

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Blida -1-



Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de Biologie et Physiologie Cellulaire

Mémoire De Fin D'Etude

En vue de l'obtention du Diplôme de Master II en Biologie

Option : Génétique-Physiologie

Thème :

Identification et mise en évidence des variations biologiques chez des patients atteints du syndrome de Prader-Willi

Présenté par : Mr BABEKER Brahim Elkhilil

Soutenance prévue le : 20 septembre 2015

Devant le jury :

Présidente :	M ^{me} . AMOKRANE A.	MAA	USDB1
Promotrice :	Dr. HALLAL S.	MAB	(CHU-Mustapha)
Co-promotrice :	M ^{me} . GUESSAIBIA N.	MCB	USDB1
Examineur :	M ^r . BENYAHIA N.	MAA	USDB1

Promotion 2014 - 2015

Remerciements

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire et au bon déroulement de ce stage de fin d'études :

Je remercie Dieu, le Tout Puissant, qui nous a donné l'opportunité de mener à bien ce modeste travail.

Mes remerciements vont tout d'abord aux membres du jury, M^{me}. AMOKRAN A, Président et Mr. BENYAHIA N, pour m'avoir fait l'honneur de juger mon travail.

Ce mémoire a été effectué au sein de l'hôpital CHU-Mustapha. Je tiens à adresser mes vifs remerciements à son directeur général.

Je remercie également le Pr YARGUI L., chef de service du laboratoire central de Biochimie, pour m'avoir accepté au sein de son laboratoire et m'avoir assuré toutes les conditions afin que je puisse effectuer ce stage dans des meilleures conditions

Mes remerciements vont à ma promotrice Dr HALLAL S., pour avoir accepté de m'encadrer, de me conseiller au quotidien et qui a toujours su diriger avec sagesse mon thème. Un immense merci pour sa disponibilité à toute heure, pour sa gentillesse et son écoute qui m'ont permis de mener à bien ce travail. Vraiment, j'ai beaucoup appris à ses côtés, toujours dans un esprit de rigueur et d'entraide mêlés.

Je souhaite notamment remercier ma co-promotrice M^{me} GUESSAIBIA N., pour m'avoir donné de son temps et pour l'intérêt qu'elle a accordé à mon travail, son soutien a été précieux.

Un grand merci à toutes les personnes travaillant au Laboratoire de Biologie moléculaire pour m'avoir aussi bien accueillie, aidée, guidée et soutenue tout au long de mon stage. Ma gratitude s'adresse tout particulièrement à CHAMI Z. et DJANNANE A., pour leurs gentillesse et soutien théorique sans oublier les résidents qui ont fait preuve d'écoute et de disponibilité.

Enfin, des vœux sincères à mes amies, à ma famille et surtout à mes parents, leur soutien et leurs encouragements m'ont été très précieux, un immense merci à tous.

Résumé

Le syndrome de Prader-Willi est une anomalie génétique rare, son diagnostic est souvent difficile à affirmer. Ceci est dû à l'extrême variété de ses signes cliniques, associant une polyphagie, une obésité, ainsi que des troubles hormonaux. La découverte des bases génétiques communes de cette maladie permet actuellement de proposer un diagnostic biologique fiable. Cette analyse met à profit le statut de méthylation au niveau des gènes incriminés dans ce syndrome, en utilisant la technique de Méthyl-PCR.

Notre travail a porté sur le diagnostic et le suivi des patients adressés au laboratoire de génétique moléculaire du CHU Mustapha pour suspicion de syndrome de Prader Willi, sur une période s'étalant sur 4 mois.

40 patients ont fait l'objet d'une analyse moléculaire du gène SNRPN/UBE3A, à la recherche de leur profil de méthylation. Les résultats ont révélé que 12% (05 patients) sont atteints du syndrome de Prader Willi.

Actuellement cette pathologie ne bénéficie pas de traitement efficace, néanmoins le diagnostic précoce de ces malades permet une meilleure prise en charge des patients, évitant les complications dues à cette pathologie, notamment le diabète et le risque cardio-vasculaire, et permet de proposer un conseil génétique fiable aux parents.

Mots clés : empreinte génomique ; syndrome de Prader-Willi ; diagnostic moléculaire ; méthylation, Méthyl-PCR

Abstract

Prader-Willi syndrome is a rare genetic disorder; clinical diagnosis is often difficult asserted before the extreme variety of these signs, especially involving polyphagia, obesity, and hormonal disorders. The discovery of common genetic basis for this disease is currently possible to propose a reliable laboratory diagnosis. This analysis builds on the methylation status of genes implicated in this syndrome, using Methyl-PCR technique.

Our work has focused on the diagnosis and monitoring of patients sent to the Molecular Genetics Laboratory of the University Hospital Mustapha suspicion of Prader Willi syndrome, over a period spanning four months.

Currently this condition does not receive effective treatment, neo least the early diagnosis of these patients allows better care for patients, avoiding the complications of this disease, including diabetes and cardiovascular risk, and allows to propose a reliable genetic counseling to parents.

Keywords: Prader-Willi syndrome; diagnosis, laboratory ; genetics counselling, methylation , Methyl-PCR

الملخص

يعتبر متلازمة Prade-Willi من الأمراض الوراثية النادرة ومن الأمراض التي من الصعب تشخيصها سريريا، وكذا أمام تقلب بعض الأعراض وخصوصا المرتبطة بالنهام، والسمنة، والاضطرابات الهرمونية. في الوقت الراهن ومع اكتشاف الأساس الجيني للمرض أصبح من الممكن اقتراح التشخيص المختبري الموثوق بها، هذا التحليل يعتمد في تميثيل على مستوى الجينات المتورطة في هذه المتلازمة، وذلك باستخدام تقنية الميثيل-PCR

وقد ركز عملنا على تشخيص ومتابعة المرضى المرسلين إلى مختبر الوراثة الجزيئية في المستشفى الجامعي لمصطفى باشا للاشتباههم بمتلازمة Prade-Willi، على مدى فترة تمتد لأربعة أشهر.

حاليا هذه المرض لا يتلقى العلاج الفعال، فقط التشخيص المبكر لهؤلاء المرضى يسمح لهم برعاية أفضل للمرضى، وكذا تجنب مضاعفات هذا المرض، بما في ذلك مرض السكري ومخاطر القلب والأوعية الدموية، اقتراح استشارة وراثية يمكن للأولياء الاعتماد عليها.

الكلمات المفتاحية : متلازمة Prade-Willi ، الأمراض الوراثية ، الاستشارة الوراثية ، ميثيل، الميثيل-PCR

Liste des figures

Figure 1 Modification de la cytosine chez les mammifères.3

Figure 2 la structure de nucléosome4

Figure 3 La dynamique des histones6

Figure 4 Les gènes soumis à l’empreinte génomique parentale.....8

Figure 5 Structure de la région 15q11q1311

Figure 6 Dysmorphie faciale. Characteristic facial features.....12

Figure 7 Représentation schématique du locus Prader-Willi14

Figure 8 Syndrome de Prader-Willi (SPW) secondaires à une micro-délétion ou une disomie uniparentale.15

Figure 9 Syndrome de Prader-Willi et d’Angelman secondaire à une mutation d’empreinte (IC).....16

Figure 10 L'arbre généalogique d'une famille X atteinte par un syndrome de prader-willi.....18

Figure 11 Image d'un gel d'électrophores de 10 patients et un témoin de Prader-Willi et d'Angelman avec un marquer de taille et un blanc.36

Liste des tableaux

Table 1 Indication de l'étude génétique.13

Table 2 Séquences d'amorces..... **Erreur ! Signet non défini.**

Table 3 Conditions de PCR : **Erreur ! Signet non défini.**

Table 4 la Répartition des variations biologique chez les 05 patients.....38

Liste des abréviations

μmol	micro mol
A	Adénine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ALAT	Alanine aminotransférase
AS	Syndrome d'Angelman
ASAT	Aspartate aminotransférase
BP	Break Point
C	Cytosine
DNMTs	DNA Méthyltransférases
dNTP	Désoxynucléotides triphosphate
EDTA	Acide éthylènediamine tétraacétique
G	Guanine
GH	Growth hormone
HbA1c	Hémoglobine glyquée
HDL	High Density Lipoproteins
LDH	Low Density Lipoproteins
pb	Paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	potentiel hydrogen
PK	Protéinase K.
QP	QIAGEN Protease (Protéase QIAGEN)
Rpm	Rotations par minute
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate QG
SNRPN	Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide N
SPW	Syndrome de Prade-Willi

T Thymine

TBE Tris Borate EDTA.

TET Tet methylcytosine dioxygenase

UBE3A Ubiquitin-protein ligase E3A

UPD uniparentale disomie

SOMMAIRE

Résumé	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction générale	
Chapitre I : Rappels bibliographiques.....	1
1. Historique	1
2. Epigénétique.....	1
2.1. Evolution du concept d'épigénétique.....	1
2.2. Les mécanismes impliqués.....	2
3. L'empreinte génomique parentale	7
3.1. L'empreinte génomique parentale : un bref historique	7
3.2. Les gènes soumis à l'empreinte : définition, fonctions	8
3.3. Les allèles maternels et paternels des gènes soumis à l'empreinte portent des marques différentielles.....	9
4. L'empreinte parentale	9
5. Syndrome Prader-Willi (PWS) et Syndrome d'Angelman.....	10
6. Diagnostic clinique.....	11
7. Diagnostic génétique.....	14
7.1. L'empreinte génomique parentale	14
7.2. Les gènes impliqués dans le SPW.....	16
8. Les variations biologiques	17
Chapitre II : MATERIEL ET METHODES.....	21
1. Recrutement des patients :	21
2. Matériel.....	21
3. Méthodes	29
3.1. Protocol d'extraction D'ADN (Extraction par salting out) :	29
3.2. Protocole opératoire du Syndrome de Prader Willi/Angelman Analyse du gène SNRPN/UBE3A.....	30
Chapitre III : Résultats et discussion.....	35

1. Origine géographique des patients :	35
2. Caractéristiques démographiques des patients :.....	35
2.1. Répartition des patients selon le sexe/âge :.....	35
3. L'hérédité de syndrome prader-willi	18
4. Analyse génétique :.....	36
5. Les variations biologiques	37
6. Physiopathologie du syndrome.....	18
7. Les variations biochimiques :	38
Conclusion	28
Références bibliographiques	35
Annexes.....	42

INTRODUCTION
GÉNÉRALE

Introduction générale

Les affections génétiques sont des pathologies rares et extrêmes variées. Leurs diagnostics requièrent une connaissance approfondie des techniques de biologie moléculaires. Le syndrome de Prader-Willi (SPW) est une maladie génétique qui se caractérise à la naissance par une diminution du tonus musculaire (hypotonie) et des difficultés à s'alimenter.

Au cours de la vie, la régulation des différentes fonctions vitales peut être perturbée : métabolisme, croissance, développement sexuel, respiration et sommeil, sensibilité à la douleur, contrôle des émotions et résistance au stress. Une dépense de calories diminuée et une prise excessive d'aliments (hyperphagie), en l'absence de contrôle, entraîne une obésité grave. Des difficultés d'apprentissage et des troubles du comportement peuvent être également présents. La sévérité des manifestations varie beaucoup d'un enfant à l'autre. Avec une prévalence estimée de 1 sur 20 000 à 1 sur 25 000. Et qui touche indifféremment les enfants des deux sexes, quelle que soit leur origine géographique.

Le syndrome de Prader-Willi est dû à une anomalie génétique, c'est-à-dire à la modification de certains gènes situés dans une région appelée 15q11-q13 du chromosome 15. (Tauber M. 2008).

Cette région du chromosome 15 a une particularité : elle est soumise au phénomène d'empreinte parentale. Les gènes situés dans cette région remplissent différemment leur fonction selon qu'ils sont situés sur le chromosome hérité du père ou de la mère. Ainsi, à l'état normal, sur le chromosome 15 transmis par le père, les gènes localisés dans la région 15q11-q13 sont fonctionnels, alors que ces mêmes gènes portés par la région 15q11-q13 du chromosome 15 transmis par la mère sont «silencieux » et ne remplissent pas de fonction. (Ehisolzer 2008).

Dans le SPW les gènes localisés dans la région 15q11-q13 du chromosome 15 situé sur l'allèle paternel ne sont pas fonctionnels ou sont absents. Et pour le diagnostic de ce syndrome est biologique, et repose sur une technique de biologie moléculaire (étude du statut de méthylation de la région 15q proximale).

A travers ce travail, nous mettrons sur ces syndromes ainsi que l'intérêt d'une approche multidisciplinaire :

- ✓ En définissant le syndrome de Prader-willi.
- ✓ En rappelant les aspects génétiques et moléculaires de ces syndromes,
- ✓ En citant les principaux outils pour le diagnostic ainsi que l'intérêt de la biologie moléculaire dans l'approche de ces syndromes.
- ✓ Et qu'elles sont les variations biologie associées à ce syndrome.

