

République Algérienne Démocratique Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique

Université des Sciences et de la Technologie d'Oran « Mohamed Boudiaf »



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Génétique Moléculaire Appliquée

Spécialité : Génétique moléculaire et cellulaire **Option :** Biologie moléculaire

THESE

Présentée par

Mademoiselle SEDIKI Fatima Zohra

En vue de l'obtention du

Diplôme de DOCTORAT

Thème

Etude génétique de la mucoviscidose dans un échantillon de la population Algérienne

Soutenue le 25/05/2015 devant la commission d'examen composée de:

<u>Qualité</u>	<u>Nom et Prénom</u>	<u>Grade</u>	<u>Etablissement d'origine</u>
<i>Présidente</i>	<i>Mme SAIDI-MEHTAR Nadhira</i>	<i>Professeur</i>	<i>USTOMB (Oran)</i>
<i>Examinatrice</i>	<i>Mme MEDIENE BENCHEKOR Sonia</i>	<i>Professeur</i>	<i>Université d'Oran</i>
<i>Examinatrice</i>	<i>Mme ABERKANE Meriem Samia</i>	<i>Maître de conf. A</i>	<i>Université d'Oran</i>
<i>Examinatrice</i>	<i>Mme ZEMANI-FODIL Faouzia</i>	<i>Maître de conf. A</i>	<i>USTOMB (Oran)</i>
<i>Directeur de thèse</i>	<i>Mr BOUDJEMA Abdallah</i>	<i>Professeur</i>	<i>USTOMB (Oran)</i>
<i>Invité</i>	<i>Mr RADOUI Abdelkarim</i>	<i>Professeur Agrégé</i>	<i>Université d'Oran I</i>

Remerciements

*J'adresse mes vifs remerciements au **Pr. SAÏDI-MEHTAR Nadhira** ; professeur en biologie moléculaire à l'université des Sciences et de la Technologie d'Oran-Mohamed Boudiaf- (USTO-MB); qui m'a fait l'honneur de présider ce jury. Veuillez croire en mon éternel respect et ma sincère gratitude.*

*Mes remerciements les plus sincères vont au **Pr. MEDIENE-BENCHEKOR Sonia**; professeur à l'université d'Oran ; pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant d'examiner ce travail et de l'enrichir de ses éminentes compétences scientifiques dont son enseignement et sa passion resteront des exemples pour moi. Veuillez trouver en ce travail, un gage de mon grand respect et ma profonde reconnaissance.*

*Je remercie également **Dr. ABERKANE Meriem Samia**; maître de conférences classe A à l'université d'Oran; d'avoir accepté avec une grande amabilité de faire partie de ce jury pour examiner cette thèse et pour m'avoir fait l'honneur de votre présence à ma soutenance. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance et de ma considération respectueuse.*

*Mes remerciements les plus respectueux s'adressent au **Dr. ZEMANI-FODIL Faouzia** ; maître de conférences classe A à l'université des Sciences et de la Technologie d'Oran-Mohamed Boudiaf- (USTO-MB); qui a accepté d'examiner ce travail. Veuillez accepter Madame le témoignage de ma reconnaissance et de mon respectueux hommage.*

*Je remercie tout particulièrement mon directeur de thèse **Pr. BOUDJEMA Abdallah** ; Professeur à l'Université des Sciences et de la Technologie d'Oran-Mohamed Boudiaf- (USTO-MB) ; pour la confiance qu'il m'a accordé en acceptant d'encadrer ce travail doctoral. Je lui suis reconnaissante pour sa patience, ses encouragements, sa sympathie et sa disponibilité à tout moment. Ses conseils, ses commentaires, ses corrections et ses qualités scientifiques ont été très précieux pour mener à bien ce travail. Enfin, j'ai été extrêmement sensible à ses qualités humaines, à sa rigueur, à son professionnalisme et à son ouverture d'esprit. Je suis infiniment heureuse et honorée d'avoir fait ma thèse sous sa direction. Aucune expression de gratitude ne sera suffisante pour vous exprimer mon respect et ma reconnaissance.*

*Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères au **Pr. RADOUI Abdelkarim**; Professeur Agrégé, Chef de service de Pneumologie et d'Allergologie Pédiatriques à L'Etablissement Hospitalier Spécialisé Canastel Oran ; de m'avoir orienté et m'encouragé au cours de mon travail, également pour sa gentillesse, sa grande compétence et sa disponibilité continue. Malgré toutes ses journées surchargées, merci d'avoir toujours trouvé un moment pour discuter quand je frappais à sa porte. Il a su me faire partager ses nombreuses connaissances, sa vision toujours claire et synthétique. Veuillez trouver en ce travail l'expression de mon estime et de ma sincère gratitude.*

J'aimerais remercier également :

Tous les patients qui ont accepté de participer à cette étude.

*Le staff hospitalier qui a contribué à la réalisation de cette étude. Je pense particulièrement à Mme **BENADDA Faouzia** surveillante médicale au service de pneumologie et d'allergologie pédiatrique à l'Etablissement Hospitalier Spécialisé Canastel Oran.*

Ce travail est le résultat d'une collaboration avec le laboratoire d'Endocrinologie Moléculaire et Maladies Rares à Bron, Lyon (France).

*Je tiens à remercier vivement le **Dr. CABET Faiza** pour m'avoir accueilli au sein de son service et pour m'avoir conseillée et guidée avec bienveillance. Je remercie chaleureusement tous les membres de son équipe pour leur grande disponibilité et l'ambiance décontractée qui m'a facilité le travail, et tout particulièrement **Mme Maryline MURENA** et **Mme Carole JOUAULT** pour m'avoir formée à l'utilisation du Kit ELUCIGENE CF30® et initiée au séquençage, pour leur simplicité, leurs précieux conseils et pour leur suivi et l'aide précieuse qu'ils m'ont apporté tout au long de mon stage.*

Mes remerciements les plus sincères vont également à l'équipe du laboratoire de Génétique Moléculaire Appliquée, Université des Sciences et de la Technologie d'Oran - Mohamed Boudiaf- (USTO-MB), ainsi que mes amis, je ne saurais de les nommer de peur d'en oublier. Vous m'avez apporté beaucoup de joie et de soutien. Vous avez été une équipe formidable avec laquelle j'ai partagé des moments extraordinaires.

Je remercie tous ceux qui par leurs encouragements, leur aide, leurs conseils ou leurs critiques, ont contribué à la réalisation de ce travail.

A toutes et tous, Merci !

Résumé

La mucoviscidose est la maladie autosomique récessive grave la plus fréquente dans la population d'origine caucasienne. Elle est due à des anomalies du gène *CFTR*, dont les multiples mutations décrites rendent compte en partie de la grande variabilité phénotypique.

Loin d'être une pathologie européenne la mucoviscidose est présente en Algérie.

A l'heure du développement de thérapies ciblées selon les mutations portées par les patients, la caractérisation de ces dernières est plus qu'indispensable.

La première partie de ce travail est focalisée sur la recherche des anomalies du gène *CFTR* responsable de la mucoviscidose dans un échantillon de 24 patients appartenant à 24 familles non apparentées. L'exploration des mutations est réalisée par différentes techniques de biologie moléculaire (PCR, PCR/ARMS, séquençage), 14 mutations différentes ont pu être identifiées.

Dans la deuxième partie de cette thèse nous nous sommes intéressés à trois mutations qui de par la littérature semblent spécifiques à la population Algérienne : c.680T>G (L227R), c.3907A>C (N1303H), c.422C>A (A141D). Les effets délétères de ces mutations ont été étudiés par le biais d'une combinaison de logiciels d'étude *in silico* et de modélisation moléculaire tridimensionnelle (3D).

La mutation c.680T>G (L227R) a été prédite comme altérant les relations hydrophobes au cœur même de la protéine ou avec les lipides formant la membrane.

D'autre part, la c.3907A>C (N1303H) a été prédite comme délétère altérant la structure et la fonction du canal *CFTR*, les changements physicochimiques entre les acides aminés natifs et mutés perturbent fortement la stabilité de la protéine. Enfin, la mutation c.422C>A (A141D) est prédite comme délétère et semble perturber les interactions ioniques, mais aussi les interactions au sein des différents segments formant le pore du canal *CFTR*.

Les résultats obtenus au terme de ce travail auraient pour but de contribuer à moyen terme à la mise en place d'un programme de diagnostic génétique, et à la mise à disposition de conseil génétique pour les familles à risque. A long terme, ces résultats pourraient aider à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaire à l'origine de cette pathologie.

Mots-clés : Mucoviscidose, gène *CFTR*, mutations, PCR, PCR/ARMS, séquençage, étude *in silico*.

Abstract

Cystic fibrosis (CF) is the most common severe autosomal recessive disorder in the Caucasian population. It is due to abnormalities of the *CFTR* gene, multiple mutations described in part reflected in the great phenotypic variability.

Far from being a European disease cystic fibrosis is present in Algeria.

At the time of the development of targeted therapies as mutations carried by patients, the characterization of these is more than indispensable.

The first part of this work is focused on finding *CFTR* gene alterations responsible for CF in a sample of 24 patients from 24 unrelated families. The exploration of mutations is performed by different molecular techniques (PCR, PCR/ARMS, sequencing), 14 different mutations have been identified.

In the second part of this thesis we focused on three mutations that appear from the literature specific to the Algerian population: c.680T>G (L227R) c.3907A>C (N1303H) and c.422C>A (A141D). The deleterious effects of these mutations were studied using a combination of software *in silico* and three-dimensional molecular modeling (3D).

The mutation c.680T>G (L227R) was predicted to alter the hydrophobic relationships at the core of the protein or with lipids (helices) forming the membrane.

On the other hand, the c.3907A>C (N1303H) was predicted as deleterious altering the structure and function of the CFTR channel, the physicochemical changes between the native and mutated amino acids greatly disturb the stability of the protein. Finally, the mutation c.422C>A (A141D) is predicted deleterious and seems to disturb ionic interactions and the interactions among different segments forming the pore of the CFTR channel.

The results obtained at the end of this work would aim to contribute in the medium term the establishment of a "genetic diagnosis" program and the provision of genetic counseling for families at risk. In the long term, these results could help a better understanding of molecular mechanisms underlying this disease.

The results obtained at the end of this work would aim to contribute in the medium term the establishment of a "genetic diagnosis" program and the provision of genetic counseling for families at risk. In the long term, these results could help a better understanding of molecular mechanisms underlying this disease.

Key words: Cystic fibrosis, *CFTR* gene, mutations, PCR, PCR/ARMS, sequencing, *in silico* study.

الملخص

تعتبر الليفية الكيسية المرض الوراثي المنتحي الأكثر انتشارا عند السكان ذوي الأصل القوقازي . هذا المرض ينتج عن أخطاء في المورثة CFTR.

أين الطفرات المتعددة المعروفة تأخذ بالحسبان جزئيا التقلب النمط الظاهري الكبير.

بعيدا أن تكون حالة مرضية أوربية الليفية الكيسية حاضرة في الجزائر.

في الوقت الذي تطورت فيه العلاجات المستهدفة وفقا للطفرات الوراثية المحمولة من طرف المرضى فان تمييز هذه الطفرات يعتبر اكثر من ضروري.

الجزء الأول من هذا العمل يتركز على البحث على الأخطاء الموجودة في المورثة CFTR المسؤولة عن الليفية الكيسية لدا عينة مكونة من 24 مريضا ينتمون إلى 24 عائلة لا يوجد بينها علاقة قرابة. تم البحث عن الطفرات بواسطة تقنيات البيولوجيا الجزيئية .

تم تحديد 14 طفرة وراثية مختلفة .

في الجزء الثاني من الأطروحة ركزنا على دراسة 3 طفرات و التي من كتابتها تبدوا خاصة بسكان الجزائر (L227R)

c.680T>G , c.3907C<A (N1303H) و c.422A<C (A141D).

تم دراسة الأعراض الضارة لهذه الطفرات الوراثية من خلال الجمع بين البرامج البيومعلوماتية و التصميم جزيئي ثلاثي الأبعاد.

تنبأت الطفرة c.680T>G (L227R) كمغيرة العلاقات الكارهة للماء على مستوى البروتين ذاته أو مع الدهون المكونة للغشاء.

و من جهة أخرى الطفرة c.3907A>C (N1303H) تنبأت كضارة مغيرة للبنية و وظيفة قناة CFTR.

التغيرات الفيزيو كيميائية بين الأحماض الأمينية الأصلية و المتحورة تعطل بشدة استقرار البروتين.

أخيرا الطفرة c.422C>A (A141D) تنبأت كمضرة و تبدوا معطلة للتفاعلات الأيونية و أيضا للتفاعلات داخل مختلف المقاطع المكونة لمسام قناة CFTR.

النتائج المحصل عليها بعد هذا العمل يمكن أن تساهم على المدى المتوسط في وضع برنامج "تشخيص وراثي" و تسمح بتقديم "الاستشارة الوراثية" للعائلات المعرضة للإصابة بهذا المرض.

على المدى الطويل يمكن لهذه النتائج أن تساعد على فهم أفضل للآليات الجزيئية المسؤولة عن هذه الحالة المرضية.

الكلمات المفتاحية: الليفية الكيسية , المورثة CFTR , الطفرات , PCR , PCR /ARMS , التسلسل, الدراسة

البيومعلوماتية.

Production scientifique

Ce travail de thèse a fait l'objet d'une publication et des communications suivantes :

Publications

- **SEDIKI FZ.**, RADOUI A., CABET F., ZEMANI-FODIL F., SAIDI-MEHTAR N., BOUDJEMA A. *Detection of CFTR mutations using PCR/ARMS in a sample of Algerian population.* Ann Biol Clin 2014; 72 (5): 549-54.
- **SEDIKI FZ.**, RADOUI A., BOUDJEMA A., ABDI M., ZEMANI-FODIL F., SAIDI-MEHTAR N., CABET F. *Spectrum of CFTR mutations in the Algerian population: Molecular and computational analysis.* ARTICLE SOUMIS AU JOURNAL OF APPLIED GENETICS.

Communications

Affichées

- **SEDIKI FZ.**, RADOUI A., CABET F., ZEMANI-FODIL F., FODIL M., SAIDI-MEHTAR N., BOUDJEMA A. «*Etude génétique de la mucoviscidose dans la population Algérienne*». Premières journées de Génétique Moléculaire Appliquée à Oran les 4 et 5 Décembre 2011.
- **SEDIKI FZ.**, RADOUI A., CABET F., ZEMANI-FODIL F., SAIDI-MEHTAR N., BOUDJEMA A. *Is Elucigene CF30 Kit effective in detecting CFTR mutations on Algerian patients?* European Journal of Human Genetics (ESGH) May 2014 Milan Italy.Vol.22 Supplement 1.

Table des matières

Liste des figures	I
Liste des tableaux	II
Liste des annexes	III
Liste des abréviations	IV
Avant propos	2
Revue Bibliographique	5
I. La mucoviscidose	5
1. Introduction et historique	5
2. Epidémiologie	6
3. Physiopathologie de la mucoviscidose	8
4. Manifestations cliniques	8
4.1. Manifestations pulmonaires	8
4.2. Manifestations digestives	9
4.3. Manifestations génitales	9
4.4. Manifestations endocrines	10
4.5. Manifestations musculo-squelettiques	10
II. Génétique de la mucoviscidose	11
1. Structure du gène <i>CFTR</i>	11
2. La protéine CFTR	12
3. Les différentes classes de mutations	15
3.1. Classification de Welsh et Smith	15
3.1.1. Classe I: Défaut de production de la protéine	15
3.1.2. Classe II: Défaut de maturation	15
3.1.3. Classe III: Mutations perturbant la régulation du canal Cl ⁻	15
3.1.4. Classe IV: Mutations altérant la conductance du canal Cl ⁻	15
3.2. Nouvelle classification (Vankeerberghen et al, 2002)	16
3.2.2. Classe V (classe I redéfinie): Mutations altérant la stabilité de l'ARNm	16
3.2.3. Classe VI: Mutations affectant la stabilité de la protéine	16
4. Fonction de la protéine CFTR	17
4.1. CFTR, un canal Cl ⁻	17

4.2. Régulateur du fonctionnement d'autres canaux ioniques	19
4.3. Autres fonctions	20
5. Corrélation génotype-phénotype	20
5.1. Influence des facteurs hétéroalléliques du gène <i>CFTR</i>	21
5.2. Gènes modificateurs dans la mucoviscidose	22
5.2.1. Gènes associés à la défense antimicrobienne	23
5.2.2. Gènes associés à la réponse immuno-inflammatoire	24
III. Diagnostic et dépistage de la mucoviscidose	27
1. Diagnostic	27
1.1. Test de sueur (iontophorèse à la pilocarpine)	27
1.2. Différence de potentiel trans-épithéliale nasale	28
1.3. Dosage de la trypsine (dépistage néonatal)	28
1.4. Analyse moléculaire du gène <i>CFTR</i>	29
VI. Traitement	30
1. Prise en charge de l'atteinte digestive	30
2. Prise en charge de l'atteinte pulmonaire	30
3. Anti-inflammatoires	31
4. Les nouvelles thérapies	32
V. Place du conseil génétique	34
1. Prise en charge des couples à risque de $\frac{1}{4}$	34
2. Prise en charge des couples à risque de $\frac{1}{2}$	35
IV. Etude <i>in silico</i> des effets délétères des mutations	36
1. Analyse de mutations exoniques	36
1.1. Prédiction des effets délétères des mutations exoniques sur la protéine CFTR par Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT)	36
1.2. Prédiction des effets des mutations par Polymorphism Phenotyping-2 (PolyPhen- 2)	37
1.3. Prédiction des effets des mutations par Align Grantham Variation Grantham Deviation (Align-GVGD)	38
1.4. Prédiction de l'effet des mutations sur la stabilité de la protéine par le logiciel I- Mutant 2.0	39
1.5. Evaluation du potentiel pathogène des mutations par Mutation Taster	40
2. Modélisation de la protéine mutée en 3D par logiciel Swiss-Pdb Viewer	41

Objectifs du travail de thèse	42
Population d'étude & méthodes	44
I. Population de l'étude	44
II. Méthodes	44
1. Méthodes d'exploration génétique	44
1.1. Extraction et dosage de l'ADN	45
1.2. Première approche : Détection de la mutation c.1521_1523delCTT (F508del)	45
1.3. Deuxième approche : Recherche des 30 mutations <i>CFTR</i> par PCR/ARMS	49
1.4. Troisième approche : Analyse des séquences (séquençage)	53
2. Analyse bioinformatique	56
2.1. Analyse des séquences par Sequence Scanner Software 2	56
2.2. Analyse des séquences par MultAlin	57
Résultats	60
I. Détection des mutations <i>CFTR</i> par PCR/ARMS dans un échantillon de la population Algérienne	60
1. Introduction	60
2. Résultats	60
II. Etude du spectre mutationnel du gène <i>CFTR</i> dans la population Algérienne: Etude moléculaire et analyse <i>in silico</i>	70
1. Introduction	70
2. Résultats	70
III. Prédiction <i>in silico</i> des effets délétères des mutations c.3907A>C (N1303H) et c.422C>A (A141D)	88
1. Introduction	88
2. Résultats	88
2.1 Résultats de l'analyse des mutations par le logiciel SIFT	88
2.2. Résultats de l'analyse des mutations par le logiciel PolyPhen-2	89
2.3 Résultats de l'analyse de la mutation par le logiciel Align-GVGD	90
2.4. Résultats de l'analyse de la stabilité de la protéine par le logiciel I-Mutant2.0	91
2.5. Résultats de l'analyse de la pathogénicité des mutations par le logiciel Mutation Taster	92
3. Construction des structures 3D par le logiciel Swiss PDB Viewer	93
3.1. Paramètres analysés pour la prédiction des effets délétères des mutations	94
3.1.1. Comparaison des changements structuraux de la protéine <i>CFTR</i>	94

3.1.2. Comparaison des propriétés physicochimiques entre acides aminés natifs et mutés	95
Discussion générale	97
I. Détection des mutations <i>CFTR</i> par PCR/ARMS dans un échantillon de la population Algérienne	98
II. Etude du spectre mutationnel du gène <i>CFTR</i> dans la population Algérienne: Etude moléculaire et analyse <i>in silico</i>	100
III. Prédiction <i>in silico</i> des effets délétères des mutations c.3907A>C (N1303H) et c.422C>A (A141D)	105
Conclusion et perspectives	108
Annexes	111
Références Bibliographique	133

Liste des figures

Figure 1 : Historique des événements marquants dans la découverte de la mucoviscidose	6
Figure 2 : Prévalence approximative de la mucoviscidose dans certains pays.....	7
Figure 3 : Les différents organes classiquement touchés par la mucoviscidose.....	8
Figure 4 : Schéma représentant l'organisation du gène CFTR.....	11
Figure 5 : Distribution des mutations tous au long du gène CFTR. (www.genet.sickkids.on.ca/cfr/app).....	12
Figure 6 : Schéma de la topologie membranaire du canal CFTR. Adapté d'après (Klein et al, 1999).	13
Figure 7 : Les différentes classes de mutations <i>CFTR</i>	17
Figure 8 : Représentation schématique du transport des ions Cl ⁻ dans les cellules épithéliales adaptée d'après (McCann & Welsh, 1990).....	18
Figure 9 : Régulation du canal CFTR d'après (Chen et al, 2006).....	19
Figure 10 : Représentation d'un couple à risque de ¼.	34
Figure 11 : Représentation d'un couple à risque de ½.	35
Figure 12 : Interface du logiciel SIFT (http://sift.jcvi.org/)	36
Figure 13 : Interface du logiciel Poly Phen-2 (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/)	38
Figure 14 : Interface du logiciel Align-GVGD (http://agvgd.iarc.fr/).....	39
Figure 15 : Interface du logiciel I-Mutant2.0.....	40
Figure 16 : Interface du logiciel Mutation Taster.....	40
Figure 17 : Barre de menu du logiciel Swiss PDB Viewer.	41
Figure 18 : Séquence d'ADN avec amorces encadrant la région d'intérêt (la position 508).	45
Figure 19 : Photo de la cuve d'électrophorèse (<i>Laboratoire LGMC-USTO-MB</i>).....	48
Figure 20 : Diagramme d'interprétation des résultats du Kit ELUCIGENE™ CF30.....	53
Figure 21 : Interface du logiciel Sequence Scanner Software 2.....	57
Figure 22 : Interface du logiciel <i>MultAlin</i>	57
Figure 23 : Exemple de résultat de l'analyse de la mutation c.3907A>C (N1303H) par le logiciel SIFT.....	88
Figure 24 : Résultats de l'analyse de la mutation c.3907A>C (N1303H) par le logiciel PolyPhen-2. .	90
Figure 25 : Résultats de l'analyse de la mutation c.422C>A (A141D) par le logiciel PolyPhen-2.	90
Figure 26 : Exemple de résultat obtenu par le logiciel Align-GVGD.....	91
Figure 27 : Exemple de résultat obtenu par le logiciel I-Mutant2.0.....	92
Figure 28 : Exemple de résultat obtenu par le logiciel MutationTaster.	93
Figure 29 : Modèle de structure 3D proposé (Serohijos et al, 2008).....	93
Figure 30 : Structure 3D des deux protéines CFTR normal (A) et mutée c.3907A>C (N1303H).....	94
Figure 31 : Structure 3D des deux protéines CFTR normal (A) et mutée c. 422A>C (A141D) (B).....	94
Figure 32 : Structure l'asparagine et de l'histidine	95
Figure 33 : Structure de l'alanine et de l'acide aspartique.	96

Liste des tableaux

Tableau I: Séquences des amorces encadrant la mutation c.1521-1523delCTT (F508del) ...	46
Tableau II: Programme de la PCR.....	46
Tableau III: Programme de formation des hétéroduplexes	47
Tableau IV: Programme de la PCR/ARMS	50
Tableau V : Oligonucléotides utilisés pour l'amplification des exons du gène <i>CFTR</i> par PCR.	54
Tableau VI: Résultats des mutations <i>CFTR</i> retrouvées dans un échantillon de 24 familles Algérienne.	61
Tableau VII: Résultats des mutations identifiés dans un échantillon de 24 patients (48 chromosomes)	63
Tableau VIII: Comparaison des résultats obtenus dans notre étude avec ceux d'autres équipes de recherche.	63
Tableau IX: Mutations détectées chez 21 patients mucoviscidosiques Algériens (N=42 CF chromosomes)	71
Tableau X: Propriétés physico-chimiques des acides aminés colorés utilisés dans les résultats du logiciel SIFT.....	89
Tableau XI: Résultats obtenus par le logiciel SIFT.....	89
Tableau XII: Propriétés physicochimiques des deux acides aminés asparagines et histidine.	96
Tableau XIII: Propriétés physicochimiques des deux acides aminés alanine et acide aspartique.	96

Liste des annexes

Annexe 1 : Notice d'informations et formulaire de consentement pour un prélèvement biologique dans le but d'une étude génétique et / ou de conservation dans une banque d'ADN	111
Annexe 2 : Etude génétique de la mucoviscidose dans la population Algérienne	116
Annexe 3 : Arbres généalogiques	119
Annexe 4 : Protocole d'extraction d'ADN à partir du sang total par la technique NaCl « Salting- Out »	127
Annexe 5 : Protocole d'amplification des exons <i>CFTR</i>	129
Annexe 6 : Tableau résumant les codes, les masses molaires, nombre d'atomes, degré d'hydrophobicité des acides aminés.	131
Annexe 7 : Tableau récapitulatif des propriétés des acides aminés.....	133

Liste des abréviations

A: Adénine

Å³: Angström³

ABC: ATP Binding Cassettes

ABCD : Absence Bilatérale des Canaux Déférents

ACE: Angiotensin I Converting Enzyme

ADN: Acide DésoxyriboNucléique

ADNc: Acide DésoxyriboNucléique complémentaire

ADP: Adénosine DiPhosphate

AINS: Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens

AMP: Adénosine MonoPhosphate

AMPc: Adénosine MonoPhosphate cyclique

ARN: Acide RiboNucléique

ARNm: Acide RiboNucléique messenger

ARMS: Amplification Refractory Mutation System

ATP: Adénosine TriPhosphate

AUCD : Absence Unilatérale des Canaux Déférents

Bases puriques: A: Adénine – G : Guanine

Bases pyrimidiques: C: Cytosine – T: Tyrosine – U: Uracile

BBS: Bleu de Bromophénol Sucrose

BDT: Big Dye Terminators

BET: Bromure d'Ethidium

BLOSUM 62: BLOck SUbstitution Matrix 62.

C: Cytosine

C°: Degré Celsius

CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator

Cl-: Ion Chlorure

3D: 3 Dimensions

dNTP: Désoxynucléotides TriPhosphate

ddNTP: Didesoxyribonucléotides

Da: Dalton

DDG: Différence d'énergie libre

DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

DHPLC: Denaturing High Performance Liquid Chromatography

DO: Densité Optique

ECBC: Examen cyto bactériologique des crachats

EDTA: acide Ethylène-Diamino-Tétra-Acétique

EHS: Etablissement Hospitalier Spécialisé

FDA: Food and Drug Administration

G: Guanine

HCl: Acide Chlorhydrique

H₂O: Eau

HGVS: Human Genome Variation Society

HLA: Human Leucocyte Antigen

IgE: Immunoglobuline Classe E

IL10: Interleukine 10

IPE: Insuffisance pancréatique exocrine

Kb: Kilobase

ng: Nano-gramme

µl: Microlitre

M: Mole

MBL: Mannose Binding Lectine

MgCl₂: Chlorure de Magnésium

min: Minute

ml: Millilitre

MLPA: Multiplex Ligation Probe Amplification

mM: MilliMole

NOs:

NBD: Nucleotides Binding Domains

ORCC: Outwardly Rectifying Chloride Channel

p: Bras court du chromosome

pb: Paire de base

PCR: Polymerase Chain Reaction

PCR/ARMS: Polymerase Chain Reaction/ Amplification Refractory Mutation System

PDB: Protein Data Bank

PKA: Protéine Kinases A

PKC: Protéine Kinases C

pH: Potentiel Hydrogène

pM: Pico Mole
PolyPhen-2: Polymorphism Phenotyping-2
PSA: Persulfate d'Ammonium
R: Domaine Régulateur
sec: secondes
SIFT: Sorting Intolerant From Tolerant
SNP: Single Nucleotide Polymorphism
SVM: Support Vector Machine
T: Thymine
Taq: Thermophilus aquaticus
TBE: Tris Borate EDTA
TEMED: Tetra-Methyl-Ethylene-Diamine
TGF- β : Transforming Growth Factor- β
TIR: Trypsine Immunoréactive
TMD: Transmembrane Domain
TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α
Tp: Tampon
Tris: Trishydroxyméthylaminométhane
U: Unité
U/ μ l: Unité par microlitre
UV: Ultraviolet
V: Volt
VEMS: Volume expiratoire maximal par seconde

Nomenclature :

- Les gènes sont indiqués en italique.
- Les protéines produites par ces gènes sont indiquées en lettres droites.
- Les mutations sont écrites par référence à l'ADNc conformément aux nouvelles recommandations de la Human Genome Variation Society (*HGVS*), l'ancienne nomenclature est notée entre parenthèses pour éviter toutes confusions. La description commence par la lettre c pour ADNc, le symbole > signifie substitué en.

Avant propos

La mucoviscidose est la maladie héréditaire autosomique grave la plus fréquente dans la population d'origine européenne. Elle est causée par des mutations du gène CFTR qui code pour un canal perméable aux ions chlorures exprimé à la membrane apicale des cellules des épithéliums sécrétoires. Ce profil d'expression explique la symptomatologie pluri-organes causée par les troubles de l'homéostasie ionique des sécrétions, incluant une atteinte respiratoire, une atteinte digestive, une atteinte génitale et des anomalies de la réabsorption ionique dans les glandes sudoripares.

A ce jour, plus de 1900 variations du gène CFTR ont été décrites et cette variabilité génotypique explique en partie la grande variabilité phénotypique, allant des formes sévères multisystémiques aux formes modérées, voire mono-symptomatiques, selon le taux de fonction résiduelle du canal CFTR. Le facteur majeur de mortalité dans la mucoviscidose est l'atteinte pulmonaire, caractérisée par un cercle vicieux associant un syndrome obstructif, un syndrome inflammatoire persistant et des infections respiratoires chroniques.

Considérée à tort comme une pathologie européenne, la mucoviscidose est retrouvée dans la population Maghrébine. Des travaux menés par Messaoud T et al en 2005 en Tunisie et Ratbi I et al, 2008 au Maroc, ainsi que Loumi O et al, 2008 en Algérie, confirment la présence de cette maladie dans ces populations respectives.

Les données de la littérature sur le profil clinique de la mucoviscidose et sur le spectre des mutations du gène CFTR en Algérie sont pauvres en raison d'un manque d'études.

À travers ce travail, nous venons contribuer au diagnostic génotypique afin d'enrichir davantage les quelques rares études existantes concernant notre population. Au cours de cette thèse, deux principaux axes de recherches ont été développés.

Dans le premier axe, nous avons caractérisé les mutations du gène CFTR responsables de la mucoviscidose dans un échantillon de patient de la population Algérienne.

A la suite des résultats obtenus, un second axe a été développé.

Dans cet axe, nous avons procédé à une analyse complète du gène CFTR par un balayage (screening) de tous les exons et introns. Suite à ce balayage et en nous référant aux données de la littérature, les mutations semblant spécifiques à la population Algérienne sont analysées afin de prédire leurs éventuels effets délétères en utilisant différents logiciels d'étude *in silico* et de modélisation moléculaire en trois dimensions (3D).

Ce mémoire de thèse est organisé en cinq parties :

La première partie est dédiée à la revue bibliographique et regroupe les connaissances actuelles sur la mucoviscidose. Les méthodes utilisées dans cette étude sont détaillées dans la partie population et méthodes.

Les résultats obtenus lors de cette étude sont présentés sous forme de deux publications complétées par des résultats non publiés. Une introduction au contexte de l'étude et un résumé des principaux résultats précèdent chaque article. Une discussion générale des résultats obtenus suit la partie résultats. Cette thèse est terminée par une conclusion générale et des perspectives.

Revue
Bibliographique

I. La mucoviscidose

1. Introduction et historique

La mucoviscidose ou fibrose kystique du pancréas [MIM#219700], est la maladie génétique récessive autosomique la plus fréquente dans les populations d'origine Caucasienne (Girodon-Boulandet & Costa, 2005). Cette pathologie est due à l'altération du gène *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) [MIM#602421] qui code pour un canal à chlorures essentiel pour le transport des ions et le maintien de l'homéostasie des cellules épithéliales. L'altération ou la perte de fonction de ce canal entraîne un déséquilibre des échanges ioniques se traduisant en une déshydratation des sécrétions muqueuses de nombreux organes.

L'incidence de cette pathologie varie selon la localisation géographique et l'appartenance ethnique. Elle touche en Europe une naissance sur 3000 (Munck et al, 2006). En France, l'incidence moyenne de la maladie est de 1/4200, cependant avec une variation d'incidence entre le nord-ouest (1/2500), et le sud-est (1/10000) est notée (Girodon-Boulandet & Costa, 2005).

Elle est connue depuis le moyen âge (maladie du baiser salé), à cette époque on disait que les enfants aux baisers salés étaient ensorcelés et mouraient « Malheur à l'enfant qui laisse un goût salé lorsqu'on l'embrasse sur le front, on lui a jeté un sort et il en mourra bientôt » (dicton d'Europe).

La première description médicale remonte à 1595 lorsque Pieter Paw, professeur d'anatomie et de botanique à Leiden déclare après avoir réalisé une autopsie sur le corps d'une fillette qu'on disait ensorcelé, décharné et épuisée par une fièvre prolongée que la cause du décès est l'atteinte du pancréas « particulièrement tuméfié, durci, brillant et blanc... de sorte qu'on aurait pu croire, au toucher, qu'il s'agissait d'un squirre (cancer) » (Busch, 1990).

C'est en 1936 que le Dr Guido Fanconi, un pédiatre suisse, décrit la mucoviscidose chez des enfants supposés atteints de maladie cœliaque et la nomme fibrose kystique du pancréas (Fanconi et al, 1936). Deux ans plus tard, le Dr Dorothy Hansine Andersen considère la maladie comme une entité à part entière (Andersen, 1938). Le terme « mucoviscidose » fut utilisé pour la première fois par le Dr Sydney Farber en 1943 (Farber, 1945).

Etymologiquement, le mot « mucoviscidose » est formé de « Muco » qui veut dire mucus ou glaire et « Visci » qui veut dire visqueux (Fanconi et al, 1936).

En 1948 et lors d'une vague de chaleur, le pédiatre New Yorkais Paul Di Sant'Agnesse découvrit que la plupart des enfants souffrant d'insolation étaient atteints de mucoviscidose. Il comprit que la composition de leur sueur est anormale, et il est parvenu à le démontrer quelques années plus tard. Effectivement, les patients souffrant de mucoviscidose présentaient un excès de sodium de chlore dans la sueur allant à une concentration cinq fois plus importante que celle présente chez les personnes saines (Di Sant'Agnesse et al, 1953).

En 1949, Lowe et collaborateurs ont émis que la maladie devrait être causée par un gène défectueux (Lowe et al, 1949). Ce n'est qu'en 1989 et après des études menées sur les conduits sudoripares que Paul Quinton identifie un transporteur au chlore comme étant la cause de la pathologie (Quinton, 1983). Un peu plus tard, et grâce au clonage du gène responsable de la mucoviscidose et la découverte des mutations de ce gène l'hypothèse du caractère monogénique est confirmée. Les principaux faits marquants sont représentés dans la Figure 1.

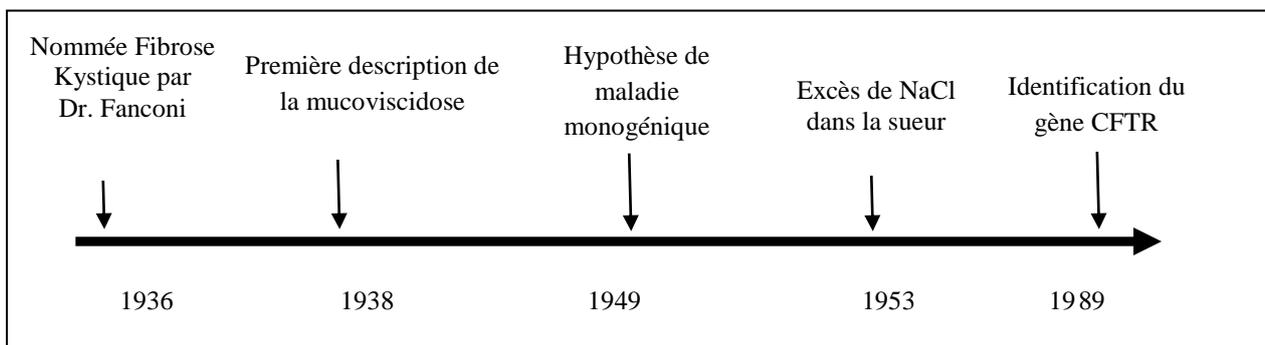


Figure 1 : Historique des événements marquants dans la découverte de la mucoviscidose.

2. Epidémiologie

Pour les populations d'origine caucasienne, l'incidence est d'une naissance sur 3 000, avec cependant des différences locales. Elle est d'environ 1/4136 en France, avec de grandes variations régionales (allant de 1/2913 en Bretagne à 1/7077 en Midi-Pyrénées) (Munck & Roussey, 2008); (Scotet et al, 2010) et la fréquence des hétérozygotes est évaluée à 1/32 en moyenne (Munck & Roussey, 2008). La maladie est beaucoup plus rare dans les populations d'Asie ou d'Afrique noire (Figure 2).

En revanche, il n'existe pas de chiffre précis concernant la prévalence au Maghreb. Les quelques études réalisées sur la population Algérienne ont démontré des mutations rencontrées en Europe telles que la c.1521_1523delCTT(F508del), c.1624G>T (G542X) et c.3909C>G (N1303K), mais avec des fréquences différentes. Cependant des mutations sont plus spécifiques à cette population c.680T>G (L227R) et c.3907A>C (N1303H) c.422C>A (A141D) (Zielenski et al, 1991) ; (Gouya et al, 1997).

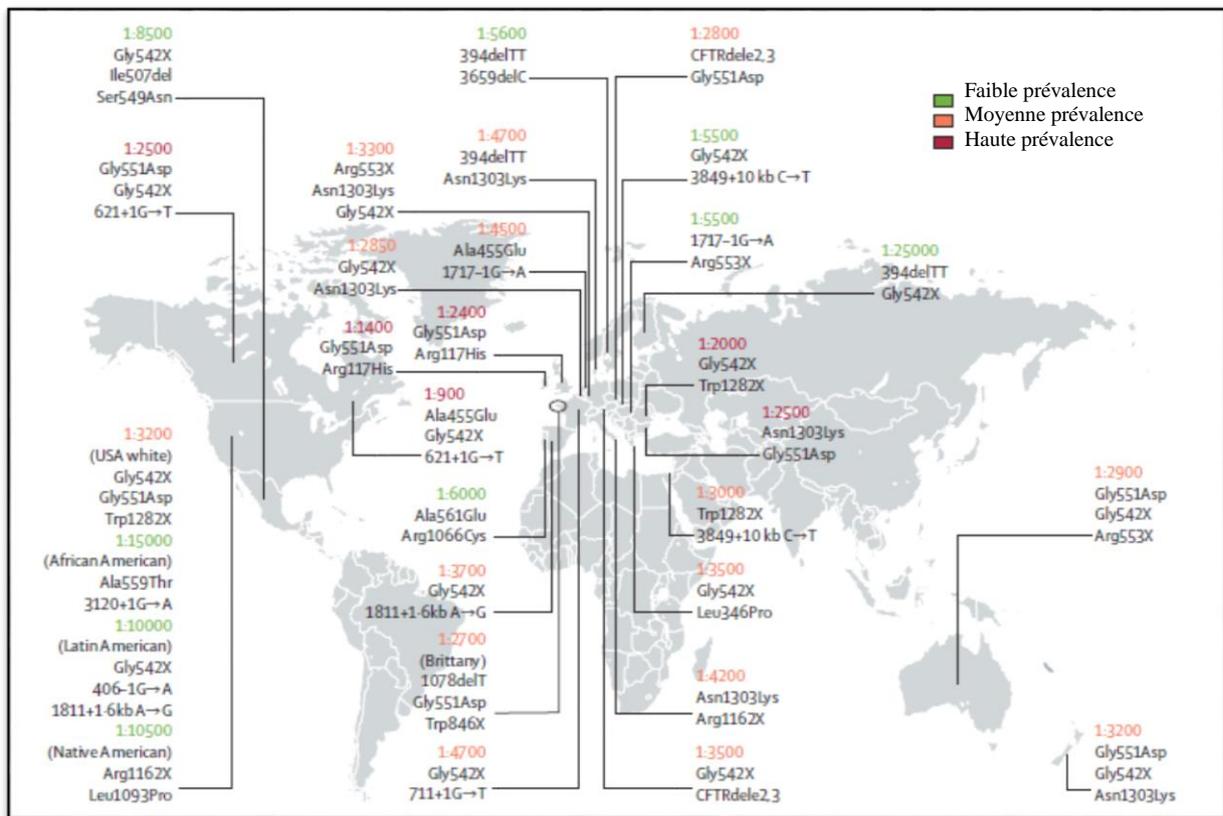


Figure 2: Prévalence approximative de la mucoviscidose dans certains pays

(O'Sullivan & D Freedman, 2009).

3. Physiopathologie de la mucoviscidose

La mucoviscidose est une maladie à atteinte polyviscérale touchant les organes possédant un épithélium à savoir, la peau, le système digestif, le système respiratoire et l'appareil reproducteur (Figure 3).

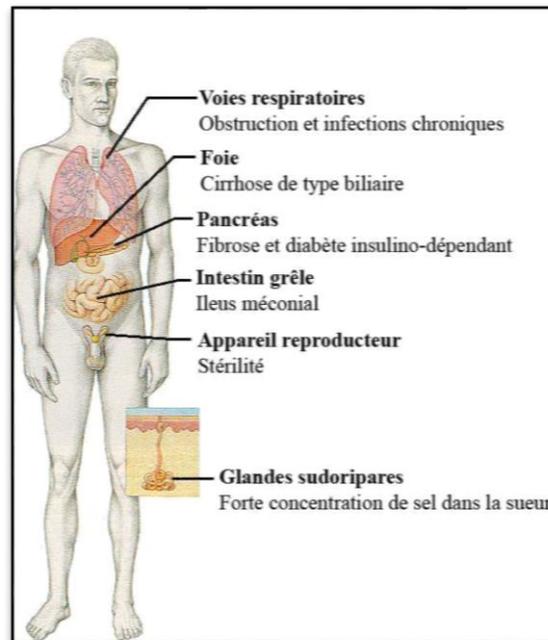


Figure 3: Les différents organes classiquement touchés par la mucoviscidose.

