

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Animale

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم بيولوجيا الحيوان

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : *Génétique*

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

LE DIAGNOSTIC DE LA MUCOVISCIDOSE A CONSTANTINE

Présenté et soutenu par : OUCHTATI Amina
Dali Hadjer

Le 28/06/2018

Jury d'évaluation :

Président : ABADI Noredine-Professeur-Université Salah Boubnider Constantine 3.

Encadreur : SIFI Karima -MCA-Université Salah Boubnider Constantine 3.

Examineur : SATTA Dalila- Professeur-Université des Frères Mentouri,Constantine1.

Examineur : HANACHI Sabah- MCA-Université Salah Boubnider Constantine 3.

Année universitaire
2017 – 2018

Résumé

La mucoviscidose est la maladie génétique grave à transmission autosomique récessive la plus fréquente dans la population caucasienne. Cette pathologie est due au dysfonctionnement de la protéine CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*), canal chlorure présent à la membrane apicale des cellules épithéliales. La déficience du canal CFTR, entraînent des perturbations hydroélectrolytiques qui sont à l'origine de l'hyper viscosité des sécrétions muqueuses. La gravité de la maladie dépend de la ou des mutations du gène *CFTR*. La mise en place du test de la sueur est préconisée afin de réduire les retards de diagnostics et de permettre une intervention précoce pour la prise en charge respiratoire et nutritionnelle de la maladie.

À travers ce travail, nous souhaitons évaluer les 7 années (2011-2018) de mise en œuvre du test de la sueur à Constantine et venons contribuer au diagnostic génotypique de la mucoviscidose. Cette étude a colligée 1113 patients originaires de 24 Wilaya, âgés de quelques jours à plus de 20 ans, la consanguinité a été retrouvée dans 31.18% des cas. Ce test a été motivé pour des signes respiratoires dans 58.22 % des cas, des signes intestinaux dans 18% des cas, retard de croissance /malnutrition dans 17.45% des cas. Les tests sudoraux ont été positifs dans 8% des cas, négatifs 84% des cas et intermédiaire dans 2% des patients. La mucoviscidose est une affection rare mais non exceptionnelle dans notre pays.

Abstract

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

المخلص

الليفة الكيسية مرض وراثي مميت تنقله عوامل وراثية متنحية، و هو اكثر الامراض الوراثية انتشارا عند الافراد من اصل اوروبي. يرجع هذا المرض إلى خلل بروتين CFTR، وهو عبارة عن قناة كلوريد موجودة في الغشاء القمي للخلايا الظهارية. خلل في قناة الكلوريد يسبب اضطرابات هيدروكهربائية و هي مصدر اللزوجة المفرطة للإفرازات المخاطية. تتوقف شدة المرض على طفرة او عدة طفرات الجين CFTR

ينصح بتنفيذ اختبار العرق للحد من التأخير في التشخيص والسماح بالتدخل المبكر لدعم و معالجة أمراض التنفسية و أمراض التغذية.

من خلال هذا العمل ، نرغب في تقييم 7 سنوات (2011-2018) من خلال تطبيق اختبار العرق في قسنطينة والمساهمة في التشخيص الجيني للتليف الكيسي. جمعت هذه الدراسة 1113 مريضاً من 24 ولاية، تتراوح اعمارهم ما بين بضعة أيام إلى أكثر من 20 سنة

تم العثور على صلة القرابة بنسبة 31.18 % من الحالات المدروسة. بين الاختبار أن نسبة الأمراض التنفسية 58.22 % ، أمراض الأمعاء بنسبة 18 % ، و التقزم و سوء التغذية بنسبة 17.45 % من الحالات.

كانت اختبارات العرق إيجابية بمعدل 8% من الحالات ، وكانت سلبية 84% ومتوسطة في 2% من عدد المرضى. التليف الكيسي مرض نادر لكنه غير استثنائي في بلدنا.

Dédicaces

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, que dieu te garde, à toi mon père.

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; maman que j'adore.

Aux personnes dont j'ai bien aimé la présence dans ce jour, à tous mes frères et mes sœurs, je dédie ce travail dont le grand plaisir leurs revient en premier lieu pour leurs conseils, aides, et encouragements.

Aux personnes qui m'ont toujours aidées et encouragées, qui étaient toujours à mes côtés, et qui m'ont accompagné durant mon chemin d'études supérieures, mes aimables amis, collègues d'étude, et frères de cœur :

Hanene, Ahlem, Mouhamed, Marwa, Hamida.

DALI HADJER

A mes parents formidables : Mohamed et Saliha

Merci pour m'avoir permis de réaliser ces études et celle à venir.

Merci pour l'éducation et les valeurs que vous m'avez transmises.

Merci pour tout l'amour que vous me portez et toute la confiance que vous m'accordez !

Je vous dédie ce mémoire en témoignage de ma reconnaissance et mon amour pour vous

A mes frères : Zaki et bilhel

Merci pour votre soutien et encouragements pendant mes études, vous occupez une grande place dans ma vie et mon cœur.

Recevez ce travail en témoignage de mon amour pour vous.

A mes chers oncles

Merci pour votre soutien et vos précieux conseils à chaque étape de mon cursus.

Recevez ce mémoire en témoignage de toute mon affection.

A tous mes amis(e)

A Sarah, ma sœur et ma confidente ; Zaki, mon assistant informatique Selma, la cluse du bonheur. Et tout le reste de mes camarades d'études en génétique moléculaire.

Merci pour votre présence et votre soutien.

A mon binôme Hadjer, Ma Sysso adoré, Jamais je n'oublierai les merveilleux souvenirs que nous avons partagés.

A l'ensemble du corps enseignant

Merci pour toutes les connaissances que vous m'aviez transmis.

OUCHTATI AMINA

Remerciements

*Avant toute chose nous remercions **ALLAH** le tout puissant qui nous a ouvert les portes du savoir et qui nous a donné la force et la volonté de poursuivre nos études.*

*Nous adressons nos vifs remerciements à notre encadreur le Professeur **Sifi Karima** ; pour la confiance qu'elle nous a accordée en acceptant d'encadrer ce mémoire de fin d'étude.*

Nous lui sommes reconnaissantes pour sa patience, ses encouragements, sa sympathie et sa disponibilité à tout moment. Ses conseils, ses commentaires, ses corrections et ses qualités scientifiques ont été très précieux pour nous aider à mener à bien ce travail.

Nous remercions également les membres du jury pour l'honneur qu'ils nous accordent en acceptant de juger notre travail. Nous tenons, enfin, à remercier tous ceux qui ont collaboré de près ou de loin à l'élaboration de ce travail à savoir tous le personnel du laboratoire de biochimie du CHUC et de recherche de biologie et de génétique moléculaire de la faculté de médecine UC3 Salah Boubnider , qu'ils acceptent nos humbles remerciements.

Table des matières

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1
Partie théorique	3
I. La mucoviscidose	4
I.1. Définition de la mucoviscidose.....	4
I.2. Histoire de la mucoviscidose.....	4
I.3. Epidémiologie.....	5
I.4. Physiopathologie de la mucoviscidose.....	7
I.4.1. Physiopathologie de la mucoviscidose au niveau respiratoire.....	7
I.4.2. Physiopathologie de la mucoviscidose au niveau digestif	8
I.5. Manifestations cliniques de la mucoviscidose.....	9
I.5.1. Manifestations pulmonaires.....	9
I.5.2. Manifestations digestives	10
I.5.3. Manifestations génitales	10
I.5.4. Manifestations endocrines	11
I.5.5. Manifestations musculo-squelettiques.....	11
I.5.6. CFTR-RD	11
II. Le gène <i>CFTR</i>	12
II.1. Localisation du gène <i>CFTR</i>	12
II.2. Séquence et taille du gène <i>CFTR</i>	13
II.3. Epissage alternatif dans le gène <i>CFTR</i>	13
II.4. Régulation de la transcription du gène <i>CFTR</i>	14
II.5. Mutations du gène <i>CFTR</i>	17
II.5.1. Origines et répartitions mondiales des mutations les plus fréquentes	17
II.5.2. Mutation c.1521_1523delCTT (p.Phe508del)	18
II.5.3. Mutations induisant un épissage alternatif.....	18
II.5.4. Différentes classes de mutations	19
II.5.4.1. Mutations de classe I.....	19
II.5.4.2. Mutations de classe II	19
II.5.4.3. Mutations de classe III	19

II.5.4.4. Mutations de classe IV	20
II.5.4.5. Mutations de classe V	20
II.5.4.6. Mutations de classe VI	20
II.5.5. Distribution géographique des mutations du gène CFTR.....	21
III. La protéine CFTR.....	22
III.1. CFTR : une protéine de la superfamille ABC.....	22
III.1.1. Propriétés des Transporteurs ABC.....	23
III.1.2. Domaines et fonctionnement d'un Transporteur ABC	23
III.1.3. Caractéristiques de la protéine CFTR par rapport aux autres transporteurs ABC.....	25
III.2. Propriétés, localisations, fonctions et synthèse de la protéine CFTR.....	25
III.2.1. Propriétés de la protéine CFTR	25
III.2.2. Tissus exprimant la protéine CFTR.....	25
III.2.3. Fonctions de la protéine CFTR.....	26
III.2.4. Biosynthèse et maturation de la protéine CFTR	27
IV- Les corrélations génotype/phénotype et gènes modificateurs dans la mucoviscidose....	29
IV.1. Variabilité des tableaux cliniques.....	29
IV.2. Rareté de la plupart des mutations	29
IV.3. Variabilité de la gravité des mutations	30
IV.4. Diversité des associations des mutations en trans	30
IV.5. Diversité des associations des mutations en cis.....	31
IV.6. Présence des séquences polymorphes induisant un épissage alternatif variable	31
IV.7. Influence des gènes modificateurs	33
V. Le diagnostic et le dépistage de la mucoviscidose.....	34
V.1. Diagnostic clinique	34
V.2. Diagnostic paraclinique.....	34
V.2.1. Test de la sueur	34
V.2.2. Différence de potentiel trans-épithéliale nasale	35
V.2.3. Dosage de la trypsine (dépistage néonatal)	35
V.2.4. Analyse moléculaire du gène CFTR.....	36
VI. Les approches thérapeutiques de la mucoviscidose.....	37
VI.1. Thérapie génique	37
VI.2. Thérapie cellulaire	39
VI.2.1. Cellules souches embryonnaires	39
VII.2.2. Cellules souches de la moelle osseuse.....	40

VI.2.3. Ces cellules souches progénitrices pulmonaires.....	42
VI.3. Pharmacothérapie	43
VI.3.1. Chaperonnes chimiques.....	43
VI.3.2. Aminoglycosides.....	44
VI.3.3. Activateurs de CFTR.....	45
VI.3.4. Activateurs de protéines "alternatives"	48
VII. Les modèles animaux dans la mucoviscidose.....	49
VIII. Le conseil génétique et mucoviscidose.....	52
VIII.1. Prise en charge des couples à risque de 1/4	52
VIII.2. Prise en charge des couples à risque de 1/2	53
VIII.3. Couples à risque a priori de 1/120.	53
Partie pratique.....	54
IX. Patients et méthodes.....	55
IX.1. Patients.....	55
IX.1.1. Recueil des données.....	57
IX.2.Méthodes.....	57
IX.2.1. Etude biochimique.....	57
IX.2.1.1. Le test de la sueur.....	57
IX.2.1.2. Matériel nécessaire.....	57
IX.2.1.3. Réactifs nécessaires.....	58
IX.2.1.4. Procédure.....	59
I.2.1.5. Mesure des volumes.....	61
IX.2.2. Etude génétique.....	62
IX.2.2.1. L'extraction de l'ADN.....	62
IX.2.2.1.1 Matériel nécessaire.....	62
IX.2.2.1.2. Réactifs nécessaires.....	62
IX.2.2.1.3.Procédure.....	62
IX.2.2.2. La PCR.....	63
IX.2.2.3.Contrôle par électrophorèse des produits de PCR des différents exons.....	70
X. Résultats.....	72
X.1. Répartition des patients selon le sexe.....	72
X.2. Répartition des patients selon l'âge au moment de la découverte de la maladie.....	72
X.3. Répartition des patients selon les wilayas.....	72

X.4. Répartition des patients selon les signes cliniques.....	73
X.5. Répartition des patients selon le type de mariage.....	74
X.6. Résultats du test de la sueur	74
X.7. Résultats des cas positifs selon le sexe.....	74
X.8. Résultats des cas positif selon les wilayas.....	74
X.9. Répartition des cas positifs selon la consanguinité.....	75
X.10. Résultats de la mise au point de la technique ARMS utilisées pour la recherche de la Delta F 508 du gène CFTR.....	75
XI. Discussion.....	76
XII. Conclusion.....	81
Référence bibliographique.....	82
Annexes.....	91

ABBREVIATIONS

AAV : Adeno associated virus

ABC : ATP binding cassette proteins

ABCD : Absence bilatérale congénitale des canaux déférents

ADP : Adénosine diphosphate

ASL : Liquide de surface des voies aériennes

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

ATF : Activating transcription factor

ATP : Adénosine triphosphate

CAVD : Absence congénitale des canaux déférents

Cbp/cut : CCAAT displacement protein cut homolog

C/EBP : CCAAT enhancer binding protein

CF : cystic fibrosis

CFTR : Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

CFTR-RD : CFTR-Related disorder

Cl⁻ : Chlore

CNX : Clanexine

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

CRE : cAMP response element

CREB : cAMP response element binding protein

CS : Cellules souches

CSE : Cellules souches embryonnaires

CSH : Cellules souches hématopoïétiques

CSM : Cellules souches mésenchymateuse

CTTNBP2 : Cortactin binding protein 2

DDP : différence de potentiel

DTM : domaine transmembranaire

ENaC : Epithelial Na⁺ channel

Endo H : Endoglycosidase H

ERQC : Endoplasmic reticulum quality control

G : guanine

Glc NAC : Acétylglucosamine

GSH : G-glytamyl-custéinyl-glycine

HCO₃⁻ : Ions bicarbonate

HGVS : Human genome variation society
HIF-1 : Hypoxia inducible Factor-1
HRE : HIF response element
HRN : High resolution melting analysis
IBMX : 3-isobutyl-1-methylxanthine
IL-1 β : Interleukine 1 beta
IMG : Interruption médicale de la grossesse
LPC : Liquide périciliaire
Mg $^{2+}$: Magnésium
MLPA : Multiplex ligation- dependant probe amplification
Na $^{+}$: Sodium
NBD : Domaine de liaison aux nucléotides
NF- κ B : Nuclear factor kappa B
ORCC : Outward rectifying chloride channel
pH : Potentiel hydrogène
Phe : Phénylalanine
Pi : Phosphate inorganique
RE : Réticulum endoplasmique
ROMK : Renal outer medullary K $^{+}$ channel
T : thymine
UPR : Unfolded protein response
USF2 : Upstream stimulatory factor 2
1-EBIO : 1-ethyl-2-benzimidazolinone
4PBA : Sodium-4-phenylbutyrate

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Incidence de la mucoviscidose dans le monde selon l’OMS en 2004.....	7
Figure 2 : Conséquence du dysfonctionnement de transport ionique sur la clairance mucociliaire dans la mucoviscidose.....	8
Figure 3 : Les symptômes de la mucoviscidose classiques et non classiques.....	12
Figure 4 : Localisation chromosomique du gène <i>CFTR</i>	13
Figure 5 : Sites d’initiation de la transcription.....	14
Figure 6 : Régulation transcriptionnelle du gène <i>CFTR</i> en condition physiologique.....	16
Figure 7 : Régulation transcriptionnelle du gène <i>CFTR</i> lors d’un stress.....	17
Figure 8 : Schéma des différentes classes de mutations du gène <i>CFTR</i> et leurs conséquences sur la fonction de la protéine dans la cellule.....	21
Figure 9 : Les séquences consensus des domaines de liaison des nucléotides (NBD).....	24
Figure 10 : Modèle du transport de drogues par la P-gp.....	24
Figure 11 : Illustration du processus de biosynthèse et de maturation de la protéine <i>CFTR</i>	29
Figure 12 : Variation du phénotype, dépendant de la mutation <i>CFTR</i> , en fonction du pourcentage d’ARNm normal et de l’activité de la protéine <i>CFTR</i>	30
Figure 13 : Effets du site polymorphe (Tn) sur l’épissage du transcrit de <i>CFTR</i>	32
Figure 14 : Effet d’un allèle spécifique sur l’activité CFT	32
Figure 15 : Contribution des gènes modificateurs dans la variabilité des signes cliniques de la mucoviscidose.....	33
Figure 16 : Mesure de la DDP chez un patient CF et non-CF lors de l’administration sur la muqueuse nasale d’amiloride, d’une solution sans chlorure et d’ATP.....	35
Figure 17 : Schéma illustre simplement le principe de la thérapie génique qui intègre à l’organisme le gène non-muté de la protéine.....	38
Figure 18 : Provenance et devenir potentiel des cellules souches embryonnaires.....	39
Figure 19 : Une coupe réalisée au niveau du poumon de la souris femelle.....	41
Figure 20 : Voies possibles de différenciation des cellules souches mésenchymateuses.....	42
Figure 21 : Les niches des cellules souches dans l’épithélium pulmonaire murin.....	43
Figure 22 : Structure des composés de la famille des xanthines.....	45
Figure 23 : Structure des composés de la familles des flavones et isoflavones.....	46
Figure 24 : Structure des composés de la famille des benzimidazolones et des benzoxazoles...	47
Figure 25 : Structure du lévamisole et son dérivé bromotétramisole ainsi que des composés de la famille des bipyridinones.....	48

Figure 26 : représentation d'un couple à risque $\frac{1}{4}$	52
Figure 27 : Représentation d'un couple à risque de $\frac{1}{2}$	53
Figure 28 : Gel d'agarose des produits de la réaction de PCR de l'exon 10 du gène CFTR ARMS normale	75

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Mutations du gène CFTR les plus fréquentes et leur distribution géographique.....	22
Tableau 2 : Manifestations compatibles avec un diagnostic de mucoviscidose.....	56
Tableau 3 : Protocole opératoire du dosage du chlore dans la sueur.....	60
Tableau 4 : protocole opératoire de la dernière étape du dosage du chlore dans la sueur.....	61
Tableau 5 : Amorces utilisées.....	66
Tableau 6 : Concentration des réactifs de la PCR.....	69
Tableau 7 : Composition du mix de la PCR.....	69
Tableau 8 : Répartition des patients selon le sexe.....	72
Tableau 9 : Répartition des patients selon l'âge au moment de la découverte de la maladie.....	72
Tableau 10 : Répartition des patients selon les wilayas.....	72
Tableau 11 : Répartition des patients selon les signes cliniques.....	73
Tableau 12 : Répartition des patients selon le type de mariage.....	74
Tableau 13 : Résultats du test de la sueur.....	74
Tableau 14 : Résultats du test de la sueur.....	74
Tableau 15 : Résultats des cas positifs selon les wilayas.....	74
Tableau 16 : Répartition des cas positifs selon la consanguinité.....	75

Introduction

La mucoviscidose est la plus fréquente des maladies autosomiques récessives dans la population caucasienne. Elle est classiquement définie par l'association d'une bronchopathie obstructive chronique, d'une insuffisance pancréatique exocrine avec une augmentation de l'ion chlorure dans la sueur au-delà de 60 millimoles (mmol) par litre [1]. La maladie est secondaire à des mutations du gène Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) à l'origine de la dysfonction de la protéine CFTR, dont la principale fonction reconnue à ce jour est d'être un canal perméable à l'ion chlorure (Cl⁻). Il en résulte un défaut du transport de Cl⁻ à travers les épithéliums et une anomalie généralisée des sécrétions muqueuses. Au niveau de la glande sudoripare, cela se traduit par un syndrome de perte de sel. Cette anomalie est à la base du principal examen biologique permettant le diagnostic de cette maladie : le « test de la sueur » [2,3]

L'incidence de la mucoviscidose varie selon l'origine géographique et ethnique. Elle est de l'ordre de 1/2000 à 1/3500 naissance en Europe et au nord de l'Amérique. Cette fréquence diminue dans les populations Méditerranéennes et principalement Maghrébines et elle est plus faible dans les populations noires (Africaines, Américaines) (1/20000) et Asiatiques (1/32400).

Les critères permettant de faire le diagnostic de la mucoviscidose ont été clairement définis lors d'une conférence de consensus Américaine (Rosenstein BJ 1998) et de recommandations internationales (De Boeck K 2006). Et le diagnostic est alors posé lorsque sont réunis : un signe clinique évocateur ou un cas dans la fratrie ou un test de dépistage néonatal positif et la démonstration d'une anomalie liée au dysfonctionnement de la protéine CFTR, un test de la sueur positif au moins à deux reprises ou la présence de deux mutations du gène *CFTR* ou une différence de potentiel (DDP) nasale positive. [4,5]

En Algérie, pays où l'incidence de cette maladie n'est pas connue car il n'existe pas de registre pour la mucoviscidose et où l'on ne pratique pas le dépistage néonatal de la mucoviscidose, la mise en place du test de la sueur est désormais préconisée afin de réduire les retards de diagnostics et de permettre une intervention précoce pour la prise en charge respiratoire et nutritionnelle de la maladie.

Devant l'impact du diagnostic de CF, un test de la sueur effectué correctement est d'une importance capitale surtout lorsqu'il s'agit d'une forme atypique. Il est donc absolument indispensable d'avoir une méthodologie fiable et standardisée pour la réalisation de ce test. [6]

À travers ce travail, nous souhaitons évaluer les 7 années (2011-2018) de mise en œuvre du test de la sueur à Constantine et venons contribuer au diagnostic génotypique de la mucoviscidose afin d'enrichir davantage les quelques rares études existantes concernant la

population Algérienne.

La mise en place de ces tests sera suivie sans doute par la création du registre Algérien de la CF.

Pour cela les objectifs de notre travail étaient de :

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

Partie théorique

I. La mucoviscidose

I.1 Définition de la mucoviscidose

La mucoviscidose ou « fibrose kystique du pancréas », est classiquement considérée comme la plus fréquente des maladies héréditaires sévères dans les populations d'origine caucasienne. Elle est transmise selon le mode autosomique récessif. Il s'agit d'une maladie chronique, monogénique et souvent létale, due à une altération du gène *CFTR* qui code pour la protéine *CFTR*, dont la fonction la plus décrite est la régulation des flux hydroélectrolytiques transmembranaires responsables de la qualité des sécrétions exocrines [7]. L'absence ou la non-fonctionnalité de cette protéine provoque un épaissement et une stase des sécrétions hydroélectrolytiques épithéliales au niveau pulmonaire, pancréatique mais aussi au niveau du tractus du tube digestif et de l'appareil génital [8].

Selon la sévérité de la maladie, elle peut être détectée à la naissance, pendant l'enfance ou à l'âge adulte. A ce jour, plus de 1700 mutations ont été identifiées dans le gène *CFTR*, dont la grande majorité sont très rares. La mutation la plus fréquente est la F508del, rencontrée chez près de 80 % des malades [9].

I.2 Histoire de la mucoviscidose

Dès le moyen âge, les enfants atteints de mucoviscidose furent décrits comme ensorcelés, comme en témoigne ce dicton du XVII^{ème} siècle : « Malheur à l'enfant qui laisse un goût de sel lorsqu'on l'embrasse sur le front: on lui jeta un sort et il mourra bientôt ! ». En 1606, Juan Alonzo de los Ruyzes de Fonteca, médecin espagnol, décrit un enfant atteint de la maladie et rapporta l'anomalie du transport ionique transépithéliale, et dont la conséquence est la production d'une sueur anormalement salée. A la même époque Pieter Pauw, professeur d'anatomie de l'université de Leyde aux Pays-Bas, décrit via l'autopsie d'une fillette de 11 ans supposée ensorcelée, des atteintes pancréatiques. Le pancréas était élargi, dur et blanc [10].

Au début du XX^{ème} siècle, les premières associations entre pathologie pancréatique et iléus méconial ou atteintes pulmonaires furent décrites.

Ce n'est qu'en 1936, que cette pathologie fut nommée pour la 1^{ère} fois « fibrose kystique du pancréas et bronchectasie » dans une thèse dirigée par Guido Fanconi. En 1938, la maladie fut réellement décrite comme une entité pathologique distincte par la pédiatre américaine Dorothy Andersen, qui donna une description des caractéristiques cliniques et histologiques de la maladie, notamment l'obstruction intestinale néonatale, les complications respiratoires et digestives et les lésions histologiques spécifiques du pancréas [11].

Le terme de mucoviscidosis, créé à partir des termes « mucus » et « visqueux », fut utilisé pour la première fois en 1943 par le docteur Sydney Farber, qui a émis l'hypothèse que

la maladie est due à une diffusion généralisée de mucus visqueux et voulu corriger la dénomination employée par Dorothy Andersen, centrée sur le pancréas [10].

En 1946, Hodge et Anderson suggérèrent le caractère héréditaire et le mode de transmission récessif de la maladie, qui est probablement causé par la mutation d'un seul gène [12].

En 1953, Paul Di Sant'Agnese, médecin hospitalier a remarqué que les enfants atteints de mucoviscidose étaient particulièrement affectés et meurent par déshydratation. Il a montré que cette déshydratation est due à une concentration anormale de chlorure de sodium et de potassium dans la sueur de ces patients. Cette découverte a permis la mise au point d'un diagnostic sensible, spécifique et réalisable en routine afin de mesurer l'excès en ions sodium (Na) et Cl- dans la sueur : le test de la sueur [13].

En effet en 1959, la technique du test de la sueur a été simplifiée par la méthode de l'iontophorèse à la pilocarpine décrite par Gibson et Cooke. Grâce à un diagnostic précoce basé sur ce test, des centres spécifiques de traitement ont été développés [14].

L'origine biochimique de la mucoviscidose fut précisée en 1981 par Knowles qui remarqua que le potentiel transépithélial, mesuré au niveau de l'épithélium nasal des patients mucoviscidosiques, est largement plus électro négatif que celui des sujets sains, puis par Quinton en 1983, qui démontra que cette électro négativité accrue provient d'une faible perméabilité de l'épithélium aux ions chlorures. Cette découverte a fait le lien physiologique entre les poumons, le pancréas et les glandes sudoripares expliquant que l'atteinte des différents organes était due à des anomalies électrolytiques et que le mucus visqueux n'était que l'une des conséquences et non la cause [15,16].

En 1985, le locus du gène responsable de la maladie fut localisé sur le bras long du chromosome 7 en 7q31 grâce à un marqueur RLFP. Puis en 1989 l'anomalie génétique a l'origine de la maladie fut mise en évidence par les équipes de Lap-Chi Tsui, Collins et Riordan. Il s'agit d'une mutation d'un gène localisé en 7q31 codant une protéine transmembranaire appelée CFTR [17]. Ce n'est qu'en 1991, qu'Anderson *et al.* Apportèrent les preuves que le CFTR était bien un canal chlore [18].

I.3 Epidémiologie

Bien que rare, la mucoviscidose est la plus fréquente des maladies génétiques grave. Elle apparait dès l'âge pédiatrique. Sa prévalence est variable en fonction de la localisation géographique des populations et de la fréquence des mutations responsables de la maladie. La migration des populations et le mariage consanguin sont aussi des facteurs qui influent la répartition de cette pathologie [19].

La mucoviscidose est plus fréquente dans les populations du nord de l'Europe et un peu moins dans les pays du sud du continent. Dans certains pays comme l'Irlande et la Grande-Bretagne un nouveau-né sur 1500 à 2500 naissances est atteint. Par contre dans d'autres pays tels que l'Espagne et la Grèce, la fréquence est de 1/3500 naissances. Alors qu'en France et en Italie, un gradient décroissant nord-sud est notable avec une incidence nationale de 1/2500 [3]. Néanmoins, dans les pays Scandinaves et l'Europe de l'Est, la fréquence varie entre 1/3500 et 1/7500 avec une incidence très faible en Finlande [20].

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

Au Moyen-Orient, l'incidence de la mucoviscidose varie en fonction des groupes ethniques et du taux de mariages consanguins. Des études effectuées dans ces pays ont montré que la fréquence maximale a été observée en Jordanie (1/2500) et la minimale aux Emirats-Arabes (1/16000). A noter qu'en Turquie l'incidence est de 1/10000 [21].

La maladie est beaucoup plus rare dans les populations d'Asie et d'Afrique noire. La prévalence en Afrique du Nord n'est pas précisément chiffrée, bien que quelques études de détections de mutations du gène *CFTR* ont été réalisées sur des effectifs réduits en Algérie [22] en Tunisie [23] et au Maroc [24].

