



publique Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid IbnBadis-Mostaganem

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

**DEPARTEMENT DE BIOLOGIE**

## **MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES**

**Présenté par :**

**Yahia pacha Amel**

**Yahia pacha Nabila**

**Pour l'obtention du diplôme de**

**Master en biologie**

**Spécialité : GÉNÉTIQUE FONDAMENTALE ET APPLIQUÉE**

**Thème**

**Fibrose kystique : étude des marqueurs moléculaires**

**Devant Le Jury :**

**Président :Guedouar Youcef MCA Université Mostaganem**

**Examineur : BenAliSidahmed MAA Université Mostaganem**

**Encadreur :CHIBANIAbdelwaheb Professeur UniversitéMostaganem**

***Année Universitaire : 2020-2021***



## *Remerciement :*

Tout d'abord, nous remercions « **le Dieu** », notre créateur de nous avoir donné les forces, la volonté et le courage

Afin d'accomplir ce travail modeste.

Nous adressons le grand remerciement à notre encadreur **Mr. CHIBANI Abdelwaheb** qui a proposé le thème de ce mémoire, pour ses conseils et ses dirigés du début à la fin de ce travail.

Nous tenons également à remercier messieurs les membres de jury pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant de siéger à notre soutenance, tout particulièrement :

**Mr. Guedouar Youcef** pour nous avoir fait l'honneur de présider le jury de cette mémoire.

Nous souhaitons exprimer notre gratitude à **Mr. Benali sidahmed** pour avoir fait de lecteur notre mémoire, aller l'examiner et ils peuvent évaluer cette mémoire.

Nous vous remercions pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail et pour vos précieux conseils et remarques.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à nos familles qui nous ont toujours soutenues

Et à tout ce qui participe de réaliser ce mémoire. Ainsi que l'ensemble des enseignants qui ont contribué à notre travail.

Enfin ; nous adressons nos plus sincères remerciements à tous nos proches ; amis et collègues et toute la promotion de **génétique fondamentale et appliquée** ; qui ont toujours soutenue et encouragée au cours de la réalisation de ce mémoire.

Merci à tous et à toutes et que toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de notre projet ; trouve ici l'expression de nos sincères sentiments.

Merci.....



## *Dédicace*

*À nos chers parents*

*« Mohamed et Ahmed »*

*Pour il nous eut soutenus moralement et matériellement jusqu'à ce jour, pour son amour  
Et leurs encouragements. Que ce travail, soit pour vous, un faible témoignage de nous  
Profonde affection et tendresse. Qu'ALLAH le tout puissant, t'accorde  
Santé, bonheur et te protège de tout mal.*

*À nos chères mères*

*Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et  
d'affection que nous éprouve pour vous deux. Vous nous avez comblés avec vos tendresses  
affection tout au long de notre parcours. Ne nous cessé jamais de notre soutenir et  
d'encourager durant toutes les années de nos études. Qu'ALLAH vous protéger et vous  
donner la santé, le bonheur et longue vie.*

*À notre grand-mère*

*Un grand respect et amour à toi, vous avez été toujours là pour notre avec vos mots vos  
encouragements et vos conseils si précieux Qu'Allah te protège et te garde pour nous.*

*A notre sœurs Amina et Ratiba ; Rabha, à mes frères; Abdbrahman ; Hakim et  
Mohammed Amine que nous aimons beaucoup pour vos petites mots et votre soutien.*

*A notre grand-père « Mohammed »*

*La bougie qui a illuminé nos vies notre cher grand-père Que Dieu vous bénisse d'une  
bonne santé*

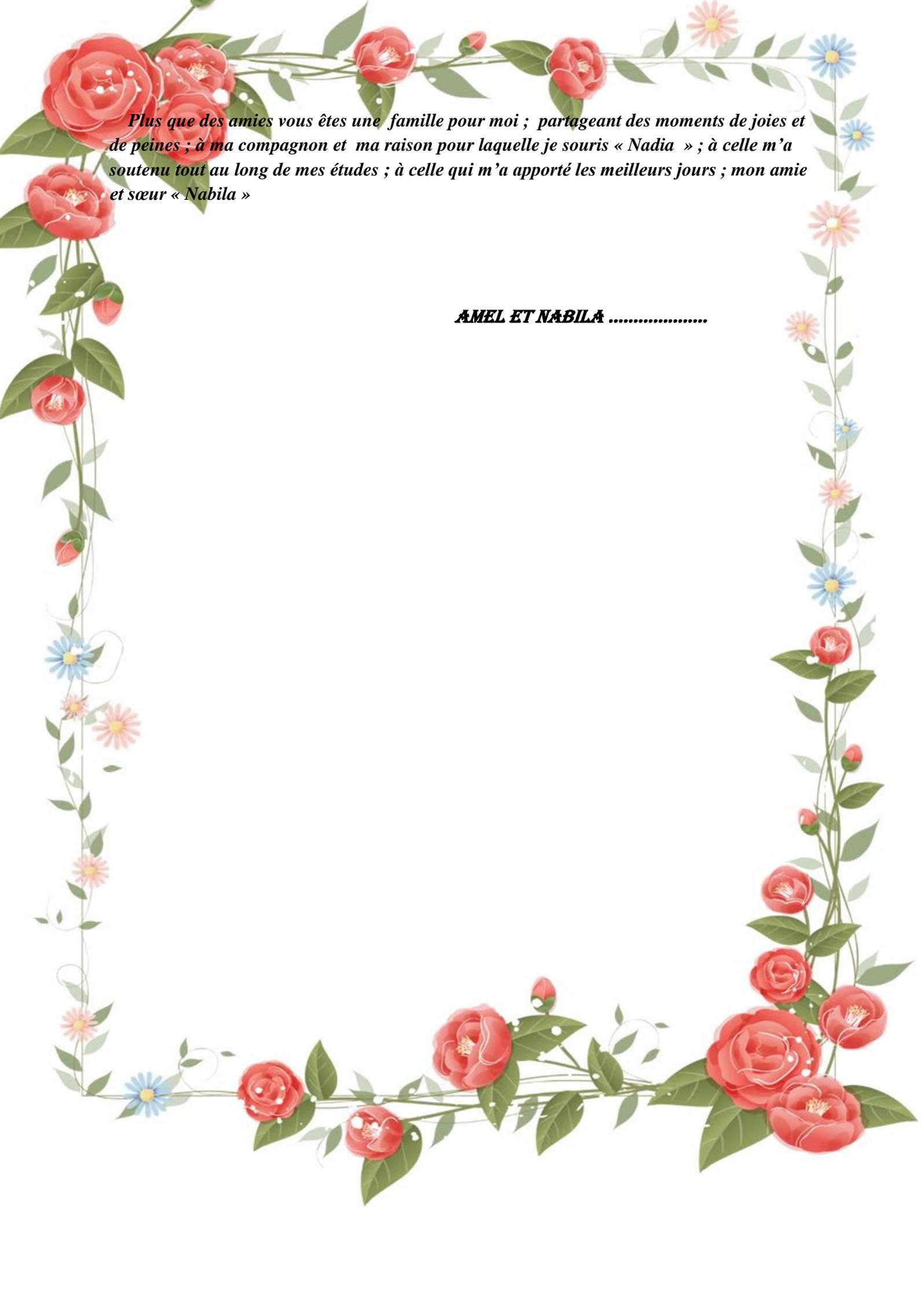
*À notre cher frère « Abdelaziz »*

*Qui nous a également beaucoup soutenus du début à la fin de nos travaux.*

*A notre petits anges*

*Rifal ; Abdelraouf ; Zakaria ; Mohamed islam*

*Petite ou grand ; proche ou lointaine, A tous ceux qui portent la famille « Yahia pacha »*



*Plus que des amies vous êtes une famille pour moi ; partageant des moments de joies et de peines ; à ma compagnon et ma raison pour laquelle je souris « Nadia » ; à celle m'a soutenu tout au long de mes études ; à celle qui m'a apporté les meilleurs jours ; mon amie et sœur « Nabila »*

**AMEL ET NABILA .....**

# Table de matière :

- ❖ Remerciement
- ❖ Dédicace
- ❖ Liste des Abréviations
- ❖ Liste des figures
- ❖ Liste des tableaux
- ❖ Résumé

Introduction.....1

## Partie Théorique

**Chapitre I : La fibrose kystique.....4**

**I. La fibrose kystique.....5**

    I.1.histoire de fibrose kystique.....5

    I.2.Epidémiologie.....6

    I.3.CFTR.....7

        I.3.1. Localisation du CFTR.....7

        I.3.2. La structure génique de CFTR .....8

        I.3.3.Régulation de la transcription du gène.....8

    I. 3.4.distribution géographique de la mutation du gène CFTR.....11

    I.3.5.la protéine CFTR.....13

    I.3.6. fonction de protéine CFTR.....14

        I.3.6.1.CFTR ; transporteur de chlore d'anion et de molécule organique.....14

        I.3.6.2.CFTR ; Régulation de canaux ionique .....14

        I.3.6.4.CFTR, alias ABCC7 ; nombre de la famille des ABC.....15

    I.4.1. la mutation du gène CFTR.....15

        I.4.1.1.origines et répartitions mondiales de la mutation les plus fréquents.....16

        I.4.1. 2.mutation C-1521-15231del CTT (p.phe508del).....16

        I.4.1.3.mutation induisant un épissage et alternatif .....16

        I.4.1.4.Différents classes de mutation .....17

            a) Mutation de classe I.....17

b) Mutation de classe II.....	17
c) Mutation de classe III : défaut d'activation du canal.....	17
d) Mutation de classe IV.....	18
e) Mutation de classe V.....	18
f) Mutation de classe VI : défaut de stabilité de la protéine mature.....	18
I.4.2. La mutation $\Delta F508$ .....	19
I.5. Influence des gènes modificateurs.....	20
I.5.1. La technologie des puces à ADN.....	21
I.5.2. Analyse moléculaire du gène CFTR.....	22
I.6. Les approches thérapeutiques de la fibrose kystique.....	23
I.6.1. thérapie génique .....	23
I.6.2. thérapie cellulaire.....	24
I.6.2.1. cellules souches embryonnaires.....	24

## **Chapitre II : Les marqueurs moléculaires spécifiques dans la fibrose kystique.....**

II.1. Définition des marqueurs moléculaires.....	26
II.2. Les marqueurs moléculaires responsables de la fibrose kystique.....	26

### **Partie pratique**

III. Patients et méthodes .....	28
III.1. patients .....	28
✚ Recrutement des cas index.....	28
✚ Cirières de sélection .....	28
III.2. méthodes.....	28
III.2.1. étude biochimique.....	28
III.2.1.1. les tests sueur.....	28
✚ Matériel de stimulation.....	29
✚ Matériel de dosage.....	29
III.2.1.2. Réactifs nécessaires.....	29
✚ Réactifs de stimulation.....	29
✚ Réactifs de dosage.....	29
III.2.1.3. Procédure de stimulation de la sudation.....	30
✚ Recueil de la sueur.....	30
✚ Dosage des chlorures sudoraux.....	31

✚ Préparation des échantillons.....	31
III.2.1.4.Mesure des volumes.....	32
✚ Expression des résultats.....	33
III.2.2.Etude génétique.....	33
III.2.2.1.Extraction de l'ADN.....	33
✚ Principe.....	33
III.2.2.1.1.Matériels nécessaires.....	34
III.2.2.1.2.Réactifs nécessaires.....	34
III.2.2.1.3.Procédure.....	34
a) Lyse de globules rouges.....	34
b) Lyse de globules blancs.....	35
c) Précipitation de l'ADN.....	35
d) Dosage de l'ADN.....	35
III.2.2.2.la PCR .....	36
✚ Principe.....	36
✚ Optimisation de la PCR.....	37
✚ Validation du test.....	38
✚ Réalisation pratique de l'amplification par PCR.....	39
III.2.2.3.Contrôle par électrophorèse des produits de PCR de différents exons.....	41
<b>IV. Résultats.....</b>	<b>43</b>
IV.1.Répartition des patients selon le sexe.....	43
IV.2.Répartition des patients selon l'âge au moment de la découverte de la maladie.....	43
IV.3.Répartition des patients selon les wilayas .....	44
IV.4.Répartition des patients selon les signes cliniques.....	45
IV.5. Répartition des patients selon le type de mariage.....	45
IV.6.Résultats du test de la sueur .....	46
IV.7.Résultats des cas positifs selon le sexe.....	46
IV.8. Résultats des cas positifs selon les wilayas.....	47
IV.9. Répartition des cas positifs selon la consanguinité.....	47
IV.10.Résultats de la mise au point de la technique ARMS utilisées pour la recherche de la delta F508 du gène CFTR .....	48
<b>V. Discussion.....</b>	<b>49</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>50</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>51</b>

## **Liste des abréviations :**

**AAV : Adenoassociated virus**

**ABC : ATP binding cassette proteins**

**ABCD : Absence bilatérale congénitale des canaux déférents**

**ADP : Adénosine diphosphate**

**ASL : Liquide de surface des voies aériennes**

**ASZI : Ankyrin repeat, SAM and basic leucine zipper domain containing 1**

**ATF : Activating transcription factor**

**CAVD : Absence congénitale des canaux déférents**

**Cbp/cut : CCAAT displacement protein cut homolog**

**C/EBP : CCAAT enhancer binding protein**

**CF : cystic fibrosis**

**CFTR: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator**

**CFTR-RD: CFTR-Related disorder**

**Cl<sup>-</sup> : Chlore**

**CNX :Clanexine**

**CPX : 8-cyclopenyl-1-1,3dipropylxanthine**

**CRE : cAMP response element**

**CREB : cAMP response element binding protein**

**CS : Cellules souches**

**CSE : Cellules souches embryonnaires**

**CSH : Cellules souches hématopoïétiques**

**CSM : Cellules souches mésenchymateuse**

**CTTNBP2 : Cortactin binding protein 2**

**DDP : différence de potentiel**

**DTM:domaine transmembranaire**

**ENaC: Epithelial Na<sup>+</sup> channel**

**Endo H: Endoglycosidase H**

**ERQC: Endoplasmic reticulum quality control**

**GlcNAC: Acétylglucosamine**

**GSH: G-glytanyl-custéinyl-glycine**

**HGVS: Human genome variation society**

**HIF-: Hypoxia inducible Factor-1**

**HRE: HIF response element**

**HRN: High resolution melting analysis**

**IBMX: 3-isobbutyl-1-methylxanthine**

**IL-1 $\beta$  : Interleukine 1 beta**

**IMG : Interruption médicale de la grossesse**

**LPC : Liquide périciliaire**

**MLPA : Multiplex ligation- dependant probe amplification**

**NBD : Domaine de liaison aux nucleotides**

**NF- $\kappa$ B: Nuclear factor kappa B**

**ORCC : Outwardrectifyingchloridechannel**

**Pi : Phosphate inorganique**

**RE : Réticulum endoplasmique**

**ROMK: Renal outer medullary K<sup>+</sup> channel**

**UPR: Unfolded protein response**

**USF2: Upstream stimulatory factor 2**

**1-EBIO: 1-ethyl-2-benzimidazolinone**

**4PBA: Sodium-4-phenylbutyrate**

## **Listes des figures :**

<b>Figure 01 : incidence de la mucoviscidose dans la monde selon OMS ;2004.....</b>	<b>7</b>
<b>Figure02 : localisation chromosomique du gène CFTR.....</b>	<b>7</b>
<b>Figure03 : sites d'initiation de la transcription.....</b>	<b>9</b>
<b>Figure 04 : régulation transcriptionnelle du gène CFTR en condition physiologique....</b>	<b>10</b>
<b>Figure 05 : régulation transcriptionnelle du gène CFTR lors d'un stress cellulaires.....</b>	<b>11</b>
<b>Figure 06 : description du gène CFTR ; du transcrit et de la protéine.....</b>	<b>12</b>
<b>Figure 07 : les différentes classes de mutation.....</b>	<b>15</b>
<b>Figure 08 : schéma des différents classes de mutation du gène CFTR et leur conséquences sur la fonction de la protéine dans la cellule.....</b>	<b>20</b>
<b>Figure 09 : contribution des gènes modification dans la variabilité des signes cliniques de la FK.....</b>	<b>20</b>
<b>Figure10 :schéma illustre simplement le principe de la thérapie génique qui intègre à l'organisme le gène non-muté de la protéine.....</b>	<b>23</b>
<b>Figure 11 : provenance et devenir potentiel des cellules souches embryonnaire.....</b>	<b>24</b>
<b>Figure12 : gel d' agarose des produits de la réaction de la PCR de l'exon 10du gène CFTR ARMS normal.....</b>	<b>48</b>

## **Liste des tableaux :**

<b>Tableau 01 : Mutation du gène CFTR les plus fréquents et leur distribution géographique.....</b>	<b>12</b>
<b>Tableau 02 : protocole opératoire du dosage du chlore dans la sueur.....</b>	<b>31</b>
<b>Tableau03 : protocole opératoire de la dernière étape du dosage du chlore dans la sueur.....</b>	<b>32</b>
<b>Tableau 04 : Amorces utilisées.....</b>	<b>37</b>
<b>Tableau 05 : concentration des réactifs de la PCR.....</b>	<b>39</b>
<b>Tableau 06 : composition du mix de la PCR.....</b>	<b>40</b>
<b>Tableau 07 : Répartition des patients selon le sexe.....</b>	<b>43</b>
<b>Tableau 08 : Répartition des patients selon l'âge au moment de la découverte de la maladie.....</b>	<b>43</b>
<b>Tableau 09 : Répartition des patients selon les wilayas.....</b>	<b>44</b>
<b>Tableau 10 : Répartition des patients selon les signes cliniques.....</b>	<b>45</b>
<b>Tableau 11 : Répartition des patients selon les types de mariage.....</b>	<b>45</b>
<b>Tableau 12 : Résultats du test de la sueur.....</b>	<b>46</b>
<b>Tableau 13 : Résultats du test de la sueur (sexe).....</b>	<b>46</b>
<b>Tableau 14 : Résultats des cas positifs selon les wilayas.....</b>	<b>47</b>
<b>Tableau 15 : Répartition des cas positifs selon la consanguinité.....</b>	<b>47</b>

## Résumé :

La mucoviscidose est la maladie génétique grave à transmission autosomique récessive la plus fréquente dans la population caucasienne. Cette pathologie est due au dysfonctionnement de la protéine CFTR (CysticFibrosisTransmembrane conductance Regulator), canal chlorure présent à la membrane apicale des cellules épithéliales. La déficience du canal CFTR, entraînent des perturbations hydro électrolytiques qui sont à l'origine de l'hyper viscosité des sécrétions muqueuses. La gravité de la maladie dépend de la ou des mutations du gène CFTR. La mise en place du test de la sueur est préconisée afin de réduire les retards de diagnostics et de permettre une intervention précoce pour la prise en charge respiratoire et nutritionnelle de la maladie. À travers ce travail, nous souhaitons évaluer les 7 années (2011-2018) de mise en œuvre du test de la sueur à Mostaganem et venons contribuer au diagnostic génotypique de la mucoviscidose. Cette étude a colligée 1113 patients originaires de 24 Wilaya, âgés de quelques jours à plus de 20 ans, la consanguinité a été retrouvée dans 31.18% des cas. Ce test a été motivé pour des signes respiratoires dans 58.22 % des cas, des signes intestinaux dans 18% des cas, retard de croissance /malnutrition dans 17.45% des cas. Les tests sudoraux ont été positifs dans 8% des cas, négatifs 84% des cas et intermédiaire dans 2% des patients. La mucoviscidose est une affection rare mais non exceptionnelle dans notre pays.

