

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

**UNIVERSITE MENTOURI CONSTANTINE
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
Département des Sciences de la Nature et de la Vie**

N° d'ordre :

N° de série :

THÈSE

**Présentée pour l'obtention du diplôme de Doctorat d'Etat en
Biologie Physiologie Animale
Option : Biologie Moléculaire**

Par

Mr. YAHIA Mouloud

THÈME

**DIAGNOSTIC, PHYSIOPATHOLOGIE ET GENETIQUE DE LA
MUCOVISCIDOSE DANS LA POPULATION DE L'EST ET SUD
ALGERIEN
[Gène CFTR et l'absence bilatérale des canaux déférents (ABCD)]**

Soutenue le :26/02/2007

Devant le jury :

Président : Ch. BENLATRECHE Prof. Faculté de Médecine, Université de Constantine

**Rapporteur: D. NAIMI Prof. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université
de Constantine**

Examineurs :

**D. SATTA Prof. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de
Constantine**

M. BOURAS MC. Faculté de Médecine, Université de Batna

A. BEGHIANI MC. Faculté des Sciences, Université de Sétif

S. LAROUÏ MC. Faculté de Médecine, Université de Batna

Invité :

N. ABADI Prof. Faculté de Médecine, Université de Constantine

Année Universitaire : 2006/2007

Table des matières

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	01

Partie Théorique

Qu'est ce que la mucoviscidose ?	03
I. Historique.....	03
II. Gène CFTR.....	04
II.1. Succès du clonage positionnel	04
II.2. Structure du gène CFTR	05
III. Protéine CFTR.....	08
III.1. Structure	08
III.2. Localisation	09
III.3. Fonctions	10
III.3.1. Fonction canal Cl ⁻ de la protéine CFTR	10
-Phosphorylation des résidus serine du domaine R par la PKA.....	11
-Interaction entre l'ATP et l'un ou les deux domaines NBFs	11
-Régulation du canal CFTR les protéines phosphatases	12
-Régulation du canal CFTR par l'ATP	13
-Régulation du canal CFTR par les seconds messagers.....	13
III.4. Corrélations des mutations du gène CFTR avec la fonction du canal Cl ⁻	15
-Classe 1 : Mutations altérant la production de la protéine CFTR.....	15
-Classe 2 : Mutations perturbant le processus de maturation cellulaire de la protéine CFTR.....	15
-Classe 3 : Mutations perturbant la régulation du canal Cl ⁻ /CFTR.....	16
-Classe 4 : Mutations altérant la conduction du canal Cl ⁻	16
-Classe 5 : Mutations influençant la quantité d'ARNm ainsi que la quantité de protéines	16
-Classe 6 : Mutations affectant la stabilité de la protéine CFTR	16
III.5. Corrélations génotype/phénotype dans la mucoviscidose classique.....	20
III.6. Distribution géographique des mutations du gène CFTR	21
IV. Organes cibles de la mucoviscidose.....	23
IV.1. Tractus respiratoire.....	23
IV.2. Tractus gastro-intestinal	24
IV.2.1. Insuffisance pancréatique	24
IV.2.2. Perturbation de la motricité digestive.....	25
-L'œsophage et l'estomac.....	26
-L'intestin	26
-L'iléus méconial.....	26
-Syndrome d'obstruction intestinale distal	25
-Mucocèle appendiculaire	27
IV.2.3. Atteinte hépatique.....	27
IV.2.4. Appareil reproducteur.....	28

Partie Expérimentale

I. Diagnostic phénotypique de la mucoviscidose	30
I.1. Matériel et méthodes	30
-Patients	30
-Réactifs pour le test de la sueur	31
-Méthodologie du test de la sueur	31
-Stimulation de la sueur	32
-Recueil de la sueur	32
-Dosage des ions chlorures dans la sueur	32
I.2. Résultats et discussion	33
II. Diagnostic génotypique de la mucoviscidose	34
II.1. Matériel et méthodes	34
II.1.1. Réactif pour l'extraction d'ADN à partir d'échantillons de sang	34
II.1.2. Méthode d'extraction d'ADN	35
-Lyse des globules rouges	35
-Destruction des membranes des globules blancs et élimination des protéines	35
-Précipitation des protéines au Na Cl 6M	36
-Précipitation à l'éthanol	36
-Evaluation de la quantité et de la qualité d'ADN	36
II.1.3. Technique de PCR	37
Principe	37
Composants de la réaction PCR et leurs rôles	38
Composition des différentes amorces utilisées dans l'amplification du gène CFTR ..	40
II.1.4. Digestion enzymatique	43
II.1.5. Electrophorèse en gel de polyacrylamide	44
-Principe	44
-Préparation d'un gel de polyacrylamide	45
II.2. Résultats et discussion	46
III. Diagnostic phénotypique de l'ABCD	55
-Résultats et discussion	56
IV. Diagnostic génotypique de l'ABCD	58
IV.1. Protocole d'analyse génétique des mutations CFTR pour les sujets ABCD	58
IV.2. Technique d'électrophorèse en gradient de gel dénaturant DGGE	59
IV.2.1. Principe	59
IV.2.2. Choix du gradient	62
IV.2.3. Préparation d'un gel en gradient dénaturant	63
- Préchauffage	63
- Préparation du bouchon	63
- Préparation d'un gel de polyacrylamide 10 - 60%	63
- Conditions d'électrophorèse	64
IV.2.4. Séquençage d'une bande obtenue de DGGE	64
- Découpage de la bande	64
- PCR	64
- Purification par électroelution	64
- Séquençage de l'ADN double brin	65
V. Résultats et discussion	66
Conclusion	
Références bibliographiques	

Liste des abréviations

- ABCD** : absence bilatérale des canaux déférents
- ABC** : ATP-Binding Cassette
- ADN** : Acide Desoxyribo-Nucléique
- ATP** : Adenosine Tri Phosphate
- BET**: bromure d'éthidium
- °C** : Degré Celsius
- CFTR** : Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
- CF** : Cystic Fibrosis
- CHO** : cellules ovariennes de hamster chinois
- DGGE** : électrophorèse en gradient de gel dénaturant
- dNTP** : Desoxy Nucléotide Triphosphate
- DO** : densité optique
- EDTA** : Acide Ethylene-Diamino-Tetra Acétique
- FID** : fosse iliaque droite
- IM** : iléus méconial
- IPE** : insuffisance pancréatique exocrine
- Kb** : kilo base
- KD** : kilo dalton
- mEq/l** : milliéquivalent par litre
- ml** : millilitre
- mM** : Milli molaire
- Mx** : hélice α hydrophobe
- NBD** : Nucleotide Binding Domain
- NBF** : Nucleotide Binding Fold
- nm** : Nanometre
- ORCC** : Outwardly Rectifying Chloride Channel
- pb** : paire de base
- PCR** : Polymerase Chain Reaction
- PKA** : protéine kinase A
- PKC** : protéine kinase C
- PPP** : protéines phosphatases dépendantes du phosphore
- PPM** : protéines phosphatases dépendantes du magnésium

PP1, PP2A , PP2B , PP2C : protéines phosphatases

qsq : quantité suffisante pour

RGO : reflux gastro-oesophagien

rpm : rotation par minute

SAB : serum albumine bovine

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate

SOID : syndrome d'obstruction intestinale distale

TAE : Tampon d'électrophorèse Tris, Acétate, EDTA

TBE : Tris Borate EDTA

TE : Tampon Tris, EDTA

TEMED : Tétra Méthyle Ethylène Diamine

Tm : température de fusion

TMD : domaine transmembranaire

Tris : Tris-hydroxyméthyl-aminométhane

U : Unité

µg : Microgramme

µl : Microlitre

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Mutations du gène CFTR les plus fréquentes et leur distribution géographique	22
02	Symptômes cliniques évocateurs de mucoviscidose	30
03	Amorces proposées par Zielenski et al., 1991	41
04	Amorces proposées par Fanen et al., 1992	42
05	Enzymes de restriction utilisées dans la digestion de nos produits PCR	44
06	Concentration du support de l'électrophorèse en fonction de la taille des fragments à séparer	45
07	Phénotypes et génotypes de 16 patients mucoviscidosiques de l'Est et Sud Algérien	47
08	Analyse biologique et biochimique du liquide séminal Chez les 18 patients ayant une ABCD	56
09	Observations échographiques de l'appareil urogénital des patients ayant une ABCD, et après le test de la sueur	57
10	Différentes mutations CFTR chez 18 patients ayant une ABCD avec leurs motifs de répétition (TG) _n m(T)	66

Introduction

La mucoviscidose, ou fibrose kystique du pancréas, est une maladie héréditaire qui se transmet selon le mode autosomique récessif. Les sujets hétérozygotes sont indemnes.

Elle est l'une des maladies génétiques les plus fréquentes à issue fatale chez la population de race blanche. Sa fréquence varie selon l'origine géographique et ethnique des patients, elle serait en Europe de l'ordre de 1 sur 3000 à 5000 naissances, plus faible dans les populations noires, asiatiques et arabes (Katznelson and Yishai 1978, Boat et al, 1989, Carles et al, 1996). Son incidence exacte en Algérie est inconnue en raison d'un manque d'études.

Le nom de mucoviscidose fut donné à la maladie pour souligner les sécrétions épaisses et visqueuses obstruant l'appareil digestif et l'arbre trachéo-bronchique des enfants malades.

Cependant, le terme de " Fibrose Kystique du pancréas " (Cystic fibrosis ou CF pour les anglophones) est celui qui demeure le plus utilisé par la communauté scientifique internationale pour désigner cette atteinte marquée par une insuffisance pancréatique exocrine.

Quel que soit le terme donné à la maladie, il s'agit toujours d'une exocrinopathie généralisée.

La mucoviscidose peut être diagnostiquée à des âges très différents (de la période néonatale, voire anténatale, à l'âge adulte) et se révéler selon plusieurs modes (iléus méconial, infection broncho-pulmonaire à répétition, atteinte pancréatique et stérilité)

Depuis 1989, nous savons que des mutations du gène CF sont associées à la fibrose kystique; ce gène code pour une protéine trans-membranaire : la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Conductance Transmembrane Regulator) qui forme une sorte de petit canal responsable du transport et des échanges eau / électrolytes, le manque ou le mauvais fonctionnement de cette protéine perturbe cette fonction, ce qui entraîne la production d'un mucus épais.

Le canal CFTR est exprimé au niveau de la membrane plasmique apicale des cellules pour de nombreux tissus épithéliaux sécréteurs tels que les glandes sudoripares, le pancréas, l'intestin, des canaux biliaires, des systèmes génitaux, dans les voies respiratoires, ainsi que dans les cellules cardiaques.

La sévérité de la maladie et le nombre d'organes atteints varient en fonction du type de mutation du gène en question.

Malgré les grandes avancées scientifiques sur la mucoviscidose dans de nombreux pays, même voisins, comme la Tunisie et le Maroc, vu le nombre de thèmes de recherches abordés dans ces pays à savoir le gène CFTR et thérapie génique, protéine CFTR et approche pharmacologique, infection et inflammation pulmonaires, transplantation et recherche clinique. En Algérie les recherches sur cette maladie ne sont qu' à leur début .

A cet effet, notre contribution à travers ce travail s'inscrit dans le cadre d'un diagnostic phénotypique et génotypique de cette pathologie héréditaire dans la population de l'Est et Sud Algérien.

Dans un premier temps, nous présenterons la structure et la méthode de clonage du gène, . Puis une description de la protéine CFTR , son fonctionnement, ses différentes anomalies et enfin les organes cibles et les aspects cliniques de la maladie.

La seconde partie rapporte les techniques utilisées et les résultats obtenus de ce diagnostic sur un groupe de patients azospermiques par absence de canaux déférents , et un autre groupe présentant d'autres symptômes évocateurs de la mucoviscidose.

Qu'est ce que la mucoviscidose ?

C'est une maladie génétique, grave, non contagieuse et chronique dont l'évolution varie d'une personne à l'autre. Toujours transmise conjointement, mais sans le savoir, par le père et la mère. Elle concerne aussi bien les garçons que les filles. Elle est présente dès la conception, en revanche elle peut se manifester plus ou moins tardivement après la naissance.

Elle affecte les sécrétions des glandes exocrines à mucus. Les glandes muqueuses fournissent des sécrétions anormalement visqueuses qui obstruent les canaux excréteurs du pancréas, du système biliaire, de l'intestin, des canaux déférents et surtout des bronches : on observe alors une dilatation, une inflammation et une atrophie de ces organes.

Cette maladie affecte également les glandes sudoripares (glandes séreuses) : leur sécrétion correspond à une sueur anormalement riche en sodium et chlore.

I. Historique

Une étude récente situe l'origine de la mucoviscidose aux confins de la Turquie et de l'Irak et en estime son apparition voici 5.000 ans environ. La maladie se serait répandue au cours des siècles vers l'Ouest et aurait, ainsi, atteint toute l'Europe, l'Amérique latine, l'Amérique du Nord et l'Australie, toutes contrées où se sont établis des européens (Claustres, 1998).

Plus près de nous, sa présence est repérée dans la littérature et l'on retrouve au XVIIème siècle des récits relatant l'histoire des enfants " au baiser salé ".

La description de la mucoviscidose en tant qu'affection autonome date de la fin des années 30.

En 1936, Fanconi la caractérise et lui donne le nom de mucoviscidose, et en 1938, Andersen donne la description anatomo-pathologique complète de cette pathologie.

En 1953, Di Sant'Agnese met en évidence un excès de chlorure de sodium dans la sueur des enfants atteints de mucoviscidose. Cette découverte conduira, peu après, à la mise au point du test de la sueur, seul test de diagnostic positif de la maladie actuellement disponible et fiable.

Dans les années 80, l'anomalie du transport de sels fut précisée par Quinton (Quinton, 1983) qui décrivit le défaut de perméabilité aux ions chlorures (Cl⁻) affectant les cellules épithéliales des glandes sudoripares, et par Knowles (Knowles, 1983) qui observa le même phénomène au niveau de l'épithélium respiratoire.

Mais la nature biochimique du défaut à l'origine de la maladie est restée longtemps inconnue, ce qui a contraint les chercheurs à employer les outils de la génétique inverse (ou clonage positionnel).

En 1985, le locus CF fut localisé sur le bras long du chromosome 7 grâce à la découverte d'une liaison avec un site polymorphe exploré par une sonde anonyme située sur ce chromosome (Tsui et al, 1985). L'année 1989 est une étape décisive et représente une grande victoire à l'actif du professeur Lap Chee TSUI au Canada car il vient de mettre en évidence l'anomalie génétique à l'origine de la maladie : une mutation d'un gène situé sur le bras long du chromosome 7. Ce gène nommé Cystic Fibrosis (CF), code pour la synthèse d'une protéine appelée Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance et qui a été isolé et séquencé par une équipe américano-canadienne dans la même année (Rommens et al, 1989 ; Riordan et al, 1989 ; Kerem et al, 1989).

II. Gène CFTR

II.1. Succès du clonage positionnel

La nature biochimique du défaut à l'origine de la mucoviscidose est restée longtemps inconnue, ce qui a exclu toute possibilité d'isoler le gène responsable par l'approche génétique classique et a contraint les chercheurs à employer les outils de la génétique inverse ou clonage positionnel.

Une première étape de cartographie génétique consiste à trouver des marqueurs informatifs qui ségréguent avec le phénotype anormal dans des familles où plusieurs enfants sont atteints. En effet, deux locus d'un même chromosome (le locus marqueur et celui du gène recherché) ont d'autant plus de chances d'être transmis à travers les générations, que la distance qui les sépare est petite. La deuxième étape consiste alors à établir une carte physique de plus en plus précise à partir d'un intervalle génétique restreint pour arriver ainsi à isoler le gène recherché. Cette stratégie, longue, a permis de cloner et d'identifier le gène de la mucoviscidose (Kerem et al, 1989 ; Riordan et al, 1989 ; Rommens et al, 1989).

En 1985, une première liaison génétique fut établie entre le locus morbide CF et l'activité de l'enzyme paraoxonase (PON). La même année, le marqueur polymorphe : DOCRI-917 souvent transmis avec la maladie est identifié (Tsui et al, 1985). L'utilisation d'hybrides somatique interspécifiques a alors permis de localiser ce marqueur DOCRI-917 sur le bras long du chromosome 7 humain entre la bande q21 et q31 (Knowlton et al, 1985). Parallèlement, deux autres locus, l'oncogène Met (White et al, 1985) et la sonde pJ3.11(D7S8) (Wainwright et al, 1985) ont permis de délimiter la zone où le gène était recherché à un intervalle de 1 à 2 centimorgans (cM).

Les travaux de cartographie physique ont permis de réduire cet intervalle et de nouvelles sondes, KM19, CS7, XV-2c et Mp6D9, en très fort déséquilibre de liaison avec le locus CF, ont été alors utilisées pour le diagnostic anténatal (Estivill et al, 1987 ; Estivill et al, 1989).

L'étape décisive a été franchie au cours de l'été 1989 par plusieurs équipes qui disposaient d'un grand nombre de familles et utilisaient des techniques de clonage mieux adaptées (Kerem et al, 1989 ; Riordan et al, 1989 ; Rommens et al, 1989). Leur stratégie combinait la marche et le saut sur le chromosome 7 (Walking and jumping). Cette dernière technique permet d'analyser des segments d'ADN de plusieurs centaines de kilo bases (kb) dont seuls les fragments de jonctions sont clonés. Il est alors plus rapide d'aller d'une extrémité à l'autre du segment sans isoler les séquences intermédiaires parfois inclonables. Un contig de 500 kb a été ainsi construit ; il restait à identifier le ou les fragments contenant le gène CF.

Pour cela les expérimentateurs utilisèrent l'hybridation interspécifique ou zoo-blotting qui repose sur le fait que les gènes impliqués dans les fonctions fondamentales sont conservés au cours de l'évolution. Ce test leur permit de découvrir 4 régions contenant des gènes actifs, ces 4 séquences sélectionnées étant à leur tour utilisées comme sondes pour cribler une banque d'ADN issues des cellules de glandes sudoripares de malades. L'une des 4 séquences isolées s'est avérée la bonne : elle comprenait 113 paires de bases (pb) du premier exon du gène candidat et constituait un cadre de lecture ouvert (Rommens et al, 1989). A partir de cette séquence de 113 pb, un ADN complémentaire de 6129 pb correspondant à la partie transcrite du gène a été reconstitué chez la plupart des malades (Riordan et al, 1989). Cet ADN contenant une délétion de 3pb, se traduisant par la perte d'une phénylalanine en position 508 ($\Delta F508$) de la protéine codée (Kerem et al, 1989). La responsabilité de cette délétion dans la genèse de la maladie pouvait être légitimement suspectée, et cette observation confortait l'idée que le gène convoité venait d'être découvert. Le gène fut appelé CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator).

II.2. Structure du gène CFTR

Le gène CFTR a été cerné puis identifié par une équipe américano-canadienne en 1989 (Rommens et al, 1989 ; Riordan et al, 1989 ; Kerem et al, 1989). Il s'agit d'un grand gène, s'étendant sur environ 250 000 paires de bases (pb) sur le bras long du chromosome 7. La région codante est répartie entre 27 exons, numérotés de 1 à 24 en dédoublant 6a/6b, 14a/14b et

17a/17b (de 38 pb pour l'exon14b à 724 pb pour l'exon 13). La région non codante est composée de 26 introns (de 1,1kb intron 6a à 40kb intron 3 (Zielenski and Tsui, 1995) (Figure 1).

Le gène CFTR est transcrit en un ARN messager de 6500 pb (dont 4440 de séquence codante) exprimé très faiblement dans les cellules épithéliales. Les séquences nucléotidiques responsables de l'expression tissu spécifique sont actuellement inconnues. L'ARNm CFTR code pour une protéine transmembranaire appelée CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator).

III. Protéine CFTR

III.1. Structure

Est une glycoprotéine composée de 1480 acides aminés, un modèle a été proposé à partir de l'analyse des séquences nucléotidiques codantes du gène (Riordan et al, 1989), (figure 2). Elle présente une forte homologie de séquence primaire avec les protéines d'une famille de transporteurs. Ces derniers ont en commun la possession d'au moins un domaine hydrophile (NBF ou Nucleotide Binding Fold) incluant des motifs Walker A et B hautement conservés qui révèlent la présence d'un site de fixation à l'ATP, et un domaine transmembranaire (TM) formé par six hélices α -hydrophobes (Mx). L'ensemble de ces protéines constitue une super-famille appelée selon les cas : TM6-NBF ou ATPase ou plus communément ABC (ATP-Binding Cassette).

La protéine CFTR possède deux motifs de TMD (TMD1 et TMD2) chacun est composé de six segments transmembranaires (Mx) (Figure 2), les deux motifs sont réunis par un domaine supplémentaire spécifique inexistant chez les autres protéines de la même famille. Ce domaine intracellulaire expose au cytoplasme plusieurs résidus sérine qui peuvent être phosphorylés par les protéines kinases A et C (PKA et PKC) (Cheng et al, 1991). Pour le rôle potentiel qu'on lui prête dans les processus de régulation, cette région a été appelée domaine R pour "Regulator-domain" (Riordan et al, 1989). Ce domaine correspond aux résidus 590 à 831 codé par l'exon 13.

La phosphorylation de ce domaine est un pré requis à l'ouverture du canal par le MgATP ; l'état déphosphorylé du domaine R maintient le canal fermé alors que des modifications de conformation interviennent dans le passage à l'état ouvert (Welsh and Smith, 1993).

Ce domaine R est situé entre deux grandes régions hydrophiles contenant des séquences susceptibles de lier l'ATP, Walker A et B (Walker et al, 1982). Ceux sont les domaines NBF1 et NBF2 (Nucleotide Binding fold).

Il existe une séquence commune à tous les transporteurs ABC : LSGGQXQR (ou motif C). Ce dernier est situé à la surface des domaines NBF, proche des sites de liaison de l'ATP. La structure secondaire des NBF consiste essentiellement en un feuillet β (60-70%) central, entouré par des hélices α (10%). Les limites des domaines NBF1 et NBF2 varient légèrement. Pour NBF1 la limite inférieure varie du résidu F434 (codé par l'exon 9) à L441, et la limite supérieure est comprise entre 1586 (codé par l'exon 12) et K684 avec une extension possible jusqu'à F650. Le domaine NBF2 est formé des résidus L1127 à L1480.

Les deux domaines en question coopèrent dans la régulation des mécanismes d'ouverture et de fermeture du canal CFTR; le premier est impliqué dans l'ouverture du canal. Alors que le deuxième est impliqué dans les deux événements. La liaison de l'ATP sur NBF2, qui possède une activité ATPasique faible, entraîne un changement de conformation de NBF1 (Gadsby and Nairn, 1999 ; Luo et al, 1998 ; Vergani et al , 2003).

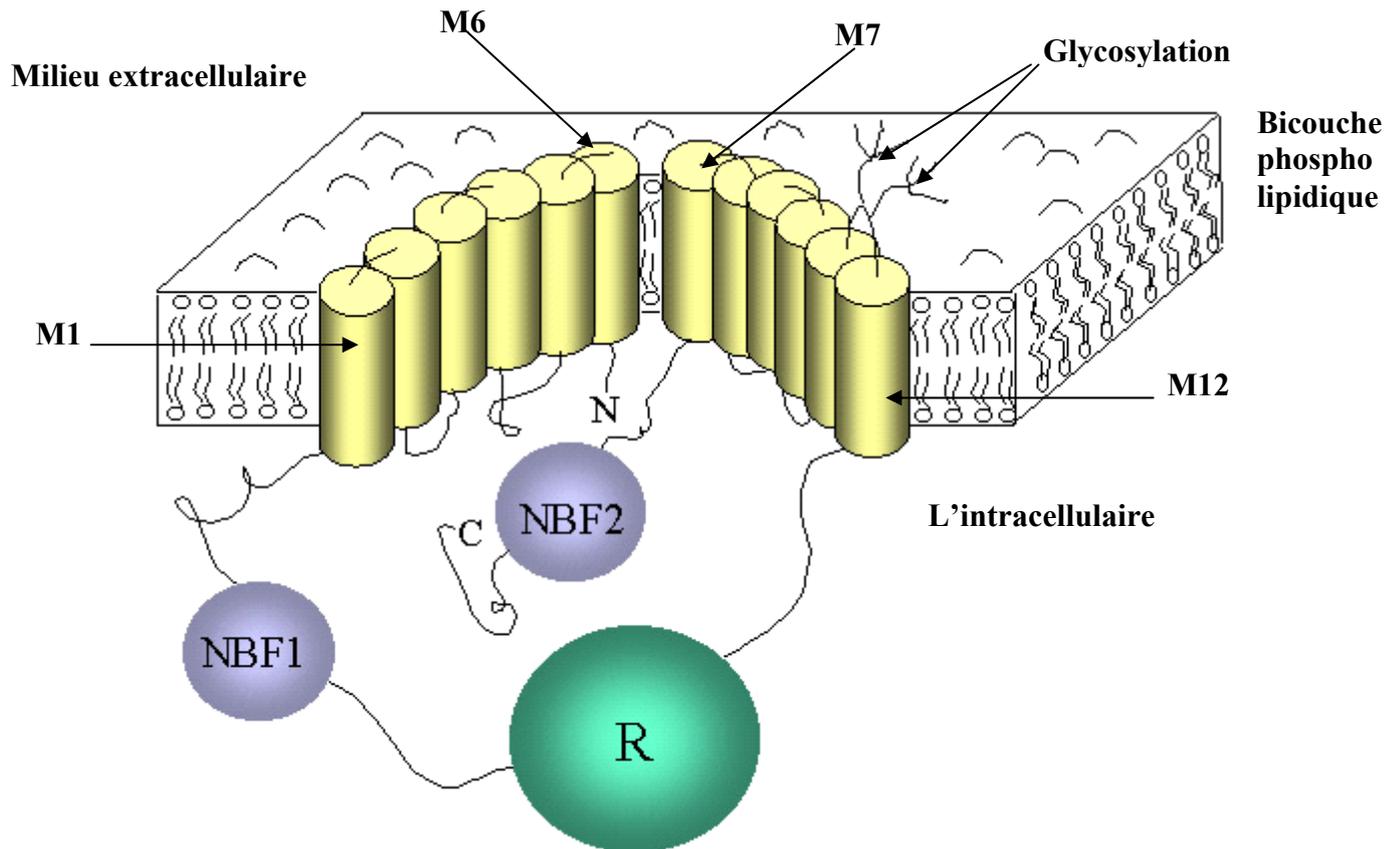


Figure 2. Modèle de la Protéine CFTR (Riordan et al, 1989)

III.2. Localisation

La protéine CFTR est surtout présente au niveau des cellules épithéliales des canaux pancréatiques, des cryptes intestinales, des canaux des glandes sudoripares, de l'arbre trachéo-bronchique (avec un gradient décroissant des glandes de la sous muqueuse vers la surface de l'épithélium) et des tubules des reins (Riordan et al, 1989).