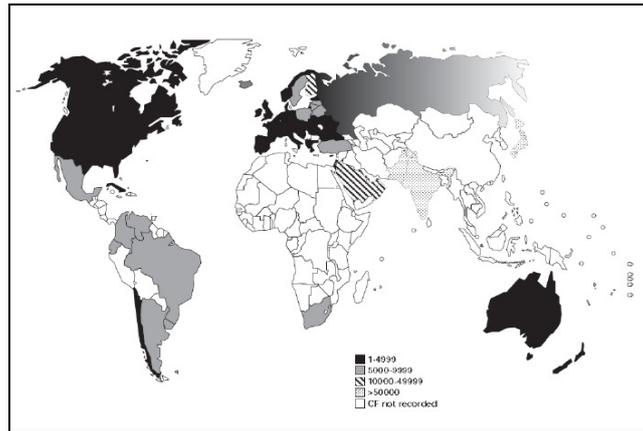


Figure 1 : Incidence de la mucoviscidose dans le monde selon l'OMS en 2004 [25]

I.4. Physiopathologie de la mucoviscidose

La mucoviscidose est une maladie à atteinte polyviscérale touchant les organes possédant un épithélium au sein des grands systèmes de l'organisme : respiratoire, digestif et génitale. L'anomalie génétique à l'origine de cette pathologie perturbe le fonctionnement de ces organes car les différents conduits finissent par être obstrués par un mucus épais et visqueux, ou d'autres sécrétions [26].

I.4.1. Physiopathologie de la mucoviscidose au niveau respiratoire

L'atteinte respiratoire due à la mucoviscidose diffère des autres manifestations viscérales de cette maladie, car elle est la cause majeure de morbidité et de mortalité. Le poumon mucoviscidosique semble morphologiquement normale *in utero* et dans le premier mois de la vie, mais les premières manifestations apparaissent rapidement puisque les glandes sous-muqueuses s'obstruent de mucus dès les premiers mois. Cela est dû à l'absence de la protéine CFTR au niveau de la membrane [27].

Au sein du poumon, existe un système de défense qui permet la filtration, la captation et la destruction des particules inhalées. En effet, l'épithélium bronchique est recouvert d'un liquide : l'ASL (liquide de surface des voies aériennes) constitué de deux phases : une phase aqueuse (le liquide périciliaire ou LPC) et une phase muqueuse [28].

Les canaux CFTR servent à la sécrétion active de chlore vers le LPC, ils interagissent avec les canaux de sodium pour limiter leur travail. Ce mouvement de chlore entraîne un mouvement de sodium et d'eau. Le transport des chlorures et des autres ions assure l'hydratation du LPC et le maintien d'une hauteur adéquate pour un battement normal des cils. Ainsi, le LPC peut également fonctionner comme un lubrifiant évitant que la couche muqueuse n'adhère aux surfaces cellulaires, ce qui facilite l'élimination du mucus sous l'effet des battements ciliaires chez les sujets sains. Alors que le mucus qui recouvre les cellules bronchiques protège le poumon des agressions de l'environnement (bactéries, virus, poussières, pollution ...).

Chez les patients atteints de mucoviscidose, un défaut de transport hydroélectrique (sécrétion d'ions chlorures) provoque une diminution de l'hydratation du mucus bronchique qui est visqueux, épais et responsable d'une clairance mucociliaire presque nulle.

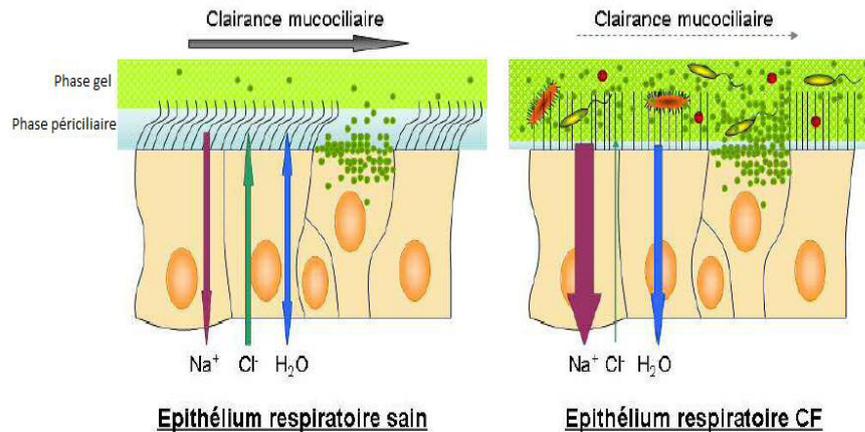


Figure 2 : Conséquence du dysfonctionnement de transport ionique sur la clairance mucociliaire dans la mucoviscidose (SAUSSEREAU, 2012) [31].

La diminution de clairance ainsi que l'accumulation du mucus créent un environnement propice à la prolifération de bactéries spécifiques, favorisant une colonisation bactérienne et une infection des poumons et des voies respiratoires [29]. Plusieurs pathogènes sont responsables de ces infections mais les principaux sont : *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenza* et *Burkholderia cepacia*. Le cercle vicieux inflammation chronique et surinfection bactérienne aboutit à la fibrose sévère du tissu pulmonaire et en conséquence à une insuffisance respiratoire majeure [30].

I.4.2. Physiopathologie de la mucoviscidose au niveau digestif

Vu que le tractus digestif est composé de nombreux organes sécréteurs, les patients mucoviscidosiques peuvent développer de nombreuses complications digestives.

L'iléus méconial constitue la manifestation initiale de la maladie dans 10 % des cas. Il apparaît dès les premiers jours de vie des nouveau-nés atteints de mucoviscidose. Il s'agit d'une occlusion intestinale, avec une absence de l'émission du méconium dans les 48 premières heures de la vie [31] dû à une déshydratation entraînée par défaut de sécrétion des anions suite à une altération de la protéine CFTR des villosités des cellules intestinales. Le mucus, trop épais au niveau du tube digestif va ralentir le transit contribuant ainsi à la malabsorption intestinale des nutriments.

Dans la plupart des cas l'occlusion peut être levée par des lavements hyperosmolaires [32].

Le syndrome de l'occlusion intestinale distale peut également survenir chez certains patients. C'est l'équivalent d'un iléus méconial tardif. Il est observé chez environ 40% des

patients dont 80% après 18 ans et résulte de l'accumulation de matières fécales desséchées dans l'iléon terminal et le caecum, favorisée par la déshydratation ou l'alitement prolongé. Il se traduit par des douleurs abdominales chroniques qui peuvent conduire à l'anorexie [33].

L'insuffisance pancréatique exocrine est la principale manifestation digestive de la mucoviscidose. Elle est due à une protéine CFTR défectueuse au niveau des canaux pancréatiques, ce qui conduit à la formation d'un mucus anormalement visqueux. L'accumulation de bouchons muqueux dans les canaux pancréatiques aboutit à leur obstruction. Par la suite, les enzymes pancréatiques (Lipase, trypsine et chymotrypsine) sont peu excrétées dans la lumière intestinale, et alors ils agressent le tissu pancréatique et induisent la fibrose. Tous ces éléments sont responsables d'un défaut d'absorption des graisses et des protéines, entraînant une dénutrition et une carence en vitamines liposolubles (A, D, E, K) et parfois hydrosolubles comme la vitamine B12 et en acides gras essentiels [30].

L'insuffisance pancréatique exocrine se traduit par une diarrhée chronique grasseuse, des insuffisances de croissance, un retard pubertaire, une anémie et des troubles carentiels. Les lésions pancréatiques sont à l'origine d'une dégradation progressive des cellules β des îlots de Langerhans, entraînant une insuffisance pancréatique endocrine et un diabète insulino-dépendant vers l'adolescence

Chez les patients mucoviscidosiques, les sécrétions biliaires acides précipitent ce qui est associé à une haute viscosité de la bile. Entraînant une obstruction des conduits hépatiques pouvant provoquer une cirrhose biliaire [27].

I.5. Manifestations cliniques de la mucoviscidose

I.5.1. Manifestations pulmonaires

La mortalité et la morbidité dans la mucoviscidose sont causées principalement par des affections pulmonaires. Généralement, les personnes atteintes, souffrent d'une infection endobronchique chronique, une inflammation et une obstruction des voies aériennes.

Les manifestations précoces se caractérisent par une toux chronique, une production intermittente d'expectorations et une dyspnée d'effort. Au fur et à mesure de la progression de la maladie pulmonaire, une lésion structurelle des voies aériennes se produit avec une bronchiectasie. Des études récentes ont indiqué que la bronchiectasie focale se produit souvent chez les jeunes patients atteints de mucoviscidose avec une fonction pulmonaire apparemment normale [34]. La maladie pulmonaire en phase terminale se caractérise par des lésions étendues des voies aériennes et par une fibrose du parenchyme pulmonaire adjacent aux voies aériennes.

I.5.2. Manifestations digestives

L'iléus méconial est parmi les manifestations digestives les plus précoces chez le nouveau-né mucoviscidosique. Il s'associe à des vomissements bilieux et à un ballonnement. Certains patients peuvent développer le syndrome d'obstruction intestinale distale à un âge plus tardif. Il s'agit d'une obstruction intestinale partielle ou complète épisodique.

Les manifestations digestives se résument en une insuffisance pancréatique exocrine, une fibrose interstitielle. Ainsi qu'une stéatorrhée et une croissance médiocre résultante d'une malabsorption des graisses. Cependant, une malabsorption des vitamines liposolubles et du zinc entraîne une anémie hémolytique, une coagulation défectueuse et des éruptions cutanées. La pancréatite récidivante aiguë ou chronique est beaucoup plus fréquente chez les patients ayant une insuffisance pancréatique [35].

L'atteinte hépatobiliaire, évolue rarement vers une cirrhose biliaire chez les adolescents et les adultes atteints de mucoviscidose.

I.5.3. Manifestations génitales

Plus de 95% des hommes atteints de mucoviscidose sont infertiles à la suite d'une azoospermie causée par un canal déférent altéré, qui peut être absent, atrophique ou fibrotique. Le corps et la queue de l'épididyme et des vésicules séminales peuvent être anormalement dilatés ou absents. Les hommes sans manifestations pulmonaires ou gastro-intestinales cliniquement apparentes peuvent présenter une CAVD (Absence congénitale du canal déférent) L'hypoplasie ou l'aplasie du canal déférent et des vésicules séminales peuvent survenir bilatéralement ou unilatéralement. Cela ne présente pas de risque pour la santé des hommes concernés car le développement et la fonction testiculaire et la spermatogenèse sont normaux.

La majorité des femmes mucoviscidosiques sont fertiles, bien que d'autres présentent un mucus cervical anormal qui peut contribuer à une baisse de la fertilité. La grossesse chez ces femmes est devenue un enjeu important, les premiers cas de grossesse étaient décourageants. Mais grâce à des améliorations dans le traitement pulmonaire, une gestion agressive des infections avec une plus grande variété d'antibiotiques et une nutrition améliorée, les grossesses sont aujourd'hui bien tolérées [32].

I.5.4. Manifestations endocrines

Le diabète lié à la mucoviscidose est diagnostiqué chez 7% des adolescents avec une augmentation de la prévalence à l'âge adulte [27].

Les complications microvasculaires du diabète sucré (rétinopathie, neuropathie et néphropathie), sont rarement exprimées, elles surviennent chez jusqu'à 20% des patients atteints [36]. Cependant, peu de rapports de complications macrovasculaires sont mise en point, cela est dû au raccourcissement de l'espérance de vie des patients. La régulation anormale de la croissance hormonale peut être responsable d'un retard de croissance linéaire.

I.5.5. Manifestations musculo-squelettiques

L'hippocratisme digital, une déformation des doigts et des ongles due à des infections pulmonaires chroniques, est secondaire à une hypertrophie bulbair du segment distal des doigts et des orteils. Jusqu'à 15% des patients âgés de plus de 12 ans peuvent développer une ostéoarthropathie hypertrophique touchant le tiers distal du fémur, du tibia, du péroné, du radius, du cubitus et de l'humérus. On estime que 23,5% des adultes mucoviscidosiques souffrent d'ostéoporose et 40% d'ostéopénie.

Les adultes atteints de mucoviscidose ont également une densité osseuse plus faible et ils sont prédisposés à un risque accru d'ostéopénie et de fractures deux fois plus élevés. Les principales causes liées à cette perte de densité sont une carence en vitamine D, un diabète insulino-dépendant, une masse corporelle faible et une post-transplantation pulmonaire [32].

I.5.6. CFTR-RD

Un consensus issu d'un travail européen a permis de distinguer deux formes de la mucoviscidose : la mucoviscidose classique ou typique (CF : Cystic Fibrosis) et la mucoviscidose non classique ou atypique (CFTR-RD : CFTR-Related Disorder) (**Figure 3**).

La mucoviscidose classique se caractérise par la présence d'au moins une manifestation clinique de la mucoviscidose et une concentration en ions chlorures de la sueur supérieure ou égale à 60 mmol/l. Alors que la mucoviscidose non classique ou atypique est définie par la présence d'au moins une caractéristique phénotypique de la mucoviscidose, et un niveau du chlorure dans la sueur normal (< 30 mmol/L chez le nourrisson, < 40mmol/L chez l'enfant) ou intermédiaire (30/40-59 mmol/L).

Un phénotype CFTR-RD, est une entité clinique associée avec un dysfonctionnement de la protéine CFTR et ne répond pas à tous les critères d'un phénotype mucoviscidosique.

Trois manifestations cliniques résument le phénotype CFTR-RD : une absence congénitale bilatérale des canaux déférents, une pancréatite récurrente ou chronique et une bronchectasie. Dans ces trois manifestations cliniques, un dysfonctionnement de la protéine

CFTR doit être visualisé pour déterminer un phénotype CFTR-RD. En général, la forme atypique peut affecter un ou plusieurs organes, la fonction pancréatique exocrine est généralement conservée et l'atteinte pulmonaire est moins sévère que dans la forme classique [37].

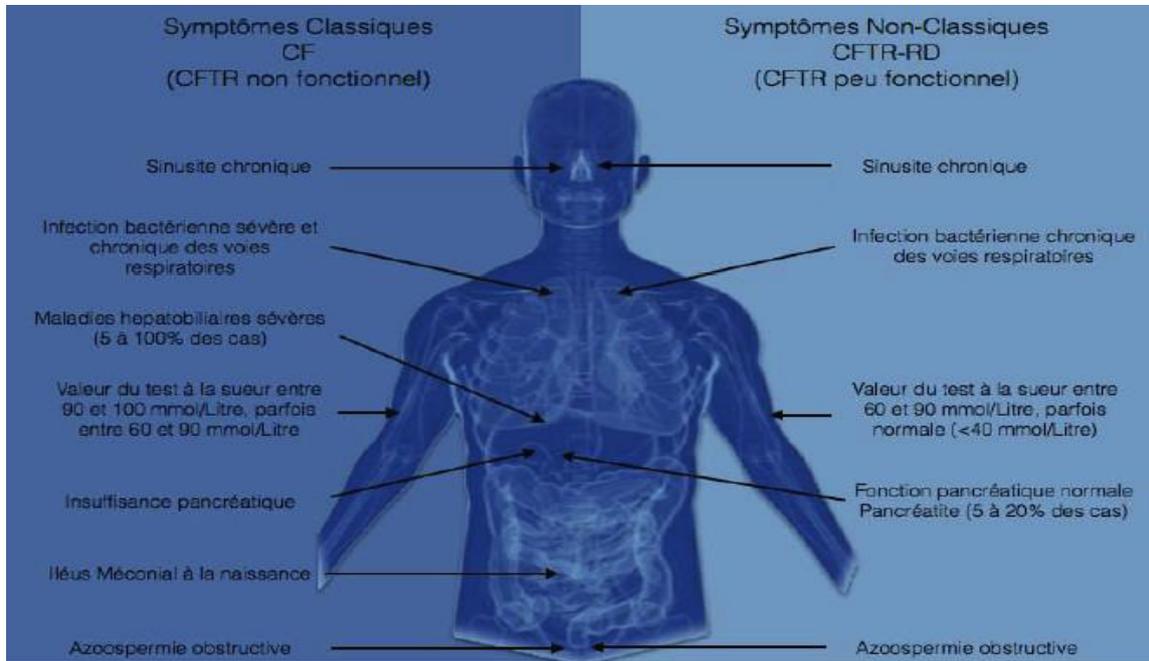


Figure 3 : Les symptômes de la mucoviscidose classiques et non classiques (Farhat, 2014) [28]

II. Le gène *CFTR*

II.1. Localisation du gène

Ce n'est qu'en 1989 que le gène *CFTR* a été identifié pour la première fois par des techniques de clonage positionnel. Le gène a été localisé par rapport au marqueur génétique D7S15 sur le bras long du chromosome 7 au locus 7q31.2 (figure 4) [26]. Plus précisément le gène *CFTR* se situe entre les deux gènes *ASZI* (ankyrin repeat, SAM ans basic leucine zipper domain containing 1) et *CTTNBP2* (cortactin binding protein 2) [38].

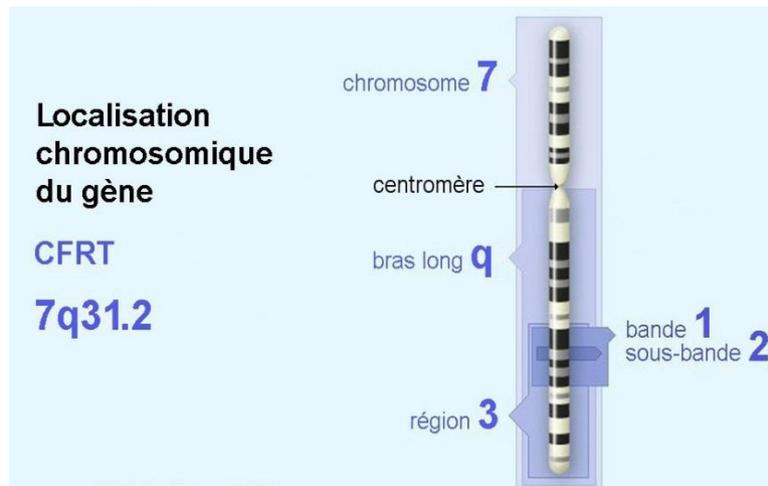


Figure 4 : localisation chromosomique du gène *CFTR* (Moisan, 2015) [71].

II.2. Séquence et taille du gène *CFTR*

La séquence du gène a été identifiée en 1989. Cette caractérisation a été basée sur l'isolement et l'alignement d'ADNc obtenus de lignées cellulaires adénocarcinomiques humaines T84 [39].

Le gène *CFTR* s'étend sur environ 230 kb. Il est transcrit en un ARNm de 6,5 kb. Ce grand gène est composé de 27 exons notés classiquement de 1 à 24 avec des exons dédoublés : 6a et 6b, 14a et 14b, 17a et 17b. Ces séquences exoniques correspondent uniquement à 2,45% du gène. Deux nomenclatures sont utilisées concernant le gène *CFTR* : la nomenclature traditionnelle, anciennement utilisée, les exons sont numérotés de 1 à 24 et la nomenclature HGVS (*Human Genome Variation Society*) qui suit les recommandations internationales [26].

II.3. Epissage alternatif du le gène *CFTR*

Il existe chez l'homme plusieurs sites d'initiation de la transcription. Le site majeur semble être situé, pour les cellules exprimant un niveau élevé de *CFTR*, à 72 Pb en amont de l'ATG, les autres se trouvant entre 60 Pb en amont et 60 Pb en aval du site majeur. Il faut toutefois noter que les résultats sont un peu discordants selon les équipes [40, 41, 42].

De nombreuses isoformes de l'ARNm du *CFTR*, dues à un épissage alternatif, ont été identifiées suggérant un niveau de régulation supplémentaire dans l'expression du gène *CFTR*.

Deux exons, préalablement non caractérisés, ont été détectés entre 900 et 500 Pb en amont de l'exon 1 (exon - 1 a et exon 1 a) et il a été possible de montrer par amplification de l'ADNc par PCR que l'épissage pouvait se faire des exons - 1a à 1 a et à 2 ou de -1 a à 2 [43]. Toutefois, la signification physiologique de l'initiation de la transcription au niveau des exons 1 a et + 1a du *CFTR* reste obscure.

L'isoforme -1a/1a/2 ne permet pas la production d'une protéine tandis que l'isoforme -1a/2 permet de générer une protéine tronquée dont la traduction est initiée dans l'exon 4 [44].

De plus, la présence d'une isoforme 1a-L/2 a été décrite chez un patient souffrant de polypose nasale [45]. L'exon -1, spécifique au tissu testiculaire et régulé durant la spermatogenèse, a été mis en évidence chez la souris. Cet exon contient une séquence Y box qui active la transcription, et lorsqu'il est rabouté à l'exon 1, permet l'exclusion d'un ORF qui réduit l'efficacité de la traduction.

II.4. Régulation de la transcription du gène

La régulation du gène CFTR est extrêmement complexe. En effet, le promoteur CFTR est régulièrement associé aux promoteurs des gènes de ménage. Le promoteur CFTR est dépourvu d'une boîte TATA et présente de nombreuses régions riches en GC, de multiples sites d'initiation de la transcription (TSS) dont la plupart sont tissu-spécifiques et peuvent varier en fonction du stade de développement. Le TSS +1 qui sert de référence est celui décrit par Riordan et al. en 1989. Il se situe à -132pb de l'ATG.

Dans le poumon humain, un changement de site d'initiation s'opère au cours du développement : le site majoritaire dans le poumon fœtal est positionné au nucléotide -132 Pb, tandis que le site utilisé dans le poumon adulte est en position -69 Pb (**Figure 5**). Ce changement de site d'initiation de la transcription participe à la régulation de la transcription et peut expliquer la diminution d'expression de *CFTR* dans le poumon adulte par rapport au poumon fœtal.

En plus de cette spécificité, Le promoteur *CFTR* comporte de nombreux sites potentiels de fixation de facteurs de transcription telque les protéines AP-1, AP2, SP1 (Specificity Protein 1).

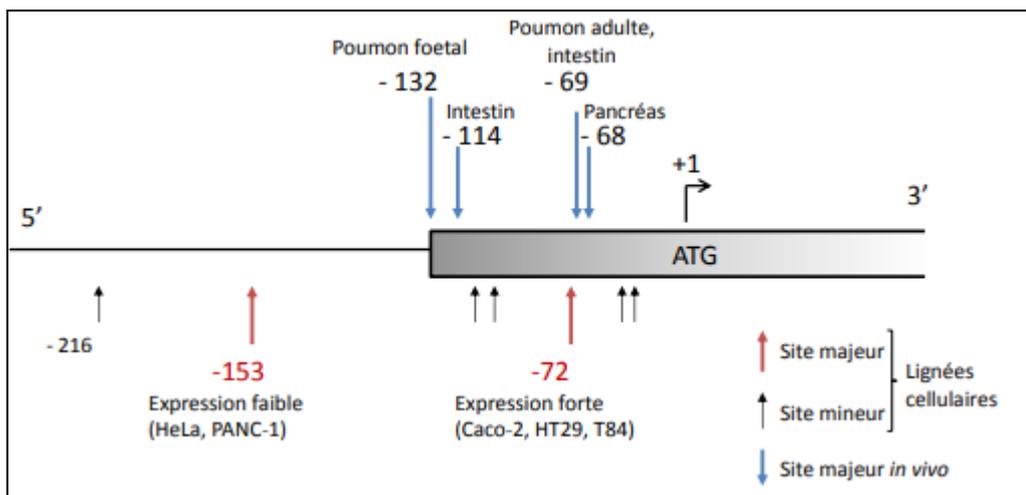


Figure 5 : sites d'initiation de la transcription (Becdelièvre, 2011) [46].

La variation moléculaire, la substitution d'une thymine (T) par une guanine (G) en position -94, a été retrouvée chez une patiente présentant une CF. Il a été montré que cette

altération modifie un site de fixation pour le facteur Sp1, mais également pour le facteur USF2 (*Upstream Stimulatory Factor 2*). Ces deux facteurs se lient au promoteur du gène *CFTR* pour activer sa transcription. Ainsi que, la substitution d'une T par une G (T>G) au niveau du site -680 permet de fixer du facteur AP-1. La liaison du facteur AP-1 sur ce site régule négativement la transcription du gène *CFTR*. Six sites potentiels de liaison de la protéine AP-1 ont été décrits dans le promoteur du gène *CFTR* en positions -222, -425, -612, -680, -914, et -996 Pb). D'autres sites potentiels liant des éléments régulateurs ont été aussi identifiés dans le promoteur *CFTR* dont quatre sites GRE en position -878, -1079, -1165 et -1405, deux sites AP-2 se situent en position -1046 et -283 et un site de fixation pour la protéine C/EBP en position -125pb.

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

Tout comme l'ouverture de son canal, le gène *CFTR* est régulé par l'AMPc. Son promoteur comporte un motif CRE (*cAMP Response Element*) où se fixent les protéines CREB et ATF. La phosphorylation active le facteur CREB par protéine kinase PKA. L'inhibition de PKA réprime la transcription du gène *CFTR*.

Un polymorphisme au sein du promoteur minimal a permis d'identifier un motif CArG-like. Ce site peut être reconnu par deux facteurs antagonistes : SRF qui active la transcription et le facteur YY1 qui est un fort répresseur. L'antagonisme fonctionnel de ces deux FTs résulte en une augmentation de l'expression du gène *CFTR*.

L'étude d'un variant identifié chez un patient atteint d'ABCD a permis de mettre en évidence la fixation de facteurs répresseurs FOXI, 33 Pb en amont du TSS majeur, spécifiquement dans les cellules issues des canaux déférents. L'ensemble des facteurs est représenté sur **la figure 6**.

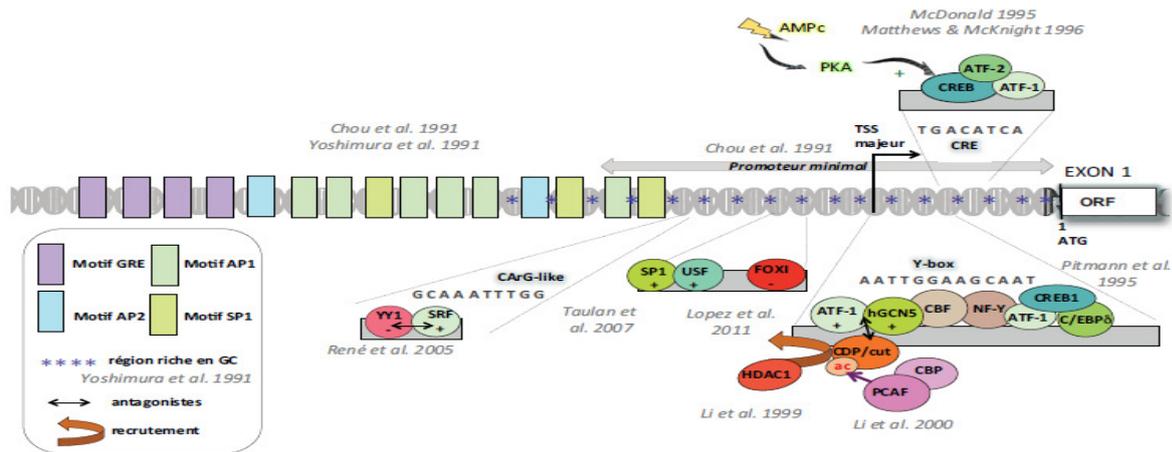


Figure 6 : régulation transcriptionnelle du gène CFTR en condition physiologique (Bonini, 2015) [47].

Lors d'une inflammation, la protéine IL-1 β (Interleukine 1 *beta*) régule le taux de transcrits CFTR dans les cellules T84 de manière dose-dépendante par l'activation du facteur de transcription NF- κ B (*Nuclear Factor Kappa B*) qui se fixe sur le motif κ B-like en position -1040 à -1030. Cette fixation a un effet positif sur l'activation transcriptionnelle de *CFTR*.

En cas d'accumulation de protéines mal conformées dans le réticulum endoplasmique, une réponse adaptative nommée UPR (*Unfolded Protein Response*) est induite afin de protéger la cellule contre ce stress. Cette réponse réprime l'activité promotrice du gène *CFTR* à travers la fixation du facteur de transcription ATF6.