**Motsclés:** Fibrose kystique,  $\Delta F508$ , puce à ADN, inflammation, apoptose, analyse canonique de redondance.

## Abstract :

Cystic fibrosis is the most common autosomal recessive inherited genetic disorder in the European population. This pathology is due to the dysfunction of the CFTR protein (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), a chloride channel present at the apical membrane of epithelial cells. The deficiency of the CFTR channel, lead to hydroelectrolytic disturbances which are at the origin of the hyper viscosity of the mucous secretions. The severity of the disease depends on the mutation (s) of the CFTR gene. The implementation of the sweat test is recommended in order to reduce the delays in diagnosis and to allow an early intervention for the respiratory and nutritional management of the disease. Through this work, we wish to evaluate the 7 years (2011-2018) of implementation of the sweat test in Mostaganem and contribute to the genotypic diagnosis of cystic fibrosis. This study collected 1113 patients from 24 Wilaya, aged from a few days to more than 20 years, consanguinity was found in 31.18% of cases. This test was motivated for respiratory signs in 58.22% of cases, intestinal signs in 18% of cases, stunting / malnutrition in 17.45% of cases. Sweat tests were positive in 8% of cases, negative 84% of cases and intermediate in 2% of patients. Cystic fibrosis is a rare but not exceptional disease in our country.

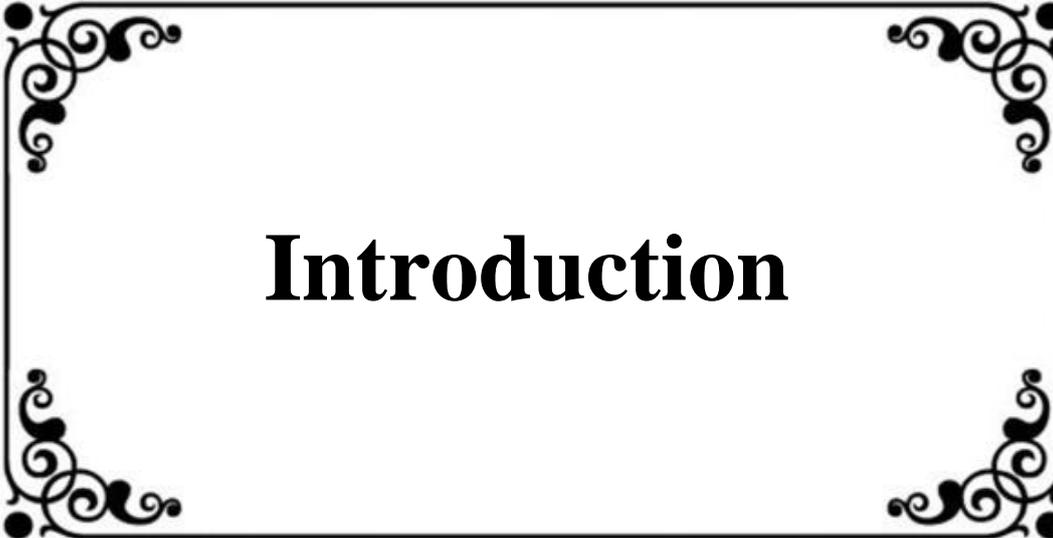
**Keywords:** Cystic fibrosis,  $\Delta$ F508, microarray, inflammation, apoptosis, canonical redundancy analysis.

## المخلص:

التليف الكيسي مرض وراثي مميت تنقله عوامل وراثية متنحية وهو أكثر الأمراض الوراثية انتشاراً عند الأفراد من أصل أوروبي. يرجع هذا المرض إلى خلل بروتين منظم توصيل غشاء التليف الكيسي وهو عبارة عن قناة كلوريد موجودة في الغشاء القمي للخلايا الظهارية. الخلل في قناة الكلوريد يسبب اضطرابات هيدروكهربائية وهي مصدر اللزوجة المفرطة للإفرازات المخاطية. تتوقف شدة المرض على طفرة أو عدة طفرات لمنظم توصيل غشاء التليف الكيسي. ينصح بتنفيذ اختبار العرق للحد من التأخر في التشخيص والسماح بالتدخل المبكر لدعم ومعالجة أمراض تنفسية وأمراض التغذية.

من خلال هذا العمل؛ نرغب في تقييم 7 سنوات (2011-2018) من خلال تطبيق اختبار العرق في مستغانم والمساهمة في التشخيص الجيني للتليف الكيسي. جمعت هذه الدراسة 1113 مريضاً من 24 ولاية؛ تتراوح أعمارهم ما بين بضعة أيام أكثر إلى من 20 سنة. تم العثور على صلة القرابة بنسبة 31,18 % من الحالات المدروسة بين الاختبار إن نسبة الأمراض التنفسية 58,22%؛ أمراض الأمعاء بنسبة 18% التقزم و سوء التغذية بنسبة 17,45 % من الحالات، كانت اختبارات العرق ايجابية بمعدل 8 بالمائة من الحالات؛ و كانت سلبية 84 بالمائة و متوسطة في 2 بالمائة من عدد المرضى. يعتبر التليف الكيسي مرض نادر لكنه غير استثنائي في بلدنا.

الكلمات المفتاحية: التليف الكيسي؛  $\Delta F508$ ؛ المصفوفات المجهرية؛ التهاب؛ موت الخلايا المبرمج؛ تحليل التكرار الكنسي



# Introduction

# Introduction

---

## **Introduction :**

La fibrose kystique (la mucoviscidose ou fibrose kystique (en anglais : cysticfibrosis, sous-entendu « du pancréas ») est une maladie génétique, affectant les épithéliums glandulaires de nombreux organes. C'est la maladie génétique létale à transmission autosomique récessive la plus fréquente dans les populations de type européen, alors qu'elle est très rare dans les populations africaines et asiatiques. Elle est liée à des mutations du gène CFTR sur le chromosome 7, entraînant une altération de la protéine CFTR (sigle pour cysticfibrosistransmembrane conductance regulator). Cette protéine est un canal ionique perméable au chlore, au thiocyanate dont la fonction est de réguler le transport du chlore à travers les membranes cellulaires. Son dysfonctionnement provoque une augmentation de la viscosité du mucus et son accumulation dans les voies respiratoires et digestives. La maladie touche de nombreux organes mais les atteintes respiratoires sont prédominantes et représentent l'essentiel de la morbidité. La forme clinique la plus fréquente associe troubles respiratoires, troubles digestifs et troubles de la croissance staturo-pondérale. D'évolution chronique et progressive, la maladie s'exprime souvent tôt dès la petite enfance même s'il existe des formes frustes de diagnostic tardif.

Le diagnostic biologique repose sur le test de la sueur confirmé par une identification des mutations génétiques. Le dépistage néonatal, généralisé en France depuis 2002 permet un diagnostic et une prise en charge précoce alors que le conseil génétique permet à un couple hétérozygote connu de ne pas avoir un autre enfant malade. Une trithérapie est en essai de phase III. Les progrès de la prise en charge ont permis d'améliorer la qualité et l'espérance de vie des patients ; ainsi en France, l'espérance de vie à la naissance est passée de sept ans en 1965 à 47 ans en 2005, et dépasse 50 ans depuis 2014.

Connue depuis les Moyens Âges, la maladie est décrite scientifiquement par le pédiatre suisse Fanconi en 1936. Elle est identifiée deux ans plus tard par Andersen comme une entité pathologique atteignant le pancréas d'où son nom historique de fibrose kystique du pancréas. Elle conserve ce nom en anglais : cysticfibrosis.

La mucoviscidose est la plus fréquente des maladies autosomiques récessives dans la population caucasienne. Elle est classiquement définie par l'association d'une bronchopathie obstructive chronique, d'une insuffisance pancréatique exocrine avec une augmentation de l'ion chlorure dans la sueur au-delà de 60 millimoles (mmol) par litre. La maladie est secondaire à des mutations du gène Cysticfibrosistransmembrane conductance regulator

## Introduction

---

(CFTR) à l'origine de la dysfonction de la protéine CFTR, dont la principale fonction reconnue à ce jour est d'être un canal perméable à l'ion chlorure (Cl<sup>-</sup>). Il en résulte un défaut du transport de Cl<sup>-</sup> à travers les épithéliums et une anomalie généralisée des sécrétions muqueuses. Au niveau de la glande sudoripare, cela se traduit par un syndrome de perte de sel. Cette anomalie est à la base du principal examen biologique permettant le diagnostic de cette maladie : le « test de la sueur »

L'incidence de la mucoviscidose varie selon l'origine géographique et ethnique. Elle est de l'ordre de 1/2000 à 1/3500 naissance en Europe et au nord de l'Amérique. Cette fréquence diminue dans les populations Méditerranéennes et principalement Maghrébines et elle est plus faible dans les populations noires (Africaines, Américaines) (1/20000) et Asiatiques (1/32400). Les critères permettant de faire le diagnostic de la mucoviscidose ont été clairement définis lors d'une conférence de consensus Américaine (*Rosenstein ; 1998*) et de recommandations internationales (*Boeck ; 2006*). Et le diagnostic est alors posé lorsque sont réunis : un signe clinique évocateur ou un cas dans la fratrie ou un test de dépistage néonatal positif et la démonstration d'une anomalie liée au dysfonctionnement de la protéine CFTR, un test de la sueur positif au moins à deux reprises ou la présence de deux mutations du gène CFTR ou une différence de potentiel (DDP) nasale positive. En Algérie, pays où l'incidence de cette maladie n'est pas connue car il n'existe pas de registre pour la mucoviscidose et où l'on ne pratique pas le dépistage néonatal de la mucoviscidose, la mise en place du test de la sueur est désormais préconisée afin de réduire les retards de diagnostics et de permettre une intervention précoce pour la prise en charge respiratoire et nutritionnelle de la maladie. Devant l'impact du diagnostic de CF, un test de la sueur effectué correctement est d'une importance capitale surtout lorsqu'il s'agit d'une forme atypique. Il est donc absolument indispensable d'avoir une méthodologie fiable et standardisée pour la réalisation de ce test. À travers ce travail, nous souhaitons évaluer les 7 années (2011-2018) de mise en œuvre du test de la sueur à Constantine et venons contribuer au diagnostic génotypique de la mucoviscidose afin d'enrichir davantage les quelques rares études existantes concernant la population Algérienne. La mise en place de ces tests sera suivie sans doute par la création du registre Algérien de la CF.

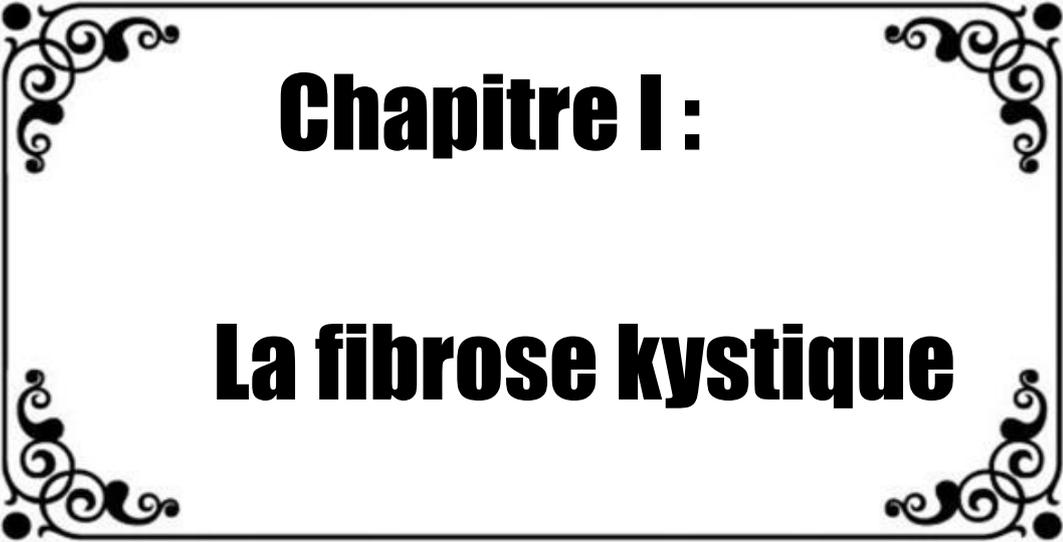
Pour cela les objectifs de notre travail étaient de :

- Déterminer les taux de chlorures sudoraux chez des patients présentant une CF probable.

## Introduction

---

- Faire le point sur les résultats des tests de la sueur réalisés durant la période 2011-2018.
- Redémarrer la recherche de mutations du gène CFTR par une recherche de la mutation la plus fréquente du gène CFTR, la F508del chez les patients présentant un test de la sueur positif, mutation souvent recherchée et en première intention par PCR ARMS.



**Chapitre I :**

**La fibrose kystique**

## I. La fibrose Kystique :

La mucoviscidose ou « fibrose kystique du pancréas », est classiquement considérée comme la plus fréquente des maladies héréditaires sévères dans les populations d'origine caucasienne. Elle est transmise selon le mode autosomique récessif. Il s'agit d'une maladie chronique, mono génique et souvent létale, due à une altération du gène CFTR qui code pour la protéine CFTR, dont la fonction la plus décrite est la régulation des flux hydro électrolytiques transmembranaires responsables de la qualité des sécrétions exocrines. L'absence ou la non fonctionnalité de cette protéine provoque un épaissement et une stase des sécrétions hydro électrolytiques épithéliales au niveau pulmonaire, pancréatique mais aussi au niveau du tractus du tube digestif et de l'appareil génital. (*Angelot, 2005*)

Selon la sévérité de la maladie, elle peut être détectée à la naissance, pendant l'enfance ou à l'âge adulte. A ce jour, plus de 1700 mutations ont été identifiées dans le gène CFTR, dont la grande majorité sont très rares. La mutation la plus fréquente est la F508del, rencontrée chez près de 80 % des malades .La fibrose kystique (FK) est une maladie héréditaire grave et mortelle. La synthèse des connaissances, réalisée dans le cadre du mandat, recense de nombreux enjeux en lien avec cette maladie, son dépistage, son diagnostic et sa prise en charge, et décrit les programmes de dépistage néonatal de la FK implantés dans plusieurs pays et provinces. (*Romey et al.2006.*)

Elle est plus fréquente dans les populations du nord de l'Europe et beaucoup plus rare dans les populations d'Asie et d'Afrique noire. La prévalence en Afrique du Nord n'est pas précisément chiffrée, bien que quelques études de détections de mutations du gène CFTR ont été réalisées sur des effectifs réduits en Algérie en Tunisie et au Maroc. (*Ratbi et al 2008* ).

### I.1.Histoire de fibrose kystique :

Ce n'est qu'en 1936, que cette pathologie fut nommée pour la 1ère fois « fibrose kystique du pancréas et bronchectasie » dans une thèse dirigée par Guido Fanconi. En 1938, la maladie fut réellement décrite comme une entité pathologique distincte par la pédiatre américaine Dorothy Andersen, qui donna une description des caractéristiques cliniques et histologiques de la maladie, notamment l'obstruction intestinale néonatale, les complications respiratoires et digestives et les lésions histologiques spécifiques du pancréas .Le terme de mucoviscidosis, créé à partir des termes « mucus » et « visqueux », fut utilisé pour la première fois en 1943 par le docteur Farber, qui a émis l'hypothèse que la maladie est due à une diffusion

généralisée de mucus visqueux et voulu corriger la dénomination employée par Dorothy Andersen, centrée sur le pancréas. (*Davis et Cooke, 2006*).

## **I.2.Epidémiologie :**

Bien que rare, la mucoviscidose est la plus fréquente des maladies génétiques grave. Elle apparait dès l'âge pédiatrique. Sa prévalence est variable en fonction de la localisation géographique des populations et de la fréquence des mutations responsables de la maladie. La migration des populations et le mariage consanguin sont aussi des facteurs qui influent la répartition de cette pathologie .

La mucoviscidose est plus fréquente dans les populations du nord de l'Europe et un peu moins dans les pays du sud du continent. Dans certains pays comme l'Irlande et la Grande-Bretagne un nouveau-né sur 1500 à 2500 naissances est atteint. Par contre dans d'autres pays tels que l'Espagne et la Grèce, la fréquence est de 1/3500 naissances. Alors qu'en France et en Italie, un gradient décroissant nord-sud est notable avec une incidence nationale de 1/2500. Néanmoins, dans les pays Scandinaves et l'Europe de l'Est, la fréquence varie entre 1/3500 et 1/7500 avec une incidence très faible en Finlande.

Aux Etats-Unis et au Canada, la fréquence de la mucoviscidose est proche de 1/3700. Cette fréquence est expliquée par la migration des populations caucasiennes dans ces pays. En Amérique du Sud, dans des pays comme l'Uruguay et l'Argentine où la population est dans 90% des cas caucasoïde, sa fréquence est de 1/3900. Alors qu'elle est réduite jusqu'à 1/8500 au Mexique ; en Colombie et au Chili ; ou la population est composée de 57% à 85% de métis (caucasoïde et amérindien).(*Bobadilla et al;2002*).

Au Moyen-Orient, l'incidence de la mucoviscidose varie en fonction des groupes ethniques et du taux de mariages consanguins . Des études effectuées dans ces pays ont montré que la fréquence maximale a été observée en Jordanie (1/2500) et la minimale aux Emirats Arabes (1/16000). A noter qu'en Turquie l'incidence est de 1/10000 ; La maladie est beaucoup plus rare dans les populations d'Asie et d'Afrique noire. La prévalence en Afrique du Nord n'est pas précisément chiffrée, bien que quelques études de détections de mutations du gène CFTR ont été réalisées sur des effectifs réduits en Algérie en Tunisie et au Maroc .(*Ratbi et al, 2008* ).

