

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique 1
جامعة سعد دحلب البلدية
Université SAAD DAHLEB-Blida1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie
Mémoire de fin d'études
En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV
Filière : Sciences Biologiques
Option : Génétique fondamentale.

Thème

Profil clinique, immunologique et génétique des patients atteints du syndrome de Comel Netherton

Présenté par :

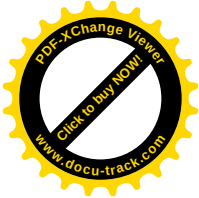
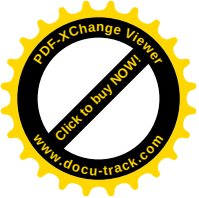
Soutenu le : 02/07/2025

- ♦ BEKKOUCHE Aicha
- ♦ GHEMATI Achouak

Noms	Garde/Lieu	Qualite
Dr BENAOU .N	MCB/USDB1	Presidente
Dr ZERROUTI .K	MCB/USDB1	Examinatrice
Pr BELAID .B	MCB/CHU Beni Messous	Promoteur
Dr AISSANI.R	MCB/USDB1	Co-promotrice

Année universitaire:

2024/2025



Remerciment

Tout d'abord, nous ne pouvons pas faire ce travail sans la bénédiction et la force d'Allah.

Nous commençons par exprimer nos vifs remerciements à notre promoteur Pr. BELAID Brahim a son aide, de nous accepte dans son service d'immunologie et pour son assistance technique et ses conseils éclairés.

Nous adressons un grand remerciement à notre Co-promotrice Pr. AISSANI Radia qui a guidée notre mémoire, et nous la remercions aussi pour son soutien constant et sa disponibilité.

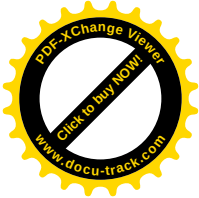
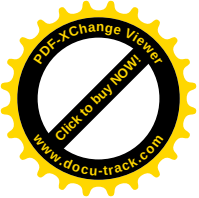
Nous tenons particulièrement à remercier Mme BENAOU M pour avoir accepté de présider le jury.

Nous souhaitons exprimer notre gratitude à Mme ZERROUTI pour accepter d'examiner ce travail.

Un grand merci à notre chef d'option Pr MOHAMED SAID R de l'université de Blida.

Merci à toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de notre projet, trouvez ici l'expression de nos sincères sentiments.

Merci



Dédicace

Je dédie cette réalisation à mon âme ambitieuse. À mon ange sur terre, à celui qui incarne l'amour et la tendresse, à mon sourire, à la source de mon bonheur pour tout ce qui est beau dans ma vie, à mes parents

À ma chère mère qui a travaillé et lutté pour ma réussite, m'a soutenu et a fait de nombreux sacrifices pour moi.

À celui qui m'a enseigné les leçons les plus importantes de ma vie, à celui dont je porte le nom avec fierté, à celui qui vit à l'étranger dans sa patrie et sa famille pour notre bien, à mon cher père. Merci pour vos nobles valeurs et votre soutien constant.

À mon petit cher frère Ayoub qui Je lui souhaite du succès dans son avenir et une vie heureuse et satisfaite.

À ma joie et mon papillon, à ma chère sœur Rayhana, qui est pour moi un pilier dans la vie et des exemples de persévérance, de courage, et de générosité.

À mon amie Nadia à mon hormone du bonheur, ta présence dans ma vie est l'une des belles choses qui m'ont fait croire que les coïncidences de la vie peuvent être merveilleuses.

À Mon amie et mon chérie, ensemble nous avons surmonté les chemins les plus difficiles et appris de nombreuses expériences. Merci pour le temps passé avec toi. Ma binôme Achouak et sa belle-famille.

Et tous mes amies qui j'appelle ma famille choisie sans exception et a tous ceux qui sont chers à mon cœur Spécialement ;

Asma, Bouthaina, dallel, kawter, khadija, Meriem, Rayan, Sara, Serine, et zahra.

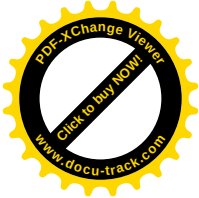
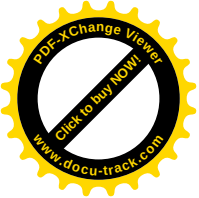
À mon chers famille BEKKOUCHE et KASDIE.

A tous mes collègues spécialement ABISMAIL.Y, BEREZIG.H, BAHLOUL.A, HAZLOUN.Y, OUAMRI.F, SADJIS, SAIDANI.F, TINGUALI.H, ZERROUK.O .

À mes collègues en Palestine, empêchés par la guerre de se tenir à ma place.



Aicha



Dédicace

Ce mémoire, c'est un peu comme un grand merci à tous ceux qui m'ont porté jusqu'ici.

*À mes parents, mes super-héros du quotidien, qui ont toujours cru en moi même quand je doutais. À toute la tribu **Ghemati** et **Djemaa**, ma grande famille toujours présente dans les bons comme dans les moments plus difficiles.*

*À ma mémé adorée, ma petite étoile protectrice. À **Roumaïssa**, ma sœur complice, et à mes frères **Mohamed**, **Mouatez** et **Mouatassef**, mes partenaires de rigolade et de soutien inconditionnel.*

*Un énorme merci à mes potes **Manel**, **Manel** et **Aïcha** - vous savez combien vos blagues et vos encouragements m'ont aidé à tenir le coup.*

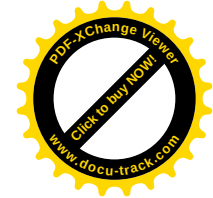
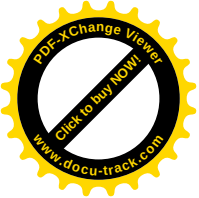
*À **Aïcha**, mon binôme préféré et mon pote de galère - sans toi, ce mémoire n'aurait jamais vu le jour !*

*Merci au **Pr Belaid**, à **Mme Aïssani** pour leur guidance, et à **M. Djidjik** pour son accueil au service d'immunologie.*

Ce mémoire, c'est un peu le vôtre à tous. Merci d'avoir été là, simplement.



Achouak



Résumer

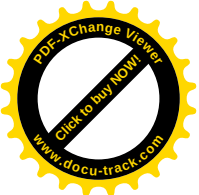
Le syndrome de Comèl-Netherton (SCN) est une génodermatose autosomique récessive rare parfois sévère. Il est caractérisé par une triade clinique typique : une ichtyose, des anomalies capillaires et une atopie, souvent accompagnée d'une dysrégulation immunitaire. En raison de la grande variabilité du tableau cliniques et des mutations impliquées dans le gène **SPINK5**, à l'origine de la maladie, une caractérisation approfondie est nécessaire pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à cette hétérogénéité.

Nous avons réalisé une étude descriptive et analytique sur sept patients algériens atteints de SCN, suivis au CHU Issaad Hassani (Beni Messous) entre mars et juin 2025. L'objectif principal était de décrire leurs profils cliniques, immunologiques et génétiques, et d'identifier d'éventuelles corrélations génotype-phénotype. Les données ont été collectées à partir d'examen clinique, de dosages des IgE, d'un immunophénotypage lymphocytaire, ainsi que du séquençage du gène **SPINK5** par NGS.

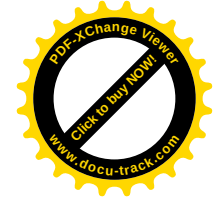
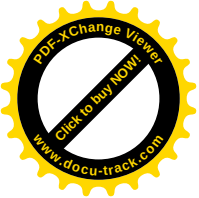
La cohorte étudiée présentait une forte consanguinité (85,7 %). Tous les patients présentaient une ichtyose et une atopie. La trichorrhéxis invaginata était fréquemment observée (85%), tandis que 57 % des patients souffraient d'infections récurrentes. Une augmentation marquée des IgE et une diminution des lymphocytes T auxiliaires ont été observés. L'analyse génétique a mis en évidence différentes mutations dans le gène **SPINK5**, incluant des mutations tronquantes et des anomalies d'épissage. Les mutations tronquantes situées dans la région N-terminale étaient associées à des formes cliniques sévères, tandis que des mutations en région C-terminale semblaient liées à des phénotypes atypiques, comme l'absence de trichorrhéxis invaginata.

Ces résultats appuient l'importante hétérogénéité du SCN. Ils mettent l'accent sur l'intérêt d'une caractérisation moléculaire pour affiner le diagnostic, anticiper la sévérité des manifestations et orienter la prise en charge thérapeutique, en particulier dans les populations à forte endogamie.

Les mots clés : SCN, Génodermatose, Peau / Barrière cutanée, Maladies génétiques congénitales, Gène **SPINK5**, Protéine **LEKTI**, Dysrégulation immunitaire, Hypersensibilité allergique, Infections, Hétérogénéité phénotypique, Mutations (spécifiquement mutations



tronquantes, variants d'épissage), Trichorrhexis invaginata, Corrélations génotype-phénotype, Cohorte de patients algériens, Profils cliniques, Profils immunologiques, Séquençage.



Abstract

Comel-Netherton syndrome (CNS) is a rare, sometimes severe, autosomal recessive Genodermatosis. It is characterized by a typical clinical triad: ichthyosis, hair abnormalities, and atopy, often accompanied by immune dysregulation. Due to the high variability of the clinical presentation and the mutations involved in the *SPINK5* gene, which cause the disease, a thorough characterization is necessary to better understand the mechanisms underlying this heterogeneity.

We conducted a descriptive and analytical study on seven Algerian patients with CNS, followed at the Issaad Hassani University Hospital (Beni Messous) between March and June 2025. The primary objective was to describe their clinical, immunological, and genetic profiles and to identify potential genotype-phenotype correlations. Data were collected from clinical examinations, IgE assays, lymphocyte immunophenotyping, and *SPINK5* gene sequencing by NGS.

The study cohort exhibited high consanguinity (85.7%). All patients presented with ichthyosis and atopy. Trichorrhexie invaginata was frequently observed (85%), while 57% of patients suffered from recurrent infections. A marked increase in IgE and a decrease in helper T cells were observed. Genetic analysis revealed various mutations in the *SPINK5* gene, including truncating mutations and splicing abnormalities. Truncating mutations located in the N-terminal region were associated with severe clinical forms, while mutations in the C-terminal region appeared to be linked to atypical phenotypes, such as the absence of trichorrhexie invaginata.

These results support the significant heterogeneity of SCN. They emphasize the value of molecular characterization to refine the diagnosis, anticipate the severity of manifestations and guide therapeutic management, particularly in populations with high endogamy.

Keywords: SCN, Genodermatosis, Skin / Skin barrier, Congenital genetic diseases, *SPINK5* gene, *LEKTI* protein, Immune dysregulation, Allergic hypersensitivity, Infections, Phenotypic heterogeneity, Mutations (specifically truncating mutations, splice variants), Trichorrhexis invaginata, Genotype-phenotype correlations, Cohort of Algerian patients, Clinical profiles, Immunological profiles, Sequencing.

الملخص

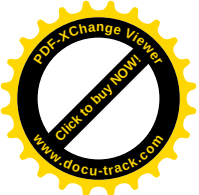
متلازمة كوميل-نيثرتون (CNS) هي مرض جلدي وراثي نادر، شديد أحياناً، وراثي جسمي متنحي. يتميز بثلاثية سريرية نموذجية: السماك، وتشوهات الشعر، والحساسية، وغالباً ما يصاحبها خلل في الجهاز المناعي. ونظراً للتباين الكبير في الأعراض السريرية والطفرات التي ينطوي عليها جين SPINK5، المُسبب للمرض، فإن التوصيف الدقيق ضروري لفهم الآليات الكامنة وراء هذا التباين بشكل أفضل.

أجرينا دراسة وصفية وتحليلية على سبعة مرضى جزائريين مصابين بالجهاز العصبي المركزي، خضعوا للمتابعة في مستشفى إسعاد الحسنى الجامعي (بني مسوس) بين مارس ويونيو 2025. وكان الهدف الرئيسي وصف سماتهم السريرية والمناعية والوراثية، وتحديد الارتباطات المحتملة بين النمط الجيني والنمط الظاهري. جُمعت البيانات من الفحوصات السريرية، وفحوصات IgE، والتنميط المناعي للخلايا الليمفاوية، وتسلسل جين SPINK5 بتقنية الجيل التالي من الجينوم (NGS).

أظهرت مجموعة الدراسة ارتفاعاً في نسب قرابة الدم (85.7%). وظهرت على جميع المرضى أعراض لداء السماك والحساسية. ولوحظت حالات متكررة من داء الشعريات الغشائية (Trichorrhexis invaginata)، بينما عانى 57% من المرضى من عدوى متكررة. ولوحظت زيادة ملحوظة في مستويات IgE وانخفاض في الخلايا التائية المساعدة. كشف التحليل الجيني عن طفرات مختلفة في جين SPINK5، بما في ذلك طفرات مُبتورة وتشوهات في الوصل. ارتبطت الطفرات المُبتورة الموجودة في المنطقة الطرفية الأمينية (N-terminal) بأشكال سريرية شديدة، بينما بدت الطفرات في المنطقة الطرفية الكربوكسيلية (C-terminal) مرتبطة بأنماط ظاهرية غير نمطية، مثل غياب داء الشعريات الغشائية (Trichorrhexie invaginata).

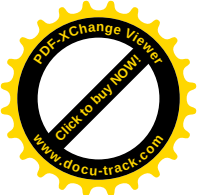
تدعم هذه النتائج التباين الكبير في SCN وتؤكد على أهمية التوصيف الجزيئي لتحسين التشخيص، وتوقع شدة الأعراض، وتوجيه التدبير العلاجي، لا سيما في المجموعات السكانية ذات التزاوج الداخلي المرتفع.

الكلمات المفتاحية: SCN، داء الجلد الوراثي، الجلد/حاجز الجلد، الأمراض الوراثية الخلقية، جين SPINK5، بروتين LEKTI، خلل التنظيم المناعي، فرط الحساسية التحسسية، العدوى، التباين الظاهري، الطفرات (على وجه التحديد الطفرات المبتورة، متغيرات الوصل)، Trichorrhexis invaginata، الارتباطات بين النمط الجيني والنمط الظاهري، مجموعة المرضى الجزائريين، الملفات السريرية، الملفات المناعية، التسلسل الجيني.



Liste des Abréviations

Abréviation	Signification
ACMG	American College of Medical Genetics and Genomics
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
AMP	Antimicrobial Peptides (Peptides antimicrobiens)
APC	Allophycocyanine
CGH-	Comparative Genomic Hybridization array
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FSC	Forward Scatter (taille cellulaire)
IgIV	Immunoglobulines intraveineuses
IUIS	l'Union Internationale des Sociétés
kU/L	Kilounités par litre
LEKTI	Lympho-Epithelial Kazal-Type Inhibitor
LL-37	Cathelicidine humaine
LOF	Loss of Function (perte de fonction)
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
NGS	Next Generation Sequencing
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PE	Phycoerythrine
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PVS1	Critère de pathogénicité (variant tronquant)
RPM	Tours par minute (centrifugation)
SCN	Syndrome de Comèl-Netherton
SOP	Standard Operating Procedure
SPINK5	Serine Protease Inhibitor Kazal-type 5
SSC	Side Scatter (granularité cellulaire)
TBNK	Panel immunophénotypique : T, B, NK
Th1 / Th2	Types de réponses immunitaires T Helpers 1 et 2
TNF alpha	Tumor Necrosis Factor alpha
TSLP	Thymic Stromel Lymphmo Protine
UI/ml	Unité Internationale par milliliter
V450	Violet 450, équivalent à Pacific Blue™
WES	Whole Exome Sequencing



Sommaire

Remerciements

Dédicaces

Résumé

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

1. Généralité sur le syndrome Comel Netherton..... 2

1.1. Manifestation cliniques..... 2

1.2 Physiopathologie du Syndrome de Comel-Netherton 3

2. Génétique du SCN..... 5

2.1. Localisation et structure du gène *SPINK5*..... 5

2.2. Types de mutations 6

2.3. Corrélation génotype-phénotype 6

2.4. Modes de transmission 7

2.5. Conseil génétique 7

3 Diagnostic et prise en charge 7

3.1 Diagnostic du SCN 7

3.2 Prise en charge..... 8

Matériels et méthodes

1. Contexte de l'étude..... 9

1.1. Les Patients..... 9

1.2. Matériel biologique..... 9

2 Méthodes 10

2.1. Immunophénotypage par Cytometrie en Flux..... 10

Principe 10

Mode d'opérateur..... 10

2.2. Dosage des immunoglobulines G, A et M par néphélométrie..... 12

Principe analytique..... 12

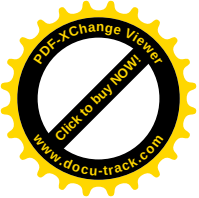
Mode d'opérateur..... 12

2.3. Dosage des IgE par chimiluminescence (CLIA) 14

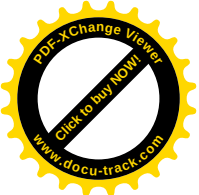
Principe 14

Mode opératoire 14

2.4.Étude Génétique du Syndrome de Comel-Netherton 15

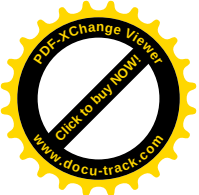


2.4.1. Extraction de l'ADN	16
Étapes:.....	16
2.4.2. Séquençage à Haut Débit (NGS)	17
4.2.3. Analyse Bioinformatique	20
2.4.3. Séquençage Sanger pour la Confirmation des Résultats	21
Étapes:.....	21
Resultats	
patient 1	23
Patient 2.....	25
Patient 3.....	27
Patient 4.....	29
Patient 5.....	30
Patient 6.....	32
Patient 7.....	33
discussion	
1. Caractéristiques Cliniques : Un Tableau Polymorphe et Souvent Sévère	40
2. Profil Immunologique : Dysrégulation Atopique et Variabilité des	
Atteintes Cellulaires	42
3. Profil Génétique : Des Mutations SPINK5 Variées et une Corrélation	
Génotype-Phénotype Éclairante	43
4. Spécificités de la Cohorte Algérienne et Implications	45
Conclusion.....	48
Les references bibliographiques	
Les annexes	



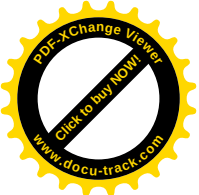
Liste des figures

Figure 1 Caractéristiques cliniques du syndrome de Comel et Netherton	3
Figure 2: Cascade physiopathologique du SCN: impact de la déficience en LEKTI sur la barrière cutanée et l'inflammation	4
Figure 3: Physiopathologie du SCN.....	5
Figure 4: Carte cytogénétique du chromosome 5 indiquant la localisation du gène SPINK5 au locus 5q32, impliqué dans le SCN.	6
Figure 5 : Mutations du gène SPINK5	6
Figure 6: principe de dosage par CLIA	14
Figure 7: les étapes de l'extraction manuelle de l'ADN génomique.	17
Figure 8: La mutation identifiée chez le 1er patient.	25
Figure 9: la mutation identifiée chez le patient n°2.....	27
Figure 10: la mutation identifiée chez les 2 patients n°3 et °4.	29
Figure 11: la mutation identifiée chez le patient n°6.....	33
Figure 12: La mutation identifiée chez le patient n°7.	35

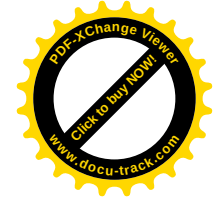
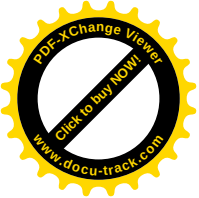


Liste des tableaux

Tableau I Manifestations cutanées et manifestations extra-cutanées du SCN.....	3
Tableau II : Les kits des Panels de Cytométrie en flux pour l'étude du SCN avec leurs dosages.	11
Tableau III : normes des immunoglobulines G, A et M selon l'âge.	13
Tableau IV : normes IgE immulite 2000XPi.....	15
Tableau V : Synthèse Démographique des Patients avec SCN.	23
Tableau VI : les manifestations cliniques des patients.	35
Tableau VII : les informations d'hémogramme des 7 patients.....	36
Tableau VIII : résultats des dosages des immunoglobulines des 7 patients.....	37
Tableau IX : les résultats de la cytométrie en flux des 7 patients.....	38
Tableau X : les variants de gène SPINK5 identifiés chez les patients.	38
Tableau XI : Spectre des variants du gène SPINK5 dans une cohorte de patients atteints du SCN : comparaison avec les données de la littérature et analyse des nouveaux variants.	45
Tableau XII : Corrélation génotype-phénotype dans le SCN : analyse des variants de SPINK5 et leurs implications cliniques.	47



Introduction

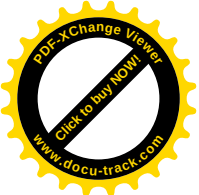


Introduction

La peau joue un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité de notre organisme. Cependant, certaines maladies génétiques congénitales peuvent affaiblir gravement cette barrière protectrice. Parmi elles, le syndrome de Comèl-Netherton (SCN) constitue une génodermatose rare et sévère, se manifestant par un tableau clinique complexe et invalidant. Ce syndrome associe une atteinte cutanée majeure, des anomalies capillaires ainsi qu'une dysrégulation immunitaire profonde à l'origine d'une hypersensibilité allergique et d'une susceptibilité aux infections. **(Dupont et al., 2018).**

L'origine génétique de cette maladie est liée à des mutations du gène ***SPINK5***, codant pour la protéine LEKTI, essentielle à la régulation des mécanismes épidermiques. Son dysfonctionnement entraîne une dégradation incontrôlée des composants de la barrière cutanée **(Martin et Dubois, 2019)**. La maladie présente, toutefois, une hétérogénéité phénotypique marquée, rendant particulièrement difficiles, son diagnostic, la prédiction de sa sévérité et l'adaptation de la prise en charge **(Lefevre, 2020)**. Cette hétérogénéité suggère un lien entre le type et la localisation des mutations dans le gène ***SPINK5*** et les manifestations cliniques et immunologiques observées. Ainsi, des mutations tronquantes ou affectant des domaines fonctionnels de la protéine LEKTI seraient associées à des formes sévères de la maladie, tandis que des variants d'épissage ou affectant des régions moins cruciales pourraient induire des formes atténuées ou atypiques, telles que l'absence de *trichorrhexis invaginata* **(Bernard et al., 2021)**.