De la même manière, il a été montré qu'en condition d'hypoxie, la cellule répond par la fixation du facteur HIF-1 (*Hypoxia Inducible Factor-1*). HIF-1 se fixe sur le site HRE (*HIF Responsive Element*) présent en position -718pb et réprime la transcription du gène *CFTR* [46]. L'ensemble des facteurs se fixant sur ces motifs est représenté sur **la figure 7**

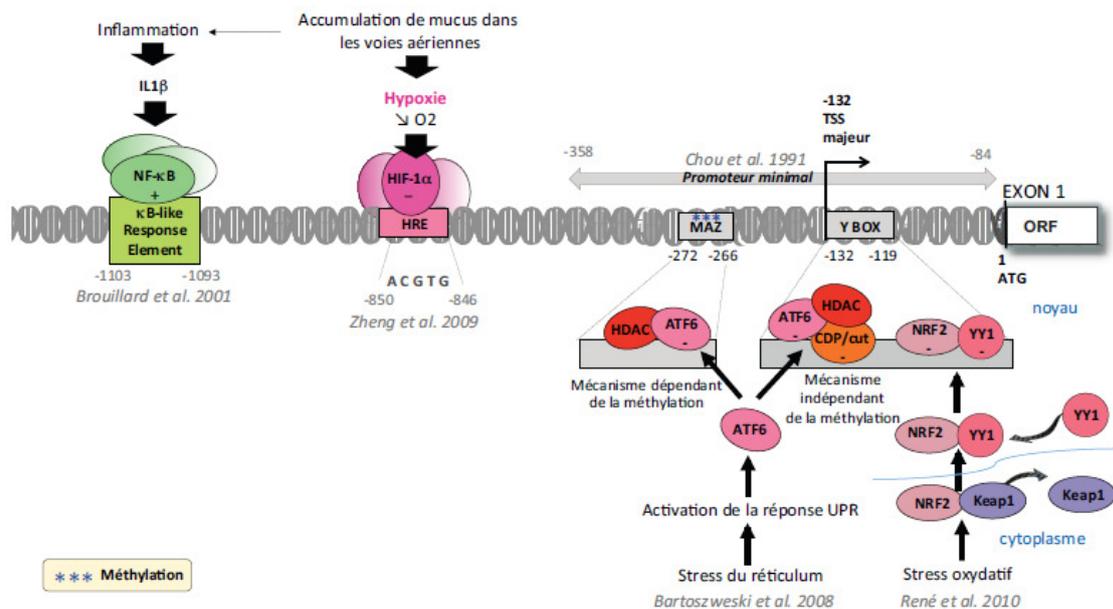


Figure 7 : régulation transcriptionnelle du gène *CFTR* lors d'un stress cellulaire (Bonini, 2015) [47].

II.5. Mutations du gène *CFTR*

II.5.1. Origines et répartitions mondiales des mutations les plus fréquentes

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

En Europe, des pays comme l'Autriche, le Danemark, la Biélorussie l'Estonie, la Belgique, la Finlande, la France, l'Allemagne, la Lituanie, les Pays-Bas, le Norvège, la Pologne, la Suède, la Suisse et l'Ukraine ont plus d'homogénéité dans leurs mutations par rapport à d'autres pays comme l'Espagne, la Bulgarie, la Grèce et la Turquie. L'hétérogénéité des mutations de ces derniers est due à leur situation géographique considérée comme une « passerelle historique » entre le Moyen-Orient et l'Afrique vers l'Europe.

Dans des pays comme la France, l'Italie et l'Espagne, l'incidence de ces trois mutations croit selon un gradient nord-sud pour arriver à une fréquence maximale dans les régions au bord de la méditerranée [28]

La présence des mutations méditerranéennes du gène *CFTR* dans des pays européens comme la Hongrie, la Slovaquie, l'Autriche peut être expliquée par la colonisation de plusieurs

parties de l'Europe par les voies fluviales. Ces mutations sont aussi présentes dans les pays Africains de la méditerranée notamment la Tunisie et l'Algérie [48].

La fréquence élevée de la mutation p.Gly551Asp dans les pays de l'Europe du nord, pourrait être expliquée par la longue histoire de migration des tribus Celtes en Europe.

II.5.2. Mutation c.1521_1523delCTT (p.Phe508del)

Sur toutes les mutations décrites, la mutation principale, généralement appelée la mutation F508del et c.1521_1523delCTT, p.Phe508del selon la nomenclature HGVS. Cette mutation décrite simultanément que la découverte du gène en 1989, consiste en une délétion de trois nucléotides au niveau du dixième exon du gène, aboutissant à l'élimination d'un acide aminé, la phénylalanine (Phe), en position 508. C'est une mutation qui perturbe la maturation et le trafic intracellulaire de la protéine CFTR et est plutôt associée à un phénotype sévère.

L'acide aminé Phe508 est impliqué dans des interactions hydrophobes critiques pour assurer un repliement correct et une bonne structuration tridimensionnelle de la protéine, avant la structuration des sites de liaison à l'ATP. En conséquence, la protéine CFTR portant la délétion est incapable d'acquies sa forme totalement glycosylée et sera repérée par le système de contrôle de qualité du Réticulum endoplasmique (RE) où elle sera retenue puis dégradée. Ainsi, la protéine p.Phe508del est absente au niveau de la membrane des cellules épithéliales. Il a été démontré que la réversion du phénotype apparaît lorsque la température d'incubation des cellules est réduite à 23-30°C, quelques protéines CFTR p.Phe508del arrivent à échapper au système de contrôle du RE. Ces protéines sont entièrement glycosylées et sont délivrées au niveau de la membrane. Cela indique que le processus de repliement de la protéine est capable d'être restauré à une température réduite et la protéine p.Phe508del maintient quelques activités. La grande majorité des patients atteints de mucoviscidose dans le monde est porteuse de la mutation F508del, et pratiquement la moitié d'entre eux portent la forme homozygote [28].

II.5.3. Mutations induisant un épissage alternatif

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

Approximativement, 35 % de l'épissage alternatif dans les cellules des mammifères conduit à la formation des ARNm contenant un codon stop prématuré qui peuvent être efficacement dégradés par le NMD [49]. De même, les épissages alternatifs résultant des mutations qui ne conduisent pas à un décalage du cadre de lecture provoqueront la formation d'un ARNm tronqué, et donc la formation d'une protéine incomplète qui pourrait être dégradée lors de la maturation au niveau du RE ou avoir une altération de sa fonction [50].

II.5.4. Différentes classes de mutations

Plus de 1700 mutations réparties tout au long du gène *CFTR*. La majorité sont des mutations dites ponctuelles. Parmi les différentes mutations recensées du gène *CFTR*, 45 % sont des mutations faux-sens, 18 % de mutations non-sens, 23 % des insertions-délétions induisant un déphasage du cadre de lecture et 14 % des mutations des sites d'épissage. Les mutations sont réparties en 6 classes sur la base du mécanisme responsable du dysfonctionnement du canal CFTR et en fonction de leur conséquence moléculaire. Une première classification a été faite par Welsh et Smith qui ont classés ces mutations en quatre groupes. Vankeerberghen a modifié ce classement pour établir 6 groupes différents.

II.5.4.1. Mutations de classe I

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

II.5.4.2. Mutations de classe II

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

II.5.4.3. Mutations de classe III : Défaut d'activation du canal.

Ces mutations affectent la régulation du canal chlorure. Il s'agit le plus souvent de mutations faux sens situées dans les domaines de liaison à l'ATP (domaines NBD1 et NBD2), entraînant une diminution de la sensibilité de la cellule à l'ATP, ce qui traduit par une absence de

signal d'ouverture. Dans cette classe, la mutation G551D est située dans le domaine NBD. Elle interfère aussi avec l'hydrolyse de l'ATP ainsi qu'avec la phosphorylation du domaine R.

II.5.4.4. Mutations de classe IV :

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

II.5.4.5. Mutations de classe V :

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

II.5.4.6. Mutations de classe VI : Défaut de stabilité de la protéine mature

Les mutations de classe VI altérant la stabilité de la protéine mature. Elles sont issues le plus souvent d'une délétion de la partie C-terminale de la protéine terminale. Les mutants de cette classe permettent la synthèse de protéines fonctionnelles mais instable au niveau membranaire et diminuent les propriétés de régulation des autres canaux. C'est le cas de la mutation Q1412X [51].

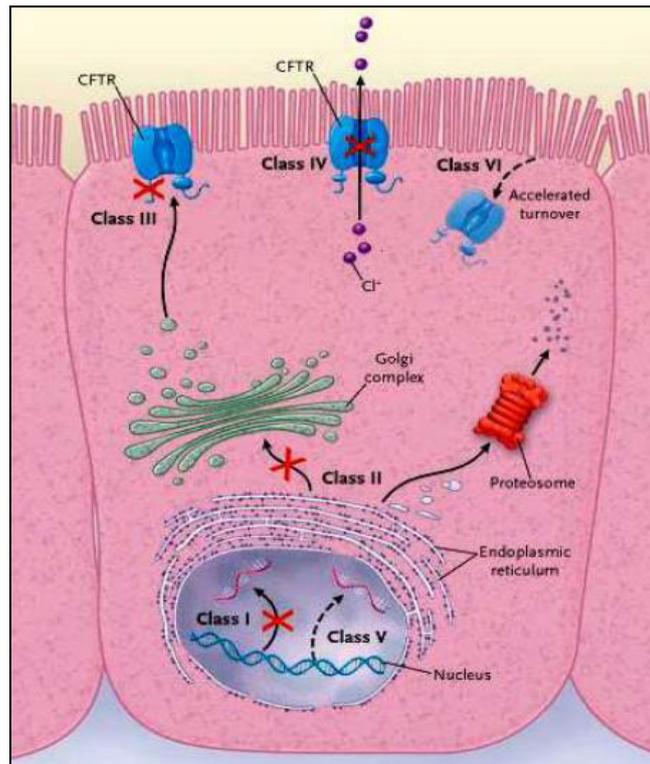


Figure 8 : Schéma des différentes classes de mutations du gène *CFTR* et leurs conséquences sur la fonction de la protéine dans la cellule (Angelot, 2005) [51].

II.5.5. Distribution géographique des mutations du gène *CFTR*

La distribution des mutations du gène *CFTR* varie d'une manière importante d'une population à l'autre. Seulement cinq mutations ont une fréquence qui dépasse le seuil de 1% : $\Delta F508$ (66,8%) est la plus fréquente à travers le monde. Elle est trouvée dans tous les pays étudiés. Dans la population maghrébine, la fréquence de la $\Delta F508$ ne dépasse pas 30% en Algérie [52], alors qu'elle est de 50.8% en Tunisie [53].

Les fréquences moyennes des mutations G542X ; N 1303K; G551D et W1282X dans le monde sont respectivement : 2.6% ; 1.6%, 1.5% et 1%, elles ne sont retrouvées que dans certaines populations. Par exemple la G542X est absente en Biélorussie, Estonie, Roumanie et Ukraine, cependant elle est très fréquente dans les pays du pourtour du bassin méditerranéen. De même, la mutation N1303K est fréquemment retrouvée avec des valeurs maximales dans les pays du Maghreb, alors qu'elle est absente en Finlande, suède et dans d'autres pays. A côté de ces cinq mutations CF, 21 mutations sont retrouvées avec des fréquences comprises entre 0,9 % et 0,1 % (Tableau 1) [30].

Tableau 1 : Mutations du gène CFTR les plus fréquentes et leur distribution géographique (Yahia, 2007) [30].

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

III. La protéine CFTR

III.1. CFTR : une protéine de la superfamille ABC

La protéine CFTR fait partie de la famille des protéines ABC ou ATP-Binding cassette proteins. Ces transporteurs ABC sont subdivisés en sept sous-familles (ABCA à ABCG). La protéine CFTR est le septième membre de la sous-famille C (nommée ABCC7). Elle est atypique car elle n'exerce pas un rôle de transporteur comme les autres protéines de la famille mais a un rôle de canal aux ions chlorures.

III.1.1. Propriétés des Transporteurs ABC

Les transporteurs ABC constituent une famille extrêmement vaste de protéines que l'on retrouve dans tout le règne vivant. L'analyse de séquence et les éléments communs semblent indiquer que les différents transporteurs ABC proviennent d'une protéine ancestrale commune. [54].

La plupart d'entre eux sont des transporteurs actifs : ils lient et transportent leur substrat à travers la membrane en utilisant l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP contre le gradient de concentration. Ces protéines sont impliquées dans le transport d'un grand nombre de substances biologiques (peptides, hormones, sucres, ions...) mais également de substances toxiques (métaux lourds, drogues...) vers le cytoplasme ou vers le milieu extracellulaire. Elles sont responsables de nombreux phénomènes de résistance (résistance aux antibiotiques, aux agents antifongiques, aux antiparasitaires, aux herbicides, ou aux anticancéreux).

Chez l'homme, on dénombre une cinquantaine de transporteurs ABC dont la plupart sont impliqués dans diverses maladies génétiques. Les gènes codant pour ces transporteurs sont largement dispersés dans le génome et montrent un large degré de similitude au niveau des acides aminés chez les eucaryotes [28].

III.1.2. Domaines et fonctionnement d'un Transporteur ABC

Un transporteur ABC fonctionnel est constitué de quatre domaines principaux deux domaines transmembranaires (DTM) et deux *domaines de liaison aux nucléotides* (NBD) [55].

Les DTM traversent plusieurs fois la membrane via des hélices α . Typiquement, il y a six hélices par domaine, soit un total de douze hélices par exportateur. Ils forment le passage à travers lequel les substrats franchissent la membrane et sont responsables de la spécificité de la protéine à son substrat.

Les deux NBD, structurellement conservés, de nature hydrophile, assurent la liaison et hydrolyse de l'ATP. Tous les NBD partagent trois motifs caractérisant la cassette de fixation de l'ATP : les motifs de Walker A et B qui permettent l'interaction avec le phosphate de l'ATP et Mg^{2+} , et un motif LSGGQ, qui représente la signature des transporteurs ABC (**Figure 9**) [56].

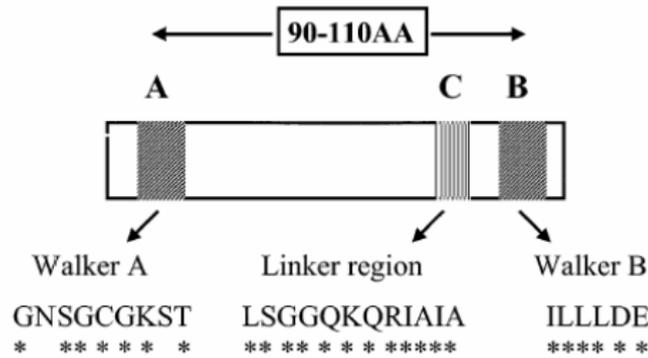


Figure 9 : Les séquences consensus des domaines de liaison des nucléotides (NBD)
(Gally, 2005) [56].

Le transport des substrats par les protéines ABC implique d'importants changements conformationnels et l'hydrolyse de l'ATP (**figure 10**). L'interaction du substrat avec un site de liaison spécifique au niveau des DTM induit un changement conformationnel de ces derniers, qui sera transmis aux NBD pour qu'ils lient l'ATP. C'est la liaison et non l'hydrolyse de l'ATP qui induit les importants changements conformationnels responsables de l'altération de l'affinité et de l'orientation du site de liaison du substrat de telle sorte que le substrat soit relargué de l'autre côté de la membrane. L'hydrolyse de l'ATP et la libération de l'ADP et du Pi permettent de restaurer le transporteur dans sa conformation initiale, fermeture du transporteur afin d'initier un nouveau cycle [28].

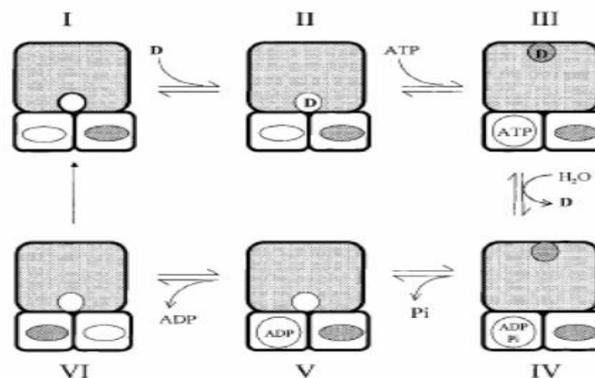


Figure 10 : Modèle du transport de drogues par la P-gp [28].

Les deux DTM sont représentés par le grand carré gris, les deux NBD par de petits carrés blancs. Le site catalytique de chaque NBD est représenté par une ellipse ; une ellipse blanche représente une conformation ouverte, une ellipse grisée une conformation fermée.

- I. L'interaction du substrat avec le site de liaison au niveau des TMD.
- II. Changement conformationnel des TMD transmis aux NBD pour qu'ils lient l'ATP.
- III. La liaison de l'ATP induit des changements conformationnels.
- IV. Altération de l'affinité et de l'orientation du site de liaison du substrat, et relargage du substrat de l'autre côté de la membrane.

V. L'hydrolyse de l'ATP et le relargage de l'ADP et du Pi.

VI. Le transporteur retrouve son état initial.

III.1.3. Caractéristiques de la protéine CFTR par rapport aux autres transporteurs ABC

Les protéines de la superfamille ABC transportent leurs substances à travers la membrane plasmique contre le gradient de concentration. Alors que La protéine CFTR qui est considérée comme unique dans cette superfamille, assure le passage passif de ses substrats selon le gradient de concentration. La liaison de l'ATP à CFTR permet de stabiliser l'état ouvert du canal au lieu d'assurer un transport actif [57].

La divergence de la protéine CFTR par rapport aux autres membres de cette superfamille se caractérise par l'insertion au milieu de la protéine de près de 210 acides aminés assurant une fonction régulatrice.

La phosphorylation des résidus sérine et thréonine au niveau de cette région résulte en l'activation du canal qui serait capable d'avoir un état d'ouverture suite à la liaison de l'ATP [58].

III.2. Propriétés, localisations, fonctions et synthèse de la protéine CFTR :

III.2.1. Propriétés de la protéine CFTR

La protéine CFTR est traduite à partir d'un ARNm de 6,5Kb. Elle exerce une fonction de canal chlorure.

La protéine CFTR est composée de 1480 acides aminés répartis en deux séquences homologues, comportant chacune six domaines transmembranaires et deux domaines de fixation aux nucléotides (NBD-1 et NBD-2). Ces deux séquences sont reliées entre elles par un domaine régulateur R. Les douze domaines transmembranaires (MSD) délimitent un canal ionique dont l'activité est déterminée par la phosphorylation du domaine R. Les régions N et C terminales de la protéine sont cytoplasmiques. Le domaine R est très spécifique du canal CFTR puisque les autres protéines de la famille ABC ne possèdent pas de domaine régulateur.

Cette protéine est identifiée au niveau de structures membranaires intracellulaires, RE et l'appareil de golgi. En fait, dans les cellules qui expriment le gène, la protéine CFTR native est non glycosylée. La glycosylation survient secondairement au niveau de RE, puis l'appareil de golgi ou elle acquiert sa forme mature avant de rejoindre la membrane apicale [59].

III.2.2. Tissus exprimant la protéine CFTR

La protéine CFTR est exprimée au niveau du pôle apicale des cellules épithéliales de l'arbre trachéo-bronchique, des glandes sudoripares, du pancréas ou encore du tractus génital. Le plus fort taux est observé au niveau du pancréas et de l'intestin.

Le niveau d'expression de la protéine CFTR est variable selon le type de tissus. *CFTR* est transcrit de manière constitutive dans les cellules d'origine épithéliale mais à un faible niveau. Cependant, la similitude du promoteur de la protéine CFTR avec celui d'un gène de ménage a suggéré son expression dans des cellules non épithéliales comme les fibroblastes pulmonaires, les macrophages alvéolaires, les neutrophiles, les monocytes.

Le niveau d'expression protéique de CFTR est variable selon les tissus. Ainsi, CFTR est exprimée fortement dans l'épithélium des conduits sudoripares, des conduits pancréatiques et des cryptes intestinales. Au niveau bronchique, l'expression protéique de CFTR est relativement faible. Elle est cependant plus importante dans les glandes sous-muqueuses que dans l'épithélium de surface. CFTR est exprimée au pôle apical des cellules ciliées ainsi que dans les glandes sous muqueuses des polypes nasaux. Dans les épithéliums issus de cellules nasales, la protéine CFTR est présente à la fois dans les cellules cylindriques ciliées et non ciliées. De plus, CFTR est essentiellement exprimé dans les cellules non ciliées (type Clara) [47].

III.2.3. Fonctions de la protéine CFTR

L'activité de la protéine CFTR est déterminée par la phosphorylation du domaine R par des protéines kinases A et G activées respectivement par l'AMP cyclique et le GMP cyclique [59].

Il s'agit d'un canal ionique de type chlorure de faible conductance. Il est impliqué dans l'hydratation des fluides sécrétés par les glandes sous-muqueuses au niveau des membranes basales des cellules épithéliales intestinales, pulmonaires, pancréatiques, des glandes sudoripares, salivaires et au niveau des canaux déférents. CFTR joue un rôle crucial dans l'équilibre hydro-électrolytique et rhéologique des sécrétions exocrines. Les mécanismes de régulations font intervenir la phosphorylation du domaine R. Lorsque la concentration intracellulaire de l'AMP cyclique augmente, le canal s'ouvre et laisse passer les ions chlorures de façon bidirectionnelle en fonction des gradients de concentration et des gradients électriques.

Au niveau respiratoire, la protéine CFTR régule aussi le fonctionnement d'autres canaux ioniques largement impliqués dans l'hydratation des sécrétions. Elle régule négativement l'activité du canal ENaC (Epithelial Na⁺ Chanel), ce qui a comme conséquence une absorption accrue de Na⁺, qui est également responsable de la déshydratation et de la diminution de la clairance mucociliaire dans les voies respiratoires [60].

La protéine CFTR stimule d'autres canaux chlorures en particulier le canal calcium dépendant et le canal chlorure rectifiant sortant ORCC (Outward Rectifying Chloride Channel). L'ORCC est bien impliqué dans la conductance membranaire, mais ne fonctionne qu'en présence du canal Cl⁻ CFTR. La régulation du canal ORCC par la protéine CFTR via les kinases,

se fait par un mécanisme autocrine/paracrine impliquant le transport d'ATP contrôlé par CFTR dans le milieu extracellulaire [61].

Cette protéine possède diverses autres fonctions comme la régulation du canal potassique ROMK (Renal Outer Medullary K⁺ channels). Il a été démontré que la présence du canal CFTR influence l'activation par l'AMPc des canaux potassium épithéliaux. Un canal potassium a été identifié sur la membrane apicale des cellules épithéliales des voies respiratoires : ROMK1. La protéine CFTR peut être couplée avec ROMK dans la membrane cellulaire, procurant à ces canaux une sensibilité à différents stimuli. CFTR est ainsi capable de transférer les effets agonistes et antagonistes sur d'autres protéines avec lesquelles elle est liée, modulant de ce fait leur activité.

De plus, la protéine CFTR est impliquée également dans la régulation de la sécrétion des ions bicarbonates (HCO₃⁻), qui permettent de tamponner le pH extracellulaire et moduler le flux du potassium par les canaux potassiques sensibles à l'ATP. Elle a également une fonction de transport du tripeptide glutathion : g-glutamyl-cystéinyl-glycine (GSH), qui est un antioxydant très abondant dans les poumons, la concentration en GSH dans les épithéliums présentant un phénotype mucoviscidose fortement réduit [62].

D'autres fonctions de la protéine CFTR ont été décrites, le transport des molécules à travers les membranes cellulaires (ATP, macromolécule dont les phospholipides ...), la régulations intracellulaire du trafic vésiculaire, le recyclage des membranes cytoplasmiques par inhibition de l'endocytose et stimulation de l'exocytose, la synthèse et la sécrétion des cytokines de l'inflammation, la régulation du PH intracellulaire, la régulation du métabolisme des jonctions cellulaires, la modulation du processus de l'apoptose [30].

III.2.4. Biosynthèse et maturation de la protéine CFTR

Les protéines membranaires sont toutes synthétisées au sein du RE, compartiment primordial au repliement et à la maturation de ces protéines. Le bon repliement des protéines au niveau du RE est assuré par la combinaison de plusieurs protéines dites « chaperonnes ». En effet, elles assurent le rôle de senseur du repliement dans ce compartiment. La sortie du RE est alors régulée par un système de contrôle de qualité dénommé ERQC (Endoplasmic Reticulum Quality Control) qui empêche le trafic des protéines mal repliées et les dirige vers la dégradation.

La biosynthèse de la protéine CFTR s'effectue en 3 étapes, Tout d'abord, la transcription du gène CFTR en ARNm, puis l'épissage de cet ARNm, et pour finir, sa traduction en protéine. Après cette traduction, la protéine CFTR est N-glycosylée au sein du RE. Puis des protéines chaperonnes, permettent son repliement correct et son passage vers l'appareil de Golgi.

Le repliement de la protéine CFTR s'effectue de manière co-traductionnelle puisque le domaine N-terminal acquiert une activité fonctionnelle alors que le domaine C terminal est encore en cours de synthèse au niveau du ribosome. Lorsque le repliement de CFTR est achevé, elle acquiert la conformation de protéine canal par des modifications post-traductionnelles, ce qui lui permet de quitter le RE en cas de bon repliement, ou d'être dirigée vers la voie de dégradation protéolytique en cas de mauvais repliement. En effet, les nombreuses protéines chaperonnes présentes dans le RE et participant à l'ERQC, comme Bip, Grp94, ou encore la calnexine (CNX) assurent un repliement correct de chaque protéine.

Dès que la protéine CFTR est synthétisée, elle acquiert sa conformation de protéine canal par des modifications post-traductionnelles qui vont lui permettre de quitter le RE. Une fois dans le RE, la protéine CFTR va subir plusieurs étapes de glycosylation de manière co-traductionnelle. La séquence protéique de CFTR contient 2 sites potentiels de N glycosylation : deux chaînes d'oligosaccharides en positions 894 et 900 au niveau de la 4^{ème} boucle extracellulaire. Ceci rend possible la visualisation des différents niveaux de maturation de la protéine CFTR.

CFTR est en premier lieu synthétisée sous la forme d'un précurseur non glycosylé d'environ 130 kDa appelé forme A. Cette forme A est rapidement glycosylée au niveau du RE pour donner naissance à la forme immature de 140 kDa nommée forme B, ou forme core-glycosylée. Pour cela, l'oligosaccharide précurseur, une unité de 14 résidus glucidiques comprenant 2 N acétylglucosamines (GlcNAc), 9 mannoses et 3 glucoses, est greffé à la chaîne polypeptidique naissante par l'oligosaccharyltransférase. Les deux glucoses terminaux sont alors immédiatement enlevés par l' α 1,3-glucosidase II et l' α 1,2-glucosidase I. Après un laps de temps durant lequel la protéine atteint un certain degré de repliement, le dernier glucose est éliminé par l' α 1,3-glucosidase II. Cette forme de la protéine, riche en mannoses, est sensible à l'Endoglycosidase H (Endo H). Les mannoses sont ensuite remplacés par des glucides complexes au niveau de l'appareil de Golgi. Cette dernière étape de glycosylation donne la forme C, forme mature, ou encore forme complexe-glycosylée de CFTR de poids moléculaire 170 kDa, capable de remonter à la membrane plasmique.

Le processus de la maturation de la protéine CFTR est très inefficace. En effet, seuls environ 30% de la forme B sont capables de quitter le RE pour l'appareil de Golgi et ainsi atteindre la forme C. Les 70% de la forme B restants sont rapidement dégradés. Le faible taux de maturation de CFTR semble être dû à un processus complexe de repliement impliquant de nombreuses interactions intra- et intermoléculaires [62].

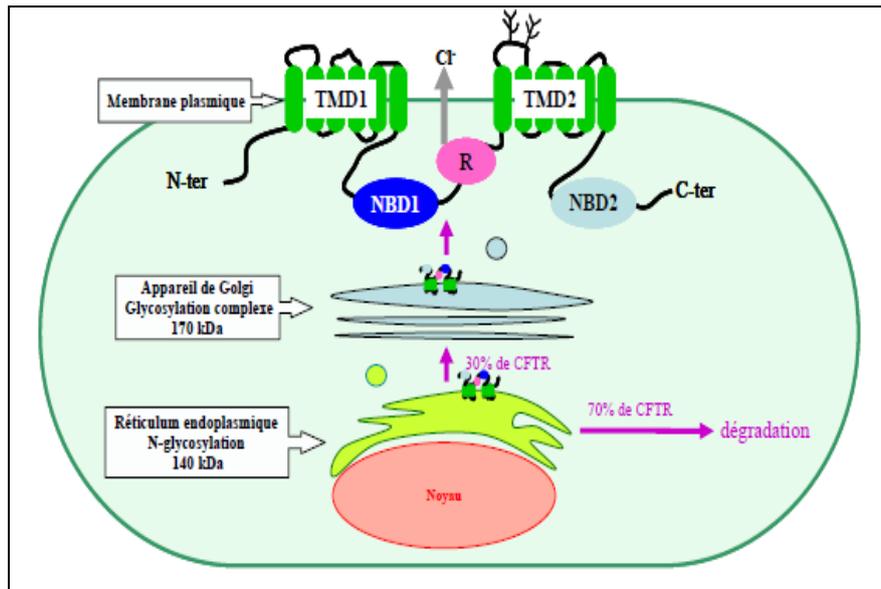


Figure 11 : Illustration du processus de biosynthèse et de maturation de la protéine CFTR (Micoud, 2008) [62].