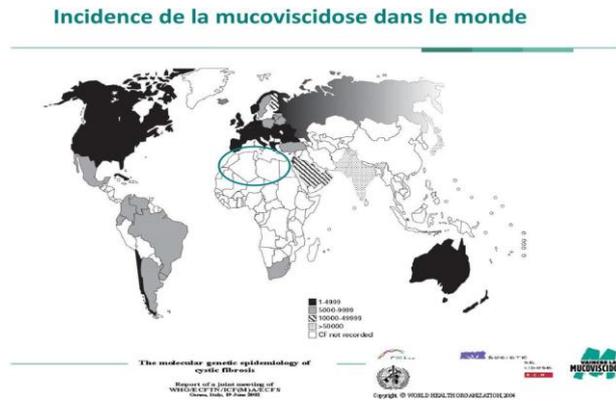


Figure1 : incidence de la mucoviscidose dans le monde selon OMS 2004

### I.3.CFTR :

#### I. 3.1. Localisation de CFTR :

Ce n'est qu'en 1989 que le gène CFTR a été identifié pour la première fois par des techniques de clonage positionnel. Le gène a été localisé par rapport au marqueur génétique D7S15 sur le bras long du chromosome 7 au locus 7q31.2 (figure 2 : localisation chromosomique du gène CFTR ). Plus précisément le gène CFTR se situe entre les deux gènes ASZI (ankyrinrepeat, SAM ans basic leucine zipper Domaincontaining 1) et CTTNBP2 (cortactin binding protein 2). (*Neri et al ; (2006).*)

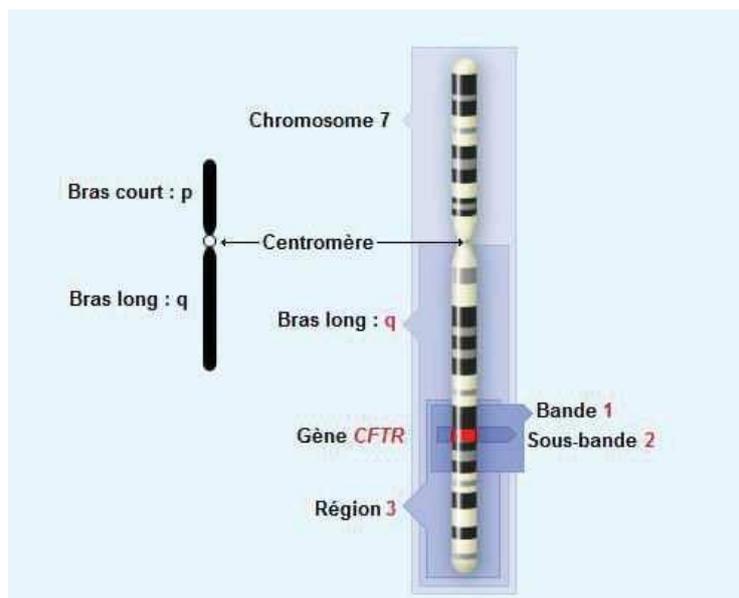


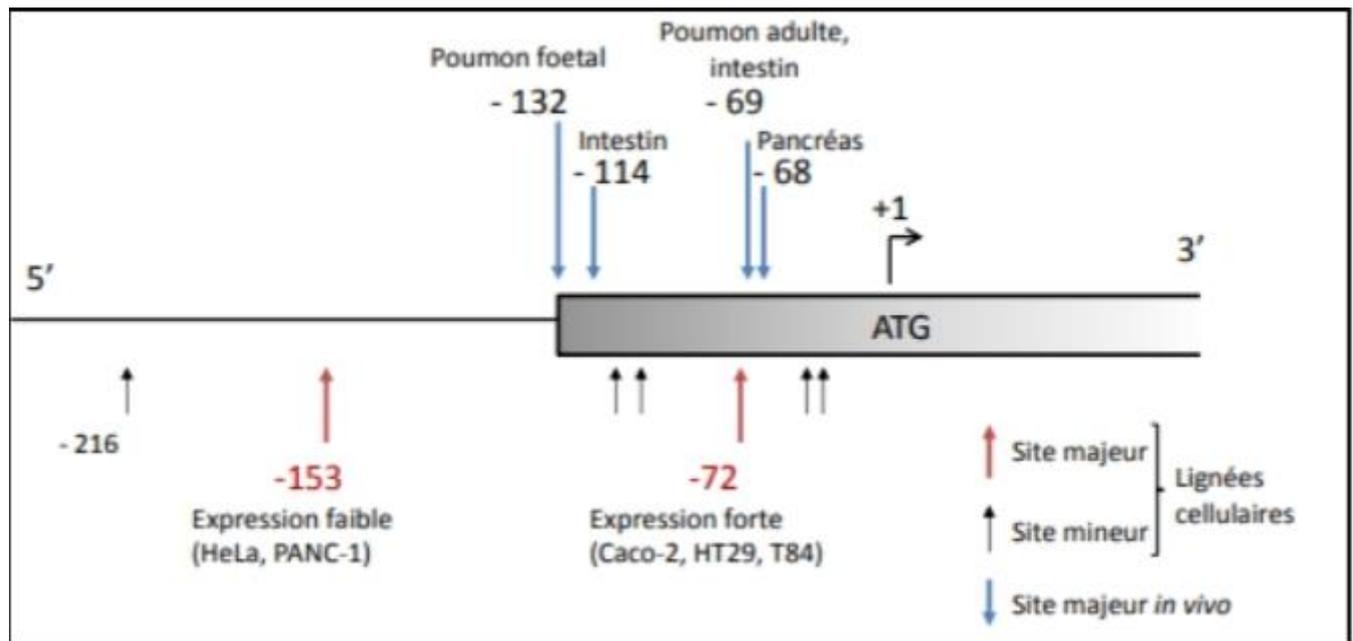
Figure 2 : localisation chromosomique du gène CFTR. (*Moisan ;2015).*)

### I.3.2. La structure génique CFTR :

Le gène CFTR, localisé dans la région q31.2 du bras long du chromosome 7, est codé par une séquence génomique de 250 000 paires de bases (Riordan, et al. 1989). Il comprend 27 exons, correspondant à un transcript mature de 6,5 kilo bases (kb). Chez les mammifères, le nombre moyen d'exon par gène est de 7 et la longueur moyenne des transcripts est de 2,2 kb Ceci présume d'une haute complexité de la régulation spatio-temporelle de son transcript. En effet, plusieurs auteurs soulignent la présence d'éléments régulateurs dans ses parties introniques et leurs rôles restent encore indéterminés (*Smith, et al. 1996; Hill, et al. 2006; Suszko et al. 2009*). De la même façon, plusieurs formes épissées ont été observées, leurs fonctions n'ont pas encore été démontrées (*Broackes-Carter, Williams et al. 2003*). Toutefois, le niveau de synthèse du CFTR est relativement bas dans la plupart des types cellulaires, mais suffisant pour assurer une fonction active de la protéine.

### I.3.3. Régulation de la transcription du gène :

La régulation du gène CFTR est extrêmement complexe. En effet, le promoteur CFTR est régulièrement associé aux promoteurs des gènes de ménage. Le promoteur CFTR est dépourvu d'une boîte TATA et présente de nombreuses régions riche en GC, de multiples sites d'initiation de la transcription (TSS) dont la plupart sont tissu-spécifiques et peuvent varier en fonction du stade de développement. Le TSS +1 qui sert de référence est celui décrit par Riordan et al. en 1989. Il se situe à -132pb de l'ATG. Dans le poumon humain, un changement de site d'initiation s'opère au cours du développement : le site majoritaire dans le poumon fœtal est positionné au nucléotide -132 Pb, tandis que le site utilisé dans le poumon adulte est en position -69 Pb (Figure 3 :sites d'initiation de la transcription)(Becdeliévre ; 2011). Ce changement de site d'initiation de la transcription participe à la régulation de la transcription et peut expliquer la diminution d'expression de CFTR dans le poumon adulte par rapport au poumon fœtal. En plus de cette spécificité, Le promoteur CFTR comporte de nombreux sites potentiels de fixation de facteurs de transcription tel que les protéines AP-1, AP2, SP1 (Specificity Protein 1).

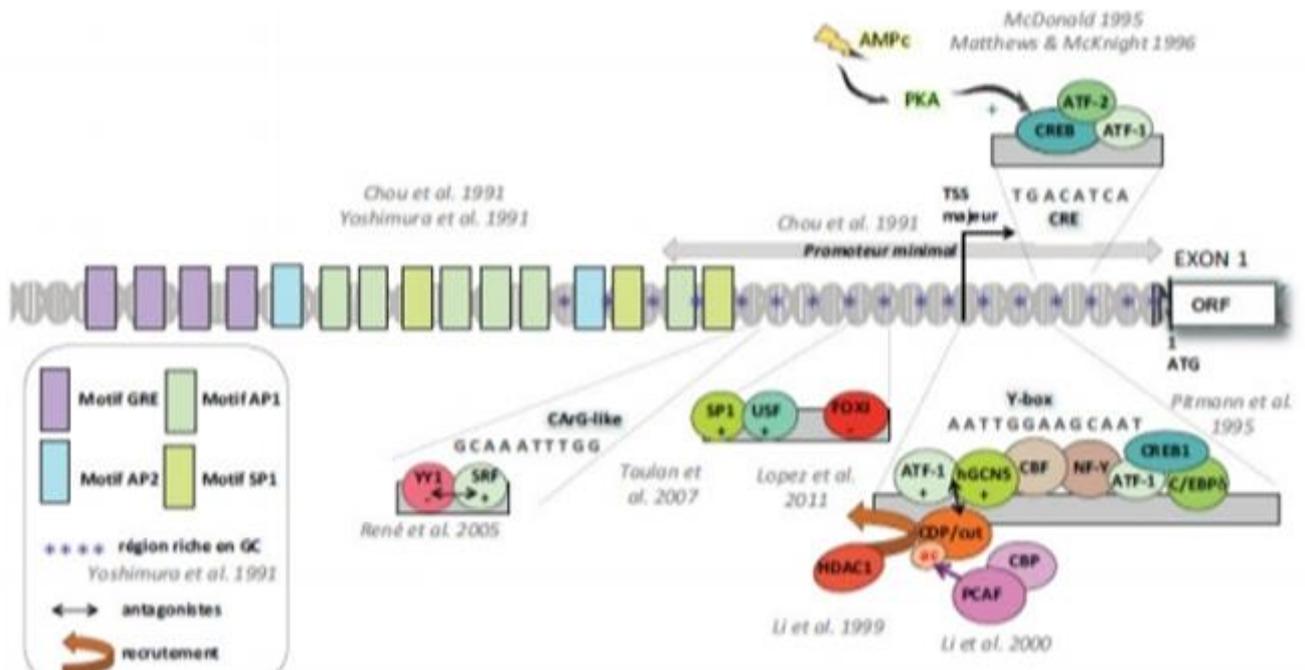


**Figure 03 : site d'initiation de la transcription (Becdelière ;2011)**

Des études fonctionnelles réalisées ont mis en évidence au sein du promoteur du gène CFTR, une séquence inversée CCAAT ou boîte Y. Il s'agit d'une région importante pour la transcription. Elle permet la fixation des facteurs C/EBP (CCAAT Enhancer Binding Protein), CREB (cAMPResponseElément Binding protein) et ATF (Activating Transcription Factor). A l'inverse, au niveau de ce motif, la fixation de la protéine CDP/cut (CCAAT DisplacementProteincuthomolog) inhibe la transcription de CFTR en empêchant la fixation du facteur ATF- 1 et de l'histone acétyltransférase humaine hGCN5 et le complexe répresseur CDP/cut qui recrute l'histonedéacétylase HDAC1 qui va modifier la structure de la chromatine. (Becdelière ;2011)

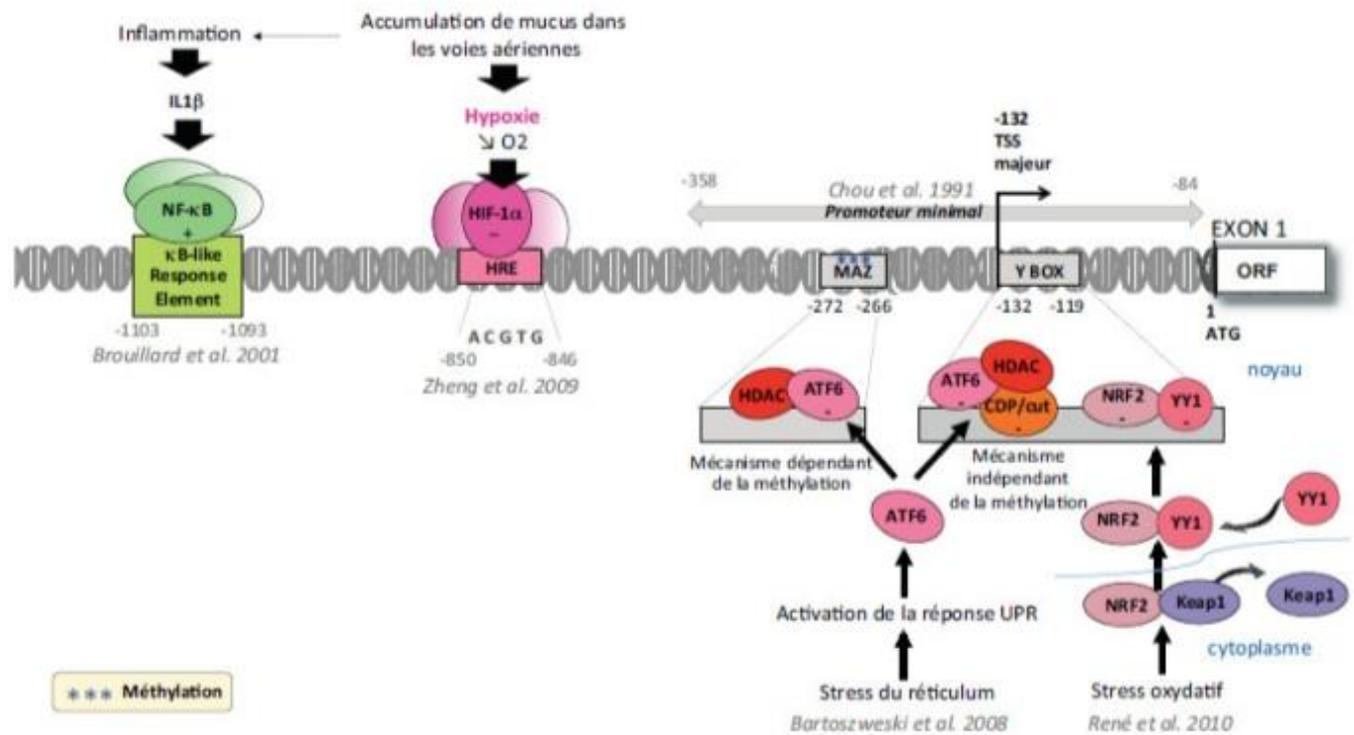
Tout comme l'ouverture de son canal, le gène CFTR est régulé par l'AMPc. Son promoteur comporte un motif CRE (cAMPRéponseElément) où se fixent les protéines CREB et ATF. La phosphorylation active le facteur CREB par protéine kinase PKA. L'inhibition de PKA réprime la transcription du gène CFTR. Un polymorphisme au sein du promoteur minimal a permis d'identifier un motif CARG- like. Ce site peut être reconnu par deux facteurs antagonistes : SRF qui active la transcription et le facteur YY1 qui est un fort répresseur. L'antagonisme fonctionnel de ces deux FTs résulte en une augmentation de l'expression du gène CFTR. .

L'étude d'un variant identifié chez un patient atteint d'ABCD a permis de mettre en évidence la fixation de facteurs répresseurs FOXI, 33 Pb en amont du TSS majeur, spécifiquement dans les cellules issues des canaux déférents. L'ensemble des facteurs est représenté sur la figure 4.. (Bonini ; 2015)



**Figure 04 : régulation transcriptionnelle des gènes CFTR en condition physiologique. (Bonini ;2015).**

Lors d'une inflammation, la protéine IL-1 $\beta$  (Interleukine 1 beta) régule le taux de transcrits CFTR dans les cellules T84 de manière dose-dépendante par l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor Kappa B) qui se fixe sur le motif  $\kappa$ B-like en position - 1040 à -1030. Cette fixation a un effet positif sur l'activation transcriptionnelle de CFTR. En cas d'accumulation de protéines mal conformées dans le réticulum endoplasmique, une réponse adaptative nommée UPR (UnfoldedProteinResponse) est induite afin de protéger la cellule contre ce stress. Cette réponse réprime l'activité promotrice du gène CFTR à travers la fixation du facteur de transcription ATF6. De la même manière, il a été montré qu'en condition d'hypoxie, la cellule répond par la fixation du facteur HIF-1 (HypoxiaInducible Factor-1). HIF-1 se fixe sur le site HRE (HIF Responsive Element) présent en position -718pb et réprime la transcription du gène CFTR . L'ensemble des facteurs se fixant sur ces motifs est représenté sur la figure 5.(Bonini ;2015).



**Figure 05 : régulation transcriptionnelle des gènes CFTR lors d'un stress cellulaire (Bonini ;2015)**

### I.3.4. Distribution géographique des mutations du gène CFTR :

La distribution des mutations du gène CFTR varie d'une manière importante d'une population à l'autre. Seulement cinq mutations ont une fréquence qui dépasse le seuil de 1 : % ΔF508 (66,8%) est la plus fréquente à travers le monde. Elle est trouvée dans tous les pays étudiés. Dans la population maghrébine, la fréquence de la ΔF508 ne dépasse pas 30% en Algérie, alors qu'elle est de 50.8% en Tunisie. Les fréquences moyennes des mutations G542X ; N 1303K; G551D et W1282X dans le monde sont respectivement : 2.6% ; 1.6%, 1.5% et 1%, elles ne sont retrouvées que dans certaines populations. Par exemple la G542X est absente en Biélorussie, Estonie, Roumanie et Ukraine, cependant elle est très fréquente dans les pays du pourtour du bassin méditerranéen. De même, la mutation N1303K est fréquemment retrouvée avec des valeurs maximales dans les pays du Maghreb, alors qu'elle est absente en Finlande, sud et dans d'autres pays. A côté de ces cinq mutations CF, 21 mutations sont retrouvées avec des fréquences comprises entre 0,9% et 0,1 % (Tableau1 : mutation du gène CFTR les plus fréquentes et leur distribution géographique (Yahia ; 2007)).

**Tableau 01 : Mutation du gène CFTR les plus fréquentes et leur distribution géographique (Yahia ; 2007) .**

Mutations	Fréquence%	Fréquence particulière dans certaines régions
ΔF508	66,8	Danemark (87,2%), Finistère (82%), Algérie (sujets suivis en france)(26,3%), Juifs ashkénazes (30%)
G542X	2,6	Juifs ashkénazes (12%), Espagne (8%), Méditerranée (6,1%)
N1303K	1,6	Tunisie (17%), Turquie et Bulgarie (6%)
G551D	1,5	Europe centrale et Celtes (6,9%)
W1282X	1,01	Juifs ashkénazes (48%)
1717-1G→T	0,83	
R553X	0,75	
711+1G→T	0,7	Quebec, Tunisie (9%)
R1162X	0,5	Italie du Nord, Algérie ( 9,8%)
621+1G→T	0,5	Pays de Galles (5,2%), Quebec (5%)
2183AA→G	0,36	Italie et Grèce (3,2%)
G85E	0,3	
R117H	0,3	
Y122X	0,3	Île de la Réunion (27%)
R347P	0,2	
Δ1507	0,2	
3849+10kb C→T	0,2	Juifs ashkénazes (4%)
394delTT	0,1	Scandinavie (28%)
1078delT	0,1	Finistère (4,9%)
R334W	0,1	Crète (11,5%)
A455E	0,1	
S549N	0,1	
R560T	0,1	
1898+1G→T	0,1	
2798+5G→A	0,1	
3659delC	0,1	

### I.3. 5. La protéine CFTR :

Le produit du gène CFTR est une protéine transmembranaire de 1480 acides aminés, dont la structure est présentée à la figure 6 : description du gène CFTR ; du transcrit et de la protéine). De forme symétrique, cette protéine possède cinq domaines : deux domaines de liaison aux nucléotides NBD (Nucléotide Binding Domain), deux domaines transmembranaires TMD (Transmembranaire Domain) et un domaine de Régulation R (Regulatory). Le domaine R possède de nombreux sites de phosphorylation contrôlant l'activité du canal (*Chappe, et al. 2005*).

