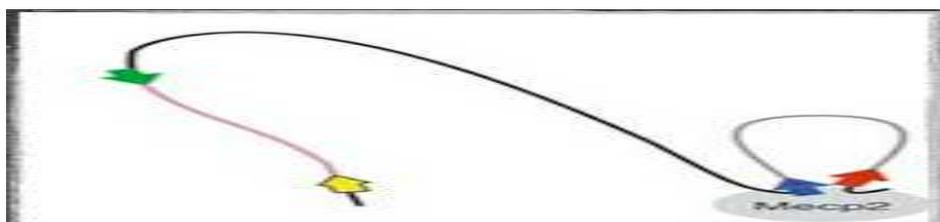


**Fig.13** : Interaction de MeCP2 avec Suv39H1 au niveau des régions méthylées « Lunyak et al. 2002 »

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

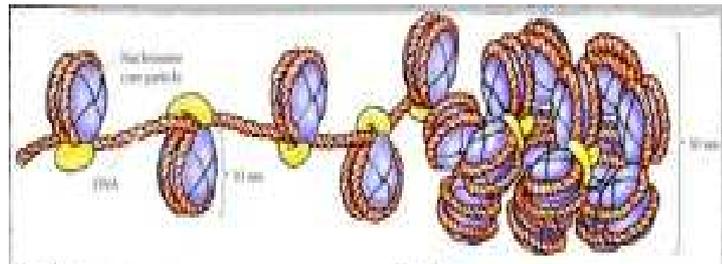
#### 4.1.3. Autre type de répression de la transcription

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



**Fig.14** : Répression par boucles d'ADN localement réprimées « Horike et al. 2005 »

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



**Fig.15** : Organisation de la chromatine (remplacement de l'histone H1, en jaune) « Skene et al. 2010 »

### 5. Différentes mutations de MECP2

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

- ✘ mutations faux-sens (remplacement d'un acide aminé par un autre dans la protéine MeCP2), par exemple T158M (thréonine en position 158 devient une méthionine) ;
- ✘ mutations non-sens (remplacement d'un acide aminé par un signal d'arrêt de la synthèse de la protéine MeCP2), par exemple R294X (arrêt de la synthèse de la protéine après l'arginine (R) en position 294) ;
- ✘ délétions ou insertions (de 1 base à plusieurs milliers).

Mutations les plus fréquentes chez les patients d'origine française et marocaine dans la série de Philippe JONVEAUX (Philippe et al. 2005) (20)

- ☞ R168X (11.5%)
- ☞ R270X (9%)
- ☞ R255X (8.7%)
- ☞ T158M (8.3%)  
(20).
- ☞ R306C (6.8%)
- ☞ R294X (5.9%)
- ☞ R133C (4.2%)

90.8% des mutations sont localisées dans l'exon4

### 6. Identification de gènes ciblés par la protéine MeCP2

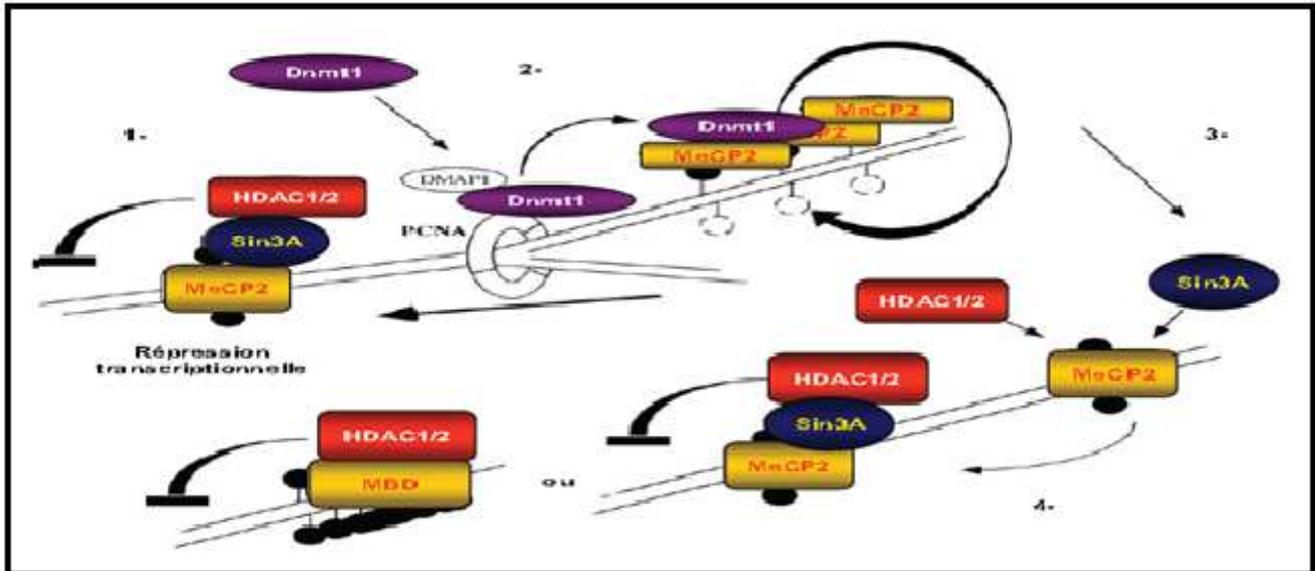
Pour la recherche des gènes infectés de ces mutations, plusieurs équipes ont mené des études de transcriptome et de protéome pour mesurer les variations globales d'expression génique au sein des cellules déficientes pour MECP2/MeCP2.

- ☞ Des études menées sur des lignées lymphoblastiques issues de patientes souffrant du syndrome de Rett ont effectivement montré des altérations subtiles du niveau d'expression de divers gènes dans ces cellules (21, 22). Pour certains d'entre eux, la liaison de MeCP2 sur leurs promoteurs dans des lignées cellulaires normales suggère que MeCP2 pourrait contribuer de façon directe à leur répression ;
- ☞ Aussi bien le cas du gène H19 (H19 est un gène pour un ARN non codantes longues , qui se trouvent dans les humains et ailleurs. Ce gène semble avoir un rôle dans certaines formes de cancer . Le gène H19 est exprimé exclusivement sur un seul allèle parental dans un phénomène connu sous le nom d'impression . H19 est seulement transcrit à partir de l'allèle hérité de la mère; l'allèle paternel H19 n'est pas exprimé); bien qu'il soit une cible directe de MeCP2 et que son niveau d'expression soit doublé dans les cellules déficientes pour Mecp2, (23).
- ☞ Deux équipes ont simultanément identifié le gène Brain-derived neurotrophic factor (Bdnf) comme une cible potentielle de MeCP2 (24) Le Bdnf est un facteur neurotrophique primordial pour la survie, la croissance et le maintien des neurones au cours du développement du système nerveux central. Impliqué dans l'apprentissage et la mémorisation, il a la capacité de moduler la plasticité synaptique en remodelant les connexions axonales et dendritiques. Le Bdnf est codé par un locus complexe

contenant quatre promoteurs, dont l'un d'eux, est activé lors de la dépolarisation membranaire des neurones en culture (25).

L'expression de Bdnf, contrôlée par ce promoteur et l'influx calcique lors de l'activation, est corrélée à la déméthylation d'éléments de réponse au calcium localisés en cis. MeCP2, en complexe avec ses partenaires mSin3A et HDAC1, s'associe spécifiquement à ce promoteur de Bdnf lorsque les neurones sont au repos. Après dépolarisation membranaire, MeCP2 est phosphorylée et se désassocie partiellement de ce promoteur, permettant ainsi le remodelage local de la chromatine et la transcription du gène(26).

## 7. Conclusion



**Fig. 16** : Représentation schématique d'un mécanisme moléculaire via MeCP2 des modifications épigénétiques au cours de la division des cellules somatiques (adaptée de Kimura et al., 2003 (Kimura and Shiota, 2003)).

1- le complexe MeCP2/Sin3A/HDAC1/2, se lie à l'ADN double brin méthyle, réprime l'expression de gènes via l'établissement d'un environnement chromatinien condensé ;

2- Au cours de la réplication, ce complexe se dissocie. MeCP2 interagit alors avec DNMT1 et l'ADN hémi-méthyle au moment de la néo-synthèse du nouveau brin d'ADN. Le complexe MeCP2-DNMT1 méthyle alors le nouveau brin d'ADN néo-synthétisé.

3- MeCP2 se retrouve ainsi lié à de l'ADN double-brin méthyle.

4- Elle se dissocie alors de DNMT1 et recrute de nouveau ces corépresseurs Sin3A/HDAC1/2 pour rétablir l'environnement chromatinien et la répression transcriptionnelle. La méthylation de l'ADN, l'environnement chromatinien condensé et la répression transcriptionnelle peuvent ainsi être maintenus au cours des divisions cellulaires des cellules somatiques.



Deuxième partie :  
Matériel & Méthodes

## 1\* Prélèvement des patients

### 1-1° Choix et description des patients prélevés

Nos patients prélevés répondent aux critères de diagnostics cliniques de syndrome de Rett (tableau 3) avec un score de diagnostic supérieur à 4.

- Le nombre de cas étudiés est de 8 patients
- Le sexe : sont tous de sexe féminin
- 6 mois (P7) et 11 ans (P4)
- Origine : 4 de Fès, 2 de Berkane, 1 de Hoceima et 1 de Taza, ils sont tous de la région Nord-est du Maroc.

## 2\* Préparation des prélèvements au laboratoire

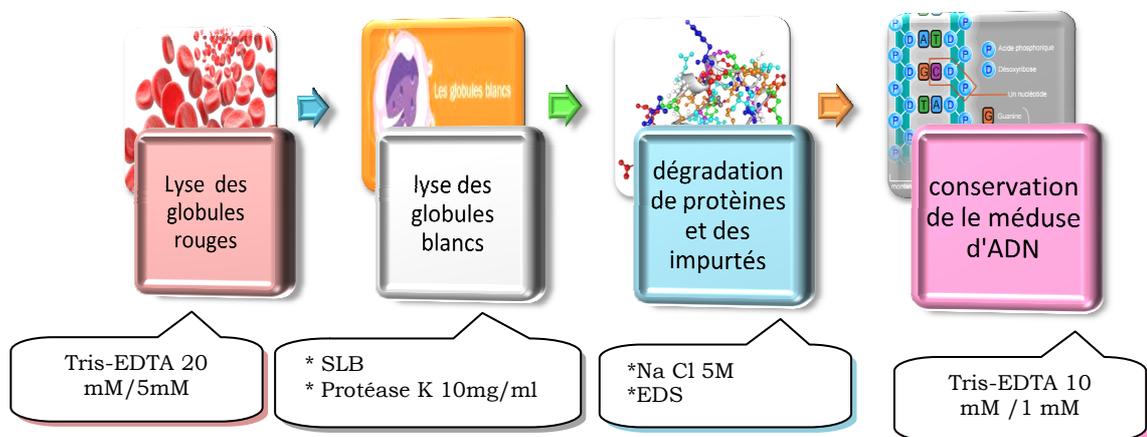
Chaque prélèvement est accompagné d'une fiche de consentement écrit éclairé (voir annexe1) et fait dans des conditions d'asepsie rigoureuse. Il s'agit d'un prélèvement sanguin périphérique de 5ml de 2 tubes d'EDTA. Le sang acheminé dans l'immédiat à l'unité puis conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2-1°) l'extraction d'ADN génomique sur suspension cellulaire

Pour détecter les différentes mutations présentant dans le gène responsable de syndrome de Rett on a fait ces études sur l'ADN des patientes et pour cette raison on procède par une extraction à partir du sang prélevé, selon 2 méthodes soit par SEL ou par KIT commercialisé dont le but est d'avoir une quantité et qualité suffisante permettant son analyse.

#### 2-1-1\*Extraction d'ADN par SEL.

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



## Réactifs nécessaires (voir annexe 2):

- ✧ Tris-EDTA 20 mM / 5 mM ;
- ✧ SLB à +42°C ;
- ✧ Protéase K 10 mg/ml ;
- ✧ Eau Distillé stérile ;
- ✧ NaCl 5 M ;
- ✧ Ethanol 75% à +4°C ;
- ✧ Tris-EDTA 10 mM /1 mM.

On a utilisé pour l'extraction d'ADN, le sang conservé dans le tube EDTA qui a été stocké à -20°C. Donc on le laisse décongeler durant toute une nuit juste avant la manipulation.

### a) Lyse des globules rouges

- ✗ 1-le sang de chaque patient est mis dans un tube stérile de 15 ml ;
- ✗ 2-deux volumes du tampon d'extraction TE 20/5 sont ajoutés dans chaque ;
- ✗ 3- l'ensemble est mis dans la glace pendant 20min ;
- ✗ 4- puis les tubes sont centrifugés à 2500 tr/mn pendant 5min ;
- ✗ 5- le surnageant est aspiré pour garder 1ml du culot.



Fig 17 : solution de lyse des globules rouges

On refait les étapes précédentes (de 1 à 5) jusqu'à l'obtention un culot blanc.

### b) Lyse des globules blancs

Le culot récupéré de l'étape précédant est suspendu dans 3ml de solution de la lyse des globules blanc (voir annexe 2), puis on ajoute 100 µl de protéinase K. le tout est incubé 2°C pendant une nuit sous agitation douce.

### c) Dénaturation et précipitation des protéines et impuretés

4 ml d'eau distillée stérile et 4 ml de NaCl 5 M sont ajouté dans chaque tube puis bien homogénéiser et centrifuger à 3000 tr/mn pendant 30 mn.

### d) Précipitation et lavage de l'ADN

- ✗ Le surnageant est récupéré dans un nouveau tube de 50 ml ;
- ✗ deux volumes d'éthanol absolu froid sont ajoutés et homogénéisé pour faire apparaitre "la méduse" d'ADN ;

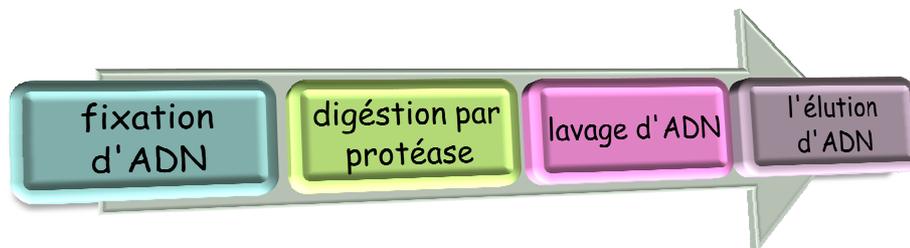
- ✘ On récupère cette dernière dans un tube eppendorff, suivi d'un lavage par l'éthanol 75%
- ✘ Enfin l'ADN extrait est conservée dans 200 µl de TE 10mM/1mM et stocké à -20°C.



Fig 18 : la banque d'ADN

### 2-1-2\* Extraction d'ADN par KIT commercialisé

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



### Réactifs nécessaires:

- ✦ Kit GeneCatcher™ DNA (3-10 ml de Sang) contenant les solutions suivantes:
  - ✦ GeneCatcher™ tampon Lysis (L13) ;
  - ✦ Protéase ;
  - ✦ Tampon Protéase ;
  - ✦ GeneCatcher™ billes Magnétiques ;
  - ✦ GeneCatcher™ tampon de lavage (W12) ;
  - ✦ GeneCatcher™ tampon Elution (E5) ;
  
- ✦ Isopropanol absolu ;
- ✦ Isopropanol 50 %.

Avant de commencer la manipulation le bain marie est réglé à 65°C

### a) La fixation d'ADN

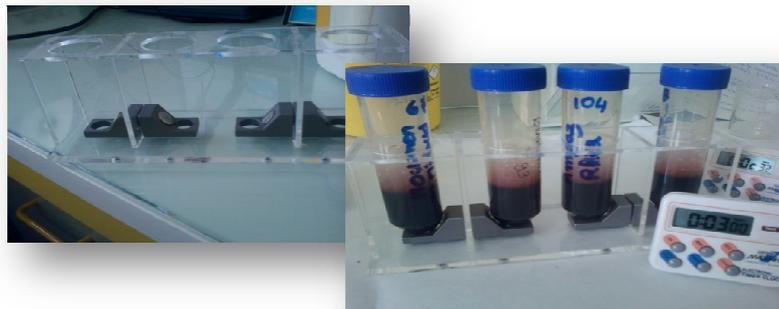
Les prélèvements selon classés en fonction du volume (tableau 4) sont mis dans des tubes stériles de 50 ml.

- les billes Magnétiques vortexer et le tampon de Lysis (L13) sont ajoutés, puis le tout est mélangé

**Tableau 4:** Volumes de billes magnétiques et du tampon de lysis correspondant au volume du sang

Sang ml	3	4	5	6	7	8	9	10
Billes µl	45	60	75	90	105	120	135	150
L13 ml	9	12	15	18	21	24	27	30

- Une incubation à température ambiante pendant 5 min est faite avec une agitation de temps en temps, ceci permet à l'ADN de se lier aux billes.
- Les tubes sont placés sur le Support de Séparateur Magnétique pendant 3 minutes. puis le surnageant est éliminé soigneusement par aspiration en veillant à ne pas toucher les billes



**Fig 19 :** le support de séparateur magnétique

- Les tubes sont élevés du Séparateur Magnétique ;
- 5 ml du tampon de Lysis (L13) est ajouté sans tenir compte du volume du sang suivie par une agitation douce ;
- un lavage est réalisé dans le but d'enlever toutes traces de contamination résiduelles ;
- Puis une incubation à température ambiante pendant 30 secondes et une deuxième incubation pendant 20 secondes tout en place les tubes sur le Séparateur Magnétique, après on élimine ;
- le surnageant est éliminé sans toucher les billes.



**Fig 20 :** l'ADN lié aux billes

### b) La digestion par protéase

- le tampon protéase et la protéase sont ajoutés dans les tubes qui sont toujours placés au séparateur magnétique (tableau 4), puis vortexés durant 30s

Tableau 5: Volume de protéase et du tampon de protéase correspondant au différent volume du sang

Sang ml	3	4	5	6	7	8	9	10
Tampon protéase ml	3	3	3	3	3-5	4	4-5	5
Protéase $\mu$ l	40	40	40	40	40	40	40	40

P

Après la suite sont incubés à 65°C pendant 10 minutes et à température ambiante durant 10 minutes avec une légère agitation pour suspendre les billes.

### c) Lavage d'ADN

- Cette étape est réalisée par l'ajout d'isopropanol (IPA) 100 % aux différents tubes qui seront mélangés doucement jusqu'à l'apparition d'un agrégat visible. Les échantillons sont remis sur le séparateur magnétique pendant 30 secondes à 1 minute. Le surnageant est éliminé toujours sans toucher les billes ;
- on ajoute 3 ml 50 % (v/v) d'isopropanol aux tubes, suivie d'une agitation ;
- l'échantillon est encore remis sur le Séparateur Magnétique pendant 30 secondes suivie par l'élimination du surnageant sans toucher les billes. Ces tubes sont gardés sur le Séparateur Magnétique pendant une 1 minute pour permettre au reste du liquide de se précipiter au fond ;
- lors de cette dernière étape de lavage sans déplacer le tube, on ajoute doucement 250  $\mu$ l du tampon de lavage (W12), on incube pendant 1 minute et on élimine le surnageant.

On répète ces étapes deux fois, puis on enlève le tube du séparateur magnétique.

### d) L'éluion d'ADN

- Pour éluer l'ADN 1 ml du tampon d'éluion (E5) est ajouté puis l'échantillon est agité doucement en tourbillon dans le but de sortir la boulette de bille du mur de tube ;
- Après incubation à 65°C pendant 1 heure, on mixe le contenu du tube par une pipette et on place le tube sur le séparateur magnétique jusqu'à clarification du surnageant ;
- Une fois claire, on récupère le surnageant contenant l'ADN épuré dans un tube d'ependorff de 1,5.

De même, l'ADN sera stocké à +4°C pour toute utilisation ultérieure.

**NB.:** Pour éviter la congélation répétée et le dégel d'ADN, il faut aliquoter l'ADN stocké dans des tubes eppendorff de 0.5ml c'est-à-dire à utilisation limitée et les à stocké à -20°C.

### 2-2°) Dosage d'ADN extrait

Le dosage d'ADN est très important car c'est un paramètre primordial pour la réussite de la PCR. De ce fait la concentration de l'ADN est estimée au niveau de l'unité par Le NanoDrop (NanoVue<sup>Plus</sup>) qui permet de mesurer les différentes concentrations sur des microéchantillons (< 2 µl), grâce à son logiciel intégré.

- NanoVue<sup>Plus</sup> quantifie rapidement et précisément les échantillons d'acides nucléiques et de protéines, en utilisant une plaque d'échantillonnage pratique ;
- Calibration automatique en longueur d'ondes ;
- Visualisation des graphes sur l'écran à cristaux liquides (115 x 85 mm).

