

LISTE D'ABREVIATIONS

AB	: Applied Biosystems
ABC	: ATP-Binding Cassette
ABPA	: Aspergillose broncho-pulmonaire allergique
ADN	: Acide désoxyribonucléique
AMPc	: Adénosine Monophosphate cyclique
ARN	: Acide RiboNucléique
ARNm	: Acide RiboNucléique messenger
ASL	: Airway surface liquid
ATP	: Adénosine triphosphate
ATPase	: Enzyme hydrolysant l'ATP
CFRD	: Cystic fibrosis-related diabetes
CFTR	: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CHU	: Centre Hospitalier Universitaire
CL ⁻	: Chlore
DDB	: Dilatations des bronches
EC	: Electrophorèse capillaire
ECBC	: Examen cyto bactériologique des crachats
EDTA	: Acide éthylène diamine tétra-acétique
ENac	: Epithelial sodium channel
FB	: Flush butter
FLT	: Flush tether
GI	: Gastro-intestinal
HCL ⁻	: Acide chlorhydrique
HCO ₃ ⁻	: Ions Bicarbonates
HNE	: Human neutrophil elastase
IGV	: Integrative Genomics Viewer
IP	: Insuffisance pancréatique
Kb	: Kilo-bases
LB	: Loading beads
MBL	: Mannose-binding lectin
MSD	: Membrane-spanning domain

NACL	: Chlorure de sodium
NBD	: Nucleotide-binding domain
NGS	: Next Generation Sequencing
NKCC	: Na-K-Cl cotransporter
ONT	: Oxford Nanopore Technologie
ORL	: Oto-rhino-laryngologie
PCR	: Réaction en chaîne par polymérase
PH	: Potentiel hydrogène
ROS	: Reactive oxygen species
SA	: Semaines d'aménorrhée
SBS	: Séquençage par synthèse
SLC	: Solute-carrier
SQB	: Sequencing buffer
TDM	: Tomodensitométrie
TGF- β	: Transforming growth factor β éta
TIR	: Trypsine immuno-réactive
TMD	: Transmembrane Domain
VCF	: Variant Call Format
VEMS	: Volume expiratoire maximal par second
α HL	: α -Hémolysine

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Composition du milieu réactionnel	17
Tableau 2 : les mutations ciblées par les 6 amplicons :	18
Tableau 3: Programmation de la PCR	20
Tableau 4 : La consanguinité chez les parents.....	29
Tableau 5 : Motifs de consultation de nos patients.....	30
Tableau 6 : Les différentes mutations retrouvées chez nos patients.	35
Tableau 7 : Les mutations classées en fonction de leur effet connu ou supposé sur la protéine CFTR.	46

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : les amorces des 6 différents amplicons désignés.....	19
Figure 2 : Image montrant les composantes de la flow cell	22
Figure 3 : Image montrant la technique de chargement de la librairie	23
Figure 4 : page de lancement de séquençage.....	24
Figure 5: Image montrant l'alignement des séquences sur IGV	25
Figure 6 : Répartition des patients selon le sexe	27
Figure 7 : Origine géographique des patients.....	28
Figure 8 : Les signes cliniques retrouvés chez nos patients par ordre de fréquence	31
Figure 9: Valeurs du chlore sudoral : Test de la sueur	32
Figure 10 : structure de la protéine CFTR	41
Figure 11 : Transport d'ions dans les voies respiratoires	44
Figure 12 : Mécanisme proposé pour le développement d'une infection chronique des voies respiratoires dans la mucoviscidose	50
Figure 13: Radiographie thoracique d'un enfant montrant une infiltration due à l'ABPA	54
Figure 14 : Méthode d'amplification NGS 2 ^{ème} génération	65
Figure 15 : Diagramme de flux indiquant les stratégies de séquençage possibles pour différents types d'échantillons.	66

PLAN

INTRODUCTION GENERALE	9
MATÉRIELS ET MÉTHODES	12
I. La population étudiée	13
1. Critères d'inclusion	13
2. Critères d'exclusion	13
II. Le recueil des données.....	14
III. Nature de prélèvement et de conservation	14
IV. Extraction de l'ADN	14
1. Principe	15
2. Protocole	15
3. Analyse qualitative de l'ADN extrait par NanoDrop	16
V. Séquençage ciblé du gène <i>CFTR</i> par Oxford Nanopore Technology (ONT)	
1. Principe	17
2. Protocole	17
2.1 PCR : 6 PCR différentes pour détecter 13 variants.....	17
2.2 Amplification	19
2.3 Analyse d'ADN amplifié par électrophorèse sur gel d'Agarose	
2.4 Purifier l'ADN restant en utilisant les billes Ampure 0.8X (volume de billes : volume d'ADN = 0.8 :1) Billes agencourt Ampure XP , Beckman Coulter , catalogue# A63881	20
2.5 Doser les produits PCR purifiés en utilisant le Nanodrop	21
2.6 Préparation de la librairie Nanopore en utilisant SQK-PBK004 et une Flow cell FONGLE.....	21
2.7 Chargement de la flow cell.....	22
2.8 Lancement du séquençage	24
2.9 Analyse des séquences	24
RESULTATS :	26
I. Analyse des observations.....	27
1. Caractéristiques générales des patients.....	27
2. Données épidémiologiques	28
2.1 Origine géographique des patients	28
2.2 Age au Diagnostic/Age au début des symptômes	28
3. Antécédents de consanguinité.....	29
4. Motif de consultation	30

5. Signes cliniques	31
6. Test de la sueur	32
7. Signes radiologiques	33
8. Explorations fonctionnelles respiratoires	33
II. Résultats du nanoséquençage	34
DISCUSSION	37
I.Epidémiologie	38
II.GENETIQUE DE LA MUCOVISCIDOSE :	38
1. Généralité :	38
2. Le gène <i>CFTR</i> :	39
3. Protéine sauvage <i>CFTR</i> :	40
3.1 . Structure et biosynthèse de la protéine <i>CFTR</i>	40
3.2. Localisation	42
3.3. Fonction de la protéine <i>CFTR</i>	43
4. Mutation du gène <i>CFTR</i> :	45
4.1. Classification Mutations de <i>CFTR</i> :	45
4.2. Distribution géographique des mutations du gène <i>CFTR</i>	47
4.3. Relation génotype phénotype :	47
III.DIAGNOSTIC DE LA MUCOVISCIDOSE	49
1. Diagnostic clinique	49
1.1. Manifestations pulmonaires et complications.	49
i. Physiopathologie	49
ii. Exacerbation pulmonaire	52
iii. Hémoptysie	54
iv. Pneumothorax	54
v. Défaillance respiratoire	55
vi. L'asthme chez les patients atteints de la mucoviscidose	55
1.2. Affection des voies aériennes supérieures	55
1.3. Manifestations gastro-intestinales	55
i. Malabsorption	56
ii. Défaillance de pancréas exocrine	56
iii. Manifestations hépatobiliaires	57
1.4 Manifestations endocriniennes	58
1.5 Manifestations urogénitales	59
IV. Signes radiologiques	60

1. Radiographie thoracique standard :	60
2. TDM thoracique :	61
V.le test de la sueur :.....	62
VI.Diagnostic moléculaire ;	63
1. Séquençage de Sanger :	63
2. NGS	64
3. nanopore:	67
3.1. Introduction :.....	67
i. Nanopores biologiques :	63
ii. Nanopores à l'état solide :.....	69
3.2. Technologie de séquençage par nanopores :	70
3.3. Processus du séquençage :	71
3.4. Application du nanopore :.....	72
i. Avantages :.....	73
ii. Limites :.....	73
VII.PRISE EN CHARGE :	75
1. Nouvelles strategies thérapeutiques	76
VIII.diagnostic prénatal.....	76
IX.Dépistage néonatal : trypsine immunoréactive et recherche génétique	77
X.Conseil génétique:.....	78
CONCLUSION	79
RESUME	81
ANNEXES	87
BIBLIOGRAPHIES	90

INTRODUCTION GENERALE

La mucoviscidose est une maladie monogénique, autosomique récessive, touchant au moins 100 000 personnes dans le monde. Des mutations du gène *CFTR*, le gène codant pour le canal ionique épithélial qui transporte normalement le chlorure et le bicarbonate, entraînent une altération de l'hydratation et de la clairance du mucus. Par conséquent, La mucoviscidose classique se caractérise par une infection et une inflammation pulmonaires chroniques, une insuffisance pancréatique exocrine, une infertilité masculine, et peut inclure plusieurs comorbidités telles que le diabète lié à la mucoviscidose ou la maladie hépatique liée à la mucoviscidose. Cette maladie autosomique récessive est diagnostiquée dans de nombreuses régions à la suite d'un dépistage néonatal, tandis que dans d'autres régions, le diagnostic repose sur un ensemble de manifestations cliniques multi-organes reconnues, sur des concentrations élevées de chlorure dans la sueur ou sur des mutations du gène *CFTR*. Dans certains cas, cette maladie est moins facile à diagnostiquer car elle ne touche qu'un seul organe, cette situation est considérée dans le contexte de variants génétiques entraînant une fonction résiduelle de la protéine. [1][2]

La recherche sur la mucoviscidose s'est considérablement intensifiée après la découverte du gène régulateur de la conductance transmembranaire de la FK (*CFTR*), qui compte plus de 2100 mutations différentes.

L'espérance de vie des personnes atteintes de mucoviscidose a été progressivement améliorée grâce aux stratégies de gestion, notamment l'augmentation de la clairance mucociliaire et le traitement agressif des infections. Cependant, la restauration de la fonction de la protéine CFTR grâce à de nouveaux médicaments modulateurs à petites molécules transforme la maladie pour de nombreux patients. Les pipelines d'essais cliniques explorent activement de nombreuses autres approches, qui seront de plus en plus nécessaires à mesure que la survie s'améliore et que la population d'adultes atteints de mucoviscidose augmente.

Le type de la mutation est un facteur déterminant dans la prise en charge. Les nouveaux traitements se basent sur la détermination du profil mutationnelle chez la population atteinte afin d'améliorer la prise en charge de ces patients. Pour les patients présentant des mutations communes comme la mutation F508del, les modulateurs de CFTR transforment la vie et peuvent même prévenir des complications majeures s'ils sont utilisés dès la petite enfance. Pour certains patients présentant des mutations rares du *CFTR*, une voie de traitement doit encore être développée.

Le séquençage Sanger à la recherche de la mutation deltaF508 est la méthode adoptée dans l'ensemble des laboratoires de génétique médicale au Maroc, cependant, la majorité des patients n'étaient pas porteurs de cette délétion.

Les technologies de séquençage de nouvelle génération en précisant 'NGS 2^{ème} génération' permettent de couvrir tout le gène *CFTR*, avec des résultats moins couteux et rapide. Alors que la technologie 3^{ème} génération, notamment le nanopore, a les mêmes caractéristiques que la technologie précédente mais avec une rapidité plus importante et un cout moindre, ce qui la rend une technologie avec beaucoup de potentiel dans le futur.

Dans notre étude, nous nous sommes basés sur la technologie nanopore afin de déterminer les mutations les plus fréquentes dans notre population, aussi bien, nous avons examiné la qualité et l'intérêt du nanopore dans les diagnostics ciblés et long range PCR.

Les objectifs de notre travail sont les suivants :

- Décrire les différents aspects cliniques de la mucoviscidose chez nos patients.
- Décrire le profil moléculaire de la mucoviscidose chez nos patients.
- Evaluer la fiabilité et l'intérêt du nano séquençage dans le diagnostic moléculaire de la mucoviscidose au Maroc.
- Attirer l'attention sur les difficultés de diagnostic de la mucoviscidose dans notre pays.

MATERIELS ET METHODES

Il s'agit d'une étude rétrospective basée sur une analyse clinique descriptive puis moléculaire par séquençage par nanopore.

I. La population étudiée

L'étude a recruté 16 patients suspects atteints de mucoviscidose et adressés au service de génétique du CHU Hassan II Fès pour analyse moléculaire.

1. Critères d'inclusion :

- ☞ Tableau clinique orientant vers une atteinte de mucoviscidose.
- ☞ Test de la sueur suspect.

2. Critères d'exclusion :

- ☞ Confirmation d'un autre diagnostic

II. Le recueil des données

Pour que notre étude soit une source d'information utile, nous avons recueilli les données nécessaires à l'aide d'une fiche d'exploitation (voir annexe).

Les données recueillies sont :

- ✓ Nom ;
- ✓ Prénom ;
- ✓ Sexe ;
- ✓ Date de naissance ;
- ✓ Région géographique ;
- ✓ Age au diagnostic ;
- ✓ Age de début de symptômes ;

- ✓ Consanguinité ;
- ✓ Résultat du test de la sueur ;
- ✓ Présence de manifestations digestives ;
- ✓ Présence de manifestations pulmonaires ;
- ✓ Agénésie bilatérale des canaux déférents ;
- ✓ Poids et taille ;
- ✓ Examens radiologiques ;
- ✓ Explorations fonctionnelles respiratoires ;

III. Nature de prélèvement et conservation.

Pour chaque patient un prélèvement de 3 à 5 ml de sang veineux périphérique a été recueilli dans un tube EDTA (Ethylène Diamine Tétra-acétique acide) qui peut être conservé à 4°C ou -20°C pour une utilisation ultérieure.

IV. Extraction de l'ADN :

L'extraction de l'ADN est la première étape pour l'analyse moléculaire. Elle consiste en l'isolement de l'ADN génomique à partir du plasma en quantité suffisante pour permettre son analyse. Les échantillons pour lesquels l'amplification par PCR est satisfaisante feront l'objet d'un séquençage dans le but de détecter les mutations génétiques.

1.Principe :

L'extraction de l'ADN génomique a été effectuée à l'aide du kit PureLink™ (référence : K1820-01, K1820-02), elle est basée sur la liaison sélective de l'ADN à une membrane à base de silice en présence de fortes concentrations de sels chaotropiques. Le lysat est préparé à partir du sang, les cellules sont digérées avec la protéinase K à 56°C en utilisant une formulation de tampon de digestion optimisée facilitant la dénaturation des protéines et renforçant l'activité de la protéinase K. Le lysat est mélangé à l'éthanol et au tampon de liaison qui permet une forte liaison de l'ADN avec la colonne de rotation.

L'ADN se lie à la membrane à base de silice dans la colonne et les impuretés sont éliminées par lavage en profondeur avec des tampons de lavage. L'ADN est ensuite élué dans le tampon d'éluion à faible teneur en sel.

2.Protocole :

Dans un tube Eppendorf de 1,5ml, un volume de 200µl du sang est mélangé avec 20µl de la protéinase k et 200µl de la solution de lyse, vortexé puis incubé pendant 10min à 60°C. Par la suite, une série de lavages a été effectuée ; à l'aide de 200µl d'éthanol absolu, puis le mélange est remis dans une colonne PureLink™ et centrifugé 1min à 8000rpm, le tube collecteur fourni par le kit doit être jeté à chaque fois. Un deuxième lavage est réalisé avec 400µl d'une solution tampon « Wash Buffer1 », le mélange est ensuite centrifugé 1min à 8000rpm et le culot est par la suite jeté. Le dernier lavage est effectué avec 400µl de tampon « Wash Buffer2 » et centrifugé 3min à 14000rpm.

La colonne est mise dans un tube Eppendorf de 1,5ml et 70µl de tampon d'éluion sont ajoutés.

On incube 5min à température ambiante. Une dernière centrifugation d'1min à 8000 rpm est réalisée pour récupérer l'ADN génomique.

3. Analyse qualitative de l'ADN extrait par NanoDrop®

Le dosage de l'ADN extrait est réalisé par spectrophotométrie à 260nm sur NanoDrop® qui permet de déterminer sa pureté:

- L'ADN est donc qualifié de pure si le ratio 260/280 est compris entre 1,8 - 2.
- Le rapport >2 indique une contamination par les ARN.
- Le rapport $<1,8$ en faveur d'une contamination par des protéines.

V. Séquençage ciblé du gène *CFTR* par Oxford Nanopore Technology (ONT)

1. Principe

Le séquençage par nanopore est une technologie unique et évolutive qui permet une analyse directe en temps réel de longs fragments d'ADN ou d'ARN. Il fonctionne en surveillant les modifications d'un courant électrique lorsque les acides nucléiques passent à travers un nanopore protéique. Le signal résultant est décodé pour fournir la séquence d'ADN ou d'ARN spécifique. Nous avons utilisé la technologie long-range PCR, puis on a séquencé par nanopore le produit de PCR après préparation de la librairie.

2. Protocole

2.1 PCR : 6 PCR différentes pour détecter 13 variants

Dans 6 tubes PCR différents de 0,2 ml, un mélange PCR (sur glace) a été préparé comme suit (1 mélange/amplicon) en utilisant la même amorce de code-barres pour les 6 amplicons mais le code-barre est changé entre les patients (1 code-barre = 1 patient).

Tableau 1 : Composition du milieu réactionnel

Réactifs	Volume
ADN	100 ng/ul (1 ul)
Amorce F à 10uM	0.25ul
Amorce R à 10uM	0.25ul
Amorce Barcodée à 10 uM	0.5ul
LongAmp Hot Start Taq 2x Master mix	12.5ul
Nuclease-free water	Jusqu'à 25ul
Volume total	25 ul

Tableau 2 : les mutations ciblées par les 6 amplicons :

	Nomenclature traditionnelle	NM_000492.4	GRCh38	Amplicon	from to GRCh38 chr7	size
117534366	711+1G>T (10.8%)	c.579+1G>T	g. 117534366 G>T	1	117534040 to 117540515	6.5
117535348	L227R (2%)	c.680T>G	g. 117535348 T>G	1	117534040 to 117540515	6.5
117540230	R334W (1.4%)	c.1000C>T	g. 117540230 C>T	1	117534040 to 117540515	6.5
117540270	R347P (1.4%)	c.1040G>C	g. 117540270 G>C	1	117534040 to 117540515	6.5
117559591	F508del (32.4%)	c.1521_1523del	g. 117559591-117559593 delCTT	2	117559121 to 117559935	0.836
117587778	G542X (5.4%)	c.1624G>T	g. 117587778 G>T	3	117586968 to 117592913	5,946
117592147	2113delA (1.4%)	c.1981del	g. 117592147 delA	3	117586968 to 117592913	5,946
117592218	2183AA->G (% ?)	c.2051_2052delins G	g. 117592218-117592219 AA>G	3	117586968 to 117592913	5,946
117627525	R1158X (1.4%)	c.3472C>T	g. 117627525 C>T	4a	117627056 to 117627831	0.8
117627537	R1162X (4%)	c.3484C>T	g. 117627537 C>T	4a	117627056 to 117627831	0.8
117639961	3849+10kbC>T (1.4%)	c.3718-2477C>T	g. 117639961 C>T	4b	117639581 to 117640389	0.83
117642566	W1282X (6.8%)	c.3846G>A	g. 117642566 G>A	5	117642061 to 117653225	11,184
117652877	N1303K (3.4%)	c.3909C>G	g. 117652877 C>G	5	117642061 to 117653225	11,184

2.2. Amplification :

6 amplicons ont été ciblés, *pour cibler 13 variants observés chez la population marocaine rapportés par des études françaises* .