IV- Les corrélations génotype/phénotype et gènes modificateurs dans la mucoviscidose

La relation entre le génotype et le phénotype chez un patient mucoviscidosique ne peut pas être systématique. Diverses causes compliquent l'établissement des corrélations génotype-phénotype :

IV.1. Variabilité des tableaux cliniques

Tous les patients mucoviscidosiques typiques ont une atteinte pulmonaire, 98% des hommes présentent une azoospermie obstructive et 85% une insuffisance pancréatique. Cependant, il est noté une grande variabilité dans les degrés d'atteinte et dans l'évolutivité de la maladie à l'échelle individuelle. Les iléus méconiaux, les cirrhoses biliaires, les pancréatites et les diabètes sont des manifestations qui apparaissent dans 5 à 20% des cas.

Cette grande variabilité des tableaux cliniques fait que la mucoviscidose affecte des différents organes avec des intensités variables. Cela exige en premier lieu une approche plus ou moins individuelle des patients afin de déterminer les phénotypes exacts correspondants [63].

IV.2. Rareté de la plupart des mutations

Les mutations identifiées sont regroupées dans trois grandes catégories en fonction de leurs fréquences mondiales. La première catégorie regroupe la mutation c.1521_1523delCTT (F508del) qui représente 66% de la fréquence des mutations du gène *CFTR*. La deuxième catégorie regroupe une série de mutations rares dont les fréquences varient entre 1 et 3%, dans cette série de mutations figurent entre autres c.1624G>T, c.3846G>A (p.Trp1282X) et c.3909C>G. La troisième série regroupe le plus grand nombre des mutations identifiées, correspond aux mutations très rares dont les fréquences atteignent un maximum de 1%.

Cette grande hétérogénéité de mutations ainsi que la rareté du plus grand nombre des mutations impliquent une approche individuelle pour déterminer exactement les mutations de chaque patient et cela nécessite un séquençage complet des 27 exons du gène pour identifier les mutations non-incluses dans les kits de dépistage [64].

IV. 3. Variabilité de la gravité des mutations

Les mutations du gène *CFTR* peuvent être classées en mutations dites sévères ou modérées. De façon générale, les mutations non-sens qui affectent les séquences consensus d'épissage et celles induisant un décalage du cadre de lecture sont sévères. Par contre, les mutations faux-sens peuvent être modérées ou sévères (Figure 12) [65].

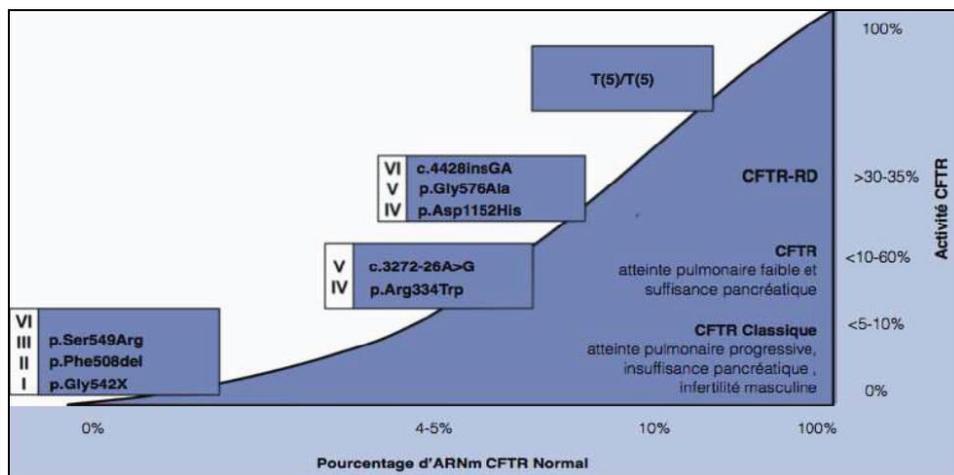


Figure 12 : Variation du phénotype, dépendant de la mutation *CFTR*, en fonction du pourcentage d'ARNm normal et de l'activité de la protéine *CFTR* (Farhat, 2014) [28]

IV.4. Diversité des associations des mutations en trans

Un des facteurs déterminant de la sévérité d'un phénotype est l'association des mutations *CFTR* en trans. Non seulement les possibilités d'association en trans sont très variables mais aussi une même association peut avoir des effets différents chez différents patients. Dans le cas de l'insuffisance pancréatique 99% des homozygotes c.1521_1523delCTT ont une insuffisance pancréatique, alors que 28% des hétérozygotes composites c.1521_1532delCTT/non-c1521delCTT et 64% des patients non-c.1521_1523delCTT/non-.1521_1523 sont suffisants pancréatiques [28].

Les mutations dites sévères sont associées, sur le plan phénotypique, à une insuffisance pancréatique et à une atteinte pulmonaire qui débute dans l'enfance. Ce sont les formes de présentation classiques de la maladie et les patients homozygotes F508del en sont les exemples les plus fréquemment rencontrés [66]

En revanche, l'association de deux mutations sévères, une mutation modérée et une autre mutation sévère, ou l'association de deux mutations modérées conduit en règle générale à une fonction pancréatique exocrine conservée que l'on nomme suffisance pancréatique et à une colonisation pulmonaire plus tardive par le *Pseudomonas aeruginosa*. Cette forme d'expression clinique plus modérée se traduit pour ces patients par une espérance de vie d'environ 50 ans alors qu'elle se situe aujourd'hui autour de 30 ans pour les formes sévères qui sont représentées par des patients porteurs à l'état homozygote de la mutation F508del. Ainsi, un patient porteur de deux mutations sévères peut parfaitement présenter un phénotype relativement modéré pendant de nombreuses années et à l'inverse, la présence d'une mutation modérée chez un patient peut parfois s'accompagner d'une évolution rapide vers l'insuffisance respiratoire terminale [67].

IV.5. Diversité des associations des mutations en cis

Les associations de mutations sur un même allèle sont un facteur qui complique la corrélation entre un phénotype et un génotype. En effet, une mutation peut avoir un effet modifié si elle est associée à une autre mutation ou polymorphisme intronique ou exonique en cis [68]. Ainsi, un séquençage complet des 27 exons et les régions introniques frontières est nécessaire chez chaque patient afin de déterminer son génotype et de découvrir de nouveaux allèles complexes.

IV.6. Présence des séquences polymorphes induisant un épissage alternatif variable

Les séquences les plus influentes dans ce contexte sont la séquence polymorphe [poly-T (Tn), et poly-TG (TG)_m], qui se situent dans la région du site accepteur d'épissage de l'intron 8 (**figure 12**).

La séquence polymorphe [poly-T (Tn) existe en trois versions avec 5, 7 ou 9 thymidines (T5, T7 et T9, respectivement). Les allèles T7 et T9 produisent un épissage normal, tandis que le variant T5 induit la synthèse de deux messagers, un normal avec l'exon 9 intact et l'autre avec une délétion en phase de l'exon 9 (**Figure 13**). Le produit ainsi obtenu est dépourvu de conductance chlorure activée par l'AMPc.

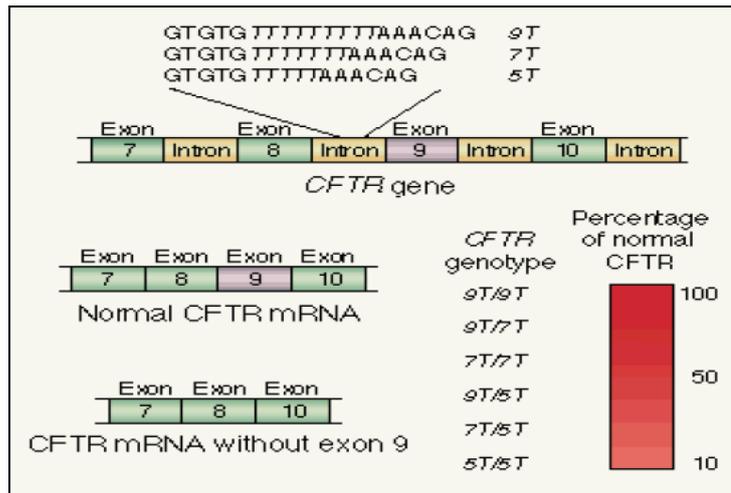


Figure 13 : Effets du site polymorphe (Tn) sur l'épissage du transcrit de *CFTR* [28].

Le nombre de TG influe aussi sur l'épissage de l'exon 9, ainsi que la présence du polymorphisme (T)5 (TG)13 sur le même allèle induit une augmentation de la proportion de messagers *CFTR* anormaux (sans exon 9) (figure 14).

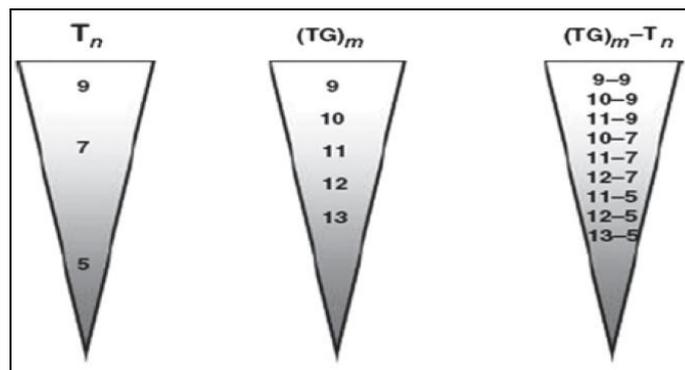


Figure 14 : Effet d'un allèle spécifique sur l'activité *CFTR*. L'effet de chaque allèle sur l'activité du canal *CFTR* est indiqué. La diminution des quantités de protéines *CFTR* Fonctionnelles est présentée de haut en bas. La zone grisée indique la forme sévère de la maladie (Micoud, 2008) [62].

Des études indépendantes ont montré que la fréquence de l'allèle T5 des patients ABCD (absence bilatérale congénitale des canaux déférents) est significativement quatre fois plus élevée que celle de la population générale (4-5%). Cette mutation à pénétrance variable induit un épissage qui diffère d'un individu à un autre et chez un même individu d'un organe à un autre.

Environ 10% des individus à travers le monde portent le variant T5, qui est associé à une ABCD, une forme de stérilité masculine. De plus, de rares homozygotes T5 ont été décrits comme patients atteints de mucoviscidose, ce qui suggère que l'allèle T5 est un allèle partiellement pathogène pour les mucoviscidosiques [69].

IV.7. Influence des gènes modificateurs

Plusieurs arguments ont mis en évidence la présence de mutations sur d'autres gènes que le gène *CFTR* dans la mucoviscidose (**figure 15**).

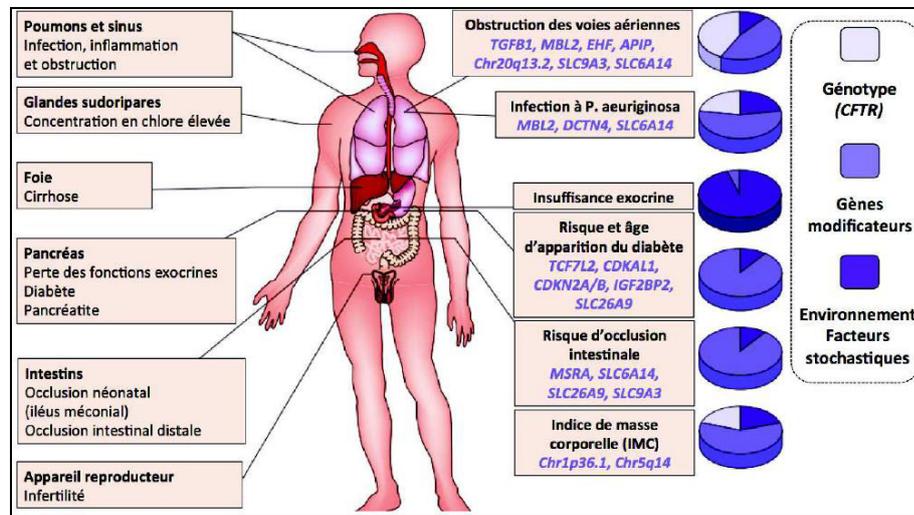


Figure 15 : Contribution des gènes modificateurs dans la variabilité des signes cliniques de la mucoviscidose [46].

La recherche de gènes modificateurs a été menée selon deux approches, celle dite « à priori » et celle des gènes candidats. Ces gènes modificateurs peuvent être impliqués dans la réponse inflammatoire (*TGFB1, IL-8, TNF, EDNRA*), la réponse infectieuse (*TLR4/TLR5/MBL2*), la lésion et la réparation cellulaire (*GSTs, NOS1/NOS3*), la réponse pharmacogénétique (*GR, 2AR*), le transport ionique (*SLC9A3, ABCC1*) ou encore le cytosquelette (*KRT8*). De plus, des études pangénomiques ont permis de mettre en évidence l'implication du gène *IFRD1*, de la région chr11p13 comportant les gènes *EHF* et *APIP* et de la région chromosomique 20 q13.2 dans l'atteinte pulmonaire.

Bien que la mucoviscidose soit une maladie monogénique, l'utilisation de technologies de séquençage de nouvelles générations devraient fournir des informations précieuses sur l'implication de ces gènes dans la progression de la maladie. Leur identification permettrait de mieux cibler les patients à risque de développer une atteinte plus importante de l'un ou l'autre des organes cibles, et ainsi de débiter une thérapeutique de prévention plus rationnelle. Il faut également tenir compte, au-delà des gènes de prédisposition, de l'impact de l'environnement pour expliquer l'hétérogénéité clinique que peuvent présenter les patients porteurs du même génotype [47].

V. Le diagnostic et le dépistage de la mucoviscidose

V.1. Diagnostic clinique

Bien qu'il existe un dépistage néonatal en France depuis 2002, il est possible de porter le diagnostic de mucoviscidose à tout âge, notamment si l'enfant est né avant 2002 ou à l'étranger.

Le diagnostic clinique est difficile, en raison de la banalité de certains symptômes respiratoires récidivants et des troubles nutritionnels difficiles à quantifier. Cependant le diagnostic de mucoviscidose doit être évoqué devant un iléus méconial chez un nouveau-né, une saveur anormalement salée de la peau, une stéatorrhée, un retard staturo-pondéral, des infections chroniques avec hypersécrétion bronchique, une toux chronique, une atteinte hépatique avec ictère ou un prolapsus rectal [70].

V.2. Diagnostic paraclinique

V.2.1. Test de la sueur

Le test de la sueur a été décrit pour la première fois en 1959 par Gibson et Cooke. Il peut être réalisé dès l'âge de 15 jours pour un nourrisson à partir de 3 kg, et reste positif toute la vie. Il n'y a pas de rapport direct entre les valeurs du test et la gravité de la maladie.

Le test de la sueur est l'examen de référence, il est indispensable pour confirmer le diagnostic de la mucoviscidose. Physiologiquement, la concentration de Cl⁻ dans la sueur est élevée chez les patients atteints. Cette élévation est due à l'absence ou l'altération de la fonction de la protéine CFTR entraînant une diminution de la réabsorption de Cl⁻ par les canaux des cellules épithéliales des glandes sudoripares [46].

Le test consiste à mesurer la concentration en chlore d'un échantillon de sueur d'au moins 100 mg. L'échantillon de sueur est recueilli par iontophorèse à la pilocarpine. Cette méthode utilise un ampèremètre à ionisation muni de deux électrodes qui va permettre la pénétration transcutanée de la pilocarpine, qui va stimuler les glandes sudoripares. Après stimulation de la sudation par iontophorèse à la pilocarpine, molécule aux propriétés cholinergiques, la sueur est recueillie sur un papier-buvard. A partir de l'échantillon de sueur obtenu. Lorsque la concentration du Cl⁻ dans la sueur est supérieure à 60 mmol/l, le test est positif. Il doit être positif à deux reprises pour affirmer le diagnostic de mucoviscidose. Une concentration inférieure à 40 mmol/l est normale. Enfin, pour une concentration du Cl⁻ intermédiaire comprise entre 40 mmol/l et 60 mmol/l, le résultat est douteux. Un nouveau test sera réalisé [32].

Le test de la sueur est considéré très fiable, il est positif dans plus de 98% des cas de mucoviscidose, cependant, 2% des patients présentent un test de la sueur normal alors qu'ils sont atteints de mucoviscidose atypique [26].

Des faux positifs existent, de cause technique (collection de sueur insuffisante, évaporation, matériel souillé...) ou pathologique (déshydratation, eczéma, malnutrition, pseudo-hypoaldostéronisme...) dépendent du manipulateur et de l'évaluation clinique [46].

V.2.2. Différence de potentiel trans-épithéliale nasale

Dans le cas de diagnostic douteux, test de la sueur intermédiaire et/ou absence d'identification de mutation *CFTR*, le diagnostic peut être complété par un test fonctionnel. Ce test consiste à mesurer la DDP transépithéliale par un voltmètre relié à deux électrodes en contact l'une avec la surface de l'épithélium nasal. La technique de mesure de la DDP a été développée par Knowles et ses collaborateurs. Elle permet en particulier d'identifier des formes atypiques de mucoviscidose et d'évaluer la fonction de la protéine CFTR en analysant le transport ionique [71].

Le transport des ions à travers l'épithélium respiratoire génère une différence de potentiel transépithéliale qui peut être mesurée in vivo. Le dysfonctionnement de la protéine CFTR à la surface apicale des cellules de la muqueuse nasale augmente la réabsorption de Na^+ et diminue celle du Cl^- , ce qui se traduit par une DDP nasale anormale. La valeur basale de la DDP nasale est plus électronégative chez les malades et sa variation lors de l'administration au niveau de la muqueuse nasale d'amiloride, un inhibiteur des canaux sodiques, est plus élevée [72]. A titre d'exemple, il a été montré que les patients avec une valeur de base de DDP normale ont une meilleure fonction respiratoire comparée aux patients avec une valeur élevée (**figure 16**) [73].

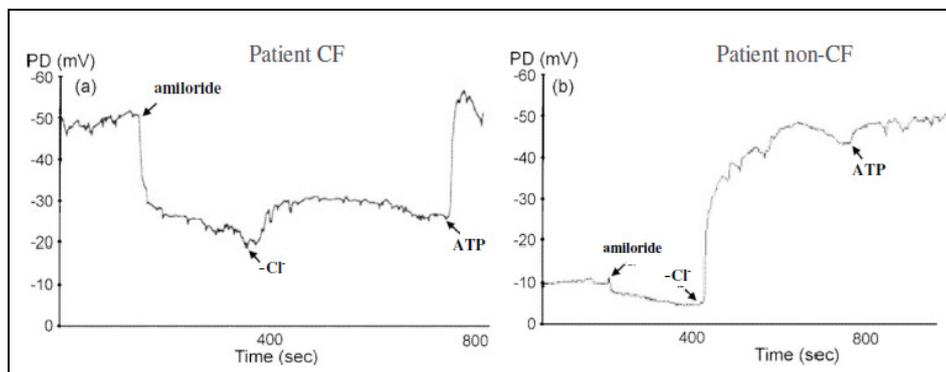


Figure 16 : Mesure de la DDP chez un patient CF et non-CF lors de l'administration sur la muqueuse nasale d'amiloride, d'une solution sans chlorure et d'ATP (Bertrand, 2006) [26].

V.2.3. Dosage de la trypsine immuno-réactive (dépistage néonatal) :

Le dépistage néonatal est le test le plus fréquemment rencontré, car il concerne tous les nouveaux nés depuis sa systématisation pour la première fois en France depuis 2002. Ce dépistage permet le diagnostic dans près de 95% des cas [72].

Ce test repose sur un dosage de la trypsine immuno-réactive suivi d'un test génétique qui détecte les mutations du gène *CFTR* les plus connues. Si ces deux points sont présents chez le nouveau-né, un test de la sueur est réalisé.

Le dépistage de la mucoviscidose chez un nouveau-né se fait généralement sur une goutte de sang séché prélevée à trois jours de vie. Les enfants atteints de mucoviscidose présentent, dans 90 % des cas, un taux élevé de trypsine immuno-réactive, une proenzyme secrétée par le pancréas et circulant dans le sang. Il est réalisé à partir d'un échantillon de sang prélevé sur papier buvard ou carton Guthrie pour l'analyse [70].

Le taux de la TIR est augmenté de façon non spécifique dans la mucoviscidose. Cette augmentation résulte d'une obstruction de canaux pancréatiques par des amas de protéines *in utero* qui génère un relargage d'enzymes dans le sang [74].

Le seuil retenu pour le dosage de la TIR est 60 µg/l. Dans les cas où cette valeur dépasse le seuil, cela conduit à réaliser un génotypage afin de rechercher les mutations les plus fréquentes du gène *CFTR*. Lorsqu'une ou deux mutations du gène *CFTR* sont mises en évidence, les enfants subissent un test de la sueur, dans le mois suivant leur naissance [28].

V.2.4. Analyse moléculaire du gène CFTR

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

La première étape consiste à réaliser une recherche des 30 mutations les plus fréquentes du gène. Cette étude est réalisée en quelques heures grâce à plusieurs kits commerciaux [75], qui permettent de dépister en quelques heures une trentaine de mutations du gène. Ces trousseaux commerciaux ont une sensibilité de 80 à 85% sur l'analyse des populations Caucasiennes. La première recherche permet d'établir un génotype dans 60% des cas. Les deux mutations sont alors identifiées. Elles sont soit identiques et le patient est homozygote pour la mutation considérée, soit différentes et le patient est dit hétérozygote composite.

La deuxième étape est réalisée en cas de génotype non établi, l'étude du gène est poursuivie par un balayage complet des séquences codantes du gène : analyse de toutes les mutations décrites dans les 27 exons. Cette analyse est réalisée par HRM (High-Resolution Melting Analysis) et/ou séquençage avec une sensibilité de détection des anomalies du gène *CFTR* supérieure à 95% [46].

Enfin, Si le génotype reste toujours incomplet, une troisième étude sur les grands réarrangements est réalisée. Ces grands remaniements (délétion, duplication), sont retrouvés dans

plus de 2% des anomalies du gène *CFTR* et révèlent plus de 20% des allèles qui restent non identifiés [71].

La recherche des remaniements se fait par PCR multiplexe avec des amorces fluorescentes ou par MLPA (Multiplex Ligation-dependant Probe Amplification) [32].

Au terme de toutes ces recherches, il reste des patients selon l'origine géographique ou ethnique, pour lesquels au moins une mutation n'a pas été caractérisée. Il est probable que ces patients soient porteurs de mutations introniques ou de mutations situées dans des régions régulatrices en 5' ou 3' du gène [71].

VI. Les approches thérapeutiques de la mucoviscidose

VI.1. Thérapie génique

La découverte du gène en cause dans la mucoviscidose en 1989 a ouvert la voie à une nouvelle approche thérapeutique qui a rapidement semblé bien adaptée : la thérapie génique. Le principe de cette approche consiste à remplacer le gène déficient en introduisant une ou plusieurs copies du gène *CFTR* sauvage dans le noyau des cellules cibles.

Les copies du gène peuvent être intégrées dans des vecteurs viraux (Adénovirus, lentivirus et virus adéno-associés (AAV), qui sont les principaux virus étudiés pour le transfert des gènes) ou des vecteurs synthétiques (liposomes cationiques, polymères).

Les premières expérimentations ont lieu *in vitro* et démontrent la faisabilité du transfert viral de gène *CFTR* dans une lignée cellulaire pancréatique mucoviscidosique, ainsi que la restauration du courant chlorure activé par l'AMPc [76].

Des essais sur l'animal ont ciblé principalement les voies respiratoires, dont les résultats ont été obtenus *in vivo* dans l'appareil respiratoire de rat, puis dans l'épithélium nasal humain. Ces études rapportent des résultats d'abord prometteurs, d'autant plus que les vecteurs viraux parviennent à transfecter les différents types cellulaires de l'arbre bronchique. Par ailleurs, les résultats obtenus chez l'homme ne sont pas encourageant. La durée d'expression du transgène est limitée à quelques semaines, le nombre des cellules transfectées est insuffisant et apparition d'une inflammation qui semble modérée [77]. De plus, le renouvellement permanent de l'épithélium respiratoire exige des administrations répétées des vecteurs viraux, qui à terme, peuvent s'avérer complètement inefficaces suite à la réponse immunitaire engendrée [78].

Des solutions alternatives aux virus ont été envisagées afin d'éviter le plus possible des problèmes de réaction immune et autres inconvénients liés aux virus, tels que la taille limitée du transgène qui peut être inséré dans la capsid virale. La plupart des vecteurs non viraux de

transfert de gène sont de nature lipidique et donc hydrophobes, mais certains possèdent une partie hydrophile électriquement chargée ou non.

Les premiers tests de transfert de gène par liposome cationique sont effectués dans les voies respiratoires. Ces composés s'avèrent être parfaitement tolérés *in vivo*, n'induisent pas ou peu de réaction inflammatoire et permettent d'incorporer d'importantes quantités d'ADN.

La durée d'expression du transgène est transitoire mais, contrairement aux vecteurs viraux, les administrations peuvent être répétées sans perte d'efficacité [79]. Cependant, l'efficacité du transfert non viral de gène est relativement faible à cause du pourcentage peu important de cellules transfectées. Une des raisons est que le mucus épais et visqueux constitue un obstacle.

Des agents mucolytiques ont été testés mais ils n'apportent qu'une faible augmentation de l'efficacité du transfert de gène. D'autres améliorations du transfert viral et non viral de gène doivent être apportées pour avoir un impact clinique significatif dans le traitement de la mucoviscidose.

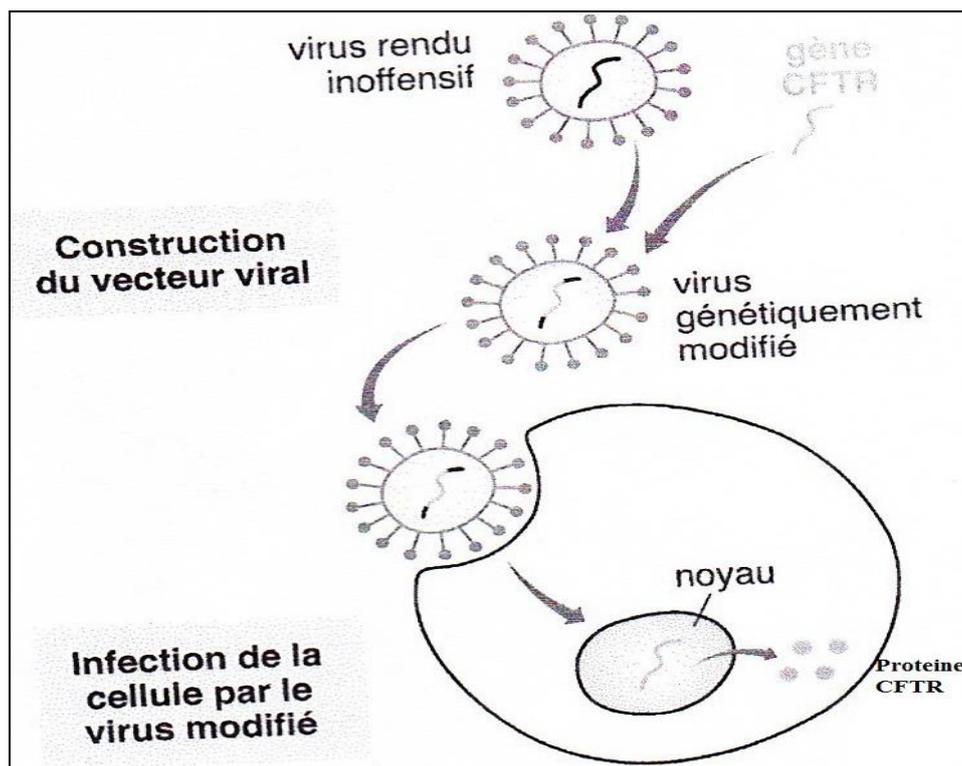


Figure 17 : Schéma illustre simplement le principe de la thérapie génique qui intègre à l'organisme le gène non-muté de la protéine [80].

VI.2. Thérapie cellulaire

Dans le cadre de la mucoviscidose, la thérapie cellulaire consiste à implanter des cellules épithéliales saines dans le système respiratoire des patients, ou de corriger la cellule pathologique par transfert de gène *ex vivo* avant réimplantation *in vivo*.

Le corps humain est formé principalement de cellules différenciées et spécialisées, équipées pour remplir les fonctions spécifiques de l'organe ou du tissu qu'elles constituent. Les cellules souches (CS) sont les précurseurs indifférenciés des cellules somatiques. En d'autres termes, ces cellules sont très plastiques, elles ont le potentiel de se spécialiser en différents types cellulaires. Elles sont capables de se différencier sous l'effet des interactions entre le programme génétique qu'elles contiennent et des facteurs environnementaux spécifiques. Plusieurs types de CS sont décrits en fonction de leur origine : CS embryonnaires, CS de moelle osseuse et CS progénitrices issus d'un tissu ou d'un organe particulier.