Modes de mesures :

- ✚ Absorbance et concentration
- ✚ Dosage et calcul de la pureté des acides nucléiques
- ✚ Dosage des protéines par les méthodes pré-programmées de Bradford, BCA, Lowry, Biuret et UV
- ✚ Balayage spectral
- ✚ Calcul du Tm
- ✚ Cinétiques enzymatiques
- ✚ Mesure à plusieurs longueurs d'onde
- ✚ Application microarray : mesure de l'incorporation des CyDye.



**Fig 21** : dosage d'ADN par NanoDrop

### 2-3°) Amplification des séquences nucléotidiques par réaction en chaîne par polymérisation (PCR)

#### 2-3-1\* Principe de la PCR

Réaction en chaîne par polymérase (PCR) est une méthode in vitro d'amplification de séquences spécifiques d'ADN. La première PCR a été décrite par K.Leppe et al. En 1971. Il a fallu ensuite attendre 1983 pour voir reparaitre la PCR dans les travaux de Kary Mullis qui a décrit les principes ce qui lui a valu le prix Nobel en 1993. Tout le monde s'accorde à dire aujourd'hui que PCR est une technique biologique des plus puissantes et utiles. La PCR est aujourd'hui une technique standard de laboratoire.

#### 2-3-2\* Les réactifs de la PCR

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

☞ Le mélange contient:

- Taq (la *Thermus Aquaticus* polymerase) : c'est un enzyme permettant la synthèse des nouveaux brins d'ADN lors de l'amplification. Cette protéine de 94 kiloDaltons, isolée de la bactérie *Thermus Aquaticus*. La Taq polymerase est une ADN polymerase thermostable. Elle résiste à des températures répétées pouvant atteindre jusqu'à 95°C ;
- Les dNTP (deoxynucleotide triphosphate) : ce mélange contient les différentes bases A, T, G, C sous la forme ATP, TTP, CTP, GTP ;
- MgCl : les ions magnésium sont importants dans la PCR, ils influent sur l'activité enzymatique de la Taq, ne pas mettre de MgCh augmente l'astringence de la réaction ;
- Les amorces ou oligonucléotides (primers) : ce sont des polymères nucléotidiques, de séquences spécifiques du gène à amplifier. Lors de la PCR, les amorces se fixent spécifiquement sur l'ADN dénaturé par chauffage et l'ADN compris entre les amorces est amplifié. Leur choix est très important, ils déterminent les caractéristiques de l'ADN amplifié (longueur, spécificité et nature) ;
- L'ADN matriciel : En théorie une copie ADN de la séquence recherchée est suffisante pour avoir une amplification, il faut cependant tenir compte de la probabilité de « rencontre » des molécules d'ADN matrice avec les amorces. Dans la pratique plusieurs copies sont nécessaires pour avoir un résultat correct. Mais la mauvaise qualité et/ou une quantité trop importante d'ADN matrice peut conduire à une amplification aspécifique, voire à une inhibition enzymatique. Il est possible d'expliquer cette inhibition par la présence de contaminants provenant de l'échantillon ou des réactifs utilisés dans les protocoles d'extraction d'ADN.
- Le tampon : Le tampon utilisé pour la réaction PCR sert à maintenir stable le pH du milieu réactionnel au niveau optimal pour la Taq polymérase (TrisHCl à pH basique 8,5 à 9). Il contient des cations bivalents Mg<sup>2+</sup>, cofacteurs indispensables pour la réaction de polymérisation avec la Taq polymérase. La présence dans le milieu réactionnel des cations bivalents Mg<sup>2+</sup> et de cations monovalents (K<sup>+</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) vont neutraliser les charges négatives des groupements phosphates au niveau de l'ADN et ainsi stabiliser les hybrides ADN/ADN. En pratique, la concentration en sel doit cependant rester compatible avec l'activité de l'ADN polymérase.
- Primers : les amorces qui permettent l'amplification spécifique du fragment d'intérêt (ADN).
- Eau pure : sert pour la dilution des réactifs de PCR et pour que le volume final soit entre 20 et 50 car la concentration élevée des réactifs peut inhiber la réaction

d'amplification. on peut remplacer l'eau par TE (Tris-EDTA) mais dans les conditions purement stérile.

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

### 2-3-3\* Principe de l'amplification d'ADN par la technique PCR

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

L'une des propriétés de toute les ADN polymérase est de ne pouvoir synthétiser le brin complémentaire qu'à partir d'une amorce. Cette propriété des ADN polymérase a été utilisée pour amplifier, par réplication successives, les séquences désirées. Il suffit pour cela de choisir des amorces capables de s'hybrider spécifiquement à l'ADN et de réaliser les réplications qui assureront l'amplification de la séquence ciblée est doublé à chaque réplication, et son augmentation est exponentielle (Santoni et al., 2000).

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

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

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

✧ Mais les différents températures et cycles dépendant de chaque gène amplifié.

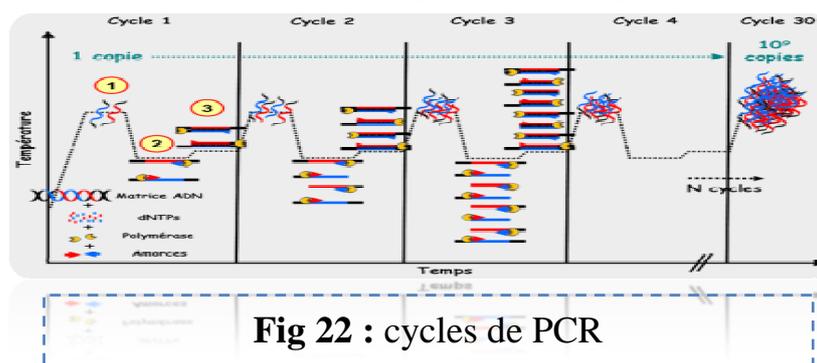


Fig 22 : cycles de PCR

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

#### 2-3-4\* Limites de la PCR:

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

## Amplification par PCR du gène MECP2

### Précautions :

- ☞ Il faut respecter la réglementation liée à l'aire pré-PCR ;
- ☞ Il faut porter des gants et utiliser des pointes à filtre pour éviter toutes contaminations par des produits de PCR de réactions de PCR antérieures ;
- ☞ Il faut vérifier la calibration des pipettes pré-PCR.
- ☞ Réserver un thermocycleur.
- ☞ Et la gestion des stocks des réactifs primaires et du petit matériel,

### 1° Conservation des réactifs

Réactif primaire	Conditionnement
H <sub>2</sub> O ppl	Ampoule de 20 ou 50ml
Tampon PCR	1.5 ml
MgCl <sub>2</sub>	1.5 ml
Taq Polymerase (Thermoprime)	50 µl (5U/µl)
dNTP	4 x 25 µmol (250 µl)
Amorces	Eppendorf de 1.5 ml

### 2° Préparation des réactifs secondaires

#### 2-1\* dNTP 2,5 mM

Tableau6 : la concentration et le volume utilisé pour la réaction de PCR

	C <sub>i</sub> (mM)	C <sub>f</sub> (mM)	Volume (µl)
dATP	100	2,5	25
dCTP	100	2,5	25
dGTP	100	2,5	25
dTTP	100	2,5	25
H <sub>2</sub> O (qsp 1ml)			900

#### 2-2\*Préparation des ADN

Tous les ADN doivent au préalable être:

- ☞ Reprécipités et repris dans du TE 1X diluée par de l'eau pure de façon à obtenir une concentration finale voisine de 100ng et 50ng ;
- ☞ Dosés au NanoDrop.

## 2-3\* Préparation des amorces (27)

Couples	sens (5'→3')	séquence	Vol pour 200pmol/ul	Taux de GC %
Exon 4A	F	GAGTGGCTTTGGTGACAGGT	277.5	55
	R	GATGCCTTTTCAAAC TTC	382.5	38.9
Exon 4B	F	ATCTCCCAAAGCTCCAGGAACTGGCAGAGG	165	56.7
	R	GAGAAGAGCGGGAAAGGA CT	237.5	55
Exon 4C	F	GAGACCGTACTCCCCATCAA	323	55
	R	GGAGAGCGCAAAGACATLGT	204.5	50
Exon 4D	F	AAGAGGAGAAGATGCCCAGA	271.5	50
	R	ACCTAACCAGGGCCAGAAGT	244	55

Dans la mise au point de la réaction PCR, le choix des amorces est crucial. Elles permettent d'assurer un double rôle; en s'hybridant à l'ADN matrice, elles délimitent la région d'ADN à amplifier (étape 2 du cycle) et avec leur extrémité 3' OH libre servir d'amorce pour l'ADN polymérase (étape 3 du cycle).

Les oligonucléotides amorces s'hybrident aux extrémités de la séquence d'ADN qui va être amplifiée (voir annexe 3), il faut donc connaître les séquences nucléotidiques des extrémités de la région ADN amplifiée. Pour faciliter le choix des séquences des deux amorces, des logiciels d'analyse de séquences permettent de vérifier les points suivants :

- \* Des Tm comparables. Les oligonucléotides amorces doivent s'hybrider à l'ADN matrice dans les mêmes conditions de température ;
- \* Des séquences qui ne soient pas complémentaires entre elles (en particulier dans la région 3') ;
- \* Des séquences qui ne contiennent pas de séquences répétées inversées (pas de repliement intramoléculaire).

### Calcul de la Tm :

Les températures de dénaturation et de polymérisation sont fixées, seule la température d'hybridation doit être calculée pour chaque nouvelle PCR. Cette température d'hybridation dépend de la composition en bases des amorces. Elle est légèrement inférieure (environ de 5°C) au Tm qui est la température de demi-dénaturation.

 Oligonucléotide inférieur à 20 nt :

$$(A+T) *2 + (C+G) *4= Tm$$

 Oligonucléotide supérieur à 20 nt :

$$[(A+T) *2 + (C+G) *4] * (1 + [(N-20)/20]) = Tm$$

Avec N= le nombre totale d'oligonucléotides

Ou bien, on peut savoir la Tm des amorces par un logiciel nommé par Perl Primer.

✗ Aussi bien par Primer 3plus qu'on peut juste introduire la séquence a détecté en rempliant quelques paramètres tels que % CG, des approximations de Tm... et on peut avoir plusieurs amorces à choisir.

#### ■ Aliquot des amorces

Les amorces sont portées sous forme lyophilisé dont la concentration après une dilution par l'eau pure est de 100pmol/μl, qui sont ensuite vortexées et considérées comme solution mère. Alors pour atteindre une concentration de 10μM on réalise une autre dilution de 1/20 (1μl d'amorce+ 19μl d'eau pure) dont le volume final est de 20μl.

### 3° Préparation du mélange réactionnel de PCR

#### 3-1\*Procédure :

- Il faut tout d'abord décongeler les réactifs à température ambiante (sauf la Taq polymérase qui reste à -20°C) ;
- Annoter la(es) barrette(s) de tubes suivant le nombre d'amplifications par PCR à réaliser ; Lorsque la décongélation est totale, vortexer brièvement les réactifs ;
- Préparer un mélange réactionnel selon le tableau suivant :

#### Promoteur/exon 1 :

	<i>C<sub>i</sub></i>	<i>C<sub>f</sub></i>	<i>V /tube</i>
<i>Tampon thermoprime</i>	10 x	5X	5 μl
<i>MgCL<sub>2</sub> thermoprime</i>	25 mM	1 mM	1 μl
<i>dNTP</i>	2,5 mM	0,2 mM	2,5 μl
<i>Amorces F+R</i>	10 μM	10 μM	2 μl
<i>DMSO</i>	100 %	7,5 %	1,5 μl
<i>Taq Thermoprime</i>	5U/μl	1,5 U/μl	0.5 μl
<i>H2O</i>			11.5μl
<i>Total MIX</i>			24 μl
+ ADN (200ng/μl)			1 μl

#### Exon 2, 3A, 3B, 3C, 4A, 4B, 4C, 4D:

	<i>Concentration</i>	<i>V /tube</i>
<i>Tampon thermoprime</i>	10 x	2,5 μl
<i>MgCL<sub>2</sub> thermoprime</i>	15 mM	1,5 μl

<i>dNTP</i>	<i>2,5 mM</i>	<i>2 µl</i>
<i>Amorces F+R</i>	<i>10 µM</i>	<i>0,5 µl</i>
<i>Taq Thermoprime</i>	<i>5U/µl</i>	<i>0,25 µl</i>
<i>H2O</i>		<i>16,75 µl</i>
<i>Total MIX</i>		<i>24µl</i>
<i>+ ADN (200ng/µl)</i>		<i>1 µl</i>

- ❑ Sortir la Taq DNA polymérase du congélateur -20°C et ajouter le volume d'enzyme nécessaire au mélange réactionnel ;
- ❑ Ranger les réactifs au congélateur à -20°C ;
- ❑ Vortexer brièvement le mélange réactionnel et le répartir dans l'ensemble des tubes.

#### 4° Réaction d'amplification par PCR

##### 4-1\*Procédure

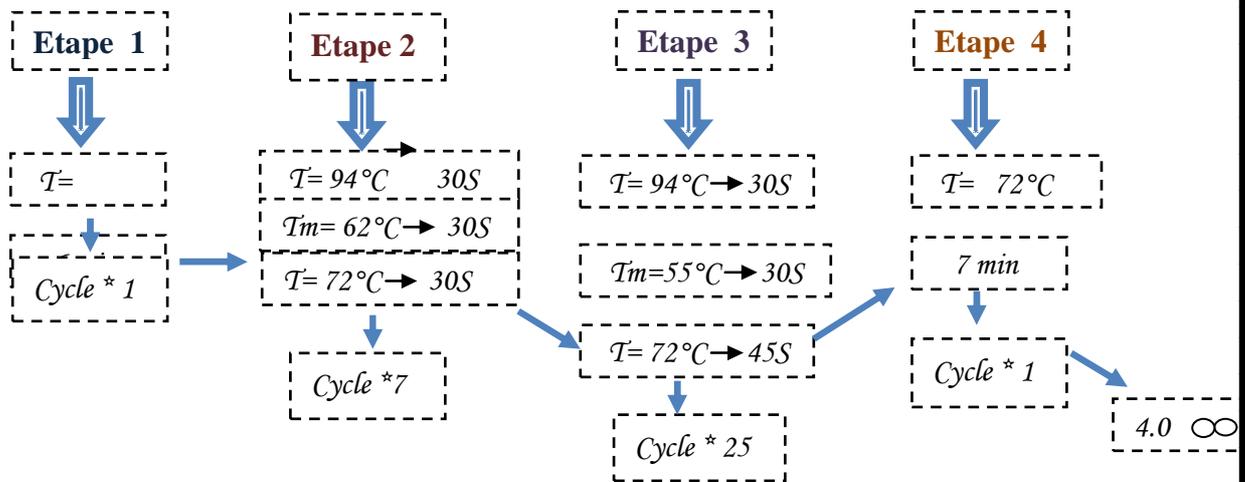
- ❑ Avant de commencer toute procédure au niveau de thermocycleur , il faut Boucher hermétiquement les barrettes de tubes ;
- ❑ Placer les barrettes de tubes dans l'un des thermocycleur réservé au préalable
- ❑ Utiliser le programme de PCR correspondant à la région cible.



**Fig 23 : thermocycleur**

<i>Température</i>	<i>Temps</i>	<i>Nombre de cycle</i>
<i>94°C</i>	<i>6min</i>	<i>1</i>
<i>94°C</i>	<i>30S</i>	
<i>62°C pour toutes les amorces.</i>	<i>30S</i>	
<i>72°C</i>	<i>30S</i>	<i>7</i>
<i>94°C</i>	<i>30S</i>	
<i>55°C pour toutes les amorces</i>	<i>30S</i>	
<i>72°C</i>	<i>45S</i>	<i>25</i>
<i>72°C</i>	<i>7min</i>	<i>1</i>
<i>10°C</i>	<i>∞</i>	

- Avant de débuter la réaction de PCR, il faut vérifier que le programme sur le thermocycleur correspond bien à celui sur la feuille de travail.



**Fig 24 :** Programme de PCR sur le thermocycleur

✘ Etape 1 : dénaturation initiale :

C'est une étape de chauffage (généralement 10 à 15 minutes à 95 °C). Elle permet de :

- dés-hybrider les ADN double brin ;
- de casser les structures secondaires ;
- d'homogénéiser le milieu réactionnel par agitation thermique ;
- d'activer les polymérase de type « Hot start » ;
- de dénaturer d'autres enzymes qui pourraient être dans la solution (Transcriptase Inverse, Uracil-N-Glycosylase).

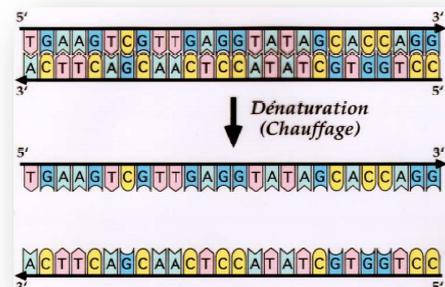
✘ Etape 2: conditions pour l'hybridation des amorces :

Les amorces utilisées pour ce gène nécessitent une PCR intermédiaire qui a comme rôle d'augmenter l'hybridation spécifique de ces amorces. Et l'élimination de ce stage ne donne aucuns résultats de polymérisation de produit de PCR.

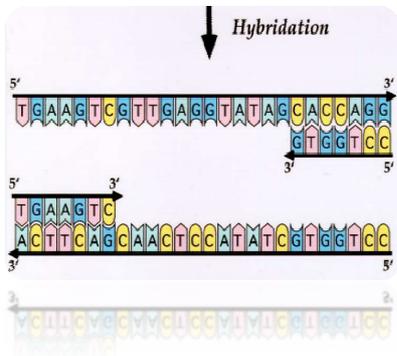
✘ Etape 3: les cycles de PCR:

Ce stage est constitué de trois périodes différentes:

- Dénaturation : La température dans le tube est réglée à 94°C et permet la dénaturation de l'ADN. En effet, l'ADN perd sa structure caractéristique en double hélice car les liaisons hydrogène reliant les bases de chaque brin

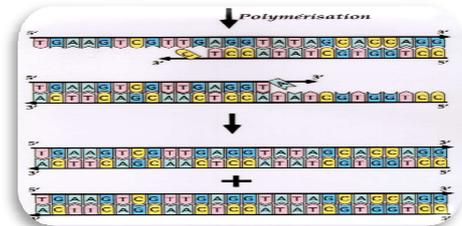


d'ADN sont instables à cette température. L'ADN double-brin (2 brins) est dénaturé en ADN simple brin (1 brin).



● Hybridation: La température d'hybridation est généralement comprise entre 50°C et 60°C elle dépend de la composition en désoxyribonucléotides (dATP, dTTP, dGTP, et dCTP) des amorces. Ces dernières reconnaissent et se fixent à leurs séquences complémentaires en reformant des liaisons hydrogène.

- Elongation : La température d'élongation est de 72°C, qui est la température idéale pour l'activité de la Taq polymérase, qui permet de synthétiser le brin complémentaire à l'ADN matrice, grâce aux dNTPs libres présents dans le milieu réactionnel.



Au cycle suivant, les nouveaux fragments synthétisés servent à leur tour de matrice pour la synthèse de nouveaux fragments d'ADN.

#### ☒ Etape 4: Elongation final

Permet de conférer à l'enzyme Taq polymérase le temps d'achever la synthèse des brins.

### 5° Visualisation du produit PCR par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%

#### 5-1\*Principe

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une technique qui permet la séparation des molécules chargées sous l'action d'un champ électrique en fonction de leur taille et de leur charge électrique. A pH neutre, les molécules d'ADN chargées négativement en raison de la présence du phosphate migrent vers l'anode. Le BET s'étant intercalé entre les bases de l'ADN va permettre de visualiser les bandes d'ADN sous UV.

#### Réactifs nécessaires (voir annexe2):

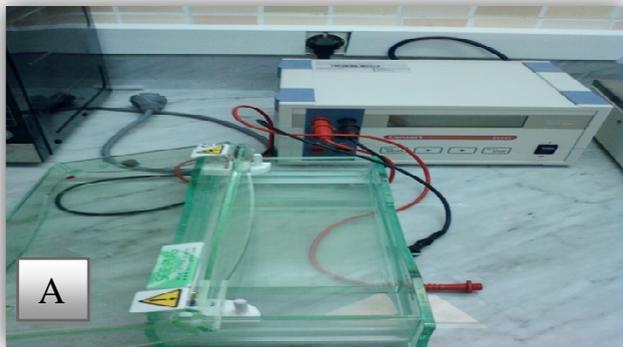
- ✧ Poudre d'agarose
- ✧ TAE 1X
- ✧ BET
- ✧ Solution de charge.