CHAPITRE I

RAPPELS

BIBLIOGRAPHIQUES

Chapitre I : Rappels bibliographiques

1. Historique

Dans les années 50, le Professeur Andrea Prader, alors médecin en chef de l'Hôpital pédiatrique de Zurich, s'est rendu compte qu'il avait examiné à plusieurs reprises des enfants présentant des symptômes similaires : ces enfants souffraient d'un surpoids, étaient de petite taille, avaient souvent de petits pieds et de petites mains, un retard intellectuel et des organes génitaux inhabituellement petits. En collaboration avec les Professeurs Heinrich Willi et Alexis Labhart, le Professeur Prader se mit à étudier ces symptômes. En 1956, les trois médecins furent les premiers à décrire dans une publication scientifique le syndrome de «Prader-Labhart-Willi», connu le plus souvent aujourd'hui sous le nom de «Syndrome de Prader-Willi» ou en anglais, «Prader-Willi Syndrome» (PWS).

Jusqu'en 1981, on ignorait toutes les causes du PWS. On diagnostiqua ce syndrome uniquement en raison de ses caractéristiques extérieures : petite taille, surpoids et autres symptômes. (Ehisolzer 2008).

2. Epigénétique

2.1. Evolution du concept d'épigénétique

Le concept d'épigénétique émerge à une époque où la génétique réalise une avancée importante grâce aux travaux de Thomas Hunt Morgan, au début du XX^{ème} siècle, sur la mutation du gène white (Morgan et al. 1910). Ses recherches permettent de comprendre le rôle joué par les chromosomes dans l'hérédité, alors même que l'acide désoxyribonucléique (ADN) n'est pas caractérisé comme étant le support de l'information génétique. Dès les années 1940, Morgan s'interroge sur le fait que toutes les cellules d'un organisme ne sont pas identiques alors qu'elles partagent les mêmes gènes déterminant les caractères.

Alors que la génétique cherche à comprendre comment sont transmis les caractères, un embryologiste, Conrad Waddington, s'intéresse aux phénomènes développementaux par lesquels les gènes et l'environnement peuvent engendrer un phénotype. Conrad Waddington rassemble alors, en 1942, les théories de la génétique et du développement sous le terme épigénétique (Waddington 1942). Dans sa définition, la notion d'hérédité est cependant absente.

L'importance de l'épigénétique va s'accroître à une période où l'on chercha à comprendre l'activité des gènes. En effet, partant du constat qu'une cellule œuf est capable d'engendrer tous les types

cellulaires d'un organisme, comment expliquer qu'une cellule neuronale soit différente d'une cellule musculaire alors même qu'elles partagent la même information génétique ?

Cela signifie qu'un certain nombre de gènes, spécifiques d'un lignage cellulaire, sont activés tandis que d'autres sont réprimés. Comment ces gènes sont-ils alors régulés ? Une première partie de la réponse fût apportée par les travaux de François Jacob et de Jacques Monod sur la régulation de l'opéron lactose (Jacob et Monod 1961). De ce modèle, ils en déduisent l'existence de deux classes de gènes : les gènes structuraux et les gènes régulateurs qui agissent de façon séquence spécifique.

Cependant, cette vision se heurte à quelques phénomènes non explicables. L'inactivation du chromosome X chez les mammifères en est un exemple. En 1959, Susumu Ohno remarque que le corpuscule de Barr est en réalité un des chromosomes X condensé (Ohno et al. 1959). Ce n'est que deux ans plus tard, en 1961, que Mary F. Lyon propose l'hypothèse qu'un des deux chromosomes X chez les mammifères femelles est inactivé de manière aléatoire (Lyon 1961). Cette théorie est contradictoire avec la vision de régulation des gènes de Jacob et Monod. Comment peut-on expliquer que des facteurs de transcription inactivent un seul des deux chromosomes X sachant que les séquences cibles sont présentes à la fois sur le chromosome paternel et maternel.

Par ailleurs, un autre phénomène montre les limites du système gènes structuraux/gènes régulateurs. En 1984, la mise au point d'expériences de transplantations nucléaires chez la souris (McGrath et Solter 1983 ; Surani et al. 1984) a permis de mettre en évidence que des embryons de souris androgénètes (deux génomes paternels) ou gynogénètes (deux génomes maternels) étaient incapables de se développer. Solter et McGrath conclurent que la contribution du génome paternel et celle du génome maternel ne sont pas équivalentes au cours de l'embryogenèse chez les mammifères, posant ainsi les bases de ce que l'on appelle aujourd'hui l'empreinte parentale.

Bien que ne faisant pas l'objet d'un consensus total (Bird et al. 2007 ; Berger et al. 2009), ces phénomènes inexplicables ont permis d'établir la définition moderne du terme épigénétique comme étant l'étude des phénomènes qui modifient l'activité du génome, de façon héritable au cours de la mitose et/ou de la méiose, et qui n'affectent pas la séquence d'ADN.

2.2. Les mécanismes impliqués

Les phénomènes concernés par l'épigénétique dépendent de la définition utilisée. Nous prendrons en compte la dynamique des histones, et la méthylation de l'ADN.

Cette dernière est certainement le plus clairement établie, car son hérédité ne fait aucun doute. (Joulié M. 2011)

2.2.1. La méthylation de l'ADN

Outre les quatre bases A,T,G et C qui composent la molécule d'ADN, on peut noter l'existence de modifications chimiques sur ces bases. Parmi ces modifications, on retrouve, chez les mammifères, l'ajout d'un groupement méthyle en position 5 d'une cytosine grâce à des enzymes spécialisées appelées ADN méthyltransférases (DNMTs ; figure 1). La cible principale de la méthylation chez les mammifères est la cytosine dans un contexte de dinucléotide CpG.

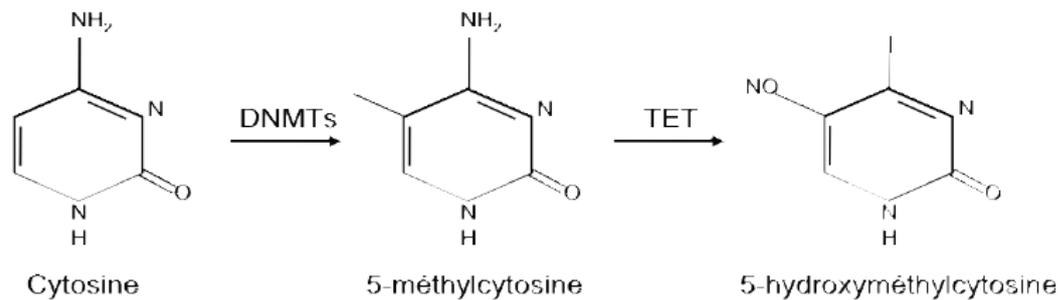


Figure 1 : Modification de la cytosine chez les mammifères.

La cytosine peut être modifiée par l'ajout d'un groupement méthyle en position 5 grâce à des enzymes spécialisées appelées ADN méthyltransférases (DNMTs). La 5-méthylcytosine peut alors être hydroxylée en 5-hydroxyméthylcytosine par l'enzyme TET. (Joulié M. 2011)

Les dinucléotides CpGs ne sont pas distribués de façon homogène au sein du génome mais ont tendance à être concentrés dans des régions appelées îlots CpG (CGIs pour CpGislands). Ces régions sont définies par un contenu de G+C d'au moins 50% sur une longueur de plus de 200 paires de bases (pb) et par un ratio de CpG observé par rapport à la fréquence attendue d'au moins 0,6. La fréquence globale des dinucléotides CpGs est ainsi très faible ($\approx 1\%$) tandis que, chez l'Homme, environ 60% des promoteurs de gènes humains possèdent un CGI. Bien que celui-ci soit habituellement non méthylés dans les cellules normales. On note tout de même qu'environ 6% des CGIs deviennent méthylés de manière tissu spécifique au cours du développement ou de la différenciation (Straussman et al. 2009 ; Illingworth et al. 2008 ; Illingworth et al. 2010 ; Borgel et al. 2010).

Les observations effectuées dans les cellules cancéreuses permettent d'établir une bonne corrélation entre la méthylation des promoteurs et la répression transcriptionnelle. En effet, les gènes des cellules tumorales dont les promoteurs à CGIs sont hyperméthylés, affichent un état transcriptionnellement

inactif. Ce phénotype est réversible puisque la suppression de la méthylation de l'ADN, par l'utilisation de drogue inhibant les DNMTs, permet la réexpression des gènes touchés (Esteller2008).

Plus récemment, des travaux ont établi que cette corrélation n'est pas uniquement restreinte aux cellules tumorales puisqu'elle concerne également les gènes de la lignée germinale. Ces derniers possèdent des promoteurs à CGIs qui sont non-méthylés dans les cellules germinales mais méthylés dans les cellules somatiques (Magdinier et al. 2002). La répression, dans ce cas précis, nécessite donc la méthylation de l'ADN (Maatouk et al. 2006 ; Velasco et al. 2010). On peut également citer l'exemple des gènes du trophectoderme qui sont réprimés dans l'embryon par une hyperméthylation des CGIs (Oda et al. 2006).

2.2.2. La dynamique des histones

Les histones sont des protéines basiques de faible poids moléculaire qui permettent la condensation de l'ADN. La structure ainsi formée est appelée nucléosome. Chaque nucléosome est composé d'un octamère d'histone comprenant deux copies de chaque histone H2A, H2B, H3 et H4. Environ 147 pb d'ADN sont enroulés autour de chaque nucléosome (Luger et al. 1997). Enfin, l'histone H1 sert de liaison afin de sceller le nucléosome.

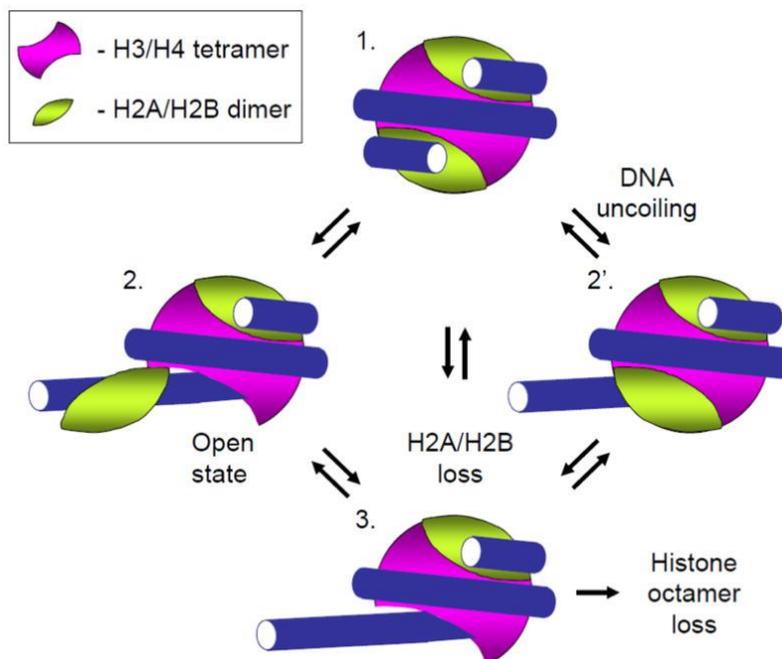


Figure 2 : la structure de nucléosome (Kulaeva et al. 2012)

Les histones sont constituées de deux parties structurellement bien distinctes, le corps des histones et la queue des histones. Cette dernière partie est sujette à de nombreuses modifications post-traductionnelles (figure 2) : phosphorylation, acétylation, méthylation, SUMOylation, ubiquitination, ADP-ribosylation, déamination, clivage de la queue et isomérisation de la proline

(Bannister et Kouzarides 2011). Ces modifications sont mises en place par des protéines spécialisées : histones acétyltransférases (HATs) (Sterner et Berger 2000), histones méthyltransférases (HMTs) (Zhang et Reinberg 2001), ou encore kinases (Nowak et Corces 2004) et possèdent la propriété d'être dynamiques et donc, réversibles grâce à des enzymes comme les histones déacétylases (HDAC). Des histones déméthylases (HDMs) ont également été mises en évidence récemment pour la lysine, ainsi que pour l'arginine (Chang et al. 2007).

Les modifications des histones ont un rôle important à jouer, d'une part dans la régulation de l'activité des gènes et d'autre part, dans des processus du métabolisme de l'ADN tels que la réparation, la réplication et la recombinaison. Deux mécanismes distincts interviennent dans la fonction des modifications des histones. Le premier, de manière directe perturbe la structure de la chromatine. Par exemple, l'acétylation et la phosphorylation ont pour effet de diminuer la charge positive des histones et perturbent ainsi les interactions ADN-histones, résultant alors en une décondensation locale de la chromatine et donc en un état permissif pour la transcription.