Dans le cadre de l'obtention d'un diplôme de Master en Génétique, notre projet de fin d'études vise à analyser le SCN à travers une cohorte de patients algériens, la caractérisation des ces patients a reposé sur une approche multidisciplinaire incluant des examens cliniques approfondis. Sur le plan biologique, des dosages des IgE sériques ont été effectués, complétés par un immunophénotypage lymphocytaire pour évaluer la dysrégulation immunitaire. Enfin, l'analyse génétique a été réalisée par séquençage de NGS du gène ***SPINK5***, permettant d'identifier les mutations impliquées et d'établir des corrélations génotype-phénotype et une confirmation avec séquençage de Sange. Les objectifs de ce travail sont de : caractériser les profils cliniques et immunologiques des patients, identifier et analyser les mutations du gène ***SPINK5*** par séquençage, et établir des corrélations génotype-phénotype permettant de mieux comprendre l'impact des variants génétiques sur la sévérité et la diversité des présentations de la maladie.



Rappel bibliographique

1. Généralité sur le syndrome Comel Netherton

Le syndrome de Comel-Netherton (SCN) est une maladie génétique autosomique récessive rare, se manifestant par trois caractéristiques cliniques : érythrodermie généralisée dès la naissance, anomalies du cheveu, dont la trichorrhexis invaginata dite « cheveux de bambou » (**Blanchard et Prose, 2020**), et diathèse atopique (**Stuvel et al., 2020**). À la naissance, on retrouve souvent une érythrodermie ichtyosiforme congénitale, avec une desquamation continue (**Bingol et al., 2011**).

Décrit pour la première fois par Mauro Comel en 1949, il a été ensuite mieux caractérisé par Earl W. Netherton en 1958. Le SCN est causé par des mutations du gène *SPINK5*, entraînant un défaut d'expression de la protéine LEKTI (Lympho-Epithelial Kazal-type-related Inhibitor), impliquée dans la régulation des protéases cutanées (**Renner et al., 2009**).

Les patients présentent souvent des infections récurrentes, suggérant une dysfonction immunitaire. En effet, des anomalies de l'immunité innée et adaptative, incluant une diminution des lymphocytes B mémoires, des réponses vaccinales altérées, et une baisse de la cytotoxicité des cellules T et NK ont été mises en évidence (**Renner et al., 2009 ; Stuvel et al., 2020**). De plus, dans certains cas, un traitement par immunoglobulines intraveineuses (IVIg) a montré une certaine efficacité.

Sur le plan épidémiologique, le SCN touche autant les filles que les garçons, sans prédisposition ethnique ou géographique connue (**Chavanas et al., 2000**). Son incidence est estimée à 1 cas pour 200 000 naissances (**Bingol et al., 2011**), et sa prévalence mondiale varie entre 1 et 9 cas par million de personnes. Aux États-Unis, selon des rapports sectoriels (**DelveInsight, 2022**) environ 1700 cas diagnostiqués ont été recensés en 2022. Les données restent extrêmement limitées, en Afrique et en Algérie, à cause d'un manque de sensibilisation médicale, de difficultés d'accès au diagnostic et à la prise en charge, ainsi que des retards dans les consultations spécialisées. La consanguinité, fréquente dans certaines régions, pourrait être un facteur aggravant.

1.1. Manifestation cliniques

Les manifestations du SCN sont classées en deux catégories : cutanées et extra-cutanées (**Tableau I**). Les patients présentent souvent une peau sèche, squameuse et sujette à des infections cutanées récurrentes. Des érythèmes et des lésions cutanées sont également fréquents (**Figure 1**) (**Smith et Barker 2006**). Les différents types de manifestations sont détaillés dans l'annexe 1.



Figure 1 Caractéristiques cliniques du syndrome de Cornelia et Netherton (Petrova et Hovnanian, 2020)

Tableau I Manifestations cutanées et manifestations extra-cutanées du SCN

Manifestations cutanées	Manifestations extra-cutanées
Ichtyose linéaire circonflexe.	Anomalies des cheveux (trichorrhexis invaginata).
Érythrodermie congénitale.	Asthme et rhinite allergique.
Infections cutanées récurrentes.	Retard de croissance.
Eczéma atopique.	Complications oculaires (kérato-conjonctivite et blépharite).
	Allergies alimentaires.

1.2 Physiopathologie du Syndrome de Cornelia-Netherton

La protéine LEKTI, retrouvée tronquée dans la SCN à cause de mutations du gène *SPINK5*, est essentielle à l'intégrité de la barrière épidermique, car elle régule l'activité de plusieurs sérine-protéases, notamment les kallikréines 5 et 7 (KLK5, KLK7), impliquées dans la desquamation (Descargues et al., 2005 ; Chavanas et al., 2000). En l'absence ou en cas de dysfonctionnement de LEKTI, ces enzymes deviennent hyperactives, conduisant à une dégradation excessive de protéines telles que la cornéodesmosine et les desmoglénines, des protéines de cohésion cellulaire. Ceci entraîne une désorganisation des jonctions interkératinocytaires et entraîne une fragilisation de la couche cornée et une perméabilité accrue de la barrière cutanée, favorisant la perte d'eau transépidermique, l'ichtyose linéaire circonflexe, les infections récurrentes, ainsi que les

anomalies capillaires caractéristiques comme la trichorrhéxis invaginata (**Bitoun et al., 2002 ; Chavanas et al., 2000**).

Parallèlement, l'hyperactivité de KLK5 active le récepteur PAR-2 (Protease-Activated Receptor 2), présent sur les kératinocytes, ce qui déclenche une cascade inflammatoire, et la production de cytokines pro-inflammatoires (l'IL-1, l'IL-6, le TNF- α , et la TSLP (Thymic Stromal Lymphopoietin) (**Briot et al., 2009**). La TSLP soutient une réponse immunitaire de type Th2, conduisant à une surproduction d'IgE, à une atopie sévère et à une prédisposition aux allergies (**Yamaga et al., 2008**). De plus, l'activation chronique du système immunitaire altère l'équilibre entre les sous-populations lymphocytaires : on observe souvent une prédominance des lymphocytes T CD4⁺ Th2, une baisse des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques et une diminution de l'activité des cellules NK (**Renner et al., 2009 ; Hovnanian, 2013**). Ces déséquilibres affaiblissent la réponse antivirale et antibactérienne, et augmentent la susceptibilité aux infections cutanées, pulmonaires et digestives (**Tableau I en annexe 1**).

Le déficit en LEKTI perturbe aussi la production ou la stabilité des peptides antimicrobiens naturels, tels que les cathélicidines et les β -défensines, ce qui aggrave la vulnérabilité du patient aux agents pathogènes, tels que *Staphylococcus aureus* (**Braff et al., 2005 ; Hovnanian, 2013**). Ainsi, le SCN est le résultat d'un enchaînement pathologique intégrant une rupture de la barrière épidermique, une activation inflammatoire persistante et un déséquilibre immunitaire profond, qui se renforcent mutuellement dans un cercle vicieux (**Figures 2 et 3**).

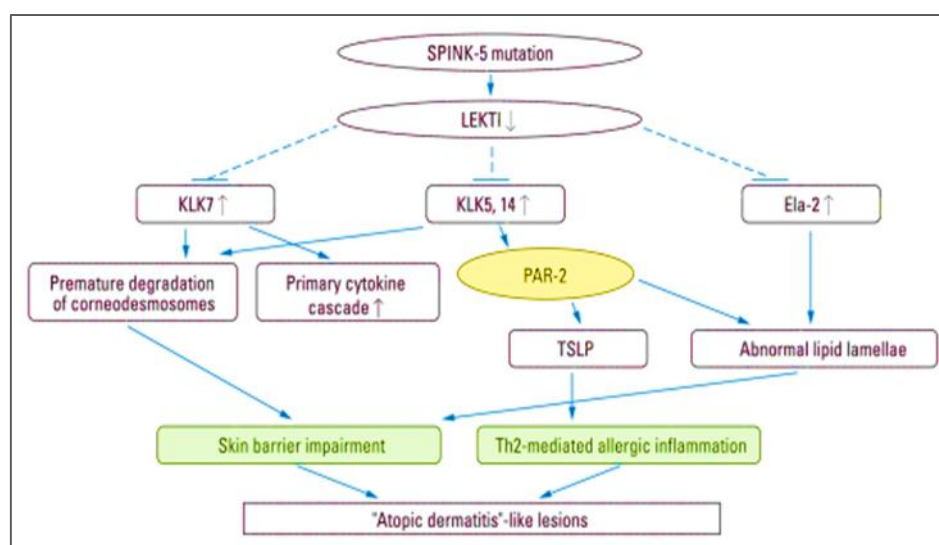


Figure 2: Cascade physiopathologique du SCN: impact de la déficience en LEKTI sur la barrière cutanée et l'inflammation (**Sang Eun Lee et al., 2010**)

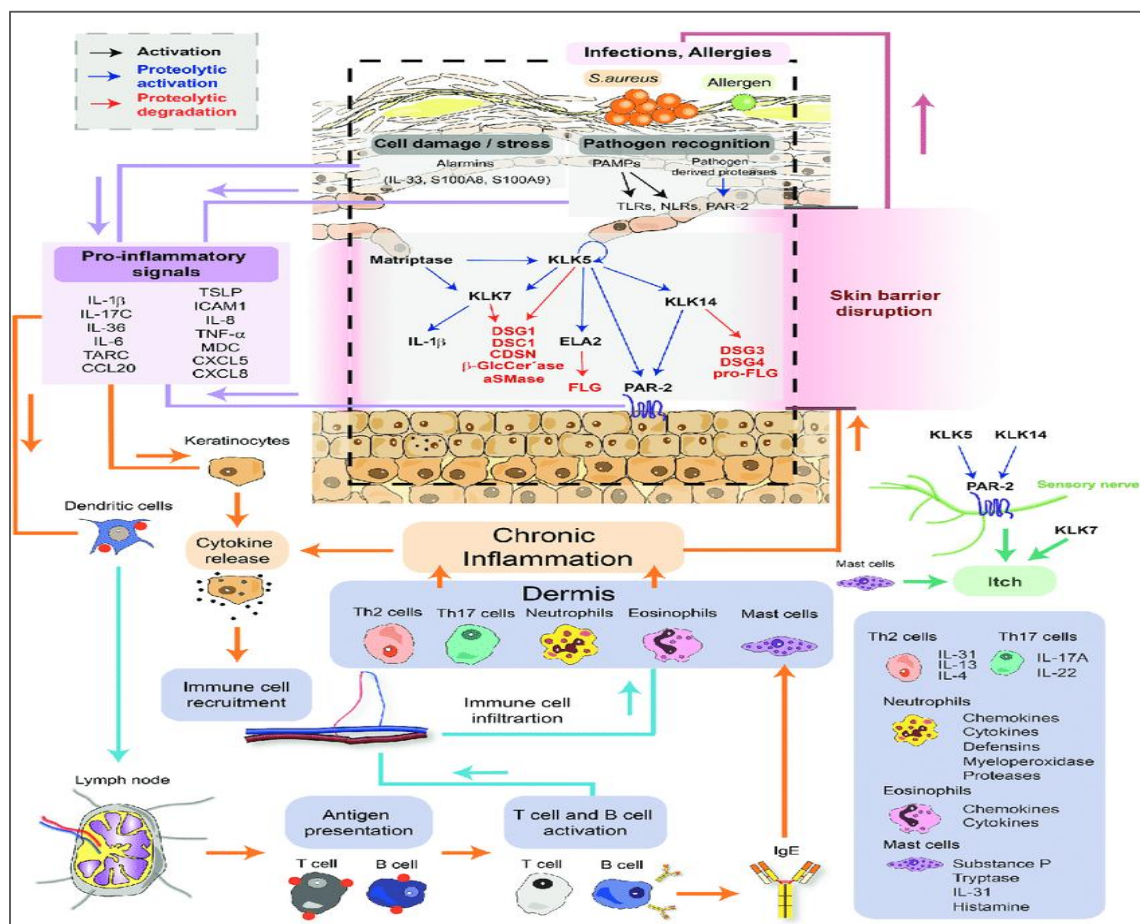


Figure 3: Physiopathologie du SCN (Smith et Barker, 2006)

2. Génétique du SCN

En 2000, l'équipe de Chavanas a réalisé une avancée majeure en identifiant les mutations responsables du syndrome SCN, établissant ainsi un lien moléculaire entre les anomalies du gène *SPINK5*, la protéine LEKTI et la maladie (Chavanas et al., 2000).

2.1. Localisation et structure du gène *SPINK5*

Le gène *SPINK5* est situé sur le bras long du chromosome 5 (5q32), dans une région d'environ 63 kb (Figure 4). Il est composé de 33 exons et permet la production de la protéine LEKTI, de 1 462 acides aminés, qui contient 15 domaines inhibiteurs de type « Kazal », présentant une spécificité d'inhibition des protéases épidermiques. La diversité des mutations dans *SPINK5* entraîne des variations phénotypiques en fonction de la localisation des mutations (Magert et al., 1999).

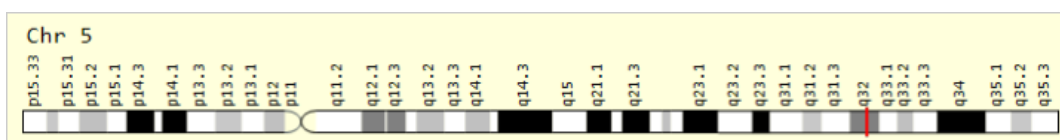


Figure 4: Carte cytogénétique du chromosome 5 indiquant la localisation du gène SPINK5 au locus 5q32, impliqué dans le SCN. (Descargues et al., 2005)

2.2. Types de mutations

Plus de 150 mutations pathogènes du gène *SPINK5* ont été répertoriées dans la base HGMD, incluant des mutations non-sens (Exemple : p.Arg317*), des mutations faux-sens (Exemple : p.Glu420Lys), des insertions/délétions (Exemple : c.153delT), ainsi que des mutations d'épissage (Exemple : c.1431-12G>A). Ces mutations entraînent une troncation ou une perte partielle de la fonction inhibitrice de LEKTI (**Figure 5 et tableau II en annexe 1**) (Bitoun et al., 2003).

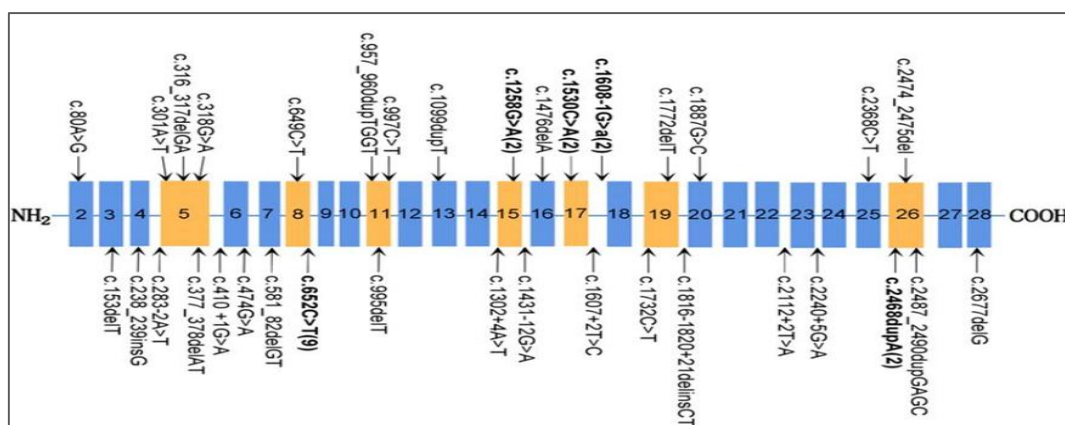


Figure 5 : Mutations du gène SPINK5 (Yu Wang et al., 2020)

2.3. Corrélation génotype-phénotype

Les études ont démontré que la nature des mutations influe sur l'expression clinique du SCN. Ainsi nous pouvons distinguer:

➤ Mutations nulles (non-sens, grands réarrangements):

Elles sont associées à des formes graves, incluant une ichtyose congénitale, un retard de croissance, et des infections cutanées récurrentes dès la naissance.

➤ Mutations faux-sens hypomorphiques:

Elles conduisent à des formes plus modérées, dominées par un eczéma chronique et des manifestations atopiques, avec une activité résiduelle de LEKTI.

➤ **Mutations affectant des domaines spécifiques :**

Certaines mutations touchent des domaines spécifiques comme D6-D9, responsables de l'inhibition de KLK5, et sont liées à une inflammation cutanée marquée (**Sprecher et al., 2004**).

2.4. Modes de transmission

Le syndrome de Comèl-Netherton suit un mode de transmission autosomique récessif (**Bitoun et al., 2002**), la maladie se manifeste, donc, lorsque les deux allèles du gène *SPINK5* sont mutés et hérités de chaque parent. Les parents d'un enfant malade ne sont généralement pas affectés, mais sont porteurs hétérozygotes du gène muté. Les génotypes possibles sont :

AA: Homozygote normal (sans maladie).

AS: Hétérozygote asymptomatique (porteur).

SS: Homozygote malade (atteint du SCN).

Avec **A:** Allèle sauvage; **S:** Allèle muté.

Le risque qu'un enfant soit atteint par le syndrome est de 25 % si les deux parents sont porteurs hétérozygotes.

2.5. Conseil génétique

Le conseil génétique est crucial pour les familles touchées par le SCN. Il permet de mieux comprendre le mode de transmission autosomique récessif et d'évaluer le risque de récurrence (25 % par grossesse lorsque les deux parents sont porteurs). De plus, des options de diagnostic prénatal ou préimplantatoire peuvent être proposées si la mutation est identifiée. Le dépistage des porteurs dans la famille élargie est également conseillé. Une approche pluridisciplinaire, comprenant des spécialistes en génétique, dermatologie et soutien psychologique, est essentielle pour une prise en charge optimale des familles (**Bitoun et al., 2002 ; Chavanas et al., 2000**).

3 Diagnostic et prise en charge

3.1 Diagnostic du SCN

Le diagnostic du syndrome de Comèl-Netherton repose sur la triade clinique, immunologique et génétique. Le diagnostic génétique repose principalement sur le séquençage du gène *SPINK5* par séquençage à haut débit (NGS), qui permet d'identifier les mutations pathogènes telles que les mutations non-sens, les décalages de cadre de lecture (frameshift), et les mutations affectant l'épissage (**Chavanas et al., 2000 ; Bitoun et al., 2002**). Des tests complémentaires,

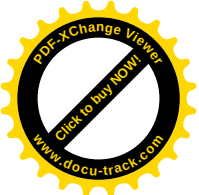
comme le MLPA ou la CGH-array, peuvent être utilisés pour identifier des délétions ou duplications d'exons (**Sprecher et al., 2001**). Des analyses fonctionnelles, telles que le Western blot, permettent de détecter l'expression de LEKTI dans les tissus cutanés, confirmant ainsi l'impact des mutations au niveau protéique (**Komatsu et al., 2002**). Le diagnostic clinique, immunologique et génétique du SCN est résumé dans le **tableau III** en annexe 1.

3.2 Prise en charge

La prise en charge du SCN repose sur une approche multidisciplinaire, centrée sur le contrôle des manifestations cutanées, atopiques et infectieuses. Sur le plan dermatologique, les soins consistent en l'application régulière d'émollients riches (vaseline, urée, acide lactique) pour restaurer la barrière cutanée, associés à des dermocorticoïdes ou des inhibiteurs de la calcineurine (tacrolimus, pimécrolimus) pour limiter l'inflammation, tout en tenant compte de la perméabilité accrue de la peau (**Sarri et al., 2017**). En cas d'hyperkératose, des kératolytiques doux peuvent être proposés avec précaution. La prévention et le traitement des infections cutanées incluent l'utilisation d'antibiotiques topiques ou systémiques selon les cas (**Bitoun et al., 2003**).

Les patients présentent fréquemment des taux très élevés d'IgE, des allergies multiples et parfois une susceptibilité accrue aux infections, ce qui nécessite un bilan immunitaire complet incluant les dosages des immunoglobulines (IgG, IgA, IgM) et un immunophénotypage lymphocytaire (TBNK) (**Chavanas et al., 2000 ; Sarri et al., 2017**). En cas de déficit immunitaire associé, l'administration d'immunoglobulines intraveineuses (IgIV) peut être envisagée (**Bitoun et al., 2003**).

En complément, des thérapies ciblées récemment utilisées ont montré un bénéfice clinique notable. L'omalizumab, un anticorps monoclonal anti-IgE, s'est révélé efficace chez certains patients présentant une dermatite atopique sévère associée à une hyper-IgE, avec amélioration des lésions cutanées et réduction des infections (**Maillard et al., 2017**). De même, le dupilumab, inhibiteur du récepteur de l'IL-4 (IL-4R α) bloquant les voies Th2 (IL-4 et IL-13), a démontré une efficacité remarquable dans plusieurs cas publiés, notamment sur l'eczéma, le prurit et la qualité de vie (**Saeki et al., 2020**). Bien que ces traitements soient encore hors AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) car SCN rare donc il n'y a pas des essais cliniques larges. Pour cette indication, ils représentent une option thérapeutique prometteuse dans les formes sévères et réfractaires du syndrome.



Matériels et méthodes

1. Contexte de l'étude

Ce travail s'est déroulé au sein l'unité des erreurs innées de l'immunité et des hémopathies malignes, au Service d'Immunologie Médicale du CHU ISSAD Hassani de Beni Messous, pendant la période de mars à juin 2025.

Il s'agit d'une étude rétrospective descriptive menée selon une méthodologie analytique standardisée (rigoureuse et identique pour chaque patient), pour garantir des conclusions solides. Nous avons analysé les dossiers médicaux des patients atteints du syndrome de Comel-Netherton, diagnostiqués selon les critères de l'Union Internationale des Sociétés d'Immunologie (IUIS).

