

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ MENTOURI CONSTANTINE

Faculté des Sciences de
la Nature et de la Vie

Département de Biologie
Animale

N° d'ordre : 122 / Mag / 2008

N° de série : 003 / CH / 2008

Mémoire présenté pour l'obtention du diplôme de Magister
Option : Génétique des Pathologies Humaines

Thème :

**RECHERCHE DE LA MUTATION $\Delta F508$ DU GÈNE CFTR DANS
LA POPULATION DE CONSTANTINE**

Par : SEDRATI Khadidja

Soutenu le 03 / 05 / 2008

Devant le jury :

Président : BEN LATRECHE. C : Professeur à la faculté de Médecine,
Constantine.

Rapporteur : NAIMI. D : Professeur à l'université Mentouri, Constantine.

Examineurs :

ABADI. N : Professeur à la faculté de Médecine, Constantine.

SATTA. D : Professeur à l'université Mentouri, Constantine.

YAHIA. M : Maître de Conférence à la faculté de Science de la Nature
université de Batna.

Année Universitaire : 2007/2008

Dédicaces

*À ma mère pour les grandes sacrifices qu'elle a
enduré à cause de moi, je lui souhaite une
longue vie*

À mes frères : Mohamed, Fares, Bilel, Lazher

À mes sœurs: Farida, Hassina, Rafiaa et Soraya

À mes belles sœurs : Karima, Wassila, Fadia

Sans oublier tous mes nièces et neveux

À MIDOU le petit bébé

Je dédit cet humble travail

WISSEM

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier tous les membres du Conseil Pédagogique du Magistère: Pr. BENLATRACHE. C , Pr. ABADI. N, Pr. SATTA. D, Pr. NAIMI.D de nous offrons l'opportunité pour la formation en Génétique des Pathologies Humaines.

Ce travail a été réalisé sous l'ingéniosité et sage direction de Madame NAIMI.D Professeur au département des Sciences de la Nature et de la vie, la progression de ce travail doit beaucoup à son enthousiasme, ses compétences, ses conseils judicieux, ses critiques constructives et orientations.

Mes vifs remerciements au Professeur BENLATRACHE. C Directrice de laboratoire biochimie (CHUC) et unité de recherche d'avoir accepté de juger ce travail et m'honorer de sa présidence du jury.

Au Professeur ABADI. N Directeur de laboratoire de biologie et génétique moléculaire au CHUC pour m'avoir permis de réaliser ce travail et d'avoir accepter de l'examiner. Qu'il trouve ici le témoignage de ma haute considération et de mon profond respect.

Au Professeur SATTA. D du département des Sciences de la Nature et de la vie et responsable de la filière de Génétique pour son dévouement, suivi et encouragements durant toute notre formation. Merci d'avoir bien voulu juger ce travail.

A Monsieur YAHIA. M , Maître de Conférence à la faculté de Science de la Nature université de Batna d'avoir bien accepté de juger ce travail

Au Dr SIFI.K pour son suivi et conseils durant la réalisation de ce travail.

Mes remerciements également A tout le personnel de laboratoire de Biologie et Génétique Moléculaire notamment M^{me} Zoubida chef de service, Yasmina, Mr Boulekroun.Z, Mr Brihmat.A et Belloum.F pour leurs aides, encouragements et disponibilité.

Un grand merci à toutes mes amies particulièrement: Djalila, Zeineb, Warda, Mouna, Hiba, Manel , Abl, Messaouda sans oublier tous mes collègues de promotion.

Table des Matières

Liste des abréviations
Liste des figures
Liste des tableaux

Introduction1

Partie bibliographique

Chapitre 1 : Physiopathologie de la mucoviscidose

1- Historique	3
2- Manifestations cliniques.....	4
2-1- Manifestations digestives	4
2-2- Manifestations respiratoires	6
2-3- Manifestations hépatobiliaire	8
2-4- Manifestations génitales.....	9
2-5- Les anomalies des glandes sudoripares	9
2-6- Autres manifestations	10
3- Prise en charge des patients.....	11
3-1- Prise en charge respiratoire	11
3-1-1- La kinésithérapie.....	11
3-1-2- L'antibiothérapie	12
3-1-3- La greffe pulmonaire	12
3-2- Prise en charge nutritionnelle.....	12

Chapitre 2 : Génétique de la mucoviscidose

1- Principales étapes de localisation de gène CFTR.....	14
2- Le Gène CFTR.....	16
2-1- Localisation et caractéristiques	16
2-2- Les mutations	18
3- La protéine CFTR	22
4- Les fonctions de la protéine CFTR.....	23
4-1- CFTR est un canal chlore AMPc dépendant.....	23
4-2- CFTR régulateur du fonctionnement d'autres canaux ioniques	24
4-3- Autres fonctions.....	25

5- Les différentes classes de mutations et leurs conséquences sur la fonction de la protéine CFTR.....	26
5-1- Classe I : Mutations altérant la production de la protéine :.....	26
5-2- Classe II : Mutations perturbant le processus de maturation cellulaire de la protéine.....	27
5-3- Classe III : Mutations perturbant la régulation du canal Cl ⁻	27
5-4- classe IV : Mutations altérant la conduction du canal Cl ⁻	27
5-5- Classe V : Mutations influençant la quantité d'ARNm ainsi que la quantité de protéines fonctionnelles.....	27
5-6- Classe VI : mutations affectant la stabilité de la protéine.....	28
6- La mutation ΔF508.....	28
7- Les corrélations phénotype – génotype.....	29
7-1- Corrélation atteinte digestive – génotype.....	30
7-2- Corrélation atteinte respiratoire et génotype.....	31
7-3- Corrélation avec absence bilatérale congénitale des canaux déférents.....	31
7-4- Les facteurs modificateurs.....	32
7-4-1- Etude d'une région candidate.....	32
7-4-2- Etude des gènes candidats.....	33
7-4-2-1- La manose binding lectin.....	33
7-4-2-2- Le monoxyde d'azote.....	33
7-4-2-3- Le transforming growth factor-β.....	34
7-4-2-4- Tumor Necrosis Factor-α.....	34
7-4-2-5- Antigènes HLA.....	34
7-4-2-6- α-1 antitrypsine.....	35
 Chapitre 3 : Diagnostic de la mucoviscidose	
1- Diagnostic biologique.....	37
1-1- Le test de la sueur.....	37
1-1-1- Stimulation de la sudation.....	37
1-1-2- Recueil de la sueur.....	38
1-1-3- Dosage du chlorure dans la sueur.....	38
1-1-4- Interprétation de résultats.....	39
1-2- Dosage de la trypsine immunoréactive (TIR).....	39
1-3- Mesure de la différence de potentiel trans-épithéliale nasale.....	40
2- Diagnostic moléculaire.....	41
2-1- l'approche directe de diagnostic.....	41
2-2- l'approche indirecte de diagnostic.....	44
3- Place du conseil génétique.....	44
3-1- Parents d'enfants atteints.....	45
3-2- Couples dont un des membres est apparenté à un sujet atteint.....	45
3-3- Suspicion anténatale sur signe d'appel échographique.....	45

Chapitre 4 : Essais sur la thérapie génique

1- Les vecteurs viraux	47
1-1- Les rétrovirus.....	47
1-2- Les adénovirus.....	47
1-2- Les AAV (Adeno Associated Virus)	49
2- Les vecteurs non viraux ou synthétiques.....	49
2-1- L'ADN nu.....	50
2-2- Les liposomes.....	50

Partie pratique

Matériels et méthodes

I- Matériel d'étude.....	52
II- Méthodes d'étude.....	53
1- Extraction d'ADN.....	53
2- Contrôle qualitatif et quantitatif d'ADN.....	53
3- Stratégie de détection de mutation $\Delta F508$	54
3-1- Amplification du fragment d'intérêt par PCR.....	54
3-2- Contrôle de produits PCR.....	56
3-3- Migration sur gel de polyacrylamide 12 %.....	57
Résultats	60
Discussion	63
 Conclusion	 68
Annexes.....	69
Bibliographie	

Liste des abréviations

- AAV:** Adeno Associated Virus
- ABC:** ATP Binding Cassette
- ABCD:** Absence Bilatérale Congénitale des canaux Déférents
- AdCFTR:** vecteur adénoviral contenant l'ADNc du gène CF
- ADN:** Acide Désoxyribo-Nucléique
- ADNc:** Acide Désoxyribo-Nucléique complémentaire
- ADP:** Adénosine Di-Phosphate
- AMPc:** Adénosine Mono Phosphate-cyclique
- AP-PCR:** Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction
- ARMS:** Amplification Refractory Mutation System
- ARNm:** Acide Ribo-Nucléique messenger
- ASO:** Allele Specific Oligonucleotide
- BBP :** Bleu de Bromophénol
- BET:** Bromur d'Ethidium
- CF:** Cystic Fibrosis
- CFGAC:** Consortium International d'Analyse Génétique de la Mucoviscidose
- CFTR:** Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
- cM:** centi Morgan
- DDP:** Différence De Potentiel nasal
- DGGE:** Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
- DHPLC:** Denaturing High Performance Liquid Phase Chromatography
- EDTA:** Ethylene Diamino Tetra Acétique acide
- EnaC:** Epithelial Na⁺ Channel)
- EPCP:** Electrophorèse en Champ Pulsé
- GSTM1:** Glutathion-S-Transférase-M1
- HET:** Heteroduplex analysis
- IL:** Interleukine
- IPE:** Insuffisance Pancréatique Exocrine
- Kb:** Kilobase
- LDR:** Multi Drug Resistance
- MBL:** Manose Binding Lectin
- mEq:** milliéquivalents
- mmol:** millimoles
- mn:** minutes
- mV:** milli-Volts
- NBD:** Nucléotide Binding Domain
- nm:** nanomètre
- NO:** Monoxyde d'azote
- NOS:** Monoxyde d'azote synthases
- ORCC:** Outwardly Rectifying Chloride Channel

pb: paires de bases
PCR: Polymerase Chain Reaction
PKA: Protéine Kinase A
PON: paraxonase
qsp: quantité suffisante pour
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphisme
rhDNase: recombinant humain Dnase
ROMK : inwardly rectifying ATP-sensitive renal potassium channel
rpm: tours par minutes
SDS: Sodium Dodecyl Sulfate
sec: secondes
SNP: Single Nucleotide Polymorphism
SP: Suffisance pancréatique
SSCP: Single Strand Conformation Analysis
TBE: Tris Borate EDTA
TE: Tris EDTA
TGF- β : Transforming Growth Factor- β
TIR: Trypsine Immuno Réactive
TMD: Trans Membrane Domaine
TNF: Tumor Necrosis Factor
TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α
UV: Ultra Violet

Liste des Figures

Figure 1 : Les organes cibles de la mucoviscidose.....	3
Figure 2 : Evacuation du mucus par les mouvements des cils.....	7
Figure 3 : Présentation de l'anomalie des glandes sudoripares.....	10
Figure 4 : Les principaux marqueurs du gène CFTR.....	15
Figure 5 : Les principales étapes de localisation du gène CFTR.....	15
Figure 6 : Localisation et structure du gène CFTR.....	17
Figure 7 : Variation de la séquence dans l'intron 8 du gène CFTR et son effet sur le taux d'ARNm.....	18
Figure 8 : Distribution des mutations dans le gène CFTR.....	20
Figure 9 : Représentation schématique de la protéine CFTR.....	22
Figure 10 : CFTR, une protéine multifonctionnelle.....	25
Figure 11 : Les différentes classes de mutation du gène CFTR.....	26
Figure 12 : La mutation $\Delta F508$	28
Figure 13 : Corrélation génotype, taux de protéine CFTR fonctionnelle et phénotype.....	30
Figure 14 : Stimulation de la sudation.....	38
Figure 15 : Transfert du gène CFTR.....	46
Figure 16 : Schémas de la construction d'un AdCFTR.....	48
Figure 17 : Les mécanismes d'entrée des complexes ADN-liposome-plasmide (A) entrée par fusion, (B) entrée par endocytose.....	51
Figure 18 : Contrôle de la qualité d'amplification sur gel d'agarose 2 %.....	57
Figure 19 : Photos de cuve d'électrophorèse tremostatée verticale utilisée lors de notre dépôt des produits d'amplification	59
Figure 20 : Révélation sur gel de polyacrylamide 12 % pour les patients P1, P2, P3, P4.....	61
Figure 21 : Révélation sur gel de polyacrylamide 12 % pour les patients P5, P6, P7, P8.....	61
Figure 22 : Présentation de la fréquence de la mutation $\Delta F508$	62

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Les statistiques selon le type de mutation.....	19
Tableau 2 : Statistique des mutations selon la région chromosomique.....	21
Tableau 3 : Symptômes cliniques évocateurs de mucoviscidose.....	36
Tableau 4 : avantages et limites des méthodes de détection des mutations du gène CFTR.....	43
Tableau 5 : Les patients.....	52
Tableau 6 : Composants de réaction PCR.....	55
Tableau 7 : Concentration en polyacrylamide en fonction de la taille des fragments à séparer.....	58
Tableau 8 : Résultats d'enquêtes et le génotypage des patients.....	60

Introduction :

La mucoviscidose ou *Cystic Fibrosis* (CF) selon la terminologie anglo-saxon, est une maladie héréditaire autosomique récessive touchant aussi bien les garçons que les filles, et qu'elle se manifeste uniquement lorsqu'une personne possède les deux allèles déficients à la fois, les hétérozygotes sont indemnes.

L'étymologie du nom de cette maladie vient de « Muco » : pour mucus qui veut dire glaire, et « Visci » : pour visqueux qui veut dire gluant et collant, car tous les symptômes de la mucoviscidose s'expliquent par un seul mécanisme : la production de sécrétions trop visqueuses, elles sont collantes et obstruent les glandes qui produisent le mucus.

Elle est liée à des mutations du gène CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator). Ces mutations entraînent des dysfonctionnements de la protéine CFTR (produit du gène) qui est un canal chlore (Cl⁻) s'exprimant dans de nombreux tissus épithéliaux. Ce canal Cl⁻ défectueux et responsable de l'épaississement du mucus.

L'incidence de la maladie varie selon l'origine géographique et ethnique, elle est de l'ordre de 1/2000 – 1/3000 nouveau né en Europe; à savoir 1/3500 au nord de l'Amérique (Bobadilla Joseph L, 2002). Cette fréquence diminue dans les populations noires (1/7056), et est plus faible chez les populations de la méditerranée (WHO, 2002).

La mutation $\Delta F508$ est considérée comme la mutation la plus fréquente car présente en moyenne dans 70% des allèles CF, avec un gradient décroissant entre le Nord et le sud en Europe (Marie Des Georges, 1998).

Malgré les grandes avancées scientifiques sur la mucoviscidose dans de nombreux pays, même voisins, comme la Tunisie et le Maroc, vu le nombre de thèmes de recherches abordés dans ces pays sur le gène CFTR, les mutations existantes et en particulier la fréquence d'une $\Delta F508$, la thérapie génique, la protéine CFTR et approches pharmacologiques, transplantation et recherches cliniques, en Algérie les recherches sur cette maladie ne sont qu'à leurs débuts.

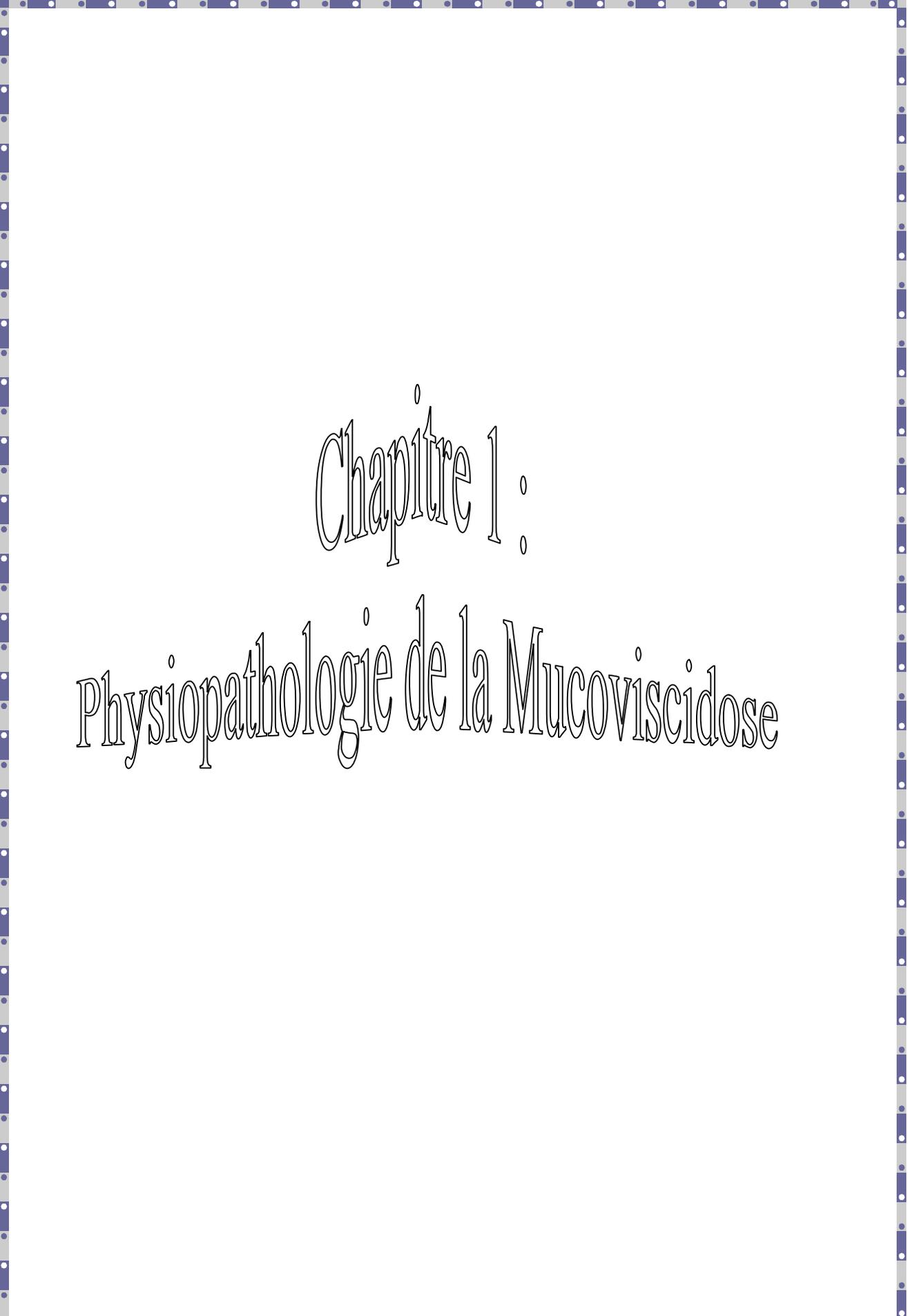
A cet effet notre contribution à travers ce travail s'inscrit dans le cadre d'une recherche de la mutation $\Delta F508$ du gène CFTR dans la population de Constantine.

Notre travail à pour objectif :

- Acquérir et maîtriser les outils de biologie moléculaire.
- Etudier des cas posant un problème diagnostique associant ou non un test de la sueur.
- Réaliser un interrogatoire des patients afin de construire leurs arbres généalogiques et connaître l'histoire familiale de la maladie.
- Rechercher la mutation $\Delta F508$ du gène CFTR au sein d'une population constantinoise.
- Déterminer la fréquence de cette délétion.
- Etablir une éventuelle relation entre la présence de la mutation $\Delta F508$ et le phénotype CF afin de permettre une prise en charge adéquate pour les patients CF.

Partie

Bibliographique



Chapitre 1 :

Physiopathologie de la Mucoviscidose

La mucoviscidose est une affection héréditaire très polymorphe, le défaut génétique à l'origine de cette maladie perturbe le fonctionnement de plusieurs organes conséquence des localisations multiples des différentes sécrétions épithéliales de l'organisme (Figure1). L'absence, l'insuffisance ou le dysfonctionnement de la protéine CFTR, produit du gène, altère la perméabilité au chlore et au sodium de la membrane apicale des cellules épithéliales de l'appareil respiratoire, du tube digestif, du tractus génital, mais également des glandes sudoripares entraînant des perturbations hydro-électrolytique, à l'origine de l'hyperviscosité des sécrétions muqueuses.

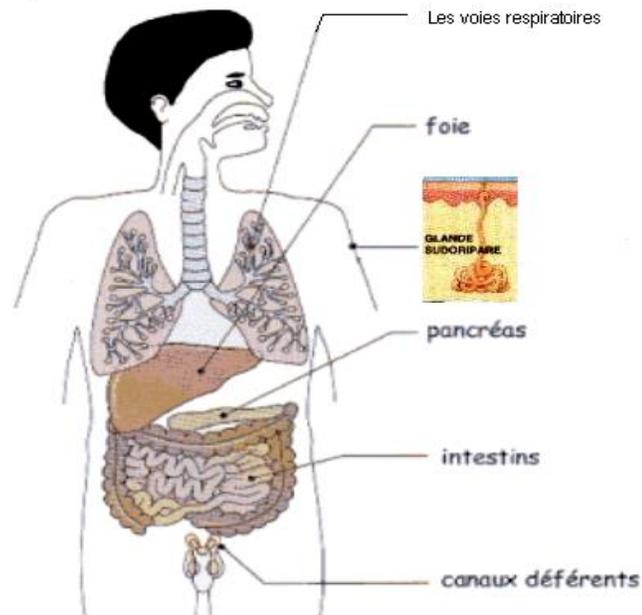


Figure 1 : Les organes cibles de la mucoviscidose

1- Historique :

La première description médicale précise de la maladie remonte à 1595. Elle a été faite par Pieter Paw, professeur d'anatomie et de botanique de Leiden (Pays-Bas) dans un ouvrage intitulé *Observationes Anatomicae Selectiores* quand il a procédé à l'autopsie d'une fillette de onze ans, disant ensorcelée. Le décès avait été causé par le pancréas, qui était particulièrement tuméfié ; il se trouvait tout près du renflement du foie, de telle sorte qu'on aurait pu croire, au toucher, qu'il s'agissait d'un squirre (sorte de cancer de consistance dure et ligneuse). La fillette était décharnée, épuisée par une fièvre hectique. Depuis, quelques observations ont été faites et rapportées au cours des siècles, évoquant d'autres cas de squirre du pancréas, des patients atrophiés, des écoulements de méconium dans la cavité abdominale, des occlusions intestinales, des prolapsus rectaux chez des

enfants souffrant de diarrhée grave et prolongée. Le goût salé qu'aurait le front de certains enfants faisait penser qu'ils étaient ensorcelés, ou victimes de mauvais sorts. Une superstition qui a traversé les siècles (Busch R, 2005).

En 1936, le pédiatre suisse Guido Fanconi von Grebel et ses collaborateurs, Uehlinger et Knauer, publièrent une première description de la maladie, en lui donnant le nom de « *Fibromatose Kystique du Pancréas et Bronchiectasies* ». La pathologiste américaine Dorothy Andersen donna la description anatomopathologique complète sur des pièces autopsiques d'une lésion pancréatique spéciale et employa en 1938 le terme « *Fibrose Kystique du Pancréas* ». En 1944, Faber fit observer que le fonctionnement anormal des glandes exocrines serait la base de la majorité des symptômes cliniques et utilisa le terme « *mucoviscidose* ». C'est en 1946 qu'Andersen et Hodges ont démontré pour la première fois que cette maladie est génétique, et résulte d'un modèle autosomale récessif de transmission (Quinton PM, 1999).

C'est en 1953 que le professeur Di Sant'Agenese découvra, à l'occasion d'une vague de chaleur à New York, l'élévation de la teneur en chlore et en sodium dans la sueur des sujets atteints de mucoviscidose en constatant le nombre élevé d'enfants déshydratés. Des travaux ultérieurs ont montré que la cellule glandulaire sudoripare sécrète une solution saline isotonique, le chlorure de sodium (NaCl) qui est ensuite réabsorbé le long du canal sudoripare. Cette réabsorption est limitée dans la mucoviscidose, ceci aboutit donc à un syndrome de perte de sel sudoral.

Les données biologiques et pathologiques ont joué un rôle important, en montrant que la pathogenèse de la mucoviscidose était liée à un défaut de transport des ions chlore à travers la membrane apicale des cellules épithéliales. Dans les années 80, l'anomalie du transport de sels fut précisée par Quinton qui décrivit le défaut de perméabilité aux ions chlore affectant les cellules épithéliales des glandes sudoripares, et par Knowles qui observa le même phénomène au niveau de l'épithélium respiratoire.

2- Manifestations cliniques :

2-1- Manifestations digestives :

Le pancréas sécrète des sucs digestifs, dits sucs pancréatiques, qui contiennent les enzymes nécessaires à la digestion des aliments, et du bicarbonate de sodium. Chez les patients CF, le pancréas est atteint et ne peut plus jouer son rôle : l'hyperviscosité du suc pancréatique provoquant l'obstruction canalaire avec dilatation pseudo kystique d'amont et

constitution progressive d'une fibrose cicatricielle en lieu, de plus, en raison de la viscosité du mucus, les enzymes ne sont pas acheminées vers l'intestin. La digestion des protéines et des graisses ne peut donc plus se faire correctement et des troubles digestifs surviennent.

Les manifestations digestives expriment d'une part l'insuffisance pancréatique exocrine (IPE) et d'autre part, les propriétés physiques des selles. Les déclarations initiales de la mucoviscidose sont constituées par un iléus méconial chez le nouveau né dans 10 à 20 % des cas (occlusion aigue intestinal néonatale due à un méconium épais) ; chez le nourrisson le prolapsus rectal est toujours évocateur (Lai HC et al, 2000).

En dehors de la période néonatale, chez l'enfant plus souvent chez l'adulte, un syndrome d'obstruction intestinale distale, qui est une occlusion de même nature, peut survenir réalisant un iléus stercoral pouvant se compliquer d'invagination, il associe des douleurs abdominales, des vomissement et des épisodes de diarrhées et constipations.

La symptomatologie la plus classique de l'atteinte digestive est indiquée par l'IPE, qui s'exprime chez environ 85 à 90 % des patients CF, elle est responsable d'une diarrhée chronique avec une stéatorrhée c'est-à-dire l'émission de selles anormalement grasses, volumineuses et nauséabondes. Cette diarrhée chronique de mal digestion est responsable de l'hypotrophie pondérale puis staturale qui contraste d'ailleurs chez le nourrisson avec un appétit conservé. Cette mauvaise digestion, objectivée par la mesure de la stéatorrhée, s'accompagne de carences secondaires vitaminique notamment en vitamines liposolubles : A D E K et oligoéléments.

La fibrose pancréatique peut s'étendre aux îlots de Langherans où apparaît alors un diabète sucré insulino-dépendant. La fréquence de diabète insulino-dépendant augmente nettement avec l'âge passant de 1% à l'âge de 10 ans à plus de 10% chez les patients de plus de 25 ans (Lanngs S et al, 1995). Des poussées de pancréatite aiguë peuvent exceptionnellement survenir.

Le reflux gastro-oesophagien est essentiellement une complication de la bronchopneumopathie chronique. Il est en règle acquis, lié à l'emphysème pulmonaire et aux modifications du gradient de pression abdomino-thoracique (quintes de toux). L'incidence du reflux gastro-oesophagien peut atteindre jusqu'à 30% des patients CF (Ledson MJ et al, 1998).

Il faut cependant noter qu'il existe deux catégories de patients porteurs d'une forme classique de mucoviscidose : la première étant les IPE qui associent notamment des

troubles digestifs et des problèmes respiratoires, la deuxième est celle des insuffisants pancréatiques (SP) qui ne souffrent que de problèmes respiratoires.

Même si les problèmes respiratoires sont le plus souvent directement responsables de la mortalité, les troubles digestifs ne doivent pas être négligés car ils peuvent avoir de lourdes conséquences pour le patient, notamment l'apparition de carences alimentaires et par conséquent de retard de croissance.

2-2- Manifestations respiratoires :

Cause majeure de la morbidité et de la mortalité, les manifestations respiratoires sont responsables de 90% des décès des patients CF (Huchon G, 2001).

La physiopathologie de l'atteinte respiratoire est complexe et prédominante. La compréhension actuelle des mécanismes impliqués dans son développement retient deux facteurs essentiels : un processus inflammatoire majeur et excessif, et une colonisation microbienne essentiellement à *Pseudomonas aeruginosa*.

Chez une personne saine, les cellules pulmonaires produisent un mucus fluide qui tapisse les voies respiratoires. Des corps étrangers, tels que les microbes, les bactéries et les particules de poussière, viennent se déposer sur ce mucus et y sont retenus prisonniers. Grâce aux mouvements des cils vibratiles des cellules de l'épithélium pulmonaire, le mucus quitte les bronches et remonte ensuite vers la gorge pour être évacué par la bouche. Ce mucus constitue donc un élément important et nécessaire à la propreté et au nettoyage des voies respiratoires.