Le deuxième se fait quant à lui de manière indirecte via le recrutement de cofacteurs. (Bannister et al. 2001 ; Lachner et al. 2001 ; Jacobs et Khorasanizadeh 2002). Historiquement, la chromatine a été caractérisée, selon sa structure, en euchromatine et en hétérochromatine. L'euchromatine correspond à une structure de l'ADN peu compacte en interphase, dite en collier de perle, regroupant des gènes transcriptionnellement actifs. Tandis que l'hétérochromatine présente un niveau de compaction plus important en fibre d'ADN de 30nm. L'hétérochromatine peut être divisée en hétérochromatine constitutive, constituée de peu de gènes et principalement de séquences répétées retrouvées au niveau des centromères et des télomères, et en hétérochromatine facultative dont le degré de compaction diffère d'un type cellulaire à un autre. (Ernst et Kellis 2010).

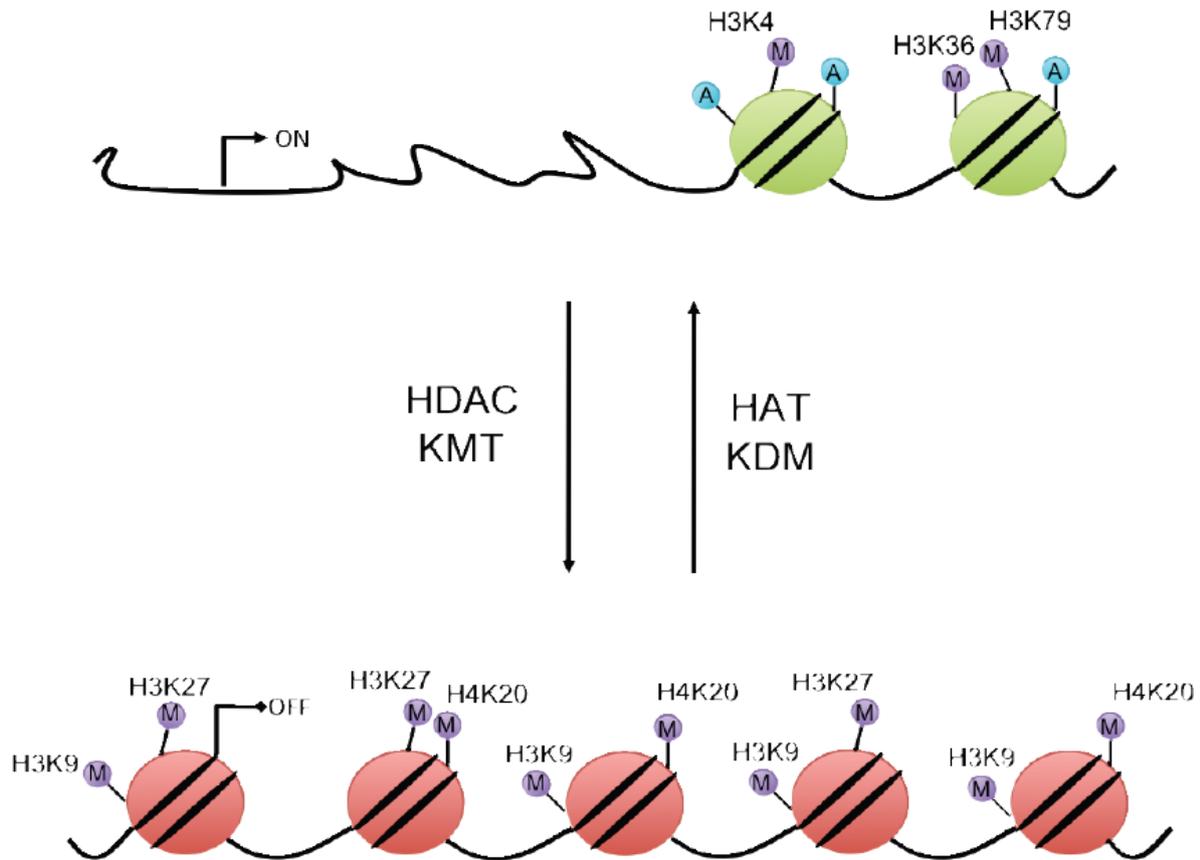


Figure 3 : La dynamique des histones. (Joulie M. 2011)

Les queues des histones peuvent subir des modifications post traductionnelles. Ces modifications peuvent être associées à un état transcriptionnellement actif avec la méthylation de H3K4, H3K36 et H3K79 et avec l'acétylation des histones. En revanche, la méthylation de H3K9, H3K27, H4K20 est assimilée à un état répressif. Ces marques sont dynamiques et régulées par des enzymes tels que les histones déacétylases (HDAC), les lysines méthyltransférases (KMT), les histones acétyltransférases (HAT) ou encore les lysines déméthylase (KDM). (Joulie M. 2011)

Bien que les modifications individuelles puissent être associées à un niveau d'activité de certaines régions du génome, la signification biologique des combinaisons des différentes marques reste énigmatique. Sachant qu'il existe plus de cent modifications d'histones distinctes, les notions d'euchromatine et d'hétérochromatine d'un point de vue fonctionnel doivent donc être réévaluées. En ce sens, de nouvelles approches cherchent à découvrir de nouveaux états chromatiniens et à comprendre la répartition spatiale des marques combinées (Ernst et Kellis 2010). A ce jour, cinquanteet-un états chromatiniens différents ont été identifiés à partir de l'enrichissement de combinaisons spécifiques des modifications d'histones. Et ces différents états ont pu être associés à une fonction biologique. De la même manière, la compréhension de la diversité cellulaire au sein

d'un organisme passe par la caractérisation systématique des différentes marques chromatinienne dans une multitude de type cellulaire (Ernst et al. 2011).

3. L'empreinte génomique parentale

3.1. L'empreinte génomique parentale : un bref historique

Tout organisme diploïde contient deux lots de chromosomes, l'un hérité du père et l'autre de la mère. Un gène donné est donc composé de deux allèles : l'allèle paternel et l'allèle maternel. En accord avec les règles classiques de l'hérédité définies par Mendel, le comportement des deux génomes est similaire, c'est-à-dire que pour un gène donné, quand le gène s'exprime, les deux allèles sont actifs, et quand il ne s'exprime pas, les deux allèles sont silencieux. Plusieurs découvertes dans le champ de la biologie du développement dans les années 1970-1980 ont montré que tel n'était pas le cas pour tous les gènes de mammifères. L'historique de la découverte de l'empreinte est passé en revue dans (Solter, 2006).

La parthénogenèse a été définie pour la première fois comme une « procréation sans influence immédiate d'un mâle ». Chez certains vertébrés, notamment les amphibiens, les reptiles et les oiseaux, des embryons parthénogénétiques se développent jusqu'à terme (Mittwoch, 1978). Chez les mammifères pourtant, les parthénogénètes meurent avant la fin de la gestation (Kaufman et al, 1977).

L'explication de cet échec est venue des travaux portant sur le développement de zygotes issus de transplantations nucléaires chez la souris. Ces études ont montré que ni les androgénètes (embryons contenant deux génomes paternels), ni les gynogénètes (embryons contenant deux génomes maternels) ne se développaient jusqu'à terme. Au stade le plus avancé de leur développement, les deux types de zygotes ont des phénotypes opposés. Dans le cas des gynogénètes, les tissus extra-embryonnaires sont atrophiés, alors que les androgénètes ont de meilleurs tissus extra-embryonnaires mais un développement de l'embryon sévèrement retardé (McGrath and Solter, 1984 ; Surani et al. 1984). Ces études ont mené à la notion que le génome dérivé de la mère et celui dérivé du père n'étaient pas fonctionnellement équivalents et que les deux étaient nécessaires au développement. Le terme d'« empreinte génomique » a été introduit à l'époque par Surani pour décrire ces différences fonctionnelles entre les deux haplogénomes introduites lors de la gamétogenèse (Surani et al. 1984).

Cette notion a été précisée par des études de génétique chez la souris. En effectuant des croisements de souches avec des translocations chromosomiques, il est possible de générer des souris présentant

des disomies uniparentales (UPD). Ces souris ont un génome équilibré, mais pour un chromosome donné, ou pour une région chromosomique donnée, elles possèdent deux chromosomes provenant du même parent, et aucun provenant de l'autre parent. En utilisant des souris UPD pour le chromosome 11, Cattanach and Kirk (1985) a montré que ces souris avaient des phénotypes précis qui différaient selon que la disomie était d'origine paternelle ou maternelle. Ils ont montré que c'était seulement la partie proximale du chromosome 11 qui était responsable de ces phénotypes (Cattanach and Kirk, 1985). Ceci a suggéré l'existence de gènes, localisés dans des régions chromosomiques précises, dont le fonctionnement était différent selon s'ils étaient hérités du père ou de la mère.

La dernière étape de la découverte de l'empreinte génomique parentale a été l'identification de gènes soumis à l'empreinte. En 1991, trois équipes ont rapporté le cas des gènes *Igf2r*, *Igf2* et *H19*, exprimés à partir de l'allèle maternel (*Igf2r*, *H19*) ou paternel (*Igf2*) spécifiquement (Barlow et al. 1991 ; Bartolomei et al. 1991 ; DeChiara et al. 1991).

3.2. Les gènes soumis à l'empreinte : définition, fonctions

Les gènes soumis à l'empreinte génomique parentale (on en connaît aujourd'hui environ 80 chez la souris) ont une expression monoallélique et spécifique de l'origine parentale : quand un gène soumis à l'empreinte s'exprime, un seul des deux allèles est actif, en fonction de l'origine parentale du chromosome qui le porte. Il peut donc être exprimé maternellement, c'est à dire que seul l'allèle maternel est actif, ou paternellement, auquel cas seul l'allèle paternel est actif (figure 4).

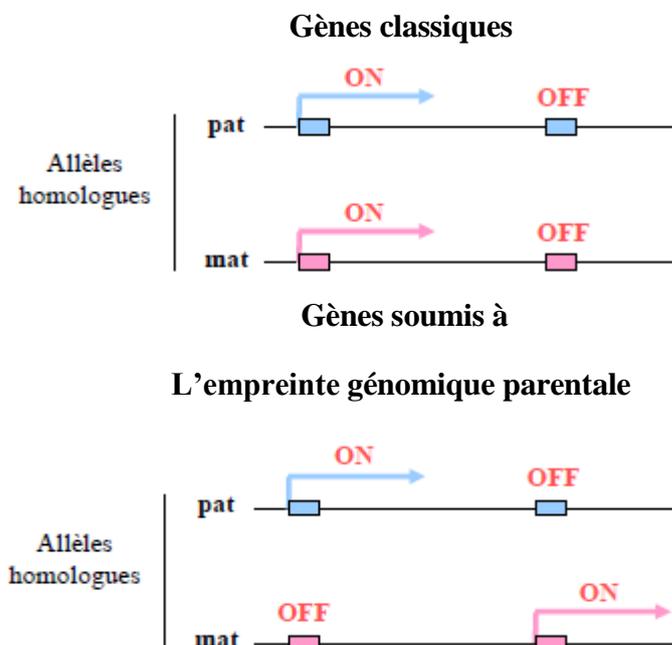


Figure 4 : Les gènes soumis à l'empreinte génomique parentale

Sont exprimés préférentiellement à partir d'un seul allèle, en fonction de l'origine parentale du chromosome qui le porte. Pat/Mat : allèles paternel (bleu) et maternel (rose). Haut : Selon les règles Mendéliennes de l'hérédité, les deux allèles d'un gène s'expriment (ON) ou ne s'expriment pas (OFF), sans différence entre les deux. Bas : pour les gènes soumis à l'empreinte, un seul des deux allèles s'exprime, le maternel ou le paternel, selon s'il s'agit d'un gène dit « à expression maternelle » ou « à expression paternelle ». (Royo H. 2007)

3.3. Les allèles maternels et paternels des gènes soumis à l'empreinte portent des marques différentielles

Concernant l'expression des gènes soumis à l'empreinte, le challenge pour la cellule est de reconnaître les allèles maternels et paternels comme tels. En vue de cette reconnaissance, les régions chromosomiques soumises à l'empreinte portent des marques spécifiques de leur origine parentale. Bien que la nature de ces marques de distinction ne soit pas complètement comprise, on sait qu'il s'agit de marques épigénétiques, c'est-à-dire qu'elles n'affectent pas la séquence de l'ADN. (Reinhart and Chaillet, 2005).