Sa forme mature et fonctionnelle est un polypeptide N-glycosylé d'environ 170 KD (Welsh and Smith, 1993).

Des études par microscopie électronique et par marquage immunologique ont montré que la protéine CFTR est également présente dans la cellule sur les membranes des endosomes et plus particulièrement des vésicules au contenu riche en clathrine (Quinton, 1983 ; Collen et al, 1987). Cette localisation de la protéine CFTR suggère qu'il puisse exister un facteur cellule spécifique qui permettrait la synthèse de la protéine et son adressage à la membrane. Il est également intéressant de noter que bien que les poumons constituent des organes cibles de la mucoviscidose, les cellules tapissant les voies respiratoires n'expriment que faiblement la protéine CFTR et par conséquent, un faible taux de protéines semble suffisant pour maintenir le transport épithélial des ions chlorure.

III.3. Fonctions

La protéine CFTR exerce une multitude de fonctions dans la cellule, dont celle de canal Cl (chlore) activé par l'adénosine mono phosphate cyclique (AMPC) (Anderson et al, 1991 ; Bear et al, 1991 ; Berger et al, 1991 ; Drumm et al, 1991 ; Schwiebert et al, 1999). Le canal Cl/CFTR pourrait permettre le passage à travers la membrane cellulaire d'autres anions, comme les ions bicarbonates, de l'urée et de l'eau. La protéine CFTR agit aussi comme régulateur de canaux ioniques, notamment un type de canal Cl, le canal Cl rectifiant sortant (ou ORCC, outwardly rectifying chloride channel) qu'il active, le canal Na (sodium) épithélial (EnaC, epithelial Na channel) qu'il inhibe, voire certains canaux K (potassium) (Kunzelmann and Schreiber, 1999 ; Chinet, 2001). Elle régulerait aussi certaines aquaporines et participerait au contrôle de nombreuses autres fonctions cellulaires, parmi lesquelles on peut citer les phénomènes d'endocytose – exocytose, le contrôle du pH des organelles intracytoplasmiques, la synthèse et la sécrétion des cytokines de l'inflammation (Becker et al, 2004), l'apoptose (Kunzelmann and Schreiber, 1999 ; Chinet, 2001 ; Pilewski and Frizzel, 1999).

En outre, la CFTR pourrait permettre la fixation puis l'élimination de *Pseudomonas aeruginosa* (et probablement d'autres germes) par les cellules épithéliales.

La protéine CFTR pourrait aussi transporter des molécules de plus grande taille que les anions Cl, tels que l'ATP et le glutathion, mais ce point reste à confirmer (Chinet and Blouquit, 2003). Dans ce paragraphe, on s'intéresse uniquement à la fonction canal Cl.

III.3.1. Fonction canal Cl⁻ de la protéine CFTR

La protéine CFTR en tant que canal Cl⁻ qui fait sortir les ions Cl⁻ de la cellule sous l'effet de leur gradient électrochimique est irréfutable. Plusieurs études ont tenté d'appréhender la nature du mécanisme d'activation de la protéine CFTR par l'AMPc *via* la PKA : elles ont

confirmé que le domaine R ainsi que les deux NBFs étaient impliqués dans ce processus. En effet le mécanisme d'ouverture / fermeture du canal Cl⁻ comporte les étapes suivantes :

- **Phosphorylation des résidus serine du domaine R par la protéine kinase A (PKA)**

Les acides aminés concernés par cette phosphorylation sont : (S660, S700, S737, S795, et S813), cette phosphorylation permet de rendre accessible l'orifice intracellulaire du pore du

canal Cl⁻, pore que constituent les segments des domaines TMD1 et TMD2, en particulier (M1, M5, M6 et M12).

L'efflux d'ions, stimulé par l'AMPc, et la probabilité d'ouverture (Po) du canal CFTR sont réduits de moitié lorsque les 4 sites sérines (S660, S737, S795 et S813) sont toutes mutées en alanine .

Cependant, l'intégrité d'une seule d'entre elles suffit à maintenir la conductance aux anions après stimulation par l'AMPc (Rich et al, 1990 ; Rich et al, 1993). Même après la suppression des 10 sites reconnus comme étant phosphorylés par la PKA, le canal Cl⁻ CFTR reste fermé tant qu'il n'est pas activé par la PKA et l'ATP, indiquant que d'autres acides aminés phosphorylables sont impliqués dans le mécanisme d'ouverture du canal (Rich et al, 1993). Toutefois, lorsque la plus grande partie du domaine R est amputée et que la sérine 660 est substituée par une alanine (S660A), le canal est ouvert en permanence par l'ATP qu'il soit ou non phosphorylé par la PKA, ce qui suggère que l'activation de la protéine CFTR dépendante de la PKA se fait essentiellement par phosphorylation des sites localisés dans le domaine R (Rich et al, 1993). Par ailleurs, le domaine R ne constitue pas à lui seul les portes du canal puisqu'une protéine CFTR qui en est déléetée reste fermée en absence d'ATP (Anderson et al ,1991 ; Rich et al, 1993).

- **Interaction entre l'ATP et l'un ou les 2 domaines NBFs**

Il a été postulé que le domaine R a un effet inhibiteur sur l'activation du canal et que son changement de conformation permet de lever l'inhibition et facilite la fonction des deux NBFs (NBF1 et NBF2) (Rich et al, 1993).

La persistance du changement conformationnel dépend d'abord du degré de phosphorylation du domaine R. Si ce dernier n'est que partiellement phosphorylé, la fixation

puis l'hydrolyse de l'ATP ne se réalisent qu'au niveau du NBF1 et jamais à celui du NBF2, ce qui a pour conséquence l'ouverture brève du canal CFTR (Hwang et al, 1994). Un temps d'ouverture plus long est enregistré lorsque la protéine CFTR est complètement phosphorylée et que l'ATP qui se fixe sur les deux NBFs n'est pas hydrolysé par le NBF2.

L'occupation par l'ATP du site de fixation du NBF2 confère donc une plus grande stabilité au canal ouvert en retardant sa fermeture (Hwang et al, 1994). Ainsi, pour un canal totalement phosphorylé, l'hydrolyse d'une molécule d'ATP par le NBF1 est nécessaire pour ouvrir le canal alors que l'hydrolyse d'une seconde molécule triphosphate par le NBF2 ou encore la présence d'ADP intracellulaire provoque la fermeture du canal (Hwang et al, 1994). Le mécanisme d'action de la protéine CFTR est donc un processus faisant intervenir la phosphorylation du domaine R, l'hydrolyse de l'ATP et une interaction entre les deux NBFs.

- **Régulation du canal CFTR par les protéines phosphatases**

Très rapidement, après phosphorylation par les PKA, la déphosphorylation par des protéines phosphatases inactive le canal. A l'inverse, l'inhibition des protéines phosphatases endogènes augmente l'efficacité de stimulation du canal CFTR et ralentit son retour à l'état désactivé. Mais peu de choses sont connues sur la spécificité avec laquelle ces différentes phosphatases déphosphorylent les phosphoserines du canal CFTR.

Chez l'être humain, les quatre principaux types de protéines phosphatases sont codés par les membres de deux familles de gènes. Les protéines phosphatases PP1, PP2A, et PP2B appartiennent à la famille des protéines phosphatases dépendantes du phosphore (PPP). La quatrième phosphatase PP2C, appartient à la famille PPM de protéines phosphatases dépendantes du magnésium et qui ne possèdent pas de domaine de régulation comme les trois précédentes.

Les phosphatases PP2A et PP2C sont critiques pour la régulation du canal CFTR. Ces enzymes portent les motifs d'ancrage à la membrane, permettant la co-localisation avec CFTR (Becq et al, 1993). La protéine PP2A provoque une déphosphorylation quasi complète du canal CFTR et les phosphatases endogènes PP2C sont des régulateurs puissants de l'activité du canal CFTR en modifiant la probabilité d'ouverture du canal, et donc le temps d'ouverture des canaux, tout en préservant le nombre de protéines actives (Hwang et al, 1994). Leurs effets sur l'ouverture et la fermeture du canal unitaire sont distincts de ceux de la PP2A, mais similaires à ceux des phosphatases endogènes dans les cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) ou intestinales T84. L'association de plusieurs phosphatases est nécessaire pour la désactivation complète du canal CFTR (Luo et al, 1998).

Le canal CFTR excisé à partir des cellules CHO ou de cellules respiratoires humaines, est désactivé par l'action de phosphatases associées à la membrane. Il est activé par des inhibiteurs

de phosphatases (Becq et al, 1993). Cette régulation a également été montrée dans le cas de certaines mutations comme R117H, G551D et Δ F508.

- **Régulation du canal CFTR par L'ATP**

L'augmentation de la concentration intracellulaire en ATP accroît la probabilité d'ouverture (P_o) des protéines CFTR déjà phosphorylées; elle accroît le taux moyen de canaux ouverts en un temps donné, en réduisant le temps entre les ouvertures. Ceci n'est plus observé lorsque l'ATP est éliminé ou remplacé par un nucléoside triphosphate non hydrolysable comme le 5-adenylylimidodiphosphate (AMP-PNP), ces molécules inhibent l'activation par l'ATP, de manière compétitive, par interaction spécifique sur le domaine NBF2 (Anderson et al, 1991). Bien que, l'AMP-PNP ne puisse pas ouvrir le canal CFTR phosphorylé, une fois le canal ouvert il peut s'y lier fortement et le bloque dans cette conformation pour quelques minutes. La liaison de l'AMP-PNP se produit probablement au niveau de l'extrémité C-terminale du domaine NBF (Gadsby et al, 1999).

Toutefois, les nucléosides triphosphates ne permettent l'ouverture des canaux que si le domaine R a été auparavant phosphorylé par la PKA (Bear et al, 1992).

- **Régulation du canal CFTR par les seconds messagers**

L'activation du canal CFTR par la protéine kinase A est stimulée par l'AMPc. Le niveau de l'AMPc est contrôlé par la balance entre sa synthèse par les adénylate-cyclases et son hydrolyse par les phosphodiesterases. Dans les cellules provenant d'épithélium respiratoire, l'activité du canal CFTR sauvage est particulièrement sensible à l'activité de la phosphodiesterase de type III. L'inhibition de ce type d'enzyme élève considérablement le niveau d'AMPc intracellulaire, entraînant une augmentation importante de l'efflux de chlorure (Stutts et al, 1995).

La figure 3 est un modèle proposé par Gadsby et Nairn pour expliquer le mécanisme d'ouverture –fermeture du canal CFTR.

III.4. Corrélations des mutations du gène CFTR avec la fonction du canal Cl⁻

Les anomalies moléculaires ont des conséquences graves sur la protéine CFTR et ses fonctions. Depuis la découverte du gène en question en 1989, de nombreux laboratoires tentent de caractériser les diverses mutations responsables de la mucoviscidose. Ils se sont regroupés au sein d'un réseau d'échange d'informations, créée à l'initiative des découvreurs du gène, le « Consortium international d'analyse génétique de la mucoviscidose », et depuis plus de 1000 mutations ont été décrites dont moins d'une vingtaine ont une fréquence supérieure à 1% (Chinet and Blouquit, 2003). La mucoviscidose constitue ainsi un remarquable modèle d'hétérogénéité allélique. Il s'agit essentiellement de mutations ponctuelles, concernant le plus souvent une seule paire de bases. L'essentiel des mutations CFTR se répartit en 42% de mutations faux sens (remplacement d'un acide aminé par un autre), 15% de non sens (transformation d'un codon d'acide aminé en signal de terminaison de traduction de la protéine, ou signal stop), 23% d'insertions ou de délétions conduisent à un déphasage du cadre de lecture de l'ARNm-CFTR, 16% de mutations d'épissage et 4% d'autres types de défauts moléculaires (délétion d'acide aminé par exemple) (Claustres, 1998).

Les conséquences des mutations sur la protéine CFTR peuvent être regroupées en 6 classes (Kunzelmann and Schreiber, 1999; Pilewski and Frizzell, 1999; Costes and al, 2001).

Classe I : mutations altérant la production de la protéine CFTR

Ces mutations résultent en une absence totale ou partielle de la protéine. Cette classe inclut les mutations non sens et celles qui produisent un codon stop prématuré (G542X), ou les mutations décalant le cadre de lecture de l'ARNm (1078delT, 3905ins T) ou celles altérant la structure de l'ARNm (621+1G→T). En principe, ces mutants ne produisent pas de protéines CFTR. Sur le plan fonctionnel, ces mutants devraient conduire à une perte de la conductance au Cl⁻ du canal CFTR dans les épithéliums atteints (figures 4a et 4b).

Classe II : mutations perturbant le processus de maturation cellulaire de la protéine

Cette classe concerne les mutations altérant le processus de maturation et/ ou de trafic intracellulaire du CFTR. L'observation de mutants $\Delta F508$ dans des systèmes d'expression in vitro a montré que la quasi totalité des molécules CFTR- $\Delta F508$ est absente de la membrane apicale. Etant mal conformées, elles sont dégradées peu après leur synthèse dans le réticulum endoplasmique au lieu d'être transportées dans le compartiment golgien (où les molécules CFTR terminent normalement leur maturation post-traductionnelle, glycosylation en particulier) (figure 5).

Les mutations de cette classe représentent la majorité des allèles (p. ex : $\Delta F508$, $CF\Delta 1507$, S549R et N1303K) (Haardt et al, 1999 ; Rozmahel et al, 1999)

Classe III : mutations perturbant la régulation du canal Cl/ CFTR

Ces mutations sont le plus souvent situées dans les domaines de liaisons d'ATP (NBF1 et NBF2), ex : G551D et G551S situées dans le domaine NBF1 et S1255P et G1349D dans le domaine NBF2). Ces mutants modifient la liaison et l'hydrolyse d'ATP ainsi que la phosphorylation du domaine R (figure 6).

Classe IV : mutations altérant la conduction du canal Cl

Les mutants de cette classe sont essentiellement des faux sens dans les domaines trans-membranaires, altérant la conduction du canal CFTR et sa sélectivité ionique. R334W et R347H par exemple, conservent environ 10% de conductance au chlore, R347P transforme le canal multi ionique en canal pauci ionique, R117H réduit de 70% le temps d'ouverture du canal CFTR et altère aussi la vitesse de passage des ions à travers le pore (figure 7).

Classe V : mutations influençant la quantité d'ARNm ainsi que la quantité de protéines fonctionnelles

Sont de découverte récente : il s'agit de déficits quantitatifs du CFTR, consécutifs à des variations qui affectent l'épissage ou la stabilité de l'ARNm ou de la protéine CFTR (par. ex : polymorphisme T de l'intron 8, $3849+10kbC \rightarrow T$ et G551S) (Haardt et al, 1999) (figure 8).

Classe VI : mutations affectant la stabilité de la protéine CFTR

Sont aussi de découverte récente, elles sont issues le plus souvent d'une délétion de la partie C-terminale de la protéine terminale, qui devient instable. Ces mutations affectent la régulation des autres canaux par CFTR (figure 9).

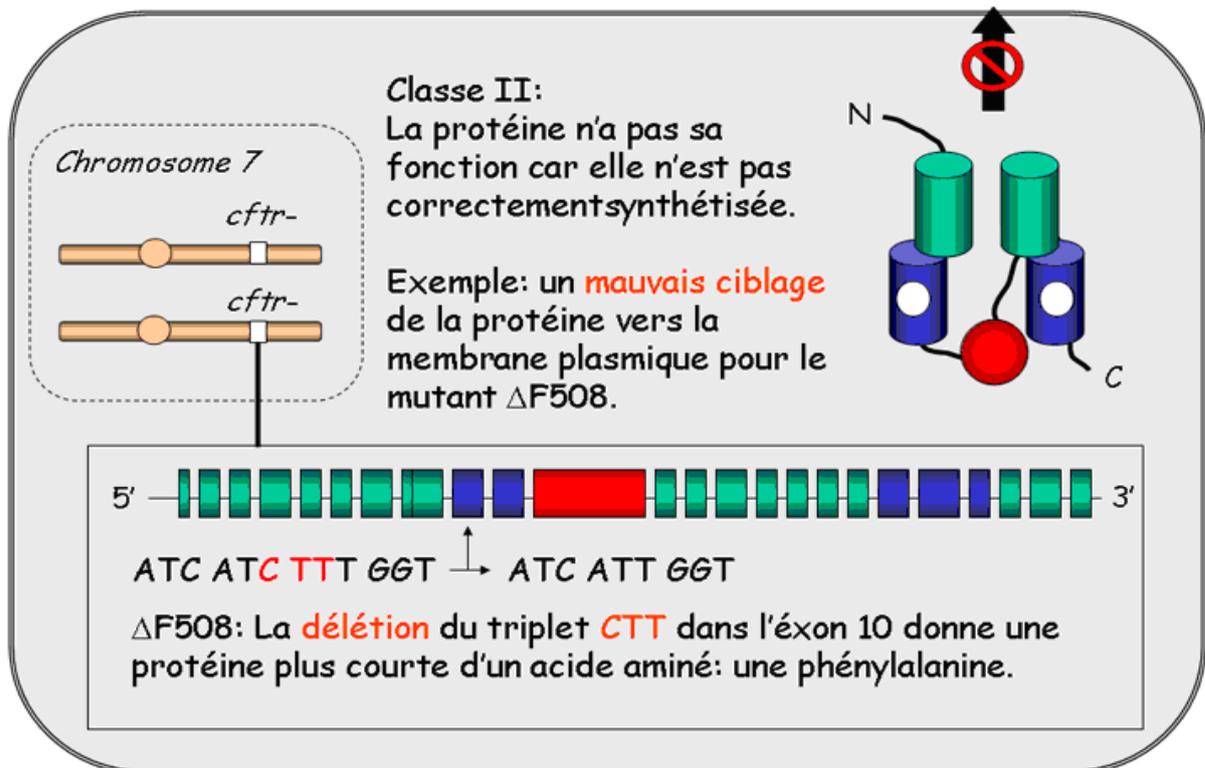


Figure 5. Mutations perturbant le processus de maturation cellulaire de la protéine

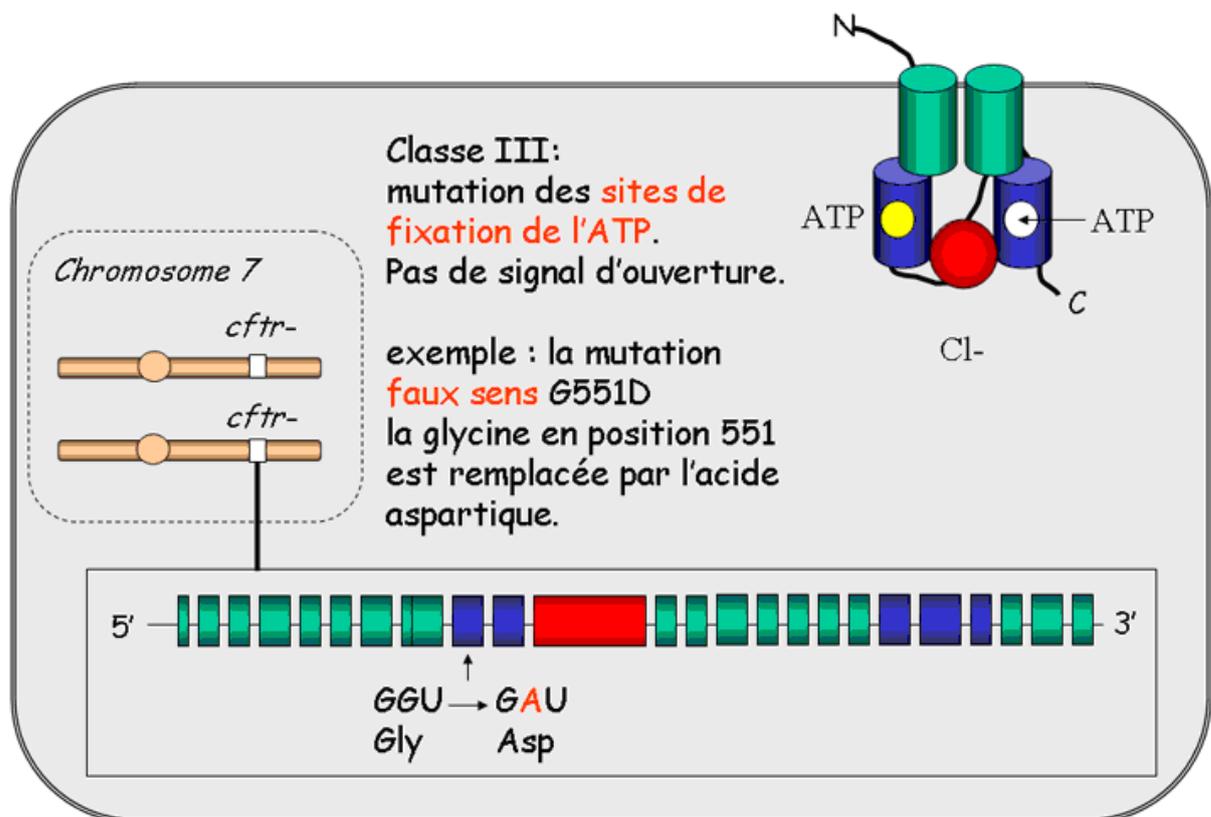


Figure 6. Mutations perturbant la régulation du canal Cl/CFTR.

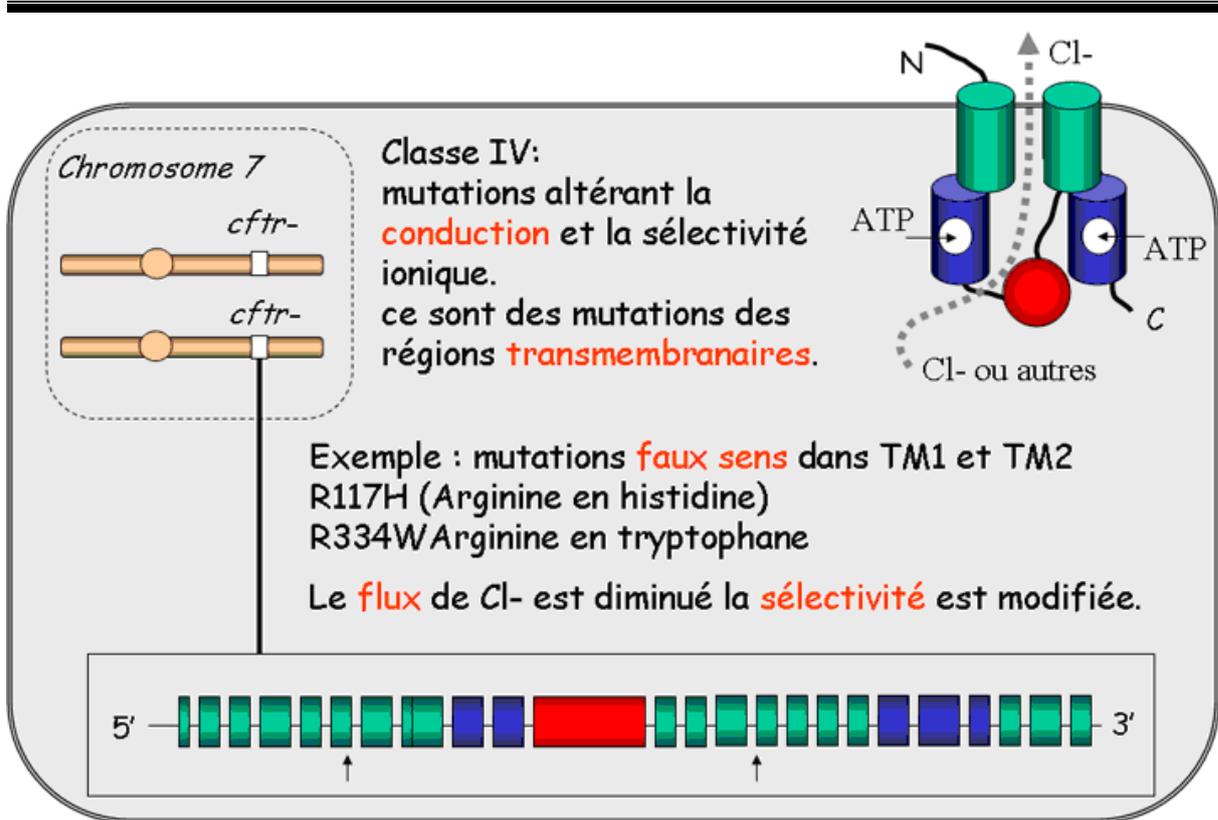


Figure 7. Mutations altérant la conduction du canal Cl⁻.