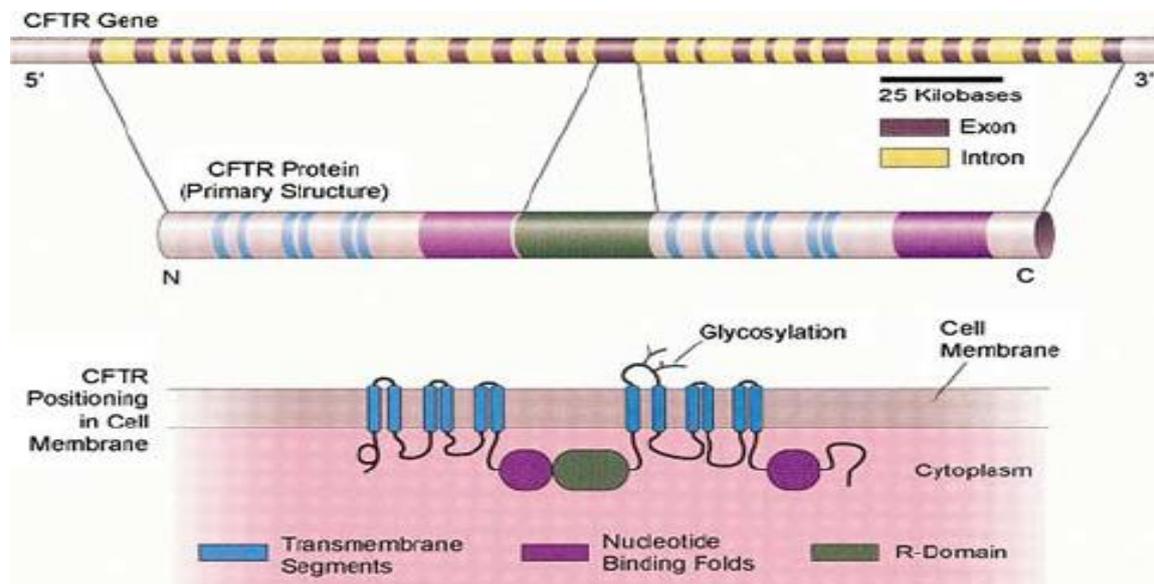


Figure 6 : Description du gène CFTR ; du transcrit et de la protéine. (*Prince .1994*)

Comme toutes les protéines membranaires, le CFTR est synthétisé dans le réticulum endoplasmique (RE), sous la forme de précurseur, que des molécules chaperonnes replient pour lui donner une structure 3D fonctionnelle (forme A) (*Gething and Sambrook 1992*). Une première étape de maturation permet la glycosylation du précurseur. Toujours immature, cette protéine glycosylée (forme B) est exportée dans l'appareil de Golgi et subit une seconde étape des modifications post-traductionnelles, où les mannoses des chaînes glycosidiques sont remplacés par des glucides plus complexes (forme C). 70 % du CFTR produit restent séquestrés dans le RE en raison d'un défaut de maturation et sont alors rapidement dégradés par le protéosome (*Lukacs, et al. 1994; Ward, Omura et al. 1995; Ellgaard and Helenius 2001; Gelman, Kannegaard et al. 2002*). Seul 30 % de CFTR synthétisés passent avec succès le contrôle de la qualité de la maturation du RE (*Aridor, et al 1995;*

*Schekman and Orci 1996; Wang, Matteson et al. 2004*) et sont adressés à la membrane plasmique pour y être intégrés comme transporteur ionique (*Matteson et al. 2004*)

### **I.3.6. Fonction de protéine CFTR :**

Les canaux Cl<sup>-</sup> peuvent être divisés en trois grandes classes : (1) les récepteurs canaux, activés par des ligands comme le GABA (Gamma- AminoButyric Acid), (2) les canaux CLC (Chloride Channel), et (3) le canal CFTR. Ceux-ci sont aussi différents dans leur structure protéique que dans leur fonction et sont connus pour jouer un rôle important dans de nombreux processus physiologiques. Au-delà du transport de chlore, ils sont impliqués dans la régulation du potentiel de membrane, du volume et du pH intracellulaire, dans le transport transépithélial, ainsi que dans la dégradation des protéines et possiblement dans la croissance cellulaire (*Suzuki, et al. 2006*). De plus, les impacts physiologiques importants observés dans des maladies où sont impliqués les canaux Cl<sup>-</sup>, comme la fibrose kystique et la myotonie de Becker, montrent l'importance fonctionnelle de ces canaux pour une bonne homéostasie cellulaire.

#### **I.3.6.1. CFTR, transporteur de chlore, d'anion et de molécules organiques :**

Les caractéristiques du canal CFTR ont été largement étudiées et ont permis de détailler sa topologie (*Rosenberg, Callaghan et al. 2005*), sa composition en domaine, son système d'activation à AMPc (adénosinemono phosphate cyclique) (*Cheng, Rich et al. 1991*), ses propriétés biophysiques (*Lee, et al. 1999; Kunzelmann, et al. 2001*); ainsi que sa perméabilité (*Tabcharani, et al. 1993, Linzdel et al. 1997*).

#### **I.3.6.2. CFTR, régulateur de canaux ioniques :**

Il a été démontré que le canal chlore ORCC (OutwardlyRectifying Chlorure Channel) ne fonctionnait qu'en présence du canal CFTR et que ce dernier assure une activité maximale au canal ORCC (*Gabriel, et al. 1993; Schwiebert, et al. 1994; Schwiebert, et al. 1998*). Le CFTR intervient également dans la régulation d'activité du canal ENaC (Epithelial amiloride-sensitive sodium Channel) en exerçant un contrôle négatif sur lui (*Boucher, et al. 1991; Mall, et al. 1998; Kunzelmann, et al. 2001; Konstas, et al. 2003*). Néanmoins, l'interaction entre les deux canaux est encore mal comprise et nécessite plus d'investigations. D'autres canaux semblent également sous l'influence du CFTR, comme les canaux potassiques (*Loussouarn, et al. 1996*) et les aquaporines (*Schreiber, et al. 1997*).

**I.3.6.4. CFTR, alias ABCC7, membre de la famille des ABC :**

La famille des ABC (ATP Binding Cassette) est une famille de 48 transporteurs membranaires d'une grande variété de substrats (acides aminés, lipides, ions, sucres, drogues). Cette famille se caractérise par la présence de nombreux domaines NBD au sein de leurs protéines (Holland and Holland 2005). Bien que peu d'entre elles aient été analysées, elles sont considérées comme des transporteurs de molécules contre un gradient de concentration stimulés par l'ATP (adénosine triphosphate). Plusieurs transporteurs ABC sont impliqués dans des pathologies humaines : la fibrose kystique, l'adrénoleucodystrophie, la maladie de Tangier, le syndrome de Dubin-Johnson. Cela suggère que cette famille de transporteurs, dont est membre le CFTR, occupe une place centrale dans la physiologie cellulaire normale. (Holland and Holland 2005).

**I.4.1. Les mutations du gène CFTR :**

Le défaut majeur qui engendre la fibrose kystique est un facteur génétique. Actuellement, plus de 1600 mutations du gène CFTR sont référencées et n'ont pas la même fréquence d'apparition. Environ 50 d'entre elles sont communément rencontrées chez les caucasiens (Estivill, et al. 1997),

tandis que d'autres sont extrêmement rares. De plus, ces mutations sont très dépendantes de groupes ethniques. Par exemple, la mutation non-sens

W1282X est surtout présente chez les Juifs Ashkénazes. Anciennement regroupées en six classes de mutations, elles le sont désormais en cinq groupes définies par l'impact de l'anomalie génétique sur la protéine (Welsh and Smith 1993; Haardt, et al. 1999).

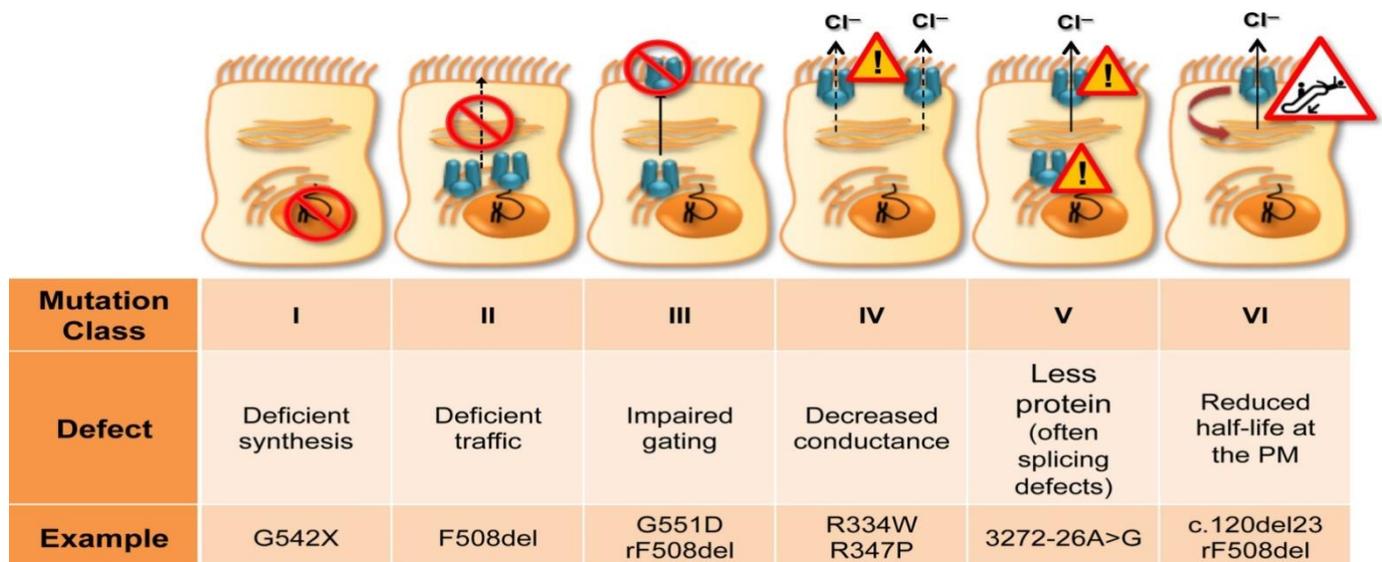


Figure7 : les différentes classes de mutation. (Carpentier).

### **I.4.1.1. Origines et répartitions mondiales des mutations les plus fréquentes :**

Plusieurs mutations du gène CFTR ont été identifiées à travers le monde. Leur existence aussi ancienne que la mutation p.Phe508del a permis leur diffusion dans diverses populations. Trois mutations appartiennent à cette catégorie : la p.Gly542X, p.Asn1303Lys et p.Gly551Asp dont les deux premières appartiennent aux populations de la méditerranée et la troisième est propre de la population Celtiques.

### **I.4.1.2. Mutation c.1521\_1523delCTT (p.Phe508del) :**

Sur toutes les mutations décrites, la mutation principale, généralement appelée la mutation F508del et c.1521\_1523delCTT, p.Phe508del selon la nomenclature HGVS. Cette mutation décrite simultanément que la découverte du gène en 1989, consiste en une délétion de trois nucléotides au niveau du dixième exon du gène, aboutissant à l'élimination d'un acide aminé, la phénylalanine (Phe), en position 508. C'est une mutation qui perturbe la maturation et le trafic intracellulaire de la protéine CFTR et est plutôt associée à un phénotype sévère. L'acide aminé Phe508 est impliqué dans des interactions hydrophobes critiques pour assurer un repliement correct et une bonne structuration tridimensionnelle de la protéine, avant la structuration des sites de liaison à l'ATP. En conséquence, la protéine CFTR portant la délétion est incapable d'acquérir sa forme totalement glycosylée et sera repérée par le système de contrôle de qualité du Réticulum endoplasmique (RE) où elle sera retenue puis dégradée. Ainsi, la protéine p.Phe508del est absente au niveau de la membrane des cellules épithéliales.

### **I.4.1.3. Mutations induisant un épissage alternatif :**

Les altérations de l'épissage jouent un rôle majeur en pathologie humaine. D'un point de vue mécanistique les différents types d'épissage alternatif résultent d'un problème d'identification de l'exon par le splicéosome. Le fait de garder ou non un exon dépend de la reconnaissance ou l'utilisation du site d'épissage. La faiblesse de ces sites est la cause principale de la réduction de l'affinité envers les splicéosome. Ainsi des mutations pouvant se produire dans un site d'épissage ou un élément exonique peuvent induire une altération de ces sites et donc de l'épissage alternatif. Par la suite, l'allèle affecté perd sa fonction ce qui peut modifier la structure de la protéine et donc la gravité de la maladie. Approximativement, 35 % de l'épissage alternatif dans les cellules des mammifères conduit à la formation des ARNm contenant un

codon stop prématuré qui peuvent être efficacement dégradés par le NMD . De même, les épissages alternatifs résultant des mutations qui ne conduisent pas à un décalage du cadre de lecture provoqueront la formation d'un ARNm tronqué, et donc la formation d'une protéine incomplète qui pourrait être dégradée lors de la maturation au niveau du RE ou avoir une altération de sa fonction. (**Wang and Cooper ; 2007**) .

#### **I .4.1.4. Différentes classes de mutations :**

Plus de 1700 mutations réparties tout au long du gène CFTR. La majorité sont des mutations dites ponctuelles. Parmi les différentes mutations recensées du gène CFTR, 45 % sont des mutations faux-sens, 18 % de mutations non-sens, 23 % des insertions-délétions induisant un déphasage du cadre de lecture et 14 % des mutations des sites d'épissage.

##### **Mutations de classe I :**

Cette catégorie regroupe les mutations altérant la production de la protéine. Il s'agit des mutations non-sens, des insertions/délétions et des mutations d'épissage entraîne la synthèse d'un ARNm tronqué instable. Il en résulte la synthèse d'une protéine tronquée non fonctionnelle et rapidement dégradée. Sur le plan fonctionnel, ces mutants conduisant à une perte de la conductance au Cl<sup>-</sup> du canal CFTR dans les épithéliums atteints. Les mutations G542X et W1282X, appartiennent à cette classe. (*Angelot ; 2005*).

##### **a) Mutations de classe II :**

Cette classe inclue les mutations qui affectent la maturation de la protéine CFTR, provoquant sa dégradation prématurée. Ces mutations peuvent conduire à l'absence totale ou une réduction de la quantité de la protéine au niveau apicale. C'est le cas de la mutation  $\Delta F508$  où les protéines mal repliées sont retenues dans le RE puis sont dégradées dans le cytoplasme par le système protéasome. Dans ce cas, très peu de protéines fonctionnelles arrivent à la membrane plasmique. (*Angelot ; 2005*).

##### **b) Mutations de classe III : Défaut d'activation du canal.**

Ces mutations affectent la régulation du canal chlorure. Il s'agit le plus souvent de mutations faux sens situées dans les domaines de liaison à l'ATP (domaines NBD1 et NBD2), entraînant une diminution de la sensibilité de la cellule à l'ATP, ce qui traduit par une absence de signal d'ouverture. Dans cette classe, la mutation G551D est située dans le domaine NBD.

Elle interfère aussi avec l'hydrolyse de l'ATP ainsi qu'avec la phosphorylation du domaine R. (*Angelot ; 2005*).

**c) Mutations de classe IV :**

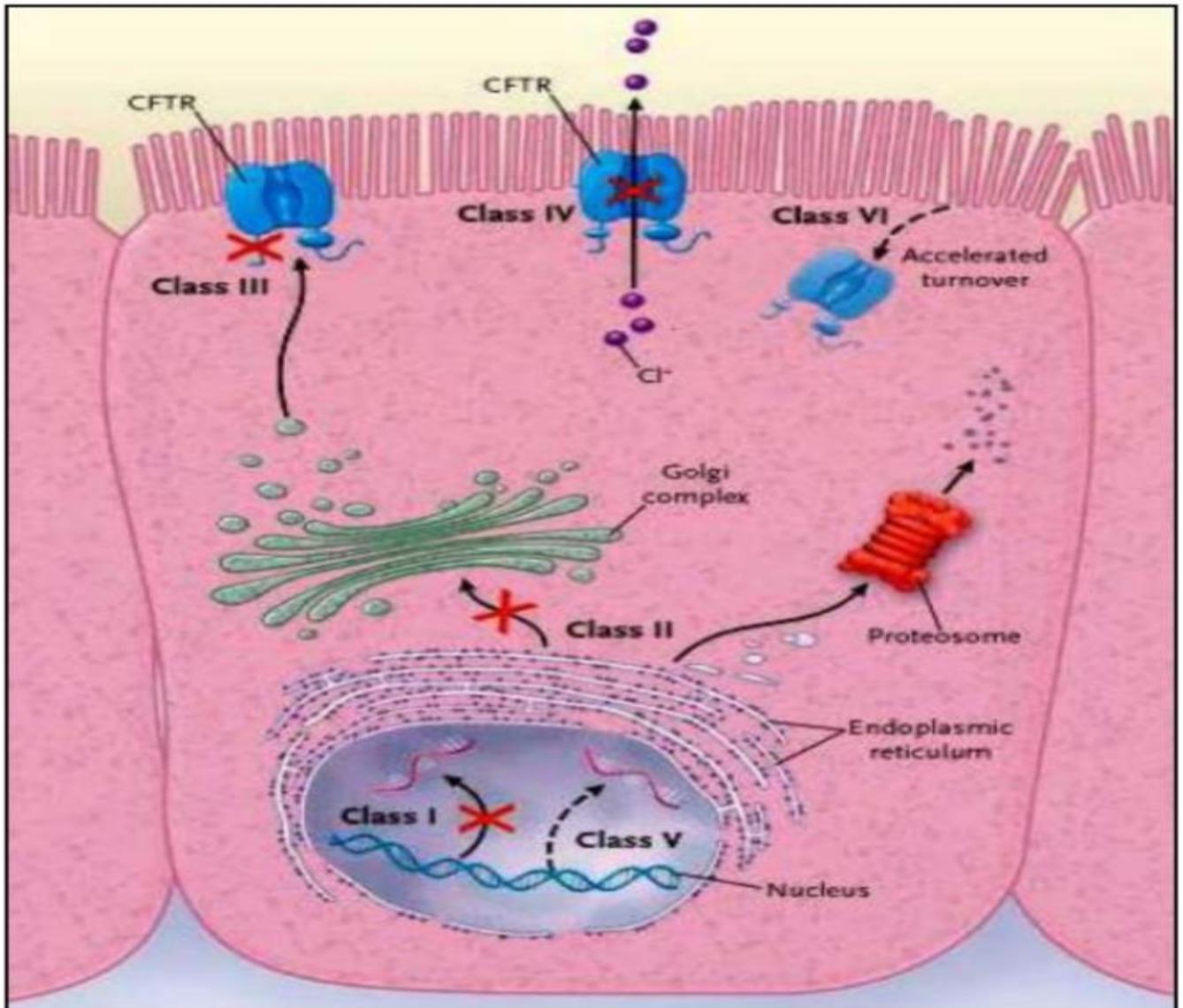
Les mutants de cette classe altèrent la conductance du canal CFTR et sa sélectivité ionique. Il s'agit le plus souvent de mutations faux-sens situées dans des régions qui forment le pore, ce qui provoque une diminution du flux des ions et un défaut de sélectivité. Ces mutations produisent une protéine correctement positionnée et ayant une activité canal  $\text{Cl}^-$  AMPc dépendante. Les caractéristiques de ces canaux sont cependant différentes de celles du canal CFTR sauvage. C'est le cas de la mutation R117H. (*Angelot ; 2005*).

**d) Mutations de classe V :**

Cette classe comprend les mutations altérant la stabilité de l'ARNm du gène CFTR. Ce sont les mutations du promoteur qui diminuent la transcription du gène CFTR et des mutations d'épissage qui permettent de produire à la fois un transcrit sauvage et aberrant. Ces mutations produisent une protéine CFTR normale mais impactent le taux de la stabilité des transcrits. La mutation A455E est l'exemple de cette classe. (*Angelot ; 2005*).

**e) Mutations de classe VI : Défaut de stabilité de la protéine mature :**

Les mutations de classe VI altérant la stabilité de la protéine mature. Elles sont issues le plus souvent d'une délétion de la partie C-terminale de la protéine terminale. Les mutants de cette classe permettent la synthèse de protéines fonctionnelles mais instable au niveau membranaire et diminuent les propriétés de régulation des autres canaux. C'est le cas de la mutation Q1412X. (*Angelot ; 2005*).