<p>Amplicon 1 (6.5kb): Primers cover region: chr7:117540515 to 117534040 (GRCh38) hCFTR_amplicon1 Fwd: TTTCTGTTGGTGCTGATATTGCTTTCTGCCTAGATGCTGGGAAAT hCFTR_amplicon1 Rev: ACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC TCATACTGTCCAGAGAAATGCTAGG</p>
<p>Amplicon 2 (0.836kb): Primers cover region: chr7:117559121 to 117559935 (GRCh38) hCFTR_amplicon2 Fwd: TTTCTGTTGGTGCTGATATTGCCACTCGACACAGAGTGAGCA hCFTR_amplicon2 Rev: ACTTGCCTGTCGCTCTATCTTCAACCATTGAGGACGTTTGTCTC</p>
<p>Amplicon 3 (5.946kb): Primers cover region: chr7:117586968 to 117592913 (GRCh38) hCFTR_amplicon3 Fwd: TTTCTGTTGGTGCTGATATTGCCGGATAGTATTTAGCTTTCTCCAGG hCFTR_amplicon3 Rev: ACTTGCCTGTCGCTCTATCTTCCACTGGCTTAGTAGAGGACCA</p>
<p>Amplicon 4a (0.8kb): Primers cover region: chr7:117627056 to 117627831 (GRCh38) hCFTR_amplicon4a_Fwd : TTTCTGTTGGTGCTGATATTGCATCATGAAGAGTTCACTTAACCACC hCFTR_amplicon4a_Rev : ACTTGCCTGTCGCTCTATCTTCTAGATTCTGCTAACACATTGCTTCA</p>
<p>Amplicon 4b (0.830kb): Primers cover region: chr7:117639581 to 117640389 (GRCh38) hCFTR_amplicon4b_Fwd : TTTCTGTTGGTGCTGATATTGCTGGATGAACTTAACTGCTTTCTCC hCFTR_amplicon4b_Rev : ACTTGCCTGTCGCTCTATCTTCTGGAAAGACTGGATGAAGAGG</p>
<p>Amplicon 5 (11.184kb): Primers cover region: chr7:117642061 to 117653225 (GRCh38) hCFTR_amplicon5 Fwd: TTTCTGTTGGTGCTGATATTGCTTGCAGGTCTCTGCTTCTGG</p>

Figure 1 : les amorces des 6 différents amplicons désignés.

Le programme de PCR utilisé est représenté sur le **Tableau 3** :

Tableau 3: Programmation de la PCR

Etape	Température	Temps	Nombre de cycles.
Dénaturation initiale	94°C	30 secs	x1
Dénaturation	94°C	20 secs	x5 (Dénaturation, Hybridation, Elongation)
Hybridation	59°C	50 secs	
Elongation	65°C	7 min	
Dénaturation	94°C	20 secs	x30 (Dénaturation, Hybridation, Elongation)
Hybridation	62°C	50 secs	
Elongation	65°C	7 min	
Elongation finale	65°C	7 min	x1
Stockage	4°C	∞	

2.3. Analyse d'ADN amplifié par électrophorèse sur gel d'agarose

5ul du produit PCR a été déposé sur un gel d'agarose à 0,8% pendant environ 30 à 45min à 90 mV,

2.4 Purifier l'ADN restant en utilisant les billes Ampure 0.8X (volume de billes : volume d'ADN = 0.8:1) Billes Agencourt AmpureXP, Beckman Coulter, Catalogue# A63881

Pour une meilleure purification : il faut purifier chaque amplicon séparément mais regrouper le même amplicon provenant de différents patients (ils ont des codes-barres différents) selon le protocole suivant :

Préparer les billes AMPure XP pour l'utilisation (laisser chauffer environ 5 minutes à température ambiante) et les remettre en suspension par vortex.

Transférer les produits PCR (chaque amplicon séparément) dans un tube DNA LoBind de 1.5ml et ajouter 0.8x de billes AMPure. Mélanger en tournant le tube.

Incuber sur un mélangeur rotatif pendant 5' à température ambiante.

Faire tourner l'échantillon (1000g pendant 15") et le mettre sur un aimant. Garder le tube sur l'aimant et retirer le surnageant à la pipette.

Maintenir le tube sur l'aimant et ajouter 5 volumes d'EtOH 70% fraîchement préparé (avec de l'eau exempte de nucléase) sans toucher le culot. Retirer l'EtOH à l'aide d'une pipette.

Répéter l'étape précédente.

Faire tourner et replacer le tube sur l'aimant. Enlever à la pipette tout résidu d'EtOH et laisser sécher brièvement (15 à 30" maximum).

Retirer le tube de l'aimant et le remettre en suspension dans 12ul de 10mM Tris-HCl pH 8.0 avec 50mM NaCl. Incuber pendant 2 minutes à température ambiante.

Pelleter les perles sur l'aimant jusqu'à ce que l'éluat soit clair (environ 2 à 5 minutes). Retirer et conserver l'éluat (garder sur la glace).

2.5. Doser les produits PCR purifiés en utilisant le Nanodrop

Prélever 1,5ul des produits PCR purifiés et évaluer le rendement et la qualité de l'ADN en utilisant un lecteur nanodrop (garder le produit sur la glace).

Conservez les produits PCR à 4°C si vous ne passez pas immédiatement à la préparation de la librairie.

2.6. Préparation de la librairie Nanopore en utilisant SQK-PBK004 et une Flow cell FONGLE

Diluer 100 fmol du produit PCR dans 5 ul de 10mM Tris-HCl pH 8.0 avec 50mM NaCl dans un tube DNA LoBind de 1.5ml. A cette étape, nous pouvons regrouper les différents amplicons si nécessaire !

NB : Utiliser le calculateur Biomath (Promega) pour convertir les ug en pmol.

Ajouter 0.5ul de RAP aux 5ul de la librairie d'ADN amplifié.

Mélanger doucement en pipettant.

Incuber la réaction pendant 5 minutes à température ambiante, puis conserver la librairie sur la glace jusqu'à ce qu'elle soit prête à être chargée.

Procéder ensuite à l'amorçage et au chargement de la cellule Flongle.

2.7 chargement de la flow cell :

Décongeler le tampon de séquençage (SQB), les billes de chargement (LB) et le tampon de rinçage (FB) du kit d'expansion de séquençage Flongle et la longe de rinçage (FLT) du kit d'amorçage de la cellule d'écoulement (EXP-FLP002)

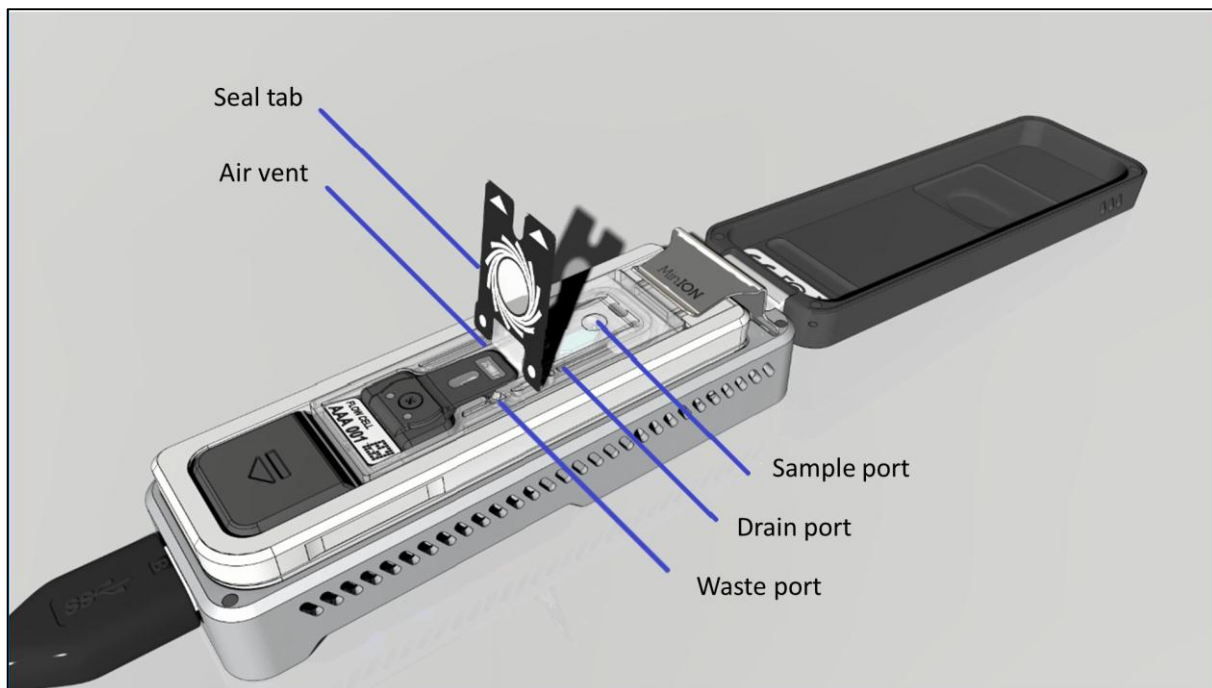


Figure 2 : Image montrant les composantes de la flow cell [1]

Mélangez les tubes de tampon de séquençage (SQB), de Flush Tether (FLT) et de tampon de rinçage (FB) par vortex et centrifugez à température ambiante. Dans un tube Eppendorf DNA LoBind frais de 1,5 ml, mélangez 117 µl de tampon de rinçage (FB) avec 3 µl de Flush Tether (FLT) et mélangez en pipettant. [1]

Pour amorcer votre cellule d'écoulement avec le mélange de tampon de rinçage (FB) et d'attache de rinçage (FLT) qui a été préparé précédemment, Placez la pointe de la pipette P200 à l'intérieur de l'orifice d'échantillonnage et distribuez lentement le fluide d'amorçage dans le Flonglet l'orifice d'échantillonnage ou la pointe de la pipette.

Mélanger au vortex le flacon de billes de chargement (LB). Préparez immédiatement le mélange de séquençage dans un nouveau tube Eppendorf DNA LoBind de 1,5 ml pour charger le Flongle, comme suit:

SQB ; 15 μ l , LB;10 μ l , DNA librairie:5 μ l : total de 30 μ l.

Placez l'embout P100 à l'intérieur.

L'orifice d'échantillonnage et distribuez lentement le mélange de séquençage dans la cellule d'écoulement en tournant le piston de la pipette vers le bas.

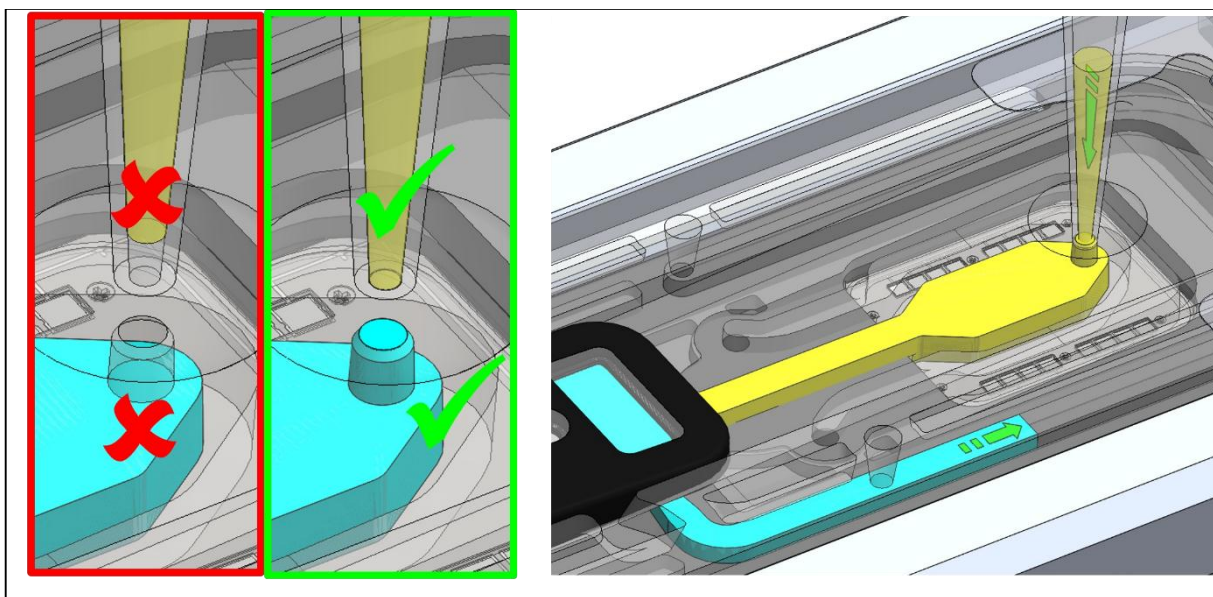


Figure 3 : Image montrant la technique de chargement de la librairie[1]

2.8 Lancement de séquençage :

Votre MinION Mk1B et la flow-cell devraient toujours être connectés. Vérifiez que votre MinION Mk1B est branché sur le port USB 3.0 de votre ordinateur, et que la flow-cell est bien fixée sur le MinION Mk1B.

Vérifiez que le logiciel MinKNOW est toujours ouvert. Accédez à la page d'accueil Start et sélectionnez Start Sequencing. À partir de là, sélectionnez les paramètres d'exécution de votre expérience dans les différents onglets.

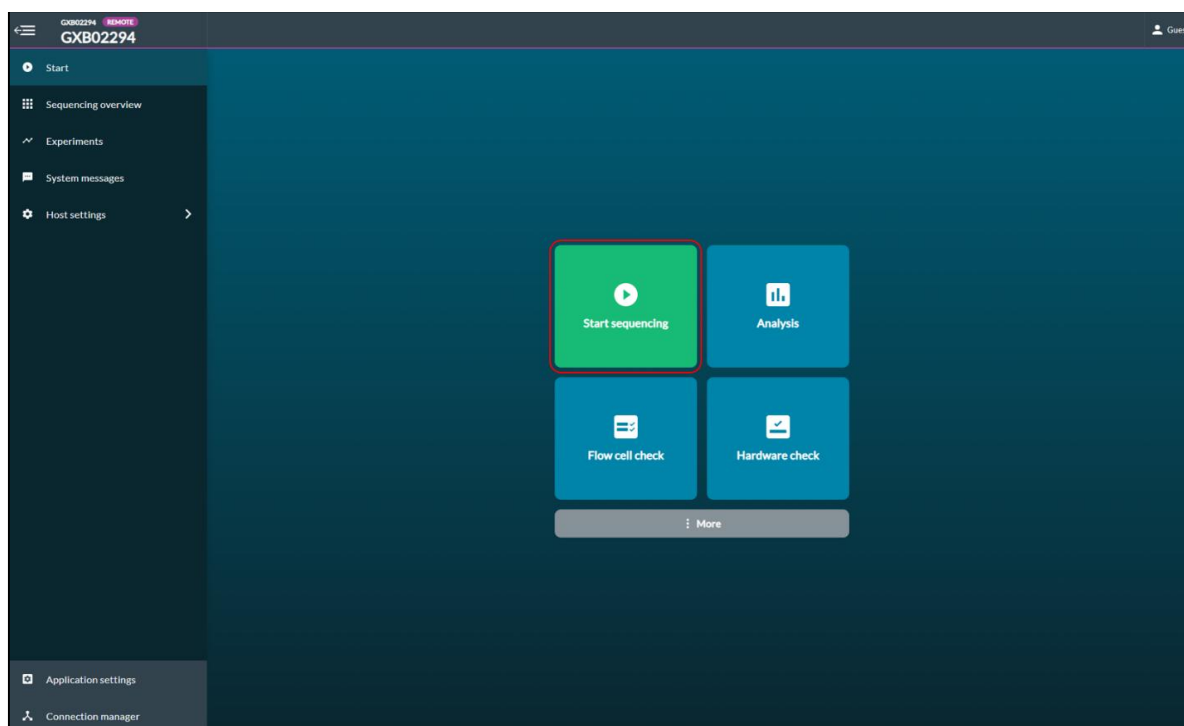


Figure 4 : page de lancement de séquençage.

2.9 Analyse des séquences :

L'analyse des séquences se fait par le logiciel **EPI2ME labs**.

Les fichiers brutes obtenus après séquençage sont téléchargés sur l'ordinateur, ensuite chaque bar code va avoir un fichier particulier pour chaque amplicon donné.

Les fichiers seront chargés sur le logiciel epi2Me. Ce dernier est construit sous forme d'étapes d'analyse à suivre afin d'obtenir des programmes qui seront exécutés l'un après l'autre pour aligner le génome 38 humain, analyser la qualité des séquences obtenues par séquençage et enfin obtenir des fichiers bam qui seront alignés.

Nous avons utilisé le programme IGV pour l'alignement des séquences.

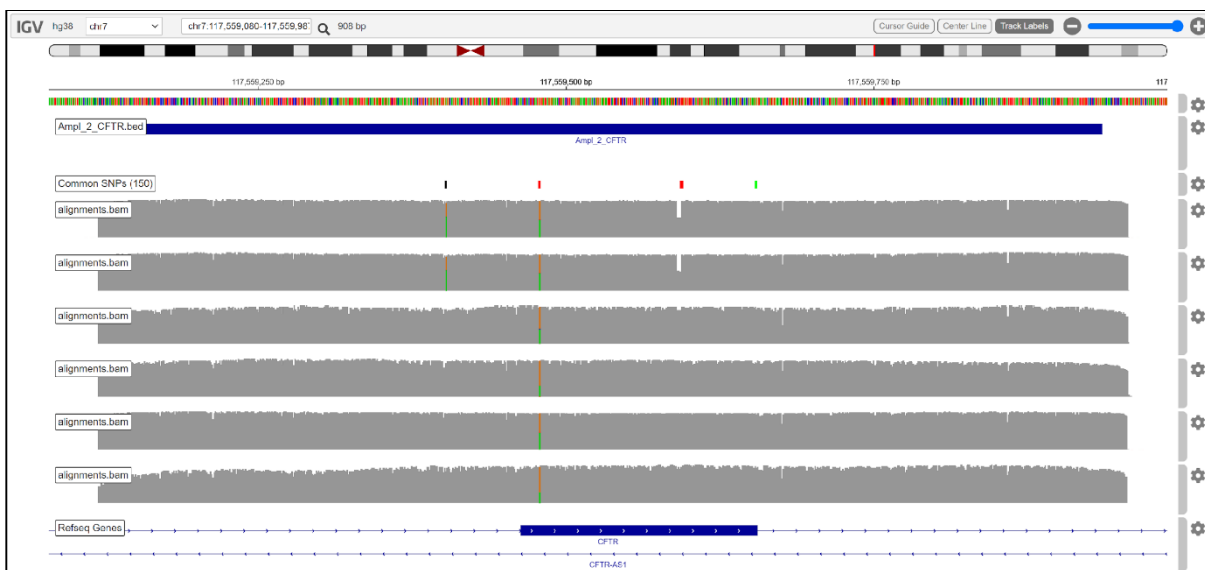
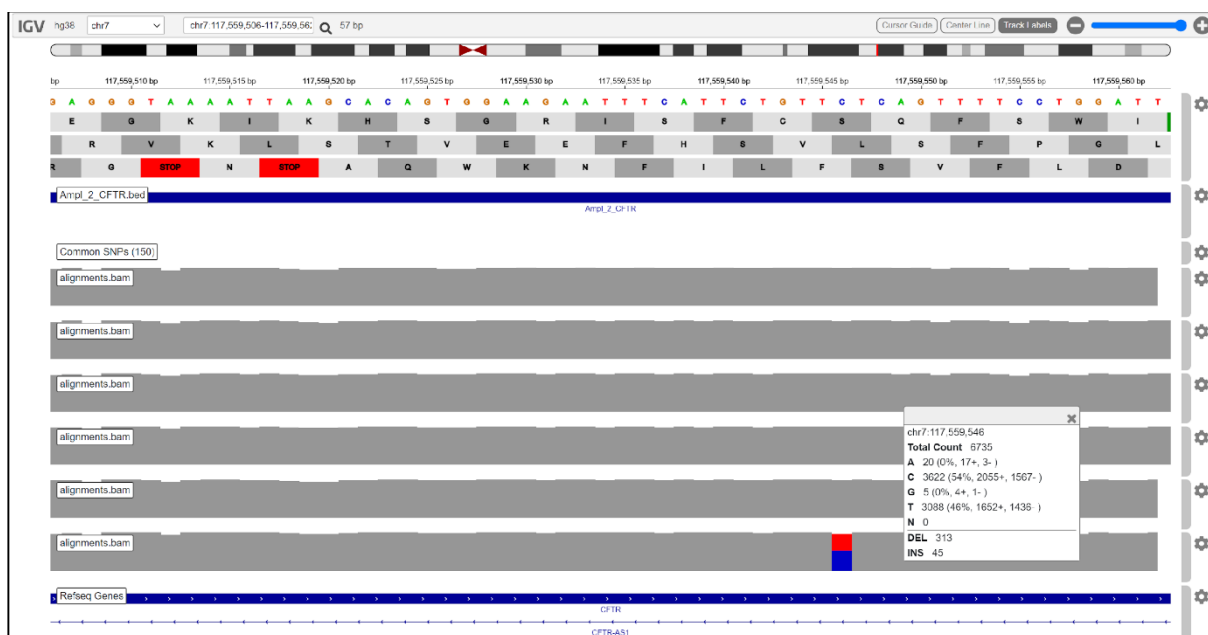


Figure 5: Image montrant l'alignement des séquences sur IGV

Le logiciel epi2me lab permet de générer des fichiers VCF rapportant toutes les variantes observées sur les séquences avec leur qualité. Une vérification manuelle est toujours indiquée pour éviter les fausses variantes liées aux erreurs de séquençage.