Adaptée d'après (Welsh & Smith, 1995).

4. Manifestations cliniques

Dans sa forme classique et sévère, la mucoviscidose associe des signes respiratoires et digestifs. Il existe néanmoins une grande variabilité phénotypique, en termes d'organes atteints et de sévérité. La sévérité des manifestations cliniques varie selon les mutations du gène *CFTR*, mais aussi selon des facteurs génétiques et environnementaux (De Braekeleer et al, 1997); (Goss et al, 2004a).

4.1. Manifestations pulmonaires

Les atteintes pulmonaires sont la principale cause de mortalité. Le mucus anormalement visqueux, obstrue les voies respiratoires et favorise la colonisation et l'infection par des germes spécifiques (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Stenotrophomonas maltophilia*) qui sont le plus souvent retrouvés (Ratjen & Döring, 2003).

La colonisation chronique par *Pseudomonas aeruginosa* est associée à un déclin beaucoup plus rapide des fonctions respiratoires entraînant une diminution de l'espérance de vie (Starner & McCray, 2005).

4.2. Manifestations digestives

L'iléus méconial, qui est une forme d'obstruction intestinale partielle ou complète résultant de sécrétions intestinales visqueuses, est le premier signe de l'atteinte digestive observé chez 10 à 15% des patients à la naissance (Munck & Roussey, 2008); Registre, 2007; (Scotet et al, 2010), il est souvent signe d'une insuffisance pancréatique exocrine ; en revanche il n'est pas corrélé à la sévérité de la maladie (Munck et al, 2006). L'atteinte digestive se traduit principalement par une atteinte pancréatique et une atteinte hépatobiliaire. On observe une insuffisance pancréatique exocrine à la naissance chez 85 à 90% des patients avec une forme sévère de mucoviscidose. Si la fonction pancréatique à la naissance est conservée chez 10 à 15% des malades, leur risque de pancréatite est accru, et une faible proportion d'entre eux (environ <5%) évolue vers une insuffisance pancréatique (Cutting, 2005). L'insuffisance pancréatique exocrine se traduit par l'émission de diarrhées graisseuses. De plus, on observe chez 20 à 50% des adolescents et des adultes atteints une destruction progressive des îlots de Langerhans. Ceci entraîne une insuffisance pancréatique endocrine et un diabète, avec une diminution et un retard à la sécrétion d'insuline associé à une insulino-résistance (Moran et al, 2010) ; (Ratjen & Döring, 2003).

En revanche, la viscosité de la bile induit l'obstruction des canaux hépatiques et empêche son évacuation vers la vésicule biliaire. L'ensemble de ces troubles digestifs, à l'origine d'une malabsorption des nutriments (protéines, lipides, vitamines liposolubles), participe à la malnutrition et au retard de croissance staturo-pondérale généralement observé chez les patients (Ratjen & Döring, 2003).

4.3. Manifestations génitales

On estime que 98% des hommes atteints de mucoviscidose sont infertiles, en raison d'une azoospermie secondaire à une atrésie ou une absence des canaux déférents et une absence ou une dilatation des vésicules séminales. On parle d'absence uni ou bilatérale des canaux déférents (AUCD ou ABCD) (Oppenheimer & Esterly, 1969). Les femmes peuvent présenter une diminution de la fertilité (hypofertilité) par épaissement du mucus cervical (Oppenheimer et al, 1970) ; (Radpour et al, 2008). Par ailleurs, un retard de puberté est observé chez ces sujets, responsable de la perte de fertilité ; ce dernier serait le résultat d'un

dérèglement hormonal touchant le système hormonal sexuel (Weyler et al, 1999). Les travaux de Weyler et al, ont démontré que la protéine CFTR régule la sécrétion de la gonadolibérine au niveau de l'hypothalamus, cette dernière régule elle-même une voie de signalisation aboutissant au contrôle de la sécrétion des hormones sexuelles (Weyler et al, 1999).

4.4. Manifestations endocrines

Un diabète insulino-dépendant est diagnostiqué chez des malades âgés de 11 à 17 ans. Il est dû à la fibrose du pancréas qui provoque sa destruction, incluant les cellules β productrices d'insuline dans les îlots de Langerhans (Hardin et al, 1997). 20% des malades mucoviscidosiques atteints d'un diabète insulino-dépendant présentent des complications microvasculaires, à savoir des rétinopathies, neuropathies et néphropathies (Andersen et al, 2006);(Schwarzenberg et al, 2007); (van den Berg et al, 2008).

4.5. Manifestations musculo-squelettiques

L'hippocratismes digital, une déformation des doigts et des ongles due, entre autre, à des maladies respiratoires chroniques, peut être rencontré chez les personnes atteintes de mucoviscidose (Braude et al, 1984). Environ 15% des patients peuvent développer une ostéoarthropathie hypertrophique impliquant la partie distale du fémur, du tibia, du péroné, du radius et de l'humérus (Cohen et al, 1986). On estime que 23,5% des adultes mucoviscidosiques souffrent d'ostéoporose, et 40% d'ostéopénie (Neri et al, 2006) ; (Paccou et al, 2010).

Les principales causes liées à cette perte de densité sont une carence en vitamine D (Javier & Jacquot, 2011), un diabète insulino-dépendant, une masse corporelle faible et une post-transplantation pulmonaire (Robertson & Macdonald, 2010).

Enfin, d'autres signes plus rares et moins spécifiques sont parfois observés, comme une myocardite non obstructive, peuvent survenir dès l'enfance. Chacun des symptômes cliniques respiratoires, digestifs ou génitaux peut être signe d'appel de la maladie et faire évoquer le diagnostic de mucoviscidose, confirmé par un test de la sueur et une étude génétique.

- 1,98% insertion/délétion décalant le cadre de lecture.
- 2,60% de larges insertions/délétions.
- 0.76% mutations au niveau du promoteur.
- 13,69% variations de séquences.
- 5,29% inconnus.

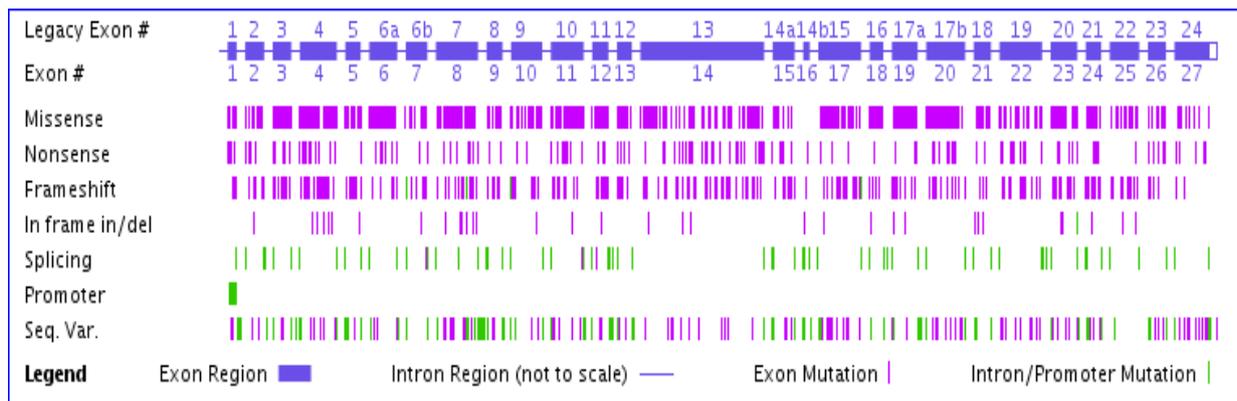


Figure 5 : Distribution des mutations tous au long du gène CFTR.
(www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app).

2. La protéine CFTR

La protéine CFTR est une glycoprotéine membranaire appartenant à la famille des transporteurs ABC « *ATP binding cassette* » (protéines ubiquitaires présentes aussi bien chez l'homme que chez les procaryotes ; elles ont pour fonction de transporter à travers la membrane ; et grâce à la fixation et l'hydrolyse de l'ATP ; diverses molécules telles que des protéines, des lipides, des sucres, des ions, des antibiotiques ou des drogues...) (Higgins & Linton, 2004) ;(Gadsby et al, 2006).

Chez l'homme la protéine CFTR est classée dans la sous classe ABCC et porte le nom de ABCC7 (Frelet & Klein, 2006).

Seule une structure cristallographique de CFTR à basse résolution est connue (Rosenberg et al, 2004). Cependant, une structure prédite a pu être déterminée à partir de la structure primaire. CFTR étant une protéine de grande taille (170 kDa), il s'avère difficile d'appliquer les techniques de modélisation moléculaire expérimentale afin d'obtenir un modèle de haute résolution. Les techniques d'alignement de séquences et de modélisation comparative ont donc été, et sont toujours, largement utilisées pour élucider la structure 3D de la protéine.

Ainsi la protéine CFTR a plusieurs domaines (Figure 6) :

Deux domaines transmembranaires hydrophobes TMD (*Transmembrane Domain*) notés TMD1 et TMD2, composés chacun de six segments (Riordan et al, 1989a) organisés en hélices α . Elle est composée également de deux domaines cytoplasmiques NBD (*Nucleotide Binding Domain*) qui fixent l'ATP (*Adénosine Triphosphate*) notés NBD1 et NBD2 reliés entre eux par un domaine régulateur « R » intra- cytoplasmique possédant un grand nombre de sites de phosphorylation, cibles de la protéine kinase (PKA, PKC).

Le domaine R est un domaine spécifique de la protéine CFTR. En effet, ce domaine n'est retrouvé dans aucun autre transporteur de la famille ABC.

Les régions C et N terminales de la protéine se situent dans le cytoplasme. D'après le profil hydrophobicité 80% des acides aminés de la protéine sont cytoplasmiques, 16% sont transmembranaires et 4% sont extracellulaires (Akabas et al, 1997).

Malgré la présence de certaines structures CFTR déterminées à faible résolution (2D) ; la structure prédite en 1989 reste la plus utilisée et la plus admise pour l'interprétation de certains résultats biochimiques et fonctionnels.

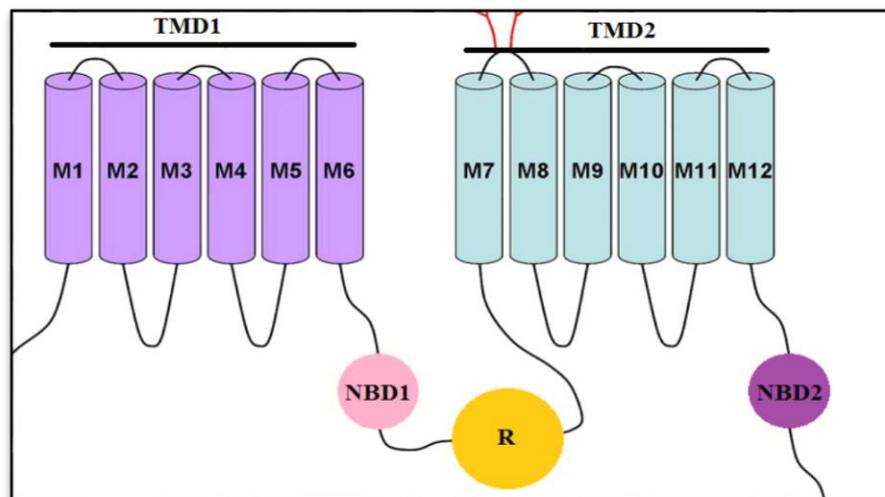


Figure 6 : Schéma de la topologie membranaire du canal CFTR. Adapté d'après (Klein et al, 1999).

Les parties  et  correspondent respectivement au Transmembrane Domain (TMD1 et TMD2), le NBD1 et 2 correspond au Nucleotide Binding Domain. M indique le segment transmembranaire en hélice α . Le R représente le domaine régulateur.

Il s'avère difficile d'appliquer les techniques de modélisation moléculaire expérimentale afin d'obtenir un modèle de haute résolution. Les techniques d'alignement de séquences et de modélisation comparative ont donc été, et sont toujours, largement utilisées pour élucider la structure 3D de la protéine.

La modélisation de la protéine a été réalisée en plusieurs temps. Les domaines NBD ont été étudiés dans un premier temps puis les domaines transmembranaires et les boucles extra et intracellulaires ont été modélisés. En revanche, le domaine R a été très peu modélisé en raison de son absence chez les autres protéines ABC transporteurs.

Un premier modèle de NBD1 est proposé en 1997 par comparaison avec les séquences des domaines F1-ATPase mitochondriaux ou encore la protéine RecA (Bianchet et al, 1997).

Cette étude propose un déplacement des frontières des NBDs. Les premières séquences proposées étaient F433-S589 pour le NBD1 et Y1218-R1386 pour le NBD2 (Riordan et al, 1989a). Suite à l'alignement de séquence réalisé par Bianchet et al, les limites proposées deviennent L441-K684 pour le NBD1 et L1227-L1480 pour le NBD2.

En 2004, un modèle murin de NBD1 est proposé grâce aux techniques d'alignement de séquence et de cristallographie (Lewis et al, 2004). Lewis et al, ont également proposé un modèle d'hétérodimère NBD1/NBD2.

La même année Callebaut et al, proposent un modèle d'hétérodimère NBD1/NBD2 humain. Cependant, il faut attendre 2007 pour que soit proposé la structure complète du transporteur Sav1866 (Dawson & Locher, 2007), ce qui permettra de proposer par homologie des modélisations de la protéine CFTR entière.

3. Les différentes classes de mutations

3.1. Classification de Welsh et Smith

Il existe un grand nombre de mutations qui ont été classées en fonction de leurs conséquences au niveau biochimique. Elles ont tout d'abord été divisées en quatre classes différentes selon Welsh et Smith (Welsh & Smith, 1993).

3.1.1. Classe I: Défaut de production de la protéine

Les mutants de la classe I sont caractérisés par une absence de la protéine au niveau de la membrane apicale. Un épissage anormal ou l'insertion prématurée d'un codon stop entraîne la synthèse d'un ARNm tronqué instable, qui de ce fait ne peut pas être traduit en protéine. Les mutations non-sens réduisent les niveaux d'expression des ARNm de 95% par rapport au niveau d'expression normal (Hamosh et al, 1992).

3.1.2. Classe II: Défaut de maturation

Les mutants de classe II ont une traduction normale, mais produisent une protéine dont le repliement (ou folding) est anormal. Cette dernière ne passe pas le système de contrôle qualité localisé au niveau du réticulum endoplasmique (RE), et de ce fait est séquestrée puis dégradée (Cheng et al, 1991). Dans cette classe, on retrouve la plus fréquente des mutations de *CFTR*, la mutation c.1521_1523delCTT (F508del), qui représente 90% des allèles mutés dans la population caucasienne.

3.1.3. Classe III: Mutations perturbant la régulation du canal Cl⁻

Ces mutations permettent la production d'une protéine localisée à la membrane apicale des cellules mais présentant une altération de la régulation de l'ouverture du canal. Les mutants de classe III peuvent affecter la phosphorylation du domaine R ou la liaison et/ou l'hydrolyse de l'ATP au niveau des domaines NBD. Parmi elles, on retrouve par exemple les mutations c.1652G>A (G551D) et c.4046G>A (G1349D) qui conservent très peu de fonction résiduelle.

3.1.4. Classe IV: Mutations altérant la conductance du canal Cl⁻

Les mutations de cette classe perturbent la sélectivité ionique et la durée d'ouverture du canal CFTR. Essentiellement situées dans les domaines transmembranaires, il s'agit de mutations faux-sens qui produisent une protéine correctement positionnée et ayant une activité canal Cl⁻ AMPc dépendante. Les caractéristiques de ces canaux sont cependant

différentes de celles du canal CFTR sauvage, avec une diminution du flux d'ions et une sélectivité modifiée. Il s'agit en général de mutations à effet modéré, dont la plus fréquente est la mutation c.350G>A (R117H), qui conserve une activité de canal chlorure résiduelle.

3.2. Nouvelle classification (Vankeerberghen et al, 2002)

À partir de la classe I, deux autres classes ont été proposées plus tard, afin de disséquer les défauts biochimiques associés (Figure 7). La classe I a ainsi été subdivisée en classe I et en classe V, cette dernière comprenant des mutations altérant la stabilité de l'ARNm de *CFTR* et la classe VI a été ajoutée

3.2.2. Classe V (classe I redéfinie): Mutations altérant la stabilité de l'ARNm

Cette classe comprend les mutations qui altèrent la stabilité de l'ARNm *CFTR* en diminuant partiellement la synthèse ou en altérant le trafic de la protéine (Kerem & Kerem, 1995). Les protéines mutées de cette classe résultent d'un épissage aberrant (c.3717+12191C>T (3849 + 10kb C>T), variant d'épissage T5 de l'intron 8 (c.1210-12T[5])), de mutations du promoteur diminuant le taux de transcription, de mutations faux-sens altérant le routage (c.1364C>A, p.Ala455Glu (A455E)) ou encore de mutations non-sens (codon stop) entraînant une diminution de l'ARNm full-length par épissage alternatif de l'exon la contenant (Hinzpeter et al, 2010);(Hull et al, 1993). Ceci entraîne une réduction de l'expression membranaire de la protéine CFTR normalement fonctionnelle.

3.2.3. Classe VI: Mutations affectant la stabilité de la protéine

La classe VI regroupe les mutations qui altèrent la stabilité de la protéine mature et diminuent les propriétés de régulation des autres canaux, comme certaines mutations situées dans le domaine C-terminal de CFTR (Haardt et al, 1999). Il est admis que cette région n'intervient ni dans la conductance, ni dans la régulation, mais peut interagir avec des protéines stabilisant CFTR à la membrane plasmique (Haardt et al, 1999). Les six classes de mutations sont regroupées dans la Figure 7.

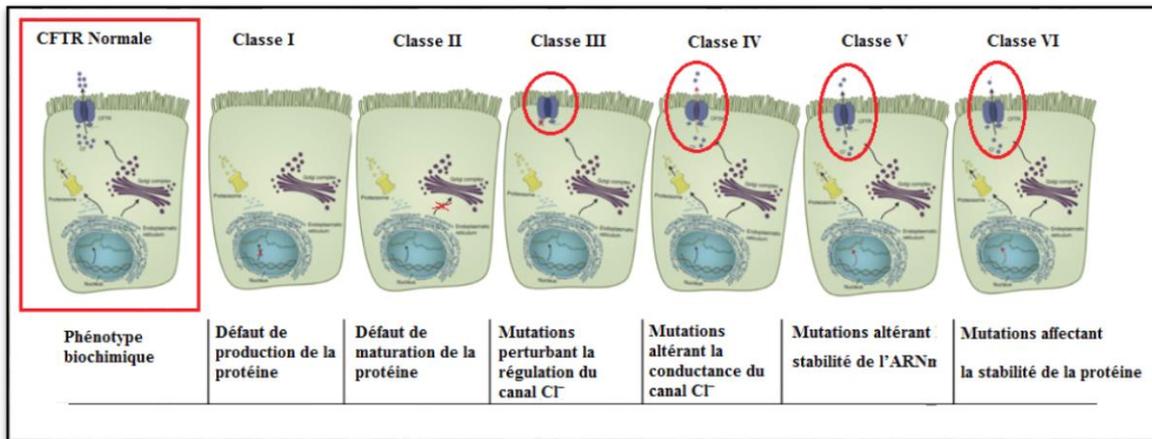


Figure 7: Les différentes classes de mutations *CFTR* (figure personnelle).

4. Fonction de la protéine CFTR

La protéine CFTR joue plusieurs fonctions. C'est un canal ionique permettant la sécrétion des ions Cl⁻ (Anderson et al, 1991) ; (Bear et al, 1991), mais en plus de la fonction canal Cl⁻ cette protéine est reconnue comme un régulateur de la fonction d'autres canaux ioniques et transporteurs (Schwiebert et al, 1999) ; (Barriere et al, 2009). Elle est également capable de transporter d'autres molécules et d'intervenir dans la régulation du pH intracellulaire (Barriere et al, 2009).

4.1. CFTR, un canal Cl⁻

Dans un épithélium sécréteur, l'absorption de Na⁺ et la sécrétion de Cl⁻ représentent la fonction majeure de la fonction épithéliale. Dans ces épithélia, le flux se fait du pôle basolatéral vers la lumière. La force motrice nécessaire au transport secondaire actif des ions Cl⁻ est produite par la pompe Na⁺/K⁺ ATPase. Les ions Cl⁻ entrent dans la membrane basolatérale grâce à des co-transporteurs N⁺/K⁺/2Cl⁻ et sortent du côté apical par diffusion passive à travers les canaux Cl⁻ (Figure8). Parmi ces canaux, il y'a la protéine CFTR, canal Cl⁻ localisé au niveau de la membrane apicale de plusieurs épithélia tels que l'intestin, les poumons, le pancréas, les glandes salivaires ...etc (Crawford et al, 1991) ; (Denning et al, 1992).

Plusieurs travaux ont montré que la sélectivité ionique du canal CFTR est due majoritairement aux acides aminés chargés positivement et présents au niveau du domaine TMD1 et TMD6 (Akabas et al, 1994) ; (Cheung & Akabas, 1996) ; (Smith et al, 2001) ; (Linsdell, 2006).

Le canal CFTR est très spécifique aux anions mais la sélectivité entre les halogénures est très faible et s'établit de la manière suivante : $\text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{I}^- > \text{F}^-$ (Anderson et al, 1991). Il a également été démontré que ce canal laissait passer plusieurs anions simultanément, y compris des anions polyatomiques avec la sélectivité suivante : $\text{NO}_3^- > \text{Cl}^- > \text{HCO}_3^- > \text{HCOO}^- > \text{CH}_3\text{COO}^-$ (Tabcharani et al, 1993) ; (Linsdell et al, 2000).

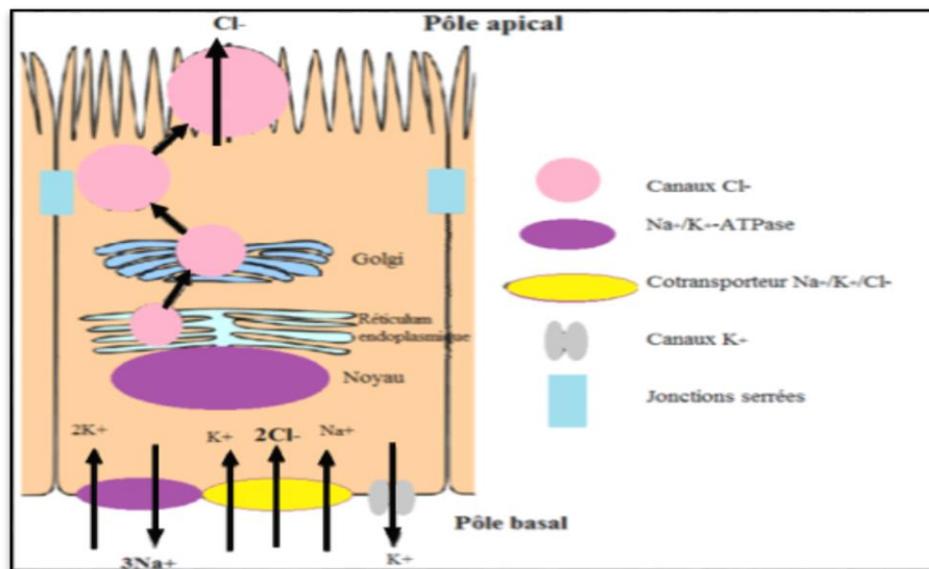


Figure 8: Représentation schématique du transport des ions Cl^- dans les cellules épithéliales adaptée d'après (McCann & Welsh, 1990).

Les ions Cl^- entrent dans la cellule par le pôle basal via le co-transporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ et en ressortent par le pôle apical via les canaux Cl^- , comme CFTR

- *Fonctionnement du Canal Cl^-*

Sous l'influence de la PhosphoKinase A (PKA), toutes ou une partie seulement des sérines régulatrices du domaine R peuvent être phosphorylées. Dans les deux cas, cette phosphorylation permet la fixation de l'ATP sur un NBD. La liaison de l'ATP induit une modification de conformation de la protéine, et l'ouverture du pore. Si le domaine R n'est que partiellement phosphorylé, l'ATP est hydrolysé en ADP qui se dissocie rapidement du NBD, et le canal reprend sa forme fermée. Si toutes les sérines régulatrices du domaine R sont phosphorylées, une molécule d'ATP peut se fixer sur le deuxième NBD, et stabiliser le canal dans sa conformation ouverte (Figure 9). L'hydrolyse de l'ATP provoque sa dissociation du NBD, et le retour à une forme instable. Le cycle d'hydrolyse (par la fonction ATPase des NBDs) semble être bien corrélé avec le cycle d'ouverture-fermeture de CFTR. Dans tous les cas, le passage des ions chlorures à travers le canal se fait selon un gradient électrochimique. Dans les cellules épithéliales bronchiques, ce gradient est

inversé par rapport aux cellules des glandes sudoripares, ce qui explique que le film liquidien qui tapisse les cellules épithéliales bronchiques soit déshydraté et pauvre en chlorures alors que la sueur des patients mucoviscidosiques est concentrée en ions chlorures.

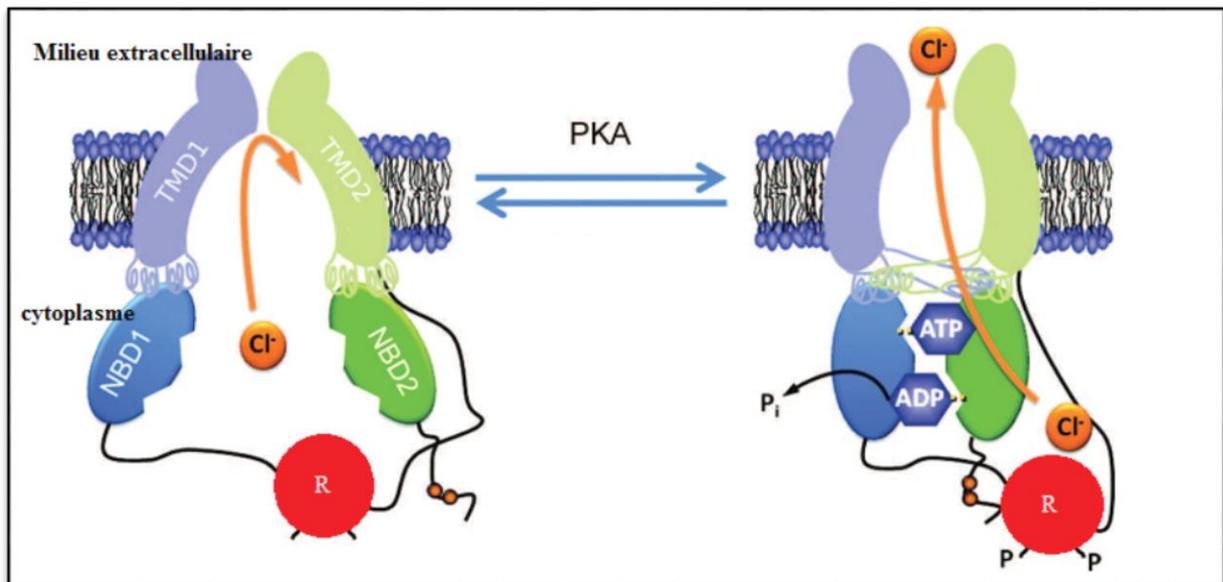


Figure 9: Régulation du canal CFTR d'après (Chen et al, 2006).

La figure représente le canal CFTR dans l'état de repos (à gauche) et dans l'état activé (à droite). P indique la phosphorylation du domaine R de régulation.

4.2. Régulateur du fonctionnement d'autres canaux ioniques

La protéine CFTR participe aux flux ionique transépithélial qui s'accompagne d'un flux d'eau modulant l'hydratation du mucus, et contrôlant l'osmolarité du liquide périciliaire. Les modifications de l'osmolarité entraînent une augmentation de la viscosité, et un ralentissement du transport mucociliaire (Quinton, 1994).

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

ORCC et l'efflux d'ions Cl^- (Schwiebert et al, 1995). Le fait que l'ATP transite par la protéine CFTR elle-même est à ce jour controversé (Reddy et al, 1996).

L'activité du canal sodique sensible à l'amiloride ENaC, responsable d'une absorption par la cellule épithéliale d'ions sodium, est également contrôlée par la protéine CFTR, mais de façon négative. Dans la mucoviscidose, l'inhibition de l'absorption est levée, ce qui doit participer à la déshydratation du mucus. Le mécanisme de régulation du canal ENaC par la protéine CFTR pourrait impliquer des protéines du cytosquelette (Stutts et al, 1995).

4.3. Autres fonctions

La protéine CFTR intervient également dans le recyclage des membranes en favorisant les phénomènes d'exocytose et en inhibant ceux d'endocytose (Bradbury et al, 1992).

Elle régule le pH intracellulaire et acidifie les compartiments intracellulaires (Barasch et al, 1991). Son dysfonctionnement a pour conséquence de modifier les sécrétions cellulaires et d'augmenter la viscosité du mucus.

La CFTR serait aussi impliquée dans le contrôle des processus du transit intracellulaire. Ainsi, cette protéine pourrait influencer la sécrétion de mucines, et d'autres protéines en agissant sur le "transfert endomembranaire", et le nombre de transporteurs ioniques.

5. Corrélation génotype-phénotype

De nombreuses études ont tenté d'établir un lien direct entre les mutations de *CFTR* et le phénotype de la maladie. Seules quelques études ont pu mettre en évidence de telles associations, intéressant essentiellement l'atteinte pancréatique et, plus rarement, l'atteinte pulmonaire. Ainsi, il a été montré que les patients porteurs de mutations dites modérées n'ont pas d'atteinte pancréatique et ont une atteinte respiratoire plus modérée. En dehors de ces exceptions, la grande majorité des études, y compris celles réalisées chez des jumeaux ou dans des fratries, s'accordent à conclure à l'absence de relation entre les mutations de *CFTR* et le phénotype de la maladie (Santis et al, 1990); (Mekus et al, 2000); (Rowntree & Harris, 2003).

Une étude américaine « CF Twin and Sibling Study », sur une plus grande cohorte de patients, a également été réalisée avec 47 paires de jumeaux monozygotes, 10 dizygotes et 231 paires de fratrie (Vanscoy et al, 2007). L'analyse a montré que les mesures de la fonction respiratoire chez les jumeaux monozygotes sont mieux corrélées, que chez des jumeaux

dizygotes ou des fratries. Ces résultats sont en faveur de l'intervention de facteurs génétiques, des gènes modificateurs. Néanmoins, la corrélation des mesures de la fonction chez les monozygotes n'atteint pas 100%, suggérant l'intervention de facteurs environnementaux ou stochastiques. Selon l'étude de Collaco et al, les variations du phénotype respiratoire seraient dues pour moitié à des gènes modificateurs et pour moitié à des facteurs environnementaux (Collaco et al, 2010).

Nombreuses sont les études qui ont cherché à mettre en évidence des facteurs environnementaux qui pourraient moduler le phénotype des patients atteints de mucoviscidose malgré les difficultés engendrées par le grand nombre de facteurs impliqués et le manque de mesure objectives et pertinentes. Le tabagisme, la pollution atmosphérique le stress semblent être associés à la sévérité de l'atteinte respiratoire (Goss et al, 2004b; Kovesi et al, 1993; Ouellet et al, 2007; Rubin, 1990; Smyth et al, 1994).

Cependant, les études portant sur les jumeaux viennent montrer que les facteurs environnementaux ne jouent pas un rôle majeur. Ces données suggèrent donc l'intervention de variants génétiques, dans le locus *CFTR* (facteurs hétéroalléliques) ou en dehors de ce dernier dans l'expression phénotypique et ce qui oriente la recherche vers les gènes modificateurs.

5.1. Influence des facteurs hétéroalléliques du gène *CFTR*

Il s'agit de variants du gène *CFTR* agissant en position cis par rapport à la mutation délétère (cis acting elements en anglais). Ils peuvent expliquer en partie les variations de phénotypes chez des patients de même génotype.

Des travaux menés par Dork et al, ont mis en évidence chez un patient homozygote pour la mutation c.1521_1523delCTT (F508del), une forme moyennement sévère de la maladie, ce qui est rare chez les sujets porteurs de cette mutation. Ces auteurs ont observé une deuxième mutation c.1658G>A (R553Q) dans une des copies et ont émis l'hypothèse que cette dernière pourrait permettre à certains canaux chlore d'avoir une fonction normale (Dork et al, 1991).

L'étude du gène *CFTR* a montré qu'une séquence polymorphe Tn, située dans l'intron8 proche de l'exon est constituée de 5, 7 ou 9 thymidines (5T, 7T, et 9T) a un rôle important dans le processus d'épissage. Le variant T5 altère l'épissage, l'exon 9 est très souvent absent dans la protéine CFTR, d'où sa diminution quantitative. Le variant est souvent retrouvé chez des sujets présentant une ABCD, le plus souvent à l'état d'hétérozygote composite. Il peut également aggraver le phénotype lorsqu'il est associé à une mutation

délétère comme l'ont décrit l'équipe de Kiewewetter et al (Kiewewetter et al, 1993). Ce fait a été observé chez les sujets hétérozygotes composites CFTR portant la mutation c.350G>A (R117H) et en particulier le génotype c.[1521_1523delCTT];[350G>A] (F508del/R117H), ces sujets pouvaient avoir une mucoviscidose avec fonction pancréatique normale, une ABCD, voire un phénotype normal chez la femme (Kiewewetter et al, 1993).

Kiewewetter et al, ont montré que, chez les sujets ayant une ABCD ou étant non atteints, la mutation c.350G>A (R117H) était associée au variant T7 qui entraîne un épissage normal ; par contre chez les sujets ayant une mucoviscidose la mutation était associée dans la plupart des cas au variant T5. Cette étude montre bien que le polymorphisme Tn est un facteur modificateur (Kiewewetter et al, 1993).

En 1998, Cuppens et al ont montré l'influence de 2 autres polymorphismes sur la synthèse de la protéine CFTR. Il s'agit des répétitions TGm, également situées dans l'intron 8, et qui modulent l'épissage de l'exon 9 et du variant M1470V, qui joue un rôle dans la maturation de la protéine. Cependant, l'effet sur le phénotype de ces deux polymorphismes est possible mais non démontré (Cuppens et al, 1998).

La mucoviscidose apparait ainsi comme une maladie à hétérogénéité clinique et ceci s'avère même chez les patients de même génotype. Les études réalisées dans des fratries et chez des jumeaux semblent indiquer l'intervention d'autres facteurs en dehors du gène *CFTR* dans la variabilité phénotypique.

5.2. Gènes modificateurs dans la mucoviscidose

La grande variabilité des profils cliniques des patients atteints de mucoviscidose, suggèrent l'intervention de variants génétiques, situés soit dans le locus même de *CFTR* (facteurs dits hétéroalléliques), soit situés en dehors de ce locus: qui orientent vers la recherche des gènes dits modificateurs. Ces variants génétiques ou polymorphismes, sont des variations individuelles dans la séquence d'un gène, non pathologiques en soit, mais pouvant moduler la gravité de la maladie (Mekus et al, 2000) ;(Rowntree & Harris, 2003).

On distingue plusieurs types de polymorphismes : des insertions-délétions de bases, des répétitions de courtes séquences nucléotidiques (micro ou mini-satellite) ou des modifications d'une seule base ou SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). Le choix des gènes étudiés est guidé par leur rôle dans la physiopathologie de la maladie (approche gène-candidat).

De nombreux gènes ont fait l'objet d'étude nous citerons :

5.2.1. Gènes associés à la défense antimicrobienne

L'atteinte pulmonaire dans la mucoviscidose est caractérisée par un déficit dans la défense antimicrobienne entraînant des infections pulmonaires accompagnées d'une inflammation intense et aboutissant à une destruction pulmonaire. Les gènes pouvant moduler la réponse aux infections sont donc candidats à modifier l'atteinte pulmonaire dans la mucoviscidose.

- **Mannose Binding Lectin (MBL)**

Mannose Binding Lectin (*MBL*), codée par le gène *MBL2*, appartient à la famille des collectives et participe à la défense innée antibactérienne. Trois variations du gène ont été décrites dans l'exon 1 du gène *MBL2* au niveau des codons 52, 54, et 57, affectant la structure tertiaire de la protéine.

L'allèle normal est désigné *MBL2-A* et l'allèle mutant *MBL2-0*. Garred et al ont montré que les patients atteints de mucoviscidose et porteurs de l'allèle *MBL2-0* avaient une fonction pulmonaire plus altérée, une fréquence augmentée de colonisation des voies aériennes à *Burkholderia cepacia* ainsi qu'une diminution estimée à huit ans de leur survie (Garred et al, 1999), confirmant les résultats de Davies et al (Davies et al, 2000).

Gabolde et al, ont montré que les patients porteurs de l'allèle *MBL2-0* avaient des fonctions respiratoire et hépatique plus altérées avec en particulier une augmentation du nombre de patients atteints de cirrhose (Gabolde et al, 2001). Un essai thérapeutique encourageant est actuellement en cours utilisant la MBL purifiée issue de plasma humain et administrée par voie intraveineuse.

Les résultats préliminaires publiés ont montré chez une patiente atteinte de mucoviscidose porteuse de l'allèle *MBL2-0* une amélioration de la fonction respiratoire (Garred et al, 2002). Ces résultats suggèrent que le gène *MBL2* pourrait être un gène modulant l'atteinte respiratoire et la survie des patients atteints de mucoviscidose.

- **Monoxyde d'azote (NO)**

L'action antimicrobienne du monoxyde d'azote (NO) est de plus en plus reconnue. Le NO est produit grâce à l'action de NO synthèses (NOS) ayant trois iso formes: NOS neuronale (NOS1), NOS inductible (NOS2) et NOS endothéliale (NOS3). Habituellement

dans des conditions inflammatoires comme les broncheectasies ou l'asthme le NO exhalé est élevé, il est diminué dans la mucoviscidose (Grasemann et al, 1997). Le NO participant à la défense antimicrobienne contre le *Pseudomonas aeruginosa*, sa diminution pourrait avoir des conséquences défavorables. Grasemann et al ont montré une association entre un polymorphisme du gène NOS1 et un polymorphisme du gène NOS3 avec le taux de NO exhalé et la colonisation par *Pseudomonas aeruginosa* chez des patients atteints de mucoviscidose (Grasemann et al, 2002).

5.2.2. Gènes associés à la réponse immuno-inflammatoire

L'inflammation précoce, excessive et inadaptée est un des facteurs déterminants de la destruction pulmonaire dans la mucoviscidose. L'élément déclenchant cette réponse inflammatoire reste actuellement débattu. L'inflammation est certes due en partie aux infections de l'appareil respiratoire mais elle pourrait même les précéder, comme le suggère la présence précoce de composants inflammatoires dans les voies respiratoires d'enfants atteints de mucoviscidose en dehors de toute infection détectable. Cette inflammation étant médiée par un certain nombre de cytokines, les gènes codant pour ces protéines font partie des gènes modificateurs potentiels :

- **Le Tumor Necrosis Factor- α (*TNF- α*)**

Le Tumoral Necrosis Factor- α (*TNF- α*), cytokine pro-inflammatoire produite principalement par les macrophages, a été retrouvé à des taux élevés dans les voies respiratoires de malades atteints de mucoviscidose. Certaines études ont démontré une relation inverse entre le taux de *TNF- α* dans les expectorations de patients et leur fonction pulmonaire (Greally et al, 1993). Un polymorphisme a été décrit dans la région promotrice (SNP-308A/G) conduisant à individualiser deux allèles, *TNF1* et *TNF2*. Le niveau de transcription de *TNF- α* est deux fois plus élevé chez les sujets porteurs de l'allèle *TNF-2* (Kroeger et al, 1997).

- **Le Transforming Growth Factor- β**

Le Transformant Growth Factor- β (*TGF- β*) est une cytokine ayant des propriétés à la fois pro- et anti-inflammatoires favorisant la prolifération des fibroblastes et la déposition du collagène. Plusieurs polymorphismes ont été décrits pour le gène de *TGF- β* dont certains influencent le taux de production du *TGF- β* , parmi lesquels des SNP au niveau des codons 10

(mutation leucine–proline) et 25 (mutation arginine–proline) ainsi qu’au niveau du promoteur en position –509C/T (Arkwright et al, 2000).

Arkwright et al, ont montré que les sujets « forts producteurs » de TGF- β porteurs de la mutation au niveau du codon 10 avaient une détérioration plus rapide de leur fonction respiratoire mais ils ne démontrent aucune relation avec les autres polymorphismes du TGF- β (Arkwright et al, 2000).

- **Enzyme de conversion de l’angiotensine I**

L’enzyme de conversion de l’angiotensine I (ACE) est une cytokine pro-inflammatoire ayant la particularité d’activer le TGF- β et d’être ainsi en partie responsable des propriétés profibrosantes du TGF- β . Un polymorphisme du gène codant pour l’ACE consiste en une insertion–délétion (I–D) au niveau de l’intron (Schurmann, 2003). Arkwright et al, ont montré que les patients fort producteurs d’ACE (D–D) avaient un risque accru de développer une hypertension portale (Arkwright et al, 2003). De plus, ils ont également trouvé une association entre la production élevée d’ACE (patients D–D) et une dégradation plus rapide de la fonction pulmonaire.

- **L’interleukine-10**

Arkwright et al, ont également étudié l’association éventuelle de l’expression phénotypique de la mucoviscidose avec un polymorphisme du gène codant pour l’interleukine-10 (IL-10) (Arkwright et al, 2003). L’IL-10 est décrite le plus souvent comme une cytokine immunosuppressive et anti-inflammatoire. Des études sur des modèles animaux ont mis en évidence que l’IL-10 était un élément clé dans la réponse anti-infectieuse, en particulier contre les infections des voies aériennes à *Pseudomonas aeruginosa* et à *Aspergillus fumigatus* (Cenci et al, 1998); (Chmiel et al, 2002).

Plusieurs polymorphismes ont été décrits, parmi lesquels trois les plus étudiés (–1082G/A, –819T/C et –592C/A) (Lazarus et al, 2002). Dans le cadre de la mucoviscidose, Arkwright et al, n’ont pas trouvé d’association entre le polymorphisme du gène codant pour l’IL-10 –592C/A et la fonction respiratoire chez 289 patients.