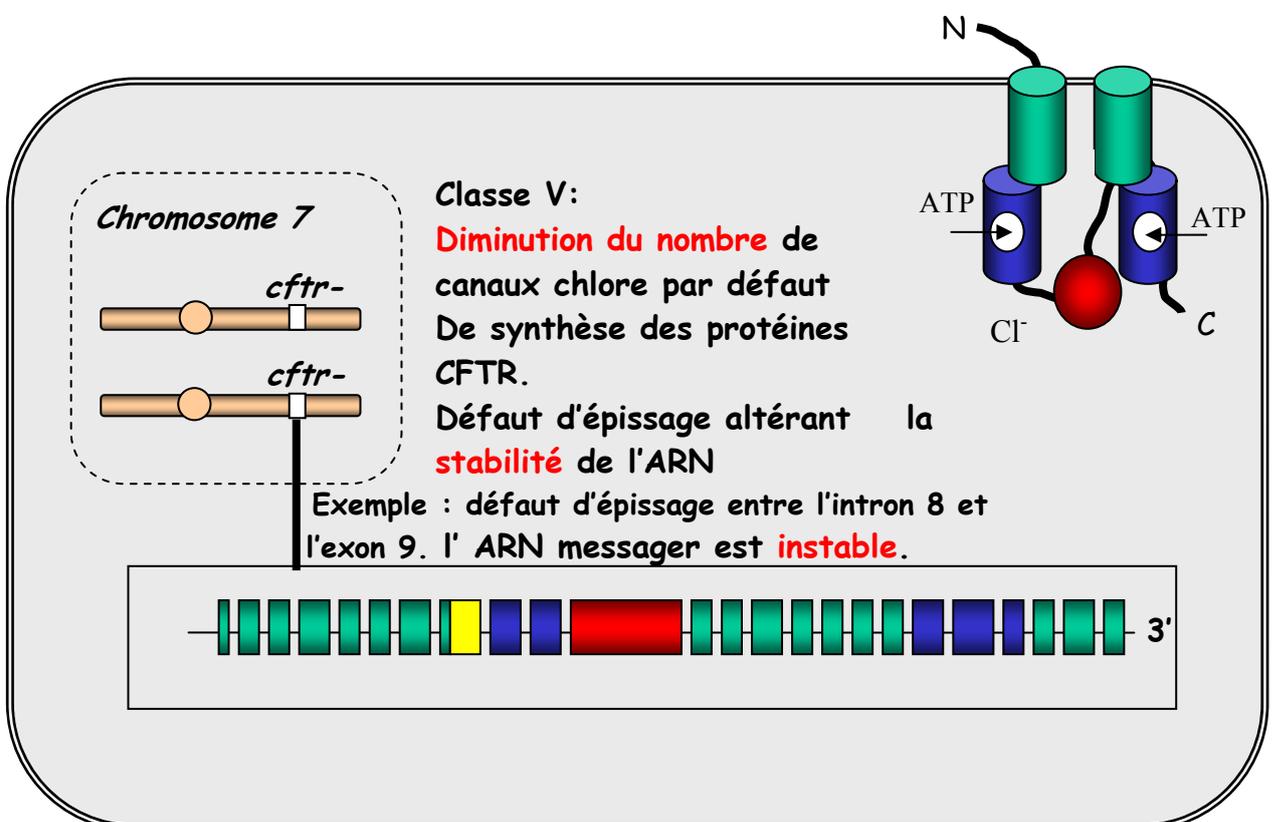


Figure 8. Mutations influençant la quantité d'ARNm ainsi que la quantité de protéines fonctionnelles

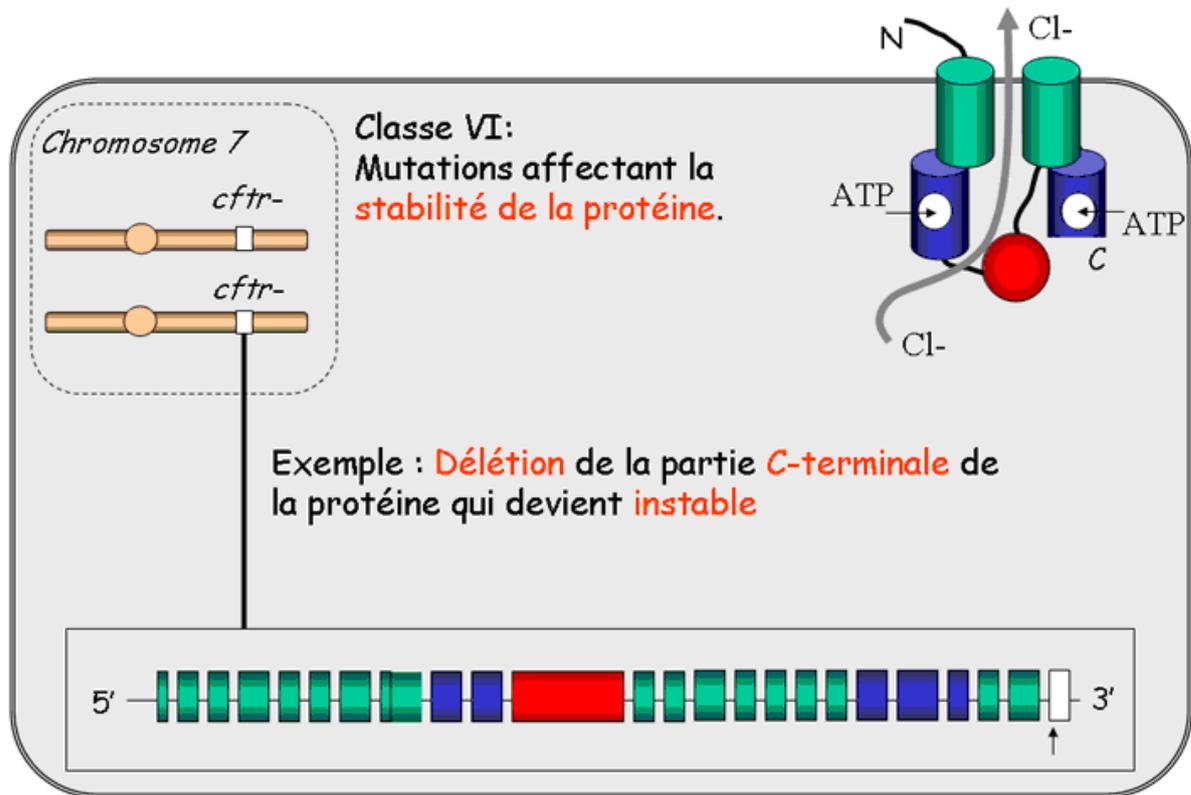


Figure 9. Mutations affectant la stabilité de la protéine CFTR

III.5. Corrélations génotype/phénotype dans la mucoviscidose classique

Sur le plan clinique, la relation génotype/phénotype est très difficile à établir, due à la faible représentation de beaucoup de mutations et aux effets environnementaux modifiant le phénotype vrai. De plus, un même phénotype peut correspondre à des désordres cellulaires différents (Pilewski and Frizzell, 1999) (figure 9).

La plupart des mutations CF ne sont trouvées que sous la forme d'hétérozygotes composites, ce qui complique l'analyse des corrélations. Seul le statut pancréatique paraît clairement déterminé par les mutations CFTR. Il y a une corrélation manifeste entre l'homozygotie $\Delta F508$ et l'insuffisance pancréatique exocrine (PI, pancreatic insufficiency), alors que les patients hétérozygotes composites pour la $\Delta F508$ et une autre mutation sont CF-PI lorsque la seconde mutation est « sévère » et sont CF-PS (pancreatic sufficiency), lorsque la seconde mutation est « modérée ». Les mutations PS, essentiellement des substitutions d'acide aminé ou des altérations de l'ARNm compatible avec une activité CFTR résiduelle dans le pancréas, sont ainsi dominantes sur les mutations PI. Il y a un nombre comparable d'allèles PI et PS, mais 85% des mucoviscidoses classiques sont CF-PI parce que les mutations les plus fréquentes sont des allèles PI.

Les autres symptômes, en particulier la sévérité de l'atteinte pulmonaire, ne s'inscrivent pas dans une simple loi d'hérédité dominante/récessive. Par exemple, on trouve un excès d'homozygotes $\Delta F508$ dans l'iléus méconial néonatal (IM, 12% des patients), en cohérence avec

l'hypothèse d'une obstruction intestinale résultant d'un déficit pancréatique. Cependant, les familles avec un enfant CF-MI ont seulement 40% de risque d'avoir un deuxième enfant CF-MI, ce qui suggère que des facteurs génétiques différents du CFTR sont aussi impliqués. L'une des pistes est la localisation d'un locus modificateur en 19q qui fait actuellement l'objet d'une investigation intensive (Rozmahel et al, 1999).

III.6. Distribution géographique des mutations du gène CFTR

L'analyse de 27177 chromosomes CF provenant de plusieurs pays du monde a montré que seulement cinq mutations CF ont une fréquence supérieure à 1% : $\Delta F508$ (66,8%) est la plus fréquente à travers le monde, est trouvée dans tous les pays étudiés; les quatre autres : G542X (2,6%); N 1303K (1,6%); G551D (1,5%) et W1282X (1%) ne sont retrouvées que dans certaines populations (par exemple, 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 que 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) (Estivill et al, 1997).

Tableau 1. Mutations du gène CFTR les plus fréquentes et leur distribution Géographique (d'après Estivill et al, 1997)

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	
ΔI507	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	

IV. Organes cibles de la mucoviscidose

IV.1. Tractus respiratoire

Les signes respiratoires et l'infection des voies aériennes dominent largement le tableau clinique dans la majorité des cas de mucoviscidose.

L'atteinte des voies respiratoires hautes est habituelle : une sinusite chronique qui donne une obstruction nasale et une rhinorrhée (90 –100%), des polypes nasaux (40-50%) ainsi qu'une surdité de transmission dans 8 à 55% des cas.

Dans le tractus respiratoire bas, le premier symptôme est la toux chronique, sèche, quinteuse, rapidement reproductrice, bronchites infectieuses et/ ou asthmatiformes marquées par leur caractère récidivant.

Les premières manifestations sont le plus souvent précoces (avant l'âge de 1an dans environ 80% des cas). La dystrophie thoracique (avec cyphose dorsale et thorax en carène) et l'hippocratisme digital d'apparition précoce témoignent de l'évolutivité de cette bronchopathie chronique obstructive.

Les poumons sont initialement colonisés par *Haemophilus influenzae*, *staphylococcus aureus* et finalement par les *pseudomonas aeruginosa* (bacille pyocyanique) et dans certains cas par *pseudomonas cépacia*.

L'infection chronique a pyocyanique constitue le problème infectieux principal et marque le plus souvent un tournant évolutif péjoratif de la maladie.

Certaines souches dites " mucoides " se développent au sein de micro colonies entourées d'une matrice exopolysaccharidique (slime). Ce caractère mucoïde est pratiquement spécifique de l'infection. L'incidence des souches mucoides augmente avec l'âge et l'évolutivité de la maladie respiratoire. Il est probable que le slime augmente l'adhésion des bactéries aux structures contaminées et gêne la pénétration des antibiotiques.

D'autres agents pathogènes comme l'*Aspergillus fumigatus*, le *Myobactérium*, *Klebsiella*, *Proteus* et *Escherichia coli* ou même des virus peuvent s'associer à cette colonisation bactérienne du tractus respiratoire (Vasil,1986, Doving, 1991, Marty and chabanon, 1993, Pignatti et al,1995).

Enfin, le rôle potentiel de potentiel de *Xanthomonas maltophila*, de *Legionella pneumophila* a été rapporté (Gilligan, 1991).

L'atteinte broncho-pulmonaire évolue par poussées qui conduisent en quelques mois ou plusieurs dizaines d'années à l'insuffisance respiratoire voir au cœur pulmonaire chronique.

Les poussées de surinfection s'accompagnent d'une anorexie qui contraste avec l'augmentation des dépenses énergétiques. Cela aboutit à une dénutrition et / ou un retard pubertaire.

Cette évolution peut être émaillée de complications pouvant engager le pronostic vital tels des pneumothorax volontiers récidivants ou des hémoptysies. Le décès survient en règle au décours d'une exacerbation des signes respiratoires d'allure infectieuse accompagnée de signes d'insuffisance cardiaque droite ou globale dans environ 1/3 des cas.

Un dysfonctionnement des muscles respiratoires et périphériques a été rapporté chez les mucoviscidosiques par de nombreux auteurs (Arora and Rochester 1982, Ferguson 1993, Bradley et al, 1999)

IV.2. Tractus gastro-intestinal

Les manifestations digestives de la mucoviscidose sont très diverses:

IV.2.1. Insuffisance pancréatique exocrine (IPE)

Est une des caractéristiques fondamentales de la mucoviscidose. Elle est aussi une des premières manifestations cliniques qui apparaît dans la vie intra-utérine et se manifeste souvent à la naissance par une augmentation très significative de la trypsine immuno réactive.

Elle est la cause principale de pertes énergétiques au cours de cette maladie. Présente chez 85 à 90% des patients, elle ne s'exprime cliniquement que lorsque plus de 90% du pancréas sont détruits (Belli et al, 2000).

Le pancréas sécrète normalement les enzymes nécessaires au catabolisme des glucides, des protéines et des lipides. Le dysfonctionnement de la protéine CFTR est responsable de l'hyper viscosité des sécrétions pancréatiques, qui obstruent les canaux pancréatiques exocrines et contribuent à la destruction secondaire des acini par le phénomène d'auto digestion. Le tissu acineux est progressivement remplacé par du tissu fibreux; d'où le nom de Fibrose Kystique ou pancréatique (Cystic fibrosis pour les anglosaxons).

La dégradation du pancréas est un processus qui s'opère graduellement et de façon variable selon les patients ; ainsi on estime que 20% des patients ayant une fonction pancréatique initialement normale développeront une insuffisance pancréatique entre l'âge de 6 mois et de 21 ans, alors que d'autres souffriront de pancréatite à l'adolescence ou à l'âge adulte (Shwachman, 1990).

La principale manifestation clinique de l'IPE est représentée par la stéatorrhée (c'est à dire l'émission de selles volumineuses graisseuses et nauséabondes), accompagnée d'une

diarrhée chronique, souvent associée à des douleurs abdominales, un ballonnement et un prolapsus rectal (Kerem et al, 1990).

La stéatorrhée n'est pas la seule cause de pertes caloriques fécales (Turck and Michaud,1998).

On peut y adjoindre les pertes liées aux bactéries coliques, ainsi qu'à la malabsorption provoquée par les anomalies du mucus intestinal et de la motricité digestive. Même en cas de supplémentation enzymatique adéquate, on estime la perte calorique fécale au cours de la mucoviscidose de 2 Kcal/g de selles.

L'insuffisance de sécrétion en lipase, trypsine et chymotrypsine entraîne un syndrome de mal digestion et de mal absorption des graisses et des protéines qui, malgré l'augmentation de l'appétit (en dehors des épisodes d'infections respiratoires), a un effet délétère sur l'état nutritionnel et est responsable d'un retard staturo-pondéral et de carence en vitamines liposolubles (A, D, E, K) et en acides gras essentiels. Le déficit de la sécrétion en amylase pancréatique est responsable d'une mal- digestion de l'amidon aboutissant à une fermentation bactérienne colique accrue, dont les conséquences nutritionnelles sont mal connues (Danni and Blau, 1978, Gilly and Bellow, 1988).

Chez certains patients, en particulier ceux n'ayant pas d'IPE, des poussées récurrentes de pancréatite peuvent être observées, qui sont parfois révélatrices de la mucoviscidose (Belli et al, 2000).

La fibrose pancréatique peut s'étendre aux îlots de langerhans et provoque une atteinte endocrine; caractérisée par une intolérance au glucose (Naimi, 1996).

On pourrait s'attendre à une fréquence accrue d'ulcères duodénaux chez les sujets atteints de FK a cause de la perte de bicarbonate pancréatique qui sert de tampon.

IV.2.2. Perturbation de la motricité digestive

Les manifestations cliniques de dysmotricité touchent l'ensemble de l'appareil digestif (Cucchiara et al, 1997; Durie, 1997)

- **L'oesophage et l'estomac**

La fréquence du reflux gastro-oesophagien (RGO) est plus élevée au cours de la mucoviscidose (Malfroot and Dab, 1991; Gregory, 1996), des brûlures épigastriques ou des régurgitations très évocatrices de reflux sont mentionnées chez plus de 20% des patients.

Selon Vic (1995), la fréquence du RGO peut atteindre 76% à l'âge pédiatrique, cependant l'adulte atteint de mucoviscidose présente un RGO plus souvent symptomatique que l'enfant

(Joshi, 2002); sa physiopathologie est mieux comprise grâce aux études manométriques (Cucchiara et al, 1991); les relaxations inappropriées du sphincter inférieur de l'œsophage (SIO) est sa cause la plus fréquente.

Ses épisodes sont majorées par l'élévation de la pression thoraco-abdominale liée aux efforts de toux et/ou aux expirations prolongées de la kinésithérapie (Vandenplas et al, 1991)

- **L'intestin**

Au niveau de l'intestin, la plupart des manifestations cliniques sont de nature obstructive:

- **L'iléus méconial (IM)**

Le méconium est la matière brunâtre accumulée dans l'intestin du fœtus à terme et qui constitue les premières selles du nouveau-né, cependant un iléus méconial, est une obstruction partielle ou complète de l'intestin, fréquemment en amont de la valvule iléo-caecale avec distension sus-jacente par un méconium très visqueux et de composition chimique anormale. Le contenu en eau est faible, riche en protéines sériques non dégradées (albumine) et en certaines disaccharidases; Il représente le symptôme clinique le plus précoce de mucoviscidose, révélateur chez 10 à 20% des nouveaux nés (Baran, 1979; Munck et al, 2001).

Ce syndrome occlusif se traduit par une distension abdominale, vomissement bilieux, absence d'émission du méconium au-delà de 48 h.

L'occlusion peut se compliquer d'un volvulus, d'une atésie, de perforation avec péritonites pouvant évoluer vers une gangrène, ou bien un prolapsus rectal.

Des IM ont été décrits chez des nouveaux-nés suffisants pancréatiques, excluant donc le rôle exclusif de l'IPE. De plus le rôle d'un défaut cellulaire intestinal de CFTR au niveau des villosités semble important en raison de la déshydratation entraînée par défaut de sécrétion des anions. Si l'iléus méconial a longtemps constitué une complication grevée d'une lourde mortalité, aujourd'hui l'amélioration de la prise en charge par des équipes pluridisciplinaires comprenant des néonatalogistes, chirurgiens pédiatres, radiologues et anesthésistes permet une substantielle réduction de la mortalité précoce (Aitken and Fiel, 1993 ; Sferra and Collins, 1993 ; Munck et al, 2001)

- **Syndrome d'obstruction intestinale distale (SOID)**

Est connu comme l'équivalent de l'IM, c'est une pathologie récurrente parfois chronique, spécifique à la mucoviscidose. Il est du à une obstruction de sévérité variable de l'intestin grêle, débutant généralement dans la région iléo-cæcal . Le tube digestif est épaissi, oedématié est rempli de matériel compact (Rubenstein et al, 1986). Il peut survenir à tout âge chez l'enfant atteint de FK, mais plus souvent chez l'enfant plus âgé. Chez les enfants plus jeunes qui ont un

SOID, on observe une diminution de l'appétit, des selles moins nombreux, de la distension et souvent des vomissements. Les patients les plus âgés se plaignent de douleurs à type de crampes, de bruits abdominaux, d'une diminution graduelle des selles et une constipation. Chez la plupart des patients, les masses fécales sont facilement palpables au niveau de la fosse iliaque droite (FID).

Le SOID touche près de 5% des patients avec IPE, les facteurs pouvant jouer un rôle dans son déclenchement sont les anomalies des mucines intestinales, le défaut de transport des électrolytes, l'allongement du temps de transit oro-coecal, la mal digestion pancréatique et la déshydratation du contenu intestinal (Munck et al, 2000).

- Mucocèle appendiculaire

Il est spécifique de la mucoviscidose, correspond à l'obstruction de la lumière appendiculaire par du mucus épais, il se traduit à l'échographie par un appendice élargi avec lumière obstruée. Il peut être asymptomatique et devra alors être surveillé par échographie annuelle.

Lorsqu'il est symptomatique les signes sont proches de ceux de l'appendicite (douleurs abdominales répétitives, la fièvre et les vomissements). Il peut se compliquer de perforation, d'abcès ou d'invagination.

L'appendicectomie, élargie au collet avec enfouissement du bas fond cœcal, permettra d'éviter la récurrence (Coughlin et al, 1990; Shields et al, 1991).

IV.2.3. Atteinte hépatique

Environ 40% des patients mucoviscidosiques présente une atteinte hépatique pouvant évoluer vers l'hypertension portale, cirrhose, la stéatose et rarement vers une décompensation hépatique ou bien une encéphalopathie porto cave. Toutefois, l'incidence de cette atteinte chez les patients adultes est probablement plus élevée puisque une étude révèle que 72% d'entre eux ont des lésions hépatiques certifiées après autopsie (Vawter and Schwachman, 1979).

Les lésions hépatobiliaires résultent de l'obstruction des ductules biliaires, conséquence d'un défaut de fonction ou d'expression de la protéine CFTR au niveau des cellules épithéliales biliaires et d'anomalies du pool des acides biliaires caractérisées par la prédominance dans la bile d'acides biliaires détergents glyco-conjugués hydrophobes et hépatotoxiques (Feranchak, 2001; Gaskin et al, 1988 ; Strandvik et al, 1988; Cohn et al, 1993). L'évolution des lésions contribuerait vers la cirrhose, la raison pour laquelle une minorité de patients atteints de fibrose kystique (FK) développent une cirrhose qui reste indéterminée. Seuls l'iléus méconial et

l'insuffisance pancréatique sont retenus comme possibles facteurs prédisposants (Colombo et al, 2002 ; Lamireau et al, 2004). Jusqu'à présent, aucun lien entre un génotype particulier et le développement d'une cirrhose n'a été formellement retenu (Colombo et al, 1999; Lindblad et al, 1999). D'autres gènes que CFTR sont vraisemblablement impliqués (Salvatore et al, 2002). La lithiase biliaire et la cholangite sclérosante constituent des atteintes non spécifiques et moins fréquentes (16% et 4% respectivement) (Waters et al, 1995).

IV.2.4. Appareil reproducteur

Dès 1971, le fait que l'Atrésie Bilatérale des Canaux Déférents (ABCD) pouvait être une forme génitale de la mucoviscidose avait été évoqué par Holsclaw et ses collaborateurs. Mais c'est seulement en 1990 qu'une équipe française a mis en évidence une fréquence particulièrement élevée de la mutation la plus fréquente du gène CFTR ($\Delta F508$) chez des patients stériles atteints d'une ABCD (Dumur et al, 1990). Au cours des années 1990, plusieurs études ont précisé les types de mutation qui pouvaient être détectées chez ces patients (Dumur et al, 1990; Anguiano et al, 1992; Osborne et al, 1993; Chillon et al, 1995; Costes et al, 1995; Vandervan and coll, 1996; Bienvenu et al, 1997; Claustres et al, 2000).

L'ABCD est trouvée chez 6 à 8% des hommes ayant une azoospermie excrétoire (Bienvenu et al, 1997). Dans ces cas, les testicules fonctionnent en principe normalement mais l'absence de déférent empêche les spermatozoïdes de se mélanger aux sécrétions des vésicules séminales et de la prostate quand se constitue le sperme au moment de l'éjaculation.

Dans la plupart des cas, les vésicules séminales sont anormales ou absentes (figure 10). Le sperme éjaculé n'est donc constitué que des sécrétions prostatiques, il est de très faible volume.

La fréquence de mutation du gène CFTR chez les hommes porteurs d'une ABCD est très variable : au moins une mutation chez 36 à 86% des hommes (Jarvi et al, 1995; Claustres et al, 2000). La variation étant en grande partie expliquée par le type et le nombre de mutations recherchées.

Un variant du gène semble particulièrement fréquent chez les hommes en bonne santé porteuse d'une ABCD. Il s'agit du nombre de thymidines (5, 7 ou 9) constituant une séquence nucléotidique polypyrimidique polymorphe située dans l'intron 8 juste en amont de l'exon 9 du gène, il est nommé le variant 5T ou IVS8-5T. Il a été démontré une relation inverse entre la longueur de cette chaîne polypyrimidique et la quantité de transcrit CFTR délété de l'exon 9 du gène. De fait, le variant 5T est 6 à 8 fois plus fréquent chez les hommes atteints d'ABCD que dans la population normale (Chu et al, 1991)

Certaines ABCD sont associées à une agénésie rénale unilatérale. Dans ces cas, l'anomalie est probablement due à une perturbation du développement du canal de Wolff et du bourgeon urétral ayant une autre origine.

I. Diagnostic phénotypique de la mucoviscidose

I.1. Matériel et méthodes

* Patients

Le diagnostic phénotypique de la mucoviscidose chez nos patients est essentiellement suggéré par des symptômes cliniques évocateurs clairement définis lors d'une conférence de consensus américaine (Rosenstein and cutting, 1998), voir tableau (2) ci dessous, puis confirmé par un taux élevé de chlore et de sodium dans leur sueur (Test de la sueur).

Tableau 2. Symptômes cliniques évocateurs de mucoviscidose

<p>Symptômes Sinorespiratoires chroniques</p>	<p>a) Toux chronique et productive b) Obstructions bronchiques c) Colonisation chronique par des pathogènes typiques de mucoviscidose (<i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Haemophilus influenzae non typable</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa mucoide ou non</i>, et <i>Burkholderia cepacia</i>). d) Anomalies radiologiques persistantes (distension, bronchectasies prédominantes dans les lobes superieurs, atéléctasies, infiltrats) e) Polypes nasaux ; anomalies radiologiques ou scanographiques des sinus f) Hippocratisme digital</p>
<p>Anomalies gastro-Intestinales et nutritionnelles</p>	<p>a) Intestinales : iléus méconial, syndrome d'obstruction intestinale distale, prolapsus rectal b) Pancréatiques : insuffisance pancréatique responsable de diarrhée graisseuse, pancréatite récurrentes c) Hépatiques : atteinte chronique se manifestant par des signes cliniques ou anatomo-pathologiques de cirrhose biliaire focale ou multilobulaire d) Nutritionnelles : retard de croissance staturo-pondérale (malnutrition protéinocalcique), hypoprotéïnémie avec œdèmes, complications secondaires aux carences en vitamines liposolubles</p>
<p>Autres</p>	<p>a) Syndrome de perte de sel : déplétion sodée aigue, alcalose métabolique chronique b) Anomalies urogénitales masculines responsables d'une azoospermie obstructive (ABCD = absence bilatérale des canaux déférents).</p>

Notre étude a été réalisée sur 34 patients dont l'âge varie de 2 mois à 41ans , et qui présentent un ou plusieurs signes cliniques indiqués sur le tableau 2, ils sont répartis en :

18 patients avec absence bilatérale des canaux déférents (ABCD), 16 patients avec d'autres symptômes évocateurs de la mucoviscidose.