RESULTATS

I - Analyse des observations :

1- Caractéristiques générales des patients:

Notre série d'étude comporte 11 garçons, soit 68.75% et 5 filles. Le sexe ratio est de 2.2

L'âge moyen de nos patients est de 13.46 ans avec des extrêmes allant de 2 mois à 40 ans avec une moyenne de 13.46 ans.

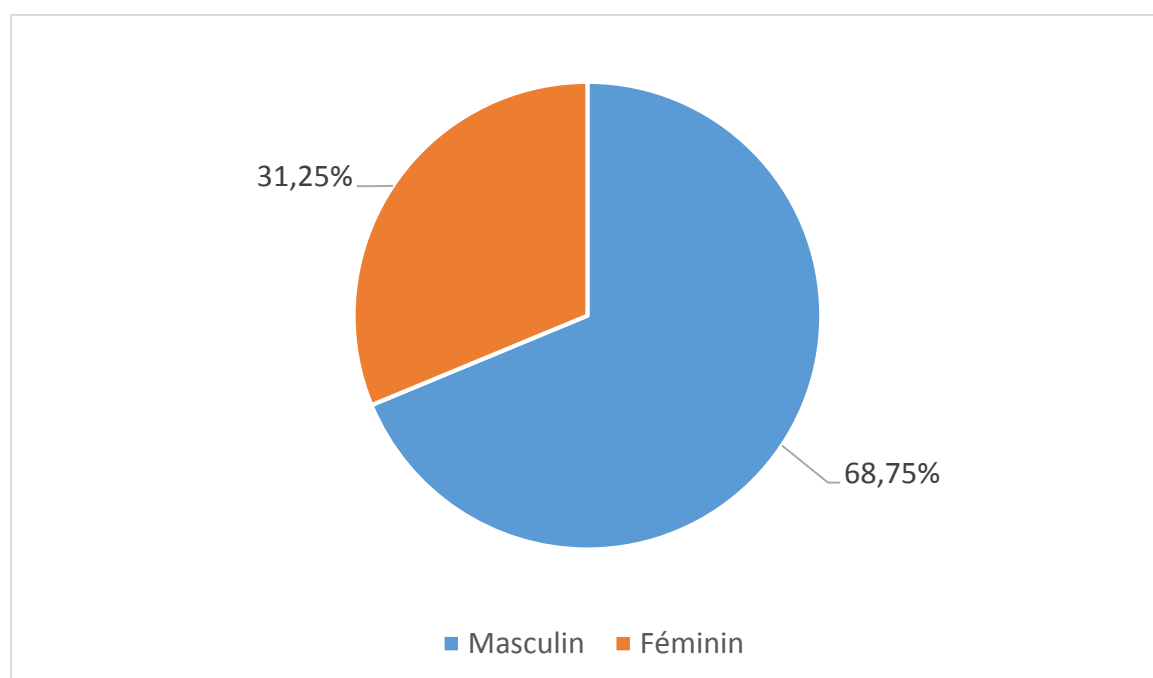


Figure 6 : Répartition des patients selon le sexe

2- Données épidémiologiques :

2-1-Origine géographique des patients :

Notre étude inclut les patients provenant du nord-est du Maroc. 8 patients sont originaires de Fès, 3 sont originaires de Taza (18.75%), 4 de Taounate (25%) et un patient est originaire de Sefrou.

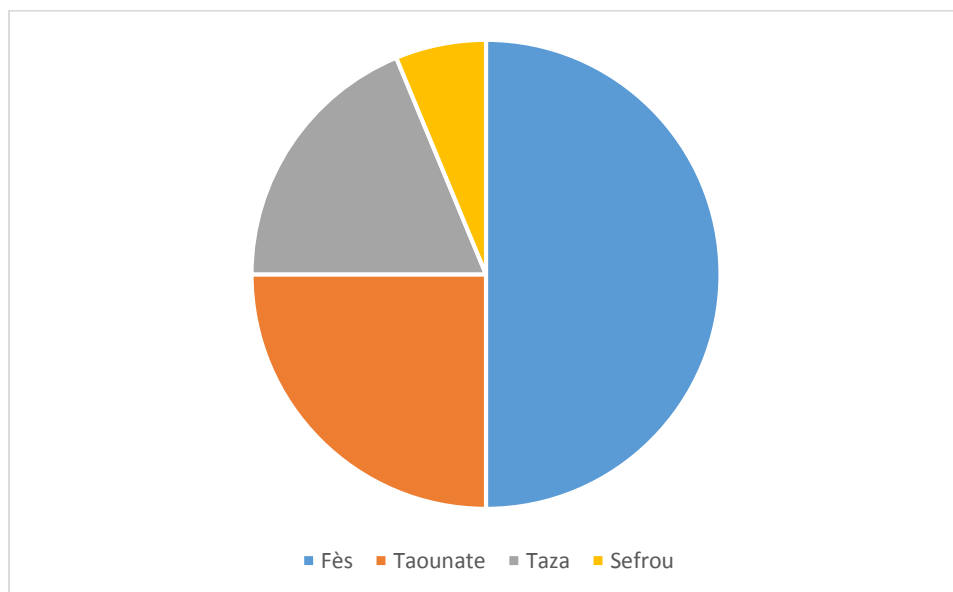


Figure 7 : Origine géographique des patients

2-2-Age au Diagnostic/Age de début des symptômes :

Les premiers symptômes de la maladie sont apparus le plus souvent au cours des 2 premières années de vie avec un âge médian de 4 ans et des extrêmes allant des premiers jours de vie à 15 ans.

L'âge moyen au diagnostic dans notre série était de 9 ans avec des extrêmes entre 2 mois et 40 ans.

A base de ces résultats on peut objectiver un retard de diagnostic chez notre population, marqué par la différence d'âge entre le début des symptômes et le diagnostic.

3- Antécédents de consanguinité :

La notion de consanguinité a été rapportée chez 8 patients (50% des patients) qui était dans la plupart des cas de premier degré (87,5%)

On note également un seul cas présentant des antécédents familiaux avec 3 décès dans la fratrie survenus en bas âge dans un tableau respiratoire évocateur de mucoviscidose .

Tableau 4 :_La consanguinité chez les parents

		Effectifs	Pourcentage	Somme
Consanguinité	1 ^{er} degré	7	43,75%	8
	2 ^{ème} degré	1	6,25%	
Pas de notion de Consanguinité		8	50%	8

4- Motif de consultation :

La mucoviscidose est une pathologie hétérogène dont le tableau clinique est très polymorphe, la majorité des patients de notre série était adressée devant des signes respiratoire, marqués par une détresse respiratoire, ou des bronchopneumopathies à répétition. Les autres motifs étaient des signes digestifs de type diarrhée graisseuse, vomissements. 2 cas ont été adressés pour azoospermie avec agénésie des canaux déférents.

Tableau 5 : Motifs de consultation de nos patients

Motif de consultation	Effectifs	Pourcentage
Détresse respiratoire	8	50%
Diarrhée graisseuse et vomissement	2	12,5%
Azoospermie	2	12,5%
Infection respiratoire	2	12,5%
Ictère cholestatique	2	12,5%

5-Signes cliniques :

La présente étude a inclus 16 patients atteints cliniquement de mucoviscidose. Les manifestations cliniques les plus fréquentes étaient l'atteinte pulmonaire rapportée chez 87,5% de la population étudiée, notamment les infections respiratoires à répétition, la bronchite chronique et l'asthme réfractaire . Le retard staturo-pondéral était présent chez 50% des cas , les signes digestifs étaient moins fréquents et dominés par une diarrhée chronique graisseuse (chez 43,75%), et une hépatopathie chronique .

Les manifestations cliniques présentes au cours de la période néonatale étaient principalement l'ictère cholestatique retrouvé chez 2cas soit 12.5%, l'iléus méconial présent chez un cas , et le tableau respiratoire chez un nouveau-né qui a été hospitalisé pour détresse respiratoire

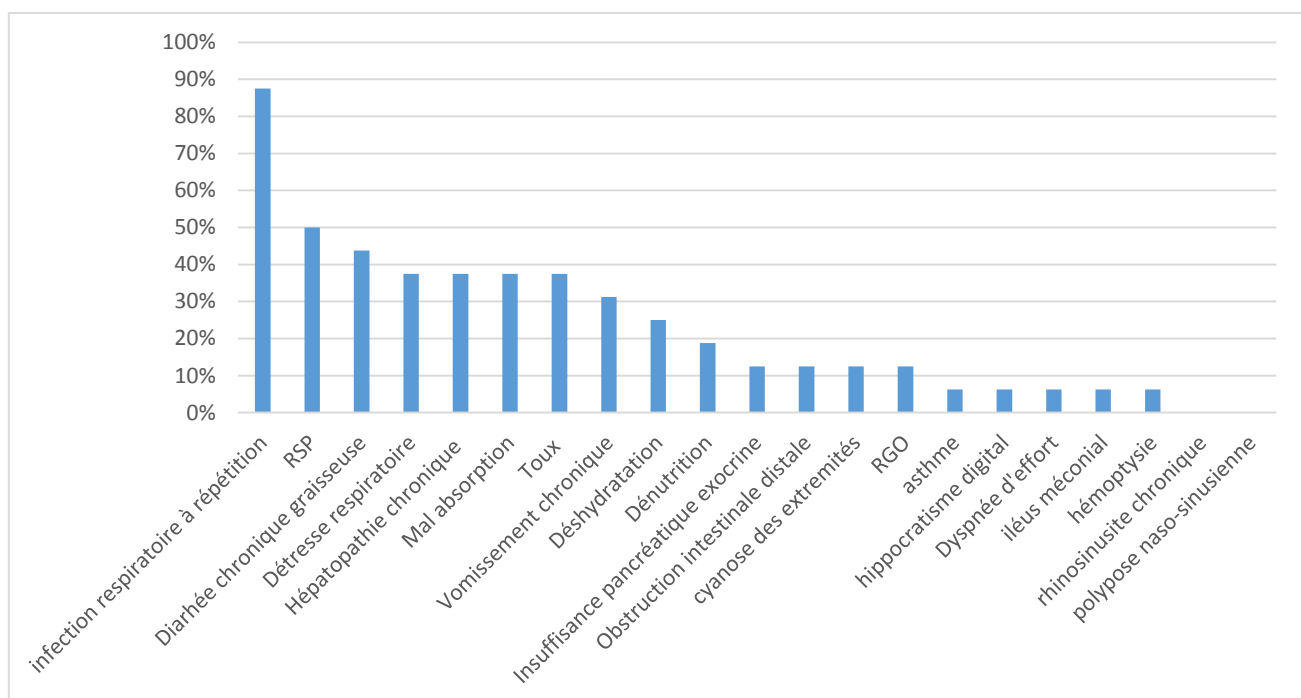


Figure 8 : Les signes cliniques retrouvés chez nos patients par ordre de fréquence

6-Test de la sueur:

Pour le test de la sueur, il n'a été réalisé que chez 9 patients (56.25%), 4 enfants sur 9, soit 44.44% ont été testés positifs, dont un avait des résultats douteux et 4 testés négatifs.

Les chiffres varient entre 49 à 120 mmol/l avec une médiane du chlore sudoral à 72 mmol/l.

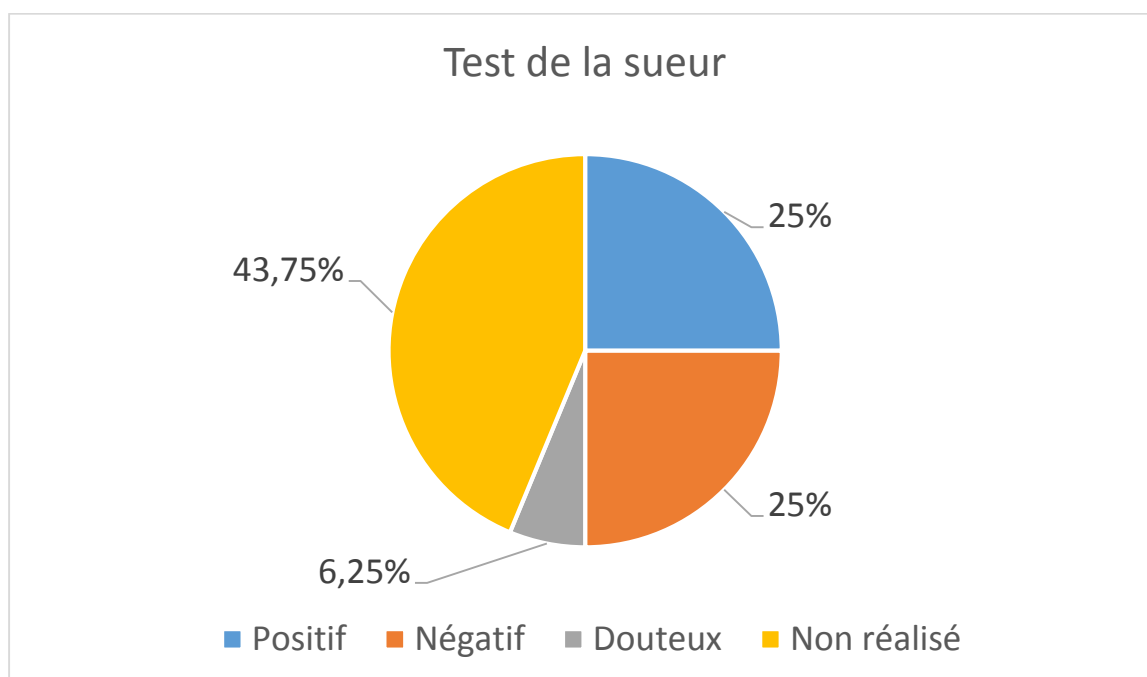


Figure 9: Valeurs du chlore sudoral : Test de la sueur

7- Signes radiologiques :

La grande majorité des patients était adressée pour une atteinte pulmonaire.

L'ensemble de nos patients ont bénéficié de radiographies thoraciques, et seulement 8 d'entre eux ont bénéficié d'une TDM thoracique.

La radiographie thoracique avait objectivé une distension thoracique chez tous nos malades, un syndrome bronchique chez 93,75 % des patients.

Sur TDM pulmonaire les signes observés étaient comme suit:

- La distension thoracique quasi-constante; a été retrouvée chez 93,75% des patients.
- Les lésions de DDB ont été observées chez 6 patients (soit chez 37,5 %) avec aspect en verre dépoli.
- Les signes de tuberculose rapportés chez un seul patient prêtant confusion avec le diagnostic de la tuberculose pulmonaire .

8- Explorations fonctionnelles respiratoires:

2 patients sur 16 ont bénéficié d'une exploration fonctionnelle respiratoire au cours de leur suivi, soit 12,5 % des cas qui a objectivé un syndrome obstructive sévère chez les 2 cas.

II. Résultats du nanoséquençage

Les Long-range PCR ont été réalisées avec analyse sur nanopore de 6 amplicons ciblant 13 variants déjà décrits chez des patients marocains résidents en France.

Les résultats étaient comme suit :

- L'analyse a confirmé la délétion 508 déjà observée chez 2 patients par séquençage classique Sanger.
- chez 3 patients, on a mis en évidence 3 mutations faux-sens pathogènes à l'état hétérozygote
- un seul patient avait une mutation de signification incertaine à l'état hétérozygote.

L'analyse des amplicons des différents patients est résumée sur le tableau ci-dessous en objectivant les différents variants introniques et exoniques rapportés dans la littérature ainsi que les nouveaux variants.

Tableau 6 : Les différentes mutations retrouvées chez nos patients.

	chr	position	ref	alt		nature
P1	7	117559591^93		Del TCT	hétérozygote	Pathogène
P1	7	117627445	T	Del T	hétérozygote	NON décrite
P2	7	117559591^93		Del TCT	hétérozygote	Pathogène
P3	7	117592854	A	T	hétérozygote	Bénigne
P3	7	117591780	A	G	hétérozygote	Bénigne
P3	7	117588150	T	C	hétérozygote	Bénigne
P3	7	117536578 117536579		InsG	hétérozygote	NON décrite
P3	7	117536579 117536580		InsG	hétérozygote	NON décrite
P3	7	117559676		DelT	hétérozygote	NON décrite
P4	7	117591873	C	T	hétérozygote	Bénigne
P4	7	117592855	C	T	hétérozygote	Bénigne
P4	7	117627612	C	T	hétérozygote	Bénigne
P4	7	117627630	A	G	hétérozygote	Bénigne
P5	7	117652483		InsrG	hétérozygote	NON décrite
P5	7	117647669	C	T	hétérozygote	Bénigne
P5	7	117642488		DelT	hétérozygote	NON décrite
P6	7	117591798	T	C	hétérozygote	Bénigne
P7	7	117591514	A	G	hétérozygote	Bénigne
P7	7	117591643	C	T	hétérozygote	Bénigne
P8	7	117535525	A	ATT	homozygote	NON décrite
P9	7	117587801	T	TG	hétérozygote	Probablement pathogène
P9	7	117591798	T	C	hétérozygote	Bénigne
P9	7	117539188	C	T	hétérozygote	NON décrite
P9	7	117559546	C	T	hétérozygote	Pathogène

P10	7	117590713	C	T	hétérozygote	NON décrite
P10	7	117591644	C	T	hétérozygote	NON décrite
P10	7	117647423	T	C	homozygote	Bénigne
P10	7	117648003	AGT	A	hétérozygote	NON décrite
P11	7	117535348	T.	G	hétérozygote	Pathogène
P12	7	117647423	T	C	homozygote	Bénigne
P12	7	117647368	G	A	hétérozygote	Bénigne
P12	7	117648702	A	T	hétérozygote	NON décrite
P12	7	117649956	C	T	hétérozygote	Bénigne
P12	7	117650204	C	T	hétérozygote	NON décrite
P12	7	117651217	T	A	hétérozygote	NON décrite
P12	7	117652483	G	GT	hétérozygote	NON décrite
P13	7	117535659	G	T	hétérozygote	NON décrite
P13	7	117642914	C	T	hétérozygote	NON décrite
P14	7	117534111	T	C	hétérozygote	Bénigne
P14	7	117535525	A	ATT	homozygote	NON décrite
P15	7	117647258	C	G	hétérozygote	NON décrite
P15	7	117647368	G	A	hétérozygote	Bénigne
P15	7	117647423	T	C	homozygote	Bénigne
P15	7	117648548	T	C	hétérozygote	NON décrite
P15	7	117648003	A	AGT	hétérozygote	NON décrite
P15	7	117539699	T	C	hétérozygote	NON décrite
P16	7	117534111	T	C	hétérozygote	Bénigne
P16	7	17535525	A	ATT	homozygote	NON décrite
P16	7	117539699	T	C	hétérozygote	NON décrite
P16	7	117540282	C	G	hétérozygote	Signification incertaine
P16	7	117650123	T	C	hétérozygote	Bénigne

DISCUSSION

I. Epidémiologie :

La mucoviscidose est la plus fréquente des maladies génétiques autosomiques récessives graves dans la population Caucasienne. En effet, son incidence est de 1 / 2500 naissances. L'épidémiologie de la mucoviscidose au Maroc est peu documentée par rapport à ses voisins algériens et tunisiens. Aucune donnée précise, n'est disponible, sur la prévalence de la mucoviscidose dans notre pays. Les données de la littérature sur le profil clinique de la mucoviscidose, et sur le spectre des mutations du gène *CFTR* au Maroc sont pauvres. Dans une étude réalisée au CHU Ar-Razi à rabat, le diagnostic de mucoviscidose a été porté chez 43 enfants dont 25 étaient de sexe masculin ; le sexe ratio a été de 1,3. L'anamnèse a permis de retrouver une consanguinité chez 27 cas (62,8%), des antécédents familiaux de mucoviscidose chez 2 cas. Dans notre étude , le diagnostic de mucoviscidose a été porté chez 16 patients dont 11 étaient de sexe masculin ; le sexe ratio a été de 2,2.[2][3]

La notion de consanguinité a été retrouvée chez 50 % des cas dans notre cohorte, elle est de 47 % dans la cohorte tunisienne et de 66% en Algérie. Ceci permet de conclure aux taux élevés de la consanguinité au Maghreb et le risque accru de transmission des maladies héréditaires dans ces populations notamment les maladies autosomiques récessives.[4]

II. GENETIQUE DE LA MUCOVISCIDOSE :

1. Généralité :

La mucoviscidose se transmet selon le mode autosomique récessif. Une personne doit être homozygote pour le gène muté concerné pour être malade. La personne reçoit un exemplaire du gène muté de chacun de ses deux parents, qui à chaque grossesse ont une chance sur quatre de transmettre la mucoviscidose à leurs enfants, un risque sur deux d'avoir un enfant avec le gène anormal mais pas malade, et un risque sur quatre d'avoir un enfant avec deux gènes anormaux.[5]

2. Le gène *CFTR* :

Le canal anionique *CFTR* (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) régule le transport du chlorure, du bicarbonate et du sodium à travers les membranes cellulaires, principalement dans les tissus épithéliaux. Dans la mucoviscidose, la protéine *CFTR* est structurellement ou fonctionnellement anormale en raison de mutations du gène *CFTR* situé sur le chromosome 7. Près de 2100 mutations du gène *CFTR* ont été identifiées à ce jour, mais toutes ne sont pas à l'origine de la maladie. Il englobe environ 189 000 paires de bases d'ADN. La partie codante du gène est divisée en 27 exons qui sont transcrits en un ARN messager (ARNm) d'environ 6500 paires de bases. La structure des exons et des introns du gène *CFTR* est bien conservée chez les mammifères et chez des espèces éloignées dans l'évolution comme les amphibiens (*Xenopus*) et les poissons .[6]

Le mode de transmission autosomique récessif de la mucoviscidose a été signalé en 1946 et le gène a été découvert en 1989. Sur la base des hypothèses de pathogènes existantes à l'époque et de la structure prédite de la protéine, le gène a été appelé régulateur de conductance transmembranaire de la cystic fibrosis (*CFTR*).