### 5-2\* Protocole expérimental

Dans un premier temps, on prépare le gel d'agarose 2%. Pour ceci on met dans un récipient 1g de poudre d'agarose et 50 ml de TAE 1X, on porte à ébullition durant 30secondes, puis on ajoute 2  $\mu$ l de BET qui est un agent révélateur par sa fluorescence sous U.V et qui va s'intercaler entre les bases.

On coule le gel dans le moule à électrophorèse, on y installe un peigne qui sera retiré après refroidissement du gel en laissant à sa place des puits où sera déposé le produit PCR.

Après refroidissement, on installe le moule dans la cuve qui est remplie du tampon de migration (TAE 1X), on dépose dans chaque puits un mélange de 5  $\mu$ l de produit PCR et de 2  $\mu$ l de solution de charge qui a pour rôle de stabiliser l'ADN au fond du puits et on lance la migration à 100 V. Finalement, on visualise les bandes d'ADN fluorescentes sous UV.



**Fig 25 :** A- *Appareil Electrophorétique pour migration de produit de PCR*

B- *Appareil pour visualiser les bandes migrées grâce a un logiciel "perfect Image"*

## 6° Séquençage de l'ADN:

### 6-1\* Principe :

Le séquençage est un procédé permettant d'obtenir la séquence cible d'un fragment d'ADN. Le principe de la technique repose sur la méthode de SANGER, qui permet le recopiage d'un brin matrice par une ADN polymérase. L'ADN dépendante est initiée par la fixation d'un oligonucléotide spécifique (amorce), complémentaire du brin matrice. Cette ADN polymérase va permettre l'élongation d'un nouveau brin complémentaire du brin matrice dans le sens 5' \_ 3'. L'ADN polymérase permet l'incorporation de nucléotides (dNTP: déoxynucléotides) libres présents dans le milieu réactionnel par la formation d'un pont phosphodiester entre le 3'OH de la chaîne et le 5' phosphate du dNTP suivant.

La réaction de Sanger repose sur l'incorporation alléatoire par cette ADN polymérase de didéoxynucléotides interrupteurs de chaîne (ddNTP) eux aussi présents dans le milieu réactionnel. Ces ddNTP diffèrent des dNTP par leur extrémité 3'. L'extrémité 3'OH des dNTP est remplacée par une extrémité 3'H. Cette modification empêche la formation de la liaison phosphodiester entre le ddNTP incorporé dans la chaîne et le nucléotide suivant. L'allongement de la chaîne est alors interrompu.

Dans le milieu réactionnel il y a compétition entre les dNTP et les ddNTP. Le rapport spécifique ddNTP/dNTP et l'affinité de la Taq pour chaque nucléotide sont optimisés de telle façon qu'un ddNTP soit statistiquement incorporé à toutes les positions possibles. Une migration électrophorétique du produit de cette réaction de séquence sur un gel très résolutif (polyacrylamide) va séparer tous les fragments présents en fonction de leur masse moléculaire (taille). Les plus petits fragments vont migrer plus rapidement que les grands. La grande résolution de ce gel permet de distinguer des fragments différents entre eux d'une paire de base. L'identification du ddNTP présent à l'extrémité 3' de chaque fragment déterminera la séquence nucléotidique du brin matrice initial.

### 6-2\* Protocole expérimental

Avant toute manipulation de séquençage on doit purifier le produit de PCR en raison d'éliminer toutes traces des constituants de la réaction de PCR (les amorces, les DNTP...) dont le but de conserver que l'ADN à séquencer.

↳ 1° Purification d'ADN par ExoSAP :

ExoSAP-IT est utilisé pour purifier le produit de PCR d'une manière rapide et efficace. Il comporte deux enzymes hydrolytiques :

- ↳ L'exonucléase I (Exo S1) qui dégrade les ADN simples brins (les amorces) ;
- ↳ La phosphatase alcaline de crevette (SAP) qui déphosphoryle les dNTPs libres, et en excès sans interférence avec les applications en aval, cette enzyme est active à 37°C et inactive à 80°C spécifiquement sur les fragments simples brins inférieurs à 100pb.

Alors au niveau réactionnel:

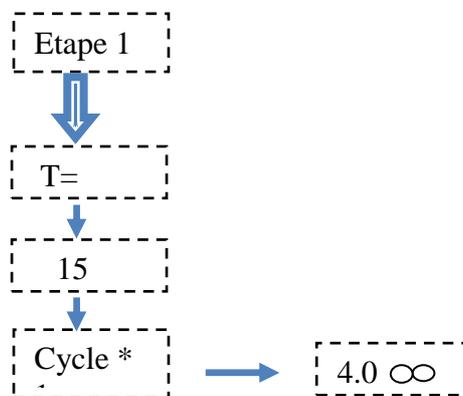
Purification de produit de PCR : on utilise :

- ↳ 2.5µl d'Exo SAP :
- ↳ Une dilution de produit de PCR : 2.75 d'ADN + 2.75 d'eau pure  
↳ Volume final = 8µl

**NB :** la dilution du produit de PCR dépend de l'intensité de la bande sur le profil d'électrophorèse.

Cette dilution est essentielle pour avoir des pics clairs et nets sans bruit de fond.

Par la suite on centrifuge le tout rapidement et on place le tube dans un thermocycleur réservé au préalable



↳ 2° Préparation des amorces (Forward et Revers)

La concentration finale des amorces utilisées doit être de 6 µM, pour ceci on procède la règle de trois

$$\begin{array}{l} 10\mu\text{M} \longrightarrow 1 \\ 6\mu\text{M} \longrightarrow X = 0.6\mu\text{L} \end{array}$$

Pour préparer 2µL : on prend 1.2µL des amorces (10µM) et on complète par 0.8 d'eau pure.

↳ 3° Réaction de séquence :

La réaction de séquence basée sur le principe de la méthode de Sanger est réalisée grâce au kit BigDyeR Terminator V1.1. Il contient non seulement les tampons, les dNTPs, la Taq Polymerase nécessaires à la synthèse des brins d'ADN, mais aussi les 4 dNTPs essentiels au séquençage, chacun étant couple a un fluorochrome différent. Ce couplage va permettre la détection des fragments synthétisés en électrophorèse capillaire et ainsi de connaître l'enchaînement des nucléotides composant la séquence d'ADN.

La réalisation de la réaction de séquence se fait avec les produits de PCR purifiés a l'ExoSAP.

Dans ce cas on utilise :

✧ 2μL de Bigday 1.1 qui est composé de :

- ✧ Taq polymérase
- ✧ dNTP
- ✧ ddNTP marqués
- ✧ tampon
- ✧ MgCL2.

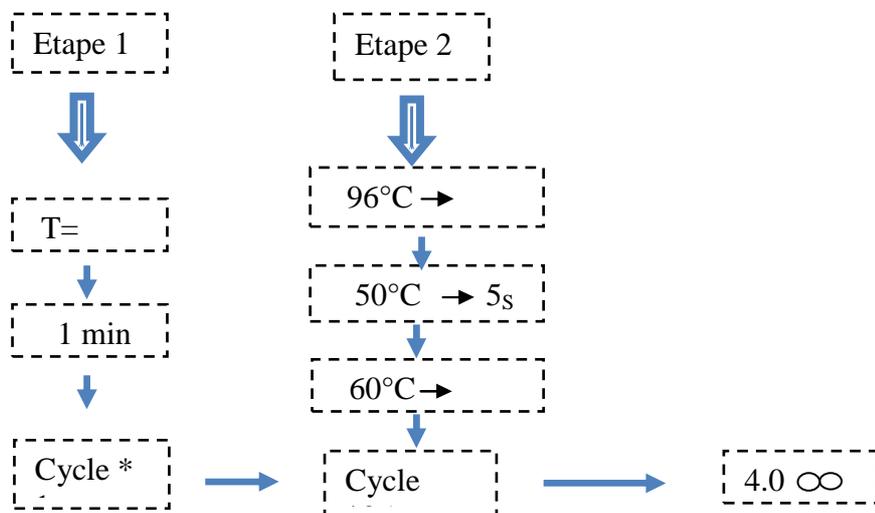
✧ 4μL de Produit PCR purifié par l'ExoSAP;

✧ 1μl d'amorces spécifiques de 6μM

✧ 3μL d'eau stérile.

☞ Volume final = 10μl

Par la suite on centrifuge le tout rapidement et on place le tube dans un thermocycleur réservé au préalable.



#### ↳ 4° Purification du produit de réaction de séquence :

Le but de cette purification est d'éliminer l'excès des réactifs de la réaction de séquençage pour ne pas gêner le séquençage.

Dans cette étape on utilise le puit de plaque où on met :

- ✧ 45µL de Solution SAM™ (tampon) ;
- ✧ 10µl de Solution XTerminator™ (résines)
- ✧ 10µL de produit de PCR

☞ Volume final = 65µl

Par la suite, on procède à légère une agitation pendant 30 min, suivie d'une centrifugation. Enfin on transfère le surnageant contenant les fragments à séquencer dans les puits de la plaque du séquenceur.

#### ↳ 5° Chargement du séquenceur

Dans la dernière étape on met la plaque dans le séquenceur qui est capable d'automatiser l'opération de séquençage de l'ADN par l'électrophorèse capillaire en utilisant des tubes capillaires de verre de seulement quelques microns de diamètre, sur plusieurs dizaines de centimètres de longueur (30 à 50 cm en général), pour réaliser la séparation des brins d'ADN de cette électrophorèse .

Une fois arrivés au site de détection, les quartes fluorochromes des dDNTP terminaux seront excités, suite à cette dernière, chaque fluorochrome émettra une lumière à une longueur d'onde différente qui sera détectée puis convertie en séquence par le logiciel d'analyse des séquences.



**Fig 26 : séquenceur Dx 3500 à 8 capillaires**

Troisième partie :  
Résultats & discussions

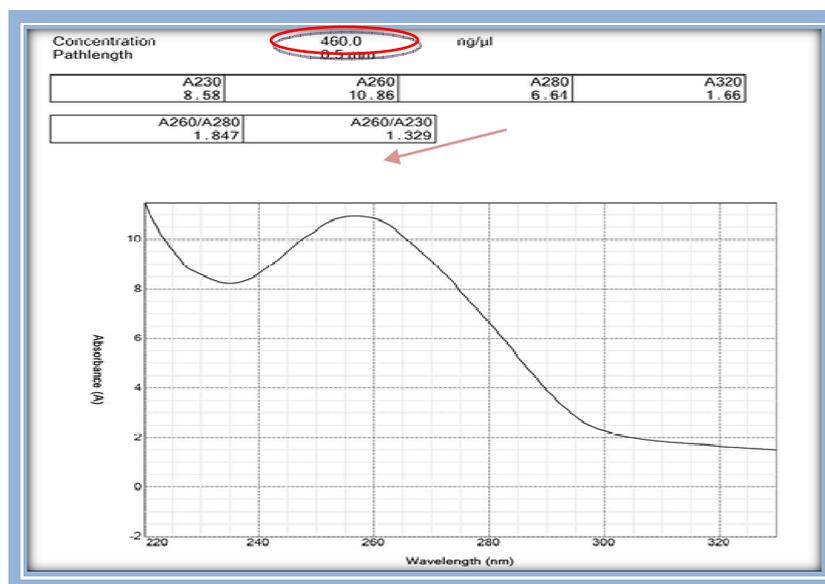
L'objectif de ce travail est de diagnostiquer par biologie moléculaire le syndrome de Rett tout en étudiant les mutations présentes dans notre échantillon de population marocaine.

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

### 1\* Résultats de dosage d'ADN par NanoDrop

Tous les prélèvements présentent une absorbance à 260, cela traduit par le pic au niveau de cette absorbance (voir annexe 4), et par conséquent une bonne concentration d'ADN (tableau 7).

Exemple du patient 2 :  $[ADN] = 460 \text{ ng}/\mu\text{l}$



**Fig 27 : exemple de dosage d'ADN par NanoDrop**

**Tableau 7 : concentration d'ADN des différents patients atteints le syndrome de Rett**

N°	Prénom	Concentration d'ADN en ng/μl
P1	Salma	609
P2	Marowa	460
P3	Safae	413
P4	salwa	83.5
P5	Romaysae	312
P6	Imane	123
P7	Sara	540.5
P8	Douae	399.5

## 2\* Résultats de la mise au point de PCR

Etude par PCR du gène MECP2, est faite par les étapes suivantes :

### ↪ 1° Design des amorces

Le choix des amorces a été mené du laboratoire de la génétique médicale de Necker en France, tout en vérifiant les critères de sa sélection.

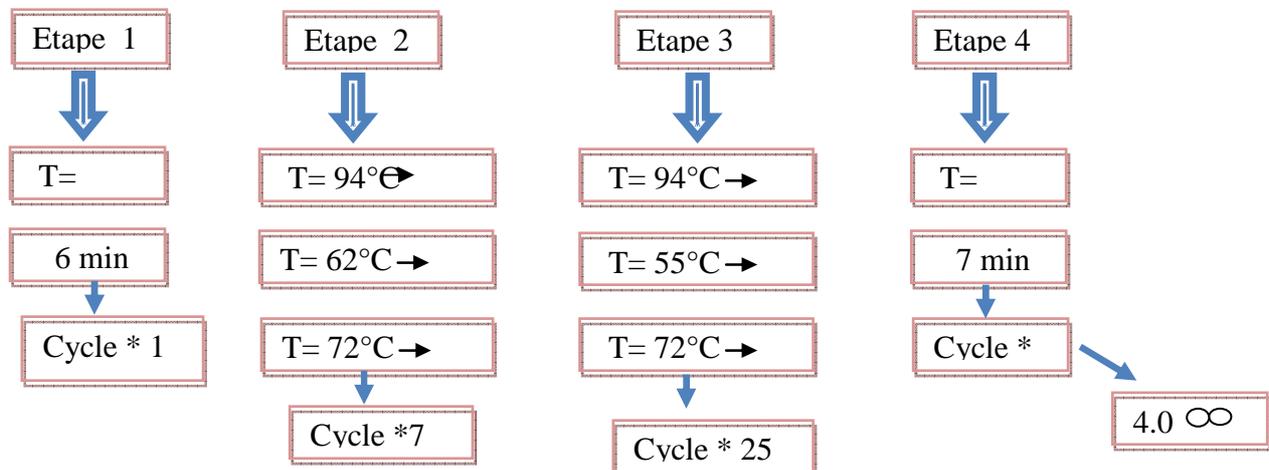
Exemple 'exon 1 l' amorce A':

#### EXON 1 :

```
CAGCCATCAACAGCTGGAGGGGTCGCCCCCTTTCCCTGGCCGAAATGGACAGGAAATCTCGCCAATTGACGGC
ATCGCCGCTGAGACCTCCCCCTCCCCGTCCTCCCCGTCCCAGCCCGGCCATCACAGCCAATGACGGGCGGGCT
CGCAGCGGCGCCGAGGGCGGGGCGCGGGCGCGCAGGTGCAGCAGCGCGGGGCCGCAAGAGGGCGGGGCGCGGA
CGTCCGGCCGTGCGGGGTCCGGAAAATCGGCGGGCGCGCGCTCCCTCCTCTCGGAGAGAGGGCTGTGGTCCCCGC
CGTCCGGAAAATGGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCGCCGAGCGGAGGAGGAGGAGGCGAGGAGGAGAGACTGTG
AGTGGGACCGCCGTGGCCGCGGGCGGGGACCCCTTGCCGGGGGGCGGGGGTCAGGGGCGGGACGTGGCGCGGGAGG
GGCCCGGGGTCCGACGACACGGCTGGCGGATGGCGTCCCTCCCTCTCTACCTCCCCCTCCGCGCCGCCGGT
GGCGACTCTCCCCTCGGCCCGTACCCGTGCTCGCGGGTGACCGTCTCGGCGGCCTCCCTGGAGCCGCCTTC
```

### 2° Optimisation de la réaction de PCR

#### 2-1\* Protocole initial utilisé



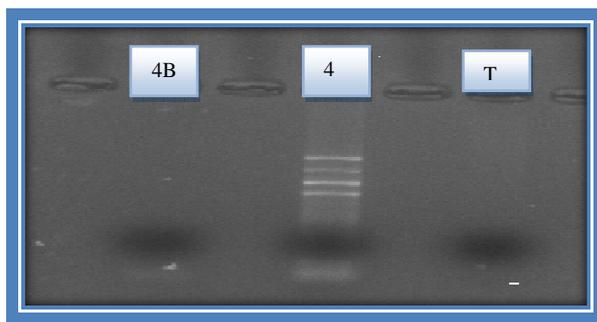


Fig 28 : amplification par les amorces 4A et 4B avec  $T_m$  (Etape 2) = 62°C,  $T_m$  (Etape 3)= 55°C et [ADN]= 200ng.

Le résultat obtenu en utilisant ce protocole initial est de 4 bandes au lieu d'une seule. Ainsi, notre réaction de PCR doit être optimisée en modifiant les paramètres suivants :

- ✗ La température d'hybridation ;
- ✗ La concentration d'ADN ;
- ✗ La concentration des amorces ;
- ✗ Mgcl2... .

### 2-2\* Optimisation de Température d'hybridation

Toujours par établir les conditions de température optimales d'hybridation des amorces, c'est-à-dire la température d'amplification la plus élevée sans diminution appréciable du rendement. Pour ce faire, nous procédons par un gradient de température (intervalles de 6-8°C) en nous inspirant des valeurs calculées selon les pourcentages de liens AT et GC  $T_m = [4(A+T) + 2(C+G)]$  et les températures théoriques retrouvées par l'institut de synthèse des amorces (Génome) (Tableau 8).

*Tableau 8: températures optimales d'hybridations des amorces (F et R) :*

Exons	$T_m$ calculé $= 2 * (T + A) + 4 * (C + G)$		$T_m$ de Génome	
	F	R	F	R
<i>Exon 1</i>	60	52	58.8	60.5
<i>Exon 2</i>	60	60	57.3	57.3
<i>Exon 3A</i>	60	68	60.5	62.1
<i>Exon 3B</i>	64	58	63.1	58.2
<i>Exon 3C</i>	60	62	58.8	58.9
<i>Exon 4A</i>	62	56	60	62
<i>Exon 4B</i>	68	62	62	60
<i>Exon 4C</i>	62	60	59.4	57.3
<i>Exon 4D</i>	60	62	57.3	59.4

Sur ce, la température optimale d'amplification a été choisie en fonction des  $T_m$  donnée par la société et qui est calculée par la formule suivante :  $T_H = T_m - 5$  (tableau 9).

**Tableau 9 : programme de cycle de température au niveau du thermocycleur (Applied Biosysteme)**

<i>E</i> tapes	<i>Activation d'ADN polymérase</i>		<i>Dénaturation Stage 2et 3</i>		<i>Hybridation Stage 2et 3</i>		<i>Elongation Stage 2et 3</i>		<i>Poursuivis de cycle</i>		<i>Nombre de Cycles</i>	
	<i>T°C+</i> <i>temps</i>	<i>C°</i>	<i>Tps (min)</i>	<i>C°</i>	<i>Tps (sec)</i>	<i>Tm</i>	<i>Tps (sec)</i>	<i>°</i>	<i>Tps (sec)</i>	<i>C°</i>		<i>Tps (min)</i>
<i>Exons</i>												
1		94	6	94	30	3	30	72	30/45	72	7	7/25
2		94	6	94	30	3	30	72	30/45	72	7	7/25
3A 3B 3C		94	6	94	30	56 57 53	30	72	30/45	72	7	7/25
4A 4B 4C 4D		94	6	94	30	55 55 53 53	30	72	30/45	72	7	7/25

### 2-3\* Concentration d'ADN

Une Forte concentration d'ADN peut inhiber la réaction de PCR, de même une concentration faible ne permettra pas son amplification. Pour cela, il faut chercher sa concentration idéale, ceci est fait par une gamme de concentration croissante de 50ng/μl jusqu'à 400ng/μl. La vérification de la bonne concentration se fait par la migration sur gel des produits PCR, jusqu'à l'absence de tout Smear ou pattes et à la présence d'une bande de taille attendue et d'intensité satisfaisante. (Tableau 10)

### 2-4 Concentration des dNTPs

Les dNTPs sont des bases de nucléotides (A, C, G et T), leurs concentrations varient selon la taille du fragment amplifié. C'est-à-dire un long fragment a besoin de plus de nucléotide pour sa synthèse qu'un fragment de petite taille.