D'autres propriétés des loci soumis à l'empreinte, comme la réplication asynchrone des allèles en phase S, leur positionnement dans le noyau, l'hypersensibilité à la DNaseI spécifique d'un allèle, et les différences de recombinaison méiotique entre les deux haplogénomes parentaux pourraient aussi servir des marques. Néanmoins, le lien entre ces propriétés et les mécanismes de l'empreinte est peu compris et on ne sait pas s'il s'agit de causes ou des conséquences de l'empreinte parentale. (Royo H. 2007)

4. L'empreinte parentale

L'empreinte parentale différentielle est un phénomène responsable de la non-équivalence des deux génomes parentaux. Ainsi, l'expression d'un gène d'une région chromosomique soumise à l'empreinte parentale va dépendre de son origine maternelle ou paternelle, induisant une expression différentielle des gènes (Federman DD. 2006 ; Ferguson-Smith et al. 2001). Ces régions sont organisées en domaines sous la dépendance de centres d'empreinte. Dans ces domaines, certains gènes, ayant le plus souvent des fonctions prolifératives, sont exprimés à partir de l'allèle d'origine paternelle ; d'autres ayant des fonctions antiprolifératives sont exprimés à partir de l'allèle d'origine maternelle. Sur le plan moléculaire, parmi les marques d'empreinte conduisant à une organisation chromatinienne différente entre les allèles maternels et paternels, la méthylation différentielle de l'ADN joue un rôle primordial (Li E, 2002). Les régions soumises à l'empreinte parentale sont en effet méthylées de manière différente entre les deux génomes parentaux au niveau des régions dites

« différentiellement méthylées » ou DMR (Differentially Methylated Region). D'une manière générale, l'hypométhylation est associée à l'expression des gènes. L'empreinte parentale est établie dans les lignées germinales mâles et femelles. La lignée germinale a le rôle crucial d'effacer l'empreinte préexistante héritée de la génération précédente puis de la rétablir selon le sexe de l'individu, permettant de définir un marquage gamète spécifique c'est-à-dire une empreinte paternelle ou maternelle (Li E, 2002).

5. Syndrome Prader-Willi (PWS) et Syndrome d'Angerman

Les syndromes de Prader-Willi et d'Angelman sont deux entités cliniquement distinctes qui présentent la particularité de partager à la fois une même localisation chromosomique et des mécanismes génétiques de survenue communs (Prader et al. 1956 ; Fryburg et al. 1991). Le syndrome de Prader-Willi (PWS) associe une diminution de l'activité fœtale, une hypotonie musculaire après la naissance, un retard de croissance, un retard mental modéré et des troubles du comportement, notamment alimentaire, entraînant l'apparition d'une obésité entre 1 et 2 ans, un hypogonadisme hypogonadotrophique et des mains et pieds petits (Greenswag LR. 1987 ; Butler et al. 1987). Sa fréquence est estimée à 1/25 000 naissances (Butler MG. 1991).

Le syndrome d'Angelman (AS) se caractérise essentiellement par un retard mental sévère, un retard des acquisitions maternelles, un retard de langage. Une dysmorphie faciale apparaît au cours de l'enfance et associe une brachycéphalie (périmètre crânien inférieur au 25^e percentile), une bouche large avec des dents espacées et un menton proéminent. Ces patients présentent un comportement particulier associant une démarche ataxique, de fréquents accès de rire souvent accompagnés de battements des mains lors des périodes d'excitation. Des crises d'épilepsie sont fréquentes et il existe un tracé électroencéphalographique caractéristique (Dittrich et al 1996 ; Buntinx et al 1995). La fréquence de ce syndrome est d'environ 1/20 000 naissances (Clayton-Smith et al 1992).

A l'origine de ces deux syndromes, on trouve, dans la majorité des cas (70 %), une même microdélétion cytogénétique sur le chromosome 15. Cependant, l'analyse de l'origine parentale du chromosome remanié montre toujours une délétion du chromosome paternel au cours du syndrome de Prader-Willi, alors que c'est le chromosome maternel qui est délété dans le syndrome d'Angelman.

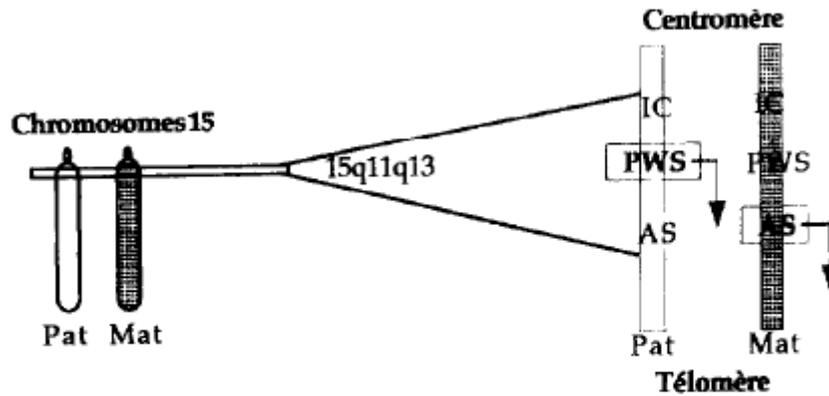


Figure 5 : Structure de la région 15q11q13 (Dupont et al. 1997)

Chez les sujets sains, le gène du syndrome de Prader-Willi (SPW) s'exprime à partir du chromosome paternel (Pat), le gène du syndrome d'Angelman (AS) à partir du chromosome maternel (Mat). (Dupont et al 1998).

Il s'agit là de l'une des premières démonstrations du rôle que peut jouer l'empreinte parentale en pathologie humaine et des différences d'expression qui existent entre les deux génomes parentaux au niveau de certaines régions chromosomiques. La mise en évidence de sujets atteints sans anomalie cytogénétique associée mais porteurs d'une disomie uniparentale (c'est-à-dire que leurs deux chromosomes 15 leur ont été transmis par le même parent) a confirmé l'existence de cette génétique non mendélienne (Engal E 1995).

6. Diagnostic clinique

A la naissance, ces enfants présentent une hypotonie particulièrement sévère nécessitant le plus souvent une hospitalisation prolongée en néonatalogie variant de quelques semaines à plusieurs mois. Cette hypotonie s'améliore partiellement mais persiste toute la vie et explique, en partie, le retard d'acquisition de la marche (acquise en moyenne à 24 mois), les complications orthopédiques (à savoir luxations de hanches, scoliose sévères plus fréquentes que dans la population générale), les signes digestifs (troubles précoces de la succion et de la déglutition), la dysarthrie, et les signes respiratoires (hypoventilation et faiblesse des muscles respiratoires majorant le risque d'infections respiratoires récurrentes chez le jeune enfant). Il existe également un syndrome dysmorphique discret mais constant (Figure 6), au niveau de la face associé à des extrémités petites (mains et pieds), qui à cet âge et devant l'hypotonie, évoque le diagnostic.

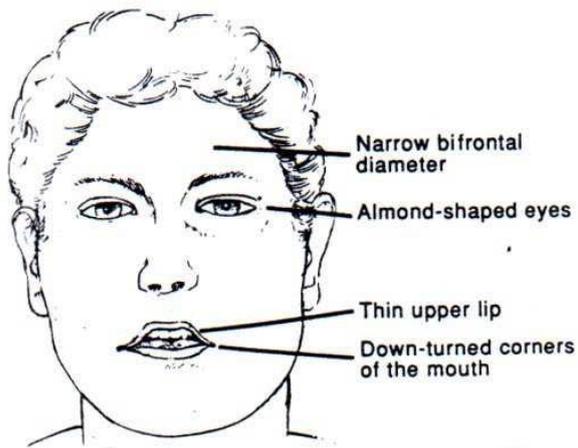


Figure 6 : Dysmorphie faciale. Caractéristique facial features. (Diene et al 2007).

Après cette phase initiale, des signes plus évocateurs apparaissent, avec la constitution d'une obésité sévère d'installation précoce, dès l'âge de 2 ans, due à une hyperphagie et une absence de satiété qui s'aggrave rapidement et explique une grande partie de la morbidité et de la mortalité de ces patients (diabète, complications respiratoires et cardiovasculaires) (Schrandt-Stumpe et al. 2004). La recherche constante de nourriture est probablement due à un défaut du système complexe de régulation de la satiété non connu aujourd'hui de manière précise (Dykens EM 2000). D'autres anomalies endocriniennes en relation avec des anomalies hypothalamo-hypophysaires font partie du tableau, associant un retard statural dû à un déficit en hormone de croissance retrouvé dans 50 à 100 % des cas (Pia Burman al. 2003), un développement pubertaire incomplet en relation avec un hypogonadisme partiel. Ces atteintes endocriniennes sont le reflet du syndrome hypothalamique retrouvé chez ces patients expliquant à la fois l'obésité et le panhypopituitarisme. Sur le plan physiopathologique, le déficit en GH, aujourd'hui certain et prouvé dans la grande majorité des cas, pourrait être expliqué par une anomalie dans la voie de la ghrelina hormone peptidique sécrétée essentiellement par l'estomac et s'opposant aux effets de la leptine au niveau hypothalamique et stimulant par ailleurs la sécrétion de GH au niveau antéhypophysaire. Le SPW est le seul cas d'obésité où les taux de ghrelina circulant sont élevés (Tauber et al. 2004). On retrouve également chez ces patients une diminution des neurones à GnRH (probablement responsable de l'hypogonadisme observé) et des neurones à oxytocine (Goldstone AP. 2005). Cette dernière hormone impliquée probablement dans la satiété et dans les troubles de la confiance et de l'attachement pourrait rendre compte de certaines caractéristiques comportementales de ces patients. Le retard mental, rarement majeur, est extrêmement variable d'un enfant à l'autre. Il est associé à des difficultés d'apprentissage (Whittington et al. 2004 ; Whittington et al. 2004) à des troubles du langage et de la parole majorés par les troubles psychologiques et comportementaux lorsqu'ils sont présents (Van Lieshout et al. 1998).

De façon globale, on rapporte des délais de langage et de parole et les compétences de ces individus (enfants et adultes) sont inférieures à ce que l'on pourrait attendre compte tenu de leur niveau intellectuel (Akefeldt et al 1997). L'articulation est ainsi souvent imprécise avec des habiletés oromotrices parfois sévèrement altérées (mouvements de la langue, des lèvres...) (Lewis et al. 2002). Par ailleurs, la hauteur de la voix est plus élevée que la normale, avec une hypernasalité très fréquente et de faibles capacités aérodynamiques (temps de phonation très courts). Ainsi, les individus PW présentent à la fois des difficultés de langage expressif et réceptif (les premières sont plus importantes) mais il existe, comme pour les autres traits, une grande variabilité interindividuelle dans la gravité et le type des déficits de langage ; certains individus pouvant être non-verbaux et les autres développer des compétences normales.

Il s'agit donc d'une affection très hétérogène, à la fois sur le plan clinique et génétique. Les signes conduisant au diagnostic sont variables en fonction de l'âge, hypotonie en période néonatale, obésité avec retard statural pendant l'enfance et à l'adolescence, troubles du comportement évocateurs, et les critères d'Holm revus en 2001 sont intéressants de ce point de vue (Tableau 1) (Gunay-Aygun et al. 2001).

Table 1 : Indication de l'étude génétique. (Gunay-Aygun et al 2001)

Âge lors de l'évaluation	Caractéristiques suffisantes pour demander un test ADN
De la naissance à 2 ans	Hypotonie avec difficulté de succion
De 2 à 6 ans	Hypotonie avec difficulté de succion Hypotonie avec antécédent de difficulté de succion Retard global du développement
De 6 à 12 ans	Petite taille et/ou retard statural associé à une accélération de la prise pondérale ^a Hypotonie avec antécédent de difficulté de succion (parfois persistance de l'hypotonie) Retard global du développement
De 13 ans à l'âge adulte	Alimentation excessive (hyperphagie, obsession de la nourriture) avec obésité centrale si incontrôlée Altération des facultés cognitives, habituellement retard mental modéré Alimentation excessive (hyperphagie, obsession de la nourriture) avec obésité centrale si incontrôlée Hypogonadisme hypothalamique et/ou problèmes comportementaux typiques (incluant des crises de colère et des traits obsessionnels et compulsifs)

7. Diagnostic génétique

7.1. L’empreinte génomique parentale

Le SPW est un syndrome de gènes contigus, lié à la région chromosomique 15q11-q13 (Figure 2).