Corvol et al, ont étudié l’effet du polymorphisme de l’IL-10 en position –1082G/A dans une cohorte franco-allemande de 378 patients (Corvol et al, 2006). Ils ont montré que les patients –1082G/G avaient une fréquence accrue de colonisation à *A. fumigatus* ainsi que d’aspergillose broncho-pulmonaire allergique. Les patients –1082 G/G avaient également des

taux sériques d'IL-10 significativement augmentés. Cette étude suggère que des variants alléliques de l'IL-10 prédisposeraient les patients atteints de mucoviscidose aux infections à *A. fumigateur* ainsi qu'au développement d'aspergillose broncho-pulmonaire allergique.

- **Antigènes HLA**

Les gènes du système HLA de classe II ont été impliqués dans la réponse allergique, en particulier médiée par les IgE. Ces gènes ont été étudiés en tant que potentiels gènes modificateurs. Aron et al, ont étudié les polymorphismes des gènes HLA DR7 et DR4 chez 98 adultes atteints de mucoviscidose (Aron et al, 1999). Cette équipe avait rapporté une augmentation des antigènes HLA DR4 et DR7 chez des patients atopiques ou asthmatique (Aron et al, 1996). Ils ont montré que l'allèle HLA DR7 était plus fréquent et l'allèle HLA DR4 moins fréquent chez les patients colonisés à *Pseudomonas aeruginosa* en comparaison aux sujets sains. Ils concluent que l'absence de l'allèle HLA DR7 ou la présence de l'allèle HLA DR4 pourrait conférer une protection contre ce pathogène.

D'autres types de gènes sont aussi étudiés comme par exemple les gènes associés au système élastase- antiélastase, et les gènes associés au système oxydants-antioxydants.

L'analyse des corrélations génotype-phénotype est donc compliquée: on peut avoir des expressions différentes de la maladie pour un même génotype. Chaque patient est un malade unique ; plusieurs causes génétiques peuvent donc être émises lorsqu'on se retrouve face à une personne atteinte de mucoviscidose, ce qui pose un problème majeur.

III. Diagnostic et dépistage de la mucoviscidose

1. Diagnostic

Le dépistage précoce de la mucoviscidose permet de commencer rapidement un traitement approprié afin d'éviter l'apparition de lésions irréversibles. Cette prise en charge précoce et spécialisée est un facteur essentiel susceptible d'augmenter considérablement la qualité et l'espérance de vie des patients. Jusqu'en 1990, le diagnostic de la mucoviscidose était basé principalement sur la mesure du chlore dans la sueur et sur les caractéristiques cliniques telles que des problèmes respiratoires récurrents, un iléus méconial, un retard staturo-pondéral et des diarrhées graisseuses (Gibson et al, 2003). Suite à l'identification du gène *CFTR* en 1989, les tests génétiques ont vu le jour, et ont permis de confirmer les suspicions de mucoviscidose mais aussi l'identification des mutations à l'origine de cette dernière.

1.1. Test de sueur (iontophorèse à la pilocarpine)

Physiologiquement, les ions chlorures présents dans les sécrétions sudorales sont réabsorbés par les cellules épithéliales tapissant le canal glandulaire. Chez les sujets mucoviscidosiques, le défaut de *CFTR* ne permet pas cette réabsorption, et les concentrations en chlorures et en sodium à la surface de la peau sont anormalement élevées (Gibson & Cooke, 1959). La sueur est hypertonique et les patients présentent une sensibilité accrue à la déshydratation. La mesure des ions chlorures sudoraux par le test décrit en 1956 par Gibson et Cooke est encore aujourd'hui le «test par excellence» pour le diagnostic de la mucoviscidose.

Après stimulation de la sudation par iontophorèse à la pilocarpine (molécule aux propriétés cholinergiques), la sueur est recueillie sur un papier-buvard (pour dosage titrimétrique, méthode de référence de Gibson et Cooke) ou dans un dispositif collecteur Macroduct ou Nanoduct (pour dosage coulométrique, basé sur le principe de saturation d'une électrode d'argent par les ions chlorures de la sueur). La concentration normale en ions chlorure est inférieure à 30 mmol/L de sueur, et la valeur pathologique est supérieure à 60 mmol/L. Entre ces deux valeurs, le résultat est considéré comme intermédiaire ou «douteux».

Ce test, qui nécessite un personnel et des installations spécialisés, constitue l'examen clé pour conforter ou récuser le diagnostic de mucoviscidose (Farrell et al, 2008) ; (Sermet-Gaudelus et al, 2010b). Il est sensible (83%) et spécifique (98%), et seuls 2 % des patients

atteints de mucoviscidose présentent un test de la sueur normal (mucoviscidose atypique, avec des mutations à effet modéré) (LeGrys, 1996) ; (Rota et al, 2008).

Cependant, des faux positifs existent, ils peuvent être de cause technique (collection de sueur insuffisante, évaporation, matériel souillé...) ou pathologique (déshydratation, eczéma, malnutrition, pseudo-hypoaldostéronisme...) dépendent du manipulateur et de l'évaluation clinique (Beauchamp & Lands, 2005).

1.2. Différence de potentiel trans-épithéliale nasale

Le transport d'ions à travers l'épithélium respiratoire génère une différence de potentiel (ddp) trans-épithéliale qui peut être mesurée *in vivo*. Le dysfonctionnement de CFTR à la surface apicale des cellules de la muqueuse nasale augmente la réabsorption de sodium et diminue celle du chlorure, ce qui se traduit par une ddp nasale anormale.

Cet examen requiert des installations et un personnel spécialisé. La méthode, réalisable chez les individus de plus de 6 ans, est plus sensible que le test de la sueur, et permet d'identifier certains patients atteints de mucoviscidose et ayant un test de la sueur normal ou intermédiaire (De Boeck et al, 2006). La mesure de la ddp transépithéliale nasale peut permettre le diagnostic de formes atypiques de mucoviscidose avec test de la sueur intermédiaire (Sermet-Gaudelus et al, 2010a).

1.3. Dosage de la trypsine (dépistage néonatal)

Le dépistage de la mucoviscidose chez un nouveau-né se fait généralement sur une goutte de sang séché prélevée trois jours de vie. Les enfants atteints de mucoviscidose présentent, dans 90 % des cas, un taux élevé de trypsine immunoréactive (Parad et al, 2005) ; (Sermet-Gaudelus et al, 2006). Cette enzyme, produite par le pancréas, est déversée dans les intestins au moment des repas. Chez les patients mucoviscidosiques, la trypsine s'infiltré dans la circulation sanguine suite à l'obstruction des canaux pancréatiques par le mucus visqueux.

Ce dépistage repose sur le dosage de trypsine immunoréactive (TIR) à partir d'un échantillon de sang prélevé sur papier buvard au 3ème jour de vie et dosé selon la technique mise au point par Crossley et al (Crossley et al, 1979). Afin de limiter le nombre de faux positifs, le dosage de la TIR est couplé à la recherche des 30 principales mutations du gène *CFTR*. En cas de résultat supérieur au seuil ($>60\mu\text{g/l}$), un test de la sueur est réalisé.

1.4. Analyse moléculaire du gène *CFTR*

Le gène *CFTR* est le seul connu comme étant responsable de la mucoviscidose. Environ 1965 variations ont été décrites (www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app). Etant donné la taille importante de ce gène (190 Kb au total, 27 exons soit 6,5Kb de région codante), la stratégie d'analyse moléculaire de ce dernier est réalisée en 3 étapes :

En premier lieu, les mutations les plus fréquentes observées chez les patients d'origine caucasienne sont recherchées à l'aide de trousse commerciales avec une sensibilité évaluée entre 80 et 85% (Kit ELUCIGENE CF30™ (Tepnel Diagnostics, 2004) ; INNO-LiPa CFTR® (INNOGENETICS)), et la recherche ciblée des mutations les plus fréquentes hors trousse, selon les origines géographiques des patients, est réalisée par des techniques de balayage.

En second lieu, selon l'indication, une analyse poussée peut être réalisée. Un balayage de toutes les régions codantes par diverses techniques: DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*)(Costes et al, 1995), DHPLC (*Denaturing High Performance Liquid Chromatography*) (Le Marechal et al, 2001), et par séquençages (détection 95% des anomalies du gène *CFTR*).

Enfin, la troisième étape est la recherche de larges remaniements, qui ne peuvent pas être détectés par les techniques citées précédemment. Ces derniers représentent environ 1,5 à 2% des allèles chez les patients mucoviscidosiques (Audrezet et al, 2004),

La recherche des remaniements se fait par PCR multiplexe avec des amorces fluorescentes (Audrezet et al, 2004), ou par MLPA (*Multiplex Ligation-dependant Probe Amplification*) (Schouten et al, 2002).

VI. Traitement

A ce jour il n'existe pas de traitement curatif, mais il existe des traitements symptomatiques améliorant le profil évolutif de la maladie. Même s'ils sont contraignants et doivent être poursuivis durant toute la vie du malade, ces traitements ont permis d'allonger l'espérance de vie des patients. L'espérance de vie des patients dans les pays développés est passée de 7 ans en 1965 à 46 ans en 2008 (<http://www.vaincrelamuco.org/>).

1. Prise en charge de l'atteinte digestive

a. Prise en charge nutritionnelle

Une dénutrition est observée dans la mucoviscidose du fait d'une diminution des ingestats et d'une augmentation des pertes. La diminution des ingestats est secondaire à l'IPE et à une anorexie favorisée par l'encombrement, les douleurs abdominales, les prises médicamenteuses, etc. L'augmentation des pertes est secondaire à l'inflammation et à l'augmentation du travail musculaire. Une prise en charge nutritionnelle avec un enrichissement des apports est le plus souvent nécessaire avec l'évolution de la maladie.

b. Insuffisance pancréatique exocrine

L'IPE touche 85-90% des patients, ce qui nécessite une supplémentation en extraits pancréatiques comme la pancréatine (Créon®) administrés par voie orale lors de chaque repas et adaptés en fonction des repas et des symptômes digestifs.

c. Supplément vitaminique

L'IPE est associée à une malabsorption des vitamines liposolubles (A, D, E, K), il existe également un déficit en vitamine B12 et en zinc. La prise en charge nutritionnelle est importante, le patients reçoit alors des compléments vitaminiques et des oligoéléments pour compenser ces pertes (Hubert, 2003).

2. Prise en charge de l'atteinte pulmonaire

a. Amélioration de la clairance mucociliaire

L'altération de la clairance mucociliaire favorise la survenue d'infections et conduit à la destruction du parenchyme pulmonaire. La kinésithérapie respiratoire est systématique dès que le diagnostic est posé, même en l'absence de symptômes.

Des mucolytiques peuvent être administrés aux patients afin de fluidifier les sécrétions. Des aérosols de désoxyribonucléase recombinante humaine (rhDNase ou dornase

alpha ou Pulmozyme®) permettent d'hydrolyser de grandes quantités d'ADN issu notamment des polynucléaires et des bactéries du site inflammatoire. Ce traitement permet de diminuer la viscosité du mucus pulmonaire, améliorant ainsi la fonction pulmonaire, et pourrait même prévenir l'inflammation pulmonaire (Quan et al, 2001).

L'inhalation de sérum salé hypertonique pourrait également favoriser l'hydratation du mucus et améliorer la clairance mucociliaire (Wills et al, 1997).

b. Antibiothérapie

L'antibiothérapie doit être précoce et doit commencer dès l'apparition de signes d'exacerbation pulmonaire. Des examens cyto bactériologiques des crachats (ECBC) sont systématiquement réalisés. Ils permettent d'isoler des germes et d'évaluer leur sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme) pour ainsi mettre en route une antibiothérapie ciblée sur le germe.

Dans un premier temps, l'antibiothérapie vise principalement le *Staphylococcus aureus* et l'*Haemophilus influenzae* souvent traités par voie orale. En cas d'infection au *Pseudomonas aeruginosa*, la primocolonisation pourra être traitée soit par une antibiothérapie orale et inhalée, soit par voie veineuse selon les signes cliniques. Il a été démontré qu'une prise en charge précoce permet d'éradiquer le pathogène de l'organisme et ainsi de retarder la colonisation chronique (Taccetti et al, 2005).

3. Anti-inflammatoires

L'infection et la libération de dérivés oxydants implique l'inflammation. Les anti-inflammatoires et antioxydants sont alors considérés comme traitements de choix.

a. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Des travaux ont rapporté que de fortes doses d'ibuprofène étaient associées à un ralentissement du déclin du volume expiratoire maximal par seconde (VEMS), chez les enfants ayant une atteinte modérée (Konstan et al, 1995), mais les effets secondaires gastriques et rénaux ont vite conduits à l'abandon de ces traitements.

b. Corticothérapie

Connus pour leur rôle anti-inflammatoire en diminuant le recrutement des neutrophiles et la libération des cytokines, les corticoïdes sont habituellement prescrit.

Par voie systémique un effet bénéfique a été noté chez les patients présentant une forme modérée de la maladie. Néanmoins, les effets nombreux secondaires enregistrés ont

vite ternis ce bénéfice (Eigen et al, 1995). En dehors, des aspergilloses broncho-pulmonaires immunoallergiques et des exacerbations sévères, les corticoïdes par voie systémique ne sont plus utilisés.

En revanche, les corticoïdes par voie inhalées restent très souvent prescrits, même s'ils font l'objet de controverse (Dezateux et al, 2000) la justification de l'utilisation de ces derniers n'est pas clairement établie dans la mucoviscidose. En Janvier 2014, un consensus a clairement défini le périmètre de prescription de ces derniers, dans le but de limiter leur prescription (Fayon et al, 2014).

4. Les nouvelles thérapies

De nombreuses molécules sont actuellement à l'étude pour rétablir la fonction du canal CFTR, certaines ont eu l'autorisation de mise sur le marché tandis que d'autres sont en expérimentation.

La molécule PTC124 (Ataluren®) pourrait restituer partiellement la fonction CFTR en présence d'une mutation non sens, en poursuivant le cadre de lecture malgré le codon stop (Welch et al, 2007). Cette molécule a fait l'objet d'étude chez les souris, chez lesquels elle induit la production de la protéine CFTR à la surface des cellules épithéliales (Du et al, 2008). Des essais ont été menés chez des adultes sains (Hirawat et al, 2007) et des adultes (Kerem et al, 2008) mucoviscidosiques, l'Ataluren® permettait alors une amélioration du transport du Cl⁻ dans l'épithélium.

Wilschanski et al, ont montré que la prise régulière d'Ataluren conduit à une amélioration, temps-dépendante, de l'activité de la CFTR, des paramètres cliniques avec en général, une bonne tolérance (Wilschanski et al, 2011).

Le Vertex 770 connu sous le nom d'Ivacaftor®, est un potentiateur (il augmente la probabilité d'ouverture du canal chlorure de la protéine mutante) de la protéine CFTR utilisé chez les sujets porteur de la mutation c.1652G>A (G551D).

Ce traitement a fait l'objet d'une étude randomisée en double aveugle contre placebo chez des sujets porteurs de la mutation c.1652G>A (G551D). Les patients recevant l'Ivacaftor ont montré une nette amélioration du VEMS, une diminution de plus de la moitié du nombre d'exacerbations et un gain pondéral et sans effets secondaires notables (Ramsey et al, 2011).

L'Ivacaftor a obtenu une autorisation de mise sur le marché par la Food and Drug Administration (FDA).

Récemment, cette molécule a été élargie à d'autres mutations en dehors de la mutation c.1652G>A (G551D):

c.3731G>A (G1244E), c.4046G>A (G1349D), c.532G>A (G178R), c.1651G>A (G551S), c.3752G>A (S1251N), c.3763T>C (S1255P), c.1646G>A (S549N) ou c.1645A>C (S549R) et ceci en se basant sur des études réalisées par De Boeck et al (De Boeck et al, 2014).

A présent les études se focalisent sur la mutation c.1521_1523delCTT (F508del).

Une récente étude montre que l'Ivacaftor associé au Lumacaftor (également appelé VX-809, connu comme un correcteur de CFTR), chez les patients de plus de 12 ans et homozygotes pour la mutation c.1521_1523delCTT (F508del) montre une efficacité modeste, mais statistiquement et cliniquement significative sur la fonction respiratoire (Boyle et al, 2014) .

Le laboratoire Vertex a déposé en novembre 2014, une demande d'autorisation de mise sur le marché aux Etats Unis et en Europe pour la combinaison Ivacaftor/Lumacaftor pour les patients c.[1521_1523delCTT] ;[1521_1523delCTT] (F508del/F508del).

V. Place du conseil génétique

Lorsqu'un diagnostic de mucoviscidose est posé, au delà de la prise en charge de l'enfant, une prise en charge génétique s'impose pour le couple et ses apparentés (Munck et al, 2005). On peut citer différentes situations dans lesquelles un conseil génétique doit être proposé aux familles:

Il faut rappeler que pour cette maladie de transmission récessive l'incidence est encore inconnue dans notre pays.

1. Prise en charge des couples à risque de $\frac{1}{4}$

Dans cette situation, les deux parents sont hétérozygotes (porteurs asymptomatiques d'une mutation dans le gène *CFTR*) (Figure10). Dans la très grande majorité des cas, il s'agit de couples qui ont donné naissance à un enfant atteint lors d'une précédente grossesse. Il peut également s'agir de couples qui ont été identifiés à la suite d'un dépistage réalisé dans les familles à risque (où la naissance d'un enfant atteint a déclenché une recherche des porteurs chez les apparentés) ou encore suite à la détection d'un intestin hyperéchogène lors du suivi échographique des grossesses.

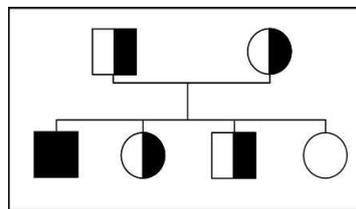


Figure 10: Représentation d'un couple à risque de $\frac{1}{4}$.

Le risque de récurrence à chaque grossesse étant de 25%, un conseil génétique sera proposé à ces couples. Une information complète leur sera donnée sur la maladie elle-même, sur le risque de récurrence à chaque grossesse et une possibilité de diagnostic prénatal, s'ils le souhaitent, leur sera proposée

Le diagnostic prénatal peut être réalisé soit par choriocentèse ou par amniocentèse. Dans le cas où le diagnostic est effectué par des techniques de biologie moléculaire sur l'ADN fœtal, la recherche des mutations *CFTR* identifiés chez les parents est recherchée.

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

En Algérie, on ne dispose pas d'informations sur l'incidence de la pathologie ni sur le taux de porteurs hétérozygotes. En Europe, le taux de porteurs est de $\frac{1}{30}$.

Grace aux progrès de la biologie moléculaire et la prise en charge de la mucoviscidose, les patients sont de plus en plus nombreux à avoir des projets de vie de couple, à envisager des enfants et à solliciter un conseil génétique.

Les patients atteints de cette pathologie transmettent obligatoirement une des deux mutations dont ils sont porteurs, le risque avant toute étude de biologie moléculaire est de $\frac{1}{60}$ ($1 \cdot \frac{1}{30} \cdot \frac{1}{2}$). L'étude exhaustive du gène *CFTR* du conjoint permet de réduire le risque résiduel en écartant 98% à 99% des mutations, ainsi ce risque rejoint le risque d'un couple pris au hasard dans la population générale. Cependant, si le conjoint est hétérozygote, le couple devient à risque de $\frac{1}{2}$ (Figure 11).

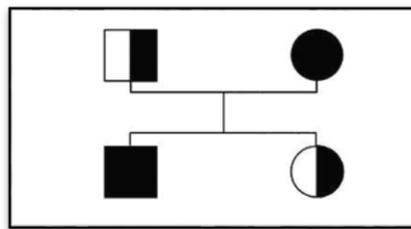


Figure 11: Représentation d'un couple à risque de $\frac{1}{2}$.

Dans les couples où un partenaire est hétérozygote (porteur d'une mutation), le risque *a priori* avant toute étude moléculaire est de $\frac{1}{120}$ ($\frac{1}{2} \cdot \frac{1}{30} \cdot \frac{1}{2}$).

L'étude moléculaire va modifier cette probabilité *a priori* en probabilité *a posteriori* chez le conjoint *a priori* non porteur. La recherche des 30 mutations les plus fréquentes en France par exemple permet d'écarter 90% des mutations (ce taux de couverture varie légèrement en fonction des régions et de l'origine ethnique), ceci ne peut s'appliquer en Algérie.

Le taux de détection des troupes spécifiques aux populations caucasiennes n'a jamais été testé chez les populations Maghrébine ou Algérienne. Un des nombreux objectifs de cette thèse est de mettre en évidence l'efficacité et le taux de détection de ce kit afin de l'utiliser entre autre dans le cadre de conseil génétique.

IV. Etude *in silico* des effets délétères des mutations

Les variations de séquences au niveau des gènes sont, le plus souvent, responsables de troubles fonctionnels des protéines concernées menant à l'apparition de nombreuses maladies.

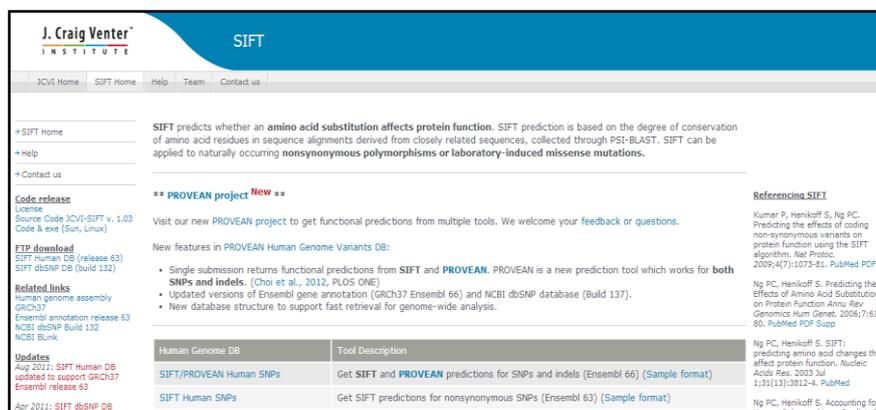
Ces variations peuvent se produire aussi bien au niveau des régions géniques codantes (exons), qu'au niveau des introns et de ce fait avoir un effet sur le processus d'épissage alternatif, ce qui se traduit par diverses conséquences sur la structure et/ou la fonction de la protéine. De nombreux logiciels ont été développés afin de prédire les différents effets et impacts de ces mutations délétères. La modélisation tridimensionnelle (3D) vient s'ajouter à ces nombreux logiciels de prédiction et permet une meilleure appréciation des défauts moléculaires.

Dans la présente étude nous nous sommes intéressés en particulier à trois (03) mutations qui sembleraient spécifiques à la population Algérienne c.3907A>C (N1303H), c.422C>A (A141D), et c.680T>G (L227R) (Gouya et al, 1997), (Zielenski et al, 1991).

1. Analyse de mutations exoniques

1.1. Prédiction des effets délétères des mutations exoniques sur la protéine CFTR par Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT)

Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT) est un logiciel gratuit accessible en ligne (Figure 12). Ce logiciel s'appuie sur l'homologie des séquences nucléotidiques ou protéiques pour prédire les effets délétères des mutations (Ng & Henikoff, 2003). Il permet de trier la substitution en fonction du degré de conservation d'un acide aminé dit intolérant par rapport au tolérant et prédit l'effet phénotypique de cette substitution sur la protéine (Ng & Henikoff, 2003). SIFT permet de prédire si une substitution est tolérée à chaque position de la séquence.



The screenshot shows the SIFT web interface. At the top, there is a navigation bar with 'J. Craig Venter INSTITUTE' and 'SIFT'. Below the navigation bar, there is a main content area with a description of SIFT: 'SIFT predicts whether an amino acid substitution affects protein function. SIFT prediction is based on the degree of conservation of amino acid residues in sequence alignments derived from closely related sequences, collected through PSI-BLAST. SIFT can be applied to naturally occurring nonsynonymous polymorphisms or laboratory-induced missense mutations.' There are also links for 'Code release', 'FTP download', 'Related links', and 'Updates'. A table at the bottom lists database links and tool descriptions.

Human Genome DB	Tool Description
SIFT/PROVEAN Human SNPs	Get SIFT and PROVEAN predictions for SNPs and indels (Ensembl 66) (Sample format)
SIFT Human SNPs	Get SIFT predictions for nonsynonymous SNPs (Ensembl 63) (Sample format)

Figure 12: Interface du logiciel SIFT (<http://sift.jcvi.org/>)

Une substitution est dite tolérante car elle est considérée comme n'ayant pas d'effet délétère sur la fonction de la protéine. A l'inverse, elle est dite intolérante lorsque celle-ci semble avoir un impact entraînant la perte partielle ou totale de la fonction de la protéine (Ng & Henikoff, 2003). Afin de prédire si le changement d'acide aminé aura un impact sur la protéine SIFT prend en compte la position et la nature de l'acide aminé.

Le logiciel SIFT se base sur le postulat que toute évolution d'une protéine est étroitement corrélée à sa fonction. Cela implique que les parties fonctionnelles soumises à de forte pression de sélection sont conservées. Il suppose que les acides aminés importants seront conservés dans la famille de protéines, et les changements donc à des positions bien conservées ont tendance à être prédits comme délétères. La forte probabilité d'avoir un effet délétère provient d'une substitution d'un acide aminé survenant à une position fortement conservée d'une famille de protéine et inversement, une faible probabilité suggère que la substitution siège en une position peu conservée.

La probabilité pondérée en fonction du nombre de séquences alignées est calculée en comparant la matrice de mutation issue de l'alignement multiple avec celles prédites par BLOck SUBstitution Matrix 62 (BLOSUM 62). SIFT calcule des probabilités normalisées pour toutes les substitutions possibles à chaque position. Les probabilités inférieures à un seuil prédéfini (<0.05) seront considérées comme délétères.

En réalité, trois différents scores basés sur la similarité entre deux acides aminés sont obtenus :

- Intolérant (Intolérant): [0.00-0.05].
- Potentially tolerant (potentiellement tolérant): [0.051-0.20].
- Tolérant (tolérant): [0.201-1.00].

1.2. Prédiction des effets des mutations par Polymorphism Phenotyping-2 (PolyPhen-2)

Polymorphism Phenotyping-2 (PolyPhen-2) est un logiciel gratuit accessible sur le lien: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/> (Figure 13). Il a été publié par Shamil Sunyaev et Vasily Ramensky en 2000 (Sunyaev et al, 2000).

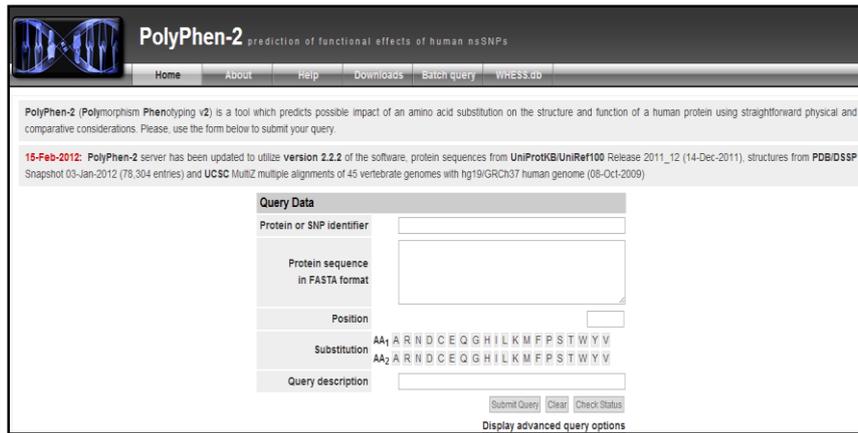


Figure 13: Interface du logiciel Poly Phen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)

Ce logiciel prédit l'impact d'une substitution d'un acide aminé sur la structure et la fonction d'une protéine en se basant sur trois informations:

- L'alignement multiple.
- Les informations structurales provenant des banques de données de structure (PDB).
- Les propriétés physico-chimiques des acides aminés.

Les prédictions sont classées en 3 niveaux: «*probably damaging*» (probablement délétère), «*possibly damaging*» (potentiellement délétère) et «*benign*» bénigne. La prédiction est dite bénigne lorsque la fonction de la protéine ne semble pas affectée par cette variation.

A l'inverse, une prédiction est dite délétère lorsque la protéine a une forte probabilité d'être altérée par la variation (Sunyaev et al, 2000).

1.3. Prédiction des effets des mutations par Align Grantham Variation Grantham Deviation (Align-GVGD)

Align Grantham Variation Grantham Deviation (Align-GVGD) est un logiciel gratuit accessible en ligne (<http://agvgd.iarc.fr/>), publié par Sean V. Tavtigian en 2008 (Tavtigian et al, 2008).

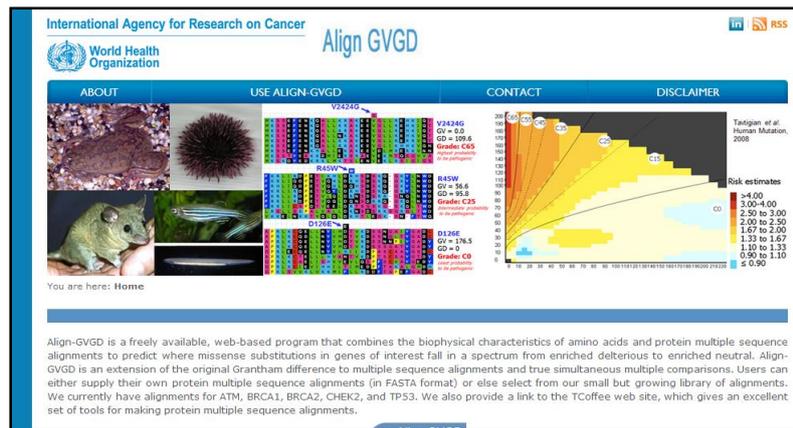


Figure 14: Interface du logiciel Align-GVGD (<http://agvgd.iarc.fr/>).

Ce logiciel combine l'alignement de séquences multiples et les caractéristiques biophysiques des acides aminés qui s'appuient sur la distance de Grantham (Figure 14). En effet, la distance de Grantham calcule l'écart physico-chimique entre deux acides aminés. Plus cette distance est élevée, plus les acides aminés en cause sont différents (Tavtigian et al, 2008). Ce logiciel prédit l'impact des mutations faux-sens sur la fonction de la protéine. Les résultats sont établis sous forme de classes [C0 à C65].

Les classes [C45 à C65] signifient que la mutation affecte la fonction, elle est dite «*more likely to affect the function*». A l'inverse, les classes [C0 à C25] indiquent que la substitution n'affecte pas la fonction, elle est dite «*less likely to affect the function*» (Tavtigian et al, 2008).

1.4. Prédiction de l'effet des mutations sur la stabilité de la protéine par le logiciel 2.0

L'effet stabilisant ou déstabilisant des mutations a été évalué par le logiciel I-Mutant 2.0 (Figure 15). Ce dernier a été conçu en 2005 par Capriotti et al, il est basé sur une approche de type Support Vector Machine (SVM) qui estime la différence d'énergie libre notée DDG entre la protéine sauvage et mutante. La prédiction se base sur la structure tertiaire ou de la séquence de la protéine (Capriotti et al, 2005). Une valeur $DDG > 0$ implique une augmentation de la stabilité de la protéine et à l'inverse une valeur $DDG < 0$ suggère un effet déstabilisant de la mutation.

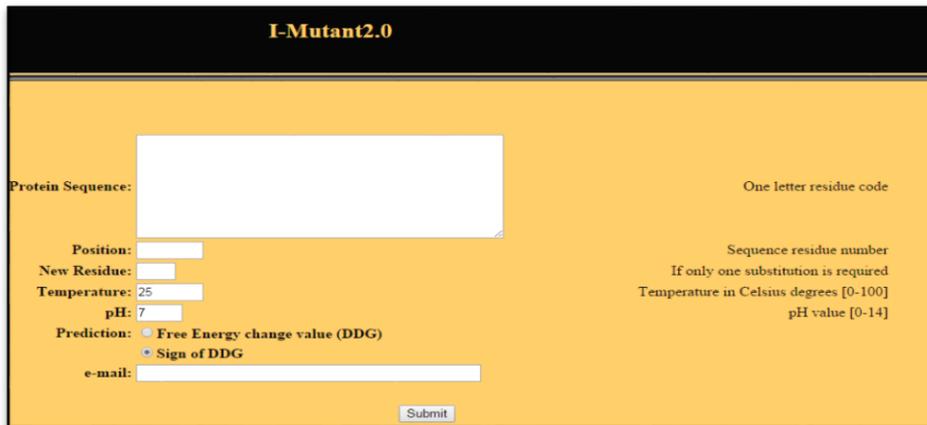


Figure 15: Interface du logiciel I-Mutant2.0

(<http://folding.biofold.org/cgi-bin/i-mutant2.0.cgi>).

1.5. Evaluation du potentiel pathogène des mutations par Mutation Taster

Mutation Taster est un logiciel gratuit, accessible sur le lien: <http://www.mutationtaster.org/> (Figure 16). Publié par Jana Marie Schwarz en 2010 (Schwarz et al, 2010).

Ce programme a été conçu pour l'évaluation rapide du potentiel pathogène des altérations de séquence de l'ADN. Il intègre des informations provenant de bases de données biomédicales ainsi que des analyses comprenant la conservation évolutive, les changements de site d'épissage et la perte de fonctions des protéines. Il prédit si variation de séquence est une mutation causale (*disease causing*) ou un polymorphisme (*polymorphism*)(Schwarz et al, 2010).

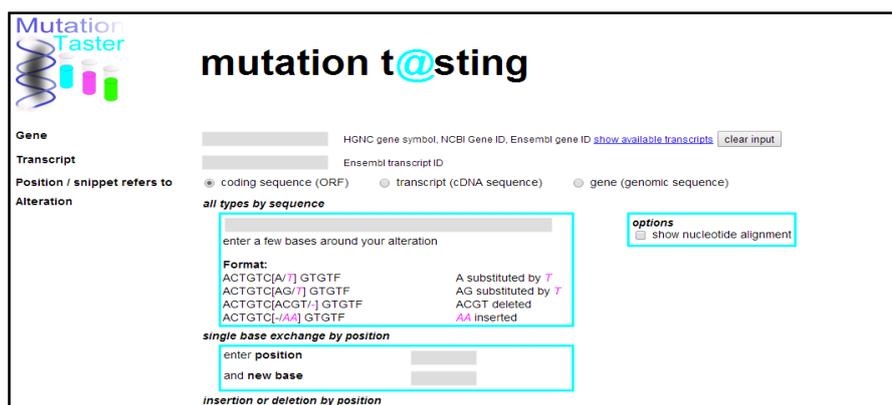


Figure 16: Interface du logiciel Mutation Taster

(<http://www.mutationtaster.org/>).

2. Modélisation de la protéine mutée en 3D par logiciel Swiss-Pdb Viewer

Nous avons utilisé le logiciel Swiss-Pdb Viewer pour étudier la modélisation moléculaire y compris l'effet de la variation d'acide aminé sur la structure 3D de la protéine CFTR, la prédiction de sa fonction ainsi que de sa stabilité. Ce programme permet d'effectuer plusieurs représentations comme : la substitution d'acide aminé, la rotation de la molécule dans l'espace, la mise en évidence de certaines liaisons, le calcul de la distance entre deux résidus, l'affichage en «ribbon», en bâtonnets et en boucle (Figure 17).



Figure 17: Barre de menu du logiciel Swiss PDB Viewer.

Afin de visualiser la structure 3D nous avons téléchargé le fichier de la protéine CFTR normal sous format pdb à partir de la banque protéique PDB accessible gratuitement (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>).

Objectifs
du travail de thèse

La mucoviscidose est une maladie génétique grave transmise selon un mode récessif autosomique. Plus de 1900 mutations ont été décrites dans le gène *CFTR*.

La caractérisation, la connaissance et la compréhension des évènements moléculaires à l'origine des anomalies de *CFTR* chez les patients, est un enjeu majeur à la fois pour le conseil génétique et pour orienter les axes de recherche d'un point de vue mécanistique puis à plus long terme thérapeutique.

Dans le travail de thèse « Etude génétique de la mucoviscidose dans la population Algérienne », nous avons effectué une étude moléculaire complète du gène *CFTR* afin de mettre en évidence les différentes mutations présentes dans la population Algérienne.

Dans le cadre de cette étude trois axes ont été développés:

Dans un premier temps, nous avons entrepris la recherche des mutations *CFTR* dans un échantillon d'enfants atteints et leurs apparentés (parents) originaires de la population Algérienne par le biais d'une trousse commerciale ELUCIGENE CF30™. Ce Kit conçu pour la population caucasienne a été utilisé pour la première fois dans la population Algérienne et fait l'objet d'une évaluation.

Dans un second temps, un balayage complet du gène a été effectué afin de déterminer les mutations non détectées par le Kit.

Et enfin, dans un troisième temps, nous proposons pour la première fois une modélisation des mutations qui semblent spécifiques à la population Algérienne, en utilisant des logiciels et outils de modélisation tridimensionnelle (3D). Cette modélisation nous permet de mieux apprécier l'impact des mutations sur la structure et/ou la fonction de la protéine.

Population d'étude
& méthodes

I. Population de l'étude

Notre travail a été réalisé sur une population de vingt-quatre (24) familles avec un enfant atteint de mucoviscidose. Les patients et leurs parents ont été recrutés au service de Pneumologie et Allergologie Pédiatriques de l'Etablissement Hospitalier Spécialisé Boukhroufa Abdelkader (EHS) Canastel-Oran, Algérie, sous la direction du Professeur agrégé Radoui Abdelkrim. L'ensemble des sujets inclus dans cette étude sont d'origine Algérienne.

Le diagnostic de la mucoviscidose repose sur les signes cliniques évocateurs et deux tests de sueur positifs ($>60\text{Mmole/L}$).

Après recueil du consentement éclairé en accord avec la déclaration d'Helsinki (Annexe 1), un volume de 15ml de sang a été prélevé par sujet sur une solution d'Ethylène Diamine Tétra Acétique (EDTA). Une fiche de renseignement (Annexe 2) regroupant les différents paramètres cliniques et biologiques nécessaires à l'étude a été établie. Les familles ont été désignées dans la présente étude par la mention 'F' suivie d'un chiffre romain. Les patients sont désignés par la mention CF suivie d'un chiffre arabe.

La représentation des généalogies des familles recrutées est donnée dans l'Annexe 3.

II. Méthodes

1. Méthodes d'exploration génétique

La stratégie élaborée pour la détection des mutations est la suivante: screener la mutation c.1521_1523delCTT (F508del) chez tous les cas et les parents par une réaction d'amplification en chaîne «PCR» (Polymerase Chain Reaction) suivie d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Les individus négatifs pour cette mutation sur un ou deux chromosomes sont ensuite explorés par PCR/ARMS (Amplification Refractory Mutation System) pour les 30 mutations les plus fréquentes dans la population européenne et ceci en utilisant un Kit commercial «Kit ELUCIGENE™ CF30» (Tepnel Diagnostics, 2004).

Les individus chez lesquels une/ou aucune mutation n'est détectée par les précédentes techniques sont explorés par analyse de séquence (séquençage).

Les mutations qui semblent spécifiques à la population Algérienne de part la littérature seront modélisées afin de mieux comprendre leurs effets sur la protéine et mieux apprécier la nature du défaut moléculaire à l'origine de la pathologie.

1.1.Extraction et dosage de l'ADN

L'ADN a été extrait à partir de 15ml de sang total par la technique de précipitation aux sels (salting out). Cette technique est basée sur le traitement des lysats de cellules blanches par une solution saline associée à la protéinase K (enzyme protéolytique) (Miller et al, 1988). Le protocole détaillé est donnée dans l'annexe 4.

L'estimation de la concentration de l'ADN se fait par la mesure de l'absorbance à 260nm. Sachant qu'une unité DO à 260nm est équivalente à 50 µg/ ml d'ADN. Ainsi, il est possible d'évaluer la qualité d'ADN d'un échantillon par la formule: Facteur de la dilution*50*DO₂₆₀.

Un ADN de bonne qualité (sans contamination par les protéines) présente un rapport DO₂₆₀/DO₂₈₀ compris entre 1,5 et 2.

1.2. Première approche : Détection de la mutation c.1521_1523delCTT (F508del)

- *Amplification de la région d'intérêt*

Exploration de la mutation c.1521_1523delCTT (F508del) qui correspond à la perte de 3 nucléotides (CTT) au niveau du 10^{ème} exon, précisément en position 508 de la protéine CFTR, par la technique de PCR.

Dans un premier temps, la région encadrant la mutation (Figure 18), a été amplifiée par PCR en utilisant un couple d'amorces noté P1 et P2 pour Primer 1 et Primer 2.



Figure 18: Séquence d'ADN avec amorces encadrant la région d'intérêt (la position 508).

-  : Partie de l'intron 9
-  : Exon 10
-  : Amorce P1
-  : Amorce P2
-  : 3 bases délétées correspondant à la perte d'une phénylalanine au niveau protéique
-  : Partie de l'intron 10

La séquence des amorces P1 et P2 est donnée dans le tableau I.

Tableau I: Séquences des amorces encadrant la mutation c.1521-1523delCTT (F508del)

N°d'amorce	Séquence de l'amorce	Température d'hybridation
Amorce P1	3' GTTGGCATGCTTTGATGACGCTTC 5'	58°C
Amorce P2	5' GTTTCCTGGATTATGCCTGGCAC 3'	58°C

L'amplification a été réalisée dans un volume final de 30µl contenant 22,8µl d'eau distillée, 3µl de tampon (TP10X+ MgCl₂), 0,6µl de dNTP (10mM), 0,9µl de chaque amorce (10mM), 0,3µl (0,75U/µl) de la Taq polymérase JumpStar (Sigma-Aldrich) (2,5U/µl) et 1,5µl d'ADN. Un tube contenant le mélange réactionnel sans ADN (témoin négatif) est systématiquement utilisé pour détecter toutes contaminations.

La réaction de PCR a été effectuée dans un thermocycleur «**Flexigene, Tchné®**» selon un programme bien défini (Tableau II).