**Figure 8 :** schéma des différentes classes de mutation du gène CFTR et leurs conséquences sur la fonction de la protéine dans la cellule (*Angelot ; 2005*)

#### **I.4.2. La mutation $\Delta F508$ :**

La délétion d'un codon provoquant la perte d'une phénylalanine dans la protéine CFTR en position 508 est l'anomalie génétique la plus fréquente dans la population caucasienne (70 % des cas) et suite à une vague d'immigration venant d'Europe, elle est devenue prépondérante en Amérique du Nord et en Australie. Cette mutation, communément désignée  $\Delta F508$ , empêche une maturation efficace du précurseur en raison d'un défaut de repliement de la protéine CFTR (mutation de classe II). Parce que cette mutation se situe dans le domaine NBD1, les chercheurs ont longtemps émis l'hypothèse que le repliement local inadéquat du domaine NBD1 entraînait une mauvaise structure 3D de la protéine CFTR (*Denning, et al.*

1992; Thomas, et al. 1992). Des travaux de 2005, utilisation technique du dichroïsme circulaire, ont montré que la mutation  $\Delta F508$  affecte très peu la topologie de la région NBD1 (Lewis, et al. 2005). De plus, il a été montré que le mauvais repliement se situe en réalité dans la partie C terminale du CFTR comprenant la partie NBD2 et également que la chaîne latérale de la phénylalanine en position 508 est un élément central dans les interactions intra-domaines et en particulier entre NBD1 et les domaines transmembranaires (Sharma et al. 2005).

**I.5. Influence des gènes modificateurs :**

Plusieurs arguments ont mis en évidence la présence de mutations sur d'autres gènes que le gène CFTR dans la fibrose kystique.

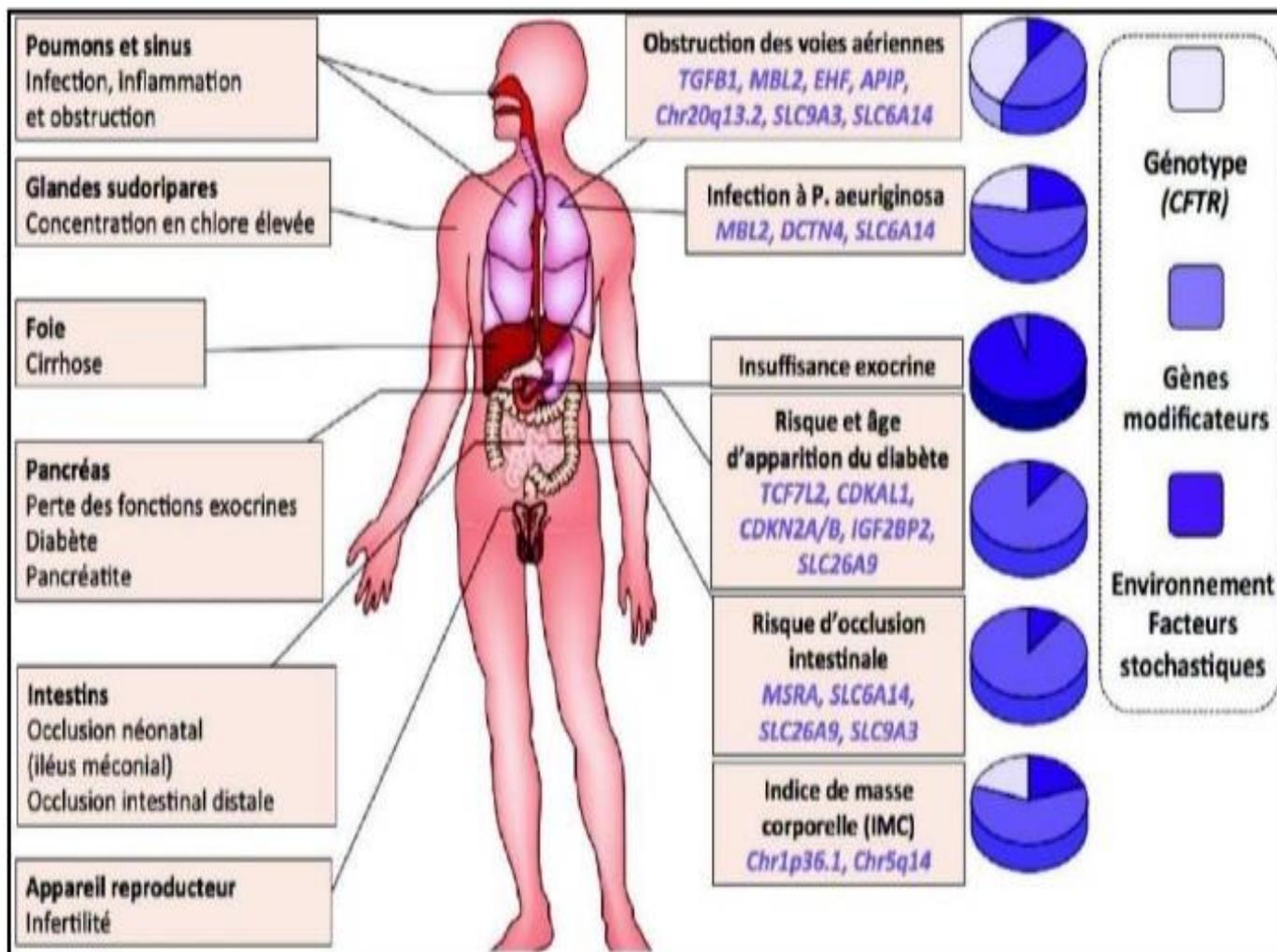


Figure 09 : contribution des gènes modificateurs dans la variabilité des signes cliniques de la fk.

(génotype-phénotype dans la mucoviscidose et caractérisation phénotypique de l'inflammation pulmonaire).

La recherche de gènes modificateurs a été menée selon deux approches, celle dite « à priori » et celle des gènes candidats. Ces gènes modificateurs peuvent être impliqués dans la réponse inflammatoire (TGFB1, IL-8, TNF, EDNRA), la réponse infectieuse (TLR4/TLR5/MBL2), la lésion et la réparation cellulaire (GSTs, NOS1/NOS3), la réponse pharmacogénétique (GR, 2AR), le transport ionique (SLC9A3, ABCC1) ou encore le cytosquelette (KRT8). De plus, des études pan génomiques ont permis de mettre en évidence l'implication du gène IFRD1, de la région chr11p13 comportant les gènes EHF et APIP et de la région chromosomique 20 q13.2 dans l'atteinte pulmonaire. Bien que la mucoviscidose soit une maladie monogénique, l'utilisation de technologies de séquençage de nouvelles générations devraient fournir des informations précieuses sur l'implication de ces gènes dans la progression de la maladie. Leur identification permettrait de mieux cibler les patients à risque de développer une atteinte plus importante de l'un ou l'autre des organes cibles, et ainsi de débiter une thérapeutique de prévention plus rationnelle. Il faut également tenir compte, au-delà des gènes de prédisposition, de l'impact de l'environnement pour expliquer l'hétérogénéité clinique que peuvent présenter les patients porteurs du même génotype. (Figure 9 : contribution des gènes modificateurs )

### **I.5.1. La technologie des puces à ADN :**

La technologie, relativement récente, des puces à ADN, permet l'analyse globale des mécanismes moléculaires intracellulaires. Effectivement, cette approche évalue en une seule expérience, au sein d'un échantillon biologique, le profil d'expression de l'ensemble des gènes. L'étude à large échelle de l'expression des gènes reflète l'activité transcriptionnelle de la cellule à un moment t dans des conditions expérimentales données. De cette activité, les modulations de certains processus biologiques nous apparaissent plus clairement et des conclusions biologiques d'ordre plus général peuvent s'appliquer. L'équipe de Brown est la première en 1995, à démontrer que l'analyse de l'ensemble du transcriptome permet d'obtenir des signatures moléculaires caractéristiques d'un état cellulaire (*Schena, Shalon et al. 1995*). Pour cette raison, la technologie des puces à ADN est largement utilisée pour un usage physiopathologique dans le but d'identifier des gènes modulés dans un contexte pathologique, pour un usage diagnostique dans l'analyse de la modulation de marqueurs connus d'une pathologie, ou encore pour un usage pronostic pour la prédiction de l'évolution de la maladie. (*Scherma, et al. 1995*)

### I.5.2. Analyse moléculaire du gène CFTR :

Aujourd'hui, en cas de suspicion de mucoviscidose, l'analyse moléculaire du gène CFTR est bien établie. Le gène CFTR est le seul responsable de la mucoviscidose. La stratégie d'analyse moléculaire de ce gène est réalisée en 3 étapes :

- La première étape consiste à réaliser une recherche des 30 mutations les plus fréquentes du gène. Cette étude est réalisée en quelques heures grâce à plusieurs kits commerciaux. qui permettent de dépister en quelques heures une trentaine de mutations du gène, Ces troussees commerciales ont une sensibilité de 80 à 85% sur l'analyse des populations Caucasiennes. La première recherche permet d'établir un génotype dans 60% des cas. Les deux mutations sont alors identifiées. Elles sont soit identiques et le patient est homozygote pour la mutation considérée, soit différentes et le patient est dit hétérozygote composite
- La deuxième étape est réalisée en cas de génotype non établi, l'étude du gène est poursuivie par un balayage complet des séquences codantes du gène : analyse de toutes les mutations décrites dans les 27 exons. Cette analyse est réalisée par HRM (High-ResolutionMeltingAnalysis) et/ou séquençage avec une sensibilité de détection des anomalies du gène CFTR supérieure à 95%.Enfin, Si le génotype reste toujours incomplet, une troisième étude sur les grands réarrangements est réalisée. Ces grands remaniements (délétion, duplication), sont retrouvés dans plus de 2% des anomalies du gène CFTR et révèlent plus de 20% des allèles qui restent non identifiésLa recherche des remaniements se fait par PCR multiplexe avec des amorces fluorescentes ou par MLPA (Multiplex Ligation-dependant Probe Amplification) . Au terme de toutes ces recherches, il reste des patients selon l'origine géographique ou ethnique, pour lesquels au moins une mutation n'a pas été caractérisée. Il est probable que ces patients soient porteurs de mutations introniques ou de mutations situées dans des régions régulatrices en 5' ou 3' du gène.(*Becdelievre. 2011*)

## I.6. Les approches thérapeutiques de la fibrose kystique :

### I.6.1. Thérapie génique :

Des solutions alternatives aux virus ont été envisagées afin d'éviter le plus possible des réactions immunes et autres inconvénients liés aux virus, tels que la taille limitée du transgène qui peut être inséré dans la capsid virale. La plupart des vecteurs non viraux de transfert de gène sont de nature lipidique et donc hydrophobes, mais certains possèdent une partie hydrophile électriquement chargée ou non. Les premiers tests de transfert de gène par liposome cationique sont effectués dans les voies respiratoires. Ces composés s'avèrent être parfaitement tolérés *in vivo*, n'induisent pas ou peu de réaction inflammatoire et permettent d'incorporer d'importantes quantités d'ADN.

Des agents mucolytiques ont été testés mais ils n'apportent qu'une faible augmentation de l'efficacité du transfert de gène. D'autres améliorations du transfert viral et non viral de gène doivent être apportées pour avoir un impact clinique significatif dans le traitement de la mucoviscidose. (Figure 11 : Schéma illustre simplement le principe de la thérapie génique) *Knowles et al*, (1983) .

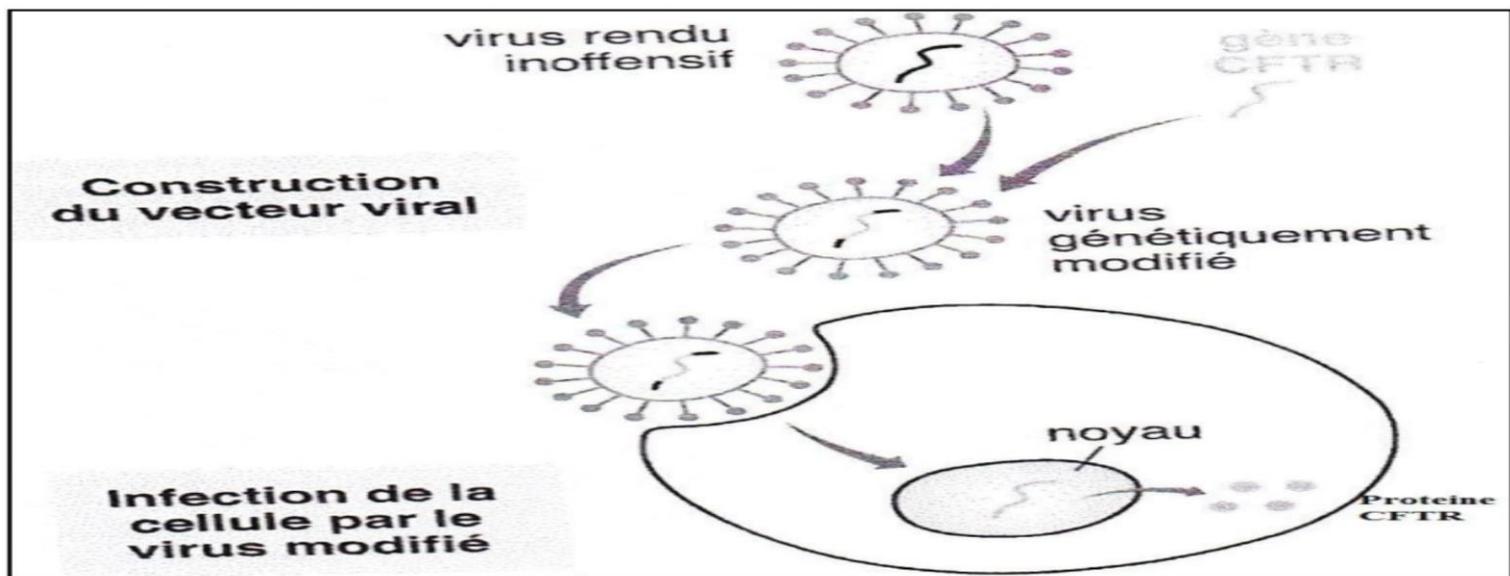


Figure 10 : schéma illustre simplement le principe de la thérapie génique qui intègre à l'organisme le gène non-muté de la protéine. (Zme, 2005).

### I.6.2. Thérapie cellulaire :

Dans le cadre de la mucoviscidose, la thérapie cellulaire consiste à implanter des cellules épithéliales saines dans le système respiratoire des patients, ou de corriger la cellule pathologique par transfert de gène *ex vivo* avant réimplantation *in vivo*. Le corps humain est formé principalement de cellules différenciées et spécialisées, équipées pour remplir les fonctions spécifiques de l'organe ou du tissu qu'elles constituent. Les cellules souches (CS) sont les précurseurs indifférenciés des cellules somatiques. En d'autres termes, ces cellules sont très plastiques, elles ont le potentiel de se spécialiser en différents types cellulaires. Elles sont capables de se différencier sous l'effet des interactions entre le programme génétique qu'elles contiennent et des facteurs environnementaux spécifiques. Plusieurs types de CS sont décrits en fonction de leur origine : CS embryonnaires, CS de moelle osseuse et CS pro génitrices issus d'un tissu ou d'un organe particulier. (*Bossard. F ; 2007*).

#### I.6.2.1. Cellules souches embryonnaires :

Les cellules souches embryonnaires (CSE) sont issues de l'embryon à un stade très précoce de son développement, lors du stade blastocyste (5 à 7 jours après la fécondation chez l'humain). Ces cellules sont douées de deux capacités importantes : celle de se multiplier à l'infini, par simple division (auto renouvellement), et celle de donner naissance à tous les types de cellules de l'organisme (pluripotente) (Figure 12 provenance et devenir potentiel des cellules souches embryonnaire).

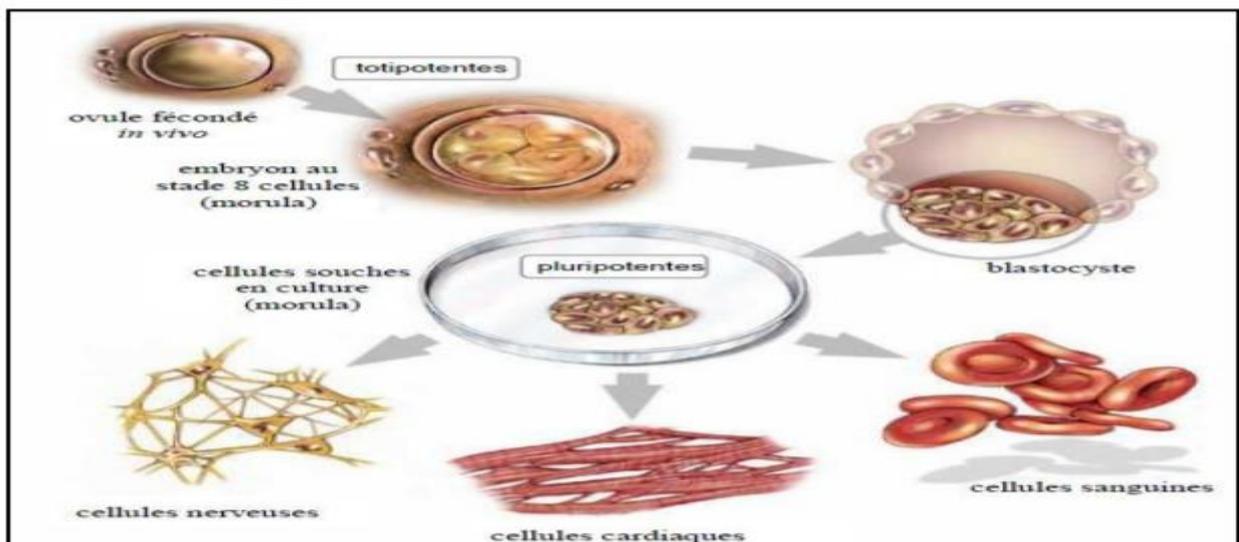


Figure 11 : provenance et devenir potentiel des cellules souches embryonnaires (*Bossard. F ; 2007*).

## **Chapitre 2:**

# **Les marqueurs moléculaires spécifique FK**

**II.1. Définition des marqueurs moléculaires :**

Les marqueurs moléculaires sont un type de marqueur génétique composé de fragments d'ADN qui servent de repères pour suivre la transmission d'un segment de chromosome d'une génération à l'autre. Ainsi, si un allèle X porté par un individu est porté par son père mais pas par sa mère, l'individu l'a reçu de son père. Les marqueurs moléculaires pour cet allèle X permettent alors d'établir l'origine parentale de cet allèle<sup>1</sup>. De ce fait, certains marqueurs moléculaires peuvent être utilisés pour effectuer des tests de parenté.

**II.2. Les marqueurs moléculaires responsables de la fibrose kystique :**

Au crépuscule des années 80, des chercheurs torontois découvrent le gène en cause dans la fibrose kystique. Anne-Marie Laberge, docteure au service de génétique médicale du centre hospitalier universitaire Sainte-Justine, à Montréal, expose les avancées permises par cette découverte.

La fibrose kystique touche 1 enfant sur 3600 au pays. Causée par une mutation du gène CFTR qui altère une protéine, elle affecte différents organes, particulièrement l'appareil digestif et les poumons. Lorsque l'équipe comprenant les docteurs Lap-Chee Tsui et John R. Riordan, de Toronto, découvre le gène CFTR (responsable de la fibrose kystique), la médecine génétique est en pleine révolution et l'identification du gène suscite alors beaucoup d'espoir. Mais depuis, malgré les avancées en termes de diagnostic – qui ont permis aux personnes touchées d'allonger leur espérance de vie de 20 à 50 ans –, il n'existe pour l'instant pas de traitement curatif. ( *C. Knoop. et al. 2010.* )



# **Partie Pratique**

### III. Patients et méthodes :

#### III.1. Patients

##### **Recrutement des cas index :**

Notre étude est prospective de type transversal et a été réalisée au niveau du laboratoire de biologie et de génétique moléculaire de la faculté de médecine université Constantine 3 Saleh Boubnider logé au niveau du laboratoire de biochimie du CHU durant la période février – juin 2018. Elle a porté sur 1113 patients des deux sexes présentant des signes cliniques de mucoviscidose probable. Ce travail a fait le point sur les résultats du test de la sueur réalisé sur une période de 7 ans (2011- 2018).