VI.2.1. Cellules souches embryonnaires

Les cellules souches embryonnaires (CSE) sont issues de l'embryon à un stade très précoce de son développement, lors du stade blastocyste (5 à 7 jours après la fécondation chez l'humain). Ces cellules sont douées de deux capacités importantes : celle de se multiplier à l'infini, par simple division (autorenouveaulement), et celle de donner naissance à tous les types de cellules de l'organisme (pluripotente) (**Figure 18**). Ces propriétés ouvrent de nombreuses perspectives, non seulement pour la médecine régénérative, mais également pour l'étude des maladies génétiques et la mise au point de traitements.

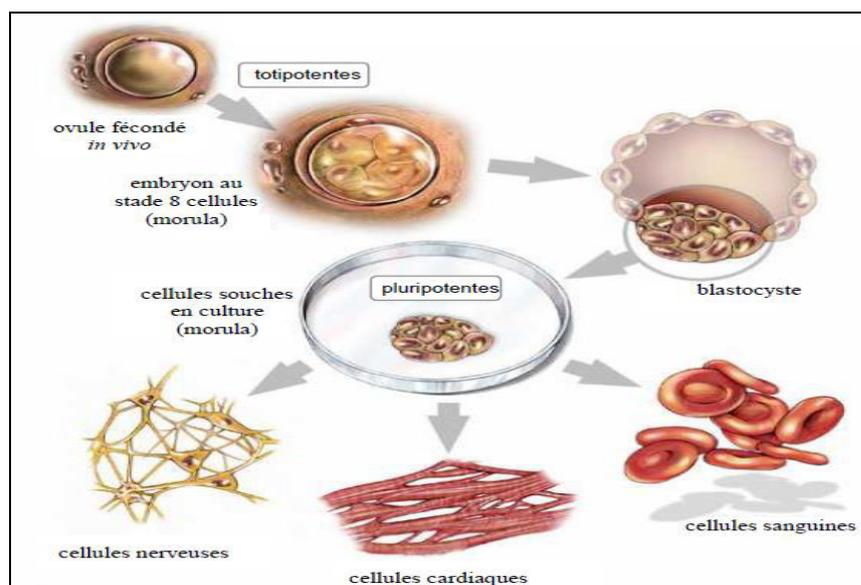


Figure 18 : Provenance et devenir potentiel des cellules souches embryonnaires [81].

Malgré que de nombreux enjeux scientifiques tendent à promouvoir la recherche sur les CSE, cette dernière doit résoudre certains problèmes. En effet, l'utilisation d'embryons pose des

problèmes éthiques évidents, puisque toutes ces expériences aboutissent à la destruction d'embryons humains à des fins expérimentales. De plus la transplantation de CS hétérologues requiert la suppression du système immunitaire du receveur. Ainsi les techniques d'administration de ces cellules et leur attachement au tissu cible doivent être optimisés.

VI.2.2. Cellules souches de la moelle osseuse

La moelle osseuse est le siège de l'hématopoïèse où les lignées cellulaires sanguines sont constamment renouvelées. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) représentent l'exemple probablement le mieux connu d'une CS multipotente physiologique identifiée avec certitude in vivo et in vitro chez l'animal et chez l'homme. La multipotentialité de ces cellules définit une de leur caractéristiques biologiques, la seconde étant représentée par leur capacité à assurer l'homéostasie des cellules sanguines et ce pendant toute la durée de vie de l'individu. En plus de ce constant renouvellement des lignées sanguines, les CSH sont capables de se différencier vers diverses lignées non sanguines dont des cellules épithéliales des voies respiratoires [82].

Afin d'explorer la possibilité d'utiliser des CS de la moelle osseuse, les chercheurs ont pris une souris femelle KO pour le gène *CFTR* (dépourvue du gène *CFTR*). Ensuite ils ont introduit, dans son sang des CS de la moelle osseuse d'une souris mâle normale, porteuse de deux allèles *CFTR* normaux.

Afin de distinguer les cellules qui venaient du mâle et les cellules de la souris femelle, ils ont marqué le chromosome Y de ces cellules par un fluorochrome rouge. Ainsi ils ont utilisé un fluorochrome vert pour marquer le cytoplasme des cellules qui portent le gène *CFTR* normal (**figure 19**). Cette transplantation a permis de détecter une réponse fonctionnelle modeste, et un taux d'ARNm et de protéines *CFTR* bas dans les poumons et le tractus digestif de ces animaux. Ceci s'explique par le faible taux d'implantation des CS parmi les cellules natives des tissus étudiés, qui est inférieur à 1 %. Mais ces résultats sont contredits par certains auteurs montrant que les CSH ne parviennent pas à se différencier en cellules épithéliales respiratoires, bien qu'elles puissent contribuer à la réparation de l'épithélium pulmonaire [83].

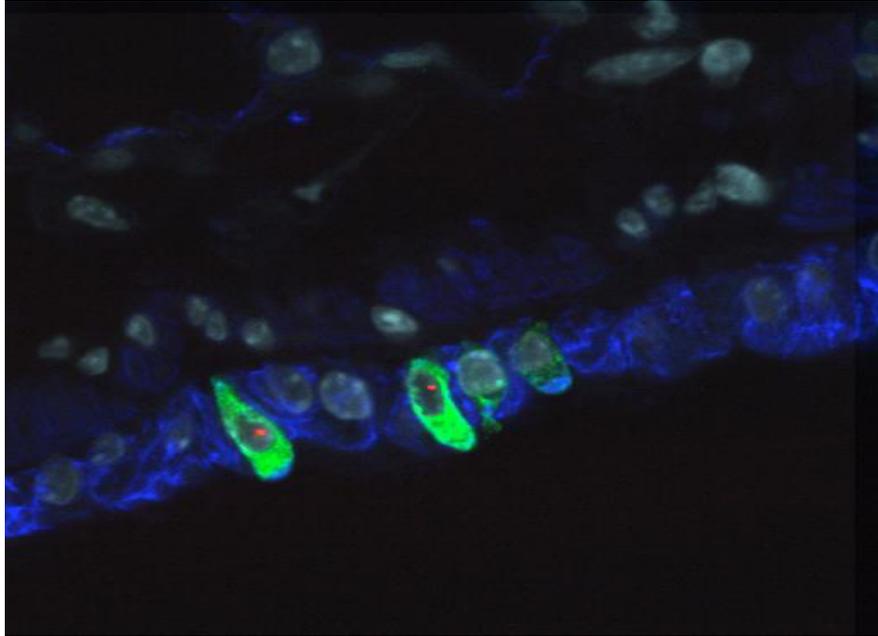


Figure 19 : Une coupe réalisée au niveau du poumon de la souris femelle [84].

- La zone entièrement noire correspond à la zone où se trouve l'air. Cet air est séparé du reste de l'organisme par une couche de cellules où deux d'entre elles apparaissent colorées.
- Les cellules qui possèdent le gène *CFTR* fonctionnel sont les deux cellules dont le cytoplasme apparaît vert fluorescent, elles appartiennent à la souris mâle car elles présentent un marquage sous forme de point rouge (dans leur noyau) qui indique la présence du chromosome Y.

Dans la moelle osseuse, il existe un autre type de cellules souches, les cellules souches mésenchymateuses (CSM). Ce sont des cellules souches tissulaires multipotentielles donnant naissance aux tissus conjonctifs du squelette : os, cartilage, stroma médullaire à différenciation vasculaire musculaire lisse et adipocytes. De façon plus contestée, elles donneraient également naissance aux cellules musculaires sarcomériques (squelettiques et cardiaques) et aux cellules respiratoires, voire à des cellules d'origine non mésodermique, tels que les hépatocytes ou les cellules neurales (**Figure 20**). L'application de l'ensemble des critères des CS à l'étude des CSM montre que ces cellules constituent une catégorie singulière, différente, à bien des égards, des CS classiques de l'hématopoïèse.

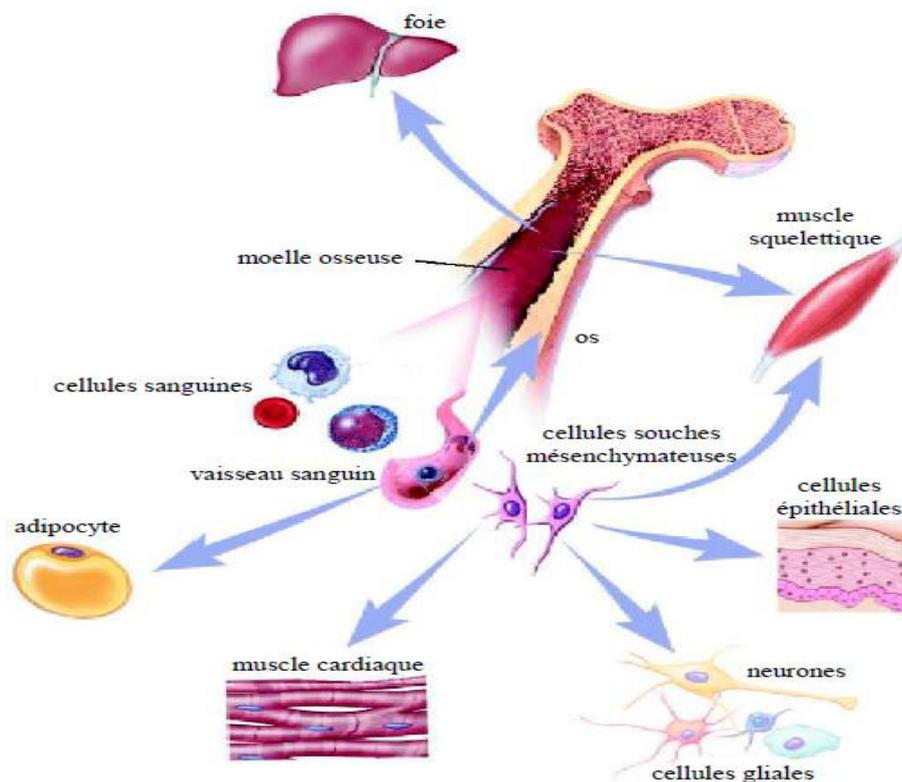


Figure 20 : Voies possibles de différenciation des cellules souches mésenchymateuses [81].

Les CSM font l'objet d'une attention croissante compte tenu de leur relative facilité d'isolement, leur multiplication rapide en culture et leur utilisation possible en transplantation autologue. D'ailleurs, des CSM mucoviscidosiques humaines corrigées par thérapie génique, sont capables de se différencier à l'intérieur d'un épithélium respiratoire mucoviscidosique reconstitué et de produire un courant chlorure apical régulé par l'AMPc. Mais les CSM semblent être une population hétérogène et il est probable que seule une sous-population particulière est à l'origine des effets bénéfiques observés. Des travaux approfondis sont requis pour mieux caractériser ces cellules et augmenter leur capacité d'implantation.

VI.2.3. Les cellules souches progénitrices pulmonaires

Les cellules progénitrices issues des poumons pourraient être une source pour la thérapie cellulaire de la mucoviscidose. Ces cellules diffèrent selon le niveau de l'arbre respiratoire étudié. A titre d'exemple au niveau des alvéoles, on trouve les cellules alvéolaires de type II, dans les bronchioles ce sont les cellules de Clara alors qu'au niveau trachéo-bronchique, il semble y avoir plusieurs populations progénitrices (**Figure 21**).

Les cellules progénitrices ont l'avantage que l'orientation de leur différenciation vers une lignée épithéliale respiratoire est plus facile qu'avec des cellules d'une autre origine. En revanche, si elles doivent être utilisées pour traiter la mucoviscidose, il faudra pouvoir en obtenir un nombre suffisant à partir des poumons des patients [82].

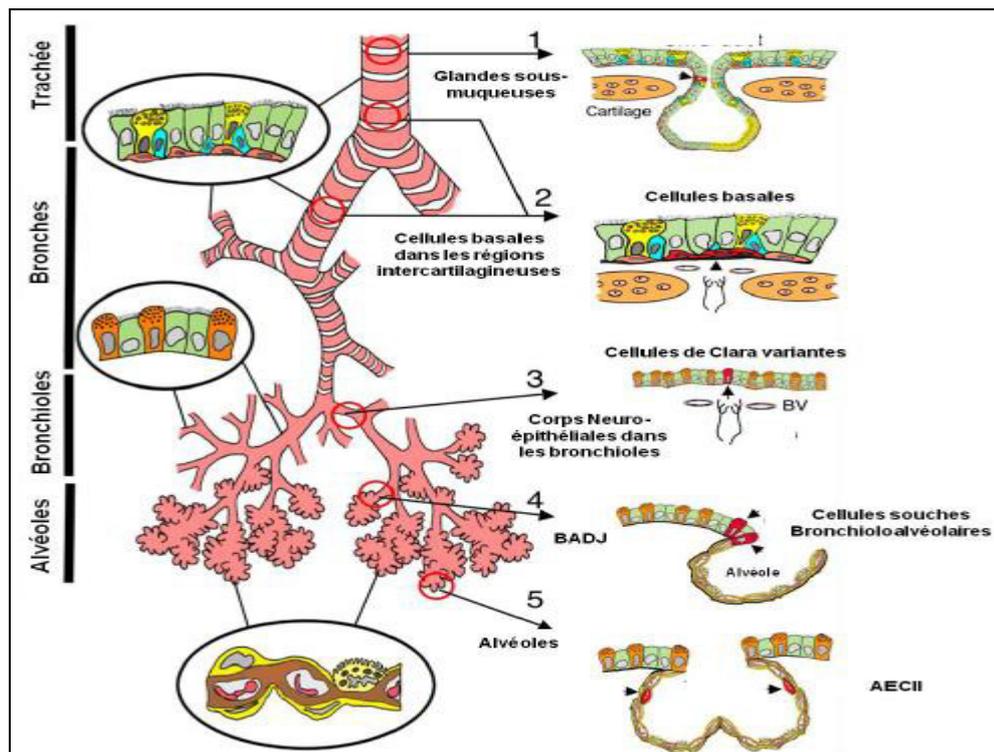


Figure 21 : Les niches des cellules souches dans l'épithélium pulmonaire murin (Bossard, 2007) [82].

- 1) Cellules basales bordant les canaux des glandes de la sous-muqueuse.
- 2) Cellules basales de l'épithélium trachéo-bronchique dans les zones cartilage- intercartilage.
- 3) Cellules de Clara variantes dans les corps neuro-épithéliaux.
- 4) BASC au niveau des jonctions bronchioalvéolaires.
- 5) AEC II dans les alvéoles

VI.3. Pharmacothérapie

Le traitement pharmacologique de la mucoviscidose vise à corriger le défaut des protéines mutantes CFTR. Cependant, selon le mutant considéré, les défauts à corriger peuvent être différents : défauts de repliement, d'adressage, de stabilité, de conductance. Par ailleurs, CFTR ayant plusieurs fonctions, certaines approches tentent de corriger une seule fonction.

VI.3.1. Chaperonnes chimiques

Les chaperonnes chimiques sont des molécules liposolubles permettant leur entrée dans la cellule. Elles sont étudiées pour leur capacité à stabiliser la protéine durant son repliement, sans se fixer directement sur le CFTR mutant.

Des chaperonnes chimiques, comme le glycérol (un polyalcool naturel non-chargé, et connu pour stabiliser les protéines), et des osmolytes de faible poids moléculaire, comme le myoinositol, la bétaïne et la taurine, présents naturellement dans les compartiments intracellulaires, peuvent accroître le processus de maturation cellulaire, soit en stabilisant les structures protéiques, soit en protégeant les protéines d'une dénaturation précoce liée à une

hyper-osmolarité de l'environnement cellulaire. Par ailleurs, des chercheurs ont tenté d'identifier des composés susceptibles d'altérer directement ou indirectement les interactions de la protéine CFTR-F508del avec les acteurs du système de contrôle de qualité du réticulum endoplasmique.

Des molécules pharmacologiques du type Buphenyl[®] également nommé sodium-4-phénylbutyrate (4PBA), ainsi que des inhibiteurs de pompes à calcium, du type curcumin, permettent un meilleur adressage de la protéine CFTR-F508del à la membrane apicale en modulant soit directement les activités des chaperonnes moléculaires endogènes Hsp70 et Hsc70, soit indirectement via une régulation fine des taux de calcium intracellulaire. Des essais cliniques de phase I/II ont eu lieu pour tester les effets du 4PBA administré oralement à des patients homozygotes pour $\Delta F508$. Les résultats démontrent une bonne tolérance du produit avec une amélioration faible mais significative de la différence de potentiel au niveau de l'épithélium nasal de ces patients.

S'inspirant des premiers résultats prometteurs du 4PBA, une équipe a testé l'effet de plusieurs acides gras à chaînes courtes sur l'adressage du mutant $\Delta F508$. Deux molécules (le 2,2-diméthyl-butyrate et l'acide α -méthylhydrocinnamique) restaurent une fonction apicale de ce mutant. Ces composés font également l'objet d'études contre le cancer pour leurs propriétés antiprolifératives.

VI.3.2. Aminoglycosides

Les aminoglycosides sont des antibiotiques qui ont la capacité, en plus de leur activité antimicrobienne, de réaliser une translecture des codons de terminaison chez les eucaryotes. Or, les mutations de *CFTR* faisant apparaître un codon stop prématuré sont retrouvées chez 10% des patients mucoviscidosiques. De tels antibiotiques comme le G418 et la gentamicine permettent la traduction de la protéine entière et ainsi de restaurer une fonction apicale normale de CFTR *in vitro* dans des cellules portant des mutations. Des essais ont ensuite eu lieu sur des patients, tout d'abord en application locale sur l'épithélium nasal. Les résultats ont montrés une augmentation significative de la différence de potentiel nasal sur les patients homozygotes ou hétérozygotes pour une mutation stop. Les effets observés sur la différence de potentiel nasal après administration systémique sont relativement faibles mais significatifs, et dépendent en partie de la mutation non-sens considérée. Mais l'efficacité de ces antibiotiques sur des patients porteurs des mêmes mutations stop est variable. Cette variabilité provient du système de dégradation des ARN non-sens dont l'efficacité varie selon les types cellulaires et les individus [85].

VI.3.3. Activateurs de CFTR

Une recherche intensive de composés exogènes susceptibles de pallier les défauts de régulation et de conductance entraînés respectivement par les mutations CFTR des classes 3 et 4 a permis l'identification d'un certain nombre de molécules activatrices. L'utilisation de ces activateurs peut être également envisagée en association avec les chaperonnes chimiques car certains mutants, comme le DF508, ont en plus du défaut de maturation, un défaut de conductance. Plusieurs familles de molécules existent avec différents modes d'action.

Les xanthines, sont des composés retrouvés naturellement dans le thé, le café et le cacao. Ce sont des dérivés purines ayant des propriétés antagonistes des récepteurs à l'adénosine mais aussi inhibitrices des phosphodiesterases. Le plus connu est l'IBMX (3-isobutyl-1-méthylxanthine) (**Figure 22**). Ses propriétés d'inhibiteur non spécifique des phosphodiesterases entraînent une augmentation des taux d'AMPC et GMPc intracellulaires, ce qui stimule l'activité chlorure de CFTR.

Le CPX (8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine) est un autre composé de la famille des xanthines (**Figure 22**). Il a la propriété de restaurer partiellement la fonction du mutant $\Delta F50$, mais il n'a aucun effet sur la protéine sauvage. L'effet du CPX ne passe pas par un antagonisme des récepteurs à l'adénosine ni par une élévation du taux d'AMPC intracellulaire. Une étude a démontré que le mécanisme d'action des xanthines repose sur une interaction directe avec le domaine NBD1 de CFTR avec des affinités qui varie selon le composé considéré mais aussi avec la présence d'une mutation.

Une équipe a proposé un autre mécanisme d'action pour les xanthines. Ces molécules peuvent maintenir le canal CFTR dans la configuration ouverte tout en bloquant partiellement le pore de la protéine, provoquant ainsi un courant résiduel permanent.

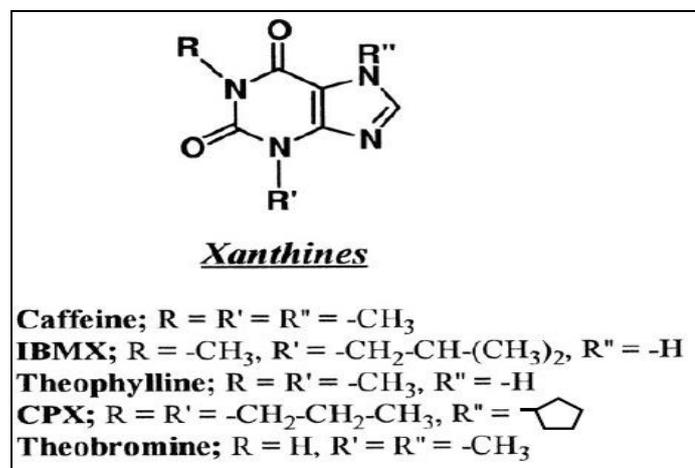


Figure 22 : Structure des composés de la famille des xanthines (SAUSSEREAU, 2012) [31].

Les flavones et isoflavones sont des molécules retrouvées naturellement dans les plantes (**Figure 23**). Ces composés ont la capacité de stimuler les transports électrolytiques sur des cellules humaines. La génistéine est plus étudié d'entre eux, elle est capable d'activer les protéines CFTR sauvages ainsi que les CFTR mutés G551D ou $\Delta F508$ après traitement au 4PBA. Son action passe par une interaction avec le domaine NBD2 de CFTR, elle inhibe toutes les activités enzymatiques du domaine NBD2. Le canal reste donc sous forme active, lié à l'ATP.

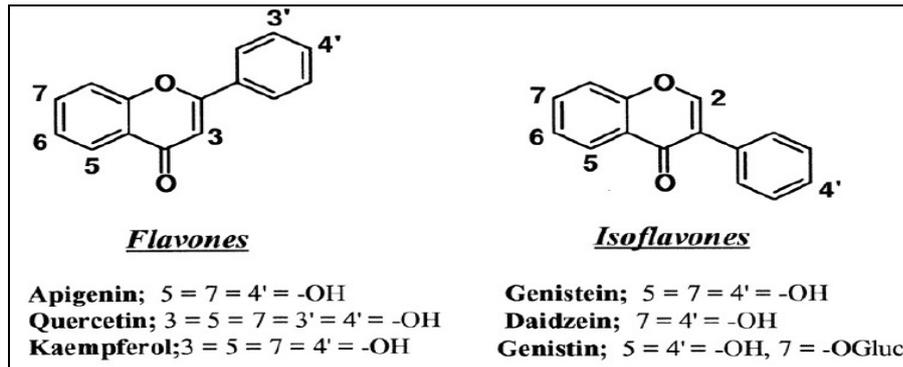


Figure 23 : Structure des composés de la familles des flavones et isoflavones (SAUSSEREAU, 2012) [31].

Les flavones et isoflavones ont d'autres propriétés qui pourraient être bénéfiques pour le traitement de la mucoviscidose. La génistéine aurait ainsi des propriétés anti inflammatoires permettant de diminuer la sécrétion excessive d'interleukine-8 par les glandes bronchiques mucoviscidosiques .En outre, la quercétine (**Figure 24**) est capable de moduler l'expression de certaines chaperonnes de la famille Hsp. Elle diminue notamment l'expression de Hsp70.

Les benzimidazolones et benzoxazoles, sont considérés comme des activateurs de CFTR. La famille des benzimidazolones est constituée de composés dérivés d'un colorant utilisé en peinture industrielle. Les benzimidazolones substitués, NS004 et NS1619 (**figure 24**) activent les protéines CFTR sauvage et mutée $\Delta F508$ lorsque les cellules sont perméabilisées.

Le 1-EBIO (1-ethyl-2-benzimidazolinone), est un composé de la famille des benzimidazolones. Il a la capacité d'activer les protéines CFTR et stimuler les canaux potassiques basolatéraux activés par le calcium ainsi que les canaux potassiques activés par l'AMPc. L'activation de CFTR serait à la fois directe et indirecte. La voie indirecte est due à l'activation des canaux potassiques qui conduisent à une hyperpolarisation de la membrane apicale, et à une augmentation du gradient électrique pour le passage de Cl^- à travers CFTR.

La chlorzoxazone ainsi qu'un autre composé de la famille des benzoxazoles la Zoxazolamine (**Figure 24**), stimulent indirectement CFTR en activant les canaux potassiques

Ca²⁺-dépendants .Par ailleurs, la chlorzoxazone et le 1-EBIO peuvent aussi stimuler l'absorption sodique par activation indirecte d'ENaC.

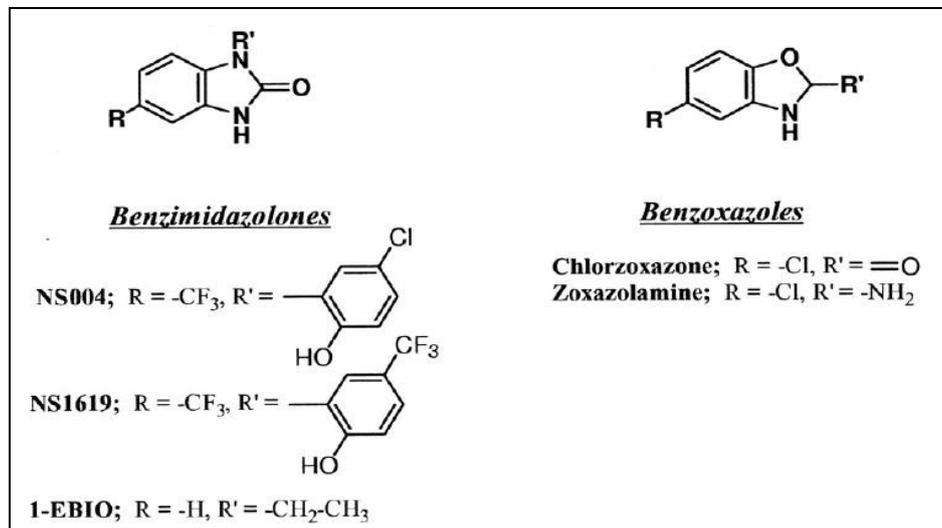


Figure 24 : Structure des composés de la famille des benzimidazolones et des benzoxazoles (SAUSSEREAU, 2012) [31].

Les composés Benzo[c]quinolizinium ont été obtenus par synthèse chimique. Ce sont des activateurs directs de CFTR qui n'affectent pas les taux intracellulaires d'AMPc ou d'ATP, ni l'activité des phosphatases. Un composé de cette famille, le MPB-07 a le pouvoir de corriger le défaut d'adressage du mutant $\Delta F508$ dans des cellules épithéliales nasales humaines fraîchement isolées. Il peut également réduire la réponse inflammatoire après l'exposition des cellules à *P.aeruginosa*.

Les inhibiteurs de phosphatases et de phosphodiesterases jouent le rôle des activateurs CFTR. L'activité de CFTR est régulée par une balance entre l'action positive des kinases et l'action négative des phosphatases. L'inhibition de l'activité des phosphatases a un effet bénéfique sur l'activité de CFTR et certains de ses mutants. Ainsi, des inhibiteurs des phosphatases PP1 et PP2A, PP2B ont la capacité d'activer CFTR. Les inhibiteurs des phosphatases alcalines, comme le levamisole et le bromotetramisole (**Figure 25**), sont également capables de stimuler la conductance chlorure de CFTR sauvage ainsi que différents mutants.

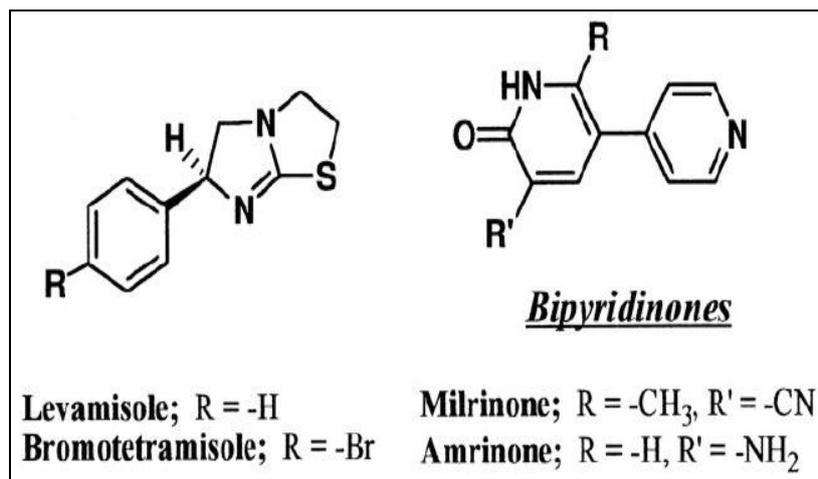


Figure 25 : Structure du lévamisole et son dérivé bromotétramisole ainsi que des composés de la famille des bipyridinones (SAUSSEREAU, 2012) [31].