Chez une personne atteinte de mucoviscidose, les sécrétions deviennent abondantes, plus visqueuses et collantes ; ce qui rend son évacuation très difficile induisant une obstruction bronchique. (Figure 2)

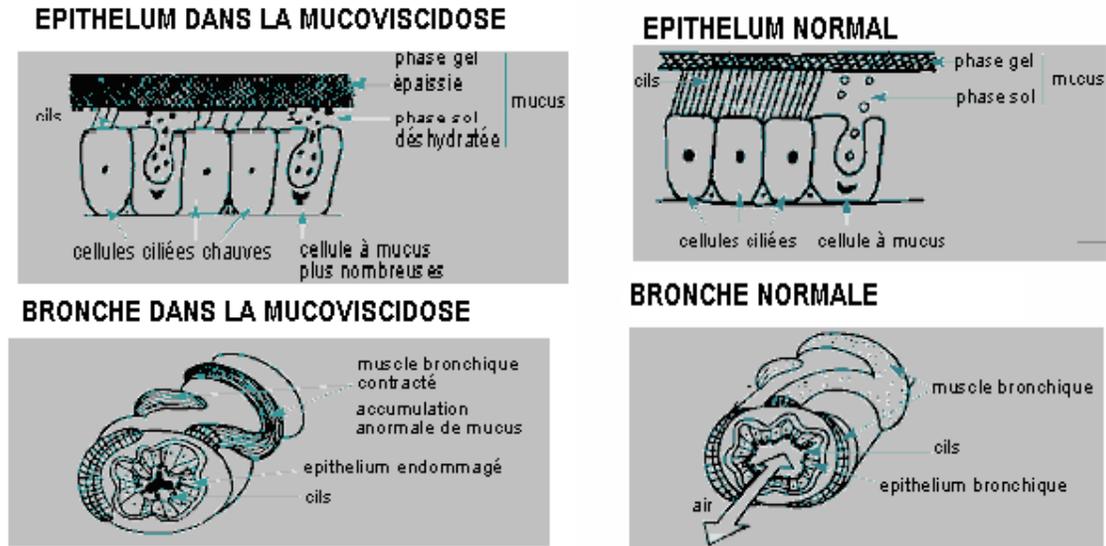


Figure 2 : Evacuation du mucus par les mouvements des cils.

Les lésions pulmonaires initiales débutent au niveau des petites voies aériennes, ensuite surviennent une obstruction, bronchiolites et des bouchons muco-purulents. L'arbre bronchique est rapidement infecté et colonisé mais le type de colonisation bronchique est évolutif avec l'âge selon une séquence stéréotypée. Il s'agit d'*Haemophilus influenzae*, puis à un âge plus avancé *Staphylococcus aureus* et enfin *Pseudomonas aeruginosa* qui apparaît vers l'âge de 8 à 10 ans (Pin I et al, 2000). Un autre germe tient une place à part : *Burkholderia cepacia* qui a été décrit au début des années 80, par une publication des données épidémiologiques nord-américaines puis anglaises faisant état d'une nette et régulière augmentation de la prévalence de cette bactérie parmi les patients atteints de mucoviscidose (patients CF) (Chabanon G et al, 1997). Ces germes sont identifiés par l'étude cyto bactériologique de l'expectoration.

Certaines caractéristiques de l'infection bronchique à *P.aeruginosa* sont propres à la mucoviscidose. L'histoire naturelle de la colonisation semble débiter par une implantation de la souche au niveau de la cavité buccale et des voies aériennes supérieures, suivie d'une colonisation trachéo-bronchique, parfois très rapide par rapport à la primo colonisation. Elle est due à une adaptation phénotypique du germe à l'environnement spécifique des bronches de ces patients. Cette adaptation phénotypique se résume par la production d'une grande quantité d'exopolysaccharides qui répondent à la définition d'alginate et qui confèrent à la bactérie le caractère mucoïde constituant un facteur de virulence. L'instabilité phénotypique de *P.aeruginosa* est bien démontrée par des techniques de

biologie moléculaire telles que l'électrophorèse en champ pulsé (EPCP) et AP-PCR (*Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction*) qui ont permis de démontrer que les états de colonisation chronique correspondaient le plus souvent à un génotype dominant persistant et que l'acquisition de résistance aux antibiotiques correspond rarement à une substitution de souches (Pin I et al, 2000).

Le syndrome respiratoire est peu spécifique avec **une toux chronique**, sèche, quinteuse, Une pathologie rhino sinusienne qui augmente avec l'âge s'y associe : **sinusite chronique**, **polypose nasale**, surdité de transmission (Clément A, 1998).

L'atteinte bronchopulmonaire évolue par poussées qui conduisent en quelques mois ou plusieurs dizaines d'années à l'insuffisance respiratoire voire au coeur pulmonaire chronique.

2-3- Manifestations hépatobiliaire :

La cirrhose hépatique est décrite comme une complication de la mucoviscidose depuis 1938 ; jusqu'à ces dernières années, l'importance de l'atteinte hépatique semblait secondaire par rapport à la gravité de l'atteinte respiratoire et, à un degré moindre, à celle de l'atteinte pancréatique.

Les raisons expliquant que les sujets CF développent ou pas une atteinte hépatique, restent à définir avec certitude ; les facteurs de risques ont été recherchés. Seul un antécédent d'iléus méconial ou de syndrome d'obstruction intestinal distal apparaît significativement liée au risque de cirrhose ultérieur (Colombo C et al, 1994). De plus il apparaît que l'atteinte hépatique est indépendante du reste des atteintes de la mucoviscidose.

L'atteinte hépatique se caractérise par l'accumulation d'un matériel granuleux éosinophile dans les canalicules biliaires intra hépatique.

La cirrhose biliaire focale est pathognomonique de la mucoviscidose, elle est représentée dans environ 10 à 15 % des cas (Labrune P, 1997). Histologiquement, on trouve une prolifération des canaux biliaires, des bouchons de mucus dans la lumière des canaux biliaires et une fibrose d'intensité variable. Ces lésions initialement en foyers progressent avec l'évolution de la maladie pour aboutir à une cirrhose biliaire multilobulaire. Il faut préciser que ces lésions sont habituellement muettes cliniquement. L'attention doit être attirée par l'existence d'une hépatomégalie (grand foie), l'atteinte hépatique ne peut être

reconnue qu'au stade des complications : insuffisance hépatobiliaire avec varices oesophagiens. Par ailleurs, les lithiases vésiculaires sont plus souvent observées avec la prolongation de la survie.

2-4- Manifestations génitales:

Un retard pubertaire put s'observer aussi bien chez les garçons que chez les filles dans les formes évoluées de la maladie.

Les malades ne sont pas réellement stériles car leurs organes génitaux sont fonctionnels (Phillipson G, 1998).

♂ Les hommes sont stériles dans plus de 95 % des cas, en raison d'une azoospermie obstructive. Il existe une atrésie ou une absence des canaux déférents, des vésicules séminales, du corps et de la queue de l'épididyme. Cependant, les testicules sont habituellement normaux, la spermatogenèse reste active mais on note une augmentation des formes anormales et immatures de spermatozoïdes, cette dernière peut être liée à une dénutrition chronique, possible pendant l'enfance ou l'adolescence. L'examen du sperme des patients CF comparé à celui de témoins fertiles montre, outre l'azoospermie, un volume de l'éjaculat diminué, une acidité augmentée et un taux de fructose abaissé. Deux hypothèses ont été évoquées pour expliquer les lésions des déférents : un état malformatif se constitue vers la 10^{ème} semaine de la gestation au moment de la transformation du canal de Wolf, ou bien une atrésie consécutive à une obstruction de la lumière des canaux par un mucus épais. Cette dernière hypothèse semble prévaloir au niveau de la tête des épидидymes et conséquemment au niveau des canaux déférents (Tizzano EF et al, 1994).

♂ Chez la femme, il n'y a pas d'anomalie morphologique de l'appareil génital. La fertilité est néanmoins diminuée en raison de modifications physicochimiques de la glaire cervicale qui est épaissie, pauvre en eau et qui gêne la migration intra-utérine des spermatozoïdes.

2-5- Les anomalies des glandes sudoripares :

Les glandes sudoripares responsables de la transpiration sont tapissées de cellules épithéliales. Ces cellules s'occupent du transport du sodium ainsi que le chlore. Chez le patient CF les canaux sont déficients, de ce fait les ions chlore étant emprisonnés (Figure

3). L'accumulation de Cl^- va entraîner une absorption en excès des ions Na^+ , il y'aura donc la formation de NaCl (sel), la transpiration sera donc plus salée que la normale (une concentration élevée en sel dans la sueur). De plus les patients se déshydrateront beaucoup plus vite.

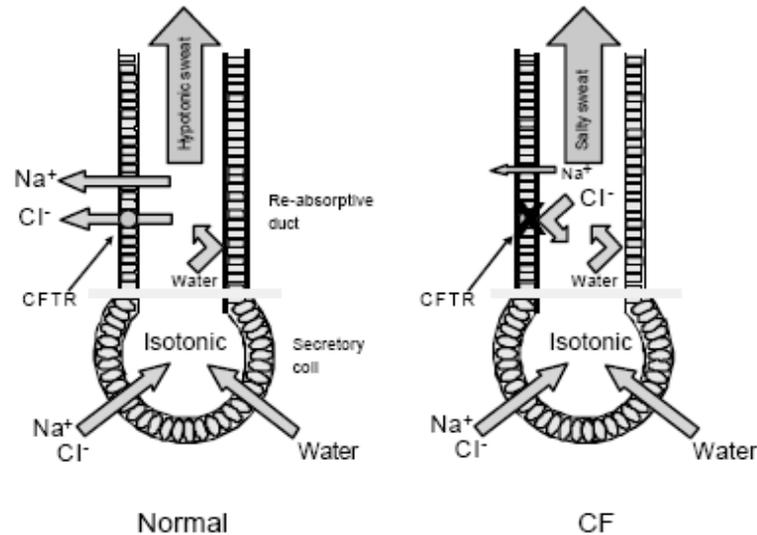


Figure 3 : Présentation de l'anomalie des glandes sudoripares (Hull J, 2003)

2-6- Autres manifestations :

- † Manifestations ORL : Des rhinopharyngites peuvent accompagner les manifestations bronchiques. Des polypes nasaux sont retrouvés chez 20 % des patients.
- † Manifestations cardio-vasculaires : Les atteintes cardiaques les plus fréquentes sont secondaires à l'hypoxie, réalisant une défaillance cardiaque aiguë lors de poussée évolutive, ou un tableau de coeur pulmonaire chronique. Des myocardopathies par fibrose ont été décrites chez le nourrisson, probablement d'origine métabolique.
- † Manifestations rhumatismales : Elles sont plus fréquentes chez l'adolescent et l'adulte, avec une prévalence estimée à 9%. Les arthralgies siègent, de manière bilatérales et symétrique aux genoux et aux chevilles, parfois aux poignets et aux coudes. Elles peuvent survenir dans l'évolution de la mucoviscidose, en premier lieu dans le cadre de l'ostéoarthropathie hypertrophiante pneumatique et évoluent alors avec les poussées de surinfections pulmonaires. Mais de véritables arthrites sans parallélisme avec l'évolution respiratoire sont possibles.

3- Prise en charge des patients :

Dans les paragraphes précédents, il apparaît que la mucoviscidose est une maladie qui touche plusieurs organes et nécessite une prise en charge globale des patients. La mobilisation d'une équipe pluridisciplinaire est indispensable : médecins, généticiens, kinésithérapeutes, infirmières, psychologues, diététiciennes....etc.

Les traitements actuels ne sont que symptomatiques c'est-à-dire qu'ils luttent contre l'encombrement bronchique, contre les infections et l'évolution trop rapide de la maladie, contre la malnutrition. Mais aucun traitement ne guérit la maladie aujourd'hui.

3-1- Prise en charge respiratoire :

La prise en charge respiratoire repose essentiellement sur la kinésithérapie respiratoire et le traitement anti-infectieux :

3-1-1- La kinésithérapie :

Le principe est de mobiliser puis éliminer les sécrétions bronchiques ; Il nécessite une formation spécialisée du personnel assurant cet acte.

Pour liquéfier les sécrétions, on utilise les aérosols et les vibrations manuelles. Les aérosols peuvent être employés pour hydrater les sécrétions par simple humidification ou nébuliser des molécules mucolytiques qui peuvent être utiles lorsque, malgré un encombrement manifeste, la toux est peu productive. Les vibrations manuelles appliquées sur la paroi thoracique ont pour but d'abaisser la viscosité des sécrétions en les fragmentant.

Pour mobiliser les sécrétions, la technique de kinésithérapie de référence est l'accélération du flux respiratoire qui doit être adapté à l'âge de l'enfant : d'abord passive chez les nourrissons, elle devient active chez l'enfant. Chez l'adolescent et l'adulte, la kinésithérapie évolue vers les techniques d'auto drainage.

La gymnastique et la rééducation respiratoire visent à éviter la dystrophie thoracique ; la pratique d'un exercice physique adapté aux épreuves d'effort et au goût du sujet est vivement conseillée.

Quelque soit la méthode retenue, la kinésithérapie doit être très régulière et quotidienne, c'est un traitement lourd et contraignant. A certaines périodes de la maladie, 2 voire 3 séances quotidiennes deviennent nécessaires. C'est à ce prix que les patients obtiennent

une diminution des sécrétions dans l'arbre bronchique qui permet de diminuer le risque de surinfections et de retarder l'évolution de la maladie.

3-1-2- L'antibiothérapie :

Une surveillance bactériologique régulière est effectuée dès que le diagnostic de mucoviscidose est fait. Une antibiothérapie bien ciblée permet de juguler les infections. Elle sera adaptée aux germes responsables qui auront été isolés sur des prélèvements bronchiques.

Les antibiotiques antipycocyanique appartiennent à deux familles : les bêtalactamines, les aminosides, sont essentiellement prescrits (Pin I et al, 2000)

D'autres médicaments sont prescrits au coup par coup : corticothérapie, broncho-dilatateurs, rhDNase (la DNase humaine recombinante) qui est une enzyme catalytique d'hydrolyse de l'ADN extracellulaire particulièrement sèche dans les sécrétions bronchiques purulentes des patients atteints de mucoviscidose (Wizla-Derambure N et al, 1998). Utilisée par voie aérosol, elle permet de diminuer la viscosité du mucus alors plus facile à évacuer par la kinésithérapie. Ce produit est pour l'instant prescrit dès que l'obstruction respiratoire est objectivée par les explorations fonctionnelles respiratoires.

3-1-3- La greffe pulmonaire :

Elle représente dans certains cas la proposition ultime en cas d'insuffisances respiratoires chronique grave et irréversible. La transplantation pulmonaire est devenue au cours de ces dernières années une perspective thérapeutique essentielle proposée aux patients de mucoviscidose souffrant d'une insuffisance respiratoire chronique très évoluée. Elle offre une franche amélioration de la survie de ces patients et un gain sensible et durable en terme de qualité de vie. Néanmoins, les risques et les échecs de la transplantation pulmonaire, le nombre limité de greffons pulmonaires disponibles imposent une sélection attentive des patients afin d'optimiser l'utilisation des greffons proposés et d'améliorer les résultats de cette transplantation. (Yankaskas JR et al, 1998)

3-2- Prise en charge nutritionnelle :

Les principales recommandations pour une bonne prise en charge digestive et nutritionnelle sont (Mac Donald A, 1996) :

- † Bien connaître les traitements de l'insuffisance pancréatique exocrine : Des extraits pancréatiques gastro-résistants sont prescrits pour parer à l'insuffisance pancréatique. Il faut les prendre au début des repas.
- † Savoir traiter énergétiquement un éventuel reflux gastro-œsophagien
- † Dépister précocement et traiter toute dénutrition : L'alimentation quotidienne doit être légèrement hypercalorique, en choisissant des aliments glucidolipidiques. Par ailleurs, il faut assurer une supplémentation en vitamines liposolubles : vitamine A, vitamine D, vitamine E et de la vitamine K. Il est nécessaire de prescrire éventuellement des oligoéléments (Fer, Zinc, Magnésium).
- † Connaître les signes de syndrome d'obstruction intestinal distal pour éviter des gestes chirurgicaux abusifs et dangereux
- † Connaître les possibilités de traitements des maladies du foie les plus sévères par transplantation

Les consultations auprès de spécialistes en diététique doivent être régulières afin d'adapter, au mieux, l'alimentation à l'évolution de la maladie.

Par ailleurs :

- Le diabète nécessite une prise en charge diététique appropriée et parfois une insulinothérapie est nécessaire.
- La polypose nasosinusienne impose une surveillance ORL régulière. Elle ne nécessite que rarement un recours à la chirurgie.
- En raison de l'absence de stérilité, une contraception est souvent indiquée chez la femme. Plusieurs cas de stérilité féminine, dans la mucoviscidose, ont été traités avec succès par insémination intra-utérine. (Durieu I et al, 2000).

Enfin, les progrès médicaux réalisés dans les traitements de cette pathologie ont fait évoluer l'espérance de vie des patients atteints de mucoviscidose, suivants les pays, de la petite enfance à 35-45 ans, avec une importante réduction de la mortalité infantile (Fogarty A et al, 2000).



Chapitre 2 :

Génétique de la Mucoviscidose

1- Les principales étapes de localisation de gène CFTR :

Malgré les informations connues sur la physiopathologie de la mucoviscidose, il n'y avait aucune idée de l'identification de la protéine ni du gène : c'est la stratégie de la génétique inverse. Le gène impliqué a été caractérisé selon une démarche de clonage positionnel par les équipes nord-américaines de Lap Tee Tsui et Collins en 1985.

Les cartes génétiques et physiques sont un point de départ important pour plusieurs analyses génétiques y compris l'identification et l'isolement du gène CFTR.

En 1985, les études systématiques des liaisons entre des marqueurs connus et le gène CFTR n'avaient pas pu révéler de locus à proximité de ce gène mais ces études avaient permis d'exclure environ 40% du génome.

Une liaison positive entre le gène CFTR et le polymorphisme du gène PON (gène codant pour une enzyme, la paroxonase plasmatique : enzyme sérique contenue dans le sérum humain) avec un taux de recombinaison de 15 cM fut découverte. Bien que cette liaison était encourageante, elle avait une valeur restreinte du fait de la méconnaissance de la nature et de la localisation chromosomique de cette protéine.

Fin 1985, le premier marqueur ADN polymorphe lié au gène CFTR a été isolé. Il s'agit d'un fragment RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) appelé DOCRI-917 (ou D7S15). Ce fragment d'ADN présente un polymorphisme en Southern avec les enzymes de restriction Hind III et Hinc II. Des études de liaison de ces trois marqueurs (CFTR, PON et DOCRI) ont permis de proposer la carte suivante :



Ce RFLP a ensuite été positionné sur le chromosome 7 en utilisant des hybrides de cellules somatiques. Donc le marqueur DOCRI-917 et le gène CFTR sont portés par le chromosome 7.

Rapidement, à la même époque, d'autres études ont montré que le marqueur *MET* (proto oncogène) était lui aussi lié au gène CFTR avec un taux de recombinaison de 1% (Tsui LC et al, 1985). Une hybridation in situ de chromosomes métaphasiques humains réalisée avec l'ADNc *MET* comme sonde a montré que le gène CFTR est sur le bras long de chromosome 7, situé en q21-q31 ; et que le locus CF est encadré par deux marqueurs plus

proches, le proto-oncogène MET et une sonde anonyme pJ3.11, situés respectivement à 0.4 cM et 0.3 cM. (Figure 4)

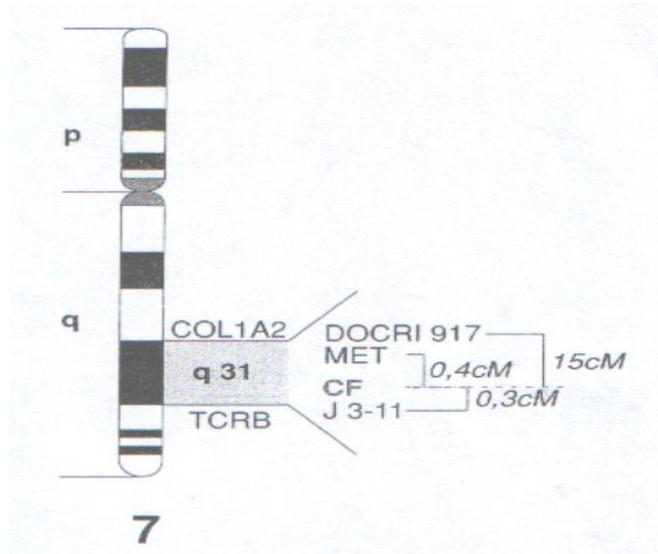


Figure 4 : Les principaux marqueurs du gène CFTR (Kaplan JC, Delpech M, 1994)

Un autre groupe a testé d'autres sondes RFLP du chromosome 7 (Figure 5):

- TCRβ (gene T cell receptor β chain), polymorphisme Bgl II.
- Col 1A2, polymorphisme Sal I.

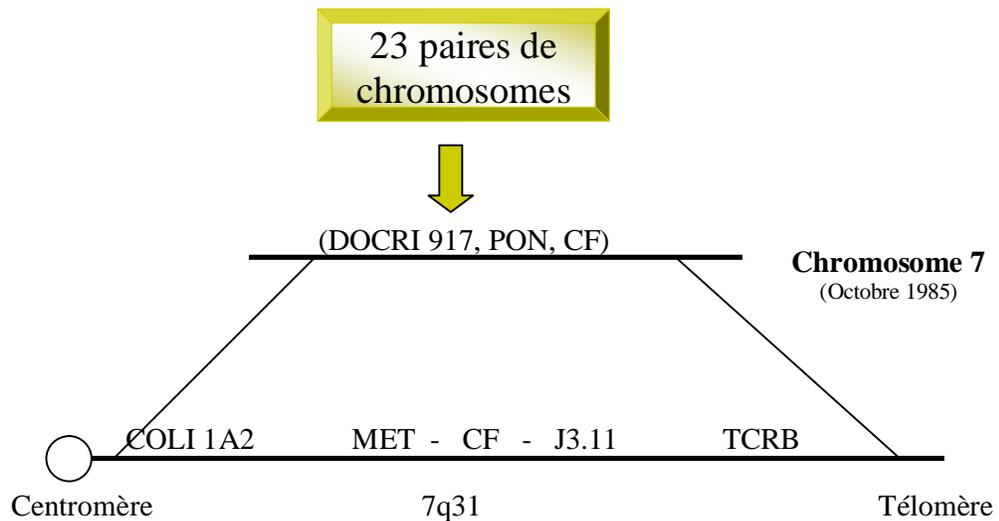


Figure 5 : Les principales étapes de localisation du gène CFTR

L'étape décisive a été franchie en 1989 par plusieurs équipes (Rommens JM et al, 1989), leur stratégie combinait deux techniques utilisées pour couvrir une immense distance génétique : **la marche sur le chromosome (walking)** qui sert à produire des clones

localisés entre les marqueurs flanquants D7S8 et *MET*. De ce fait, chaque étape isolée a représenté seulement 10 à 20 Kb et **le saut sur le chromosome (*jumping*)** qui a pour but de sauter plusieurs centaines de kilobases plus loin dans la même région sub-chromosomique. Le succès de tels sauts sur le chromosome dans la région candidate a permis d'obtenir de nouveaux points de départ pour des marches ultérieures, jusqu'à ce que la plus grande partie de la région soit recouverte par des clones d'ADN. (Strachan T, Read AP, 1998).

Pour chaque clone obtenu, une cartographie de restriction détaillée est réalisée afin de suivre la progression de la marche et de ranger les différents clones les uns par rapport aux autres. Une carte de restriction de la région totale, censée contenir le gène CFTR, a été obtenue.

Au fur et à mesure que des clones positifs sont obtenus, ils sont testés afin de savoir s'ils correspondent à des séquences codantes. Pour chacun des clones un zooblot est tout d'abord réalisé, les clones répondant positivement étant ensuite séquencés et utilisés pour cribler des banques d'ADNc ce qui a permis le clonage d'une région contiguë de 6500 pb contenant 24 exons. Il restait à montrer que cet ADNc était associé au gène CFTR.

La distribution tissulaire des ARNm correspondants à ce gène, ainsi que les caractéristiques de son produit : une protéine transmembranaire de transport de Chlore appelée CFTR sont compatibles avec les données physiopathologiques connues pour la mucoviscidose.

Utilisé pour transformer des lignées cellulaires issue de malades CFTR, le gène de type sauvage restaurait la fonction normale, l'ultime confirmation du fait que la séquence isolée était bien le gène CFTR.

2- Le Gène CFTR :

2-1- Localisation et caractéristiques :

Le gène CFTR localisé en 7q31.2 est un gène très long qui s'étend sur 250 kb, la région codante est répartie sur 27 exons, numérotés de 1 à 24 dont trois de ces exons (6, 14, 17) étant ultérieurement dédoublés en (6a, 6b) / (14a, 14b) / (17a, 17b) (figure 6). La taille moyenne des exons est de 200 pb, l'exon 14b (38 pb) étant le plus petit et l'exon 13 le plus grand (724 pb). Quant à la taille des introns elle varie très largement entre 1.1 Kb (intron 6)

et 40 Kb (intron 3) (Férec C et al, 2004). Ce gène est transcrit en un ARNm de 6500 pb dont 4440 pb de séquences codantes.

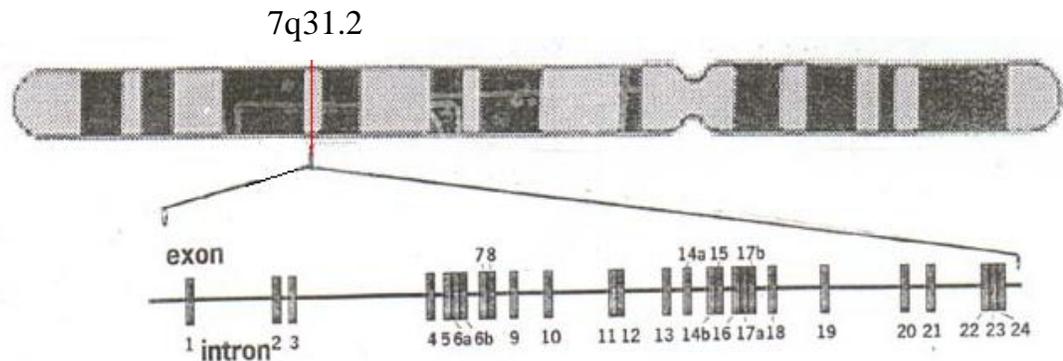


Figure 6 : Localisation et structure du gène CFTR

Le promoteur du gène CFTR présente les caractéristiques retrouvées dans les gènes à transcription ubiquitaire. L'analyse par séquençage de la région de 3.8 Kb en 5' du premier exon montre d'une part l'absence d'élément TATA dans les 500 pb précédant le site d'initiation de la transcription et d'autre part l'absence de boîte CCAAT dans des positions habituelles pour le fonctionnement de ces éléments dans la plupart des gènes d'un tissu spécifique. Dans les 500 pb qui précèdent le premier exon on a trouvé une grande richesse en contenu G+C (65%).

En plus du site majeur d'initiation de la transcription, déterminé par les différentes méthodes d'analyse a -72 pb de l'ATG, de multiples sites mineurs ont été mis en évidence a -121, à -133, à -153 de l'ATG. (Suen TC & Tsui LC, 1995)

Ce promoteur contient aussi d'autres séquences qui pourraient intervenir dans la modulation de la transcription du gène CFTR.

La comparaison de 3.8 Kb de séquence en 5' du gène CFTR avec les séquences de promoteurs d'autres gènes ne montre pas de similitude frappante, excepté pour une séquence de 28 pb a -168 qui montre une homologie de 89% avec une séquence régulatrice du promoteur du gène humain du collagène $\alpha 1$ (Koh J et al, 1993) et pour quatre petites régions montrant une homologie de 80% avec des séquences retrouvées dans le promoteur du gène codant pour l'inhibiteur de la sécrétion des leucoprotéases, gène qui est exprimé seulement dans les cellules épithéliales bronchiques (Koh J et al, 1993).

Une des particularités du gène CFTR est l'existence de transcrits délétés d'un ou de plusieurs exons chez des sujets normaux. Ces transcrits sont dus à des anomalies conduisant à un épissage alternatif dont le plus étudié et le plus fréquent est le transcrit délété de l'exon 9 (Pagani F et al, 2000).

L'analyse fine du gène CFTR a montré l'importance d'une séquence nucléotidique polypyrimidique polymorphe située dans l'intron 8, juste en amont de l'exon 9 au cœur d'une séquence critique pour le processus d'épissage (Hefferon TW et al, 2002), et constituée selon les cas, de cinq, sept ou neuf thymines (T) (Figure 7). Plus courte la séquence poly-T en amont de l'exon 9 sur l'ADN génomique, plus élevée sera la proportion de l'ARNm sans exon 9 dans le cytoplasme. La séquence 5T est donc particulièrement mal reconnue par les mécanismes qui assurent l'épissage, de sorte que les rares individus homozygotes 5T/5T dans la population ont une majorité de transcrit CFTR incomplets. Le cadre de lecture de ces ARNm délétés reste intact car l'exon 9 comporte un nombre entier de codon (Mac V et al, 1997).

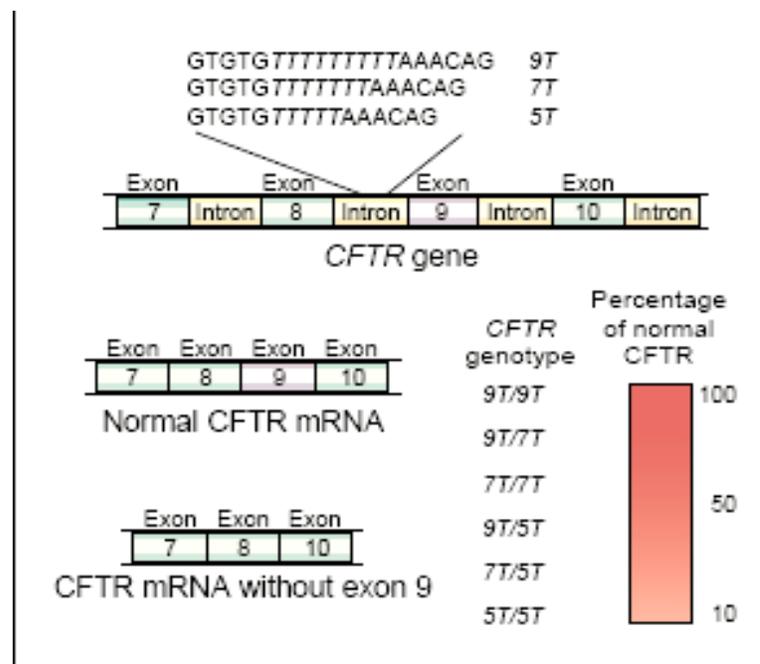


Figure 7 : Variation de la séquence dans l'intron 8 du gène CFTR et son effet sur le taux d'ARNm (Chillon M et al, 1995).