Matériel

1.1. Les Patients

Cette étude rétrospective descriptive a inclus 7 patients (6 filles et 1 garçon) atteints de syndrome de Comel-Netherton, diagnostiqués et suivis au service d'Immunologie Médicale du CHU ISSAT Hassani. Tous les patients présentaient les critères complets de la maladie, incluant une ichtyose congénitale, des anomalies immunologiques caractéristiques et diverses manifestations systémiques. Les données cliniques et biologiques ont été recueillies à partir des dossiers médicaux et analysées de manière exhaustive, dans le respect des normes éthiques.

Des échantillons biologiques ainsi que des équipements spécialisés ont été utilisés pour réaliser notre travail.

1.2. Matériel biologique

Le sang total prélevé sur EDTA et le sérum ont été utilisés pour les analyses immunologiques et génétiques. Le tube est identifié et toutes les informations du patient sont consignées dans un formulaire présenté en **annexe 2**.

Des enzymes et molécules à activités biologiques ont également été utilisées, tels que ceux contenus dans les kits d'extraction d'ADN (QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen), la protéinase K pour la lyse cellulaire, la Taq polymérase pour l'amplification PCR, et les enzymes de réparation d'extrémités (NEBNext End Repair Mix).

pour le dosage des immunoglobulines (Tina-Quant®, Siemens) et des anticorps destinés à la cytométrie en flux (BD Multitest™ 6-Color TBNK) (**Tableau V en annexe 2**).

1.3. Matériels non biologiques

Les analyses ont été effectuées à l'aide d'équipements de pointe, notamment un cytomètre en flux (BD FACSLyric™), un automate de néphélométrie (Atellica NEPH 630, Siemens) et plateforme Illumina MiSeq pour le séquençage NGS et SeqStudio™ pour le séquençage Sanger. Nous avons également utilisé des centrifugeuses, un vortex ainsi que des congélateurs à -20°C et -80°C. L'ensemble des solutions, réactifs et appareillages utilisés lors de notre étude sont résumés en **annexe 2**.

2 Méthodes

2.1. Immunophénotypage par Cytométrie en Flux

Principe

Ils ont réalisé un immunophénotypage par cytométrie en flux sur des échantillons de sang total afin de caractériser les populations de cellules immunitaires LT, LB et NK. Le principe repose sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux conjugués à des fluorochromes spécifiques de différents marqueurs de surface cellulaire. L'acquisition des données a été effectuée sur un cytométrie de flux, permettant l'analyse individuelle de chaque cellule en suspension.

Mode d'opérateur

- Prélèvement du sang total sur tube EDTA. 30 µl de sang total sont déposés dans un tube à fond rond en polystyrène de 5ml pour correspondre à l'appareil.
- Il s'en suit l'étape de marquage par ajout des anticorps monoclonaux spécifiques aux marqueurs d'intérêt voire **(tableau II)**. Les anticorps utilisés sont couplés à des fluorochromes spécifiques (ex. FITC, PE, APC), permettant la détection simultanée de plusieurs marqueurs : CD3-FITC, CD4-PE, CD8-PerCP, CD19-APC, CD16/56-PE-Cy7, etc. **(Tableau II)**.

Tableau II : Les kits des Panels de Cytométrie en flux pour l'étude du SCN avec leurs dosages.

Panel	Marqueur	Fluorochrome	Volume
TBNK	CD3	FITC	3µL
	CD4	APC	2µL
	CD8	PE-Cy7	3µL
	CD16	PE	3µL
	CD19	PerCP-Cy5.5	4 µL
	CD45	PerCP-Cy5.5	4µL
	CD56	PE	3µL
Panel T	CD3	V500	3.5µL
	CD4	APC	2µL
	CD8	PerCP	4µL
	CD45RO	PE-Cy7	3µL
	CD45RA	FITC	3µL
	CD31	PE	3µL
	CD27	APCH7	2µL
	CD45RO	PE-CF594	3µL
	CD25	APC-H7	2µL
Panel B	CD27	PE-Cy7	3µL
	CD21	FITC	3µL
	CD20	V450	3.5µL
	CD38	PE	3 µL
	CD24	APC	2µL

- Agiter le mélange à l'aide d'un vortex pour homogénéiser, puis incuber à l'abri de la lumière pendant 15 min à température ambiante.
- La lyse des globules rouges est obtenue par ajout de 2 ml de SLR (Solution Lyse de globule Rouge). Agiter de nouveau à l'aide d'un vortex, puis incuber pendant 10 minutes à température ambiante.
- Centrifuger à 3 500 RPM /1 min, puis éliminer le surnageant.
- Ajouter 2 ml de solution de lavage PBS, vortexer, puis centrifuger à 3 500 RPM pendant 1 min. jete le tube sur une gaze (jeter la solution).
- Resuspendre le culot cellulaire dans 500 µl de solution de lavage, pour analyse par cytométrie en flux (BD FACS Lyric). La lecture asse fait via le logiciel FlowJo®.

- Les résultats sont visualisés sous forme de dot plots et histogrammes, où chaque fluorochrome émet un signal spécifique selon sa longueur d'onde.

La cytométrie en flux classe bien les cellules en fonction de leur taille (paramètre FSC = Forward Scatter, lié à la taille cellulaire) et de leur granularité (paramètre SSC = Side Scatter, reflétant la complexité interne). Ces deux paramètres physiques permettent une première discrimination des populations cellulaires **Figure 13 en annexe 2** :

- Petites cellules peu granulaires (ex : lymphocytes) → Faible FSC/SSC.
- Cellules granulaires (ex : neutrophiles) → SSC élevé.
- Grosses cellules (ex : monocytes) → FSC élevé.

2.2. Dosage des immunoglobulines G, A et M par néphélémétrie

Principe analytique

La néphélémétrie, technique mise en œuvre sur l'analyseur Atellica® NEPH 630 (Siemens Healthineers), repose sur le principe de diffusion lumineuse par les complexes immuns en solution. Cette méthode quantitative permet la détermination précise des concentrations sériques en immunoglobulines (IgG, IgA et IgM) par mesure de l'intensité lumineuse diffusée à 90° par un laser hélium-néon ($\lambda = 840 \text{ nm}$) après formation de complexes spécifiques antigène-anticorps. La lumière diffusée est proportionnelle à la concentration des immunoglobulines présentes dans l'échantillon biologique.

Mode d'opérateur

a. Préparation des échantillons biologiques

- Prélèvement sanguin par ponction veineuse sur tube sec (3-5 mL).
- Coagulation à température ambiante pendant 30 minutes.
- Centrifugation à 3000 g pendant 10 minutes à température contrôlée (20°C).
- Aliquotage du surnageant sérique et conservation à -20°C en cas d'analyse différée.

b. Paramétrage analytique

- Utilisation des réactifs N Latex (Siemens Healthineers) spécifiques, exemple : N Latex IgG (réf. OUHP20).
- Calibration préalable avec le standard protéique N Protein Standard SL (Siemens).

c. Procédure analytique automatisée

- Chargement des échantillons (volume minimal : 50 μ L)
- Dilution automatique selon les paramètres prédéfinis :
 - IgG: dilution systématique 1:20 (1 volume de sérum + 19 de diluent) pour éviter la saturation de signal.
 - IgA et IgM: dilution 1:4 pour optimiser la sensibilité et l'adaptation aux faibles concentrations.
- Incubation à 37°C pendant 6 minutes.
- Lecture néphélométrique à angle fixe (90°).

d. Assurance qualité

- Inclusion systématique de contrôles multiniveaux (Liquichek™ Immunoglobulin Control, Bio-Rad)
- Critères d'acceptabilité:
 - Coefficient de variation <5% pour IgG et IgA.
 - Coefficient de variation <8% pour IgM.
- **Vérification de la linéarité sur la gamme de mesure voir tableau.**

e. Interprétations des résultats

Les valeurs obtenues sont comparées aux intervalles de référence établis selon les tranches d'âge sont détaillées dans **le tableau**

- Population pédiatrique (1-10 ans) : IgG (5-12 g/L), IgA (0,2-2,5 g/L) avec IgM (0,5-2 g/L)

Tableau III: normes des immunoglobulines G, A et M selon l'âge.

Age \ g/L	IgG	IgA	IgM
<1 mois	8,30 – 12,31	0,01 – 0,05	0,25 – 0,59
1-3 mois	2 – 6	0,08 – 0,34	0,12 – 0,48
4-6 mois	3,2 – 5,2	0,1 – 0,46	0,20 – 0,66
7-12 mois	4,6 – 8,6	0,19 – 0,55	0,31 – 0,77
13-24 mois	5,6 – 9,6	0,26 – 0,74	0,35 – 0,81
25-36 mois	7,1 – 10,7	0,66 – 1,2	0,48 – 0,74
3-5 ans	7 – 11,6	0,79 – 1,69	0,40 – 0,90
6-8 ans	6,80 – 11,8	0,70 – 1,90	0,32 – 0,98
9-11 ans	6,9 – 11,5	0,68 – 1,94	0,39 – 0,79

12-16 ans	8,3 – 10,7	0,85 – 2,11	0,62 – 1,09
adultes	7 - 16	0,70 - 4	0,40 – 2,30

2.3.Dosage des IgE par chimiluminescence (CLIA)

Principe

Le dosage des IgE par chimiluminescence (CLIA) sur l'analyseur Siemens IMMULITE® 2000 XPI, repose sur le principe d'une réaction immunologique spécifique entre les IgE sériques et des anticorps anti-IgE marqués par un composé luminescent. Sous l'action d'un substrat, la lumière émise est quantifiée proportionnellement à la concentration en IgE (**Figure 6**). Cette méthode automatisée, précise et sensible, permet un diagnostic biologique du syndrome de Comel-Netherton, caractérisé par une hyper-IgE fréquente.

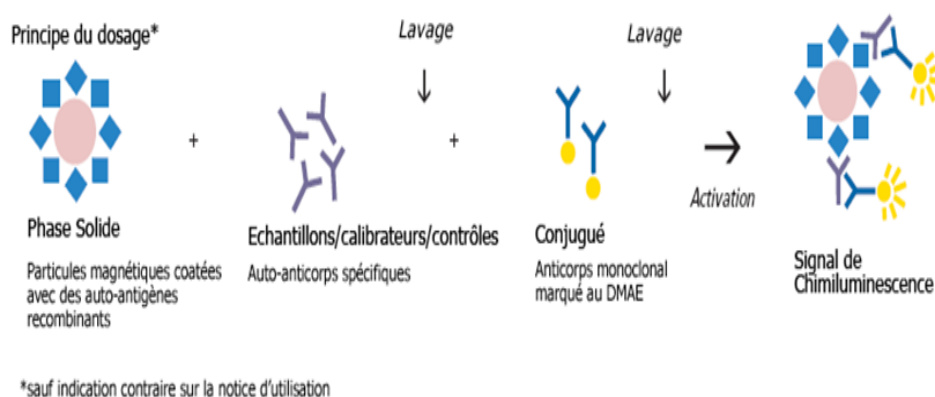
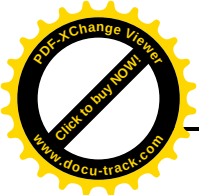


Figure 6: principe de dosage par CLIA

Mode opératoire

- Prélever 3 à 5 mL de sang veineux dans un tube sec ou SST (tube avec gel séparateur de sérum), en respectant les conditions d'asepsie et en homogénéisant le contenu par retournements doux.
- Laisser coaguler le sang pendant 30 minutes à température ambiante, puis prélever le caillot sanguin.
- Centrifuger à 2000-3000 g pendant 10 à 15 minutes afin d'obtenir un sérum clair, sans hémolyse ni lipémie.
- Répartir le sérum en aliquotes de 100 à 200 µL dans des microtubes. Conserver à 2-8 °C pour un stockage de courte durée (≤ 7 jours), ou à -20 °C pour un stockage prolongé, en évitant les cycles répétés de congélation-décongélation.



- Allumer l'analyseur IMMULITE 2000 xpi et vérifier les paramètres système (température, niveaux de réactifs, absence d'erreurs).
- Charger les échantillons dans le carrousel de l'analyseur (identification par code-barres). Utiliser un volume de 50 à 100 µL de sérum par analyse.
- Lancer la séquence analytique selon les instructions du **tableau 6 en annexe 2**.
- Convertir les signaux de luminescence en concentrations d'IgE totales (kU/L) à l'aide de la courbe de calibration (plage : 2 à 5000 kU/L).
- Effectuer une dilution si le résultat dépasse 5000 kU/L afin d'éviter une saturation du signal.
- **Comparer les reultats obtenus aux valeurs de reference : chez l'adulte ou l'enfant, les IgE 9sont generalement inferieures a 100Ku/L (valeurs variables selon l'age, voir tableau**

Tableau IV: normes IgE immulite 2000XPi

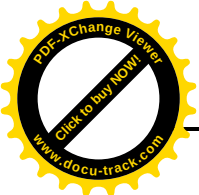
Age (ans)	Valeurs IgE (UI/ml)
0-1	29
1-2	49
2-3	45
3-9	52
Adulte	87

□ Interpréter les résultats en tenant compte du contexte clinique: Dans le cas du syndrome de Comel-Netherton, les taux d'IgE sont souvent très élevés, dépassant 1000 kU/L et pouvant atteindre plus de 10 000 kU/L.

□ Nettoyer l'analyseur selon la Procédure Opératoire Standardisée (SOP) après chaque utilisation.

2.4.Étude Génétique du Syndrome de Comel-Netherton

Dans le cadre de l'étude génétique du syndrome de Comel-Netherton, l'objectif principal est de détecter et d'identifier les variants génétiques au sein du gène *SPINK5*, connu pour être associé



à cette pathologie. Cette approche permet de caractériser précisément les anomalies génétiques responsables de la maladie.

2.4.1. Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN vise à isoler l'ADN génomique purifié des échantillons biologiques, en éliminant les contaminants cellulaires tels que les protéines et les lipides, afin de préparer l'ADN pour les applications de séquençage.

Étapes:

- **Préparation de l'échantillon :**
 - Un volume de 200 à 400 μL de sang prélevé avec EDTA est utilisé.
 - Il est dilué si nécessaire dans un tampon de lyse (Buffer ATL).
- **Lyse des cellules sanguines :**
 - De la protéinase K et du tampon de lyse ATL sont ajoutés au sang.
 - Elles sont incubées à 56°C pour détruire les membranes cellulaires et libérer l'ADN.
- **Purification de l'ADN :**
 - L'échantillon est mélangé avec de l'éthanol.
 - Il est transféré dans une colonne de purification.
 - L'ADN est fixé sur la silice après centrifugation.
- **Lavage de l'ADN :**
 - Deux lavages successifs sont effectués avec les tampons AW1 et AW2 pour éliminer les impuretés et les contaminants.
- **Élution de l'ADN purifié :**
 - L'ADN est incubé avec un tampon d'élution.
 - Il est récupéré par centrifugation.
- **Quantification et stockage :**
 - L'ADN est quantifié par spectrophotométrie ou fluorimétrie.
 - Il est stocké à -20°C ou -80°C pour une utilisation ultérieure.

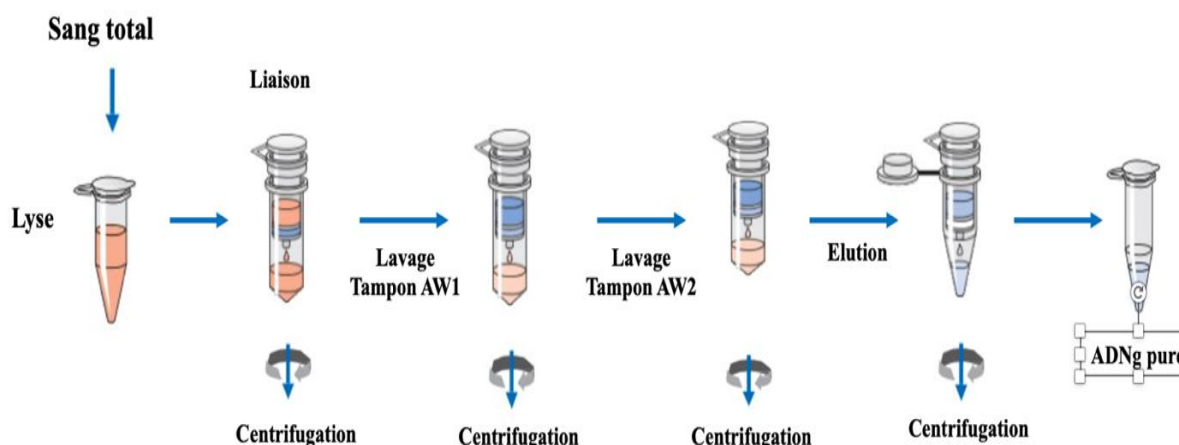


Figure 7: les étapes de l'extraction manuelle de l'ADN génomique.

2.4.2. Séquençage à Haut Débit (NGS)

Plus spécifiquement le Séquençage de l'Exome Entier (WES), est une technologie permettant d'analyser des millions de fragments d'ADN en parallèle pour une caractérisation génétique approfondie. Le protocole de Séquençage à Haut Débit (NGS) est détaillé dans l'annexe()

4.2.1. Préparation de la Librairie pour Séquençage de l'Exome Entier (WES)

Étapes :

- **Fragmentation aléatoire de l'ADN génomique par sonication :**
 - L'ADN génomique est fragmenté par sonication à l'aide d'un sonicateur Covaris LE220.
 - Les fragments obtenus sont de 150 à 400 pb, avec un pic moyen de 200 à 250 pb.
 - Les microtubes sont vortexés, puis centrifugés pour éliminer les bulles d'air.
 - Ils sont placés dans le sonicateur avec les paramètres : 600 secondes, duty 5%, intensité 2, cycle par rafale 50.
 - La qualité de l'ADN fragmenté est vérifiée avec un bioanalyseur Agilent 2100.
- **Purification de l'ADN fragmenté :**
 - Des billes AMPure XP sont utilisées pour purifier l'ADN fragmenté.
 - Après incubation de l'ADN avec les billes, le mélange est centrifugé.

- Il est placé sur un support magnétique pour séparer l'ADN lié aux billes.
- Elles sont lavées à l'éthanol à 70%.
- L'ADN est élué dans un tampon d'élution SPRI.
- **Réparation des extrémités de l'ADN fragmenté :**
 - Un mélange réactionnel de réparation d'extrémité (contenant le tampon et les enzymes NEBNext) est préparé pour créer des extrémités franches.
 - Elles sont incubées dans un thermocycleur.
- **Nettoyage de l'ADN réparé :**
 - L'ADN réparé est purifié avec des billes AMPure XP.
 - Elles sont lavées successivement à l'éthanol.
 - L'ADN est élué dans un tampon d'élution SPRI.
- **Ajout de désoxyadénine à l'extrémité 3' de l'ADN (dA-Tailing) :**
 - Des nucléotides de désoxyadénine (dA) sont ajoutés aux extrémités 3' de l'ADN.
 - Cette étape est réalisée avec un mélange réactionnel spécifique (contenant le tampon et l'enzyme Fragment de Klenow (3' → 5' exo-)).
 - Elles sont incubées à 37°C.
- **Nettoyage de l'ADN à queue désoxy-Adénine (dA-tailed) :**
 - L'ADN est purifié pour éliminer les réactifs en excès.
- **Ligation des adaptateurs Illumina à l'ADN à queue dA :**
 - Un mélange réactionnel de ligation (contenant le tampon, l'adaptateur multiplex d'ADN, et l'ADN ligase Quick T4) est préparé.
 - Elles sont incubées à 20°C.
- **Nettoyage et sélection de la taille de l'ADN ligaturé par l'adaptateur :**
 - L'ADN ligaturé est purifié et sélectionné en taille à l'aide de billes AMPure XP.
 - Elles sont lavées à l'éthanol.
- **Amplification de la librairie d'ADNg :**
 - Un mix PCR est préparé avec KAPA HiFi HotStart ReadyMix, des amorces PCR directes et inverses indexées, et l'ADN ligaturé.
 - La PCR est réalisée dans un thermocycleur avec un programme spécifique.

- Pour l'évaluation de la qualité de l'enrichissement exonique par qPCR :
 - 0,5 ng d'ADN de librairie sont mis par réaction de 15 μ L.
 - Les dilutions de travail de toutes les librairies sont préparées à une concentration de 0,1 ng/ μ L.
 - Le mélange qPCR pour chaque test est préparé comme suit : 7,5 μ L de SYBR Green PCR Master Mix, 0,3 μ L de mélange d'amorces sens/inverse (5 μ M), 5 μ L d'ADN matrice (0,1 ng/ μ L), pour un volume total de 10 μ L.
 - La qPCR est exécutée sur le système QuantStudio™ 5.
- **Nettoyage de l'ADN amplifié par PCR :**
 - La librairie amplifiée est nettoyée à l'aide de billes AMPure XP.
 - Elle est éluée dans un tampon d'élution SPRI.
- **Vérification de la qualité et de la quantité :**
 - La quantité et la taille de la librairie d'ADNg sont vérifiées sur un bioanalyseur Agilent™ 2100.
 - Il est veillé à l'élimination des amorces PCR et à la taille moyenne du pic (entre 325 et 350 pb).
 - Un protocole additionnel peut être requis si la librairie présente une large gamme de poids moléculaires ou un pic supérieur à 400 pb.

4.2.2. Séquençage par Synthèse (SBS) sur HiSeq2000™ Illumina

Le séquençage par synthèse (SBS) permet la lecture de la séquence d'ADN en détectant les bases incorporées de manière séquentielle, grâce à des signaux fluorescents émis lors de l'élongation du brin complémentaire. Le protocole de Séquençage par Synthèse (SBS) est détaillé dans **l'annexe (3)**

Étapes :

- **Cycle de Séquençage :**
 - Un nucléotide fluorescent est ajouté à chaque position du fragment d'ADN.
 - À chaque cycle, un nucléotide est incorporé dans un brin complémentaire.
 - Chaque nucléotide est marqué par un fluorophore spécifique (A, C, G, T).

- **Détection et Imagerie :**

- La caméra CCD du HiSeq™ 2000 détecte la fluorescence émise par chaque nucléotide qui est incorporé.
- Ce processus est répété de manière itérative pour lire la séquence de chaque fragment d'ADN sur plusieurs cycles.
- Après chaque incorporation, l'éclairage de la Flow Cell est capturé par un système d'imagerie.
- Chaque image représente la fluorescence émise par les nucléotides ajoutés à chaque cluster. Cela permet de déterminer l'identité de la base ajoutée à chaque cycle et de reconstituer la séquence.