Les composés de la famille des bipyridinones, l'amrinone et la milrinone (**Figure 25**), sont des inhibiteurs de phosphodiésterases et activent CFTR en augmentant le taux d'AMPc intracellulaire. Ces composés peuvent stimuler le mutant $\Delta F508$ dans des lignées cellulaires humaines et des cellules épithéliales humaines isolées. Une étude *in vivo* réalisée chez la souris homozygote $\Delta F508$ a montré que l'association de la milrinone avec un activateur de la PKA permet de restaurer une réponse fonctionnelle au niveau de l'épithélium nasal de ces animaux, alors que la milrinone seule ou l'activateur de la PKA seul sont sans effet. De même chez les patients mucoviscidosiques, la milrinone seule n'a aucun effet.

Divers autres composés naturels ou de synthèse sont susceptibles de stimuler la fonction de CFTR. Tel que, le peptide natriurétique de type C et certains anesthésiques de la famille des alcanols.

VI.3.4. Activateurs de protéines "alternatives"

Chez les patients mucoviscidosiques, le transport chlorure *via* CFTR est absent ou très limité. Tandis que le transport chlorure activé par le calcium est fonctionnel et peut être activé par l'ATP et l'UTP. En association avec l'amiloride pour inhiber l'absorption sodique par le canal sodium amiloride-sensible ENaC, l'UTP permet d'améliorer la clairance muco-ciliaire des patients mucoviscidosiques. Cependant, l'effet obtenu est actuellement de trop courte durée pour avoir une significativité clinique dans le temps.

La description d'un cas clinique a ouvert de nouvelles perspectives thérapeutiques dans la mucoviscidose pour des composés anti-tumoraux. Ainsi, un patient mucoviscidosique traité pour une tumeur maligne a vu que sa fonction respiratoire est devenue quasiment normale et son infection à *P. aeruginosa* a disparu après la chimiothérapie. Il n'a plus besoin de suivre son

traitement par physiothérapie pour améliorer la clairance du mucus. Pourtant, le test de la sueur est toujours positif.

Des tests plus approfondis ont démontrés la présence d'ARNm des gènes MDR et MRP dans les cellules épithéliales nasales de ce patient, alors que ces ARNm ne sont pas détectables chez un sujet sain. Les protéines MDR et MRP permettent de détoxifier les cellules et confèrent ainsi une résistance à certaines molécules habituellement nocives.

Certains transporteurs ABC peuvent compenser la fonction défectueuse d'une autre protéine de la même famille. D'ailleurs, la surexpression de CFTR dans une lignée cellulaire murine confère à ces cellules un phénotype proche de cellules exprimant MDR ou MRP. De plus, des substrats de MRP sont capables d'interagir avec CFTR pour moduler sa conductance chlorure en l'inhibant. Il est ainsi possible que MDR et MRP puissent compenser certaines fonctions de CFTR, ce qui explique l'amélioration des symptômes observée chez le patient mucoviscidosique ayant subi une chimiothérapie.

La doxorubicine utilisée dans les traitements anti-cancéreux inhibe l'interaction avec Hsp70, et donc corriger en partie le défaut de $\Delta F508$. Mais ces résultats sont en désaccord avec ceux réalisés dans une lignée cellulaire humaine dans laquelle la doxorubicine stimule l'expression de MDR mais inhibe celle de CFTR en diminuant son taux d'ARNm.

L'azithromycine, un antibiotique utilisé pour lutter contre les infections bactériennes dans la mucoviscidose, semble aussi capable de compenser les dysfonctions de CFTR. En effet, un traitement journalier pendant quatre semaines à l'azithromycine de patients mucoviscidosiques permet d'augmenter significativement la conductance chlorure apicale de l'épithélium nasal. Une corrélation positive a été décrite entre le taux d'ARNm de MRP et la restauration de la différence de potentiel au niveau de l'épithélium nasal. Cependant, deux autres études n'ont pas révélé de modification des taux d'ARNm MDR ou de différence de potentiel nasal après traitement à l'azithromycine, même si une amélioration des symptômes respiratoires a été observée [27].

VII. Les modèles animaux dans la mucoviscidose :

Des modèles animaux récemment produits, y compris les modèles de rats, de furets et de porcs, ont démontrés une gamme de phénotypes de maladies pulmonaires bien caractérisés avec des degrés de gravité variables.

Au cours de ces 20 dernières années, des recherches *in vivo* sur la mucoviscidose ont utilisées des modèles murins génétiquement modifiés. Peu de temps après la découverte du gène *CFTR* en 1989, le premier modèle de souris CF a été décrit : des souris KNOCK-OUT pour *CFTR* [86]. Deux groupes majeurs de modèles de souris CF existent: des allèles nuls (souris knockouts) sans ARNm détectable ou protéine CFTR fonctionnelle, et des allèles mutants avec

des mutations de CFTR communes (souris F508del-CFTR) [87]. Ces modèles présentent des similitudes et des différences marquées avec la maladie humaine : La plupart développent des anomalies de transport d'ions et des symptômes digestifs similaires à l'homme. Elles ne présentent pas les lésions pulmonaires caractéristiques retrouvées chez les patients mucoviscidosiques. En effet, l'absence d'atteinte respiratoire peut s'expliquer soit par la composition cellulaire de l'épithélium bronchique qui est différente chez la souris dont les cellules de Clara représentent plus de 50 %, soit il existe une différence d'expression du gène *CFTR* chez la souris, ou encore les canaux CFTR et ENaC ne sont pas colocalisés dans les mêmes cellules, ce qui empêche le contrôle de ENaC par CFTR [88].

Un autre modèle de souris présente un phénotype typique de mucoviscidose, c'est le modèle F508del-CFTR. Ces souris se caractérisent par un poids diminué, des obstructions intestinales non létales. Toutefois, aucune accumulation de mucus dans les poumons, le pancréas, les canaux biliaires, les glandes salivaires ou les canaux déférents n'a été observées. Les modèles murins humanisés qui expriment exclusivement la CFTR humaine avec des mutations communes sont également en cours de développement [89].

Les poumons porcins partagent plusieurs caractéristiques anatomiques et histologiques avec les poumons humains, tels que la structure arborescente trachéobronchique similaire, et l'abondance des glandes sous-muqueuses des voies respiratoires [90]. Étant donné que les porcs CF reproduisent de nombreuses caractéristiques de la maladie des voies respiratoires, ils ont été utiles pour plusieurs recherches, notamment sur la pathogenèse des maladies pulmonaires. L'étude des défauts de transport des électrolytes et l'exploration des mécanismes de biosynthèse et de mauvais traitement des CFTR-Phe508del. Les porcs FC ont également fourni une voie utile pour explorer les origines de l'inflammation et de l'infection dans les voies respiratoire, en identifiant le rôle de l'expérimentation des approches de thérapie génique des voies respiratoires virales à médiation [91].

Un modèle de porc knockout CF a été créé en utilisant une approche alternative qui implique un ciblage séquentiel de CFTR. Après la reproduction des premiers porcs CF, il a été réalisé que l'entretien des animaux nécessite un élevage intensif et coûteux en raison du phénotype gastro-intestinal sévère. Les porcelets CF nouvellement nés ont une pénétrance à 100% de l'iléus méconial, les porcelets nécessitant une intervention chirurgicale peu de temps après la naissance pour soulager l'obstruction [92].

Une série de mesures de transport ionique effectuées sur les épithéliums nasal, trachéal et bronchique des porcs CF en utilisant des tissus, des cultures et des approches in vivo a révélé des anomalies électrophysiologies correspondant à la perte d'activité CFTR. Le transport de chlorure

médiée par CFTR est considérablement réduit dans l'épithélium nasal, trachéal et bronchique des porcs CF par rapport au type sauvage [93].

À l'avenir, les porcs atteints de mucoviscidose peuvent également être utiles pour le test à long terme de médicaments tels que les modulateurs CFTR et pour l'évaluation des stratégies de prévention des maladies respiratoires [94].

Le modèle de furet a été développé en raison des similitudes entre la biologie et l'anatomie des cellules du poumon de furet et du poumon humain. Les poumons de furet normaux ont été utilisés pour modéliser des infections pulmonaires humaines car il présente un phénotype pulmonaire sévère qui est hétérogène entre les animaux. Les voies aériennes des furets ont des glandes sous-muqueuses dans toute la trachée et des bronches primaires qui expriment des taux élevés de CFTR.

Les poumons du furet présentent des obstructions par du mucus, une inflammation, toutes les manifestations importantes des voies aériennes de la mucoviscidose. Compte tenu de cela, le furet peut être utile pour tester l'efficacité de thérapies potentielles dans des conditions d'infection et d'inflammation, ce qui n'a pas été possible avec les modèles précédents. La présence d'une infection pulmonaire spontanée aide également à comprendre les changements complexes dans le microbiote pulmonaire avec la progression de la maladie [95]. Un inconvénient du modèle de furet FC est l'absence de dysrégulation du canal ENaC dans les tissus des voies respiratoires, un processus considéré comme important dans la pathogenèse de la maladie pulmonaire.

Les furets atteints de mucoviscidose développent également une gamme de pathologies gastro-intestinales similaires à celles observées chez les patients atteints de mucoviscidose. Notamment, ces furets présentent une prévalence élevée d'iléus méconial (75%) souvent fatale, ainsi qu'un dysfonctionnement pancréatique, une malnutrition et une maladie hépatique. Tous ces symptômes s'observent très précocement, chez le nouveau-né [96]. De plus. Un nouveau modèle le furet KO-*CFTR* modifié au niveau intestinal a été créé afin d'éviter un décès prématuré par une obstruction intestinal.

Les modèles animaux jouent un rôle fondamental dans la compréhension de la mucoviscidose. Parallèlement au développement de technologies d'édition de gènes rapides et précises. Il est possible d'utiliser de nouvelles espèces afin de modifier des modèles existants en introduisant des mutations CFTR spécifiques à l'homme. Les modèles animaux qui récapitulent avec précision les caractéristiques de la maladie pulmonaire humaine CF seront cruciaux pour fournir aux chercheurs une ressource pour tester des thérapies pulmonaires expérimentales, identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et élucider les mécanismes complexes à l'origine

des maladies pulmonaires CF. Bien qu'il n'existe pas de modèle parfait de maladie pulmonaire de la mucoviscidose, chaque modèle animal présente des avantages uniques et peut être utilisé de façon complémentaire pour étudier les questions liées à la mucoviscidose. [97].

VIII. Le conseil génétique et mucoviscidose

Aujourd'hui, la mucoviscidose est systématiquement dépistée à la naissance. Les familles dont un membre souffre de mucoviscidose bénéficient d'une consultation de conseil génétique. L'objectif est d'aider les patients et leurs proches à comprendre le mode de transmission héréditaire de la maladie. Cette information leur permet de bien appréhender les différentes possibilités. Elle éclaire leur décision de concevoir ou non un enfant.

Il existe différentes situations dans lesquelles un conseil génétique doit être proposé aux familles :

VIII.1. Prise en charge des couples à risque de 1/4

Dans ce cas, les deux parents sont hétérozygotes c'est-à-dire porteurs asymptomatiques d'une mutation (**figure 26**). Il s'agit de couples qui ont donné naissance à un enfant atteint. Il peut également s'agir de couples qui ont été identifiés à la suite d'un dépistage réalisé dans les familles à risque ou encore suite à la détection d'un intestin hyperéchogène lors du suivi échographique des grossesses.

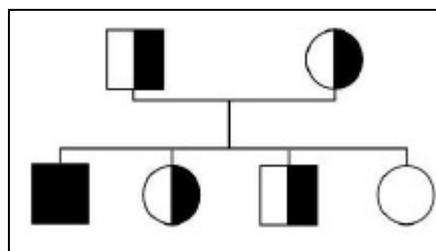


Figure 26 : représentation d'un couple à risque 1/4.

Le risque de réapparition à chaque grossesse étant de 25 %, un conseil génétique sera proposé à ces couples dans le but d'informer sur le risque de récurrence à chaque grossesse et une possibilité de diagnostic prénatal [98].

Dès 11 semaines d'aménorrhée, le diagnostic prénatal sera possible par choriocentèse, et un peu plus tard à partir de 16 semaines d'aménorrhée par amniocentèse. Dans tous les cas, le diagnostic sera réalisé par biologie moléculaire par l'identification dans l'ADN fœtal la présence ou l'absence de la mutation du gène *CFTR* porté par les parents. Le résultat du diagnostic prénatal est obtenu en 48 heures. Dans 98 % des cas, les mutations paternelles et maternelles sont connues et le diagnostic est direct par recherche de ces mutations au niveau de l'ADN fœtal. Si l'une des mutations n'est pas connue, on s'appuiera sur un diagnostic indirect en

utilisant des marqueurs polymorphes intra ou extra géniques qui caractérisent le chromosome porteur de l'allèle délétère inconnu [99].

Il faut également noter que la très grande majorité des couples à risque de $\frac{1}{4}$, pour laquelle le diagnostic de mucoviscidose fœtale est porté opte pour une demande d'Interruption Médicale de la grossesse (IMG). Une autre possibilité peut être proposée à ces couples. Il s'agit du diagnostic préimplantatoire réalisé dans le cadre d'une procréation médicalement assistée. Ce diagnostic est considéré comme prioritaire pour les femmes qui ont déjà dû subir plusieurs IMG à la suite de diagnostics prénatals positifs.

VIII.2. Prise en charge des couples à risque de $\frac{1}{2}$

Les patients atteints de mucoviscidose transmettent obligatoirement une des deux mutations dont ils sont porteurs, le risque pour leur couple d'avoir un enfant atteint avant toute étude de biologie moléculaire est élevé $\frac{1}{60}$ ($1 \times \frac{1}{30} \times \frac{1}{2}$). Il est donc primordial de réaliser une étude exhaustive du gène *CFTR* chez le conjoint, afin d'écartier le maximum de mutations et de pouvoir réduire le risque résiduel de mucoviscidose. En écartant 98 % ou 99 % des mutations selon l'origine du conjoint, le risque résiduel de mucoviscidose pour ce couple rejoint le risque d'un couple pris au hasard dans la population générale. En revanche, si le conjoint se révèle être hétérozygote, le couple devient à risque de $\frac{1}{2}$ (Figure 27).

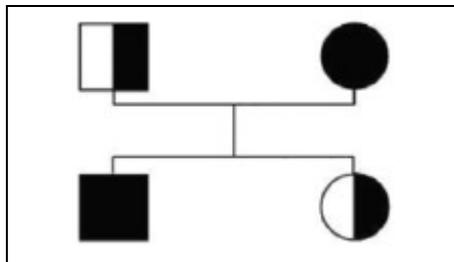


Figure 27 : Représentation d'un couple à risque de $\frac{1}{2}$.

VIII.3. Couples à risque a priori de $\frac{1}{120}$.

Dans cette situation l'un des partenaires est porteur hétérozygote d'une mutation du gène *CFTR*. Le risque a priori pour ce cas de couples avant toute analyse de génétique est de $\frac{1}{120}$ ($\frac{1}{2} \times \frac{1}{30} \times \frac{1}{2}$).

L'étude moléculaire a pour but de modifier cette probabilité *a priori* de $\frac{1}{120}$ en probabilité *a posteriori* après avoir analysé le gène *CFTR* chez le conjoint *a priori* non porteur. Une première étude simple consiste à rechercher la présence de la mutation F508del et des 30 mutations les plus fréquentes du gène permettant d'écartier environ 90 % des mutations du gène. Ce taux peut varier légèrement selon les régions et l'origine ethnique des conjoints [100].

Partie pratique

IX. Patients et méthodes

IX.1. Patients

✚ Recrutement des cas index

Notre étude est prospective de type transversal et a été réalisée au niveau du laboratoire de biologie et de génétique moléculaire de la faculté de médecine université Constantine 3 Saleh Bounider logé au niveau du laboratoire de biochimie du CHU durant la période février – juin 2018.

Elle a porté sur 1113 patients des deux sexes présentant des signes cliniques de mucoviscidose probable.

Ce travail a fait le point sur les résultats du test de la sueur réalisé sur une période de 7 ans (2011- 2018).

✚ Critères de sélection

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

**Tableau 2 : Manifestations compatibles avec un diagnostic de mucoviscidose
(Riordan et al., 1998) [101].**

1. Atteinte respiratoire chronique traduite par :

- a. La colonisation du tractus respiratoire par des germes évocateurs de mucoviscidose et en particulier *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*.
- b. Une toux chronique avec bronchorrhée.
- c. Des anomalies radiologiques persistantes (bronchectasies, infiltrats, atélectasies, hyperinflation...)
- d. Une obstruction chronique des voies aériennes avec parfois des signe d'hyperréactivité bronchique.
- e. Une polypose nasale, la documentation (RX ou CT) d'anomalies persistantes des sinus.
- f. Un hippocratisme digital.

2. Atteinte digestive :

- a. Intestinale : iléus méconial, équivalent d'iléus méconial, prolapsus rectal.
- b. Pancréatique : insuffisance pancréatique exocrine, épisodes récidivants de pancréatite.
- c. Hépatique : hépatopathie chronique (cirrhose biliaire focale, cirrhose multilobulaire ...)
- d. Nutritionnelle : retard de croissance, œdème avec hypoprotéïnémie, manifestations traduisant une carence en vitamines liposolubles (ADEK).

3. Symptômes traduisant une perte d'électrolytes : coup de chaleur avec déshydratation hyponatrémique, hypokaliémique et hypochlorémique, alcalose métabolique chronique.

4. Stérilité masculine par absence congénitale des canaux déférents.

Critères d'exclusion

- Toutes les autres pathologies pulmonaires et digestives.
- Les patients sous traitement pouvant perturber le test de la sueur sont écartées sous réserve de terminer leur traitement.

IX.1.1. Recueil des données

Questionnaire

Pour tous les patients nous avons réalisé un recueil systématique des données cliniques et biologiques grâce à un questionnaire approprié comportant :

Etat civil, circonstance de découverte de la mucoviscidose probable, symptomatologie clinique, bilan biologique, radiologique, présence ou l'absence d'autres organes atteints (**Annexe I**). Un arbre généalogique ainsi que la consanguinité et les antécédents familiaux ont aussi été notés.

Le consentement éclairé (**Annexe II**) a été obtenu des tuteurs des patients quand l'âge du patient est inférieur à 18 ans.

IX.2. Méthodes

IX.2.1. Etude biochimique

IX.2.1.1. Le test de la sueur

Le test de la sueur a été mis en place en juin 2011 au laboratoire de biologie et de génétique moléculaire de la faculté de médecine université 3 de Constantine (dosage par titrimétrie des chlorures de la sueur recueillie après stimulation par iontophorèse à la pilocarpine). Le test de la sueur reste l'examen de première intention pour le diagnostic de la mucoviscidose.

Principe de test

Le test de la sueur est un examen qui consiste à mesurer la concentration sudorale en chlorure de sodium. Un taux trop élevé de NaCl dans la sueur est l'un des signes les plus importants de la mucoviscidose. Il comporte trois étapes :

- Stimulation des glandes sudoripares.
- Recueil et prélèvement de la sueur.
- Dosage et analyse de la sueur.

I.2.1.2. Matériel nécessaire

Matériel de stimulation

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

Le matériel utilisé :

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

Matériel de dosage

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

I.2.1.3. Réactifs nécessaires

Réactif de stimulation

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

Réactif de dosage

- Acide nitrique 1N (prêt à l'emploi)
- Solution de diphényle carbazone :
 - Diphényle carbazone 0.2 g.
 - Alcool 95% 100 ml.
 - Bleu de bromophénol 0.05 g.
- Solution de nitrate mercurique Hg (NO₃)₂ :
 - HNO₃ 7.5 ml.
 - Eau distillée 100 ml.
 - Solution A.

0.3 ml de la solution A + 0.3 g de Hg (NO₃)₂ + 100 ml d'eau distillée.

- L'eau distillée.
- Solution NaCl à 1g/l.
- L'eau physiologique.

IX.2.1.4. Procédure

✚ Stimulation de la sudation

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

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

✚ Recueil de la sueur

On utilise un papier filtre Whatman sans cendre préalablement pèse au 0.1 mg près. Celui-ci sera appliqué sur la surface stimulée, recouvert d'un film plastique qui colle hermétiquement à la peau pour éviter tout risque d'évaporation.

Après 30 à 60 minutes de sudation, le papier filtre est retiré à l'aide d'une pince et pesé immédiatement. Le poids de sueur minimal pour que le test soit fiable doit être de 100 mg et plus. Si plusieurs échantillons sont récupérés, ceux-ci seront traités séparément.

✚ Dosage des chlorures sudoraux

Dans notre étude nous avons dosé les ions chlorures par la technique titrimétrique de Schales. Elle est quantitative puisqu'elle tient compte du volume de la sueur.

Après extraction des chlorures du papier filtre avec 10 ml d'eau distillée, le dosage se fait par titrimétrie avec une solution de nitrate mercurique et en présence de diphénylcarbazone comme indicateur coloré. Le virage est marqué par l'apparition d'une coloration violette stable.

Les précautions doivent être nombreuses pour éviter toute erreur : la pesée doit être extrêmement précise, le risque de contamination chlorée par la verrerie doit être évité, de même que la contamination de l'échantillon par les mains de l'opérateur.

Il est nécessaire que le test soit réalisé de façon courante au niveau d'un laboratoire et par une personne expérimentée. C'est alors un test fiable, mais qui ne peut être réalisé au lit du malade.

✚ Préparation des échantillons

Boite de pétrie 01 : boite de pétrie blanc.

Papier filtre + 10 ml d'eau distillée.

Boite de pétrie 02 : boite de pétrie contrôle NaCl.

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

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

Papier filtre + 10 ml d'eau distillée.

Boite de pétrie 04 : boite de pétrie titrage HgNO₃⁻.

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

Tableau 3 : Protocole opératoire du dosage du chlore dans la sueur.

	1	2	3	4
	Blanc	Contrôle NaCl	Echantillon	Titrage HgNO₃⁻
Papier filtre	+	+	+	+
Eau distillée	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
NaCl 9%	-	100 µl	-	-
NaCl 0.01 M	-	-	-	1 ml

NB : Laisser le papier Whatman au contact de l'eau distillée pendant au moins 10 minutes.

Rajouter dans chaque boite de pétrie 05 gouttes d'acide nitrique 2%, et 05 gouttes de diphénylcarbazone à 0.4%.

Tableau 4 : protocole opératoire de la dernière étape du dosage du chlore dans la sueur.

	1 Blanc	2 Contrôle NaCl	3 Echantillon	4 Titration HgNO₃⁻
Acide nitrique 2%	05 gouttes	05 gouttes	05 gouttes	05 gouttes
Diphénylcarbazone	05 gouttes	05 gouttes	05 gouttes	05 gouttes

IX.2.1.5. Mesure des volumes

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

✚ Expression des résultats

- **Titre de nitrate mercurique**

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

d : ml lu à la burette pour le titrage du HgNO₃⁻.

c : ml lu à la burette pour le blanc.

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

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

a : ml lu à la burette pour le contrôle.

c : ml lu à la burette pour le blanc.

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

[Cl] normale dans le contrôle NaCl = 145 ± 3 mEq/L.

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

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

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

IX.2.2. Etude génétique :

IX.2.2.1. Extraction de l'ADN :

✚ Principe :

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

IX.2.2.1.1. Matériels nécessaires

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

IX.2.2.1.2. Réactifs nécessaires

- TE 20 :5 25ml
- TE 10 :1 1.5ml
- TE 10 :1 300-1000µl
- Tampon de lyse

NaCl 400 mM, EDTA 2mM, Tris 10mM, PH 8.2

- SDS 10% 200 µl
- Protéinase K 10mg/ml
- NaCl 4M 1 ml
- Ethanol 70%

IX.2.2.1.3. Procédure

✚ Lyse des globules rouges

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

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

Lyse des globules blancs

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

Précipitation de l'ADN

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

Dosage de l'ADN

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

IX.2.2.2. La PCR

La PCR est un outil fondamental de la biologie moléculaire. Elle permet de repérer un fragment d'ADN ou de gène précis, présent même en quantité infime dans un mélange puis de le multiplier rapidement.

La PCR a été décrite pour la première fois par Karry Mullis en 1983 et publiée en 1985, ce qui a valu à Karry Mullis le prix Nobel de chimie en 1993.

Principe :

La PCR est basée sur la capacité de l'ADN polymérase à synthétiser le brin complémentaire, d'un ADN servant de matrice. Pour initier le processus, un segment d'acides nucléiques doit s'y associer afin de servir d'amorce. Cette amorce ou primer est un oligonucléotide de synthèse de 17 à 30 bases de longueur, et dont la séquence est complémentaire à celle du brin à amplifier. L'amorce permet de délimiter les bornes de la séquence à amplifier. L'association à l'ADN cible est suivie de son élongation par la polymérase, aboutissant ainsi à la synthèse d'un ADN double brin.

La PCR consiste en une succession cyclique de 3 étapes :

Le milieu réactionnel tamponné comprend tous les éléments indispensables : les précurseurs nucléotidiques (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), le cation Mg^{++} indispensable au bon fonctionnement de l'enzyme et à l'incorporation correcte des précurseurs, l'ADN polymérase et les amorces. A ce milieu est ajouté l'ADN extrait du milieu biologique à étudier.

- **Première étape : Dénaturation thermique**

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

- **Deuxième étape : Hybridation des amorces ou annealing**

Le milieu réactionnel est amené à une température inférieure au T_m des amorces. Ce T_m est fonction de la séquence et est en général de l'ordre de 45 à $70^{\circ}C$. Les amorces en large excès, s'hybrident à tout l'ADN simple brin comportant la séquence complémentaire.

- **Troisième étape : Elongation et extension des amorces**

Une ADN polymérase (la taq polymérase) allonge les amorces en y incorporant les désoxynucléotides complémentaires de la séquence de la matrice à laquelle est hybridée.

La synthèse s'effectue dans le sens $5' \rightarrow 3'$ à $72^{\circ}C$ (température optimale). A la fin du cycle, deux copies de la séquence d'ADN cible sont obtenues.

Un nouveau cycle commencera par l'étape de dénaturation, suivie successivement des étapes d'hybridation et d'extension.

A chaque cycle correspond le doublement du nombre de copies de la séquence cible. De manière générale 15 à 40 cycles sont effectués, générant un nombre considérable de copies de la séquence cible.

L'amplification est exponentielle selon la formule 2^n à la puissance n , n représente le nombre de cycles, par exemple une PCR de 30 cycles génère théoriquement 2^{30} copies de cibles initialement présentes.

Le rendement de la réaction n'atteint jamais 100%. Ce qui, en fin d'amplification, nous permet d'obtenir en pratique moins de copies que celles attendues par la théorie.

La PCR peut être adaptée de plusieurs façons pour faciliter l'analyse de l'ADN. Plusieurs stratégies différentes sont utilisées pour la détection des mutations ponctuelles. Les méthodes actuelles reposent sur l'amplification de la cible, généralement par PCR, suivie de l'identification de variants d'ADN en utilisant des sondes, des endonucléases de restriction, des ligases ou des polymérases ou par amplification refractory mutation system (ARMS) et c'est la technique que nous allons utiliser dans notre étude.

Le système ARMS est une technique établie qui améliore l'utilité de la PCR pour la détection de mutations et d'autres polymorphismes dans l'ADN.

En 1989 Newton et ses collaborateurs (1989) [102] ont décrit pour la première fois la PCR ARMS ou amplification refractory mutation system ou système d'amplification de mutation réfractaire (ARMS) comme une technique générale pour l'analyse de toute mutation ponctuelle ou de toute petite délétion.

Le principe de la méthode est que, dans des conditions appropriées, un oligonucléotide qui n'est pas adapté à la séquence d'ADN cible (génomique) à son extrémité 3' ne sera pas prolongé par la Taq ADN polymérase. L'extrémité 3' d'une amorce ARMS confère donc sa spécificité à l'allèle, donc un produit ARMS n'est généré que si l'amorce est adaptée.

Un test ARMS typique consiste en deux réactions complémentaires. La première réaction contient une amorce ARMS spécifique de la séquence d'ADN normale et donc ne peut pas amplifier l'ADN muté. De même, la seconde réaction contient une amorce spécifique du mutant et ne peut pas amplifier l'ADN normal. Le génotype d'un individu peut être déterminé par l'analyse des produits d'amplification. Un individu normal génère un produit de PCR seulement dans le mix amorce normale, un hétérozygote donne des produits dans les deux réactions, et un individu mutant homozygote ne le fait que dans la réaction avec amorces mutées mutante.

Dans la technique de PCR ARMS: l'une des amorces utilisées porte la base mutée à son extrémité 3' (amorce T), l'autre correspond à l'allèle normal (amorce N), ce qui permet de déterminer si l'ADN exploré porte ou non la mutation.