Tableau II: Programme de la PCR

Phases	Etapes	Temps (min)	Température (°C)	Cycle (s)
Phase1	Dénaturation	20	94	1
Phase2	Dénaturation	30	94	36
	Hybridation	2	58	
	Elongation	1	72	
Phase3	Elongation Finale	20	72	1

- **Formation des hétéroduplexes**

Etant donné que nous ne disposons pas au départ des témoins hétérozygotes pour la mutation c.1521_1523delCTT (F508del), il était indispensable de générer des hétéroduplexes *in vitro*. Nous avons réalisé un mix contenant l'ADN amplifié d'un sujet atteint avec un ADN d'un sujet normal. La dénaturation renaturation permet d'obtenir un hétéroduplex grâce au programme présenté dans le tableau III.

Tableau III: Programme de formation des hétéroduplexes

Température (C°)	Temps (min)
94°	5 min
4°	3 min
65°	10 min
20°	5 min

- ***Test d'amplification***

Le produit d'amplification de la région encadrant la mutation c.1521_1523delCTT (F508del) du gène *CFTR* est testé par électrophorèse sur gel d'agarose à 3% (1,5g d'agarose standard) dans 50 ml de TBE1/X [tris à 0,089M/ EDTA à 0,25mM /acide borique à 0,089M/ pH =8] en présence d'un marqueur de taille (100pb) (Biolab New-England). Durant la préparation du gel on ajoute 4 µl de Bromure d'Éthidium (BET Sigma-Aldrich) qui est un agent intercalant entre les bases azotées.

Dans chaque puits du gel, on dépose 10 µl d'un mélange contenant 5µl de produit d'amplification et 5µl de tampon de charge composé de Bleu de Bromophénol Sucrose (BBS) 6X. Le tampon de charge permet de donner le front de migration et alourdit l'ADN afin qu'il reste au fond des puits lors du dépôt et de l'électrophorèse. La migration se fait pendant 30 min à 100 V.

Les résultats ont été visualisés aux ultraviolets (UV) grâce à la fluorescence du Bromure d'Éthidium (BET) incorporé dans le gel. Le gel a été photographié à l'aide d'un appareil polaroïd adapté sous les UV d'un transilluminateur.

- ***Electrophorèse sur gel de polyacrylamide***

Après amplification de la région d'intérêt par PCR, on procède à une séparation des fragments amplifiés par une électrophorèse verticale sur gel de polyacrylamide (29:1) (ratio acrylamide/ bisacrylamide) à 12 %. La concentration choisie est en fonction de la taille du fragment attendu 98 et 95 pb. Le gel de polyacrylamide est plus résolutif que l'agarose. Il permet de discriminer jusqu'à une paire de base (sachant que la mutation recherchée est une délétion de 3 bases).

Le gel de polyacrylamide est une matrice de séparation utilisée en électrophorèse de biomolécule. Il est constitué d'acrylamide qui est l'unité de base et de bisacrylamide (méthylène-bisacrylamide) qui est l'agent pontant. En fonction des différents taux de ces deux substances on obtient différents maillages et donc différentes densités du gel. La réaction de polymérisation se fait grâce à l'ajout de deux substances réactives: le "TEMED" (*Tetra-Methyl-Ethylene-Diamine*) et "persulfate d'ammonium" (PSA) qui en réagissant avec la lumière, deviennent des anions hyper réactifs enclenchant la polymérisation.

a-Préparation du gel à 12%

La plaque à électrophorèse sert à couler le gel, elle se compose de deux plaques en verre de dimension différente (10cm x 10cm), de deux espaceurs latéraux (Spacer) de 1mm et d'un joint en caoutchouc. Tous ces éléments lavés avec du détergent, rincés à l'éthanol 70% et séchés pour éliminer toutes traces d'eau. Le gel de polyacrylamide à 12% est préparé à partir de 7,5 ml de solution d'acrylamide-bisacrylamide 29:1, de 2,5 ml TBE10X, de 175 µl Persulfate d'ammonium (PSA) à 10% et de 15 ml d'eau distillée stérile. La polymérisation du gel est assurée par addition de 20 à 25µl de TEMED. Le gel est coulé verticalement à l'aide d'une seringue entre les deux plaques de verre en mettant au-dessus un peigne à dents pour former les puits après polymérisation de ce dernier (Figure 19).



Figure 19: Photo de la cuve d'électrophorèse (*Laboratoire LGMC-USTO-MB*)

b-Conditions de migration

Dans chaque puits 15 µl d'un mélange contenant 12µl de produit d'amplification et 3µl de tampon de charge composé de bleu de bromophénol sucrose 6X est déposé. La migration se fait pendant 45 min à 160V; sachant que l'ADN migre deux fois moins vite que le bleu de bromophénol.

c-Coloration au BET

Après migration, le gel est plongé dans un bain contenant BET et TBE1X pendant 10 min puis visualisé sur une plaque d'UV.

➤ **Résultats attendus**

Après visualisation du gel trois situations peuvent se présenter:

- Sujets avec deux allèles c.1521_1523delCTT (F508del): Homoduplex de 95pb.
- Sujets avec un allèle c.1521_1523delCTT (F508del): Homoduplex 95pb, Homoduplex 98pb, hétéroduplex 98/95pb.
- Sujets avec deux allèles non c.1521_1523 (F508del): Homoduplex 98pb.

1.3. Deuxième approche : Recherche des 30 mutations *CFTR* par PCR/ARMS

Les 30 mutations les plus fréquentes dans la population européenne sont recherchées par une technique PCR/ARMS grâce au Kit ELUCIGENE™ CF30. Le principe de l'ARMS est que les oligonucléotides avec un résidu incohérent 3' ne fonctionneront pas comme amorces de PCR dans des conditions spécifiques. Une sélection des oligonucléotides adéquats permet aux séquences de mutant spécifique ou d'ADN normal d'être amplifiées ou détectées.

Ce kit est conçu pour la détection qualitative simultanée in vitro des 30 mutations suivantes: c.3276C>A (Y1092X), c.1585-1G>A (1717-1G>A), c.1624G>T(G542X), c.3846G>A (W1282X), c.3909C>G (N1303K), c.1521_1523delCTT (F508del), c.3718-2477C>T (3849+10kbC>T), c.262_263delTT (394delTT), c.489+1G>T(621+1G>T), c.1657C>T (R553X), c.1652G>A (G551D), c.350G>A(R117H), c.3484C>T (R1162X), c.1000C>T (R334W), c.1364C>A (A455E), c.2051_2052delinsG (2183AA>G), c.3528delC (3659delC), c.948delT (1078delT), c.1519_1521delATC (I507del), c.1040G>C (R347P), c.3752G>A (S1251N), c.178G>T (E60X), c.1680-877FG>T (1811+1.6kbG>A), c.3140-26A>G (3272-26A>G), c.2988+1G>A (3120+1G>A), c.2657+5G>A (2789+5G>A),

c.579+1G>T (711+1G>T), c.254G>A (G85E), c.366T>A (Y122X) et c.2538G>A (W846X) du gène CTFR (Tepnel Diagnostics, 2004).

Ce kit permet de distinguer les individus qui sont hétérozygotes ou homozygotes pour la mutation c.1521_1523delCTT (F508del). En parallèle, ce même Kit permet de valider les résultats obtenus par la première approche.

- *Composants du Kit*

Le kit comprend quatre (4) tubes d'amorces A, B, C et D.

Chaque tube contient un mélange réactionnel d'amorce bien spécifique, également des amorces de contrôle et les triphosphates désoxynucléotides dans un tampon. Un tampon de dilution, du colorant de charge et de l'AmpliTaq Gold.

- **Préparation des amplimères**

Pour une réaction PCR, nous réalisons un mélange réactionnel contenant 2,8µl d'H₂O, 0,33µl de tampon, 1,67µl de colorant, 10µl de mélange réactionnel d'amorces 0,2µl de TaqGold. Une quantité de 1µl d'ADN [10ng/µl] est ajoutée. L'amplification a été effectuée dans un thermocycleur « **Flexigene, Tchne** ® » selon un programme bien défini.

- **Programme d'amplification**

Il est impératif de programmer le thermocycleur avec un cycle unique pour activer l'AmpliTaq Gold à 94°C pendant 20 minutes, puis suivre le programme indiqué dans le tableau IV.

Tableau IV: Programme de la PCR/ARMS (Kit ELUCIGENE CF30®)

Phases	Etapes	Temps (min)	Température (°C)	Cycle (s)
Phase1	Activation de la Taq Gold	20	94	1
Phase2	Dénaturation	30'	94	35
	Hybridation	2	58	
	Elongation	1	72	
Phase3	Elongation Finale	20	72	1

- **Electrophorèse sur gel d'agarose NuSieve 3:1 à 3%**

Les produits d'amplification sont testés par électrophorèse sur gel d'agarose NuSieve 3:1 (de Cambrex Bioscience) à 3%, en utilisant du TBE/BET (Tris Borate EDTA/Bromure d'Ethidium) comme tampon et en présence d'un marqueur de taille (100 pb) (d'Amersham Pharmacia Biotech). Le temps de migration est de 1h30 à 70V.

- **Interprétation des résultats**

Les produits de PCR sont observés en bandes en traînées sur les pistes du gel.

Afin de bien interpréter les résultats il est impératif que:

1. Les bandes supérieures et inférieures soient clairement visibles dans tous les échantillons (voir Figure 20).
2. Aucune des traînées ne doit posséder de taches excessives et de fond fluorescent.
3. Les positions supérieures et inférieures des bandes de contrôle doivent indiquer la taille moléculaire correcte (voir Figure 20).
4. Le contrôle négatif ne montre aucune bande dans la partie définie par les bandes supérieures et inférieures. Une bande de diagnostic ne doit pas être interprétée si une bande similaire apparaît également dans le contrôle négatif pour la série de PCR, car ceci est une indication de contamination par ADN ou de produits de PCR.

Si un des points décrits précédemment n'est pas observé, les résultats ne doivent pas être interprétés et il faut procéder à un autre test.

5. La présence de produit de PCR générée à partir de l'amorce normale c.1521_1523delCTT (F508del) dans la piste B indique que l'échantillon contient la séquence normale pour ce site. Le produit de PCR normal sera observé dans la traînée de la piste B du gel à 160pb et est identifié en comparant la position de la bande à la traînée du marqueur adjacent.

6. Les produits de PCR des individus qui portent n'importe quelles des mutations c.3276C>A (Y1092X), c.1585-1G>A (1717-1G>A), c.1624G>T (G542X), c.3846G>A (W1282X), c.3909C>G (N1303K), c.1521_1523delCTT (F508del) et c.3718-2477C>T (3849+10kbC>T) sont observés dans la traînée de gel de la piste A et sont identifiés en comparant la position de chaque bande à l'aide d'une traînée de marqueur adjacente. Les tailles des bandes de produit dans les paires de base sont montrées sur la figure 20. Seules les bandes de produit de la taille requise doivent être interprétées.

7. Les produits de PCR des individus qui portent n'importe quelles des mutations c.262_263delTT (394delTT), c.489+1G>T (621+1G>T), c.3752G>A (S1251N), c.1652G>A (G551D), c.350G>A (R117H), c.3484C>T (R1162X), et c.1000C>T (R334W) sont observés dans la traînée de gel de la piste B et sont identifiés en comparant la position de chaque bande à l'aide d'une traînée de marqueur adjacente. Les tailles des bandes de produit dans les paires de base (pb) sont montrées sur la figure 20. Seules les bandes de produit de la taille requise doivent être interprétées.

8. Les produits de PCR des individus qui portent n'importe quelles des mutations c.2051_2052delinsG (A455E), 2183AA>G, c.3528delC (3659delC), c.948delT (1078delT), c.1519_1521delATC (I507), c.1040G>C (R347P), c.1657C>T (R553X) et c.178G>T (E60X) sont observés dans la traînée de gel de la fiole C et sont identifiés en comparant la position de chaque bande à l'aide d'une traînée de marqueur adjacente. Les tailles des bandes de produit dans les paires de base sont montrées sur la figure 20. Seules les bandes de produit de la taille requise doivent être interprétées.

9. Les produits de PCR des individus qui portent n'importe quelles des mutations :

c.1680-877FG>T (1811+1.6kbG>A), 3272-26G>A, c.2988+1G>A (3120+1G>A), c.2657+5G>A (2789+5G>A), c.579+1G>T (711+1G>T), c.254G>A (G85E), c.366T>A (Y122X) et c.2538G>A (W846X) sont observés en bandes et sont identifiés en comparant la position de chaque bande à l'aide d'une traînée de marqueur adjacente. Les tailles des bandes de produit dans les paires de base (pb) sont montrées sur la figure 20. Seules les bandes de produit de la taille requise doivent être interprétées.

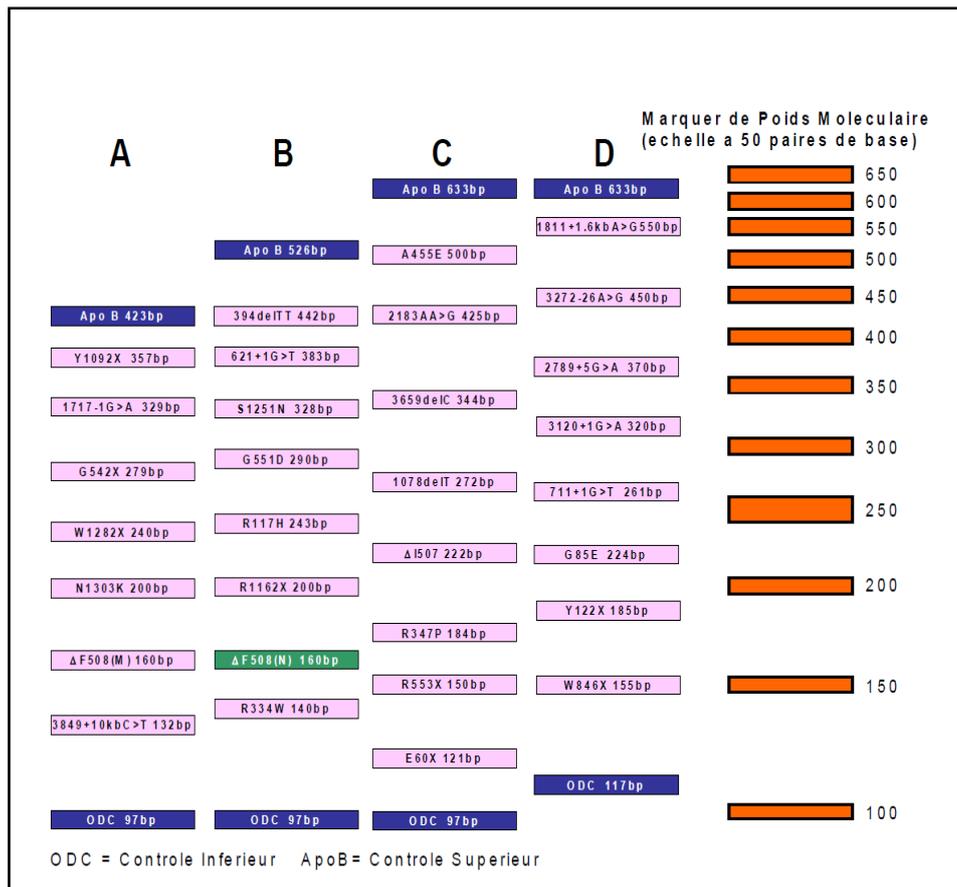


Figure 20: Diagramme d'interprétation des résultats du Kit ELUCIGENETM CF30

(Tepnel Diagnostics, 2004).

• **Remarque**

c.1521_1523delCTT (F508del): Lorsque un individu est homozygote la bande contrôle de la piste «B» n'apparaît plus.

1.4. Troisième approche : Analyse des séquences (séquençage)

Les individus chez lesquels aucune, voir une seule mutation est détectée sont screenés par séquençage complet. Les ADN ont été séquencés au laboratoire LGMC, USTO-MB, et au service d'endocrinologie et maladies rares de l'hôpital Mère Enfant Lyon (France). Par ailleurs, des confirmations de génotypes ont été réalisées pour certains ADN par la société GENOSCREEN (France).

• **Principe de la technique**

Cette méthode est basée sur l'incorporation des ddNTPs qui bloquent l'extension du fragment. En effet, ils sont dépourvus de groupement hydroxyle en 3' donc ils ne peuvent pas former une liaison phosphodiester 3'→5'. Chaque ddNTP est marqué par un fluorochrome

différent (La qualité du séquençage est basée sur la proportion dNTP/ddNTP). La réaction comporte trois étapes qui se dérouleront à des températures différentes de façon cyclique; L'ADN bicaténaire est au préalable dénaturé à 96°C, puis une amorce va s'hybrider sur l'ADN simple brin à 50°C et enfin une extension est réalisée à 60°C.

Le mélange réactionnel utilisé est le «Big Dye Terminators versions v1.1 (BDT v1.1)» (Applied Biosystems®), et la migration électrophorétique des séquences est réalisée sur le séquenceur automatique ABI PRISM 310. Après installation de la plaque (où on a déposé les produits de séquence purifiés) dans l'appareil, l'échantillon d'ADN va être injecté d'une façon électrocinétique, séparé par électrophorèse capillaire, illuminé par un laser.

La fluorescence ainsi émise par chaque ddNTP est collectée par une caméra CCD et restituée sous forme de chromatogrammes.

- **Conditions de séquençage**

-Amplification par PCR

Au cours de cette étape chaque région est amplifiée en utilisant les amorces spécifiques.

Les amorces sont choisies de façon à couvrir le fragment amplifié, il existe des amorces sens (F) et des amorces anti-sens (R), les séquences des amorces ainsi que les tailles des amplimères attendus sont représentés dans le tableau V. Le protocole détaillé est donné dans l'annexe 5.

Tableau V : Oligonucléotides utilisés pour l'amplification des exons du gène *CFTR* par PCR.

Exon	PCR Primer 5' → 3'	Taille du fragment amplifié (pb)
1	GGAGTTCACCTAAA (B115-B) ACACGCCCTCCTCTTCGTG (10D)	933
2	CCAAATCTGTATGGAGACCA (2i-5) TATGTTGCCCAGGCTGGTAT (2i-3)	378
3	CTTGGGTTAATCTCCTTGGA (3i-5) ATTCACCAGATTCGTAGTC (3i-3)	309
4	TCACATATGGTATGACCCTC (4i-5) TTGTACCAGCTCACTACCTA (4i-3)*	438
5	ATTTCTGCCTAGATGCTGGG (5i-5) AACTCCGCCTTCCAGTTGT (5i-3)	395
6a	TTAGTGTGCTCAGAACCACG (6Ai-5) TATGCATAGAGCAGTCCTG (6Ai-3)	385
6b	TGGAATGAGTCTGTACAGCG (6Ci-5) GAGGTGGAAGTCTACCATGA (6Ci-3)	417
7	AGACCATGCTCAGATCTTCCAT (7i-5) GCAAAGTTCATTAGAAGTATC (7i-3)	410
8	TGAATCCTAGTGTGGCAA (8i-5) TCGCCATTAGGATGAAATCC (8i-3)	359
9	TAATGGATCATGGCCATGT (9i-5) ACAGTGTGAATGTGGTGCA (9i-3)	561

10	GCAGAGTACCTGAAACAGGA (10i-5) CATTACAGTAGCTTACCCA (10i-3)	491
11	CAACTGTGGTTAAAGCAATAGTGT (11i-5) GCACAGATTCTGAGTAACCATAAT (11i-3)	425
12	GTGAATCGATGTGGTGACCA (12i-5) CTGGTTTAGCATGAGGCGGT (12i-3)	426
13	(a) TGCTAAAATACGAGACATATTGCA (13i-5) F ATCTGGTACTAAGGACAG (C1-1M)	528
	(b) TCAATCCAATCAACTCTATACGAA (X13B-5) TACACCTTATCCTAATCCTATGAT (13i-3A) R	497
14a	AAAAGGTATGCCACTGTAAAG (14Ai-5) GTATACATCCCCAACTATCT (14Ai-3)	511
14b	GAACACCTAGTACAGCTGCT (14Bi-5) AACTCCTGGGCTCAAGTGAT (14Bi-3)	449
15	GTGCATGCTTCTTAATGCA (15i-5) AAGGCACATGCCTCTGTGCA (15i-3)	485
16	CAGAGAAATTGGTCGTTACT (16i-5) ATCTAAATGTGGGATTGCCT (16i-3)	570
17a	CAATGTGCACATGTACCCTA (17Ai-5) TGTAACCAACTGTGGTAAG (17Ai-3)	579
17b	TTCAAAGAATGGCACCAGTGT (17Bi-5) ATAACCTATAGAATGCAGCA (17Bi-3)	463
18	GTAGATGCTGTGATGAACTG (18i-5) AGTGGCTATCTATGAGAAGG (18i-3)	451
19	GCCCGACAAATAACCAAGTGA (19i-5) GCTAACACATTGCTTCAGGCT (19i-3)	454
20	GGTCAGGATTGAAAAGTGTGCA (20i-5) CTATGAGAAAACCTGCACTGGA (20i-3)	473
21	AATGTTTACAAGGGACTCCA (21i-5) CAAAAGTACCTGTTGCTCCA (21i-3)	477
22	AAACGCTGAGCCTCACAAGA (22i-5) TGTCACCATGAAGCAGGCAT (22i-3)	562
23	AGCTGATTGTGCGTAACGCT (23i-5) TAAAGCTGGATGGCTGTATG (23i-3)	400
24	GGACACAGCAGTTAAATGTG (24i-5) ACTATTGCCAGGAAGCCATT (24i-3)	569

-Purification des produits d'amplification

Cette étape vise à l'élimination des amorces et des dNTPs en excès dans les produits d'amplification avant séquençage par l'action d'une phosphatase alcaline et d'une exonucléase. Cette purification a été réalisée en utilisant le Kit ExoSAP-IT (Affymetrix, Paris, France). Un volume de 1µl d'ExoSAP-IT est ajouté à l'amplimère. Ce mélange est incubé pendant 15 min à 37°C puis pendant 15 min à 80°C.

-Réaction de séquence

Cette étape de séquençage consiste en une réaction de séquence. Il s'agit d'une PCR non conventionnelle permettant la formation de nombreuses copies d'ADN de différentes tailles du fragment d'ADN à séquencer. La taille du fragment d'ADN dépend du nombre de dNTP qui seront polymérisés par la Taq polymérase avant qu'un ddNTP ne vient s'incorporer à la séquence d'ADN.

Dans chaque tube de la réaction de séquence, il faut mettre, un mix de séquence, du produit de PCR purifié et amorce sens ou anti-sens. Le Protocole détaillé est donné dans l'Annexe 5.

-Purification des produits de séquence

La purification des produits de séquence permet d'éliminer les réactifs en excès et de reprendre le produit final dans une solution adaptée à la migration électrophorétique.

Cette purification repose sur une purification EDTA/éthanol. 11,36mM d'EDTA, 0,27M d'acétate de sodium, 83% d'Ethanol sont ajoutés au produit de réaction de séquence. Ce mélange est incubé pendant 15 min à 37°C puis centrifugé 45 min à 2000g à 4°C. Le culot est ensuite repris dans 15 µl de Hi-Di formamide (Applied Biosystem, Foster City, Etats-Unis).

-Electrophorèse capillaire

Les échantillons sont chargés sur le séquenceur ABI PRISM 310 (Applied Biosystem, Forest City, Etats-Unis) pour réaliser l'électrophorèse capillaire. Les fragments d'ADN injectés vont migrer le long du capillaire dans le POP-6 (Applied Biosystem, Forest City, Etats-Unis) à une vitesse qui dépendra de leurs tailles.

2. Analyse bioinformatique

2.1. Analyse des séquences par Sequence Scanner Software 2

La recherche des variations à partir des chromatogrammes est effectuée à l'aide de logiciel d'analyse Sequence Scanner Software 2 (Applied Biosystems, Forest City, Etats-Unis). Ce logiciel permet l'interprétation de la séquence sous forme de tracé constitué de pics de différentes couleurs (vert, bleu, noir et rouge) correspondant à chacune des bases de la séquence à analyser (Figure 21).

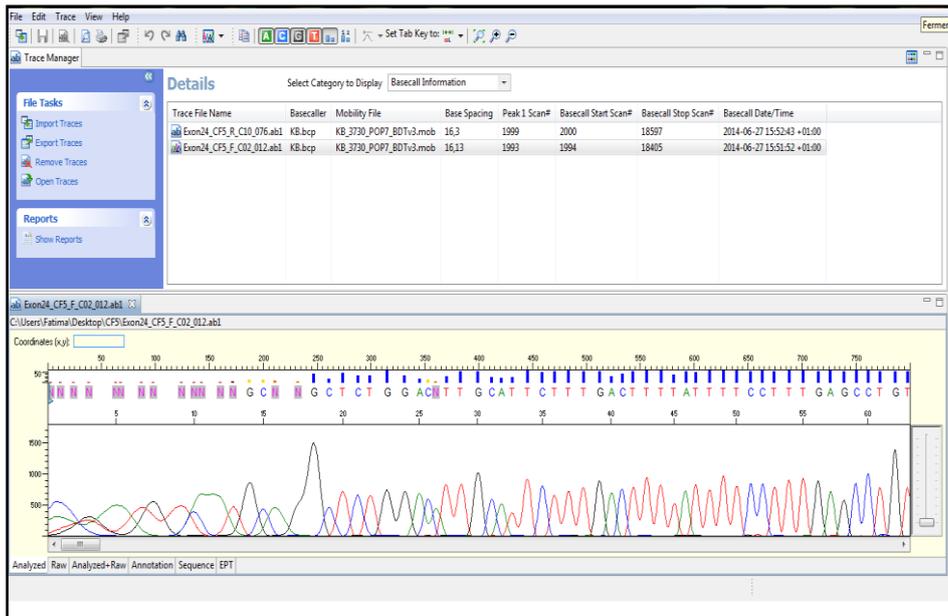


Figure 21: Interface du logiciel Sequence Scanner Software 2.

2.2. Analyse des séquences par MultAlin

L'analyse est complétée par un second logiciel « MultAlin » gratuit est accessible sur le net (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>), qui permet l'alignement des brins sens et anti-sens par rapport à la séquence de référence (Figure 22). Ce logiciel nous permet d'effectuer une comparaison entre les différentes séquences et de confirmer tout changement de base détecté par la première analyse.

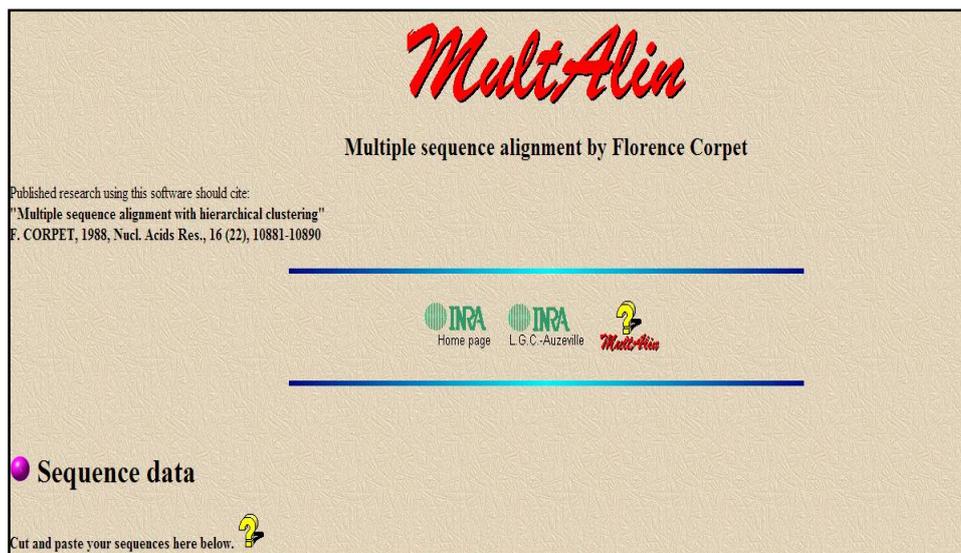


Figure 22: Interface du logiciel *MultAlin*

(<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>), mise à jour : 28/03/2000.

La partie résultats de cette thèse est représentée en trois parties. La première partie correspond aux résultats issus de la caractérisation des mutations responsables de la mucoviscidose dans la population Algérienne par PCR/ARMS et de l'évaluation du Kit ELUCIGENE CF30™. Ces derniers sont présentés sous forme d'un article original publié en 2014 dans le journal «*Annales de Biologie Clinique*».

La deuxième partie s'intéresse au screening complet du gène *CFTR* par analyse de séquences chez les patients, et prédiction *in silico* des effets délétères de la mutation c.422A>C (L227R).

Les résultats de cette partie ont été soumis dans un article original au journal of Applied Genetics.

Enfin, la troisième partie intitulée étude *in silico* des effets délétères des mutations qui semblent spécifiques à la population Algérienne de part la littérature. Certains résultats de cette partie sont reportés dans le second article.

Résultats

I. Détection des mutations *CFTR* par PCR/ARMS dans un échantillon de la population Algérienne

Article I: Accepté le 11 Avril 2014

Titre: Detection of *CFTR* mutations using PCR/ARMS in a sample of Algerian population

Auteurs: Fatima Zohra Sediki, Abdelkarim Radoui, Faiza Cabet, Faouzia Zemani-Fodil, Nadhira Saidi-Mehtar, Abdallah Boudjema.

1. Introduction

Longtemps considérée comme une pathologie européenne, la mucoviscidose est bien présente dans notre pays, même si sa fréquence exacte n'est pas connue, elle est actuellement plus fréquemment diagnostiquée.

Grâce aux progrès de la biologie moléculaire, il est désormais possible d'identifier les mutations du gène *CFTR* responsables de cette pathologie. La connaissance précise des mutations *CFTR* causales ou non causales présente un intérêt évident pour le diagnostic clinique et la recherche. Une meilleure compréhension des défauts moléculaires associés aux différentes mutations *CFTR* devrait servir de base au développement de nouveaux composés pharmaceutiques destinés à corriger les anomalies de la transcription ou améliorer l'adressage de la protéine.

De nombreuses études ont été effectuées afin de caractériser les mutations responsables de la mucoviscidose dans plusieurs populations. Cependant, très peu d'études ont concernés la population Algérienne. Dans cet axe de recherche, nous venons contribuer à la caractérisation génotypique en recherchant les 30 mutations les plus fréquentes chez les caucasiens grâce à la trousse commerciale ELUCIGENE CF30™. Dans un second temps, nous rapporterons pour la première fois l'évaluation de la trousse ELUCIGENE CF30™ dans notre pays, mais aussi au Maghreb.

2. Résultats

L'objectif principal de ce volet de thèse était la détection des mutations responsables de la mucoviscidose dans un échantillon de 24 patients appartenant à 24 familles non apparentés. Les résultats sont détaillés dans l'article publié inclus dans ce manuscrit page : 64-69.

Tous les résultats de la présente étude ont été validés par nos collaborateurs de l'hôpital Femme Mère Enfant, service d'Endocrinologie Moléculaire et Maladies rares de Bron Lyon.

Sur les 24 familles étudiées, 16 présentent une consanguinité soit 66,66%. 5 mutations ont été identifiées : c.1521_1523delCTT (F508del), c.579+1G>T (711+1G>T), c.1624G>T (G542X), c.3909C>G (N1303K), et c.1652G>A (G551D).

Chez 8 familles (33%) les enfants sont homozygotes, pour le reste des familles les enfants sont hétérozygotes composites. Toutes les données sont regroupées dans le tableau IV.

Tableau VI: Résultats des mutations CFTR retrouvées par le Kit ELUCIGENE CF30™ dans un échantillon de 24 familles Algérienne.

N° Famille	Consanguinité	Sexe	Mutations CFTR
1	Oui	M	*
		F	*
		M	*
2	Oui	M	*
		F	*
		M	*
3	Pas d'information	M	c. [1521_1523delCTT];[579G>T] (F508del/711+1G>T)
4	Non	M	c.[1652G>A];[=] (G551D/-)
		F	*
		M	c. [1652G>A];[?] (G551D/*)
5	Non	M	*
		F	*
		F	*
6	Oui	M	c.[3909C>G];[=] (N1303K/-)
		F	c.[3909C>G];[=] (N1303K/-)
		F	c.[3909C>G];[3909C>G] (N1303K/N1303K)
7	Non	M	*
		F	c. [1624G>T];[=] (G542X/-)
		M	c. [1624G>T];[?] (G542X/*)
8	Oui	M	c. [579G>T];[=] (711+1G>T/-)
		F	c. [579G>T];[=] (711+1G>T/-)
		M	c. [579G>T];[579G>T] (711+1G>T/711+1G>T)
9	Oui	M	c. [579G>T];[=] (711+1G>T/-)
		F	c. [1521_1523delCTT];[=] (F508del/-)
		M	c. [1521_1523delCTT];[579G>T] (F508del/711+1G>T)
10	Oui	M	*
		F	*
		F	*

11	Oui	M F M	c. [579G>T];[=] (711+1G>T/-) c. [579G>T];[=] (711+1G>T/-) c. [579G>T];[579G>T] (711+1G>T/711+1G>T)
12	Non	M F F	* c. [1521_1523delCTT];[?] (F508del/*) c. [1521_1523delCTT];[?] (F508del/*)
13	Oui	M F M	c. [1624G>T];[=] (G542X/-) c. [1624G>T];[=] (G542X/-) c. [1624G>T];[1624G>T] (G542X/G542X)
14	Oui	M F F	c. [1624G>T];[=] (G542X/-) c. [1624G>T];[=] (G542X/-) c. [1624G>T];[1624G>T] (G542X/G542X)
15	Non	M F M	* * *
16	Non	M F M	c.[1521_1523delCTT];[=] (F508del/-) c.[1521_1523delCTT];[=] (F508del/-) c.[1521_1523delCTT];[1521_1523delCTT] (F508del/F508del)
17	Oui	M F M	* * *
18	Non	M F M	* * *
19	Oui	M F F	c.[1521_1523delCTT];[=] (F508del/-) c.[1521_1523delCTT];[=] (F508del/-) c.[1521_1523delCTT];[1521_1523delCTT] (F508del/F508del)
20	Oui	M F F	* * *
21	Oui	M F F	* * *
22	Oui	M F M	* * *
23	Oui	M F M	c.[1521_1523delCTT];[=] (F508del/-) c.[1521_1523delCTT];[=] (F508del/-) c.[1521_1523delCTT]; [1521_1523delCTT] (F508del/F508del)
24	Oui	M F M	* * *

M: Masculin, F: Féminin, * : Mutation non détectée par le Kit ELUCIGEN CF30™. Les génotypes sont décrit comme suit : [allèle 1];[allèle2] suivant les recommandations de : Den Dunnen JT and Antonarakis SE. *Hum.Mutat* 2000; 15: 7-12.

Seules 5 mutations ont été mises en évidence parmi le panel des 30 proposées par le Kit, ce qui représente 46,66% des allèles. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau VII.

Tableau VII: Résultats des mutations identifiés dans un échantillon de 24 patients (48 chromosomes)

Mutations	Exon/Intron	Substitution nucléotide	Substitution Acide aminé	Nombre de chromosome	Fréquence (%)
c.1521_1523delCTT(F508del)	Exon 11	delCTT	del phe 507/508	9	18,75
c.579+1G>T (711+1G>T)	Intron 5	G→T711+1	Défaut d'épissage	6	12,5
c.1624G>T (G542X)	Exon 12	G→T 1756	Gly→Stop 542	5	10
c.3909C>G (N1303K)	Exon 24	C→G4041	Asn→Lys 1303	2	4
c.1652G>A (G551D)	Exon 12	C→A 1652	Gly→Asp 542	1	2
Total				23/48	47,25

La mutation c.1521_1523delCTT (F508del) a été retrouvée dans 9 allèles (9/48), c.579+1G>T (711+1G>T) dans 6 allèles (6/48), c.1624G>T (G542X) dans 5 allèles (5/48), c.3909C>G (N1303K) dans 2 allèles (2/48) et la c.1652G>A (G551D) dans seulement un 1 allèle (1/48). Nous avons comparé nos résultats à ceux obtenus par d'autres équipes, les résultats sont donnés dans le tableau VIII.

Tableau VIII: Comparaison des résultats obtenus dans notre étude avec ceux d'autres équipes de recherche.

Mutations détectées dans la population Algérienne	La présente étude (2013) (n=24)	Loumi O et al (1999) (n=10)	Boukari R et al (2005) (n=24)	Loumi O et al (2008) (n=36)	Cabet F et al (2010) (n=27)
c.1521_1523delCTT (F508del)	18,75%	20%	18%	16,7%	20%
c.579G>T (711+1 G>T)	12,5%	10%	10%	8,3%	19%
c.1624G>T (G542X)	10%	-	-	1,4%	-
c.3909C>G (N1303K)	4%	20%	15%	8,3%	-
c.1652G>A (G551D)	2%	-	-	-	-

Detection of *CFTR* mutations using PCR/ARMS in a sample of Algerian population

Détection des mutations *CFTR* par PCR/ARMS dans un échantillon de la population algérienne

Fatima Zohra Sediki¹
Abdelkarim Radoui²
Faiza Cabet³
Faouzia Zemani-Fodil¹
Nadhira Saidi-Mehtar¹
Abdallah Boudjema¹

¹ Laboratoire de génétique moléculaire et cellulaire, Université des sciences et de la technologie Mohamed Boudiaf (USTO-MB), Oran, Algérie
<sediki.fatima@gmail.com>

² Service de pneumologie et allergologie pédiatriques, Établissement hospitalier spécialisé (EHS) Canastel, Oran, Algérie

³ Service d'endocrinologie moléculaire et maladies rares, Hôpital Femme-Mère-Enfant, Bron-Lyon, France

Abstract. Cystic fibrosis (CF) is the most common autosomal recessive disease in Caucasians. Wrongly considered as a European disease, CF is found in Algeria; but the literature data on the clinical profile and the spectrum of *CFTR* gene mutations are poor. In this study we investigate twenty-four unrelated Algerian families, with at least one child with CF. DNA extracts from blood samples of patients and parents were screened for *CFTR* gene mutations using Elucigene CF30 Kit which is based on a PCR/ARMS technique. Only five different mutations were identified. On the 48 alleles studied, most common mutations were: c.1521_1523delCTT (F508del) 18.75%, c.579+1G>T (711+1G>T) 12.5%, c.1624G>T (G542X) 10.41%, c.3909C>G (N1303K) 4%, and c.1652G>A (G551D) 2%. The Elucigene CF30 kit highlights a portion of *CFTR* mutations in the Algerian population. It remains important for a first screening as it reveals the most common mutations. All this information is of interest for genetic testing and genetic counseling in Algeria and in European countries where immigration from the Maghreb is common.

Key words: cystic fibrosis, PCR/ARMS, Elucigene CF30 Kit, Algeria

Résumé. La mucoviscidose est la maladie autosomique récessive la plus fréquente chez les Caucasiens. Considéré à tort comme une pathologie européenne, la mucoviscidose est rapportée en Algérie, mais les données de la littérature sur le profil clinique et le spectre des mutations du gène *CFTR* sont pauvres. Dans cette étude, nous avons exploré vingt-quatre familles algériennes non apparentées, avec au moins un enfant atteint de mucoviscidose. L'ADN a été extrait à partir d'échantillons de sang. Les patients et les parents ont été testés pour les mutations du gène *CFTR* en utilisant le Kit Elucigene CF30 qui est basé sur une technique de PCR/ARMS. Seulement cinq mutations ont été identifiées. Sur les 48 allèles étudiés, les mutations les plus fréquentes étaient: c.1521_1523delCTT (F508del) 18,75%, c.579+1G>T (711+1G>T) 12,5%, c.1624G>T (G542X) 10,41%, c.3909C > G (N1303K) 4 %, et c.1652G >A (G551D) 2%. Le kit Elucigene CF30 met en évidence une partie des mutations *CFTR* dans la population algérienne. Il demeure important pour un premier dépistage, car il révèle les mutations les plus communes. Toutes ces informations sont d'intérêt pour le test génétique et le conseil génétique en Algérie, mais aussi pour les pays européens où l'immigration en provenance du Maghreb est importante.

Mots clés : mucoviscidose, PCR/ARMS, Kit Elucigene CF30, Algérie

Article received February 11, 2014,
accepted April 11, 2014

doi:10.1684/abc.2014.0989

Reprints: F.Z. Sediki

To cite this article: Sediki FZ, Radoui A, Cabet F, Zemani-Fodil F, Saidi-Mehtar N, Boudjema A. Detection of *CFTR* mutations using PCR/ARMS in a sample of Algerian population. *Ann Biol Clin* 2014; 72(5): 549-54 doi:10.1684/abc.2014.0989

Cystic fibrosis (CF) [MIM # 219700] is the most common autosomal recessive genetic disease, in Caucasian populations. It is due to the alteration of the *CFTR* (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) gene [MIM # 602421] which encodes a chloride channel protein essential for ion transport and epithelial cells homeostasis [1]. Alteration or loss of function of this protein leads to an imbalance of ion exchange, resulting in dehydration of the mucous secretions of many organs [2].

To date, more than 1900 mutations in the *CFTR* gene have been reported to the cystic fibrosis genetic analysis consortium [3]. The frequency of these mutations varies among different populations according to the geographical and ethnic origin of patients [4]. In Europe, the incidence of the CF is average 1/2000 to 1/4300 births. However, it is marked by local and regional variation [4].

Wrongly considered as a European disease, cystic fibrosis is found in the North African population. Studies have been done, in Algeria by Loumi O *et al.* and Cabet F *et al.* [5, 6] in Tunisia by Messaoud T *et al.* [7] and Morocco by Ratbi I *et al.* [8] confirmed the presence of this disease in these respective populations. However, no information is available about the incidence of CF in the Maghreb.

In Algeria, the literature data on the clinical profile of CF and the spectrum of *CFTR* gene mutations are poor. This study has two aims: the first one is to detect *CFTR* mutations in a sample of CF patients using a PCR/ARMS (polymerase chain reaction/ amplification refractory mutation system) technique and the second to evaluate the effectiveness of the Elucigene CF30 Kit (Tepnel Diagnostics, Oxon, United Kingdom) in the molecular diagnosis of CF in the Algerian population. This information is important in order to provide and improve the appropriate genetic services for CF patients and their families.

Materials and methods

Population study

A total of 24 unrelated Algerian families with at least one CF affected child were studied. In one family we have no information about the parents. The patients were referred to us by Pneumology and allergology department of the specialized hospital center, in Canastel, Oran (Algeria). CF diagnosis was based on clinical findings and repeated positive sweat chloride tests (>60 mmol/L). A written consent to the genetic study was obtained from all subjects.

DNA extraction

Blood samples were collected from the affected children, and their parents. Genomic DNA was extracted from peripheral blood leucocytes using the salting out method [9].