La transcription de *CFTR* est initiée 80 paires de bases en amont du site de départ de la traduction. Le gène *CFTR* présente des différences temporelles et spatiales dans son expression.[6]

L'expression de *CFTR* est également régulée au cours du développement des organes. Malgré les nombreuses preuves que l'expression de *CFTR* est hautement sélective, les éléments précis qui régulent l'expression de *CFTR* n'ont pas été identifiés. Les séquences immédiatement en amont du site de départ de la transcription de *CFTR* génèrent une faible expression dans la plupart des tissus. Ce modèle d'expression est cohérent avec la présence d'éléments promoteurs basaux.[7]

3. Protéine sauvage CFTR :

3.1 Structure et biosynthèse de la protéine CFTR

La protéine CFTR est un membre de la superfamille des transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette Transporter) de liaison à l'adénosine triphosphate (ATP), principalement exprimée dans la membrane apicale des épithéliums, dont les produits comprennent des protéines transmembranaires impliquées dans le transport d'une grande variété de substrats à travers les membranes intra et extracellulaires. Comme les autres membres de l'ABC, cette glycoprotéine de 1480 acides aminés d'un poids moléculaire d'environ 170 kDa est une protéine multi-domaine composée de deux domaines membranaires (MSD) qui forment le canal, chacun composé de six domaines hélicoïdaux (TMD1 à TMD12) et des boucles extracellulaires intermédiaires, deux domaines cytoplasmiques de liaison aux nucléotides (NBD) et quatre boucles intracytoplasmiques reliant les TMD du côté cytoplasmique de la protéine. NBD1 est connecté à un domaine intracellulaire, appelé régulateur (R). De manière très intéressante, ce domaine R, une caractéristique unique du CFTR parmi les protéines ABC il contient des résidus sérine qui sont phosphorylés par la protéine kinase A et la protéine kinase C et régulés par l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC). Ce mécanisme est obligatoire pour la porte du canal à l'état ouvert. En raison de sa teneur élevée en acides aminés chargés, R est un peptide non structuré, qui interagit simultanément avec différentes régions de la protéine et améliore la liaison de l'ATP aux NBD .[8]

Cela médie l'interaction entre les deux NBD et les changements conformationnels conduisant à l'état ouvert. Une hydrolyse ultérieure de l'ATP confère alors le retour à l'état de conductance fermée basale. Ce modèle a été suggéré par le fait que des mutations dans NBD1 ou NBD2 diminuant l'activité ATPase conduisent à une diminution du taux de fermeture du canal .[9]

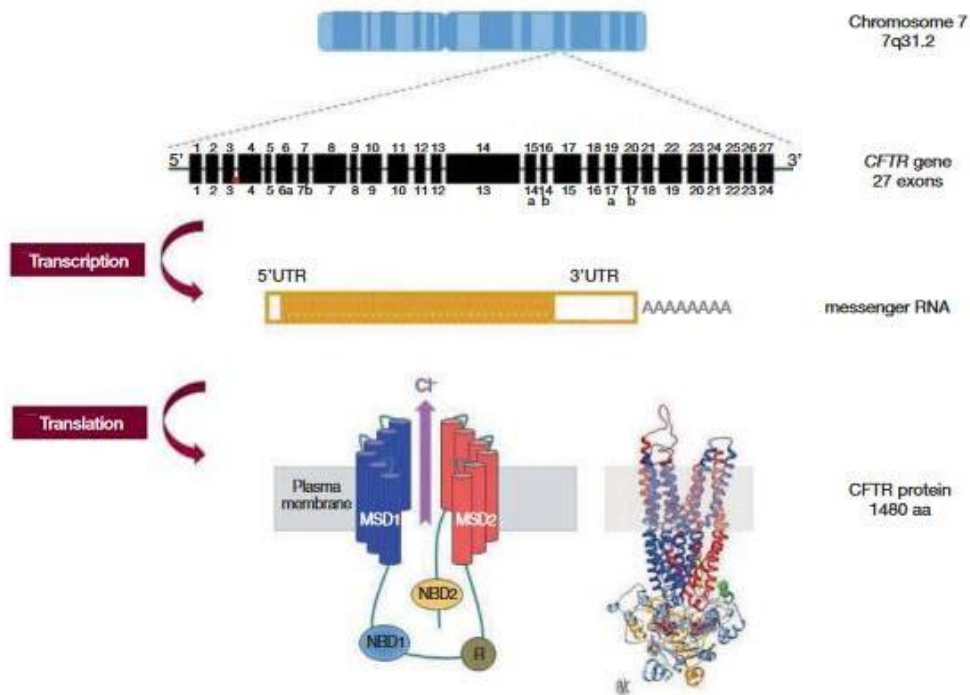


Figure 10 : structure de la protéine CFTR [9]

Le gène CFTR est transcrit en 6,13 kb d'acide ribonucléique messenger (ARNm) codant pour la protéine CFTR de 1480 acides aminés. CFTR est le seul transporteur ABC connu qui agit comme un canal anionique. La structure et la fonction normales de CFTR sont illustrées dans la figure ci-dessus.

3.2 Localisation

La protéine CFTR est exprimée dans de nombreux tissus. Elle se trouve principalement au niveau de la membrane apicale (luminale) des tissus épithéliaux polarisés, notamment :

- ✓ l'épithélium de surface des voies respiratoires et les glandes sous-muqueuses.
- ✓ L'épithélium du canal pancréatique.
- ✓ L'épithélium des cellules de la crypte, des glandes sous-muqueuses et des glandes de Brunner dans le tractus gastro-intestinal.
- ✓ Le revêtement épithélial de la vésicule biliaire et des canaux biliaires intra-hépatiques.
- ✓ L'épithélium des glandes sudoripares.
- ✓ L'épithélium des glandes salivaires.
- ✓ L'épithélium des canaux déférents et de l'épididyme.
- ✓ L'épithélium du col de l'utérus et de l'utérus l'épithélium du canal collecteur du rein.

Les tissus épithéliaux qui expriment la protéine CFTR correspondent en grande partie aux sites touchés par la maladie, à quelques exceptions près, comme le rein, où d'autres voies semblent avoir une plus grande importance fonctionnelle. CFTR est également exprimé, bien que généralement dans une moindre mesure, dans les cellules et les tissus non épithéliaux, notamment :

- Les cardiomyocytes ventriculaires et les cellules musculaires lisses aortiques,
- Les neurones du cerveau,
- Les cellules endothéliales cornéennes et vasculaires,
- Les lymphocytes. [10]

3.3 Fonction de la protéine CFTR

La protéine CFTR joue un rôle fondamental dans le transport trans-épithélial des fluides et des électrolytes car il fonctionne comme un canal anionique et un régulateur des transporteurs d'ions dans les cellules épithéliales. Les TMD de CFTR forment un pore sélectif pour les anions, qui les transportent à travers la membrane selon le gradient électrochimique transmembranaire. Ceci explique pourquoi elle entraîne le chlorure (Cl^-) et le bicarbonate (HCO_3^-) dans les épithéliums intestinaux, pancréatiques et des voies respiratoires, alors qu'elle médie l'absorption de Cl^- dans l'épithélium des glandes sudoripares. Dans ce dernier épithélium, le sodium (Na^+) suit passivement l'absorption du Cl^- . De plus, le pore CFTR peut passer d'une conformation perméable à Cl^- à une conformation perméable à des anions plus gros, tels que HCO_3^- , en fonction des anions se liant dans le pore. Hormis les anions tels que Cl^- et HCO_3^- , CFTR est également perméable à d'autres anions tels que I^- , Br^- et F^- et à des substrats bioactifs tels que le glutathion ou l'ATP. La protéine CFTR exerce également une fonction de régulation pour d'autres canaux épithéliaux. Le CFTR inhibe l'activité ENaC (**Figure 11**) et traduit donc une réduction de la réabsorption de Na^+ dans les épithéliums des voies respiratoires .[11][12][13]

Sur la surface apicale, CFTR stimule la sécrétion de Cl^- et de HCO_3^- et régule l'absorption de Na^+ en inhibant l'ENaC. Le CFTR régule également positivement les canaux Cl^- (ANO1) et SLC26A9 ainsi que l'échangeur d'anions SLC26A4, augmentant la sécrétion de Cl^- et HCO_3^- et augmentant ainsi l'hydratation et le pH de l'ASL. Na^+ et l'eau suivent le gradient électrochimique à travers la voie paracellulaire. Sur la membrane basolatérale, NKCC1 accumule Cl^- intra-cellulairement supporté par la Na^+/K^+ -ATPase. Le recyclage de K^+ à travers la membrane basolatérale se produit pour le bon fonctionnement de la pompe Na^+/K^+ .[14]

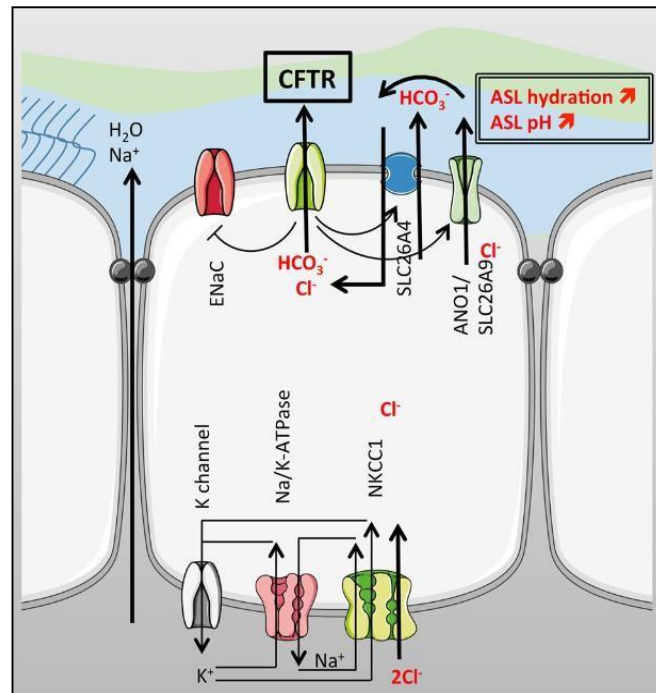


Figure 11 : Transport d'ions dans les voies respiratoires [14]

La protéine CFTR peut également interagir via sa séquence extrême d'acides aminés C-terminale avec des protéines contenant un domaine PDZ, qui sont des organisateurs importants pour les transporteurs d'ions présents dans l'épithélium des voies respiratoires. Par exemple, l'activation réciproque entre CFTR et la famille SLC26 des échangeurs $\text{HCO}_3^- / \text{Cl}^-$ dépend de l'interaction du domaine PDZ et de la liaison du domaine STAS des protéines de la famille SLC26 au domaine CFTR R. CFTR régule donc la sécrétion de HCO_3^- directement par son canal et en interagissant avec des paralogues de la famille SLC26 avec un modèle d'expression spécifique au tissu. Cela a été démontré dans l'épithélium pancréatique (interaction entre CFTR et SLC26-A3 et -A6) et éventuellement dans les voies respiratoires (*interaction entre CFTR et SLC26-A4*). [15]

4. Mutation du gène *CFTR* :

4.1 Classification Mutations de *CFTR* :

La mucoviscidose est une maladie monogénique dont le mode de transmission est autosomique récessif. Elle est plus fréquente dans les populations d'origine nord-européenne avec une incidence d'environ 1 sur 3000 et une fréquence de portage de 1 sur 25. En revanche, la CF est présente chez 1/4000 e10 000 Latino-Américains, 1/15 000e20 000 Afro-Américains et 1/350 000 Japonais.

Près de 2100 mutations du gène *CFTR* ont été signalées à ce jour, bien que la majorité d'entre elles soient rares et que toutes ne soient pas à l'origine de la FK. Dans certaines populations, un petit nombre de mutations du gène *CFTR* prédomine, tandis que d'autres régions présentent une plus grande diversité de mutations. La mutation la plus fréquente en Europe est la Phe508del (précédemment appelée DF508), qui est une délétion in-frame (3 paires de bases) de l'acide aminé phénylalanine en position 508 de la protéine.

En Europe et en Amérique du Nord, cette mutation représente environ deux tiers des allèles connus. Vingt-trois autres mutations sont décrites comme "relativement courantes", mais aucune d'entre elles ne représente plus de 5 % des mutations.

Les mutations peuvent être classées en fonction de leur effet connu ou supposé sur la protéine CFTR, comme le montre le tableau 7. Ce système comporte toutefois des limites dans la mesure où de nombreuses mutations ne sont pas encore classées et où certaines confèrent des caractéristiques relevant de plus d'une classe.[16]

Les mutations de classe I ont tendance à conférer une maladie grave, car la protéine CFTR non fonctionnelle produite est dégradée dans la cellule. Les mutations de classe II, où, dans le meilleur des cas, seules des quantités négligeables de protéine CFTR atteignent la membrane apicale, sont les plus courantes, notamment la mutation Phe508del.

Dans les mutations de classe III, la protéine CFTR normale atteint la membrane apicale, mais une régulation défectueuse signifie que le canal ne peut pas être activé et, par conséquent, ne s'ouvre pas. La mutation de classe III la plus courante est Gly551Asp (anciennement connue sous le nom de G551D), que l'on retrouve chez environ 5 % des personnes atteintes de FK.

Les mutations de classe IV entraînent une réduction de la conductance des ions chlorure et le phénotype est généralement plus léger.

Les mutations de classe V font que le CFTR fonctionnel atteint la membrane apicale mais en quantité réduite, ce qui entraîne également une maladie moins grave. Les mutations de classe VI entraînent une instabilité de la protéine CFTR avec une longévité réduite à la membrane apicale, ce qui confère un mauvais pronostic.

Tableau 7 : Les mutations classées en fonction de leur effet connu ou supposé sur la protéine CFTR.[16]

Classe	Effet sur la protéine CFTR	CFTR Fonctionnel	Expression apicale de CFTR	Exemples de mutations
I	Production défectueuse	Non	Non	G542X, W1282X, R553X, R1162X, E822X, 1717-1G>A, 711+1G>T, 621+1G>T
II	Altération du processus cellulaire de la protéine.	Non	Non	F508del, N1303K, I507del, R1066C, S549R, G85E
III	Perturbation de la régulation de la chaîne Cl ⁻ .	Non	Oui	G178R, G551D, G551S, R560T, V520F, G970R, G1244E, S1255P, G1349D
IV	Altération de la conduction de Cl ⁻	Réduit	Oui	R117H, R334W, R347P, R1070W
V	Réduction de la quantité des protéines CFTR fonctionnelles.	Réduit	Réduit	3272-26A>G, 3849+10kbC>T, A455E, D565G

4.2 Distribution géographique des mutations du gène *CFTR*

Parmi les mutations collectées, les mutations faux-sens représentent 40% ; le décalage de cadre de lecture 16% ; les mutations du site d'épissage 12% ; non-sens 8% ; insertions / délétions 2%; grandes insertions / délétions 3%; et les mutations du promoteur 0,8%. Les variations de séquence, qui ne devraient pas être à l'origine de la maladie, représentent 14% de tous les allèles. La mutation la plus fréquente est p.Phe508del, F508del, qui représente 70% des allèles CF chez les patients provenant du nord-ouest au sud-est d'Europe. Parmi les allèles restants, moins de 20 mutations se produisent à une fréquence mondiale de plus de 0,1% [17] [18].

Certaines mutations atteignent une fréquence plus élevée dans des populations spécifiques, par exemple, 48% de tous les allèles chez les juifs ashkénazes en Israël (p.Trp1282X) et 24% à la Réunion française (p.Tyr122X). Bien que la plupart des mutations *CFTR* aient été associées à des populations originaires de l'Europe, des mutations *CFTR* ont également été identifiées dans des populations d'Afrique et d'Asie de l'Est, comme la mutation c.2988 + 1G> A, qui explique 46% des allèles CF africains et 13% des allèles CF afro-américains [17]

4.3 Relation génotype phénotype :

La mucoviscidose est une affection autosomique récessive et les mutations du gène *CFTR* sont bien établies et acceptées comme cause de la mucoviscidose, bien qu'il existe un large éventail de phénotypes d'expression de la maladie. En général, les mutations de classe I, II et III sont considérées comme « sévères », et les patients porteurs de deux copies de ces mutations n'ont généralement pratiquement pas de fonction *CFTR* résiduelle. En revanche, les patients présentant des mutations de classe, V et IV peuvent avoir une fonction *CFTR* résiduelle, bien qu'insuffisante. En général, les patients porteurs de ces mutations dites « légères » ont de meilleurs résultats et une meilleure survie que les patients porteurs de mutations « sévères ». Il est important de noter que de nombreux autres facteurs peuvent affecter les résultats

cliniques et que même les patients porteurs de mutations *CFTR* « légères » peuvent avoir une maladie clinique sévère. Les résultats cliniques peuvent varier même chez les patients présentant les mêmes mutations. Cette observation a conduit à une recherche de gènes modificateurs ou de changements épigénétiques qui pourraient expliquer cette variabilité.[19]

Les études se sont focalisées sur les gènes impliqués dans des voies présumées importantes dans la pathogenèse de la maladie pulmonaire CF, comme les gènes de transport d'ions ou les gènes liés à la réponse inflammatoire.

Les polymorphismes dans les gènes de la lectine de liaison au mannose (MBL) et du facteur de croissance transformant bêta (TGF- β) ont été liés à des formes plus graves. Des variants du gène *DCTN4* chez les patients atteints de mucoviscidose se sont avérés être associés à une infection précoce à *Pseudomonas aeruginosa*,[20][21]

III. DIAGNOSTIC DE LA MUCOVISCIDOSE

1. Diagnostic clinique

La mucoviscidose est une maladie multi-systémique, et ses caractéristiques cliniques reflètent le large impact que la perte de la fonction de CFTR de la mucoviscidose a sur plusieurs organes. Cependant, les atteintes pulmonaires et gastro-intestinales représentent la grande majorité de la morbidité et de la mortalité dans la mucoviscidose.