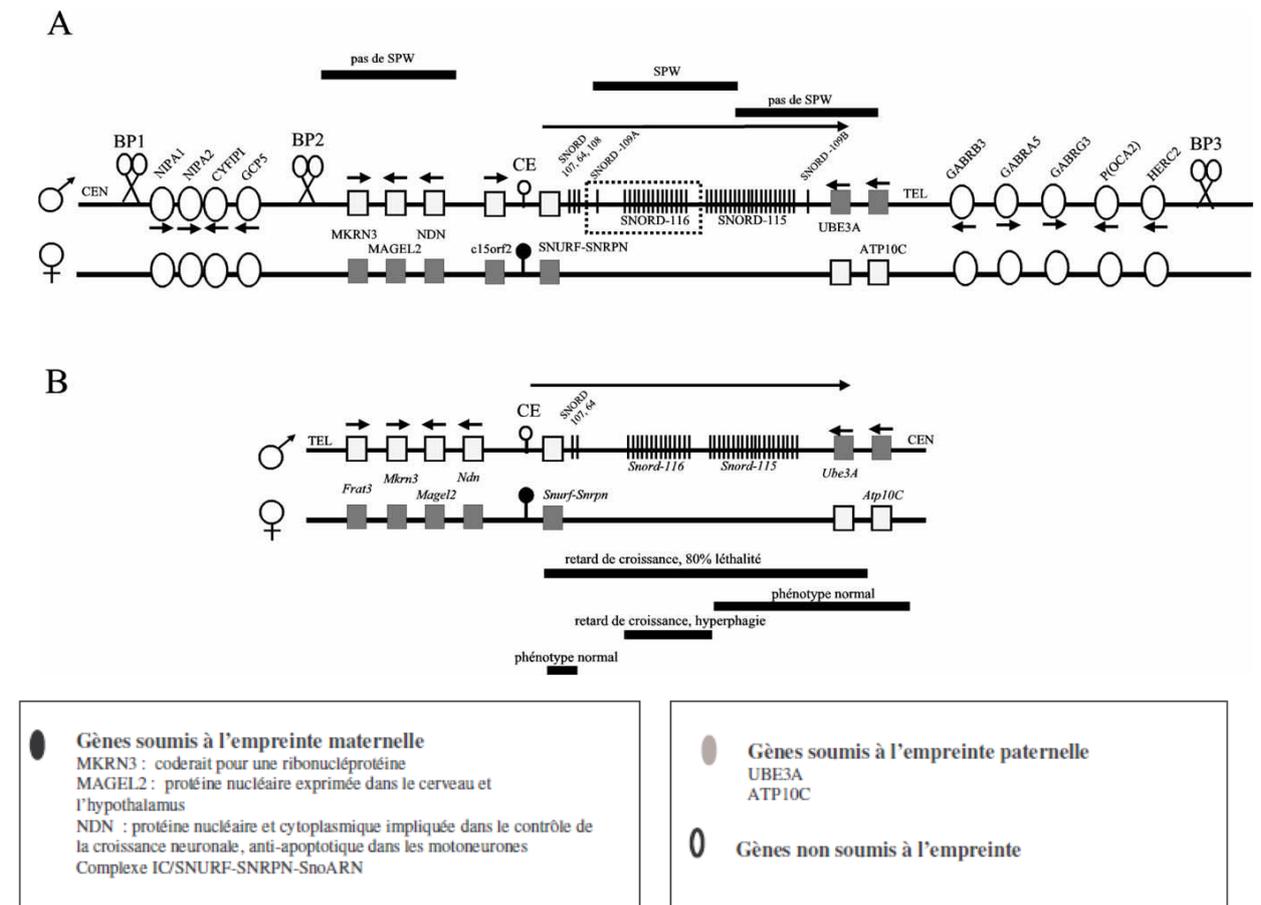


Figure 7 : Représentation schématique du locus Prader-Willi. (Tauber et al. 2011)

Les gènes à expression paternelle et maternelle sont respectivement symbolisés par des carrés blancs et gris (les gènes à expression biallélique sont représentés par des ovales blancs). Les gènes des snoARN C/D sont représentés par des barres verticales. BP1 (break point), BP2 et 3 indiquent la position des principaux points de cassures : les délétions de type I sont comprises entre BP1 et BP3, alors que celles de types II impliquent BP2 et 3. Les flèches indiquent le sens de transcription des gènes, et les barres noires horizontales positionnent certaines délétions informatives décrites dans le texte. La région différenciellement méthylée chevauchant le centre d’empreinte (CE) est symbolisée par un cercle vide (allèle hypométhylé) et un cercle plein (allèle hyperméthylé). La région minimale critique susceptible de contenir un gène d’intérêt majeur pour le SPW (le cluster SNORD116) est encadrée. Les deux loci chromosomiques ne sont pas dessinés à l’échelle. (Tauber et al. 2011).

Cette région fut la première pour laquelle le phénomène d’empreinte parentale appelé aussi genomic imprinting a été démontré. (Gunay-Aygun et al. 2001 ; Goldstone AP.2004) Ce phénomène correspond à un processus biochimique de contrôle épigénétique de l’expression de certains gènes qui sont dit « soumis à l’empreinte génomique ». Ces gènes ont comme caractéristique essentielle de subir au cours de la gamétogenèse et via la méthylation de l’ADN un « marquage » qui est différent selon qu’il s’effectue dans la lignée germinale mâle ou femelle. Cela conduit, dans les cellules somatiques à des différences d’expression des deux allèles paternel et maternel de ces gènes. Le fait que certains gènes de la région 15q11-q13 soient à travers ce phénomène d’empreinte naturellement inactivés sur le chromosome 15 d’origine maternelle (Chai et al. 2003), explique que deux principaux mécanismes sont à l’origine du syndrome de Prader-Willi:

- microdélétion cytogénétiques interstitielles touchant la région 15q11-q13 du chromosome 15 paternel, observées dans 70 % des cas.
- disomie uniparentale (DUP15) maternelle, situation résultant d’une non-disjonction méiotique maternelle suivie par la perte mitotique (post-zygotique) de l’unique chromosome 15 paternel et observée dans 25% à 30% des cas.

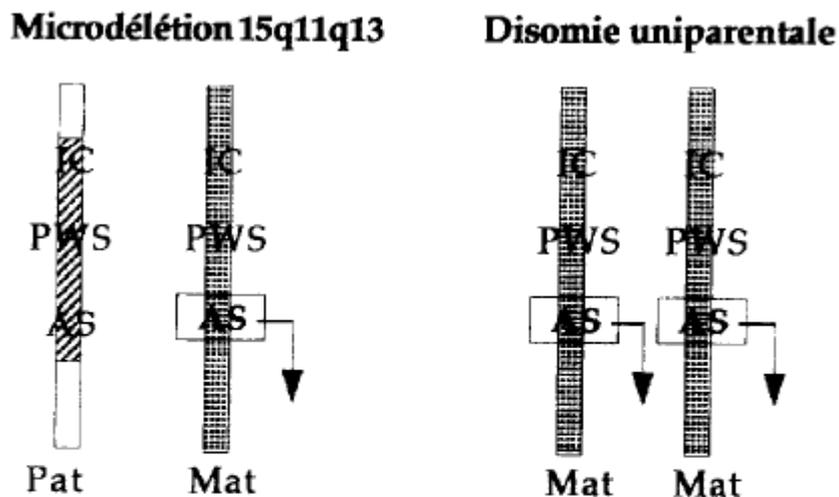


Figure 8 : Syndrome de Prader-Willi (SPW) secondaires à une micro-délétion ou une disomie uniparentale. (Dupont et al. 1997)

Absence d’expression du gène PWS. Soit par délétion de la région 15q11q13 du chromosome paternel, soit par absence d’empreinte de type paternelle sur l’un des deux chromosomes 15.

-dans un très faible nombre de cas, on retrouve une des mutations du centre d’empreinte (1 à 2

dans le syndrome de Prader-Willi tandis qu'elle est paternelle pour les deux autres gènes dont le gène UBE 3A dont l'implication dans le syndrome d'Angelman est bien connue. (Tauber et al 2004)

8. Les variations biologiques

Relations génotype-phénotype

Le SPW est caractérisé par une hétérogénéité phénotypique qui a fait très tôt l'objet de tentatives de corrélations avec les deux types d'anomalies génétiques les plus couramment observées (Gillissen Kaeskasch et al 1995).

Ainsi, il a été initialement montré que les phénotypes les plus typiques étaient ceux liés aux délétions 15q13-q11. Comparativement, les phénotypes associés aux disomies uniparentales maternelles comportent des caractéristiques physiques atténuées avec notamment une absence d'hypopigmentation et des performances cognitives globalement meilleures (Mitchell et al. 1996).

Il n'y a pas aujourd'hui de consensus strict sur l'existence de corrélation génotype phénotype mais il existe des données pour certaines caractéristiques phénotypiques qui évoquent une relation forte avec le génotype.

L'efficacité cognitive globale serait de même niveau quelle que soit la forme génétique (Steinhausen et al 2004). Les compétences verbales des individus présentant une disomie sont meilleures que celles de sujets délétés mais il existe des divergences en ce qui concerne les compétences non-verbales (Steinhausen et al. 2004 ; Veltman et al. 2004).

Deux études récentes (Butler et al 2004 ; Varela et al. 2005), portant sur des adolescents et jeunes adultes présentant un SPW, ont mis en évidence des différences phénotypiques en fonction du type de la délétion (forme longue 1 ou courte 2). Les distinctions trouvées entre ces trois types génétiques - les deux délétions et les disomies - concernent les problèmes comportementaux (essentiellement la présence de comportements adaptatifs), psychologiques (l'intensité des obsessions et compulsions), et cognitifs (les processus d'intégration visuo-motrice, les performances en lecture et mathématiques). Ainsi, les sujets ayant les délétions les plus étendues (sous-groupe 1) un comportement compulsif significativement plus marqué et une perception visuelle plus altérée. Les patients ayant des délétions plus courtes (sous-groupe 2) présenteraient quant à eux des phénotypes plus proches de ceux décrits dans le groupe des disomies uniparentales maternelles. (Tauber et al. 2004).

9. L'hérédité de syndrome prader-willi

Bien que le syndrome de Prader-Willi soit associé à diverses anomalies sur le chromosome 15. Dans la majorité des cas (98%) sont attribués au hasard ou dits « de novo ». Il s'agit d'un accident génétique spontané ayant eu lieu lors de la conception ou immédiatement après. Imprévisible : l'enfant est porteur du syndrome de Prader-Willi alors que ses parents ne sont ni atteints, ni porteurs de la maladie. Il est donc important de caractériser précisément le défaut génétique pour guider le conseil génétique donné aux familles.

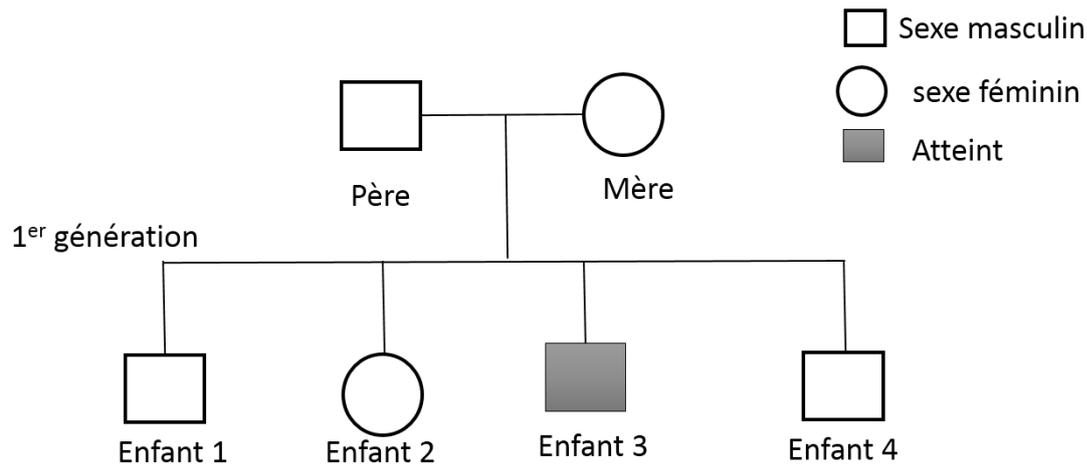


Figure 10 L'arbre généalogique d'une famille X atteinte par un syndrome de prader-willi.

10. Physiopathologie du syndrome

Des nombreuses manifestations du SPW sont en relation avec un dysfonctionnement de l'hypothalamus, structure située au niveau du cerveau qui régule les fonctions hormonales et certains comportements :

- L'hypothalamus intervient dans la sensation de faim et de satiété. En effet, le contrôle du poids se fait sous l'intervention de plusieurs hormones, en particulier une hormone secrétée par l'estomac, la ghreline, qui agit au niveau de l'hypothalamus : elle stimule l'appétit et entraîne une augmentation de la prise alimentaire. Chez les personnes atteintes de SPW, on retrouve une augmentation anormale de la quantité de ghreline. Cette augmentation expliquerait en partie le dérèglement de l'hypothalamus entraînant une sensation de satiété plus tardive avec une envie de manger plus fréquemment et en plus grande quantité.

- L'hypothalamus intervient également dans la régulation des hormones impliquées dans le développement sexuel. Dans le SPW, leur production insuffisante (hypogonadisme) est à l'origine du développement pubertaire incomplet.

- Un dysfonctionnement de l'hypothalamus est également impliqué dans le retard de croissance dû à un déficit en hormone de croissance.

- Enfin, d'autres manifestations du SPW semblent également être en relation avec un dérèglement de l'hypothalamus tels que les troubles respiratoires, les troubles de la régulation de la température (thermorégulation), le seuil élevé de résistance à la douleur, la diminution de la résistance au stress et les troubles du comportement.