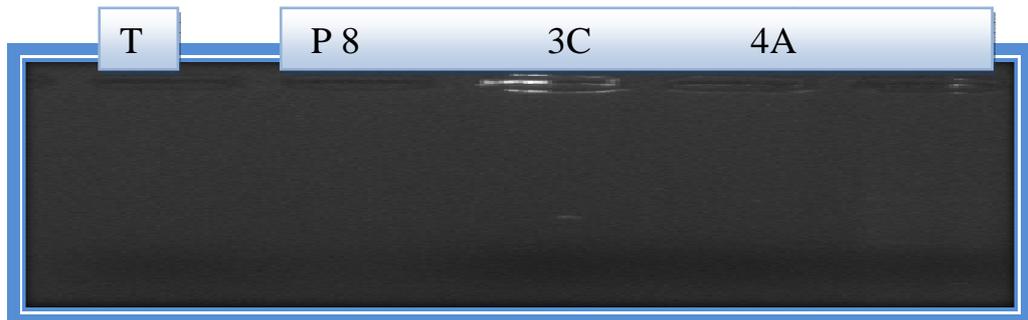
En principe la bonne concentration de dNTPs utilisée est de 2,5mM (Tableau 10).

**Tableau10: Mélange réactionnel pour chaque gène pour volume totale de 25  $\mu$ l**

<i>Exons Compositions</i>	<i>1 <math>\mu</math>l</i>	<i>2 <math>\mu</math>l</i>	<i>3 <math>\mu</math>l</i>	<i>4 <math>\mu</math>l</i>
<i>Mgcl2</i>	<i>1mM</i> ==1	<i>1mM</i> ==1.5	<i>1mM</i> ==1.5	<i>1mM</i> ==1.5
<i>Tampon</i>	<i>5X</i> ==5	<i>1X</i> ==2.5	<i>1X</i> ==2.5	<i>1X</i> ==2.5
<i>dNTP 0.2mM</i>	2.5	2	2	2
<i>Amorce F10<math>\mu</math>mol</i>	2	0.5	0.5	0.5
<i>Amorce R 10<math>\mu</math>mol</i>	2	0.5	0.5	0.5
<i>ADN polymérase (AmpliTaq Gold ) 1.5U/<math>\mu</math>l</i>	0.5	0.25	0.25	0.25
<i>ADN( 100ng/<math>\mu</math>l)</i>	1	1	1	1
<i>Eau (qsp 25 <math>\mu</math>l)</i>	9	16.75	16.75	16.75
<i>DMSO</i>	<i>7,5%</i> ==1.5	-	-----	-----

### 2-5 Essai de la PCR sans étape 2

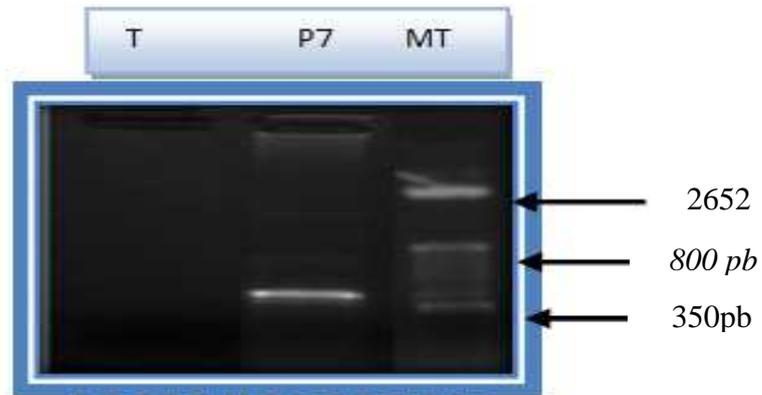
Après avoir déterminé les différents paramètres utilisés dans les différentes étapes, j'ai réalisé une autre manipulation dans le cadre de découvrir l'intérêt de l'étape 2 dans l'amplification des amorces. En éliminant cette étape aucun résultat n'est montré. Donc cette dernière est indispensable pour la réussite de la PCR.



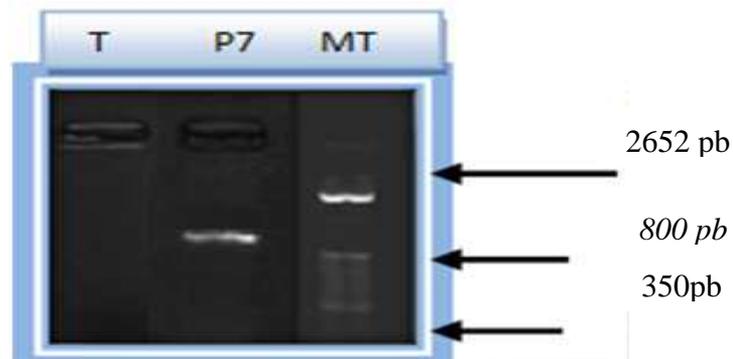
**Fig 29 : amplification par les amorces 4A et 4B sans étape 2**

↪ 3- PCR pour l'exon 4 avec les amorces 4C, 4D et en fixant la concentration d'ADN entre 50 et 100 ng

**3-1\* PCR pour l'exon 4 amorce 4C**



**Fig 30** : Résultats de l'amplification par PCR de l'exon 4 du gène MECP2 à partir de l'ADN du patient 7 en utilisant l'amorce 4C  
\*MT désigne marqueur de taille en pb



**Fig 31** : Résultats d'amplification par PCR avec l'amorce 4D à partir de l'ADN génomique de l'exon 4 du gène MECP2 chez le patient 7.

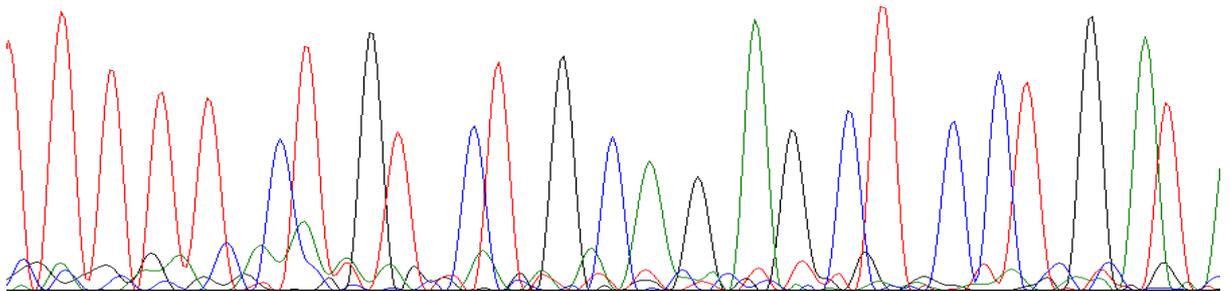
Les résultats obtenus montrent que le couple d'amorce F et R 4D (Fig 30) et 4C (Fig 31) du gène MECP2 « exon 4 », génère un fragment de la taille attendue pour le patient 7 Rett et qu'il sera séquencé par la suite

### *3\* Résultats de séquençage:*

#### Unité de génétique médicale et d'oncogénétique CHU Fès :

Le séquençage a été réalisé sur le produit de PCR du patient 7 (figures 30, 31).

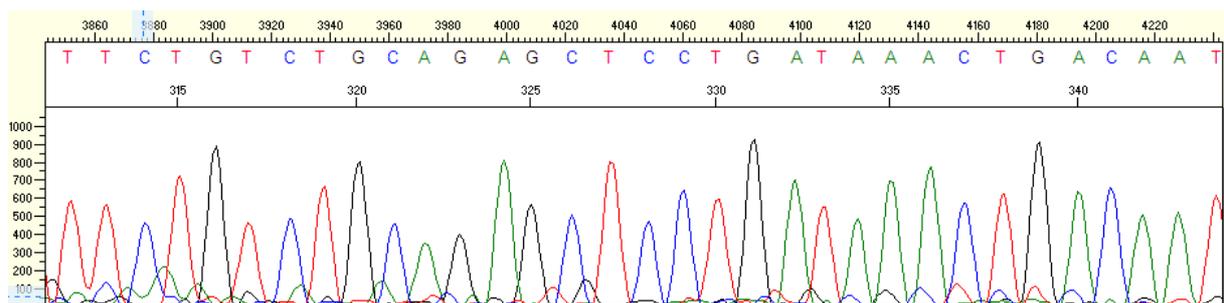
- La première migration (figure 30) génère une seule bande a été séquencée par l'amorce 4C (F, R), dont la dilution du produit de séquençage est de  $\frac{1}{2}$ .



**Fig 32 :** Analyse de la séquence de l'exon 4 de gène MECP2 par l'amorce 4C (F,R ) du patient 7.

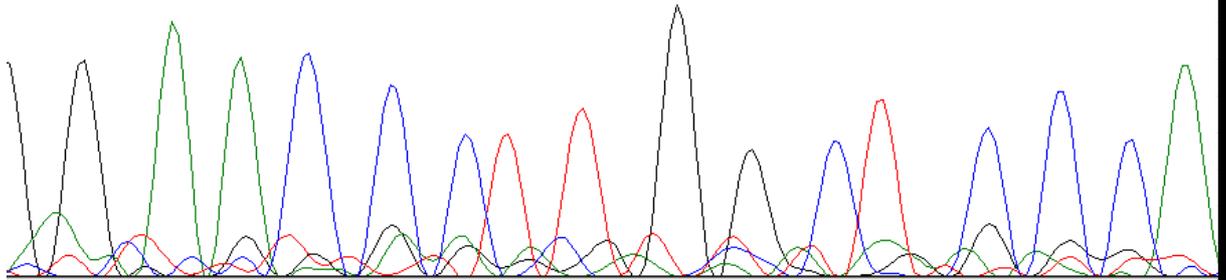
On ne peut pas réaliser un alignement puisqu'il y a la présence des bruits de fond qui sont dus, soit à la concentration de dilution du produit de séquence, soit à la purification de la réaction de séquence, ou bien soit à l'optimisation de condition de PCR.

Après une deuxième dilution de  $\frac{1}{2}$  on constate une diminution de bruit de fond (figure 33).



**Fig 33 :** 2<sup>ème</sup> séquence de l'exon 4 de gène MECP2 par l'amorce 4C (F, R) du patient 7.  
"Dilution de  $\frac{1}{4}$ "

- Pour la deuxième migration (figure 31) qui a été réalisée par l'amorce 4D (F, R), la présence aussi des bruits de fond (figure 34) qui empêchent de réaliser l'alignement par BLAST.



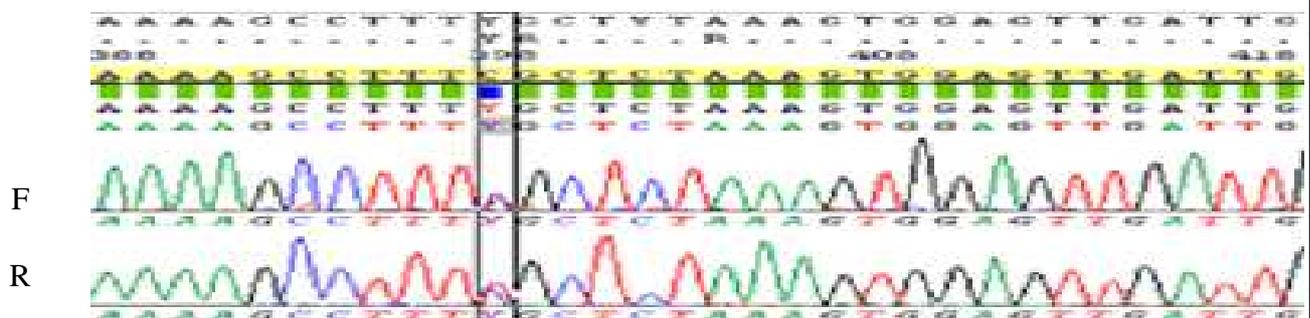
**Fig 34** : Analyse de la séquence de l'exon 4 de gène MECP2 par l'amorce 4D (F,R) du patient 1.

Ce travail représente la première étude réalisée au Maroc sur le syndrome de Rett. L'analyse moléculaire sera disponible au profit des patients marocains dans le futur proche, en explorant en premier l'exon 4 et en deuxième lieu les autres exons.

#### Laboratoire de Génétique Humaine CHU de Nancy-Brabois :

Au niveau du laboratoire de Génétique Humaine CHU de Nancy-Brabois, on a analysé les patients de syndrome de Rett par d'autres amorces spécifiques (voir annexe 5) qui ont permis d'obtenir des mutations au niveau de gène MECP2, exon 4.

- On ce qui concerne la séquence réalisée par l'amorce 4A (F, R), la présence d'une mutation délétère chez le patient 4 "397 C>T" à l'état hétérozygote dans l'exon 4 du gène MECP2 (Fig35).



**Fig 35** : Analyse de la séquence de l'exon 4 de gène MECP2 par l'amorce 4A (F,R) du

Après alignement et correction des séquences par "BLAST", les résultats ont confirmé la mutation sur ce gène de ce patient (figures 36).

```

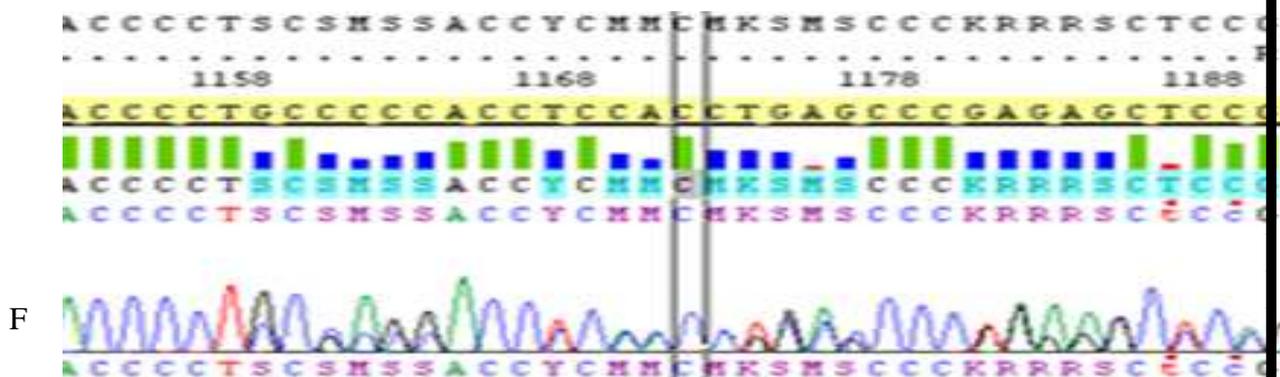
Score = 660 bits (357)   Expect = 0.0
Identities = 359/360 (99%)   Gaps = 0/360 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 1      TCCCCAGGGAAAAGCCTTTCTCTAAAGTGGAGTTGATTGCGTACTTCGAAAAGGTAGG 60
Sbjct 604    TCCCCAGGGAAAAGCCTTTCTCTAAAGTGGAGTTGATTGCGTACTTCGAAAAGGTAGG 663
Query 61     CGACACATCCCTGGACCCTAATGATTTTGACTTCACGGTAACTGGGAGAGGGAGCCCCTC 120
Sbjct 664     CGACACATCCCTGGACCCTAATGATTTTGACTTCACGGTAACTGGGAGAGGGAGCCCCTC 723
Query 121    CCGGCGAGAGCAGAAACCACCTAAGAAGCCCAATCTCCCAAAGCTCCAGGAAGTGGCAG 180
Sbjct 724     CCGGCGAGAGCAGAAACCACCTAAGAAGCCCAATCTCCCAAAGCTCCAGGAAGTGGCAG 783
Query 181    AGGCCGGGGACGCCCAAGGGGAGCGGCACCACGAGACCCAAGGCGGCCACGTCAGAGGG 240
Sbjct 784     AGGCCGGGGACGCCCAAGGGGAGCGGCACCACGAGACCCAAGGCGGCCACGTCAGAGGG 843
Query 241    TGTGCAGGTGAAAAGGGTCTCTGGAGAAAAGTCCITGGGAAGCTCCTTGTCAAGATGCCITT 300
Sbjct 844     TGTGCAGGTGAAAAGGGTCTCTGGAGAAAAGTCCITGGGAAGCTCCTTGTCAAGATGCCITT 903
Query 301    TCAAACCTCGCCAGGGGGCAAGGCTGAGGGGGGTGGGGCCACCACATCCACCAGGTCAT 360
Sbjct 904     TCAAACCTCGCCAGGGGGCAAGGCTGAGGGGGGTGGGGCCACCACATCCACCAGGTCAT 963
  
```

**Fig 36:** Résultat de l'alignement de MECP2 du patient 4

L'alignement de cette première partie d'exon 4 montre une mutation de substitution de paires de nucléotide de type transition 397C>T (figure 35,36) et par conséquent elle a engendré au niveau protéique Arg133 en Cys.

■ Pour la séquence établie par l'amorce 4B (F, R), on peut mettre en évidence la présence des mutations chez deux patients 5 et 6.

✗ Patient 5: présente une mutation délétère 1158\_1186 del à l'état hétérozygote dans l'exon 4 (Fig 37).



**Fig 37 :** Analyse de la séquence de l'exon 4 de gène MECP2 par l'amorce 4B (F, R) du patient 5.

Après alignement et correction des séquences par "BLAST", les résultats ont confirmé la mutation sur ce gène (figure 38).

```

Score = 545 bits (295), Expect = 1e-152
(identities = 313/331 (95%), Gaps = 0/331 (0%))
Strand=Plus/Plus
Query 1 CAAGGAGAGCAGCCCCAAGGGGCGCAGCAGCAGCGCCTCCTCACCCCCAAGAAGGAGCA 60
Sbjct 1140 CAAGGAGAGCAGCCCCAAGGGGCGCAGCAGCAGCGCCTCCTCACCCCCAAGAAGGAGCA 1199
Query 61 CCACCACCATCACCACCACCTCAGAGTCCCCAAGGSCCCCGTGCCACTGCTCCCACCCCT 120
Sbjct 1200 CCACCACCATCACCACCACCTCAGAGTCCCCAAGGSCCCCGTGCCACTGCTCCCACCCCT 1259
Query 121 SCSMSAACYCMMCKMSGCCGRRRSC TCCGAGGACCCACCCAGCCCCCCTGAGCCCCA 180
Sbjct 1260 GCCCCAGGTCCAGCTGAGGCCCCAGCTCCGAGGACCCACCCAGCCCCCCTGAGCCCCA 1319
Query 181 GGACTTGAGCAGCAGCGTCTGCAAAGAGGAGAAGATGCCAGAGGAGGCTCACTGGAGAG 240
Sbjct 1320 GGACTTGAGCAGCAGCGTCTGCAAAGAGGAGAAGATGCCAGAGGAGGCTCACTGGAGAG 1379
Query 241 CGACGGCTGCCCAAGGAGCCAGCTAAGACTCAGCCCCGGGTTGCCACCCGCCACGGC 300
Sbjct 1380 CGACGGCTGCCCAAGGAGCCAGCTAAGACTCAGCCCCGGGTTGCCACCCGCCACGGC 1439
Query 301 CGCAGAAAAGTACAAACACCGAGGGGAGGGA 331
Sbjct 1440 CGCAGAAAAGTACAAACACCGAGGGGAGGGA 1470
  
```

Fig 38 : Résultat de l'alignement de MeCP2 du patient 5.

L'alignement de cette partie d'exon 4 avec l'amorce 4B montre une mutation délétère de paires de nucléotide. 1158\_1186del (figure 37,38) et par conséquence elle a engendré au niveau protéique Pro387 Arg fsX8.

- ✗ **Patient 6** : présent deux mutations 916 C>T; 1208dupC dans l'exon 4 du gène MECP2 (Fig 39, 40).

☞ Mutation 916C>T

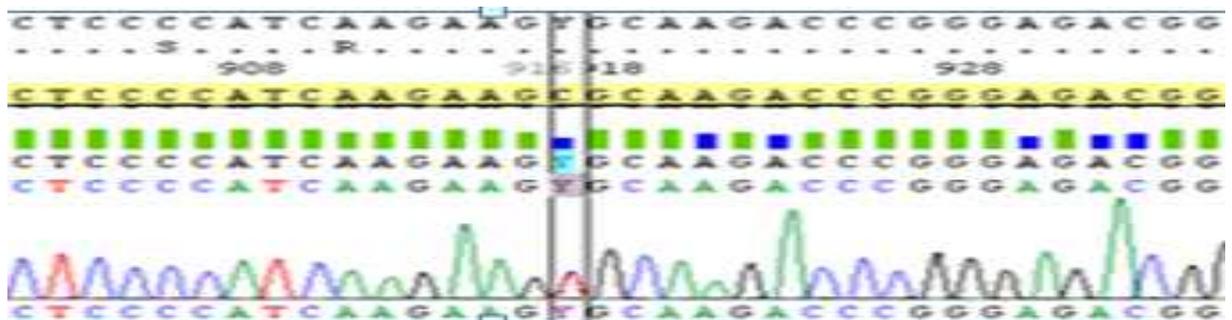


Fig 39 : Analyse de la séquence de l'exon 4 de gène MECP2 par l'amorce 4B (F, R) du patient 6.