1.1 Manifestations pulmonaires et complications.

i. Physiopathologie

Les caractéristiques physiopathologiques de la maladie pulmonaire liée à la mucoviscidose sont une infection chronique des voies respiratoires et une inflammation. Le dysfonctionnement de CFTR entraîne la perte de la couche de liquide de surface des voies respiratoires (ASL), l'acidification de l'ASL et une altération de la clairance mucociliaire, qui à leur tour entraînent une infection bactérienne chronique des voies respiratoire[22]. La présence chronique de bactéries dans les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose provoque une réaction inflammatoire neutrophile intense (**Figure 12**).

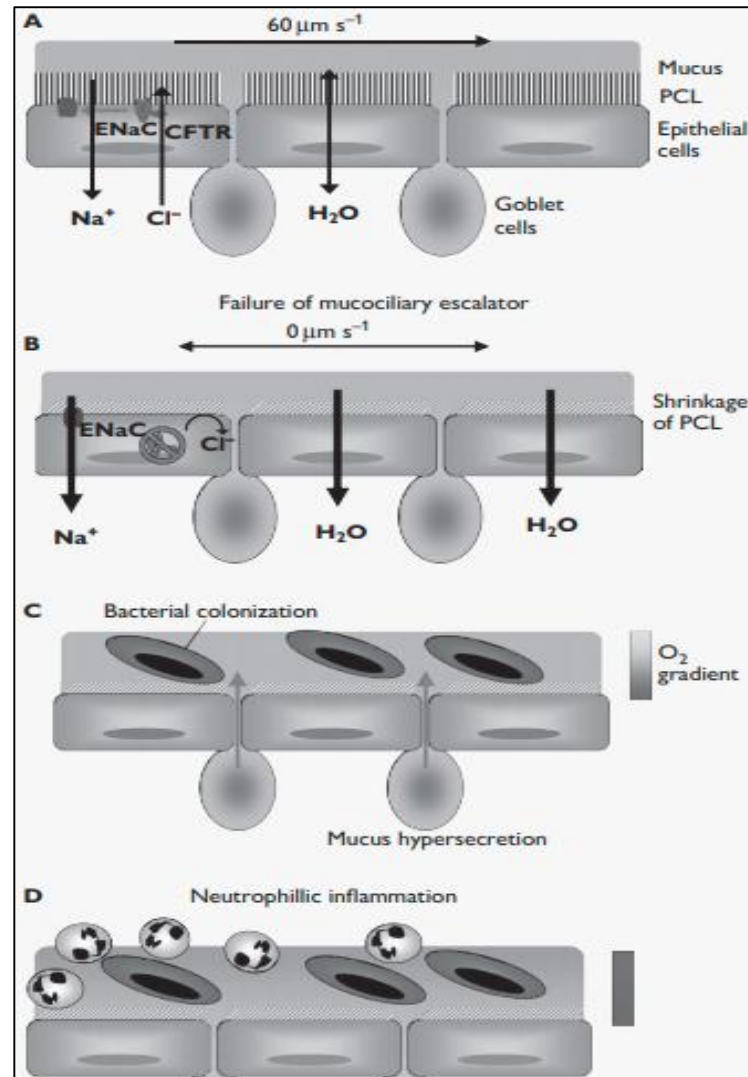


Figure 12 : Mécanisme proposé pour le développement d'une infection chronique des voies respiratoires dans la mucoviscidose [23].

Commentaire : (A) : Dans des voies respiratoires normales, l'hydratation est contrôlée par l'absorption de Na^+ et la sécrétion de Cl^- . (B) : Dans la mucoviscidose l'absence de CFTR conduit à une absorption non régulée de Na^+ et à une déshydratation associée de la couche péri-ciliaire (PCL) et du mucus. Le mucus devient adhérent dans les plaques qui permettent la colonisation bactérienne (C), favorisée par un gradient hypoxique à travers la plaque. La réponse inflammatoire (D) qui en résulte conduit à un cercle vicieux d'inflammation, de sécrétion et de rétention de mucus, et finalement de destruction des voies respiratoires.

La libération d'enzymes protéolytiques, telles que l'élastase neutrophile humaine (HNE), et d'autres médiateurs inflammatoires, tels que les espèces oxydantes réactives (ROS), provoque des lésions des voies respiratoires. HNE contribue au maintien du processus inflammatoire en induisant l'expression de chimiokines neutrophiles par les cellules épithéliales des voies respiratoires. Au fil du temps, la présence d'une inflammation chronique des voies respiratoires neutrophiles entraîne une bronchectasie. Ce processus d'infection et d'inflammation survient peu de temps après la naissance chez les nourrissons atteints de mucoviscidose. Malgré un diagnostic précoce par dépistage néonatal (NBS), jusqu'à 30% des nourrissons atteints de mucoviscidose présentent des signes radiographiques de bronchectasie à l'âge d'un an. La présence de HNE libre dans le liquide bronchoalvéolaire des nourrissons atteints de mucoviscidose est associée à une bronchectasie persistante[24][25]. Les mesures de la fonction pulmonaire sont également anormales dès la première année de vie (Linnane et al., 'Lung Function in Infants with Cystic Fibrosis Diagnosed by Newborn Screening'..) Au début de l'évolution de la mucoviscidose, il y a peu ou pas de symptômes cliniques ou de signes d'inflammation des voies respiratoires ou de bronchectasie. Cependant, au fil du temps, les patients atteints de mucoviscidose passent d'une toux fréquente intermittente à une toux quotidienne chronique [26]. Au fur et à mesure que la bronchectasie progresse et que les sécrétions muco-purulentes s'accumulent dans les voies respiratoires inférieures, les patients commencent à produire des expectorations quotidiennes. Comme pour les symptômes cliniques, il y a peu de signes de progression précoce de la maladie dans la mucoviscidose. Au fil du temps, des crépitements et des ronchi peuvent être entendus, reflétant la présence de zones focales de bronchectasie. La respiration sifflante est une autre découverte de l'examen physique et résulte d'une obstruction muqueuse des voies respiratoires.

L'atteinte respiratoire conditionne le pronostic de la maladie. Elle est responsable de 90 % des cas de décès chez les patients. Elle résulte directement ou indirectement de la perte des fonctions de la protéine CFTR au niveau des cellules du tractus respiratoire. La modification de la composition et de la rhéologie des sécrétions qui en résulte s'associe à une inflammation bronchique précoce et constitutive. Cela induit une bronchopathie chronique obstructive, à l'origine de dilatations des bronches, d'un emphysème avec destruction du parenchyme et finalement d'une insuffisance respiratoire chronique et mortelle.

Les manifestations respiratoires sont présentes chez environ 75 % des nourrissons dès la première année de vie. Dans notre étude seulement 1 seul nourrisson sur 3 avait des signes respiratoires précoces.

La symptomatologie pulmonaire n'est pas toujours spécifique : toux prolongée, sèche et quinteuse, ou plus souvent productive ; bronchites ou bronchiolites récidivantes ; encombrement bronchique et expectoration mucopurulentes persistantes entre deux épisodes aigus. L'auscultation pulmonaire, souvent pauvre, contraste avec l'importance des symptômes cliniques.

L'examen cyto bactériologique des crachats (ECBC) de préférence par expectoration induite peut parfois révéler une infection à *Haemophilus influenzae* ou à *Streptococcus aureus*. Ceux-ci sont le plus souvent non contributifs.[26]

ii. Exacerbation pulmonaire

En plus de l'infection chronique et de l'inflammation avec déclin progressif de la fonction pulmonaire, la mucoviscidose se caractérise par une augmentation aiguë épisodique des symptômes respiratoires. Ces poussées sont souvent appelées exacerbations pulmonaires et, en général, désignent un changement par rapport aux symptômes respiratoires de base nécessitant une augmentation de la clairance des voies respiratoires et un traitement antibiotique. La physiopathologie des

exacerbations pulmonaires de la mucoviscidose sont associées à une augmentation de l'inflammation des voies respiratoires[27]. Plusieurs ensembles de critères diagnostiques aient été développés. La plupart comprennent des caractéristiques d'augmentation de la toux et de la production de crachats, de nouveaux crépitements, une diminution de la fonction pulmonaire, de la fatigue ou une diminution de la tolérance à l'exercice et une perte de poids.

Rabin et al ont utilisé les données de l'étude épidémiologique de la mucoviscidose pour développer des critères basés sur l'âge, suggérant que les caractéristiques d'une exacerbation pulmonaire peuvent changer avec l'âge et la progression de la maladie .[28]

iii. Hémoptysie

Une hémoptysie mineure est courante dans la mucoviscidose, en particulier chez les patients adultes. Le saignement provient généralement des artères bronchiques, dont les deux tiers proviennent de l'aorte et un tiers des vaisseaux mammaires et intercostaux. L'hémoptysie majeure est généralement associée à une maladie grave. Elle survient chez environ 7% des patients plus adultes. Le registre des patients de la Fondation américaine de la mucoviscidose concernant 28 858 patients sur une période de 10 ans a montré qu'une hémoptysie massive s'est produite avec une incidence annuelle de 0,87% et que dans l'ensemble, 4,1% des patients ont présenté une hémoptysie sur une période de 2 ans. Il est à noter que 1 patient sur 100 aura une hémoptysie massive chaque année. Les patients qui ont présenté une hémoptysie majeure étaient plus âgés (âge moyen de 24 ans) avec une maladie pulmonaire plus sévère (60% avaient un volume expiratoire forcé en 1 seconde [FEV1] inférieur à 40%). Les principaux facteurs de risque étaient la présence du *Staphylococcus aureus* dans les expectorations et le diabète. La morbidité et la mortalité sont augmentées après une hémoptysie massive[29].

iv. Pneumothorax

Le pneumothorax est une autre complication observée chez les patients atteints de mucoviscidose en phase terminale, généralement avec un VEMS <30%. Cela se produit lorsque la pression dans les alvéoles est élevée, généralement en raison du bouchage du mucus des voies respiratoires. Lorsque la pression dépasse la pression interstitielle, de l'air s'échappe et peut pénétrer dans l'espace pleural. La colonisation par *P. aeruginosa*, l'aspergillose bronchopulmonaire allergique (ABPA) et une hémoptysie massive préalable sont des facteurs de risque de pneumothorax dans la mucoviscidose. [30]

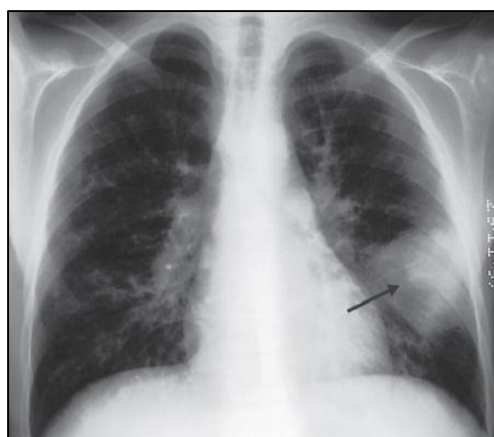


Figure 13: Radiographie thoracique d'un enfant montrant une infiltration due à l'ABPA [30].

Environ 3% des patients atteints de mucoviscidose souffriront d'un pneumothorax au cours de leur vie. Avoir un pneumothorax est un signe de mauvais pronostic avec près de 50% de mortalité en 2 ans.[30]

v. Défaillance respiratoire

L'histoire naturelle de la mucoviscidose est celle de l'aggravation de l'obstruction des voies respiratoires, conduisant éventuellement à une insuffisance respiratoire. Les patients développent généralement une hypoxémie, une hypercapnie et, finalement, une hypertension pulmonaire. L'accent doit être mis sur le

soulagement des symptômes, tels que la dyspnée, et sur le confort du patient. La ventilation à pression positive non invasive peut être utile dans ces situations, mais l'intubation est déconseillée à moins qu'elle ne soit utilisée comme pont pour une greffe qui devrait survenir bientôt [30].

vi. L'asthme chez les patients atteints de la mucoviscidose

Le diagnostic d'asthme chez les patients atteints de mucoviscidose est mal défini et controversé. La respiration sifflante survient chez ~ 60% des enfants atteints de mucoviscidose au cours des 6 premières années de vie, . Environ 20% des enfants atteints de mucoviscidose ont un asthme cliniquement diagnostiqué. [31]

1.2 Affection des voies aériennes supérieures

L'atteinte nasale et des sinus est observée chez presque toutes les personnes atteintes de mucoviscidose. On note que les symptômes incluent l'obstruction nasale, les maux de tête quotidiens, la toux matinale et le raclage de la gorge. Ceux qui ont des polypes nasaux sont plus susceptibles d'avoir une hyposmie et un élargissement du pont nasal. La prévalence des polypes nasaux dans la mucoviscidose est très variable, allant de 7 à 48%, la plupart étant de petite taille et visibles uniquement par endoscopie. [32]

Les bactéries isolées des sinus ont tendance à être les mêmes que celles trouvées dans les voies respiratoires inférieures, *P. aeruginosa* étant la plus courante chez les patients plus âgés, tandis que *S. aureus* et *Haemophilus influenzae* sont plus fréquentes chez les jeunes enfants.[32]

1.3 Manifestations gastro-intestinales

Le tractus gastro-intestinal (GI) chez les patients atteints de la mucoviscidose est une source de morbidité et de mortalité importantes. Son importance a été notée depuis les premières descriptions de la maladie . Des anomalies de la fonction gastro-intestinale peuvent être détectées *in utero* et peuvent évoluer tout au long de l'âge

adulte, avec une maladie intestinale fonctionnelle, sans changement structurel pathologique. Une insuffisance exocrine pancréatique ou un cancer gastro-intestinal peuvent survenir chez une population vieillissante.[33]

i. Malabsorption

Les conséquences d'une malabsorption à long terme peuvent être dévastatrices avec un retard de croissance permanent, un dysfonctionnement cognitif et un déclin plus rapide de la fonction respiratoire. [34]

ii. Insuffisance pancréatique exocrine

La cause principale de la malabsorption intestinale chez la population atteinte de mucoviscidose est l'insuffisance pancréatique exocrine due à la destruction des glandes acineuses résultant d'une augmentation de la viscosité des sécrétions pancréatiques. Il en résulte un mauvais écoulement des enzymes et du bicarbonate hors du système canalaire pancréatique et l'activation de ces enzymes dans la glande provoquant une autodigestion et une destruction glandulaire. Plus de 80% de la population britannique de mucoviscidose souffre d'insuffisance pancréatique, avec une prévalence augmentant avec l'âge, et des images radiologiques caractéristiques de remplacement graisseux du tissu pancréatique notées sur l'imagerie en coupe.[30]

Une insuffisance pancréatique (IP) dans la petite enfance peut être suspectée lorsque d'autres manifestations de la mucoviscidose sont apparues. Le lait maternel humain contient de faibles taux d'amylase et de lipase, ce qui peut retarder son apparition après le sevrage .[35]

Les patients adultes atteints de mucoviscidose développant une IP présentent des caractéristiques partagées avec la population d'IP non-CF avec les caractéristiques classiques de distension et d'inconfort abdominaux, de selles flottantes, de flatulences et de perte de poids. L'insuffisance exocrine pancréatique entraîne l'incapacité de décomposer les glucides complexes, les protéines et les graisses .[35]

iii. Manifestations hépatobiliaires

L'atteinte du foie associée à la mucoviscidose est la troisième cause de décès chez les patients atteints de mucoviscidose .Elle est présente chez 15 à 30% des enfants atteints . La survie est diminuée chez les enfants qui développent une cirrhose . CFTR est situé dans la membrane sur la surface apicale des cholangiocytes et entraîne l'hydratation de la bile. Une fonction CFTR anormale conduit à des sécrétions épaisses inspirées qui, à leur tour, conduisent à une obstruction biliaire. Le dysfonctionnement de la protéine CFTR influence également les fonctions digestives en raison d'une alcalinisation réduite de la bile. L'accumulation de sels biliaires entraîne des lésions hépatocytaires, une inflammation et une fibrose. La présentation clinique de la maladie hépatobiliaire est variable, mais se développe généralement pendant l'enfance ou l'adolescence. L'hépatomégalie asymptomatique, associée à la fibrose, se présente chez 10 à 30% des patients atteints de mucoviscidose à l'entrée de la puberté.[36]. Il existe trois stades de la maladie avancée chez les enfants plus âgés et les adultes :

- 1 Stéatose hépatique ;
- 2 Cirrhose biliaire focale ;
- 3 La cirrhose multi-lobulaire.

1.4 Manifestations endocriniennes

La prévalence du diabète lié à la mucoviscidose (CFRD) a augmenté avec l'amélioration de la survie des patients atteints de mucoviscidose, et c'est l'une des complications les plus courantes chez les patients atteints de mucoviscidose. La prévalence augmente avec l'âge, touchant près de 20% des adolescents et 40 à 50% des adultes atteints de mucoviscidose [37]. Au fur et à mesure que les lésions pancréatiques progressent, il y a finalement une proportion critique de cellules des îlots qui ne fonctionnent plus, ce qui entraîne une insuffisance en insuline ainsi qu'un certain degré de résistance à l'insuline. De cette façon, le CFRD diffère du diabète de type 1 ou de type 2 typique. Le diagnostic de CFRD est associé à un déclin de la fonction pulmonaire, et de l'état nutritionnel. [19]

Le gène *CFTR* s'exprime au niveau de la plupart des tissus épithéliaux polarisés. L'atteinte digestive de la mucoviscidose conditionne moins fortement le pronostic vital que l'atteinte pulmonaire, mais joue un rôle majeur dans la gravité de certaines formes (iléus méconial, cirrhose,...) et potentialise la gravité de la maladie pulmonaire par le biais de la malnutrition dont elle est en grande partie responsable. Elle participe largement à la morbidité par toute une série de manifestations cliniques plus ou moins fréquentes et plus ou moins handicapantes.

La présence de symptômes caractéristiques associant, atteintes respiratoire, digestive et nutritionnelle (triade classique) est le principal motif qui oriente les médecins vers le diagnostic de mucoviscidose. Dans notre série, Les principaux signes cliniques rapportés sont d'ordre respiratoire, dominés par les infections respiratoires à répétition (87,5% des cas), une toux chronique (37,5% des cas). Les troubles de croissance et de nutrition (retard staturopondéral présent chez 50% des cas et dénutrition chez 18,75% des cas). Les troubles digestifs avec diarrhées chroniques faisaient partie des signes clinique initiaux.

Ces données sont comparables à plusieurs autres études, notamment une étude

égyptienne de Shahin et al, où 84% des cas avaient une pneumonie chronique et 56% une maladie digestive . Une autre étude tunisienne de Bousetta et al., a noté que les pneumonies chroniques étaient présentes chez 70% et l'atteinte digestive chez 56% des patients (diarrhée chronique 59.3% – retard staturopondéral 35%)[4]. L'étude portugaise de Guardiano et al., a rapporté les mêmes résultats avec en effet des pneumonies chroniques chez 70% et une atteinte digestive chez 22% des cas Guardiano and Vaz, 'Fibrose quística – Caracterização clínica de uma amostra de doentes portuguesas'..[38]

Les signes respiratoires dominant le tableau clinique et représentent le principale motif de consultation , les même résultats étaient rapportés par une étude réalisée à rabat où les manifestations respiratoires étaient au premier plan (82,9% des patients étaient hospitalisés pour des signes respiratoires : dont 88,6% avaient des antécédents de BPP répétées et 65,7 % présentaient des signes physiques d'atteinte de l'appareil respiratoire au moment du diagnostic d'emblée sévères avec insuffisance respiratoire chronique (8,6 % des cas).

Il paraît clair que le diagnostic de la mucoviscidose n'est évoqué au Maroc que lorsque le patient présente la triade classique ou lorsque le patient est symptomatique avec des antécédents familiaux. Les médecins ne reconnaissent que la forme grave.

Considérée à tort comme une pathologie européenne, cette maladie est exclue de la pratique de routine de nos médecins, ce qui empêche les patients d'entrer dans un circuit conduisant à des centres d'expertise, où ce diagnostic pourrait être posé.