Le contexte clinique de cette maladie chez cette deuxième catégorie de patients a été confirmé par un test de la sueur, qui consiste à mesurer la concentration du chlorure dans leur sueur, sachant que les glandes sudoripares des malades mucoviscidosiques ont une teneur augmentée en ions Na^+ , K^+ et Cl^- . On ne teste cependant que le chlore pour des raisons techniques.

• **Réactifs pour test de la sueur**

Acide nitrique 1N (prêt à l'emploi).

- Solution de diphényle carbazone:

Diphényl carbazone	0.2 g
Alcool 95 %	100 ml
Bleu de bromophénol	0.05 g

- Solution de nitrate mercurique $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$:

HNO_3	7.5 ml
Eau distillée	100 ml

0.3 ml de la solution A + 0.3 g de $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ + 100 ml d'eau distillée

- L'eau distillée
- Solution Na Cl à 1g/l
- L'eau physiologique

Pour voir si le réactif ne s'est pas dégradé ou n'a pas diminué de titre, un contrôle d'efficacité s'effectue au début de chaque semaine avec de l'eau physiologique dont le titre est de 150 mEq/l, et après avoir titrer le nitrate mercurique "t".

• **Méthodologie du test de la sueur**

Un test de la sueur positif constitue un élément commun à toute les formes de mucoviscidose. Cette méthode a été publiée par (Di Sant'Agnesse et al, 1953), puis améliorée par (Gibson and Cook, 1959), et reste comme examen de référence de première intention pour le diagnostic fiable et positif de la mucoviscidose à partir du taux de Cl^- et Na^+ dans la sueur des malades, le test se décompose en trois étapes (Webster, 1983) :

-Stimulation de la sueur

La sueur est obtenue après iontophorèse à la pilocarpine (drogue cholinergique qui stimule les glandes sudoripares). Comme celle ci ne traverse pas la barrière cutanée, l'iontophorèse va

permettre sa pénétration de la peau vers les glandes sudoripares (ionisation transcutanée), sa réalisation s'effectue à l'aide d'un ampèremètre à ionisation muni de deux électrodes.

Le bras droit ou gauche est généralement utilisé. La peau devra être indemne de toute altération (eczéma, écorchure) et débarrassée, par un lavage soigneux, des chlorures physiologiques résiduels.

La jonction électrique est réalisée par des compresses imbibées d'une solution de sulfate de potassium à 1 % sous la cathode (fil et pole de couleur noir) et d'une solution de pilocarpine à 0.064 % sous l'anode (fil et pole de couleur rouge). Les électrodes sont fixées à l'aide de bandes de caoutchouc sur la face antérieure de l'avant bras, préalablement nettoyée.

Un courant de 1.5 à 4 mA est appliqué pendant 6 minutes. La peau est ensuite lavée à l'eau distillée et séchée.

L'utilisation d'appareils branchés sur le courant alternatif impose comme précaution d'utiliser le bras droit, car un mauvais fonctionnement peut être à l'origine de spasmes musculaires et de fibrillation ventriculaire surtout chez le jeune enfant. Il est souhaitable d'utiliser des appareils avec batterie rechargeable.

- Recueil de la sueur

On utilise un papier filtre préalablement pesé à 0,1 mg près (P1). Celui-ci sera appliqué sur la surface stimulée, recouvert d'un film plastique collé hermétiquement à la peau pour éviter tout risque d'évaporation.

Après 30 à 60 mn de sudation, le papier filtre est retiré à l'aide d'une pince, et immédiatement repesé précisément (P2) et placé dans un récipient clos.

Le test exige au moins 150 mg de sueur.

NB : les patients chez lesquels la transpiration est lente ou difficile, ils sont enroulés dans des couvertures, avec une bouillotte remplie d'eau chaude placée sur la zone stimulée, et même on peut leur administrer des boissons chaudes tels que le lait.

-Dosage des ions chlorures dans la sueur

Pour le dosage de ces ions nous avons utilisé la méthode colorimétrique modifiée de (Schales and Schales, 1947) : le papier filtre imbibé de sueur, est plongé dans 5 ml d'eau distillée. Après extraction (5 à 10 minutes), la solution est titrée avec du nitrate mercurique en milieu acide nitrique et en présence de diphénylcarbazone comme indicateur coloré.

Le virage est marqué par l'apparition d'une coloration violette stable.

Pour la détermination du taux des chlorures, on utilise la formule suivante :

$$[\text{Cl}^-] \text{ mEq/l} = (\text{Vd} - \text{Vt}) \times t \times 0,602 / 0,035 / \Delta P$$

Vd : volume du nitrate mercurique du dosage (qui a permis le virage du jaune au violet)

Vt : Volume du nitrate mercurique du témoin

(le témoin est constitué d'eau distillée dont les chlorures existent à l'état de traces en raison d'une contamination atmosphérique).

t : Titre de la solution du nitrate mercurique

ΔP : Poids de la sueur (g) = P2 - P1

NB : 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 (port de gants sterils).

I.2. Résultats et discussion

Selon la technique de Gibson et Cooke (1959), lorsque la valeur de chlore est inférieure à 40 mmol/l, le test est normal ; lorsqu'elle est supérieure à 60 mmol/l, le test est positif ; mais la répétition du test à deux reprises est nécessaire pour confirmation de la présence d'une mucoviscidose. Entre 40 et 60 le test est douteux, il faudra également le répéter ; si le deuxième s'avère être négatif, un troisième test sera nécessaire pour contrôle et confirmation (Welsh and Smith, 1996 ; Naimi and Chabani, 1997). La sensibilité de ce test est de 98%, la spécificité est de 83%, et la valeur prédictive positive de 99,5% (Schwachman and Mahmoodian, 1981).

Pour les bases biologiques de ce test : dans les autres organes cibles de la CF, le mécanisme physiopathologique essentiel est habituellement le défaut du transport trans-épithéliale de chlore (Quinton, 1999). Dans les glandes sudoripares, du sujet non mucoviscidosique, la sueur élaborée par les cellules glandulaire est presque isotonique ; elle emprunte ensuite les canaux sudoripares avant d'être excrétée (Quinton, 1999). Les cellules épithéliales canalaire forment une couche confluyente imperméable à l'eau qui absorbe activement le Na⁺ par des canaux ENaC apicaux. Le chlore est absorbé passivement à travers les canaux Cl/CFTR. L'eau ne suivant pas, il en résulte un liquide sudoral hypotonique. Ce mécanisme visant à préserver les électrolytes dans l'organisme.

Chez nos patients, dont le test de la sueur est positif, l'absorption de chlore dans les canaux excréteurs n'est plus possible, la couche épithéliale étant imperméable au chlore du fait de l'absence de canaux Cl/CFTR. Dans ces conditions, l'absorption de sodium ne peut plus se produire ce qui explique la concentration élevée de Na Cl dans leur sueur (Chinet et al, 2003).

Nous avons constaté que nos résultats du test de la sueur sont identiques quel que soit le génotype des autres mutations CFTR: que l'enfant soit ΔF 508 homozygote ou ΔF 508 hétérozygote, ou non porteur de la mutation ΔF 508. Les mêmes résultats ont été retrouvés par (Farrell et al, 1996 ; Wilschanski et al, 1995).

Notre étude nous a révélé également que le test de la sueur ne permet pas d'identifier les hétérozygotes, bien que les concentrations de chlore soient un peu supérieures à la moyenne (Littlewood, 1986)

II. Diagnostic génotypique (recherche de mutations)

II.1. Matériel et méthodes

II.1.1. Réactifs pour extraction d'ADN à partir d'échantillons de sang de patients

BLB : Blood Lysis Buffer (20x), pH 7.4

NH ₄ Cl	: 3.1M	: 165.8g
KHCO ₃	: 0.2 M	: 20g
EDTA	: 20Mm	: 40 ml d'une solution stock à 0.5M, pH 8.0
H ₂ O qsp : 1000 ml		

WLB : White Lysis Buffer (1x)

Tris Cl	: 10 mM	: 1.21g
NaCl	: 400 mM	: 23.4g
EDTA	: pH 8.0 : 2 mM	: 4ml d'une solution stock à 0.5M
H ₂ O qsp : 1000 ml		

TE : 10 mM Tris/ 0,1 mM EDTA , pH 7.5 (1x)

Tris – HCL	2M, pH 7.5	: 1ml
EDTA	0.4M , pH 8.0	: 50 µl
H ₂ O qsp : 200 ml Ajuster pH 7.5 avec HCl		

Proteinase K (Boehringer) : 20 mg/ml ED

SDS 20% ED **Ethanol** : 100%

NaCl 6M : 175.2g NaCl (solution saturée- utiliser le surnageant)

H₂O qsq : 500ml

II.1.2. Méthode d'extraction d'ADN

Lorsque le test de la sueur est positif, il faut confirmer le diagnostic par l'étude des anomalies du gène CFTR, cette étude nécessite l'extraction de l'acide désoxyribonucléique (ADN), support de notre information génétique, ceci se fait à partir de sang total par l'utilisation d'un kit commercialisé : le BAC NUCLEON 3 D'Amersham Life Sciences (Royaume-Uni).

La récupération d'ADN se fait à partir des globules blancs du sang. En effet, se sont les seules cellules sanguines contenant un noyau car les autres cellules, les globules rouges, sont des cellules anucléés.

Pour récupérer cet ADN, commun à toutes les cellules d'un même organisme, nous avons suivi la méthode de Miller et al, 1988 et qui comporte les étapes suivantes :

• **Lyse des globules rouges**

Les globules rouges sont des cellules sanguines anucléés. Elles résultent d'une transformation de réticulocytes en érythrocytes (hématies ou globules rouges), c'est à dire en cellules ayant perdu leur noyau et spécialisées dans le transport des gaz *via* l'hémoglobine. De ce fait, ce type de cellules n'est pas intéressant car elle ne contiennent pas d'ADN, et il faut donc les éliminer par l'emploi d'une solution hypotonique qui a pour effet leur éclatement.

En effet, 35 ml de la solution BLB sont ajoutés au 10 ml de sang prélevé sur EDTA, puis les tubes sont plongés dans la glace pendant 30 mn pour accélérer la lyse, cette solution a une concentration inférieure à celle intracellulaire et, par un phénomène de pression osmotique, va permettre la pénétration d'eau dans le milieu hypertonique , c'est à dire dans les hématies, et cette entrée massive d'eau aboutira à son éclatement. Une centrifugation à 2500 t/ mn pendant 10 minutes permet de recueillir un culot blanc contenant les globules blancs, après élimination du surnageant dans un Becher contenant de l'eau de javel. On resuspend a nouveau le culot dans 30 ml de BLB pour l'élimination de toute trace d'hémoglobine. Une deuxième centrifugation analogue à la précédente permet d'obtenir la fraction cellulaire désirée après élimination du surnageant ; le culot constitué uniquement de globules blancs est rincé délicatement avec 1ml de BLB, puis utilisé directement ou conservé à -20°C .

• **Destruction des membranes des globules blancs et élimination des protéines**

Pour libérer l'ADN contenu dans les globules blancs, il faut détruire leurs membranes plasmiques et nucléaires. Donc, on resuspend le culot dans 0.5 ml de BLB, puis on ajoute 4 ml de WLB pour lyser les membranes plasmiques et nucléaires.

Pour désagréger la bicouche phospholipidique, 200 μl de détergent SDS 20% sont rajoutés, la destruction des membranes libère aussi les protéines, afin de les digérer ; 150 μl de protéinase K est introduite dans le milieu. L'ensemble est incubé durant une nuit à 37°C sous agitation douce.

• **Précipitation des protéines au Na Cl 6M**

Pour chaque tube, on rajoute 1.2 ml Na Cl 6M, suivit d'une agitation forte pendant 15 secondes ; une mousse blanche se forme. Une centrifugation à 3500 t/mn pendant 15 mn permet au sel et aux protéines de se précipiter au fond du tube. On transvase le surnageant, et on lui rajoute 0.2 ml Na Cl 6M, puis on agite pendant 15 secondes.

Une dernière centrifugation à 3500t/mn pendant 15 mn permet l'élimination totale des protéines et les sels résiduels au fond du tube, alors que l'ADN est à l'état soluble dans la phase aqueuse.

• **Précipitation à l'éthanol de l'ADN**

Elle permet l'obtention d'ADN pur et concentré, elle se fait suite à un additionnement de 2 volumes d'éthanol 100% par volume d'échantillon. L'éthanol permet de déshydrater l'ADN, ce qui entraîne l'agrégation des molécules en de multiples brins, qui forment alors une masse de fibres visibles appelées la méduse. On récupère l'ADN sur une pipette pasteur boulée, puis on effectue un lavage dans 1 ml d'éthanol 70%, on égoutte et on resuspend la méduse dans TE (0.5 ml en moyenne). Pour casser les nucléases, l'ADN est soumis à une température de 65°C pendant 30 mn, puis les tubes sont placés dans une roue spéciale à température ambiante pour homogénéiser l'ADN.

• **Evaluation de la qualité et de la quantité de l'ADN**

L'ADN étant la matière première de notre recherche, sa qualité est primordiale et conditionne la réussite de nos travaux. Avant de procéder au génotypage, la qualité et la quantité d'ADN sont systématiquement évaluées.

Par exemple, pour les réactions d'amplification par la technique PCR, il est important de connaître la concentration en acides nucléiques des échantillons utilisés ainsi que leur pureté. En effet, une concentration trop importante d'ADN peut inhiber la réaction d'amplification. Pour un échantillon, 1µl d'ADN dosé à 250 ng / µl suffit.

• **Mesures**

Pour cela, nous avons mesuré les densités optiques (DO) des échantillons à deux longueurs d'onde : 260 nm et 280 nm.

La densité optique à 260 nm permet de quantifier les échantillons car les acides nucléiques absorbent spécifiquement à cette longueur d'onde. Celle à 280 nm permet de détecter une contamination protéique car les acides aminés absorbent spécifiquement à cette longueur d'onde

• **Calculs**

La concentration en ADN est donnée par la formule suivante

$$\text{ADN} = \text{DO}_{260\text{nm}} \times d \times 50 \quad d \text{ étant le facteur de dilution}$$

Sachant qu'une unité de DO à 260 nm correspond à 50 µg/ml d'ADN

Le rendement ou le ratio est donné par le rapport entre la DO à 260 nm et la DO à 280 nm. Il détermine la pureté de l'ADN et doit être compris entre 1.6 et 2 pour que l'ADN soit considéré comme pure et donc utilisable.

Si la pureté et la concentration d'ADN sont satisfaisantes, on réalise l'amplification par PCR et la migration électrophorétique. Pour un stockage à court terme, l'ADN est gardé à 4°C, tandis que pour un stockage à long terme, l'ADN sera conservé à -20°C.

II.1.3. Technique de PCR

• Principe

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique consistant à amplifier la séquence d'ADN désirée par réplication successives et ce, grâce aux ADN polymérase (Saiki et al, 1985). Ces enzymes ont la propriété de synthétiser le brin complémentaire à partir d'une amorce. C'est pourquoi il est nécessaire de choisir des amorces oligonucleotidiques synthétiques capables de s'hybrider aux bornes de la séquence désirée qui pourra être, ainsi, amplifiée.

Pour pouvoir réaliser cette opération, il est indispensable d'avoir une connaissance préalable de la séquence que l'on souhaite amplifier.

Le nombre de copies de la séquence choisie est doublé à chaque réplication et son augmentation est donc exponentielle.

L'amplification se fait en trois temps :

Tout d'abord, une dénaturation thermique des matrices à 94°C assure la dissociation des deux brins d'ADN. Puis, un abaissement de la température jusqu'à 62°C permet l'hybridation des amorces avec les bornes de la séquence désirée. Enfin, l'élongation du brin complémentaire à partir des amorces grâce à l'action de l'ADN polymérase : la *Taq* Polymérase, et ce, à 72°C

Ces trois étapes constituent un cycle au cours duquel la quantité d'ADN cible a été doublée.

Chaque cycle dure quelques minutes, le taux d'amplification (théorique) est de 2 (exposant) n , si bien qu'après une trentaine de cycles de PCR, le nombre de copies est de plusieurs dizaine de millions de fois supérieur à n'importe quelle autre séquence du génome. Cette surreprésentation la rend facilement analysable et manipulable.

L'enzyme utilisée est une polymérase thermostable extraite d'une bactérie vivant dans les sources chaudes : *Thermus aquaticus*. Par contre, l'enzyme utilisée auparavant était détruite à chaque cycle, au cours de l'étape de dénaturation. Il fallait donc l'ajouter à chaque cycle, inconvénient supprimé grâce à l'utilisation de la *Taq* polymérase.

De nouveaux types de PCR ont été introduits. Nous citerons brièvement :

La PCR dite « Multiplex » pour amplifier des gènes avec de nombreux exons (le gène CFTR), il est possible d'introduire dans le milieu d'amplification des couples d'amorces spécifiques différentes.

La PCR dite « Nested PCR » : elle correspond à une seconde PCR réalisée en utilisant des nouvelles amorces situées à l'intérieur du domaine défini par les amorces de la première PCR.

La PCR quantitative : dans ce type de PCR, on cherche à estimer le nombre de copies présent dans la séquence cible d'ADN ou d'ARN. La proportionnalité entre le nombre d'amplifications et le nombre de copies n'est valable que pour un nombre de cycles PCR faible.

• **Composants de la réaction PCR et leurs rôles**

Selon le protocole kit, nous avons introduit dans le tube les volumes suivants :

- Eau stérile	36.1 µl
-Tampon Tris-HCL 10X, 20mM, pH 8	5.0 µl
- dNTP à 1,25 Mm	2.0 µl
- MgCl ₂ à 50 Mm	1.5 µl
-Amorce sens (5' → 3') à 12.5 pmol/µl	2.0 µl
-Amorce anti-sens (3' → 5') à 12.5 pmol/µl	2.0 µl
-Taq Polymerase	0.4 µl
-L'ADN à amplifier (250ng/µl)	1.0 µl
Volume total	50 µl

A la fin de préparation des échantillons, trois à cinq gouttes de paraffine sont ajoutées dans les tubes afin d'éviter l'évaporation, au moment de l'augmentation de la température dans le thermocycler (bloc chauffant-refroidissant programmable, les montées et descentes en température ainsi que les durées de chacune des étapes sont pilotées par microprocesseur).

Les tubes sont placés dans le thermocycler et les réactions en chaîne sont programmées durant 28 cycles à 94°C pendant une minute, puis à 62°C pendant 45 mn et enfin à 72°C pendant une minute et trente secondes.

• **Rôles des composants de la PCR**

L'eau stérile est utilisée afin d'éviter les contaminants risquant de nuire à la manipulation. Le tampon Tris HCl permet une activité optimale de l'enzyme par maintien du pH. Le désoxy Nucléotide TriPhosphate (ou dNTP) contient les quatre désoxynucléotides Triphosphates à savoir : désoxy Adénosine Triphosphate (dATP), désoxy Guanosine Triphosphate (dGTP) , désoxy Cytidine Triphosphate (dCTP) et désoxy Thymidine Triphosphate (dTTP). Ces nucléotides sont les substrats de l'ADN polymérase pour synthétiser la séquence complémentaire à la séquence cible.

Le MgCl₂ permet la formation d'un pont entre l'enzyme et le brin d'ADN afin de favoriser la synthèse du brin complémentaire par l'enzyme.

Le choix des amorces est une étape importante lors de la mise au point d'une PCR. Parmi les critères de sélection : la séquence des amorces ne doit pas permettre la formation d'épingles à cheveux, ni d'hybrides entre amorces. De plus, la composition en bases doit être équilibrée et les séquences choisies ne doivent pas correspondre à des séquences génomiques répétées.

Les amorces ou primers utilisés dans notre étude sont livrés avec le kit PCR (Boehringer Mannheim France).

Le tube contenant le milieu réactionnel est placé dans un Thermocycleur qui délivre à chaque instant au milieu réactionnel une température donnée permettant la réalisation de l'une des trois étapes du cycle de PCR.

La température d'hybridation des amorces ou T_m (Température melting) correspond à la température de fusion de celle-ci. Pour déterminer cette température, il faut dénombrer les adénines et les thymines présentes au sein de la séquence de l'amorce. Faire de même avec les guanines et les cytosines.

La température d'hybridation nous est donnée par la formule suivante :

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = 2 (A+T) + 4 (G + C)$$

L'ADN extrait doit avoir une concentration comprise entre 200 et 250 ng/ μL

L'ensemble de ces conditions ainsi respectées et le fait de ne pas dépasser 30 cycles de PCR, permet d'éviter la formation de bandes non spécifiques.

Effectivement les deux problèmes majeurs rencontrés lors de la manipulation sont :

- Les contaminations d'où l'intérêt de porter des gants ; d'autoclaver le matériel et d'aliqoter les tubes qui ne serviront que pour une seule amplification puis seront jetés.
- La formation de bandes non spécifiques en raison de l'hybridation des amorces avec des fragments d'ADN que l'on ne désire pas amplifier. Ces fragments sont alors amplifiés en même temps que les fragments voulus, et donneront sur l'électrophorégramme plusieurs bandes d'intensité plus ou moins faible.

• **Remarque :**

La PCR est une technique très sensible, son risque majeur est la contamination, la vérification de l'efficacité de la technique par électrophorèse sur gel d'agarose est une étape obligatoire dans certains laboratoires surtout débutants; cependant, au niveau du laboratoire dans lequel notre étude a été réalisée, la PCR est devenue une technique de routine, et un certain nombre de mesures sont obligatoirement appliquées afin de limiter au maximum les risques de contamination tel que :

- isolement physiques des différentes phases de la PCR par cloisonnement des locaux
- manipulations dans des hottes à flux laminaires

- utilisation de matériel stérile à usage unique
- mise en marche de système de climatisation/ventilation (avec filtres absolus) produisant des pressions différentes d'une pièce à l'autre .
- le port des gants, de masques et de lunettes
- utilisation de pipettes à cônes munis de barrières filtres
- aliquotage des réactifs
- destruction d'un éventuel ADN contaminant par l'exposition des tubes contenant le mélange réactionnel aux UV avant l'addition de l'ADN cible.
- **Compositions des différentes amorces utilisées dans l'amplification du gène CFTR :**
(Tableaux 3 et 4)

Tableau 3. Amorces proposées par Zielenski et al., 1991

Exon	Composition de l'amorce de 5' à 3'	Nom	Taille du produit (pb)
1	TCGGCTTTTAACCTGGGCAGTGA	1i5	308
	GTGGGCACGTGTCTTTCCGAAGC	1i3	
2	CATAATTTTCCATATGCCAG	E2F	333
	CACCATACTTGGCTCCTATT	E2R	
3	CTTGGGTTAATCTCCTTGA	3i5	309
	ATTCACCAGATTCGTAGTC	3i3	
4	TCACATATGGTATGACCCTC	4i5	438
	TTGTACCAGCTCACTAACCTA	4i3	
6b	TGGAATGAGTCTGTACAGCG	6bi5	417
	GAGGTGGAAGTCTACCATGA	6bi3	
8	TGAATCCTAGTGCTTGGCAA	8i5	357
	TCGCCATTAGGATGAAATCC	8i3	
9	TAATGGATCATGGGCCATGT	9i5	561
	ACAGTGTTGAATGTGGTGCA	9i3	
10	GCAGGTACCTGAAACAGGA	10i5	491
	CATTCACAGTAGCTTACCCA	10i3	
11	CAACTGTGGTTAAAGCAATAGTGT	11i5	425
	GCACAGATTCTGAGTAACCATAAT	11i3	
12	GTGAATCGATGTGGTGACCA	12i5	332
	CTGG3TAGCATGAGGCGGT	12i3	
13	TGCT4ATACGAGACATATTGCA	13i6	310
	AGGAGCATCTCCTTCTAATGAGA	Mr13e3	
15	GTGCATGCTCTTCTAATGCA	15i5	485
	AAGGCACATGCCTCTGTGCA	15i3	
16	CAGAGAAATTGGTCGTTACT	16i5	570
	ATCTAAATGTGGGATTGCCT	16i3	
17b	TTCAAAGAATGGCACCAGTGT	17bi5	452
	TGCAGCATTTTATTATTGA	17be3	
18	GTAGATGCTGTGATGAACTG	18i5	390
	AGTGGCTATCTATGAGAAGG	18i3	
19	GCCCGACAAATAACCAAGTGA	19i5	454
	GCTAACACATTGCTTCAGGCT	19i3	
20	GGTCAGGATTGAAAGTGTGCA	20i5	472
	CTATGAGAAAAGTGCCTGGA	20i3	
21	CAATACAATAAGGGAAAAAT	21F	240
	AATGATGTCAGCTATATCAG	21R	

Tableau 4. Amorces proposées par Fanen et al., 1992

Exon	Composition de l'amorce de 5' à 3'	Nom	Taille du produit (pb)
5	TATTTGTATTTTGTGGTTGA	DCF5i5	235
	CTTTCCAGTTGTATAATTTA	DCF5i3	
6a	TGGAAGATAACAATGACACCTG	DCF6ai5	345
	GCATAGAGCAGTCCTGGTTT	DCF6ai3	
7	CATCCTGAATTTTATTGTTA	DCF7i5	365
	ATCATAGTATATAATGCAGC	DCF7i3	
14a	GTATACATCCCCAAACTATCT	14ai3	251
	CTTAGATTCAAGTAATACTA	14asp5	
14b	GAACACCTAGTACAGCTGCT	14bi5	248
	ATAAAACACAATCTACACAA	DCF14bi3	
17a	TGCAATGTGAAAATGTTTAC	17ae5	283
	CTCTTATAGCTTTTTTACAA	17ae3	
22	AGAATGTCAACTGCTTGAGTG	22SSCPF	297
	AAGCAGGCATAATGATTCTGT	22SSCPR	
23	CTGTTCTGTGATATTATGTG	DCF23i5	200

II.1.4. Digestion enzymatique

Pour la détection de la présence de mutation dans le gène CFTR, nous avons utilisé des enzymes de restriction qui sont capables de reconnaître spécifiquement une courte séquence, de 4 à 10 pb, et de cliver l'ADN au site reconnu. Ils permettent de fragmenter l'ADN en segments de taille réduite, ou de le couper à tel ou tel site désiré. Certains enzymes coupent le site en son milieu et produisent deux fragments dont les extrémités sont franches.