4.2.3. Analyse Bioinformatique

L'analyse bioinformatique des données de séquençage à haut débit est essentielle pour transformer les données brutes en informations biologiques significatives, en identifiant et en annotant les variations génétiques potentiellement pathogènes. Les données de séquençage brutes sont traitées pour identifier et annoter les variations génétiques.

Étapes :

- **Contrôle Qualité et Prétraitement des Données Brutes :**

- La qualité des reads est évaluée avec des outils comme FastQC.
- Le découpage des bases de mauvaise qualité et le retrait des adaptateurs sont effectués si nécessaire, en utilisant des outils comme Cutadapt, Trimmomatic, PRINSEQ et QC3.

- **Alignement de Séquence :**

- Les reads prétraitées sont mappées sur le génome de référence avec des outils d'alignement comme Bowtie2 et BWA, qui implémentent l'algorithme de Transformation de Burrows-Wheeler (BWT).

- **Traitement Post-Alignement :**

- Les doublons de read sont supprimés pour corriger les biais de l'amplification PCR (avec Picard MarkDuplicates et SAM Tools).
- Le réalignement des indels est réalisé pour améliorer la qualité de l'alignement dans ces régions (avec SRMA et IndelRealigner du GATK).
- Le recalibrage du score de qualité de base (BQSR) est ajusté pour une meilleure précision.

- **Appel des Variants :**

- Les variants génomiques (SNV, indels, CNV, SV) sont détectés en comparant les reads alignées au génome de référence (avec GATK (UnifiedGenotyper et HaplotypeCaller), SAM Tools et FreeBayes).
- **Annotation et Priorisation des Variants :**
 - Les variants détectés sont annotés avec des informations telles que la caractéristique génomique, le symbole du gène, la fonction exonique et le changement d'acide aminé. Des outils comme ANNOVAR sont utilisés.
 - Ils sont priorisés en intégrant des bases de données publiques (par exemple, gnomAD, 1000 Genomes, ExAC) pour la fréquence des allèles mineurs, les preuves expérimentales et la prédiction de l'impact délétère. La prise en compte du phénotype clinique du patient est cruciale.

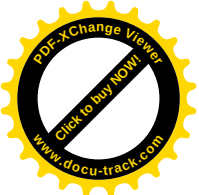
3.4 Séquençage Sanger pour la Confirmation des Résultats

Cette méthode valide les variants spécifiques identifiés par NGS en utilisant l'incorporation de ddNTPs fluorescents pour stopper l'élongation de l'ADN. Le protocole séquençage sanger est détaillé dans l'annexe(3)

Étapes:

- **Préparation de l'échantillon :**
 - L'ADN à séquencer est extrait.
 - Le segment d'ADN est amplifié par PCR à l'aide d'amorces spécifiques.
 - Le produit PCR est purifié pour éliminer les impuretés (primers, nucléotides non incorporés).
 - La concentration de l'ADN purifié est mesurée avec un NanodropTM 2000.
- **Préparation de la Réaction de Séquençage :**
 - Le produit PCR (ADN matrice) est mélangé avec les amorces, les quatre dNTPs et les ddNTPs marqués par des fluorochromes distincts.
 - L'enzyme Taq polymérase est ajoutée.
 - Le kit de séquençage de cycle Big DyeTM Terminator v3.1 est utilisé. Le volume total de la réaction est généralement de 20 µL.
- **Amplification et Terminaison :**
 - Durant l'amplification, la polymérase ajoute des dNTPs.

- L'incorporation d'un ddNTP arrête la synthèse, générant des fragments d'ADN de différentes tailles, chacun portant un marqueur fluorescent.
- **Purification du produit par séquençage du cycle :**
 - Les dye terminators en excès sont éliminés, souvent en utilisant des kits comme le DyeEx 2.0 Spin (Qiagen).
- **Séparation des Fragments par Électrophorèse Capillaire :**
 - Les fragments obtenus sont séparés par électrophorèse capillaire à l'aide du SeqStudio.
 - Le système utilise une colonne capillaire contenant un gel qui sépare les fragments d'ADN en fonction de leur taille.
 - Les signaux fluorescents des ddNTPs sont détectés à des positions spécifiques le long de la colonne.
- **Analyse des Résultats :**
 - Le SeqStudio utilise un détecteur optique pour lire les signaux lumineux émis par les fluorochromes.
 - Les données sont converties en une séquence d'ADN par un logiciel d'analyse intégré, générant un chromatogramme.
- **Interprétation et Vérification :**
 - Les chromatogrammes sont inspectés pour évaluer la qualité des lectures (pics nets et non superposés, valeur de qualité $Q > 20$).
 - Si la qualité est insuffisante, un reséquençage ou une optimisation des conditions peut être nécessaire.
 - L'alignement et l'assemblage des séquences sont effectués pour obtenir une séquence plus longue et fiable.
 - Une analyse bioinformatique compare les résultats avec des bases de données pour l'identification de séquences et l'analyse de mutations.
- **Sauvegarde et Exportation des Données :**
 - Une fois le séquençage terminé, les résultats sont exportés sous forme de fichiers. ab1 (chromatogrammes) ou .fasta pour l'alignement et l'analyse bioinformatique.



Résultats

Parmi les déficits immunitaires rare qui affectent la peau et la première ligne de défense, on trouve le syndrome du Comel Netherton. Cette maladie se caractérise par une triade manifestations cliniques : une ichtyose, des anomalies pilaires distinctives (trichorrhexie invaginata) et une dysrégulation immunitaire souvent marquée par des atopies sévères et des infections récurrentes. Cette affection est causée par des mutations du gène SPINK5. Bien qu'elle ne soit due qu'à un seul gène, elle présente de multiples mutations et ses symptômes varient d'une patient à l'autre. Les 7 cas des patients présentés ici illustrent la complexité phénotypique et les défis de prise en charge associés au SCN.

Tableau V: Synthèse Démographique des Patients avec SCN.

Patient	Sexe	Âge Diagnostic (Mois)	Année Diagnostic	Âge Apparition Symptômes	CHU de Suivi	Province d'Origine	Consanguinité (degré)	Antécédents Familiaux / Cas Multiples
1	F	6	2014	Naissance	Bab El Ouad	Médéa	Non	Sœur décédée
2	F	4,5	2020	Naissance	Bab El Ouad	Alger	3ème	Sœur décédée
3	F	4	2019	2 mois	Blida	Blida	3ème	Aucun
4	F	3,5	2019	2 mois	Blida	Blida	3ème	Sœur avec même diagnostic
5	F	120	2020	Naissance	Parnet	Alger	2ème	Sœur décédée
6	F	36	2019	Naissance	Parnet (B)	Bouira	2ème	Sœur décédée
7	M	36	2021	Néonatal	Beni Messous (B)	Non spécifiée	3ème	2 cas familiaux d'ichtyose

patient 1

Le patient n°1 est une fille a été diagnostiquée avec le Syndrome de Comel-Netherton (SCN) à l'âge de six mois, en 2014, les premiers signes cutanés étant apparus dès sa naissance. Suivie au service de Pédiatrie du CHU de Bebb El Ouad et originaire de Médéa, son histoire familiale est marquée par le décès d'une sœur présentant un tableau clinique similaire, ce qui

oriente vers une transmission autosomique récessive, bien qu'aucune consanguinité parentale n'ait été rapportée.

Dès la période néonatale, l'enfant a manifesté un ensemble de symptômes graves et multisystémiques, caractéristiques des formes sévères du SCN. Elle présentait une ichtyose congénitale diffuse, se manifestant par une érythrodermie et une desquamation généralisée. L'examen microscopique de ses cheveux a confirmé la trichorrhexie invaginata, signe distinctif du SCN, identifiable par des invaginations et des fractures de la tige pilaire, lui donnant un aspect de "cheveux en bambou".

Au-delà des atteintes dermatologiques, le tableau clinique incluait des complications systémiques importantes. Sur le plan digestif, l'enfant souffrait d'une allergie sévère aux protéines du lait de vache et d'une diarrhée chronique récurrente, qui ont conduit à un retard de croissance staturo-pondérale sévère, témoignant d'une malabsorption intestinale. Sa susceptibilité aux infections était notable, avec des antécédents d'infections respiratoires récurrentes et plusieurs épisodes de septicémie, soulignant une dysfonction immunitaire. Une complication auto-immune, sous la forme d'une anémie hémolytique auto-immune, a également été diagnostiquée, illustrant la dysrégulation immunitaire intrinsèque au syndrome. Aucune autre manifestation organique majeure n'a été documentée (**voir tableau VI**).

L'hémogramme a montré une leucocytose ($15400/\text{mm}^3$), associée à une neutrophilie (41,0% soit $6314/\text{mm}^3$) et une éosinophilie très marquée (49,60% soit $7638/\text{mm}^3$), signes d'un état inflammatoire chronique et d'une atopie sévère. Une lymphopénie relative (9,40% soit $1448/\text{mm}^3$) a également été observée. Au niveau érythrocytaire, une anémie (hémoglobine à 6,1 g/dl) avec des indices de Wintrobe (MCHC : 32, MCV : 87) était présente, en lien avec l'anémie hémolytique auto-immune. Le nombre de plaquettes ($108000/\text{mm}^3$) était aux limites basses (**voir tableau VII**).

Les taux normaux d'IgG (9,31 g/l), IgA (1,36 g/l) et IgM (0,47 g/l) étaient dans les valeurs de référence pour son âge. Cependant, le taux sérique d'IgE était très élevé, atteignant 3450,77 UI/ml, une caractéristique presque constante du SCN (**voir tableau VIII**). Le bilan immunologique a révélé une population lymphocytaire totale de 39,0% ($6006/\text{mm}^3$). La répartition des sous-populations était la suivante : une augmentation des lymphocytes T CD3+ à 77% ($4625/\text{mm}^3$), lymphocytes T CD4+ à 40% ($2402/\text{mm}^3$), lymphocytes T CD8+ à 34% ($2042/\text{mm}^3$) dans les normes, avec un rapport CD4/CD8 préserve de 1,18. Les lymphocytes B

CD19+ diminuer représentaient 11,5% (691/mm³), et une proportion normale des cellules Natural Killer (NK) CD56+ étaient à 12% (691/mm³) (**voir tableau IX**).

L'analyse génétique du gène SPINK5 (référence de transcrit NM_006846.4) a mis en évidence une mutation homozygote de type non-sens, c.67A>T, entraînant la substitution de la lysine par un codon stop prématuré en position 23 (p.Lys23Ter). Cette mutation est prédictive d'une protéine LEKTI tronquée et non fonctionnelle, confirmant le diagnostic moléculaire du SCN et expliquant l'ensemble des manifestations cliniques observées chez l'enfant. Celle-ci n'a pas reçu de traitement substitutif par immunoglobulines. Au moment de la dernière évaluation, elle était toujours en vie. Sa prise en charge a été principalement symptomatique, visant à contrôler les manifestations cutanées, à gérer les complications infectieuses et digestives, et à traiter l'anémie hémolytique auto-immune (**voir tableau X**).

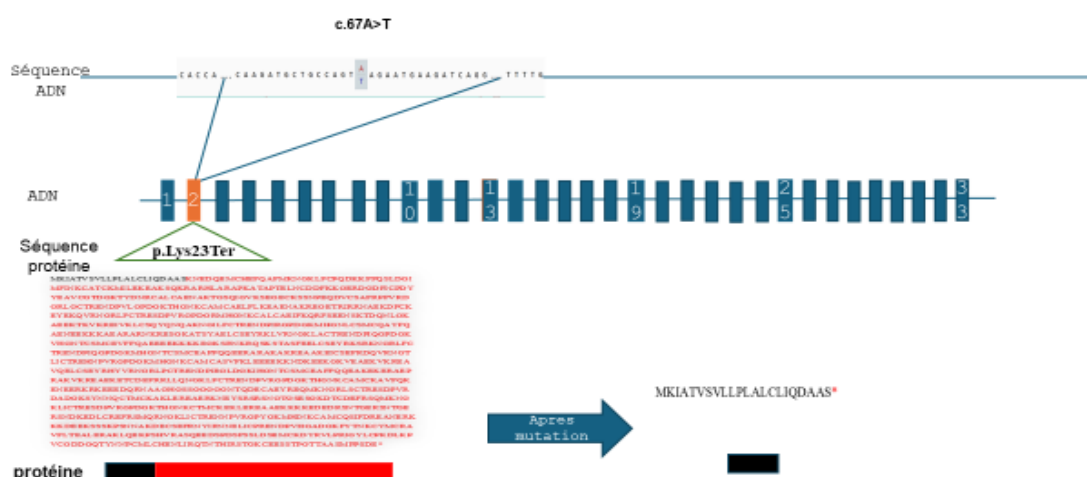


Figure 8: La mutation identifiée chez le 1er patient.

Patient 2

Le patient n°2 est une fille algérienne a été diagnostiquée avec le SCN à l'âge de 4,5 mois, en 2020, les premiers signes cutanés étant apparus dès sa naissance. Suivie au service de Pédiatrie du CHU de Beb El Oquad et originaire de Alger, son histoire familiale est marquée par le décès d'une sœur présentant un tableau clinique similaire, ce qui oriente vers une transmission autosomique récessive, bien qu'aucune consanguinité parentale n'ait été rapportée.

Le tableau clinique de l'enfant était principalement caractérisé par des atteintes significatives de la peau et des phanères, ainsi qu'un retard de croissance. Elle présentait une alopecie et une ichtyose. L'examen microscopique de ses cheveux a confirmé la présence de "cheveux en bambou", un signe très évocateur de la trichorrhexie invaginata, une anomalie pileuse typique du SCN. Un retard de croissance sévère était également une manifestation majeure, suggérant une atteinte systémique, comparable à celles observées dans les formes graves du SCN (**voir tableau VI**) .

Le bilan hématologique a révélé une leucocytose à 15 600/mm³. L'analyse de la formule sanguine montrait une éosinophilie marquée avec 32,10% d'éosinophiles, soit 5008/mm³. Les lymphocytes ne représentaient que 1,30% de la population leucocytaire, soit 203/mm³, indiquant une lymphopénie absolue. Une anémie microcytaire était également présente, avec un taux d'hémoglobine de 10,1 g/dL, un volume globulaire moyen (MCV) de 69 fL et une concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (MCHC) de 32,4 g/dL. Le nombre de plaquettes était de 277 000/mm³(**voir tableau VII**) .

Les dosages des immunoglobulines sériques ont montré des taux d'IgG à 7,33 g/L, d'IgA à 1,21 g/L et d'IgM à 0,83 g/L, tous dans les valeurs normales de référence pour son âge. Il est à noter que le taux d'IgE normales ou légèrement élevées était de 28,7 UI/mL, se situant dans les limites normales ou légèrement élevées, mais pas excessivement, contrairement à ce qui est souvent observé dans les cas de SCN sévère (**voir tableau VIII**). Le phénotypage lymphocytaire par cytométrie en flux a détaillé les sous-populations, dont le total s'élevait à 22,5% (soit 3510/mm³). Les lymphocytes T CD3+ représentaient 56% (soit 1948/mm³), les lymphocytes T CD4+ normales de 45% (soit 1580/mm³), et une diminution marquée des lymphocytes T CD8+ 9% (soit 316/mm³), avec un rapport CD4/CD8 déséquilibré important de 5,00, un profil inhabituel. Les lymphocytes B CD19+ étaient à 13,5% (soit 474/mm³) sont légèrement diminués et les cellules Natural Killer (NK) CD56+ à 29% (soit 1018/mm³) sont dans les normes (**voir tableau IX**).

L'analyse génétique du gène SPINK5 (référence de transcrite NM_006846.4) a mis en évidence une mutation homozygote de type délétion : c.941_956del. Cette délétion entraîne un décalage du cadre de lecture (frameshift), prédit au niveau protéique par p.Glu314fs. Cette mutation, reconnue comme pathogène, a confirmé le diagnostic moléculaire du syndrome de Comèl-Netherton chez l'enfant. Elle n'a pas reçu de traitement substitutif par immunoglobulines. Au moment de la dernière évaluation, l'enfant était toujours en vie. Sa prise

en charge a été principalement symptomatique, axée sur la gestion des manifestations cutanées, des complications associées et du retard de croissance. Ce cas souligne la variabilité phénotypique au sein du SCN, même en présence d'une mutation *SPINK5* confirmée (voir tableau X).

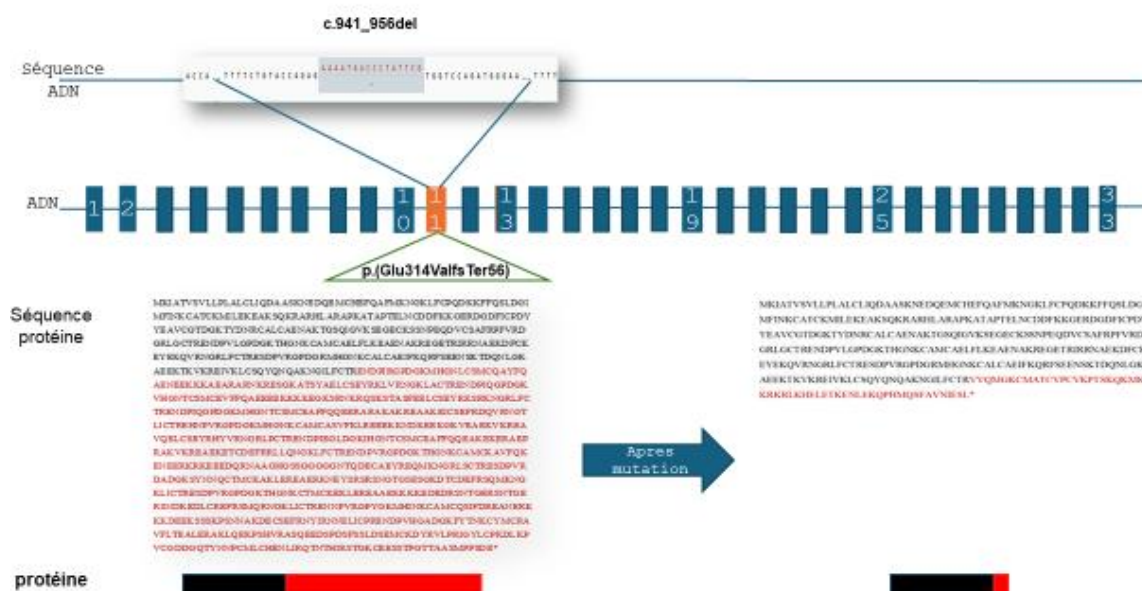


Figure 9: la mutation identifiée chez le patient n°2.

Patient 3

Le patient n°3 est une fille algérienne a été diagnostiquée avec (SCN) a l'âge de 4 mois en 2019, a été prise en charge au service de pédiatrie du CHU de Blida, sa province d'origine. Les premiers symptômes étaient apparus dès l'âge de 2 mois. L'anamnèse familiale a révélé une consanguinité au troisième degré. Le diagnostic clinique posé était le Syndrome de Comèl-Netherton (SCN), une pathologie classée parmi les déficits immunitaires combinés associés ou avec des caractéristiques syndromiques.

Le tableau clinique de l'enfant se caractérisait par des infections sinopulmonaires et gastro-intestinales récurrentes. Sur le plan cutané, une ichtyose était notable. L'examen microscopique de ses cheveux a confirmé la présence de "cheveux en bambou", signe distinctif et pathognomonique de la trichorrhexie invaginata du SCN. Aucune maladie auto-immune ou trouble lymphoprolifératif n'a été documenté (voir tableau VI).

L'évaluation hématologique de l'enfant a révélé une leucocytose à $14\,700/\text{mm}^3$. Son taux d'hémoglobine était de $7,7\text{ g/dL}$, avec un MCHC de $28,8$ et un MCV de $79,7$, indiquant une anémie. Le nombre de plaquettes était élevé, à $690\,000/\text{mm}^3$ (**voir tableau VII**).

Les dosages des immunoglobulines sériques ont montré des taux d'IgG limite inférieure de taux normale à $6,7\text{ g/L}$, d'IgA sont diminuées à $0,46\text{ g/L}$ et de taux normale ou légèrement diminuée d'IgM à $0,68\text{ g/L}$. Le taux d'IgE légèrement élevées était de 124 UI/mL (**voir tableau VIII**). Des analyses plus fines des sous-populations lymphocytaires ont également été réalisées. Le phénotypage lymphocytaire par cytométrie en flux, représentant $21,0\%$ (soit $3087/\text{mm}^3$) des lymphocytes totaux, a détaillé les sous-populations suivantes : Lymphocytes T CD3+ limites à 64% (soit $1976/\text{mm}^3$), Lymphocytes T CD4+ à 49% (soit $1513/\text{mm}^3$) sont limites inférieures de normale, une diminution des lymphocytes T CD8+ à 12% (soit $370/\text{mm}^3$), avec un rapport augmente des CD4/CD8 de $4,08$. Les lymphocytes B CD19+ étaient à $22,0\%$ (soit $679/\text{mm}^3$) dans les normes et les cellules Natural Killer (NK) CD56+ à 13% (soit $401/\text{mm}^3$) dans les normes ou légèrement diminuées (**voir tableau IX**).

L'analyse génétique du gène SPINK5 (référence de transcrit NM_006846.4) a mis en évidence une mutation de type délétion : c.1233del. Cette délétion est prédite au niveau protéique par p.Glu412fs, indiquant un décalage du cadre de lecture. Cette mutation est connue pour être pathogène et a confirmé le diagnostic moléculaire du syndrome de Comèl-Netherton chez l'enfant. Celle-ci n'a pas reçu de traitement substitutif par immunoglobulines. Au moment de la dernière évaluation, l'enfant était toujours en vie. Sa prise en charge a été principalement symptomatique, axée sur la gestion des infections récurrentes et des manifestations cutanées (**voir tableau X**).