1.5 Manifestations urogénitales

L'azoospermie obstructive est retrouvée chez plus de 95% des hommes atteints de mucoviscidose, conduisant à l'infertilité .L'obstruction est due à une absence bilatérale congénitale du canal déférent. Les vésicules séminales sont également

atrophiques ou absentes. Cela peut être dû à une obstruction par des sécrétions déshydratées dans le tractus génital in utero ou à des anomalies du développement de l'appareil reproducteur. Le diagnostic peut être posé lorsque le canal déférent n'est pas palpable à l'examen scrotal ou n'est pas évident à l'échographie. L'analyse du sperme révèle une azoospermie et un faible volume de sperme.[39]

Dans notre série 2 patients étaient adressés pour infertilité. Les progrès des techniques de reproduction assistée (injection intracytoplasmique de spermatozoïdes dans l'ovule) permettent aux patients mâles, porteurs d'agénésie des canaux déférents, d'avoir des enfants.

IV. Signes radiologiques :

1. Radiographie thoracique standard :

Les signes radiologiques sont souvent précoces mais également non spécifiques. Ils associent à des degrés divers:

- une distension pulmonaire, bien visible en particulier chez le nourrisson sur les clichés de profil par l'augmentation de l'espace clair rétrosternal et rétrocardiaque ;
- un syndrome bronchique : épaississement péribronchique, images en «rails», en « canon de fusil », impactions mucoïdes ; localisés aux deux tiers supérieurs des poumons , avec prédominance aux sommets est typique ;
- des dilatations de bronches; des atélectasies lobaires ou segmentaires, d'abord réversibles puis définitives et sièges de bronchectasies.

Dans notre série, La radiographie du thorax était pathologique chez tous nos patients. Les images étaient très différentes dans leur intensité et leur topographie. L'étendue et l'importance de dégâts parenchymateux sont d'autant plus importantes que l'enfant est plus âgé et que la maladie est évoluée. La distension thoracique était

quasi constante, ces données sont comparables avec l'étude faite au CHU Avicenne de Rabat. [41]

2. TDM thoracique :

L'atteinte structurale des voies aériennes et du parenchyme est aux mieux étudiée par TDM thoracique.

Dans le cas de la mucoviscidose, elle permet en effet de visualiser un important spectre d'images précises: impactions mucoïdes, bronchectasies, emphysème, épaississement péribronchique.

Les changements dans les scores scannographiques sont étroitement liés aux modifications de l'état clinique, notamment à la qualité de vie et à la survie, au taux d'exacerbation, mais également à d'autres paramètres comme la spirométrie (notamment le VEMS), et les paramètres inflammatoires. Lorsqu'une exacerbation est traitée efficacement, les scores s'améliorent rapidement avec l'état clinique. [40]

Dans notre série, les 8 patients qui ont bénéficié d'une TDM thoracique, ayant comme aspect radiologique principale ; une distension thoracique quasi-constante; a été retrouvée chez 93,75%, les lésions de DDB ont été observées chez 6 patients (soit chez 37,5 %) avec aspect en verre dépoli.

Dans la série réalisée au CHU Avicenne à Rabat, les résultats scannographiques des 30 patients ont montré: une distension thoracique quasi-constante, un épaississement des parois bronchiques (chez 90 % des patients), des images en faveur d'impactions mucoïdes (chez 86,6 % des patients), des condensations parenchymateuses (chez 63,3% des patients), enfin des images en mosaïque traduisant l'obstruction bronchiolaire (chez 56,6% des patients) .[41]

V. le test de la sueur :

Le test de la sueur se déroule toujours en trois étapes, d'abord la stimulation de la sudation par iontophorèse à la pilocarpine, recueil de sueur dans un microcapillaire (collecteur Macroduct®) et enfin dosage des électrolytes dans la sueur.

La méthode de dosage de référence de Gibson et Cooke est fondée sur le dosage des ions chlorure dans la sueur à l'aide d'un papier filtre, par titrimétrie, selon la méthode modifiée de Schales. Les difficultés de réalisation de ce test amènent les laboratoires à utiliser des méthodes plus standardisées, comme la coulométrie.

Pour que le diagnostic soit fiable, on exige classiquement un poids minimal de sueur de 100 mg, et la confirmation par deux tests positifs en méthode de référence.

La valeur seuil de 60 mEq/l de chlorure semble permettre une distinction extrêmement précise et fiable des sujets atteints ou non de mucoviscidose. Entre 30 et 60 mEq/l de chlorure, le diagnostic est douteux.[42]

Les faux positifs sont le plus souvent liés à des erreurs techniques. Il peut s'agir également de situations pathologiques entraînant une élévation de la concentration sudorale en chlorure de sodium. Il est recommandé de faire le test en dehors de toute pathologie oedémateuse, d'hypoalbuminémie et de toute prise médicamenteuse. L'obtention de quantité de sueur insuffisante est la principale cause des faux négatifs chez l'enfant de moins de 6 semaines. Quelques mutations peuvent être associés avec des valeurs de chlore sudoral bas ou intermédiaire notamment la mutation R117H, certaines mutations d'épissage comme 3120G→A, 875+1G→C, 3849 +10kbC→T et des mutations de classe V.[42]

Le diagnostic final de mucoviscidose n'est cependant pas uniquement établi sur le résultat du test de la sueur. Il repose sur la confrontation d'un ensemble d'arguments : les éléments, la valeur de la TIR (en recherchant les causes

d'hypertrypsinémie : souffrance fœtale, cardiopathie, etc.), les résultats de la biologie moléculaire et le résultat du test de la sueur. [42]

Parmi les 16 patients qui ont fait l'objet de cette étude, seulement 9 ont bénéficié du test de la sueur contrairement à une étude réalisée par l'équipe du chu Avicenne dans laquelle tous les patients avaient bénéficié de ce test [41]. En effet, les indications de ce test doivent être élargies aux différents aspects cliniques de cette pathologie.

VI. Diagnostic moléculaire :

1. Séquençage de Sanger :

Les méthodes fondatrices du séquençage de l'ADN sont principalement la synthèse de didésoxyribonucléotides de Sanger (Sanger & Coulson, ; Sanger, Nicklen, & Coulson,) et le clivage chimique de Maxam–Gilbert (Maxam & Gilbert). La méthode Maxam–Gilbert est basée sur la modification chimique de l'ADN et le clivage ultérieur du squelette de l'ADN sur des sites aux nucléotides modifiés. Le séquençage Sanger utilise des nucléotides spécifiques en fin de chaîne (nucléotides didésoxy) qui ne comportent pas de groupe 3'–OH. Ainsi, aucune liaison phosphodiester ne peut être formée par l'ADN polymérase, ce qui entraîne la terminaison de la chaîne d'ADN après leur incorporation. Les ddNTP sont marqués par radioactivité ou par fluorescence permettant leur détection sur des gels de "séquençage" ou des machines de séquençage automatisé, respectivement.

Bien que la chimie de la méthode originale de Maxam–Gilbert ait été modifiée pour aider à éliminer les réactifs toxiques, la méthode de séquençage par synthèse de Sanger est devenue la méthode de référence en matière de séquençage.[43]

Elle a été développée en 1997 et a connu depuis plusieurs innovations qui ont contribué à son amélioration : (1) le développement de colorants fluorescents, (2) l'utilisation du séquençage à cycle thermique pour réduire la quantité d'ADN d'entrée et de polymérase thermostables nécessaires pour incorporer de manière efficace et précise les colorants terminateurs dans l'ADN en phase de synthèse, (3) le développement de logiciels pour interpréter et analyser les séquences. [44]

2. NGS

Le séquençage de nouvelle génération (NGS), également appelé séquençage massivement parallèle ou séquençage à haut débit, est une technologie permettant le séquençage simultané de millions de séquences d'ADN ou d'ARN. [43]

Il présente plusieurs avantages par rapport aux méthodes de séquençage traditionnelles, notamment un débit plus élevé avec la capacité de multiplexage des échantillons, une plus grande sensibilité dans la détection des variants, un délai d'exécution plus rapide et un coût plus faible.

Le NGS représente une véritable révolution technologique en matière de séquençage, après le séquençage Sanger.

Les méthodes de séquençage de deuxième génération peuvent être regroupées en deux grandes catégories, le séquençage par hybridation et le séquençage par synthèse (SBS). Les méthodes SBS représentent la version perfectionnée du séquençage Sanger, sans les terminateurs didésoxy, en combinaison avec des cycles répétés de synthèse, d'imagerie et des méthodes permettant d'incorporer des nucléotides supplémentaires. À première vue, ces nouvelles méthodes peuvent sembler onéreuses, mais les réactions sont exécutées en parallèle, souvent dans des volumes de l'ordre du nanolitre, du picolitre ou du zeptolitre, dans de petites chambres, et le coût par paire de bases séquencée est donc plus faible. Les perfectionnements constants et la miniaturisation permettent de réduire encore plus les coûts. [45]

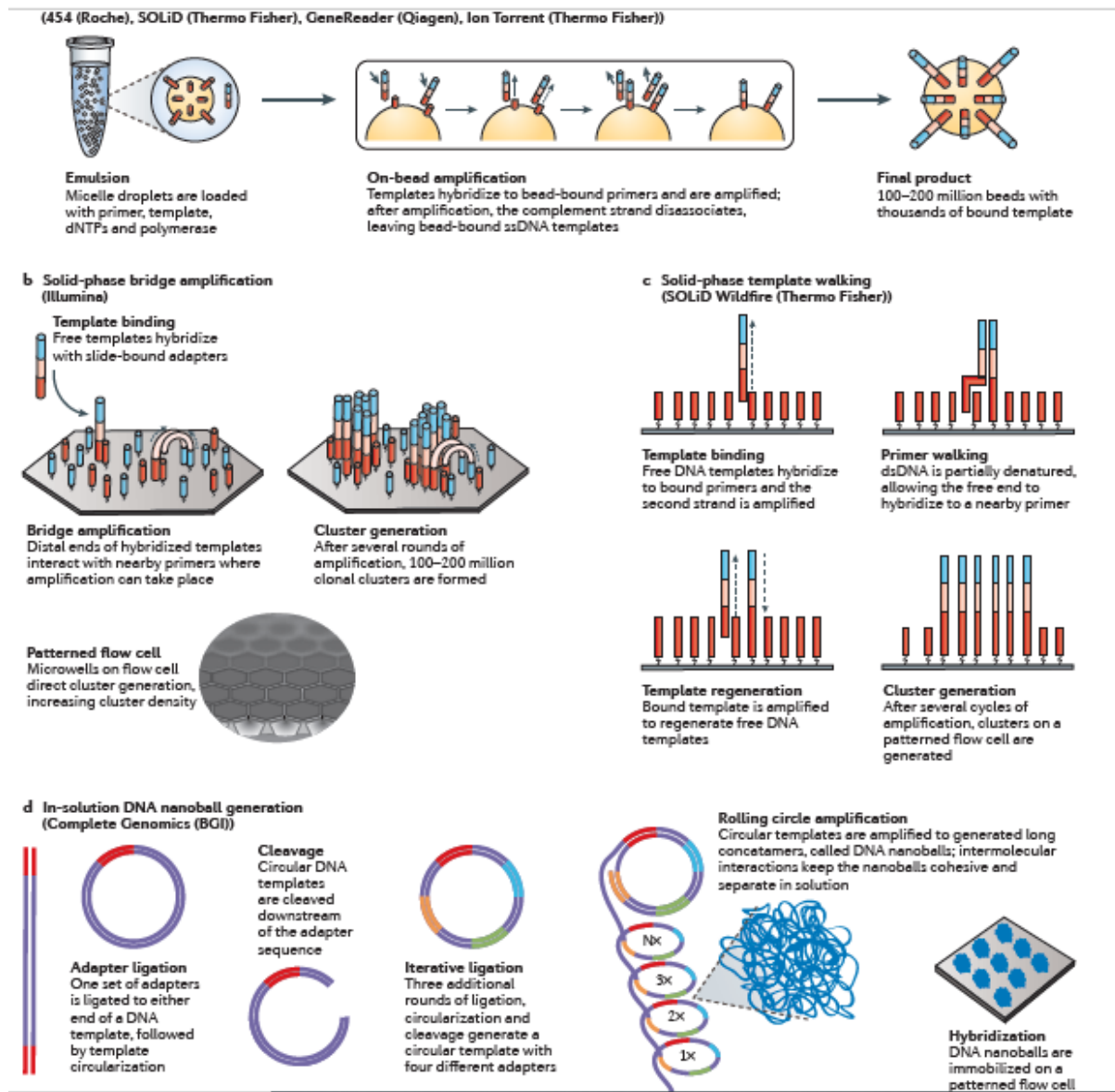


Figure 14 : Méthode d'amplification NGS 2^{ème} génération [45]

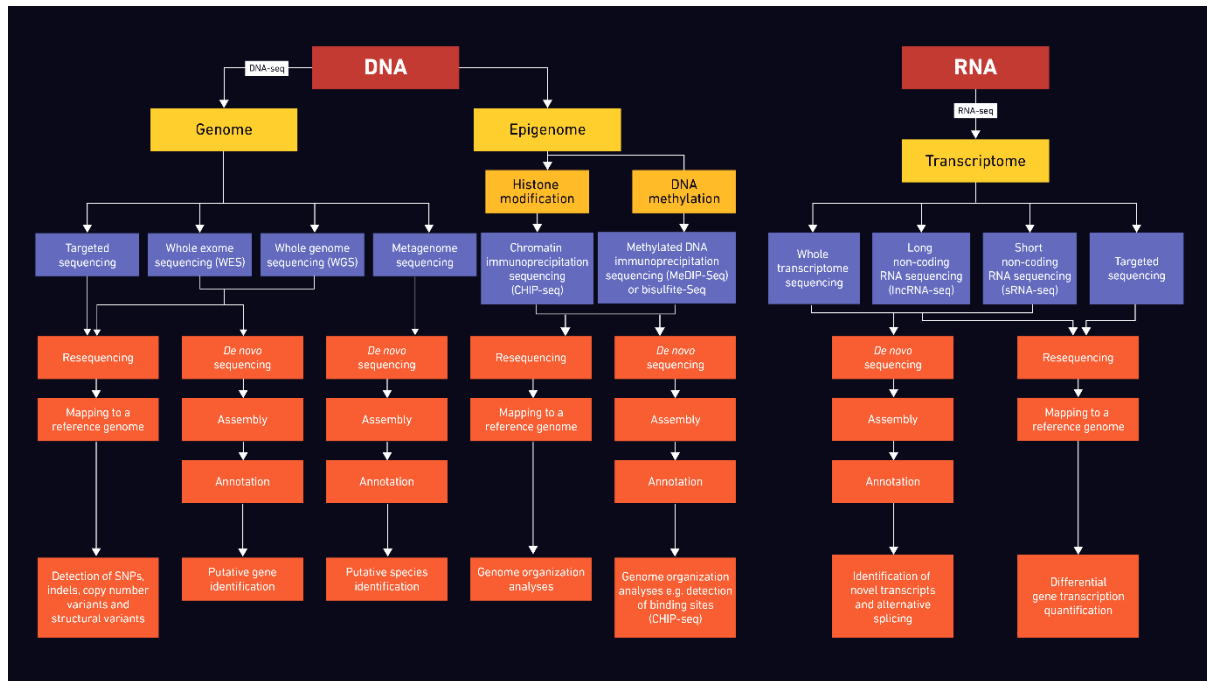


Figure 15 : Diagramme de flux indiquant les stratégies de séquençage possibles pour différents types d'échantillons. [45]

3. nanopore:

3.1 Introduction :

L'idée du séquençage par nanopores a été proposée par Deamer et Branton et indépendamment par Church. Le concept est basé sur la détection d'un courant électrique lors du passage des nucléotides à travers un minuscule canal. En 1993, Deamer, Branton et Kasiannowicz ont utilisé l' α -hémolysine (α -HL), une protéine toxique formant des pores sécrétée par *Staphylococcus aureus*, pour détecter la traversée de l'ADN par le nanopore α -HL selon *Song et al.* En 1996, leurs résultats de translocation d'ADN à travers le nanopore α -HL ont été publiés .

Un nanopore est simplement un petit trou de l'ordre de 1 nm de diamètre interne qui est constitué de certaines protéines cellulaires transmembranaires. Le séquençage par nanopore fonctionne sur le principe des variations minutes du courant électrique à travers le nanopore immergé dans un fluide conducteur auquel une tension est appliquée lorsqu'un nucléotide (ou brin d'ADN) en mouvement le traverse. Chaque nucléotide de la molécule d'ADN, en passant à travers le nanopore, obstrue le nanopore à un degré différent et caractéristique, et la quantité de changement de courant est caractéristique pour chaque nucléotide différent. L'ADN peut être forcé de passer à travers le trou une base à la fois, comme un fil dans le chas d'une aiguille. La variation du courant peut être lue directement, et la séquence de l'ADN qui passe peut être déterminée en détectant les variations du courant générées spécifiques à la base passée. [46]

Bien que la technologie n'ait pas été utilisée en routine pour le séquençage, selon les scientifiques qui l'ont développée, elle peut séquencer l'intégralité du génome de 5,4 kilobases du virus en une seule lecture continue. Toutefois, l'objectif initial est de fournir des lectures de 100 kilobases. C'est encore beaucoup plus long que les fragments traités par d'autres technologies. Le système initial sera doté d'une fonction permettant de lire l'ADN à un rythme de plusieurs centaines de kilobases par seconde. [46]

La catégorie de nanopore utilisée peut être divisée en deux parties, le nanopore à l'état solide et le nanopore biologique :

i. Nanopores biologiques :

Les protéines formant des pores peuvent former des nanopores, typiquement la protéine est en forme de champignon et un noyau creux la traverse. Le connecteur Phi 29, la porine MspA et l' α -hémolysine sont quelques protéines qui forment des pores. L' α -hémolysine (α -HL, également appelée α -toxine) est le premier nanopore biologique et le plus utilisé, détenant une valeur énorme dans le domaine du séquençage de l'ADN. L' α -HL est une exotoxine sécrétée par la bactérie *Staphylococcus aureus*, un pathogène humain. Cet heptamère en forme de champignon est un canal transmembranaire de 232,4 kDa, constitué d'une coiffe de 3,6 nm de diamètre et d'un β -barreau transmembranaire de 2,6 nm de diamètre. Lors des travaux de laboratoire, un nanopore est inséré dans un film bicouche lipidique, puis des manipulations sont effectuées sur des protéines à canal unique et des mesures sont prises. [46]

Les nanopores biologiques proviennent de molécules de protéines naturelles ou de nanopores artificiels générés par génie génétique. Cependant, les nanopores biologiques sont fragiles et présentent des caractéristiques telles qu'une courte durée de vie, une instabilité intrinsèque et une exigence stricte d'un environnement spécifique, ce qui ne permet pas d'assurer le fonctionnement à long terme d'un biocapteur.

ii. Nanopores à l'état solide :

Les nanopores à l'état solide sont essentiellement créés dans des films de composés de silicium, le nitrure de silicium étant le plus souvent utilisé. De nombreuses techniques sont utilisées pour la fabrication de nanopores à l'état solide, notamment le "déploiement et la sculpture par faisceau d'ions" et la "fabrication par faisceau d'électrons". Le diamètre des nanopores à l'état solide est contrôlable dans une plage précise allant du sub-nanomètre à la centaine de nanomètres, cette plage variant en fonction des paramètres expérimentaux. En général, en comparaison avec les membranes lipidiques, les matériaux diélectriques comme le SiN, qui présentent une stabilité chimique et thermique supérieure, sont utilisés dans les nanopores à l'état solide. Cependant, cette stabilité dépend des paramètres qui conduisent à la formation de ces pores. En ce qui concerne les nanopores à base de graphène, même si leur stabilité chimique et thermique n'est pas démontrée, ils possèdent des propriétés chimiques uniques qui sont très avantageuses par rapport à leurs compléments biologiques. Les nanopores à l'état solide ont ouvert la voie à un large éventail de recherches, en particulier dans le domaine du séquençage de l'ADN, de l'identification des interactions entre protéines, du transport moléculaire et de l'identification de l'environnement.