CHAPITRE II

MATERIEL ET

METHODES

Chapitre II : MATERIEL ET METHODES

Notre travail est une étude rétrospective effectuée sur 40 patients adressés au laboratoire de Biochimie du CHU Mustapha, au niveau de l'unité de Génétique moléculaire, pour retard mental syndromique, associant dysmorphie un retard psychomoteur, et d'autres signes associés.

Notre travail à porter sur la réalisation du diagnostic moléculaire du syndrome de PW sur une période de 4 mois (février 2015- Mai 2015) ; à la recherche de cas de syndromes Prader-Willi avérés.

1. Recrutement des patients :

L'unité de génétique reçoit des patients adresses pour une suspicion de maladies génétiques, afin de confirmer ou d'infirmer le diagnostic. Proposé et de déceler l'anomalie chromosomique à l'origine du retard mental.

Les critères cliniques de sélection de nos patients reposent essentiellement sur la présence d'un retard mental et une obésité sévère, mais aussi sur d'autres critères secondaires dont :

- ✓ Crises convulsives.
- ✓ Troubles comportementaux : agressivité, stéréotypie.
- ✓ Troubles alimentaires et troubles du sommeil.

2. Matériel

2.1. Matériel biologique :

Le test génétique est réalisé sur l'ADN extrait à partir de sang total prélevé sur l'anticoagulant EDTA. 10 ml de sang veineux périphérique sont prélevés stérilement sur 2 tubes EDTA (Ethylène Diamine Tétra-Acétique) (0.5M, pH=8) au 1/20ème (19 volumes de sang pour 1 volume d'anticoagulant) pour les études génétiques, le sang peut être conservé 15 jours au réfrigérateur (+4°C).

Et pour les analyses biochimiques on utilise 2 tubes prélevés sur l'héparinate de lithium.

3. Méthodes

Notre travail est divisé en 2 étapes (extraction de l'ADN et l'analyse moléculaire au niveau du locus SNRPN du chromosome 15).

L'étude génétique est basée sur l'analyse de la constitution chromosomique de l'individu à la recherche d'anomalies chromosomiques (disomie uniparentale, micro-délétion) et pour réaliser cette étude nous avons besoin de 2 étapes qui sont : l'extraction de l'ADN et le Profil de Méthylation de l'ADN.

3.1 Protocole d'extraction d'ADN (Extraction par salting out) :

L'extraction de l'ADN est commune à la réalisation de l'étude génétique standard et ce mode opératoire permet d'extraire l'ADN à partir de sang total, prélevé sur 2 tubes qui contiennent l'anticoagulant EDTA. Le protocole s'étale sur plusieurs étapes, les étapes sont résumées ci-après :

3.1.1. Lyse des globules rouges

Dans un tube Falcon de 50 ml : Prendre 10 ml de sang total + 40 ml de Tampon de lyse. Homogénéiser et incuber 10-15 min à température ambiante. On centrifuge 10 mn à 2500 trs/mn à température ambiante. On élimine avec précaution, le surnageant (contenant les hématies). On répète l'opération précédente 2 fois avec de l'eau physiologique. S'il y a des hématies qui persistent dans le culot, on effectue un lavage supplémentaire jusqu'à avoir un culot blanchâtre dépourvu des globules rouges.

3.1.2. Lyse des leucocytes

On ajoute au culot des blancs 2 ml de tampon WLB ; 10 µl de SDS à 20 % et 50 µl de protéinase K pour dénaturer les membranes cellulaires. On incube une nuit à 37°C sous agitation.

3.1.3. Précipitation des protéines

Le lendemain, retirer les tubes du bain marie ; rajouter à l'extrait 1.3 ml de NaCl*6M, et on homogénéise, et on centrifuge à 3500 rpm pendant 25 min, afin de précipiter les débris cellulaires. On récupère le surnageant (phase aqueuse), contenant l'ADN.

3.1.4. Précipitation de l'ADN

Rajouter 3 volumes (10 ml) d'éthanol absolu glacial au surnageant récupéré précédemment (précipitation de l'ADN, la méduse devient visible). On laisse l'ADN se précipiter par agitation douce en retournant délicatement le tube jusqu'à ce que les filaments d'ADN forment une méduse ; on récupère la méduse dans un tube Eppendorf (1,5 ml) contenant 300 µl d'éthanol à 70%.

Centrifuger à 3500 rpm pendant 10 min, éliminer le surnageant ; la méduse d'ADN ainsi condensée est lavée 2 fois à l'éthanol 70% afin d'éliminer les traces de sels : Récupérer l'ADN et procéder au séchage à sec (speed vac) pour éliminer l'alcool.

3.1.5. Dissolution de l'ADN

Reprendre l'ADN dans 300 µl de Tris-EDTA .Cette solubilisation nécessite une agitation continue dans un vortex, pendant 3 jours à peu près.

3.2 Protocole opératoire du Syndrome de Prader Willi/Angelman Analyse des gènes SNRPN/UBE3A

Cette technique demande des conditions de stérilité parfaites. En effet, des microorganismes pourraient altérer la manipulation. Le travail se fait sous hotte, avec port de gants stériles.

Ce mode opératoire définit la technique permettant le diagnostic du syndrome de PraderWilli/Angelman, par technique de méthyl PCR.

Les gènes SNRPN/UBE3A sont soumis à l'empreinte parentale ;

SNRPN : Inactivation de l'allèle maternel

UBE3A : Inactivation de l'allèle paternel

Mécanisme d'inactivation sous contrôle épigénétique par méthylation des ilots CpG

Cette méthylation différentielle au niveau de chacun des locus est mise à profit pour le diagnostic du PW/AS.

L'ADN subit préalablement un traitement au bisulfite de sodium, en présence d'hydroquinone, et en milieu alcalin, entraînant une désamination des cytosines non méthylées en Uraciles. (Résistance des cytosines méthylées au traitement)

L'ADN traité, est ensuite amplifié en utilisant 2 couples d'amorces spécifiques (selon le statut de méthylation de chaque allèle). La PCR est réalisée en présence d'un témoin normal, d'un témoin PW, et d'un témoin AS.

Les produits de PCR des patients sont testés par électrophorèse sur gel Nu-cieve-Agarose à 4%. Cette technique permet de mettre en évidence :

✓ **Prader Willi :**

- La micro-délétion q11.2-q13 du chromosome 15 paternel
- La disomie maternelle du chromosome 15

✓ **Angelman :**

- La micro-délétion q11.2-q13 du chromosome 15 maternel
- La disomie paternelle du chromosome 15

3.2.1. Matériels et réactifs

3.2.1.1. Matériel :

- Eppendorff 1,5 ml

- Microtubes 0.2 ml, avec couvercle

Thermocycleur Applied Biosystem, Biorad min Mj, Biorad T100

3.2.1.2. Réactifs

-Kit de Taq gold ; contenant Tampon 10X, Mgcl₂ 25 mM, et Taq polymérase 5 U/μl

- dNTP 10 mM

- Les amorces mères reconstituées à 100 μM (congélateur -80°)

- Les amorces filles diluées (congélateur Eniem -20)

- Kit de purification Gel-extraction de Qiagen

3.2.2. Mode opératoire :

3.2.2.1. Extraction d'ADN :

Extraction d'ADN à partir de sang total par Salting Out, suivre le mode opératoire.

Doser L'ADN par le spectrophotomètre.

Une quantité d'ADN de 2 μg est requise pour le traitement de méthylation

3.2.2.2. Dosage de l'ADN

Les acides nucléiques sont dosés par technique spectrophotométrique, ont procédé au dosage sur l'ADN dilué au 1/50.

La concentration d'acides nucléiques est déterminée par une mesure effectuée à 260 nm contre un blanc. L'interférence par des contaminants se reconnaît par calcul d'un « ratio ». Les protéines absorbant à 280 nm, le ratio A260/A280 est utilisé pour estimer la pureté de l'acide nucléique. L'ADN pure devrait avoir un ratio d'environ 1,8. La quantité d'acide nucléique peut être estimée par comparaison à une gamme de concentrations en utilisant l'intensité de la fluorescence émise par le bromure d'éthidium lorsque celui-ci est irradié par la lumière UV. La concentration de l'ADN génomique est ajustée à une concentration finale 50 ng/µl.

3.2.3. Traitement de méthylation :

3.2.3.1. Réactifs :

✚ Hydroquinone :

Formule chimique : C₆H₆O (sigma, PM= 110.1)

Préparer une solution à 100 mM : peser 110 mg /10 ml eau stérile
(Distribuer 500 µl dans des eppendorfs, et conserver à -20° C)

Diluer au 1/10^{ème} au moment de l'emploi.

✚ Bisulfite de sodium :

Na₂S₂O₅ solide, PM= 190.06

Préparer une solution à 2M, peser 19 g/50 ml d'eau stérile

- Mettre la poudre dans le tube Falcon de 50 ml
- Ajouter de l'eau distillée à 40 ml
- Ajuster le pH à 5 (pH initial de 4, ajouter quelques gouttes de lessive de soude)
- Ajuster le volume final à 50 ml

Distribuer 2 ml de Bisulfite de sodium dans des eppendorfs recouverts de papier aluminium (à conserver à - 20°)

3.2.3.2. Traitement de l'ADN :

La quantité d'ADN requise pour le traitement est de 2 µg.

Soit une concentration d'ADN à X µg/ml :

X µg----- 1000 µl

2 µg----- Y= 2000/X

Y est le volume d'ADN correspondant à 2µg

Dans un eppendorff stérile :

ADN dosé 2µg (Y= 2000/X)

NaOH (10 M)..... 1.5 µl

Eau stérileqsp 50 µl

Incuber à 37° pendant 10 minutes au Bain marie

Retirer les eppendorff du bain marie, puis ajouter :

Hydroquinone (10 mM).....30 µl (une dilution au 1/10 ème est réalisée)

Bisulfite de sodium (2M)..... 320 µl

Paraffine liquide Quelques gouttes

Incuber à 55° pendant 18 heures au Bain marie

3.2.3.3. Purification de l'ADN traité : (A l'aide du kit Qiagen gel extraction)

1- Dans des eppendorff neufs de 2 ml, ajouter 800 µl de tampon QG

2- Récupérer l'ADN traité sous la paraffine en 2 fois,

- 320 µl (à l'aide de P1000)
- 80 µl (à l'aide de P200)

CHAPITRE III

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre III : Résultats et discussion**1. Origine géographique des patients :**

Notre étude comporte 40 patients présentant un retard mental associant une obésité et une polyphagie. Ils sont adressés au laboratoire par des neurologues, pédiatres et psychiatres répartis sur tout le territoire national (Alger, Blida, Médéa, Boumerdes, Tizi Ouzou, Bejaïa, Ain Defla, Chlef, Sétif, Oran, Skikda, M'sila Biskra, Ouargla...etc.) pour le diagnostic moléculaire du syndrome de Prader-Willi.

2. Caractéristiques démographiques des patients :**2.1. Répartition des patients selon le sexe/âge :**

Le SPW est une maladie autosomique qui peut toucher les deux sexes, Nôtre étude a été effectuer sur les deux sexes (filles et garçon).

L'âge moyen de nos patients est de (11.8 ± 4.09) Le patient le plus âgé en avait 17 ans, et le plus jeune avait à peine 5 ans.

Le SPW est une maladie génétiquement orpheline, ce qui rend le diagnostic clinique difficile à un âge précoce ; sauf si le bébé présent une hypotonie sévère.

Plus de la moitié de nos patients consultent à un âge relativement précoce (moins de 6 ans). Ceci est dû à l'attention particulière porté à l'enfant, aussi bien par les parents, que par le personnel éducatif des crèches. Grace à cette vigilance, les enfants peuvent être rapidement diagnostiqués, ce qui permet une prise en charge dans les meilleurs délais et donc assurera une meilleure qualité de vie à l'enfant.

Les autres cas sont des enfants dont l'âge est compris entre 5 et 10 ans. A cet âge-là, l'enfant devrait normalement créer des liens avec les autres enfants, mais au lieu de ça il rencontre des difficultés d'adaptation sociale et scolaire qui peut constituer des motifs de consultation.

Les deux tranches d'âges restantes, à savoir 10-15 ans et 15 ans et moins représentent. Ces chiffres reflètent la difficulté de poser un diagnostic en raison des moyens limités disponibles en Algérie en plus des difficultés d'accès à ce type d'examens.

3. Analyse génétique :

Le test génétique standard a été effectué pour l'ensemble des patients adressés au service (40 patients). Cette analyse a révélé 5 malades (12.5%) présentant le syndrome de Prader-Willi. Le test de syndrome d'Angelman est lancé simultanément.