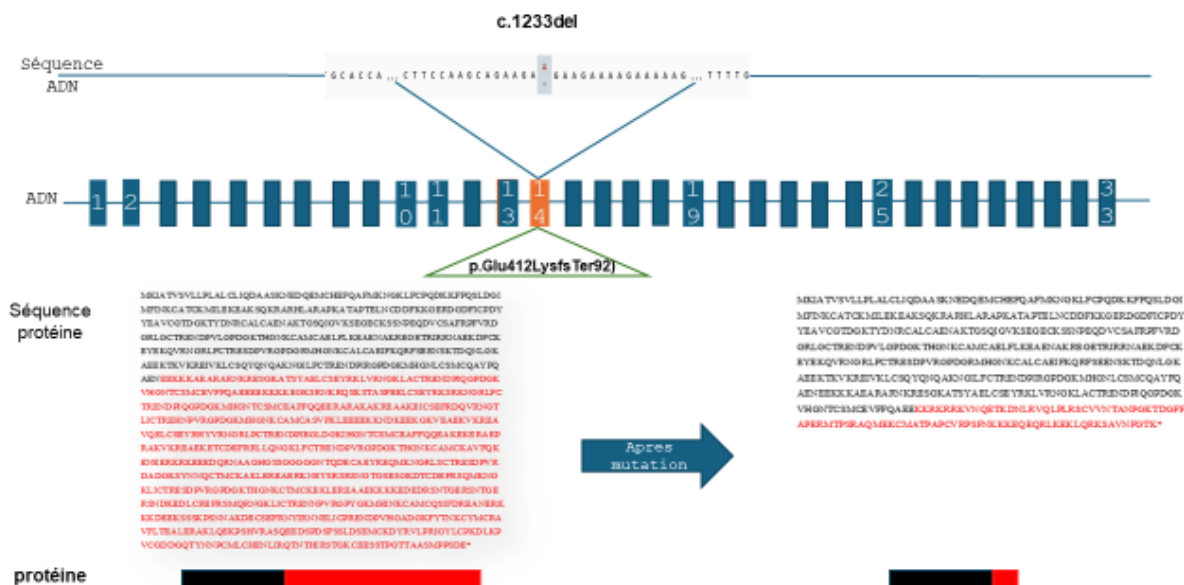


Figure 10: la mutation identifiée chez les 2 patients n°3 et °4.

Patient 4

Le patient n°3 est une fille Algérienne a été diagnostiquer avec (SCN) a l'âge de 3,5 mois en 2019, a été admise au service de pédiatrie du CHU de Blida, sa province d'origine. Les symptômes avaient débuté dès l'âge de 2 mois. L'histoire familiale est marquée par une consanguinité au 3ème degré et la présence d'une sœur également diagnostiquée avec le Syndrome de Comèl-Netherton (SCN).

Le tableau clinique de l'enfant était caractérisé par plusieurs atteintes significatives. Sur le plan infectieux, elle a présenté des infections sinopulmonaires récurrentes, des épisodes de diarrhée, du muguet buccal et une méningoencéphalite, soulignant une vulnérabilité immunitaire prononcée. Au niveau cutané, une ichtyose était notée. L'examen microscopique des cheveux a confirmé la présence de "cheveux en bambou", un signe distinctif de la trichorrhexie invaginata et pathognomonique du SCN. Aucune maladie auto-immune ou trouble lymphoprolifératif n'a été documenté pendant son suivi (**voir tableau VI**).

L'évaluation hématologique a révélé une leucocytose à 10 900/mm³. Son taux d'hémoglobine était de 12,6 g/dL, avec un MCHC de 33,7 et un MCV de 86. Le nombre de

plaquettes était élevé, à 583 000/mm³. La formule sanguine montrait 54,3% de neutrophiles (soit 5919/mm³) et une éosinophilie marquée à 42,90% (soit 4676/mm³). Les lymphocytes ne représentaient que 2,80% de la population leucocytaire, soit 305/mm³, suggérant une lymphopénie absolue (**voir tableau VII**).

Les dosages des immunoglobulines sériques ont montré des taux d'IgG à 7,91 g/L dans les valeurs références à son âge, d'IgA à 0,87 g/L est légèrement diminuée et d'IgM de taux normale ou légèrement élevée à 1,63 g/L. Le taux d'IgE était de 50,5 UI/mL, se situant légèrement au-dessus des valeurs normales pour l'âge (**voir tableau VIII**). Des analyses plus fines des sous-populations lymphocytaires ont également été réalisées. Le phénotypage lymphocytaire par cytométrie en flux, représentant 42,5% (soit 4633/mm³) des lymphocytes totaux, a détaillé les sous-populations suivantes avec des taux dans les normes : Lymphocytes T CD3+ à 56% (soit 2571/mm³), Lymphocytes T CD4+ à 33% (soit 1506/mm³), Lymphocytes T CD8+ à 17% (soit 788/mm³), avec un rapport CD4/CD8 de 1,91. Les lymphocytes B CD19+ étaient à 22,0% (soit 1019/mm³) et les cellules Natural Killer (NK) CD56+ à 23% (soit 1042/mm³) est légèrement augmentée (**voir tableau IX**).

L'analyse génétique du gène SPINK5 (référence de transcrite NM_006846.4) a mis en évidence une mutation de type délétion : c.1233del. Cette délétion est prédite au niveau protéique par p.Glu412fs, indiquant un décalage du cadre de lecture. Il est crucial de noter que cette mutation est identique à celle identifiée chez sa sœur, ce qui renforce la preuve de son rôle pathogène dans le syndrome de Comèl-Netherton au sein de cette famille. L'enfant n'a pas reçu de traitement substitutif par immunoglobulines. Au moment de la dernière évaluation, elle était toujours en vie. Sa prise en charge a été principalement symptomatique, axée sur la gestion des diverses infections récurrentes et des manifestations cutanées. Ce cas illustre une présentation clinique du SCN avec des complications infectieuses variées, soulignant l'importance d'une approche multidisciplinaire dans la prise en charge de ces patients (**voir tableau X**).

Patient 5

Le patient n°5 est une fille algérienne a été diagnostiquée à l'âge de 10 ans (120 mois) en 2020, a été suivie au service de pédiatrie du CHU Parnet à Alger. Les symptômes qui ont conduit au diagnostic du Syndrome de Comèl-Netherton (SCN) étaient présents dès sa naissance. Son anamnèse familiale a révélé une consanguinité au 2ème degré et le décès d'une

sœur, suggérant une transmission génétique de la maladie. Le SCN est classé parmi les déficits immunitaires combinés associés ou avec des caractéristiques syndromiques.

Le tableau clinique de l'enfant était caractérisé par une alopécie et un retard de croissance (failure to thrive). Les données disponibles ne mentionnent pas spécifiquement la présence de maladies infectieuses récurrentes, de maladies auto-immunes ou de troubles lymphoprolifératifs pour cette patiente. L'examen microscopique de ses cheveux a confirmé la présence de "cheveux en bambou", un signe distinctif de la trichorrhexie invaginata et pathognomonique du SCN (**voir tableau VI**).

L'évaluation hématologique de l'enfant a révélé une numération des globules blancs (WBC) de 6500/mm³. Son taux d'hémoglobine était de 12,3 g/dL, avec un MCHC de 33 et un MCV de 73. Le nombre de plaquettes était de 293 000/mm³. La formule sanguine montrait 44,9% de neutrophiles (soit 2919/mm³) et une éosinophilie marquée à 50,90% (soit 3309/mm³). Les lymphocytes représentaient 4,20% de la population leucocytaire, soit 273/mm³, indiquant une lymphopénie absolue (**voir tableau VII**).

Les dosages des immunoglobulines sériques ont montré des taux d'IgG à 8,26 g/L, d'IgA à 0,96 g/L, et d'IgM à 0,52 g/L, tous dans les valeurs normales pour son âge. Contrairement à d'autres cas de SCN, le taux d'IgE était également dans les limites normales à 7,74 UI/mL (**voir tableau VIII**). Le phénotypage lymphocytaire par cytométrie en flux, représentant 23,5% (soit 1528/mm³) des lymphocytes totaux, a détaillé les sous-populations suivantes : Lymphocytes T CD3+ à 86% (soit 1314/mm³), une diminution marquée des lymphocytes T CD4+ à 30% (soit 458/mm³), une augmentation relative des Lymphocytes T CD8+ à 45% (soit 687/mm³), avec un rapport CD4/CD8 de 0,67, ce qui est inversé par rapport à la normale. Les lymphocytes B CD19+ étaient à 7,5% (soit 115/mm³) et une diminution marquée des cellules Natural Killer (NK) CD56+ à 7% (soit 99/mm³). (**Voir tableau IX**).

L'analyse génétique du gène SPINK5 (référence de transcrit NM_006846.4) a mis en évidence une mutation de type défaut d'épissage (splicing defect) : c.1888-1G>A. Cette mutation affecte le site d'épissage et est prédite comme entraînant une perte de fonction de la protéine (p=0), confirmant le diagnostic moléculaire du syndrome de Comèl-Netherton chez l'enfant. Celle-ci n'a pas reçu de traitement substitutif par immunoglobulines. Au moment de la dernière évaluation, l'enfant était toujours en vie. Sa prise en charge a été principalement symptomatique, axée sur la gestion des manifestations cliniques. Ce cas est intéressant par la

normalité de ses taux d'IgE et l'absence apparente de certaines complications graves souvent associées au SCN, malgré une éosinophilie et une lymphopénie absolue. (**Voir tableau X**).

Patient 6

Le patient n°6 est une fille a été diagnostiquée avec (SCN) à l'âge de 3 ans (36 mois) en 2019, les premiers signes cutanés étant apparus dès sa naissance. Suivie au service de pédiatrie B du CHU Parnet à Alger, étant originaire de Bouira. Son anamnèse familiale a révélé une consanguinité au 2^{ème} degré ainsi que le décès d'une sœur, ce qui suggère une transmission génétique de la maladie. Le SCN est classé parmi les déficits immunitaires combinés associés ou avec des caractéristiques syndromiques.

Le tableau clinique de l'enfant se caractérisait principalement par des infections récurrentes des voies respiratoires. Sur le plan cutané et pileux, elle présentait une alopécie, une érythrodermie et une ichtyose. Les données disponibles ne mentionnent pas spécifiquement la présence de maladies auto-immunes ou de troubles lymphoprolifératifs. L'examen microscopique de ses cheveux a confirmé la présence de "cheveux en bambou", un signe distinctif de la trichorrhexie invaginata et pathognomonique du SCN (**voir tableau VI**).

L'évaluation hématologique de l'enfant a révélé une numération des globules blancs (WBC) de 21 300/mm³. Son taux d'hémoglobine était de 6,4 g/dL, avec un MCHC de 26,7 et un MCV de 42, indiquant une anémie microcytaire. Le nombre de plaquettes était de 469 000/mm³. La formule sanguine montrait 44,8% de neutrophiles (soit 9542/mm³) et une éosinophilie très marquée à 52,90% (soit 11268/mm³). Les lymphocytes ne représentaient que 2,30% de la population leucocytaire, soit 490/mm³, suggérant une lymphopénie absolue (**voir tableau VII**).

Les dosages des immunoglobulines sériques ont montré des taux d'IgG à 14,6 g/L, d'IgA à 1,73 g/L et d'IgM à 1,37 g/L, tous dans les valeurs de référence pour son âge. Le taux très élevée d'IgE était >2000 UI/mL, une caractéristique fréquemment observée dans le SCN (**voir tableau VIII**). Des analyses plus fines des sous-populations lymphocytaires ont également été réalisées. Le phénotypage lymphocytaire par cytométrie en flux a détaillé les sous-populations, la population lymphocytaire totale étant de 42,5% (soit 9053/mm³). Les lymphocytes T CD3⁺ représentaient 61% (soit 5477/mm³), les lymphocytes T CD4⁺ normales

à 31% (soit 2806/mm³), et les lymphocytes T CD8+ normales à 20% (soit 1811/mm³), avec un rapport CD4/CD8 normal de 1,55. Une augmentation marquée des lymphocytes B CD19+ étaient à 33,5% (soit 3033/mm³) et une légère diminution des cellules Natural Killer (NK) CD56+ à 6% (soit 543/mm³). (**Voir tableau IX**).

L'analyse génétique du gène SPINK5 (référence de transcrit NM_006846.4) a mis en évidence une mutation de type faux-sens (missense) : c.2423C>T, qui entraîne une substitution de la thréonine par une isoleucine en position 808 (p.Thr808Ile). Cette mutation est connue pour être pathogène et a confirmé le diagnostic moléculaire du syndrome de Comèl-Netherton chez l'enfant. Celle-ci n'a pas reçu de traitement substitutif par immunoglobulines. Au moment de la dernière évaluation, l'enfant était toujours en vie. Sa prise en charge a été principalement symptomatique, axée sur la gestion des infections respiratoires récurrentes et des manifestations cutanées. (**Voir tableau X**).

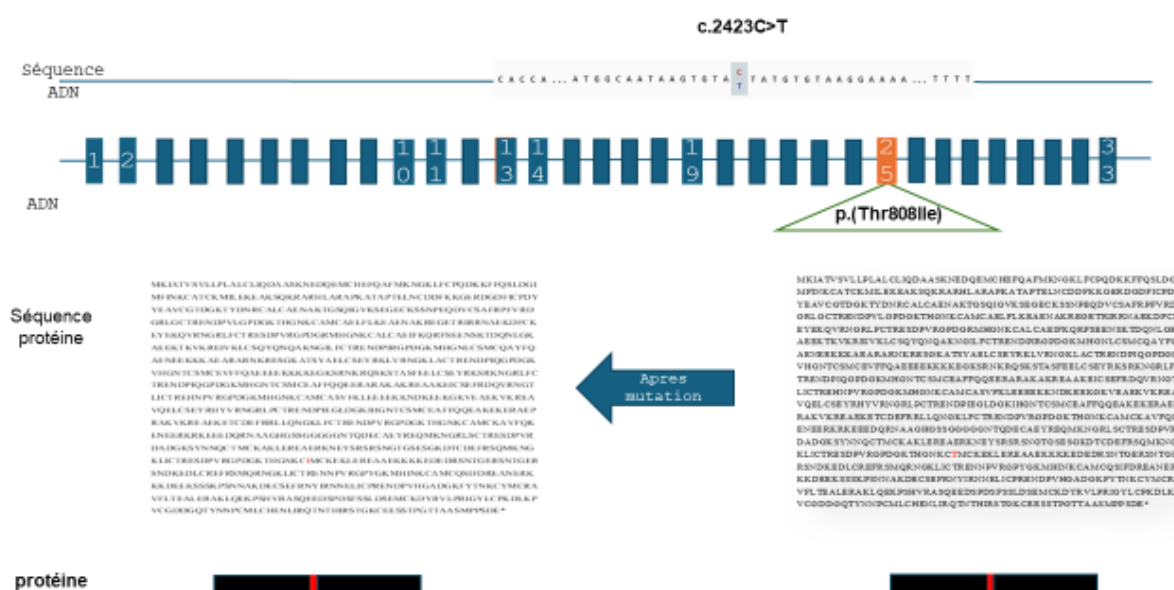


Figure 11: la mutation identifiée chez le patient n°6.

Patient 7

Le patient n°7 est un garçon Algérien a été diagnostiquée à l'âge de 3 ans (36 mois) en 2021, suivie au service de pédiatrie du CHU de Beni Messous. Ses symptômes avaient débuté dès la période néonatale. L'anamnèse familiale a révélé une consanguinité au 3ème degré et la présence de deux cas familiaux d'ichtyose, suggérant une transmission génétique. Le

diagnostic clinique posé était le Syndrome de Comèl-Netherton (SCN), une pathologie classée parmi les déficits immunitaires combinés associés ou avec des caractéristiques syndromiques.

Le tableau clinique du garçon était principalement caractérisé par une ichtyose et une allergie alimentaire. Il est notable que, contrairement aux autres cas de SCN, l'examen microscopique de ses cheveux a révélé l'absence de "cheveux en bambou", un signe habituellement distinctif de la trichorrhexie invaginata. Les données disponibles ne mentionnent pas spécifiquement la présence de maladies infectieuses, auto-immunes ou de troubles lymphoprolifératifs (**voir tableau VI**).

L'évaluation hématologique du garçon a révélé une numération des globules blancs (WBC) de 11 900/mm³. Son taux d'hémoglobine était de 9,9 g/dL, avec un MCHC de 31,8 et un MCV de 51, indiquant une anémie microcytaire. Le nombre de plaquettes était de 449 000/mm³. La formule sanguine montrait 61,2% de neutrophiles (soit 7283/mm³) et une éosinophilie marquée à 34,10% (soit 4058/mm³). Les lymphocytes ne représentaient que 3,50% de la population leucocytaire, soit 417/mm³, suggérant une lymphopénie absolue (**voir tableau VII**).

Les dosages des immunoglobulines sériques ont montré des taux limite inférieures de la normale d'IgG à 5,84 g/L, normales d'IgA à 1,59 g/L, et d'IgM à 1,63 g/L est légèrement élevées. Le taux d'IgE modérément élevées était de 266 UI/mL, se situant dans les limites élevées (**voir tableau VIII**). Le phénotypage lymphocytaire par cytométrie en flux a détaillé les sous-populations, la population lymphocytaire totale étant de 25,0% (soit 2975/mm³). Une proportion augmentée des lymphocytes T CD3+ représentaient 71% (soit 2097/mm³), une diminution marquée des lymphocytes T CD4+ à 24% (soit 702/mm³), et une augmentation relative des lymphocytes T CD8+ à 35% (soit 1029/mm³), avec un rapport CD4/CD8 de 0,68, un profil inversé. Les lymphocytes B CD19+ légèrement diminuée étaient à 13,6% (soit 405/mm³) et les cellules Natural Killer (NK) CD56+ à 16% (soit 470/mm³) sont dans les normes (**voir tableau IX**).

L'analyse génétique du gène SPINK5 (référence de transcrit NM_006846.4) a mis en évidence une mutation de type délétion : c.2483del, qui entraîne un décalage du cadre de lecture prédit au niveau protéique par p.Asp828fs. Cette mutation est connue pour être pathogène et a confirmé le diagnostic moléculaire du syndrome de Comèl-Netherton chez le garçon, et ce, malgré l'absence du signe classique des "cheveux en bambou". Il n'a pas reçu de traitement

substitutif par immunoglobulines. Au moment de la dernière évaluation, il était toujours en vie. Sa prise en charge a été principalement symptomatique, axée sur la gestion de l'ichtyose et de l'allergie alimentaire. Ce cas souligne la variabilité phénotypique du SCN, même pour des signes considérés comme pathognomoniques. (Voir tableau X).

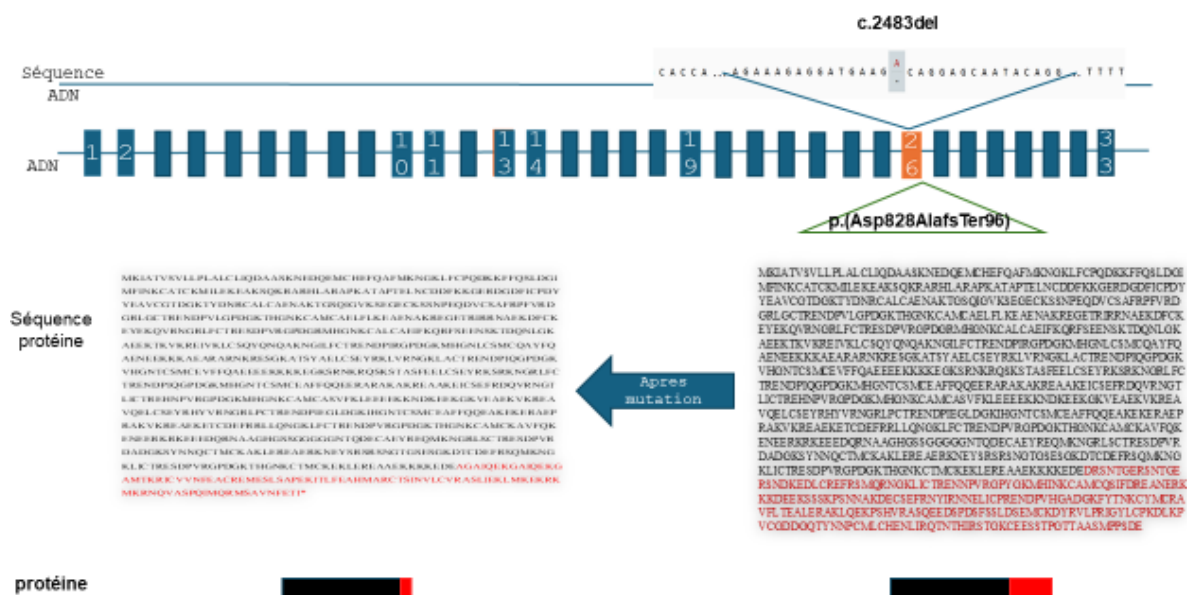


Figure 12: La mutation identifiée chez le patient n°7.

Tableau VI: les manifestations cliniques des patients.

Catégorie de Manifestation	Caractéristiques Cliniques Spécifiques	Fréquence (sur 7 patients)	Patients Affectés (N°)	Observations et Pertinence Clinique
Manifestations Cutanées	Ichtyose et Érythrodermie Congénitale (desquamation continue)	Quasi-constante 6/7	1,3,4,5,6,7 Sauf 2	Sévérité précoce (naissance/petite enfance), quasi-constante , conforme aux descriptions classiques.
	Trichorrhexie invaginata ("cheveux en bambou")	6/7	1,2,3,4,5,6 Sauf 7	Signe pathognomonique , mais variabilité phénotypique : son absence n'exclut pas le diagnostic (si confirmation génétique).

Manifestations Digestives	Retard de croissance staturo-pondérale sévère et "failure to thrive"	Fréquent 3/7	1,2,5	Malabsorption fréquente et atteinte digestive , impactant la croissance.
	Allergie sévère aux protéines du lait de vache et diarrhée chronique récurrente	Variable 2/7	1,7 (allergie alimentaire)	Complications gastro-intestinales bien documentées.
Manifestations Immunologiques et Infectieuses	Infections récurrentes (notamment respiratoires et sinopulmonaires)	Prévalentes 4/7	1,3,4,6	Dysfonction immunitaire sous-jacente aggravée par l'altération de la barrière cutanée, menant à une vulnérabilité infectieuse .
	Septicémie	Observée 1/7	1	Illustre une vulnérabilité extrême aux infections.
	Anémie hémolytique auto-immune	Unique dans cette cohorte 1/7	1	Manifestation auto-immune rare mais possible due à la dysrégulation immunitaire (nécessite un suivi approfondi).
Sévérité Générale	Symptomatologie cutanée et systémique significative dès la petite enfance, conduisant à une morbidité significative	Très élevée 7/7	7	Impact global sévère dès l'enfance, soulignant la nécessité d'une prise en charge multidisciplinaire et précoce.