Après alignement et correction des séquences, les résultats ont confirmé la mutation sur le gène MECP2 (figure 40).

```

Score = 440 bits (238), Expect = 4e-121
Identities = 239/240 (99%), Gaps = 0/240 (0%)
Strand=Plus/plus
Query 1 GAAACGGGGCCGAAAGCCGGGGAGTGTGGTGGCAGCCGCTGCCGCCGAGGCCAAAAAGAA 60
Sbjct 900 GAAACGGGGCCGAAAGCCGGGGAGTGTGGTGGCAGCCGCTGCCGCCGAGGCCAAAAAGAA 959
Query 61 AGCCCGTGAAGGAGTCTTCTATCCGATCTGTGCAGGAGACCGTACTCCCCATCAAGAACTG 120
Sbjct 960 AGCCCGTGAAGGAGTCTTCTATCCGATCTGTGCAGGAGACCGTACTCCCCATCAAGAACTG 1019
Query 121 CAAGACCCGGGAGACGGTCAGCATCGAGGTCAAGGAAGTGGTGAAGCCCCTGCTGGGTGC 180
Sbjct 1020 CAAGACCCGGGAGACGGTCAGCATCGAGGTCAAGGAAGTGGTGAAGCCCCTGCTGGGTGC 1079
Query 181 CACCCTCGGTGAGAAGAGCGGGAAAGGACTGAAGACCTGTAAGAGCCCTGGGCGGAAAAAG 240
Sbjct 1080 CACCCTCGGTGAGAAGAGCGGGAAAGGACTGAAGACCTGTAAGAGCCCTGGGCGGAAAAAG 1139

```

Fig 40: Résultat de l'alignement de MECP2 du P6

L'alignement de cette partie d'exon établi par l'amorces 4B montre une mutation de substitution de paires de nucléotide de type transition 916C>T (figure 39, 40) et par conséquence elle a engendré au niveau protéique Arg306Cys.

↳ Mutation 1208dupC

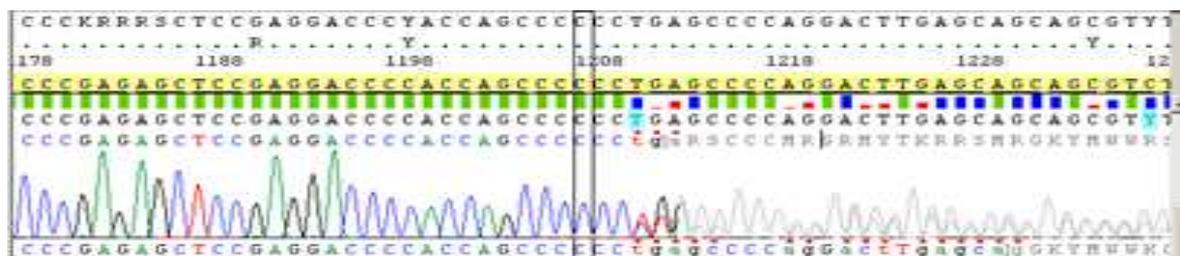


Fig 41 : Analyse de la séquence de l'exon 4 de gène MeCP2 par l'amorce 4B (F, R) du patient 6

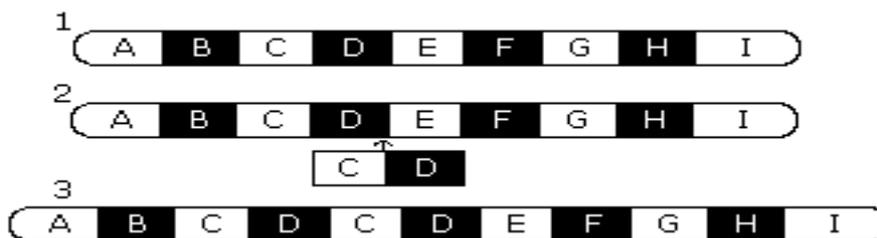


Fig 42 : une mutation de duplication d'une partie de gène

1-Chromosome normal avant mutation

2-Gènes du chromosome homologue sont copiés et inséré dans la séquence génétique

3-Nouveau chromosome possède tous les gènes initiaux ainsi qu'un double emploi, qui est généralement inoffensive

```

Score = 416 bits (225), Expect = 5e-114
Identities = 240/246 (98%), Gaps = 6/246 (2%)
Strand=Plus/Plus

Query 1      CCACCACCATCACCACCACTCAGAGTCCCCAAAGGCCCCCGTGCCACTGCTCCCACCCCT 60
            |||
Sbjct 1200   CCACCACCATCACCACCACTCAGAGTCCCCAAAGGCCCCCGTGCCACTGCTCCCACCCCT 1259

Query 61     GCCCCACCTCCACCTGAGCCCGAGAGCTCCGAGGACCCACCAGCCCCCCCCCTGA 120
            |||
Sbjct 1260   GCCCCACCTCCACCTGAGCCCGAGAGCTCCGAGGACCCACCAGCCCC-----TGA 1313

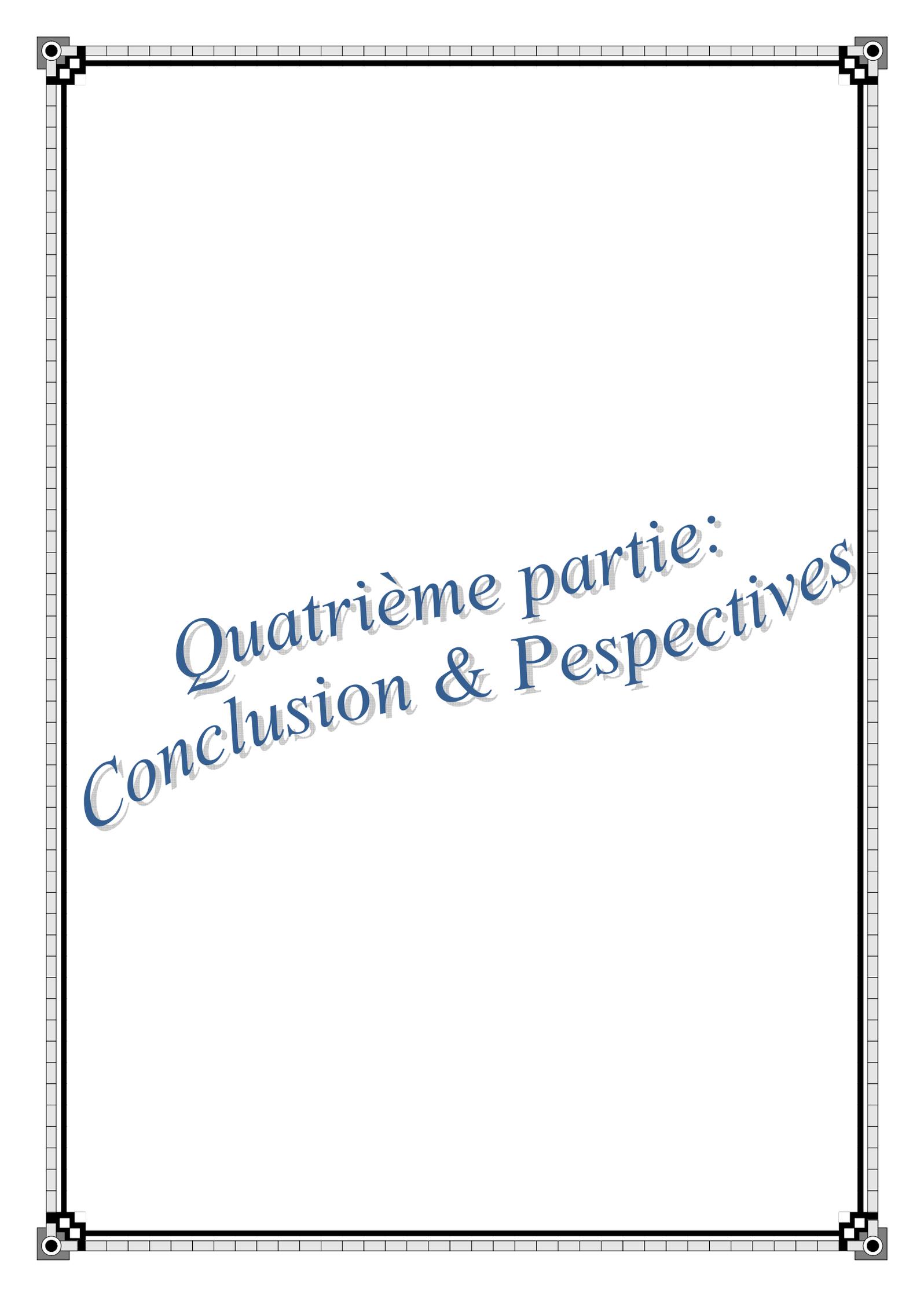
Query 121    GCCCCAGGACTTGAGCAGCAGCGTCTGCAAAGAGGAGAAGATGCCAGAGGAGGCTCACT 180
            |||
Sbjct 1314   GCCCCAGGACTTGAGCAGCAGCGTCTGCAAAGAGGAGAAGATGCCAGAGGAGGCTCACT 1373

Query 181    GGAGAGCGACGGCTGCCCAAGGAGCCAGCTAAGACTCAGCCCGCGGTTGCCACCGCCGC 240
            |||
Sbjct 1374   GGAGAGCGACGGCTGCCCAAGGAGCCAGCTAAGACTCAGCCCGCGGTTGCCACCGCCGC 1433

Query 241    CACGGC 246
            |||
Sbjct 1434   CACGGC 1439
  
```

Fig 43 : Résultat de l'alignement de MECP2 du P6

On ce qui concerne cette mutation 1208dupC, les gènes mutants sont affichées deux fois sur le même chromosome au terme de duplication de ces gènes. Cela peut révéler une mutation avantageuse étant donné aucune information génétique perdue ou modifiée et de nouveaux gènes sont acquis.



*Quatrième partie:  
Conclusion & Perspectives*

# conclusion

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

Ce travail est une contribution à l'étude au Maroc d'aspect génétique par le diagnostic moléculaire des maladies neurologique dans le but de trouver une corrélation phénotypes – génotypes chez ces patients avec la maladie de syndrome de Rett.

En France en 1999, Amir et al. (Amir et al. 1999) mirent en évidence 5 mutations dans le gène MECP2 chez 29 patientes étudiées, ce qui représentait un taux de couverture du syndrome de Rett d'environ 20%. Lors de la deuxième publication (Wan et al. 1999), le gène MECP2 fut incriminé dans 50% des cas. Aujourd'hui, les analyses le mettent en cause dans 80 à 85%, voire même 100% des cas (Auranen et al. 2001). Cette augmentation est à corrélérer fortement avec une sélection de plus en plus stricte des patientes présentant un syndrome de Rett typique.

Lors de mon travail nous avons réalisé une étude génétique sur 8 patients, de la région, par la mise au point de la technique PCR pour relever les mutations responsable de ce syndrome. Par exemple :

- la mutation 397C>T chez la patiente 4, qui à une récurrence de 29 fois en France (28). C'est une mutation de faux-sens localisé au niveau de l'exon 4 précisément au niveau de la région MBD « domaine de liaison aux cytosines méthylées »
- la mutation 916C>T chez la patiente 6, qui à une récurrence de 45 fois en France (28). C'est une mutation de faux-sens localisé au niveau de l'exon 4 précisément au niveau de la région TRD « domaine de répression transcriptionnelle»
- la mutation 1158-1186del chez la patiente 5, C'est une mutation de délétère localisé au niveau de l'exon 4 précisément au niveau de la région TRD « domaine de répression transcriptionnelle»

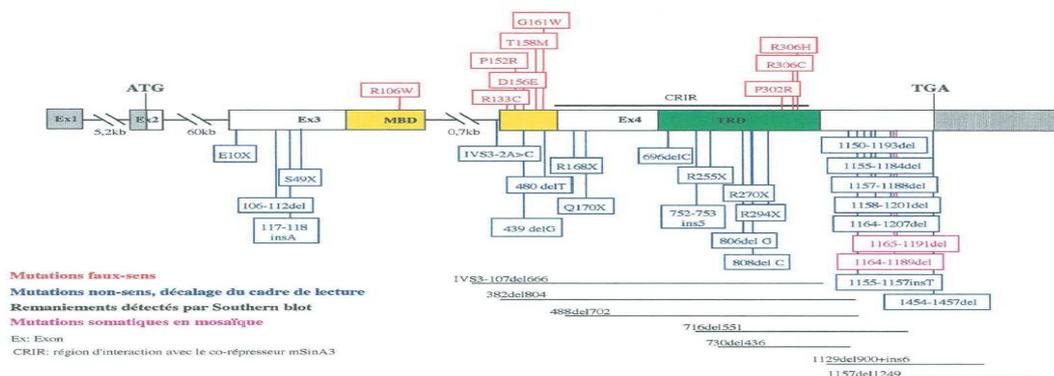


Fig 44 : une comparaison différentes mutations du gène MECP2 identifiées en France

Tout en comparant avec la France selon (Wan et al. 1999), on remarque que la majorité des substitutions correspondaient à des transitions C>T localisées au niveau de sites 5'CpG3'. Ceci est le cas des 2 patientes parmi 3 précédemment citées. Les dinucléotides 5'CpG3' sont sous-représentés dans le génome humain du fait de leur hypermutabilité. En effet, 60 à 90% de ces dinucléotides ont une cytosine méthylée chez l'Homme et cette cytosine méthylée peut être désaminée spontanément pour donner une thymine. Il a été montré que le système de réparation de l'ADN ne reconnaissait pas efficacement le mésappariement T-G, contribuant ainsi au maintien de la substitution par transition C>T au cours du cycle suivant de réplication de l'ADN (Bird 1986). Ce mécanisme de mutagenèse du gène MECP2 ne constitue pas une particularité, il est retrouvé dans de nombreux autres gènes (Krawczak et al. 1996).

D'autre part, la région codante 3' de l'exon 4 du gène MECP2 (entre les nucléotides 1011 et 1189) est encline à de petites délétions (de 7 à 191 pb). L'analyse de la séquence de cette région et notamment à proximité des bornes des délétions, met en évidence des répétitions de pentanucléotides: CCACC qui seraient responsables de mésappariements à l'origine des délétions (Bienvenu et al. 2000).

# *Perspectives*

Afin de réaliser la mise au point de PCR pour détecter les différentes mutations responsables de ce syndrome. Le vise à faire des analyses sur un grand nombre échantillon dès qu'on disposera de nouveaux patients par des collaborations avec d'autre CHU du Maroc dans le but de valider la fiabilité de ce test moléculaire et l'appliqué dans le diagnostique local au sein de l'unité.

*Annexes  
&  
Références bibliographiques*

# Annexe 1

## Fiche de consentement

### FORMULAIRE DE RECUEIL DE CONSENTEMENT ÉCLAIRE

Participation à une recherche biomédicale

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

De : Mr .....

Nom : .....

Prénom : .....

Adresse : .....

.....

.....

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

Age : .....

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### **Recueil des données :**

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

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

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

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

**Information :**

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

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

Je serai informé(e) des résultats globaux de l'examen, à l'issue de celui-ci.

Les prélèvements *sanguins* réalisés et inutilisés lors de cette *étude moléculaire du gène MECP2* seront conservés au DNAtèque du CHU Hassan II, Fès, MAROC

Ces prélèvements pourront être utilisés pour des recherches futures portant sur le syndrome de RETT et ce dans le respect de la confidentialité.

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

(Cocher la case correspondant à votre volonté)

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

Je conserve un exemplaire de cette information.

# Annexe 2

## Composition des produits utilisés

### ❖ Préparation des solutions utilisées dans l'extraction d'ADN par sel :

#### 🔗 Lyse des hématies : TE 20/5 : 1 L

- ✗ 20 ml de tris – HCl      pH=7.6      1M
- ✗ 10 ml EDTA disodique      pH=8      0.5M
- ✗ Complexer avec H<sub>2</sub>O distillé jusqu'à 1 l (970ml)

#### 🔗 Lyse des globules blancs:

- ✗ 10 ml de Tris HCL      pH=7.6      1 M
- ✗ 20ml EDTA disodique      pH=8      0.5M
- ✗ 20ml SDS 10% (sodium dodécyl sulfate)
- ✗ 10 ml Nacl 5M et on complète jusqu'à 1 l

#### 🔗 Lyse et conservation de la méduse d'ADN (200ml) TE 10/1

- ✗ 2 ml Tris Hcl      pH = 7.6      1M
- ✗ 400µl EDTA disodique      pH = 8      0.5 M
- ✗ Complète jusqu'à 200ml de H<sub>2</sub>O distillée

#### 🔗 Tris HCl 1M ➡ minimise l'activité DNase

- ✗ Tris base      121.1g
- ✗ Eau distillé      qsp 1L
- ✗ Ajuster le pH à 7.6 par du HCl ➡ pH=7.6 on doit ajouter 60ml d'HCl
- ✗ Autoclaver et conserver à 4°C

🔗 SDS à 10% ➡ détruit les protéines membranaires

✗ 25g de SDS + ED qsp 205ml      50g SDS + 400ml H<sub>2</sub>O ➡  
V<sub>f</sub>=500ml

✗ Conserver a température ambiante

🔗 Préparation de la protéinase K :

✗ Pour 100ml de Tampon de stockage

50ml	CaCl <sub>2</sub> mM
50 ml	Tris HCl 250mM

✗ Pour 10 ml de protéinase K solution mère :

- Ajouter 10ml de tampon de reconstitution à 100mg de protéinase K
- Mettre 200µl de la solution mère dans des tubes eppendorf de 1,5 ml
- Stocker à -20°C

🔗 Préparation de la CaCl<sub>2</sub> 50mM

✗ Dissoudre 1.375g de CaCl<sub>2</sub> (PM=110) dans 250ml d'eau distillée

🔗 Préparation du Tris HCl 250mM

✗ Prendre 25ml de la solution Tris HCl 1 M

✗ Compléter jusqu'à 100ml

🔗 Préparation de NaCl 5ml ➡ les ions Na<sup>+</sup> neutralisent la molécule d'ADN qui devient moins hydrophile et donc beaucoup moins soluble dans l'eau

✗ NaCl : 292,2g  
✗ H<sub>2</sub>O : 800ml } V<sub>F</sub>=1

🔗 Préparation d'EDTA 0.5m : ➡ agent chélateur se combine au Mg<sup>2+</sup> (cofacteur de la DNase) qui inactive sa fonction.