Cependant, la plupart réalisent une coupure dissymétrique : on parle dans ce cas d'extrémités cohésives (chaque fragment possède une chaîne qui dépasse l'autre de quelques bases).

Plusieurs centaines de ces enzymes ont été caractérisés : ils reconnaissent une grande variété de sites de coupure. Les enzymes de restriction sont utilisés pour établir une carte de restriction de toute molécule d'ADN que l'on souhaite caractériser. Cela consiste à déterminer l'ordre des sites de restriction le long de cette molécule, qui vont produire, après "digestion

enzymatique" de cette molécule, des fragments de tailles différentes dont la taille pourra être définie par électrophorèse.

Les enzymes de restriction appartiennent à la classe des endonucléases, c'est-à-dire des enzymes capables de cliver les liaisons phosphodiester entre deux nucléotides à l'intérieur d'un acide nucléique. Les endonucléases se différencient des exonucléases qui dégradent la molécule d'ADN à partir de l'une de ses extrémités (3' ou 5').

Les séquences de nucléotides reconnues par les enzymes de restriction sont habituellement des séquences dites palindromiques. Les séquences palindromiques sont des séquences où la succession des nucléotides lue dans le sens 5'→3' (gauche-droite) pour le premier brin est identique à la séquence lue dans le sens droite-gauche pour le second brin (sens 5'→3'). Il faut remarquer que dans les ADN, on rencontre statistiquement des séquences reconnues par des enzymes de restriction. Ainsi, la séquence GATC reconnue par l'enzyme *Mbo* I est présente avec une fréquence statistique de 1/256 paires de bases ($1/4^4$). En effet, la fréquence de coupure d'un ADN par une enzyme de restriction donnée peut être approchée statistiquement en considérant le nombre de nucléotides de la séquence spécifique reconnue par l'enzyme. Ainsi, par exemple, dans la séquence de six nucléotides: GGATCC reconnue par l'enzyme

Bam HI, on aura donc une fréquence de coupure statistique de $1/4^6$, soit 1 coupure tous les 4096 nucléotides.

La plupart des enzymes de restriction utilisées au laboratoire présentent un site de reconnaissance (souvent palindromique) et un site de coupure identique ou proche du site de reconnaissance, ce sont des enzymes de type II.

Les enzymes de type I reconnaissent des séquences sur l'ADN sans aucune symétrie. Ces enzymes coupent non pas au niveau de la séquence de reconnaissance mais 1000 à 5000 paires de bases plus loin. Les enzymes de type III présentent également un site de reconnaissance mais coupent une vingtaine de nucléotides plus loin.

Les enzymes appropriées à notre travail sont indiquées sur le tableau 5.

Tableau 5. Enzymes de restriction utilisées dans la digestion de nos produits PCR

L'enzyme	Séquence palindromique avec site de restriction
<i>Bst</i> I	G▼GATC C C CTC▲G
<i>Taq</i> I	T▼CG A A GC▲T
<i>Sma</i> I	CCC▼GGG GGG▲CCC
<i>Pvu</i> II	CAG▼CTG GTC▲GAC
<i>Bgl</i> II	A▼GATC T T CTTG▲A
<i>Cla</i> I	AT▼CG AT TA GC▲TA
<i>Hae</i> III	GG▼CC CC▲GG
<i>Hpa</i> II	C▼CG G G G C▲C
<i>Aat</i> II	G ACGT▼C C▲TGCA G

II.1.5. L'électrophorèse en gel de polyacrylamide

- Principe

Il repose sur la séparation de molécules chargées électriquement, en fonction de leur charge et de leur taille et ce, sous l'influence d'un champ électrique, l'ADN est chargé négativement donc les différents ADN possèdent la même densité de charge et migreront vers le pôle positif, soit l'anode. De plus, le gel de polyacrylamide est réticulé, donc les molécules d'ADN de petites tailles migrent plus vite que les molécules de grandes tailles, c'est l'effet de tamisage. En outre, ce gel permet d'analyser des fragments de moins de 1000 pb en raison de ses petits pores

Le polyacrylamide est formé par copolymérisation d'acrylamide monomère et de bisacrylamide, agent de pontage. Cette réaction de copolymérisation se fait selon un mécanisme radicalaire. Ces radicaux libres formés à partir du persulfate d'ammonium, initient la réaction et ce, en présence de TEMED (Tétra Méthyle Ethylène Diamine).

Le degré de polymérisation du gel, fonction du diamètre des pores, dépend de la concentration totale en acrylamide et du pourcentage en bis-acrylamide.

La concentration en polyacrylamide est ajustée suivant la taille des fragments d'ADN à séparer. A titre indicatif, on peut se reporter au tableau (6) ci-dessous (Sambrook et al, 1989)

Tableau 6. Concentration du support de l'électrophorèse en fonction de la taille des fragments à séparer (Sambrook et al, 1989).

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

• **Préparation d'un gel de polyacrylamide**

Notre gel est de 10 % (Kerem et al, 1989), car nos fragments d'ADN, produits de la digestion enzymatique, ont une taille comprise entre 50 pb et 250 pb et cela correspond à une taille de pores suffisante.

- On pèse 0,1g de persulfate d'ammonium pour 1ml eau stérile

- On verse dans un tube en polypropylène :

La solution de polyacrylamide	7.5 ml
Le tampon TBE 0.5x	750 µl
Le persulfate d'ammonium	150 µl
Le TEMED	15 µl

On complète à 15 ml avec de l'eau stérile

- On homogénéise par retournement puis on coule le gel entre les deux plaques et on place les peignes qui permettent d'aménager des puits dans le gel.

- Après solidification, on ôte les peignes et on introduit dans quatre puits les échantillons composés de 8 µl d'ADN et de 2 µl de tampon de charge contenant :

1/ Un alourdisseur (sucrose) permettant d'augmenter la densité d'ADN à déposer dans le gel afin de pouvoir l'entraîner vers le fond du puits. Cela évite à l'échantillon d'amplification de remonter à la surface du tampon et donc de contaminer les autres puits.

2/ Un marqueur de mobilité (bleu de bromophénol) permettant de visualiser la migration.

Dans le cinquième puits, nous avons introduit 1µl le marqueur de taille avec 2µl de tampon de charge ; ce marqueur est constitué d'un ensemble de fragments d'ADN linéaires bi caténaire de tailles connues.

Ici, on a utilisé un plasmide digéré par une enzyme de restriction la *Hae* III, et donnant ainsi des fragments d'ADN de taille différente. Le temps de migration est de deux heures à 150 volts.

- Après ce temps, on dépose le gel dans un bain de bromure d'éthidium (BET) et de tampon Tris Borate EDTA (TBE) pendant 10 minutes. Le BET est un colorant fluorescent qui s'intercale entre les bases azotées et provoque une émission de fluorescence en présence de radiations UV, permettant ainsi la visualisation des bandes d'ADN.
- Le gel est déposé par la suite sur la plaque UV et, grâce au BET qui fluoresce, on visualise les bandes et on les photographie (fig 11a - d).

Habituellement, toute mutation ainsi détectée est caractérisée par séquençage direct du produit PCR. En raison de la mise en œuvre plus longue et plus coûteuse du séquençage, ainsi que l'exploration en routine des exons ciblés du gène CFTR dans ce laboratoire, nous avons opté pour une stratégie qui consiste à répéter l'électrophorèse au moins en triplicate pour chaque échantillon, ce qui nous a permis d'identifier les différentes mutations indiquées sur le tableau 7.

II.2. Résultats et discussion

L'électrophorèse des produits PCR après digestion par des enzymes appropriés permet l'identification des mutations, la détermination de la taille de chaque fragment d'ADN en mesurant leur distance de migration en la comparant à celle de ce marqueur de taille, ainsi que la confirmation de l'état hétérozygote ou l'état homozygote pour la mutation concernée.

Dans le cas où le site de restriction est absent dans le produit PCR, un seul fragment est mis en évidence qui apparaît sous la forme d'une seule bande sur le profil électrophoretique chez les homozygotes (Pistes: A, D, F, J, M et P), et de deux bandes chez les hétérozygotes (Piste: C)

Tandis que, si le site de restriction est présent dans le produit en question, le nombre de bandes visualisées varie en fonction du nombre des fragments de restriction (Pistes: B, E, G, H, I, K, L, N et O) (fig 11a - d).

Tableau 7. Phénotypes et génotypes de 16 patients mucoviscidiques de l'Est et Sud

Algérien

P	Origine	Consang	L'âge	Sexe	Symp	Test de sueur cliq mEq/l	Mutations CFTR
P01	Menea	Oui	1an	F	OIR,APS,IPE,RC	95, 100	Δ F508/ Δ F508
P02	Ain Touta	Oui	9mois	F	APM, IPE	80, 110	Δ F508/S549N
P03	Ain Azel	Non	4ans	F	APM, IPE	65,90,90	Δ F508/W1282X
P04	El –Kala	Oui	2ans	M	APM,OIR,IPE	92, 95	W1292X/W1292X
P05	Sidi-Okba	Non	2ans	M	OIR, IPE	72 , 80	R334W/ R347H
P06	Mzad chiche	Oui	6ans	M	APS,IPE,RC	100-129	Δ F508/ Δ F508
P07	El-Oued	Non	7mois	M	APM, IPE	86,86,92	N1303K/ R553X
P08	Djamaa	Oui	8ans	F	APM,IPE,OIR	109 ,89, 93	Δ F508/ N1303K
P09	Djamaa	Oui	5ans	M	APM,IPE	87,107	Δ F508/ N1303K
P10	SoukNaaman	Oui	1ans	M	APS, IPE,RC	172, 192	Δ F508/ Δ F508
P11	Tebessa	Oui	6ans	F	APM, IPE	80,115	G542X/ G542X
P12	Ouargla	Non	4ans	F	IPE , DT	65,104	G85E/Y122X
P13	Chechar	Non	9 ans	F	OIR,APS,IPE	70,80	Δ F508/ Δ F508
P14	Guelma	Non	18 mois	M	OIR, IPE, RC	80,100	W1282X/W1282X
P15	Chir	Oui	3ans	M	IPE,OIR,APS,RC	NF	Δ F508/ Δ F508
P16	Deraan	Non	2ans	M	APM	89 ,100	Δ F508/ G542X

P : Patient

Consang : consanguinité

Sym cli : symptômes cliniques

OIR : obstructions intestinales répétées

APS : atteinte pulmonaire sévère

IPE : insuffisance pancréatique exocrine

RC : retard de croissance

APM : atteinte pulmonaire modérée

DT : diabète

NF : non fait

L'analyse de 32 chromosomes CF provenant de 16 patients de l'est et sud algérien chez lesquels le diagnostic phénotypique a confirmé la présence de la pathologie et a montré que la mutation Δ F508 est la plus fréquente : 10/16 (62,5%), une fréquence située entre deux extrêmes la plus élevée au Danemark (87,2 %) et la plus basse en Turquie (21,3 %)(Estivill et al, 1997) .

5/16 (31,25%) des patients sont hétérozygotes composites avec $\Delta F508$ sur un allèle et une autre mutation du gène CFTR sur l'autre chromosome, 5/16 (31,25%) sont homozygotes pour la mutation $\Delta F508$, 3/16 (18,75%) ont la mutation N1303K, 2/16 (12,5%) portent la mutation W1282X, 2/16 (12,5%) ont la mutation G542X.

Les autres mutations (G85E, Y122X, R553X, R334W, R347H et S549N) sont rares, voire détectées seulement chez un seul patient.

A l'état homozygote, nous avons constaté que la mutation $\Delta F508$ est associée à la forme classique de la maladie avec une augmentation des électrolytes dans leur sueur, une insuffisance pancréatique exocrine et une atteinte obstructive des poumons, le plus souvent, sévère chez l'ensemble des malades, et même avec des occlusions intestinales répétées chez quelques patients ayant ce même génotype, ceci confirme le résultat obtenu par (Zielenski, 2000) : un même génotype ne peut pas exprimer toujours le même phénotype .

Chez le reste des homozygotes pour les autres mutations (W1282X/W1282X, G542X/G542X, W1292X/W1292X), ainsi que les hétérozygotes composites porteurs d'une ou deux mutations légères comme: ($\Delta F508/S549N$, $\Delta F508/W1282X$, R334W/R347H, G85E/Y122X et autres), nous avons constaté qu'en dépit d'un test de sueur pathologique, la majorité des malades présentent une atteinte pulmonaire modérée associée avec une insuffisance pancréatique à l'exception du cas (P 16) dont la fonction pancréatique est préservée. Ceci suggère le caractère dominant des mutations dites légères ou peu sévères.

Sur le plan physiopathologique, la mutation $\Delta F508$ est considérée comme la plus sévère, car souvent la protéine CFTR malformée est détruite dans le système réticulum endoplasmique – appareil de Golgi , où elle occupe une mauvaise position au sein des membranes cellulaires des organes cibles. Ceci induit soit un dysfonctionnement total, soit un fonctionnement très réduit qui se répercute sur la circulation du chlore à travers les parois des cellules endothéliales de certains organes exocrines. Cette circulation de chlore amoindrie provoque l'épaississement du mucus, et l'accumulation de sécrétions visqueuses associées avec l'obstruction progressive et la destruction subséquente des conduits excréteurs.

Si les raisons de l'élévation anormale de la concentration du chlore de la sueur de ces malades ont été expliquées dans le paragraphe réservé au test de la sueur, nous essayons dans cette partie d'établir un lien physiopathologique entre cette forme de mutation et ces atteintes sévères.

Concernant l'atteinte pulmonaire, l'élément central est le liquide de surface bronchique qui recouvre l'épithélium de surface des voies aériennes, et comme la protéine CFTR contrôle les transports ioniques trans-épithéliaux, donc elle participe à la régulation de l'hydratation de ce liquide bronchique (Boucher, 1994). Les cellules de l'épithélium de surface des voies aériennes

humaines normales sont équipées à la fois pour une absorption active de sodium et pour une sécrétion active de chlore. L'importance relative de ces deux mouvements conditionnant le flux net hydro électrolytique et permettant de réguler finement le volume de la couche liquidienne de surface (Boucher, 1994 ; Chinet, 2000 ; Chinet, 2001). Le canal CFTR intervient dans la régulation de ces transports ioniques à différents niveaux : c'est d'abord un canal chlore activable par l'AMPc. De plus, CFTR permet l'activation par l'AMPc du canal ORCC (Outwardly Rectifying chloride channel) et exerce une inhibition tonique sur le canal ENaC.

Dans les voies aériennes de nos sujets mucoviscidosiques, il y a une hyperabsorption de sodium et un défaut de sécrétion de chlore qui se traduit par une augmentation de l'absorption de sel et donc d'eau. L'hyperabsorption de sodium résulte de la levée de l'inhibition tonique qu'exerce CFTR sur les canaux ENaC. L'hyperabsorption de sel est d'autant plus marquée que la sécrétion active de chlore est défectueuse et ne peut être stimulée par les agents qui augmentent la concentration intracellulaire d'AMPc. Cela résulte de l'absence ou des dysfonctionnement des canaux Cl/CFTR et des perturbations de la régulation des canaux Cl ORCC. L'hyperabsorption de sel et d'eau entraîne donc une déshydratation du liquide de surface bronchique, modifiant les propriétés rhéologiques de ce liquide et altérant la clairance mucociliaire (Boucher, 1994 ; Boucher, 1999; Chinet, 2000 ; Chinet, 2001). Cela a pour conséquences la survenue d'infections broncho-pulmonaires répétées et la présence d'une réaction inflammatoire locale intense et délétère. Selon Davis et al (1996), la susceptibilité des voies aériennes mucoviscidosiques aux infections à *Pseudomonas aeruginosa* est très particulière, car environ 75 % des sujets malades sont infectés par ce germe. Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer la colonisation des conduits respiratoires par ce type de bactéries :

- l'épithélium des voies aériennes mucoviscidosiques est en permanence lésé par les processus infectieux, d'où des processus de réparation au cours desquels les cellules épithéliales passent par des phases de différenciation, de migration et de prolifération, alors que ce germe se fixe préférentiellement sur les cellules en cours de réparation par rapport aux cellules normales (De Bentzmann et al, 1996 ; Plotkowski et al, 1999).

- d'autres travaux suggèrent, à l'inverse, que cette bactérie se lierait à CFTR sur les cellules épithéliales bronchiques normales, ce qui permettrait l'internalisation du germe et sa destruction avec la cellule épithéliale. Ce système d'élimination serait à l'évidence perturbé dans la mucoviscidose correctement localisé, d'où la persistance de ce germe dans les voies aériennes mucoviscidosiques (Pier et al, 1997).

- une autre hypothèse considère que *P. aeruginosa* (et d'autres germes) pourrait adhérer préférentiellement aux mucines des sujets mucoviscidosiques. En effet, la composition biochimique des mucines bronchiques pourrait être constitutionnellement altérée dans la

mucoviscidose avec notamment une augmentation des résidus sulfates (Carnoy et al, 1993 ; Zhang et al, 1995). CFTR pourrait indirectement contrôler ce phénomène en régulant le pH dans les citernes de l'appareil de Golgi; il en résulterait dans la mucoviscidose une alcalinisation diminuant l'activité d'enzymes pH-dépendantes (comme les sialyltransférases) rendant accessibles un plus grand nombre de sites sur les glycoprotéines muciniques pour la sulfatation (Zhang et al, 1995 ; Chinet, 2001).

Les infections broncho-pulmonaires répétées et la colonisation des voies aériennes par *P. aeruginosa* sont délétères pour la fonction respiratoire. Elles entraînent une inflammation locale intense avec libération de cytokines, afflux de polynucléaires activés et relargage d'enzymes destructrices telles que l'élastase neutrophile. Cette enzyme protéolytique est en effet capable de léser les cellules épithéliales bronchiques, de cliver les principaux constituants de la matrice extracellulaire, d'altérer la clairance mucociliaire (Hendry et al, 1999). En outre, les facteurs de virulence sécrétés par *P. aeruginosa* peuvent eux mêmes léser les cellules épithéliales bronchiques, stimuler la sécrétion de mucines, et favoriser la réaction inflammatoire participant ainsi à la destruction cellulaire (Denning et al, 1998 ; Britigan et al, 1999).

Outre l'inflammation secondaire aux infections microbiennes et à la colonisation des voies aériennes par le germe en question, il pourrait exister une inflammation constitutionnelle indépendante des infections broncho-pulmonaires. Une étude a retrouvé une augmentation du nombre des polynucléaires neutrophiles et de la concentration d'interleukine (IL-8) dans le liquide de lavage bronchovéolaire d'enfants mucoviscidosiques de 1 à 12 mois, même indemnes d'infection broncho-pulmonaire, suggérant l'existence d'une inflammation primitive (Khan et al, 1995).

D'autres travaux ont montré que les cellules épithéliales des voies aériennes des sujets atteints de mucoviscidose secrètent plus d'IL-8 (pro-inflammatoire) et moins d'IL-10 (anti-inflammatoire) que les cellules de sujets indemnes (Boufield et al, 1995 ; Tabary et al, 1999).

L'inflammation, qu'elle soit secondaire aux infections ou primitive, joue un rôle central dans les manifestations de la maladie. Les tissus pulmonaires sont en effet détruits par les infections et par certains produits de l'inflammation avec formation de broncheectasies, puis à un stade ultime, insuffisance respiratoire et décès.

Concernant la physiopathologie de l'insuffisance pancréatique de la mucoviscidose : cette anomalie a été constatée au niveau de la sécrétion canalaire et la sécrétion acineuse. Les sécrétions ductulaires pancréatiques sont des sécrétions hydroélectrolytiques riches en ion bicarbonate.

En fait, le transfert basolatéral de cet ion se fait par l'intermédiaire d'un cotransporteur $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ stimulé par l'AMPc sous l'influence d'un gradient électrogénique créée par la

dépolarisation membranaire due à CFTR suite à l'excrétion de l'ion Cl^- , tandis que sa sortie au niveau du pôle apical se fait par un autre cotransporteur qui est $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. Dans la mucoviscidose, l'absence d'activité CFTR entraîne un défaut de dépolarisation de la membrane et donc d'entrée de bicarbonate dans la cellule. Il en résulte un défaut de sécrétion de bicarbonate (Soleimani and Shumaker, 1999).

Pour l'anomalie de la sécrétion acineuse, on sait bien qu'après leur synthèse, les enzymes pancréatiques sont véhiculées à travers la cellule acineuse dans les grains de zymogène puis excrétées par un mécanisme d'exocytose. Les membranes des grains de zymogène sont ensuite recyclées par endocytose. Ce phénomène, et non l'exocytose est dépendant du pH alcalin qui règne dans la lumière acineuse grâce à la sécrétion de bicarbonate des cellules ductulaires et peut être également des cellules acineuses les plus proches du ductule.

Dans la mucoviscidose, le défaut de sécrétion de bicarbonate aboutit à une acidification du milieu. L'endocytose des membranes est altérée et il en résulte une accumulation de matériel membranaire au pôle apical des cellules sécrétrices et une dilatation de la lumière acineuse. L'environnement alcalin est également indispensable à la solubilisation des protéines déversées lors de l'exocytose. Il existe donc une corrélation entre le pH luminal et la capacité sécrétoire des cellules acineuses (Freedman and Alvarez, 1999).

Selon l'étude de Baxter et al (1988), les hétérozygotes composites sont protégés contre la déperdition hydrique et saline au cours des diarrhées dues à des entérotoxines d'*Escherichia coli* et du *Vibrio cholerae*, ces souches ont en commun la production de toxines qui augmentent la concentration d'AMPc ou de GMPc dans les entérocytes et entraînent une augmentation de la sécrétion de chlorure. Si on admet que les hétérozygotes ont 50% d'activité de la protéine CFTR, leur sécrétion de chlorure en réponse aux toxines bactériennes, sera moins élevée, d'où une déperdition hydrique moins importante et la survie prolongée. Pier et al (1998), ont suggéré récemment que la première boucle extracellulaire de CFTR est nécessaire à l'internalisation de *Salmonella typhi* dans les cellules épithéliales intestinales. La protéine ΔF508 , associée à une diminution de l'expression de CFTR à la surface des épithéliums, diminuerait l'entrée du pathogène dans l'épithélium intestinal assurant une protection vis à vis de l'infection, ce ci peut être considéré comme l'un des mécanismes de sélection des hétérozygotes.

Sur le plan moléculaire :

La mutation ΔF508 a été identifiée par Kerem B et al., (1989) ; elle s'agit d'une mutation de la classe II, localisée dans le domaine NBD1(codé par l'exon 10), résulte d'une délétion de trois nucléotides (CTT) en position 1653, 1654 et 1655 du messenger de ce gène , aboutissant à l'élimination de la phénylalanine(F) en position 508. Cette délétion n'entraîne pas de décalage du cadre de lecture et n'a pas d'effet sur la liaison d'ATP et le changement du

troisième nucléotide du codon 507 ne change pas l'acide aminé (isoleucine); mais la seule conséquence est l'absence de l'acide aminé 508 qui est la phénylalanine.

La mutation perturbe le repliement du domaine NBD1 et empêche la maturation complète de la protéine. La mutation $\Delta F508$ est probablement impliquée 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.

Au niveau des profils électrophorétiques, la délétion de 3pb entraîne en effet un raccourcissement du produit PCR correspondant à l'allèle $\Delta F508$ (91 pb) qui migre plus rapidement que l'allèle normal (94 pb).

La mutation N1303K, est aussi de la classe II, identifiée par Osborne et al., (1991); située dans le domaine NBF2, codée par l'exon 21, elle résulte suite à une substitution d'une cytosine par une guanine en position 4041 dans la séquence nucléotidique et qui, se traduit dans la séquence protéique par la substitution d'une asparagine (N) par la lysine (K) sur le codon 1303.

La mutation W1282X, a été identifiée par Vidaud et al., (1990); localisée dans le domaine NBF2, codée par l'exon 20, elle correspond à une substitution d'une guanine par une adénine en position 3979 dans la séquence nucléotidique et qui se traduit dans la séquence protéique par le changement de la tryptophane (W) par le codon STOP sur le codon 1282, et donc un dysfonctionnement de la protéine CFTR.

La mutation G542X, identifiée par Kerem B et al., (1990); rencontrée au niveau du domaine NBF1 codée par l'exon 11, elle est produite suite à une substitution d'une guanine par une thymine en position 1756 de la séquence nucléotidique et qui se traduit dans la séquence protéique par le remplacement de la glycine (G) par un codon STOP sur le codon 542.

La mutation G85E, identifiée par Zielenski et al., (1991b); située au niveau du domaine TM1, codée par l'exon 3, elle correspond à une substitution d'une guanine par une adénine en position 386 de la séquence nucléotidique et qui se traduit dans la séquence protéique par le changement de la glycine (G) par la glutamate (E) sur le codon 85.

La mutation Y122X, identifiée par Chevalier-Porst et al., (1992); localisée dans le domaine TM2, codée par l'exon 4, elle résulte suite à une substitution d'une thymine par une adénine en position 498 de la séquence nucléotidique et qui se traduit dans la séquence protéique par le remplacement de la tyrosine (Y) par un codon STOP sur le codon 122.

La mutation R553X, identifiée par Cutting et al., (1990); trouvée au niveau du domaine NBF1, codée par l'exon 11, elle correspond à une substitution d'une cytosine par une thymine en position 1789 de la séquence nucléotidique et qui se traduit dans la séquence protéique par le changement d'une arginine (R) par un codon STOP sur le codon 553.

Selon Hamosh, 1991, l'ARNm touché par cette mutation est instable et ne produit pas de protéine.