2-2- Les mutations :

Depuis la découverte du gène CFTR, plus de 100 laboratoires dans le monde coordonnent les efforts et tentent de caractériser les diverses mutations responsables de la

mucoviscidose. Ils se sont regroupés au sein d'un réseau d'échange d'informations, créé à l'initiative des découvreurs du gène, le Consortium International d'Analyse Génétique de la Mucoviscidose CFGAC : « *Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium* » (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>). Cette structure a permis d'établir rapidement le spectre des mutations rencontrées dans les différentes populations étudiées dans le monde. Actuellement, il existe près de 1542 mutations qui ont été rapportées, des mutations non-sens, des mutations altérant l'épissage, des micro-insertions et des micro-délétions décalant le cadre de lecture, et des mutations faux-sens (Tableau 1).

Type de mutation	Nombre	Fréquence %
Faux sens	644	41.76
Décalage de cadre de lecture	243	15.76
Epissage	196	12.71
Non sens	149	9.66
Micro insertion/délétion	31	2.01
grande insertion/délétion	44	2.85
Région promotrice	8	0.52
Polymorphisme	225	14.59

Tableau 1 : Les statistiques selon le type de mutation
<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>

Les mutations sont inégalement réparties parmi les 27 exons de gène CFTR (Figure 8, tableau 2).

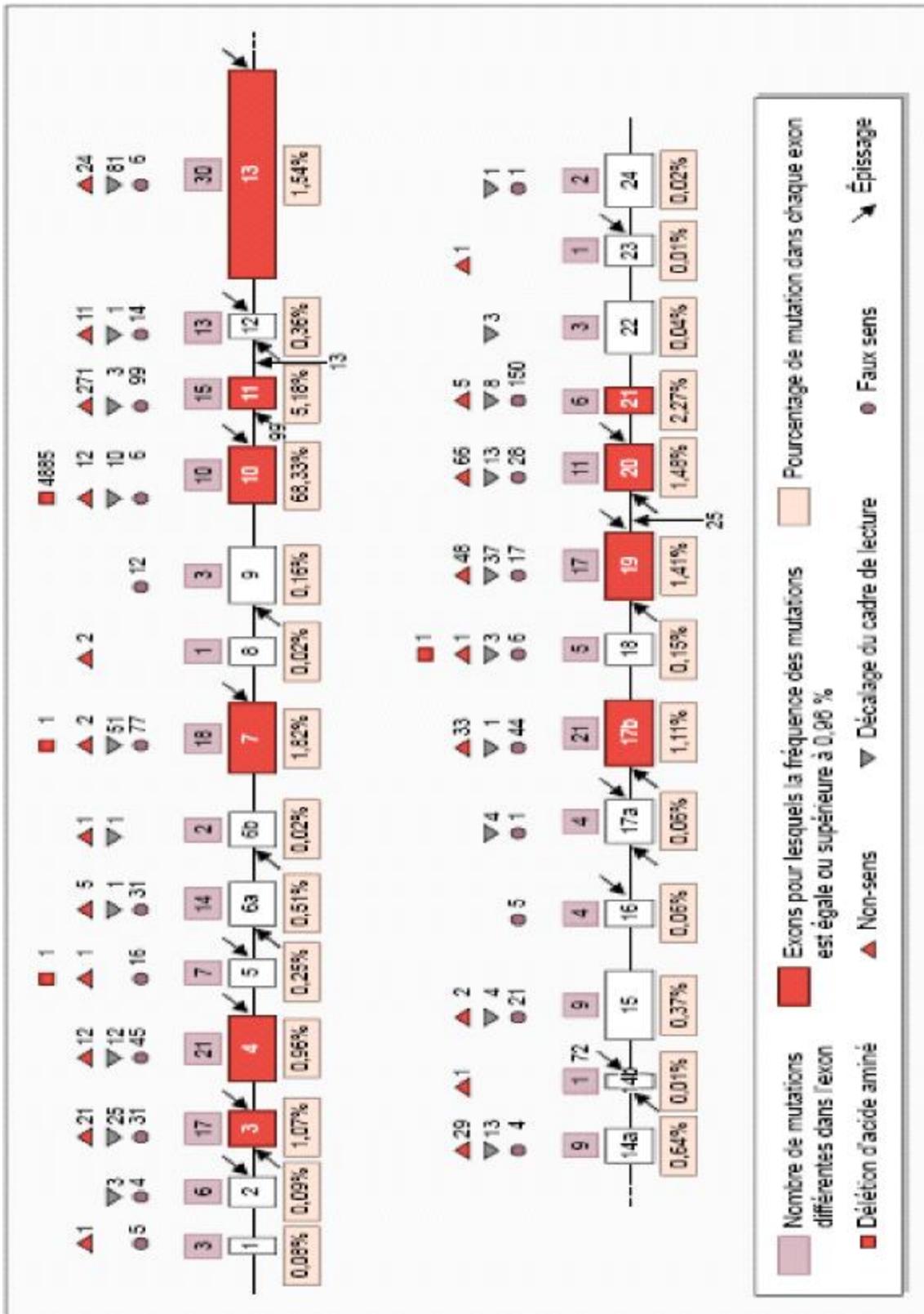


Figure 8 : Distribution des mutations dans le gène CFTR (Des Georges M et al, 1998)

La région	Nombre de mutations	Distribution %	La région	Nombre de mutations	Distribution %
Promoteur	16	1.04	intron 1	4	0.26
5'UTR et exon 1	28	1.82	intron 2	22	1.43
exon 2	29	1.88	intron 3	18	1.17
exon 3	46	2.98	intron 4	12	0.78
exon 4	107	6.94	intron 5	8	0.52
exon 5	26	1.69	intron 6a	8	0.52
exon 6a	41	2.66	intron 6b	8	0.52
exon 6b	18	1.17	intron 7	10	0.65
exon 7	87	5.64	intron 8	14	0.91
exon 8	26	1.69	intron 9	11	0.71
exon 9	28	1.82	intron 10	17	1.10
exon 10	67	4.35	intron 11	15	0.97
exon 11	42	2.72	intron 12	10	0.65
exon 12	41	2.66	intron 13	7	0.45
exon 13	138	8.95	intron 14a	11	0.71
exon 14a	31	2.01	intron 14b	9	0.58
exon 14b	2	0.13	intron 15	10	0.65
exon 15	62	4.02	intron 16	9	0.58
exon 16	21	1.36	intron 17a	15	0.97
exon 17a	40	2.59	intron 17b	12	0.78
exon 17b	79	5.12	intron 18	9	0.58
exon 18	28	1.82	intron 19	11	0.71
exon 19	55	3.57	intron 20	17	1.10
exon 20	51	3.31	intron 21	7	0.45
exon 21	30	1.95	intron 22	2	0.13
exon 22	28	1.82	intron 23	10	0.65
exon 23	24	1.56	intron 24	4	0.26
exon 24	20	1.30			

Tableau 2 : Statistique des mutations selon la région chromosomique
<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>

3- La protéine CFTR :

La séquence protéique déduite à partir du gène CFTR correspond à une glycoprotéine transmembranaire composée de 1480 acides aminés, et fait partie des familles des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette). L'analyse de séquence indique la présence de deux fois six segments transmembranaires putatifs (TMD : Trans Membrane Domaine TMD1, TMD2), et trois domaines intracellulaires (Kogan I et al, 2002) (Figure 9) :

† Deux domaines de liaison aux nucléotides notés NBD1 et NBD2 (Nucléotide Binding Domain) : Selon les auteurs, les limites des domaines NBD1 et NBD2 varient légèrement (Callebauta I, 2004). Pour NBD1 la limite inférieure varie du résidu F434 codé par l'exon 9 à L441, et la limite supérieure est comprise entre I586 codé par l'exon 12 et K684 avec une extension possible jusqu'à F650 (Duffieux F et al, 2000) (Lewis HA et al, 2004). Le domaine NBD2 est formé des résidus L1127 à L1480 (Bianchet MA et al, 1997).

† Un domaine régulateur R : ce domaine correspond aux résidus 590 à 831 codés par l'exon 13.

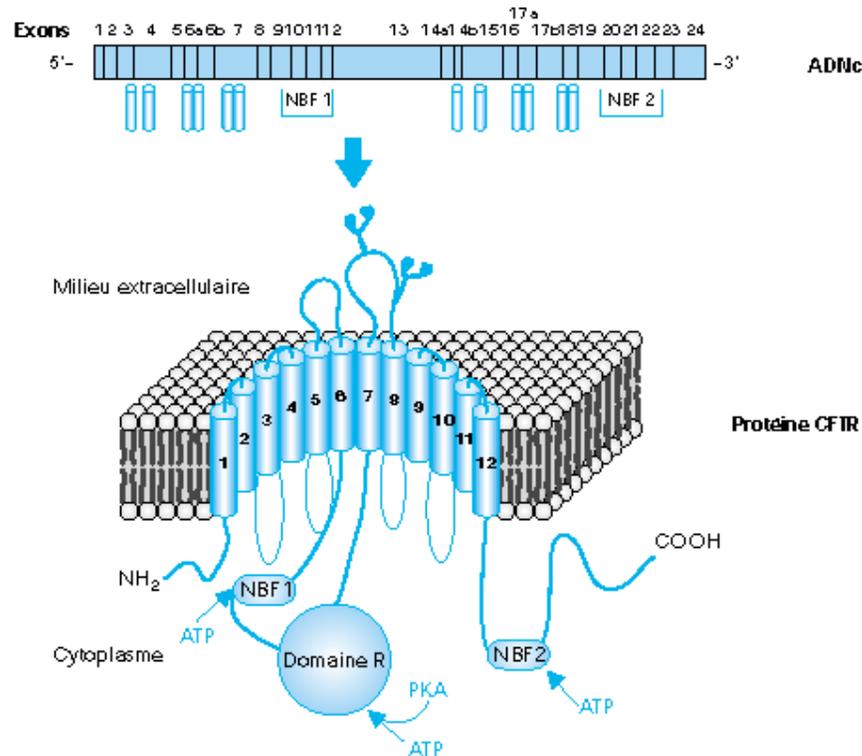


Figure 9 : Représentation schématique de la protéine CFTR

D'après les profils d'hydrophobicité, 80 % des acides aminés sont dans le cytoplasme, 16% dans les segments transmembranaires et 4% dans les boucles extra-cellulaires. Les domaines N et C terminaux de la protéine sont cytoplasmiques (Akabas MH et al, 1997; Tuesnàdy GE et al, 1997).

La protéine CFTR est surtout présente au niveau des cellules épithéliales des canaux pancréatiques, des cryptes intestinales, des canaux des glandes sudoripares et de l'arbre trachéo-bronchique.

4- Les fonctions de la protéine CFTR :

4-1- CFTR est un canal chlore AMPc dépendant :

Elle se comporte comme un canal chlore Cl⁻ de faible conductance régulé par la voie de l'AMPc.

Par analogie avec les autres protéines canalaire, on considère que les domaines transmembranaires (TMD1 et TMD2), interviennent dans la formation du pore. Alors que le domaine TMD2 est peu impliqué, le domaine TMD1 joue un rôle important dans la conductance et dans la sélectivité du canal Cl⁻ (Devidas S & Guggino WB, 1997). Les segments membranaires M1, M5, M6, et M12 sont impliqués dans la zone formant le pore (Schwiebert EM et al, 1998). La partie du pore la plus resserrée a un diamètre d'environ 5.3 Å (Hanrahan JW et al, 1998).

Les mécanismes qui contrôlent l'ouverture et la fermeture du canal Cl⁻ sont des événements séquentiels, impliquant des étapes de phosphorylation suivies de la liaison et de l'hydrolyse de l'ATP. L'état déphosphorylé du domaine R maintient le canal fermé, son degré de phosphorylation détermine la probabilité d'ouverture. Ainsi les deux domaines NBD coopèrent dans la régulation des mécanismes d'ouverture et de fermeture du canal Cl⁻. (Gadsby DC & Nairn AC, 1999)

La liaison et l'hydrolyse de l'ATP, sur les sites NBD, entraînent une modification conformationnelle des TMD du canal CFTR. L'hydrolyse des nucléotides triphosphates est indispensable à l'ouverture du canal, et la phosphorylation préalable par la PKA (Protéine Kinase A) augmente cette réaction. Le canal déphosphorylé est incapable d'hydrolyser l'ATP. Sur des membranes excisées, après phosphorylation par les PKA, le canal peut être ouvert par les nucléotides triphosphates mais pas par les analogues non hydrolysables de

l'ATP, l'ADP ni l'AMPc (Schultz BD et al, 1995). Très rapidement, après phosphorylation par les PKA, la déphosphorylation par des protéines phosphatases inactive le canal.

L'hydrolyse de l'ATP représente l'étape limitante à la fois pour l'ouverture et la fermeture du canal. Ces deux événements interviennent sur des sites différents d'une même molécule. Le domaine NBD1 est le site d'hydrolyse de l'ATP couplé à l'ouverture du canal et le domaine NBD2 est le site d'hydrolyse de l'ATP permettant la fermeture du canal (Aleksandrov L et al, 2002).

4-2- CFTR régulateur du fonctionnement d'autres canaux ioniques :

Plus récemment, il a été montré que la protéine CFTR régule le fonctionnement d'autres canaux ioniques de la cellule épithéliale (Figure 10) (Hanrahan JW & Wioland MA, 2004). En particulier, elle active celui d'un canal Cl^- rectifiant sortant ORCC : *Outwardly Rectifying Chloride Channel*, qui était supposé, avant le clonage du gène CFTR, être le produit défectueux dans la mucoviscidose. L'activation de la protéine CFTR est associée à une sortie d'ATP de la cellule qui va se fixer à un récepteur purinergique. Celui-ci va, à son tour, activer, par l'intermédiaire d'une protéine G, l'ouverture du canal ORCC et l'efflux d'ions Cl^- (Zeng W et al, 1997).

L'activité du canal sodique sensible à l'amiloride ENaC : *Epithelial Na^+ Channel*, responsable d'une absorption par la cellule épithéliale d'ions sodium, est également contrôlée par la protéine CFTR, mais de façon négative. Dans la mucoviscidose, l'inhibition de l'absorption est levée, ce qui doit participer à la déshydratation du mucus. Le mécanisme de régulation du canal ENaC par la protéine CFTR pourrait impliquer des protéines du cytosquelette (Stutts MJ, 1995) ou bien faire intervenir une interaction directe entre les deux protéines. Cette régulation serait indépendante de l'état d'activation de CFTR.

Une autre étude réalisée sur des cellules épithéliales humaines des canaux pancréatiques a montré que la protéine CFTR contrôle l'activation dépendante de l'adénosine monophosphate-cyclique (AMPc) d'un canal potassique K^+ (Loussouarn G et al, 1996).

5- Les différentes classes de mutations et leurs conséquences sur la fonction de la protéine CFTR :

Les anomalies moléculaires du gène CFTR ont des conséquences variables sur la protéine CFTR et sa fonction. Ces conséquences peuvent être regroupées en six classes (Figure 11) (Rowe SM et al, 2005) (Pilewski JM & Frizzell RA, 1999) (Mickle JE & Cutting GR, 1998) :

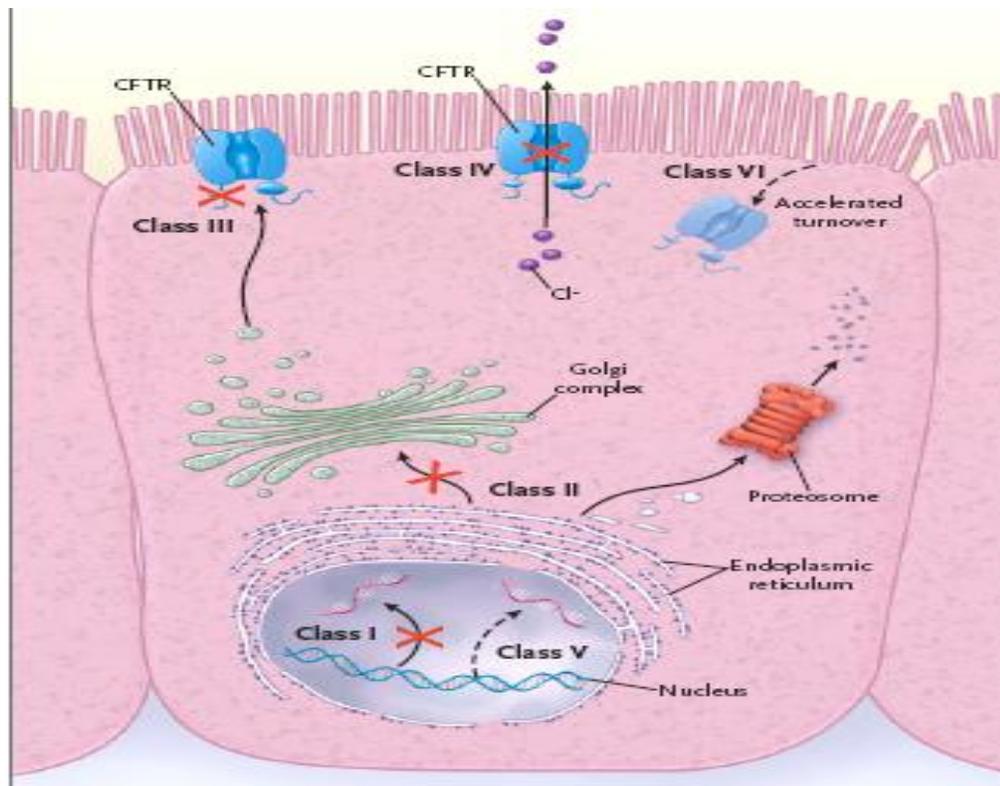


Figure 11 : Les différentes classes de mutations du gène CFTR (Rowe SM et al, 2005)

5-1- Classe I : Mutations altérant la production de la protéine :

Ces mutations résultent en une absence totale ou partielle de la protéine. Cette classe inclut les mutations non-sens et celles qui produisent un codon stop prématuré (G542X, R553X), en plus des mutations décalant le cadre de lecture de l'ARNm (1078delT, 3905insT) ou celle altérant la structure de l'ARNm (621+1G → T). Dans certains cas l'ARNm muté est instable et ne produit pas de protéine. Dans les autres cas, la protéine anormale produite sera probablement instable et rapidement dégradée. C'est ce qui se produit quand la protéine est tronquée ou contient des séquences aberrantes (anomalies d'épissage ou de décalage de la phase de lecture).

Sur le plan fonctionnel, ces mutants devraient conduire à une perte de la conductance au Cl⁻ du canal CFTR dans les épithéliums atteints.

5-2- Classe II : Mutations perturbant le processus de maturation cellulaire de la protéine :

De nombreuses mutations altèrent la maturation de la protéine et son ciblage vers la membrane plasmique, elle n'est donc pas adressée au bon endroit ; en général elle reste localisée dans le cytoplasme. Dans ce cas, très peu de protéines fonctionnelles arrivent à la membrane apicale des épithéliums. Étant mal conformées, elles sont dégradées peu après leur synthèse dans le réticulum endoplasmique au lieu d'être transportées dans le compartiment golgien où les molécules CFTR terminent normalement leur maturation post traductionnelle. Ainsi, la protéine est soit absente, soit présente en quantité réduite dans la membrane apicale. L'exemple majoritaire est la $\Delta F508$ qui a fait l'objet de notre étude.

5-3- Classe III : Mutations perturbant la régulation du canal Cl⁻ :

Ces mutations sont le plus souvent situées dans les domaines de liaison à l'ATP (NBD1 et NBD2). Exemple : les mutations G551D, G551S situées dans le domaine NBD1 et S1255P, G1349D dans le domaine NBD2. Ces mutations modifient la liaison et l'hydrolyse de l'ATP ainsi que la phosphorylation du domaine R.

Ces mutants sont synthétisés et localisés, mais ne peuvent pas être activés ou ont une fonction de canal Cl⁻ anormale.

5-4- Classe IV : Mutations altérant la conduction du canal Cl⁻ :

Certains segments des TMD participent à la formation du pore ionique. Cette classe inclut les mutation faux sens situées dans ces régions, altérant la conduction du canal CFTR et sa sélectivité ionique. Les mutations R334W et R347H par exemple conservent environ 10% de conductance au chlore, R347P transforme le canal multi ionique en un canal pauci ionique, R117H réduit de 70% le temps d'ouverture du canal et altère aussi la vitesse de passage des ions à travers le pore.

5-5- Classe V : Mutations influençant la quantité d'ARNm ainsi que la quantité de protéines fonctionnelles :

Sont de découverte récente : il s'agit de déficits quantitatifs du CFTR, consécutifs à des variations qui affectent l'épissage ou la stabilité de l'ARNm ou de la protéine CFTR. Le

polymorphisme T de l'intron 8 et 3849+10KbC → T ainsi que G551S représente un exemple de mutants de cette classe (Haardt M et al, 1999).

5-6- Classe VI : mutations affectant la stabilité de la protéine :

Une étude récente a montré que la troncation de l'extrémité C-terminale de la protéine induit une instabilité marquée de la protéine CFTR. Ces mutations affectent la régulation des autres canaux par la CFTR (Haardt M et al, 1999).

Globalement, les mutations des classes I, II, III et VI ont un effet délétère sévère, tandis que celles des classes V et IV ont un effet modéré (McKone EF et al, 2003).

6- La mutation $\Delta F508$:

C'est une mutation de classe II, localisée dans le domaine NBD1 (codé par l'exon 10).

La mutation $\Delta F508$, qui correspond à la perte d'un résidu phénylalanine en position 508 de la protéine due à une délétion de 3 nucléotides CTT (Figure 12). Elle perturbe la maturation de la protéine CFTR, en empêchant sa glycosylation et son routage vers la membrane cytoplasmique des cellules épithéliales.

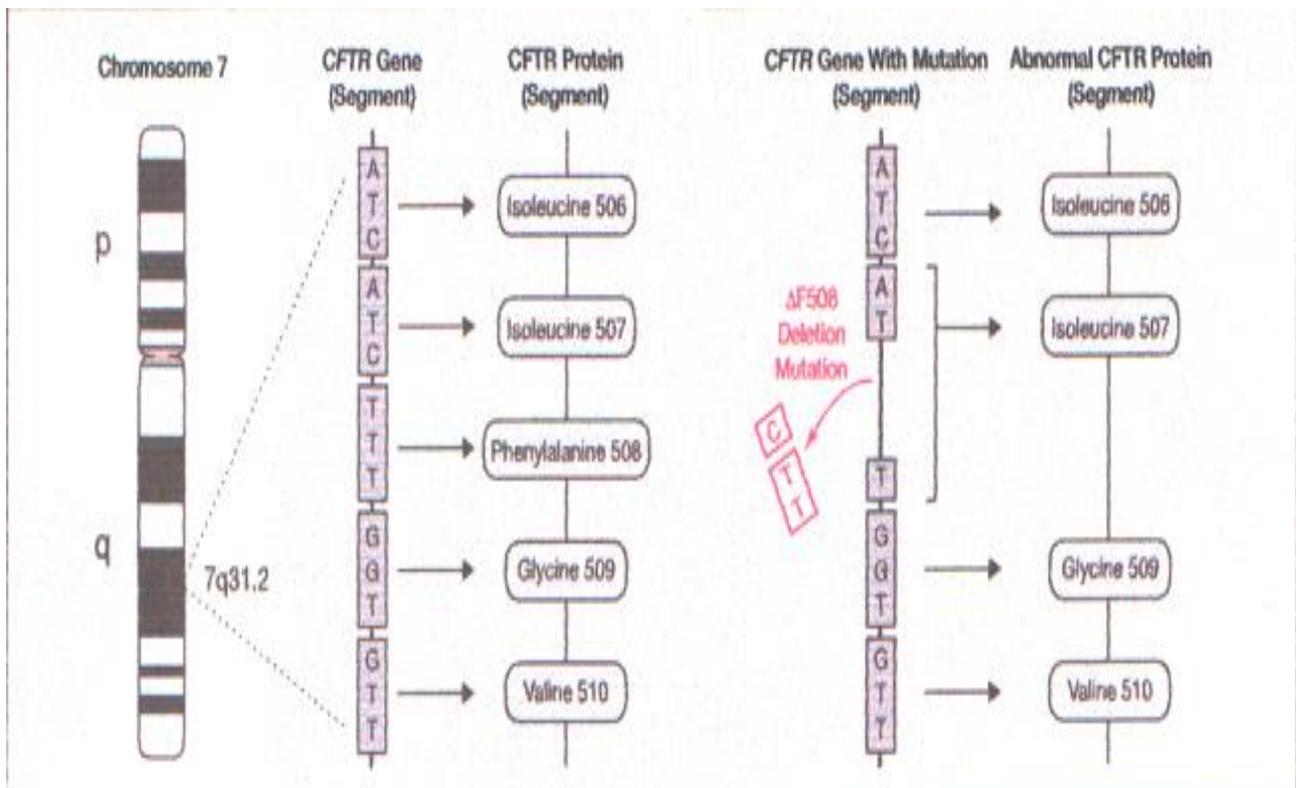


Figure 12 : La mutation $\Delta F508$ (Vastag B, 2003)

Il existe une hétérogénéité de répartition de cette délétion, suivant un gradient Nord-Ouest/Sud-Est en Europe. Par exemple, 87.2 % en Danemark, 81 % en Bretagne et 50 % en Italie (Claustre M, 1998). Les populations méditerranéennes ayant les taux les plus bas : de 62 % dans le sud de France à 21 % en Turquie (Des Georges M et al, 2004). Cette fréquence élevée dans les populations européennes suggère l'existence d'un effet fondateur très important (un seul événement mutationnel survenu dans le passé) et que la mutation se serait alors maintenue par un avantage sélectif des hétérozygotes. Selon l'une des hypothèses avancées, les porteurs de la mutation auraient été protégés contre la déperdition hydrique et saline au cours des diarrhées dues à des toxines bactériennes ; la protéine $\Delta F508$ diminuerait par ailleurs l'entrée du germe pathogène dans l'épithélium intestinal assurant une protection vis-à-vis de l'infection (Kälin N et al, 1999)

La mutation $\Delta F508$ est ainsi retrouvée sur 16.7 % des chromosomes CF algériennes (Loumi O et al, 2006). Cette fréquence est toutefois comparable à celle obtenue dans les populations Turques, Juives et Tunisiennes (Messaoud T et al, 1996).

7- Les corrélations phénotype - génotype :

Il existe chez les patients atteints de mucoviscidose une grande variabilité clinique. Bien que de nombreux patients soient diagnostiqués précocement au cours de la première année de vie, un nombre non négligeable de patients sont diagnostiqués plus tardivement à l'âge adulte en raison d'une symptomatologie clinique incomplète. L'identification des anomalies moléculaires du gène CFTR a ainsi permis d'entreprendre des études visant à établir des relations entre le phénotype clinique et le génotype.

Il n'y a pas une relation simple entre le génotype et le phénotype pouvant rendre compte des variations cliniques entre patient non apparentés ou au sein d'une même fratrie. La plupart des mutations du gène CFTR ne sont retrouvées que sous la forme des hétérozygotes composites, ce qui complique l'analyse des corrélations. Plusieurs études ont porté sur les corrélations phénotype – génotype, cependant cette relation reste mal comprise (Rebecca K et al, 2003). Le génotype *CF* (mutations majeures ou mineures) dépend du niveau d'expression de la protéine CFTR fonctionnelle, qui conditionne la sévérité du phénotype (Figure 13)

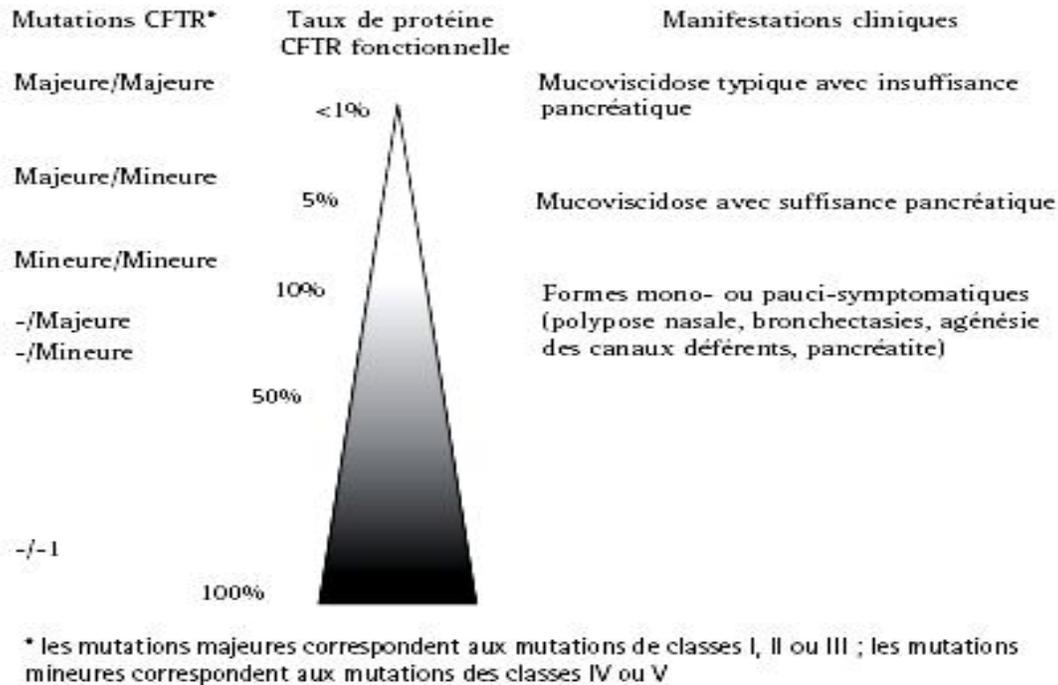


Figure 13 : Corrélation génotype, taux de protéine CFTR fonctionnelle et phénotype

(Teich N et al, 2002)

7-1- Corrélation atteinte digestive et génotype :

Une première classification des patients a été proposée selon la conservation d'une fonction pancréatique exocrine (SP) ou l'existence d'une insuffisance pancréatique exocrine sévère associée (IPE) (Meeting report, 2002) (De Boeck K et al, 2005).