✗ 186,1g d'EDTA  
✗ 1000ml d'H<sub>2</sub>O  
✗ pH=8(20g de NaOH) } V<sub>F</sub>=1

❖ Préparation des solutions la migration des produits de PCR :

🔗 BET ( Bromure d'ethidium) à 10mg/ ml :

- ✗ BET : 0.5g
- ✗ Eau distillé : qsp 50ml
- ✗ Laisser dissoudre
- ✗ Conserver à 4°C et à l'abri de la lumière

🔗 Gel d'agarose à 2% :

- ✗ Agarose : 1g
- ✗ Tampon TAE 1X : 50ml
- ✗ Chauffer à ébullition
- ✗ Couler le gel dans la cuve d'électrophorèse

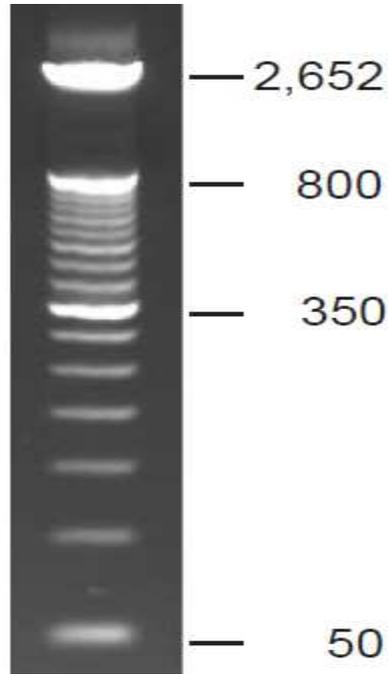
🔗 Tampon TAE (Tris-Acétate-EDTA) 50X :

- ✗ Tris-base : 242g
- ✗ EDTA 0.5M PH 8 : 100ml
- ✗ Acide acétique : 57ml
- ✗ Eau distillée : qsp 1000ml
- ✗ Alliquoter et autoclaver
- ✗ Conserver à 4°C

🔗 Tampon de charge :

- ✗ bleu de bromophénol : 0.1g
- ✗ sucrose : 50g
- ✗ eau distillée : q. s .p 100ml
- ✗ conserver la solution à 4°C

**photo du marqueur  
Ladder 50pb 150  
ng/lane  
2% E-Gel® Ex- agarose**



**du taille DNA  
ng/lane 150  
gel**

## Annexe 3

# Séquence de gène responsable de syndrome de Rett

### EXON 1 :

CAGCCATCAACAGCTGGAGGGTCCGCCCCCTTTCCCTGGCCGAAATGGACAGGAAATCTCGCCAATTGACGGC  
ATCGCCGCTGAGACCTCCCCCTCCCCGTCTCCCCGTCCCAGCCCGG**CCATCACAGCCAATGACGG**GCGGGCT  
CGCAGCGGCGCCGAGGGCGGGGCGGGGCGCGCAGGTGCAGCAGCGCGGGCCGGCCAAGAGGGCGGG**GCCGCA**  
**CGTCGGCCGTGCGGGGTCCGAAAATCGGCGGCGCGCGCTCCCTCCTCTCGGAGAGAGGGCTGTGGTCCCCGC**  
**CGTCCGAAAATGGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGAGCGGAGGAGGAGGAGGCGAGGAGGAGACT**GTG  
AGTGGGACCGCCGTGGCCGCGGGGCGGGGACCCTTGCCGGGGGGCGGGGTGAGGGGCGGGACGTGGCGCGGGAGG  
GGCCCGGGGTGCGACGACACGGCTGGCGGAT**GGCGTCCCTCCTCTAC**CCTCCCCCTCCGCGCCGCCGT  
GGCGACTCTCCCCTCGGCCGTACCCGTGCTCGGGGTGACCGTCTCGGGCCCTCCCTGGAGCCGCTTC

### EXON 2 :

TCTAACAAGCATGAATCTTTCTTTATTTTAGCACTGTGTGTTACGTGCCAGTAATTTGCAGCTTATCCTTTGTT  
TCTAGCT**AGGTAAGCTGGGAAATAGCC**TAGTACTTTGTCTATGTGTTTATCTTCAAAATGTCCTAAATAGCCCTG  
GGAAAAGGTCGTGCAGCTCAATGGGGGCTTTCAACTTACAATTTTCTTTGTTTTAG**GCTCCATAAAAAATACAGA**  
**CTCACCAGTTCCTGCTTTGATGTGACATGTGACTCCCCAGAATACACCTTGCTTCTGTAGACCAGCTCCAACAGG**  
**ATTCCATGGTAGCTGGGATGTTAGGGCTCAG**GTAAGTAACCTTCTTTTTTTTTTTTTTAGTATATGTCCTGGTTT  
GGCCATCTGTTTTTTTTTTTTTAAAAAAGGAAAAGAGGAAAAAATATACTACTCTTGACAGT  
ATAAAAGTACCCAAAGACTAAAGACA**TAACTGTGCCAACTGTGCC**ATATAATAAAAAAAGTCACTTCCCTGA  
GCCCTGAAAGTTCAG

### EXON 3 :

GTTGTCCTGGGAAGGACATCAAGATCTGAGTGTATGATGGCCTGGGGCCTTGCAATGTGGTGGG**GTCCAAGCCT**  
**GCCTCTGCTCACTTGTCTGCAGACTGGCATGTTCTGTGATACTTACATACTGTTTAAACACTCAG****GGAAGA**  
**AAAGTCAGAAGACCAGGACCTCCAGGGCCTCAAGGACAAACCCTCAAGTTTAAAAAGGTGAAGAAAGATAAGAA**  
**AGAAGAGAAAAGGGCAAGCATGAGCCCGTGCAGCCATCAGCC****CACCACTCTGCTGAGCCCGCAGAGGCAGGCAA**  
**AGCAGAGACATCAGAAGGGTCTAG**GCTCCGCCCCGGCTGTGCCGGAAGCTTCTGCCTCCCCAAACAGCGGCGCTC  
**CATCATCCGTGACCGGGGACCCATGTATGATGACCCACCCTGCC****TGAAGGCTGGACACGGAAG****CTTAAGCAAAG**  
**GAAATCTGGCCGCTCTGCTGGGAAGTATGATGTGATTTGATCAA**GTAAGTAAGAGCAACTCCTATCTCTACAGG  
GCAGGGAGGGCAGGGACAAGGATCCCTCATGGA**GCAGGAAAATGTATGTGCCA**GGGTGGGGTGGGGGGAACAT  
AAACAATGAACACTGAGACCAGGTGTGCTTGAATGACCGTGTACAGAGGTGCTGCCCT

### EXON 4 :

cggcaggcagacgagt**gagtggcttgggtgacaggt**cctcaggggcagccaggcagtgactctcgttcaatag  
taacgtttgtcagagcgttgtcaccaccatccgctctgcoctatctctgacattgctatggagagcctctaattg  
ttccttgtgtctttctgtttgcctccacag**TCCCCAGGGAAAAGCCTTTTCGCTCTAAAAGTGGAGTTGATTGCGTA**  
**CTTCGAAAAGGTAGGCGACACATCCCTGGACCCTAATGATTTGACTTACCGGTAACCTGGGAGAGGGAGCCCTC**  
**CCGGCAGAGACAGAAACCACCTAAGAAGCCAAATCTCCAAAGCTCCAGGAACTGGCAGAGG****CCGGGACGCCC**  
**CAAAGGGAGCGGCACCACGAGACCCAAGGCGCCACGTGAGGGTGTGACGGTGAAGGGTCTTGAGAAAAG**  
**TCCTGGGAAGCTCCTTGTCAAGATGCCTTTTCAAACCTTC****GCCAGGGGGCAAGGCTGAGGGGGTGGGGCCACCAC**  
**ATCCACCAGGTATGGTGTCAAACGCCCCGGCAGGAAGCGAAAAGCTGAGGCCGACCTCAGGCCATTCCCAA**  
**GAAACGGGGCCGAAAGCCGGGAGTGTGGTGGCAGCCGCTGCCGCCGAGGCCAAAAAGAAAGCCGTGAAGGAGTC**  
**TTCTATCCGATCTGTGCAGGAGACCGTACTCCCCATCAA****GAAGCGCAAGACCCGGGAGACGGTCAAGATCGAGGT**  
**CAAGGAAGTGGTGAAGCCCTGCTGGTGTCCACCCTCGGTGAGAAGAGCGGGAAAAGGACT****GAAGACCTGTAAGAG**  
**CCCTGGGCGGAAAAGCAAGGAGAGCAGCCCCAAGGGGCGCAGCAGCAGCGCTCCTCACCCCCAAGAAGGAGCA**  
**CCACCACCATCACCACACTCAGAGTCCCCAAAGGCCCCCGTGCACCTGCTCCCACCCTGCCCCACCTCCACC**  
**TGAGCCCGAGAGCTCCGAGGACCCACCAGCCCCCTGAGCCCCAGGACTTGAGCAGCAGCGTCTGCA****AAGAGGA**  
**GAAGATGCCAG****GGAGGCTCACTGGAGAGCGACGGCTGCCCAAGGAGCCAGCTAAGACTCAGCCCGGGTTGC**  
**CACCGCCGCCACGGCCGAGAAAAGTACAAACACCGAGGGGAG****GGAGAGCGCAAAGACATTGT****TTCATCCTCCAT**  
**GCCAAGGCCAAACAGAGAGGAGCCTGTGGACAGCCGGACGCCCCGTGACCGAGAGAGTTAGCTGACTTTACACGGA**  
**GCGGATTGCAAAGCAAACCAACAAGAATAAAGGCAGCTGTTGTCTTCTCCTTATGGGTAGGGCTCTGACAAAG**  
**CTTCCCATTAACTGAAATAAAAAATATTTTTTTTTTCTTTTCAGTAAACTTAGAGTTTCGTGGCTTCAGGGTGGGA**

GTAGTTGGAGCATTGGGGATGTTTTTCTTACCGACAAGCACAGTCAGGTTGAAGACCTAACCAGGGCCAGAAGTA  
GCTTTGCACTTTTCTAAACTAGGCTCCTTCAACAAGGCTTGCTGCAGATACTACTGACCAGACAAGCTGTTGACC  
AGGCACCTCCCCTCCCGCCAAACCTTTCCCCATGTGGTTCGTTAGAGACAGAGCGACAGAGCAGTTGAGAGGAC  
ACTCCCCTTTTCGGTGCCATCAGTGCCCCGTCTACAGCTCCCCCAGCTCCCCCACCTCCCCACTCCCAACCAC  
GTTGGGACAGGGAGGTGTGAGGCAGGAGAGACAGTTGGATTCTTTAGAGAAGATGGATATGACCAGTGGCTATGG  
CCTGTGCGATCCCACCCGTGGTGGCTCAAGTCTGGCCCCACACCAGCCCCAATCCAAAACCTGGCAAGGACGCCTC  
ACAGGACAGGAAAGTGGCACCTGTCTGCTCCAGCTCTGGCATGGCTAGGAGGGGGGAGTCCCTTGAACACTGCG  
TGTAGACTGGCCTGAACCACAGGAGAGGATGGCCAGGGTGAAGTGGCATGGTCCATTCTCAAGGGACGTCTCTC  
AACGGGTGGCGCTAGAGGCCATGGAGGCAGTAGGACAAGTGCAGGCAGGCTGGCCTGGGGTCAGGCGGGCAGA  
GCACAGCGGGGTGAGAGGGATTCTAATCACTCAGACAGTCTGTGACTTAGTGGACAGGGGAGGGGGCAAAGGG  
GGAGGAGAAGAAAATGTTCTTCCAGTTACTTTCCAATTCTCCTTTAGGGACAGCTTAGAATTATTTGCACATATG  
AGTCTTCATGTTCCCACTTCAAACAACAGATGCTCTGAGAGCAAACCTGGCTTGAATTGGTGACATTTAGTCCC  
TCAAGCCACCAGATGTGACAGTGTGAGAACTACCTGGATTTGTATATATACCTGCGCTTGTFTTTAAAGTGGGCT  
CAGCACATAGGGTTCACGAAGCTCCGAAACTCTAAGTGTGTTGCTGCAATTTTATAAGGACTTCTGATTGGTT  
TCTCTTCTCCCCTTCCATTTCTGCCTTTTGTTCATTTTCTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT  
TCCTAGTTCATCCCTTCTCTTCCAGGCAGCCGCGGTGCCAACCACTTGTGCGCTCCAGTCCCAGAACTCTG  
CCTGCCCTTTGTCTCTGCTGCCAGTACCAGCCCCACCTGTTTTGAGCCCTGAGGAGGCTTGGGCTCTGCTG  
AGTCCGACCTGGCCTGTCTGTGAAGAGCAAGAGAGCAGCAAGGTCTTGCTCTCTAGGTAGCCCCCTTCTCCCTG  
GTAAGAAAAGCAAAGGCATTTCCACCCTGAACAACGAGCCTTTTACCCTTCTACTCTAGAGAAGTGGACTG  
GAGGAGCTGGGCCGATTTGGTAGTTGAGGAAAGCACAGAGGCCTCCTGTGGCCTGCCAGTCATCGAGTGGCCCA  
ACAGGGGCTCCATGCCAGCCGACCTTGACCTCACTCAGAAGTCCAGAGTCTAGCGTAGTGACAGGGCAGTAGC  
GGTACCAATGCAGAACTCCCAAGACCCGAGCTGGGACCAGTACCTGGGTCCCCAGCCCTTCTCTGCTCCCCCTT  
TCCCTCGGAGTTCTTCTTGAATGGCAATGTTTTGCTTTTGTCTCGATGCAGACAGGGGGCCAGAACACCACACAT  
TCACTGTCTGTCTGGTCCATAGCTGTGGTGTAGGGGCTTAGAGGCATGGGCTTGTCTGTGGGTTTTTAATTGATC  
AGTTTTCATGTGGGATCCCATCTTTTTAACCTCTGTTTCCAGGAAGTCTTATCTAGCTGCATATCTTCATCATAT  
GGTATATCTTTTTCTGTGTTTACAGAGTCTCTTATATCTAAATCTGTCCAACTGAGAAGTACTTATCAAAG  
TAGCAAATGAGACAGCAGTCTTATGCTTCCAGAACAACCCACAGGCATGTCCCATGTGAGCTGTCCATGAACT  
GTCAAGTGTGTGTTGTCTTGTGTAATTCAGTTATTGTCCCTGGCTTCTTACTATGGTGAATCATGAAGGAGTG  
AAACATCATAGAAACTGTCTAGCACTTCCCTTGCCAGTCTTTAGTGATCAGGAACCATAGTTGACAGTTCCAATCA  
GTAGCTTAAGAAAAACCCTGTTTTGTCTCTTCTGGAATGGTTAGAAAGTGAAGGGAGTTTGGCCCGTTCTGTTTGT  
GAGTCTCATAGTTGGACTTTCTAGCATATATGTGTCCATTTCTTATGCTGTAAAAAGCAAGTCTTGCAACCAAAC  
TCCCATCAGCCCAATCCCTGATCCCTGATCCCTTCCACCTGCTCTGCTGATGACCCCCCAGCTTCACTTCTGAC  
TCTTCCCAGGAAGGGAAGGGGGGTGAGAAGAGAGGGTGAAGTCTCCAGAACTTCTTCTCCAAGGACAGAAGGCT  
CCTGCCCCCATAGTGGCCTCGAACTCCTGGCACTACCAAAGGACACTTATCCACGAGAGCGCAGCATCCGACCAG  
GTTGTCACTGAGAAGATGTTTATTTTGGTCAAGTTGGGTTTTTATGTATTATACTTAGTCAAATGTAATGTGGCTT  
CTGGAATCATTGTCCAGAGCTGCTTCCCCGTCACCTGGGCGTCATCTGGTCCCTGGTAAGAGGAGTGGCTGGCCCA  
CCAGGCCCCCTGTCAACCATGACAGTTCATTAGGGCCGATGGGGCAGTCGTGGTTGGGAACACAGCATTTCAA  
GCGTCACTTTATTTTCACTCGGGCCCCACCTGCAGCTCCCTCAAAGAGGCAGTTGCCAGCCTCTTTCCCTTCCAG  
TTTATTTCCAGAGCTGCCAGTGGGGCCTGAGGCTCCTTAGGGTTTTCTCTCTATTTCCCCCTTTCTTCTCATTTCC  
CTCGTCTTTCCCAAAGGCATCACGAGTCACTGCCTTTTCCAGCAGGAGCCTTGGCGGTTTATCGCCCTGGCAGGC  
AGGGGCCCTGCAGCTCTCATGCTGCCCCCTGCCTTGGGGTCAAGTTGACAGGAGGTTGGAGGGAAAGCCTTAAGCT  
GCAGGATTCTCACCAGCTGTGTCCGGCCAGTTTTGGGGTGTGACCTCAATTTCAATTTTGTCTGTACTTGAACA  
TTATGAAAGTGGGGCCTCTTTTCAAGTGAATTTGTGAACAGCAGAATTGACCGACAGCTTTCCAGTACCCATGGGG  
CTAGGTCAATTAAGGCCACATCCACAGTCTCCCCACCTTGTTCAGTTGTTAGTTACTACCTCTCTCTGACA  
ATACTGTATGTCGTGAGCTCCCCCAGGTCTACCCTCCCCGGCCCTGCTGTGGTGGGCTTGTCAATAGCCAGT  
GGGATTGCCGGTCTTGACAGCTCAGTGAGCTGGAGATACTTGGTCAAGCCAGGCGCTAGCACAGCTCCCTTCTG  
TTGATGCTGTATTCCCATATCAAAGACACAGGGGACACCCAGAAACGCCACATCCCCCAATCCATCAGTGCCAA  
ACTAGCCAACGGCCCCAGCTTCTCAGCTCGCTGGATGGCGGAAGCTGCTACTCGTGAGCGCCAGTGCAGGTTGCAG  
ACAATCTTCTGTTGGGTGGCATCATTCCAGGCCCGAAGCATGAACAGTGCACCTGGGACAGGGAGCAGCCCCAAA  
TTGTCACCTGCTTCTCTGCCCAGCTTTTCAATTGCTGTGACAGTGTGCGAAAGAGGGTAATAACCAGACACAAA  
CTGCCAAGTTGGGTGGAGAAAGGAGTTTCTTTAGCTGACAGAATCTCTGAATTTTAAATCACTTAGTAAGCGGCT  
CAAGCCCAGGAGGGAGCAGAGGGATACGAGCGGAGTCCCCTGCGCGGGACCATCTGGAATTTGGTTTAGCCAAAGT  
GGAGCCTGACAGCCAGAACTCTGTGTCCCCGTCTAACCACAGCTCCTTTTCCAGAGCATTCAGTCAAGGCTCTC  
TGGGCTGACTGGGCCAGGGGAGGTTACAGGTACCAGTCTTTAAGAAGATCTTTGGGCATATACATTTTATGCT  
GTGTCATTGCCCAAATGGATTCTGTTTCAAGTTTACACCTGCAGATTCTAGGACCTGTGTCTTAGACTTCCAGG  
GAGTCAGCTGTTTCTAGAGTTTCTACCATGGAGTGGGTCTGGAGGACCTGCCCGGTGGGGGGGAGAGCCCTGCT  
CCCTCCGGGTCTTCTACTCTTCTCTGCTCTGACGGGATTTGTTGATTCTCTCCATTTTGGTGTCTTTCTCTT  
TTAGATATTGTATCAATCTTTAGAAAAGGCATAGTCTACTTGTATAAAATCGTTAGGATACTGCCTCCCCAGGG  
TCTAAAATTACATATTAGAGGGGAAAAGCTGAACACTGAAGTCAAGTCTTCAACAATTTAGAAGGAAAACCTAGAA  
AACATTTGGCAGAAAATTACATTTGATGTTTTTGAATGAATACGAGCAAGCTTTTACAACAGTGTGATCTAAA  
AATACTTAGCACTTGGCCTGAGATGCCTGGTGAGCATTACAGGCAAGGGGAATCTGGAGGTAGCCGACCTGAGGA