##### **Critères de sélection :**

Le diagnostic phénotypique de nos patients a été réalisé par des pédiatres et des pneumo-phtisiologues, essentiellement suggéré par des symptômes cliniques évocateurs clairement définis lors d'une conférence de consensus Américaine (Riordan and cutting, 1998) (Tableau 1), puis confirmé par un taux élevé de chlore et de sodium dans leur sueur.

#### III.2. Méthodes :

##### III.2.1. Etude biochimique :

##### III.2.1.1. Le test de la sueur :

Le test de la sueur a été mis en place en juin 2011 au **laboratoire de biologie de l'hôpital de Che Guevara**(dosage par titrimétrie des chlorures de la sueur recueillie après stimulation par iontophorèse à la pilocarpine). Le test de la sueur reste l'examen de première intention pour le diagnostic de la mucoviscidose. Principe de test Le test de la sueur est un examen qui consiste à mesurer la concentration sudorale en chlorure de sodium. Un taux trop élevé de NaCl dans la sueur est l'un des signes les plus importants de la mucoviscidose. Il comporte trois étapes : - Stimulation des glandes sudoripares. - Recueil et prélèvement de la sueur. - Dosage et analyse de la sueur

**✚ Matériel de stimulation :**

La technique que nous avons utilisée dans notre étude est la technique de Gibson et Cooke (1959) utilisant l'iontophorèse à la pilocarpine pour stimuler la production de la sueur. Le matériel utilisé :

- Mallette ambulatoire contenant :
  - Un appareil galvanique sur batterie.
  - Un dispositif électronique intégré.
  - Deux électrodes en étain.
  - Un papier film.
- Un adaptateur d'alimentation : entrée secteur 220 V, sortie 9 V.
- Une paire de gants hydrophiles à usage unique, de taille adéquate pour les électrodes.

**✚ Matériel de dosage :**

- Microburette avec support.
- Pipette graduée de 5 ml, 10 ml, 20 ml.
- Micropipette réglable de 1ml et 100 µl.
- Pointes pour micropipette jaunes et bleues.
- Boite de pétrie.
- Papier filtre qualitatif moyen (Whatman sans cendre, diamètre 7 cm).
- Balance de précision électronique.

**III.2.1.2. Réactifs nécessaires :****✚ Réactif de stimulation :**

- Une solution d'acide sulfurique.
- Une solution de chlorhydrate de pilocarpine.

**✚ Réactif de dosage :**

- Acide nitrique 1N (prêt à l'emploi)
- Solution de diphényle carbazone :
  - Diphényle carbazone 0.2 g.

- Alcool 95% 100 ml.
- Bleu de bromophénol 0.05 g.
- Solution de nitrate mercurique Hg (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>
  - HNO<sub>3</sub> 7.5 ml.
  - Eau distillée 100 ml.
  - Solution A.0.3 ml de la solution A + 0.3 g de Hg (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> + 100 ml d'eau distillée
- L'eau distillée.
- Solution NaCl à 1g/l.
- L'eau physiologique.

### III.2.1.3. Procédure Stimulation de la sudation :

La sueur est obtenue après une stimulation chimique (iontophorèse), par une drogue cholinergique (la pilocarpine). Cette dernière ne traverse pas la barrière cutanée, l'iontophorèse va permettre sa pénétration de la peau vers les glandes sudoripares. Elle est réalisée à l'aide d'un ampèremètre à ionisation muni de deux électrodes. La jonction électrique est réalisée par des compresses imprégnées d'une solution d'acide sulfurique pour la cathode et d'une solution de sulfate de pilocarpine à l'anode.

Les électrodes sont fixées à l'aide de bande de caoutchouc (le parafilm) sur la face antérieure de l'avant-bras (l'endroit utilisé dans notre étude), cette face doit être saine sans écorchure ni eczéma, et bien nettoyée afin d'éliminer les chlorures physiologiques résiduels ou les films lipidiques laissés par les crèmes ou le lait de toilette. Le courant appliqué est de 1.5 à 4 mA. Quand l'intensité de 4 mA est atteinte, on maintient l'application pendant 6 minutes ce qui permet la migration de la pilocarpine, sous forme cationique de l'anode (pôle +) vers la cathode (pôle -) et sa pénétration sous une faible épaisseur de peau jusqu'aux glandes sudorales. La peau est ensuite lavée à l'eau distillée et séchée.

#### Recueil de la sueur :

On utilise un papier filtre Whatman sans cendre préalablement pesé au 0.1 mg près. Celui-ci sera appliqué sur la surface stimulée, recouvert d'un film plastique qui colle hermétiquement à la peau pour éviter tout risque d'évaporation. Après 30 à 60 minutes de sudation, le papier filtre est retiré à l'aide d'une pince et pesé immédiatement. Le poids de sueur minimal pour

que le test soit fiable doit être de 100 mg et plus. Si plusieurs échantillons sont récupérés, ceux-ci seront traités séparément.

### + Dosage des chlorures sudoraux :

Dans notre étude nous avons dosé les ions chlorures par la technique titrimétrique de Schales. Elle est quantitative puisqu'elle tient compte du volume de la sueur. Après extraction des chlorures du papier filtre avec 10 ml d'eau distillée, le dosage se fait par titrimétrie avec une solution de nitrate mercurique et en présence de diphénylcarbazone comme indicateur coloré. Le virage est marqué par l'apparition d'une coloration violette stable. Les précautions doivent être nombreuses pour éviter toute erreur : la pesée doit être extrêmement précise, le risque de contamination chlorée par la verrerie doit être évité, de même que la contamination de l'échantillon par les mains de l'opérateur. Il est nécessaire que le test soit réalisé de façon courante au niveau d'un laboratoire et par une personne expérimentée. C'est alors un test fiable, mais qui ne peut être réalisé au lit du malade.

### + Préparation des échantillons :

**Boite de pétrie 01 :** boite de pétrie blanc.

Papier filtre + 10 ml d'eau distillée.

**Boite de pétrie 02 :** boite de pétrie contrôle NaCl.

Papier filtre +10 ml d'eau distillée + 100 µl solution NaCl 9%.

**Boite de pétrie 03 :** boite de pétrie échantillon du malade.

Papier filtre + 10 ml d'eau distillée.

**Boite de pétrie 04 :** boite de pétrie titrage  $\text{HgNO}_3^-$ .

Papier filtre + 09 ml d'eau distillée + 01 ml de NaCl 0.01M (10 meq/L).

### Tableau 2 : Protocole opératoire du dosage du chlore dans la sueur

	1 Blanc	2 Contrôle NaCl	3 Echantillon	4 Titration $\text{HgNO}_3^-$
Papier filtre	+	+	+	+

<b>Eau distillée</b>	<b>10 ml</b>	<b>10ml</b>	<b>10ml</b>	<b>10ml</b>
<b>NaCl 9%</b>	-	<b>100 µl</b>	-	-
<b>NaCl 0.01 M</b>	-	-	-	<b>1ml</b>

**NB :** Laisser le papier Whatman au contact de l'eau distillée pendant au moins 10 minutes. Rajouter dans chaque boîte de pétrie 05 gouttes d'acide nitrique 2%, et 05 gouttes de diphénylcarbazonne à 0.4%.

**Tableau 3 : protocole opératoire de la dernière étape du dosage du chlore dans lasueur.**

	<b>1</b> <b>Blanc</b>	<b>2</b> <b>Contrôle</b> <b>NaCl</b>	<b>3</b> <b>Echantillon</b>	<b>4</b> <b>Titrage</b> <b>HgNO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>
<b>Acide nitrique 2%</b>	<b>05 gouttes</b>	<b>05 gouttes</b>	<b>05 gouttes</b>	<b>05 gouttes</b>
<b>Diphénylcarbazonne</b>	<b>05 gouttes</b>	<b>05 gouttes</b>	<b>05 gouttes</b>	<b>05 gouttes</b>

### III.2.1.3. Mesure des volumes :

- Titrage du nitrate mercurique sur la boîte de pétrie 4 : ajouter le nitrate mercurique jusqu'à l'apparition d'une couleur mauve claire. Soit d le chiffre lu en ml.
- Dosage du chlore dans la boîte de pétrie 1 (blanc) : titrer par le nitrate mercurique jusqu'à l'apparition d'une couleur mauve claire stable. Soit c le chiffre lu en ml.
- Dosage du chlore dans la boîte a pétrie 2 (contrôle) : titrer par le nitrate mercurique jusqu'à l'apparition d'une couleur mauve claire stable. Soit a le chiffre lu en ml.
- Dosage du chlore dans la boîte de pétrie 3 (échantillon) : titrer par le nitrate mercurique jusqu'à l'apparition de la couleur mauve claire stable. Soit b le chiffre lu en ml.

### ✚ Expression des résultats :

- **Titre de nitrate** **mercurique :**

$$N = 0.01 / (d - c)$$

**d** : ml lu à la burette

pour le titrage du  $\text{HgNO}_3^-$ .

**c** : ml lu à la burette pour le blanc.

- **Concentration du chlore dans le contrôle de NaCl :**

$$[\text{Cl}] \text{ dans le contrôle NaCl} = ((a - c) \cdot N / 0.1) \cdot 1000$$

**a** : ml lu à la burette pour le contrôle.

**c** : ml lu à la burette pour le blanc.

**NB** : Reporter les valeurs du contrôle sur une carte à valeurs moyenne.

[Cl] normale dans le contrôle NaCl =  $145 \pm 3$  mEq/L.

Si les contrôles sont hors limite, vérifier les dates de préparation des réactifs.

- **Concentration du chlore dans l'échantillon :**

$$[\text{Cl}] \text{ dans l'échantillon} = (b - c) \cdot N / \text{poids de sueur en g} \times 1000$$

## III.2.2. Etude génétique :

### III.2.2.1. Extraction de l'ADN :

#### ✚ Principe :

Les leucocytes sont séparés du sang total par lyse hypotonique et traités ensuite par un détergent (SDS) et une protéinase K. L'ADN nucléaire est libérées dans le milieu et les protéines qui lui sont associées sont digérées et éliminées par précipitation au NaCl. La pelote de l'ADN est formée dans le surnageant par précipitation avec l'éthanol. L'ADN est solubilisé en phase aqueuse par le rapport de la DO à 260nm sur la DO à 280nm (longueur d'onde d'absorption des protéines) qui doit être compris entre 1.7 à 2.

**III.2.2.1.1. Matériels nécessaires :**

- Tube flacon 50ml
- Pastette stérile
- Pipette pasteur
- Agitateur rotateur
- Pipette graduée 1 ml, 10 ml, 20 ml
- Micropipette réglable de 100 - 1000  $\mu$ l

**III.2.2.1.2. Réactifs nécessaire :**

- TE 20 :5 25ml
- TE 10 :1 1.5ml
- TE 10 :1 300-1000 $\mu$ l
- Tampon de lyse
- NaCl 400 mM, EDTA 2mM, Tris 10mM, PH 8.2 SDS 10% 200  $\mu$ l
- Protéinase K 10mg/ml
- NaCl 4M 1 ml
- Ethanol 70%

**III.2.2.1.3. Procédure :****a. Lyse des globules rouges :**

La lyse des globules rouges est réalisée en complétant le volume de sang avec une solution hypotonique TE 20 :5. Après lavage, les tubes sont mis dans la glace pendant 10 minutes, puis centrifugés à 3800 tours/min pendant 10min. La centrifugation, quant à elle permet de séparer le surnageant qui contient les débris de globules rouges des globules 63 blancs qui sont

précipités au fond du tube formant un culot. Cette opération de lavage est répétée plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'un culot blanchâtre qui correspond aux globules blancs.

### **b. Lyse des globules blancs :**

Le culot de leucocytes est traité par 25ml de TE, solution de lyse des globules blanc. 100 $\mu$ l de protéinase K à 10 mg/ml sont additionnés pour digérer les protéines associées à l'ADN nucléaire. Après homogénéisation, le mélange est incubé au bain-marie à 37°C pendant une nuit. L'EDTA est un chélateur d'ions bivalents inhibant l'activité des DNases et le SDS est un puissant détergent lysant les membranes cellulaires et dissociant les complexes d'acides nucléiques.

### **c. Précipitation de l'ADN :**

Un millilitre de NaCl 4M sont ajoutés dans chaque tube. Après une centrifugation de 15min à 2500 tours/min, le surnageant contenant l'ADN est transféré dans un autre tube et est précipité avec deux volumes d'éthanol absolu froid. L'ADN est visible à l'œil sous forme de filaments formant une pelote. Cette dernière est récupérée et ensuite lavée avec une solution d'éthanol à 70% pour se débarrasser des traces éventuelles de sels, puis séchée et dissoute dans des tubes eppendorf en présence de 300 à 1000 $\mu$ l de TE10 :1 selon la taille de la pelote. L'ADN est dissout totalement dans ce tampon sous agitation douce à +4°C pendant plusieurs jours.

### **d. Dosage de l'ADN :**

Le dosage de l'ADN est effectué par la mesure de la densité optique par spectrophotométrie d'un aliquote dilué au 1/100 (20 $\mu$ l d'ADN + 1980 $\mu$ l d'eau distillée stérile). Une première lecture à une longueur d'onde de 260 nm nous permet d'estimer la densité optique des acides nucléiques. Une seconde lecture est effectuée à une longueur d'onde de 280 nm afin de déterminer une éventuelle contamination par les protéines. Pour avoir un critère de pureté indicatif, le rapport de DO260nm/280nm est établi. Il doit être compris entre 1.7 et 2. Une valeur inférieure à 1.7 témoigne d'une contamination par les protéines, et une valeur supérieure à 2 d'une contamination par les sels.

### III.2.2.2. La PCR :

La PCR est un outil fondamental de la biologie moléculaire. Elle permet de repérer un fragment d'ADN ou de gène précis, présent même en quantité infime dans un mélange puis de le multiplier rapidement. La PCR a été décrite pour la première fois par Kary Mullis en 1983 et publiée en 1985, ce qui a valu à Kary Mullis le prix Nobel de chimie en 1993.

#### Principe :

La PCR est basée sur la capacité de l'ADN polymérase à synthétiser le brin complémentaire, d'un ADN servant de matrice. Pour initier le processus, un segment d'acides nucléiques doit s'y associer afin de servir d'amorce. Cette amorce ou primer est un oligonucléotide de synthèse de 17 à 30 bases de longueur, et dont la séquence est complémentaire à celle du brin à amplifier. L'amorce permet de délimiter les bornes de la séquence à amplifier. L'association à l'ADN cible est suivie de son élongation par la polymérase, aboutissant ainsi à la synthèse d'un ADN double brin. La PCR consiste en une succession cyclique de 3 étapes : Le milieu réactionnel tamponné comprend tous les éléments indispensables : les précurseurs nucléotidiques (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), le cation  $Mg^{++}$  indispensable au bon fonctionnement de l'enzyme et à l'incorporation correcte des précurseurs, l'ADN polymérase et les amorces. A ce milieu est ajouté l'ADN extrait du milieu biologique à étudier.

#### ➤ Première étape : Dénaturation thermique :

Cette étape consiste à séparer par la chaleur les deux brins en rompant les liaisons hydrogènes. L'ADN double brin est chauffé à 94°C. Cette température est supérieure à la température de dénaturation (Melting température ou  $T_m$ ) de l'ADN qui passe alors sous forme simple brin. Ces brins servent de matrice au cours des cycles d'amplification.

#### ➤ Deuxième étape : Hybridation des amorces ou annealing :

Le milieu réactionnel est amené à une température inférieure au  $T_m$  des amorces. Ce  $T_m$  est fonction de la séquence et est en général de l'ordre de 45 à 70 °C. Les amorces en large excès, s'hybrident à tout l'ADN

#### ➤ Troisième étape : Elongation et extension des amorces :

L'ADN polymérase synthétise un brin complémentaire. L'enzyme lit la séquence du brin opposé et étend l'amorce en ajoutant des nucléotides dans l'ordre avec lequel ils

peuvent s'apparier. Le processus dans son ensemble est répété un grand nombre de fois.

### Optimisation de la PCR :

- **Choix de l'enzyme :**

La Taq ADN polymérase est une enzyme très largement utilisée pour effectuer les PCR. Cette enzyme obtenue à partir de *thermus aquaticus* possède une bonne thermolabilité, ce qui lui permet de résister dans certaines limites aux températures élevées nécessaires à la séparation des doubles brins. La quantité de Taq ADN polymérase utilisée pour une réaction de PCR de 50 µl, varie de 0.2 et 0.5 UI, voire 1 UI. Une quantité trop importante d'enzyme est souvent à l'origine d'un bruit de fond important (bandes parasites) voire une inhibition de la réaction.

- **Choix des amorces :**

Les amorces sont des séquences exactement complémentaires du fragment à amplifier (absence de mésappariements).

Principes généraux relatifs aux choix des amorces :

- La taille des amorces doit être entre 20 et 30 nucléotides.
- Leur composition en G+C doit être de 50%
- L'hybridation des amorces sur elles-mêmes et entre elle doit être évitée car il y a un risque de formation de produits de PCR non spécifiques, notamment de dimères d'amorces qui sont des bandes parasites, résultant de l'hybridation des amorces sens et anti-sens entre elles. Ces appariements affectent l'efficacité et la spécificité de la réaction de PCR. Les amorces ne doivent pas faire de boucles (loops) sur elles-mêmes (absence de structure secondaires).

Les amorces utilisées sont les suivantes :

**Tableau 4 : Amorces utilisées**

Nom de l'amorce	La séquence de l'amorce
AF 508 - Primer 1= DF-C	<b>gACTTCACTTCTAATgATgATTATgggAgA</b>
AF 508 - Primer 2= DF-j-N	<b>gTATCTATATTCATCATAggAAACACCACA</b>
F 508 - Primer 3 = DF-w-M	<b>GTATCTATATTCATCATAGGAAACACCATT</b>
AAT4	<b>GGGCCTCAGTCCCAACATGGCTAAGAGGT</b>
AAT3	<b>CCCACCTTCCCCTCTCTCCAggCAAATggg</b>

- **Température de fusion et d'hybridation :**

La température de fusion ou de dénaturation (melting temperature  $T_m$ ) des amorces doit être suffisamment élevée (au minimum 55 °C) quand cela est possible. Plus le  $T_m$  d'une amorce est élevée, moins le risque d'hybridation non spécifique est important ; il est donc important de dessiner des amorces à  $T_m$  élevée. La différence de  $T_m$  entre les deux amorces (A ou sens et B ou antisens) ne devra pas être trop importante :  $T_m A - T_m B < 5$  °C. Pour calculer le  $T_m$  d'une amorce, on pourra s'aider de la formule suivante :

$$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$$

Cette formule, valable pour des amorces de taille inférieure à 25 nucléotides, est cependant approximative. La température d'hybridation est égale à la  $T_m$  moins 5 °C ( $T^\circ \text{ hybridation} = T_m - 5^\circ\text{C}$ ). Une température d'hybridation trop basse risque de donner des hybridations non spécifiques.

- **Concentration des chlorures de magnésium :**

Le chlorure de magnésium est un cofacteur essentiel pour la Taq polymérase. Il existe une relation inverse entre la quantité de dNTP utilisée et la concentration de  $MgCl_2$ . Les dNTP chélatent une partie des ions  $Mg^{2+}$  et par conséquent, une augmentation des dNTPs diminue la concentration disponible d'ions  $Mg^{2+}$  libres. Nous avons utilisé une solution de  $MgCl_2$  à 25 mM et nous avons réalisé une gamme de  $MgCl_2$ .