Tableau VII: les informations d'hémogramme des 7 patients.

	1	2	3	4	5	6	7
Leucocytes (WBC) /mm³	15400	15600	14700	10900	6500	21300	11900
Neutrophiles %	41,0% (6314)	66,6	ND	54,3% (5919)	44,9% (2919)	44,8% (9542)	61,2% (7283)

Éosinophiles%	49,60% (7638)	32,10% (5008)	0	42,90% (4676)	50,90% (3309)	52,90% (11268)	34,10% (4058)
Lymphocytes (Formule) %	9,40% (1448)	1,30% (203)	0	2,80% (305)	4,20% (273)	2,30% (490)	3,50% (417)
Hémoglobine (g/dl)	6,1	10,1	7,7	12,6	12,3	6,4	9,9
MCV (fl)	87	69	79,7	86	73	42	51
MCHC (g/dL)	32	32,4	28,8	33,7	33	26,7	31,8
Plaquettes/mm ³	108000	277000	690000	583000	293000	469000	449000

ND : non disponible.

Tableau VIII: résultats des dosages des immunoglobulines des 7 patients.

Immunoglobulines	1	2	3	4	5	6	7
IgG (g/L)	9,31 (I)	7,33 (I)	6,7 (I)	7,91 (I)	8,26 (N)	14,6 (I)	1,59 (I)
IgA (g/L)	1,36 (I)	1,21 (I)	0,46 (N)	0,87 (I)	0,96 (N)	1,73 (I)	1,63 (I)
IgM (g/L)	0,47 (N)	0,83 (I)	0,68 (I)	1,63 (I)	0,52 (N)	1,37 (I)	266 (I)
IgE Sérique (UI/ml)	3450,77 (I)	28,7 (N)	124 (I)	50,5 (I)	7,74 (N)	>2000 (I)	ND

I : Increase

N : Normal

ND : Non Disponible

Tableau IX: les résultats de la cytométrie en flux des 7 patients.

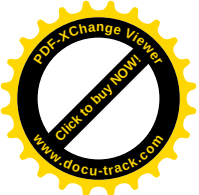
	1	2	3	4	5	6	7	Normes Pédiatriques %
Lymphocytes Totaux %	39,0% (6006)	22,5% (3510)	21,0% (3087)	42,5% (4633)	23,5% (1528)	42,5% (9053)	25,0% (2975)	40-70
Lymphocytes T CD3+ %	77% (4625)	56% (1948)	64% (1976)	56% (2571)	86% (1314)	61% (5477)	71% (2097)	55-80
Lymphocytes T CD4+ %	40% (2402)	45% (1580)	49% (1513)	33% (1506)	30% (458)	31% (2806)	24% (702)	30-60
Lymphocytes T CD8+ %	34% (2042)	9% (316)	12% (370)	17% (788)	45% (687)	20% (1811)	35% (1029)	15-35
Rapport CD4/CD8 (ratio)	1,18	5,00	4,08	1,91	0,67	1,55	0,68	1-4
Lymphocytes B CD19+ %	11,5% (691)	13,5% (474)	22,0% (679)	22,0% (1019)	7,5% (115)	33,5% (3033)	13,6% (405)	10-25
Cellules 2NK CD56+ %	12% (691)	29% (1018)	13% (401)	23% (1042)	7% (99)	6% (543)	16% (470)	5-20

Tableau X: les variants de gène *SPINK5* identifiés chez les patients.

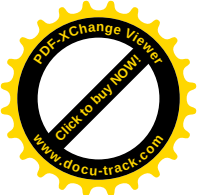
N°	Variant (ADN)	Variant (Protéine)	Type de Variant	Conséquence Protéique	Localisation Exon/Intron	Statut ACMG
1	c.67A>T	p.Lys23Ter	Non-sens	Arrêt prématuré (codon stop)	Exon 2	Pathogène (PVS1)
2	c.941_956del	p.(Glu314Val fsTer56)	Délétion (frameshift)	Décadrement, protéine tronquée	Exon 11	Pathogène (PVS1)

3	c.1233del	p.Glu412Lys fsTer92)	Délétion (frameshift)	Décadrement, protéine tronquée	Exon 14	Pathogène (PVS1)
4	c.1233del	p.Glu412Lys fsTer92)	Délétion (frameshift)	Décadrement, protéine tronquée	Exon 14	Pathogène (PVS1)
5	c.1888-1G>A	(p=0)	Défaut d'épissage	Altération du site d'épissage (perte)	Intron 19-20(dernier nucléotide de intron 19)	Pathogène (PVS1)
6	c.2423C>T	p.(Thr808Ile)	Faux-sens	Substitution d'acide aminé	Exon 25	Likely pathogenic
7	c.2483del	p.(Asp828Al afsTer96)	Délétion (frameshift)	Décadrement, protéine tronquée	Exon 26	Pathogène (PVS1)

PVS1 : Variant entraînant une protéine tronquée ou absente.



Discussion



Cette étude visait à caractériser le profil clinique, immunologique et génétique de patients algériens atteints du syndrome de Comèl-Netherton (SCN), une maladie génétique rare et complexe. Nos résultats, obtenus à partir d'une cohorte de sept patients, apportent des données précieuses sur les manifestations de cette affection dans un contexte local, tout en confirmant de nombreuses observations de la littérature internationale.

1. Caractéristiques Cliniques : Un Tableau Polymorphe et Souvent Sévère

L'ensemble de nos sept patients présentait une symptomatologie cutanée et systémique significative, soulignant la sévérité du SCN dès la petite enfance. L'ichtyose et l'érythrodermie congénitale étaient des manifestations quasi-constantes, apparaissant dès la naissance ou dans les premiers mois de vie (Patientes A, C, D, E, F, Patient G), ce qui est en accord avec les descriptions classiques de l'érythrodermie ichtyosiforme congénitale et la desquamation continue (**Bingol et al., 2011**).

La trichorrhexie invaginata "cheveux en bambou", considérée comme un signe pathognomonique (**Blanchard et Prose, 2020**), a été confirmée par examen microscopique chez six de nos sept patients (Patientes A, B, C, D, E, F). L'absence de ce signe chez le Patient G, malgré un diagnostic génétique confirmé, est une observation intéressante. Cela met en lumière la variabilité phénotypique du SCN et rappelle que l'absence d'un signe clinique habituellement caractéristique ne doit pas exclure le diagnostic, surtout en présence d'autres signes évocateurs et d'une confirmation génétique. Des cas de SCN sans trichorrhexie invaginata ont été rapportés, soulignant la diversité d'expression de la maladie.

Les manifestations extra-cutanées étaient également prévalentes et contribuaient significativement à la morbidité. Le retard de croissance staturo-pondérale sévère a été observé chez la Patiente A et la Patiente B, et un "failure to thrive" chez la Patiente E, corroborant la fréquente atteinte digestive et la malabsorption intestinale dans les formes sévères du SCN. La Patiente A souffrait d'une allergie sévère aux protéines du lait de vache et de diarrhée chronique récurrente, des complications gastro-intestinales bien

documentées (**Smith et Barker, 2006**). Les infections récurrentes, notamment respiratoires et sinopulmonaires, étaient une problématique majeure chez plusieurs patients (Patientes A, C, D, F), renforçant l'hypothèse d'une dysfonction immunitaire sous-jacente aggravée par la rupture de la barrière cutanée. La Patiente A a même présenté plusieurs épisodes de septicémie, illustrant la vulnérabilité extrême de ces patients aux infections. L'allergie alimentaire était également notée chez le Patient G.

Une observation notable est la survenue d'une anémie hémolytique auto-immune chez la Patiente A. Bien que non systématiquement rapportée, la dysrégulation immunitaire intrinsèque au SCN peut prédisposer à des manifestations auto-immunes, justifiant un suivi immunologique approfondi au-delà des paramètres standard.

2. Profil Immunologique : Dysrégulation Atopique et Variabilité des Atteintes Cellulaires

Le profil immunologique de notre cohorte a confirmé des caractéristiques connues du SCN, mais a également mis en évidence une certaine hétérogénéité, particulièrement concernant les taux d'IgE.

L'hyper-IgE sérique, une caractéristique quasi-constante du SCN reflétant la diathèse atopique et la réponse immunitaire de type Th2 (**Yamaga et al., 2008**), a été massivement élevée chez la Patiente A (3450,77 UI/ml) et la Patiente F (>2000 UI/ml), confirmant des formes sévères d'atopie. Cependant, des taux d'IgE plus modérés (Patientes C, D, G) voire dans les valeurs de référence (Patiente E : 7,74 UI/ml, Patiente B : 28,7 UI/ml) ont été observés chez d'autres patients. Cette variabilité, notamment un taux d'IgE normal chez la Patiente E malgré un diagnostic génétique et des manifestations cliniques typiques (alopécie, retard de croissance, cheveux en bambou), est une donnée importante. Elle suggère que si l'hyper-IgE est un marqueur fréquent, son absence ne doit pas exclure le diagnostic de SCN et que d'autres mécanismes immunologiques peuvent être prédominants dans certains cas.

L'éosinophilie marquée, présente chez toutes les patientes ayant une formule sanguine détaillée (Patientes A, B, D, E, F, G), est un reflet direct de l'état inflammatoire chronique et de

l'atopie sévère, en lien avec la production de cytokines pro-inflammatoires et la réponse Th2 soutenue par la TSLP (**Briot et al., 2009**).

Concernant les sous-populations lymphocytaires, l'analyse par cytométrie en flux a révélé des anomalies variables mais généralement conformes aux descriptions d'une dysrégulation immunitaire. Bien que les taux d'IgG, IgA et IgM soient généralement dans les valeurs de référence pour l'âge chez la majorité des patients (A, B, E, F, G), les anomalies lymphocytaires sont plus subtiles et méritent une attention particulière. Par exemple, la Patiente A présentait une lymphopénie relative. Le rapport CD4/CD8 était variable, allant de 0,67 (Patiente E, Patient G) à 5,00 (Patiente B). Un déséquilibre en faveur des Th2 est souvent décrit (**Renner et al., 2009 ; Hovnanian, 2013**), et nos données sur les sous-populations, bien que nécessitant une interprétation fine des valeurs absolues et des ratios, sont compatibles avec une altération de l'équilibre immunitaire. La diminution de l'activité des cellules NK et des lymphocytes B mémoires, suggérée par la littérature, n'a pas pu être directement évaluée avec les données fournies mais reste un axe de recherche important dans ce contexte.

3. Profil Génétique : Des Mutations SPINK5 Variées et une Corrélation Génotype-Phénotype Éclairante

L'analyse génétique du gène SPINK5 a permis de confirmer le diagnostic moléculaire chez tous nos patients et de caractériser les types de mutations.

Nous avons identifié quatre types de mutations, toutes prédictives d'une perte de fonction de la protéine LEKTI :

- Mutation non-sens : c.67A>T (p.Lys23Ter) chez la Patiente A. Cette mutation, entraînant un codon stop prématuré très tôt dans la séquence protéique, est typiquement associée à une protéine tronquée et non fonctionnelle, ce qui concorde avec la présentation clinique extrêmement sévère de la Patiente A (ichtyose diffuse, retard de croissance sévère, allergies multiples, septicémie, anémie hémolytique auto-immune). Ceci est en ligne avec les formes graves associées aux mutations nulles (**Sprecher et al., 2004**).
- Mutations par délétion et décalage du cadre de lecture (frameshift) :
c.941_956del (p.Glu314fs) chez la Patiente B.

c.1233del (p.Glu412fs) chez la Patiente C et la Patiente D. L'identification de la même mutation chez les deux sœurs (Patientes C et D) issues d'une famille consanguine renforce la preuve de sa pathogénicité et souligne l'importance des études intrafamiliales.

c.2483del (p.Asp828fs) chez le Patient G. Ces mutations de type frameshift sont également considérées comme des mutations nulles ou quasi-nulles, car elles altèrent gravement la protéine en aval du site de mutation. Les phénotypes observés chez ces patients (ichtyose, alopecie, infections récurrentes, retard de croissance) sont cohérents avec des formes modérées à sévères du SCN.

- Mutation faux-sens : c.2423C>T (p.Thr808Ile) chez la Patiente F. Cette mutation, qui entraîne une substitution d'un acide aminé, est décrite comme pathogène. Selon la littérature, les mutations faux-sens peuvent entraîner des formes plus modérées en permettant une activité résiduelle de LEKTI (**Sprecher et al., 2004**). Cependant, la Patiente F présentait un tableau clinique marqué par des infections respiratoires récurrentes, une érythrodermie et une ichtyose, ainsi qu'une hyper-IgE massive, suggérant que cette mutation, bien que faux-sens, conduit à une perturbation significative de la fonction de LEKTI.
- Mutation d'épissage : c.1888-1G>A (p=0) chez la Patiente E. Ce type de mutation affecte le site d'épissage et est prédictif d'une perte de fonction, confirmant également le diagnostic. La Patiente E présentait des manifestations cutanées et un retard de croissance typiques, malgré un taux d'IgE dans la norme.

Ces résultats confirment la diversité des mutations du gène SPINK5 (plus de 150 répertoriées dans HGMD) et leur impact sur la fonction de LEKTI (**Bitoun et al., 2003**). La corrélation génotype-phénotype est globalement respectée dans notre cohorte : la mutation tronquante précoce (p.Lys23Ter) chez la Patiente A est associée à la forme la plus sévère, tandis que les autres mutations, bien que délétères, peuvent permettre des phénotypes légèrement différents. L'observation chez le Patient G (c.2483del) d'un SCN sans "cheveux en bambou" mais avec une mutation génétique confirmée est un exemple éloquent de cette hétérogénéité phénotypique, soulignant la nécessité d'une approche diagnostique intégrée (clinique, immunologique, et génétique).

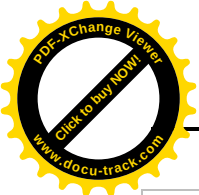
4. Spécificités de la Cohorte Algérienne et Implications

L'étude de cette cohorte algérienne, bien que de taille modeste (n=7), apporte des données locales précieuses. L'importance de la consanguinité est mise en évidence, avec 4 patients (Patientes C, D, E et Patient G) issus de familles consanguines (3ème ou 2ème degré), et deux autres (Patientes A et B) avec des antécédents familiaux de décès similaire (sœur), fortement suggestifs d'une transmission autosomique récessive. Cela est en accord avec votre section d'introduction qui mentionne que la consanguinité, fréquente dans certaines régions, pourrait être un facteur aggravant en Algérie. Ces observations renforcent la nécessité d'un conseil génétique rigoureux pour les familles touchées, afin d'évaluer les risques de récurrence (25% par grossesse) et d'envisager des options de diagnostic prénatal ou préimplantatoire (Bitoun et al., 2002).

Le retard de diagnostic, bien que non explicitement chiffré pour tous, semble être une réalité, avec un diagnostic posé à 6 mois pour la Patiente A et à 4 mois pour la Patiente C, malgré des symptômes néonataux. La Patiente E n'a été diagnostiquée qu'à 10 ans. Ces délais soulignent les défis d'accès au diagnostic et à la prise en charge spécialisée en Algérie, comme vous l'avez mentionné dans votre introduction. Une meilleure sensibilisation médicale et l'intégration du dépistage génétique précoce pourraient améliorer significativement la prise en charge et le pronostic des patients.

Tableau XI: Spectre des variants du gène SPINK5 dans une cohorte de patients atteints du SCN : comparaison avec les données de la littérature et analyse des nouveaux variants. (Bitoun et al, 2002) (Chavanas et al, 2000) et (ClinVar), (ncbi).

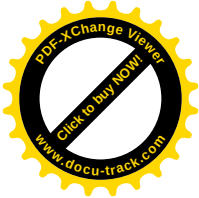
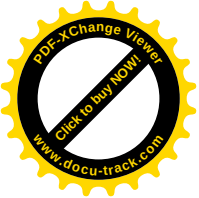
N°	Variant	Type	Déjà Rapporté ?	Phénotype	Pays (Littérature)
1	c.67A>T (p.Lys23Ter)	Nonsense	Oui	Netherton sévère	France, Liban



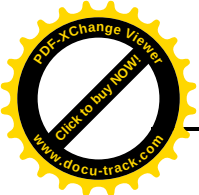
2	c.941_956del (p.Glu314fs)	Délétion 16 pb	Non (Nouveau)	Netherton (attendu)	Non mentionné
3-4	c.1233del (p.Glu412fs)	Délétion 1 pb	Non (Nouveau)	Netherton (attendu)	Non mentionné
5	c.1888-1G>A	Alt. épissage	Oui	Netherton classique	Europe
6	c.2423C>T (p.Thr808Ile)	Missense	oui (Likely Pathogenic)	Phénotype variable (à confirmer)	Non mentionné
7	c.2483del (p.Asp828fs)	Délétion 1 pb	Non (Nouveau)	Netherton (attendu)	Non mentionné

Tableau XII: Corrélation génotype-phénotype dans le SCN : analyse des variants de SPINK5 et leurs implications cliniques.

Type de Variant	Exemple	Phénotype Associé	Données Littérature	Implications Cliniques
Nonsense/Frameshift (N-terminal)	p.Lys23Ter (P1)	Forme sévère (infections précoces, hypo-IgG)	Décrits en France/Liban (Bitoun et al., 2003)	Prise en charge intensive (IgIV, antibiothérapie)
Frameshift(C-terminal)	p.Asp828fs (P7)	Forme atypique (pas de cheveux bambou)	Cas rares, activité partielle (Chavanas et al., 2000)	Surveillance allergies/dermatite
Missense	p.Thr808Ile (P6)	IgE >2000 UI/mL, phénotype variable	Mutations rares, phénotypes atténués (Sales et al., 2020)	Ciblage anti-IgE (dupilumab)
Altération d'épissage	c.1888-1G>A (P5)	Diagnostic tardif (10 ans)	Variant connu en Europe (Raghunath et al., 2004)	Dépistage familial recommandé



Conclusion

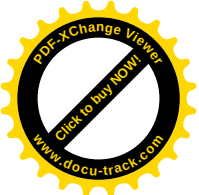


Conclusion

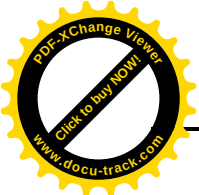
Ce travail académique a eu pour objectif d'analyser le syndrome de Comèl-Netherton (SCN) à travers l'étude des profils cliniques, immunologiques et génétiques de sept patients algériens.

Les résultats obtenus ont confirmé la forte hétérogénéité du SCN. Sur le plan clinique, tous les patients présentaient une ichtyose et une atopie, avec une fréquence élevée de trichorrhexis invaginata et d'infections récurrentes. Immunologiquement, une augmentation des IgE et une diminution des lymphocytes T auxiliaires ont été observées. L'analyse génétique a révélé diverses mutations dans le gène SPINK5, incluant des mutations tronquantes associées à des formes cliniques sévères et des mutations en région C-terminale liées à des phénotypes atypiques.

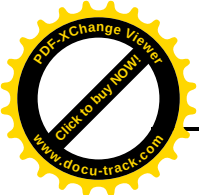
Ces découvertes soulignent l'importance d'une caractérisation moléculaire précise pour affiner le diagnostic du SCN, anticiper la sévérité des manifestations et orienter la prise en charge thérapeutique, en particulier dans les populations à forte endogamie. Ce travail contribue ainsi à une meilleure compréhension de cette maladie complexe dans le contexte algérien, et ouvre la voie à des approches diagnostiques et thérapeutiques plus ciblées.