CATGGCTTCTGAACCTGTCTTTTGGGAGTGGTATGGAAGGTGGAGCGTTTACCAGTGACCTGGAAGGCCAGCAC  
CACCTCCTTCCCCTCTTCTCATCTTGACAGAGCCTGCCCCAGCGCTGACGTGTCAGGAAAACACCCAGGGAAC  
TAGGAAGGCACCTTCTGCCTGAGGGGAGCAGCCTGCCTTGGCCACTCCTGCTCTGCTCGCCTCGGATCAGCTGAGCCT  
TCTGAGCTGGCCTCTCACTGCCTCCCCAAGGCCCCCTGCCTGCCCTGTGAGGAGGCAGAAGGAAGCAGGTGTGAG  
GGCAGTGCAAGGAGGGAGCACAACCCCCAGCTCCCGCTCCGGGCTCCGACTTGTGCACAGGCAGAGCCAGACCC  
TGGAGGAAATCCTACCTTTGAATTCAGAACATTTGGGGAATTTGGAAATCTCTTTGCCCCAAAACCCCATTTCT  
GTCCTACCTTTAATCAGGTCTGCTCAGCAGTGAGAGCAGATGAGGTGAAAAGGCCAAGAGGTTTGGCTCCTGCC  
CACTGATAGCCCCCTCTCCCCGAGTGTGTTGTGTGCAAGTGGCAAAGCTGTTCTTCTGGTGACCCTGATTATAT  
CCAGTAACACATAGACTGTGCGCATAGGCCCTTTGTCTCCTCTATCCTGGGCTTTTGTGTTTGTCTTTTAGT  
TGCTTTTAGTTTTCTGTCCCTTTTATTTAACGCACCGACTAGACACAAAAGCAGTTGAATTTTATATATATA  
TCTGTATATTGCACAATTATAAACTCATTGCTTGTGGCTCCACACACACAAAAAAGACCTGTTAAAAATTATA  
CCTGTTGCTTAATTACAATATTTCTGATAACCATAGCATAGGACAAGGGAAAAATAAAAAAAGAAAAAAGAAAA  
AAAAACGACAAATCTGTCTGCTGGTCACTTCTTCTGTCCAAGCAGATTTCGTGGTCTTTTCTCGCTTCTTTCAAG  
GGCTTCTGTGCCAGGTGAAGGAGGCTCCAGGCAGCACCCAGGTTTTGCACTCTTGTGTTTCTCCCGTGCTTGTGA  
AAGAGGTCCCAAGGTTCTGGGTGCAGGAGCGCTCCCTTGACCTGCTGAAGTCCGGAACGTAGTCGGCACAGCCTG  
GTCGCCTTCCACCTCTGGGAGCTGGAGTCCACTGGGGTGGCCTGACTCCCCAGTCCCCTTCCCGTGACCTGGT  
AGGGTGAGCCCATGTGGAGTCAGCCTCGCAGGCCTCCCTGCCAGTAGGGTCCGAGTGTGTTTATCCTTCCCCT  
CTGTGAGCCTGGGGGCTGGAGCGGAGACGGGAGGCCTGGCCTGTCTCGGAACCTGTGAGCTGCACCAGTGTAGAA  
CGCCAGGGACCCAGAATCATGTGCGTCAGTCCAAGGGTCCCCTCCAGGAGTAGTGAAGACTCCAGAAATGTCC  
CTTTCTTCTCCCCATCCTACGAGTAATTGCATTTGCTTTTGAATTTCTTAATGAGCAATATCTGCTAGAGAGTT  
TAGCTGTAACAGTTCTTTTTGATCATCTTTTTTAATAATTAGAAAACCAAAAAAATCCAGAACTTGTCTTCTC  
CAAAGCAGAGAGCATTATAATCACCAGGGCCAAAAGCTTCCCCTCCCTGCTGTGATTGCTTCTTCTGAGGCCTGAA  
TCCAAAAGAAAAACAGCCATAGGCCCTTTCAGTGGCCGGGCTACCCGTGAGCCCTTCGGAGGACCAGGGCTGGGG  
CAGCCTCTGGGCCACATCCGGGGCCAGCTCCGGCGTGTGTTTCAAGTGTAGCAGTGGGTGATGATGCTCTTTCCC  
ACCCAGCCTGGGATAGGGGAGAGGAGGCGAGGAGGCCGTTGCCGCTGATGTTTGGCCGTGAACAGGTGGGTGTC  
TGCGTGCCTCCACGTGCGTGTGTTTCTGACTGACATGAAATCGACCCCGAGTTAGCCTCACCCGTTGACCTTAG  
CCCTGCCCGGATGGAGCGGGGCCACCCGGTTCAGTGTGTTTCTGGGGAGCTGGACAGTGGAAAAGGCTTGC  
AGAACTTGAAGCCTGCTCCTTCCCTTGTACCACGGCCTCCTTTCCGTTTGATTGTCAGTGTCAATCAATAA  
CAGCCGCTCCAGAGTCAGTAGTCAATGAATATATGACCAAATATCACCAGGACTGTTACTCAATGTGTGCCGAGC  
CCTTGCCCATGCTGGGCTCCCGTGTATCTGGACACTGTAACGTGTGCTGTGTTTGTCTCCCTTCCCCTTCCCTTCTT  
TGCCCTTACTTGTCTTTCTGGGGTTTTTCTGTTTGGGTTTTGGTTTTTATTTCTCCTTTTGTGTTCCAAA  
CATGAGGTTCTCTACTGGTCTCTTAACTGTGGTGTGAGGCTTATATTTGTGTAATTTTTGGTGGGTGAAAG  
GAATTTTGCTAAGTAAATCTCTTCTGTGTTTGAAGTGAAGTCTGTATTGTAATATGTTTAAAGTAATTGTTCCA  
GAGACAAATATTTCTAGACACTTTTTCTTTACAAACAAAAGCATTTCGGAGGGAGGGGATGGTACTGAGATGAG  
AGGGGAGAGCTGAACAGATGACCCCTGCCAGATCAGCCAGAAGCCACCCAAAGCAGTGGAGCCAGGAGTCCCA  
CTCCAAGCCAGCAAGCCGAATAGCTGATGTGTTGCCACTTTCCAAGTCACTGCAAAACCAGGTTTTTGTTCGCCCC  
AGTGGATTCTGTTTTGCTTCCCCTCCCCCGAGATTATTACCACCATCCCGTGTCTTTAAGGAAAAGGCAAGATT  
GATGTTTTCTTGAGGGGAGCCAGGAGGGGATGTGTGTGTGCAGAGCTGAAGAGCTGGGGGAGAAATGGGGCTGGGCC  
CACCAAGCAGGAGGCTGGGACGCTCTGCTGTGGGCACAGGTGAGGCTAATGTTGGCAGATGCAGCTCTTCCCTGG  
ACAGGCCAGGTGGTGGGCATTCTCTCTCCAAGGTGTGCCCCGTGGGCATTACTGTTTAAAGCACTTCCGTCACAT  
CCCACCCATCCTCCAGGGCTCAACACTGTGACATCTCTATTCCCACCCCTCCCCTTCCAGGGCAATAAAAATGA  
CCATGGAGGGGGCTTGACTCTCTTGGCTGTACCCGATCGCCAGCAAAACTTAGATGTGAGAAAACCCCTTCCC  
ATTCATGGCGAAAACATCTCCTTAGAAAAGCCATTACCCTCATTAGGCATGGTTTTGGGCTCCAAAACACCTG  
ACAGCCCTCCCTCCTCTGAGAGGCGGAGAGTGTGACTGTAGTGACCATTGCATGCCGGGTGCAGCATCTGGAA  
GAGCTAGGCAGGGTGTCTGCCCCCTCCTGAGTTGAAGTCATGCTCCCCTGTGCCAGCCAGAGGCGGAGAGCTAT  
GGACAGCATTGCCAGTAACACAGGCCACCCTGTGCAGAAGGGAGCTGGCTCCAGCCTGGAAAACCTGTCTGAGGTT  
GGGAGAGGTGCACTTGGGGCACAGGGAGAGGCCGGGACACACTTAGCTGGAGATGTCTCTAAAAGCCCTGTATCG  
TATTCACCTTCAGTTTTTGTGTTTTGGGACAATTACTTTAGAAAATAAGTAGGTCGTTTTAAAAACAAAAATTAT  
TGATTGCTTTTTTGTAGTGTTCAGAAAAAGGTTCTTTGTGTATAGCCAAATGACTGAAAAGCACTGATATATTTA  
AAAACAAAAGGCAATTTATTAAGGAAATTTGTACCATTTAGTAAACCTGTCTGAATGTACCTGTATACGTTTCA  
AAAACACCCCCCCCCACTGAATCCCTGTAACCTATTTATTATATAAAGAGTTTGCCTTATAAATTTacataaaa  
atgtcggttgtgtcttttgttgtaaaaatcaagtgattttttcataaggttcttttactattggaaaagatggg  
cagcagcagttttattttatttttgaagttttttaatacatgtgaaagcaagaataactcagcatgcctttct  
aagtgacgcggtttgcacctttt

# Annexe 4

## Dosage d'ADN par NanoDrop

SR P2 MAROUA

DNA

21/03/2012 10:43:58

Product NanoVue  
Version 4282 V2.0.4  
Serial Number 116259  
Date 21 March 2012  
Time 10:43:58

Instrument Calibration Fail  
21 March 2012 10:40:57

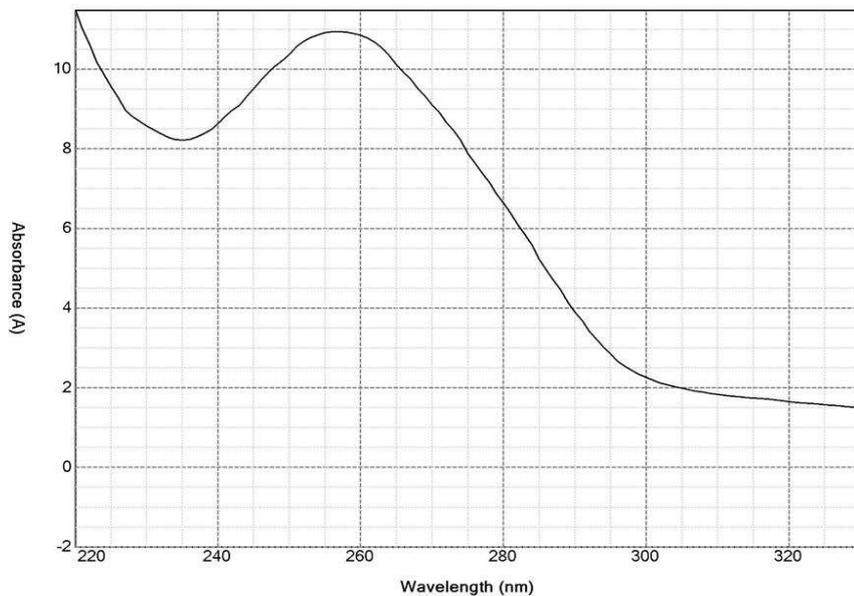
Pathlength Automatic  
Dilution Factor 1.000  
Background On  
Factor 50.0  
Units ng/ $\mu$ l

Sample 2

Concentration 460.0 ng/ $\mu$ l  
Pathlength 0.5 mm

A230	A260	A280	A320
8.58	10.86	6.64	1.66

A260/A280	A260/A230
1.847	1.329



# SR P6 IMANE

DNA

21/03/2012 10:45:43

Product NanoVue  
Version 4282 V2.0.4  
Serial Number 116259  
Date 21 March 2012  
Time 10:45:43

Instrument Calibration Fail  
21 March 2012 10:40:57

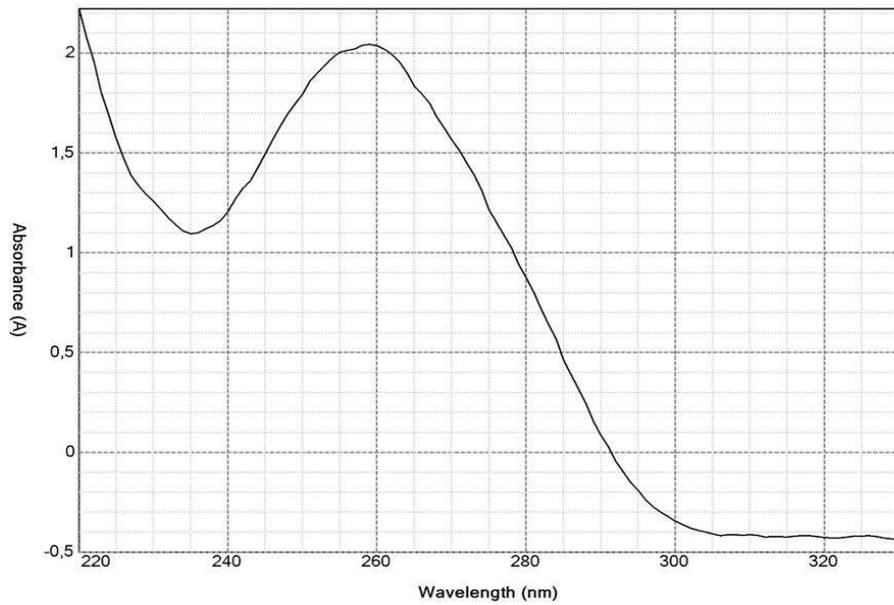
Pathlength Automatic  
Dilution Factor 1.000  
Background On  
Factor 50.0  
Units ng/ $\mu$ l

Sample 3

Concentration 123.0 ng/ $\mu$ l  
Pathlength 0.5 mm

A230	A260	A280	A320
1.26	2.04	0.88	-0.42

A260/A280	A260/A230
1.892	1.464



# SR P1 SALMA

DNA

21/03/2012 10:47:15

Product NanoVue  
Version 4282 V2.0.4  
Serial Number 116259  
Date 21 March 2012  
Time 10:47:15

Instrument Calibration Fail  
21 March 2012 10:40:57

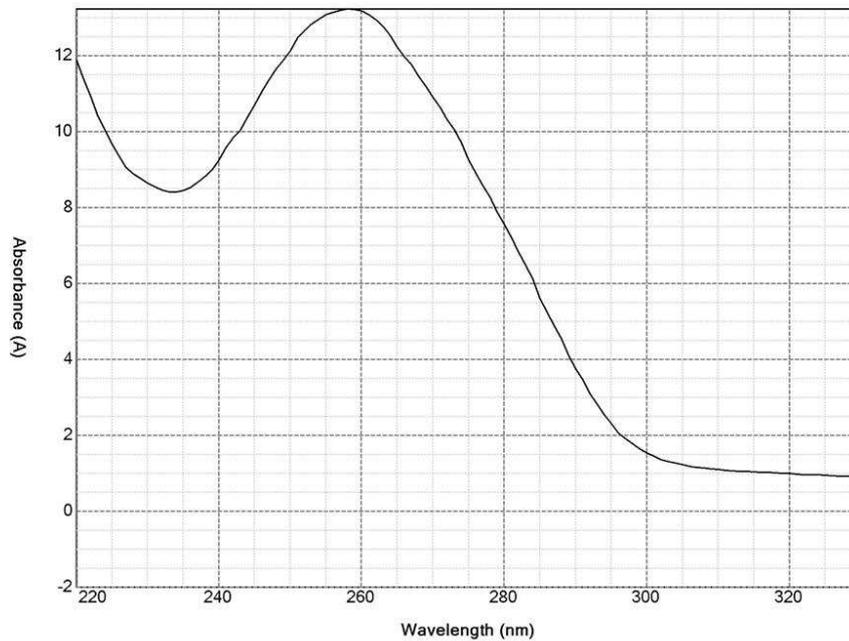
Pathlength Automatic  
Dilution Factor 1.000  
Background On  
Factor 50.0  
Units ng/ $\mu$ l

Sample 4

Concentration 609.5 ng/ $\mu$ l  
Pathlength 0.5 mm

A230	A260	A280	A320
8.64	13.18	7.55	0.99

A260/A280	A260/A230
1.858	1.593



# SR P5 ROMAYSAE

DNA

21/03/2012 10:48:33

Product NanoVue  
Version 4282 V2.0.4  
Serial Number 116259  
Date 21 March 2012  
Time 10:48:33

Instrument Calibration Fail  
21 March 2012 10:40:57

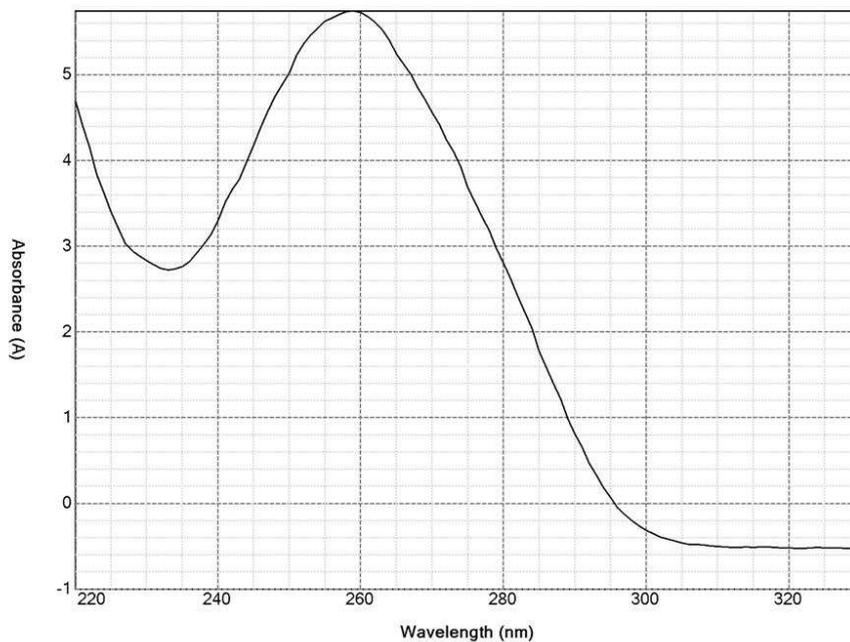
Pathlength Automatic  
Dilution Factor 1.000  
Background On  
Factor 50.0  
Units ng/ $\mu$ l

Sample 5

Concentration 312.5 ng/ $\mu$ l  
Pathlength 0.5 mm

A230	A260	A280	A320
2.83	5.73	2.80	-0.52

A260/A280	A260/A230
1.883	1.866



# SR P4 SALWA

## DNA

21/03/2012 10:49:47

Product NanoVue  
Version 4282 V2.0.4  
Serial Number 116259  
Date 21 March 2012  
Time 10:49:47

Instrument Calibration Fail  
21 March 2012 10:40:57

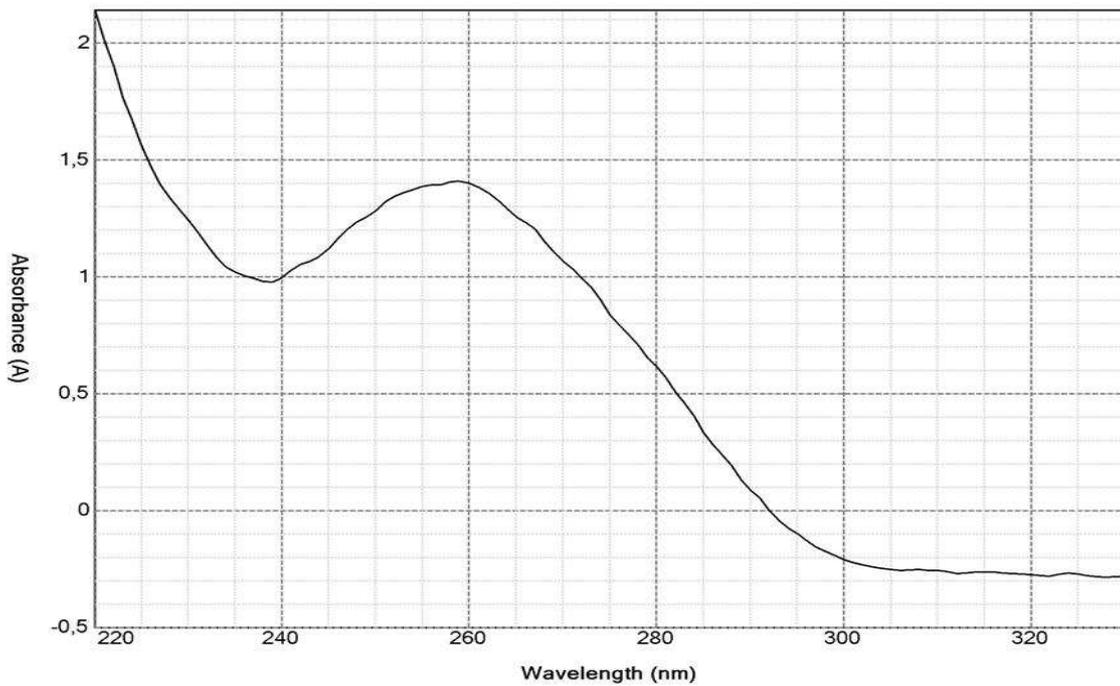
Pathlength Automatic  
Dilution Factor 1.000  
Background On  
Factor 50.0  
Units ng/ $\mu$ l

Sample 6

Concentration 83.5 ng/ $\mu$ l  
Pathlength 0.5 mm

A230	A260	A280	A320
1.25	1.40	0.62	-0.274

A260/A280	A260/A230
1.876	1.099



# SR P3 SAFAE

## DNA

21/03/2012 10:51:15

Product NanoVue  
Version 4282 V2.0.4  
Serial Number 116259  
Date 21 March 2012  
Time 10:51:15

Instrument Calibration Fail  
21 March 2012 10:40:57

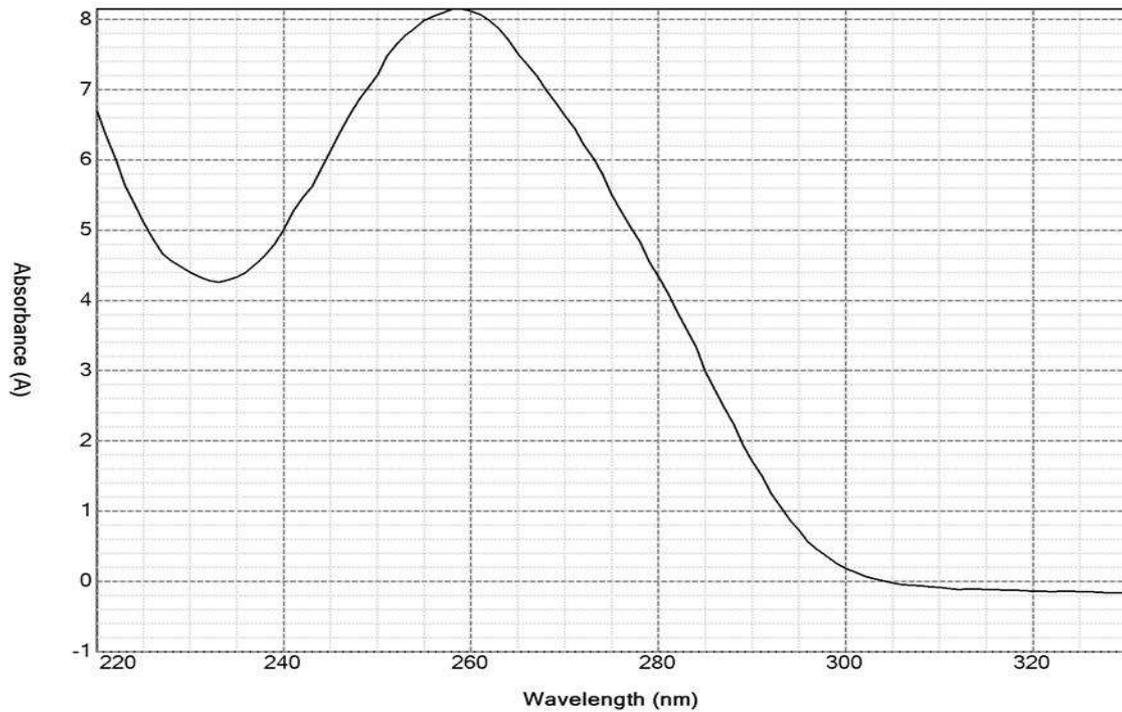
Pathlength Automatic  
Dilution Factor 1.000  
Background On  
Factor 50.0  
Units ng/ $\mu$ l