La mutation R334W, identifiée par Gasparini et al., (1991) ; localisée dans le domaine TM6, codée par l'exon 7, elle est produite suite à une substitution d'une cytosine par une thymine en position 1132 de la séquence nucléotidique et qui se traduit dans la séquence protéique par le remplacement d'une arginine (R) par un tryptophane sur le codon 334.

La mutation R347H, identifiée par Cremonesi et al., (1992) ; rencontrée dans le domaine TM6, codée par l'exon 7, elle correspond à une substitution d'une guanine par une adénine en position 1172 de la séquence nucléotidique et qui se traduit dans la séquence protéique par le remplacement d'une arginine (R) par une histidine (H) sur le codon 347.

La mutation S549N, identifiée par Cutting et al., (1990) ; située sur le domaine NBF1, codée par l'exon 11, elle résulte suite à une substitution d'une guanine par une adénine en position 1778 de la séquence nucléotidique et qui se traduit dans la séquence protéique par le changement d'une sérine (S) par une asparagine (N) sur le codon 549.

III. Diagnostic phénotypique de L'ABCD

Afin d'étudier les anomalies moléculaires du gène CFTR, chez les sujets azoospermiques par absence de canaux déférents, une sélection phénotypique et clinique extrêmement rigoureuse des patients a été faite suite à une collaboration entre : médecins spécialistes, biologistes et radiologues, en se basant sur l'établissement de plusieurs examens cliniques tels que :

La palpation

Le spermogramme

L'examen biochimique du liquide séminal

L'étude hormonale

Echographie endorectale

Echographie rénale

Les examens ont été effectués dans différentes cliniques privées à l'Est et Sud Algérien

Les résultats de ce diagnostic phénotypique d'ABCD sont présentés dans les tableaux 8 et 9

Résultats et discussion

Tableau 8. Analyse biologique et biochimique du liquide séminal

Chez les 18 patients ayant une ABCD.

	ABCD N=18	Témoïn (valeurs de référence)
Spermatozoïdes	0	10 à 20 x 10 ⁶ SPZ / ml
Volume du liquide séminal (ml) après 3 jours d'abstinence	0,97 ± 0,3	1,8 à 5,8
Citrate (μ moles)	58,43±12,10	> 47
Fructose (μ moles)	0,17±0,12	> 21
pH du liquide séminal	6,52 ±0,2	7,4

Tableau 9. Observations échographiques de l'appareil urogénital des patients ayant une ABCD, et après le test de la sueur

Valeurs prises comme références : Vésicules séminales 5 à 6 ml, Epididymes : environ 10 mm d'épaisseur, nv : non vu, RAS : Rien à signaler, D : droit G : Gauche

Patients	Origine	Age (ans)	Test de la sueur mEq/l	Vésicules séminales (ml)D / G	Epididyme mm D / G	Anomalies rénales
P1	Ouargla	26	50	2,5 /0,7	11/12	RAS
P2	Djelfa	34	68	5/6	10/12	RAS
P3	Ain Beida	27	49	0,5/1,1	10/11	RAS
P4	Annaba	38	55	nv/2	11/13	RAS
P5	Ghardaia	33	38	1,3/0,9	10/10	Kyste sur le rein droit.
P6	Biskra	30	38	2,7/1,1	9/11	RAS
P7	Ain mlila	39	62	0,8/nv	10/10	RAS
P8	Setif	29	60	nv/nv	10/12	RAS
P9	Ghardaia	31	53	0,8/0,4	8/10	RAS
P10	Batna	27	36	6/0,6	11/13	RAS
P11	Batna	28	39	8/0,5	9/11	RAS
P12	Batna	40	53	7/ nv	13/10	Kyste sur le rein droit.
P13	Tebessa	29	48	nv/1,5	11/9	RAS
P14	Tougourt	37	40	2/nv	12/11	RAS
P15	Batna	32	45	2/0,5	9/9	RAS
P16	Khenchela	25	49	2,8/0,6	11/11	RAS
P17	Souk ahras	39	39	0,4/nv	12/12	RAS
P18	Guelma	41	48	3,3/3,5	9/11	Kyste sur le rein gauche et droit.

A la palpation : les épидидymes sont fermes en raison du liquide séminal qui s'y accumule, accumulation qui distend les tubules proximaux. Absence bilatérale des canaux déférents ou présence de fins cordons fibreux.

L'éjaculat est de faible volume $< 1\text{cm}^3$ après 3 jours d'abstinence.

Azoospermie du liquide séminal, due à des obstacles sur les voies génitales empêchant le passage des spermatozoïdes produit normalement par le testicule.

Forte réduction ou une absence de fructose dans le liquide séminal en raison, soit à une absence ou anomalies des vésicules séminales, ces dernières sont les principales productrices de fructose et la plus grande partie de la phase liquide du sperme, soit il existe un obstacle après l'abouchement des vésicules séminales, qui s'accompagne d'une absence des canaux déférents : c'est la situation la plus fréquente.

Le pH du liquide séminal est acide ($\text{pH} < 7$), cette acidification reflète l'absence de sécrétion des vésicules séminales qui contribuent normalement à produire un liquide alcalin riche en fructose (Casals et al, 1995 ; Oates and Amos, 1994).

Les valeurs des dosages hormonaux (LH, FSH et testostérone) sont normales, ce qui indique que le testicule fabrique normalement les spermatozoïdes, mais qu'il y a un obstacle à leur passage dans l'éjaculat. Les concentrations de la carnitine et de l'alpha 1-4 glucosidase sont abaissées, ces deux substances sont fabriquées par l'épididyme, leur diminution s'explique par la présence aussi d'un obstacle après l'épididyme.

Par échographie endorectale : les vésicules, ainsi que les ampoules déférentielles (extrémités distales et dilatées des déférents où se connectent les vésicules séminales) sont souvent anormales (hypo-ou hyperplasique) ou absentes (Casals et al, 1995 ; Mercier and al, 1995).

L'échographie rénale, confirme que l'ABCD en question n'est pas associée à une agénésie rénale, due à une anomalie de développement du canal de Wolff, mais elle s'agit d'une atrésie liée à des mutations du gène CFTR. Cette dernière confirmation représente une orientation forte pour engager un bilan génétique à la recherche de mutations du gène qui empêchent la fonction normale de l'épithélium du déférent et de l'épididyme.

A noter que nos patients ne présentaient aucune symptomatologie clinique évocatrice de mucoviscidose, tant au niveau pulmonaire que digestif, et les résultats du test de la sueur étaient normaux.

IV. Diagnostic génotypique de l'ABCD

Notre étude génétique a été réalisée sur 18 sujets chez lesquels le diagnostic phénotypique d'ABCD avait été clairement établi par des médecins spécialistes Algériens.

IV.1. Protocole d'analyse génétique des mutations CFTR pour des sujets ABCD

Pour la réalisation de cette étude, nous avons suivi le même protocole discuté dans la partie expérimentale précédente, à savoir l'extraction d'ADN à partir des leucocytes périphériques (Miller et al, 1988), puis cet ADN est amplifié par la technique de PCR dont les conditions ont été décrites par (Fanen et al, 1992 ; Claustres et al, 1993).

Les produits PCR sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% après digestion enzymatique, puis visualisés aux UV après coloration au bromure d'éthidium (Chehab and Wall, 1992).

Les séquences polypyrimidiques de l'intron 8 situées à la jonction de cet intron et de l'exon 9 ont été identifiées par la technique d'électrophorèse en gradient de gel dénaturant (DGGE) (Ficher and Lerman, 1983 ; Kieswetter et al, 1993). Les conditions d'électrophorèse ont été choisies de façon à n'explorer que les trente trois paires de bases qui précèdent l'exon 9 (Costes et al, 1995). Une fois séquencées, elles nous ont permis d'identifier chacune par le motif de répétition (TG)_n **m**(T) ou **n** et **m** présentent respectivement le nombre de TG et de T, **n** étant égal à 9,10,11,12 ou 13 et **m** égal à 5,7 ou 9.

Nous signalons que les primers utilisés pour l'amplification du variant polypyrimidique de l'intron 8 sont :

Pour l'allèle 5T : 5'-CCCCAAATCCCTGTTAAAAAC-3'

Pour l'allèle 7T : 5'-CCCCAAATCCCTGTTAAAAAAAC-3'

Pour l'allèle 9T : 5'-CCCCAAATCCCTGTTAAAAAAAAC-3'

(Zielenski et al, 1991)

IV.2. Technique d'électrophorèse en gradient de gel dénaturant (DGGE)

IV.2.1. Principe

Cette technique permet la séparation électrophorétique de fragment d'ADN double brin en fonction de leur séquence nucléotidique (Ficher and Lerman, 1983 ; Meyers et al, 1985 ; Meyers et al, 1987 a et b). Les fragments porteurs d'une variation nucléotidique présentent le plus souvent une mobilité électrophorétique différente de celle de l'ADN témoin.

Le principe de la méthode repose sur la division de l'ADN en domaines de fusion qui se dénaturent en bloc, les uns après les autres, lorsque l'on soumet l'ADN double brin à des conditions progressivement dénaturantes, physique (température) (Rosenbaum and Reissner, 1987) ou chimique (urée/ formamide) (Ficher and Lerman, 1983).

Un domaine de fusion se compose de 25 à plusieurs centaines de paires de bases. Sa dénaturation se produit à partir d'une température de fusion (T_m) qui dépend de la stabilité thermodynamique du double brin et des interactions entre les bases adjacentes d'un même brin d'ADN. Dans un gel de polyacrylamide contenant une concentration linéairement croissante d'urée et de formamide, les fragments d'ADN de même taille présentent une vitesse de migration identique jusqu'à ce que des concentrations spécifiques d'agents dénaturants soient atteintes. Les domaines de fusion de plus faible stabilité se dissocient alors et génèrent une molécule d'ADN particulièrement dénaturée (structure dite "branchée"). Cette dénaturation partielle est accompagnée d'un ralentissement important de la mobilité électrophorétique du double brin, du fait de la structure branchée et de la réticulation du gel. Ainsi, toute modification de séquence située dans le domaine de plus faible stabilité modifie le T_m du fragment, donc la quantité d'agent requise pour sa dénaturation, et par conséquent la mobilité électrophorétique du fragment. La comparaison de la distance de migration des fragments d'ADN colorés au bromure d'éthidium permet de détecter ceux qui ont eu une migration "anormale" c'est à dire porteurs d'une variation nucléotidique.

La température de fusion de chaque domaine caractérisant une séquence peut être déterminée à partir du programme informatique MELT 87 de (Lerman and Silverstein, 1987). Ce programme calcule la courbe de fusion d'un fragment d'ADN donné (figure 12).

Avec l'avènement de la PCR, la technique DGGE a pu être appliquée à des produits d'amplification. Le choix des amorces se fait alors de telle sorte que la séquence à cribler représente le domaine de plus faible stabilité du fragment amplifié. Généralement, la région d'intérêt comporte plusieurs domaines de fusion. Dans ce cas, seuls les domaines de plus basse fusion sont analysables car l'ouverture d'un domaine de fusion peut considérablement ralentir le fragment au point d'empêcher la dénaturation des autres domaines. La carte de fusion d'un fragment à analyser ne comporte parfois qu'un seul domaine de fusion. Sa dénaturation conduit à la dissociation totale du double brin et par conséquent la migration devient ininterprétable.

La solution, pour éviter la dénaturation totale du double brin et pour permettre que toute la séquence à analyser soit le domaine de plus faible stabilité, consiste souvent à insérer à l'extrémité 5' d'une des amorces de PCR une séquence très stable riche en guanine (G) et cytosine (C) appelée (GC-clamp) qui crée artificiellement un domaine à haute température de fusion (Sheffield et al, 1989 ; Meyers et al, 1985 ; Meyers et al, 1987a).

Ainsi, chaque fragment néosynthétisé pendant la réaction de PCR est « GC clampé », c'est à dire : il commence ou finit par la séquence riche en GC qu'il est difficile de dénaturer.

Ce GC-Clamp est composé d'une succession de GC, d'une longueur comprise entre 60 et 80 nucléotides. Une base de thymine (T) est ajoutée de temps en temps pour faciliter l'ouverture du clamp au cours de la dénaturation pendant la PCR.

Il est possible de remplacer le GC-clamp par un clamp chimique (ChemiClamp) : un dérivé du psoralène (molécule retrouvée naturellement dans certains végétaux tels que : les ombellifères, les légumineuses et les rutacées), est ajouté en 5' de l'amorce et a la propriété de s'insérer entre les brins de l'ADN puis de s'y lier de façon covalente après irradiation par les ultra-violet (UV) à la fin de PCR (Costes et al, 1993).

La sensibilité de la technique DGGE est encore accrue par la détection des hétéroduplex. Au cours de la réaction de PCR, des hétéroduplex se forment par ré association des matrices sauvages et mutées. Ainsi, ce sont quatre espèces moléculaires différentes qui sont obtenues à la fin de la réaction de PCR : un homoduplex sauvage, un homoduplex muté et deux hétéroduplexes. Les hétéroduplexes, très instables en raison de la présence d'un mauvais appariement, seront les premiers à être dénaturés.

En DGGE, après révélation du gel, les sujets homozygotes, présente une bande, tandis que les hétéroduplexes, le plus souvent, quatre bandes distinctes sont observées. Il peut arriver cependant que seulement trois ou deux bandes soient visibles, les déstabilisations n'étant pas toujours très importantes. Les migrations des hétéroduplexes et des homoduplexes peuvent aussi se comporter de la même façon (une seule bande est alors observée).

IV.2.2. Choix du gradient

Lerman et Silverstein (1987), ont écrit plusieurs programmes d'aide à la DGGE. Deux de ces programmes, MELT et SQHTX sont extrêmement utiles et prédictifs quant aux conditions à appliquer pour une molécule précise en DGGE. Ces deux programmes travaillent en termes de température et non en concentration de dénaturant : il faut convertir en utilisant la formule suivante :

$$DENCNC = 3.2 \times (EQTEMP - 57)$$

DENCNC = concentration en dénaturant

EQTEMP = équivalent température

Pour un gradient d'urée-formamide de 10 % à 60 % (60.125°Eq à 75.75°Eq), on estime que les molécules sont soumises à des forces dénaturantes qui augmentent d'environ 0.975°Eq par centimètre parcouru :

$$(75,75 - 60,125)/16 = 0,975 \text{ °Eq/cm} \quad (16 : \text{hauteur du gel en cm})$$

Le programme MELT 87 de Lerman Silverstein permet de calculer la courbe de fusion d'une molécule d'ADN en fonction de sa séquence nucléotidique, cette courbe permet de révéler la présence des domaines de fusion, dont les paires de bases se dénaturent toutes à la même température. Cela se traduit sur la courbe par la présence de plateaux (figure 12) :

- s'il y a un plateau unique, cela veut dire qu'il n'y a qu'un seul domaine de fusion et que la DGGE ne permettra pas de détecter une mutation. Il faut essayer avec un GC *clamp* pour introduire un domaine de fusion très stable.
- s'il y a plusieurs plateaux, alors il y a autant de domaines de fusion et la DGGE détectera peut être les mutations situées dans le domaine de fusion le plus bas (plateau plus bas).

Après avoir choisi un gradient d'agent dénaturant en fonction du T_m du domaine à analyser, il est également possible d'apprécier le temps de migration nécessaire à l'analyse d'un fragment à l'aide d'un autre programme : le programme SQHTX (Lerman et Silverstein). Celui-ci fournit la corrélation entre la dénaturation partielle et la mobilité électrophorétique, la constante de dissociation en fonction de la température en degré-équivalents atteinte par le fragment d'ADN dans le gel dénaturant, et la différence de migration entre les homoduplexes et les hétéro duplexes.

Remarque : L'exécution de ces deux programmes informatiques a été effectuée par un spécialiste.

IV.2.3. Préparation d'un gel en gradient dénaturant

Nous avons utilisé un système classique d'électrophorèse de protéine (système Hoeffler), où le gel est immergé dans un « aquarium » de tampon chauffé par un bain-marie à circulation d'eau.

Notre système d'électrophorèse comprend deux espaceurs de 1,5 mm d'épaisseur, un peigne de 11 dents, deux plaques de verre de 16 cm x 18 cm, deux pinces et un portoir avec une bande de caoutchouc.

• Préchauffage

Préchauffer à 60°C la cuve d'électrophorèse contenant 5 litres de tampon TAE 1X, par l'intermédiaire d'un bain thermostaté à circulation d'eau.

• Préparation du bouchon

On prélève 10 ml de solution 0% dénaturante (6,5 %acrylamide diluée dans TAE 1X), puis on ajoute 70 µl de persulfate d'ammonium et 100 µl de TEMED pour une polymérisation rapide. Ensuite on verse la solution sur une bande de papier Whatman préalablement disposée sur la bande de caoutchouc, puis on applique la tranche du montage plaques de verre + espaceurs + pinces par dessus, la solution-bouchon monte par capillarité entre les deux plaques de verre. La polymérisation se fait après 10 minutes.

• **Préparation d'un gel de polyacrylamide 10 - 60%**

Préparation de la solution 1 (18 ml) :

TAE 50 X.....	360 µl
Polyacrylamide	2,34 ml
Solution 100% dénaturante (60% final) (Urée 7M, formamide désionisée 40%)	10.8 ml
H ₂ O qsp.....	18 ml

Préparation de la solution 2 (18 ml) :

TAE 50 X.....	360 µl
Polyacrylamide.....	2,34 ml
Solution 100% dénaturante (10 % final)	1,8 ml
H ₂ O qsp.....	18 ml

On rince la tuyauterie du préparateur de gradient avec de l'eau distillée en utilisant une pompe péristaltique, puis on verse la solution 1(60%) dans la chambre de mélange, et on ajoute 90 µl de persulfate d'ammonium et 18 µl de TEMED aux solutions 1 et 2, La pompe est mis en marche au maximum du débit.

En fin, on verse dans l'autre chambre la solution 2 (10%), puis lorsque la première solution arrive aux plaques de verre, on ouvre la circulation entre les deux chambres, et on laisse le gel se polymériser pendant 30 minutes.

• **Conditions d'électrophorèse**

On mélange 6 µl de produits de PCR avec 2 µl de tampon de charge pour entraîner l'ADN au fond du puits. L'électrophorèse est effectuée à 160 V constants. La durée de migration est de 6 heures, température 60°C.

IV.2.4. Séquençage d'une bande obtenue par DGGE

Il permet la confirmation et la caractérisation d'une mutation détectée par DGGE et nécessite quatre étapes :

• **Découpage de la bande à étudier**

Après coloration au bromure d'éthidium du gel de DGGE, on découpe sous UV la bande d'ADN dans le polyacrylamide et on la dépose dans un microtube.

• **PCR**

Dans un micro tube, on imbibe la bande de gel avec 34,5 µl d'eau distillée et 5 µl tampon *Taq* DNA polymérase 10X, puis la préparation est gardée à 4°C pendant 10 heures. Après on ajoute à la PCR les substances suivantes:

SAB (sérum albumine bovine) (1mg/ml).....2,5 µL

Oligonucléotides utilisés pour la PCR avant DGGE.....25 à 50 pmoles

On complète à 45 µl avec de l'eau s'il y a eu évaporation, puis on ajoute pendant la première étape de renaturation :

5 µl dNTP 2 mM + 0,25 µl *Taq* DNA Polymerase (1,25 U)

On utilise le même programme que pour l'amplification avant DGGE

• **Purification par électroélution**

Pour l'extraction d'ADN de ce gel, nous avons utilisé la technique de Duro et al.,(1991) ;

1^{ère} étape : Microélectrophorèse

On découpe la bande d'ADN à purifier à partir du gel, puis on place ce morceau de gel sur un petit carré de para film d'un petit dispositif utilisé pour l'électroélution d'ADN. Le morceau de gel est disposé à l'intérieur de l'électrode circulaire de platine (l'anode). Ensuite on plante le fil de platine (la cathode) dans le gel sans le transpercer complètement, et on recouvre le complexe gel électrodes avec une goutte de TBE 1X.

Les conditions d'électrophorèse : 25 V pendant 2 minutes.

2^{ème} étape : Purification de l'ADN

On récupère la goutte de TBE 1X dans un micro tube à l'aide d'une micropipette, puis on ajoute un volume de chloroforme pour extraire l'ADN et on agite, on récupère le surnageant, puis on ajoute de l'acétate de sodium 3 M à une concentration finale dans le surnageant de 0,3 M. On Précipite avec 2 volumes d'éthanol 95% (- 20°C) pendant 15 minutes à 0°C.

Le mélange est centrifugé pendant 15 minutes à 12000 trs/ min à 4°C, on élimine le surnageant, le culot est séché sous vide, et enfin, on resuspend l'ADN dans un tampon de TE.

• **Séquençage de l'ADN double-brin**

Pour la caractérisation des séquences polypyrimidiques de l'intron 8, nous avons utilisé la méthode de terminaison de chaîne décrite par (Sanger et al, 1977). L'ADN devant être séquencé est préparé comme une molécule à simple brin pour qu'il puisse agir comme une matrice pour une synthèse d'ADN dans la réaction de séquençage et pour permettre la fixation de l'amorce, ceci nécessite une dénaturation d'ADN en deux simples brins.

La réaction de séquençage débute dès lors que l'on a ajouté une ADN polymérase I d'*E coli* (*Taq* polymérase) à un milieu réactionnel contenant la matrice d'ADN simple brin, une amorce les quatre désoxyribonucléosides triphosphates (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), un di-déoxynucléotide différent par tube (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) et des désoxyribonucléosides radioactifs. Dans cette incubation à 37°C, l'enzyme commence à copier des matrices en étendant l'amorce liée. Au cours de cette polymérisation, les di-

déoxynucléotides seront quelques fois incorporés à la place du déoxynucléotide correspondant (par exemple, un ddGTP à la place d'un dGTP). Dans cette éventualité, aucune élongation postérieure ne peut se réaliser puisque des analogues di-désoxy sont dépourvus du groupement 3'-OH nécessaire à la formation de la liaison phosphodiester 3'→5' suivante. Ainsi cette chaîne particulière s'arrête à ce point. Par exemple, dans le tube où a été ajouté du ddGTP, la réaction s'arrêtera quelquefois quand l'enzyme rencontrera un C sur l'ADN à séquencer. Ceci conduira à la production de produits de taille différente dans chaque tube, les quatre mélanges de réaction subissent une électrophorèse dans les rangées parallèles d'un gel de polyacrylamide en condition dénaturante, le temps de migration dure trois heures. A la fin de la migration, le gel est séché puis exposé pour autoradiographie. La séquence ADN est simplement déterminée par une lecture du modèle de la bande sur l'autoradiogramme du bas du gel vers le haut (c'est à dire en lisant la séquence ADN dans le même sens où elle a été synthétisée à partir de l'amorce). La séquence lue à partir du gel correspond à la séquence du brin ADN synthétisé et il s'agit par conséquent de la séquence complémentaire du brin de matrice ADN original.

V. Résultats et discussion

Tableau 10. Différentes mutations CFTR chez 18 patients ayant une ABCD avec leurs motifs de répétition (TG)n m(T)

	Patients	Caractéristiques cliniques	Mutations du gène CFTR	Alleles (TG)n m(T)
Deux mutations détectées 38,88%	P3	RAS	$\Delta F508 / M952 I$	(TG)10 9T /(TG)10 7T
	P7	Sinusite chronique	A445 E / R 117H	(TG)11 9T /(TG)10 7T
	P8	RAS	I 556V / Q 1352 H	(TG)11 7T /(TG)11 7T
	P10	RAS	D 443Y/ G 542 X	(TG)10 7T /(TG)10 9T
	P13	RAS	$\Delta F 508 / A 1364 V$	(TG)10 9T /(TG)10 7T
	P14	Diarrhées	$\Delta F 508 / R117 H$	(TG)10 9T /(TG)10 7T
Une seule mutation détectée 61,12%	P15	RAS	W 1282X / D1152 H	(TG)10 7T /(TG)10 7T
	P1	RAS	$\Delta F 508 / -$	(TG)10 9T / (TG)12 5T
	P2	RAS	R553 X / -	(TG)12 7T /(TG)10 7T
	P4	RAS	V 232 D / -	(TG)10 9T /(TG)11 5T
	P5	RAS	V562 I / -	(TG)10 7T /(TG)13 5T
	P6	RAS	D1152 H / -	(TG)10 7T / (TG)12 7T
	P9	RAS	2184 del A / -	(TG)11 7T / (TG)12 5T
	P11	RAS	G1069 R / -	(TG)10 7T /(TG)11 7T
	P12	RAS	R 117H / -	(TG)10 7T /(TG)11 7T
	P16	RAS	$\Delta F 508 / -$	(TG)10 9T /(TG)12 5T
	P17	Allergie	$\Delta F 508 / -$	(TG)10 9T /(TG)12 5T
	P18	RAS	E 60X / -	(TG)9 9T /(TG)11 7T

A l'issue de la recherche des mutations du gène CFTR de ces sujets (Tableau 10) et (figures 13a- d), un spectre de mutation a été établi; ce qui explique, la grande fréquence des mutations du gène CFTR dans cette pathologie (Patricio et al, 1993 ; Oates and Amos, 1994 ; Braekeller et al, 1996). En accord avec les premiers travaux (Dumur et al, 1990 ; Anne et al, 1997), la fréquence de la délétion $\Delta F508$ est la plus élevée. Elle a été identifiée sur 6 chromosomes. A coté de la mutation $\Delta F508$, de nombreux autres défauts moléculaires ont été observés, tel que la R117H décelée sur 3 chromosomes confirmant son apparition régulière dans cette pathologie (Gervais et al, 1993), elle s'agit d'une mutation capable d'exprimer environ 10% de conductance canalaire résiduelle (Sheppard et al, 1993).

Les autres mutations n'ont pas affecté plus d'un chromosome ; tandis que, 11 chromosomes ne présentent aucune mutation.