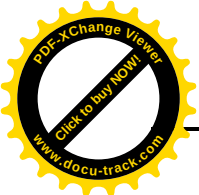
Références bibliographie



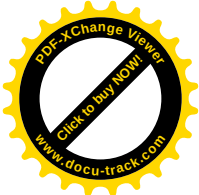
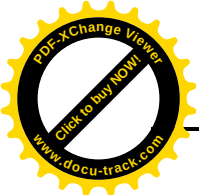
1. Bernard, Cécile, David Roussel, et Élise Lambert. "Corrélations Génotype-Phénotype dans les Mutations du Gène *SPINK5*." *Génétique Moléculaire Humaine* 30, no. 5 (2021) : 200-15.
2. Bingol, A. O., Calka, O., & Karadag, A. S. (2011). Netherton syndrome : A case report and review of the literature. *Dermatology Reports*, 3(1), e5. <https://doi.org/10.4081/dr.2011.e5>
3. Bitoun, E., Chavanas, S., & Prost-Squarcioni, C. (2002). LEKTI proteolytic processing in human primary keratinocytes, tissue distribution and defective expression in Netherton syndrome. *Human Molecular Genetics*, 11(20), 2417–2430. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.20.2417>
4. Bitoun, E., Micheloni, A., & Lamant, L. (2003). LEKTI proteolytic processing in human primary keratinocytes, tissue distribution and defective expression in Netherton syndrome. *Journal of Investigative Dermatology*, 121(6), 1405–1411. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12634.x>
5. Blanchard, B., & Prose, N. (2020). Netherton syndrome : A review of clinical aspects and management. *Pediatric Dermatology*, 37(4), 589–594. <https://doi.org/10.1111/pde.14194>
6. Braff, M. H., Di Nardo, A., & Gallo, R. L. (2005). Keratinocytes store the antimicrobial peptide cathelicidin in lamellar bodies. *Journal of Investigative Dermatology*, 124(2), 394–400. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.23594.x>
7. Briot, A., Deraison, C., & Lacroix, M. (2009). Kallikrein 5 induces atopic dermatitis-like lesions through PAR2-mediated thymic stromal lymphopoietin expression in Netherton syndrome. *Journal of Experimental Medicine*, 206(5), 1135–1147. <https://doi.org/10.1084/jem.20082242>
8. Chavanas, S., Bodemer, C., & Rochat, A. (2000). Mutations in *SPINK5*, encoding a serine protease inhibitor, cause Netherton syndrome. *Nature Genetics*, 25(1), 141–142. <https://doi.org/10.1038/75977>
9. DelveInsight. (2022). *Netherton syndrome – Epidemiology forecast to 2032*. DelveInsight.
10. Descargues, P., Deraison, C., & Prost, C. (2005). Corneodesmosomal cadherins are preferential targets of stratum corneum trypsin- and chymotrypsin-like hyperactivity in Netherton syndrome. *Journal of Investigative Dermatology*, 124(2), 272–279. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.23583.x>



11. Dupont, Jean, Monique Leclerc, et Nicolas Moreau. "Caractéristiques Cliniques et Immunologiques du Syndrome de Comèl-Netherton : Une Revue." *Orphanet Journal of Rare Diseases* 13, no. 1 (2018) : 45.
12. Hovnanian, A. (2013). Netherton syndrome : Skin inflammation and allergy by loss of protease inhibition. *Cell and Tissue Research*, 351(2), 289–300. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1351-6>
13. International Union of Immunological Societies (IUIS). (2023). *Primary Immunodeficiency Diseases: Classification and Diagnostic Criteria*. IUIS.
14. Komatsu, N., Takata, M., & Otsuki, N. (2002). Elevated stratum corneum hydrolytic activity in Netherton syndrome suggests an inhibitory regulation of desquamation by SPINK5-derived peptides. *Journal of Investigative Dermatology*, 118(3), 436–443. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01655.x>
15. Kurban, M., Ghosn, S., & Abbas, O. (2010). Netherton syndrome: Report of identical twins presenting with severe atopic dermatitis. *European Journal of Dermatology*, 20(5), 628–630. <https://doi.org/10.1684/ejd.2010.1039>
16. Lefevre, Sophie. "Hétérogénéité Phénotypique dans le Syndrome de Comèl-Netherton." *Journal de Génétique Médicale* 57, no. 3 (2020) : 123-30.
17. Maillard, H., Bara, C., & Dupuy, A. (2017). Omalizumab therapy for Netherton syndrome : A case report. *JAAD Case Reports*, 3(6), 550–552. <https://doi.org/10.1016/j.jdcrr.2017.07.012>
18. Magert, H. J., Standker, L., & Kreutzmann, P. (1999). LEKTI, a novel 15-domain type of human serine proteinase inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 274(31), 21499–21502. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.31.21499>
19. Martin, Pierre, et Quentin Dubois. "Le Rôle de LEKTI dans la Fonction de Barrière Épidermique." *Journal de Dermatologie Investigatrice* 139, no. 8 (2019) : 1700-07.
20. Netherton, E. W. (1958). A unique case of trichorrhexis nodosa : "Bamboo hairs". *Archives of Dermatology*, 78(4), 483–487. <https://doi.org/10.1001/archderm.1958.01560100049007>
21. Oji, V., Eckl, K. M., & Aufenvenne, K. (2010). Loss of corneodesmosin leads to severe skin barrier defect, pruritus, and atopy : Unraveling the peeling skin disease. *American Journal of Human Genetics*, 87(2), 274–281. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.07.005>



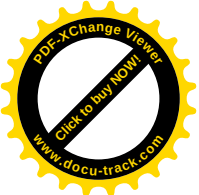
22. Petrova, E., & Hovnanian, A. (2020). Advances in understanding of Netherton syndrome and therapeutic implications. *Expert Opinion on Orphan Drugs*, 8(7), 227–240. <https://doi.org/10.1080/21678707.2020.1788389>
23. Promega Corporation. (2024). *Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit : Protocol and User Guide*. Promega.
24. Renner, E. D., Hartl, D., & Rylaarsdam, S. (2009). Comèl-Netherton syndrome defined as primary immunodeficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124(3), 536–543. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.04.029>
25. Richards, S., Aziz, N., & Bale, S. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants : A joint consensus recommendation of the ACMG and AMP. *Genetics in Medicine*, 17(5), 405–424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
26. Saeki, H., Tsunemi, Y., & Fujita, H. (2020). Dupilumab efficacy in Netherton syndrome : A case series. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 34(8), e355–e357. <https://doi.org/10.1111/jdv.16325>
27. Sang Eun Lee, Kim, J. M., & Lim, Y. (2010). Netherton syndrome with KLK5 and LEKTI deficiency : A pathophysiological study. *Experimental Dermatology*, 19(8), e100–e108. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2010.01126.x>
28. Sarri, C. A., Roussaki-Schulze, A., & Zafiriou, E. (2017). Netherton syndrome : A comprehensive review of clinical aspects. *American Journal of Clinical Dermatology*, 18(6), 779–795. <https://doi.org/10.1007/s40257-017-0283-z>
29. Siemens Healthineers. (2023). *IMMULITE® 2000 XPI IgE Assay : Instructions for Use*. Siemens.
30. Siemens Healthineers. (2023). *Atellica® NEPH 630 Immunoglobulin Assays : Technical Specifications*. Siemens.
31. Smith, C. H., & Barker, J. N. (2006). Netherton's syndrome : A syndrome of elevated IgE and characteristic skin and hair findings. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117(4), 836–841. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.12.1343>
32. Sprecher, E., Chavanas, S., & DiGiovanna, J. J. (2001). The spectrum of pathogenic mutations in SPINK5 in 19 families with Netherton syndrome : Implications for mutation detection and first case of prenatal diagnosis. *Journal of Investigative Dermatology*, 117(2), 179–187. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01403.x>



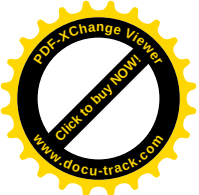
33. Stuvél, K., van Gijn, M. E., & Dalm, V. A. S. H. (2020). Netherton syndrome : A primary immunodeficiency ? *Journal of Clinical Immunology*, 40(1), 24–34. <https://doi.org/10.1007/s10875-019-00690-9>
34. Wang, Y., Wang, L., & Yu, M. (2020). Novel SPINK5 mutations in Netherton syndrome and genotype-phenotype correlation. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 8(6), e1245. <https://doi.org/10.1002/mgg3.1245>
35. Yamaga, K., Kawaguchi, M., & Kato, T. (2008). Increased thymic stromal lymphopoietin levels in Netherton syndrome. *Allergology International*, 57(4), 401–403. <https://doi.org/10.2332/allergolint.08-OA-0019>

Listes des sites :

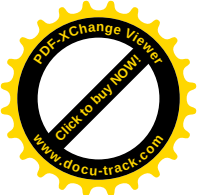
1. ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>).
2. DbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>).
3. Ensembl (<http://www.ensembl.org/>).
4. Gene (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>).
5. Genome browser (<https://genome.ucsc.edu/>).
6. Google scholar (<https://scholar.google.com/>).
7. Mutalyser (<https://www.mutalyser.org/>).
8. Orphanet (<https://www.orpha.net/>).
9. Provean (<http://provean.jcvi.org/>) .
10. PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>).



Les annexes



Annexe 1



Annexe 1

1. Manifestation clinique :

1.1. Symptômes :

Le SCN caractérisée par une triade de symptômes principaux : ichtyose linéaire circonflexe, anomalies des cheveux (trichorrhexis invaginata), et atopie. Les patients présentent souvent une peau sèche, squameuse et sujette à des infections cutanées récurrentes. Des érythèmes et des lésions cutanées sont également fréquents (**Smith et Barker., 2006**)

a. manifestations cutanée

- **Érythrodermie ichtyosiforme congénitale** : Dès la naissance, les nourrissons présentent une éruption cutanée généralisée (érythrodermie) caractérisée par une peau rouge, squameuse et sujette à des infections récurrentes (**Chavanas et al., 2000**).
- **Ichtyose linéaire circonflexe** : Il s'agit d'une forme de cercles ou de spirales (particulièrement d'ichtyose), caractérisée par des plaques érythémateuses (rougeurs) et squameuses, souvent en forme d'anneaux ou de lignes serpigineuses. Les lésions cutanées migrent et évoluent au fil du temps, ce qui les distingue des autres formes d'ichtyose (**Bitoun et al., 2002**).
- **Sécheresse cutanée sévère** : La peau est extrêmement sèche en raison d'une barrière cutanée déficiente, ce qui entraîne une perte excessive d'eau (**Hovnanian, 2013**) et sujette à des infections récurrentes, notamment bactériennes (staphylocoques) et fongiques. (**Smith et Barker 2006**)

b. Anomalies capillaires

Les patients souffrant de SCN présentent des anomalies capillaires notamment ;

- Des cheveux présentant une trichorrhexis invaginata (aussi appelés cheveux en bambou) : des cheveux fragiles et qui se brisent facilement et ils montrent des nodules distinctifs observables au microscope, qui proviennent de l'invagination de la tige pileuse, d'où l'appellation « cheveux en bambou ». (**Chavanas et al., 2000**)
- Alopécie : La chute de cheveux (perte partielle ou complète des cheveux) peut résulter de la

fragilité des cheveux. Il est possible que les sourcils et les cils soient également touchés, apparaissant comme clairsemés ou anormaux. Une diminution partielle ou totale des cheveux peut se produire en raison de leur vulnérabilité accrue (**Renner et al., 2009**).



Figure 01 :Érythrodermie congénitale ichtyosiforme chez un nourrisson atteint du syndrome de Comel-Netherton.



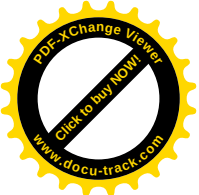
Figure 02 : Trichorrhexis invaginata (cheveux en bambou) et alopecie du syndrome de Comel Netherton

c. Atopie

C'est une caractéristique majeure du SCN. Elle se manifeste par une prédisposition génétique à développer des réactions allergiques :

- Eczéma atopique : Une inflammation cutanée chronique provoquant des démangeaisons intenses, des rougeurs et des squames.
- Asthme : Une inflammation des voies respiratoires entraînant des difficultés respiratoires.
- Rhinite allergique : Une inflammation des muqueuses nasales provoquant des éternuements, un écoulement nasal et une congestion.
- Allergies alimentaires : Des réactions d'hypersensibilité à certains aliments, pouvant provoquer des symptômes cutanés, digestifs ou respiratoires." (**Renner et al., 2009**).

D. Infections cutanées récurrentes



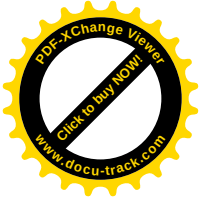
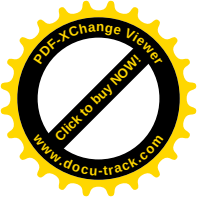
La perturbation de la barrière cutanée chez les patients atteints du SCN les rend particulièrement vulnérables aux infections cutanées, notamment ; Infections bactériennes ; Souvent causées par *Staphylococcus aureus*, elles se manifestent par des impétigos, des folliculites ou des abcès. Infections fongiques ; Des mycoses cutanées, telles que la candidose, peuvent survenir en raison de l'altération de la barrière épidermique. Infections virales : Les patients sont également à risque d'infections virales, comme l'herpès simplex. **(Smith et Barker 2006)**

d. Autres manifestations cliniques

- Un retard de croissance peut survenir en raison de la déshydratation chronique, de la malabsorption nutritionnelle et de l'inflammation systémique. **(Renneret *al.*,2009).**
- Les problèmes gastro-intestinaux sont fréquents chez les patients du SCN, bien que souvent sous-diagnostiqués. Ces problèmes peuvent inclure une malabsorption des nutriments essentiels due à des atteintes intestinales et des symptômes digestifs comme des douleurs abdominales ou de la diarrhée. **(Renneret *al.*,2009).**
- Inflammation de la cornée et de la conjonctive (kérato-conjonctivite) et des paupières (blépharite), souvent liées à l'atopie.**(Oji et *al.*,2010).**
- Une déshydratation sévère et des déséquilibres électrolytiques peuvent survenir en raison de la perte Trans épidermique d'eau. **(Smith et Barker., 2006).**
- Troubles métaboliquesune augmentation des IgE sériques (hyperimmunoglobulinémie E) est souvent observée, reflétant un état atopique et inflammatoire **(Renner et *al.*, 2009).**

3. Les implications infectieuses

L'altération de la barrière cutanée, facilitant l'invasion par des agents pathogènes et une colonisation bactérienne persistante, en particulier par *Staphylococcus aureus* **(Stuvel et *al.*, 2020).** En outre, on constate une altération systémique de la régulation immunitaire : cela englobe une réponse humorale modifiée, une diminution des lymphocytes B mémoire et une réduction de la cytotoxicité des cellules NK, qui participent à une vulnérabilité accrue aux infections cutanées, pulmonaires, intestinales et virales **(Renner et *al.*, 2009).** Notamment, on a signalé des infections cutanées répétées, des pneumonies, des troubles de l'intestin et des infections à papillomavirus humain (HPV). L'altération des Peptides

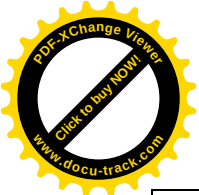


AntiMicrobiens (AMP), notamment par dégradation enzymatique (ex. LL-37, β -défensines), accroît la sensibilité aux agents pathogènes (Briot et al., 2009).

Ces implications sont résumées dans ce tableau

Tableau 1 les implications infectieuses de SCN et le rôle de AMP (Stuvel et al., 2020), (Briot et al., 2009), (Renner et al., 2009),(Fölster-Holst et al., 1999)

Type d'infection	Pathogènes	AMP	Causes	Conséquences clinique
Cutané	Staphylococcus aureus, Candida spp., HSV	Diminution ou dégradation des AMP (LL-37, β -défensines, RNase 7)	Altération de la barrière cutanée ; hyperactivité des kallikréines dégradant les AMP	Impétigo, dermatite infectée, candidose cutanée, herpès chronique
Infections virales cutanées	HPV (types 16, 51, 52)	Affaibli défense antivirale locale compromise	Déficiences des cellules NK et CD8+, réponse antivirale affaiblie	Infection et immflammation chronique
Respiratoire	S. pneumoniae, H. influenzae, virus respiratoires	Défaut d'induction d'AMP dans les muqueuses respiratoires	Déficiences en IgG, altération de la réponse innée (AMP + cellules NK), faible clairance des agents pathogènes	Otites, bronchites, pneumonies récidivantes
Digestif	Giardia, virus entériques, E. coli, Rotavirus	AMP intestinaux (α -défensines, REG3 γ) possiblement	Perméabilité intestinale accrue ; inflammation chronique ;	Diarrhée chronique, malabsorption, perte de poids, déshydratation



		réduits ou mal régulés	altération de la production de mucus et AMP intestinaux	
Systémiques (septicémies)	Bactéries Gram+ et Gram– (ex. Pseudomonas, Klebsiella)	Barrière cutanée compromise + AMP insuffisants = porte d'entrée microbienne	Dissémination de pathogènes cutanés ou digestifs ; immunité humorale et cellulaire défaillante	Bactériémie, fièvre, sepsis, hospitalisation en soins intensifs

Tableau 2:des mutations identifiées dans SPINK5 (syndrome de Comèl-Netherton)

Mutation (p.)	Type	Domaine Kazal impacté	Effet sur la protéine LEKTI	GOF/LOF	Conséquences génétiques principales	Référence
c.2468delA / p.Asn823fs	Frameshift	Kazal 13–15	Protéine tronquée	LOF	ARNm instable, perte de domaines inhibiteurs, dégradation par NMD	Chavanas et al., 2000 (Nat Genet)
c.1431delG / p.Gly477fs	Frameshift	Kazal 8–9	Troncation partielle	LOF	Protéine instable, inhibition incomplète des KLK	Bitoun et al., 2002 (J Invest Dermatol)
c.2015+1G>A	Mutation d'épissage	Kazal 11–12	Exon skipping → forme aberrante	LOF	Protéine mal repliée ou absente, altération de l'épissage	Hovnanian et al., 2000
c.1258_1259insT	Insertion	Kazal 6–7	Frameshift → arrêt prématuré	LOF	Protéine tronquée, perte de la fonction inhibitrice	Komatsu et al., 2002
c.682T>G / p.Leu228Ter	Mutation non-sens	Kazal 4	Arrêt prématuré de la traduction	LOF	Perte de 11 domaines inhibiteurs restants, absence de fonction	Sarri et al., 2017 (Br J Dermatol)
c.957_960delAGTT / p.Glu320fs	Délétion (frameshift)	Kazal 5	Décalage du cadre → perte partielle	LOF	Synthèse d'un fragment incomplet, instabilité protéique	Sprecher et al., 2001
c.1640T>A / p.Leu547Ter	Mutation non-sens	Kazal 9	Troncation	LOF	Perte des derniers domaines inhibiteurs, activité résiduelle faible	Chavanas et al., 2000
c.891+1G>C	Mutation d'épissage	Kazal 4–5	Mauvais épissage	LOF	Protéine anormale, mauvaise régulation des KLK	Bitoun et al., 2003
c.80A>G / p.Asp27Gly	Mutation faux-sens (rare)	Domaine N-terminal	Changement ponctuel (effet discuté)	LOF probable	Altération du repliement ou de la sécrétion, fonction incertaine	Chavanas et al., 2000
Délétion exon 4	Délétion complète	Kazal 2	Perte d'un domaine	LOF	Repliement partiel, réduction de la fonction, perte de stabilité	Sarri et al., 2017
Duplication exons 22–23	Duplication	Kazal 10–11	Extension de la séquence	LOF	Protéine allongée, fonction altérée	Sprecher et al., 2001

Une **mutation de type "loss of function"** (perte de fonction) est une altération génétique qui réduit ou élimine complètement l'activité normale d'un gène. Elle empêche la production d'une protéine fonctionnelle ou rend celle-ci inefficace, perturbant ainsi le rôle biologique du gène.

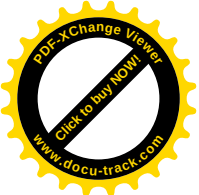
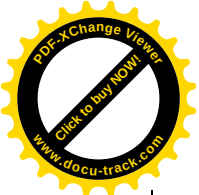
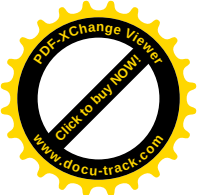


Tableau 3 : diagnostic du syndrome de Comel-Netherton (Chavanas et al, 2000) (Bitoun et al, 2003) (Sarri et al, 2017) (DermNet NZ)

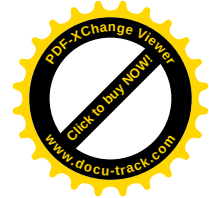
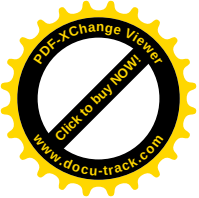
Étape	Examen	Résultat attendu	Commentaires
Clinique	Observation clinique	Érythrodermie néonatale, ichtyose linéaire circonflexe, cheveux cassants, atopie	Souvent les premiers signes visibles dès la naissance.
Trichoscopie	Microscopie des cheveux	Trichorrhexis invaginée (cheveux en "bambou")	Très spécifique du syndrome, visible dès la petite enfance.
Immunologique	Dosage IgE totales	Élévation importante (>2000 UI/ml parfois)	Très fréquente, reflète l'atopie associée.
	Dosage IgG, IgA, IgM	Normales ou parfois diminuées (hypogammaglobulinémie transitoire possible)	Évaluer le statut immunitaire global.
	TBNK panel (CD3, CD4, CD8, CD19, NK)	Souvent normal, mais parfois altération légère du sous-groupe T ou B	À faire si infections fréquentes.
	Cytokines / profil lymphocytaire	Parfois activation chronique (IL-4, IL-5, IL-13 élevés)	Non systématique mais utile en recherche ou cas sévères.
Allergologique	Tests cutanés, IgE spécifiques	Allergies fréquentes (aliments, aéroallergènes, etc.)	Manifestations atopiques importantes.
Génétique	Séquençage SPINK5	Mutation biallélique : homozygote ou double hétérozygote	Confirmation génétique indispensable.



	Autres gènes ichtyosiques (panel NGS)	Négatif si SPINK5 confirmé, mais utile en cas de doute diagnostique	Diagnostic différentiel (par ex. ichtyose congénitale non syndromique).
Biopsie cutanée	Histologie	Hyperkératose, spongieuse, infiltrat lymphocytaire, parfois absence de LEKTI	Parfois utilisée pour orienter le diagnostic avant confirmation génétique.



Annexe 2



Annexe 2

1. Matériels biologiques

1.1 Échantillon

Les prélèvements sanguins constituent un élément central dans l'étude du syndrome de Comel-Netherton. Le sang total, recueilli sur EDTA, permet l'analyse des populations lymphocytaires par cyrtométrie en flux, tandis que le sérum, obtenu par centrifugation, est utilisé pour le dosage des immunoglobulines (IgE, IgG, IgA, IgM) par méthodes immun-enzymatiques ou de chimiluminescence.

Ces échantillons, conservés à -20°C ou -80°C selon les analyses ultérieures, offrent une base essentielle pour évaluer les dysrégulations immunologiques caractéristiques de la maladie, notamment l'hyper-IgE fréquemment observée. Le respect des protocoles de prélèvement et de conservation garantit la fiabilité des résultats.

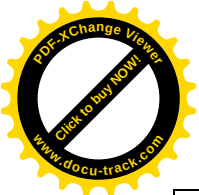
1.2. Réactifs et kits utilisés

Les analyses ont été réalisées à l'aide de réactifs et kits standardisés pour garantir la reproductibilité des résultats. L'extraction d'ADN a été effectuée avec le kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen), tandis que le dosage des IgE sériques a utilisé le système Immuno 2000 xpi (siemens healthinees). Les immunoglobulines G, A et M ont été quantifiées par immuno sur automate Atellica NEPH 630 (siemens healthinees) avec les réactifs Tina-Quant®. Pour la cytométrie en flux, les anticorps monoclonaux marqués (BD Multitest™ 6-Color TBNK) ont permis le phénotypage lymphocytaire. Le séquençage du gène SPINK5 a été réalisé avec le kit BigDye™ Terminator v3.1 (Thermo Fisher) sur séquenceur ABI 3500xl. Tous les réactifs ont été utilisés selon les protocoles des fabricants, avec des contrôles qualité systématiques pour chaque série analytique.