- **Validation du test :**

Pour chaque série de réactions de PCR, il est indispensable d'effectuer un contrôle négatif et éventuellement, un contrôle positif.

- **Contrôle négatif :**

Il s'agit d'un tube contenant tous les réactifs et l'enzyme, mais sans ADN, il permet de s'assurer qu'aucun réactif ou enzyme n'est contaminé.

- **Contrôle positif :**

Il s'agit d'un tube contenant tous les réactifs et l'enzyme avec un ADN connu et déjà étudié. Ce contrôle, qui permet de s'assurer que la réaction s'est bien effectuée, n'est utilisé que lorsque les réactions de PCR ne sont pas concluantes,

- **Marqueur de taille :**

Un marqueur de taille est une solution contenant différents fragments d'ADN de tailles variables et connues. Il est utilisé pour l'estimation de la taille d'un fragment d'ADN amplifié. Il peut être remplacé par des fragments ou témoins de masse moléculaire connue qui migrent en parallèle au fragment d'ADN à estimer.

- **✚ Réalisation pratique de l'amplification par PCR :**

Préparation de l'échantillon d'ADN sous forme d'une solution de travail adéquate et vérification que tous les réactifs nécessaires sont disponibles, et en quantité suffisante pour amplifier l'exon 10 du gène CFTR. Les différentes solutions doivent être préparées sous une hotte à ADN stérile. Les amorces sont fournies sous forme lyophilisée, et les DNTP sous forme de flacons de solution mère contenant 100 mM de chaque dNTP. Ces réactifs sont préparés selon les concentrations suivantes :

**Tableau 5 : Concentration des réactifs de la PCR.**

<b>Solution de travail</b>	<b>Concentration</b>
<b>ADN</b>	<b>100 ng/μl</b>
<b>Amorces</b>	<b>25 pmol /μl</b>
<b>Dntp</b>	<b>2.5 Mm</b>

- **Préparation des Mix PCR :**

Cette opération s'effectue dans une pièce appelée de Pré PCR sous hotte stérile. Dans des tubes eppendorff de 1.5 ml, on prépare les Mix ou mélange total des réactifs nécessaires à notre PCR pour chaque exon, en tenant compte du nombre d'échantillons à traiter, plus un témoin négatif.

La composition du Mix est la suivante :

**Tableau 6 : Composition du mix de la PCR**

Réactifs	Quantité Volume 45 $\mu$ l
Tampon 10X	5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	2 $\mu$ l
dNTP 2.5 mM	5 $\mu$ l
DF-C (25 pmol) : 1 $\mu$ l (tube A/B amorce commune)	1 $\mu$ l
DF-j-N (25 pmol) : 1 $\mu$ l (tube A amorce normale)	1 $\mu$ l
DF-w-M (43 pmol) : 2 $\mu$ l (tube B amorce mutée)	1 $\mu$ l
AAT4 (43 pmol) : 1 $\mu$ l (tube A/B amorce exon contrôle interne)	1 $\mu$ l
AAT3 (43 pmol) : 1 $\mu$ l (tube A/B amorce exon contrôle interne)	1 $\mu$ l
ADN (250 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	30 $\mu$ l

Le mélange réactionnel standard ARMS contient 43 pmoles de chacune des amorces concernées et 4.3 mM de dNTP (dATP, dCTP, dGTP et TTP, Pharmacia) dans du tampon de réaction (KCl 43 mM, Tris HCl 8,6 mM [pH 8,3], MgCl<sub>2</sub> 1,0 mM et gélatine 0,008%). Le mélange réactionnel (45  $\mu$ l) contenant tous les composants à l'exception de l'enzyme est chauffé à 94 ° C pendant 5 minutes dans un thermo cycler. Après l'addition de l'enzyme 0.3 microlitre de Taq ADN polymérase dans 5  $\mu$ l de tampon de réaction. Ces mélanges sont distribués dans des micro tubes à PCR fixés sur une plaque portemicrotubes. Un gène de contrôle témoin d'une amplification est utilisé (Amorces AAT3 et AAT4).

- **Programme du thermo cycler :**

Les micro tubes sont placés dans un thermo cycler qui sera programme comme suit:

**Pour l'exon : 10**

- 95°C pendant 5 mn
- **95°C pendant 2mn**
- **60°C pendant 2 mn ← 35 fois**
- **72°C pendant 2mn**
- 72°C pendant 10mn

-Après amplification de l'exon par PCR, les produits de PCR sont contrôlés par électrophorèse.

### **III.2.2.3. Contrôle par électrophorèse des produits de PCR des différents exons :**

- **Principe de la technique :**

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet de séparer les exons en fonction de leur taille. Elle est réalisée dans une cuve de migration horizontale.

- **Le gel d'agarose :**

Le contrôle de PCR est réalisé sur un gel d'agarose à 3%.

- **Tampon d'électrophorèse :**

Le tampon Tris-Borate est le plus utilisé, sous forme de mélange Tris-Borate-EDTA (TBE). Le Tris et le borate ne portent quasiment pas de charges au PH désiré, ce qui réduit leur mobilité. Un avantage du tampon Tris est qu'il s'agit d'une molécule de taille suffisamment importante, ce qui freine sa migration électro-phorétique.

La concentration d'un tampon est exprimé en X. La mention X indique la dilution à effectuer à partir d'une solution mère de concentration nX. Les tampons sont généralement dilués à 1X.

- **Traitement de l'échantillon pour le dépôt :**

Les produits de PCR sont préparés pour être déposés, avec une pipette de précision, sur gel d'agarose. Le gel d'agarose est placé avec son support ou plateau dans une cuve

d'électrophorèse. Le gel placé dans la cuve sera totalement immergé, en positionnant les puits du côté de la cathode pôle noir.

Il faut remplir délicatement et très lentement la cuve avec le tampon TBE jusqu'à recouvrir le gel. Ajouter le colorant de charge 2 µl de bleu de bromophénol à chaque 10 µl produit de PCR de chaque échantillon, pour pouvoir suivre visuellement la migration des dépôts. Ce mélange est déposé dans un puits du gel d'agarose.

Un marqueur de taille, déposé dans un puits est utilisée pour chaque série d'échantillons.

- **La migration :**

La migration électrophorétique dure environ 45 mn à 100 volts. Elle peut être arrêtée lorsque le courant de charge arrive à proximité du bord opposé du gel.

- **Visualisation des produits de PCR :**

La visualisation des exons séparés en fonction de leur taille par transillumination du gel qui contient du Bromure d'ethidium ou BET, molécule qui a l'habitude de s'intercaler entre les bases des acides nucléiques.

Dans ces conditions, l'exposition du gel à un rayonnement UV de 312 nm permet la fluorescence du BET lié à l'ADN. Cette technique permet de repérer et de situer les différents fragments ayant migrés par rapport au marqueur de taille moléculaire.

**IV. Résultats :****IV.1 répartition des patients selon le sexe :**

Nous avons recruté 1113 patients dont 604 sont de sexe masculin et 509 de sexe féminin avec un sexe ratio H/F=1.19 et la p-Value = 0.003.

**Tableau 7 : Répartition des patients selon le sexe.**

Sexe	Nombres	Pourcentage
<b>Masculin</b>	<b>604</b>	<b>54%</b>
<b>Féminin</b>	<b>509</b>	<b>46%</b>

**IV.2. Répartition des patients selon l'âge au moment de la découverte de la maladie :**

Presque la moitié de nos patients étaient âgés entre quelques jours à 12 mois (46%, suivie de 38% de 1 à 5ans, et de 9% de 5 ans à 10 ans). Les autres tranches d'âge sont faiblement représentées.

**Tableau 8 : Répartition des patients selon l'âge au moment de la découverte de la maladie.**

Age	Nombres	Pourcentage
<b>De quelques jours à 12 mois</b>	<b>509</b>	<b>46%</b>
<b>De 1 ans à 5 ans</b>	<b>420</b>	<b>38%</b>
<b>De 5 ans à 10 ans</b>	<b>104</b>	<b>9%</b>
<b>De 10 ans à 15 ans</b>	<b>54</b>	<b>5%</b>
<b>De 15 ans à 20 ans</b>	<b>15</b>	<b>1%</b>
<b>Plus de 20 ans</b>	<b>11</b>	<b>1%</b>

## IV.3. Répartition des patients selon les wilayas :

Tableau 9 : Répartition des patients selon les wilayas.

Régions	Nombres de cas	Pourcentage
Constantine	309	27.76%
Oum bouaghi	86	7.72%
Mila	84	7.54%
Batna	75	6.74%
Skikda	67	6.01%
Annaba	60	5.39%
Guelma	42	3.77%
Jijel	31	2.78%
Tébessa	30	2.69%
Khanchla	24	2.15%
Biskra	09	0.81%
Oued souf	09	0.81%
Souk ahrass	06	0.54%
Taraf	06	0.54%
Bourdjbouariridj	03	0.27%
Ouargla	03	0.27%
Ilizi	02	0.18%
Msila	02	0.18%
Sidi bel aabes	02	0.18%
Blida	01	0.09%
Laghouat	01	0.09%
Mostaganem	01	0.09%
Tlemcen	01	0.09%
Indéterminé	259	23.27%

Mille cent treize (1113) Tests sudoraux ont été réalisés chez 1050 patients originaires de 23 villes Algériennes.

**IV.4. Répartition des patients selon les signes cliniques :**

Les demandes ont été motivées pour des symptômes respiratoires dans 58,22% des cas, digestifs 18% et nutritionnel dans 17,45%. Les autres manifestations cliniques sont faiblement représentées. **31.18%** de nos patients sont issus de mariages consanguins et **68.82%** ont des parents non consanguins.

**Tableau 10 : Répartition des patients selon les signes cliniques.**

Signes cliniques	Nombres de cas	Pourcentage
<b>Problèmes respiratoires</b>	<b>637</b>	<b>58.22%</b>
<b>Diarrhée Chroniques/ Stéatorrhée/ Malabsorption</b>	<b>197</b>	<b>18%</b>
<b>Retard de croissance / Malnutrition</b>	<b>191</b>	<b>17.45%</b>
<b>Atteintes Hépatiques/ Ictère/ Hypertension portale/ Cirrhose</b>	<b>53</b>	<b>4.84%</b>
<b>Prolapsus rectal</b>	<b>08</b>	<b>0.73%</b>
<b>Déshydratation/ troubles électrolytique</b>	<b>05</b>	<b>0.46%</b>
<b>Iléus méconial</b>	<b>02</b>	<b>0.18%</b>
<b>Autres</b>	<b>01</b>	<b>0.09%</b>

**IV.5. Répartition des patients selon le type de mariage****Tableau 11 : Répartition des patients selon le type de mariage.**

Type de mariage	Nombres	Pourcentage
<b>Consanguins</b>	<b>347</b>	<b>31.18%</b>
<b>Non Consanguins</b>	<b>766</b>	<b>68.82%</b>

#### IV.6. Résultats du test de la sueur :

Tableau 12 : Résultats du test de la sueur.

Résultats du test	Nombres	Pourcentage
Positif	91	8%
Négatif	935	84%
Douteux	25	2%
Non concluants (poids de sueur < 100mg)	62	6%

Nous avons réalisé 1051 tests chez 1113 patients présentant une mucoviscidose probable. Le test de la sueur était positif chez 8% des patients et douteux dans 2% des cas.

#### IV.7. Résultats des cas positifs selon le sexe :

Tableau 13 : Résultats du test de la sueur :

Sexe	Nombres	Pourcentage
Masculin	52	57,14%
Féminin	39	42,86%

57,14% des patients ayant subi un test de la sueur sont de sexe masculin et 42,86% de sexe féminin.

**IV.8. Résultats des cas positifs selon les wilayas :****Tableau 14 : Résultats des cas positifs selon les wilayas :**

<b>Région</b>	<b>Nombre des cas positifs</b>	<b>Pourcentage</b>
<b>Constantine</b>	<b>16</b>	<b>24%</b>
<b>Batna</b>	<b>13</b>	<b>19%</b>
<b>Oum bouaghi</b>	<b>09</b>	<b>13%</b>
<b>Annaba</b>	<b>05</b>	<b>7%</b>
<b>Khanchla</b>	<b>05</b>	<b>7%</b>
<b>Mila</b>	<b>04</b>	<b>6%</b>
<b>Tebessa</b>	<b>04</b>	<b>6%</b>
<b>Skikda</b>	<b>03</b>	<b>4%</b>
<b>Ain mlila</b>	<b>03</b>	<b>4%</b>
<b>Sétif</b>	<b>02</b>	<b>3%</b>
<b>Mostaganem</b>	<b>01</b>	<b>1%</b>
<b>Biskra</b>	<b>01</b>	<b>1%</b>
<b>Oued souf</b>	<b>01</b>	<b>1%</b>

Les taux des ions chlorures dans la sueur des patients variaient de 5 à 140 mmol/l.

**IV.9. Répartition des cas positifs selon la consanguinité :****Tableau 15 : Répartition des cas positifs selon la consanguinité.**

<b>Type de mariage</b>	<b>Nombres de cas positifs</b>	<b>Pourcentage</b>
<b>Consanguin</b>	<b>22</b>	<b>33%</b>
<b>non consanguin</b>	<b>40</b>	<b>60%</b>
<b>Indéterminé</b>	<b>05</b>	<b>7%</b>

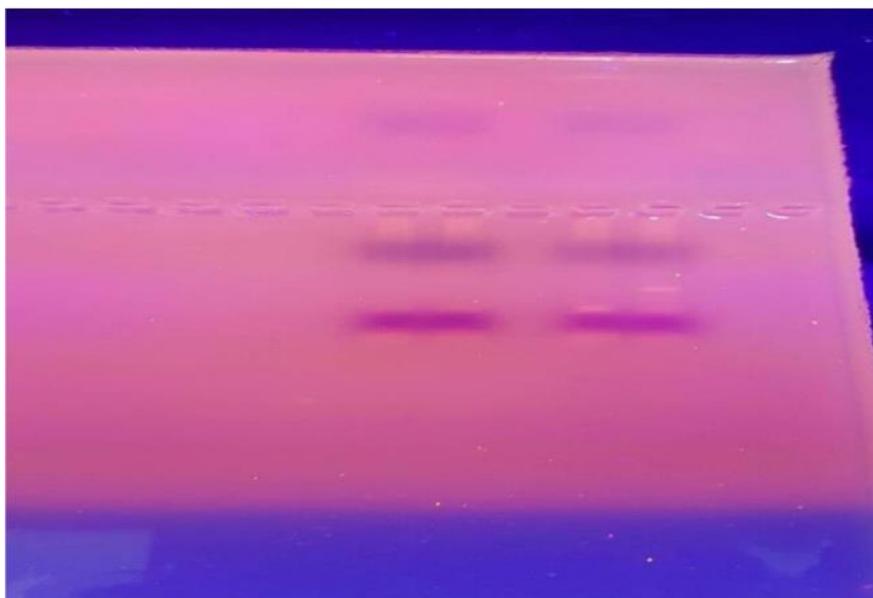
33% des cas positifs sont issus de mariages consanguins et 60% des cas positifs sont de mariages non consanguins.

#### **IV.10. Résultats de la mise au point de la technique ARMS utilisées pour la recherche de la Delta F 508 du gène CFTR :**

Un test ARMS a été développé pour la mutation delta F508 du gène CFTR, le cycle de température paramètres de la réaction PCR, les conditions du tampon, et la concentration des amorces ARMS ont été modifiés. Nous avons changé la concentration des amorces et l'avons ajustée à 25pmol/l. Les tests ARMS comprennent tous un contrôle interne de la réaction de PCR.

Le nouveau mélange réactionnel standard ARMS contient 25 pmoles de chacune des amorces concernées et 2.5 mM de dNTP (dATP, dCTP, dGTP et TTP, Pharmacia) dans du tampon de réaction (KCl 43 mM, Tris HCl 8,6 mM [pH 8,3], MgCl<sub>2</sub> 1,0 mM et gélatine 0,008%). Le mélange réactionnel (45ul) contenant tous les composants à l'exception de l'enzyme est chauffé à 94 ° C pendant 5 minutes dans un thermo cycler.

Après l'addition de l'enzyme 1 unité de Taq ADN polymérase dans 5µl de tampon de réaction. Un gène de contrôle témoin d'une amplification a été utilisé (Amorces AAT3 et AAT4) .Il s'agit d'un fragment de 360 pb de l'exon III du gène de l'alpha 1 antitrypsine.



**Figure 12 : gel d'agarose des produits de la réaction de PCR de l'exon 10 du gène CFTR ARMS normale.**

**V. Discussion :**

Au cours de ces 20 dernières années, l'amélioration de la prise en charge de la mucoviscidose ainsi que le développement des moyens de diagnostics ont permis d'augmenter considérablement l'espérance de vie des patients. La mise en place du test de la sueur est désormais préconisée afin de réduire les retards de diagnostics et de permettre une intervention précoce pour la prise en charge respiratoire et nutritionnelle de la maladie. Ce test constitue l'examen clé pour le diagnostic de la mucoviscidose. Ses indications sont multiples. Les progrès de la génétique ne l'ont pas mis en question, car il s'agit d'un des examens les plus sensibles en médecine. Son interprétation doit tenir compte des modalités opératoires et des renseignements cliniques.

La sensibilité du test de la sueur est de 98%, sa spécificité est de 83% et sa valeur prédictive positive est de 99.5%.

Selon la technique de Gibson et Cooke, lorsque la concentration en Cl<sup>-</sup> est supérieure à 60 mEq/l le test est positif. Il doit être positif à deux reprises pour affirmer le diagnostic de la mucoviscidose. Alors que pour une concentration inférieure à 40 mmol /l, le test est normal. Chez les nourrissons de moins de 6 mois, une concentration en Cl qui est inférieure à 30 mmol/l, révèle un test négatif.

## Conclusion

---

### **Conclusion :**

Les résultats de cette étude confirment que la mucoviscidose n'est pas rare en Algérie. Son diagnostic nécessite au moins une symptomatologie clinique et un test de la sueur positif à deux reprises d'où l'importance d'instaurer le test de la sueur dans nos hôpitaux. En attendant le dépistage prénatal et la création de centres de références seuls garant d'une prise en charge efficace.

Ce test reste l'examen de première intention pour le diagnostic de mucoviscidose les progrès de la génétique ne l'ont pas remis en cause car il s'agit d'un des examens les plus sensibles en médecine. Sa technique est délicate et nécessite une méthodologie stricte.

Le test de la sueur reste jusqu'à ce jour le moyen le plus discriminant pour le diagnostiquer la mucoviscidose lorsque la génétique ne permet pas d'affirmer le diagnostic.

Affirmer le diagnostic de CF requiert une expertise multidisciplinaire impliquant clinicienne, physiologistes et généticiens spécialisés.

L'intérêt d'effectuer le diagnostic est évident pour le patient qui peut bénéficier d'une prise en charge médicale spécialisée en attendant l'avènement de la thérapie génique espoir attendu par tout mucoviscidosique.