Sample 7

Concentration 413.0 ng/ $\mu$ l  
Pathlength 0.5 mm

A230	A260	A280	A320
4.40	8.13	4.34	-0.132

A260/A280	A260/A230
1.848	1.823



# SR P7 SARA

## DNA

21/03/2012 10:54:30

Product NanoVue  
Version 4282 V2.0.4  
Serial Number 116259  
Date 21 March 2012  
Time 10:54:30

Instrument Calibration Fail  
21 March 2012 10:40:57

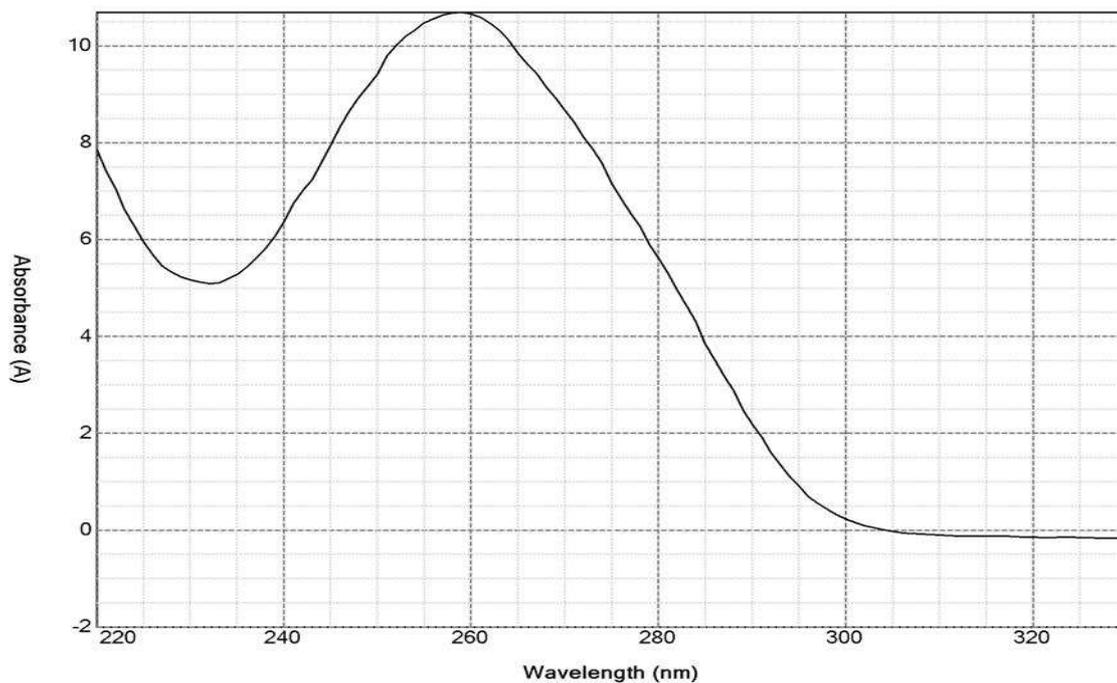
Pathlength Automatic  
Dilution Factor 1.000  
Background On  
Factor 50.0  
Units ng/ $\mu$ l

Sample 8

Concentration 540.5 ng/ $\mu$ l  
Pathlength 0.5 mm

A230	A260	A280	A320
5.17	10.67	5.61	-0.139

A260/A280	A260/A230
1.880	2.036



# SR P8 Douae

DNA

14/05/2012 10:41:39

Product NanoVue  
Version 4282 V2.0.4  
Serial Number 116259  
Date 14 May 2012  
Time 10:41:39

Instrument Calibration Pass  
14 May 2012 10:34:45

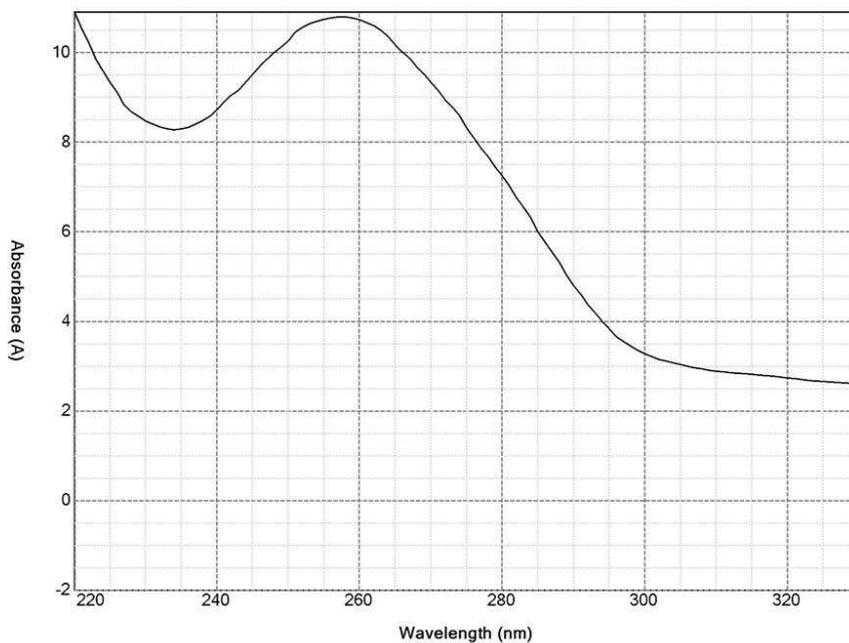
Pathlength Automatic  
Dilution Factor 1.000  
Background On  
Factor 50.0  
Units ng/ $\mu$ l

Sample 2

Concentration 399.5 ng/ $\mu$ l  
Pathlength 0.5 mm

A230	A260	A280	A320
8.48	10.73	7.24	2.74

A260/A280	A260/A230
1.776	1.392



## Annexe 5

# Protocole d'amplification par PCR du gène MECP2

"Laboratoire Nancy France"

### Amorces

Couples	sens (5'->3')	séquence	taille du produit
exon 4A	Fbis	TGT AAA ACG ACG GCC AGT CGT TTG TCA GAG YGT TGT CA	339 pb
	R	CAG GAA ACA GCT ATG ACC ACA GAT CGG ATA GAA GAC TCC TT	
exon 4B	F	TGT AAA ACG ACG GCC AGT CTT TTC AAA CTT CGC CAG GG	582 pb
	R	CAG GAA ACA GCT ATG ACC TGC TCA AGT CCT GGG GCT CA	

### Exon 4A, 4B :

	Cf	V /tube
Tampon thermoprime	1X	2,5 µl
MgCL <sub>2</sub> thermoprime	1,5 mM	1,5 µl
dNTP	0,2 mM	2 µl
Amorces F+R	0,2 µM	0,5 µl
Taq Thermoprime	1,5 U/µl	0,25 µl
H2O		16,75 µl
Total MIX		24 µl
+ ADN (200ng/µl)		1 µl

### 2. Réaction d'amplification par PCR

Température	temps	Nb de cycles
95 °C	5 min	32 autres 38 e1/pro
95 °C	30sec	
62°C e4A, e4B	30 sec	
72 °C	45sec	
72 °C	10 min	
4 °C	∞	

# Références bibliographique

- [1] <http://www.xtraordinaire.org/genetique.html>
- [2] [http://fr.wikipedia.org/wiki/Chromosome\\_X](http://fr.wikipedia.org/wiki/Chromosome_X)
- [3] *Le syndrome de Rett. Encyclopédie orphanet grand public.*  
[www.orpha.net/data/phatho/pub/fr/rett-FRfrPub91v01.pdf](http://www.orpha.net/data/phatho/pub/fr/rett-FRfrPub91v01.pdf)/ mai 2006.
- [4] Professeur Josette MANCINI « le syndrome de Rett » mars 2004.
- [5] Lyon, M. F. *Gene action in the X-chromosome of the mouse (Mus musculus L.).*  
*Nature* 190:372.
- [6] *MeCP2: structure and function* Nicholas L. Adkins and Philippe T. Georgel  
*Biochem. Cell Biol.* Downloaded from [www.nrcresearchpress.com](http://www.nrcresearchpress.com) by Laurentian University on 02/15/12.
- [7] Lewis, J. D., R. R. Meehan, W. J. Henzel, I. Maurer-Fogy, P. Jeppesen, F. Klein, and A. Bird. . *Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA.* *Cell* 69:905.
- [8] Meehan, R. R., J. D. Lewis, and A. P. Bird. 1992. *Characterization of MeCP2, a vertebrate DNA binding protein with affinity for methylated DNA.* *Nucleic Acids Res* 20:5085.
- [9] Reichwald, K., J. Thiesen, T. Wiehe, J. Weitzel, W. A. Poustka, A. Rosenthal, M. Platzer, W. H. Stratling, and P. Kioschis. 2000. *Comparative sequence analysis of the MECP2-locus in human and mouse reveals new transcribed regions.* *Mamm Genome* 11:182.
- [10] Klose, R. J., S. A. Sarraf, L. Schmiedeberg, S. M. McDermott, I. Stancheva, and A. P. Bird. 2005. *DNAbinding selectivity of MeCP2 due to a requirement for A/T sequences adjacent to methyl-CpG.* *Mol Cell* 19:667.

- [11]cc Wakefield, R. I., B. O. Smith, X. Nan, A. Free, A. Soteriou, D. Uhrin, A. P. Bird, and P. N. Barlow. 1999. *The solution structure of the domain from*
- [12] Kaludov, N. K., and A. P. Wolffe. 2000. *MeCP2 driven transcriptional repression in vitro: selectivity for methylated DNA, action at a distance and contacts with the basal transcription machinery. Nucleic Acids Res 28:192.*
- [13] Buschdorf, J. P., and W. H. Stratling. 2004. *A WW domain binding region in methyl-CpG-binding protein MeCP2: impact on Rett syndrome. J Mol Med 82:135.*
- [14] Jung, B. P., D. G. Jugloff, G. Zhang, R. Logan, S. Brown, and J. H. Eubanks. 2003. *The expression of methyl CpG binding factor MeCP2 correlates with cellular differentiation in the developing rat brain and in cultured cells. J Neurobiol 55:86.*
- [15] Adachi, M., E. W. Keefer, and F. S. Jones. 2005. *A segment of the Mecp2 promoter is sufficient to drive expression in neurons. Hum Mol Genet 14:3709.*
- [16] Liu, J., and U. Francke. 2006. *Identification of cis-regulatory elements for MECP2 expression. Hum Mol Genet 15:1769.*
- [17] *Specific association between the methyl-CpG-binding domain protein 2 and the hypermethylated region of the human telomerase reverse transcriptase promoter in cancer cells. Chatagnon A, Bougel S, Perriaud L, Lachuer J, Benhattar J, Dante R. Carcinogenesis. 2009 Jan;30 (1):28-34.*
- [18] Kouzarides, T. 2002. *Histone methylation in transcriptional control. Curr Opin Genet Dev 12:198.*
- [19] Fuks, F., P. J. Hurd, D. Wolf, X. Nan, A. P. Bird, and T. Kouzarides. 2003. *The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. J Biol Chem 278:4035.*
- [20] [http://www.germaco.net/RettMecp2fonction\\_fr.html](http://www.germaco.net/RettMecp2fonction_fr.html) *Spectrum and distribution of MECP2 mutations in 424 Rett syndrome patients: a molecular update.*
- [21] *Amandine Chatagnon<sup>1,y</sup>, Ste´phanie Bougel<sup>2,y</sup>, Laury Perriaud<sup>1</sup>, Joe´l Lachuer<sup>3</sup>, Jean Benhattar<sup>2</sup> and Robert Dante<sup>1, \_</sup> Specific association between the methyl-CpG-binding domain protein 2 and the hypermethylated region of the human telomerase reverse transcriptase promoter in cancer cells Carcinogenesis vol.30 no.1 pp.28–34, 2009*

- [22] *Violaine BOURDON le 6 juin 2002 Développement d'une stratégie de criblage du gène MECP2 chez des patientes atteintes d'un syndrome de Rett : Mise en évidence d'un spectre hétérogène de mutations*
- [23] *Ballestar, E., S. Ropero, M. Alaminos, J. Armstrong, F. Setien, R. Agrelo, M. F. Fraga, M. Herranz, S. Avila, M. Pineda, E. Monros, and M. Esteller. 2005. The impact of MECP2 mutations in the expression patterns of Rett syndrome patients. Hum Genet 116:91.*
- [24] *Traynor, J., P. Agarwal, L. Lazzeroni, and U. Francke. 2002. Gene expression patterns vary in clonal cell cultures from Rett syndrome females with eight different MECP2 mutations. BMC Med Genet 3:12.*
- [25] *Drewell, R. A., C. J. Goddard, J. O. Thomas, and M. A. Surani. 2002. Methylation-dependent silencing at the H19 imprinting control region by MeCP2. Nucleic Acids Res 30:1139.*
- [26] *Chen, W. G., Q. Chang, Y. Lin, A. Meissner, A. E. West, E. C. Griffith, R. Jaenisch, and M. E. Greenberg. 2003. Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2. Science 302:885.*
- [27] *Laboratoire de CHU Nancy Dr Christophe PHILIPPE Praticien Hospitalier (Génétique moléculaire) Maître de Conférences des Universités CHU 47- 04 : Génétique Humaine Laboratoire de Génétique Humaine- EA 4368 CHU de Nancy-Brabois*

# Liste des Figures

	Page
<i>Figure 1 : Différents niveaux d'organisation de la chromatine</i>	1
<i>Figure 2: Mode de transmission de la maladie</i>	1
<i>Figure 3 : Différents gènes constituant le chromosome X humain</i>	9
<i>Figure 4: Structure de MeCP2</i>	10
<i>Figure 5 : Domaines de méthyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2)</i>	11
<i>Figure 6 : Epissage alternatif des isoformes de MeCP2</i>	12
<i>Figure 7 : Les deux isoformes de la protéine MeCP2 produites par épissage alternatif</i>	12
<i>Figure 8 : Différentes isoformes des protéines à MBD de mammifères</i>	13
<i>Figure 9: Structure du domaine MBD « NCBI »</i>	14
<i>Figure 10 : Principe du système de transcription GAL4</i>	14
<i>Figure 11 : Domaine d'interaction entre MeCP2 et le co-represseur Sin3A</i>	16
<i>Figure 12: Répression transcriptionnelle par interaction de MeCP2 et Sin3A des régions méthylées du génome</i>	17
<i>Figure 13 : Interaction de MeCP2 avec Suv39H1 au niveau des régions méthylées</i>	18
<i>Figure 14 : Répression par boucles d'ADN localement réprimées</i>	18
<i>Figure 15 : Organisation de la chromatine (remplacement de l'histone H1, en jaune)</i>	19
<i>Figure 16 : Représentation schématique d'un mécanisme moléculaire via MeCP2 des modifications épigénétiques au cours de la division des cellules somatiques</i>	21
<i>Figure 17 : Solution de lyse des globules rouges</i>	25
<i>Figure 18 : banque d'ADN</i>	26

<i>Figure 19 : Support de séparateur magnétique</i>	27
<i>Figure 20 : l'ADN lié aux billes</i>	27
<i>Figure 21 : Dosage d'ADN par NanoDrop</i>	29
<i>Figure 22 : Cycles de PCR</i>	32
<i>Figure 23 : Thermocycleur</i>	38
<i>Figure 24 : Programme de PCR sur thermocycleur</i>	39
<i>Figure 25 : A. Appareil électrophorétique pour migration du produit PCR B. Appareil pour visualiser les bandes migrées grâce à un logiciel "perfect Image"</i>	41
<i>Figure 26 : Séquenceur Dx 3500 à 8 capillaires</i>	45
<i>Figure 27 : Exemple de dosage d'ADN par NanoDrop</i>	46
<i>Figure 28 amplification par les amorces 4A et 4B avec <math>T_m</math> (étape 2) = 62°C, <math>T_m</math> (étape 3)= 55°C et [ADN]= 200ng.</i>	48
<i>Figure 29 : amplification par les amorces 4A et 4B sans étape 2</i>	51
<i>Figure 30 : résultats d'amplification par PCR de l'exon 4 du gène MECP2 à partir de l'ADN du patient 7 en utilisant l'amorce 4C</i>	51
<i>Figure 31 : résultats d'amplification par PCR avec l'amorce 4D à partir de l'ADN génomique de l'exon 4 du gène MECP2 chez le patient 7.</i>	52
<i>Figure 32 : Analyse de la séquence de l'exon 4 de gène MECP2 par l'amorce 4C (F,R) du patient 7.</i>	52
<i>Figure 33 : 2èmes séquences de l'exon 4 de gène MECP2 par l'amorce 4C du patient 7</i>	53
<i>Figure 34 : Analyse de la séquence de l'exon 4 du gène MECP2 par l'amorce 4D (F, R) du patient 7.</i>	54
<i>Figure 35 : Analyse de la séquence de l'exon 4 de gène MECP2 par l'amorce 4A (F,R) du patiente 4</i>	54
<i>Figure 36 : Résultat de l'alignement de MECP2 du P4</i>	54

<i>Figure 37 : Analyse de la séquence de l'exon 4 de gène MECP2 par l'amorce 4B (F, R) du patient 5</i>	55
<i>Figure 38: Résultat de l'alignement de MECP2 du P5</i>	55
<i>Figure 39 : Analyse de la séquence de l'exon 4 du gène MECP2 par l'amorce 4B du patient 6</i>	56
<i>Figure 40 : Résultat de l'alignement de MECP2 du P6</i>	57
<i>Figure 41 : Analyse de la séquence de l'exon 4 du gène MECP2 par l'amorce 4B du patient 6</i>	57
<i>Figure 42 : une mutation de duplication d'une partie de gène</i>	57
<i>Figure 43 : résultat de l'alignement de MECP2 di P6</i>	57
<i>Figure 44: une comparaison différentes mutations du gène MECP2 identifiées en France</i>	58

# Liste des tableaux

	<b>Page</b>
<b>Tableau 1 : Localisation des gènes sur le chromosome X</b>	<b>3</b>
<b>Tableau 2 : Localisation chromosomique et structure des gènes humains codant les protéines à MBD</b>	<b>13</b>
<b>Tableau 3 : Les critères cliniques des patients atteints le syndrome de Rett</b>	<b>22</b>
<b>Tableau 4: Volumes de billes magnétiques et du tampon de lysis correspond au volume du sang</b>	<b>28</b>
<b>Tableau 5: Volumes de protéase et du tampon de protéase correspond au différents volume du sang</b>	<b>25</b>
<b>Tableau 6 : Concentration et le volume de dNTP pour la réaction de PCR</b>	<b>34</b>
<b>Tableau 7 : Concentration d'ADN des différentes patientes atteintes le syndrome de Rett</b>	<b>47</b>
<b>Tableau 8 : températures optimales d'hybridations des amorces ( F et R)</b>	<b>49</b>
<b>Tableau 9 : programme de cycle de température au niveau du thermocycleur (Applied Biosysteme)</b>	<b>49</b>
<b>Tableau 10 : Mélange réactionnel pour chaque gène pour volume totale de 25 µl</b>	<b>50</b>

# Résumé

Le syndrome de Rett est une pathologie neurodéveloppementale progressive sévère, causée par des mutations dominantes du gène MECP2. La protéine MeCP2, fortement exprimée dans les neurones matures, est un répresseur transcriptionnel de la famille des methyl-CpG-binding proteins (MBP) caractérisées par leur capacité de liaison aux nucléotides CpG méthylés. Bien que les mécanismes moléculaires responsables du syndrome de Rett demeurent obscurs, il semble probable que cette pathologie soit due à l'expression incontrôlée de gènes normalement réprimés par MeCP2 dans les neurones. Une étape clé dans la compréhension de cette maladie serait donc d'identifier les gènes cibles de MeCP2.

Les objectifs de ce travail sont :

- ☒ Mettre au point les techniques de cytogénétique conventionnelle et moléculaire pour le diagnostic de ce syndrome tels que :
  - L'extraction d'ADN
  - Réaction de polymérisation en chaîne
  - Séquençage.
  
- ☒ Détecter les mutations responsables chez les patients d'origines marocaines.