En fait, tous les types de mutation ont déjà été identifiées chez des patients atteints de mucoviscidose (Anne et al, 1997, Dohle et al, 1999). Ceci a permis à de nombreux auteurs de définir l'ABCD comme étant une mucoviscidose à expression génitale (Anguiano et al, 1992 ; Ferec et al, 1996). La mutation A1364V qui semble être parmi celles qui sont spécifiques à l'ABCD selon de nombreux auteurs a été détectée chez un seul patient par rapport à d'autres études, ceci reflète très probablement l'inégale répartition géographique des mutations du gène CFTR.

L'analyse des 36 chromosomes ABCD a donnée :

7/18 (38,88%) des patients présentant une double mutation hétérozygote (Pistes: A, B, C, D, E, F et G) et 11/18 (61,12%) avec une seule mutation (Pistes: H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q et R). Par ailleurs, aucune mutation homozygote n'a été révélée pour $\Delta F508$, ou un génotype hétérozygote pour deux mutations sévères. Ce qui confirme l'idée qu'un phénotype ABCD hétérozygote résulte, soit de la combinaison de deux allèles, un de nature sévère et l'autre de nature modérée ou peu sévère << Mild >>, soit l'association de deux allèles qualifiés de peu sévères (Férec et al, 1994) . A noter que les mutations peu sévères ont un effet dominant par rapport aux mutations sévères (Braeckeller et al, 1996 ; Dohle et al, 1999).

La mutation $\Delta F508/R117H$ (Piste: F) identifiée chez le patient (P14) a été observée à la fois chez des patients présentant une mucoviscidose peu sévère avec suffisance pancréatique et chez des patients stériles par absence de canaux déférents mais sans aucun autre signe clinique (Anguiano et al, 1992). Cette complexité des relations génotype/phénotype du CFTR reçut un début d'explication lorsque des chercheurs montrèrent que la mutation R117H pouvait être associée à deux haplotypes CFTR différents (Chu et al, 1991). Il existe un variant pyrimidique constitué d'une succession de thymidines situées en amont de l'exon 9 du gène CFTR.

Ce variant peut se présenter sous trois formes dans la population générale, une suite de 5T, 7T ou 9T. Kiesewetter et al.,(1993); montrèrent que chez les patients atteints de mucoviscidose de génotype $\Delta F508/R117H$, la mutation R117H était portée par un variant 5T alors que les sujets stériles par absence de déférents de même génotype mais sans mucoviscidose voyaient leur mutation R117H portée par un variant 7T. Ce polymorphisme de T est situé en position -5' de l'exon 9 et cette succession variable de pyrimidines est impliquée dans la séquence consensus, du site accepteur d'épissage de l'intron 8 (Chu et al, 1991). Ainsi un variant 5T conduit à un messenger très incomplètement épissé, 90% environ du transcrit est anormal, dépourvu d'exon 9 (exon 9), alors que l'épissage est correctement réalisé avec le variant 7T ou le

variant 9T (plus courte est la séquence poly-T en amont de l'exon 9 sur l'ADN génomique, plus élevée sera la proportion de l'ARNm sans exon 9 dans le cytoplasme). L'absence de l'exon 9 est la conséquence d'un mécanisme d'épissage alternatif. Les transcrits délétés de l'exon 9 conservent leur cadre de lecture et pour cette raison, il n'est pas exclu qu'ils puissent jouer un rôle physiologique dans les cellules.

Cependant, la séquence de l'exon 9 qui code pour une partie du premier NBF (NBF1), est impliquée dans la fixation de l'ATP (*via* un motif de Walker) et semble donc indispensable à l'ouverture du canal Cl⁻. En effet, les études de transfection des ADNc sans exon 9 dans des cellules n'exprimant plus le CFTR montrent que la protéine délétée de 61 acides aminés est immature et non glycosylée et que ces cellules sont incapables de restituer une conductance aux ions chlorure (Chu et al, 1993; Costes et al, 1995b). La proportion de transcrits CFTR sans exon 9 varie considérablement d'un individu à l'autre. Dans les cellules épithéliales bronchiques de patients non atteints de mucoviscidose, il est enregistré jusqu'à 92 % de messagers sans exon 9. Ce résultat semble démontrer que 8 % de messagers normaux sont suffisants dans certaines cellules épithéliales pour maintenir l'intégrité du potentiel transmembranaire (Chu et al, 1991; Chu et al, 1993)

Dans notre travail, 16.16 % des chromosomes ABCD analysés (6/36) sont porteurs d'une séquence répétée 5T; alors qu'elle n'est habituellement observée que dans 5% des chromosomes normaux (Chillon et al, 1995 ; Mercier et al, 1995).

Cet allèle 5T n'est pas retrouvé chez les sujets porteurs de 2 mutations sur le gène CFTR .

En revanche, 6/11 des patients chez qui nous n'avons pu trouver qu'une seule mutation sont porteurs de cet allèle 5T. Ceci montre sans ambiguïté, l'implication de cette mutation chez ces patients.

La présence du variant 5T en question dans le site accepteur d'épissage de l'intron 8 conduit à la synthèse d'une très faible quantité d'ARNm CFTR normal; un sujet homozygote 5T ne synthétise que 8% à 12% de la quantité normale d'ARNm, ce qui permet toutefois la synthèse d'une quantité de protéine suffisante pour éviter un phénotype de mucoviscidose. Mais pas réellement suffisante pour éviter l'apparition de formes frontières comme l'absence de déférents. En revanche, lorsque ce chromosome portant un variant 5T est associé à un allèle portant une mutation délétère, la petite quantité de messenger CFTR normal (entre 3% et 8% peut se traduire par une absence de canaux déférents chez l'homme (Ferec et al, 1996).

L'explication physiopathologique mise en avant serait un épaissement muqueux à l'intérieur du canal déférent conduisant à une obstruction précoce intracanaliculaire et une involution intra-utérine de ces canaux (Chillon et al, 1995)

Cette règle n'est très certainement pas absolue. Pour preuve, des patients de génotypes $\Delta F508/5T$ ont donné naissance à des enfants, mais également des patients porteurs de ce même génotype, présentant une mucoviscidose diagnostiquée, avec une atteinte pulmonaire discrète et sans atteinte pancréatique, ont été décrits (Ferec et al, 1994).

La pénétrance de variant n'est pas totale et des études de transmission des haplotypes dans ces familles montrent que d'autres gènes ou d'autres facteurs génétiques sont probablement impliqués dans cette pathologie comme le variant $(TG)_n$, M470V, R75Q et F508C (Estivill, 1996; Anne de Mees et al, 1998; Rozmahel et al, 1996; Cuppens et al, 1998)

Conclusion

La mucoviscidose survient chez des individus ayant hérité de deux gènes CFTR mutés. L'absence, l'insuffisance ou le dysfonctionnement de la protéine CFTR altèrent la perméabilité au chlore et au sodium de la membrane des cellules épithéliales, entraînent aussi les perturbations hydro électrolytiques à l'origine de l'hyper viscosité des sécrétions muqueuses.

En dépit des progrès immenses qui ont été obtenus dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques, de nombreux domaines où la connaissance est incomplète persistent. Son diagnostic phénotypique est suggéré par des symptômes cliniques évocateurs et confirmé par un taux élevé de chlore dans la sueur des malades présentant les formes classiques de la maladie. Cependant, la détection des formes frontières de cette pathologie telle que l'atrésie bilatérale des canaux déférents est basée sur l'établissement de plusieurs examens cliniques tels que : l'analyse biologique et biochimique du liquide séminal et une observation échographique de leur appareil urogénital. Ces hommes, consultant pour stérilité n'ont aucun signe apparent de mucoviscidose.

Le diagnostic génotypique repose sur la recherche des mutations dans le gène. Dans notre étude, nous n'avons recherché que des mutations fréquentes dans la zone méditerranéenne et qui sont facilement analysables et d'un coût modeste.

Leur détection est effectuée par amplification par PCR des fragments d'ADN ciblés obtenus d'un prélèvement de sang, puis l'analyse des profils de restriction après digestion enzymatique des produits PCR et migration par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de bromure d'éthidium. Tandis que les séquences polypyrimidiques de l'intron 8 ont été identifiées par la techniques de DGGE. Les résultats obtenus nous confirment que la mucoviscidose est présente au sein de la population algérienne, et illustrent bien comment la combinaison des diverses mutations de ce gène peut conduire à une variation dans le spectre des phénotypes observés chez notre population, d'où l'importance de l'instauration du test à la sueur dans nos hôpitaux pour la confirmation de cette pathologie. Ceci va permettre aux médecins de mettre au point de nouvelles approches thérapeutiques bénéfiques pour les malades; car, lors de nos enquêtes, nous avons constaté que beaucoup de malades mucoviscidosiques sont traités comme des asthmatiques en raison de l'absence de diagnostic fiable de cette pathologie héréditaire.

L'étude du spectre de distribution des mutations du gène CFTR sur l'ensemble du territoire algérien est donc indispensable, traduisant une connaissance des familles informatives et l'élaboration de test prénatal, ainsi que l'incidence des hétérozygotes et homozygotes par le biais d'une analyse génétique. Les résultats de l'analyse génétique permettront l'orientation des

familles à risque et l'établissement d'un véritable conseil génétique par l'élaboration des programmes d'éducation afin de faire comprendre aux personnes la nature du risque de transmission de mucoviscidose.

Notre travail ne représente qu'une approche sur l'étude des mutations du gène CFTR en Algérie. Beaucoup d'autres mutations restent à rechercher et qui seraient probablement spécifiques à l'Algérie.

De très grandes perspectives, restent à concrétiser par des études plus vastes et plus approfondies.

Le suivi des patients dans des centres de soins spécialisés, l'intensification de la kinésithérapie respiratoire, le développement de l'antibiothérapie antityocyannique et la prise en charge nutritionnelle, permettront à des patients de plus en plus d'atteindre l'âge adulte tout en bénéficiant d'une meilleure qualité de vie. Certains patients peuvent même devenir parents.

Cependant, en l'absence de traitement curatif, la transplantation pulmonaire est l'ultime recours devant l'insuffisance respiratoire grave. Le développement des recherches dans les domaines de la thérapie génique ou du traitement pharmacologique de la protéine CFTR font espérer des traitements prometteurs.

المخلص:

اللفظة الكيسية مرض وراثي مميت وهو أكثر الأمراض الوراثية انتشارا عند الأفراد من أصل أروبي، تنقله عوامل وراثية متنحية محمولة على كروموسومات جسمية. هذا المرض يصيب أغلبية الأعضاء التي تحتوي على الأنسجة البطانية التي تحترق موضع نقل الماء و الأيونات وبالأخص المجاري الهوائية ، البنكرياس، المجاري الصفراوية، الأمعاء ، الغدد اللعابية و المجاري التناسلية . إن التخثرات التي تصيب هذه المورثة هي السبب في ظهور هذا المرض .

يقوم الجين المعنى بسخ كفاءة بروتينية تسمى CFTR التي تقوم بوظائف مختلفة في الخلية، أهمها تنظيم نقل الصوديوم و الكلور عبر أغشية الخلايا البطانية. إن أي خلل في هذه الوظيفة يترجم خاصة بإنتاج إفرازات على درجة كبيرة من اللزوجة التي تؤدي إلى غلق القنوات الإفرازية للأعضاء المستهدفة : فنشاهد إذن تمديدات و التهابات وضمور لهذه الأعضاء . كما أن هذا الخلل الوظيفي ينجم عنه ارتفاع كل من تركيز الصوديوم و الكلور في عرق الأفراد المريضة، و منه يتخذ اختبار العرق كوسيلة ناجحة لتشخيص هذا المرض.

من أجل تشخيص ظاهري ووراثي لهذا المرض عند فئة من سكان شرق و جنوب الجزائر : اقتصرنا دراستنا على 34 فرد موزعين على النحو التالي: - 18 شخصا من جنس ذكر تم تشخيص العيوب الثاني الجوانب للقنوات الناقلة للطفات لديهم و ذلك بواسطة التحليل البيولوجية و البيوكيميائية لطفاتهم وكذلك عن طريق التصوير المصق بالأشعة الصوتية لأجهزتهم البولية التناسلية.

- 16 شخصا آخر حصل أيضا بارزة لهذا المرض و التي تم تأكيده عن طريق اختبار العرق. في حين أن الطفرات الخاصة بمورثة CFTR تم تحديدها عن طريق الفصل الكهربائي في هلام البولي أكريلاميد لنتائج التفاعل التثبيتي التسلسلي (PCR) و ذلك بعد الهضم الإنزيمي ثم المشاهدة بواسطة الأشعة فوق البنفسجية في وجود البرومير تينديوم .

بينما التعرف على التسلسل لمحدد البيريميدين الخاص بالقطعة الدالة رقم 8 التي تتدخل في القسم التناوبي فقد تم عن طريق تقنية الفصل الكهربائي في هلام ذو التدرج التخريبي (DGGE) مما سمح لنا بالتحرف على 9 **إيلايت** كل واحد متميز بنوع من التابع للقواعد الأروية (TG) n m (T) .

إن كل الطفرات التي تم التعرف عليها من خلال دراستنا قد تم إيجادها عند المصابين بهذا المرض لدى أفراد أخرى في بقاع مختلفة من العالم، غير أن الحد المهم من الطفرات التي وجدناها من خلال دراستنا مقارنة بالحد المحدود للعينات المدروسة يؤكد بأن أصل هذا التنوع الكبير للأعراض المرضية لهذا الداء هي نتيجة حتمية للتنوع الهائل لطفرات مورثة (CFTR).

Références bibliographiques

Aitken, ML.; and Fiel, SB.; (1993).

Cystic fibrosis

Dis Mon. 39: 1

Anguiano, A.; Oates, RD.; Amos, JA.; Dean, M.; Gerard, B.; Stewart, C.; Maher, TA.; et al., (1992).

Congenital bilateral absence of the vas deferens. A primarily genital form of cystic Fibrosis.

JAMA. 267: 1794-7.

Anderson, DH.; (1938).

Cystic Fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease .

Am J Dis Child. 56: 344.

Anderson, MP.; Rich, DP.; Gregory, RJ.; Smith, AE.; and welsh, MJ.; (1991).

Generation of cAMP- activated chloride current by expression of CFTR

Science. 251: 679-82.

Anne, DM.; Caroline, G.; Marie, D.; et al., (1997).

Genetic findings in congenital bilateral aplasia of vas deferens patients and identification of six novel mutation.

Journals wiley. 14: 1059-7794.

Anne, DM.; et al., (1998).

Linkage disequilibrium between the M470V variant and the IVS8 poly T allele of the CFTR gene in CBAVD.

J Med Genet. 35: 0-0.

Arora, N.; and Rochester, D.; (1982).

Respiratory muscle strength and maximum volutar ventilation in undemourished patients

Am Rev Resp Dis. 126: 5-8.

Baran, D.; (1979).

Mucoviscidose

Bruxelle-Médicale. 10: 445-48.

Baxter, P.; Goldhill, J.; Hardcastle, J.; Hardcastle, PT.; and Taylor, CJ.; (1988).

Accounting for cystic fibrosis.

Nature. 335: 211.

- Bear, CE.; Duguay, F.; Naismith, AL.; Kartner, N.; Hanrahan, JW.; and Riordan, JR.; (1991).
Cl⁻ channel activity in Xenopus oocytes expressing the cystic fibrosis gene.
J Biol Chem. 266: 19142-5.
- Bear, CE.; Li, CH.; Kartner, N.; Bridges, RJ.; Jensen, TJ.; Ramjeesingh, M.; and Riordan, JR.; (1992).
Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR).
Cell. 68: 809-18.
- Becker, MN.; Sauer, MS.; Mulebach, MS.; Hirsch, AJ.; Wu, Q.; Verghese, MW.; and Randell, SH.; (2004).
Cytokine secretion by cystic fibrosis airway cells.
Am J Respir Crit Care Med. 169: 645-653
- Becq, F.; Merten, MD.; Voeckel, MA.; Gola, M.; and Figarella, C.; (1993).
Characterization of AMPc dependant CFTR-chloride channel in human tracheal gland cells.
FEBS Lett. 321: 73-78.
- Belli, DC.; Roy, CC.; and Lenaerts, C.; (2000).
Mucoviscidose.
In: Navarro J, Schmitz J, éd. Gastro-entérologie pédiatrique, 2^{ème} édition. Paris:
Flammarion Médecine-Science. 551-72.
- Berger, HA. ; Anderson, MP.; Gregory, RJ.; Thompson, S.; Howard, PW.; Maurer, RA.; Mulligan, R.; Smith, AE.; and Welsh, MJ.; (1991).
Identification and regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-generated chloride channel.
J Clin Invest. 88: 1422-31.
- Bienvenu, T.; Bienvenu, T.; Gazeneuve, C.; Kaplan, J.; and Beldjoud, C.; (1997).
Molecular diagnosis of congenital bilateral absence of the vas deferens: analysis of the CFTR gene in 64 french patients.
Ann Genet. 40 (1): 5-9.
- Boat, TF.; Welsh, MJ.; and Beaudet, AL.; (1989).
Cystic fibrosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds)
The metabolic basis of inherited disease.
6th edn .Mc Graw-Hill, New York: 2649-2680

Boufield, T.; Konstan, M.; Burfeind P.; et al., (1995).

Normal bronchial epithelial cells constituted produce the anti- inflammatory interleukin-10, wich is down regulated in cystic fibrosis.

Am J Respir Cell Mol Biol. 13: 257-61.

Boucher, RC.; (1994).

Human airway ion transport.

Am J Respir Crit Care Med. 150: 271-81 et 581-93

Boucher, RC.; (1999).

Molecular insights into the physiology of the “thin film” of airway surface liquid .

J Physiol (London). 516: 631-8

Braeckeler, D.; and Férec, C.; (1996).

Mutations in the cystic fibrosis gene in men with congenital bilateral absence of vas deferens.

Mol Hum Reprod. 2: 669-677.

Bradley, S.; Solin, P.; Wilson,J.; Johns,D.; Walters, EH.; and Naughton, MT.; (1999).

Hypoxemia and hypercapnia during exercice and sleep in patients with cystic fibrosis.

Chest. 116: 647-54.

Britigan, BE. ; Railsback, MA. ; and Cox, CD.; (1999).

The *Pseudomonas aeruginosa* secretory product pyocyanin inactivates alpha (I) protease inhibitor: Implications for pathogenesis of cystic fibrosis lung disease.

Infect Immun. 67: 1207-12.

Carles, S.; Desgeorges, M.; Goldman, A.; Thiart, R.; Guittard, C.; Kitazos, CA.; de Ravel, TJL.;

Westwood, ART.; Claustres, M.; and Ramsay, M.; (1996).

First report of CFTR mutations in black cystic fibrosis patients of southern African origin

J Med Genet. 33: 802-804.

Carnoy, C.; Ramphal, R.; Scharfman,A.; et al., (1993).

Altered carbohydrate composition of salivary mucins from patients with cystic fibrosis and the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*.

J Respir Cell Mol Biol. 9: 323-34.

Casals,T.; Bassas, L.; Ruiz-Romero, J.; et al., (1995).

Extensive analysis Of 40 infertile patients with congenital absence of the vas deferens : in 50 % of cases only one CFTR allele could be detected .

Hum Genet. 95: 205-11.

Chehab, F.; and Wall, J.; (1992).

Detection of multiple cystic fibrosis mutations by reverse dot blot hybridisation : A technology for carrier screening.

Hum Genet. 89:163-168.

Cheng, SH.; Rich, DP.; Mashell, J.; Gregary, RJ.; et al., (1991).

Phosphorylation in the R domain by cAMP-dependant protein kinase regulated the CFTR chlorid channel.

Cell. 66: 1027-36.

Chevalier-Porst, F.; Chomel, JC.; Hillaite, D.; Kitzis, A.; Kaplan, JC.; Goutaland, R.;

Mathieu, M. ; and Bozon, D.; (1992).

A non sens mutation in exon 4 of the cystic fibrosis gene frequent among the population of the Reunion Island.

Hum Mol Genet .1: 647-649.

Chillon,M.; Casals,T.; Mercier, B.; Bassas, L.; Lissens,W.; Silber, S.; Romev, MC.; et al., (1995).

Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens.

N Eng J Med. 332:1475-80.

Chinet, Th.; (2000).

Mucoviscidose, In : Friedlander G , Clérici C (eds) , Biologie et pharmacologie des epithliums .

Paris : EDK: 89-96

Chinet, Th.; (2001).

Physiologie de la sécrétion épithéliale .In : Navarro J, Bellon G (eds). La mucoviscidose .

Montpellier: Ed Espaces. 34: 33-48.

Chinet,Th.; and Blouquit, S.; (2003).

Génétique et biologie cellulaire de la mucoviscidose.

Revue du praticien. 53 : 130-134.

Chu, CS.; Trapnell, BC.; Murtagh, JJ.; Moss, J.; Dalemans, W.; Jallat, S.; Mercenier, A.; et al., (1991).

Variable deletion of exon 9 coding séquences in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gène m RNA transcripts in normal bronchial epithelium.

EMBO J. 10: 1355-63.

Chu, CS.; Trapnell, BC.; Curristin, S.; Cutting, GR.; and Crystal, RG.; (1993).

Genetic basis of variable exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA.

Nat Gene. 3(2): 151-6.

Claustres, M.; Laussel, M.; Desgeorges, M.; et al., (1993).

Analysis of the 27 exons and flanking region of the cystic fibrosis gene: 40 different mutations account for 92,1% of the mutant alleles in southern France.

Hum Mol Genet. 2(8): 1209-1213.

Claustres, M.; (1998).

Génétique, dépistage et épidémiologie de la mucoviscidose.

Mt pédiatrie. 1(3): 261-268.

Clausres, M.; Guittard, C.; Chevalier, F.; Verlingue, C.; Ferec, C.; Girton, E.; Gazeneuve, C.; Bienvenu, T.; Lalau, G.; et al., (2000).

Spectrum of CFTR mutations in cystic fibrosis and in congenital absence of the vas deferens in France.

Hum Mutat. 16: 143-156.

Cohn, JA.; Strong, TV.; Picciotto, MR.; Nairn, AC.; Collins, FS.; and Fitz, JG.; (1993) .

Localization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in human bile duct epithelial cells.

Gastroenterology. 105: 1857 -1864.

Colombo, C.; Crosignani, A.; and Battezzati, PM.; (1999).

Liver involvement in cystic fibrosis.

J Hepatol. 31: 946-54.

Colombo, C.; Battezzati, PM.; Crosignani, A.; Morabito, A.; Costantini, D.; Padoan R, et al., (2002).

Liver disease in cystic fibrosis: a prospective study on incidence, risk factors, and outcome .

Hepatology. 36: 1374-1382.

Collen, MJ.; Knowles, MR.; Gatzky, JT.; and Boucher, RC.; (1987).

Abnormal apical cell membrane in cf respiratory epithelium .

J Clin Invest. 79: 80-85.

Costes, B. ; Girodon, E. ; Ghanem, N. ; Chassignol, M.; Thong, NT.; Dupret, D.; and Goossens, M.; (1993).

Psoralen-modified oligonucleotide primers improve detection of mutations by denaturing gradient gel electrophoresis and provide an alternative to GC-clamp.

Hum Mol Genet. 2: 393-7.

Costes, B. ; Girodon, E. ; Ghanem, N.; Flori, E.; Soufir, JC.; and Goossens, M.; (1995a).

The genetic basis of congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD) .

20th European Cystic Fibrosis Conference Brussels, Belgium.

Costes, B.; Girodon-Boulandet, E.; Ghanem, N.; Flori, E.; Jardin, A.; Soufir, JC.; and

Goossens, M.; (1995b).

Frequent occurrence of the CFTR intron 8 (TG)_n 5T allele in men with congenital bilateral absence of the vas deferens.

Eur J Hum Genet .3: 285-93.

Costes, B.; Girodon-Boulandet, E.; Pagesy, P.; Fanen, P.; and Goossens, M.; (2001).

La génétique. In : Navarro G (eds). La mucoviscidose.

Montpellier : Espaces. 34 : 16-32.

Coughlin, JP.; Gauderer, MW.; Stern, RC.; Doershuk, CF.; Izant, RJ.; and Zollinger, RM.; (1990).

The spectrum of appendiceal disease in cystic fibrosis.

J Pediatr Surg. 25: 835-9.

Cremonesi, L.; Ferrari, M.; Belloni, E.; Magnani, C.; Seia, M.; Ronchetto, P.; Rady, M.; et al., (1992).

Four new mutations of the CFTR gene (541 delC, R347H, R352Q, E585X) detected by DGGE analysis in Italian CF patients, associated with different clinical phenotypes.

Hum Mutat. 1: 314-319.

Cucchiara, S.; Santamaria, F.; Andreott, MR.; Minella, R.; Ercolini, P.; Oggero, V.; et al., (1991).

Mechanisms of gastroesophageal reflux in cystic fibrosis.

Arch Dis Child. 6: 617-22.

Cucchiara, S.; Borrelli, O.; and Campanozzi, F.; (1997).

Gastrointestinal motility in cystic fibrosis. 21st European Cystic Fibrosis Conference.

Davos. 16-9.

Cuppens ,H.; et al., (1998).

Polyvariant mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene.

J Clin Invest.101: 487-496.

Cutting , GR.; Kasch, LM.; Rosenstein, BJ.; Zielenski, J.; Tsui, LC.; Antonarakis, SE.;

Davis, PB.; Drumm, M.; and Konstan, MW.; (1990).

Cystic Fibrosis .

State of the Art. Am J Resp Crit Care Med . 154: 1229-56.

Danni, LG.; and Blau, K.; (1978).

Exocrin gland functionand the basic biochemical defect CF.

Lancet 2. 8086: 406-407.

Davis, PB.; Drumm, ML.; and Konstan, MW.; (1996).

State of the art: cystic fibrosis.

Am J Resp Crit Care Med. 154: 1229 – 56.

De Bentzmann, S.; Roger, P.; and Puchelle, E.; (1996).

Pseudomonas aeruginosa adherence to remodelling respiratory epithelium .

Eur Respir J. 9: 2145-50.

Dening, GM. ; Wollenweber , LA. ; Railsback, MA.; Cox, CD.; Stoll, LL.; and Britigan, BE.; (1998).

Pseudomonas pyocyanin increase interleukin-8 expression by human airway epithelial cell .