En particulier, l'IPE a été associée à un homozygote ou à un hétérozygote composite pour des mutations graves de la classe I, II ou III. Les mutations associées à une fonction pancréatique normale sont considérées modérées alors que celles associées à une insuffisance pancréatique sont considérées sévères. Ainsi, les patients ayant une mutation IPE sur un allèle et une mutation SP sur l'autre allèle ont un phénotype SP. Avec une mutation SP, l'activité de la protéine CFTR est suffisante pour conférer une fonction pancréatique (Tsui LC & Durie P, 2001).

Plusieurs équipes ont confirmé ultérieurement que près de 100 % des patients homozygotes pour la mutation $\Delta F508$ ont une insuffisance pancréatique. Toutefois, l'existence d'homozygotes $\Delta F508$ ou d'hétérozygotes composites $\Delta F508 / G551D$ ou $\Delta F508 / R334W$ sont PS (Bienvenu T, 2003). D'autres ont un retentissement plus discret (comme R117H, R347P, R347H, A455E) : elles ne génèrent pas d'insuffisance

pancréatique et sont observées dans des formes de moindre gravité chez 15 à 20 % des malades (Girodon E et al, 1997).

7-2- Corrélation atteinte respiratoire et génotype :

Il a été montré que des patients présentant deux mutations sévères ont statistiquement une maladie d'apparition plus précoce et plus sévère et sont plus souvent colonisés par le germe *P.aeruginosa* que les patients porteurs au moins d'une mutation modérée (Braun AT et al, 2006).

Seule la mutation A455E a été fortement associée à l'état de la fonction pulmonaire. Aux Pays-Bas, la mutation A455E est relativement fréquente. L'analyse de 33 patients hétérozygotes composites $\Delta F508 / A455E$ a révélé des tests de la fonction pulmonaire améliorés et un taux de colonisation par *P.aeruginosa* réduits par rapport aux homozygotes $\Delta F508$ issus de la même population (Gan KH et al, 1995). Ces résultats suggèrent que la mutation A455E produit une atteinte pulmonaire moins sévère que $\Delta F508$ chez les patients aux Pays-Bas. Une étude similaire sur 9 malades canadiens hétérozygotes composites $\Delta F508 / A455E$ a révélé une fonction pulmonaire moins sévère que celle de 5 homozygotes $\Delta F508$ issus de la même population (De Braekeleer M et al, 1997). Ces études indiquent que A455E produit une atteinte pulmonaire modérée et que A455E a un effet dominant sur les allèles sévères comme $\Delta F508$.

7-3- Corrélation avec Absence Bilatérale congénitale des Canaux Déférents (ABCD):

Un à deux pour cent des hommes stériles, par ailleurs indemnes de toute atteinte pulmonaire ou pancréatique, présentent une absence bilatérale des canaux déférents (ABCD) (Desideri-Vaillant C et al, 2004) (Yahia M & Naimi D, 2005). Plusieurs travaux ont maintenant établi que près de 80 % des patients porteurs d'ABCD sont hétérozygotes composites, soit pour deux mutations à effet modéré, soit pour une mutation sévère, le plus souvent $\Delta F508$ (43 %) suivie de R117H (29 %) (Uzun S et al, 2005) (Claustre M et al, 2000)

En particulier, le variant 5T de l'intron 8 est six à huit fois plus fréquent sur les chromosomes des hommes ABCD associé à une mutation sévère. Ainsi, l'association $\Delta F508/IVS8-5T$, particulièrement fréquente chez ces patients, suffirait à générer l'ABCD (Andrea LF et al, 2003)

7-4- Les facteurs modificateurs :

La variabilité de l'expressivité clinique observée chez des patients présentant un même génotype CF, même au sein d'une famille, suggère que la sévérité de la maladie est modulée par d'autres facteurs génétiques et environnementaux (Hull J & Thomson AH, 1998).

Les observations rapportées chez des jumeaux, portant la même mutation du gène CFTR, semblent indiquer que les facteurs environnementaux ne jouent pas un rôle dominant (Mekus F et al, 2000). Ces données suggèrent donc fortement l'intervention de variants génétiques, en dehors du locus CF, dans l'expression phénotypique de la maladie et orientent vers la recherche de gènes modificateurs.

Les premiers travaux sur la recherche de gènes modificateurs dans la mucoviscidose sont menés par des stratégies essentielles :

- La première étant l'approche de régions chromosomiques candidats : c'est-à-dire une région d'un chromosome où l'on soupçonne la présence d'un gène modificateur ; ce sont le plus souvent les données acquises sur les modèles animaux de la maladie qui suggèrent l'existence d'une telle région.
- La deuxième repose sur l'approche de gène candidat qu'il s'agit de gènes dont la fonction est connue et est supposée interagir avec celle du gène majeur à l'origine de la maladie.

En ce qui concerne la mucoviscidose, les recherches ont concerné sept gènes candidats et une région candidat.

7-4-1- Etude d'une région candidate :

L'utilisation de modèles murins de mucoviscidose a permis d'identifier un locus impliqué dans la sévérité de l'atteinte digestive. L'analyse de divers croisements a montré que la région centromérique du chromosome 7 devait contenir un gène modulant la gravité de l'atteinte intestinale. Or cette région a pour homologue, dans le génome humain, la bande q13 du chromosome 19. C'est donc une région candidate à la présence d'au moins un gène modificateur d'un des symptômes intestinaux de la mucoviscidose, l'iléus méconial. La confirmation est venue de l'étude de 185 paires de germains atteints (Zielenski J et al, 1999). Cette observation a été complétée par une analyse génétique avec des marqueurs microsatellites en 19q13 dans des fratries de patients atteints de mucoviscidose. Une

association a pu être documentée entre la présence de microsatellites dans la région chromosomique D19S112 et l'existence d'un iléus méconial à la naissance (Corvol H et al, 2006)

7-4-2- Etude des gènes candidats :

7-4-2-1- La manose binding lectin (MBL) :

Le gène MBL2 est localisé en 10q11.2-q21, trois variations du gène de type SNP : Single Nucleotide Polymorphism ont été décrites dans l'exon 1 du gène MBL2 : l'allèle normal est désigné MBL2-A et l'allèle mutant MBL2-O. L'allèle MBL2-O est associée à un taux sérique effondré de protéine MBL et les sujets MBL2-A/MBL-O, MBL2-O/MBL-O ont des infections récurrentes touchant souvent l'arbre respiratoire. On a donc formulé l'hypothèse que le gène *MBL* pouvait être un gène modificateur dans la mucoviscidose en accroissant le risque infectieux, en particulier pulmonaire. Ce fait devrait entraîner une atteinte plus grave de la fonction respiratoire chez les sujets hétérozygotes MBL2-A/MBL2-O ou homozygotes MBL2-O/MBL2-O.

Des études ont montré que les patients atteints de mucoviscidose et porteurs de l'allèle MBL2-O avaient une fonction pulmonaire plus altérée (Garred P et al, 1999) (Davis J et al, 2000) (Gabolde M et al, 2001) (Yarden J et al, 2004).

4-7-2-2- Le monoxyde d'azote (NO):

L'action antimicrobienne du NO est de plus en plus reconnue. Le NO est produit grâce à l'action d'un groupe d'enzymes appelées NO synthases (NOS). On connaît actuellement trois isoformes de NOS : NOS neuronale (NOS1), NOS inductible (NOS2) et NOS endothéliale (NOS3). Les trois variants sont exprimés dans les voies aériennes. Alors qu'habituellement dans des conditions inflammatoires comme les bronchectasies ou l'asthme le NO exhalé est élevé, il est diminué dans la mucoviscidose (Grasemann H et al, 1997). Le NO participant à la défense antimicrobienne contre le *P.aeruginosa*, sa diminution pourrait avoir des conséquences défavorables ; une association a été montrée entre un polymorphisme du gène NOS1 et le gène NOS3 avec le taux de NO exhalé et la colonisation par *P.aeruginosa* chez des patients atteints de mucoviscidose (Grasemann H et al, 2000).

7-4-2-3- Le transforming growth factor- β (TGF- β):

Le gène TGF- β est situé en position 19q13.1-q13.3. Plusieurs polymorphismes ont été décrits pour ce gène dont certains influencent le taux de production de la cytokine TGF- β , parmi lesquels des SNP au niveau des codons 10 (T869C) et 25 (G915C), dans les deux cas l'allèle proline est associé à un taux de synthèse de la cytokine plus bas, ainsi qu'au niveau du promoteur en position -509C/T. Les sujets TT qui ont un taux plus élevé de cytokines ont une atteinte respiratoire plus sévère que les sujets TC ou CC, qui sont hétérozygotes ou homozygotes pour l'allèle proline. Arkwright et al ont montré que seul le polymorphisme du codon 10 était associé à l'atteinte respiratoire. De plus les sujets CF «forts producteurs» de TGF- β porteurs de la mutation au niveau du codon 10 avaient une détérioration plus rapide de leur fonction respiratoire mais ils ne démontrent aucune relation avec les autres polymorphismes du TGF- β (Arkwright PD et al, 2000).

7-4-2-4- Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α):

Certaines études ont démontré une relation inverse entre le taux de TNF- α dans les expectorations de patients et leur fonction pulmonaire. Le gène du TNF- α est localisé sur le chromosome 6 et un polymorphisme a été décrit dans la région promotrice (SNP-308A/G) conduisant à individualiser deux allèles, TNF1 et TNF2. Le niveau de transcription de TNF- α est plus élevé chez les sujets porteurs du gène TNF2, les sujets CF homozygotes pour le gène TNF1 avaient une meilleure fonction respiratoire que ceux porteurs de TNF2 à l'état hétérozygote ou homozygote. (Kroeger KM et al, 1997) (Hull J & Thomson AH, 1998)

7-4-2-5- Antigènes HLA:

Les gènes du système HLA de classe II ont été impliqués dans la réponse allergique, en particulier médiée par les IgE. Compte tenu de la fréquence des manifestations allergiques chez les patients atteints de mucoviscidose, ces gènes ont été étudiés en tant que potentiels gènes modificateurs (Aron Y et al, 1999). Des recherches ont montré que, chez les adultes atteints de mucoviscidose, les gènes HLA-DR3 et DR4 étaient associés à l'infection pulmonaire par *P.aeruginosa*. Les sujets non porteurs du gène DR4 ou porteurs du gène DR7 étaient plus souvent infectés que les sujets porteurs de DR4 ou non porteurs de DR7. En outre, le taux plasmatique de l'immunoglobuline IgE était plus élevé chez les sujets DR7 (Aron Y et al, 1996). Par contre, les fonctions respiratoires n'étaient pas différentes dans ces groupes.

7-4-2-6- α -1 antitrypsine :

Un des premiers gènes à avoir été étudié est l' α -1-antitrypsine, enzyme inhibitrice de protéases. Cette enzyme, en se fixant sur l'élastase des neutrophiles, inhibe ses effets délétères, en particulier la destruction du tissu pulmonaire et l'élimination de germes pathogènes comme *P.aeruginosa*. Des taux élevés d'élastase des neutrophiles ont été retrouvés dans les voies respiratoires de patients CF. Un déficit en α -1-antitrypsine dans la mucoviscidose devrait aboutir logiquement à un excès d'élastase au niveau pulmonaire et donc à une pathologie respiratoire plus sévère.

En 2001, Mahadeva et ces collaborateurs ont montré une association entre le déficit en α -1-antitrypsine et une acquisition précoce du *P.aeruginosa* mais en revanche, pas d'association avec la sévérité de l'atteinte pulmonaire (Mahadeva R et al, 2001). Ces résultats ont été récemment controversés par une étude multicentrique canadienne ayant étudié 716 patients CF, cette étude ne montre pas d'association entre les génotypes du gène codant pour l' α -1-antitrypsine et la fonction pulmonaire, le devenir clinique et l'âge de la première infection à *P.aeruginosa* (Frangolias DD et al, 2003).



Chapitre 3 :

Diagnostic de la Mucoviscidose

Le diagnostic de la mucoviscidose repose sur :

- L'existence d'au moins un antécédent familial de mucoviscidose.
- La présence d'au moins une des manifestations cliniques évocatrices (Tableau 3)
(Tamalet A et al, 2000)

<i>Système respiratoire</i>	† Obstruction des voies respiratoires et bronchiolites.
	† Infection chronique par : <i>H.influenzae</i> , <i>S.aureus</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>B.cepacia</i> .
	† Inflammation.
	† Toux chronique.
	† Polypes nasaux.
	† Sinusites chroniques.
<i>Système digestif</i>	† Iléus méconial (en période néonatale).
	† Syndrome d'obstruction intestinale distale.
	† Prolapsus rectal.
	† Reflux gastro-oesophagien.
	† Insuffisance pancréatique exocrine.
† Pancréatite aigue.	
<i>Système hépatobiliaire</i>	† Cirrhose biliaire.
	† Lithiases vésiculaires.
<i>Système génital</i>	† Puberté retardée
	† Infertilité :
	○ Homme : azoospermie obstructive.
	○ Femme : consécutive à la présence d'un mucus cervicale anormal.
<i>Glandes sudoripares</i>	† Sueur très concentrée en chlore.

Tableau 3 : Symptômes cliniques évocateurs de la mucoviscidose.

Les signes cliniques évocateurs varient avec l'âge :

- En période néonatale : iléus méconial, ictère rétionnaire prolongé, détresse respiratoire, retard et lenteur d'évacuation du méconium.

- Chez le nourrisson et l'enfant : problèmes respiratoires à répétition, occlusion ou sub-occlusion intestinale, déshydratation, coup de chaleur, baiser salé, retard de croissance, diarrhée chronique, stéatorrhée, prolapsus rectal, myocardiopathie.

- Chez l'adulte, il s'agit le plus souvent de formes moins sévères et/ou incomplètes. Les deux principales circonstances du diagnostic sont des signes de

dilatation des bronches ou de stérilité masculine par agénésie bilatérale des canaux déférents.

Quelque soit l'âge de la révélation et les circonstances de la découverte, la démarche diagnostique est identique. Evoqué cliniquement, le diagnostic est confirmé par des testes biologiques fonctionnels et moléculaires (Robert C & Stern MD, 1997).

1- Diagnostic biologique :

En dehors du diagnostic moléculaire, le diagnostic biologique est basé sur les tests suivants :

- ó Le test de la sueur
- ó Le dosage de la trypsine immunoréactive (TIR)
- ó Mesure de la différence de potentiel nasal (DDP)

1-1- Le test de la sueur :

Les techniques utilisées pour la réalisation du test de la sueur comportent trois temps opératoires principaux :

1-1-1- Stimulation de la sudation :

L'obtention d'un échantillon de sueur pour l'analyse est de concept simple, cependant les difficultés rencontrées en pratique, ont conduit à la mise au point de différentes méthodes de test de la sueur. La première technique de stimulation de sudation, mise au point par Schwachman en 1955, consistait à provoquer une hyperthermie des sujets par l'utilisation de sac plastique, cependant, le temps requis pour obtenir une quantité suffisante de sueur est variable ; certains enfants deviennent fébriles après être rester seulement 30 minutes dans le sac, des adultes doivent y rester 2 heures. Cette méthode est cependant peu confortable. Mauer proposa en 1956 une stimulation par injection intradermique de drogue cholinergique mais c'est en 1959 que GIBSON et COOKE mettent au point la technique de stimulation par iontophorèse à la pilocarpine qui est une molécule cationique douée de propriétés cholinergiques, est transportée au niveau des glandes sudoripares au moyen d'un gradient électrique, et stimule leur sécrétion (Gibson LE, Cooke RE, 1959). Cette technique est encore aujourd'hui considérée comme méthode de référence. Elle consiste à provoquer la sudation (ionisation transcutanée) en faisant passer pendant quelques minutes un courant de très faible intensité au travers d'une compresse ou d'un papier filtre imprégnée de pilocarpine et déposée au niveau de l'avant-

bras (Figure 14). L'intensité du courant délivré est adaptée pour chaque appareil en fonction du type d'électrode et de support utilisés, elle est de l'ordre de 0,3 à 1,5mA, elle peut aller jusqu'à 5mA.

La concentration en pilocarpine, l'intensité électrique et la surface de stimulation conditionnent la durée de la stimulation. (Marchand M et al, 1998)



Figure 14 : Stimulation de la sudation

1-1-2- Recueil de la sueur :

La sueur émise doit être recueillie sans aucune altération de sa qualité : ni souillure, ni évaporation, ni perte de liquide. La faible quantité recueillie rend la technique d'autant plus délicate. Le recueil de la sueur diffère d'une méthode à l'autre ; il s'effectue d'après la technique de GIBSON et COOKE par la pose d'une compresse ou d'un papier filtre préalablement pesé sur la zone cutanée stimulée, un échantillon de sueur d'au moins de 100 mg est indispensable pour que le test soit interprétable (Katherisan N et al, 2004). D'autres techniques utilisent des micro capillaires ou des cupules.

1-1-3- Dosage du chlorure dans la sueur :

Le dosage s'effectue sur l'échantillon obtenu après dilution avec de l'eau distillée. C'est le principe de la méthode de GIBSON et COOKE qui est couplé à une titrimétrie classique de Schales et Schales .Il est possible de mesurer le taux de chlorures directement à l'endroit de l'émission sans recueil réel, par une électrode sélective posée à l'endroit de la stimulation.

La pratique de dosage doit s'entourer de multiples précautions : la précision de la pesée, élimination de tout risque de contamination chlorée par la verrerie, contrôle de la qualité des réactifs.

1-1-4- Interprétation de résultats :

Les résultats obtenus sont exprimés en milliéquivalents (mEq) ou en millimoles (mmol) de chlorures par litre de sueur. La valeur seuil de 60 mEq/L de chlorures permet une distinction extrêmement précise et fiable des sujets atteints ou non de mucoviscidose (Lenoir G et al, 1998). Les valeurs usuelles du test de la sueur se situent au-dessous de 40 mEq/L de chlorures. Entre 40 et 60 mEq/L de chlorures le diagnostic est douteux. Dans ce cas le test doit être répété à plusieurs reprises et la discussion doit s'aider d'arguments cliniques (Tableau 3).

Ce test doit être effectué avec soin, deux tests positifs sont nécessaires pour affirmer le diagnostic de la mucoviscidose. (Chinet T et al, 2000)

1-2- Dosage de la trypsine immunoréactive (TIR) :

Actuellement, dans deux tiers des cas, le diagnostic de la mucoviscidose se fait avant l'âge d'un an. Le dosage de la trypsine immunoréactive est la meilleure technique pour un dépistage néonatal (Heeley AF & Bangert SK, 1992).

La trypsine est une protéine de 201 acides aminés, d'un poids moléculaire de 23 kDa et qui possède quatre ponts disulfures. C'est une endopeptidase synthétisée par les cellules acineuses du pancréas sous forme d'une pro-enzyme qui inactive le trypsinogène, celui-ci est secrété dans le duodénum où il est activé sous l'action de l'entérokinase donnant la trypsine.

Une infime proportion du trypsinogène secrété se retrouve dans la circulation sanguine. Le pouvoir protéolytique de la trypsine est trop intense pour qu'elle soit isolée dans la circulation sanguine. Elle se présente donc dans le sérum, liée à des inhibiteurs des protéases tels que l' α 1-antitrypsine et l' α 2-macroglobuline.

Sous le terme de trypsine immunoréactive (TIR), on regroupe un ensemble de molécules qui ont en commun le caractère d'être reconnues par divers anticorps développés contre la trypsine humaine (anticorps antitrypsine). C'est la spécificité radio immunologique de l'enzyme liée à sa structure moléculaire qui permet d'effectuer le dosage de la trypsine sérique (Gaillard O, 2003)

Chez le sujet sain, la concentration de trypsine sérique (mesurée par technique radio isotopique) oscille entre 140 et 400ng/ml. Cette enzyme ne varie pas selon le sexe mais semble dépendre de l'âge car les valeurs sont un peu plus faibles chez l'enfant. Un taux

élevé correspond au passage du trypsinogène dans le sang circulant en raison de l'obstruction des acini pancréatiques ; avec l'âge, le taux décroît puis devient inférieur à la normale.

Comme pour les autres dépistages pratiqués en période néonatale, le sang capillaire est prélevé aux alentours du 4^{ème} jour de vie par incision avec une micro lance au niveau de la face latéro-postérieure du talon. Il est déposé par gouttes sur une fiche en papier filtre, puis séché à température ambiante pendant deux à trois heures, avant d'être expédié au laboratoire.

Le dosage de la trypsine immunoréactive requiert l'utilisation des méthodes d'immunoanalyse avec marqueur. Ces méthodes sont classées d'une part en fonction de leur principe immunochimique : excès d'antigène (dosage par compétition) ou excès d'anticorps (méthode « sandwich »), d'autre part en fonction de la nature du signal émis par le marqueur : radioactivité, fluorescence, activité enzymatique, etc....

La trypsinémie doit être interprétée en fonction de l'âge. Le taux moyen mesuré entre le 3^{ème} et le 5^{ème} jour de la vie s'établit entre 200ng/ml et 300ng/ml. Au dessus de 700ng/ml, la présomption de la mucoviscidose devient forte. Des taux supérieurs à 900ng/ml sont considérés comme pathologiques. L'hypertrypsinémie n'est cependant pas pathognomonique de la mucoviscidose ; il existe en effet des hypertrypsinémies néonatales transitoires (associées à une hypoxie ou à une souffrance foetale) ou persistantes (associées aux trisomies 13, 18 ou 21, aux insuffisances rénales, aux pathologies pancréatiques, hépatiques ou intestinales). Aussi, en cas de positivité, et notamment en l'absence d'autre pathologie associée, seul le test de la sueur permet de trancher.

1-3- Mesure de la différence de potentiel trans-épithéliale nasale :

Les transports actifs d'ions à travers l'épithélium des voies respiratoires et les glandes sudoripares génèrent une différence de potentiel (DDP) transépithélial qui peut être mesurée *in vivo* (Middleton PG et al, 1994)

La technique d'identification des anomalies de transport ioniques qui consiste à mesurer le DDP transépithélial au niveau du tractus respiratoire, a été mise au point par Knowles en 1981. Cette valeur est significativement augmentée chez les patients CF par rapport à celle du sujet sain (Knowles M et al, 1981).

La DDP est mesurée entre deux électrodes : l'une dite « électrode de référence », est introduite dans l'espace cellulaire sous cutané (en général dans l'avant bras). Cet espace est

en continuité électrique avec celui des voies aériennes. L'autre électrode est dite « exploratrice », en contact avec le pôle apical de l'épithélium cilié nasal, qui sera la source de DDP car il transporte activement les ions chlore, sodium et potassium. Un millivoltmètre à haute impédance mesure donc la DDP entre ces deux électrodes (Domingo-Ribasa C et al, 2006)

La DDP nasale est une valeur négative exprimée en milli-volts (mV), chez les patients CF la DDP nasale (en valeur absolue) est environs deux fois plus élevés que chez le sujet sain (Ho LP et al, 1997). D'après une étude faite par Meharzi et ces collaborateurs, chez 50 patients CF d'âge moyen de 10 ans et de 21 sujets témoins d'âge moyen de 8 ans, la DDP nasale est retrouvée chez les patients CF (-28 ± 8 mV) par rapport au groupe témoin (-8 ± 3 mV) (Meharzi A et al, 1995).

La mesure de la DDP nasale paraît reproductible, aussi bien chez les sujet sain que chez les patients CF, elle constitue une aide au diagnostic de mucoviscidose mais c'est un examen long, délicat et nécessitant un personnel entraîné.

2- Diagnostic moléculaire :

Le clonage du gène CFTR et l'identification des mutations causales ont permis de mettre en œuvre des stratégies de diagnostic moléculaire adaptées à la situation clinique, dans les formes atypiques de la maladie qui s'accompagnent d'un test de la sueur dans les limites de la normale. La mise en évidence d'allèles mutés est un élément de diagnostic (Rosenstein R & Cutting G, 1998). L'étude de l'ADN est aussi utilisée lors du diagnostic néonatal de la maladie en complément du dosage de la trypsine immunoréactive (Ferec C et al, 1995).

Les différentes techniques utilisées reposent presque toutes sur l'analyse de fragments d'ADN du gène CFTR amplifiée par PCR (**Polymerase Chain Reaction**).

2-1- L'approche directe de diagnostic :

Le grand nombre de mutations identifiées dans les chromosomes de patients CF oblige à mettre en place une stratégie par étapes. Dans un premier temps le diagnostic est basé sur la recherche d'une ou plusieurs mutations connues qui sont réalisées à l'aide de cinq méthodes différentes :

- i** L'analyse des produits PCR de l'exons 10 par électrophorèse en gel de polyacrylamide permet de rechercher rapidement la mutation $\Delta F508$ et de la

différencier de la $\Delta I507$ grâce aux profils différents des hétéro duplex engendré chez l'hétérozygote.

- ï La séparation électrophorétique de produits de PCR après digestion enzymatique permet de déceler les mutations qui modifient des sites de restriction naturels ou introduits dans les produits d'amplification.
- ï L'analyse de produits PCR par hybridation avec sondes oligonucléotidiques spécifiques (ASO : Allele Specific Oligonucleotide) ou par reverse dot blot, est utilisée pour identifier rapidement 8 à 16 mutations
- ï L'étude par des méthodes électrophorétiques ou chromatographiques permettant de détecter des modifications de séquence : DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), SSCA (Single Strand Conformation Analysis), HET (Heteroduplex Analysis), DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Phase Chromatography) (Nollau P et al, 1997). Ces méthodes sont suivies d'un séquençage afin d'identifier les modifications de séquence.
- ï Des trousse commerciales permettant la recherche rapide de mutations fréquentes ont été développées. La trousse CF12 commercialisée par « Cellmark Diagnostics » permet la détection de 12 mutations en utilisant la méthode d'amplification allèle dépendante ARMS (Amplification Refractory Mutation System)

Le choix des méthodes par un laboratoire dépend de leur sensibilité et de leur fiabilité, mais aussi de l'histoire du laboratoire et des outils déjà disponibles et maîtrisés. Chaque méthode a ses avantages et ses limites que les laboratoires ne doivent pas méconnaître (Tableau 4).

Méthodes de détection ciblées des mutations	Mutations détectées	Avantages	Limites
Analyse des hétéroduplex (molécules double brin présentant un mismatch) (PCR + gel de contrôle)	Principalement ? F508 et ? I507 autres microinsertion/délétion	Simple et rapide	Profil de migration non spécifique d'une mutation
Digestion par enzyme de restriction (PCR+restriction+gel de contrôle)	En fonction de la séquence	Simple et rapide Identification d'une mutation détectée par une méthode de balayage	Non spécifique, si la mutation abolit un site de restriction (GSSLD et RSSXX abolissent le même site de coupure HincII)
Hybridation à des ASO / dot blot / reverse dot blot	8 à 17 mutations	Rapide, automatisable, plusieurs mutations à la fois	Mise au point délicate
ARMS (Amplification spécifique d'allèles)	12 à 20 mutations	Rapide, plusieurs mutations à la fois	Choix critique des amorces de PCR Résultat fondés sur l'absence de produits PCR Non distinction des homozygotes et des hétérozygotes
Ligation d'oligonucléotides (OLA)	31 mutations	Rapide, plusieurs mutations à la fois	Nécessite l'utilisation d'un séquenceur d'ADN (coûteux)
DGGE	Toute mutations localisée dans les régions codantes et les bornes introniques	Grande sensibilité (>95%)	Mise au point difficile Pas d'automatisation possible Risque de ne pas détecter certaines mutations à l'état homozygote
DHPLC		Rapide, semi-automatisée	Mauvaise détection des mutations à l'état homozygote Appareil coûteux
SSCP		Simple et rapide	Sensibilité limitée 80-85%
séquençage		100% sensibilité	Coûteux si utilisé en 1 ^{ère} intention

Tableau 4: Avantages et limites des méthodes de détection des mutations du gène CFTR (Ser JR et al, 2002)

2-2- L'approche indirecte de diagnostic :

Le diagnostic génotypique indirect s'appuie sur les résultats d'une analyse de liaison génétique effectuée à l'aide de marqueurs ADN du gène CF. Il permet d'identifier, chez chacun des deux parents d'un enfant atteint, celui des deux chromosomes qui est porteur du gène délétère. Cette approche a encore quelques indications mais implique obligatoirement d'étudier le cas index :

- ó Mutation(s) non identifiée(s) chez le cas index si le diagnostic de la mucoviscidose est certain.
- ó Mise en évidence d'une délétion par anomalie de ségrégation des allèles.
- ó Mise en évidence d'une disomie uniparentale.
- ó Suspicion d'une contamination des cellules fœtales par des cellules maternelles qui peut se produire lors du prélèvement fœtal.
- ó Exclusion du gène CFTR par comparaison des marqueurs transmis par les parents : observation d'un enfant malade et d'un enfant sain qui ont hérité les mêmes haplotypes parentaux.