Mutation detection strategy

Mutations were detected as the following procedures. All samples were analyzed for 30 mutations using the Elucigene CF30 Kit (Tepnel Diagnostics, Oxon, United Kingdom) which detects point mutations or small deletions in deoxyribonucleic acid, using a method based on ARMS (amplification refractory mutation system) allele specific amplification technology.

The Elucigene CF30 Kit can identify the 30 most common mutations among Caucasian population at the same time:

c.3276C>A (Y1092X), c.1585-1G>A (1717-1G>A), c.1624G>T (G542X), c.3846G>A (W1282X), c.3909C>G (N1303K), c.1521_1523delCTT (F508del), c.3718-2477C>T (3849+10kbC>T), c.262_263delTT (394delTT), c.489+1G>T (621+1G>T), c.1657C>T (R553X), c.1652G>A (G551D), c.350G>A (R117H), c.3484C>T (R1162X), c.1000C>T (R334W), c.1364C>A (A455E), c.2051_2052delinsG (2183AA>G), c.3528delC (3659delC), c.948delT (1078delT), c.1519_1521delATC (F1507), c.1040G>C (R347P), c.3752G>A (S1251N), c.178G>T (E60X), c.1680-877FG>T (1811+1.6kbG>A), c.3140-26A>G (3272-26A>G), c.2988+1G>A (3120+1G>A), c.2657+5G>A (2789+5G>A), c.579+1G>T (711+1G>T), c.254G>A (G85E), c.366T>A (Y122X) and c.2538G>A (W846X) [10].

DNA was amplified following the amplification program from Elucigene CF30 work protocol. It consists on AmpliTaq Gold polymerase activation at 94°C for 20 minutes, followed by 35 cycles consisting of denaturation at 94°C for 30 seconds, primer attachment stage at 58°C for 2 minutes and extension at 72°C for 1 minute. At the end of the amplification program, the extension stage of the last cycle, at 72°C, was programmed to last 20 minutes [10].

PCR products were carried out on agarose gel 3% (NuSieve 3:1). Samples with c.1521_1523delCTT (F508del) mutation were validated on a non-denaturing 12% polyacrylamide gel [11].

Results

A total of 24 Algerian CF families were screened 16 of them were consanguineous (66.66%). Five mutations were identified. These mutations were: c.1521_1523delCTT (F508del), c.579+1G>T (711+1G>T), c.1624G>T (G542X), c.3909C>G (N1303K), and c.1652G>A (G551D).

In 8 families (33%), the children were homozygous for their mutations and 5 (17.85%) were compound heterozygous. All mutations and family details are summarized in *table 1*.

Table 1. CFTR mutations detected in a sample of 24 Algerian CF families.

Family	CM	Sex	CF mutations
1	Yes	M	*
		F	*
		M	*
2	Yes	M	*
		F	*
		M	*
3	No information	M	c. [1521_1523delCTT];[579+1G>T] (F508del/711+1G>T)
4	No	M	c.[1652G>A];[=] (G551D/-)
		F	*
		M	c. [1652G>A];[?] (G551D/*)
5	No	M	*
		F	*
		F	*
6	Yes	M	c.[3909C>G];[=] (N1303K/-)
		F	c.[3909C>G];[=] (N1303K/-)
		F	c.[3909C>G];[3909C>G] (N1303K/N1303K)
7	Yes	M	*
		F	c. [1624G>T];[=] (G542X/-)
		M	c. [1624G>T];[?] (G542X/*)
8	Yes	M	c. [579+1G>T];[=] (711+1G>T/-)
		F	c. [579+1G>T];[=] (711+1G>T/-)
		M	c. [579+1G>T];[579+1G>T] (711+1G>T/711+1G>T)
9	No	M	c. [579+1G>T];[=] (711+1G>T/-)
		F	c. [1521_1523delCTT];[=] (F508del/-)
		M	c. [1521_1523delCTT];[579+1G>T] (F508del/711+1G>T)
10	Yes	M	*
		F	*
		F	*
11	Yes	M	c. [579+1G>T];[=] (711+1G>T/-)
		F	c. [579+1G>T];[=] (711+1G>T/-)
		M	c. [579+1G>T];[579+1G>T] (711+1G>T/711+1G>T)
12	No	M	*
		F	c. [1521_1523delCTT];[?] (F508del/*)
		F	c. [1521_1523delCTT];[?] (F508del/*)
13	Yes	M	c. [1624G>T];[=] (G542X/-)
		F	c. [1624G>T];[=] (G542X/-)
		M	c. [1624G>T];[1624G>T] (G542X/G542X)
14	Yes	M	c. [1624G>T];[=] (G542X/-)
		F	c. [1624G>T];[=] (G542X/-)
		F	c. [1624G>T];[1624G>T] (G542X/G542X)
15	No	M	*
		F	*
		M	*
16	No	M	c.[1521_1523delCTT];[=] (F508del/-)
		F	c.[1521_1523delCTT];[=] (F508del/-)
		M	c.[1521_1523delCTT];[1521_1523delCTT](F508del/F508del)
17	Yes	M	*
		F	*
		M	*
18	No	M	*
		F	*
		M	*
19	Yes	M	c.[1521_1523delCTT];[=] (F508del/-)
		F	c.[1521_1523delCTT];[=] (F508del/-)
		F	c.[1521_1523delCTT];[1521_1523delCTT] (F508del/F508del)
20	Yes	M	*
		F	*
		F	*

Original article

Table 1. (Continued).

Family	CM	Sex	CF mutations
21	Yes	M	*
		F	*
		F	*
22	Yes	M	*
		F	*
		M	*
23	Yes	M	c.[1521_1523delCTT];[=] (F508del/-)
		F	c.[1521_1523delCTT];[=] (F508del/-)
		M	c.[1521_1523delCTT];[1521_1523delCTT](F508del/F508del)
24	Yes	M	*
		F	*
		M	*

CM: consanguineous marriage; *: Mutation none detected by the Elucigen CF30 Kit. Genotypes are described as: "[change allele 1];[change allele 2]" according to: Den Dunnen JT and Antonarakis SE. *Hum.Mutat* 2000; 15: 7-12.

Table 2. Mutation identification results in a sample of 24 CF Algerian patients (N=48 CF chromosomes).

Mutations	E/I ¹	Substitution nucleotide	Substitution Amino acid	N. of chromosomes	Frequency (%)
c.1521_1523delCTT (F508del)	Exon 11	delCTT	del phe 507/508	9	18.75
c.579+1G>T (711+1G>T)	Intron 5	G→T711+1	RNA splicing defect	6	12.5
c.1624G>T (G542X)	Exon 12	G→T 1756	Gly→Stop 542	5	10.41
c.3909C>G (N1303K)	Exon 24	C→G4041	Asn→Lys 1303	2	4
c.1652G>A (G551D)	Exon 12	C→A 1652	Gly→Asp 542	1	2
Total				23/48	47.66

¹: exon/intron

Table 3. Frequency of CFTR mutations in our sample compared to previous Algerian studies.

Mutations detected in the Algerian population	Present study (2013)	Loumi <i>et al.</i> (1999)	Boukari <i>et al.</i> (2005)	Loumi <i>et al.</i> (2008)	Cabet <i>et al.</i> (2010)
c.1521_1523delCTT (F508del)	18.75%	20%	18%	16.70%	20%
c.579+1G>T (711+1 G>T)	12.50%	10%	10%	8.30%	19%
c.1624G>T (G542X)	10.41%	-	-	1.40%	-
c.3909C>G (N1303K)	4%	20%	15%	8.30%	-
c.1652G>A (G551D)	2%	-	-	-	-

In screening the twenty four CF patients (48 chromosomes) for 30 mutations available in Elucigene kit. Only five mutations were found. These mutations were, as reported in table 2: c.1521_1523delCTT (F508del) in 9 alleles (9/48), c.579+1G>T (711+1G>T) in 6 alleles (6/48), c.1624G>T (G542X) in 5 alleles (5/48), c.3909C>G (N1303K) in 2 alleles (2/48) and c.1652G>A (G551D) in only 1 allele (1/48).

Our results were validated in the molecular endocrinology and rare diseases department, Femme Mere Enfant Hospital, Bron, Lyon (France), except for the c.1521_1523delCTT (F508del) mutation which was done in our laboratory.

Discussion

The c.1521_1523delCTT (F508del) was the most common mutation detected in the current study. Its frequency in our sample was 18.75%, which is comparable to the one reported by Boukari R *et al.* (18%), and not so far from the one reported by Cabet F *et al.* (20% in a sample of 27 CF patients) [12], [6] on table 3. Loumi O *et al.* [5] showed a frequency of 16.7%, which is less than our finding. This small variation can be explained by the limited size of our population sample. In comparing the present results to the ones obtained by Messaoud T *et al.* [7] in the Tunisian population, we notice that the frequency of this mutation

in our sample is low (18.75% vs. 50.4%). However, it is also comparable to reported data for Iranian populations [13]. In Europe, c.1521_1523delCTT (F508del) shows a northwest-to-southeast gradient, with a maximum (100%) of all CF chromosomes in the Faroe Islands of Denmark and a minimum (24.5%) in Turkey [14].

Beside the c.1521_1523delCTT (F508del), the c.579+1G>T (711+1G>T) was observed on two homozygous and two heterozygous, corresponding to 12.5% of CF chromosomes. This mutation has been first described with a high frequency in CF families living in Quebec. It had already been found in previous work of Loumi O *et al.* in 1999 and in 2008, in the Algerian population, respectively with a frequency of 10 and 8.3% [5, 15].

Cabet F *et al.*, reported a frequency of 19% in a sample of 27 Algerian CF patients; it was the second most frequent after the c.1521_1523delCTT (F508del) in their study [6].

Finding this mutation in our sample is further evidence that this splicing mutation is indeed present, in the Maghreb. It seems to be rare in European countries; it has been reported in Italy (1.3%), and Spain (1.3%) [16, 17]. The c.1624G>T (G542X) mutation was found on three CF patients, two of them were homozygous of which were from consanguine families. This mutation is considered as the most common mutation, in the Mediterranean regions of Europe and Africa [12]. It is supposed to be introduced into the Mediterranean region by the migration of Phoenicians [18].

The c.3909C>G (N1303K) was found only in one patient who was homozygous for this mutation. It has been reported as the second most frequent mutation after the c.1521_1523delCTT (F508del) in a sample of classic CF in Loumi O *et al.* work [5].

The c.3909C>G (N1303K) was known as a common mutation in the Mediterranean region [4]. It is described as the fourth mutation with a percentage of 5.92% in the Tunisian population [7].

However, the frequency of this mutation seems to be higher in Lebanese and Palestinian populations, respectively with a frequency of 20 and 21% [19, 20].

The c.1652G>A (G551D) known as the Celtic mutation was found in only one CF patient. It is more common in north-west, central Europe and in particular, the UK (3.1%) and also in Northern Ireland (3.7%), the Czech Republic (3.8%), and Ireland (5.7%) [14].

The Elucigene CF30 detected 5 mutations in our sample, which is about 16.66%.

Although, the detection rate seems low compared to European populations.

The ARMS-PCR method used by Elucigene CF30 Kit offers the possibility of a fast diagnosis; it allows having the results in one day. The simple protocol and minimal

equipment requirement (thermocycler and electrophoresis system) makes CF DNA analysis available to most laboratories with experience in PCR. The kit is sensitive even if the amount of DNA is small. This may be interesting for Guthrie cards or buccal cells.

One limitation of this kit is the inability to distinguish homozygous/heterozygous except for the c.1521_1523delCTT (F508del). However, this constraint is quickly exceeded if a family study is undertaken, and this is what we did in this study.

The kit detects some common mutations in the Mediterranean edges and does not detect specific mutations in the Algerian population as the c.422C>A (A141D), c.680T>G (L227R), and c.3907A>C (N1303H) [21, 22].

Even if the kit covers only 16.66% of the CF chromosomes, it remains interesting in first instance, the sequencing remains indispensable to the complete genetic study.

The most interesting is to develop in collaboration with Elucigene one specific Maghreb kit and include mutations which frequency is higher than 2% to improve coverage (current kit provides coverage for 85% of mutations involved in classic cystic fibrosis forms in France).

Conclusion

In the present study, we detected five mutations (c.1521_1523delCTT (F508del), c.579G+1>T (711+1G>T), c.1624G>T (G542X), c.3909C>G (N1303K), c.1652G>A (G551D) accounting for 47.66% of alleles, by the Elucigene CF30 kit. However, some of mutations remain uncharacterized in this case sequencing is required. To our knowledge, this is the first time that PCR/ARMS using Elucigene CF30 Kit is performed in Algeria, this contributed to an evaluation of this Kit in a sample of CF patients. All this information is of interest in designing an appropriate strategy for genetic testing of patients in Algeria and is interest for genetic counseling, a carrier screening program and eventually prenatal diagnosis.

Acknowledgements. We would like to thank all the CF families and their respective physician for their full collaboration in these investigations. We are grateful to Professor Yves Morel, Maryline Murena and Carole Jouault, member of Molecular endocrinology and rare disease Bron Lyon for excellent technical assistance. This work was supported by the Laboratory of molecular and cell genetics, University of science and technology of Oran and the Algerian ministry of higher education and scientific research.

Conflicts of interest: The authors declare no conflict of interest.

Original article

References

1. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem BS, Drumm ML, Melmer G, Dean M, *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989 ; 245 : 1059-65.
2. Kunzelmann K, Schreiber R. CFTR, a regulator of channels. *J Membr Biol* 1999 ; 168 : 1-8.
3. Database. Cystic fibrosis mutation <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>.
4. World health organization. The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis. Report of a joint meeting of WHO/ECFTN/ICF(M)A/ECFS. WHO/HGN/CF/WG/04.02. Geneva, WHO/HGN/CF/WG, 2004.
5. Loumi O, Ferec C, Mercier B, Creff J, Fercot B, Denine R, *et al.* CFTR mutations in the Algerian population. *J Cyst Fibrosis* 2008 ; 7 : 54-9.
6. Cabet F, Radoui A, Boggio D, Bellon G, Morel Y. Etude du gène CFTR chez 27 patients algériens. *Med Sci* 2010 ; 26 : 139.
7. Messaoud T, Bel Haj Fredj S, Bibi A, Elion J, Ferec C, Fattoum S. Molecular epidemiology of cystic fibrosis in Tunisia. *Ann Biol Clin (Paris)* 2005 ; 63 : 627-30.
8. Ratbi I, Genin E, Legendre M, Le Floch A, Costa C, Cherkaoui-Deqqaqi S, *et al.* Cystic fibrosis carrier frequency and estimated prevalence of the disease in Morocco. *J Cyst Fibrosis* 2008 ; 7 : 440-3.
9. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988 ; 16 : 1215.
10. Tepnel Diagnostics. Ltd, Elucigene TM CF 30 Instructions sheet, 2004.
11. Rommens J, Kerem BS, Greer W, Chang P, Tsui LC, Ray P. Rapid nonradioactive detection of the major cystic fibrosis mutation. *Am J Hum Genet* 1990 ; 46 : 395-6.
12. Boukari R, Smati-Bourtel L, Benhalla-Djadoun KN, Redjala O, Boufersaoui A, Douiri D, *et al.* Caractéristiques cliniques et corrélations génotypiques de la mucoviscidose en Algérie. *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2005 ; 45 : 565-70.
13. Alibakhshi R, Kianishirazi R, Cassiman JJ, Zamani M, Cuppens H. Analysis of the CFTR gene in Iranian cystic fibrosis patients : identification of eight novel mutations. *J Cyst Fibros* 2008 ; 7 : 102-9.
14. Bobadilla JL, Macek M, Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis : a worldwide analysis of CFTR mutations—correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat* 2002 ; 19 : 575-606.
15. Loumi O, Baghriche M, Delpech M, Kaplan JC, Bienvenu T. Analysis of the complete coding region of the CFTR gene in ten Algerian cystic fibrosis families. *Hum Hered* 1999 ; 49 : 81-4.
16. Castaldo G, Rippa E, Sebastio G, Raia V, Ercolini P, de Ritis G, *et al.* Molecular epidemiology of cystic fibrosis mutations and haplotypes in southern Italy evaluated with an improved semi-automated robotic procedure. *J Med Genet* 1996 ; 33 : 475-9.
17. Chillon M, Casals T, Gimenez J, Nunes V, Estivill X. Analysis of the CFTR gene confirms the high genetic heterogeneity of the Spanish population : 43 mutations account for only 78% of CF chromosomes. *Hum Genet* 1994 ; 93 : 447-51.
18. Loirat F, Hazout S, Lucotte G. G542X as a probable Phoenician cystic fibrosis mutation. *Hum Biol* 1997 ; 69 : 419-25.
19. Farra C, Menassa R, Awwad J, Morel Y, Salameh P, Yazbeck N, *et al.* Mutational spectrum of cystic fibrosis in the Lebanese population. *J Cyst Fibros* 2010 ; 9 : 406-10.
20. Laufer-Cahana A, Laufer-Cahana A, Lerer I, Sagi M, Rachmilewitz-Minei T, Zamir C, *et al.* Cystic fibrosis mutations in Israeli Arab patients. *Hum Mutat* 1999 ; 14 : 543.
21. Gouya L, Pascaud O, Munck A, Elion J, Denamur E. Novel mutation (A141D) in exon 4 of the CFTR gene identified in an Algerian patient. *Hum Mutat* 1997 ; 10 : 86-7.
22. Zielenski J, Bozon D, Kerem B, Markiewicz D, Durie P, Rommens JM, *et al.* Identification of mutations in exons 1 through 8 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics* 1991 ; 10 : 229-35.

II. Etude du spectre mutationnel du gène *CFTR* dans la population Algérienne: Etude moléculaire et analyse *in silico*.

Article II: Soumis le 20/01/2015.

Journal: Journal of Applied Genetics

Titre: Spectrum of *CFTR* mutations in the Algerian population: Molecular and computational analysis.

Auteurs: Fatima Zohra Sediki, Abdelkarim Radoui, Abdallah Boudjema, Meriem Abdi, Faouzia Zemani-Fodil, Nadhira Saidi-Mehtar, Faiza Cabet.

1. Introduction

Les mutations du gène *CFTR* peuvent être recherchées par différentes techniques. Les trousse de diagnostic commercialisées permettent la détection de mutations les plus fréquentes (entre 20 et 36 selon la trousse utilisée), couvrant environ 80% des mutations responsables de la mucoviscidose en Europe. Dans notre premier volet nous nous sommes rendue compte que ce taux de détection est loin des 80% retrouvés en Europe, le taux d'allèles CF détecté dans notre cohorte était de 47,66% d'où la nécessité d'un criblage complet du gène *CFTR*.

Dans ce second volet, nous avons entrepris un séquençage complet des 27 exons du gène ainsi que la totalité des introns composant ce dernier d'une part. D'autre part, nous nous sommes intéressés à la mutation c.680T>G (L227R), de part la littérature celle-ci semble spécifique à la population Algérienne. L'étude *in silico* permet une meilleure compréhension de l'effet et de l'impact de cette dernière sur le dysfonctionnement de la protéine.

2. Résultats

Les résultats de la détection des mutations responsables de la mucoviscidose chez 21 patients CF par séquençage sont détaillés dans l'article II inclus dans ce manuscrit pages:74-87.

La recherche des mutations par criblage complet du gène *CFTR* a révélé 14 mutations différentes dont une nouvelle jamais décrite dans la littérature. Les fréquences des mutations sont regroupées dans le tableau IX.

Tableau IX: Mutations détectées chez 21 patients mucoviscidosiques Algériens (N=42 chromosomes).

Mutations	Exon/ Intron	Substitution nucléotide	Acide amine substitué	Nombre de chromosomes porteurs	Fréquence (%)
c.1521_1523delCTT (F508del)	Exon 11	delCTT	Délétion de Phe à la position 508	9	21,42
c.579+1G>T (711+1G>T)	Intron 5	G>T 711+1	Défaut d'épissage	6	14,28
c.680T>G (L227R)	Exon 6	T>G 812	Leu>Arg 227	4	9,52
c.1624G>T (G542X)	Exon 12	G>T 1756	Gly>Stop 542	4	9,52
c.3909C>G (N1303K)	Exon 24	C>G 4041	Asn>Lys 1303	2	4,76
c.595C>T (H199Y)	Exon 6	C>T 727	His>Tyr 199	2	4,76
c.2988+1G>A (3120+1G>A)	Intron 18	G>A 3120+1	Défaut d'épissage	2	4,76
c.1673T>C (L558S)	Exon 12	T>C 1805	Leu>Ser 558	2	4,76
c.2051_2052delAAinsG (2183AA>G)	Exon 14	A>G 2183 délétion de A à la position 2184	Décalage du cadre de lecture	2	4,76
c.4340 del (4472delT)	Exon 27	Délétion de T à la position 4472	Codon Stop	1	2,38
c.868C>T (Q290X)	Exon 7	C>T 1000	Gln>Stop 290	1	2,38
c.1766+3A>C (1898+3A>C)	Intron 13	A>C19898+3	Défaut d'épissage	1	2,38
c.1652G>A (G551D)	Exon 12	G>A 1784	Gly>Asp 551	1	2,38
c.1647T>G (S549R)	Exon 12	T>G 1779	Ser>Arg	1	2,38
Total				38/42	88,06

La deuxième partie s'intéresse à la prédiction *in silico* des effets délétères de la mutation c.422A>C (L227R).

Le caractère pathogène de la mutation c.680T>G (L227R) a été évalué par différents logiciels. SIFT prédit le changement de la leucine en position 207 en Arginine comme intolérant, ce qui pourrait par conséquent avoir un impact sur la protéine en induisant une perte totale voir partielle de sa fonction.

Les logiciels PolyPhen-2 et Align-GVGD prédisent respectivement que ce changement est probablement endommageant et interférant avec la fonction de la protéine CFTR. L'analyse par le logiciel I-Mutant2.0 montre que la substitution de la leucine en arginine à la position 227 de la protéine CFTR affecte sensiblement la stabilité de cette dernière. Enfin, Mutation Taster confirme le caractère pathogène de cette mutation.

Journal of Applied Genetics
Spectrum of CFTR mutations in the Algerian population: Molecular and computational analysis
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Spectrum of CFTR mutations in the Algerian population: Molecular and computational analysis
Article Type:	Original Paper
Section/Category:	Human Genetics
Corresponding Author:	Fatima Zohra Sedki, PhD Université des Sciences et de la Technologie d'Oran-Mohamed Boudiaf (USTO-MB), Algérie.Laboratoire de Génétique Moléculaire et Cellulaire Oran, ALGERIA
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Université des Sciences et de la Technologie d'Oran-Mohamed Boudiaf (USTO-MB), Algérie.Laboratoire de Génétique Moléculaire et Cellulaire
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Fatima Zohra Sedki, PhD
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Fatima Zohra Sedki, PhD Abdelkarim Radoul, Pr Abdallah Boudjema, Pr Meriem Abdi, Dr Faouzia Zemani-Fodil, Dr Nadhira Saldi-Mehtar, Pr Faiza Cabet, Dr
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	Cystic fibrosis (CF) is the most common autosomal recessive disorder in Caucasians. Little has been reported on its occurrence in Algerian population. In order to contribute to the few existing data we undertook this study. The aim was in first instance to detect genetic alteration in the CFTR gene of 21 CF Algerian patients by sequencing. 14 different mutations were detected. Among these mutations the c.680T>G (L227R) which seems to be specific to the Algerian population, it was in silico studied to determine its impact at a molecular level. This is the first study that combined a molecular and computational analysis. These findings will assist in genetic counselling, prenatal diagnosis and future screening of CF in Algeria.
Suggested Reviewers:	Claude Férec, Pr Laboratoire de génétique moléculaire et d'histocompatibilité Génétique Génomique & Biotechnologies CHRU de Brest - Hôpital Morvan claude.ferec@chu-brest.fr Pr Férec works a lot on Cystic Fibrosis. Between 2004 and 2014, C. Férec wrote the following 46 articles about Cystic Fibrosis. Frederic Becq, Pr Université de Poitiers France, Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires frederic.becq@univ-poitiers.fr Pr. Frederic Becq, has many works on cystic fibrosis, CFTR channel and treatment.

Original Paper

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Title: Spectrum of CFTR mutations in the Algerian population: Molecular and computational analysis

Authors: Fatima Zohra SEDIKI¹#, Radoui Abdelkarim²#, Abdallah BOUDJEMA¹, Meriem ABDI¹, Faouzia ZEMANI-FODIL¹, Nadhira SAIDI-MEHTAR¹, Faiza CABET³.

Affiliations:

¹ Laboratoire de Génétique Moléculaire et Cellulaire, Université des Sciences et de la Technologie d'Oran- Mohamed Boudiaf (USTO-MB), Algérie.

² Service de Pneumologie et Allergologie pédiatriques, Etablissement hospitalier spécialisé (EHS) Canastel, Oran, Algérie.

³ Service d'endocrinologie moléculaire et maladies rares, Hôpital Femme-Mère-Enfant, Bron-Lyon, France.

The authors have contributed equally to the study.

***Corresponding author:**

Fatima Zohra SEDIKI is to be contacted at:

Laboratoire de Génétique Moléculaire et Cellulaire, Université des Sciences et de la Technologie d'Oran- Mohamed Boudiaf (USTO-MB), Algérie.

Address: BP. 1505 El M'naouar -ORAN- 31000 Algérie

Telephone number: (+213) 550861008

E-mail address: sediki.fatima@gmail.com (Fatima Zohra Sediki).

Abstract

Cystic fibrosis (CF) is the most common autosomal recessive disorder in Caucasians. Little has been reported on its occurrence in Algerian population. In order to contribute to the few existing data we undertook this study. The aim was in first instance to detect genetics alteration in the CFTR gene of 21 CF Algerian patients by sequencing. 14 different mutations were detected. Among these mutations the c.680T>G (L227R) which seems to be specific to the Algerian population, it was in silico studied to determine its impact at a molecular level. This is the first study that combined a molecular and computational analysis. These findings will assist in genetic counseling, prenatal diagnosis and future screening of CF in Algeria.

Key words: Cystic fibrosis; CFTR gene; Algerian population; mutations; in silico.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Introduction

1 Cystic fibrosis (CF) [MIM # 219700] is the most common autosomal recessive genetic
2 disease in Caucasian populations. It is due to the alteration of the CFTR (Cystic Fibrosis
3 Transmembrane Conductance Regulator) gene [MIM # 602421] which encodes a chloride
4 channel protein essential for ion transport and epithelial cells homeostasis (Rommens et al.
5 1989).
6
7
8
9

10 CFTR protein is classified as ATP Binding Cassette transporter, or an ABC transporter. The
11 name refers to the fact that the channel uses ATP (Adenosine triphosphate) binding to open
12 and close normally (Jordan et al. 2008). It is made up of five domains: two membrane
13 spanning domains (MSD1 and MSD2) that form the chloride ion channel, two nucleotide-
14 binding domains (NBD1 and NBD2) that bind and hydrolyze ATP (Adenosine TriPhosphate),
15 and a regulatory (R) domain (Gabriela et al. 2007).
16
17
18
19
20

21 Wrongly considered as a European disease, CF is found in Algeria. Previous studies showed
22 that it is present in this population (Loumi et al. 2008); (Cabert et al. 2010); (Sediki et al.
23 2014). The literature data on the clinical profile of CF and the spectrum of CFTR gene
24 mutations in Algeria are poor because of a lack of studies. It is in this perspective, and
25 through this work we contribute to genotypic diagnosis to enrich the few existing data on this
26 population.
27
28
29
30
31

32 The molecular studies of the CF show the c.680T>G (L227R) mutation seem to be specific to
33 the Algerian population (Zielenski et al. 1991).
34
35

36 Knowledge of the 3D structure of a protein is of major assistance in understanding the
37 function and its role in causing disease. Proteins with mutations do not always have 3D
38 structures that are analyzed and deposited in Protein data bank (PDB). Therefore, it is
39 necessary to construct 3D models by locating the mutation in 3D structures. This is a simple
40 way of detecting what kind of adverse effects that a mutation can have on a protein.
41
42
43
44

45 In order, to understand the impact of those mutations in a molecular level, mutation that is
46 described as specific to the Algerian population and found in our cohort will be analysed.
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Methods

Sample composition

A total of 21 Algerian CF patients were investigated. The patients were referred to us by Pneumology and Allergology Department of the specialized hospital center, in Canastel, Oran (Algeria). CF diagnosis was based on clinical findings and repeated positive sweat chloride tests (>60 mmol/L). A written consent to the genetic study was obtained from all subjects. The study adheres to the principles of the Declaration of Helsinki.

Mutation analysis

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using the salting out precipitation method (Miller et al. 1988).

All subjects were analyzed with an amplification refractory mutation system assay (PCR/ARMS), in previous study as described by Sediki et al (Sediki et al. 2014).

For the patients in whom a mutation could still not be identified on one or both of CFTR genes, complete sequencing of the CFTR coding region and its exon/intron junctions was aimed. The Amplification of all 27 CFTR exons, including flanking intronic regions, was performed using CFTR gene specific primers. Direct nucleotide sequencing was carried out using Big Dye terminator cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystem, New Jersey, USA). Sequence analysis was performed on an ABI Prism 310 DNA sequencer (Applied Biosystem, New Jersey, USA).

Mutation (s) that seem(s) to be specific to the Algerian CF patients and present in our cohort will be explored by in silico study.

Prediction methods

Different bioinformatics tools exploring impact on protein were used to evaluate the possible functional alteration.

SIFT (Sorting Intolerant from Tolerant) is a sequence homology-based tool that sorts intolerant from tolerant amino acid substitutions and predicts whether an amino acid substitution in a protein will affect the protein function (<http://sift.jcvi.org>). SIFT scores are classified as intolerant (0.00-0.05), potentially intolerant (0.051-0.10), borderline (0.101-0.20), or tolerant (0.201-1.00) (Kumar et al. 2009). The higher a tolerance index, the less functional impact a particular amino acid substitution is likely to have.

PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2) is a tool for prediction of possible impact of an amino acid substitution on the structure and function of a human protein (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>). This prediction is based on straightforward empirical

1 rules which are applied to the sequence, phylogenetic and structural information
2 characterizing the substitution.

3 **Align GVGD**

4 Align-GVGD is a program that combines the biophysical characteristics of amino acids and
5 protein multiple sequence alignments to predict where missense substitutions in genes of
6 interest fall in a spectrum from enriched deleterious to enriched neutral
7 (http://agvgd.iarc.fr/agvgd_input.php).

8 Align-GVGD is an extension of the original Grantham differences to multiple sequence
9 alignments and true simultaneous multiple comparisons.

10 **MutationTester**

11 MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org/>) is a fast web-based application to evaluate
12 DNA sequence variants using information from various sources combined and evaluated in a
13 naive Bayes classifier.

14 **I-Mutant2.0**

15 I-Mutant2.0 (<http://folding.biofold.org/i-mutant/i-mutant2.0.html>) is a support vector machine
16 (SVM) based tool for automatic prediction of protein stability changes upon single point
17 mutations.

18 **Swiss PDB Viewer software**

19 The mutations were performed by Swiss PDB Viewer Software (<http://www.expasy.org/spdb>)
20 ; Swiss Institute of Bioinformatics, Basel, Switzerland).

21 **Results**

22 **Genotyping results**

23 A total of 21 patients were screened, 14 of them were consanguineous (66.66%) and in one
24 patient we have no information.

25 14 mutations were identified; a description of those identified mutations is reported in table 1.
26 Reported by Cabet F the c.4340del (4472delT), is a novel mutation not described in any
27 databases or in published data.

28 Two patients had no mutations identified.

29 The most prevalent mutation were c.1521_1523delCTT (F508del), it accounted for 21.42%
30 (9/42). The c.579+1G>T (711+1G>T) was found as the second most common 14.25 % (6/42),
31 Two mutations reached a frequency of 9.52% (4/42), the c.680T>G (L227R) and the
32 c.1624G>T (G542X).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

The c.3909C>G (N1303K), c.595C>T (H199Y), c.2988+1G>A (3120+1G>A), c.1673T>C (L558S), and c.2051_2052delAAinsG (2183AA>G) were found with a frequency of 4.76% (2/42).

While, the c.4340del (4772delT), the c.868C>T (Q290X), c.1766+3A>C (1898+3A>C), c.1652G>A (G551D), and 1647T>G (S549R) mutations account for 2.38% (1/42).

The c.680T>G (L227R) in silico analysis results

This mutation is a changed of a Leucine (L) into an Arginine (R) at position 227 of the CFTR protein. The in silico Analysis of the effect of this mutation shows that, the Leucine is conserved among eleven species, PolyPhen-2 predict the variation as probably damaging with a score of 1.00. Furthermore, this mutation was categorized as “Disease causing (p-value: 1)’ and “Deleterious (score: 0)” using MutationTaster and SIFT softwares. Analysis with GVDG Align shows that the c.680T>G (L227R) was considered as “most likely interfere with function.” I-Mutant2.0 shows that the mutation affects the protein stability.

Discussion

In the current study the c.1521_1523delCTT (F508del) is the most common mutation with a frequency of 21.42%. This frequency is comparable to the one reported by Cabet et al (20% in a sample of 27 CF patient) (Cabete et al. 2010). Loumi et al reported a frequency of 16.7% (Loumi et al. 2008) which is less than our finding but this can be explained by the limited size of our sample. The present results matches with the literature which showed that a very low frequency occur in North African countries.

Beside, the c.1521_1523delCTT (F508del), the c.579+1G>T (711+1G>T) mutation was the second most frequent (14.28%). It was found in four patients, two patients were homozygous for this mutation, while two were carried the c.579+1G>T (711+1G>T) mutation in compound heterozygosity with the c.152_1523delCTT (F508del). This mutation was described in CF families living in Quebec, but it was already found in previous Algerian’s studies (Loumi et al. 1999), (Loumi et al. 2008); (Cabete et al. 2010).

Finding this splicing mutation in the current data provides additional evidence for its higher frequency in the Maghreb.

The fourth (and fifth) mutation were c.680T>G (L227R) (9.52%) and c.1624G>T (G542X) (9.52%).

The c.680T>G (L227R) mutation was found in two CF patients, they were homozygous. Based on the literature, this mutation was first described in CF Algerian patient (Database), it seems to be specific to the Algerian population. It is rare in other populations, there are 9/49.000 patients with this mutation in the CFTR2 international database (Database).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

The c.1624G>T (G542X) mutation was found on two CF patients; they were homozygous and from consanguine families. It is considered as the most common mutation, in the Mediterranean regions of Europe and Africa (Loirat et al. 1997). This mutation appeared in the ancient Phoenicia and it was probably introduced into the Mediterranean region by the migration of Phoenicians and spread along their maritime trades routes (Loirat et al. 1997); (Estivill et al. 1997).

Slatkin's and Rannala's works showed that this mutation is 1.5-3 times older than c.1521_1523delCTT which appeared probably less than 10000 years ago (Slatkin and Rannala 1997).

The c.595C>T (H199Y) was found in only one patient who was homozygous for this mutation. This mutation has been found for the first time in German CF patient. It is due to a nucleotide change C to A at the position 727 of CFTR protein that falls into the transmembrane MSD1. In our laboratory, an in silico study showed that the previous change predicted as probably damaging.

Found in one CF patient, the c.3909C>G (N1303K) account for 4.76%. This mutation was described as the second most frequent in Loumi et al work (8.3%) (Loumi et al. 2008). It is found in most of the Western and Mediterranean countries (WorldHealthOrganization 2004), but its frequency seems to be high in middle east specially in Lebanon and Palestine where it reached 20% (Farra et al. 2010); (Laufer-Cahana et al. 1999).

The c.2988+1G>A (3120+1G>A) is a splicing mutation in intron 18, it was found in one homozygous CF patient. This mutation was particularly frequent in African CF chromosome (Macek et al. 1997; Tzetis et al. 1997), it also has been identified in four native African CF patients (Carles et al. 1996). Furthermore, it has been established that c.2988+1G>A (3120+1G>A) is a predominant CF mutation in Saudi Arabia (el-Harith et al. 1997). Three Greek CF families have been reported to harbor this mutation (Tzetis et al. 1997). Finding this mutation in a CF Algerian patient is evidence that this mutation is present in diverse populations.

The missense mutation c.1673T>C (L558S) was found in one CF patient (4.76%). This mutation was reported for the first time in one of the CF gene of a Sicilian patient (Database).

The c.2051_2052delAAinsG (2183AA>G) is a frameshift mutation in exon 14, found in homozygous patient. This mutation was first described in three Canadian patients (Bozon et al. 1994) and later was shown to have a significant frequency in patients from Middle east and southern Europe.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

The c.4340 del (4472delT) was found in one CF patient who was compound heterozygous. It has been detected by Faiza Cabet. This novel mutation never reported or described in any databases. It is a deletion of a T nucleotide at the position 4472 of the CFTR gene that causes a stop codon 20 bases further.

The c.868C>T (Q290X) was detected in one CF patient. This mutation was first reported in a French CF patient (Database).

The c.1766+3 A>C (1898+3A>C) was found in a compound heterozygous, this mutation is likely to result on RNA splicing defect. It was originally identified in a Moroccan CF chromosome (Database) . This mutation seems to be rare in Caucasians and does not reach the 0.1% threshold of general population frequency to warrant screening in the US (Grody et al. 2001).

Found in one CF chromosome the c.1652G>A (G551D) seems to be rare in our cohort, it is known as Celtic mutation. It is more common in north-west, in central Europe and in particular in UK with a frequency of 3.1%, Ireland (5.7%) and the Czech Republic (3.8%) (Bobadilla et al. 2002).

The c.1647T>G (S549R) mutation was also found in one CF chromosome. This missense mutation was first reported in a non-Ashkenazi Jewish patient from Morocco (Kerem et al. 1990). It had been described also in Saudi Arabia and in the United Emirates Arabs (el-Harith et al. 1997); (Frossard et al. 1998).

Finally, two patients had no mutation. The inability to detect mutations patients may be partially explained by the fact that the currently most advanced CFTR genetic tests study only the coding region and the adjacent exon/intron junctions. Mutations located in the intronic and promoter regions as well as distant regulatory sequences are not routinely screened for, and may therefore be missed.

In the present study, all exonic and intronic regions have been screened; the promoter region has not been done.

However, there is emerging evidence that genes other than CFTR may cause a disease clinically indistinguishable from CF. Mekus et al, works showed that, in a German family, no mutation could be identified in both CFTR genes of a CF patient, and his sister, who had inherited the same CFTR genes from their parents, was not affected (Mekus et al. 1998). CF is characterized not only by defective chloride secretion, but also by increased sodium absorption in the airways. Sodium transport is mediated through the amiloride sensitive epithelial sodium channel, ENaC, which is made of the 3 subunits SCNN1A, SCNN1B and SCNN1G. There is evidence that mutations in SCNN1B may cause CF-like disease in a small

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

fraction (about 10%) of CF patients in whom a CFTR mutation cannot be found on both CFTR genes (Sheridan et al. 2005).

In the case reported by Mekus et al, Azad et al identified heterozygosity for a hyperactive mutation in the SCNN1A gene (Azad et al. 2009). The authors suggested that there might be a polygenic mechanism of disease involving CFTR and SCNN1A in some patients.

The in silico study of the c.680T>G (L227R) with SIFT, showed that the amino acid change is not tolerated; each amino acid has its own specific size, charge, and hydrophobicity-value.

The residue is located in a region annotated in the Uniprot database as a transmembrane domain. The wild-type residue was neutral, while the mutant residue is positively charged (Fig1). This can disturb the (ionic) interactions with the other transmembrane helices.

The mutant residue is bigger than the wild-type residue (**Mass:** 156.19 vs. 113.16 Dalton, **Volume:** 173.4 vs. 166.7 Å³, **Surface:** 225 vs. 170 Å²) it is clearly shown in Figure 2; this can disturb either the contacts with the other transmembrane domains or with the lipid-membrane. The wild-type residue is more hydrophobic than the mutant residue which can affect the hydrophobic interactions within the core of the protein or with the membrane lipids.

Conclusion

In conclusion, this is to our knowledge the first study that includes a genetic exploration and bioinformatics analysis regarding CF in Algeria. The molecular analysis shows 14 mutations including a novel mutation. This work is evidence of a large mutational spectrum of CFTR gene mutation in Algeria. The information provided by our study is of interest in designing an appropriate diagnostic strategy. In other hand, the in silico analysis of the c.680T>G (L227R) mutation that is reported as Algerian ones, showed that this mutation seems to affect the hydrophobic interactions within the core of the protein or with the membrane lipids.

Our study suggests that the application of computational tools can provide an interesting approach to understand the impact of the mutations on protein level.

Acknowledgments

The authors wish to thank patients and their respective physician for their full collaboration in these investigations.

Conflicts of interest

The Authors declare no conflict of interest.