Infect Immun. 66: 5777-84.

Di Sant' Agnese, PA. ; Darling, RC. ; Perera, GA. ; et al., (1953).

Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas : Clinical significance and relationship to the disease.

Pediatrics. 23: 545-9.

Dohle, GR.; Veeze, HJ.; Overbeek, SE.; et al., (1999).

The complex relationships between cystic fibrosis and congenital bilateral absence of the vas deferens: clinical, electrophysiological and genetic data.

Hum Rep. 14 (2): 371-374.

Doving, G.; (1991).

Microbiological lung infections: neuw therapeutic strategies.

Path Biol. 39 (6): 587 -591.

Drumm, ML.; Wilkinson, DJ.; Smit, LS.; WorRell, RT.; Strong, TV.; Frizzell, RA.; Dawson, DC.; and Collins, FS.; (1991).

Chloride conductance expressed by delta F508 and other mutant CFTRs in *Xenopus* oocytes.

Science. 254: 1797-9.

Dumur, V.; Gervais, R.; Rigot, JM. ; Lafitte, JJ.; Manouvrier, S. ; Biserte, J. ; Mazeman, E. ; and roussel, P. ; (1990).

Abnormal distribution of $\Delta F508$ allele in azoospermic men with congenital aplasia of the epididymys and vas deferens.

Lancet. 336 (8713): 512.

Durie, PR.; (1997).

Intestinal motility in cystic fibrosis – lower GI involvement 21st European .

Cystic Fibrosis Conference. Davos : 24-7.

Duro, G. ; Izzo, V.; Barbieri, R.; Cantone, MA.; et al., (1991).

A method for eluting DNA in a wide range of molécular weights from agarose gels.

Anal Biochem. 195: 111-115.

Estivill, X.; Scambler, PJ.; Wainwright, BJ.; et al., (1987).

Patterns of polymorphism and linkage disequilibrium for cystic fibrosis

Genomics. 1: 257-263

Estivill,X.; Morral, N.; Nunes, V.; et al., (1989).

Δ F 508 gene deletion in cystic fibrosis in Southern Europe.

Lancet. 2: 1404.

Estivill X.; (1996).

Complexity in a monogenic disease.

Nature Genet. 12: 348-350.

Estivill, X.; Bancells, C.; Ramos, C.; and the Biomed CF Mutation Analysis Consortium.; (1997).

Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations.

Hum Mutat. 10: 135-54.

Fanen, P.; Ghanem, N.; Vidaud, M.; et al., (1992).

Molecular characterisation of cystic fibrosis : 16 novel mutations identified by analysis of the whole cystic fibrosis conductance transmembrane regulator (CFTR) coding region and splice junctions.

Genomics. 13: 770-776.

Farrell, PM.; and Kosciak, RE.; (1996).

Sweat chlorid concentrations in infants homozygous or heterozygous for Δ F 508 cystic fibrosis.

Pediatrics. 97: 524-7.

Feranchak, AP.; et al., (2001).

Seminars in liver disease

21: 471-88.

Ferec, C.; Mercier, B.; and Audrézet, M.; (1994).

Les mutations de la mucoviscidose : du génotype au phénotype.

Médecine/ science.10 : 631-9.

Ferec, C.; Verlingue, C.; and Mercier, B.; (1996).

Le gène CFTR : Agénésie des déférents et mucoviscidose, deux maladie pour un même gène.

M/S. 12: 485-490.

Ferguson, GT.; (1993).

Respiratory muscle function in chronic obstructive pulmonary disease.

Sem Resp Med. 14: 430-45.

Fischer, SG.; and Lerman, LS.; (1983).

DNA Fragment differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels correspondence with melting theory.

Proc Natl Academic Sci USA. 80: 1579-1583.

Freedmann,SD.; and Alvarez, JG.; (1999).

Pathogenesis of pancreatic disease in cystic fibrosis .

Pediatr Pulmonol. Suppl 19: 129.

Gadsby, DC.; and Nairn, AC.; (1999).

Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis.

Physiol Rev.79: 77-107.

Gaskin, KJ.; Warters, DL.; Howman-Giles, R.; de Silva, M.; Earl, JW.; Martin, HC.; et al., (1988).

Liver disease and common-bile-duct stenosis incystic fibrosis.

N Engl J Med. 318: 340-346.

Gasparini, P.; Nunes, V.; Savoia, A.; Dognini, M.; Morral , N.; Gaona, A.; Bonizzato, A.; et al., (1991).

The search of Southern European cystic fibrosis mutations: Identification of two new mutations, four variants, and intron sequences.

Genomics. 10: 193-200 .

Gervais, R.; Dumur, V.; Rigot, JM.; et al., (1993).

High frequency of the R 117H cystic fibrosis mutation in patients congenital absence of the vas deferens

N Engel J Med. 328: 446-447.

Gibson, LE.; and Cook, RE.; (1959).

A test for concentration of electrolytes in sweat in in cystic fibrosis of the pancreas utilising pilocarpine by iontophoresis.

Pediatrics. 23: 545

Gilligan, P.; (1991).

Microbiology of airway disease in patient with cystic fibrosis.

Clin. Microbiol. 4: 35-51.

Gilly, R.; and Bellow, G.; (1988).

Mucoviscidose: maladie kystique pancréatique.

Encyclopédie médico-chirurgicale, Paris. 4060 : 10.

Gregory, P.C.; (1996).

Gastrointestinal pH, motility; transit and permeability in cystic fibrosis .

J Pediatr Gastroenterol Nutr. 23 : 513-23.

Haardt, M.; Benharouga, M.; Lechardeur, D.; Kartner, N.; and Lukacs, G.L.; (1999).

C terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis . A novel class of mutation

J Biol chem. 274: 21873-7.

Hamosh, A.; King, T.M.; Rosenstein, B.J., Corey, M.; Levison, H.; Durie, P.; Tsui, L.C.; et al., (1991).

Cystic fibrosis patients bearing both the common missense mutation Gly-- --Asp at codon 551 and the delta F508 mutation are clinically indistinguishable from delta F508 homozygotes, except for decreased risk of meconium ileus.

Am J Hum Genet. 51: 245-50 .

Hendry, J.; Elborn, J.S.; Nixon, L.; Shale, D.J.; and Webb, A.K.; (1999).

Cystic fibrosis: inflammatory response to infection with *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Eur Respir J. 14: 435-38.

Holsclaw, D.S.; Lober, B.; Jockin, H.; and Schwachman, H.; (1971).

Genital abnormalities in male patients with cystic fibrosis.

J Urol. 106(4): 568-74.

Hwang, T.C.; Nagel, G.; Nairn, A.C.; and Gadsby, D.C.; (1994).

Regulation of the gating of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator CL channels by phosphorylation and ATP hydrolysis.

Proc Natl Acad Sci USA. 91: 4698-4702.

Jarvi, K.; Zielenski, J.; Wilschanski, M.; Durie, P.; Buckspan, M.; Tullis, E.; Markievics, D.; et al., (1995).

Cystic fibrosis transmembrane regulator and obstructive azoospermia.

Lancet. 345: 1578.

Joshi, V.; (2002).

Recent advances in the endoscopic and surgical management of gastroesophageal reflux in cystic fibrosis.

16th Annual North American Cystic Fibrosis

Conference, New Orleans. *Pediatr Pulmonol. Suppl* 24: 114-5.

Katznelson, D.; and Ben-Yishay, M.; (1978).

Cystic fibrosis in Israel : clinical and genetics aspects .

***Isr J Med Sci.* 14: 204 -211.**

Kazazian, HH.; (1990).

A cluster of cystic fibrosis mutations in the first nucleotide binding fold of the cystic fibrosis conductance regulator protein.

***Nature.* 346: 366-369.**

Kerem,B.; Rommens, JM.; Buchanan, JA.; Markiewics, D.; Cox, TK.; Chakravarti, A.;

Buchwald, M.; and Tsui, LC.; (1989).

Identification of the cystic fibrosis gene: Genetic analysis.

***Science.* 245: 1073-1080.**

Kerem, E.; Corey, M.; Kerem, B.; Durie, P.;Tsui, LC.; and Levison, H.; (1989).

Clinical and genetic comparison of patient with cystic fibrosis, with or without meconium ileus.

***J Pediatr.* 114: 767-773.**

Kerem, B.; Zielenski, J.; Markiewics, D.; Gazit, E.; Yahaf, J.; Kennedy, D.; Riordan, JR.;

Collins, FS.; Rommens, JR; and Tsui, LC; (1990).

Identification of mutations in regions corresponding to the 2 putative nucleotide (ATP) binding folds of the cystic fibrosis gene .

***Proc Natl Acad Sci USA.* 87: 8447-8451.**

Kerem, E.; Corey, M.; and Kerem, BS.; (1990).

The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis: analysis of the most common mutation ΔF 508.

***N Eng J Med.* 323: 1517-22.**

Khan, TZ.; Wagener , JS.; Bost, T; Martinez, J.; Accurso, FJ.; and Riches, DWH.; (1995).

Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis .

***Am J Respir Crit Care Med.* 151: 1075-82.**

Kieswetter, S.; Macek, M.; Davis, C.; et al., (1993).

A mutation in CFTR produces different phenotypes depending on chromosomal background.

***Nat genetics.* 5: 274-278.**

Knowles, MR.; Carson, JL.; Collier, AM.; Gatzky, JT.; and Boucher, RC.;
(1983).

Measurement of nasal transepithelial electric potential differences in normal human subjects in vivo.

Am Rev Respir Dis. 124: 484-90.

Knowlton, RG.; Shumm, JW.; Akots, G.; Helms, C.; et al., (1985).

Cystic fibrosis locus defined by a genetically polymorphic DNA marker.

Nature. 318: 380.

Kunzelmann, K.; and Schreiber, R.; (1999).

CFTR, a regulator of channel

J Membrane Biol. 168: 1-8.

Lamireau, T.; Monnereau, S.; Martin, S.; Marcotte, JE.; Winnock, M.; and Alvaez, F.;
(2004).

Epidemiologie of liver disease in cystic fibrosis : a longitudinal study

J Hepatolgy. 41: 920-925.

Lerman, LS.; and Silverstein, KS.; (1987).

Computational Simulation of DNA Melting and its application to Denaturing Gradient Gel Electrophoresis.

Methods in Enzymology. 155: 483-501.

Lindblad, A.; Glaumann, H.; and Sstrandvik, B.; (1999).

Natural History of liver disease in cystic fibrosis.

Hepatology. 30: 1151-1158.

Littlewood, JM.; (1986).

The sweat test

Arch Dis Child. 61: 1041-3.

Luo, J.; Pato, MD.; Riordan, JR.; and Hanrahan, JW.; (1998).

Differential regulation of single CFTR channels by PP2C, PP2A, and other phosphatases

Am J Physiol. 274: 1397-1410.

Malfrout, A.; and Dab, I.; (1991).

New insights on gastroesophageal in cystic fibrosis by longitudinal follow up

Arch Dis Child. 66: 1339-45.

Marty, N.; and Chabanon, G.; (1993).

Pseudomonas aeruginosa dans la mucoviscidose.

Revue française des laboratoires. 249: 103 – 107.

Mercier, B.; Verlingue, C.; Lissens, W.; and al., (1995).

Is congenital bilateral absence of vas deferens a primary form of cystic fibrosis ?

Analyses of the CFTR gene in 67 patients.

Am J Hum Genet. 56: 272-7.

Meyers, RM.; Ficher, SG.; Maniatis, T.; and Lerman, LS.; (1985).

Nearly all single base substitutions in DNA fragment joined to a GC-clamp can be detected by dénaturing gradient gel electrophoresis .

Nucleic Acids Res. 13: 3131-45.

Meyers, RM.; Ficher, SG.; Maniatis, T.; and Lerman, LS.; (1987a).

Modification of the melting properties of duplex DNA by attachment of a GC-rich DNA sequence as determined by denaturing gradient gel electrophoresis.

Nucleic Acids Res. 13: 3111-29.

Meyers, RM.; Maniatis, T.; and Lerman, LS.; (1987b).

Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel Electrophoresis.

Meth Enzymol. 155: 501-27.

Miller, SA.; Dykes, DD.; and Polesky, HG.; (1988).

A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.

Nucleic acids Res. 16: 1215.

Munck, A.; Navarro, J.; and Turck, D.; (2001).

Prise en charge digestive et nutritionnelle

Arch Pediatr. 5 : 1-18.

Munck, A.; Belarbi, N.; de Lagausie, P.; Peuchmaur, M.; and Navarro, J.; (2000).

Ultrasonographie detects appendicular mucocele in cystic fibrosis patients suffering recurrent abdominal pain .

Pediatrics. 105 : 921.

Naimi, D.; (1996).

Mucoviscidose : physiopathologie génétique et thérapie

JAM. 6.1 : 5-12.

Naimi, D.; Chabani, MI.; (1997).

Recherche des mutations du gène CFTR dans le constantinois

JAM. 2: 94-99.

Oates, RD.; and Amos, JA.; (1994).

The genetic basis of congenital absence of the vas deferens and cystic fibrosis.

J Androl. 15:1-8.

Osborne, LR. ; Santis, G.; and Hodson, M.; (1991).

A mutation in the second nucleotide binding fold of the cystic fibrosis gene.

Am J Hum Genet. 48: 608-612.

Osborne, LR.; Lynch, M. ; Middleton, PG.; Alton, EFWF. ; Geddes, DM. ; Pryor, JP.; Hodsen, ME. ; et al ., (1993).

Nasal epithelial ion transport and genetic analysis of infertile men with congenital bilateral absence of the vas deferens.

Hum Mol Genet. 2:10. 1605-9.

Patricio, P.; Asch, RH.; Handelin, B. ; et al., (1993).

Aetiology of congenital absence of vas deferens : Genetic study three generations.

Hum Reprod. 8:215-222.

Pier,GB.; Grout , M.; and Zaidi,T.; (1997).

Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung .

Proc Natl Acad Sci USA. 94: 12088-93.

Pier, GB.; Grout , M.; Zaidi,T.; Meluleni, G.; Mueschenborn, SS. ; and al., (1998).

Salmonella typhi uses CFTR to enter intestinal epithelial cells.

Nature. 393: 79-82.

Pignatti, Pf.; Bombieri, C.; Benetazzo, M.; and Luisetti, M.; (1995).

Increased incidence of cystic fibrosis gene mutations in adults with disseminated Bronchiectasis.

Hum Mol Genet. 4: 635 – 639.

Pilewski, JM.; and Frizzel, RA.; (1999).

Role of CFTR in airway disease.

Physiol Rev. 79: S215-S255.

Plotkowski, MC.; Debentzmann, S.; Pereira, SHM.; et al., (1999).

Pseudomonas aeruginosa internalization by human epithelial respiratory cells depends on cell differentiation, polarity, and junctional complex integrity.

Am J Respir Cell Mol Biol. 20: 880-90.

Quinton, PM.; (1983).

Chloride impermeability in Cystic Fibrosis.

Nature. 301: 421.

Quinton, PM.; (1999).

Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective.

Physiol Rev. 79: S23-S45.

- Rich, DP.; Anderson, MP.; Gregory, RJ.; Cheng, SH.; Paul, S.; Jefferson, DM.; et al., (1990).
Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells.
Nature. 347: 358-63.
- Rich, DP.; et al., (1993).
Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl channel by negative charge in the R domain.
J Biol Chem. 268: 20259-20267.
- Riordan, JR.; Rommens, JM.; Kerem, B.; Alon, N.; Rozmahel, R.; et al.,(1989).
Identification of the cystic fibrosis gene : cloning and characterization of complementary DNA.
Science. 245: 1066-1072.
- Rommens, JM.; Iannuzzi, MC. ; Kerem, B. ; Drumm, ML.; Melmer, G.; and al.; (1989).
Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome 7 and jumping.
Science. 245: 1059-1065.
- Rosenbaum, V.; and Reissner, D.; (1987).
Biophysical Chem. 26: 235-246.
- Rosenstein, BJ.; and Cutting, GR.; (1998).
The diagnosis of cystic fibrosis: A consensus statement .
J Pediatr. 132: 589-95.
- Rozmahel, R.; Wilschanski, M.; Matin, A.; et al., (1996).
Modulation of disease severity in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator deficient mice by a secondary genetic factor.
Nature Genet. 12: 280-7.
- Rubenstein, S.; Moss, R.; and Lewiston, N.; (1986).
Constipation and meconium ileus equivalent in patients with cystic fibrosis .
Pediatrics. 78: 473-9.
- Saiki, RK.; Scharef, S.; Faloona, F.; Mullis, KB.; et al., (1985).
Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnostic of sickle-cell anemia.
Science. 230: 1350-1354.
- Salvatore, F.; Scudiero, O.; and Castaldo, G.; (2002).
Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis: the role of modifier genes
Am J Med Genet. 111: 88-95.

Sambrook, J.; Fritsch, EF; and Maniatis, T.; (1989).

Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd Ed . Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.

Sanger, F.; Nicklen, S.; and Coulson, AR.; (1977).

DNA sequencing with chain terminating inhibitors .
Proc Natl Acad Sci USA. 74: 5462-5467.

Schales, O.; and Schales, SS.; (1947) .

A simple and accurate method for the determination of chloride in biological fluids.
J Biol Chem. 140: 879.

Schwiebert, EM.; Benos, DJ.; Egan, ME.; Stutts, MJ.; and Guggino, WB.; (1999).

CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel .
Physiol Rev. 79: 145-66.

Sferra, TJ.; and Collins, FS. ; (1993).

The molecular of cystic fibrosis .
Annu Rev Med. 44: 133.

Sheffield, VC.; Cox, DR.; Lerman, LS.; and Myers, R.; (1989).

Attachment of the 40 base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes.
Proc Natl Acad Sci USA. 86: 232-6.

Sheppard, DN.; Rich, DP.; Ostedgaard, LS.; Gregory, RJ.; Smith, AE.; and Welsh, M.; (1993).

Mutations in CFTR associated with mild-disease-form Cl-channels with altered pore properties.
Nature. 362: 160-4

Shields, MD.; Levson, H.; Reisman, JJ.; Durie, PR.; and Canny GJ.; (1991).

Appendicitis in cystic fibrosis.
Arch Dis Child. 66:307-10.

Shwachmann, HL.; Mahmoodian, A.; and Neff, RK.; (1981)

sweat test: sodium and chloride values.
J Pediatr. 98: 576-8

Shwachmann, HL.; (1990).

Cystic fibrosis ,In Isselbacher KJ.; et al.,
Harrison's Principles of Internal Medicine. Mc Graw-Hill, St Louis: 1233-1235

Soleimani, M.; and Shumaker, H.; (1999).

How cystic fibrosis affects pancreatic ductal bicarbonate secretion .
Pediatr Pulmonol. Supp19: 131-2.

- Strandvik, B.; Hjelt, L.; Gabrielsson, N.; and Glaumann, H.; (1988).
Sclerosing cholangitis in cystic fibrosis.
Scand J Gastroenterol Suppl. 143: 121-124.
- Stutts, MJ.;Canessa, CM.;Olsen, JC.;Hamrick, M.;Cohn , JA.;Rossier, BC.;and Boucher, RC.;
(1995).
CFTR as a cAMP-dependant regulator of sodium channels.
Science. 269: 857-850.
- Tabary, O.; Zahm, J.; Hinnrasky, J.; et al., (1999) .
Genistein inhibits constitutive and inducible NF.B activation ad decreases IL-B
production by human cystic fibrosis bronchial gland cells.
Am J Pathol. 155: 473-81.
- Turck, D.; and Michaud, L.; (1998).
Cystic fibrosis : nutritional conséquences and management.
Bailliere's Clin Gastroenterol.12: 505-22.
- Tsui, LC.; Buchwald, M.; Barker, D.;et al., (1985).
Cystic fibrosis locus defined by a genetically polymorphic DNA marker
Science. 230: 1054-1057.
- Vandenplas, Y.; Diercx, A.; Blecker, U.; Lancier, S.; and Deneyer, M.; (1991).
Esophageal pH monitoring data during chest physiotherapy.
J Pediatr Gastroenterol Nutr. 13:23-6.
- Vandervan, K.; and Coll, A.; (1996).
Cstic Fibrosis screening in healthy men with reduced sperm quality
Hum Reprod. 11: 513-7.
- Vasil, ML.; (1986).
Pseudomonas aeruginosa and cystic fibrosis : unusual adaptation and pathogenesis.
J Pediatr. 108: 508 – 800.
- Vawter, GF.; and Schwchman, HL.; (1979) .
Pathol Ann. 14: 357-82 .
- Vergani, P.; Nairn, AC.; and Gadsby, DC.; (2003).
On the mécanism of Mg ATP dependent gating of CFTR Cl- channel
J Gen Physiol. 121: 17-36.
- Vic, P.; Tassin, E.; Turck, D.; Gottrand, F.; Launay,V.; and Farriaux, JP.; (1995).
Fréquence du reflux gastro-oesophagien chez le nourrisson et le jeune enfant atteint
de mucoviscidose.
Arch Pediatr. 2 :742-6.

Vidaud, M.; Fanen, P.; Martin, J.; Ghanem, M.; Nicolas, S.; and Goossens M.; (1990).

Three mutations in the CFTR gene in french cystic fibrosis patients : Identification by denaturing gradient gel electrophoresis.

Hum Genet. 85: 446-449

Wainwright, B.J.; Scambler, P.J.; Schmidke, J., Watson, P.; et al., (1985).

Localisation of cystic fibrosis locus to human chromosome 7 cen – q22

Nature 318. 318: 384 -385.

Walker, J.E.; Sarasate, M.; Runswick, M.J.; and Gay, N.J.; (1982).

EMBO J. 1: 945.

Waters, D.L. ; Dorney, S.F. ; Gruca, MA .; Marin, HC. ; Howman-Giles, R. ; Kan, A.E. ; et al., (1995).

Hepatobiliary disease in cystic fibrosis patients with pancreatic sufficiency.

Hepatology. 21: 963-969.

Webster, H.L.; (1983).

Laboratory diagnosis of cystic fibrosis. CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory

Sciences, in CRC Press, Inc, Boca Raton , Florida. 18: 4 -1

Welsh, M.J.; and Smith, A.E.; (1993).

Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis .

Cell. 73: 1251-4.

Welsh, M.; and Smith, A.; (1996). "La mucoviscidose"

Pour la science.

220 : 66-74

White, M.B.; Carvalho, M.; Derse, D. ; O'Brien, S.J.; et al., (1985)

Detecting single base substitutions as heteroduplex polymorphisms.

Genomic. 12: 301-6.

Wilschanski, M.; Zielenski, J.; Markiewicz, D.; Tsui, L.C.; Corey, M.; Levison, H.; et al., (1995).

Correlation of sweat chlorid concentration with classes of the cystic fibrosis transmembrane conductance régulator gene mutations

J Pediatr. 127: 705-10.

Zhang, Y.; Doranz, B.; Yankaskas, J.R.; and Engelhardt, J.F.; (1995).

Genotypic analysis of respiratory mucous sulfation defects in cystic fibrosis .

J Clin Invest. 96: 2997-3004.

Zielenski, J.; Rozmahel, R.; Bozon, D.; Kerem, B.; Grzelczak, Z.; Riordan, JR.; Rommens, JM.; and Tsui, LC.; (1991b).

Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regular (CFTR) gene .

Genomic. 10: 214-228.

Zielenski, J.; and Tsui, LC.; (1995).

Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations

Ann Rev Genet. 29: 777-507.

Zielenski, J.; (2000).

Genotype and phenotype in cystic fibrosis

Respiration. 67: 117-3.

Résumé

La mucoviscidose est la maladie génétique létale la plus fréquente des maladies héréditaires chez les sujets d'origine européenne, de transmission autosomique récessive. Elle affecte la plupart des organes comportant un tissu épithélial, siège de transport hydro électrolytique transépithélial, notamment les voies aériennes, le pancréas, les voies biliaires, l'intestin, les glandes sudoripares et le tractus génital. Le gène dont les anomalies sont responsables de la mucoviscidose code pour une protéine canal Cl⁻ dénommée CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) qui exerce de multiples fonctions dans la cellule, l'une des plus importantes est le contrôle des transports de sodium et de chlore à travers les épithéliums. Cette fonction défectueuse se traduit notamment par une production de sécrétions anormalement visqueuses qui obstruent les canaux excréteurs de ces organes cibles : on observe alors une dilatation, une inflammation et une atrophie de ces organes. Elle se traduit également par une augmentation de la concentration en sodium et en chlore dans la sueur, à la base du test de la sueur.

Afin d'effectuer un diagnostic phénotypique et génotypique chez une partie de la population algérienne, notre étude a été réalisée sur 34 patients dont 18 sujets masculins chez qui le diagnostic de l'atrésie bilatérale des canaux déférents a été confirmé par des analyses biologiques et biochimiques du sperme et par une échographie approfondie de leur appareil urogénital et 16 patients avec d'autres symptômes évocateurs de la mucoviscidose chez qui le contexte clinique a été confirmé par un test de la sueur. Cependant, les anomalies du gène CFTR ont été déterminées par électrophorèse en gel de polyacrylamide des produits PCR (Polymérase Chain Reaction), après digestion enzymatique, puis visualisés aux ultraviolet (UV) après action du bromure d'éthidium. Tandis que la caractérisation des séquences polypyrimidiques de l'intron 8 impliqué dans l'épissage alternatif a été effectuée par la technique d'électrophorèse en gradient de gel dénaturant (DGGE) et par le séquençage de ses sites donneurs, accepteurs et de branchement. Ce qui nous a permis d'identifier neuf allèles caractérisés chacun par le motif de répétition (TG)_nm(T).

Toutes les mutations détectées lors de notre étude ont déjà été identifiées chez des patients atteints par cette pathologie dans d'autres populations du monde. Toutefois, le nombre important de mutation trouvé par rapport à celui des patients étudiés témoigne que l'origine de cette grande variabilité clinique qui caractérise la maladie est la conséquence d'une diversité énorme de défauts moléculaires du gène CFTR.

Mots clés: Fibrose cystique, mucoviscidose, ABCD, mutations CFTR, symptômes cliniques