L'approche de diagnostic direct est particulièrement avantageuse par rapport à l'approche indirecte lorsque les apparentés demandeurs sont éloignés du cas index et/ou que l'étude de la ségrégation des marqueurs est impossible ou non informative. Lorsque l'étude moléculaire du gène CFTR est demandée dans un but de diagnostic (formes atypiques ou frontières de la mucoviscidose), seule la détection des mutations peut éventuellement permettre de confirmer le diagnostic.

3- Place du conseil génétique :

Le conseil génétique intervient dans un grand nombre de situations, en particulier dès qu'un couple ayant une histoire familiale de mucoviscidose est demandeur d'un diagnostic prénatal. Il a pour objectifs d'évaluer le risque, pour le couple, d'avoir un enfant atteint de mucoviscidose, de l'informer sur la maladie et les possibilités de prise en charge thérapeutique, encore bien insuffisantes aujourd'hui, sur la possibilité d'un diagnostic prénatal et les moyens employés pour le réaliser, ainsi que sur les risques inhérents au prélèvement. Le diagnostic prénatal ne se conçoit que si le couple est préparé à l'idée de l'interruption médicale de grossesse en cas de diagnostic positif (Julia S & Bieth E, 2000)

3-1- Parents d'enfants atteints :

C'est la situation la plus simple, les deux conjoints sont *a priori* hétérozygotes et leur risque d'avoir un enfant atteint est de 25 %. L'étude moléculaire du gène CFTR et l'identification des mutations permettent de proposer un diagnostic prénatal fiable.

3-2- Couples dont un des membres est apparenté à un sujet atteint :

Le risque *a priori*, pour un apparenté, d'être porteur d'une mutation du gène CFTR dépend de son lien de parenté avec le cas index : 2/3 dans la fratrie, 1/2 chez les oncles et tantes, 1/4 chez les cousins germains, etc. La fréquence des hétérozygotes pour la mucoviscidose dans la population générale étant de 1/25, le risque *a priori* pour le couple d'avoir un enfant atteint est respectivement de 1/150, 1/200 et 1/400.

Au mieux, il faut d'abord rechercher si l'apparenté est porteur d'une des anomalies du cas index. S'il ne l'est pas, le couple peut être rassuré, en sachant que seuls les frères et sœurs d'enfants atteints pourront l'être totalement. On ne peut en effet définitivement exclure que des apparentés plus éloignés n'aient pas hérité une mutation du gène CFTR d'un autre ascendant. Si l'apparenté est hétérozygote, le risque pour le couple est alors de 1/100, quel que soit le lien de parenté (Girodon E et al, 1997).

3-3- Suspicion anténatale sur signe d'appel échographique :

Une place à part est à faire aux couples n'ayant aucune histoire familiale de mucoviscidose et qui attendent un enfant chez qui l'on suspecte la maladie devant la découverte d'une masse abdominale hyperéchogène évoquant une obstruction digestive. Le plus souvent, le terme de la grossesse est supérieur à vingt semaines d'aménorrhée et le dosage des enzymes intestinales dans le liquide amniotique ne donne pas d'information. La recherche d'anomalies du gène CFTR, menée parallèlement à l'établissement du caryotype fœtal. L'étude moléculaire doit être menée en parallèle chez les parents : en effet, la découverte chez l'un d'eux d'une mutation du gène CFTR non héritée par le fœtus élimine le diagnostic de mucoviscidose.

Le conseil génétique est en définitive un acte médical indispensable dans la prise en charge tant sur le plan de la prévention de la récurrence au niveau familial que sur le plan conceptionnel. Au sien d'une équipe multidisciplinaire le conseiller généticien informe du risque génétique et coordonne les différentes missions médicales en vue de donner une réponse adaptée au couple ayant un projet parental.



Chapitre 4 :

Essais sur la thérapie génique

Bien que l'amélioration des traitements conventionnels, et surtout une bien meilleure prise en charge des patients, aient permis d'augmenter de manière significative l'espérance de vie des malades, la mucoviscidose reste malheureusement une maladie contre laquelle aucun traitement définitif n'est encore disponible.

La thérapie génique consiste à introduire une séquence codante (ADNc) du gène CFTR à l'intérieur des cellules cibles, dans le cas particulier les cellules épithéliales bordant la lumière bronchique, afin de suppléer au CF muté et de rétablir la fonction physiologique de l'épithélium. Ceci devrait les transformer en cellules comparables à celles de patients hétérozygotes connues pour être phénotypiquement normales et devrait empêcher le développement des manifestations broncho-pulmonaires de la maladie (Bellon G, 1998).

Les poumons constituent la cible principale de tels traitements par thérapie génique étant donné que les anomalies digestives sont moins graves et plus facilement maîtrisées par les traitements symptomatiques.

Le processus de transfert nécessite donc généralement un vecteur permettant de compacter et de délivrer le gène d'intérêt dans la cellule où il doit s'exprimer pour un bénéfice thérapeutique (Figure 15). Pour introduire le gène d'intérêt à l'intérieur d'une cellule, deux types de vecteurs sont actuellement plus étudiés sur la thérapie génique de la mucoviscidose (Lee Tim WR et al, 2005) (Flotte TR et al, 2001) : Les vecteurs viraux et les vecteurs non viraux. Depuis 1993, plusieurs essais cliniques de thérapie génique de mucoviscidose ont été mis en évidence. Ils diffèrent cependant par la nature du vecteur de transfert de gènes utilisé et par la procédure d'administration. La faisabilité et la sûreté de ces procédures de transferts de gènes ayant été établies durant ces études afin d'évaluer plus précisément : les avantages et les inconvénients relatifs des vecteurs sélectionnés, et ceux de nouveaux modes d'administration des vecteurs (Pavirani A et al, 1999).

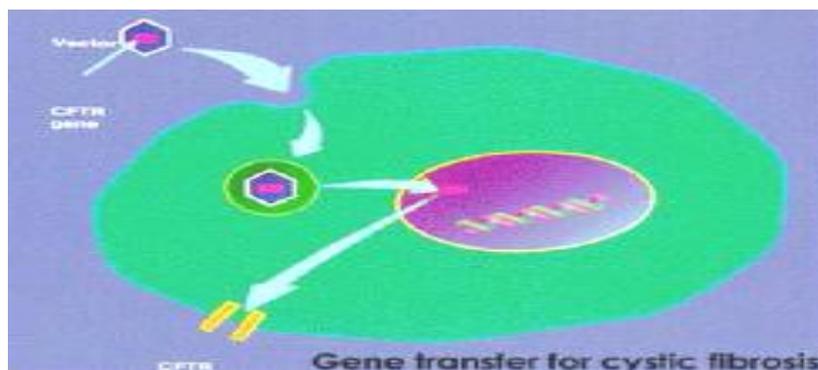


Figure 15 : Transfert du gène CFTR (www.unifr.ch/nfp37/)

Un vecteur idéal doit avoir les caractéristiques suivantes :

- † Une capacité suffisante de transfert.
- † Etre indétectable par le system immunitaire.
- † Non inflammatoire.
- † Avoir une longue durée d'expression et/ou une possibilité d'administrer d'une manière répétée.

1- Les vecteurs viraux :

Se sont des virus qui ont la capacité de pénétrer les cellules et de mélanger leur matériel génétique avec celui des cellules. Ce sont donc de bons candidats vecteurs, mais la virulence doit d'abord être atténuée. On compte actuellement plusieurs types de vecteurs viraux. Parmi ces vecteurs, on retrouve : les rétrovirus, les adénovirus et les AAV (Adeno Virus).

1-1- Les rétrovirus :

Les rétrovirus se sont des virus dont le matériel génétique est de l'ARN et qui est transcrit en ADN par la transcriptase inverse. Les rétrovirus amène le gène thérapeutique à l'intérieur du noyau de la cellule cible lors de la mitose et l'intègre dans le chromosome.

L'utilisation des rétrovirus présente de nombreux avantages tels que l'expression prolongée de gène insérée et une haute efficacité de transduction. Malgré cela, il existe encore des inconvénients pour ce type de vecteurs citant la taille limitée du gène inséré, un risque de mutation suite à une mauvaise insertion et la grande difficultés de reproduction.

1-2- Les adénovirus :

C'est un virus dont le matériel génétique est de l'ADN double brin, il amène le gène thérapeutique dans le noyau de la cellule cible, qu'elle soit en mitose ou non. Par contre, le gène ne s'intègre pas au chromosome mais reste en position épisomale. Il a donc tendance à disparaître au fil des divisions cellulaire (Naimi D et al, 1999) (Hitt MM, Graham FL, 2000).

Le génome adénoviral est subdivisé en régions génétiques exprimées, soit précocement durant le cycle viral et codant pour des protéines régulatrices (régions early E1 à E4), soit

après la réplication virale et codant pour des protéines structurales (Imperiale MJ, Kochanek S, 2003).

Le vecteur adénoviral contenant l'ADNc du gène CFTR (AdCFTR) est construit par délétion de la région E1, essentiel à la réplication et indispensable de l'activation de la transcription des autres promoteurs viraux, et de la région E3 dont la fonction est d'assurer *in vivo* une atténuation de la réponse immunitaire de l'hôte mais dont l'absence n'est pas un handicap pour la réplication virale *in vitro*. De plus, le gène E3 n'est enlevé ici que pour faire de la place afin de permettre ainsi l'introduction de séquences exogènes de plus grande taille. La région virale E1 est remplacée par une « cassette d'expression » contenant l'ADNc du gène CFTR (Figure 16)

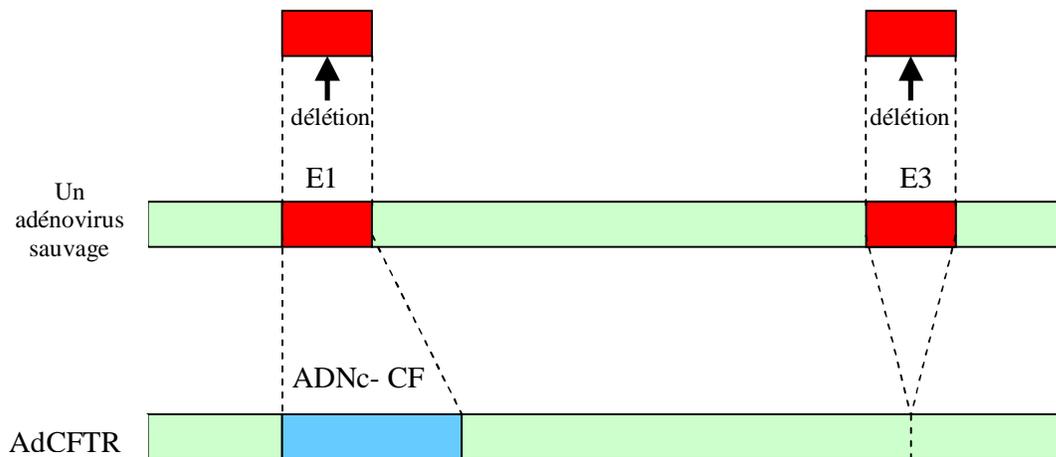


Figure 16 : Schémas de la construction d'un AdCFTR

Les études *in vitro* ont démontré que ces vecteurs AdCFTR permettent effectivement une transduction efficace de cellules pulmonaires isolées de patients et l'obtention d'une forte expression d'une protéine CFTR fonctionnelle, avec pour conséquence la correction des anomalies de transport ionique (Paviani A et al, 1996) (Naimi D et al, 1999). Un AdCFTR a été administré à 6 patients. La procédure a été bien tolérée, aucune déviation des paramètres inflammatoires ou immunologiques n'ayant été observée. Plus surprenant cependant, aucune augmentation de la concentration en anticorps dirigés contre le vecteur adénoviral n'a été observée. Bien que la dose virale administrée dans cette étude soit relativement faible pour le poumon entier, une persistance de l'ADN viral et de l'expression du gène CFTR transduit a pu être mise en évidence respectivement durant 3 semaines et 15 jours (Perricone MA et al, 1997). Cependant, il semble que l'efficacité de

transduction soit progressivement diminuée au fur et à mesure des injections, en quelques sortes l'expression du gène CFTR diminue après la seconde et la troisième administration et le nombre maximal d'injections efficaces reste donc indéfini. (Harvey BG et al, 1999)

1-3- Les AAV :

C'est un virus non enveloppé à ADN simple brin, non pathogène, très répandu chez l'homme. Il est naturellement déficient pour les gènes *rep* (qui codent pour les protéines de réplication) et *cap* (qui codent pour les protéines de capsid), il doit être aidé par un adénovirus ou par le virus de l'herpès pour se répliquer. C'est le seul virus de mammifère connu qui s'intègre spécifiquement dans une région du génome (bras court du chromosome 19 humain) mais cette propriété disparaît lorsqu'il est modifié en vecteur. Le gène CFTR est inséré dans le chromosome de la cellule ou reste en position épisomale.

Un vecteur AAV portant le gène CFTR a été administré dans l'épithélium nasal et par bronchofibroscopie dans les poumons. Aucune toxicité n'a été observée chez les patients traités, avec une persistance du gène CFTR jusqu'à 70 jours après l'administration du vecteur (Wagner JA et al, 1998). Si les vecteurs AAV possèdent des avantages spécifiques, dont notamment un pouvoir inflammatoire réduit, les difficultés associées à leur production à grande échelle (Flotte TR, 2003).

Seule la mise au point d'une lignée de complémentation produisant de manière permanente les protéines adénovirales nécessaires à la réplication du vecteur AAV, et les protéines *Rep* et *Cap* du AAV, permettrait d'assurer un développement compatible avec une application clinique. Or, la production d'une telle lignée n'a pas encore pu être réalisée en raison des fortes toxicités de certaines de ces protéines (Pavirani A et al, 1999).

2- Les vecteurs non viraux ou synthétiques :

Les vecteurs synthétiques sont à base d'ADN, de protéines, de lipides ou de polymères cationiques, ils n'ont pas de risque de virulence puisque se sont des particules inertes.

L'utilisation de vecteurs non viraux peut nécessiter une injection directe d'ADN plasmidique ou le mélange d'ADN plasmidique avec des composés qui lui permettent de traverser la membrane cellulaire et d'empêcher l'ADN de se dégrader (Alton EW, 2004).

Il existe deux types de vecteurs synthétiques : l'ADN nu et les liposomes.

2-1- L'ADN nu :

Le gène CFTR est cloné dans un plasmide bactérien construit de façon à exprimer dans les cellules humaines la protéine CFTR. Le plasmide nu (parce que sans vecteur viral ou autre support) est injecté dans le tissu pulmonaire, entre dans une cellule où il se maintient dans le noyau. L'efficacité du système reste cependant très faible.

2-2- Les liposomes :

Les liposomes sont de petites vésicules creuses composées en général de lipides cationiques synthétiques capables de véhiculer de l'ADN en elles et l'introduire à l'intérieur de la cellule (Un liposome peut fusionner avec la membrane cellulaire, libérant son contenu dans la cellule).

Il existe deux principaux chemins de livraison de l'ADN par les liposomes (Templeton SN, 2002) (Figure 17) il est :

- † Complexe ADN-liposome : Un liposome peut fusionner avec la membrane cellulaire, libérant son contenu dans la cellule (Figure 17A)
- † Liposome complexé au plasmide : Le complexe liposome-plasmide (appelé également *lipoplexe*) est introduit dans la cellule cible par endocytose l'ADN doit ensuite sortir de l'endosome et échapper au lysosome pour atteindre le noyau ; seulement une petite partie de complexe gagne l'intérieur du noyau, où ils persistent sous forme extrachromosomique. (Figure 17B)

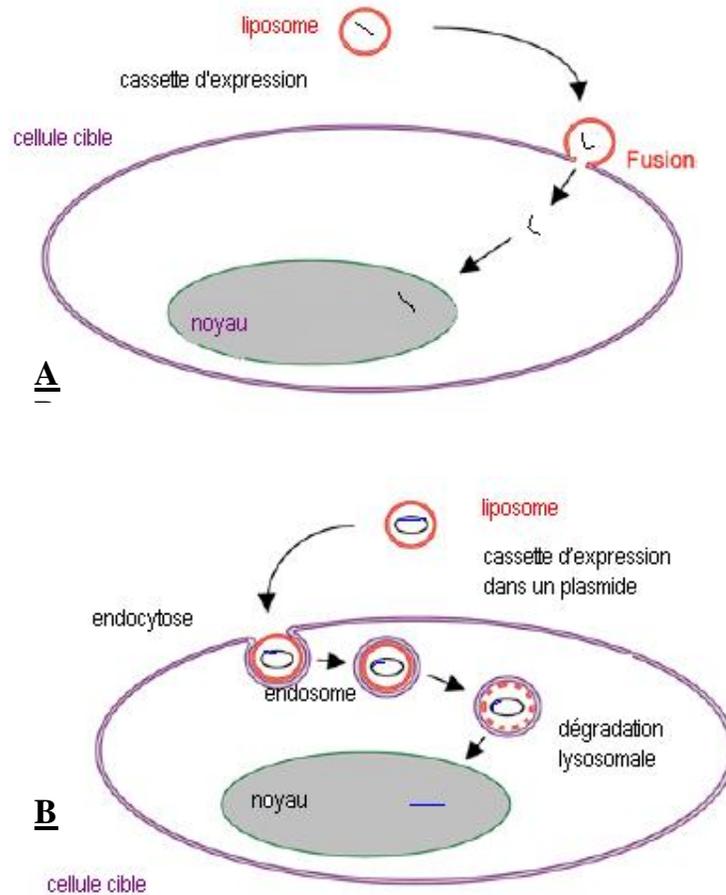


Figure 17 : Les mécanismes d'entrée des complexes ADN-liposome-plasmide
(A) entrée par fusion, (B) entrée par endocytose

Comparé au transport par les virus, ce système de transfert présente un certain nombre d'avantages:

- Il ne risque pas d'introduire dans la cellule du DNA viral qui pourrait se révéler indésirable
- On peut transférer dans la cellule cible du DNA (cassette) de grande taille, au moins jusqu'à 50 kb.
- Le risque de réponse inflammatoire ou immune est moindre à cause de l'absence de protéines

Par contre le rendement est très faible.

Partie

Pratique



Matériels et méthodes

I- Matériels d'étude :

Notre étude est réalisée sur 8 familles. L'âge des patients varie entre 6 mois et 22 ans : 5 patients présentaient un test positif de la sueur (TS), 3 patients sont suspects de mucoviscidose par des symptômes évocateurs de la maladie (Tableau 3), dominée principalement par les broncho-pneumopathies à répétition et des symptômes digestives. (Tableau 5)

Le test de la sueur consiste en une mesure du taux des ions chlorés par litre de sueur. Les résultats obtenus sont exprimés en milliéquivalents par litre de sueur (mEq/L). Une valeur supérieure à 60 mEq/L représente un TS positif. Les valeurs usuelles se situent au-dessous de 40 mEq/L de chlorures. Entre 40 et 60 mEq/L de chlorures le diagnostic de la mucoviscidose est douteux.

P	L'âge	TS ([Cl ⁻] mEq/L de sueur)
01	6 mois	Non fait
02	4 ans	108 – 81
03	8 ans	76 – 80
04	6 ans	Non fait
05	22 ans	70 – 88
06	12 ans	Non fait
07	3 ans	81 – 69
08	5 ans	80 – 94

Tableau 5 : Les patients

Ces malades sont orientés par les médecins de différents centres hospitaliers et services de CHUC vers le laboratoire de Biologie et Génétique Moléculaires pour une étude moléculaire du gène CFTR.

Un recueil de données est effectué au niveau du service de Biologie et Génétique Moléculaire en plus du dossier médical du malade, un interrogatoire des parents du patient est mené par nous même (Annexe 2), permettant la construction de son arbre généalogique

(Annexe 3). L'interrogatoire des parents du patient est indispensable pour suivre l'histoire évolutive de la pathologie ; il faut toujours tracer un arbre généalogique et rechercher s'il y a consanguinité. Nous avons également recherché dans la famille d'autres pathologies qui pourraient avoir un rapport avec la mucoviscidose.

II- Méthodes d'étude :

Le prélèvement sanguin se fait sur tube EDTA, permet d'étudier l'ADN et plus précisément d'identifier l'anomalie moléculaire du gène, on procède à cette analyse en plusieurs étapes :

1- Extraction de l'ADN :

L'extraction de l'ADN génomique à partir des leucocytes du sang total des patients s'effectue par lyse hypotonique de globules rouges, ils seront ensuite traités par un détergent (SDS : **S**odium **D**odecyl **S**ulfate) et une protéinase K.

Dans le lysat, l'ADN nucléaire ainsi libéré est associé aux différentes protéines qui seront digérées et éliminées par précipitation au NaCl. Le surnageant ainsi récupéré est traité par de l'éthanol dans lequel une pelote de l'ADN se forme par précipitation. (Annexe 5)

2- Contrôle quantitatif et qualitatif d'ADN :

- L'ADN absorbe à 260 nm alors que les protéines absorbent à 280 nm (témoins de contamination).

- L'échantillon est dilué au 1/100 dans l'eau distillée stérile (10 µl de l'ADN solubilisé dans 990 µl de l'eau stérile).

- Les valeurs de la DO sont lues à 260 et 280 nm (longueurs d'onde d'absorption des acides nucléiques et des protéines respectivement) dans le même type de cuve que celle ayant servi à faire le zéro (eau stérile).

- La valeur du rapport de DO 260 nm / DO 280nm informe sur la pureté de l'ADN indique la contamination de l'ADN par les protéines ou par les ARN.

On considère que

- L'ADN est suffisamment pur lorsque le rapport $R = DO_{260} / DO_{280}$ est compris entre 1.6 et 2 ($1.6 < R \leq 2$).
- L'ADN est contaminé par les protéines si : $DO_{260} / DO_{280} < 1.6$.
- L'ADN est contaminé par les ARN si : $DO_{260} / DO_{280} > 2$.

La pureté de l'ADN est essentielle pour une action efficace des enzymes de restriction utilisées par la suite. Dans le cas où l'ADN est contaminé, ce dernier ne laisserait pas aboutir à un bon résultat dans les étapes suivantes de son analyse par PCR. Il est donc indispensable de procéder à une autre extraction de la pelote de l'ADN afin d'atteindre la pureté souhaitée. Les ADN purs sont conservés à + 4°C jusqu'à utilisation.

La densité optique à 260 nm permet de calculer la concentration de l'ADN sachant que :

1 unité de DO_{260} nm = 50 μ g/ ml d'ADN double brin.

Donc :

La concentration de l'ADN en μ g /ml = facteur de dilution x DO_{260} x 50 μ g / ml

La quantité de l'ADN peut être vérifiée par contrôle de taille des molécules d'ADN ainsi obtenus par extraction, en faisant migrer à 100 volts 5 μ l de la solution d'ADN contenant 2 μ l de BET (**B**romure d'**E**thydium) (100 mg/ml) sur un gel d'agarose 0.8 %. Le BET rend visible l'ADN sous UV, il s'intercale entre ces bases.

3- Stratégie de détection de la mutation Δ F508 :

3-1- Amplification du fragment d'intérêt par PCR :

L'approche que nous avons choisie pour mettre en évidence la délétion de 3 pb CTT au codon 508 (Δ F508) au niveau de l'exon 10 du gène CFTR consiste tout d'abord à amplifier la région d'intérêt par PCR. Cette méthode décrite par Saiki et al en 1985 qu'on appelle réaction en chaîne de polymérase consiste à amplifier une région cible de l'ADN génomique. Pour cela, il est hybridé avec deux amorces oligonucléotidiques (20-30 bases), complémentaires des extrémités 3' des deux brins d'ADN encadrant la région à étudier. Elle est amplifiée en

présence de désoxynucléotides triphosphates et d'une ADN polymérase, thermorésistante : la Taq-polymérase (*Thermus aquaticus*).

L'amplification s'effectue grâce à trois réactions consécutives : une dénaturation des brins d'ADN suivie d'une hybridation des amorces et enfin une élongation. Théoriquement après un cycle d'amplification, on obtient 2 copies du fragment désirer à amplifier (un cycle). Les deux nouveaux doubles brins sont dénaturés par chauffage pour produire des matrices simple brin et un deuxième cycle de réplication est réalisé. Des cycles répétés de synthèse et de dénaturation aboutissent à une augmentation exponentielle du nombre de segments répliqués.

- Composants de la réaction PCR :

Volume	Constituants	Concentrations finales
5 µL	Tampon (10X)	1X
5 µL	dNTP (2 mM)	0.2 mM
4 µL	MgCl ₂ (25 mM)	2 mM
0.8 µL	DFA (105 µM)	1.6 µM
0.8 µL	DFB (103 µM)	1.6 µM
0.3 µL	Taq polymérase (5U/µL)	0.03 U/µL
1 µL	ADN	
qsp 50 µL	Eau distillée stérile	

Tableau 6 : Composants de réaction PCR

Deux amorces encadrant la région ont été utilisé:

DFA : 5' GTT TTC CTG GAT TAT GCC TGG 3' (amorce sens)

DFB : 5' ATG CTT TGA TGA CGC TTC TGT 3' (amorce anti-sens)

Tous les éléments indispensables à la réaction sont rassemblés dans un tube (Tableau 6) qui sera soumis aux différentes températures correspondant à chaque étape. Ces cycles de température sont réalisés automatiquement dans un thermocycleur. Dans notre étude les réactions en chaînes sont programmées comme suit :

94°C pendant 7 mn

94°C pendant 40 sec
52°C pendant 40 sec
72°C pendant 1 mn } 30 cycles

72°C pendant 10 mn
94°C pendant 7 mn
56°C pendant 30 mn pour une élongation plus importante

La série d'amplification doit comporter un contrôle négatif (B : blanc) témoignant de la qualité de l'amplification (contamination de l'ADN), trois contrôles positifs : un homozygote $\Delta F508 / \Delta F508$, un hétérozygote $\Delta F508 / \text{non } \Delta F508$ et un homozygote normal N/N.

3-2- Contrôle de produits PCR :

Le Contrôle de la taille des fragments amplifiés s'effectue par une électrophorèse sur un gel d'agarose à 2 % (2g d'agarose qsp 100 ml de TBE : tampon **T**ris **B**orate **E**DTA) (Annexe 4) additionné de 10 μ l de BET qui est un colorant fluorescent s'intercalant entre les bases azoté et provoque une émission de fluorescence en présence de radiation UV, permettant ainsi la visualisation des bandes d'ADN)

Le gel est coulé sur une plaque de la cuve horizontale.

Dans chaque puits du gel, il est déposé 10 μ l de produit d'amplification + 2 μ l BBP (**B**leu de **B**romophénol).

Les dépôts se font du coté cathode (-). Le système soumis à une migration sous un courant de 100 volts pendant 45 minutes. (Figure 18)

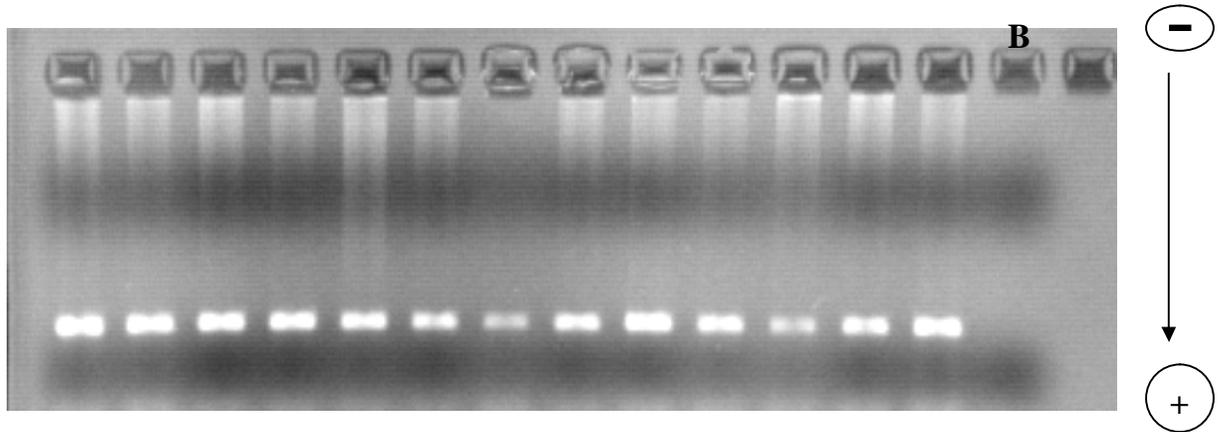


Figure 18 : Contrôle de la qualité d'amplification sur gel d'agarose 2 % ; B : blanc

Cette analyse permet aussi, d'observer si une éventuelle contamination de l'ADN est survenue au cours de la PCR.

3-3- Migration sur gel de polyacrylamide 12 % :

Après avoir amplifié la région d'intérêt par PCR, on procède à une séparation des fragments amplifiés par une électrophorèse verticale sur gel de polyacrylamide 12 %. C'est une migration en fonction de la taille et de la charge sous un champ électrique.

L'ADN est chargé négativement donc les différents ADN possèdent la même densité de charge et migreront vers le pôle positif, soit l'anode. De plus le gel de polyacrylamide est finement réticulé, donc les molécules d'ADN de petites tailles migrent plus vite que les molécules de grandes tailles, c'est l'effet de tamisage. En outre ce gel permet d'analyser des fragments de moins de 1000 pb en raison de ses petits pores.