L'électrophorèse de l'ADN est réalisée dans un gel d'agarose creusé de puits (15puits) où seront déposées les solutions d'ADN à analyser. La lecture de gel après migration s'effectue sous la lumière UV et le résultat est le suivant :

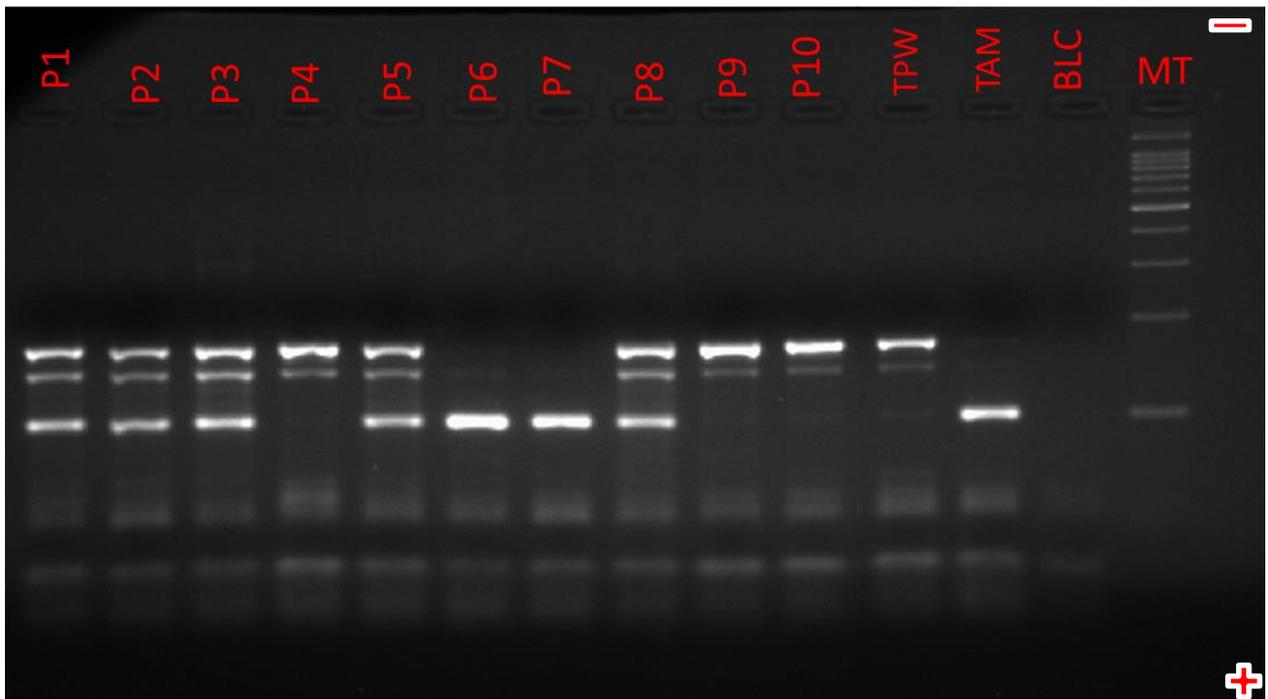


Figure 11 Image d'un gel d'électrophores de 10 patients et un témoin de Prader-Willi et d'Angelman avec un marqueur de taille et un blanc.

P1-P10= les patients numérotés de 1 jusqu'à 10

TPW= Témoin de Prader-Willi

TAM= Témoin d'Angelman

BLA= Blanc (c'est l'eau distillée, que est utilisée dans la technique ; nous permettant de savoir s'il est contaminé ou non)

MT= Marqueur de Taille

En général on fait l'analyse de chaque patient deux fois pour confirmer les résultats.

Ce test nous permet de diagnostiquer deux types d'anomalies ; la micro-délétion q11.2-q13 du chromosome 15 paternel et la disomie maternelle du chromosome 15 chez les patients PW, et chez les patients d'Angelman, il nous permettant de connaître la micro-délétion q11.2-q13 du chromosome 15 maternel et la disomie paternelle du chromosome 15.

L'ADN s'ionise sur ses groupements phosphates et migre vers l'anode. La résistance du gel poreux au déplacement de l'ADN dans le champ électrique est proportionnelle à la taille des fragments d'ADN. Ils seront donc séparés en fonction de leur taille, exprimée en paires de base, les plus petits fragments migrant les plus rapidement.

Afin de disposer d'une référence de taille, on dépose dans un des puits du gel d'électrophorèse, un marqueur, mélange de fragments de tailles connues, en général obtenu par digestion d'un ADN parfaitement identifié par une enzyme de restriction.

Normalement un gène est exprimé à partir de deux allèles, l'un d'origine maternelle et l'autre d'origine paternelle. L'empreinte génomique ou parentale constitue une exception à une règle génétique, car il existe une expression différente de l'allèle maternel ou paternel pour certains gènes. Dans le cadre du syndrome de Willi-Prader, l'allèle maternel est silencieux, et l'allèle paternel est exprimé.

Les patients normaux présentent deux bandes, correspondant aux deux allèles paternel et maternel ; donc pas de micro-délétion dans cette région et pas disomie uniparentale.

S'il y a présence d'une seule bande, le patient est soit SPW ou soit Angelman.

4. Les variations biologiques

A l'âge adulte, avec le développement de l'autonomie, l'évolution du SPW est à l'origine d'un dysfonctionnement hormonal dominée par les troubles du comportement alimentaire et par l'aggravation d'une obésité. L'obésité peut entraîner des complications qui menacent l'espérance de vie : diabète, problèmes cardiaques ou vasculaires, problèmes respiratoires, oedème lymphatique (lymphoedème). De plus, les troubles psychologiques (colères, anxiété) peuvent être invalidants pour l'insertion socioprofessionnelle.

Une batterie d'analyses biochimiques a été proposée aux 5 patients confirmés PW, pour essayer de déterminer les variations biologiques rencontrées pour ce syndrome.

5. Les variations biochimiques :

Les paramètres choisis sont en relation directe avec la symptomatologie du syndrome.

Pour les paramètres de routines (Glycémie, fonction rénale, bilan lipidique, bilan phosphocalcique, et fer, et un bilan hépatique).

- HbA1c qui est le reflet de l'imprégnation glycémique des 3 derniers mois
- Et homocystéine qui est un marqueur prédictif de survenu de manifestation cardiovasculaire

Table 2 la Répartition des variations biologique chez les 05 patients. (voire l'annexes)

	Moyenne	Ecart-type	Valeurs normales
Age	11.80	4.09	
Calcémie	98.00	5.29	85 – 105 mg/l
Phosphorémie	43.00	8.15	27 – 47 mg/l
Magnésium	21.50	2.12	17 – 24 mg/l
Fer	86.67	26.03	37 – 145 µg%
Glycémie	1.44	1.13	0,7 – 1,10 g/l
Urée	0.24	0.02	0,1 – 0,5 g/l
Créatinémie	4.00	0.00	6 – 11 mg/l
Acide-Urique	45.40	4.72	24 – 77 mg/l
Triglycéride	0.94	0.26	0.50 - 150 g/l
Cholestérol total	1.69	0.25	1.6 – 2.00 g/l
HDLc	0.50	0.06	0.4 – 0.95 g/l
LDH	187.67	60.67	135 – 225 UI/l
ASAT	26.80	13.10	< 37 U.l/l
ALAT	39.40	45.17	< 41 U.l/l
Homocystéine	8.49	2.30	5 – 15 µmol/l
HbA1c	7.20	3.47	4 – 6 %

Ces résultats ne montrent pas des variations significatives pour l'ensemble des paramètres réalisés sur les 04 patients (enfants).

Le 5eme patient, dont l'âge est de 17 ans, on remarque une élévation importante de la glycémie, de l'HbA1c, et de l'homocystéine, avec variation du bilan lipidique.

L'âge des patients oriente les résultats des tests biochimiques ; en effet les patients présentant la forme pédiatrique, et bénéficiant d'un suivi diabétique ne montrent pas des variations significatives, avec des taux compris dans l'intervalle de référence pour chacun des paramètres.

Les patients diagnostiqués tardivement, comme le cas de notre malade âgé (17 ans), on observe une installation des complications dû au SPW, à savoir diabète (glycémie à jeun très élevée 3.13g/l, avec un taux important d'HbA1c 12.39%, et une élévation du taux d'homocystéine.

Cette étude préliminaire effectuée sur un nombre restreint de malade et sur une période assez court, est une première en Algérie.

Ces résultats nous permettent de préciser certains objectifs à atteindre.

- Diagnostic précoce, pour éviter les complications, et prendre en charge les patients sur le plan diabétique.
- La nécessité d'assurer un suivi pour ces patients régulièrement afin de déceler d'éventuelles complications.
- Et réaliser une étude semblable sur un nombre des patients plus important et sur une durée plus longue.

Conclusion

Notre travail au sein du Laboratoire central de biochimie du CHU Mustapha nous a permis de nous familiariser avec les techniques courantes utilisées pour le diagnostic du syndrome de Prader-willi.

Nôtre étude à porter sur le syndrome de Prader-Willi, qui est un retard mental syndromique. En dehors des premiers mois de la vie, la symptomatologie du SPW est dominée par l'obésité et des troubles psychiatriques ; L'étude du phénotype comportemental dans le SPW et des mécanismes organiques sous-jacents permettra de développer de nouveaux liens, notamment, entre la psychiatrie, la génétique, et les recherches pharmacologiques.

Une consultation génétique est indispensable à l'orientation diagnostique car une bonne connaissance des caractères phénotypiques de ce syndrome est nécessaire au choix des tests génétiques à réaliser.

Les résultats génétiques (Analyse du gène SNRPN/UBE3A) de nos 40 patients qui nous ont été adressés pour suspicion de SPW ont révélé que 12% (05 patients) sont des patients PW.

Un suivi sur le plan biologique a été proposé pour ces patients ce qui a révélé la nécessité d'instaurer un diagnostic précoce, pour éviter les complications dues à l'obésité, notamment le diabète.

Cette étude effectuée sur une période assez courte devra être élargie sur un nombre plus important de malades, et sur une durée plus longue.

D'un point de vue thérapeutique, les recherches actuelles sont fondées sur des substances pharmacologiques agissant sur la régulation hypothalamique. Une autre éventualité serait la possibilité de réexpression des gènes portés sur le chromosome 15 d'origine maternelle, mais ceci reste encore très théorique.

Références bibliographiques

- Akefeldt AB, Gillberg C. Voice, speech and language characteristics of children with Prader-Willi syndrome. *J Intellect Disabil Res* 1997 ; 41 : 302-11.
- Angelman H. "Puppet children": a report of three cases. *Dev Med Child Neural* 1965; 7 : 681 -8.
- Bannister, A., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research* , 21 (3), 381-95.
- Bannister, A., Zegerman, P., Partridge, J., Miska, E., Thomas, J., Allshire, R., et al. (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* , 410 (6824), 120-124.
- Barlow, D.P., Stoger, R., Herrmann, B.G., Saito, K. and Schweifer, N. (1991) The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus. *Nature*, 349, 84-87.
- Bartolomei, M.S., Zemel, S. and Tilghman, S.M. (1991) Parental imprinting of the mouse H19 gene. *Nature*, 351, 153-155.
- Berger, S., Kouzarides, T., Shiekhattar, R., & Shilatifard, A. (2009). An operational definition of epigenetics. *Genes & Development* , 23 (7), 781-3.
- Bird, A. (2007). Perceptions of epigenetics. *Nature* , 447 (7143), 396-8.
- Borgel, J., Guibert, S., Li, Y., Chiba, H., Schübeler, D., Sasaki, H., et al. (2010). Targets and dynamics of promoter DNA methylation during early mouse development. *Nature Genetics*, 42 (12), 1093-100.
- Buntinx IM, Hennekam RCM, Brouwer OF, Stroink H, Beuten J, Mangleschots et al. Clinical profile of Angelman syndrome at different ages. *Am J Med Genet* 1995 ; 56: 176-83.
- Butler MC. Prader-Willi syndrome: current understanding of cause and diagnosis. *Am J Med Genet* 1990 ; 35 : 319-32.
- Butler MG, Bittel DC, Kibiryeveva N, Talebizadeh Z, Thompson T. Behavioral differences among subjects with Prader-Willi syndrome and type I or type II deletion and maternal disomy. *Pediatrics* 2004 ;113 : 565-73.
- Butler MG, Meaney FJ. An anthropometric study of 38 individuals with Prader-Labhart-Willi syndrome. *Am J Mrd Genet* 1987 ; 26 : 445-55