### Références bibliographiques :

1. Welsh MJ, Ramsey BW, Accurso F, Cutting GR. Cystic fibrosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *Metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. pp. 5121-5188. New York : McGraw-Hill, 2001 : 5121-88.
1. Di Sant'Agnese PA, Darling RC, Perera GA, et al. Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas; clinical significance and relationship to the disease. *Pediatrics* 1953; 12:549-63.
2. Gonska T, Ip W, Turner D, et al. Sweat gland bioelectrics differ in cystic fibrosis: a new concept for potential diagnosis and assessment of CFTR function in cystic fibrosis. *Thorax* 2009; 64:932-8.
3. Munck A, Dhondt JL, Sahler C, et al. Implementation of the French nationwide cystic fibrosis newborn screening program. *J Pediatr* 2008; 153:228-33.
4. Roussey M, Munck A. Questions soulevées et réponses apportées depuis la généralisation du dépistage néonatal de la mucoviscidose en France. *Arch Pediatr* 2009 ; 16 : 540-2.
5. Coakley J, Scott S, Mackay R, et al. Sweat testing for cystic fibrosis: standards of performance in Australasia. *Ann Clin Biochem* 2009; 46:332-7.
6. Carpentier., A. Modification du tropisme de vecteurs pseudoviraux dérivés des papillomavirus pour l'application aux thérapies pulmonaires. Thèse de doctorat : Science de la Vie et de la Santé : Université François Rabelais de Tours, 2012, 6p.
7. Angelot. F. Pathologies associées aux mutations et polymorphismes du gène cysticfibrosistransmembrane conductance regulator ou CFTR. Thèse de doctorat : Pharmacie : Université de Franche Comté, 2005, 9p.
8. Romey MC. 2006. Caractérisation fonctionnelle de mutants CFTR naturels : intérêt pour la mucoviscidose. *Ann Biol Clin*. 64(5) : 429-38.
9. Sermet-Gaudelus I, Lenoir G. Mucoviscidose: de la physiopathologie aux nouvelles thérapies. *Arch. Pédiatrie Organe Off. Société Française Pédiatrie*. mai 2012; 19
10. Davis PB. Cystic fibrosis since 1938. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 1 mars 2006; 173(5):475-482
11. Andersen; DH; Hodges R.G., 1946. Celiac syndrome; genetics of cystic fibrosis of the pancreas, with a consideration of etiology. *Am J Dis Child* 72, 62-80.

## Références bibliographiques

---

12. Di Sant'Agnese PA, Darling RC, Perera GA, Shea E. Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas; clinical significance and relationship to the disease. *Pediatrics*. nov 1953;12(5):549-563.
13. Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics*. Mars 1959;23(3):545-549.
14. Knowles M.R., Carson J.L., Collier A.M., Gatzky J.T. Measurements of nasal transépithélial electric potential differences in normal human subjects in vivo *Am Rev Respir Dis* 1981; 124; 484-90.
15. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989;245:1059–65.
16. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N et al. Identification of cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245:1066–73.
17. Anderson, MP; Rich, DP; Gregory, RJ; Smith, AE; and Welsh, MJ; (1991). Generation of cAMP- activated chloride current by expression of CFTR.
18. Gros C. Traitement de l'infection à *Pseudomonas aeruginosa* dans la mucoviscidose : état actuel et perspective. Thèse de doctorat : pharmacie : Université de Nantes faculté de pharmacie, 2012, 22p.
19. Bobadilla JL, Macek M, Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat*. 2002; 19(6):575-606.
20. Vaincre la mucoviscidose ; Centres de référence maladies rares et mucoviscidose ; Novembre 2010 page 127.
21. Loumi O, Ferec C, Mercier B, Creff J, Fercot B, Denine R, et al. CFTR mutation in Algerian population. *J cystfibros*. 2008 Jan ; 7(1) :54-9.
22. Fredj SH, Messaoud T, Templin C, des Georges M, Fattoum S, Claustres M. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutation spectrum in patients with cystic fibrosis in Tunisia. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2009 Oct; 13(5): 577-81.
23. Ratbi I, Genin E, Legendre M, Le Flosch A, Costa C, CherkaouiDeqqaqi S, et al. Cystic fibrosis carrier frequency and estimated prevalence of the disease in Morocco. *J CystFibros*. 2008; 7(5) :440-3.
24. World Health Organization. The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis, 2004. Disponible sur: <http://www.who.int/genomics/publications/en/>. (Consulté le 22/03/2017)

## Références bibliographiques

---

25. Bertrand. J. Approches pharmacologiques de CFTR et de CaCC dans la mucoviscidose. Thèse de doctorat : biologie santé. Université de Poitiers, 2006, 24p.
26. Bossard, F. La mucoviscidose : Correction de la mutation DF508 par surexpression de NHE-RF1 ; Modifications d'expression de NHE-RF1 et des récepteurs b-adrénergiques dans les poumons humains. Thèse de doctorat : biologie. Université de Nantes, 2007, 2-93p.
27. Farhat, R. Multiples conséquences physiopathologiques de mutations et d'allèles complexes du gène CFTR : l'importance des études génétique, moléculaire, cellulaire & in silico dans la détermination de l'impact de ces variations sur l'épissage et la protéine. Thèse de doctorat : Biologie santé. Université de Poitiers, 2014, 4-26p.
28. Marie G. Transfert de la pédiatrie à l'adulte de patients atteints de mucoviscidose: le vécu des patients et des équipes au CHU de Nice. Médecine humaine et pathologie. 2013.
29. YAHIA., M. Diagnostic, physiopathologie et génétique de la mucoviscidose dans la population de l'Est et sud Algérien [gène CFTR et l'absence bilatérale des canaux déférents (ABCD)]. Thèse de doctorat : physiologie animale. Université Mentouri Constantine, 2007, 19-24
30. Chappe; V; T ; Irvine ;et al.2005.Phosphorylation of CFTR by PKA promotes binding of the regulatory domain.”EMBO J24 (15): 2730-2740.
31. De Breakeleer ;M,C .Allard ; et al . 1998. « Correlation of sweat chloride concentration with genotypes in cystic fibrosis patients in Saguenay Lac-Saint–Jean;Quebec;Canada.Clin Biochem 31(1):33-36.
32. Denning; G.M.M.P. Anderson; et al. (1992).” Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature – sensitive.”
33. Du ;K;M; Sharma;et al.2005. “The Delta F508 cystic fibrosis mutation impairs domain – domain interaction and arrests post-translational folding of CFTR.” Nat Struct Mol Biol 12 (1): 17-25.
34. Guilbault ;C;J;P.Novak; et al.2006. Distinct pattern of lung gene expression in the CFTR-KO mice developing spontaneous lung disease compared with their littermate controls.”Physiol Genomics 25(2):179-193.
35. Holland ; K; A; and L . B.Holland (2005).”Adventures with ABC-proteins : highly conserved ATP- dependent transporters .” Acta Microbiol Immunol Hung 52 (3-4):309-322.

## Références bibliographiques

---

36. Lee.M.G., Wigley W.C; et al. 1999. « Regulation of Cl<sup>-</sup> /HCO<sup>3-</sup> exchange by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expressed in NIH 3T3 and HEK 293 cells.”J Biol Chem 274 (6) : 3414 -3421.
37. Lewis; H.A.X. Zhao; et al. (2005). Impact of the deltaF508 mutation in first nucleotide-binding domain of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator on domain folding and structure. Biol chem. 280 (2).
38. Li;Q.B.T. Lee; et al. (2005).” Genome-scal analysis of positional clustering of mouse testis –specific genes.”BMC Genomics 6 (1):7.
39. Linsdell;P.J.A.Tabcharani ; et al (1997) . Permeability of wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels to polyatomic anions .” J Gen physiol 110 (4):355-364.
40. Ott; C;J ; M . Suszko; et al (2009). “A complex intronic enhancer regulates expression of the CFTR gene by direct interaction with the promoter.”J cell Mol Med 13(4): 680-692.
41. Prince, L.S; R. B. Workman : Jr et al.(1997) . rapid endocytosis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel.” proc Natl Acad Sci USA 91(11): 5192-5196.
42. Smith; D.F.E. Galkina ; et al (2005). “GRO family chemokines are specialized for monocyte arrest from flow.”Am J Physiol Heart Circ physiol 289 (5): H 1976-1984.
43. Smith; A.N; M. Barth; et al . (1996).”A regulatory element in intron 1 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene.” J Biol Chem 271(17): 9947-9954.
44. Suzuki;M .T. Morita ; et al (2006). « Diversity of CL (-) Channels « Cell Mol Life Sci 63(1): 12-24.
45. Tabcharani .J.A.J.M.Rommens; et .al.1993.”Multi\_ion pore behaviour in the CFTR chloride channel. »Nature 366(6450):79\_82.
46. Thomas .P.J.Y.H.Ko;et . al.1992.”Altered protein folding may be the molecular basis of most cases of cystic fibrosis .”FEBS Lett 312 (1): 7-9.
47. Walsh D.E.B.J.Harvey ; et al.2000.CFTR regulation of intracellular calcium in normal and cystic fibrosis human airway epithelia .” J Membr Biol 177(33) : 209-219.
49. Becdelievre., A. Contribution à l’amélioration des connaissances sur la relation génotype-phénotype dans la mucoviscidose et caractérisation phénotypique de l’inflammation pulmonaire. Thèse de doctorat : génétique humaine. Université Paris-Est t-Val de Marne, 2011,13-31p.

## Références bibliographiques

---

59. Bonini., J. Identification d'éléments régulateurs du gène CFTR et applications pour lamucoviscidose. Thèse de doctorat : génétique moléculaire. Université Montpellier, 2015, 27p.
60. Drumm ML, Pope HA, Cliff WH, Rommens JM, Marvin SA, Tsui LC, Collins FS, Frizzell RA, Wilson JM. (1990) Correction of the cystic fibrosis defect in vitro by retrovirus-mediated gene transfer. *Cell* 62(6): 1227-33.
61. Aridor, M., S. I. Bannykh, et al. (1995). "Sequential coupling between COPII et COPI vesicle coats in endoplasmic reticulum to Golgi transport." *J Cell Biol* 131(4): 875-893.
62. Biwersi, J., N. Emans, et al. (1996). "Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activation stimulates endosome fusion in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(22): 12484-12489.
63. Boucher, R. C., T. Chinet, et al. (1991). "Ion transport in normal and CF airway epithelia." *Adv Exp Med Biol* 290: 105-115; discussion 115-108.
63. Bradbury, N. A., T. Jilling, et al. (1992). "Regulation of plasma membrane recycling by CFTR." *Science* 256(5056): 530-532.
64. Cutting, G. R. (2005). "Modifier genetics: cystic fibrosis." *Annu Rev Genomics Hum Genet* 6: 237-260.
65. De Braekeleer, M., C. Allard, et al. (1998). "Correlation of sweat chloride concentration with genotypes in cystic fibrosis patients in Saguenay Lac-Saint-Jean, Quebec, Canada." *Clin Biochem* 31(1): 33-36.
66. Denning, G. M., M. P. Anderson, et al. (1992). "Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive." *Nature* 358(6389): 761-764.
67. Du, K., M. Sharma, et al. (2005). "The DeltaF508 cystic fibrosis mutation impairs domain-domain interactions and arrests post-translational folding of CFTR." *Nat Struct Mol Biol* 12(1): 17-25.
68. Gambardella, S., M. Biancolella, et al. (2006). "Gene expression profile study in CFTR mutated bronchial cell lines." *Clin Exp Med* 6(4): 157-165.
69. Gabriel, S. E., L. L. Clarke, et al. (1993). "CFTR and outward rectifying chloride channels are distinct proteins with a regulatory relationship." *Nature* 363(6426): 263-268.
70. Gentleman, R., Carey, V., Huber, W. and Hahne, F. "genefilter: methods for filtering genes from microarray experiments."
71. Gething, M. J. and J. Sambrook (1992). "Protein folding in the cell." *Nature* 355(6355): 33-45.

## Références bibliographiques

---

72. Kunzelmann, K., R. Schreiber, et al. (2001). "Mechanisms of the inhibition of epithelial Na(+) channels by CFTR and purinergic stimulation." *Kidney Int*60(2): 455-461.
73. Lee, M. G., W. C. Wigley, et al. (1999). "Regulation of Cl<sup>-</sup>/ HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchange by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expressed in NIH 3T3 and HEK 293 cells." *J Biol Chem* 274(6): 3414-3421.
74. Linsdell, P. and J. W. Hanrahan (1998). "Glutathione permeability of CFTR." *Am J Physiol* 275(1 Pt 1): C323-326.
75. Loussouarn, G., S. Demolombe, et al. (1996). "Expression of CFTR controls cAMP-dependent activation of epithelial K<sup>+</sup> currents." *Am J Physiol* 271(5 Pt 1): C1565-1573.
76. Lukacs, G. L., A. Mohamed, et al. (1994). "Conformational maturation of CFTR but not its mutant counterpart (delta F508) occurs in the endoplasmic reticulum and requires ATP." *EMBO J* 13(24): 6076-6086.
77. Raychaudhuri, S., J. M. Stuart, et al. (2000). "Principal components analysis to summarize microarray experiments: application to sporulation time series." *Pac Symp Biocomput*: 455-466.
77. Roum, J. H., R. Buhl, et al. (1993). "Systemic deficiency of glutathione in cystic fibrosis." *J Appl Physiol* 75(6): 2419-2424.
78. Rozmahel, R., M. Wilschanski, et al. (1996). "Modulation of disease severity in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator deficient mice by a secondary genetic factor." *Nat Genet* 12(3): 280-287.
79. Schwiebert, E. M., T. Flotte, et al. (1994). "Both CFTR and outwardly rectifying chloride channels contribute to cAMP-stimulated whole cell chloride currents." *Am J Physiol* 266(5 Pt 1): C1464-1477.
80. Schwiebert, E. M., M. M. Morales, et al. (1998). "Chloride channel and chloride conductance regulator domains of CFTR, the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(5): 2674-2679.
81. Welsh, M. J. and A. E. Smith (1993). "Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis." *Cell* 73(7): 1251-125.
82. (Wang GS, Cooper TA. Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nat Rev Genet*. 2007) .
83. kits Cystic Fibrosis Genotyping Assay, Abbott ;Elucigene TMCF30 ; Gene-Probe ; INNO- Lipa CFTR, Innogenetics).

## Références bibliographiques

---

84. Drumm ML, Pope HA, Cliff WH, Rommens JM, Marvin SA, Tsui LC, Collins FS, Frizzell RA, Wilson JM. (1990) Correction of the cystic fibrosis defect in vitro by retrovirus-mediated gene transfer. *Cell* 62(6): 1227-33.
85. Knowles M, Gatzky J, Boucher R. (1983) Relative ion permeability of normal and cystic fibrosis nasal epithelium. *J Clin Invest* 71(5): 1410-7.
86. Harvey BG, Leopold PL, Hackett NR, Grasso TM, Williams PM, Tucker AL, Kaner RJ, Ferris B, Gonda I, Sweeney TD, Ramalingam R, Kovesdi I, Shak S, Crystal RG. (1999) Airway epithelial CFTR mRNA expression in cystic fibrosis patients after repetitive administration of a recombinant adenovirus. *J Clin Invest* 104(9): 1245-55.
87. Hyde SC, Southern KW, Gileadi U, Fitzjohn EM, Mofford KA, Waddell BE, Gooi HC, Goddard CA, Hannavy K, Smyth SE, Egan JJ, Sorgi FL, Huang L, Cuthbert AW, Evans MJ, Colledge WH, Higgins CF, Webb AK, Gill DR. (2000) Repeat administration of DNA/liposomes to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Ther* 7(13): 1156- 65.
88. Revues périodiques de l'association "Vaincre la mucoviscidose", 2011. Disponible sur: <https://sites.google.com/site/lamucoviscidoseettroislyceens/sommaire/iii-traitements-guerison->
89. The ZME Science newsletter. Massive database of of 1,500 stem cell lines derived from diseased cells set to aid drug development, 2005. Disponibl sur : <https://www.zmescience.com/research/stembanc-project-1500-stem-cell-lines/> (consulté le 07/06/2018).
90. Bossard., F. La mucoviscidose : Correction de la mutation DF508 par sur-expression de NHE-RF1 ; Modifications d'expression de NHE-RF1 et des récepteurs b-adrénergiques dans les poumons humains. Thèse de doctorat : Biologie. Université de NANTES, 2007, 78-93p.
91. Biochard D., P. Le Roy, H. levéziel, J.-M. Elsen. Utilisation des marqueurs moléculaires en génétique animale. 1998, INRA Prod. Anim.
92. Mhiri, M.-A. Grandbastien. Éléments transposables et analyse de la biodiversité végétale. Editeurs JF Morot-Gaudry et JF Briat. Editions INRA, Paris, 2004.

## Références bibliographiques

---

93. F. David et E. Turlotte, « An Isothermal Amplification Method », *Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences*, vol. 321, 1998.
94. C. Knoop, M. Dumonceaux, B. Rondelet, M. Estenne. 2010. Complications de la transplantation pulmonaire : complications médicales.
95. Moison., S. Etude des mécanismes de régulation à distance du gène CFTR. Thèse de doctorat : génétique génomique fonctionnelle et biotechnologies. Université BretagneOccidentale, 2014, 78p.
96. Romey M C.2006.Caractérisation fonctionnelle de mutants CFTR naturels : intérêt pour lamucoviscidose .*Annales de Biologie clinique*.5(64) : 429-37.
97. Ellgaard, L. and A. Helenius (2001). "ER quality control: towards an understanding at the molecular level." *Curr Opin Cell Biol* 13(4): 431-437.
98. Estivill, X., C. Bancells, et al. (1997). "Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. The Biomed CF Mutation Analysis Consortium." *Hum Mutat* 10(2): 135-154.
99. Gao, L., K. J. Kim, et al. (1999). "Abnormal glutathione transport in cystic fibrosis airway epithelia." *Am J Physiol* 277(1 Pt 1): L113-118.
100. Gelman, M. S., E. S. Kannegaard, et al. (2002). "A principal role for the proteasome in endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded intracellular cystic fibrosis transmembrane conductance regulator." *J Biol Chem* 277(14): 11709-11714.
101. Hill, A. E., J. S. Hong, et al. (2006). "Micro-RNA-like effects of complete intronic sequences." *Front Biosci* 11: 1998-2006.
102. Konstas, A. A., J. P. Koch, et al. (2003). "cAMP-dependent activation of CFTR inhibits the epithelial sodium channel (ENaC) without affecting its surface expression." *Pflugers Arch* 445(4): 513-521.
103. Kowalski, M. P. and G. B. Pier (2004). "Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to lipid rafts of epithelial cells is required for *Pseudomonas aeruginosa*-induced cellular activation." *J Immunol* 172(1): 418-425.
104. Kunzelmann, K., R. Schreiber, et al. (2000). "Control of epithelial Na<sup>+</sup> conductance by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator." *Pflugers Arch* 440(2): 193-201.
105. Kunzelmann, K., R. Schreiber, et al. (2001). "Mechanisms of the inhibition of epithelial Na<sup>(+)</sup> channels by CFTR and purinergic stimulation." *Kidney Int* 60(2): 455-461.

## Références bibliographiques

---

106. Mall, M., M. Bleich, et al. (1998). "The amiloride-inhibitable Na<sup>+</sup> conductance is reduced by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in normal but not in cystic fibrosis airways." *J Clin Invest* 102(1): 15-21.
107. Schekman, R. and L. Orci (1996). "Coat proteins and vesicle budding." *Science* 271(5255): 1526-1533.
108. Schena, M., D. Shalon, et al. (1995). "Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray." *Science* 270(5235): 467-470.
109. Schreiber, R., R. Greger, et al. (1997). "Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activates water conductance in *Xenopus* oocytes." *Pflugers Arch* 434(6): 841-847.
110. Wang, X., J. Matteson, et al. (2004). "COPII-dependent export of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from the ER uses a di-acidic exit code." *J Cell Biol* 167(1): 65-74.
111. Ward, C. L., S. Omura, et al. (1995). "Degradation of CFTR by the ubiquitinproteasome pathway." *Cell* 83(1): 121-127.