Le polyacrylamide est formé par copolymérisation d'acrylamide et de bisacrylamide, cette réaction se fait selon un mécanisme radicalaire. Ces radicaux libres sont formés à partir du persulfate d'ammonium et en présence de TEMED (**T**étra **M**éthyle **E**thylèn **D**iamine). On obtient ainsi un réseau, dont les mailles sont de taille variable en fonction des proportions d'acrylamide et de bis-acrylamide utilisées.

La concentration de polyacrylamide est ajustée suivant la taille des fragments d'ADN à séparer (Tableau 7) (Sambrook J et al, 1989)

Taille des fragments d'ADN à séparer	% en polyacrylamide
1000 pb à 2000 pb	3.5
80 pb à 500 pb	5
60 pb à 400 pb	8
40 pb à 200 pb	12
25 pb à 150 pb	15
6 pb à 100 pb	20

Tableau 7 : Concentration en polyacrylamide en fonction de la taille des fragments à séparer (Sambrook J et al, 1989)

Concernant notre étude, la région encadrée par les deux amorces aura une taille de 92 pb pour un fragment normal, toutefois le fragment délété sera à 89 pb, ce qui justifie le choix d'un pourcentage du gel de polyacrylamide à 12 %.

Préparation d'un gel de polyacrylamide 12 %

- Monter le support du gel : maintenir deux plaques de verre bien serrées verticalement et séparées par un joint de 2 mm d'épaisseur et placer de chaque coté des pinces fixatrices.

Bis Acrylamide	15 ml
Acrylamide	14.25 ml
TBE 10X	5 ml
H2O Dist	15.75 ml
APS 25%	156 µl
TEMED	41 µl
Préparation pour 50 ml de gel	

- L'addition de persulfate d'ammonium et de TEMED (agents polymérisant), juste avant de couler le gel (risque de polymérisation dans le bécher).

- Homogénéiser, couler immédiatement en versant le contenu de bûcher entre les deux plaques de verre par une seringue en ayant soin de ne pas faire de bulles d'air.
- Placer le peigne plat afin de former les puits et laisser polymériser à température ambiante pendant 1h 30 mn à 2 heures.

Quand le gel est polymérisé, plonger le système (gel + électrodes) dans la cuve verticale thermostaté contenant du tampon TBE 10X

- faire le dépôt. Dans chaque puits du gel, il est déposé 12 µl de produit d'amplification + 5 µl BBP.
- Mettre sous tension le générateur à un voltage élevé soit 150-170 volts durant 4h30 mn (Figure 19). La migration est terminée, quand le bleu atteint le bas du gel.



Figure 19 : Photos de cuve d'électrophorèse thermostatée verticale utilisée lors de notre dépôt des produits d'amplification

Après préparation du colorant avec 100 ml de TBE 10X et 10 µl de BET dans un bac.

- Glisser délicatement le gel de façon horizontale dans le bac pendant 10 à 15 mn.
- Décolorer le gel, en l'immergeant dans un bac contenant du TBE 10X de 10 à 15 mn.
- Visualiser le gel aux UV et prendre une photo.



Résultats

Au cours de cette étude, nous avons recensé des cas positifs au test de la sueur. De plus on constate une prédominance d'une symptomatologie respiratoire présentée essentiellement par des broncho-pneumopathies dyspnéisantes précoces et répétées dont la gravité est maximale. L'atteinte digestive se manifeste par des diarrhées chroniques, un iléus méconial et une hépatomégalie.

Notre enquête nous a mené aux résultats suivants :

- Le premier patient âgé de six mois issu d'un mariage consanguin et présentant un IM et des BPR, il est décédé 15 jours après le prélèvement. Ce patient était homozygote $\Delta F508$.
- Les patients P2, P3 et P7 âgés de 4, 8 et 3 ans respectivement, tous issus d'un mariage consanguin, présentaient un test positif de la sueur effectué à deux reprises. Le génotypage indique une absence de la mutation $\Delta F508$. Par ailleurs ces patients expriment une IPE par des diarrhées chroniques. Chez ces patients, on a encore retenu la présence des BPR. Chez ces patients, on a encore retenu la présence des BPR.
- Le patient P6 de parents consanguins âgé de 12 ans et dont la symptomatologie était semblable au troisième patient, la mutation $\Delta F508$ était encore absente chez ce sujet, mais il est important de noter l'absence de confirmation d'un phénotype CF par un test de la sueur.
- Le patient P4 est un garçon âgé de 6 ans lui aussi issu d'un mariage consanguin et qui présentait une allergie en plus des bronchiolites chroniques. Chez ce patient on a repéré l'absence de l'allèle muté $\Delta F508$.
- Le patient P5 est une jeune fille de 22 ans son test de la sueur était positif, elle est issue de parents consanguins, cette patiente était diabétique et présentait des BPR. L'étude moléculaire a révélé une homozygotie $\Delta F508$.
- Le patient 8 était un garçon de 5 ans, on a remarqué d'après son arbre généalogique l'absence de consanguinité. Ce patient était homozygote $\Delta F508/\Delta F508$ ce qui confirme le diagnostic de la mucoviscidose qui a été évoqué sur la présence des broncho-pneumopathies à répétitions et ensuite devant un test positif de la sueur.

P	Origine	Consanguinité	L'âge	TS([Cl-] mEq/Lde sueur)	Symptômes dominants	La mutation $\Delta F508$
01	El Eulma	Oui	6 mois	Non fait	BPR, IM	$\Delta F508/\Delta F508$
02	Constantine	Oui	4 ans	108 – 81	BPR, DC	non $\Delta F508$ /non $\Delta F508$
03	Constantine	Oui	8 ans	76 – 80	BPR, DC, H	non $\Delta F508$ /non $\Delta F508$
04	Constantine	Oui	6 ans	Non fait	BC, A	non $\Delta F508$ /non $\Delta F508$
05	Constantine	Oui	22 ans	70 – 88	BPR, DT	$\Delta F508/\Delta F508$
06	Constantine	Oui	12 ans	Non fait	BPR, DC, H	non $\Delta F508$ /non $\Delta F508$
07	Guelma	Oui	3 ans	81 – 69	BPR, DC	non $\Delta F508$ /non $\Delta F508$
08	El Hadjar	Non	5 ans	80 - 94	BPR	$\Delta F508/\Delta F508$

Tableau 8 : Résultat de l'enquête et le génotypage des patients

A : Allergie, DC : Diarrhées Chroniques, BPR : Broncho-pneumopathies à Répétition, BC : Bronchiolites Chroniques, H : Hépatomégalie, IM : Iléus Méconial, DT : Diabète

A l'échelle moléculaire notre étude est portée sur 16 chromosomes CF la révélation est faite sur un gel de polyacrylamide 12 %

L'étude moléculaire découvre que trois patients étaient homozygotes $\Delta F508/\Delta F508$ et cinq patients étaient homozygotes non $\Delta F508$ /non $\Delta F508$ (Tableau 8)(Figure 20 et 21), le résultat est témoigné chez les trois premiers patients par une analyse moléculaire similaire chez les parents de chacun de ces trois patients (P1, P2, P3) (Figure 20) ce qui a révélé que les parents de patient n°1 étaient des hétérozygotes $\Delta F508$ / non $\Delta F508$.

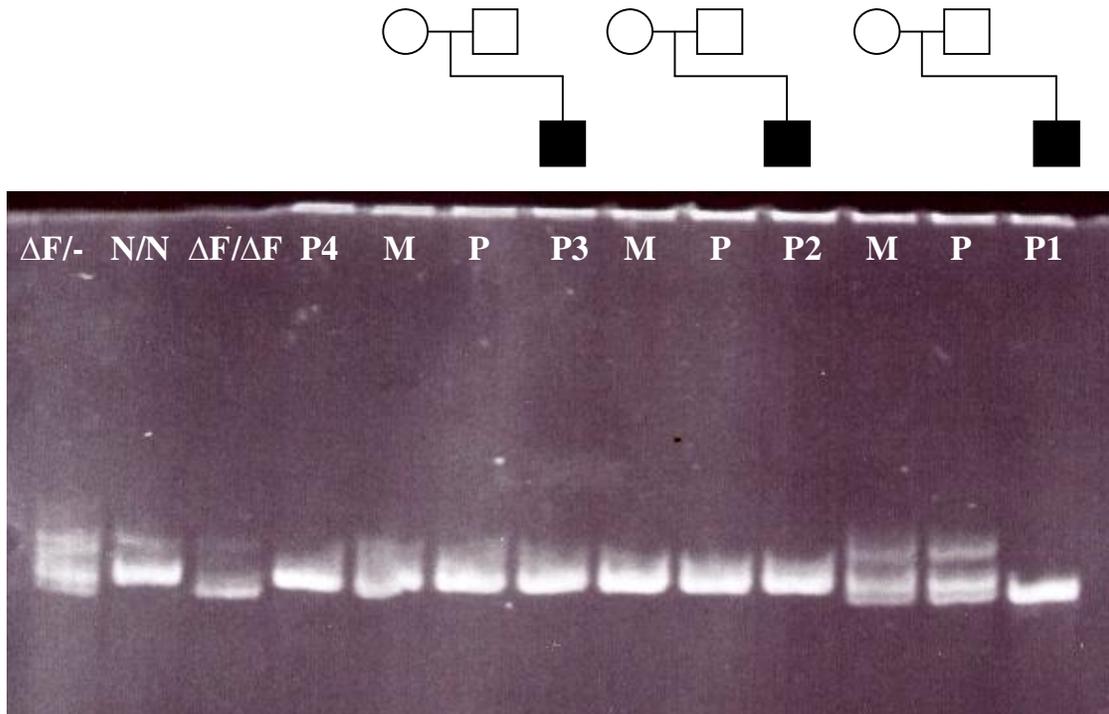


Figure 20 : Révélation sur gel de polyacrylamide 12 % pour les patients P1, P2, P3, P4

P : Père ; M : Mère ; N/N : Homozygote normal ; $\Delta F/\Delta F$: homozygote pour la mutation $\Delta F508$; $\Delta F/-$: hétérozygote

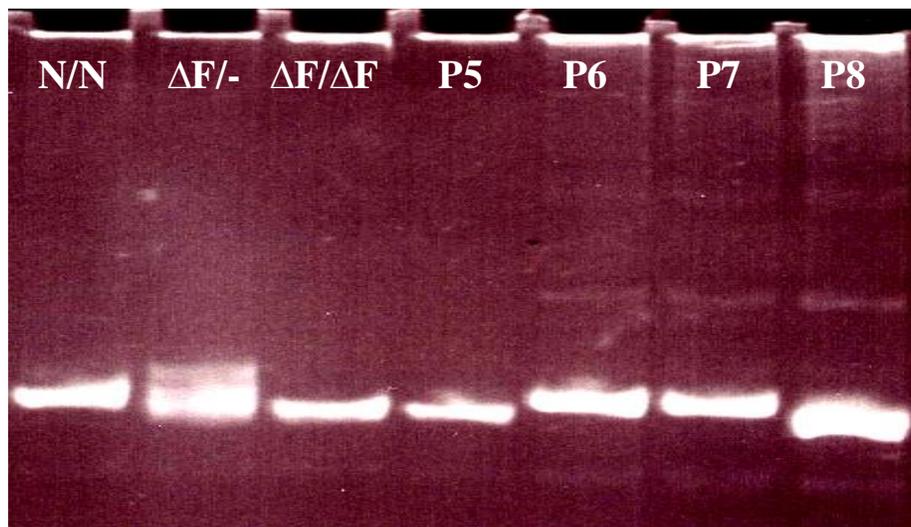
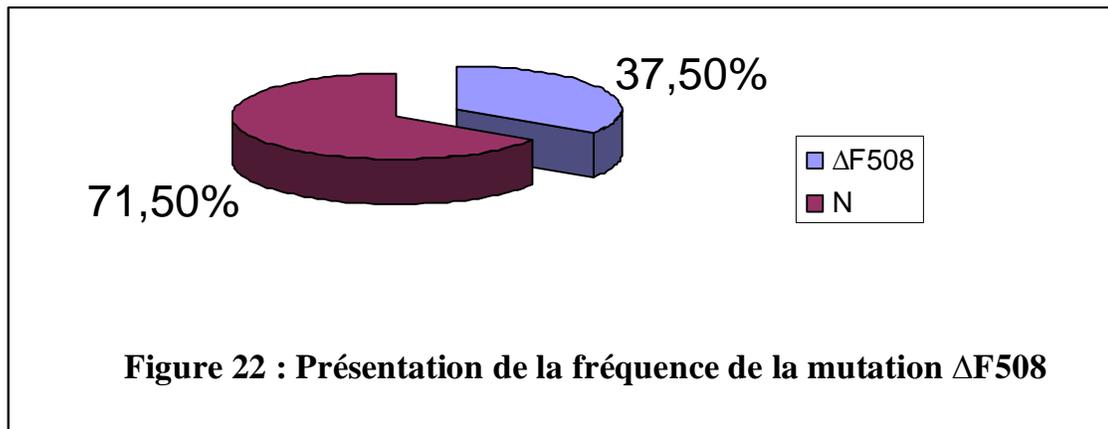


Figure 21 : Révélation sur gel de polyacrylamide 12 % pour les patients P5, P6, P7, P8

La mutation $\Delta F508$ est ainsi retrouvée sur 37,5 % des chromosomes CF.





Discussions

Les patients que nous avons étudiés sont des enfants et de jeunes adultes. En général, la maladie se révèle dans la petite enfance. Il existe des formes néonatales gravissimes avec ou sans iléus méconial (Patient 1) (Lai HC et al, 2000), les patients homozygotes $\Delta F508/\Delta F508$ (P1, P5 et P8) (Tableau 8) (Figure 20 et 21), ont un risque très élevé de développer un iléus méconial ce qui est le cas pour le patient 1 (O'Connor GT et al, 2002). Les formes très atténuées apparaissent plus tardivement, certaines formes sont révélées même à l'âge adulte (Patient 5), Chinet T et ces collaborateurs ont trouvé une fréquence de 41 % des patients d'âge moyenne de 27 ans (18 au 55 ans) présentant une symptomatologie chronique et homozygotes $\Delta F508/\Delta F508$. (Chinet T et al, 2000)

Le premier patient P1 était homozygote $\Delta F508/\Delta F508$, c'était un bébé de six mois issu d'un mariage consanguin (Annexe 3), et présentant un iléus méconial, il a décédé 15 jours après le prélèvement. Selon la littérature, dans 10 à 20 % des cas, les patients homozygotes $\Delta F508/\Delta F508$ ont un risque très élevé de développer un iléus méconial, ce qui constitue une déclaration initiale de la pathologie. De plus, différentes études ont établie les relations entre le phénotype et le génotype dans la mucoviscidose. Quelques chercheurs ont pu démontré que certaines mutations sévères sont étroitement associé à l'insuffisance pancréatique ou à des complications comme l'iléus méconial. (Duguépéroux I & De Braekeleer M, 2004)

Cette symptomatologie digestive a été associée chez ce patient à des broncho-pneumopathies à répétition. En effet, Braun AT et ces collaborateurs ainsi que d'autres chercheurs ont montré l'existence d'une corrélation entre l'homozygotie $\Delta F508$ et la sévérité de l'atteinte pulmonaire. (Braun AT et al, 2006)(Farrell PM et al, 2003)(Johansen HK et al, 1991).

Les patients P2, P3 et P7 âgés de 4, 8 et 3 ans respectivement, tous issus d'un mariage consanguin (Annexe 3), ces patients présentaient un test positif de la sueur effectué à deux reprises (Tableau 8). On a trouvé une absence de la mutation $\Delta F508$. La présence des différentes mutations $\Delta F508$ du gène CFTR, a étendu les conclusions des différents rapports y compris la valeur de test de la sueur dans les différents groupes de patients CF. L'hypothèse est que la concentration du chlore sudoral peut refléter directement l'activité CFTR et que le fonctionnement des différentes classes de mutation CFTR montre des différences dans la conductance du chlore épithélial et dans les valeurs du chlore sudoral. Wilschanki et al ont analysé les niveaux de la concentration du chlore sudoral chez 455 patients en relation avec les différentes classes de mutations CFTR, cette équipe n'a pas trouvé de différence entre les

patients porteurs des mutations de la classe I (85 patients), des mutations de la classe II (294 patients), les mutations de la classe III (48 patients) et les patients de la classe V (11 patients). (Desmarquest P et al, 2000)

Par ailleurs, ces patients P2, P3 et P7 présentaient des diarrhées chroniques et donc expriment l'IPE. En particulier, l'IPE a été associées à un homozygote ou un hétérozygote composite pour des mutations graves de la classe I, II ou III (Tsui LC & Durie P, 2001). Dans une étude semblable, 15 cas sur 2971 patients CF présentaient une IPE et porteurs d'un génotype autre que $\Delta F508/\Delta F508$ (G551D/N1303K, Y1092X/A455E, G542X/mutation inconnue). (Walkowiak J et al, 2002)(De Boeck K et al, 2005). D'autre part, une étude a suggéré qu'il existe une mutation 711 + 1G \rightarrow T a été mise en évidence, cette mutation conduit à des symptômes sévères se manifestant par des troubles pulmonaires associés à des diarrhées chroniques (Loumi O, 2006)

D'une part, la présence d'une atteinte pulmonaire peut être due à un phénotype CF. Plusieurs chercheurs suggérèrent que le phénotype pulmonaire est lié directement à une mutation faux sens du gène CFTR comme R117H et A455E (De Braekeller M et al, 1997) (Massie RJ et al, 2001). D'autre part, la variabilité de la sévérité de l'atteinte pulmonaire a été ainsi jointe au patients CF homozygotes pour les mutations non sens exemple : R553X, G542X, W1282X (Castaldo G et al, 1997) ce qui pourrait expliquer les cas des patients non $\Delta F508$ /non $\Delta F508$ (P2, P3 et P7) (Tableau 8) (Figure 20 et 21). On peut encore supposer d'après Miller PW que chez les patients présentant une maladie pulmonaire il existerait, soit une seconde mutation non encore identifiée, soit un statut d'hétérozygotes pour les mutations du gène CFTR qui serait une prédisposition à une maladie pulmonaire chronique. Dans ce cas il serait nécessaire de réaliser une analyse complète du gène CFTR (Miller PW, 1994)

L'exception retenue pour le patient P3 était la présence d'une hépatomégalie. L'importance de l'atteinte hépatique semblait secondaire par rapport à l'atteinte pulmonaire. L'hépatomégalie peut être isolé de consistance normale et associée à un aspect hyperéchogène à l'échographie. Un gros foie est retrouvé chez 20 à 30 % des patients CF (Lacaille F, 2005) (Colombo C et al, 2002).

Le patient P4 était un garçon âgé de 6 ans lui aussi issu d'un mariage consanguin et qui présentait une allergie à côté des bronchiolites chroniques. Chez ce patient on a repéré l'absence de l'allèle muté $\Delta F508$. Quelques cas d'allergie citons spécifiquement les rhinites

chroniques allergiques peuvent avoir une clinique proche de celle d'une mucoviscidose. L'écoulement ou l'obstruction nasale associée à des bronchiolites chroniques peuvent conduire à penser à la sécrétion d'un mucus épais et au diagnostic CF.

Le patient P5 était une jeune fille de 22 ans issue de parents consanguins avec un test positif de la sueur, l'étude moléculaire a révélé une homozygotie $\Delta F508$. La relation entre la gravité des manifestations respiratoires et la présence d'un double allèle $\Delta F508$ était largement décrite comme une mucoviscidose (Braun AT et al, 2006) (Farrell PM et al, 2003) (Johansen HK et al, 1991).

Toutefois, l'existence de l'homozygotie $\Delta F508$ ou d'hétérozygotes composites $\Delta F508/G551D$ ou $\Delta F508/R334W$ suffisants pancréatiques, même s'ils sont rares, représente un obstacle à une généralisation absolue de cette théorie (Bienvenu T, 2003).

Cette patiente est également diabétique. En fait, environ 10 % des cas de mucoviscidose, tous âges confondus, se compliquent d'un diabète. Vantyghem M et al ont montré qu'après 20 ans le diabète touche un tiers des patients CF et la moitié après 30 ans (Vantyghem M et al, 2005).

Le patient P6 de parents consanguins âgé de 12 ans et dont la symptomatologie était semblable au troisième patient P3, la mutation $\Delta F508$ était encore absente chez ce sujet, mais il est important de noter l'absence de confirmation d'un phénotype CF par un test à la sueur.

Le diagnostic de la mucoviscidose repose sur soit l'existence d'au moins un antécédent familial de mucoviscidose soit la présence d'au moins une des manifestations cliniques évocatrices (Tableau 3) (Tamalet A et al, 2000). Le patient 8 était un garçon de 5 ans, on a remarqué d'après son arbre généalogique l'absence de consanguinité. Ce patient était homozygote $\Delta F508/\Delta F508$ ce qui confirme le diagnostic de la mucoviscidose qui a été évoqué sur la présence des broncho-pneumopathies à répétitions et ensuite devant un test positif de la sueur.

Compte tenu de la gravité de la maladie, de son évolutivité de l'âge des premiers signes et du degré de l'atteinte de différents organes, la mucoviscidose est une maladie très hétérogène sur le plan phénotypique. La variabilité de l'expression clinique observée chez des patients présentant un même génotype $\Delta F508/\Delta F508$ suggère que la sévérité de la maladie est

modulée par d'autres facteurs génétiques, ainsi que des facteurs environnementaux. (Hull J & Thomson AH, 1998) (Mekus F et al, 2000).

Actuellement, plus de 1500 mutations CFTR ont été rapportées au CFGAC. La plus fréquente est la mutation $\Delta F508$ qui montre une distribution variable dans les chromosomes CF selon les populations.

La mutation $\Delta F508$ détectée initialement sur gel de polyacrylamide 12 %. Le choix des méthodes par un laboratoire dépend de leur sensibilité et leur fiabilité mais aussi de l'histoire du laboratoire et des outils déjà disponibles et maîtrisés ainsi que du coût. (Serre JL et al, 2002).

Parmi les méthodes de détection des mutations on distingue celles qui sont fondées sur la recherche spécifique d'une ou de plusieurs mutations connues (Dequeker E & Cassiman JJ, 1998). A présent la plupart des laboratoires utilisent en premières intentions des outils de recherches ciblées principalement des trousse commercialisées qui détectent rapidement et de façon simultanée entre 8 et 31 mutations. (Claustres M et al, 1993) (Bienvenu T et al, 1995).

A notre échelle, seule la détection de la mutation $\Delta F508$ était disponible. De façon générale, un résultat indiquant qu'un patient est homozygote pour une mutation ne peut être confirmé que si l'analyse de l'ADN de ses parents montre qu'ils sont tous deux porteurs de cette mutation (Serre JL et al, 2002). Chez les patients P1, P2 et P3, le résultat est confirmé par une analyse chez les parents de chacun d'eux. Le patient P1 qui était homozygote $\Delta F508/\Delta F508$, leurs parents étaient hétérozygotes $\Delta F508/N$, ainsi que pour les patients P2 et P3 qu'ils étaient non $\Delta F508$ /non $\Delta F508$; l'absence de l'allèle $\Delta F508$ est confirmé chez leurs parents.

En conséquence, l'absence de mutation, ou la présence d'une seule mutation identifiée chez un patient ne peut éliminer le diagnostic de mucoviscidose ou l'implication du gène CFTR dans la pathologie observée, ce qui pourrait être le cas essentiellement pour les patients P2, P3 et P7 dont les valeurs du test de la sueur étaient positifs et pour les patients P4 et P6 qui présentaient des symptômes évocateurs de la mucoviscidose.

Dans notre travail, la mutation $\Delta F508$ est retrouvée sur 37,5 % des chromosomes CF, ce résultat conforte ceux rapportés précédemment sur une étude préliminaire réalisée sur 20 chromosomes CF algériens qui détecte une fréquence de 20 % de la mutation $\Delta F508$ (Loumi

O et al, 1999). En addition, une autre étude effectuée en 2006 sur des patients algériens a trouvé une fréquence de 16.7 % pour cette délétion (Loumi O et al, 2008)

D'autres équipes ont réalisé des travaux ultérieurs sur l'Algérie signalant une fréquence de 26,3 % de la même mutation (Claustres M, 1998), 32.43 % dans une sous population originaires d'Afrique du Nord (Tunisie, Algérie, Maroc) (Des Georges M et al, 1998).

La fréquence retrouvée est encore toutefois comparable à celle obtenue sur une population tunisienne, l'étude réalisée en 2005 sur 540 chromosomes CF a montré une fréquence de 50,74 % de la $\Delta F508$ (Messaoud T et al, 2005).

De plus, cette fréquence peut cadrer avec le gradient décroissant décrit pour cette mutation, elle décroît d'environ 100 % dans les pays scandinaves jusqu'à moins de 50 % dans les pays méditerranéens, ceci permet de dire que la mutation $\Delta F508$ est probablement originaire d'Europe et qu'elle se serait ensuite dispersée sur le continent par le biais des migrations (Morral N et al, 1994).

Conclusion :

Le présent travail nous a permis d'acquérir les outils fondamentaux de la biologie moléculaire ainsi de bien maîtriser les bases de manipulations.

Les résultats obtenus dans ce travail ont confirmé que la mutation $\Delta F508$ est présente au sein de la population algérienne et en particulier constantinoise. La recherche de $\Delta F508$ confirme le diagnostic de la mucoviscidose chez trois de nos patients, ce qui pourrait donc fournir un diagnostic définitif de la pathologie.

Lors de nos enquêtes, nous avons noté une absence de diagnostic fiable de cette pathologie héréditaire. En faite, la maladie ne sera évoquée que si le patient présente une atteinte pulmonaire typique ou une insuffisance pancréatique exocrine associée ou non à une atteinte pulmonaire.

Les données moléculaires que nous venons d'évoquer sont de nature à attirer l'attention sur la nécessité de ne pas exclure cette pathologie de la routine des explorations mais également l'utilité de maîtriser une meilleure connaissance de la pathologie en milieu hospitalier ce qui implique un bon diagnostic afin de permettre une prise en charge précoce et adaptée.

Le test de la sueur reste le test de diagnostic qui a fait ses preuves d'utilité et de sa valeur à travers l'histoire. A la lumière de notre étude, nous exposons l'importance de l'instauration du test de la sueur dans nos hôpitaux ; ceci permettra aux médecins et aux biologistes de confirmer ou d'infirmier la pathologie.

A notre échelle, seule la détection de la mutation $\Delta F508$ était disponible, c'est pour la détection des mutations que le développement des techniques comme la DGGE et la SSCP a un intérêt considérable. Plus loin, le séquençage direct des 27 exons du gène et leurs régions introniques flanquantes, permet de détecter toutes les mutations décrites et d'identifier de nouvelles mutations.

Pareillement, l'étude de spectre de distribution des mutations du gène CFTR sur le territoire algérien est donc indispensable, traduisant une connaissance des familles informatives et de mettre en œuvre une stratégie de prévention de la mucoviscidose à travers le conseil génétique et le diagnostic prénatal, ainsi que l'incidence des hétérozygotes.

Conclusion :

Les résultats obtenus dans ce travail ont confirmé que la mutation $\Delta F508$ est présente au sein de la population algérienne et en particulier constantinoise. La recherche de $\Delta F508$ confirme le diagnostic de la mucoviscidose chez trois de nos patients, ce qui pourrait donc fournir un diagnostic définitif de la pathologie.

Lors de nos enquêtes, nous avons noté une absence de diagnostic fiable de cette pathologie héréditaire. En fait la maladie ne sera évoquée que si le patient présente une atteinte pulmonaire typique ou une insuffisance pancréatique exocrine associée ou non à une atteinte pulmonaire. Les données moléculaires que nous venons d'évoquer sont de nature à attirer sur la nécessité de ne pas exclure cette pathologie de la routine des explorations chez les enfant présentant des signes évocateurs de la mucoviscidose, a fin de permettre un diagnostic et une prise en charge précoce et adapté.

Le test de la sueur reste le test de diagnostic qui a fait son preuve d'utilité et de sa valeurs l'histoire. A la lumière de notre étude, nous exposons l'importance de l'instauration du test à la sueur dans nos hôpitaux ; ceci permettra aux médecins et aux biologistes de confirmer ou d'affirmer la pathologie, mais également l'utilité de maîtriser une meilleure connaissance de la pathologie en milieu hospitalier ce qui implique un bon diagnostic.

L'étude de spectre de distribution des mutations du gène CFTR sur le territoire algérien est donc indispensable, traduisant une connaissance des familles informatives et de mettre en œuvre une stratégie de prévention de la mucoviscidose à travers le conseil génétique et diagnostic prénatal, ainsi que l'incidence des hétérozygotes.

Bibliographie

Akabas MH, Cheung M, Guinamard R, 1997, Probing the structural and functional domains of the CFTR chloride channel, *J Bioenerg Biomembr*, **29**: 453-463.

Aleksandrov L, Aleksandrov AA, Chang X, Riordan JR, 2002, The First Nucleotide Binding Domain of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Is a Site of Stable Nucleotide Interaction, whereas the Second Is a Site of Rapid Turnover, *J Biol Chim*, **277**: 15419–15425.

Alton EW, 2004, Use of Nonviral and Viral Vectors for CF Gene Therapy, *Proc Am Thorac Soc*, **1**: 296–301.

Ameen N, Silvis M, Bradbury NA, 2007, Endocytic trafficking of CFTR in health and disease, *Journal of Cystic Fibrosis*, **6**:1–14.0

Andrea LF, Brenardino, Cintia E, Lima et Mayana Zatz, 2003, Analysis of mutations in the cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) gene in patients with obstructive azoospermia, *Genet molec Biol*, **26**:1-3.