Dans cette étude nous avons utilisé des couples d'amorces spécifiques de la Delta F508, mutation la plus fréquemment rencontrées dans toutes les populations. Les couples d'amorces utilisés ainsi que leurs séquences sont précisés dans le **tableau 5**.

Les conditions d'amplifications sont celles décrites dans la référence [103].

Optimisation de la PCR

- **Choix de l'enzyme**

La Taq ADN polymérase est une enzyme très largement utilisée pour effectuer les PCR. Cette enzyme obtenue à partir de *thermus aquaticus* possède une bonne thermolabilité, ce qui lui permet de résister dans certaines limites aux températures élevées nécessaires à la séparation des doubles brins.

La quantité de Taq ADN polymérase utilisée pour une réaction de PCR de 50 µl, varie de 0.2 et 0.5 UI, voire 1 UI. Une quantité trop importante d'enzyme est souvent à l'origine d'un bruit de fond important (bandes parasites) voire une inhibition de la réaction.

- **Choix des amorces**

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

Principes généraux relatifs aux choix des amorces :

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

Les amorces utilisées sont les suivantes :

Tableau 5 : Amorces utilisées

Nom de l'amorce	La séquence de l'amorce
AF 508 - Primer 1= DF-C	gACTTCACTTCTAATgATgATTATgggAgA
AF 508 - Primer 2= DF-j-N	gTATCTATATTCATCATAggAAACACCACA
F 508 - Primer 3 = DF-w-M	GTATCTATATTCATCATAGGAAACACCATT
AAT4	GGGCTCAGTCCCAACATGGCTAAGAGGT
AAT3	CCCACCTTCCCCTCTCTCCAaggCAAATggg

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

La température de fusion ou de dénaturation (melting température T_m) des amorces doit être suffisamment élevée (au minimum 55 °C) quand cela est possible. Plus le T_m d'une amorce est élevé, moins le risque d'hybridation non spécifique est important ; il est donc important de dessiner des amorces à T_m élevée.

La différence de T_m entre les deux amorces (A ou sens et B ou antisens) ne devra pas être trop importante : $T_m A - T_m B < 5$ °C.

Pour calculer le T_m d'une amorce, on pourra s'aider de la formule suivante :

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

Cette formule, valable pour des amorces de taille inférieure à 25 nucléotides, est cependant approximative.

La température d'hybridation est égale à la T_m moins 5 °C ($T^\circ \text{ hybridation} = T_m - 5^\circ\text{C}$). Une température d'hybridation trop basse risque de donner des hybridations non spécifiques.

- **Concentration des chlorures de magnésium**

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

Nous avons utilisé une solution de $MgCl_2$ à 25 mM et nous avons réalisé une gamme de $MgCl_2$.

- ✚ **Problèmes rencontrés au cours de la réaction de PCR**

- Bandes parasites : Les bandes parasites sont le reflet d'un manque de spécificité et probablement de sensibilité.
- En front de migration : Ce sont des dimères d'amorce. Il faut revoir le choix des amorces et les conditions expérimentales de la PCR.
- Un aspect en frottis ou smears sur le gel : peut-être lié à une mauvaise optimisation, mais il faut toutefois envisager, préalablement à toute remise en question du protocole expérimental, deux causes fréquentes : à savoir une quantité d'ADN trop importante dans le mélange réactionnel et / ou un programme comportant trop de cycles. Il faut à priori éviter de dépasser plus de 40 cycles.
- Des bandes parasites peuvent apparaître en raison de mauvaises conditions initiales d'hybridation à basse température.

Détection des contaminations

La PCR est une technique très sensible. La contamination est le risque majeur et permanent de la PCR. Pour réaliser une PCR, plusieurs précautions sont donc à prendre :

- Il est nécessaires d'insérer des contrôles dans des séries d'analyse par PCR, pour vérifier la qualité et les performances du test et détecter certaines anomalies risquant d'invalider le résultat.
- Fractionner les réactifs en fractions aliquotés de petit volume.
- Ne pas hésiter à jeter tout réactif suspect.
- Stériliser les tampons, les pointes de pipettes, les tubes.
- Décontaminer les pipettes à l'eau de javel diluée.
- Ne pas oublier d'irradier aux UV la zone de travail pendant environ 15 mn une fois le travail terminé.
- Se servir de pipettes utilisant des pointes à filtre jetables.

Validation du test

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

- **Contrôle négatif**

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

- **Contrôle positif**

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

- **Marqueur de taille**

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

Réalisation pratique de l'amplification par PCR

Préparation de l'échantillon d'ADN sous forme d'une solution de travail adéquate et vérification que tous les réactifs nécessaires sont disponibles, et en quantité suffisante pour amplifier l'exon 10 du gène CFTR.

Les différentes solutions doivent être préparées sous une hotte à ADN stérile. Les amorces sont fournies sous forme lyophilisée, et les DNTP sous forme de flacons de solution

mère contenant 100 mM de chaque dNTP. Ces réactifs sont préparés selon les concentrations suivantes :

Tableau 6 : Concentration des réactifs de la PCR.

Solution de travail	Concentration
ADN	100 ng/μl
Amorces	25 pmol /μl
dNTP	2.5 mM

- **Préparation des Mix PCR**

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

La composition du Mix est la suivante :

Tableau 7 : Composition du mix de la PCR.

Réactifs	Quantité Volume
	45 μl
Tampon 10X	5 μl
MgCl ₂ 25 mM	2μl
dNTP 2.5 mM	5 μl
DF-C (25 pmol) : 1μl (tube A/B amorce commune)	1 μl
DF-j-N (25 pmol) : 1μl (tube A amorce normale)	1 μl
DF-w-M (43pmol) : 2μl (tube B amorce mutée)	1 μl
AAT4 (43 pmol) : 1μl (tube A/B amorce exon contrôle interne)	1 μl
AAT3 (43pmol) : 1μl (tube A/B amorce exon contrôle interne)	1 μl
ADN (250 ng/μl)	1 μl
H2O	30 μl

Le mélange réactionnel standard ARMS contient 43 pmoles de chacune des amorces concernées et 4.3 mM de dNTP (dATP, dCTP, dGTP et TTP, Pharmacia) dans du tampon de réaction (KCl 43 mM, Tris HCl 8,6 mM [pH 8,3], MgCl₂ 1,0 mM et gélatine 0,008%). Le mélange réactionnel (45ul) contenant tous les composants à l'exception de l'enzyme est chauffé à 94 ° C pendant 5 minutes dans un thermocycler.

Après l'addition de l'enzyme 0.3 microlitre de Taq ADN polymérase dans 5µl de tampon de réaction. Ces mélanges sont distribués dans des microtubes à PCR fixés sur une plaque porte-microtubes.

Un gène de contrôle témoin d'une amplification est utilisé (Amorces AAT3 et AAT4).

- **Programme du thermocycler**

Les microtubes sont placés dans un thermocycler qui sera programme comme suit:

Pour l'exon : 10	
- 95°C pendant 5 mn	
- 95°C pendant 2mn	} 35 fois
- 60°C pendant 2 mn	
- 72°C pendant 2mn	
- 72°C pendant 10mn	

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

IX.2.2.3. Contrôle par électrophorèse des produits de PCR des différents exons

- **Principe de la technique**

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

- **Le gel d'agarose**

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

- **Tampon d'électrophorèse**

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

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

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

Les produits de PCR sont préparés pour être déposés, avec une pipette de précision, sur gel d'agarose. Le gel d'agarose est placé avec son support ou plateau dans une cuve d'électrophorèse. Le gel placé dans la cuve sera totalement immergé, en positionnant les puits du côté de la cathode pôle noir.

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

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

- **La migration**

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

- **Visualisation des produits de PCR**

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

Dans ces conditions, l'exposition du gel à un rayonnement UV de 312 nm permet la fluorescence du BET lié à l'ADN.

Cette technique permet de repérer et de situer les différents fragments ayant migrés par rapport au marqueur de taille moléculaire.

X. Résultats

X.1 répartition des patients selon le sexe

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

Tableau 8 : Répartition des patients selon le sexe.

Sexe	Nombres	Pourcentage
Masculin	604	54%
Féminin	509	46%

X.2. Répartition des patients selon l'âge au moment de la découverte de la maladie

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

Tableau 9 : Répartition des patients selon l'âge au moment de la découverte de la maladie.

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

X.3. Répartition des patients selon les wilayas

Tableau 10 : Répartition des patients selon les wilayas.

Régions	Nombres de cas	Pourcentage
Constantine	309	27.76%
Oum bouaghi	86	7.72%
Mila	84	7.54%
Batna	75	6.74%
Skikda	67	6.01%
Annaba	60	5.39%

Guelma	42	3.77%
Jijel	31	2.78%
Tébessa	30	2.69%
Khanchla	24	2.15%
Biskra	9	0.81%
Oued souf	9	0.81%
Souk ahrass	6	0.54%
Taraf	6	0.54%
Bourdj bouariridj	3	0.27%
Ouargla	3	0.27%
Ilizi	2	0.18%
Msila	2	0.18%
Sidi bel aabes	2	0.18%
Blida	1	0.09%
Laghouat	1	0.09%
Bechar	1	0.09%
Tlemcen	1	0.09%
Indéterminé	259	23.27%

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

X.4. Répartition des patients selon les signes cliniques

Les demandes ont été motivées pour des symptômes respiratoires dans 58,22% des cas, digestifs 18% et nutritionnel dans 17,45%. Les autres manifestations cliniques sont faiblement représentées.

Tableau 11 : Répartition des patients selon les signes cliniques.

Signes cliniques	Nombres de cas	Pourcentage
Problèmes respiratoires	637	58.22%
Diarrhée Chroniques/ Stéatorrhée/ Malabsorption	197	18%
Retard de croissance / Malnutrition	191	17.45%
Atteintes Hépatiques/ Ictère/ Hypertension portale/ Cirrhose	53	4.84%
Prolapsus rectal	8	0.73%
Déshydratation/ troubles électrolytique	5	0.46%
Iléus méconial	2	0.18%
Autres	1	0.09%

X.5. Répartition des patients selon le type de mariage

Tableau 12 : Répartition des patients selon le type de mariage.

Type de mariage	Nombres	Pourcentage
Consanguins	347	31.18%
Non consanguins	766	68.82%

31.18% de nos patients sont issus de mariages consanguins et 68.82% ont des parents non consanguins.

X.6. Résultats du test de la sueur

Tableau 13 : Résultats du test de la sueur.

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

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

X.7. Résultats des cas positifs selon le sexe

Tableau 14 : Résultats du test de la sueur.

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

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

X.8. Résultats des cas positifs selon les wilayas

Tableau 15 : Résultats des cas positifs selon les wilayas.

Région	Nombre des cas positifs	Pourcentage
Constantine	16	24%
Batna	13	19%
Oum bouaghi	9	13%
Annaba	5	7%
Khanchla	5	7%
Mila	4	6%

Tebessa	4	6%
Skikda	3	4%
Ain mlila	3	4%
Sétif	2	3%
Jijel	1	1%
Biskra	1	1%
Oued souf	1	1%

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

X.9. Répartition des cas positifs selon la consanguinité

Tableau 16 : Répartition des cas positifs selon la consanguinité.

Type de mariage	Nombres de cas positifs	Pourcentage
Consanguin	22	33%
non consanguin	40	60%
Indéterminé	5	7%

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

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

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

Le nouveau mélange réactionnel standard ARMS contient 25 pmoles de chacune des amorces concernées et 2.5 mM de dNTP (dATP, dCTP, dGTP et TTP, Pharmacia) dans du tampon de réaction (KCl 43 mM, Tris HCl 8,6 mM [pH 8,3], MgCl₂ 1,0 mM et gélatine 0,008%). Le mélange réactionnel (45ul) contenant tous les composants à l'exception de l'enzyme est chauffé à 94 ° C pendant 5 minutes dans un thermocycler.

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

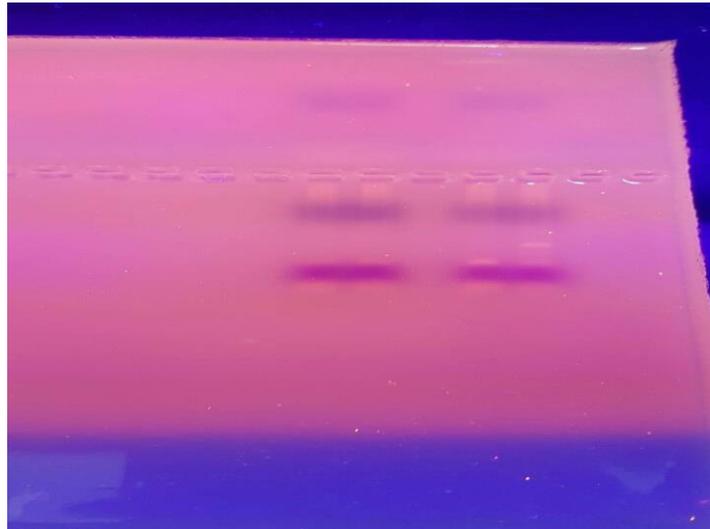


Figure 28 : Gel d'agarose des produits de la réaction de PCR de l'exon 10 du gène CFTR ARMS normale.

XI. Discussion

Au cours de ces 20 dernières années, l'amélioration de la prise en charge de la mucoviscidose ainsi que le développement des moyens de diagnostics ont permis d'augmenter considérablement l'espérance de vie des patients.

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

La sensibilité du test de la sueur est de 98%, sa spécificité est de 83% et sa valeur prédictive positive est de 99.5% [104].

Selon la technique de Gibson et Cooke [105], lorsque la concentration en Cl^- est supérieure à 60 mEq/l le test est positif. Il doit être positif à deux reprises pour affirmer le diagnostic de la mucoviscidose. Alors que pour une concentration inférieure à 40 mmol/l, le test est normal. Chez les nourrissons de moins de 6 mois, une concentration en Cl^- qui est inférieure à 30 mmol/l, révèle un test négatif.

Ce seuil a été défini initialement grâce à l'étude historique de Shwachman [106], puis par celle de Lenoir G [107] qui a aussi retrouvé une discrimination très nette entre les valeurs sujets malades et sains. La répétition de ce test est nécessaire pour la confirmation du diagnostic de CF [108].

Entre 40 et 60 mEq/l le test est douteux, il faudra également le répéter. Récemment l'European cystic fibrosis diagnostic working group [109,110] a reconsidéré ces valeurs et a recommandé de considérer comme nouvelles valeurs limites pour le chlore 30 et 60 mEq/l. Lorsque le taux est inférieur à 30 mEq/l le test est négatif.

A Constantine, les premiers travaux ont commencé en 2011 avec l'installation du test de la sueur, 1051 tests réalisés chez 1113 patients suspects de mucoviscidose.

Le laboratoire a réalisé 159.28 tests par année, ce qui dépasse largement le nombre exigé par les directives internationales à savoir un minimum de 50 tests par an. Ce chiffre dépasse celui qui a été réalisé à l'hôpital Beni Messous d'Alger durant la période 1995-2002 [111].

La mucoviscidose est une affection rare mais non exceptionnelle dans notre pays. Une nette augmentation du nombre de patients diagnostiqués est observée grâce à la sensibilisation des praticiens et au développement des moyens du diagnostic. Dans notre étude, le diagnostic a été évoqué devant la positivité du test de la sueur.

Durant la période 2011-2018, il a été réalisé 1113 tests chez 1051 patients âgés de quelques jours à plus de 20 ans. Ce test est revenu positif chez quatre-vingt et onze patients avec une fréquence de 8%.

Ce test a été motivé pour des signes respiratoires au premier plan suivi des signes intestinaux, du retard de croissance /malnutrition, des signes hépatiques, des cas d'obstruction intestinale, d'iléus méconial puis des autres manifestations cliniques.

Les patients ayant un test positif, présentent une altération au niveau des canaux Cl⁻/CFTR ce qui rend impossible l'absorption du chlore au niveau des canaux excréteurs. Dans ces conditions, la concentration en NaCl s'élève dans la sueur. Le diagnostic de mucoviscidose a été confirmé par un 2^{ème} test [112] chez les 91 patients (8%).

Globalement, il n'y a pas de chiffre précis concernant la prévalence de la CF en Afrique du nord. En Algérie, en Tunisie et au Maroc, les seules données disponibles sont celles de quelques études de détection de mutations du gène CFTR qui ont été réalisées sur des effectifs réduits [113], celles concernant les patients d'origine Maghrébine vivant en Europe, les résultats de l'étude oranaise [114] qui a recensé 29 cas et ceux de l'étude Algéroise [115] qui a parlé de 180 cas enregistrés dans toute l'Algérie.

Selon le bilan des données 2013 du registre Français de la mucoviscidose, 6329 patients ont été recensés [116].

Aux USA, en 2011, le nombre de malades a été estimé à environ 30 000 et au monde entier, il est de 70 000 [116].

Nous avons constaté qu'il n'y a aucun rapport entre les taux de chlore dans la sueur et la sévérité de la maladie ce qui est en accord avec les données de la littérature [116,117].

L'étude des résultats entre les deux tests d'un même enfant a montré une bonne corrélation ($r=0.7$), $p<0.01$). Les taux moyens de chlore sudoral variaient de 5–140 mEq/l.

Les fréquences élevées des tests positifs étaient de Constantine et Oum Bouaghi. Elle doit faire évoquer un effet fondateur.

Deux pourcent (2%) de nos patients ont présenté des taux de chlorures intermédiaires ou douteux. En effet, ces taux n'excluent pas une mucoviscidose car certains cas authentiques de mucoviscidose présentent une concentration sudorale de Cl < 40 mEq/l. C'est le plus souvent le cas de patients adultes suffisants pancréatiques, ou d'hétérozygotes simples qui présentent une concentration sudorale de chlore plus élevée, d'une déviation standard en moyenne par rapport aux sujets sains (entre 15 et 40 mmol/l Cl), mais cette différence n'est pas suffisante pour les identifier [118,119].

Dans ces cas une étude génétique du gène *CFTR* sera proposée car certaines mutations sont en effet associées à des résultats négatifs ou intermédiaires : 3849+10kbC>T, 3849+10kbC>T, R117H, G551S, A455E, D1152H, IVS8(5T), L206W, 2789+5G>A ou A455E.

Pour faire la part des choses, les tests permettant l'exploration fonctionnelle de la protéine CFTR et la mesure de la DDP transépithéliale sur épithélium nasal ou rectal seront utiles. Cependant, certaines pathologies peuvent induire une augmentation des chlorures sudoraux en dehors de la mucoviscidose, tels les troubles hydroélectrolytiques généraux, la malnutrition, la présence d'œdèmes, ou certaines affections cutanées exsudatives comme l'eczéma. Il faut alors différer le test. L'incidence des faux positifs serait de 15 % [120].

Chez neuf cent trente-cinq (935) patients, soit un taux de 84%, le test est revenu normal, avec une moyenne de 5.65 à 30 mEq/l. Une concentration sudorale de chlorures < 30 mEq/l, élimine à priori une CF chez le nourrisson de moins de 6 mois. Il pourrait s'agir de forme dite modérée ou de sujets non mucoviscidosiques.

L'incidence des faux négatifs du test de la sueur serait de l'ordre de 12 % [121,122] et varierait selon les méthodes [123]. Ces causes sont le plus souvent un séchage insuffisant de la peau, et surtout un débit de sueur insuffisant [124].

Le choix de 30 mEq/l de Cl est principalement basé sur le fait que cette valeur représente +2 DS par rapport à la moyenne des nourrissons hétérozygotes F508del et +4 DS au-dessus de celle des nourrissons non porteurs de mutations [125, 126,127,128].

Cependant un test de la sueur négatif avec une symptomatologie clinique franche n'exclue pas une forme modérée de CF, il sera proposé une étude génétique du gène CF.

Dans notre étude, la récolte d'un taux élevé de sueur n'oriente pas vers une mucoviscidose. Il n'existe pas de différence significative entre le poids de la sueur des patients atteints de mucoviscidose et des autres patients non mucoviscidosiques.

La mucoviscidose affecte autant les garçons que les filles, cependant, nous avons noté une légère prédominance masculine de la maladie.

L'âge moyen des patients ayant présenté un test positif au moment du diagnostic est de quelques jours à 12 mois. En effet l'âge au diagnostic de la maladie est variable. Le diagnostic est posé dans 70% des cas avant l'âge de un an, 86% des cas avant l'âge de 5 ans et dans 7% des cas à 10 ans ou plus tard [129].

Selon les études Algériennes, les premiers signes apparaissent à 3 mois et la médiane de délai diagnostic est de 2ans [115] de plus, la maladie peut être diagnostiquée dès la naissance par un iléus méconial.

La majorité de nos patients sont âgés de quelques jours à 12 mois (46%). En effet, l'âge est variable, la maladie peut être diagnostiquée dès la naissance par un iléus méconial, ou même chez le fœtus dès le deuxième trimestre par une hyperechogénicité intestinale qui pourrait être associée à des images de dilatation intestinale évocatrice d'une obstruction digestive, ou à une absence de la vésicule biliaire.

Le diagnostic peut être affirmé tardivement pendant l'enfance (38% de nos patients sont âgés de 1 à 5 ans, et 9% sont de 5 à 10 ans), à l'adolescence ou bien à l'âge adulte.

Nous avons noté une prédominance masculine chez nos patients. La CF est une maladie autosomique récessive, les deux sexes sont atteints de façon égale mais aléatoire. Ce résultat est en accord avec de nombreuses études mais reste sans explication.

31.18% de nos patients mucoviscidosique sont issus de mariages consanguins (consanguinité élevée en Algérie) en effet la consanguinité augmente le risque de survenu de maladie autosomiques récessives comme la mucoviscidose.

La présence d'un deuxième cas de mucoviscidose dans la fratrie et la mortalité dans la fratrie représentent des critères important pour le diagnostic de la CF [130]

L'atteinte respiratoire était présente dans 58,22% des cas. L'atteinte respiratoire domine le tableau clinique et conditionne la morbimortalité .Elle est responsable de plus des deux tiers des décès. Elle se manifeste souvent dans l'enfance dans plus de de 80% des cas au cours de la première année de vie [131].

L'iléus méconial a été retrouvé chez nos patients. En effet, l'iléus méconial révèle la maladie dans 15% des cas [132]. Une constipation est parfois associée à un prolapsus rectal fréquent chez le petit enfant au moment de l'apprentissage de la propreté [133].

L'insuffisance nutritionnelle et le retard staturopondéral sont constants à un stade évolué de la maladie. Ils résultent de la conjonction de pertes énergétiques par mal digestion des graisses et des vitamines liposolubles. L'état nutritionnel est un élément clinique majeur de la surveillance, du pronostic et de la prise en charge de la maladie [134].

L'atteinte hépatique apparaît généralement avant l'âge de dix ans et sa fréquence, de l'ordre de 4,84 %, ne semble pas augmenter avec l'allongement de la survie des patients [135].

Une hépatomégalie et une cholestase biologique sont fréquentes, mais une cirrhose biliaire ne se développe que chez 5 à 10% des patients.

La déshydratation aigue compliquée souvent d'un syndrome de perte de sel sudoral à l'occasion d'un coup de chaleur ou d'une hyperthermie.

Le test de la sueur est un acte de biologie médicale et sa réalisation est soumise au respect du guide de bonne exécution des analyses (GBEA) [136].

L'atteinte respiratoire domine le tableau clinique, 58% de nos patients souffrent de problèmes pulmonaires : infection endobronchique chronique, inflammation, et une obstruction des voies aériennes. Elle se manifeste souvent dans l'enfance, dans plus de 80% des cas au cours de la première année de vie [34].

La diarrhée chronique et le retard de croissance se présentent respectivement chez 18% et 17,45% de nos patients. En effet, 4,84% des patients ont une atteinte hépatique et seulement 0.73% souffrent d'un prolapsus rectal.

Tous les patients ayant présenté le test positif, ont bénéficié d'un prélèvement en vue d'une étude génétique.

Le but de la deuxième partie de l'étude était de développer le diagnostic moléculaire de la mucoviscidose par un test ARMS unique spécifique pour les mutations delta F508 du gène CFTR. Nous avons utilisé comme référence l'article publié par Richard M. Ferrie [103].

Au cours du développement de la technique, les conditions de la réaction PCR n'ont pas été maintenues identiques à celles de l'article. La température d'hybridation a été ajustée à 56.5°C et la concentration des amorces a été diluée à 25 pmol/μl et la concentration de dNTP ajustée à 2.5mM pour tout le test ARMS.

Nous allons continuer à développer ce test pour la version muté du gène contenant la delta F 508. Puisque par manque de temps une partie du test uniquement a été développé.

Ce test développé sera utilisé pour la recherche de la delta F508 aussi bien chez les patients homozygotes que pour les porteurs hétérozygotes et même pour un diagnostic prénatal.

La multiplex ARMS est particulièrement utile dans cette situation, car elle permet une évaluation précise du risque de CF chez les patients et le fœtus rapidement.

XII. Conclusion

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

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

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

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

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

Références bibliographiques

- [1] Welsh MJ, Ramsey BW, Accurso F, Cutting GR. Cystic fibrosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *Metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. pp. 5121-5188. New York : McGraw-Hill, 2001 : 5121-88.
- [2] Di Sant'Agnesse PA, Darling RC, Perera GA, et al. Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas; clinical significance and relationship to the disease. *Pediatrics* 1953; 12:549-63.
- [3] Gonska T, Ip W, Turner D, et al. Sweat gland bioelectrics differ in cystic fibrosis: a new concept for potential diagnosis and assessment of CFTR function in cystic fibrosis. *Thorax* 2009; 64:932-8.
- [4] Munck A, Dhondt JL, Sahler C, et al. Implementation of the French nationwide cystic fibrosis newborn screening program. *J Pediatr* 2008;153:228-33.
- [5] Roussey M, Munck A. Questions soulevées et réponses apportées depuis la généralisation du dépistage néonatal de la mucoviscidose en France. *Arch Pediatr* 2009;16:540-2.
- [6] Coakley J, Scott S, Mackay R, et al. Sweat testing for cystic fibrosis: standards of performance in Australasia. *Ann Clin Biochem* 2009;46:332-7.
- [7] Carpentier., A. Modification du tropisme de vecteurs pseudoviraux dérivés des papillomavirus pour l'application aux thérapies pulmonaires. Thèse de doctorat : Science de la Vie et de la Santé :Université François Rabelais de Tours,2012, 6p.
- [8] ANGELOT., F. Pathologies associées aux mutations et polymorphismes du gène cystic fibrosis transmembrane conductance regulator ou CFTR. Thèse de doctorat : Pharmacie : Université de Franche Comté, 2005, 9p.
- [9] Romey MC.2006.Caractérisation fonctionnelle de mutants CFTR naturels : intérêt pour la mucoviscidose. *Ann Biol Clin*.64(5) :429-38.
- [10] Sermet-Gaudelus I, Lenoir G. Mucoviscidose: de la physiopathologie aux nouvelles thérapies. *Arch. Pédiatrie Organe Off. Société Française Pédiatrie*. mai 2012;19 Suppl 1:S1 -.
- [11] Davis PB. Cystic fibrosis since 1938. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 1 mars 2006; 173(5):475-482.
- [12] ANDERSEN, D.H., HODGES, R.G., 1946. Celiac syndrome; genetics of cystic fibrosis of the pancreas, with a consideration of etiology. *Am J Dis Child* 72, 62-80.
- [13] Di Sant'Agnesse PA, Darling RC, Perera GA, Shea E. Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas; clinical significance and relationship to the disease. *Pediatrics*. nov 1953;12(5):549-563.
- [14] Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics*. Mars 1959;23(3):545-549.
- [15] Knoweles M.R., Carson J.L., Collier A.M., Gatzky J.T. Measurements of nasal transépithélial electric potential differences in normal human subjects in vivo *Am Rev Respir Dis* 1981; 124; 484-90.
- [16] Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989;245:1059-65.