Reference

- 1
2 Azad AK et al. (2009) Mutations in the amiloride-sensitive epithelial sodium channel in
3 patients with cystic fibrosis-like disease Human mutation 30:1093-1103
4 doi:10.1002/humu.21011
5
6
7 Bobadilla JL, Macek M, Jr., Fine JP, Farrell PM (2002) Cystic fibrosis: a worldwide analysis
8 of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening
9 Human mutation 19:575-606 doi:10.1002/humu.10041
10
11
12 Bozon D, Zielenski J, Rininsland F, Tsui LC (1994) Identification of four new mutations in
13 the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene: I148T, L1077P,
14 Y1092X, 2183AA-->G Human mutation 3:330-332 doi:10.1002/humu.1380030329
15
16
17 Cabet F, Radoui A, Boggio D, Bellon G, Morel Y (2010) Etude du gène CFTR chez 27
18 patients algériens. Medecine/science 26:139
19
20
21 Carles S et al. (1996) First report of CFTR mutations in black cystic fibrosis patients of
22 southern African origin Journal of medical genetics 33:802-804
23
24
25 Database C <http://www.cfr2.org/>
26
27 Database CFM <http://www.genet.sickkids.on.ca/cfr/>
28
29 el-Harith EA et al. (1997) Novel and characteristic CFTR mutations in Saudi Arab children
30 with severe cystic fibrosis Journal of medical genetics 34:996-999
31
32
33 Estivill X, Bancells C, Ramos C (1997) Geographic distribution and regional origin of 272
34 cystic fibrosis mutations in European populations. The Biomed CF Mutation Analysis
35 Consortium Human mutation 10:135-154 doi:10.1002/(SICI)1098-
36 1004(1997)10:2<135::AID-HUMU6>3.0.CO;2-J
37
38
39 Farra C et al. (2010) Mutational spectrum of cystic fibrosis in the Lebanese population
40 Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society
41 9:406-410 doi:10.1016/j.jcf.2010.08.001
42
43
44 Frossard PM, Girodon E, Dawson KP, Ghanem N, Plassa F, Lestringant GG, Goossens M
45 (1998) Identification of cystic fibrosis mutations in the United Arab Emirates.
46 Mutations in brief no. 133. Online Human mutation 11:412-413
47 doi:10.1002/(SICI)1098-1004(1998)11:5<412::AID-HUMU15>3.0.CO;2-O
48
49
50 Gabriela MR, Alonso RP, Iris D (2007) XV-2c and KM.19 haplotype analysis in Chilean
51 patients with cystic fibrosis and unknown CFTR gene mutations. Biological research
52 40:223-229
53
54
55 Grody WW, Griffin JH, Taylor AK, Korf BR, Heit JA (2001) American College of Medical
56 Genetics consensus statement on factor V Leiden mutation testing Genetics in
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

medicine : official journal of the American College of Medical Genetics 3:139-148
doi:10.109700125817-200103000-00009

Jordan IK, Kota KC, Cui G, Thompson CH, McCarty NA (2008) Evolutionary and functional divergence between the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and related ATP-binding cassette transporters Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105:18865-18870 doi:10.1073/pnas.0806306105

Kerem BS et al. (1990) Identification of mutations in regions corresponding to the two putative nucleotide (ATP)-binding folds of the cystic fibrosis gene Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 87:8447-8451

Kumar P, Henikoff S, Ng PC (2009) Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm Nature protocols 4:1073-1081 doi:10.1038/nprot.2009.86

Laufer-Cahana A, Lerer I, Sagi M, Rachmilewitz-Minei T, Zamir C, Rivlin JR, Abeliovich D (1999) Cystic fibrosis mutations in Israeli Arab patients Human mutation 14:543 doi:10.1002/(SICI)1098-1004(199912)14:6<543::AID-HUMU16>3.0.CO;2-V

Loirat F, Hazout S, Lucotte G (1997) G542X as a probable Phoenician cystic fibrosis mutation Human biology 69:419-425

Loumi O, Baghriche M, Delpech M, Kaplan JC, Bienvenu T (1999) Analysis of the complete coding region of the CFTR gene in ten Algerian cystic fibrosis families Human heredity 49:81-84 doi:22849

Loumi O, Ferec C, Mercier B, Creff J, Fercot B, Denine R, Grangaud JP (2008) CFTR mutations in the Algerian population Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society 7:54-59 doi:10.1016/j.jcf.2007.04.004

Macek M, Jr. et al. (1997) Identification of common cystic fibrosis mutations in African-Americans with cystic fibrosis increases the detection rate to 75% American journal of human genetics 60:1122-1127

Mekus F, Ballmann M, Bronsveld I, Dork T, Bijman J, Tummler B, Veeze HJ (1998) Cystic-fibrosis-like disease unrelated to the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Human genetics 102:582-586

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells Nucleic acids research 16:1215

Rommens JM et al. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping Science 245:1059-1065

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Sediki FZ, Radoui A, Cabet F, Zemani-Fodil F, Saidi-Mehtar N, Boudjema A (2014)
Detection of CFTR mutations using PCR/ARMS in a sample of Algerian population
Annales de biologie clinique 72:549-554 doi:10.1684/abc.2014.0989

Sheridan MB et al. (2005) Mutations in the beta-subunit of the epithelial Na⁺ channel in
patients with a cystic fibrosis-like syndrome Human molecular genetics 14:3493-3498
doi:10.1093/hmg/ddi374

Slatkin M, Rannala B (1997) Estimating the age of alleles by use of intraallelic variability
American journal of human genetics 60:447-458

Tzetzis M, Kanavakis E, Antoniadis T, Doudounakis S, Adam G, Kattamis C (1997)
Characterization of more than 85% of cystic fibrosis alleles in the Greek population,
including five novel mutations Human genetics 99:121-125

WorldHealthOrganization (2004) The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis. A
joint meeting of WHO/ECFTN/ ECFTN/ICF
(M)/A/ECFSWHO/HGN/CF/WG/0402Geneva, WHO/HGN/CF/WG

Zielenski J, Bozon D, Kerem B, Markiewicz D, Durie P, Rommens JM, Tsui LC (1991)
Identification of mutations in exons 1 through 8 of the cystic fibrosis transmembrane
conductance regulator (CFTR) gene Genomics 10:229-235

Table

Table 1: CFTR mutations detected in 21 Algerian CF patients (N=42 CF chromosomes).

Mutations	E/I¹	Substitution nucleotide	Substitution Amino acid	N. of chromosomes carrier	Frequency (%)
c.1521_1523delCTT (F508del)	Exon 11	delCTT	Deletion of Phe 507/508	9	21.42
c.579+1G>T (711+1G>T)	Intron 5	G>T 711+1	mRNA splicing defect	6	14.28
c.680T>G (L227R)	Exon 6	T>G 812	Leu>Arg 227	4	9.52
c.1624G>T (G542X)	Exon 12	G>T 1756	Gly>Stop 542	4	9.52
c.3909C>G (N1303K)	Exon 24	C>G 4041	Asn>Lys 1303	2	4.76
c.595C>T (H199Y)	Exon 6	C>T 727	His>Tyr 199	2	4.76
c.2988+1G>A (3120+1G>A)	Intron 18	G>A 3120+1	mRNA splicing defect	2	4.76
c.1673T>C (L558S)	Exon 12	T>C 1805	Leu>Ser 558	2	4.76
c.2051_2052delAAinsG (2183AA>G)	Exon 14	A>G 2183and deletion of A at 2184	Framshift	2	4.76
c.4340 del (4472delT)	Exon 27	Deletion of T at 4472	Stop Codon	1	2.38
c.868C>T (Q290X)	Exon 7	C>T 1000	Gln>Stop 290	1	2.38
c.1766+3A>C (1898+3A>C)	Intron 13	A>C19898+3	mRNA splicing defect	1	2.38
c.1652G>A (G551D)	Exon 12	G>A 1784	Gly>Asp 551	1	2.38

c. 1647T>G (S549R)	Exon 12	T>G 1779	Ser>Arg	1	2.38
Total				38/42	88.06

¹Exon/ Intron

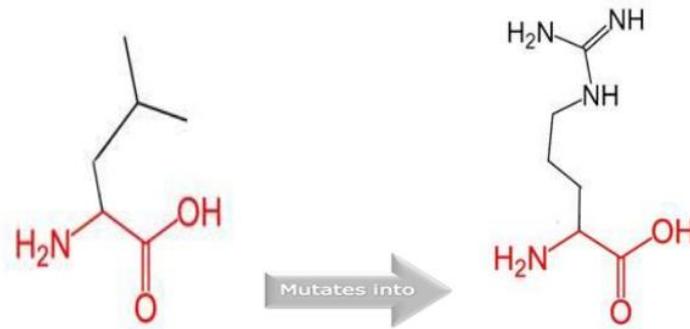


Fig 1 Schematic structures of the original (left) and the mutant (right) amino acid. The backbone, which is the same for each amino acid, is colored red. The side chain, unique for each amino acid, is colored black.

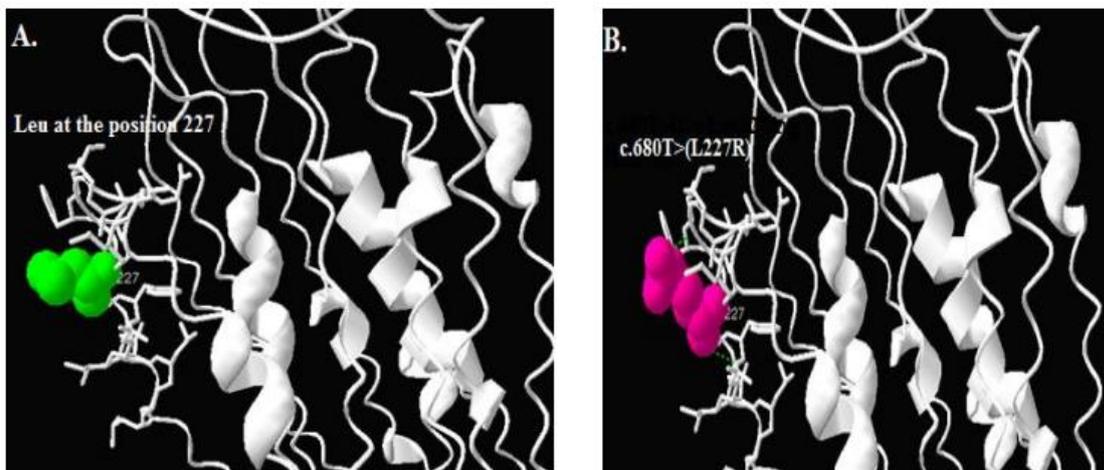


Fig 2 A. Location of the Leucine at the position 227 of human CFTR protein on 3D model. Ribbon diagram of human CFTR protein was produced using Swiss PDB Viewer 4.0.4 software.
 B. Location of the c.680T>G, p.Leu227Arg (L227R) mutation on 3D model of human CFTR protein. Ribbon diagram of human CFTR protein was produced using Swiss PDB Viewer 4.0.4 software.

III. Prédiction in silico des effets délétères des mutations c.3907A>C (N1303H) et c.422C>A (A141D)

1. Introduction

Les effets délétères des mutations c.3907A>C (N1303H) et c.422C>A (A141D) n'ont jamais été décrits, ni fait l'objet d'études. Ces mutations ont été explorées en utilisant quatre logiciels bioinformatiques: SIFT, PolyPhen-2, Align-GVGD, Mutation Taster. Par la suite, les structures 3D des protéines contenant ces mutations ont été construites par modélisation moléculaire en utilisant le logiciel Swiss Pdb Viewer.

2. Résultats

2.1 Résultats de l'analyse des mutations par le logiciel SIFT

Le résultat du logiciel SIFT est représenté dans la figure 23. L'analyse est représentée sous forme de colonnes. La colonne de gauche donne les acides aminés pour la position donnée qui sont prédits comme intolérants. A l'inverse, ceux de la colonne droite sont prédits comme étant tolérants.

Les acides aminés sont colorés en fonction de leurs propriétés physico-chimiques (tableau X).

La prédiction du logiciel SIFT permet de comprendre la cause de l'effet de cette mutation.

Predict Not Tolerated	Position Seq Rep	Predict Tolerated
wf c my	1301R 1.00	i h d n l v p e t q g s k AR
wc f v	1302K 1.00	i h y p l g n M t s d a r QE K
ywv t s r q p m l k i h g f e d c a	1303N 1.00	N
ywv t s r q p n m l k i h g f e d c a	1304L 1.00	L
ywv t s r q p n m l k i h g f e c a	1305D 1.00	D
ywv t s r q n m l k i h g f e d c a	1306P 1.00	P
	1307Y 0.90	w c m p q i e r k t v a d g s l f H N Y
w m f i c y l v h	1308E 0.90	r t p q k s n a d E G
c w f m y d i v	1309Q 0.90	g p h s l n t a e R Q K
c m p	1310W 0.90	i q v e t d f s a g n r k y l H W
w c f m y i h v	1311S 1.00	l p g q a t d e R K N S
w m i f c l v y r h p q k a t	1312D 1.00	e g n S D
w c f m y	1313Q 1.00	h i l g n p r t s V a k Q d E
w c f m y i h l v	1314E 1.00	r g p n q k s a d T E
d h g n e c w s r k y p q t a	1315I 1.00	f v M L I
	1316W 1.00	d c n h q e r p k g t s m y i v f A W L
c w f d m i y v g p h s l n a t e	1317K 1.00	R Q K
y w t s r q p n m l k i h g f e d c a	1318V 1.00	V
w f y c m h	1319A 1.00	i l r a p v g q k s d T E A
c w m f i y l v h r t g s p n a k	1320D 1.00	q E D
c w f m y i h l v	1321E 1.00	r g n t p s k Q d A E
w h y d n r q f e k c m g p s	1322V 1.00	t l i A V
m w i f v c l y r p q h t k e a	1323G 1.00	s d N G
d h g n e c w s r k y p q t a f m	1324L 1.00	v l l
c w f d m i y	1325R 1.00	v g p s n l a t e q H R K
w m f i c l y v r h q p e k a	1326S 1.00	g t d N S
h d w q n p e r g e k s y t a m	1327V 1.00	l F I V
y w v t s r q p n m l k h g f e d c a	1328I 1.00	I
c w f m v i h l v r	1329E 1.00	g n t o s k a A D E

Figure 23: Exemple de résultat de l'analyse de la mutation c.3907A>C (N1303H) par le logiciel SIFT.

Tableau X: Propriétés physico-chimiques des acides aminés colorés utilisés dans les résultats du logiciel SIFT

Couleur de l'acide aminé	Propriété physico-chimique
Rouge	Basique
Vert	Polaire non chargé
Noir	Non polaire
Bleu	Acide

Les résultats obtenus pour les deux mutations c.3907C>A (N1303H) et c.422C>A (A141D) sont résumés dans le tableau XI.

L'analyse de la mutation c.3907A>C (N1303H) montre que la substitution de l'asparagine en histidine en position 1303 est intolérante (Intolerated). Ce résultat signifie que cette dernière a un impact entraînant une perte partielle ou totale de la fonction protéique.

En revanche, la mutation c.422C>A (A141D) conduisant à la substitution d'une Alanine en Acide aspartique semble tolérante (Tolerated).

Tableau XI: Résultats obtenus par le logiciel SIFT.

Mutation en cDNA	Mutation au niveau protéique	Score	Prédiction
c.3907C>A	Asn1303His	score: 0	Intolérante (Intolerated)
c.422A>C	Ala141Asp	score: 0,16	Tolérante (Tolerated)

2.2. Résultats de l'analyse des mutations par le logiciel PolyPhen-2

Les résultats de l'analyse de la mutation c.3907A>C (N1303H) par le logiciel PolyPhen-2 sont représentés dans la figure 24. Cette mutation a été prédite comme probablement délétère pour la structure de la protéine (Probably Damaging).

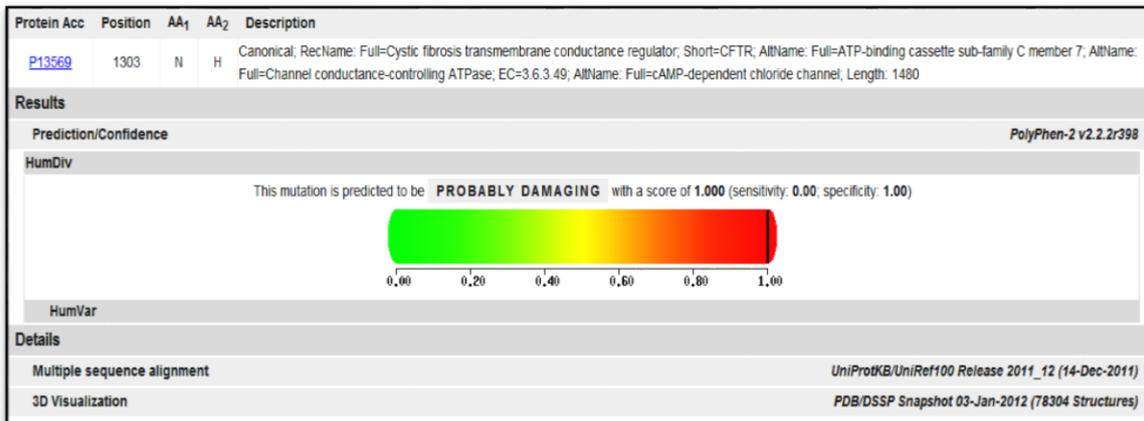


Figure 24: Résultats de l'analyse de la mutation c.3907A>C (N1303H) par le logiciel PolyPhen-2.

La mutation c.422C>A (A141D) a été prédite par ce même logiciel comme possiblement délétère (Probably damaging), le résultat de l'analyse est représenté dans la figure 25.

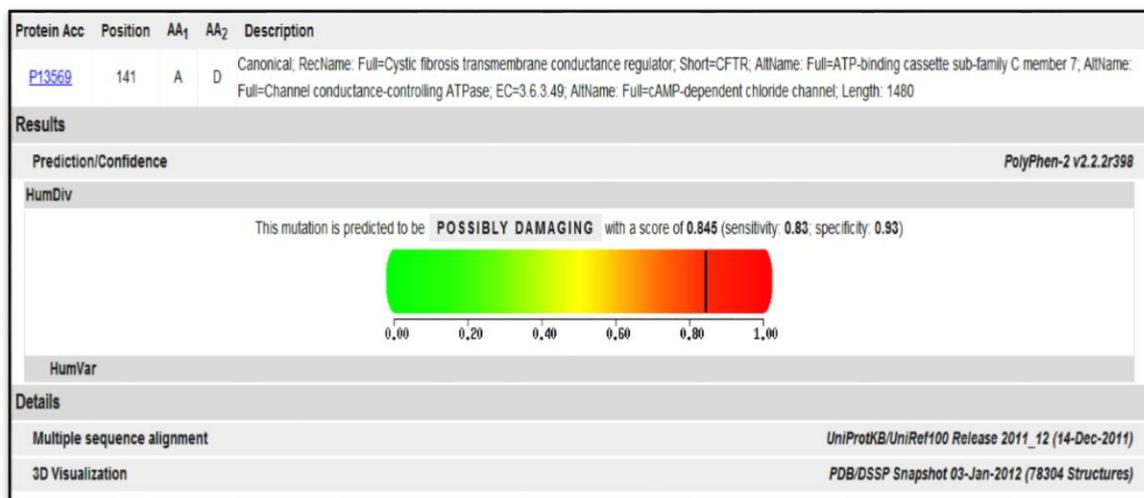


Figure 25: Résultats de l'analyse de la mutation c.422C>A (A141D) par le logiciel PolyPhen-2.

Ce logiciel a également permis d'obtenir le résultat d'alignement multiple par comparaison avec toutes les espèces enregistrées sur UniProKB, ceci nous a permis de confirmer que la mutation siège dans une région conservée entre plusieurs espèces.

2.3 Résultats de l'analyse de la mutation par le logiciel Align-GVGD

Un exemple de résultat obtenu par le logiciel Align-GVGD est représenté dans la figure 26. L'analyse des deux mutations c.3907A>C (N1303H) et c.422C>A (A141D) a

permis de calculer la valeur GV (Variation de Grantham) et GD (Ecart de Grantham) entre les acides aminés sauvages et mutés. Pour la mutation c.3907A>C (N1303H) la GV est égale à 0,00, ce qui signifie que la variation siège au niveau d'une région très conservée entre les espèces analysées. D'autre part le calcul de GD montre une valeur égale à 68,35 ceci montre que les propriétés physicochimique entre Asparagine et l'Histidine sont modérément conservées.

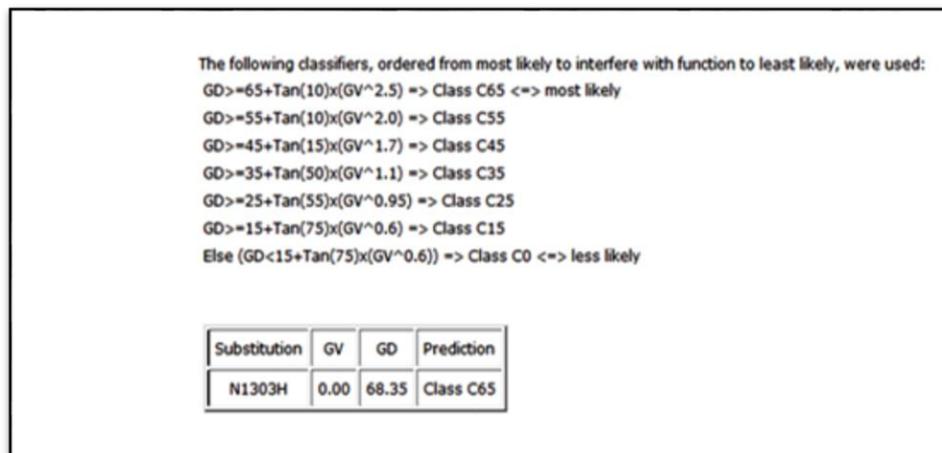


Figure 26: Exemple de résultat obtenu par le logiciel Align-GVGD.

L'analyse par ce logiciel a permis de prédire que cette mutation correspond à la classe C65: Interférant avec la fonction CFTR. Tandis que pour la valeur GV prédite pour la mutation c.422C>A (A141D) était de 152,26 alors que la valeur GD est de 61,50. Les résultats obtenus permettent de classer cette mutation dans la classe C0: N'affectant probablement pas la fonction CFTR.

2.4. Résultats de l'analyse de la stabilité de la protéine par le logiciel I-Mutant2.0

L'analyse de l'effet des mutations sur la stabilité de la protéine CFTR a été effectuée par le logiciel I-Mutant2.0. Un exemple de résultat obtenu est représenté dans la figure 27.

```

I-Mutant2.0

*****
**                                     **
**                               I-Mutant v2.0                               **
**       Predictor of Protein Stability Changes upon Mutations       **
**                                     **
*****

SEQ File: fileseq.txt

Position  WT  NEW  DDG  pH  T
         141  A   D  -0.16  7.0  25

WT: Aminoacid in Wild-Type Protein
NEW: New Aminoacid after Mutation
DDG: DG(NewProtein)-DG(WildType) in Kcal/mol
     DDG<0: Decrease Stability
     DDG>0: Increase Stability
T:   Temperature in Celsius degrees
pH:  -log[H+]

*****

```

Figure 27: Exemple de résultat obtenu par le logiciel I-Mutant2.0.

L'analyse des deux mutations c.3907A>C (N1303H), c.422C>A (A141D) par ce logiciel, a permis de calculer la différence d'énergie (DDG) entre la protéine CFTR normale et la protéine mutée. Les valeurs respectives des DDG pour les mutations c.3907A>C (N1303H), c.422C>A (A141D) sont égales à -2,05 et -0,16, respectivement. Ces valeurs négatives indiquent que les deux mutations sont déstabilisantes pour la structure de la protéine CFTR.

2.5. Résultats de l'analyse de la pathogénicité des mutations par le logiciel Mutation Taster

Le logiciel Mutation Taster a également été utilisé afin de prédire si ces mutations sont responsables de pathogénicité. Un exemple de résultat obtenu par ce logiciel est représenté dans la figure 28. L'analyse des mutations c.3907A>C (N1303H), c.422C>A (A141D) par le logiciel Mutation Taster a permis de prédire que ces dernières seraient responsables du développement de la maladie.

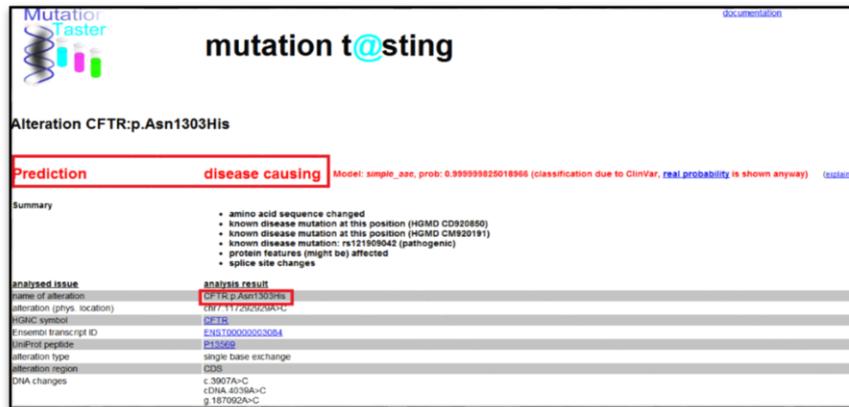


Figure 28: Exemple de résultat obtenu par le logiciel MutationTaster.

3. Construction des structures 3D par le logiciel Swiss PDB Viewer

Les structures 3D des protéines CFTR normales et mutées ont été construites pour chacune des deux mutations en utilisant le logiciel Swiss PDB Viewer

Etant donné qu'il n'existe pas de structure cristallographique, nous avons utilisé le modèle théorique de la structure 3D proposée par Serohijos et al en 2008 (Serohijos et al, 2008). Ce modèle est représenté dans la figure 29.

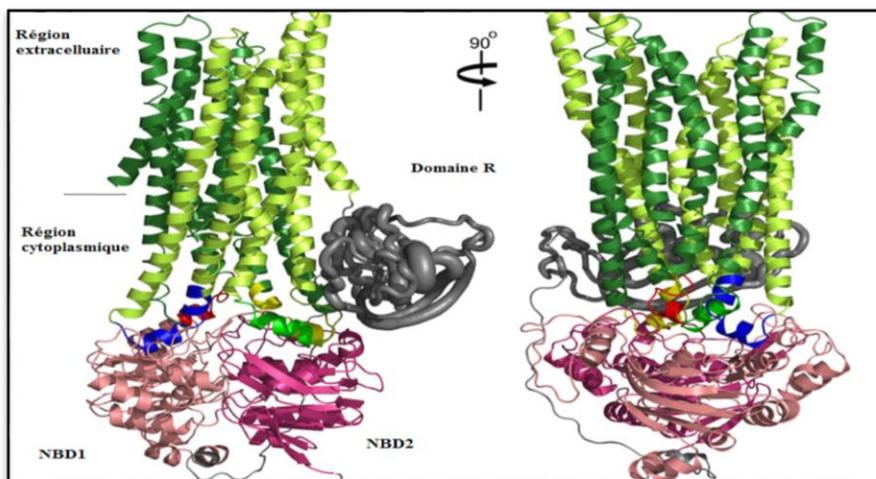


Figure 29: Modèle de structure 3D proposé (Serohijos et al, 2008).

3.1. Paramètres analysés pour la prédiction des effets délétères des mutations

3.1.1. Comparaison des changements structuraux de la protéine CFTR

- **c.3907A>C (N1303H)**

La structure 3D hypothétique de la protéine CFTR normale (Figure 30.A) a été comparée à celle contenant la mutation c.3907A>C (N1303H) (Figure 30.B) afin de déterminer tous les changements structuraux de la protéine. On ne note aucun changement structural visible au niveau de la protéine.

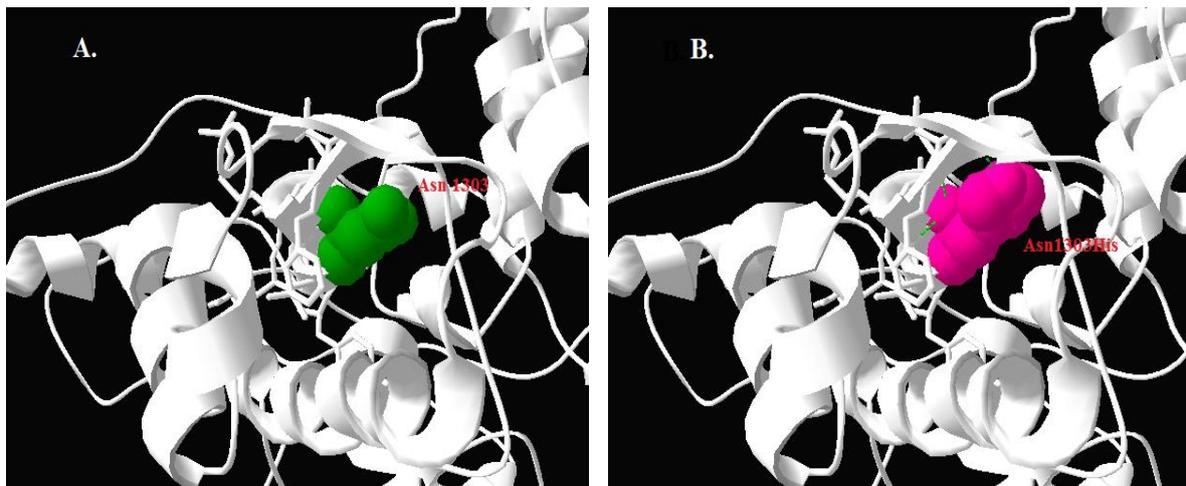


Figure 30: Structure 3D des deux protéines CFTR normal (A) et mutée c.3907A>C (N1303H) (B).

- **c.422A>C (A141D)**

La structure 3D de la protéine CFTR normale (Figure 31.A) a été comparée à celle contenant la mutation c.422A>C (A141D) (Figure 31.B) afin de déterminer les éventuels changements de structure possibles.

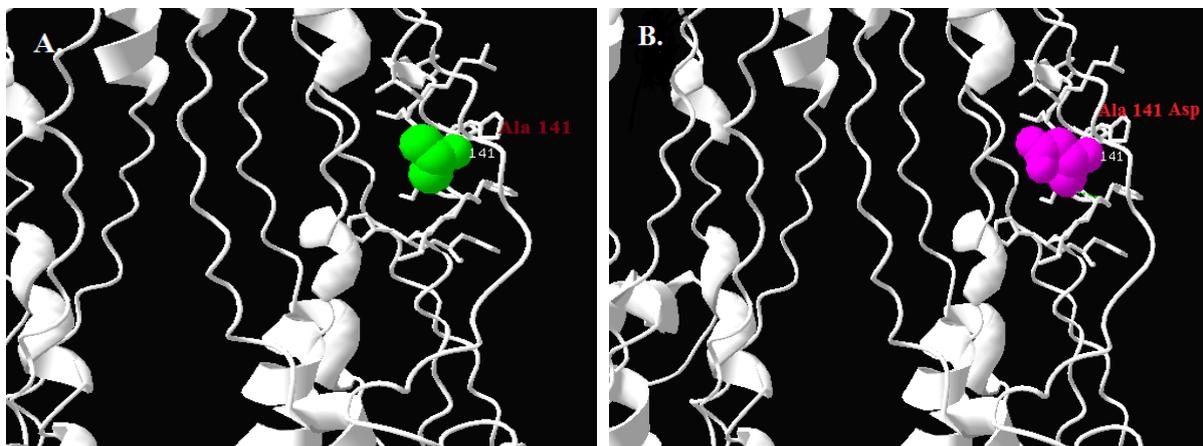


Figure 31: Structure 3D des deux protéines CFTR normal (A) et mutée c. 422A>C (A141D) (B).

3.1.2. Comparaison des propriétés physicochimiques entre acides aminés natifs et mutés

Les effets délétères des mutations sur la structure et la fonction de la protéine CFTR peuvent être expliqués par les différences de propriétés entre les acides aminés natifs et mutés. Une comparaison entre les propriétés des acides aminés a été effectuée.

- **c.3907C>A (N1303H)**

La mutation c.3907C>A (N1303H) est une substitution d'une asparagine en histidine à la position 1303 de la protéine CFTR. Les structures de ces deux acides aminés sont représentées dans la figure 32. Les propriétés de ces deux acides aminés sont données dans le tableau XII.

Le figure montre les structure schématique de l'acide aminé natif (à gauche) et le muté (à droite). Le squelette commun entre les deux structures est en rouge. Tandis que la chaîne latérale unique à chacun est de couleur noire. C'est cette dernière qui leur confère des propriétés physicochimiques particulières.

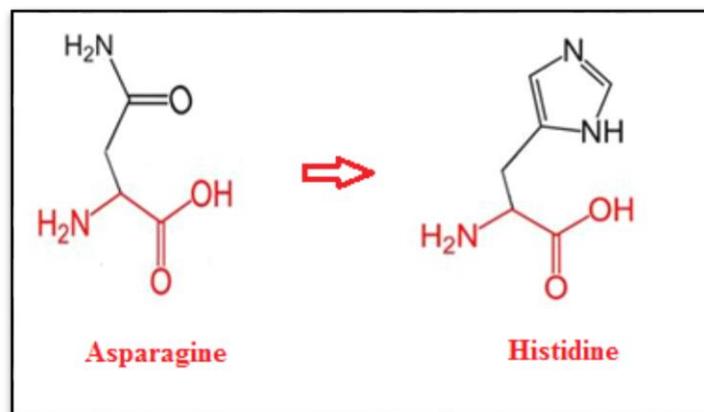


Figure 32: Structure l'asparagine et de l'histidine

Les différences entre ces deux acides aminés résident dans leur taille ainsi que leur charge (tableau XII). Ces différences sont souvent à l'origine de changement de conformations mais aussi de fonction lorsqu'ils touchent des sites importants.

Tableau XII: Propriétés physicochimiques des deux acides aminés asparagine et histidine.

Acide aminé	Masse (Annexe 6)	Type (Annexe 7)	Hydrophobicité	Charge
Asparagine	132 Da	Polaire non chargé	-3,5	Neutre
Histidine	155 Da	Basique	-3,2	Positive

- **c.422A>C (A141D)**

La mutation c.422A>C (A141D) est à l'origine d'une substitution d'une alanine en acide aspartique. Les structures des deux acides aminés sont représentées dans la figure 33. Les propriétés physicochimiques de chacun sont résumées dans le tableau XIII.

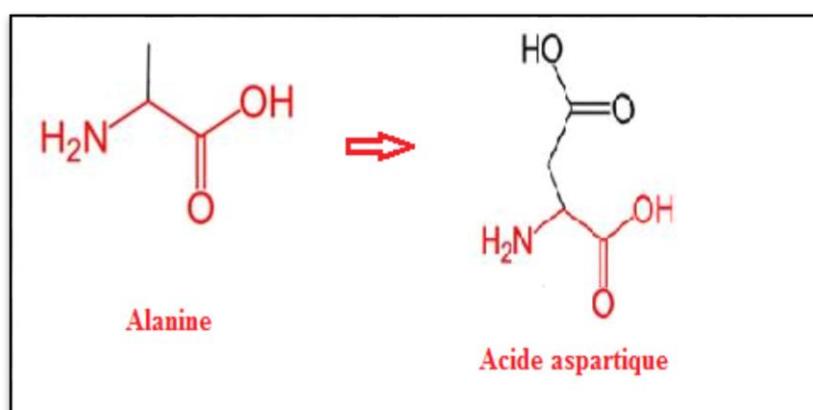


Figure 33: Structure de l'alanine et de l'acide aspartique.

La différence entre les deux acides aminés réside dans la taille et les propriétés physicochimiques de chacun. On note la présence d'un groupement COOH au niveau de la chaîne latérale qui représente la principale différence. Toutes ces différences pourraient être à l'origine de la défaillance de la protéine CFTR.

Tableau XIII: Propriétés physicochimiques des deux acides aminés alanine et acide aspartique.

Acide aminé	Masse (Annexe 6)	Type (Annexe 7)	Hydrophobicité	Charge
Alanine	89 Da	Aliphatique Polaire	1,8	Neutre
Acide aspartique	133 Da	Acide	-3,5	Négative

Discussion générale

I. Détection des mutations *CFTR* par PCR/ARMS dans un échantillon de la population Algérienne

Le principal objectif de cette partie d'étude était la caractérisation des mutations responsables de la mucoviscidose chez 24 patients appartenant à 24 familles non apparentées. A cet effet, une stratégie d'étude moléculaire a été établie.

Cette stratégie consiste dans un premier temps en la recherche de la mutation c.1521_1523delCTT (F508del) par une PCR suivie d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Cette méthode est peu laborieuse et peu coûteuse. Dans un second temps, les individus pour lesquels une mutation voire aucune mutation n'a été détectée sont explorés par le biais d'un Kit commercial ELUCIGENE CF30™ pour les 30 mutations les plus fréquentes dans la population caucasienne en utilisant la technique PCR/ARMS. Ce Kit a été utilisé pour la première fois en Algérie et a également fait l'objet d'une évaluation au cours de notre étude.

La stratégie de détection moléculaire utilisée est similaire à celles utilisées par plusieurs laboratoires de diagnostic et les Centres de Ressources et de Compétence Mucoviscidose (CRCM).

L'étude moléculaire du gène *CFTR* a permis de détecter 5 mutations aux fréquences différentes. La mutation c.1521_1523delCTT (F508del) est la plus fréquente avec un taux de 18,75%, ceci est comparable aux travaux réalisés par Boukari et al (18%), et assez proches de ceux rapportés par Cabet F et al (20%) (Cabet et al, 2010). Loumi et al rapportent une fréquence de 16,7% (Loumi et al, 2008), cette différence peut être expliquée par la taille réduite de notre échantillon.

Ce qui est à noter dans notre étude est la forte présence de la mutation c.579+1G>T (711+1G>T) (12,5%). Cette mutation a été décrite pour la première fois chez des familles Canadiennes de la région de Chicoutimi (Database). Hors, elle a été rapportée par Loumi et al, dans la population Algérienne avec une fréquence de 10 et 8,3% en 1999 et 2008 (Loumi et al, 1999) ; (Loumi et al, 2008). Des travaux réalisés en 2010 ont montré une fréquence de 19%, faisant de cette mutation la deuxième en terme de fréquence après la c.1521_1523delCTT (F508del) (Cabet et al, 2010). La c.579+1G>T (711+1G>T) est rare en Europe, elle atteint 1,3% en Italie et en Espagne (Castaldo et al, 1996); (Chillon et al, 1994).

Trouver cette mutation à une fréquence élevée est une preuve de plus que cette dernière est bien présente et fréquente au Maghreb.

La mutation c.1624G>T (G542X) a été retrouvée chez trois patients, dont deux homozygotes et de familles consanguines. Cette mutation est communément retrouvée dans les pays du pourtour méditerranéen, on suppose qu'elle a été introduite en méditerrané par les Phéniciens (Loirat et al, 1997).

La mutation c.3909C>G (N1303K) a été mise en évidence seulement chez un seul patient, et à l'état homozygote. Cette dernière a été rapportée comme une des mutations les plus fréquentes par Loumi et al (Loumi et al, 2008), arrivant en deuxième position après la c.1521_1523delCTT (F508del). En Tunisie, elle atteint 5,92% (Messaoud et al, 2005).

Connue comme une mutation celtique, la c.1652G>A est retrouvée chez un seul patient. Celle-ci est fréquente au Nord Ouest et au centre de l'Europe, particulièrement en Angleterre et nord de l'Irlande (Bobadilla et al, 2002).

Ce travail a permis d'évaluer le Kit ELUCIGENE CF30™ dans notre population, il en ressort que le taux de détection reste relativement bas: il est de 16,66% néanmoins, ce Kit présente de nombreux avantages et demeure important en première instance.

Un des avantages de ce kit réside dans la rapidité avec laquelle les résultats peuvent être obtenus. En effet, l'étude des 30 mutations peut être réalisée en une journée. Par ailleurs, ce kit ne nécessite pas l'utilisation d'appareils spécifiques, puisque seul thermocycleur et un dispositif d'électrophorèse sont nécessaires. Enfin, ce kit est suffisamment sensible pour pouvoir être utilisé dans des échantillons peu concentrés.

Une des limites de ce Kit est l'inaptitude à faire la distinction entre les homozygotes et les hétérozygotes pour une mutation autre que la c.1521_1523delCTT (F508del). Cette difficulté a été vite contournée dans notre cas par l'exploration des parents (étude familiale). Ceci est également utile et recommandé car il permet de détecter la présence d'allèle portant deux mutations.

Le Kit détecte des mutations fréquentes dans le bassin méditerranéen, sans détecter les mutations spécifiques à la population Algérienne. Donc, il serait intéressant de développer un Kit Maghreb incluant les mutations à une fréquence moins de 2% pour une parfaite détection.

II. Etude du spectre mutationnel du gène *CFTR* dans la population Algérienne: Etude moléculaire et analyse *in silico*.

Dans cette deuxième partie de thèse, nous avons balayé par screening complet l'ensemble des 27 exons composant le gène *CFTR* par séquençage et ceci chez 24 patients (21 seulement ont été inclus dans l'article scientifique original soumis au journal of Applied Genetics, 3 patients ont été exclus, car la lésion recherchée ils échappent au séquençage il s'agirait de gros remaniements).

D'autre part, en se basant sur les données de la littérature et sur les données issus du séquençage la mutation c.680T>G (L227R) semble spécifique à la population Algérienne, cette dernière a fait l'objet d'une étude *in silico*.

14 mutations différentes ont été révélées dont une nouvelle mutation détectée par notre collaboratrice Dr. Cabet.

La mutation la plus fréquente reste la c.1521_1523delCTT (F508del), avec une fréquence de 21,42% ce qui est comparable à celle rapportée par Cabet et al en 2010, où on estime cette dernière à 20% (sur un échantillon de 27 patients). Loumi et al rapportent une fréquence de 16,7%. Cette différence peut s'expliquer par la taille de l'échantillon (21 vs 36). En revanche, nos résultats concordent avec ceux de la littérature rapportant une fréquence assez faible en Afrique du Nord.

On note une disparité importante concernant les fréquences de la mutation c.1521_1523delCTT (F508del) dans le monde liées aux origines ethniques et à la localisation géographique des patients. De plus, il existe un gradient Nord-Ouest/Sud-Est dans la distribution de cette mutation en Europe. L'hypothèse la plus probable sur l'origine de cette mutation repose sur l'histoire des populations de Baloutchistan (région située entre l'Iran (20%), le Pakistan (70%) et l'Afghanistan (10%). Le territoire baloutche originel se situait sur le Plateau iranien, duquel ils ont migré entre le Xème et XIVème siècle de notre ère pour s'installer sur leur territoire actuel. Cette région cernée de montagnes est décrite comme l'une des plus isolées au monde. Les mariages consanguins y étaient fréquents. On suppose que cette mutation serait apparue chez ces habitants du Plateau iranien et aurait voyagé jusqu'en Europe avec les premiers flux d'émigrants. Elle se serait ensuite répandue dans toute l'Europe, et en particulier vers le nord-ouest, par vagues migratoires successives (Dawson & Frossard, 2000). Un brassage génétique aurait ensuite eu lieu en Europe Centrale et au Moyen-Orient

par des peuples émigrants de fonds génétiques différents apportant avec eux de nouvelles mutations, diluant ainsi la mutation c.1521_1523delCTT (F508del) (Morral et al, 1994).

Cela explique le gradient décroissant de fréquence de l'allèle c.1521_1523del CTT (F508del) du Nord-Ouest de l'Europe vers le Sud-Est. Par ailleurs, cette idée est renforcée par le fait que certaines communautés isolées géographiquement et/ou linguistiquement et culturellement n'ont pas ou peu subi cette dilution allélique, d'autant plus que la consanguinité était assez forte dans ces populations restreintes. C'est le cas des populations des Îles Féroé par exemple où seule la mutation c.1521_1523delCTT (F508del) est retrouvée (Schwartz et al, 1995).

La mutation c.579+1G>T (711+1G>T) rarement observée dans les autres populations est la plus fréquente (14,28%) après la c.1521_1523delCTT (F508del).