Les nanopores en Si₃N₄ et SiO₂ sont les plus utilisés et leur fabrication est compatible avec les procédés industriels de circuits intégrés à base de semi-conducteurs à oxyde métallique complémentaire. Ces nanopores peuvent être gravés par ions dans des films Si₃N₄ et SiO₂ indépendants, à l'aide d'un faisceau d'ions d'argon ou d'un faisceau d'électrons. [46]

3.2 Technologie de séquençage par nanopores :

ONT est une technologie de séquençage de molécules uniques basée sur des nanopores. Le premier proto-type, MinION, a été mis sur le marché en 2014. La plateforme mise à jour, PromethION, a été publiée en 2015 avec un débit amélioré. Deux versions de PromethION, nommées ProthelION 24 et 48, intègrent respectivement 24 et 48 réservoirs de flux. Grâce à l'explosion du nombre de réservoirs de flux par rapport à MinION, le système PromethION a pu produire jusqu'à 7,6 To de données, alors que MinION ne pouvait générer que 50 Go en 72 heures de fonctionnement. [47]

Il existe trois formes de séquençage nanopore, 1D, 2D et 1D2. Le kit 1D utilise un nanopore où seul un brin d'ADN est séquencé. Le kit 2D a été utilisé pour la première fois dans l'ONT. Une structure en épingle à cheveux a été utilisée à une extrémité de l'ADN double brin pour connecter deux brins. Après avoir terminé le séquençage d'un brin, le séquençage de l'autre brin commence immédiatement. De cette façon, il est équivalent de répéter le séquençage deux fois, ce qui peut être utilisé pour la correction des bases. 1D2 est similaire à 2D, mais il n'a pas besoin d'épingles à cheveux pour lier physiquement les deux brins d'ADN ensemble. Le système de réaction pour le séquençage par nanopores est réalisé dans une cellule à écoulement, dans laquelle deux compartiments remplis de solution ionique ont été séparés par des membranes contenant soit 2048 (MinION) soit 12 000 (PromethION) nanopores. Le processus de séquençage génique par nanopores peut être divisé en trois parties : la préparation de la librairie, le processus de séquençage et le basecalling. [47]

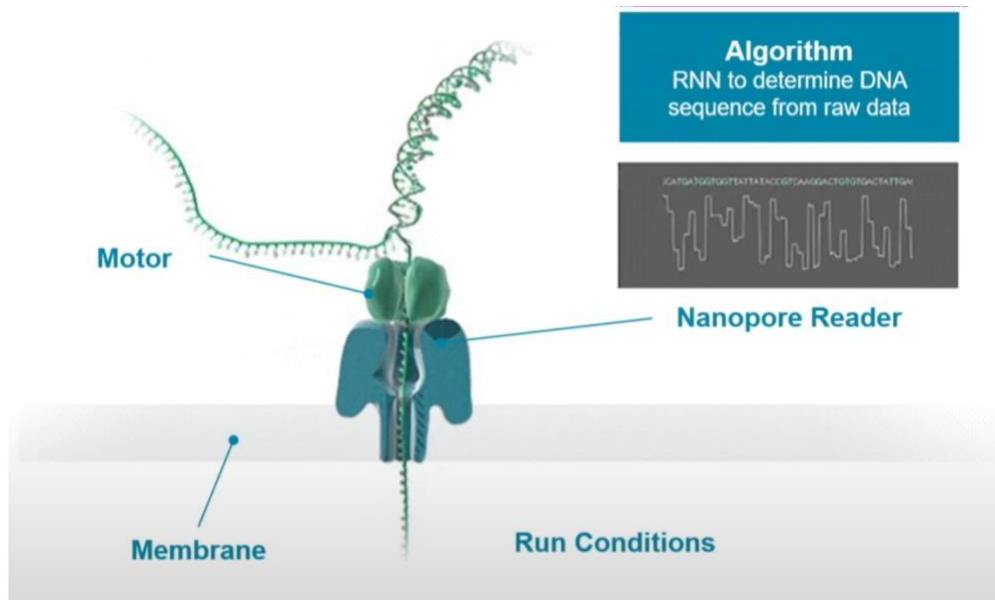


Figure 16 : Processus du séquençage par nanopore [47]

3.3 Processus du séquençage :

La figure 16 montre le processus schématisé du séquençage. Le support d'ADN à séquencer est mélangé avec des copies d'enzyme processive. Lorsque le complexe ADN-protéine s'approche du nanopore, l'enzyme se lie à un leader simple brin à l'extrémité de la matrice d'ADN double brin, ouvre le double brin et fait passer un simple brin à travers le nanopore. Une molécule unique à haute spécificité peut interférer avec le courant lorsque le long brin d'ADN ouvert traverse le nanopore une base à la fois. Ces signaux de courant peuvent être utilisés pour déterminer le type de base. [48]

- ***Basecalling:***

Au cours du processus de lecture des bases, en raison de la différence de charge et de structure des nucléotides lorsqu'ils traversent le nanopore, le courant mesuré provoque de petites perturbations. Ces signaux électriques peuvent ensuite être traduits en séquences d'ADN grâce aux algorithmes d'apprentissage profond (deep learning). Cependant, les signaux de lecture sont bruyants et aléatoires car ils proviennent de plusieurs molécules dans les nanopores, ce qui est difficile pour le basculeur.

En outre, la résistance du trou est déterminée par les bases de plusieurs nucléotides situés au point le plus étroit du trou . Étant la dernière étape pour l'interprétation de l'ensemble de la séquence d'ADN, l'analyse des données à l'aide de l'apprentissage profond est un défi, qui nécessite des algorithmes efficaces et une grande quantité de données pour l'entraînement informatique.

3.4 Application du nanopore :

Application	Description
Recherche Clinique	Avec la technologie nanopore, la lecture longue peut aider les chercheurs à identifier et à phaser les variantes génétiques, et à caractériser pleinement les nouvelles isoformes et les transcrits de fusion. La technologie nanopore donne un nouvel aperçu de la santé et des maladies, du cancer à l'immunologie en passant par les neurosciences.
Détection Des microbes	La technologie des nanopores peut être utilisée pour séquencer la séquence d'ADN ou d'ARN des microbes, et elle aide les chercheurs à classer ou à surveiller les microbes. En outre, si la technologie nanopore peut être appliquée dans le domaine de la santé publique, il est prometteur d'établir une surveillance des microbes et de réagir rapidement en cas de pandémie.
Assemblage du Génome	Grâce à la capacité de séquençage à lecture longue, la technologie de séquençage nanopore peut surmonter les problèmes que rencontrent les dispositifs de séquençage à lecture courte dans le domaine des fragments à longue répétition.
Génomique Environnementale	La technologie de séquençage nanopore, portable et abordable, constitue un outil unique pour la recherche environnementale, notamment l'évaluation de la biodiversité, l'identification des agents pathogènes et la conservation des animaux. En outre, l'analyse des données en temps réel permet un accès immédiat aux résultats, que ce soit en laboratoire ou sur le terrain.

i. Avantages :

Les avantages potentiels du système nanopore sont qu'il pourrait permettre le séquençage en temps réel de molécules simples à faible coût ; il devrait également permettre de lire de très longues molécules d'ADN en une seule lecture. La technologie nanopore devrait permettre le séquençage à un coût très faible, de 25 à 40 dollars par gigabase de séquence. Cela signifie que le séquençage d'un génome humain avec une couverture standard de 30 fois ne coûterait que quelques milliers de dollars. Comme il s'agit d'un procédé de séquençage très rapide, il pourrait constituer un choix futur de séquençage pour presque toutes les applications.[47][48]

ii. Limites :

Jusqu'à présent, le séquençage nanopore en est encore au stade de la preuve de concept et n'est pas encore commercialisé, parallélisé ou routinisé. À ce stade, cette technologie présente de nombreux problèmes qui doivent être pris en compte avant son utilisation commerciale réelle. L'un d'entre eux pourrait être la manière d'améliorer sa résolution afin qu'elle puisse détecter des bases uniques avec le mouvement rapide de l'ADN à travers le trou.

Les cas de notre série font partie de la forme classique de la mucoviscidose ; le diagnostic était évoqué devant l'atteinte respiratoire chronique et/ou l'atteinte digestive associée aux troubles nutritionnels et/ou au retard staturo-pondéral, on a cherché dans les antécédents : la notion de consanguinité chez les parents ainsi que les cas similaires dans la fratrie, le test de la sueur a été demandé pour orienter le diagnostic.

L'étude moléculaire réalisée dans un premier temps par le séquençage de Sanger n'a révélé la présence de la mutation F508del à l'état homozygote chez aucun dans notre série , à l'encontre de l'étude génétique qui était faite chez 32 patients tunisiens, la mutation F508del était la plus fréquente (56%), suivie de la mutation G542X et 711 + 1G > T (5% chacun) puis la mutation G85E (3%) et la mutation W1282X (3%)[4].

Une étude marocaine avait identifié 13 mutations différentes dont 58,3% ont été à l'état homozygote : F508del, E1104X, G85E, 711 + 1 G > T, R1162X, N1303K, R553X, TG11T5, TG12T5, 3199del6, S977S, V562I, c.3140-16 t > A. La mutation F508del était majoritaire (52%), suivie de la mutation E1104X (12,5%) aboutissant toutes les deux à l'absence de fonction de la protéine CFTR et à un phénotype sévère. [51]. La mutation F508del étant la plus fréquente aussi bien dans les populations européennes. Contrairement à notre étude.

Pour la série égyptienne, Les mutations détectées étaient F508del (58 %), 2183AA/G (10 %), N1303K (6 %), W1282X (4 %), et R347P (2%).[50]

Nous avons ensuite procédé au séquençage par nanopore en utilisant les long-range PCR ciblant des régions plus importantes du gène *CFTR*. Nous avons réussi à détecter la mutation F508del chez 2 patients mais à l'état hétérozygote, et cette mutation a été confirmée par la technique de Sanger étant une technique de référence.

D'autres mutations rapportées sur le tableau des résultats du séquençage ont été mises en évidence. La plupart sont des mutations introniques mais aucune des mutations ciblées pour lesquelles les amorces ont été désignées n'étaient détectées.

Dans notre série nous avons également identifié une mutation de signification incertaine ainsi que plusieurs mutations non décrites dont l'effet sur la fonction protéique doit être confirmé par des analyses complémentaires notamment les analyses fonctionnelles.

Le recours à la technologie du séquençage par nanopore aura énormément d'avantage pour poursuivre cette étude en ciblant la totalité du gène *CFTR*, vu que l'utilisation des long-range PCR permet l'analyse des longs fragments avec un avantage majeur par rapport au séquençage deuxième génération dans la détection de délétions qui représentent 2% des patient atteints de la mucoviscidose.

VII. PRISE EN CHARGE :

Les recommandations sont actuellement basées sur des consensus, d'experts. La prise en charge nécessite une collaboration entre gastroentérologues, pneumologues, oto-rhino-laryngologistes (ORL), microbiologistes, kinésithérapeutes, psychologues et diététiciennes. Les patients ont besoin d'un suivi mensuel jusqu'à six mois, puis tous les trois mois ou plus dans les situations à risque (à l'annonce du diagnostic, en situation d'aggravation). À chaque consultation, on doit pratiquer un ECBC, une évaluation nutritionnelle par une diététicienne et une spirométrie dès que possible. Un bilan annuel doit être réalisé et comporte au minimum : imagerie thoracique, explorations fonctionnelles respiratoires, échographie hépatique, examen ORL, saturation en oxygène, un ECBC, une numération formule sanguine, un ionogramme sanguin, un bilan hépatique complet, une sérologie aspergillose, des IgE totales et spécifiques de l'infection à *Aspergillus*, une évaluation nutritionnelle complète comportant notamment une enquête diététique, un dosage des vitamines A,E et 25-OH-vitamine D, un dosage de l'hémoglobine glyquée, du taux de prothrombine,

La recherche d'une stéatorrhée est indiquée en cas de présence d'un infléchissement pondéral. L'étude de l'âge osseux se fait, à partir de l'adolescence, associée si possible, à une absorptiométrie biphotonique pour l'étude des compartiments corporels. Une HGPO est préconisée tous les deux ans à partir de l'âge de 10 ans. La réalisation d'une spirométrie avec courbe de débit/volume et d'une mesure non invasive de la saturation en oxygène (SaO₂) sont recommandés tous les six mois à l'état stable. [49]

L'éducation thérapeutique est fondamentale dans l'accompagnement du patient et des parents à tous les âges de la maladie, avec l'objectif de rendre le patient davantage responsable de sa prise en charge et de faciliter l'observance des traitements.

1. Nouvelles stratégies thérapeutiques

Les différentes étapes de la physiopathologie de la maladie ont permis de définir plusieurs stratégies thérapeutiques. La thérapie génique s'attache à corriger le gène anormal ; les thérapies d'édition d'ARN modifient les ARNm porteurs de mutations ; les thérapies protéiques modulent les conséquences des mutations ; les thérapies de substitution recherchent des voies alternatives aux anomalies de transport ionique.

Des études cliniques montrent qu'une restauration de 10 % de protéine à la membrane suffit pour diminuer de façon significative les symptômes, augmenter les fonctions respiratoires de 12 % et diminuer de 40 mEq/l le Cl⁻ sudoral. [42]

VIII. diagnostic prénatal

Le diagnostic prénatal s'adresse aux couples « à risque », c'est à dire aux parents d'un enfant déjà malade ou aux couples ayant des apparentés proches avec enfant atteint. Le test se pratique sur les cellules de villosités choriales prélevées à 10SA . La technique du diagnostic préimplantatoire, qui, après fécondation in vitro, recherche les mutations sur une seule cellule de l'oeuf prélevée au stade de blastomère, trouve une de ses meilleures indications dans la mucoviscidose. [49]

IX. Dépistage néonatal : trypsine immunoréactive et recherche génétique

Le dépistage néonatal pour la mucoviscidose est réalisé dans plusieurs pays dans le monde mais absent au Maroc.

En France, Il est réalisé à partir du sang recueilli sur papier buvard pour le test de Guthrie, idéalement à 72 heures de vie. Il repose sur le dosage de la trypsine immunoréactive (TIR), enzyme pancréatique dont un taux élevé reflète une souffrance pancréatique. Un dosage de TIR à 72 heures de vie supérieur à 65 μ g/l conduit à la pratique d'une recherche génétique. [42]

En cas de mutation identifiée sur les deux allèles ou d'un des deux allèles (situation soit de simple hétérozygotie, soit de maladie avec une deuxième mutation non identifiée), l'enfant bénéficie d'un un test de la sueur. [42]

Si celui-ci est positif, on affirme le diagnostic de mucoviscidose. Si aucune mutation n'est retrouvée, un nouveau prélèvement est réalisé sur l'enfant à trois semaines pour un nouveau dosage de la TIR. Si la TIR reste élevée, un test de la sueur est réalisé.

Ce mode de dépistage est assez sensible mais on estime à environ 3 à 4 % le nombre de faux négatifs. En effet, la TIR peut s'élever de façon non spécifique à l'occasion de tout stress néonatal.

Le dépistage néonatal offre l'opportunité d'améliorer le pronostic de la maladie grâce à un suivi médical précoce, et la mise en route de mesures préventives et de traitements appropriés pour retarder l'atteinte pulmonaire ou nutritionnelle.[42][49]

X. Conseil génétique:

La mucoviscidose est héritée selon le mode autosomique récessif. Au moment de la conception, chaque frère d'un individu atteint a à 25 % de chances d'être atteint à son tour, 50 % de chances d'être un porteur asymptomatique et 25 % de chances de ne pas être atteint et de ne pas être porteur. Le test de porteur pour les parents à risque et le test prénatal pour les grossesses à risque accru sont possibles si les variants pathogènes de CFTR ont été identifiés dans la famille. [49]

CONCLUSION

La mucoviscidose est une affection héréditaire complexe secondaire à un défaut du fonctionnement de la protéine CFTR longtemps jugée exceptionnelle, et encore mal connue au Maroc où les moyens diagnostiques sont considérablement et amplement limités. Malheureusement, l'âge médian de survie des enfants marocains atteints de cette maladie ne dépasse pas 8 ans. Vivre avec la mucoviscidose au Maroc est très compliqué du fait du dépistage tardif, de la rareté du personnel soignant connaissant bien la maladie, de la difficulté de sa prise en charge ainsi que de l'indisponibilité des traitements adéquats.

A ce jour, plus de 2100 mutations du gène CFTR ont été rapportées. Nous avons essayé de déceler seulement les 13 variants les plus fréquents dans la région maghrébine. L'idéal serait d'effectuer une analyse de tous les exons du gène ainsi que leurs sites d'épissage pour déterminer tous les variants possibles, y compris les nouveaux. Par conséquent, nous proposons de constituer un panel de mutations qui caractérisent la population marocaine en utilisant le séquençage d'Oxford nanopore technologie.

Cette expérience avec ONT, nous a permis de confirmer sa fiabilité, sa portabilité, son coût qui est bien inférieure par rapport au séquençage de deuxième génération, sa vitesse de production de données. Il n'y a aucune limite apparente à la longueur d'ADN pouvant être séquencée.

La présente étude est une ébauche pour faire le point sur les aspects cliniques et moléculaires de la mucoviscidose dans la population Marocaine et s'inscrit dans la stratégie d'amélioration des moyens du diagnostic moléculaire.

Nous comptons dans un deuxième temps augmenter inclure plus de patients dans l'étude, cibler la totalité du gène CFTR par nanoséquençage et réaliser Des analyses fonctionnelles pour confirmer l'effet pathogène des nouveaux variants identifiés.

RESUME

Resume

Introduction :

La mucoviscidose est la maladie héréditaire autosomique récessive la plus grave dans la population caucasienne. Sa fréquence au Maroc semble rejoindre les chiffres européens avec une valeur de 1/1680 et 1/4150 naissances. Ces chiffres sont en contradiction avec l'idée largement répandue chez nos professionnels de santé, selon laquelle la mucoviscidose est une pathologie exceptionnelle dans notre population. Le gène impliqué dans cette affection est nommée CFTR. Plusieurs mutations ont été découvertes dont la plus fréquente est $\Delta F508$ chez la population caucasienne. Le spectre des mutations identifiées chez les patients atteints de mucoviscidose (CF) varie en fonction des origines ethno-géographiques des individus. Si la mutation p.Phe508del (F508del) reste la plus fréquente chez les patients quelque soit leur origine, sa fréquence allélique, qui est d'environ 68% des allèles CF en France , peut fortement varier d'une population à l'autre.

Le séquençage Sanger à la recherche de la mutation deltaf508 est la méthode adoptée dans l'ensemble des laboratoires de génétique au Maroc, cependant, la plus grande majorité des patients ne sont pas porteurs de cette délétion.

La technologie de séquençage de 3ème génération, notamment le oxford nanopore, est une technologie basée sur l'utilisation des pores protéiques comme plateforme de séquençage avec une rapidité plus importante et un coût moindre, ce qui la rend une technologie avec beaucoup de potentiel dans le futur.

Objectif :

L'étude a pour objectif de caractériser le spectre génétique des variants du gène CFTR des patients atteints de mucoviscidose issus de nos groupes ethniques.

Méthodes :

Etude rétrospective réalisée entre 01/01/2017 et 01/03/2021 incluant 16 patients colligés au service de génétique du CHU Hassan II de Fès, ayant été adressés pour étude génétique devant la suspicion clinique d'une mucoviscidose.

Résultats :

Notre étude a inclus 16 patients. La consanguinité était présente chez 8 patients. L'aspect clinique était dominé par le tableau typique de la mucoviscidose.

Le séquençage par méthode sanger ciblant la délétion 508 était réalisé chez tous les patients, objectivant chez 2 patients la délétion 508 mais à l'état hétérozygote.

L'analyse par nanopore avec long-range PCR préalable couvrant 13 variants par 6 Amplicons , avait confirmé chez les 2 patients la délétion 508 à l'état hétérozygote . Chez 3 patients, on a mis en évidence 3 mutations faux-sens pathogènes à l'état hétérozygote. Un seul patient avait une mutation de signification incertaine à l'état hétérozygote nécessitant une étude fonctionnelle afin d'évaluer la pathogénicité de la mutation.

Conclusion :

L'étude moléculaire est une étape basique de diagnostic de la mucoviscidose en raison de la corrélations clinico-mutationnelle, ce qui peut affecter la communication des résultats, le conseil génétique, les prévisions de pronostic et les décisions thérapeutiques.