- [17] Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N et al. Identification of cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245:1066–73.
- [18] Anderson, MP.; Rich, DP.; Gregory, RJ.; Smith, AE.; and Welsh, MJ.; (1991). Generation of cAMP- activated chloride current by expression of CFTR.
- [19] GROS C. Traitement de l'infection à *Pseudomonas aeruginosa* dans la mucoviscidose : état actuel et perspective. Thèse de doctorat: pharmacie : Université de Nantes faculté de pharmacie, 2012, 22p.
- [20] Bobadilla JL, Macek M, Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat.* 2002; 19(6):575-606.
- [21] Vaincre la mucoviscidose ; Centres de référence maladies rares et mucoviscidose ; Novembre 2010 page 127.
- [22] Loumi O, Ferec C, Mercier B, Creff J, Fercot B, Denine R, et al. CFTR mutation in Algerian population. *J cyst fibros.* 2008 Jan ; 7(1) :54-9.
- [23] Fredj SH, Messaoud T, Templin C, des Georges M, Fattoum S, Claustres M. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutation spectrum in patients with cystic fibrosis in Tunisia. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2009 Oct; 13(5): 577-81.
- [24] Ratbi I, Genin E, Legendre M, Le Flosch A, Costa C, Cherkaoui Deqqaqi S, et al. Cystic fibrosis carrier frequency and estimated prevalence of the disease in Morocco. *J Cyst Fibros.* 2008 sep ; 7(5) :440-3.
- [25] World Health Organization. The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis, 2004. Disponible sur: <http://www.who.int/genomics/publications/en/>. (Consulté le 22/03/2017).
- [26] BERTRAND., J. Approches pharmacologiques de CFTR et de CaCC dans la mucoviscidose. Thèse de doctorat : biologie santé. Université de Poitiers, 2006, 24p.
- [27] BOSSARD., F. La mucoviscidose : Correction de la mutation DF508 par surexpression de NHE-RF1 ; Modifications d'expression de NHE-RF1 et des récepteurs b-adrénergiques dans les poumons humains. Thèse de doctorat : biologie. Université de Nantes, 2007, 2-93p.
- [28] FARHAT., R. Multiples conséquences physiopathologiques de mutations et d'allèles complexes du gène CFTR : l'importance des études génétique, moléculaire, cellulaire & in silico dans la détermination de l'impact de ces variations sur l'épissage et la protéine. Thèse de doctorat : Biologie santé. Université de Poitiers, 2014, 4-26p.
- [29] Marie G. Transfert de la pédiatrie à l'adulte de patients atteints de mucoviscidose: le vécu des patients et des équipes au CHU de Nice. *Médecine humaine et pathologie.* 2013.
- [30] YAHIA., M. Diagnostic, physiopathologie et génétique de la mucoviscidose dans la population de l'Est et sud Algérien [gène CFTR et l'absence bilatérale des canaux déférents(ABCD)]. Thèse de doctorat : physiologie animale. Université Mentouri Constantine, 2007, 19-24p.
- [31] SAUSSEREAU., E. Utilisation des bactériophages comme thérapie lors d'une infection à *Pseudomonas aeruginosa* dans le cadre de la mucoviscidose : efficacité et innocuité. Thèse de doctorat : physiologie et physiopathologie. Université Pierre et Marie Curie, 2012, 29p.
- [32] SEDIKI., FZ. Etude génétique de la mucoviscidose dans un échantillon de la population Algérienne. Thèse de doctorat : Biologie moléculaire. Université Mohamed Boudiaf d'Oran, 2015, 9-35p.

- [33] C. Knoop, M. Dumonceaux, B. Rondelet, M. Estenne. 2010. Complications de la transplantation pulmonaire : complications médicales. *4(27) : 365-382.*
- [34] Knowles MR, Boucher RC. La clairance du mucus en tant que mécanisme principal de défense innée des voies respiratoires chez les mammifères. *J Clin Invest* 2002; 109 : 571-577.
- [35] Dray X, Bienvenu T, Desmazes-Dufeu N, Dusser D, Marteau P, Hubert D. Syndrome d'obstruction intestinale distale chez les adultes atteints de fibrose kystique. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2 : 498-503.
- [36] De Boeck K, Weren M, Proesmans M, Kerem E. Pancréatite chez les patients atteints de fibrose kystique: corrélation avec le statut pancréatique et le génotype. *Pédiatrie* 2005; 115 : e463-e469.
- [37] Braude S, Kennedy H, Hodson M, Batten J (1984) Hypertrophic osteoarthropathy in cystic fibrosis. *Br Med J (Clin Res Ed)* 288: 822-823.
- [38] Neri AS, Lori I, Taccetti G, Festini F, de Martino M, Masi L, Brandi ML (2006) Alteration of bone mineral density in cystic fibrosis adults. *Chest* 130: 1952-1953; author reply 1953.
- [39] Paccou J, Zeboulon N, Combescure C, Gossec L, Cortet B (2010) The prevalence of osteoporosis, osteopenia, and fractures among adults with cystic fibrosis: a systematic literature review with meta-analysis. *Calcified tissue international* 86: 1-7.
- [40] Yoshimura K, Akamura H, Trapnell BC, Dalemans W, Pavirani A, Lecocq JP, Crystal RG. The cystic fibrosis gene has «housekeeping»-type promoter and is expressed at low levels in cells of epithelia origin. *J Biol Chem* 1991; 266: 9140-4.
- [41] Chou JL, Rozmahel R, Tsui LC. Characterization of the promoter region of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *J Biol Chem* 1991; 266: 24471-6.
- [42] Koh J, Sferra TJ, Collins FS. Characterization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator promoter region. *J Biol Chem* 1993; 268: 15912-21.
- [43] Jordan BR. Ilots HTF : le gène annoncé. *médecine/sciences* 1991; 7: 153-60.
- [44] Lewandowska M., Costa F.F., Bischof J.M., et al., 2010. Multiple mechanisms influence regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene promoter. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 43(3) : 334-341.
- [45] Hinzpeter A., de Becdelièvre A., Bieth E., et al., 2014. Identification of a novel 5' alternative CFTR mRNA isoform in a patient with nasal polyposis and CFTR mutations. *Human mutation* 35(7) : 805–808.
- [46] BECDELIEVRE., A. Contribution à l'amélioration des connaissances sur la relation génotype-phénotype dans la mucoviscidose et caractérisation phénotypique de l'inflammation pulmonaire. Thèse de doctorat : génétique humaine. Université Paris-Est t-Val de Marne, 2011, 13-31p.
- [47] BONINI., J. Identification d'éléments régulateurs du gène CFTR et applications pour la mucoviscidose. Thèse de doctorat : génétique moléculaire. Université Montpellier, 2015, 27p.
- [48] Loumi, O., Ferec, C., Mercier, B., Creff, J., Fercot, B., Denine, R. and Grangaud, J.P.(2008) CFTR mutations in the Algerian population. *Journal of Cystic Fibrosis*, 7, 54-59.
- [49] Green RE, Lewis BP, Hillman RT, Blanchette M, Lareau LF, Garnett AT, et al. Widespread predicted nonsense-mediated mRNA decay of alternatively-spliced transcripts of human normal and disease genes. *Bioinformatics*. 2003;19 Suppl 1:i118-21.
- [50] Wang GS, Cooper TA. Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nat Rev Genet*. 2007;8(10):749-61.

- [51] CARPENTIER., A. Modification du tropisme de vecteurs pseudoviraux dérivés des papillomavirus pour l'application aux thérapies pulmonaires. Thèse de doctorat : Sciences de la Vie et de la Santé. Université François – Rabelais De Tours, 2012, 15-16p.
- [52] Boukari R, Smati L, Benhalla KN, Redjala O, Boufersaoui A, Benhasine F, et al. Cystic fibrosis in Algeria: clinical spectrum and genotypic data. *J cyst Fibros.* 2006 ;5 suppl 1:S302. Et Loumia, O., Ferec, C., Mercier, B., Creff, J., Fercot, B., Denine, R. and Grangaud, J.P. (2008) CFTR mutations in the Algerian population. *Journal of Cystic Fibrosis*, 7, 54-59.
- [53] Messaoud T, Bel Haj Fredj S, Bibi A, Elion J, Ferec C, Fattoum Épidémiologie moléculaire de la mucoviscidose en tunisie. *Ann Biol Clin (Paris).* 2005 Nov-Dec ;36(6) :627-30.
- [54] Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, et al. Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* 1990 ; 346 : 362-5.
- [55] Mourez M, Jehanno M, Hofnung M, Dassa E. Rôle, fonctionnement et structure des transporteurs à ATP binding cassette (ABC). *Médecine/sciences.n°3(16) :386-94.*
- [56] Gally., F. Etude structure/fonction d'une protéine ABC : sur, le récepteur des sulfonyleures. Thèse de doctorat : Génie Biologique et Médical : Université JOSEPH FOURIER, 2005, 23-24p.
- [57] Vergani P, Lockless SW, Nairn AC, Gadsby DC. CFTR channel opening by ATP-driven tight dimerization of its nucleotide-binding domains. *Nature.* 2005;433(7028):876-80.
- [58] Baker JM, Hudson RP, Kanelis V, Choy WY, Thibodeau PH, Thomas PJ, et al. CFTR regulatory region interacts with NBD1 predominantly via multiple transient helices. *Nat Struct Mol Biol.* 2007;14(8):738-45. et Riordan JR. CFTR function and prospects for therapy. *Annu Rev Biochem.* 2008;77:701-26.
- [59] BENJAMIN., B. Synthèse et évaluation de modulateurs de la protéine CFTR. Thèse de doctorat : science de médicament. Université Joseph Fourier, Grenoble I, 2008, 20-29p.
- [60] NGUYEN., T. Fonction de CFTR dans les processus de réparation de l'épithélium des voies aériennes et développement de nouvelles stratégies thérapeutiques en fibrose kystique. Thèse de doctorat : science biomédicale. Université de Montréal, 2014, 2-3p.
- [61] BOUAZZI., S. Implications de la Phosphatidylcholine phospholipase C, des transporteurs de dipeptides et de la cobalamine dans le processus inflammatoire. Application à l'étude de la mucoviscidose. Thèse de doctorat : biologie santé et environnement. Université de Lorraine, 2013, 68p.
- [62] MICOUD., J. Rôles des interactions interdomaines dans le comportement cellulaire de la protéine CFTR. Thèse de doctorat : Biologie Cellulaire. Université Joseph Fourier, Grenoble 1, 2008, 15-34p.
- [63] Fiel SB. Clinical management of pulmonary disease in cystic fibrosis. *Lancet.* 1993; 341(8852):1070-4.
- [64] Bobadilla JL, Macek M, Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat.* 2002;19(6):575-606.
- [65] Bienvenu T. Les bases moléculaires de l'hétérogénéité phénotypique dans la mucoviscidose. *L'essentiel de l'information scientifique et médicale.* 1997, 55(2):113-121.

- [66] Kerem E, Corey M, Kerem BS, Rommens J, Markiewicz D, Levison H, et al. The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis--analysis of the most common mutation (delta F508). *N Engl J Med.* 1990;323(22):1517-22.
- [67] Férec C, Mercier B, Audrézet MP. : Les mutations de la mucoviscidose : du génotype au phénotype. *Médecine/Sciences* 1994;10:631-9.
- [68] Kiesewetter S, Macek M, Davis C, Curristin SM, Chu CS, Graham C, et al. A mutation in CFTR produces different phenotypes depending on chromosomal background. *Nat Genet.*1993;5(3):274-8.
- [69] RAVE-HAREL N, KEREM E, NISSIM-RAFINIA M, MADJAR I, GOSHEN R, AUGARTEN A, RAHAT A, HURWITZ A, DARVASI A, KEREM B. The molecular basis of partial penetrance of splicing mutations in cystic fibrosis. *Am J Hum Genet.* 1997, 60, 87-94.
- [70] BREPSON., C. PRISE EN CHARGE DES ENFANTS ATTEINTS DE MUCOVISCIDOSE, DEPISTES A LA NAISSANCE, A L'HOPITAL D'ENFANTS A NANCY. Thèse de doctorat : pharmacie. Université Henri Poincaré – Nancy 1, 2010,41p.
- [71] MOISON., S. Etude des mécanismes de régulation à distance du gène CFTR. Thèse de doctorat : génétique génomique fonctionnelle et biotechnologies. Université Bretagne Occidentale, 2014, 78p.
- [72] RADOUI., A. La mucoviscidose de l'enfant « approche épidémiologique et étude clinique dans l'Ouest Algérien. Thèse de doctorat : science médicale. Université d'Oran, 2012, 33-58p.
- [73] R. Matran, T. Perez, V. Neve, S. Robin, R. Nevriere. 2003 Actualités sur les explorations diagnostiques de la mucoviscidose. *Des maladies respiratoires.* 2(20) : 21-25.
- [74] LEHENAFF., C. La protéine CFTR : Implication et cible thérapeutique dans la maladie osseuse chez les patients atteints de mucoviscidose. Thèse de doctorat : physiologie et physiopathologie. Université de reims champagne-ardenne, 2012,11p.
- [75] kits Cystic Fibrosis Genotyping Assay, Abbott ; Elucigene TMCF30 ; Gene-Probe ; INNO-Lipa CFTR, Innogenetics),
- [76] Drumm ML, Pope HA, Cliff WH, Rommens JM, Marvin SA, Tsui LC, Collins FS, Frizzell RA, Wilson JM. (1990) Correction of the cystic fibrosis defect in vitro by retrovirus-mediated gene transfer. *Cell* 62(6): 1227-33.
- [77] Knowles M, Gatzky J, Boucher R. (1983) Relative ion permeability of normal and cystic fibrosis nasal epithelium. *J Clin Invest* 71(5): 1410-7.
- [78] Harvey BG, Leopold PL, Hackett NR, Grasso TM, Williams PM, Tucker AL, Kaner RJ, Ferris B, Gonda I, Sweeney TD, Ramalingam R, Kovesdi I, Shak S, Crystal RG. (1999) Airway epithelial CFTR mRNA expression in cystic fibrosis patients after repetitive administration of a recombinant adenovirus. *J Clin Invest* 104(9): 1245-55.
- [79] Hyde SC, Southern KW, Gileadi U, Fitzjohn EM, Mofford KA, Waddell BE, Gooi HC, Goddard CA, Hannavy K, Smyth SE, Egan JJ, Sorgi FL, Huang L, Cuthbert AW, Evans MJ, Colledge WH, Higgins CF, Webb AK, Gill DR. (2000) Repeat administration of DNA/liposomes to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Ther* 7(13): 1156-65.
- [80] Revues périodiques de l'association "Vaincre la mucoviscidose", 2011. disponible sur: <https://sites.google.com/site/lamucoviscidoseettroislyceens/sommaire/iii-traitements-guerison-possible> (consulté le 08/07/2018)

- [81] The ZME Science newsletter. Massive database of of 1,500 stem cell lines derived from diseased cells set to aid drug development, 2005. Disponible sur : <https://www.zmescience.com/research/stembancc-project-1500-stem-cell-lines/>(consulté le 07/06/2018).
- [82]BOSSARD., F. La mucoviscidose : Correction de la mutation DF508 par sur-expression de NHE-RF1 ; Modifications d'expression de NHE-RF1 et des récepteurs b-adrénérgiques dans les poumons humains. Thèse de doctorat : Biologie. Université de NANTES, 2007, 78-93p.
- [83]Bruscia EM, Price JE, Cheng EC, Weiner S, Caputo C, Ferreira EC, Egan ME, Krause DS. (2006)Assessment of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) activity in CFTR-null mice after bone marrow transplantation. Proc Natl Acad Sci U S A 103(8): 2965-70.
- [84]Jauzein F. Soigner la mucoviscidose avec des cellules souches : un essai chez l'animal, 2008. Disponible sur : <https://www.magnard.fr/compagnons/svt/IMG/pdf/MucoviscidoseCellSouches.pdf> (Consulté le 07/08/2018).
- [85] Romey M C.2006.Caractérisation fonctionnelle de mutants CFTR naturels : intérêt pour la mucoviscidose .Annales de Biologie clinique.5(64) : 429-37.
- [86] Snouwaert JN, Brigman KK, Latour AM, Malouf NN, Boucher RC, Smithies O, Koller BH. : An animal model for cystic fibrosis made by gene targeting. Science 1992 ; 257 : 1083-8.
- [87] Egan ME. Quelle est l'utilité des modèles murins de fibrose kystique? Drug Discov Aujourd'hui Dis Modèles. 2009; 6: 35-41
- [88] Grubb BR, Boucher RC: Pathophysiology of gene-targeted mouse models for cystic fibrosis. Physiol Rev 1999; 79: s193-s214.
- [89] Hodges CAGL, Drumm ML, Clarke LL. Modèle de souris exprimant le CFTR humain pour tester des thérapies dirigées CFTR. Pediatr Pulmonol. 2016; 51 (Suppl 45): 115-193
- [90] Rogers CS, Abraham WM, Brogden KA, Engelhardt JF, Fisher JT, McCray PB, Jr, McLennan G, Meyerholz DK, Namati E, Ostedgaard LS, et al. Le poumon porcine comme un modèle potentiel pour la fibrose kystique. Am J Physiol Cellule pulmonaire Mol Physiol. 2008; 295 : 240-263.
- [91] Stoltz DA, Meyerholz DK, Pezzulo AA, Ramachandran S, député Rogan, Davis GJ, Hanfland RA, Wohlford-Lenane C, Dohrn CL, Bartlett JA, et al. Les porcs atteints de fibrose kystique développent une maladie pulmonaire et présentent une éradication bactérienne défectueuse à la naissance. Sci Transl Med. 2010; 2 : 29ra3.
- [92] Ostedgaard LS, Meyerholz DK, Chen JH, Pezzulo AA, Karp PH, Rokhlina T, Ernst SE, Hanfland RA, Reznikov LR, Ludwig PS, et al. La mutation delta F508 provoque un mauvais traitement CFTR et une maladie ressemblant à la fibrose kystique chez les porcs. Sci Transl Med. 2011; 3: 74ra24.
- [93] Chen JH, DA Stoltz, Karp PH, Ernst SE, Pezzulo AA, Moninger TO. Recteur MV, Reznikov LR, Launspach JL, Chaloner K, et al. La perte de transport d'anions sans augmentation de l'absorption de sodium caractérise l'épithélium des voies aériennes de la fibrose kystique porcine du nouveau-né. Cellule. 2010; 143 : 911-923.
- [94] GM, White MM, Browne N, McElvaney NG, EP Reeves. Modèles animaux de la pathologie de la mucoviscidose: parallèles phénotypiques et divergences. Biomed Res Int. 2016; 2016: 5258727.

- [95] Sun XS, Olivier AK, Liang B, Yi YL, Sui HS, Evans TIA, Zhang YL, Zhou WH, Tyler SR, Fisher JT, et al. Phénotype pulmonaire des furets juvéniles et adultes de la transmission de la conductance transmembranaire de la fibrose kystique. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014; 50 : 502-512.
- [96] Sun XS, Sui HS, Fisher JT, Yan ZY, Liu XM, Cho HJ, Joo NS, Zhang YL, Zhou WH, Yi YL, et al. Phénotype de la maladie d'un furet modèle CFTR-knockout de la fibrose kystique. *J Clin Invest*. 2010; 120 : 3149-3160.
- [97] Alexandra McCarron, Martin Donnelley, David Parsons. Airway disease phenotypes in animal models of cystic fibrosis. *Respiratory research*. 2018: 10.
- [98] McIntosh I, Raeburn JA, Curtis A, Brock DJ.: First-trimester prenatal diagnosis of cystic fibrosis by direct gene probing. *Lancet* 1989;2:972-3.
- [99] Fanconi G, Uehlinger E, Knauer C. Das : Coeliakiesyndrom bei angeborener zystischer Pankreasfibromatose und Bronchiektasien. *Wien Med Wochenschr* 1936;86:753-6.
- [100] FÉREC, Claude. Génétique médicale: La mucoviscidose : du gène CFTR au conseil génétique. Université Médicale Virtuelle Francophone, 2011, 5p.
- [101] Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N et al. Identification of cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989;245 :1066-73.
- [102] Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, et al (1989) Analysis of any point mutation in DNA: the amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 17:2503- 2516.
- [103] Ferrie RM, Schwarz MJ, Robertson NH, et al. Develop- ment, multiplexing and application of ARMS tests for common mutations in the CFTR gene. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 251–262.
- [104] Schwachman et Mahmoodian, 1981 Shwachman H, Mahmoodian A. Pilocarpine iontophoresis sweat testing results of seven years' experience. *Bibl Paediatr.*;86:158-82, 1967.
- [105] Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* 1959, 23(3) : 545-9.
- [106] (Shwachman H 1955 Shwachman H, Leubner H, Catzel P. Mucoviscidosis. *Adv Pediatr*. 1955;7:249-323.
- [107] Lenoir G, Vrielynck S, Sermet-Gaudelus I, Souilamas R. Transplantation pulmonaire pédiatrique et mucoviscidose. *Pédiatrie - Maladies infectieuses*. 4(025):F-10.
- [108] Welsh and Smith, 1 Welsh MJ , Smith A E .Molecular mechanisms ofCFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 1993 ; 73 : 1251-1254).
- [109] De Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, Taylor C, Cuppens H, Dodge J, Sinaasappel M; Diagnostic Working Group. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax*;61(7):627-35, 2006.
- [110] Goubau C, Wilschanski M, Skalicka V, Lebecque P, Southern K, Sermet I, Munck A, Derichs N, Middleton P, Hjelte L, Padoan R, Vasar M, De Boeck K. Phenotypic characterization of patients with intermediate sweat chloride values: towards validation of the European diagnostic algorithm for cystic fibrosis. *Thorax*; 64(8):683-91, 2009.
- [111] Loumo .O diagnostic phénotypique, biochimique et moléculaire de la mucoviscidose dans une population infantile algérienne ,adulte azospermique : faculté des sciences biologiques Alger 2016.
- [112] Ratjen F, Doring G. Cystic fibrosis. *Lancet* 2003;361:681–9

- [113] Boukari R, Smati L, Benhalla KN, Redjala O, Boufersaoui A, Benhassine F, et al. Cystic fibrosis in Algeria: clinical spectrum and genotypic data. *J Cyst Fibros.* 2006;5 suppl 1:S302.
- [114] Radoui Abdelkarim. La mucoviscidose de l'enfant « Approche épidémiologique et étude clinique dans l'Ouest Algérien ». Thèse de doctorat en sciences médicales, spécialité : Pédiatrie ,université d'Oran faculté de médecine d'Oran département de médecine, Soutenue publiquement le 17 Avril 2012 devant le jury.
- [115] Boukari R, et al. Smati L, Benhalla KN, Radoui K, Kaddache C, Touri S, Bioud B, Bensadi N, Maouche H, Dehimi A, Ferhani Y, Drali W, Atek A, Arhab D, Benzaghrou R. **La mucoviscidose: évolution de la prise en charge en Algérie.** *Arch Pediatr.* 2015 May;22(5 Suppl 1):5-6.
- [116] Registre français de la mucoviscidose -Bilan des données 2013.
- [117] Sermet-Gaudelus 2010 Sermet-Gaudelus I¹, Mayell SJ, Southern KW. Guidelines on the early management of infants diagnosed with cystic fibrosis following newborn screening. *J Cyst Fibros.* 2010 Sep;9(5):323-9.
- [118] Farrell PM, Kosciak RE. Sweat chloride concentrations in infants homozygous or heterozygous for F508 cystic fibrosis. *Pediatrics.* 97:524-8, 1996.
- [119] Stewart B, Zabner J, Shuber AP, Welsh MJ, McCray PB Jr 1995. Normal sweat chloride values do not exclude the diagnosis of cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 151:899-903, 1996.
- [120] LeGrys V Legrys VA : Sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis : practical considerations. *Pediatrics* 1996 ; 129 : 892-7.
- [121] Legrys VA. Sweat testing : sample collection and quantitative analysis ; approved guidelines. Third edition. Villanova, Pennsylvania, USA : CLSI C34-A4, 2009
- [122] MacLean WC, Jr., Tripp RW. Cystic fibrosis with edema and falsely negative sweat test. *J Pediatr.* 1973 Jul;83(1):86-8.
- [123] Legrys VA, Yankaskas JR, Quittell LM, Marshall BC, Mogayzel PJ. Diagnostic sweat testing. the cystic fibrosis foundation guidelines. *J Pediatr* 2007 ; 151 : 85-9.
- [124] Beauchamp M, Lands LC. Sweat testing:are view of current technical requirements. *Pediatr Pulmonol* ; 39 : 507-11, 2005.
- [125] Farrell PM, Kosciak RE. Sweat chloride concentrations in infants homozygous or heterozygous for F508 cystic fibrosis. *Pediatrics* 1996;97:
- [126] Stewart B, Zabner J, Shuber A, et al. Normal sweat chloride values do not exclude the diagnosis of cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:
- [127] Feldmann D, Couderc R, Audrezet MP, et al. CFTR genotypes in patients with normal or borderline sweat chloride levels. *Hum Mutat* 2003;22:340. [43] Clinical Laboratory Standards Institute formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards. Sweat Testing: Sample Collection and Quantitative Analysis: Approved Guideline. NCCLS Document C34-A2. Wayne, PA, National Committee for Clinical Laboratory Standards,
- [128] Massie J, Gaskin K, Van Asperen P, et al. Sweat testing following newborn screening for cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2000;29:
- [129] V Storni , M Claustres , T. Chinet S. Ravilly. Diagnostic de la mucoviscidose. *Archives de pédiatrie* :Volume 8, supplement 5, , Pages 818-832, December 2001.
- [130] Rosenstein BJ , Cutting GR.The diagnosis of cystis fibrosis in new borns through other adults : A consensus statement, cystis fibrosis fondation report. *J pediatri* 2008, 153(2) :S4-14).
- [131] Observatoire national de la mucoviscidose ,Rapport en France en 2005,2007, Judge EP.
- [132] Munck A, Gerardin M, Alberti C, Ajzenman C, Lebourgeois M, Aigrain Y, et al. Clinical outcome of cystic fibrosis presenting with or without meconium ileus: a matched cohort study. *J Pediatr Surg.* 2006 Sep;41(9):1556-60.
- [133] Olivier Mouterdea. Manifestations digestives et nutritionnelles de la mucoviscidose. *Revue francophone des laboratoires* Volume 2007, Issue 397, December 2007, Pages 43-47,

- [134] Corey M, Lai HC Corey M, McLaughlin FJ, Williams M, Levison H. A comparison of survival, growth, and pulmonary function in patients with cystic fibrosis in Boston and Toronto. *J Clin Epidemiol* ; 41(6):583-91, 1988. `
- [135] Colombo C, Castellani MR, Balistreri WF, Seregini E, Assaisso ML, Giunta A. Scintigraphic documentation of an improvement in hepatobiliary excretory function after treatment with ursodeoxycholic acid in patients with cystic fibrosis and associated liver disease. *Hepatology*. Apr;15(4):677-84, 1992
- [136] www.legifrance.gouv.f : Arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale (GBEA). *Journal Officiel* 1999 ; 287.

ANNEXES

Annexe I : Questionnaire pour la réalisation du test de la sueur

Date :

Nom : Prénom : N° Dossier : Sexe : Féminin Masculin

Date de naissance : Age (.....an mois)

Lieu de naissance :

Adresse : Ville : Téléphone :

Médecin traitant : Ville :

Poids de l'enfant :Kg

Taille de l'enfant : Cm

Poids/taille : %.

Motif de demande de test de la sueur :

Hypotrophie Non Signes respiratoires Non

Signes digestifs

Signes hépatiques

Signes cardiaques

Signes ORL

Autre motif

Confirmation par un deuxième test

Non Non Non

Oui : Oui :

Oui : Oui :

Oui : Oui :

Non:

Traitement en cours :

Consanguinité des

parents : Non Oui

Origine des parents : Père : Mère :

Autres cas atteint de mucoviscidose dans la famille : Non Oui : Qui ? :

Antécédents de décès dans la fratrie : Non Oui : Motif :

Antécédents d'hospitalisation : Non Oui : Combien de fois ? :

Test déjà réalisée : Non Oui : Valeur :

meq/l Ou ? : Résultats du test de la sueur : Mode de stimulation : Pilocarpine

Test 1 : Lieu : Avant bras droit

Poids sueur (mg) : Chlore (mmol/L) :

Test 2 : Lieu : Avant bras gauche

Poids sueur (mg) : Chlore (mmol/L) :

Conclusion : Test : Négatif Douteux Positif Commentaire, décision :

Cachet et signature du médecin

Annexe II : Consentement éclairé du patient

Centre hospitalier universitaire Benbadis de Constantine

Laboratoire de biologie et génétique moléculaire

Laboratoire de biochimie

Indentification du paient	N du prélèvement :
Nom : Prénom :	Adresse :
Date de naissance	Tel :

CONSENTEMENT

Je soussigné(e), sus nommé, reconnais avoir été informé(e) par le..... sur les examens des caractéristiques génétiques qui seront réalisées, dans un but diagnostic et/ou de recherche, à partir :

- Du prélèvement qui m'a été effectué A visée diagnostique
- A visée de recherche

Pour :

.....
.....
.....
.....

Je donne mon consentement pour ce prélèvement et je reconnais avoir reçu l'ensemble des informations, permettant la compréhension de cet acte biologique et sa finalité.

Fait à....., le.....Signature

ATTESTATION

Je certifie avoir informé le (ou la) patient(e) sus nommé(e) sur les caractéristiques de la maladie recherchée, les moyens de la détecter, les possibilités de prévention et de traitement, et avoir recueilli le consentement du (ou de la) patient(e)	Signature et cachet
---	---------------------

Un document de ce type doit accompagner la prescription – et les documents cliniques indispensables pour chacune des analyses demandées.

Le médecin prescripteur doit conserver le consentement écrit, les doubles de la prescription et de l'attestation, et les comptes rendus d'analyses de biologie médicale commentés et signés.