Arkwright PD, Laurie S, Super M, 2000, TGF-beta(1) genotype and accelerated decline in lung function of patients with cystic fibrosis, *Thorax*, **55**: 459-462.

Aron Y, Desmazes-Dufeu N, Matran R, 1996, Evidence of a strong, positive association between atopy and the HLA class II alleles DR4 and DR7, *Clin Exp Allergy* ; **26**:821–288.

Aron Y, Polla BS, Bienvenu T, Dall'ava J, Dusser D, Hubert D, 1999, HLA class II polymorphism in cystic fibrosis. A possible modifier of pulmonary phenotype, *Am J Respir Crit Care Med*, **159**: 1464-1468.

Bellon G, 1998, Vers un traitement préventif des manifestations respiratoires de la mucoviscidose par transfert de gènes, *Médecine thérapeutique / Pédiatrie*, **1**: 248-252.

Bianchet MA, Ko YH, Amzel LM, Pedersen PL, 1997, Modeling of nucleotide binding domains of ABC transporter proteins based on a F1-ATPase/recA topology: Structural model of the nucleotide binding domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), *J Bioenerg Biomemb*, **29**:503-524.

Bienvenu T, 2003, La mucoviscidose : les relations entre le génotype et le phénotype, *archives de pédiatrie*, **10**: 318s-324s.

Bienvenu T, Cazeneuve C, Kaplan JC, Beldjord C, 1995, Mutation heterogeneity of cystic fibrosis in France : screening by denaturing gradient gel electrophoresis using psoralen- modified oligonucléotide, *Hum Mutat* ; **6** : 23-29.

Bobadilla JL, Macek M, Fine JP, Farrell PM, 2002, Cystic Fibrosis: A Worldwide Analysis of CFTR Mutations-Correlation With Incidence Data and Application to Screening, *hum mut*, **19**:575-606.

Braun AT, Farrell PM, Ferec C, Pierre Audrezet M, Laxova A, Li Z, Kosorok MR, Rosenberg MA, Gershan WM, 2006, Cystic fibrosis mutations and genotype–pulmonary phenotype analysis, *Journal of Cystic Fibrosis*, **5**: 33 – 41.

- Busch R**, 2005, Que savons-nous de l'histoire de la fibrose kystique?, *SVB*, **29**:28-30
- Callebauta I, Eudes R, Mornon JP, Lehn P**, 2004, Nucleotide-binding domains of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: detailed sequence analysis and three-dimensional modeling of the heterodimer, *Cell Mol Life Sci*, **61**: 230–242.
- Castaldo G, Rippa E, Salvatore D, Sibillo R, Raia V, de Rits G, Salvatore F**, 1997, Severe liver impairment in cystic fibrosis affected child homozygous for the G542X mutation. *Am J Hum Genet*, **69** :115-158.
- Chabanon G, Segonds Ch, Marty N, Dournes JL, Agueda L**, 1997, Aspects microbiologiques des infections pulmonaires au cours de la mucoviscidose, *Médecine thérapeutique*, **3**: 451-457.
- Chillón M, Casals T, Mercier B, Bassas L, Lissens W, Silber L, Romey M, Ruiz-Romero J, Verlingue C, Claustres M, Nunes V, Férec C, Estivill E**, 1995, Mutations in the Cystic Fibrosis Gene in Patients with Congenital Absence of the Vas Deferens, *NEJM*, **332**:1475-1480.
- Chinet T, Fajac I, Férec C, Garcia Carmona T, Nguyen Khoa T**, 2000, Diagnostic de la mucoviscidose chez l'adulte, *Rev Mal Respir*, **17**: 739-748.
- Claustres M**, 1998, Génétique, dépistage et épidémiologie de la mucoviscidose, *Mt Pédiatrie*; **1**:261-269.
- Claustres M, Guittard C, Bozon D, Chevalier F, Verlingue C**, 2000, Spectrum of CFTR mutations in cystic fibrosis and congenital absence of the vas deferens in France, *Hum Mutat*; **16**:143–56.
- Claustres M, Laussel M, Des Georges M, Giansily M, Culard FJ, Razakatsara G, Demaille J**, 1993, Analysis of the 27 exons and flanking regions of cystic fibrosis gene: 40 different mutations account for 91.2 % of the mutant alleles in Southern France, *Hum Mol Genet*, **2**: 1209 – 1213.
- Clément A**, 1998, Atteinte respiratoire dans la mucoviscidose, *Médecine thérapeutique*, **1**: 97-99.
- Colombo C, Apostolo M, Ferrari M, Sela M, Genomi S, Giunta A, Sereni L**, 1994, Analysis of risk factors for development of liver disease associated with cystic fibrosis, *J Pediatr*, **124**: 393-399.
- Colombo C, Battezzati PM, Crosignani A**, 2002, Liver disease in cystic fibrosis: a prospective study on incidence, risk factors, and outcome, *Hepatology*; **36**: 1374-1382.
- Corvol H, Flamant C, Vallet C, Clement A, Brouard J**, 2006, Les gènes modificateurs dans la mucoviscidose, *Archives de pédiatrie*, **13**: 57–63.

Costes B, et al, 1995, Frequent occurrence of the CFTR intron 8 (TG)_n5T allele in men with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Eur J Hum Genet*, **3** : 285-293.

Davies J, Neth O, Alton E, 2000, Differential binding of mannose-binding lectin to respiratory pathogens in cystic fibrosis. *The Lancet* ; **355**:1885–1886.

De Boeck K, Weren M, Proesmans M, Kerem E, 2005, Pancreatitis among patients with cystic fibrosis: correlation with pancreatic status and genotype, *Pediatrics*, **115**:e463-e469.

De Braekeleer M, Allard C, Leblanc JP, Simard F, Aubin G, 1997, Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis patient's compound heterozygous for the A455E mutation. *Hum Genet*, **101**: 208-211.

De Braekeller M, Allard C, Leblanc JP, Simard F, aubin G, 1997, Genotype – phenotype correlation in cystic fibrosis patientd compound heterozygous for the A455E mutation, *Hum Gent*, **101** : 208-211.

Dequeker E, Cassiman JJ, 1998 Evaluation of *CFTR* gene mutation testing methods in 136 diagnostic laboratories: report of a large European external quality assessment, *Eur J Hum Genet* ; **6** : 165-175.

Des Georges M, Claustres M,Guittard C, Bozon D,Chevalier F, Verlingue C, Ferec C, Girodon E, Cazeneuve C, Bienvenu T et al, 1998, les bases moléculaires de la mucoviscidose en France:plus de 300 mutations et 506 génotypes différents sont en cause, *médecine/science* , **14** : 1413-1421.

Des Georges M, Guittard C, Altiéri JP, Templin C, Sarles J, Sarda P, Claustres M, 2004, High heterogeneity of CFTR mutations and unexpected low incidence of cystic fibrosis in the Mediterranean France, *Journal of Cystic Fibrosis*, **3**:265– 272.

Desideri-Vaillant C, Creff J, Le marechal C, Moalic V, Ferec C, 2004, Implication du gène CFTR dans la stérilité masculine associée à une absence de canaux déférents, *Immuno-analyse & Biologie spécialisée* **19**: 343–350.

Desmarquest P, Feldmann D, Tamalat A, Boule M, Fauroux B, Tournier G, Clement A, 2000, Genotype analysis and phenotypic manifestations of children with intermediate sweat chloride test results, *Chest*, **118**: 1591-1597.

Devidas S, Guggino WB, 1997, CFTR: domains, structure, and function. *J Bioenerg Biomembr*, **29**: 443–451.

Domingo-Ribasa C, Bosque-Garciab M, 2006, Nasal Potential Difference Test to Diagnose Cystic Fibrosis, *Arch Bronconeumol*, **42**: 33-38.

Duffieux F, Annereau JP, Boucher J, Miclet E, Pamard O, Schneider M, Stoven V, Lallemand J, 2000, Nucleotide-binding domain 1 of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, *Eur J Biochem*, **267**: 5306-5312

- Duguépéroux I, De Braekeleer M**, 2004, Genotype–phenotype relationship for five CFTR mutations frequently identified in western France. *J Cystic Fibrosis*; **3**:259–263.
- Durieu I, Lepercq J, Rigot JM, Boggio D**, 2000, fertilité et reproduction, *Rev Mal Respir*, **17**: 802 – 806.
- Farrell PM, Li Z, Kosorok MR, Laxova A, Green CG, Collins J**, 2003, Longitudinal evaluation of bronchopulmonary disease in children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*, **36**: 230– 240.
- Férec C, Le Maréchal C, Audrézet MP, Farinha CM, Amaral MD, Gallati S, Sanz J, Steiner B, Mouchel N, Harris A, Schwarz MJ**, 2004, Analysis of genomic CFTR DNA, *Journal of Cystic Fibrosis*, **3** :7-10.
- Ferec C, Verlingue C, Parent P**, 1995, Neonatal screening for cystic fibrosis: result of a pilot study using both immunoreactive trypsinogen and cystic fibrosis gene mutation analyses, *Hum Genet*, **96**: 542-548.
- Flamant C, Henrion-Caude A, Boelle PY**, 2004, Glutathione-S-transferase M1, M3, P1 and T1 polymorphisms and severity of lung disease in children with cystic fibrosis. *Pharmacogenetics*; **14**:295–301.
- Flotte TR**, 2003, CF gene therapy with AAV, *Pediatr Pulmonol*, **Suppl 25**: 156–157.
- Flotte TR, Laube BL.**, 2001, Gene therapy in cystic fibrosis, *Chest*, **120**:124S–131S.
- Fogarty A, Hubbard R, Britton J**, 2000, International Comparison of Median Age at Death From Cystic Fibrosis, *CHEST*, **117**:1656 –1660.
- Frangolias DD, Ruan J, Wilcox PJ, Davidson AG, Wong LT, Berthiaume Y**, 2003, Alpha 1-antitrypsin deficiency alleles in cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*; **29**:390– 396.
- Gabolde M, Hubert D, Guilloud-Bataille M**, 2001, The mannose binding lectin gene influences the severity of chronic liver disease in cystic fibrosis, *J Med Genet* ; **38**:310–1.
- Gadsby DC, Nairn AC**, 1999, Control of CFTR channel gating by phosphorylation and Nucleotide hydrolysis, *Physiol Rev*, **79 Suppl**: S77-S107.
- Gaillard O**, 2003, La trypsine (TIR), *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*, **18**:254–255.
- Gan KH, Veeze HJ, Ouweland AM, Halley DJ, Scheffer H, Hout A, Overbeek SE, Jongste JC, Bakker W, Heijerman HG**, 1995, A cystic fibrosis mutation associated with mild lung disease, *N Engl J Med*, **333**: 95-99.
- Garred P, Pressler T, Madsen HO**, 1999, Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. *J Clin Invest*, **104**:431–437.

Gibson E, Cooke RE, 1959, A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilising pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* ; **23** : 545-9 *site in*: Katherisan N, Gupta A, Mumford S, Cade A, Jones R, 2004, Sweet conductivity for the diagnosis of cystic fibrosis, *Journal of Cystic Fibrosis*, **3**, 205.

Girodon E, Costes B, Caseneuve C, Fanen P, Goossens M, 1997, Génétique de la mucoviscidose, *Médecine thérapeutique*, **3**: 431-341.

Grasemann H, Knauer N, Buscher R, 2000. Airway nitric oxide levels in cystic fibrosis patients are related to a polymorphism in the neuronal nitric oxide synthase gene, *Am J Respir Crit Care Med*, **162**: 2172–2176.

Grasemann H, Michler E, Wallot M, 1997, Decreased concentration of exhaled nitric oxide (NO) in patients with cystic fibrosis, *Pediatr Pulmonol*, **24**:173–7.

Haardt M, Benharouga M, Lechardeur D, Kartner N, Lukacs G, 1999, C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis: A novel class of mutation, *J Biol Chem*, **274**: 21873-21877.

Hanrahan JW & Wioland MA, 2004, Revisiting Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Structure and Function, *Proc Am Thorac Soc*, **1**: 17–21.

Hanrahan JW, Kone Z, Mathews CJ, Luo J, Jia Y, Linsdell P, 1998, Path-clamp studies of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel, *Meth Enzymol*, **293**: 169-195.

Harvey BG, Leopold PL, Hackett NR, Grasso TM, Williams PM, Tucker AL, Kaner RJ, Ferris B, Gonda I, Sweeney TD, 1999, Airway epithelial CFTR mRNA expression in cystic fibrosis patients after repetitive administration of a recombinant adenovirus, *J Clin Invest*, **104**: 1245–1255.

Heeley AF, Bangert SK, 1992, The neonatal detection of cystic fibrosis by measurement of immunoreactive trypsin in blood. *Ann Clin Biochem*, **29**:361–376.

Hefferon TW, Broackes-Carter FC, Harris A, Cutting GR, 2002, Atypical 5' Splice Sites Cause CFTR Exon 9 To Be Vulnerable to Skipping, *Am J Hum Genet*, **71**:294–303.

Hefferon TW, Broackes-Carter FC, Harris A, Cutting GR, 2002, Atypical 5' Splice Sites Cause CFTR Exon 9 To Be Vulnerable to Skipping, *Am J Hum Genet*, **71**:294–303.

Hitt MM, Graham FL, 2000, Adenovirus vectors for human gene therapy, *Adv Virus Res*, **55**: 479–505.

Ho LP, Samways JM, Porteous DJ, Dorin JR, Carothers A, Greening AP, Innes JA, 1997, Correlation between nasal potential difference measurements, genotype and clinical condition in patients with cystic fibrosis, *Eur Respir J*, **10**: 2018–2022.

Huchon G, Pneumologie, 2001, *Masson*, paris, **ISBN2-225-83266-8**: 134-138.

- Hull J**, 2003, The basic science of cystic fibrosis, *Current Paediatrics*, **13**: 253-258
- Hull J, Thomson AH**, 1998, Contribution of genetic factors other than CFTR to disease severity in cystic fibrosis, *Thorax*, **53**: 1018-1021.
- Imperiale MJ, Kochanek S**, 2003, Adenovirus vectors: biology, design and production, *Curr Top Microbiol Immunol*, **273**: 335–357.
- Johansen HK, Nir M, Hoiby N, Koch C, Scharzt M**, 1991, Severity of cystic fibrosis in patients homozygotes and heterozygous for $\Delta F508$ mutation. *Lancet* ; **337** : 631-634.
- Julia S, Bieth E**, 2000, Le conseil génétique dans la mucoviscidose, *Rev Mal Respir*, **17**:807-811.
- Kälin N, Claab A, Sommer M, Puchelle E, Tmmler B**, 1999, $\Delta F508$ CFTR protein expression in tissues from patients with cystic fibrosis, *J clin invest*, **103**:1379-1390.
- Kaplan JC, Delpech M**, 1994, Biologie moléculaire et médecine, *Medecine-Science Flammarion*, Paris, ISBN 2-257-10488-9, P329.
- Katherisan N, Gupta A, Mumford S, Cade A, Jones R**, 2004, Sweet conductivity for the diagnosis of cystic fibrosis, *Journal of Cystic Fibrosis*, **3**: 205.
- Knowles M, Gatzky J, Boucher R**, 1981, Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis, *N Engl J Med*, **305**: 1489-1495. *Site in*: **Chinet T, Fajac I, Ferec C, Garcia Carmona T, Nguyen Khoa T**, 2000, Diagnostic de la mucoviscidose chez l'adulte, *Rev Mal Respir*, **17**: 739-748.
- Kogan I, Ramjeesingh M, Li C, Bear CE**, 2002, Studies of the molecular basis for cystic fibrosis using purified reconstituted CFTR protein. *Methods Mol Med*, **70**:143– 57.
- Koh J, Sferra TS, Collins FS**, 1993, Characterization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator promoter region, *J Biol Chem*, **268** : 15912-15921
- Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ**, 1997, The -308 tumor necrosis factoralpha promoter polymorphism effects transcription, *Mol Immunol*, **34**:391–399.
- Labruno P**, 1997, atteinte hépato-biliaire de la mucoviscidose, *Medecine Thérapeutique*, **3**: 459-464.
- Lacaille F**, 2005, Atteinte hépatique dans la mucoviscidose *mt pédiatrie*, **8** : 204-211
- Lai HC, Kosorok MR, Laxova A, Davis LA, FitzSimmon SC, Farrell PM**, 2000, Nutritional status of patients with cystic fibrosis with meconium ileus: a comparison with patients without meconium ileus and diagnosed early through neonatal screening, *Pediatrics*, **105**: 53– 61.

- Lanngs S, Hansen A, Thortseinson B, Nerup J, Kerup J, Koch C**, 1995, Glucose tolerance in patients with cystic fibrosis: five year prospective study, *BMJ*, 311: 655-659.
- Ledson MJ, Tran J, Walshaw MJ**, 1998, Prevalence and mechanism of gastro-oesophageal reflux in adult cystic fibrosis patients, *JR Soc Med*, **91**: 7-9.
- Lee Tim WR, Matthews DA, Blair EG**, 2005, Novel molecular approaches to cystic fibrosis gene therapy, *Biochem J*, **387**:1-15.
- Lenoir G, Nguyen Khoa T, Simon G, Michalewski A, Viot N, Thevenin M, Sorin M, Lacour B**, 1998, Comment, quand et pourquoi demander un test de la sueur en 1997 ?, *Ann Pédiatr*, **45**: 171-177.
- Lewis HA, Buchanan SG, Burley SK**, 2004, Structure of nucleotide-binding domain 1 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *EMBO J*, **23**:282-93.
- Loumi O**, 2006, Diagnostic phénotypique, biochimique et moléculaire de la mucoviscidose dans une population algérienne infantile, adulte et azoospermique, Thèse de Doctorat d'état en Science de la Nature, *Université des Sciences et de la Technologie HOUARI BOUMEDIENE*.
- Loumi O, Baghriche M, Delpech M, Kaplan JC, Bienvenu T**, 1999, Analysis of the complete coding region of the CFTR gene in ten Algerian cystic fibrosis families, *Hum Hered*, **49**: 81-84
- Loumi O, Ferec C, Creff J, Fercot B, Mercier B, Denine R, Grangaud JP**, 2006, CFTR mutations in the Algerian population: A novel mutation 4272delA, *Journal of Cystic Fibrosis*, **12** :28-35.
- Loumi O, Ferec C, Mercier B, Creff J, Fercot B, Denine R, Grangaud JP**, 2008, CFTR mutations in the Algerian population, *Journal of Cystic Fibrosis*, **7**:54-59.
- Loussouarn G, Demolombe S, Mohammad-Pannah R, Escande D, Baro I**, 1996, Expression of CFTR controls cAMP-dependent activation of epithelial K⁺ currents, *Am J Physiol*, **271** : 1565-1573.
- Mac Donald A**, 1996, Nutritional management of cystic fibrosis, **74**: 81 – 87.
- Mac V, Jarvi KA, Zielenski J, Durie P, Tsui LC**, 1997, Higher proportion of intact exon 9 CFTR mRNA in nasal epithelium compared with vas deferens, *Hum Mole Genet*, **6**: 2099-2107.
- Mahadeva R, Sharples L, Ross-Russell RI**, 2001, Association of alpha(1)-antichymotrypsin deficiency with milder lung disease in patients with cystic fibrosis, *Thorax*, **56**: 53–58.
- Maherzi A, Ategbo S, Pharaon I, Munck A, Cezard JP, Foucaud P, Navarro J**, 1995; Différence de potentiel transépithélial nasal dans la mucoviscidose : applications clinique de sa mesure, *La Presse médicale*, **24**: 437-440.

- Marchand M, Jarreau C, Chauffert I, Garcia I, Asselin D, Thouvenot J-P, Genest A-F**, 1998, Le test de la sueur, *Ann Biol Clin*, **56**: 215-221.
- Massie RJ, Poplauski N, Wilcken B, Goldblatt J, Bymes C, Robertson C**, 2001, Intron 8 polythymidine sequence in Australasian individuals with cystic fibrosis mutations R117H and R117C, *Eur Resp J*, **17**:1195-1200.
- McKone EF, Emerson SS, Edwards KL, Aitken ML**, 2003, Effect of genotype on phenotype and mortality in cystic fibrosis: a retrospective cohort study; *THE LANCET*, **361**: 1671–1676.
- Meeting report**, 2002, Classification of cystic fibrosis and related disorder, *Journal of Cystic Fibrosis*, **1**:5–8.
- Mekus F, Ballmann M, Bronsveld I**, 2000, Categories of deltaF508 homozygous cystic fibrosis twin and sibling pairs with distinct phenotypic characteristics, *Twin Res*, **3**:277–93.
- Messaoud T, Bel Haj Ferdj S, Bibi A, Elion J, Ferec C, Fattoum S**, 2005, Epidémiologie moléculaire de la mucoviscidose en Tunisie, *Ann Biol Clin*, **63**:627-630
- Messaoud T, Verlingue C, Danamur E, Pascaud O, Quere I, Fttoum S, Elion J, Ferec C**, 1996, distribution of CFTR mutation in cystic vifibrosis patients of tunisian origin: identification of two novel mutations, *Eur J Hum Genet*, **4**:20-24
- Mickle JE, Cutting GR**, 1998, Clinical implications of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutations, *Clin Chest Med*, **19**:443-458.
- Middleton PG, Geddes DM, Alton E**, 1994, Protocols for in vivo measurement of the ion transport defects in cystic fibrosis nasal epithelium, *Eur Respir J*, **7**: 2050–2056.
- Miller PW**, 1994, CFTR mutations and adult pulmonary disease. 8th Annual North American cystic fibrosis conference. Orlando 20-23/10/1994. *Pediatric pulmonology*, **10**: 137-138.
- Morral N, Bertanpetit J, Estivill X, Nunes V, Casals T, Giménez J, Reis A, Varron-Mateeva R, Macek JrM, Angelicheva D, Dancheva R, Romeo G, Russo MP, Garnerone S, Ferrani M, Claustre M, Des George M, Schwartz M, Ferec C, Nemeti M Dahl N, Kadasi L**, 1994, The origine of the major cystic fibrosis mutation ($\Delta F508$) in the European populations, *Nature Genetics*, **7**: 169-175.
- Naimi D, Khammouni W, Renaud W, Bianco N, Figarella C, Merten MD**, 1999, High lysosomal activities in cystic fibrosis tracheal gland cells corrected by adenovirus-mediated CFTR gene transfer, *BBA*, **1453**: 14-22
- Nollau P, Wagener C**, 1997, Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment, *Clin Chem*, **43**: 1114-1128.
- O'Connor GT, Quinton HB, Kahn R, Robchaud P, Maddack J, Lever T, Detzer M, Brooks JG**, 2002, Northern New England Cystic Fibrosis Consortium. Case-mix adjustment for evaluation of mortality in cystic fibrosis, *Pediatr Pulmonol*, **33**: 99-105.

Pagani F, Buratti E, Stuani C, Romano M, Zuccato M, Niksic M, Giglio L, Faraguna D, Baralle FE, 2000, Splicing Factors induce CFTR exon 9 skipping through a nonevolutionary conserved intronic element, *J Biol Chem*, paper in press:Manuscript **M910165199**;1-30.

Paviani A, Schtz C, Mehtali M, 1996, Thérapie génique de la mucoviscidose par transfert adénoviral du gène CFTR, *médecine/sciences*, **12**:25-33.

Pavirani A, Régulier E, Bellon G; Mehtali M, 1999, Essais cliniques de thérapie génique de la mucoviscidose: état des lieux et perspectives, *médecine/sciences*, **15** :595-605.

Perricone MA, Morris JE, Pavelka K, 1997, Molecular analysis of adenovirus-mediated transfer and expression efficiency of CFTR cDNA in individuals with CF. *Pediatr Pulmonol*, suppl **14**: 261.

Phillipson G, 1998, Cystic fibrosis and reproduction, *Rerod Fertil Dev*, **10**: 113-119.

Pilewski JM, Frizzell RA, 1999, Role of CFTR in airway disease, *Physiol Rev*, **79**:S215-S255.

Pin I, Grenet D, Scheid P, Domblides P, Stern M, Hubert D, 2000, Spécificités et prise en charge de l'atteinte pulmonaire au cours de la mucoviscidose à l'âge adulte, *Revu des Mal Resp*, **17**, 779-784.

Quinton PM, 1999, Physiological Basis of Cystic Fibrosis: A Historical Perspective, *Physiological Reviews*, **79**: 3-22.

Robert C, Stern MD, 1997, The diagnosis of cystic fibrosis, *N Engl J Med*, **336**: 487-491.

Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, Zsiga M, Buchwald M, Riordan JR, Tsui L-C, Collins FS, 1989, Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping, *Science*, **245**: 1059-1065. *site in*: Laurence Nieto, le clonage positionnel: exemple du gène de la mucoviscidose.

Rosenstein R, Cutting G, 1998, The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement, *J Pediatr*, **132**: 589-595.

Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ, 2005, Mechanisms of disease: Cystic Fibrosis, *N Engl J Med*, **352**:1992-2001.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1989, Molecular cloning : A laboratory manual, *site in* : **Yahia M**, 2007, diagnostic, physiopathologie et génétique de la mucoviscidose dans la population de l'est et sud algérien, thèse, Université Montouri Constantine.

Schales O, Schales SS, 1941, A simple and accurate method for the determination of chloride in biological fluids, *J Biol Chem*, **140** : 879, *site in*: Katherisan N, Gupta A, Mumford S, Cade A, Jones R, 2004, Sweet conductivity for the diagnosis of cystic fibrosis, *Journal of Cystic Fibrosis*, **3**, 205.

Schultz BD, Venglarik CJ, Bridges RJ, Frizzell RA, 1995,. Regulation of CFTR Cl-channel gating by ADP and ATP analogues. *J Gen Physiol*, **105**:329-361.

Schwiebert EM, Benos DJ, Egan ME, Stutts MJ, Guggino WB, 1999, CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. *Physiol Rev*, **79**:S145-S166.

Schwiebert EM, Morales MM, Devidas S, Egan M, 1998, Chloride channel and chloride conductance regulator domains of CFTR, the cystic fibrosis conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci* **95**:2674-2679.

Serre JL, Boileau C, Boutros N, Casetta A, Cointe D, David V, Diolez A, Girodon E et al, 2002, Les diagnostics génétiques, *Dunod:Paris:ISBN 2 10 005599 2*; 93.

Strachan T, Read AP, 1998, Génétique moléculaire humaine, *Medecine-Science Flammarion*, Paris, ISBN **2-257-11046-3**, 384-385.

Stutts MJ, 1995, CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels, *Science*, **269**: 847-851.

Suen TC, Tsui LC, Close proximity of positive and negative regulatory elements in the human CFTR promoter region, 9th annual cystic fibrosis conference, Dallas, 12-15 October 1995, *pediatr pulmonol*, **Suppl12**, 193.

Teich N, Ockenga J, Keim V, Mossner J, 2002, Genetic risk factors in chronic pancreatitis, *J Gastroenterol*; **37**: 1-9.

Templeton SN, 2002, Cationic liposome-mediated gene delivery in vivo, *Bioscience Reports*,**22**: 123 -130

Tizzano EF, Silver MM, Chitayat D, Benichou JC, Buchwald M, 1994, Differential cellular expression of cystic fibrosis transmembrane regulator in human reproductive tissues. clues for the infertility in patients with cystic fibrosis, *Am J Pathol*, **144**: 906-914.

Tmalet A, Fauroux B, Clément A, 2000, diagnostic de la mucoviscidose chez l'enfant, *Rev Mal Respir*, **17** : 725-732.

Tsui LC, Buchwald M, Barker D, Braman JC, Knowlton RG, Schumm J, Eiberg H, Mohr J, Kennedy D, Plavsic N, Zsiga M, Markiewicz D, Akots G, Brown V, Helms C, Gravius T, Parker C, Rediker K, Donis-Keller H, 1985, Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker, *Science*, **230**: 1054-1057. *site in*: Laurence Nieto, le clonage positionnel: exemple du gène de la mucoviscidose.

Tsui LC, Durie P, 2001, Genotype and phenotype in cystic fibrosis, *hospital practice*, **12**:367-371.

Tuesnàdy GE, Bacos E, Varadi A, Sarkadi B, 1997, Membrane topologie distinguishes a subfamily of the ATP-binding cassette (ABC) transporteurs, *FEBS Letters*, **402**: 1-3.

Uzun S, Gökçe S, Klalus W, 2005, Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations in males with congenital bilateral absence of the vas defrens, *J Exp Med*, **207**: 279-285.

Vantghem M, Moussaid-Ghennoun R, Permenis P, Marcelli-Tourvielle S, Ferez T, Wallaert B, 2005, Le diabète dans la mucoviscidose chez l'adult, *Ann Endocrinol*, **66** : 357-354.

Vastag B, 2003, Cystic fibrosis gene testing a challenge, *JAMA*, **289**: 2923-2924

Wagner JA, Reynolds T, Moran ML, Moss RB, Wine JJ, Flotte TR, Gardner P, 1998, Efficient and persistent gene transfer of AAV-CFTR in maxillary sinus, *Lancet* **351**:1702–1703.

WHO/ECFTN/ICF(M)A/ECFS Report of a joint meeting, The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis, Genoa, Italy, 19 June 2002.

Wizla-Derambure N, Michaud L, Sardet A, Deschildre A, Loeuille GA, Tassin E ; Loire N ; Buisine C ; Boutry E, Dias J, Hecquet F, Turck D, 1998, Effets de la rhDNase sur la fonction respiratoire et le statut nutritionnel de l'enfant et de l'adolescent atteints de mucoviscidose, *Archives de pédiatrie*, **5**:378-383.

Yahia M, Naimi D, 2005, Recherche des mutations du gène CFTR chez les patients affectes par l'atresie bilatérale des cannaux déferants (ABCD) dans l'Est et Sud Algérien, *Science & Technologie*, **23**:97-101.