Les mutations c.680T>G (L227R) et c.1624G>T (G542X) ont une fréquence de 9,52%. Retrouvée chez deux patients à l'état homozygote, la c.680T>G (L227R) a été rapportée pour la première fois en 1993 chez une patiente Algérienne (<http://www.genet.sickkids.on.ca/app>). Cette mutation semble spécifique à la population Algérienne de part la littérature, rare dans les autres populations. On en recense dans la database internationale CFTR2 9/49000 cas, dans la base de données Française UMD-CFTR 6 cas seulement ont été enregistrés seulement. Afin de mieux comprendre l'impact de cette mutation au niveau protéique nous avons entrepris une étude *in silico*.

Retrouvée chez deux patients tout deux homozygotes issus de familles consanguines, la mutation c.1624G>T (G542X) est relativement fréquente dans les pays du pourtour méditerranéen spécialement en Italie et en Tunisie (Estivill et al, 1997). Cette mutation serait apparue en Phénicie (région correspondant au Liban actuel, plus quelques territoires Syriens, Israéliens et Palestiniens) et probablement introduite par les Phéniciens en méditerranée lors des voyages commerciaux et de la mise en place de comptoirs marchands (Loirat et al, 1997) ; (Estivill et al, 1997). Les travaux de Slatkin et Rannala, suggèrent qu'elle serait plus ancienne que la mutation c.1521_1523delCTT (F508del) (Slatkin & Rannala, 1997).

La mutation c.595C>T (H199Y) a été retrouvée chez un seul patient à l'état homozygote. Cette mutation a été rapportée pour la première fois chez un patient d'origine Allemande.

La mutation c.3909C>G (N1303K) décrite comme la deuxième en terme de fréquence dans l'étude de Loumi et al (8,3%) (Loumi et al, 2008), a une fréquence de 4,76% dans notre échantillon. Cette mutation est très répandue dans les pays du pourtour méditerranéen, au

Moyen Orient avec une fréquence plus élevée particulièrement au Liban et en Palestine ou elle atteint 20% (Farra et al, 2008) ; (Laufer-Cahana et al, 1999).

La mutation d'épissage c.2988+1G>A (3120+1G>A) siège au niveau de l'intron 18, retrouvée chez un seul patient (4,76%). Elle est particulièrement retrouvée en Afrique (Macek et al, 1997). De plus, il a été montré que cette dernière est prédominante en Arabie Saoudite (el-Harith et al, 1997). Trois cas portants cette mutation ont été également rapportés en Grèce (Tzetis et al, 1997). Retrouvée cette mutation dans notre étude est une preuve de plus que elle est présente dans divers populations.

La mutation c.1673T>C (L558S) a été mise en évidence chez un seul patient à l'état homozygote (4,76%). Elle fut rapportée pour la première fois chez un patient d'origine Sicilienne (Database).

La mutation c.2051_2052delAAinsG (2183AA>G), siégeant au niveau de l'exon 14, est retrouvée chez un seul patient à l'état homozygote. Rapportée chez 3 patients Canadiens pour la première fois (Bozon et al, 1994), elle est décrite un peu plus tard et même fréquente en Moyen Orient et le Sud de l'Europe.

La mutation c.4340delT (4472delT) a été découverte par notre collaboratrice Cabet et soumise à la database pour indexation. Cette dernière est une délétion d'une thymine à la position 4472 conduisant à un codon stop 20 bases plus loin.

Décrite pour la première fois chez un patient français, la mutation c.868C>T (Q290X) a été mis en évidence chez un seul patient.

Retrouvée chez un patient hétérozygote composite la mutation d'épissage c.1766+3A>C (1898+3A>C) a été révélée pour la première fois chez un patient Marocain (Database). Cette mutation semble rare chez les caucasiens et ne dépasse pas les 0,1% (Grody et al, 2001).

La c.1652G>A (G551D) est une mutation rare dans notre cohorte, il s'agit d'une mutation Celtique très commune au Nord/Ouest et Centre de l'Europe plus particulièrement en Angleterre (3,1%), en Irlande (5,7%) et en République Tchèque (3,8%) (Bobadilla et al, 2002).

La mutation c.1647T>G (S549R) est retrouvée que sur un seul patient CF et à l'état hétérozygote. Décrite pour la première fois chez un patient d'origine juive non Ashkénaze (Kerem et al, 1990), plus tard elle serait décrite en Arabie Saoudite et aux Emirats Arabes (el-Harith et al, 1997).

Deux patients ne présentaient aucune mutation, un des deux patients présentait le polymorphisme c.1408A>G (M470V), ce polymorphisme est considéré comme sans conséquences cliniques (Dequeker et al, 2009). Cependant, cela n'exclue pas la possibilité qu'il puisse contribuer à un phénotype proche de celui de la mucoviscidose chez certains individus. L'impossibilité de détecter de mutations peut être partiellement expliquée par le fait que la partie promotrice n'est pas étudiée systématiquement lors des analyses génétiques et peuvent être donc ignorées. Cependant, il existe une preuve imminente qu'il existe en dehors du gène *CFTR* d'autres composantes génétiques qui pourraient causer une maladie cliniquement difficile à différencier de la mucoviscidose. Les travaux de Makus et al, chez une famille mucoviscidosiques Allemande, aucune mutation décelable chez un enfant et sa sœur (Mekus et al, 1998). De plus, le défaut de sécrétion de Cl⁻ n'est pas la seule caractéristique de la maladie.

Le canal ENaC est constitué de trois sous-unités distinctes α , β , γ . Des études ont montré qu'une mutation sur la sous unité β peut engendrer des symptômes très proches de ceux de la mucoviscidose cette constatation a été vérifiée chez 10% des patients chez lesquels aucune mutation *CFTR* n'a été détectée (Sheridan et al, 2005). Les auteurs ont suggéré qu'il pourrait y avoir un mécanisme polygénique de la maladie impliquant *CFTR* et *SCNN1A* chez certains patients (Sheridan et al, 2005).

L'analyse *in silico* de la mutation c.680T>G (L227R) par le logiciel SIFT a montré que le changement d'acide aminé n'est pas toléré; chaque acide aminé a sa propre taille, la charge, et l'hydrophobicité qui lui est spécifique.

De plus, le résidu de type sauvage était neutre, tandis que le résidu mutant est chargé positivement. Contenu sa position au sein de la protéine *CFTR* (domaine transmembranaire) ce changement peut perturber les interactions ioniques avec les autres hélices transmembranaires qui compose cette dernière.

Le résidu mutant est plus grand que le résidu de type sauvage (Mass: 156,19 contre 113,16 Dalton, Volume: 173,4 vs.166.7 a³, Surface: 225 vs 170 Å²), cela peut perturber aussi bien les contacts avec les autres domaines transmembranaires qu'avec la membrane lipidique. On a noté également que le résidu de type sauvage (Leucine) est plus hydrophobe que le résidu mutant (Arginine) qui peut affecter les interactions hydrophobes au cœur même de la protéine ou avec les lipides de la membrane.

Ce volet a permis de confirmer la diversité des mutations *CFTR* en Algérie (14 mutations différentes ont été décrites dont une nouvelle), d'autres part notre étude suggère que

l'utilisation des outils *in silico* est très intéressante car elle permet une meilleure connaissance des défauts moléculaires à l'origine de la pathologie.

III. Prédiction *in silico* des effets délétères des mutations c.3907A>C (N1303H) et c.422C>A (A141D)

Les effets délétères et le caractère pathogène des mutations c.3907A>C (N1303H) et c.422C>A (A141D) ont été étudiés par différents logiciels de prédiction *in silico*.

Les logiciels SIFT, PolyPhen-2 et Align-GVGD ont permis de prédire un effet délétère des deux mutations c.3907A>C (N1303H) et c.422C>A (A141D) sur la fonction protéique du canal CFTR, tandis que I-Mutant2.0 a permis de mettre en évidence un effet déstabilisant de ces dernières sur la protéine. Enfin, le logiciel Mutation Taster a confirmé le caractère pathogène de ces deux altérations.

Cependant, ces résultats restent généraux et ne témoignent que partiellement de l'effet des ces deux mutations. C'est pour cette raison et dans le but de conforter davantage notre étude en apportant de nouveaux éléments que la modélisation 3D par le logiciel Swiss PDB Viewer a été entreprise.

La mutation c.3907A>C (N1303H) siège au niveau du Nucleotide Binding Domain 2 (NBD2), ce domaine est important de part sa fonction de fixation de l'ATP. Il semblerait que le résidu muté perturbe la structure de base de ce domaine et affecte sensiblement son activité catalytique et par conséquent déstabilise et altère la fonction de la protéine CFTR.

De même, la mutation c.422C>A (A141D) a été analysée par logiciel Swiss PDB Viewer. Le résidu muté se trouve au niveau du domaine transmembranaire 1 (TMD1). Pour rappel, les domaines transmembranaires 1 et 2 (TMD1 et TMD2) entrent dans la formation du pore (canal). Alors que TMD2 est peu impliqué, le domaine TMD1 joue un rôle important dans la conductance et la sélectivité des ions. Les segments M1 à M6 formant le domaine TMD1 ont une structure secondaire essentiellement formée d'hélice α dont une face est exposée dans la lumière du canal. Le résidu muté est plus hydrophobe que le sauvage et est chargé négativement alors que le résidu sauvage est neutre, cela pourrait non seulement perturber les interactions ioniques mais aussi les interactions au sein des différents segments formant ce domaine.

Il est essentiel de combiner plusieurs outils de prédiction *in silico* afin d'avoir une meilleure appréciation des effets délétères des mutations et de les confronter avec ceux d'études fonctionnelles. Les résultats combinées d'études *in silico* et fonctionnelles auraient une retombée directe sur l'interprétation des analyses de diagnostic moléculaires et donc sur

le conseil génétique, et permettraient également d'améliorer la connaissance de la physiopathologie des CFTRopathies, essentiel au développement de stratégies thérapeutiques adaptées au patient.

Conclusion et perspectives

Au cours de ce travail de thèse, les altérations du gène *CFTR* responsables de la mucoviscidose dans un échantillon de 24 patients appartenant à 24 familles non apparentées ont été caractérisées.

Bien que notre échantillon soit réduit 14 mutations différentes ont été révélées, ce qui témoigne de la grande diversité du spectre mutationnel à l'origine de cette pathologie dans notre population.

La suite logique de ce travail, serait de proposer un test génétique aux individus issus de familles à risque afin de mettre en place une stratégie de prévention à travers le conseil génétique et le diagnostic prénatal.

Lors de notre étude, nous avons constaté l'absence de tests génétiques pour cette pathologie héréditaire dans les services de pédiatrie. La maladie est évoquée que si le patient présente une atteinte pulmonaire atypique ou une insuffisance pancréatique exocrine associée ou non à une atteinte pulmonaire. Les données moléculaire que nous venons d'évoquer sont de nature à attirer l'attention sur la nécessité d'intégrer la recherche de la mucoviscidose dans la routine des explorations chez l'enfant présentant une atteinte pulmonaire, afin de permettre un diagnostic précoce.

Le test sudoral autrefois inaccessible est aujourd'hui disponible dans nos hôpitaux, ce qui devrait inciter les cliniciens à le demander de façon systématique lorsqu'il y'a suspicion de mucoviscidose.

La création de réseaux pluridisciplinaires comprenant médecins généralistes, pédiatres, généticiens, pneumologues, radiologues, diététiciens, psychologues semble plus que nécessaire, afin de permettre une prise en charge adéquate des patients et de leur familles.

Dans la deuxième partie de cette thèse, nous avons contribué à la compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine du défaut du canal *CFTR*. Les effets délétères de trois mutations spécifiques à la population Algérienne c.3907A>C (N1303H), c.422C>A (A141D), c.680T>G (L227R) ont été étudiés en utilisant d'une combinaison de logiciels d'étude *in silico* et modélisation 3D.

La mutation c.680T>G (L227R) a été prédite comme altérant les relations hydrophobes au cœur même de la protéine ou avec les lipides de la membrane.

D'autre part, la c.3907A>C (N1303H) a été prédite comme délétère au niveau structure et fonction du canal *CFTR*, les changements physicochimiques entre les acides aminés natifs et mutés perturbent fortement la stabilité de la protéine.

Enfin, la mutation c.422C>A (A141D) est prédite comme délétère, il est noté que le résidu muté est plus hydrophobe que le sauvage et par conséquent perturber les interactions

ioniques mais aussi les interactions au sein des différents segments formant le pore du canal CFTR.

Cette étude a permis de montrer l'efficacité de l'utilisation associée de plusieurs logiciels prédictifs afin d'évaluer l'impact des mutations au niveau protéique. Les études fonctionnelles sont longues et laborieuses, et ne permettent pas d'obtenir des résultats rapides sur l'effet délétère d'une mutation, les logiciels bioinformatiques restent un outil de choix avant de réaliser des études *in vivo*.

Annexes

Annexe 1

Notice d'informations et formulaire de consentement pour un prélèvement biologique dans le but d'une étude génétique et / ou de conservation dans une banque d'ADN

Madame, Monsieur,

Le Docteur Radoui vous a proposé de participer à l'étude intitulée « **Etude génétique de la mucoviscidose chez l'enfant atteint et sa famille** ».

Avant de prendre une décision, nous vous recommandons vivement de prendre votre temps pour lire ces informations afin de comprendre pourquoi cette recherche est menée et ce qu'elle implique, d'en discuter avec votre entourage, votre famille et / ou votre médecin traitant.

Votre participation doit être libre et volontaire. Votre décision de participer ou non n'affectera en rien votre suivi médical. À tout moment, vous pouvez vous retirer du projet cité sans justification de votre part.

En cas de retrait ou de refus ultérieur, les échantillons conservés seront alors, suivant votre volonté, détruits ou rendus anonymes (plus aucun lien entre la personne et l'échantillon).

1. Description du projet de recherche :

1.1 Justification du projet :

En Algérie, longtemps considérée comme exceptionnelle, la mucoviscidose est actuellement mieux connue et mieux diagnostiquée.

Un programme de collaboration scientifique entre le service de pneumologie et allergologie pédiatriques de l'EHS Canastel, le laboratoire de Génétique Moléculaire et Cellulaire de l'Université des Sciences et Technologie d'Oran (USTO), le service d'endocrinologie de l'hôpital Femme Mère Enfant de Lyon sous l'égide de la Fédération Française de mucoviscidose a été élaboré pour réaliser l'étude génétique du gène responsable de la mucoviscidose chez le patient atteint de mucoviscidose et chez sa famille.

L'étude génétique va conforter le diagnostic et ouvrir d'éventuels espoirs thérapeutiques pour les patients atteints de mucoviscidose. Elle permet aussi de proposer un conseil génétique pour les porteurs sains.

Les résultats scientifiques obtenus seront d'un grand apport pour le développement de la biologie moléculaire de la mucoviscidose en Algérie.

1.2 Objectifs du projet:

Identifier à partir des échantillons biologiques collectés les mutations impliquées dans la survenue de la maladie, confirmer le diagnostic chez les patients atteints et déterminer les individus porteurs au sein de la famille.

1.3 Collaboration du patient :

Un prélèvement sanguin vous sera demandé, ce prélèvement est indispensable pour l'analyse génétique.

1.4 Sollicitation de participation :

Nous vous proposons de participer à ce projet et ainsi de contribuer à cette étude.

Nous vous laissons le temps pour lire la notice d'information, d'en discuter avec votre entourage, votre famille et / ou votre médecin traitant.

Si vous acceptez de participer à ce projet nous vous sommes très reconnaissants :

1. Signer les trois (03) formulaires de consentement.
2. Répondre à un questionnaire sur l'histoire de la famille afin de réaliser l'arbre généalogique.
3. Accepter des prélèvements biologiques (prise de sang) pour réaliser les analyses génétiques. Si le prélèvement est réalisé, il sera de 25 ml. Le seul risque que vous encourez est un point d'hématome au point de la pique.
4. Les techniques de biologie moléculaire utilisées imposent une conservation du prélèvement par congélation, ainsi que des étapes de transformation du prélèvement pour l'étude d'une partie de votre patrimoine génétique (ADN).
5. Cette étude peut s'étendre sur quelques années l'ADN peut être donc conservé le temps nécessaire dans une banque d'ADN.

Dans le cadre de collaboration scientifique, certains partenaires publics et privés pourront, si vous êtes d'accord, utiliser de manière anonyme les échantillons et les données cliniques. Ces différents utilisateurs s'engagent à respecter les principes énoncés dans le consentement que vous signerez. Ces partenaires travaillent en réseau et permettent de développer de nouvelles méthodes diagnostiques ou thérapeutiques.

2. Conservation et procédure de sécurité des échantillons d'ADN :

2.1 Identification des échantillons :

La confidentialité des échantillons et des données sera assurée par l'assignation et l'utilisation de code spécifique. Votre ADN ne sera pas identifié par votre nom mais un code permettra de vous lier à l'échantillon et aux données cliniques. Le décodage ne pourra s'effectuer que par

l'investigateur principal ou une personne déléguée par ce dernier et soumise au secret professionnel.

2.2 Durée de conservation :

Vos échantillons biologiques seront conservés au sein du Laboratoire de Génétique Moléculaire et Cellulaire de l'Université des Sciences et Technologie d'Oran (USTO) pour plusieurs années sous la responsabilité du Pr. Boudjema Abdallah (chef d'équipe).

En cas de retrait de participation de votre part, vos échantillons seront détruits à moins que vous autorisiez le gestionnaire de ces échantillons de les utiliser de manière strictement anonyme. Dans ce cas plus aucun lien entre vous et l'échantillon biologique ne sera possible.

2.3 Autres recherches :

Vos échantillons seront utilisés pour le projet de recherche décrit ci-dessus. A la fin de ce projet, plutôt que de détruire vos échantillons et ADN, ceux-ci pourraient être utilisés de façon anonyme pour d'autres projets de recherche, si vous êtes d'accord ?

Ces recherches pourraient impliquer l'envoi des échantillons à d'autres équipes de chercheurs publics et /ou privées, même à l'extérieur de notre institution. Cependant, il sera impossible de vous identifier, les tubes et données étant entièrement codées.

3. Confidentialité :

Le recueil, la saisie et le traitement des données contenues dans votre dossier médical ne seront effectués que par des personnes tenues au secret médical et professionnel.

Ces données ne seront utilisées qu'aux seules fins de recherches médicales.

Elles seront donc utilisées de manière **anonyme et codifiées**. Elles resteront strictement **confidentielles**. La publication des résultats de la recherche ne comportera aucun résultat individuel permettant de vous identifier.

4. Communication des résultats :

Vous pourrez communiquer avec l'équipe de recherche afin d'obtenir des informations sur l'avancement des travaux et les résultats généraux du projet.

5. L'aspect réglementaire :

L'inobservation de l'obligation du secret professionnel, expose son ou ses auteurs aux sanctions prévues à l'article 301 du code pénal.

Fiche de Consentement

Je soussigné (e) M Né (e) le.....

Demeurant à.....

Certifie avoir pris connaissance de la notice d'information et du consentement sur l'étude intitulée
« **Etude génétique de la mucoviscidose chez l'enfant atteint et sa famille**».

Le Docteur Radoui m'en a bien remis un exemplaire.

J'ai eu l'occasion de poser toutes les questions que je voulais et avoir obtenu réponse à toutes mes questions. Je reconnais avoir reçu l'ensemble des informations nécessaires à la compréhension de la finalité et des conséquences de cette étude.

J'accepte librement et volontairement de participer à cette recherche et je consens :

- Au prélèvement qui sera effectué chez moi
- Au prélèvement qui sera effectué chez mes enfants mineurs ou une personne majeure sous tutelle.

Je suis parfaitement conscient (e) que je peux retirer à tout moment mon consentement à ma participation à cette recherche et cela, quelles que soient mes raisons et sans supporter aucune responsabilité ou que les résultats ne me soient pas communiqués. Je peux à tout moment demander que le sang prélevé ou les produits de celui-ci (notamment l'ADN extrait) soient détruits. Le fait de ne plus participer à cette recherche ne portera pas atteinte à mes relations avec le médecin investigateur.

Je donne mon accord pour l'utilisation à des fins statistiques ou épidémiologiques des informations concernant les résultats de cette recherche, qui auront été au préalable rendues anonymes.

Je suis au courant que les échantillons pourront être utilisés dans d'autres projets de recherche
(Veuillez cocher la proposition qui vous convient)

- Oui, j'accepte que les échantillons soient réutilisés pour de nouveaux projets de recherche en génétique.
- Non, je ne souhaite pas que les échantillons soient réutilisés. Ceux-ci seront détruits dès la fin du projet ci-dessus.

Fait à, le

Nom, prénom.....

N° Carte d'identité :

Signature de la personne donnant le consentement

Engagement des investigateurs :

Le projet de recherche a bien été décrit au participant :
ainsi que les modalités de sa participation et notre engagement par rapport à la collection
d'échantillons biologiques et génétiques que nous constituons. Nous avons bien répondu à
toutes ses questions et lui avons réaffirmé que sa participation est libre et volontaire.

Fait à, le

Signature des investigateurs

Dr. Radoui Abdelkarim
Maitre Assistant en Pédiatrie
Chef de service de Pneumologie et
Allergologie Pédiatriques
EHS Canastel. Oran

Mlle Sediki Fatima Zohra
Doctorante en Biologie Moléculaire
Directeur de thèse : Pr. Boudjema Abdallah
Laboratoire de Génétique Moléculaire et Cellulaire
Université de l'USTO. Oran

Annexe 2

Etude génétique de la mucoviscidose dans la population Algérienne

Responsable du projet : Mr BOUDJEMA Abdallah Pr /Mr RADOUI Abdelkarim PHD

Membre participant : Mme FODIL-ZEMANI Faouzia PDH-HDR

Doctorante : M^{lle} SEDIKI Fatima Zohra

➤ Cette fiche doit être utilisée pour tous les patients, nouveaux ou déjà connus (y compris les décédés).

Les réponses aux questions posées se font en cochant la ou les case(s) correspondante(s).

Identité du patient

N° du dossier :

Nom :

(Nom jeune fille pour femmes mariées)

Prénom :

Sexe :

1. masculin

2. féminin

Date de naissance :

| | | | | | | | | | | |

Naissance :

1. unique

2. multiple

Lieu de naissance :

Adresse :

Téléphone :

Médecin traitant :

Consentement pour les nouveaux

patients :

1. recueilli

2. en cours de recueil

Diagnostic de la mucoviscidose

Date du diagnostic (MM AAAA)

| | | | | | | | | | | |

Résultat du test de la sueur (mmol de Cl/l)

| | | | |

Biologie Moléculaire :

(Indiquer les mutations en clair)

1. mutation

2. mutation

Le diagnostic a été suggéré par :

1. antécédents familiaux

2. diagnostic anténatal

3. dépistage néonatal

4. iléus méconial

5. obstruction intestinale (autre qu'iléus méconial)

6. déshydratation/troubles électrolytiques

7. retard de croissance/malnutrition

8. diarrhée
chronique/stéatorrhée/malabsorption
.....

9. problème respiratoire

- 10. prolapsus rectal
- 11. ictère néonatal
- 12. polype nasal/sinusite chronique. . .
- 13. stérilité
- 14. autre (*préciser*) _____

Symptômes :

En rapport avec la mucoviscidose

- 1 .aucun symptôme
- 2 .insuffisance pancréatique
- 3 .cirrhose/hypertension portale
- 4a .diabète nécessitant une insulinothérapie
- 4b. diabète NE nécessitant PAS une insulinothérapie
- 5 .calculs biliaires
- 6. pancréatite aiguë
- 7. obstruction intestinale (*autre qu'ileus méconial*)
- 8 .hémoptysie de moyenne ou grande abondance
- 9. polypes nasaux
- 10. pneumothorax
- 11 .pose d'un drain thoracique pour pneumothorax
- 12. arthropathie
- 13. aspergillose traitée
- 14. cancer ou antécédent de cancer

Préciser la nature

- Autre symptôme

Préciser _____

Anthropométrie

- Taille *en ds* _____
- Poids *en ds*
_____ , _____
- **Poids / Taille en (%)**

- Signe d'IRC : Oui Non

Fratrie

*Concerne le patient ainsi que les frères et sœurs issus **du même père et de la même mère y compris les décédés** (Ne pas tenir compte des demi-frères et des demi-sœurs).*

- nbre d'enfants dans la fratrie (*patient compris*) _____
- rang du patient dans la fratrie

- nbre de frères et sœurs du patient atteints de mucoviscidose

Les parents sont t-ils apparentés ?

- Oui Non

(Si oui préciser le degré)

L'arbre généalogique :

ECBC

Pour l'ECBC, sont demandés les germes retrouvés sur l'ensemble des examens de l'année 2010 et les germes retrouvés sur le dernier examen de l'année s'il ya plus d'un examen fait dans l'année.

L'ECBC a-t-il été réalisé dans l'année 2011 ?

1 non

2 oui

Mois du dernier ECBC :

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Résultats ECBC 2010 (choix multiples)

La première colonne est à remplir si l'ECBC s'est avéré positif pour l'un des germes ci-dessous en cours d'année.

Dans la deuxième colonne donner les résultats du dernier ECBC de l'année

	CUMUL ECBC 2010	DERNIER ECBC
1 Flore normale	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2 Pneumocoque (<i>Streptococcus pneumoniae</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3 Streptocoque (autre que <i>Streptococcus pneumoniae</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

(Préciser) _____

4 *Haemophilus influenzae*

5 Staphylocoque méti S

6 Staphylocoque méti R

7 *Pseudomonas aeruginosa*

8 autres types de *Pseudomonas*

(Préciser) _____

9 *Stenotrophomonas maltophilia* ...

10 *Burkholderia cepacia*

11 *Alcaligenes xylooxidans*

12 *Mycobacterium tuberculosis*. . .

13 Mycobactérie atypique

(Préciser) _____

14 *Aspergillus*

15 *Candida*

16 Autres germes.

Germe 1 (préciser) _____

Germe 2 (préciser) _____

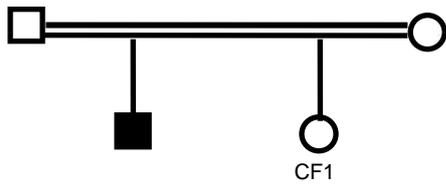
Germe 3 (préciser) _____

Annexe 3

Arbres généalogiques

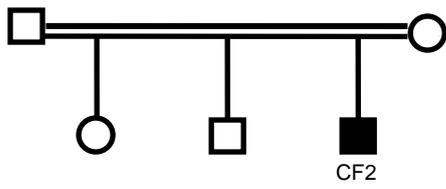
F.I

.



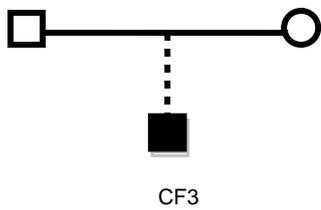
F.II

.



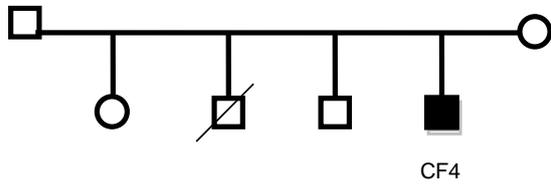
F.III

▪

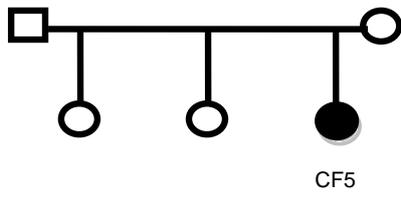


F.IV

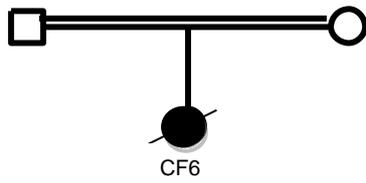
▪



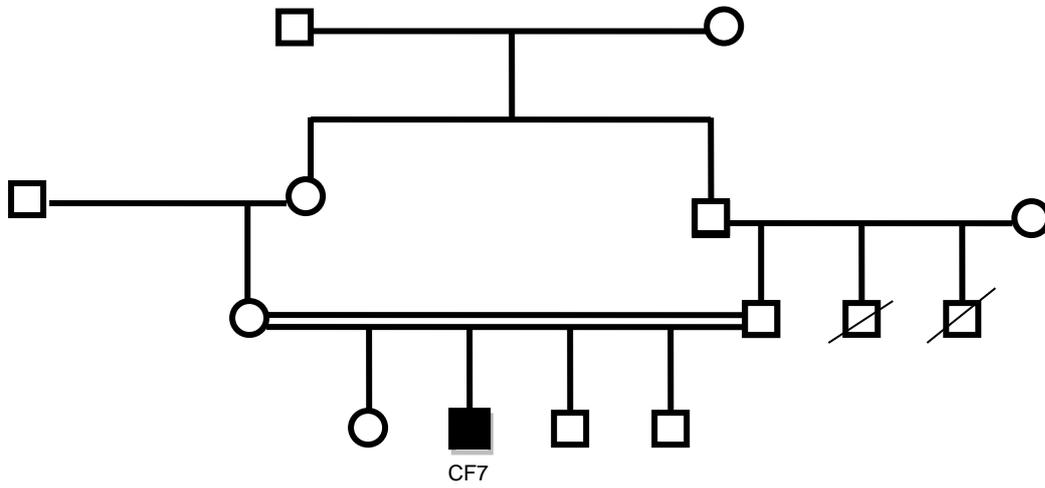
F.V



F.VI

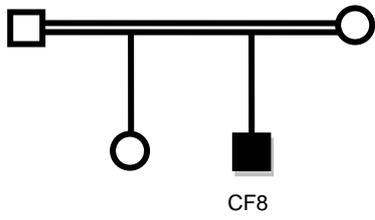


F.VII

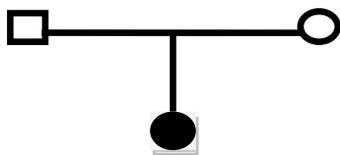


F.VIII

▪

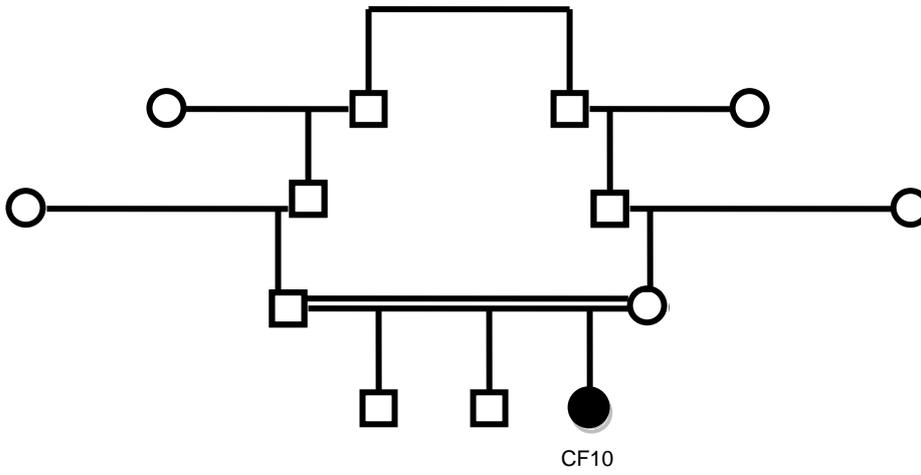


F.IX



F.X

▪



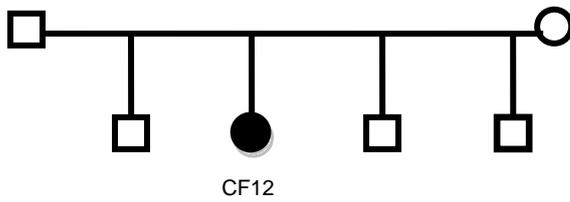
F.XI

▪

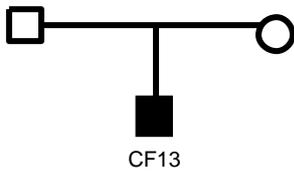


F.XII

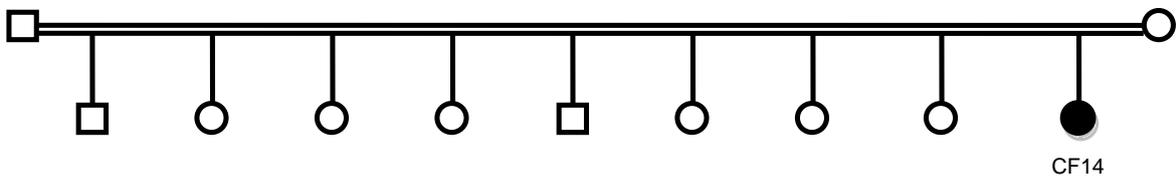
▪



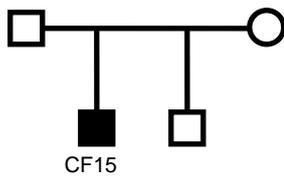
F.XIII



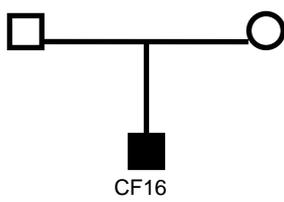
F.XIV



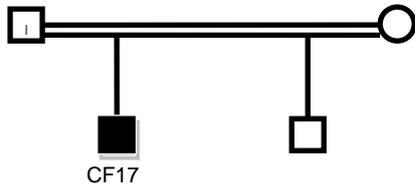
F.XV



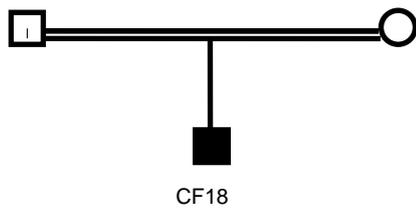
F.XVI



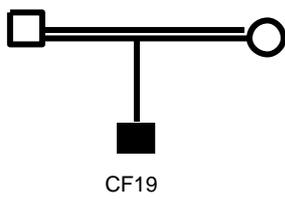
F.XVII



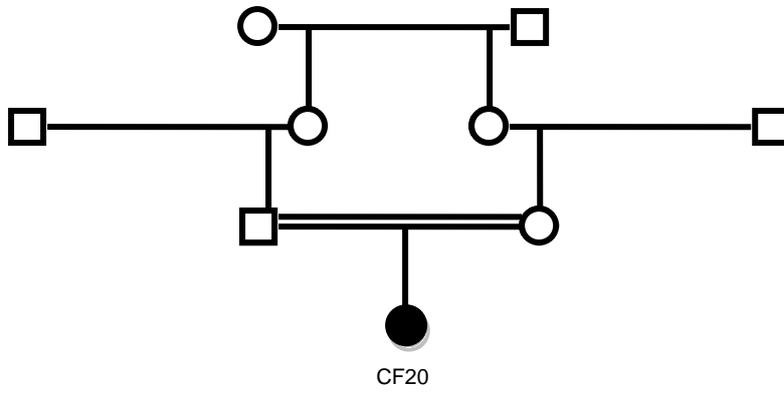
F.XVIII



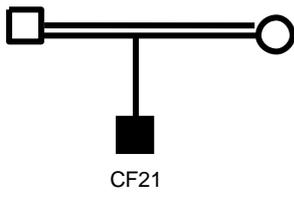
F.XIX



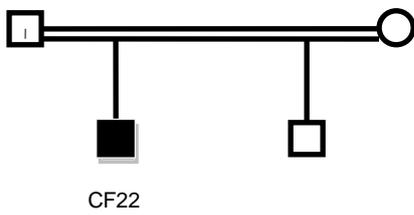
F.XX



F.XXI



F.XXII

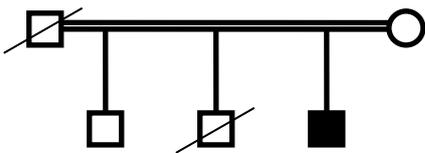


F.XXIII



CF23

F.XXIV



CF24

Annexe 4

Protocole d'extraction d'ADN à partir du sang total par la technique NaCl « Salting- Out ».

- **Solutions et Réactifs**

- TE10/10
- TE10/1
- Protéinase K (20mg /ml)
- Solution de lyse des globules blancs « SLB »
- NaCl à 5M
- Ethanol absolu,
- ethanol 70%;

Préparation de TE10/10 (1L)	Préparation de TE10/1 (1L)	Préparation de la solution de lyse des globules blancs (200ml)	Préparation de NaCl 5M (1L)
10ml Tris-HCl (1M, pH=8) 20ml EDTA (0.5M, pH=8) qsp 1L Eau distillée.	10ml Tris-HCl (1M, pH=8) 2 ml EDTA (0.5M, pH=8) qsp 1L Eau distillée.	2ml tris-HCl (1M, pH=8) 40ml EDTA (0.5M, pH=8) 10ml SDS (10%) qsp 200ml Eau distillée.	292,25g dans 1000ml d'eau distillée.

- **Méthode**

- Décongeler 20 ou 30 ml de sang à 37°C.
- Compléter le tube avec du TE10/10 jusqu'à 45ml, agiter doucement et mettre dans la glace pendant 30min. Centrifuger à 2500 tours pendant 15min.
- Eliminer le surnageant, Ajouter 15ml de TE10/10, un retournement du tube suffit pour resuspendre le culot, puis compléter le tube à 45ml de TE10/10.
- Mettre le tube dans la glace pendant 10min et centrifuger à 2500 tours pendant 15min.
- Reprendre cette étape jusqu'à obtention d'un culot blanchâtre (culot de globules blancs).
- Au culot de lymphocytes, ajouter 5 ml de solution de lyse des globules blancs et 125µl de protéinase K à 20mg/ml et homogénéiser le culot.
- Incuber à 37°C toute la nuit dans un bain marie, sous agitation douce.
- Ajouter 2 ml de NaCl, agiter vigoureusement et centrifuger à 4000 tours/min pendant 10 min.

- Récupérer le surnageant dans un autre tube, ajouter 2 volumes d'éthanol absolu froid, laisser précipiter l'ADN par retournement du tube (Formation de la méduse)
- Récupérer la méduse par une pipette pasteur scellée, la rincer une fois à l'éthanol à 70%, la placer soit dans un tube eppendorf et la laisser sécher à l'air libre
- Dissoudre la méduse dans 200-500µl de TE10/1.

Pour une totale dissolution, laisser les tubes sur agitation lente à température ambiante pendant au moins 24 heures.

Annexe 5

Protocole d'amplification des exons *CFTR*

L'amplification de l'exon 9 et 17b nécessite des conditions particulières.