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Cattanach, B.M. and Kirk, M. (1985) Differential activity of maternally and paternally derived chromosome regions in mice. *Nature*, 315, 496-498.
- Chai JH, Locke DP, Grealley J et al. Identification of four highly conserved genes between breakpoint hotspots BP1 and BP2 of the Prader-Willi/angelman syndromes deletion region that have undergone evolutionary transposition mediated by flanking duplicons. *Am J Hum Genet* 2003 ; 73 : 898-925.
- Chang, B., Chen, Y., Zhao, Y., & Bruick, R. (2007). JMJD6 is a histone arginine demethylase. *Science (New York, NY)* , 318 (5849), 444-7.
- Clayton-Smith I, Pembrey ME. Angelman syndrome. *J Med Genet* 1992; 29 : 412-5
- DeChiara, T.M., Robertson, E.J. and Efstratiadis, A. (1991) Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell*, 64, 849-859.
- Developmental programming of CpG island methylation profiles in the human genome. *Nature Structural & Molecular Biology* , 16 (5), 564-71.
- Dittrich B, Buiting K, Kom B, Richard S, Buxton J, Saitoh S et al. Imprint switching on human chromosome 15 may involve alternative transcripts of the SNRPN gene. *Nat Genet* 1996 ;14 : 163-70.
- Dupont JM, Cuisset L. Bases génétiques des syndromes de Prader-Willi et d'Angelman : implications pour la conduite du diagnostic biologique. 1998 ; 5 : 4 18-24
- Dykens EM. Contaminated and unusual food combinations: what do people with Prader-Willi syndrome choose? *Mental retardation* 2000 ; 38 : 163-71.
- Engel E. La disomie uniparentale: revue des causes et conséquences en clinique humaine. *Ann Genet* 1995 ; 38 : 113-36.
- Ernst, J., & Kellis, M. (2010). Discovery and characterization of chromatin states for systematic annotation of the human genome. *Nature biotechnology* , 28 (8), 817-25.
- Ernst, J., Kheradpour, P., Mikkelsen, T., Shoresh, N., Ward, L., Epstein, C., et al. (2011). Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types. *Nature* , 473 (7345), 43-9.
- Esteller, M. (2008). Epigenetics in cancer. *The New England journal of medicine* , 358 (11), 1148-59.
- Federman DD. The biology of human sex differences. *N Engl J Med* 2006 ; 354 :1507-14.
- Ferguson-Smith AC, Surani MA. Imprinting and the epigenetic asymmetry between parental genomes. *Science* 2001 ; 293 : 1086-9.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Gillissen Kaeskasch G, Robinson W, Lohmann D, Kaya-Westerloh S, Passarge E, Horsthemke B. Genotype-phenotype correlation in a series of 167 deletion and nondelation patients with Prader-Willi syndrome. *Human Genetics* 1995 ; 96 : 638-43.
- Goldstone AP. Prader-Willi syndrome: advances in genetics, pathophysiology and treatment. *Trends in Endocrinol and Metab* 2004 ; 15 : 12-20.
- Goldstone AP. Prader-Willi syndrome: advances in genetics, pathophysiology and treatment. *Trends in Endocrinol and Metab* 2004 ; 15 : 12-20.
- Greenswag LR. Adults with Prader-Willi syndrome: a survey of 232 cases. *Dev Med Child Neural* 1987 ; 26 : 145-52 .
- Gunay-Aygun M, Schwartz S, Heeger S, O’Riordan MA, Cassidy SB. The changing purpose of Prader-Willi syndrome clinical diagnosis criteria and proposed revised criteria. *Pediatrics* 2001 ; 108 : E92.
- Illingworth, R., Gruenewald-Schneider, U., Webb, S., Kerr, A., James, K., Turner, D., et al. (2010). Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. *PLoS genetics* , 6 (9).
- Illingworth, R., Kerr, A., Desousa, D., Jørgensen, H., Ellis, P., Stalker, J., et al. (2008). A novel CpG island set identifies tissue-specific methylation at developmental gene loci. *PLoS Biology*, 6 (1), e22.
- Jacob, F., & Monod, J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins†. *Journal of Molecular Biology* , 3 (3), 318-356.
- Jacobs, S., & Khorasanizadeh, S. (2002). Structure of HP1 chromodomain bound to a lysine 9-methylated histone H3 tail. *Science (New York, NY)* , 295 (5562), 2080-2083.
- Joulie Michael. Recherche de nouvelles protéines humaines se liant à l'ADN méthylé. Th.Doct. Sc. Science du vivant. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. French.
- Kaufman, M.H., Barton, S.C. and Surani, M.A. (1977) Normal postimplantation development of mouse parthenogenetic embryos to the forelimb bud stage. *Nature*, 265, 53-55.
- Kulaeva O, Hsieh F, Chang H, Luse D, Studitsky V. Mechanism of Transcription through a Nucleosome by RNA polymerase II. 2012. PMID: PMC3535581

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., & Jenuwein, T. (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*, 410 (6824), 116-120.
- Lewis BA, Freebairn, L., Heeger, S., Cassidy, SB. Speech and language skills of individuals with Prader-Willi syndrome. *Am. J. of speech-language pathology* 2002 ; 11 : 1-10.
- Li E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genetics* 2002 ; 3 : 662-73.
- Luger, K., Mäder, A., Richmond, R., Sargent, D., & Richmond, T. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389 (6648), 251-60.
- Lyon, M. (1961). Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* (190), 372-373.
- Maatouk, D., Kellam, L., Mann, M., Lei, H., Li, E., Bartolomei, M., et al. (2006). DNA methylation is a primary mechanism for silencing postmigratory primordial germ cell genes in both germ cell and somatic cell lineages. *Development*, 133 (17), 3411-8.
- Magdinier, F., D'Estaing, S., Peinado, C., Demirci, B., Berthet, C., Guérin, J., et al. (2002). Epigenetic marks at BRCA1 and p53 coding sequences in early human embryogenesis. *Molecular human reproduction*, 8 (7), 630-5.
- McGrath, J. and Solter, D. (1984) Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell*, 37, 179-183.
- McGrath, J., & Solter, D. (1983). Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science (New York, NY)*, 220 (4603), 1300-2.
- Mitchell J, Schinzel A, Langlois S et al. Comparison of phenotype in uniparental disomy and deletion Prader-Willi syndrome: sex differences. *Am J Med Genet* 1996, 65 : 133-6.
- Mittwoch, U. (1978) Parthenogenesis. *J Med Genet*, 15, 165-181.
- Morgan, T. (1910). Sex limited inheritance in *Drosophila*. *Science (New York, NY)*.
Mori, T., Li, Y., Hata, H., & Kochi, H. (2004). NIFK is a ubiquitin ligase that is capable of ubiquitinating PCNP, a PEST-containing nuclear protein. *FEBS letters*, 557 (1-3), 209-14.

- Nicolls RD, Knoll JH, Butler MG, Karam S, Lalande M. Genetic imprinting suggested by maternal heterodisomy in nondeletion Prader-Willi syndrome. *Nature* 1989 ; 342: 281-5.
- Nowak, S., & Corces, V. (2004). Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends in genetics : TIG* , 20 (4), 214-20.
- Oda, M., Yamagiwa, A., Yamamoto, S., Nakayama, T., Tsumura, A., Sasaki, H., et al. (2006). DNA methylation regulates long-range gene silencing of an X-linked homeobox gene cluster in a lineage-specific manner. *Genes & Development* , 20 (24), 3382-94.
- OHNO, S., KAPLAN, W., & KINOSITA, R. (1959). Formation of the sex chromatin by a single X-chromosome in liver cells of *Rattus norvegicus*. *Experimental cell research* , 18, 415- 418.
- Pia Burman E, Ritzén M, Lindgren AC. Endocrine dysfunction in Prader-Willi syndrome: a review with special reference to GH. *Endocrine Reviews* 2001 ; 22 : 787-99.
- Postel-Vinay A, Pinto G, Diene G, Tauber M, Polak M. Syndrome de Prader-Willi (SPW) . In *Prise en charge des maladies génétiques*. 2004.
- Prader A, Labhart A, Willi H. Ein syndrom van adipositas, kleinwuchs, kryptorchismus und oligophrenie nach myatonieartigem zustand IM neugeborenenalter. *S&w& Med Wochenschr* 1956 ; 86 : 1260-1
- Reinhart, B. and Chaillet, J.R. (2005) Genomic imprinting: cis-acting sequences and regional control. *Int Rev Cytol*, 243, 173-213.
- Royo Hélène. Etude par imagerie cellulaire d'une nouvelle famille d'ARNs non-codants dont les gènes sont soumis a l'empreinte génomique parentale. Th. Doct. Sc. Biologie Moléculaire et Cellulaire. Paul Sabatier : l'Université Toulouse III. 2007.
- Schrandt-Stumpel CT, Curfs LM, Sastrowijoto P, Cassidy SB, Schrandt JJ, Fryns JP. Prader-Willi syndrome; causes of death in an international series of 27 cases. *Am J Med Genet* 2004 ; 124A :333-8.
- Solter, D. (2006) Imprinting today: end of the beginning or beginning of the end? *Cytogenet Genome Res*, 113, 12-16.
- Steinhausen HC, Eiholzer U, Hauffa BP, Malin Z. Behavioural and emotional disturbances in people with Prader-Willi Syndrome. *J Intellect Disabil Res* 2004 ; 48:47-52.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Sterner, D., & Berger, S. (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR , 64 (2), 435-59.
- Straussman, R., Nejman, D., Roberts, D., Steinfeld, I., Blum, B., Benvenisty, N., et al. (2009).
- Surani, M., Barton, S., & Norris, M. (1984). Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature*.
- Surani, M.A., Barton, S.C. and Norris, M.L. (1984) Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature*, 308, 548-550.
- Tauber M, Conte Auriol F, Moulin P, Molinas C, Delagnes V, Salles JP. Hyperghrelinemia is a common feature of Prader-Willi syndrome and pituitary stalk interruption : a pathophysiological analysis. *Horm Res* 2004 ; 62 : 49-54.
- Tauber M, Diène G, Glattard M, Bieth E. Le syndrome de Prader-Willi. Novembre 2004
- Tauber M, Diène G, Glattard M, Bieth E. Le syndrome de Prader-Willi. *mt pédiatrie*, vol. 9, n° 4, juillet-août 2006.
- Tauber M. Cavallé J. Le syndrome de Prader-Willi. 2011 ; 6:161-171 DOI 10.1007/s11690-011-0284-7.
- Tauber Maïthé. Le syndrome de Prader-Willi. Encyclopédie Orphanet Grand Public. Avril 2008. Disponible à l'adresse : www.orpha.net/data/patho/Pub/fr/PraderWilli-FRfrPub139v01.pdf
- Urs Ehisolzer (2008). Le syndrome de Prader-Willi: vivre avec les personnes concernées. KARGER. ISBN 978-3-8055-8359-6
- Van Lieshout CFN, De Meyer RE, Curfs LMG, Koot HM, Fryns JP. Problem behaviors and personality of children and adolescents with Prader-Willi syndrome. *J of Pediatr Psychol* 1998 ; 23 : 111-20.
- Varela MC., Kok F., Setian N., Kim CA., Koiffmann CP. Impact of molecular mechanisms, including deletion size, on Prader-Willi syndrome phenotype: study of 75 patients. *Clin genet* 2005 ; 67 : 47-52.
- Velasco, G., Hubé, F., Rollin, J., Neuillet, D., Philippe, C., Bouzinba-Segard, H., et al. (2010). Dnmt3b recruitment through E2F6 transcriptional repressor mediates germ-line gene silencing in murine somatic tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 107 (20), 9281-6.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Veltman MW, Thompson RJ, Roberts SE, Thomas NS, Whittington J, Bolton PF. Prader-Willi syndrome, a study comparing deletion and uniparental disomy cases with references to autism spectrum disorders. *European Child and Adolescent Psychiatry* 2004 ; 13 : 42-50.
- Waddington, C. (1942). Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature* .
- Whittington J, Holland A, Webb T, Butler J, Clarke D, Boer H. Academic underachievement by people with Prader-Willi syndrome. *J Intellect Disabil Res* 2004; 48 : 188-200.
- Whittington J, Holland A, Webb T, Butler J, Clarke D, Boer H. Cognitive abilities and genotype in a population-based sample people with Prader-willi syndrome. *J Intellect Disabil Res* 2004 ; 48 : 172-87.
- Zhang, Y., & Reinberg, D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes & Development* , 15 (18), 2343-60.

Annexes

- Bain marie advantage - Lab AL 05-01.
- Cuve d'électrophorèse de type Sub-Cell GT de la firme Biorad.
- Electrophorèse de PowerPac Univarsal de la firme Biorad.
- Equipement de capture de photo Gel Doc XR de la firme Biorad.
- Kit Quantifiler Human DNA Quantification
- Micro-centrifugeuse (Spin) centrifuge 5415 D. de la firme Eppendorf.
- Micro-onde.
- QiAquick Gel Extraction kit 250 de la firme QiAgen
- Réfrigérateurs (+4°C, -20°C).
- Spectrophotomètre BioPhotometer de la firme Eppendorf.
- speedvac DNA 1200 de la firme Thermo.
- Thermocycleur (PCR) C1000 Touch de la firme BIO RAD.



Matériel d'extraction l'ADN



Spectrophotomèt



Spectrophotomètre



Micro-centrifugeuse



speedvac



Kit Quantifiler Human
DNA Quantification



Bain marie



Equipement de capture de photo Gel Doc XR



Thermocycleur (PCR)



QiAquick Gel Extraction kit 250