Yankaskas JR, Mallory GB, 1998, Lung transplantation in cystic fibrosis: consensus conference statement, *Chest*, **113**: 217 - 226.

Yarden J, Radojkovic D, De Boeck K, 2004, Polymorphisms in the mannose binding lectin gene affect the cystic fibrosis pulmonary phenotype, *J Med Genet*, **41**:629–633.

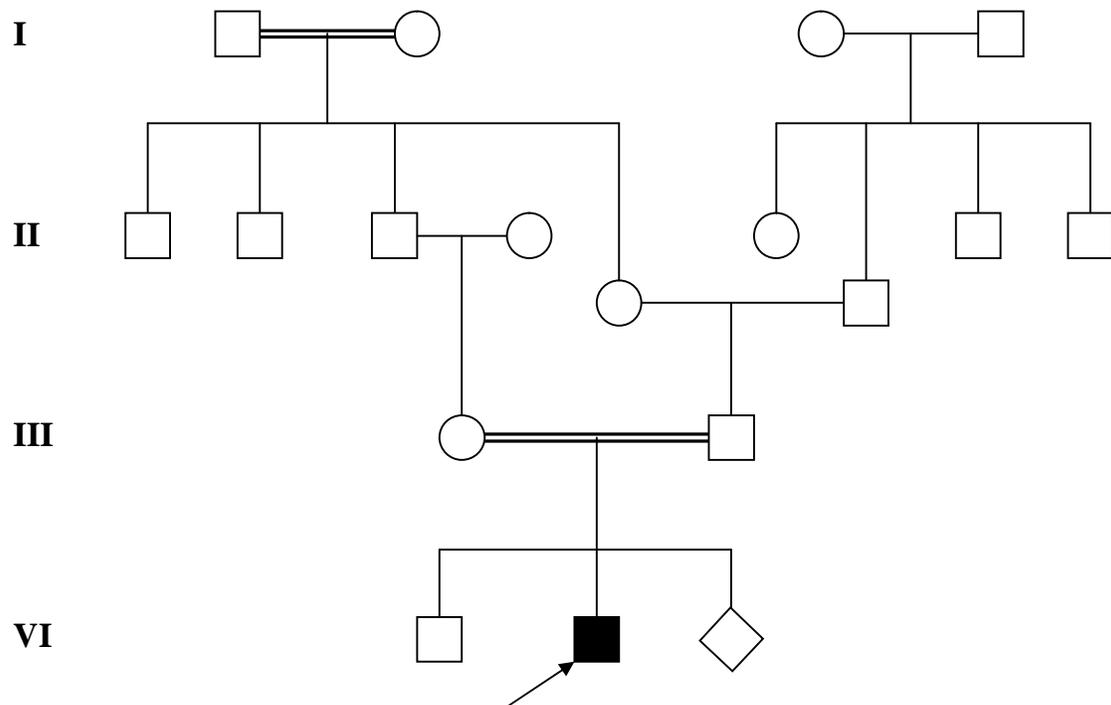
Zeng W, Lee MG, Muallem S, 1997, Membrane-specific regulation of Cl⁻ channels by purinergic receptors in rat submandibular gland acinar and duct cells, *J Biol Chem*, **272**: 32956-32965.

Zielenski J, Corey M, Rozmahel R, 1999, Detection of a cystic fibrosis modifier locus for meconium ileus on human chromosome 19q13, *Nat Genet*, **22**:128–129.

Zielenski J, Rozmahel R, Bozon D, Kerem B, Grzelczak Z, Riordan JR, 1991, Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics*, **10**: 214–28.

Annexes

Acide Aminé	Symbole	Codons
Isoleucine	I	ATT, ATC, ATA
Leucine	L	CTT, CTC, CTA, CTG, TTA, TTG
Valine	V	GTT, GTC, GTA, GTG
Phénylalanine	F	TTT, TTC
Méthionine	M	ATG
Cystéine	C	TGT, TGC
Alanine	A	GCT, GCC, GCA, GCG
Glycine	G	GGT, GGC, GGA, GGG
Proline	P	CCT, CCC, CCA, CCG
Thréonine	T	ACT, ACC, ACA, ACG
Sérine	S	TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC
Tyrosine	Y	TAT, TAC
Tryptophane	W	TGG
Glutamine	Q	CAA, CAG
Asparagine	N	AAT, AAC
Histidine	H	CAT, CAC
Acide Glutamique	E	GAA, GAG
Acide Aspartique	D	GAT, GAC
Lysine	K	AAA, AAG
Arginine	R	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
Codons Stop	X	TAA, TAG, TGA



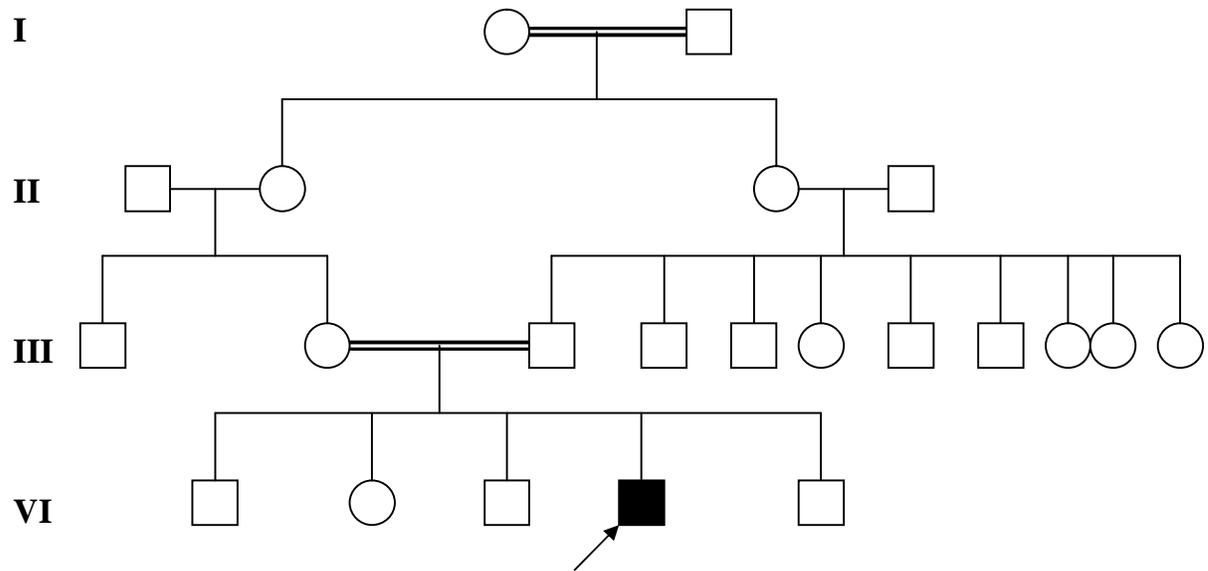
Famille N° 1

Age 6 mois

Age de diagnostic 1 mois

Broncho-pneumopathies à répétition, Iléus méconial

Teste de la sueur : Non fait



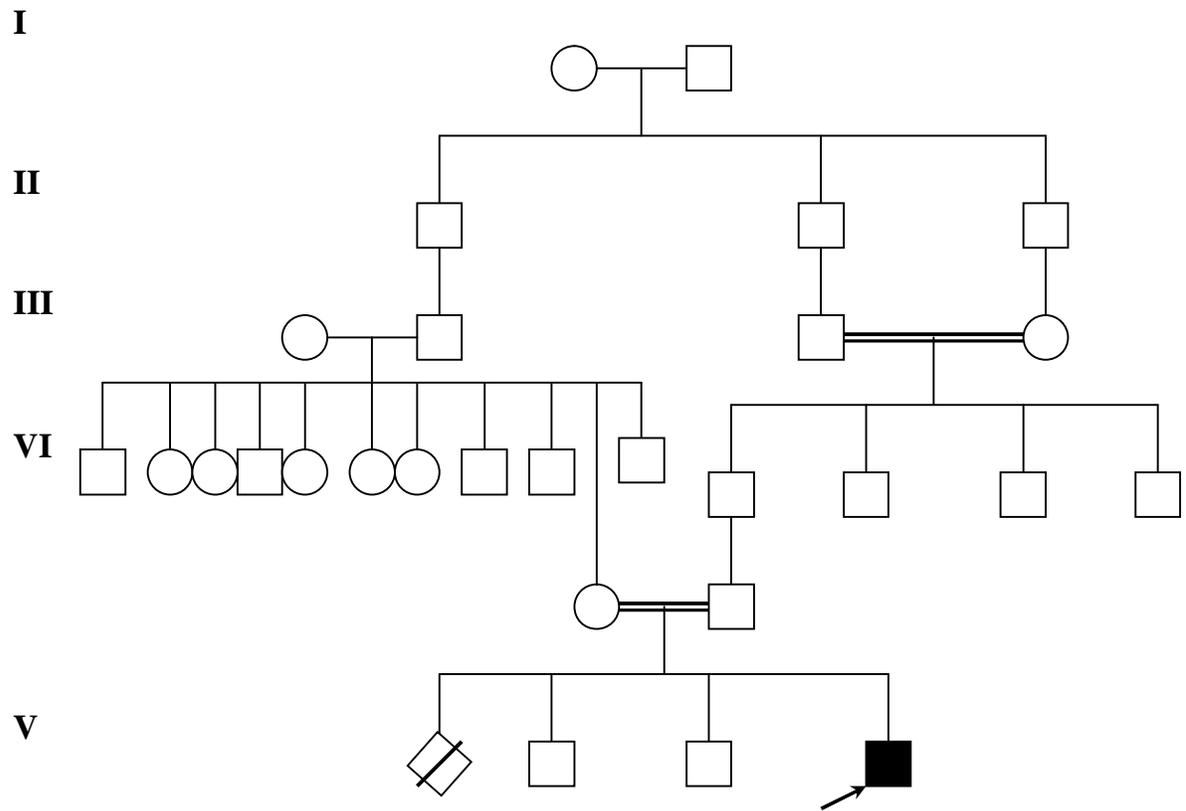
Famille No 2

Age 4 ans

Age de diagnostic 1 ans

Broncho-pneumopathies à répétition, diarrhées chroniques

Teste de la sueur : 108 mEq/L, 81 mEq/L

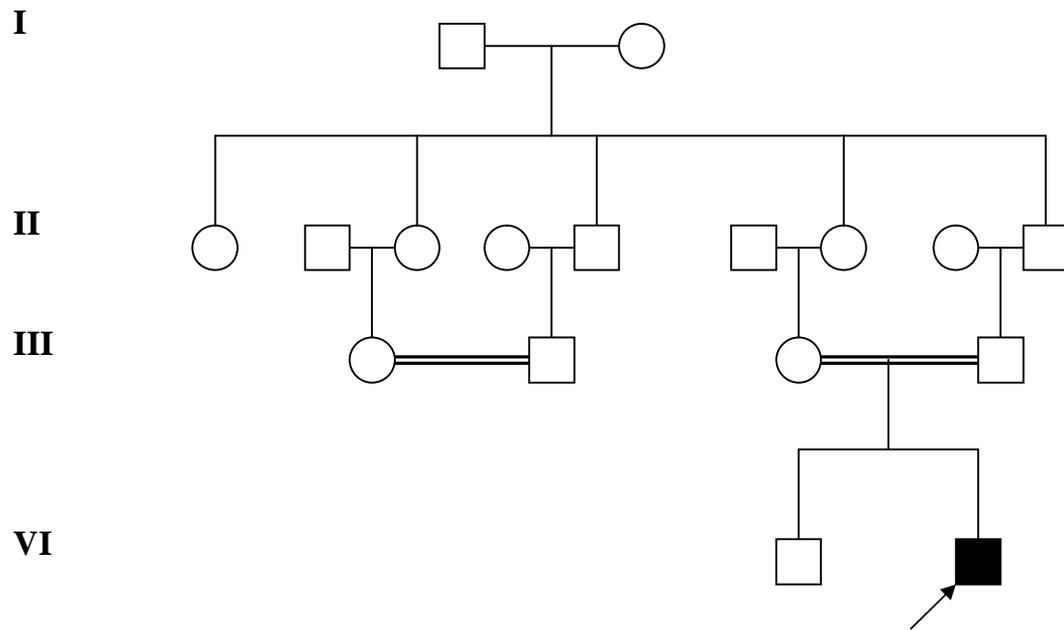
Famille N° 3

Age 8 ans

Age de diagnostic 9 mois

Broncho-pneumopathies à répétition, diarrhées chroniques, hépatomégalie.

Teste de la sueur : 76 mEq/L, 80 mEq/L

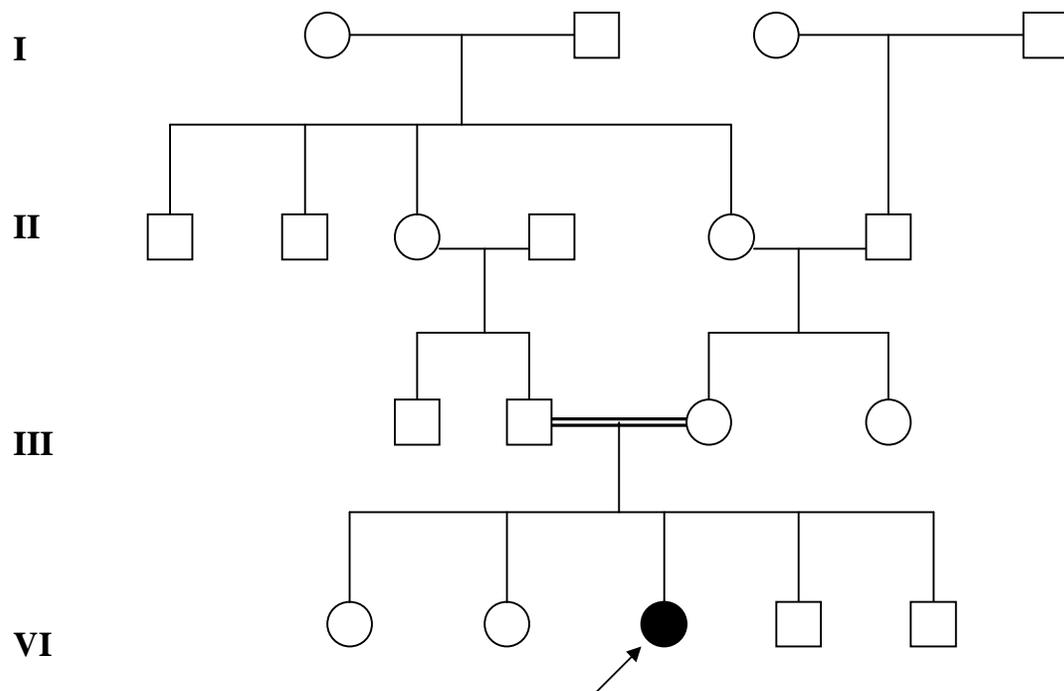
Famille №4

Age 6 ans

Age de diagnostic 3 ans

Bronchiolites chroniques, allergie

Teste de la sueur : Non fait



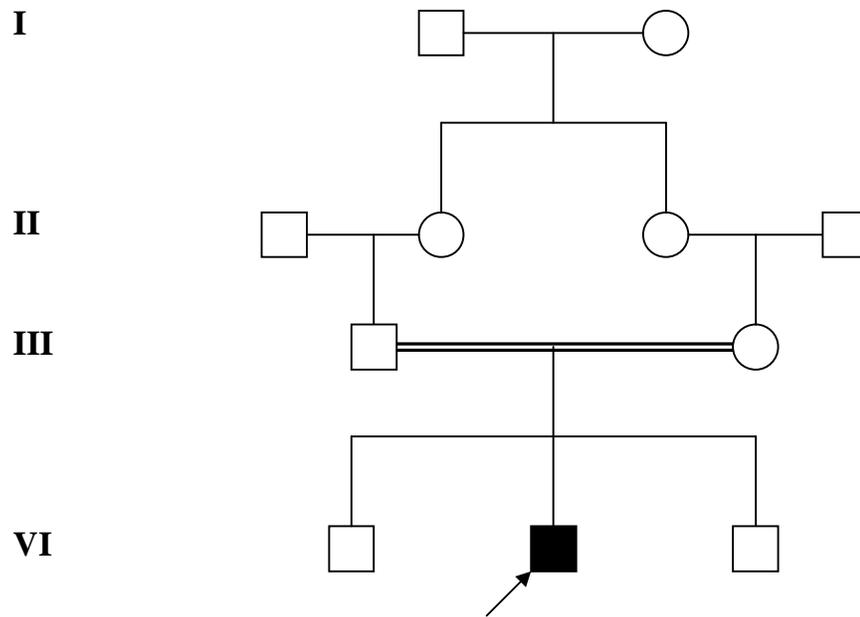
Famille № 5

Age 22 ans

Age de diagnostic 18 ans

Broncho-pneumopathies à répétition, diabète

Teste de la sueur : 70 meq/L



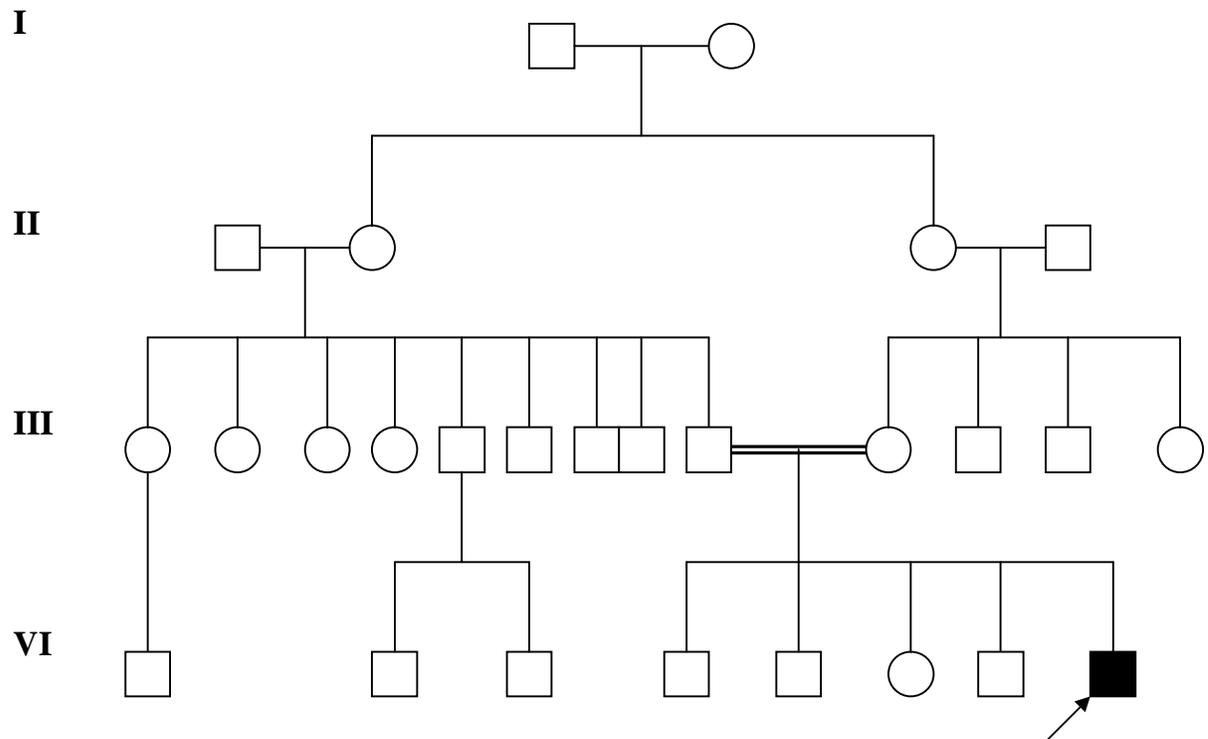
Famille N° 6

Age 12 ans

Age de diagnostic 1 ans

Broncho-pneumopathies à répétition, diarrhées chroniques, hépatomégalie.

Teste de la sueur : Non fait



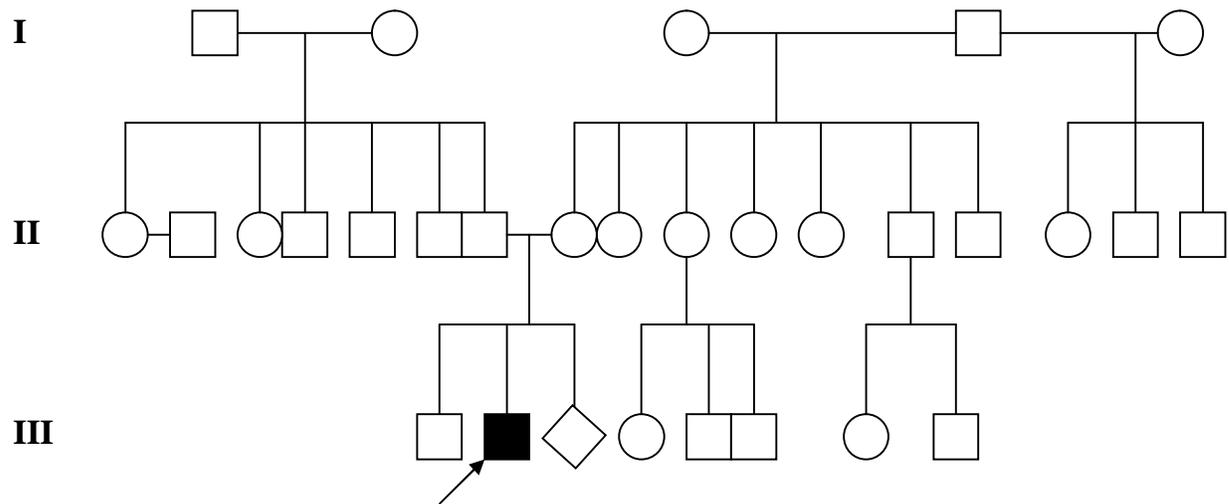
Famille No 7

Age 3 ans

Age de diagnostic 9 mois

Broncho-pneumopathies à répétitions, chroniques, diarrhées chroniques.

Teste de la sueur : 81 mEq/L, 69 mEq/L



Famille N° 8

Age 5 ans

Age de diagnostic 6 mois

Broncho-pneumopathie à répétition

Teste de la sueur : 80 mEq/L, 94mEq/L

Préparation de TE 20 :5

- Tris 20 mM
- EDTA 5 mM

Ajusté le pH à 7,5 par HCl

Préparation de TE 10 :5

- Tris 10 mM
- EDTA 1 mM

Ajusté le pH à 7,4 par HCl

Préparation de TBE 10X

- Tris.....108g
- Acide borique.....55g
- EDTA.....9.3g

Ajuster le pH à 8,3 par de l'acide acétique

Préparation de TBE 1X

- TBE 10X.....100 mL
- H₂O.....qsp 1000mL

Les pesés pour la préparation d'un gel de polyacrylamide 12 % :

- Acrylamide28.5g (qsp pour 100 ml H₂O distillée)
- Bis acrylamide1.5g (qsp pour 100 ml H₂O distillée)
- Persulfate d'ammonium (APS) 25 %..... 25g (qsp pour 100 ml H₂O distillée)

1- Préparation des leucocytes

- Dans un tube Falcon de 50 ml ; mettre le sang total et compléter avec du TE (20 :5).
(Annexe 4) Laisser 10 min dans la glace.

- Centrifuger 15 mn à 3900 rpm.

- Déverser le surnageant prudemment afin de garder le culot leucocytaire précipité au fond de tube.

- Rajouter le TE (20:5) au culot jusqu'à 25-30 ml, agiter pour le remettre en suspension et laisser 10 mn dans la glace.

- Centrifuger dans les mêmes conditions précédentes.

- Déverser le surnageant : obtention d'un culot de leucocytes.

(Si on s'arrête à ce niveau, les mettre dans un tube nunc de 1.5 ml avec du TE (10 :1) et les conserver à -20°C dans un congélateur).

2- Extraction de l'ADN

- Décongeler les leucocytes.

- Centrifuger pendant 15 mn à 3900 rpm

- Dilacérer le culot de leucocytes soigneusement afin de les prendre complètement et les mettre dans un tube Falcon conique de 15 ml.

- Ajouter 3 ml de tampon de lyse (NaCl 400 mM, EDTA 2mM, Tris 10mM, PH 8.2)

- Ajouter 200 µL de SDS à 10% (10 g SDSqsp 100 ml H₂O)

- Ajouter 100 µL de protéinase K à 10 mg / ml.

- Dans l'étuve, agiter le tube sur une roue rotative à 37°C pendant une nuit.

- Le lendemain, refroidir dans la glace.

- Ajouter 1 ml de NaCl 4 M et agiter rigoureusement à la main.

- Remettre 5 mn dans la glace (précipitation des protéines).

-Centrifuger 15 mn à 2500 rpm.

-Transvaser le surnageant dans un tube Falcon de 50 ml, ajouter 2 fois son volume d'éthanol absolu (100%) préalablement refroidi et agiter en tournant le tube plusieurs fois : **la formation de la méduse** visible à l'œil nu. (Laisser éventuellement 30 min à -20°C si la pelote d'ADN ne se forme pas).

- Récupérer la pelote d'ADN par une pipette pasteur et la rincer 2 fois dans l'éthanol à 70% dans un tube nunc (eppendorf) stérile.

3- Solubilisation de l'ADN :

- L'ADN est réhydraté en ajoutant entre 300 et 1000 μL de TE (10 :1) (Annexe 7) selon la grosseur de la pelote et la concentration souhaitée.

- Laisser une nuit sur agitateur rotateur à 37°C , puis à température ambiante jusqu'à dissolution complète (de 1 jusqu'à 3 jours).

L'ADN est solubilisé en phase aqueuse TE (10 :1). Sa pureté ainsi que sa concentration sont estimées par spectrophotométrie à UV.

ملخص:

مرض اللزاج المخاطي هو مرض وراثي ينتقل بطريقة جسيمية متتالية ، يتمثل المرض في إصابة شاملة لجميع الغدد ذات الإفراز الخارجي مما يترتب عنه سوء وظيفي للكثير من الأنسجة الطلائية . المرض ناتج عن طفرة في المورثة (cystic fibrosis transmembrane regulator CFTR) مما يشكل إخلال في أداء البروتين CFTR و الذي يشكل قناة للكلور متواجدة عبر العديد من الأعضاء. هذه القناة تعتبر غير وظيفية مما يؤدي إلى ظهور الأعراض لهذا المرض أكثر من 1500 طفرة وراثية تم اكتشافها ، تعتبر الطفرة $\Delta F508$ الأكثر انتشارا فهي موجودة ضمن 70 % من مجمل الصبغيات المصابة بهذا المرض مع تواجد ترتيب متنازل بين الشمال و الجنوب في أوروبا. في هذه الدراسة تم الكشف عن الطفرة $\Delta F508$ و التي وجدت ضمن 37.5% ضمن الصبغيات المبحوثة ، النسبة المحصل عليها هي نسبة مقاربة للنسب الملاحظة سابقا في الجزائر و لدى الشعوب المغاربية.

Abstract :

Mucoviscidosis or Cystic fibrosis (CF) is an inherited disorder transmitted according to the autosomal recessive mode, the disease affects all the exocrine glands that widespread dysfunction of many epithelial tissues.

CF is due to a mutation in CFTR gene (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator), caused dysfunction of CFTR protein which is a chloride channel and represents the gene product. This channel is defective and leads to the clinical manifestations of CF.

More than 1500 mutations have been reported. Worldwide, the most common is the $\Delta F508$ mutation, it represents in mean of 70 % of CF alleles, with a clear North to South decrease gradient in Europe.

In our study, the frequency of the $\Delta F508$ mutation was assessed on eight East Algerian families, we carried out DNA extraction from peripheral blood, polymerase chain reaction (PCR) followed by electrophoresis on 12 % polyacrylamide gel.

The allele frequency of $\Delta F508$ mutation was 37.5 %, this frequency is lower than observed for North European population but is comparable to data presented for Algerian, Tunisian, Turkish and Jewish population.

Nom : SEDRATI Prénom : Khadidja	Date de soutenance 03 / 05 / 2008
TITRE : Recherche de mutation $\Delta F508$ du gène CFTR dans la population de Constantine	
NATURE DU DIPLOME : Magister en génétique des pathologies humaines	
RESUME : <p>La mucoviscidose (CF : Cystic Fibrosis) est une maladie héréditaire autosomique récessive. C'est une exocrinopathie généralisée frappant les glandes à sécrétions muqueuses ce qui implique un dysfonctionnement dans de multiples tissus épithéliaux.</p> <p>Elle est due à des mutations du gène CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), entraînant un dysfonctionnement de la protéine CFTR, produit du gène, qui est un canal chlore. Ce canal étant défectueux conduisant aux manifestations cliniques de la mucoviscidose.</p> <p>Plus de 1500 mutations ont été décrites, la mutation $\Delta F508$ est considérée comme la mutation la plus fréquente, elle est présente en moyenne dans 70% des allèles CF, avec un gradient décroissant entre le Nord et le sud en Europe</p> <p>Dans notre travail, la fréquence de la mutation $\Delta F508$ a été évaluée sur huit familles de l'Est Algérien. On a réalisé l'extraction de l'ADN à partir du sang périphérique, une PCR suivie d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12 %.</p> <p>La mutation $\Delta F508$ a été retrouvée sur 37.5% des chromosomes CF étudiés. Ce résultat conforte ceux rapportés précédemment en Algérie, ainsi que sur des populations maghrébines.</p>	
Mots clés : mucoviscidose, gène CFTR, protéine CFTR, mutation $\Delta F508$, PCR, Algérie.	
Laboratoire de recherche : Laboratoire de Biologie et de Génétique Moléculaire CHU de Constantine	