Abstract :

Introduction :

Cystic fibrosis is the most common lethal autosomal recessive disease in Caucasians. Its frequency in Morocco seems to join European figures with a value of 1/1680 and 1/4150 births. These figures contradict the widely held belief amongst healthcare professionals that cystic fibrosis is a rare condition in our population. The gene involved in this condition is called CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator gene). Several mutations have been discovered, the most frequent of which is $\Delta F508$ in the Caucasian population. The spectrum of mutations identified in patients with cystic fibrosis (CF) varies according to the individuals' ethno-geographic origins. While the p.Phe508del (F508del) mutation remains the most frequent in patients regardless of their origin, its allelic frequency, which is around 68% of CF alleles in France (Claustres et al. 2000), can vary greatly from one population to another.

Sanger sequencing for the deltaf508 mutation is the method adopted in all the genetics laboratories in Morocco, however the vast majority of patients do not carry this deletion.

The 3rd generation technology, in particular the oxford nanopore, is a technology with even greater speed and lower cost as it is based on the use of protein pores as a sequencing platform which gives it a lot of potential in the future .

Objective :

The aim of this study is to characterize the genetic spectrum of the CFTR gene variants in patients with cystic fibrosis from our ethnic groups.

Methods :

It is a Retrospective study carried out between 01/01/2017 and 01/03/2021 including 16 patients from the genetics department of the Hassan II University

Hospital in Fez, who were referred for a genetic study after clinical suspicion of cystic fibrosis.

Résultats :

Our study included 16 patients. Inbreeding was present in 8 patients. Clinical aspect was dominated by the typical cystic fibrosis symptoms.

Sanger sequencing targeting the 508 deletion was performed in all patients, identifying the 508 deletion in 2 patients but in heterozygous state.

The nanopore analysis with prior long-range PCR covering 13 variants by 6 Amplicons, confirmed the 508 deletion in heterozygous state in the 2 patients. In 3 patients, 3 pathogenic heterozygous missense mutations were found. Only one patient had a heterozygous mutation of uncertain significance requiring a functional study to assess its pathogenicity.

Conclusion :

The molecular study is a basic diagnostic step in cystic fibrosis because of the clinico-mutational correlations; it impacts the communication of results, genetic counseling, prognosis predictions and treatment decisions.

ملخص :

مقدمة:

يعتبر التليف الكيسي المرض الوراثي المتنحي والغير مرتبط بالجنس الأكثر خطورة عند الساكنة القوقازية ذات البشرة البيضاء، ويبدو تردده بالمغرب مقاربا الأرقام الأوربية بقيمة $1680 \setminus 1$ و $4150 \setminus 1$ ولادة. هذه الأرقام تتناقض مع الفكرة الشائعة عند مهني الصحة، والتي تعتبر التليف الكيسي مرضا استثنائيا عند ساكنتنا. تسمى المورثة المسؤولة عن هذا المرض بسفتر. العديد من الطفرات تم اكتشافها حيث الأكثر انتشارا هي $\Delta F508$ عند الساكنة القوقازية. طيف الطفرات المحددة عند المرضى المصابين بالتليف الكيسي تختلف حسب الأصول الإثنية الجغرافية للأفراد. وإذا كانت الطفرة = $P.PHE508DEL/F508DEL$ تبقى هي الأكثر انتشارا عند المرضى مهما كانت أصولهم، فترددتها الحليلي، والذي يقارب % 68فرنسا، يمكن أن يختلف بشكل كبير من ساكنة إلى أخرى.

إن تسلسل صانجر للبحث عن طفرة دلتا508 هو الطريقة المعتمدة في كل مختبرات علم الوراثة بالمغرب ، ومع ذلك ، فإن الغالبية العظمى من المرضى لا يحملون هذا الخبن. تقنية الجيل الثالث و لا سيما أوكسفورد نانوبور ، وهي تقنية تعتمد على استخدام مسام البروتين كمنصة تسلسلية ذات سرعة أكبر وتكلفة أقل ، مما يجعلها تقنية ذات إمكانات هائلة في المستقبل.

أهداف:

الهدف من هذه الدراسة هو تمييز الطيف الجيني لمتغيرات $CFTR$ للمرضى المصابين بمرض المصابين بالتليف الكيسي لمجموعتنا الاثنية .

الطرق:

تم إجراء دراسة رجعية ما بين 01/03/2021 و = 01/01/2017 شملت 16 مريضا تم تجميعهم من مصلحة الوراثة بالمستشفى الجامعي الحسن الثاني بفاس، كان قد تم توجيههم من أجل دراسة جينية لاشتباه اصابتهم بالتليف الكيسي

نتائج:

تضمنت دراستنا 16 مريضا تمت إحالتهم إلى قسم الوراثة في المستشفى الجامعي الحسن الثاني بفاس للاشتباه في اصابتهم بالتليف الكيسي.

تواجد زواج الأقارب عند 8 مرضى. حيث سيطرت صورة التليف الكيسي النموذجية على المظهر السريري. تم إجراء التسلسل بواسطة طريقة صانجر التي تستهدف حذف 508 عند جميع المرضى ، مما أدى إلى حذف 508 عند مريضين ولكن في حالة متغايرة اللاقحة.

أكد تحليل نانوبور مع تفاعل البلمرة المتسلسل طويل النطاق الذي يغطي مسبقا 13 متغيرا بواسطة 6 اومبليكون، عند مريضين حذف 508 في حالة متغايرة اللاقحة.

عند 3 مرضى ، تم كشف 3 طفرات خطأ غير متجانسة ممرضة في حالة متغايرة اللاقحة. كان لدى مريض واحد فقط طفرة متغايرة اللاقحة ذات أهمية غير مؤكدة تتطلب دراسة وظيفية لتقييم الأمراض لها.

خاتمة:

تعد الدراسة الجزيئية خطوة أساسية في تشخيص التليف الكيسي بسبب الارتباطات الطفرية السريرية ، والتي قد تؤثر على تداول النتائج ، والاستشارة الوراثية ، وتنبؤات التشخيص ، و القرارات العلاجية

ANNEXE

La fiche d'exploitation :

- Nom et prénom
- Sexe :
- Date de naissance :

- Age au diagnostic/âge au début de symptôme:
- Région géographique :
- Motif de consultation :

- Suspicion clinique :

❖ Atteinte respiratoire

- | | | |
|---|--|---|
| <input type="checkbox"/> Infection/colonisation par des pathogènes typiques | <input type="checkbox"/> Bronchite chronique | <input type="checkbox"/> Asthme |
| <input type="checkbox"/> Dilatation des bronches | <input type="checkbox"/> Obstruction des voies aériennes | <input type="checkbox"/> Toux quinteuse, persistante répétitive |
| <input type="checkbox"/> Polypose naso-sinusienne | <input type="checkbox"/> Rhinosinusite chronique | <input type="checkbox"/> Résistance aux antibiotiques |
| <input type="checkbox"/> Autre (précisez) :..... | | |

❖ Atteinte digestive et troubles nutritionnels

- | | | |
|--|--|---|
| <input type="checkbox"/> Iléus méconial | <input type="checkbox"/> Obstruction intestinale distale | <input type="checkbox"/> Prolapsus rectal |
| <input type="checkbox"/> Insuffisance pancréatique | <input type="checkbox"/> Pancréatite chronique | <input type="checkbox"/> Hépatopathie chronique |
| <input type="checkbox"/> Retard staturo-pondérale | <input type="checkbox"/> Diarrhé chronique graisseuse | <input type="checkbox"/> Patient déshydraté |
| <input type="checkbox"/> Mal absorption | <input type="checkbox"/> Mal nutrition | <input type="checkbox"/> Reflux gastro-œsophagien |
| <input type="checkbox"/> Vomissement chronique | | |
| <input type="checkbox"/> Autre (précisez) :..... | | |

❖ Agénésie bilatérale des canaux déférents :

❖ Autres :

● Avec antécédents :

Antécédent familial personnel:

.....

Conjoint atteint de mucoviscidose hétérozygote

connu (précisez la mutation) :

Consanguinité

● Test de la sueur :

● Imagerie :

Radio thorax

Autres :

● EFR :

● Résultats du nanoséquençage :

BIBLIOGRAPHIE

- [1]. Davis SD, Rosenfeld M, Chmiel J (Eds) (2020) Cystic Fibrosis: A Multi-Organ System Approach. Springer International Publishing, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-42382-7>
- [2].Ameen N, Martensson B, Bourguignon L, Marino C, Isenberg J Gwenn E. McLaughlin (1999) CFTR channel insertion in vivo. *Journal of Cell Science* 112, 887–894.
- [3].Bareil C, Bergougoux A (2020) CFTR gene variants, epidemiology and molecular pathology. *Archives de Pédiatrie* 27: eS8–eS12. [https://doi.org/10.1016/S0929-693X\(20\)30044-0](https://doi.org/10.1016/S0929-693X(20)30044-0)
- [4].Boussetta K, Khalsi F, Bahri Y, Belhadj I, Tinsa F, Messaoud TB, Hamouda S (2018) Cystic fibrosis in Tunisian children: a review of 32 children. *African Health Sciences* 18: 664. <https://doi.org/10.4314/ahs.v18i3.24>
- [5].Bertrand CA, Frizzell RA (2003) The role of regulated CFTR trafficking in epithelial secretion. *American Journal of Physiology–Cell Physiology* 285: C1–C18. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00554.2002>
- [6]Gentzsch M, Dang H, Dang Y, Garcia–Caballero A, Suchindran H, Boucher RC, Stutts MJ (2010) The Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Impedes Proteolytic Stimulation of the Epithelial Na⁺ Channel. *Journal of Biological Chemistry* 285: 32227–32232. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.155259>
- [7].Riordan JR, Rommens JM, Kerem B–S, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou J–L, Drumm ML, Iannuzzi MC Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Cloning and Characterization of Complementary DNA. 245: 8.
- [8].Ostedgaard LS, Baldursson O, Vermeer DW, Welsh MJ, Robertson AD (2000) A functional R domain from cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is predominantly unstructured in solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 5657–5662. <https://doi.org/10.1073/pnas.100588797>

- [9]. Vergani P, Nairn AC, Gadsby DC (2003) On the Mechanism of MgATP-dependent Gating of CFTR Cl⁻ Channels. *Journal of General Physiology* 121: 17–36. <https://doi.org/10.1085/jgp.20028673>
- [10]. Saint-Criq V, Gray MA (2017) Role of CFTR in epithelial physiology. *Cellular and Molecular Life Sciences* 74: 93–115. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2391-y>
- [11]. Cui L, Aleksandrov L, Chang X-B, Hou Y-X, He L, Hegedus T, Gentzsch M, Aleksandrov A, Balch WE, Riordan JR (2007) Domain Interdependence in the Biosynthetic Assembly of CFTR. *Journal of Molecular Biology* 365: 981–994. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.10.086>
- [12]. Shcheynikov N, Kim KH, Kim K, Dorwart MR, Ko SBH, Goto H, Naruse S, Thomas PJ, Muallem S (2004) Dynamic Control of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Cl⁻ / HCO₃⁻ Selectivity by External Cl⁻. *Journal of Biological Chemistry* 279: 21857–21865. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313323200>
- [13]. Gao L, Kim KJ, Yankaskas JR, Forman HJ (1999) Abnormal glutathione transport in cystic fibrosis airway epithelia. *American Journal of Physiology–Lung Cellular and Molecular Physiology* 277: L113–L118. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1999.277.1.L113>
- [14]. Saint-Criq V, Gray MA (2017) Role of CFTR in epithelial physiology. *Cellular and Molecular Life Sciences* 74: 93–115. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2391-y>
- [15]. Garnett JP, Hickman E, Burrows R, Hegyi P, Tiszlavicz L, Cuthbert AW, Fong P, Gray MA (2011) Novel Role for Pendrin in Orchestrating Bicarbonate Secretion in Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)-expressing Airway Serous Cells*. *Journal of Biological Chemistry* 286: 41069–41082. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.266734>

- [16]. Wang Y, Wrennall JA, Cai Z, Li H, Sheppard DN (2014) Understanding how cystic fibrosis mutations disrupt CFTR function: From single molecules to animal models. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 52: 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.04.001>
- [17]. Castellani C, Cuppens H, Macek M, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, Tullis E, Assael BM, Bombieri C, Brown A, Casals T, Claustres M, Cutting GR, Dequeker E, Dodge J, Doull I, Farrell P, Ferec C, Girodon E, Johannesson M, Kerem B, Knowles M, Munck A, Pignatti PF, Radojkovic D, Rizzotti P, Schwarz M, Stuhmann M, Tzetic M, Zielenski J, Elborn JS (2008) Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *Journal of Cystic Fibrosis* 7: 179–196. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2008.03.009>
- [18]. Ferec C, Cutting GR (2012) Assessing the Disease–Liability of Mutations in CFTR. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2: a009480–a009480. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009480>
- [19]. Filbrun AG, Lahiri T, Ren CL (2016) *Handbook of Cystic Fibrosis*. Springer International Publishing, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-32504-0>
- [20]. Drumm ML, Konstan MW, Schluchter MD, Handler A, Pace R, Zou F, Zariwala M, Fargo D, Xu A, Dunn JM, Darrah RJ, Dorfman R, Sandford AJ, Corey M, Zielenski J, Durie P, Goddard K, Yankaskas JR, Wright FA, Knowles MR (2005) Genetic Modifiers of Lung Disease in Cystic Fibrosis. *New England Journal of Medicine* 353: 1443–1453. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa051469>
- [21]. Gravina LP, Crespo C, Giugno H, Sen L, Chertkoff L, Mangano A, Castaños C (2015) Mannose–binding lectin gene as a modifier of the cystic fibrosis phenotype in Argentinean pediatric patients. *Journal of Cystic Fibrosis* 14: 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2014.07.012>

- [22]. Cohen–Cymberknoh M, Kerem E, Ferkol T, Elizur A (2013) Airway inflammation in cystic fibrosis: molecular mechanisms and clinical implications. *Thorax* 68: 1157–1162. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2013-203204>
- [23]. Stutts M, Canessa C, Olsen J, Hamrick M, Cohn J, Rossier B, Boucher R (1995) CFTR as a cAMP–dependent regulator of sodium channels. *Science* 269: 847–850. <https://doi.org/10.1126/science.7543698>
- [24]. Mott LS, Park J, Gangell CL, de Klerk NH, Sly PD, Murray CP, Stick SM (2013) Distribution of Early Structural Lung Changes due to Cystic Fibrosis Detected with Chest Computed Tomography. *The Journal of Pediatrics* 163: 243–248.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2012.12.042>
- [25]. Sly PD, Gangell CL, Chen L, Ware RS, Ranganathan S, Mott LS, Murray CP, Stick SM (2013) Risk Factors for Bronchiectasis in Children with Cystic Fibrosis. *New England Journal of Medicine* 368: 1963–1970. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1301725>
- [26]. McColley SA, Ren CL, Schechter MS, Regelman WE, Pasta DJ, Konstan MW, for the Investigators Coordinators of the Epidemiologic Study of Cystic Fibrosis (2012) Risk factors for onset of persistent respiratory symptoms in children with cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology* 47: 966–972. <https://doi.org/10.1002/ppul.22519>
- [27]. Ferkol T, Rosenfeld M, Milla CE (2006) Cystic fibrosis pulmonary exacerbations. *The Journal of Pediatrics* 148: 259–264. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2005.10.019>
- [28]. Rabin HR, Butler SM, Wohl MEB, Geller DE, Colin AA, Schidlow DV, Johnson CA, Konstan MW, Regelman WE, on behalf of the Scientific Advisory Group and Investigators of the Epidemiologic Study of Cystic Fibrosis (2004) Pulmonary exacerbations in cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology* 37: 400–406. <https://doi.org/10.1002/ppul.20023>

- [29]. Flume PA (2009) Pulmonary Complications of Cystic Fibrosis. *RESPIRATORY CARE* 54: 10
- [30]. Bush A, Bilton D, Hodson M, Hodson and Geddes' Cystic Fibrosis, Fourth Edition. Cystic Fibrosis: 673
- [31]. Ren CL, Konstan MW, Rosenfeld M, Pasta DJ, Millar SJ, Morgan WJ, for the Investigators and Coordinators of the Epidemiologic Study of Cystic Fibrosis (2014) Early childhood wheezing is associated with lower lung function in cystic fibrosis: Wheezing and Lung Function in CF. *Pediatric Pulmonology* 49: 745–750. <https://doi.org/10.1002/ppul.22894>
- [32]. Robertson JM, Friedman EM, Rubin BK (2008) Nasal and sinus disease in cystic fibrosis. *Paediatric Respiratory Reviews* 9: 213–219. <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2008.04.003>
- [33] Thompson WG, Longstreth GF, Drossman DA, Heaton KW, Irvine EJ, Muller–Lissner SA (1999) Functional bowel disorders and functional abdominal pain. *Gut* 45: ii43–ii47. <https://doi.org/10.1136/gut.45.2008.ii43>
- [34]. Konstan MW, Butler SM, Wohl MEB, Stoddard M, Matousek R, Wagener JS, Johnson CA, Morgan WJ (2003) Growth and nutritional indexes in early life predict pulmonary function in cystic fibrosis. *The Journal of Pediatrics* 142: 624–630. <https://doi.org/10.1067/mpd.2003.152>
- [35]. Mall MA, Elborn JS (Eds) (2014) Cystic Fibrosis. European Respiratory Society. <https://doi.org/10.1183/1025448x.erm6414>
- [36]. Kobelska–Dubiel N, Klineciewicz B, Cichy W (2014) Liver disease in cystic fibrosis. *Gastroenterology Review* 3: 136–141. <https://doi.org/10.5114/pg.2014.43574>
- [37]. Moran A, Dunitz J, Nathan B, Saeed A, Holme B, Thomas W (2009) Cystic Fibrosis–Related Diabetes: Current Trends in Prevalence, Incidence, and Mortality. *Diabetes Care* 32: 1626–1631. <https://doi.org/10.2337/dc09–0586>

- [38]. Guardiano M and Vaz LG (2005) Fibrose quística – Caracterização clínica de uma amostra de doentes portuguesas. *Revista Portuguesa de Pneumologia* 11: 381–406. [https://doi.org/10.1016/S0873-2159\(15\)30514-6](https://doi.org/10.1016/S0873-2159(15)30514-6)
- [39]. Kaplan E, Shwachman H, Perlmutter AD, Rule A, Khaw K-T, Holsclaw DS (1968) Reproductive Failure in Males with Cystic Fibrosis. *New England Journal of Medicine* 279: 65–69. <https://doi.org/10.1056/NEJM196807112790203>
- [40]. Constantine S, Au V, Slavotinek J (2004) Abdominal manifestations of cystic fibrosis in adults: A review. *Australasian Radiology* 48: 450–458. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1673.2004.01345.x>
- [41]. *Faraj et al. – UNIVERSITE MOHAMMED V DE RABAT FACULTE DE MEDECINE.Pdf*, n.d.)
- [42]. *Noël – Mucoviscidose Physiopathologie, Génétique, Aspec.Pdf*, n.d.)
- [43]. Yiming Zhong, ‘Application of Next Generation Sequencing in Laboratory Medicine’, n.d., 19.
- [44]. sanger sequencing technic
- [45]. Goodwin – Coming of Age Ten Years of next-Generation Sequen.Pdf’, n.d.
- [46]. ‘Wang – 2021 – Nanopore Sequencing Technology, Bioinformatics and.Pdf’, n.d.
- [47]. Lin et al. – 2021 – Nanopore Technology and Its Applications in Gene S.Pdf’, n.d.
- [48]. Sara Goodwin et al., ‘Oxford Nanopore Sequencing, Hybrid Error Correction, and de Novo Assembly of a Eukaryotic Genome’, n.d., 7
- [49]. genereview , cyctic fibrosis
- [50]. Shahin WA, Mehaney DA, El-Falaki MM (2016) Mutation spectrum of Egyptian children with cystic fibrosis. *SpringerPlus* 5: 686. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2338-7>
- [51]. Ratbi I, Génin E, Legendre M, Le Floch A, Costa C, Cherkaoui-Deqqaqi S, Goossens M, Sefiani A, Girodon E (2008) Cystic fibrosis carrier frequency and estimated prevalence of the disease in Morocco. *Journal of Cystic Fibrosis* 7: 440–443. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2007.12.006>