<u>Pour l'exon 9 :</u>		<u>Pour l'exon 17b :</u>	
<u>Réactifs :</u>		<u>Réactifs :</u>	
Tampon 10X (Mg Free)	2,5 µl	Tampon	5µl
dNTP 25mM (Core dilué 1/8)	4µl	dNTP 25mM (dilué 1/8)	8µl
MgSO ₄ (25mM)	2µl	MgCl ₂	7,5µl
Amorce F	0,5µl	Amorce F	1 µl
Amorce R	0,5µl	Amorce R	1 µl
Taq Optimase	0,1µl	Taq QBiogene	0,2 µl
H ₂ O	12,7µl	H ₂ O	26,3 µl
ADN (10ng/µl)	2,5µl	AND (10ng/µl)	1µl

Amplification des autres exons

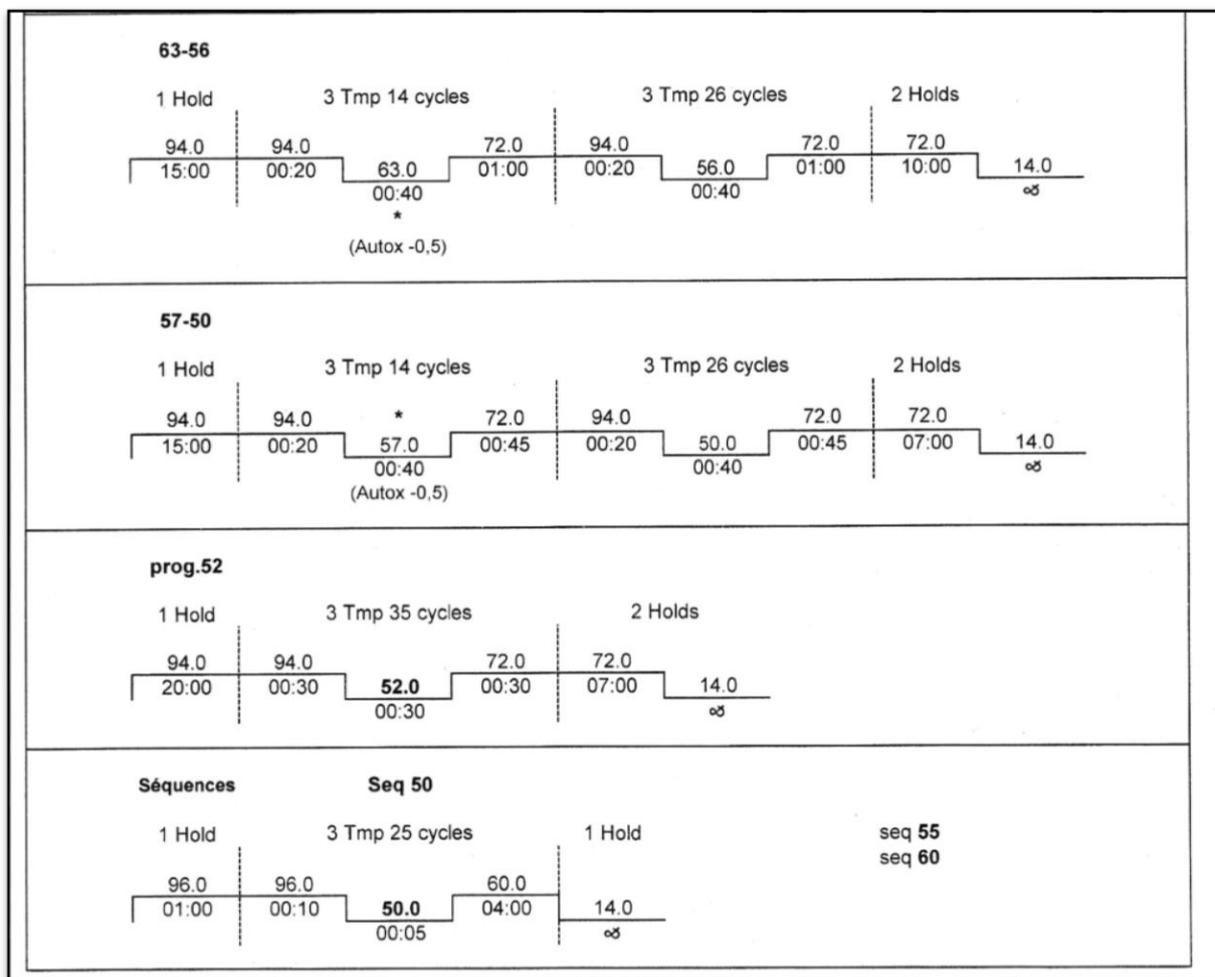
Mix GoldStar® (Ce mix comprend tout les réactifs nécessaires pour une PCR sauf les amorces)

Mix GoldStar®	25µl
H ₂ O	22 µl
Amorce F	1µl
Amorce R	1µl
AND (100ng/µl)	1µl

Toutes les PCR ont été réalisées dans un thermocycleur « Biometra® » selon un programme bien spécifique à chaque exon voire groupe d'exons :

PCR Touchdown 57-50°		PCR Touchdown 63-56°		PCR 30'' 60°
Exon 2	Exon13	Exon 4	Exon15	Exon 1 PCR 52°
Exon 3	Exon 17a	Exon 5	Exon 16	Exon 14b
Exon 6a	Exon 17b	Exon 8	Exon 21	PCR 58°
Exon 6b	Exon 18	Exon 9	Exon 22	Exon 11
Exon 7	Exon 19	Exon 10	Exon 23	
Exon 12	Exon 20	Exon 14a	Exon 24	

Le programme des cycles d'amplification détaillé est donné ci-dessous :



Annexe 6

Tableau résumant les codes, les masses molaires, nombre d'atomes, degré d'hydrophobicité des acides aminés.

http://www.imgt.org/IMGTeducation/Aide-memoire/_UK/aminoacids/abbreviation.html#refs

Acide Aminé	Abréviations		Masse moléculaire (Da)	Nombre d'atomes	Volume (Å ³)	Degré d'hydrophobicité
Alanine	Ala	A	89	13	88,6	1,8
Arginine	Arg	R	174	26	173,4	-4,5
Asparagine	Asn	N	132	17	114,1	-3,5
Acide Aspartique ou Aspartate	Asp	D	133	16	111,1	-3,5
Cystéine	Cys	C	121	14	108,5	2,5
Glutamine	Gln	Q	146	20	143,8	-3,5
Acide Glutamique ou Glutamate	Glu	E	147	19	138,4	-3,5
Glycine	Gly	G	75	10	60,1	-0,4
Histidine	His	H	155	20	153,2	-3,2
Isoleucine	Ile	I	131	22	166,7	4,5
Leucine	Leu	L	131	22	166,7	3,8
Lysine	Lys	K	146	24	168,6	-3,9
Méthionine	Met	M	149	20	162,9	1,9
Phénylalanine	Phe	F	165	23	189,9	2,8
Proline	Pro	P	115	17	112,7	-1,6

Serine	Ser	S	105	14	89,0	-0,8
Thréonine	Thr	T	119	17	116,1	-0,7
Tryptophane	Trp	W	204	27	227,8	-0,9
Tyrosine	Tyr	Y	181	24	193.6	-1,3
Valine	Val	V	117	19	140.0	4,2

Da : Dalton

Å³: Angström³

Annexe 7

Tableau récapitulatif des propriétés des acides aminés

<http://www.cours-medecine.info/biochimie/acides-amines.html>

Acide Aminé	Structure de R	Type de R	Radical	Catégorie	Polarité	pHi
Glycine	Linéaire (L)		H	Neutre (n)	Apolaire (A)	5,97
Alanine	L		CH ₃	n	A	6,02
Valine	L ramifié		CH-(CH ₃) ₂	n	A	5,97
Leucine	L ramifié		CH ₂ -CH-(CH ₃) ₂	n	A	5,98
Isoleucine	L ramifié		CH ₃ -CH-CH ₂ -CH ₃	n	A	6,02
Méthionine	L ramifié		(CH ₂) ₂ -S-CH ₃	n	A	5,75
Proline	Hétéro cyclique	noyau pyrrolidine	cycle saturé	n	A	6,1
Phénylalanine	cyclique	benzène	CH ₂ -noyau benzène	n	A	5,98
Tryptophane	cyclique	indole	CH ₂ -indole-benzène	n	A	5,88
Sérine	L	alcool I	CH ₂ -OH	n	Polaire Non Ionisable PNI	5,68
Thréonine	L	Alcool II	CH-OH-CH ₃	n	PNI	5,65
Cystéine	L	Thiol	CH ₂ -SH	n	PNI	5,02
Asparagine	L	amide	CH ₂ -CO-NH ₂	n	PNI	5,41
Glutamine	L	amide	(CH ₂) ₂ -CO-NH ₂	n	PNI	5,65
Tyrosine	cyclique	OH Phénolique	CH ₂ -Benzène-OH	n	PNI	5,65
Aspartate	L	COOH	CH ₂ -COOH	acide	Polaire Ionisable	2,87
Glutamate	L	COOH	(CH ₂) ₂ -COOH	acide	PI	3,22
Lysine	L	amine	(CH ₂) ₄ -NH ₂	basique	PI	9,74
Arginine	L	guanidine	(CH ₂) ₃ -NH-C-NH-NH ₂	basique	PI	10,76
Histidine	hétérocyclique	imidazole	CH ₂ -imidazole	basique	PI	7,58

References
bibliographiques

A

Akabas MH, Cheung M, Guinamard R (1997) Probing the structural and functional domains of the CFTR chloride channel. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **29**: 453-463

Akabas MH, Kaufmann C, Cook TA, Archdeacon P (1994) Amino acid residues lining the chloride channel of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *The Journal of biological chemistry* **269**: 14865-14868

Andersen DH (1938) Cystic fibrosis of the pancreas and its retention to celac disease. *AmJDisChild* **56**: 344-399

Andersen HU, Lanng S, Pressler T, Laugesen CS, Mathiesen ER (2006) Cystic fibrosis-related diabetes: the presence of microvascular diabetes complications. *Diabetes care* **29**: 2660-2663

Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Souza DW, Paul S, Mulligan RC, Smith AE, Welsh MJ (1991) Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* **253**: 202-205

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

Arkwright PD, Pravica V, Geraghty PJ, Super M, Webb AK, Schwarz M, Hutchinson IV (2003) End-organ dysfunction in cystic fibrosis: association with angiotensin I converting enzyme and cytokine gene polymorphisms. *American journal of respiratory and critical care medicine* **167**: 384-389

Aron Y, Desmazes-Dufeu N, Matran R, Polla BS, Dusser D, Lockhart A, Swierczewski E (1996) Evidence of a strong, positive association between atopy and the HLA class II alleles DR4 and DR7. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* **26**: 821-828

Aron Y, Polla BS, Bienvenu T, Dall'ava J, Dusser D, Hubert D (1999) HLA class II polymorphism in cystic fibrosis. A possible modifier of pulmonary phenotype. *American journal of respiratory and critical care medicine* **159**: 1464-1468

Audrezet MP, Chen JM, Ragueneas O, Chuzhanova N, Giteau K, Le Marechal C, Quere I, Cooper DN, Ferec C (2004) Genomic rearrangements in the CFTR gene: extensive allelic heterogeneity and diverse mutational mechanisms. *Human mutation* **23**: 343-357

B

Barasch J, Kiss B, Prince A, Saiman L, Gruenert D, al-Awqati Q (1991) Defective acidification of intracellular organelles in cystic fibrosis. *Nature* **352**: 70-73

Barriere H, Bagdany M, Bossard F, Okiyoneda T, Wojewodka G, Gruenert D, Radzioch D, Lukacs GL (2009) Revisiting the role of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and counterion permeability in the pH regulation of endocytic organelles. *Molecular biology of the cell* **20**: 3125-3141

Bear CE, Duguay F, Naismith AL, Kartner N, Hanrahan JW, Riordan JR (1991) Cl⁻ channel activity in *Xenopus* oocytes expressing the cystic fibrosis gene. *The Journal of biological chemistry* **266**: 19142-19145

Beauchamp M, Lands LC (2005) Sweat-testing: a review of current technical requirements. *Pediatric pulmonology* **39**: 507-511

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

Bobadilla JL, Macek M, Jr., Fine JP, Farrell PM (2002) Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening. *Human mutation* **19**: 575-606

Boyle MP, Bell SC, Konstan MW, McColley SA, Rowe SM, Rietschel E, Huang X, Waltz D, Patel NR, Rodman D (2014) A CFTR corrector (lumacaftor) and a CFTR potentiator (ivacaftor) for treatment of patients with cystic fibrosis who have a phe508del CFTR mutation: a phase 2 randomised controlled trial. *The lancet Respiratory medicine* **2**: 527-538

Bozon D, Zielenski J, Rininsland F, Tsui LC (1994) Identification of four new mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene: I148T, L1077P, Y1092X, 2183AA-->G. *Human mutation* **3**: 330-332

Bradbury NA, Jilling T, Berta G, Sorscher EJ, Bridges RJ, Kirk KL (1992) Regulation of plasma membrane recycling by CFTR. *Science* **256**: 530-532

Braude S, Kennedy H, Hodson M, Batten J (1984) Hypertrophic osteoarthropathy in cystic fibrosis. *Br Med J (Clin Res Ed)* **288**: 822-823

Busch R (1990) On the history of cystic fibrosis. *Acta Universitatis Carolinae Medica* **36**: 13-15

C

Cabet F, Radoui A, Boggio D, Bellon G, Morel Y (2010) Etude du gène CFTR chez 27 patients algériens. *Medecine/science* **26**: 139

Capriotti E, Fariselli P, Calabrese R, Casadio R (2005) Predicting protein stability changes from sequences using support vector machines. *Bioinformatics* **21 Suppl 2**: ii54-58

Castaldo G, Rippa E, Sebastio G, Raia V, Ercolini P, de Ritis G, Salvatore D, Salvatore F (1996) Molecular epidemiology of cystic fibrosis mutations and haplotypes in southern Italy evaluated with an improved semiautomated robotic procedure. *Journal of medical genetics* **33**: 475-479

Cenci E, Mencacci A, Fe d'Ostiani C, Montagnoli C, Bacci A, Del Sero G, Perito S, Bistoni F, Romani L (1998) Cytokine- and T-helper-dependent immunity in murine aspergillosis. *Research in immunology* **149**: 445-454; discussion 504-445

Chen L, Patel RP, Teng X, Bosworth CA, Lancaster JR, Jr., Matalon S (2006) Mechanisms of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activation by S-nitrosoglutathione. *The Journal of biological chemistry* **281**: 9190-9199

Cheng SH, Rich DP, Marshall J, Gregory RJ, Welsh MJ, Smith AE (1991) Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel. *Cell* **66**: 1027-1036

Cheung M, Akabas MH (1996) Identification of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel-lining residues in and flanking the M6 membrane-spanning segment. *Biophysical journal* **70**: 2688-2695

Chillon M, Casals T, Gimenez J, Ramos MD, Palacio A, Morral N, Estivill X, Nunes V (1994) Analysis of the CFTR gene confirms the high genetic heterogeneity of the Spanish population: 43 mutations account for only 78% of CF chromosomes. *Human genetics* **93**: 447-451

Chmiel JF, Konstan MW, Saadane A, Krenicky JE, Lester Kirchner H, Berger M (2002) Prolonged inflammatory response to acute Pseudomonas challenge in interleukin-10 knockout mice. *American journal of respiratory and critical care medicine* **165**: 1176-1181

Cohen AM, Yulish BS, Wasser KB, Vignos PJ, Jones PK, Sorin SB (1986) Evaluation of pulmonary hypertrophic osteoarthropathy in cystic fibrosis. A comprehensive study. *Am J Dis Child* **140**: 74-77

Collaco JM, Blackman SM, McGready J, Naughton KM, Cutting GR (2010) Quantification of the relative contribution of environmental and genetic factors to variation in cystic fibrosis lung function. *The Journal of pediatrics* **157**: 802-807 e801-803

Corvol H, Flamant C, Vallet C, Clement A, Brouard J (2006) [Modifier genes and cystic fibrosis]. *Archives de pediatrie : organe officiel de la Societe francaise de pediatrie* **13**: 57-63

Costes B, Girodon E, Ghanem N, Flori E, Jardin A, Soufir JC, Goossens M (1995) Frequent occurrence of the CFTR intron 8 (TG)_n 5T allele in men with congenital bilateral absence of the vas deferens. *European journal of human genetics : EJHG* **3**: 285-293

Crawford I, Maloney PC, Zeitlin PL, Guggino WB, Hyde SC, Turley H, Gatter KC, Harris A, Higgins CF (1991) Immunocytochemical localization of the cystic fibrosis gene product CFTR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 9262-9266

Crossley JR, Elliott RB, Smith PA (1979) Dried-blood spot screening for cystic fibrosis in the newborn. *Lancet* **1**: 472-474

Cuppens H, Lin W, Jaspers M, Costes B, Teng H, Vankeerberghen A, Jorissen M, Droogmans G, Reynaert I, Goossens M, Nilius B, Cassiman JJ (1998) Polyvariant mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes. The polymorphic (Tg)_m locus explains the partial penetrance of the T5 polymorphism as a disease mutation. *The Journal of clinical investigation* **101**: 487-496

Cutting G (2005) Modifier genetics: cystic fibrosis. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **6**: 237-260

D

Database CFM <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>.

Davies J, Neth O, Alton E, Klein N, Turner M (2000) Differential binding of mannose-binding lectin to respiratory pathogens in cystic fibrosis. *Lancet* **355**: 1885-1886

Dawson KP, Frossard PM (2000) A hypothesis regarding the origin and spread of the cystic fibrosis mutation deltaF508. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians* **93**: 313-315

Dawson RJ, Locher KP (2007) Structure of the multidrug ABC transporter Sav1866 from *Staphylococcus aureus* in complex with AMP-PNP. *FEBS letters* **581**: 935-938

De Boeck K, Munck A, Walker S, Faro A, Hiatt P, Gilmartin G, Higgins M (2014) Efficacy and safety of ivacaftor in patients with cystic fibrosis and a non-G551D gating mutation. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*

De Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, Taylor C, Cuppens H, Dodge J, Sinaasappel M (2006) Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax* **61**: 627-635

De Braekeleer M, Allard C, Leblanc J, Simard F, Aubin G (1997) Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis patients compound heterozygous for the A455E mutation. *Human genetics* **101**: 208-211

Denning GM, Ostedgaard LS, Cheng SH, Smith AE, Welsh MJ (1992) Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in chloride secretory epithelia. *The Journal of clinical investigation* **89**: 339-349

Dequeker E, Stuhmann M, Morris MA, Casals T, Castellani C, Claustres M, Cuppens H, des Georges M, Ferec C, Macek M, Pignatti PF, Scheffer H, Schwartz M, Witt M, Schwarz M, Girodon E (2009) Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders--updated European recommendations. *European journal of human genetics : EJHG* **17**: 51-65

Dezateux C, Walters S, Balfour-Lynn I (2000) Inhaled corticosteroids for cystic fibrosis. *The Cochrane database of systematic reviews*: CD001915

Di Sant'Agnese P, Darling R, Perera G, Shea E (1953) Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas; clinical significance and relationship to the disease. *Pediatrics* **12**: 2598-2605

Dork T, Wulbrand U, Richter T, Neumann T, Wolfes H, Wulf B, Maass G, Tummler B (1991) Cystic fibrosis with three mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Human genetics* **87**: 441-446

Du M, Liu X, Welch EM, Hirawat S, Peltz SW, Bedwell DM (2008) PTC124 is an orally bioavailable compound that promotes suppression of the human CFTR-G542X nonsense allele in a CF mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 2064-2069

E

Eigen H, Rosenstein BJ, FitzSimmons S, Schidlow DV (1995) A multicenter study of alternate-day prednisone therapy in patients with cystic fibrosis. Cystic Fibrosis Foundation Prednisone Trial Group. *The Journal of pediatrics* **126**: 515-523

el-Harith EA, Dork T, Stuhmann M, Abu-Srair H, al-Shahri A, Keller KM, Lentze MJ, Schmidtke J (1997) Novel and characteristic CFTR mutations in Saudi Arab children with severe cystic fibrosis. *Journal of medical genetics* **34**: 996-999

Estivill X, Bancells C, Ramos C (1997) Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. The Biomed CF Mutation Analysis Consortium. *Human mutation* **10**: 135-154

F

Fanconi G, Uehlinger E, Knauer C (1936) Das coeliakiesyndrom bei angeborener zystischer pankreasfibromatose und bronchiektasien. 753-756

Farber S (1945) Some organic digestive disturbances in early life. *JMichState MedSoc* **44**: 587-594

Farra C, Medawar R, Mroueh S, Souaid M, Cabet F, Awwad J (2008) Cystic fibrosis: a new mutation in the Lebanese population. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* **7**: 429-432

Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR, Durie PR, Legrys VA, Massie J, Parad RB, Rock MJ, Campbell PW, 3rd (2008) Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *The Journal of pediatrics* **153**: S4-S14

Fayon M, Corvol H, Chiron R, Bui S (2014) [National consensus regarding the prescription of inhaled corticosteroids in cystic fibrosis]. *Archives de pediatrie : organe officiel de la Societe francaise de pediatrie* **21**: 88-94

Frelet A, Klein M (2006) Insight in eukaryotic ABC transporter function by mutation analysis. *FEBS letters* **580**: 1064-1084

G

Gabolde M, Hubert D, Guilloud-Bataille M, Lenaerts C, Feingold J, Besmond C (2001) The mannose binding lectin gene influences the severity of chronic liver disease in cystic fibrosis. *Journal of medical genetics* **38**: 310-311

Gadsby D, Vergani P, Csanády L (2006) The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature*: 477-483.

Garred P, Pressler T, Lanng S, Madsen HO, Moser C, Laursen I, Balstrup F, Koch C (2002) Mannose-binding lectin (MBL) therapy in an MBL-deficient patient with severe cystic fibrosis lung disease. *Pediatric pulmonology* **33**: 201-207

Garred P, Pressler T, Madsen HO, Frederiksen B, Svejgaard A, Hoiby N, Schwartz M, Koch C (1999) Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. *The Journal of clinical investigation* **104**: 431-437

Gibson LE, Cooke RE (1959) A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* **23**: 545-549

Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW (2003) Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* **168**: 918-951

Girodon-Boulandet E, Costa C (2005) Génétique de la mucoviscidose. *Mt pédiatrie* **8**

Goss C, Newsom S, Schildcrout J, Sheppard L, Kaufman J (2004a) Effect of ambient air pollution on pulmonary exacerbations and lung function in cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*: 816-821

Goss CH, Newsom SA, Schildcrout JS, Sheppard L, Kaufman JD (2004b) Effect of ambient air pollution on pulmonary exacerbations and lung function in cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* **169**: 816-821

Gouya L, Pascaud O, Munck A, Elion J, Denamur E (1997) Novel mutation (A141D) in exon 4 of the CFTR gene identified in an Algerian patient. *Human mutation* **10**: 86-87

Grasemann H, Michler E, Wallot M, Ratjen F (1997) Decreased concentration of exhaled nitric oxide (NO) in patients with cystic fibrosis. *Pediatric pulmonology* **24**: 173-177

Grasemann H, Storm van's Gravesande K, Gartig S, Kirsch M, Buscher R, Drazen JM, Ratjen F (2002) Nasal nitric oxide levels in cystic fibrosis patients are associated with a neuronal NO synthase (NOS1) gene polymorphism. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* **6**: 236-241

Greally P, Hussein MJ, Cook AJ, Sampson AP, Piper PJ, Price JF (1993) Sputum tumour necrosis factor-alpha and leukotriene concentrations in cystic fibrosis. *Archives of disease in childhood* **68**: 389-392

Grody WW, Griffin JH, Taylor AK, Korf BR, Heit JA (2001) American College of Medical Genetics consensus statement on factor V Leiden mutation testing. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* **3**: 139-148

H

Haardt M, Benharouga M, Lechardeur D, Kartner N, Lukacs GL (1999) C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without

impairing its biogenesis. A novel class of mutation. *The Journal of biological chemistry* **274**: 21873-21877

Hamosh A, Rosenstein BJ, Cutting GR (1992) CFTR nonsense mutations G542X and W1282X associated with severe reduction of CFTR mRNA in nasal epithelial cells. *Human molecular genetics* **1**: 542-544

Hardin DS, LeBlanc A, Lukenbough S, Seilheimer DK (1997) Insulin resistance is associated with decreased clinical status in cystic fibrosis. *The Journal of pediatrics* **130**: 948-956

Higgins C, Linton K (2004) The ATP switch model for ABC transporters. . *Nature structural & molecular biology*: 918-926

Hinzpeter A, Aissat A, Sondo E, Costa C, Arous N, Gameiro C, Martin N, Tarze A, Weiss L, de Becdelievre A, Costes B, Goossens M, Galietta LJ, Girodon E, Fanen P (2010) Alternative splicing at a NAGNAG acceptor site as a novel phenotype modifier. *PLoS genetics* **6**

Hirawat S, Welch EM, Elfring GL, Northcutt VJ, Paushkin S, Hwang S, Leonard EM, Almstead NG, Ju W, Peltz SW, Miller LL (2007) Safety, tolerability, and pharmacokinetics of PTC124, a nonaminoglycoside nonsense mutation suppressor, following single- and multiple-dose administration to healthy male and female adult volunteers. *Journal of clinical pharmacology* **47**: 430-444

<http://www.vaincrelamuco.org/>

Hubert D (2003) [Cystic fibrosis in adults]. *La Revue du praticien* **53**: 158-162

Hull J, Shackleton S, Harris A (1993) Abnormal mRNA splicing resulting from three different mutations in the CFTR gene. *Human molecular genetics* **2**: 689-692

I

INNOGENETICS INNO-LIPA®.

J

Javier RM, Jacquot J (2011) La fragilité osseuse dans la mucoviscidose : quoi de neuf? *Revue du rhumatisme* **78**: 232-237

K

Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* **245**: 1073-1080

Kerem BS, Zielenski J, Markiewicz D, Bozon D, Gazit E, Yahav J, Kennedy D, Riordan JR, Collins FS, Rommens JM, et al. (1990) Identification of mutations in regions corresponding

to the two putative nucleotide (ATP)-binding folds of the cystic fibrosis gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 8447-8451

Kerem E, Hirawat S, Armoni S, Yaakov Y, Shoseyov D, Cohen M, Nissim-Rafinia M, Blau H, Rivlin J, Aviram M, Elfring GL, Northcutt VJ, Miller LL, Kerem B, Wilschanski M (2008) Effectiveness of PTC124 treatment of cystic fibrosis caused by nonsense mutations: a prospective phase II trial. *Lancet* **372**: 719-727

Kerem E, Kerem B (1995) The relationship between genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Current opinion in pulmonary medicine* **1**: 450-456

Kiesewetter S, Macek M, Jr., Davis C, Curristin SM, Chu CS, Graham C, Shrimpton AE, Cashman SM, Tsui LC, Mickle J, et al. (1993) A mutation in CFTR produces different phenotypes depending on chromosomal background. *Nature genetics* **5**: 274-278

Klein I, Sarkadi B, Varadi A (1999) An inventory of the human ABC proteins. *Biochimica et biophysica acta* **1461**: 237-262

Konstan MW, Byard PJ, Hoppel CL, Davis PB (1995) Effect of high-dose ibuprofen in patients with cystic fibrosis. *The New England journal of medicine* **332**: 848-854

Kovesi T, Corey M, Levison H (1993) Passive smoking and lung function in cystic fibrosis. *The American review of respiratory disease* **148**: 1266-1271

Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ (1997) The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Molecular immunology* **34**: 391-399

L

Laufer-Cahana A, Lerer I, Sagi M, Rachmilewitz-Minei T, Zamir C, Rivlin JR, Abeliovich D (1999) Cystic fibrosis mutations in Israeli Arab patients. *Human mutation* **14**: 543

Lazarus R, Klimecki WT, Palmer LJ, Kwiatkowski DJ, Silverman EK, Brown A, Martinez F, Weiss ST (2002) Single-nucleotide polymorphisms in the interleukin-10 gene: differences in frequencies, linkage disequilibrium patterns, and haplotypes in three United States ethnic groups. *Genomics* **80**: 223-228

Le Marechal C, Audrezet MP, Quere I, Ragueneas O, Langonne S, Ferec C (2001) Complete and rapid scanning of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene by denaturing high-performance liquid chromatography (D-HPLC): major implications for genetic counselling. *Human genetics* **108**: 290-298

LeGrys VA (1996) Sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis: practical considerations. *The Journal of pediatrics* **129**: 892-897

Lewis HA, Buchanan SG, Burley SK, Connors K, Dickey M, Dorwart M, Fowler R, Gao X, Guggino WB, Hendrickson WA, Hunt JF, Kearins MC, Lorimer D, Maloney PC, Post KW, Rajashankar KR, Rutter ME, Sauder JM, Shriver S, Thibodeau PH, Thomas PJ, Zhang M, Zhao X, Emtage S (2004) Structure of nucleotide-binding domain 1 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *The EMBO journal* **23**: 282-293

Linsdell P (2006) Mechanism of chloride permeation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *Experimental physiology* **91**: 123-129

Linsdell P, Evagelidis A, Hanrahan JW (2000) Molecular determinants of anion selectivity in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel pore. *Biophysical journal* **78**: 2973-2982

Loirat F, Hazout S, Lucotte G (1997) G542X as a probable Phoenician cystic fibrosis mutation. *Human biology* **69**: 419-425

Loumi O, Baghriche M, Delpech M, Kaplan JC, Bienvenu T (1999) Analysis of the complete coding region of the CFTR gene in ten Algerian cystic fibrosis families. *Human heredity* **49**: 81-84

Loumi O, Ferec C, Mercier B, Creff J, Fercot B, Denine R, Grangaud JP (2008) CFTR mutations in the Algerian population. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* **7**: 54-59

Lowe CU, May CD, Reed SC (1949) Fibrosis of the pancreas in infants and children; a statistical study of clinical and hereditary features. *Am J Dis Child* **78**: 349-374

M

Macek M, Jr., Mackova A, Hamosh A, Hilman BC, Selden RF, Lucotte G, Friedman KJ, Knowles MR, Rosenstein BJ, Cutting GR (1997) Identification of common cystic fibrosis mutations in African-Americans with cystic fibrosis increases the detection rate to 75%. *American journal of human genetics* **60**: 1122-1127

McCann JD, Welsh MJ (1990) Regulation of Cl⁻ and K⁺ channels in airway epithelium. *Annual review of physiology* **52**: 115-135

Mekus F, Ballmann M, Bronsveld I, Bijman J, Veeze H, Tummler B (2000) Categories of deltaF508 homozygous cystic fibrosis twin and sibling pairs with distinct phenotypic characteristics. *Twin research : the official journal of the International Society for Twin Studies* **3**: 277-293

Mekus F, Ballmann M, Bronsveld I, Dork T, Bijman J, Tummler B, Veeze HJ (1998) Cystic-fibrosis-like disease unrelated to the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Human genetics* **102**: 582-586

Messaoud T, Bel Haj Fredj S, Bibi A, Elion J, Ferec C, Fattoum S (2005) Molecular epidemiology of cystic fibrosis in Tunisia. *Annales de biologie clinique* **63**: 627-630

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research* **16**: 1215

Moran A, Becker D, Casella S, Gottlieb P, Kirkman M, Marshall B, Slovis B (2010) Epidemiology, pathophysiology, and prognostic implications of cystic fibrosis-related diabetes: a technical review. *Diabetes care* **33**

Morral N, Bertranpetit J, Estivill X, Nunes V, Casals T, Gimenez J, Reis A, Varon-Mateeva R, Macek M, Jr., Kalaydjieva L, et al. (1994) The origin of the major cystic fibrosis mutation (delta F508) in European populations. *Nature genetics* **7**: 169-175

Munck A, Gerardin M, Alberti C, Ajzenman C, Lebourgeois M, Aigrain Y, Navarro J (2006) Clinical outcome of cystic fibrosis presenting with or without meconium ileus: a matched cohort study. *Journal of pediatric surgery* **41**: 1556-1560

Munck A, Roussey M (2008) The French nationwide cystic fibrosis newborn screening program: strategy and results. *Archives de pediatrie : organe officiel de la Societe francaise de pediatrie* **15**: S1-6

Munck A, Sahler C, Briard M, Vidailhet M, Farriaux JP (2005) [Cystic fibrosis: the French neonatal screening organization, preliminary results]. *Archives de pediatrie : organe officiel de la Societe francaise de pediatrie* **12**: 646-649

N

Neri AS, Lori I, Taccetti G, Festini F, de Martino M, Masi L, Brandi ML (2006) Alteration of bone mineral density in cystic fibrosis adults. *Chest* **130**: 1952-1953; author reply 1953

Ng PC, Henikoff S (2003) SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic acids research* **31**: 3812-3814

O

O'Sullivan P, D Freedman S (2009) Cystic Fibrosis. *Lancet* **373**: 1891–1904

Oppenheimer EA, Case AL, Esterly JR, Rothberg RM (1970) Cervical mucus in cystic fibrosis: a possible cause of infertility. *Am J Obstet Gynecol* **108**: 673-674

Oppenheimer EH, Esterly JR (1969) Observations on cystic fibrosis of the pancreas. V. Developmental changes in the male genital system. *The Journal of pediatrics* **75**: 806-811

Ouellet C, Bilodeau G, Cantin AM (2007) [Oxidative stress, smoking and CFTR: can cystic fibrosis be acquired?]. *Medecine sciences : M/S* **23**: 9-10

P

Paccou J, Zeboulon N, Combescure C, Gossec L, Cortet B (2010) The prevalence of osteoporosis, osteopenia, and fractures among adults with cystic fibrosis: a systematic literature review with meta-analysis. *Calcified tissue international* **86**: 1-7

Parad RB, Comeau AM, Dorkin HL, Dovey M, Gerstle R, Martin T, O'Sullivan BP (2005) Sweat testing infants detected by cystic fibrosis newborn screening. *The Journal of pediatrics* **147**: S69-72

Q

Quan JM, Tiddens HA, Sy JP, McKenzie SG, Montgomery MD, Robinson PJ, Wohl ME, Konstan MW (2001) A two-year randomized, placebo-controlled trial of dornase alfa in young patients with cystic fibrosis with mild lung function abnormalities. *The Journal of pediatrics* **139**: 813-820

Quinton PM (1983) Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature* **301**: 421-422

Quinton PM (1994) Viscosity versus composition in airway pathology. *American journal of respiratory and critical care medicine* **149**: 6-7

R

Radpour R, Gourabi H, Dizaj AV, Holzgreve W, Zhong XY (2008) Genetic investigations of CFTR mutations in congenital absence of vas deferens, uterus, and vagina as a cause of infertility. *Journal of andrology* **29**: 506-513

Ramsey BW, Davies J, McElvaney NG, Tullis E, Bell SC, Drevinek P, Griese M, McKone EF, Wainwright CE, Konstan MW, Moss R, Ratjen F, Sermet-Gaudelus I, Rowe SM, Dong Q, Rodriguez S, Yen K, Ordonez C, Elborn JS (2011) A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *The New England journal of medicine* **365**: 1663-1672

Ratjen F, Döring G (2003) Cystic Fibrosis. *The Lancet* 681-689

Reddy MM, Quinton PM, Haws C, Wine JJ, Grygorczyk R, Tabcharani JA, Hanrahan JW, Gunderson KL, Kopito RR (1996) Failure of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to conduct ATP. *Science* **271**: 1876-1879

Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, et al. (1989a) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**: 1066-1073

Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC (1989b) Identification of the Cystic-Fibrosis Gene - Cloning and Characterization of Complementary-DNA. *Science* **245**: 1066-1072

Robertson J, Macdonald K (2010) Prevalence of bone loss in a population with cystic fibrosis. *Br J Nurs* **19**: 636-639

Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, et al. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* **245**: 1059-1065

Rosenberg MF, Kamis AB, Aleksandrov LA, Ford RC, Riordan JR (2004) Purification and crystallization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *The Journal of biological chemistry* **279**: 39051-39057

Rota M, Nguyen-Khoa T, Marchand M, Feldmann D, Dumont J, Khalfon D, Vassault A, Borgard JP (2008) [Sweat testing: review of technical requirements]. *Annales de biologie clinique* **66**: 221-227

Rowntree RK, Harris A (2003) The phenotypic consequences of CFTR mutations. *Annals of human genetics* **67**: 471-485

Rubin BK (1990) Exposure of children with cystic fibrosis to environmental tobacco smoke. *The New England journal of medicine* **323**: 782-788

S

Santis G, Osborne L, Knight R, Hodson ME, Ramsay M (1990) Genetic influences on pulmonary severity in cystic fibrosis. *Lancet* **335**: 294

Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G (2002) Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic acids research* **30**: e57

Schurmann M (2003) Angiotensin-converting enzyme gene polymorphisms in patients with pulmonary sarcoidosis: impact on disease severity. *American journal of pharmacogenomics : genomics-related research in drug development and clinical practice* **3**: 233-243

Schwartz M, Sorensen N, Brandt NJ, Hogdall E, Holm T (1995) High incidence of cystic fibrosis on the Faroe Islands: a molecular and genealogical study. *Human genetics* **95**: 703-706

Schwarz JM, Rodelsperger C, Schuelke M, Seelow D (2010) MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nature methods* **7**: 575-576

Schwarzenberg SJ, Thomas W, Olsen TW, Grover T, Walk D, Milla C, Moran A (2007) Microvascular complications in cystic fibrosis-related diabetes. *Diabetes care* **30**: 1056-1061

Schwiebert EM, Benos DJ, Egan ME, Stutts MJ, Guggino WB (1999) CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. *Physiological reviews* **79**: S145-166

Schwiebert EM, Egan ME, Hwang TH, Fulmer SB, Allen SS, Cutting GR, Guggino WB (1995) CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. *Cell* **81**: 1063-1073

Scotet V, Dugueperoux I, Audrezet M, Audebert-Bellanger S, Muller M, Blayau M, C. F (2010) Focus on cystic fibrosis and other disorders evidenced in fetuses with sonographic finding of echogenic bowel: 16-year report from Brittany, France. *Am J Obstet Gynecol* **203**: 592 e591-596

Sermet-Gaudelus I, Girodon E, Sands D, Stremmler N, Vavrova V, Deneuille E, Reix P, Bui S, Huet F, Lebourgeois M, Munck A, Iron A, Skalicka V, Bienvenu T, Roussel D, Lenoir G, Bellon G, Sarles J, Macek M, Roussey M, Fajac I, Edelman A (2010a) Clinical phenotype and genotype of children with borderline sweat test and abnormal nasal epithelial chloride transport. *American journal of respiratory and critical care medicine* **182**: 929-936

Sermet-Gaudelus I, Munck A, Rota M, Roussey M, Feldmann D, Nguyen-Khoa T (2010b) [French guidelines for sweat test practice and interpretation for cystic fibrosis neonatal screening]. *Archives de pediatrie : organe officiel de la Societe francaise de pediatrie* **17**: 1349-1358

Sermet-Gaudelus I, Roussel D, Bui S, Deneuille E, Huet F, Reix P, Bellon G, Lenoir G, Edelman A (2006) The CF-CIRC study: a French collaborative study to assess the accuracy of cystic fibrosis diagnosis in neonatal screening. *BMC pediatrics* **6**: 25

Serohijos AW, Hegedus T, Aleksandrov AA, He L, Cui L, Dokholyan NV, Riordan JR (2008) Phenylalanine-508 mediates a cytoplasmic-membrane domain contact in the CFTR 3D structure crucial to assembly and channel function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 3256-3261

Sheridan MB, Fong P, Groman JD, Conrad C, Flume P, Diaz R, Harris C, Knowles M, Cutting GR (2005) Mutations in the beta-subunit of the epithelial Na⁺ channel in patients with a cystic fibrosis-like syndrome. *Human molecular genetics* **14**: 3493-3498

Slatkin M, Rannala B (1997) Estimating the age of alleles by use of intraallelic variability. *American journal of human genetics* **60**: 447-458

Smith SS, Liu X, Zhang ZR, Sun F, Kriewall TE, McCarty NA, Dawson DC (2001) CFTR: covalent and noncovalent modification suggests a role for fixed charges in anion conduction. *The Journal of general physiology* **118**: 407-431

Smyth A, O'Hea U, Williams G, Smyth R, Heaf D (1994) Passive smoking and impaired lung function in cystic fibrosis. *Archives of disease in childhood* **71**: 353-354

Starner TD, McCray PB, Jr. (2005) Pathogenesis of early lung disease in cystic fibrosis: a window of opportunity to eradicate bacteria. *Annals of internal medicine*: 816-822

Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC, Hamrick M, Cohn JA, Rossier BC, Boucher RC (1995) CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science* **269**: 847-850

Sunyaev S, Ramensky V, Bork P (2000) Towards a structural basis of human non-synonymous single nucleotide polymorphisms. *Trends in genetics : TIG* **16**: 198-200

T

Tabcharani JA, Rommens JM, Hou YX, Chang XB, Tsui LC, Riordan JR, Hanrahan JW (1993) Multi-ion pore behaviour in the CFTR chloride channel. *Nature* **366**: 79-82

Taccetti G, Campana S, Festini F, Mascherini M, Doring G (2005) Early eradication therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *The European respiratory journal* **26**: 458-461

Tavtigian SV, Byrnes GB, Goldgar DE, Thomas A (2008) Classification of rare missense substitutions, using risk surfaces, with genetic- and molecular-epidemiology applications. *Human mutation* **29**: 1342-1354

Tepnel Diagnostics Ltd (2004) ELUCIGENETM CF 30 Instructions sheet.

Tsui L, Buchwald M, Barker D, Braman J, Knowlton R, Schumm J, Eiberg H, Mohr J, Kennedy D, Plavsic N (1985) Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science* 1054-1057.

Tzetis M, Kanavakis E, Antoniadis T, Doudounakis S, Adam G, Kattamis C (1997) Characterization of more than 85% of cystic fibrosis alleles in the Greek population, including five novel mutations. *Human genetics* **99**: 121-125

V

van den Berg JM, Morton AM, Kok SW, Pijl H, Conway SP, Heijerman HG (2008) Microvascular complications in patients with cystic fibrosis-related diabetes (CFRD). *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* **7**: 515-519

Vankeerberghen A, Cuppens H, Cassiman JJ (2002) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* **1**: 13-29

Vanscoy LL, Blackman SM, Collaco JM, Bowers A, Lai T, Naughton K, Algire M, McWilliams R, Beck S, Hoover-Fong J, Hamosh A, Cutler D, Cutting GR (2007) Heritability of lung disease severity in cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* **175**: 1036-1043

W

Welch EM, Barton ER, Zhuo J, Tomizawa Y, Friesen WJ, Trifillis P, Paushkin S, Patel M, Trotta CR, Hwang S, Wilde RG, Karp G, Takasugi J, Chen G, Jones S, Ren H, Moon YC, Corson D, Turpoff AA, Campbell JA, Conn MM, Khan A, Almstead NG, Hedrick J, Mollin A, Risher N, Weetall M, Yeh S, Branstrom AA, Colacino JM, Babiak J, Ju WD, Hirawat S, Northcutt VJ, Miller LL, Spatrack P, He F, Kawana M, Feng H, Jacobson A, Peltz SW, Sweeney HL (2007) PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* **447**: 87-91

Welsh M, Smith A (1995) Cystic fibrosis. *Sci Am* **273**: 52-59

Welsh MJ, Smith AE (1993) Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* **73**: 1251-1254

Weyler RT, Yurko-Mauro KA, Rubenstein R, Kollen WJ, Reenstra W, Altschuler SM, Egan M, Mulberg AE (1999) CFTR is functionally active in GnRH-expressing GT1-7 hypothalamic neurons. *The American journal of physiology* **277**: C563-571

Wills PJ, Hall RL, Chan W, Cole PJ (1997) Sodium chloride increases the ciliary transportability of cystic fibrosis and bronchiectasis sputum on the mucus-depleted bovine trachea. *The Journal of clinical investigation* **99**: 9-13

Wilschanski M, Miller LL, Shoseyov D, Blau H, Rivlin J, Aviram M, Cohen M, Armoni S, Yaakov Y, Pugatsch T, Cohen-Cymberknoh M, Miller NL, Reha A, Northcutt VJ, Hirawat S, Donnelly K, Elfring GL, Ajayi T, Kerem E (2011) Chronic ataluren (PTC124) treatment of nonsense mutation cystic fibrosis. *The European respiratory journal* **38**: 59-69

www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app

Z

Zielenski J, Bozon D, Kerem B, Markiewicz D, Durie P, Rommens JM, Tsui LC (1991) Identification of mutations in exons 1 through 8 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics* **10**: 229-235

Résumé

La mucoviscidose est la maladie autosomique récessive grave la plus fréquente dans la population d'origine caucasienne. Elle est due à des anomalies du gène *CFTR*, dont les multiples mutations décrites rendent compte en partie de la grande variabilité phénotypique.

Loin d'être une pathologie européenne la mucoviscidose est présente en Algérie.

A l'heure du développement de thérapies ciblées selon les mutations portées par les patients, la caractérisation de ces dernières est plus qu'indispensable.

La première partie de ce travail est focalisée sur la recherche des anomalies du gène *CFTR* responsable de la mucoviscidose dans un échantillon de 24 patients appartenant à 24 familles non apparentées. L'exploration des mutations est réalisée par différentes techniques de biologie moléculaire (PCR, PCR/ARMS, séquençage), 14 mutations différentes ont pu être identifiées.

Dans la deuxième partie de cette thèse nous nous sommes intéressés à trois mutations qui de par la littérature semblent spécifiques à la population Algérienne : c.680T>G (L227R), c.3907A>C (N1303H), c.422C>A (A141D). Les effets délétères de ces mutations ont été étudiés par le biais d'une combinaison de logiciels d'étude *in silico* et de modélisation moléculaire tridimensionnelle (3D).

La mutation c.680T>G (L227R) a été prédite comme altérant les relations hydrophobes au cœur même de la protéine ou avec les lipides formant la membrane.

D'autre part, la c.3907A>C (N1303H) a été prédite comme délétère altérant la structure et la fonction du canal CFTR, les changements physicochimiques entre les acides aminés natifs et mutés perturbent fortement la stabilité de la protéine. Enfin, la mutation c.422C>A (A141D) est prédite comme délétère et semble perturber les interactions ioniques mais aussi les interactions au sein des différents segments formant le pore du canal CFTR.

Les résultats obtenus au terme de ce travail auraient pour but de contribuer à moyen terme à la mise en place d'un programme de diagnostic génétique, et à la mise à disposition de conseil génétique pour les familles à risque. A long terme, ces résultats pourraient aider à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaire à l'origine de cette pathologie.

Mots-clés : Mucoviscidose, gène *CFTR*, mutations, PCR, PCR/ARMS, séquençage, étude *in silico*.