1.3. Matériels non biologiques

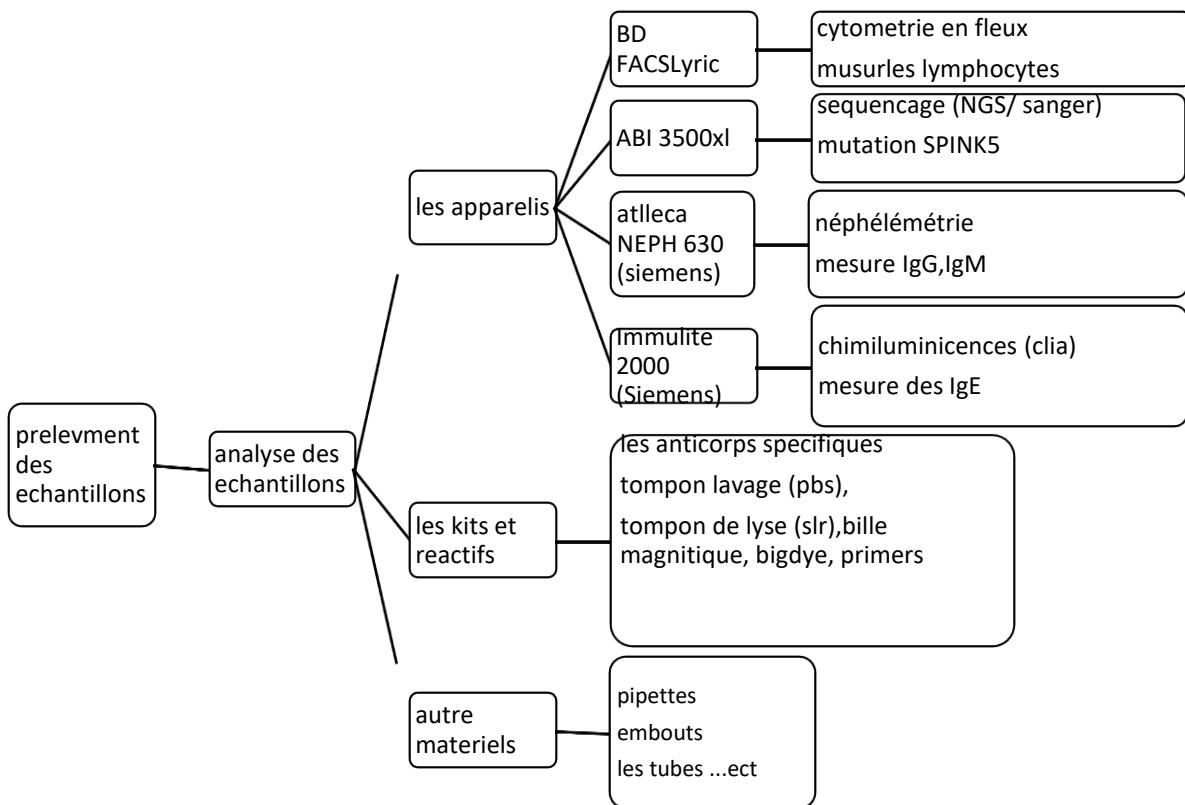
Ils sont résumés dans ce **tableau 4**

Catégorie	Appareil/Matériel	Spécifications/Modèle	Utilité
-----------	-------------------	-----------------------	---------



Cytométrie en Flux	BD FACSLyric	Cytomètre multiparamétrique	Analyse des populations lymphocytaires (T, B, NK)
	Logiciel BD FACSuite	Analyse des données	Interprétation des profils immunologiques
	Tubes 12 × 75 mm	Plastique à fond rond	Contention des échantillons
	Pipettes automatiques	0,5–1000 µL	Distribution précise des réactifs
Dosage des IgE	Immulite 2000 xpi (Siemens)	Chimiluminescence	Dosage précis des IgE totales et spécifiques
Dosage des IgG/IgM	Atellica NEPH 630 (siemens)	Néphélémétrie	Mesure quantitative des IgG/IgM
	Architect i2000SR (Abbott)	Chimiluminescence	Dosage haut débit des immunoglobulines
Matériel Général	Centrifugeuse	-	Préparation des échantillons
	Vortex	-	Homogénéisation
	Glacière/Rack froid	-	Conservation des anticorps/échantillons

Diagramme : résume les matériels utilisé dans nos étude



- | | |
|---------------------------|-----------------------------------|
| ① Réservoir déchets | ④ Port manuel pour tube |
| ② Réservoir de gaine | ⑤ Chargeur universel BD FACS™ |
| ③ Cytomètre BD FACSLytic™ | ⑥ Station de travail BD FACSuite™ |

Figure3 : l'appareil utilisé en cytométrie en flux BD FACSLyric™ et ses composants principaux.



Figure 4 : l'analyseur d'immunoessais Siemens Healthineers IMMULITE 2000 Xpi utilise pour le dosage des IgE (IMMULITE® 2000 XPi.)

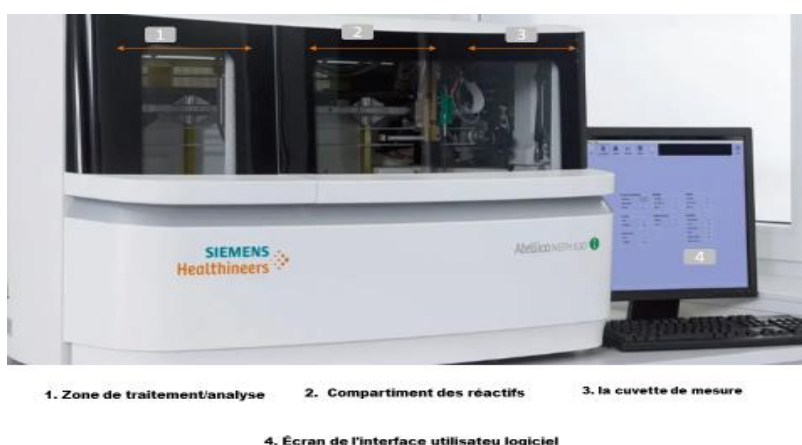


Figure5 : l'analyseur de néphélométrie Siemens Atellica NEPH 630 utilise pour le dosage des IgM, IgG, IgA (Atellica® NEPH 630 system).

Tableau 6 : Séquence Automatisée :

Étape	Action	Durée
Distribution billes	Ajout des microparticules anti-IgE	10-20 sec
Ajout échantillon	Pipetage du sérum du patient	10 sec
Incubation	Agitation à 37°C pour formation du complexe antigène-anticorps	30-60 min
Lavage	4 cycles de lavage pour éliminer les composants non liés	5 min
Ajout substrat	Réaction chimioluminescente (phosphatase alcaline + substrat)	10 sec
Lecture	Mesure de la luminescence (intensité proportionnelle à la concentration)	5min

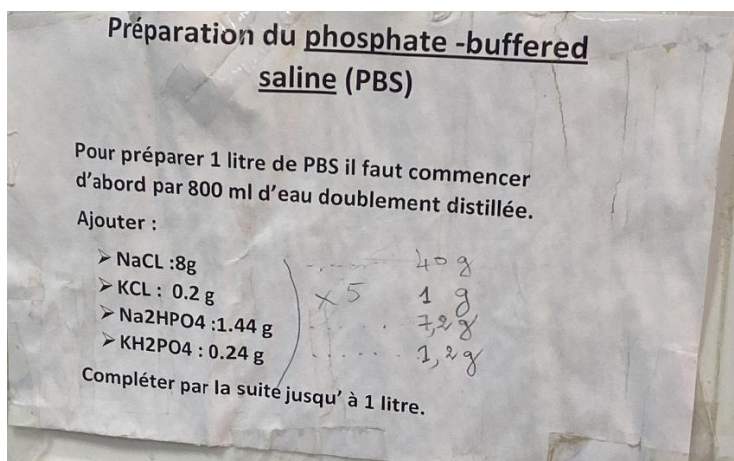


Figure 6: preparation du solution PBS

Tableau 9: Profil des sous-populations lymphocytaires dans le syndrome de Comel-Netherton comparé à un adulte sain

Population Lymphocytaire	Marqueurs Phénotypiques	Adulte Sain	dans le cas du SCN
Lymphocytes T Helper	CD3+ CD4+	30 - 60%	légèrement diminué (25 - 55%)
Lymphocytes T Cytotoxiques	CD3+ CD8+	15 - 35%	dans la normale ou légèrement diminué (10 - 30%)
Lymphocytes B	CD19+	5 - 15%	Généralement dans la normale (5 - 15%)
Cellules NK	CD16+/56+	5 - 20%	Peut varier (5 - 20%)

Les appareils utilisés dans la recherche de mutation et autres



Figure 7: L'extracteur automatique Maxwell de Pro méga.



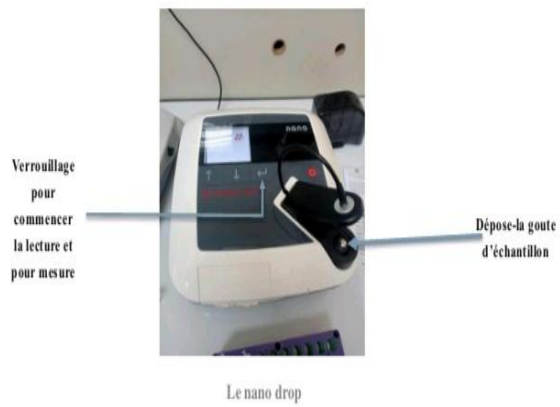


Figure 9: le nano drop

Figure 8: vortex.



Figure10 :centrifugeuse.

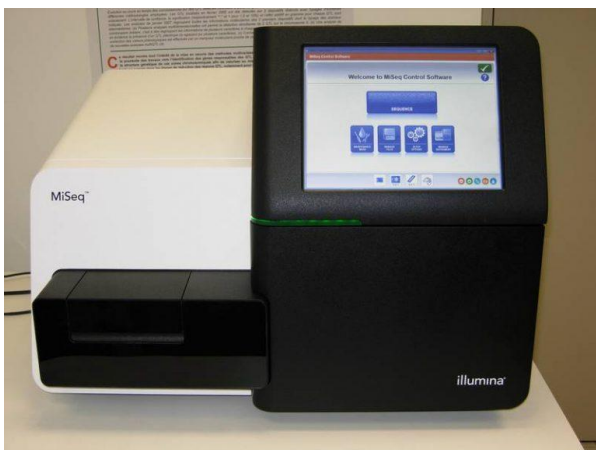


Figure11 :NGS sequinsing

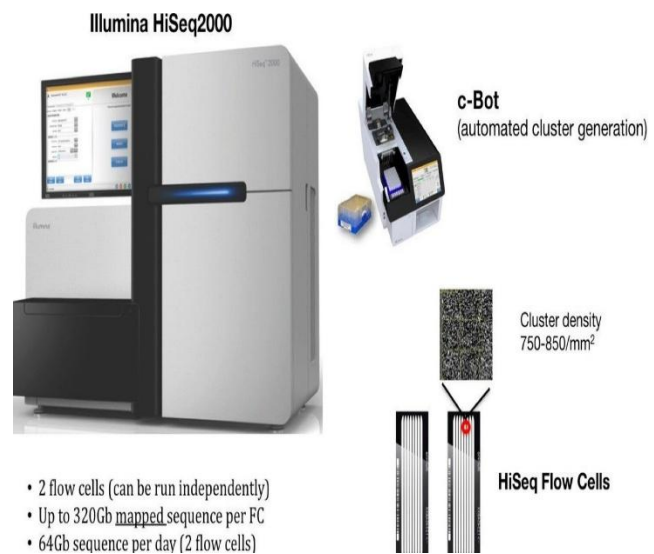
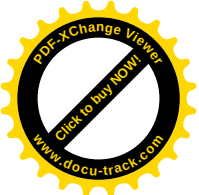


Figure 12:illumina HiSeq 2000



Annexe 3

Annexe 3:1 les protocoles detaillés

4. Recherche des mutations du gène *SPINK5* par Séquençage

5. Extraction de l'ADN génomique

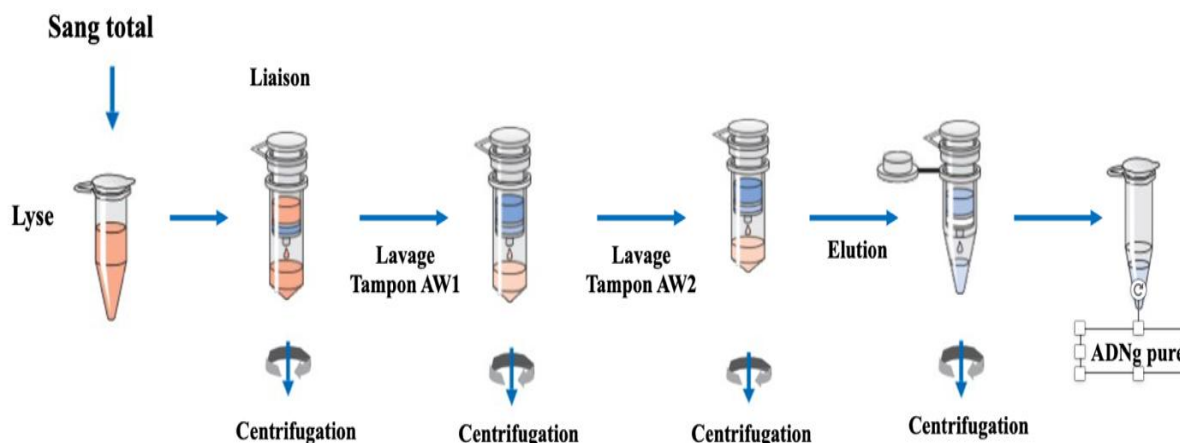


Figure13 : les étapes de l'extraction manuelle de l'ADN génomique

Séquençage Sanger

Procédure de séquençage sur SeqStudio™

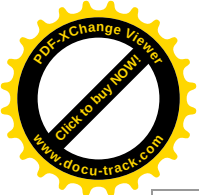
Le séquençage Sanger sur le SeqStudio™ suit un ensemble d'étapes standard qui permettent d'obtenir une lecture précise de l'ADN.

Tableau 7 Composants utilisés par cycle de réaction de séquençage

Composant	Quantité	Volume
Mélange réactionnel prêt Big Dye Terminator 3.1	8 µL	8 µL
Amorce de séquençage	3,2 pmoles	1 µL
Eau (qualité biologie moléculaire)	Variable	9 µL
Template	Variable selon la concentration du template	11 µL

Tableau 8 Quantités d'ADN recommandées par réaction

Taille du produit PCR	Quantité
100 à 200 pb	2 à 6 ng/µL



200 à 500 pb	6 à 20 ng/μL
500 à 1000 pb	10 à 40 ng/μL
1000 à 2000 pb	20 à 80 ng/μL
>2000 pb	40 à 100 ng/μL

- Les mélanges réactionnels peuvent être transférés dans des tubes PCR ou des plaques 96 appropriées ; mélanger délicatement et procéder au séquençage du cycle.
- Placer les tubes dans un thermocycleur ProFlex™ PCR system et effectuez la réaction de séquençage du cycle en suivant les conditions énumérées dans le tableau ci-dessous.
- Les échantillons doivent être purifiés ou stockés dans des conteneurs qui minimiseront l'exposition à la lumière à -20 °C.

Tableau 9 Paramètres de réaction de séquençage du cycle

Paramètre	Température	Temps (sec)	Cycles	Temps de rampe
Incubation	96°C	60	25 cycles	/
Dénaturation	96°C	10		1s
Recuit	50°C	5		
Prolongation	60°C	240		
Hold	4°C	Jusqu'à purification		

Tableau 10 Exécuter les modules, les longueurs de lecture et les durées d'exécution appropriées

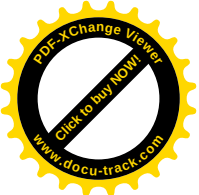
	Longueur de lecture continue	Durée d'exécution approximative
ShortSeq	≥350 pb	30 minutes
MediumSeq	>500 pb	45 minutes
LongSeq	>800 pb	120 minutes

Visualisation et analyse des séquences d'ADN

protocole de préparation de la librairie pour séquençage de l'exome entier (WES)

❖ Matériels, équipements, consommables et réactifs utilisés

- Système AMPure XP (billes SPRI) (Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

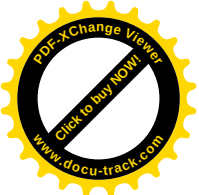


- Tampon de liaison SPRI (PEG 20%, NaCl 2,5M) : Préparation de 40% PEG8000 en pesant 16 g de PEG dans un tube conique stérile de 50 mL. Apporter le volume jusqu'à 40µL avec de l'eau sans nucléase. Agiter sur un agitateur à plaques pendant 4 h ou toute la nuit. Mélanger des volumes égaux de 5 M NaCl et 40% de PEG pour 20% de PEG, 2,5M de solution de NaCl. Bien vortexer et laisser les bulles d'air se déposer avant utilisation. Conserver à 4 °C et ramener à température ambiante avant utilisation.
- Tampon d'élution SPRI : Tris-HCl 20 mM, pH 8 ou le tampon Qiagen EB (Qiagen, Germantown, MD, USA) : Tris-HCl 10 mM, pH 8,5.
- Support magnétique
- Sonicateur Covaris (LE220) (Covaris, Woburn, MA, USA).
- Bioanalyseur 2100 (Agilent, Santa Clara, Californie, États-Unis).
- Ensemble maître de préparation de bibliothèque d'ADN NEBNext pour Illumina (NEB, Ipswich, MA).
- KAPA HiFi HotStart ReadyMix (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA) : KAPA HiFi HotStart DNA Polymerase dans un tampon de réaction exclusif, dNTP (0,3 mM de chaque dNTP à 1 ×), MgCl₂ (2,5 mM à 1 ×) et des stabilisateurs.
- Kit de test Qubit dsDNA BR (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).
- Roche NimbleGen SeqCap EZ Exome v3 (Roche, Indianapolis, IN, États-Unis).
- ADN humain COT, qualité fluorométrique 1 mg/mL, 1 ml (Roche, Indianapolis, IN, USA).
- Dynabeads M-270 Streptavidine (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).
- NanoDrop ND-1000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, États-Unis).
- Fluoromètre Qubit (Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA).
- Mélange maître SYBR Green PCR (Roche Molecular Systems, Ct # 04707516001).
- Système PCR en temps réel ABI 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, Californie, États-Unis).
- Eau sans nucléases (Life Technologies 10977-015)

a. Purification et sélection de la taille de l'ADN

Les billes d'immobilisation réversible en phase solide (SPRI, Système AMPure XP) ont été utilisées pour une purification efficace et une sélection de la taille d'ADN. Ce système est parfaitement adapté à la purification à partir de faibles concentrations d'ADN, est facile à utiliser et peut être automatisé, facilitant ainsi la purification de l'ADN à haut débit et la sélection de la taille.

b. Fragmentation aléatoire de l'ADN génomique par sonication

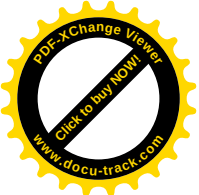


Nous avons utilisé la fragmentation ultrasonique de l'ADN basé sur Covaris pour la préparation de la librairie WES selon les étapes suivantes :

- a. Transférer 0,5 à 3 µg d'ADNg dans 120 µL d'eau sans nucléase dans des microtubes Covaris.
- b. Vortexer brièvement les microtubes contenant des échantillons d'ADN, puis centrifuger pour éliminer les bulles d'air. Si des bulles d'air subsistent, une deuxième étape de centrifugation est nécessaire.
- c. Placer les microtubes dans le portoir microtube, puis placez le portoir dans la chambre de sonication. Nous avons utilisé les paramètres suivants pour obtenir une plage de taille d'ADN de 150 à 400 pb, avec une taille de pic moyenne comprise entre 200 et 250 pb : temps = 600 secondes, duty= 5%, intensité = 2, cycle par rafale = 50
- d. Une fois la fragmentation terminée, retirer la plaque de fragmentation du sonicateur, essuyez l'eau de l'extérieur des tubes et centrifuger.
- e. Pour chaque échantillon, transférer l'ADN fragmenté dans un tube Eppendorf de 1,5 mL.
- f. Évaluer la qualité de l'ADN génomique fragmenté à l'aide d'un bioanalyseur Agilent 2100 : analysez l'ADN fragmenté sur la puce ADN HS à l'aide du bioanalyseur pour déterminer la taille de l'ADN fragmenté

c. Purification de l'ADN fragmenté

- Les billes AMPure XP doivent être retirées du stockage à 4 °C, au moins 30 minutes avant utilisation, pour leur permettre de s'équilibrer à température ambiante.
- Bien mélanger les réactifs pour que la suspension de billes apparaisse homogène.
- Aliquoter 216 µL de billes AMPure XP entièrement remises en suspension à température ambiante dans un tube Eppendorf (un tube par échantillon).
- Pour chaque échantillon, transférer le volume total d'ADN fragmenté (0,5 à 3 µg dans ~119 µL) du tube Covaris dans un tube Eppendorf contenant des billes AMPure XP (le volume de billes ajouté est de 1,8 x le volume d'ADN d'origine).
- Bien mélanger et incubé à température ambiante pendant 5 min en mélangeant de façon intermittente à l'aide d'une pipette pour maintenir les billes en suspension pendant tout le temps.
- Centrifuger les tubes pendant 1 min à 3000 x g, puis les placer sur un support magnétique pendant 3 min ou jusqu'à ce que la solution soit claire.
- Sans mélanger les billes, retirer 330 µL du surnageant et le jeter.



- En gardant les tubes dans le support magnétique, verser 400µL d'éthanol à 70% fraîchement préparé dans chacun et incubé pendant 30 secondes.
- Retirer et jeter l'éthanol et tout surnageant restant.
- Sécher les billes à 37 °C pendant 5 min ou jusqu'à ce que l'éthanol résiduel soit évaporé.
- Ajouter 42,5 µL de tampon d'élution SPRI et remettre les billes en suspension en pipetant doucement.

d. Réparation de la librairie de séquençage de l'ADN du génome entier (ADNg)

Le kit NEB Next™ DNA Sample Prep a été utilisé pour construire la librairie à partir de l'ADN fragmenté. Ce kit contient des mélanges de master mixés d'enzymes et de réactifs pour la réparation finale de l'ADN fragmenté, le dA-tailing, la ligature d'adaptateurs d'oligonucléotides synthétiques et l'amplification de l'ADN ligaturé par l'adaptateur, à l'aide d'amorces PCR à code-barres spécifiques à l'adaptateur, pour obtenir la librairie d'ADNg finale. Après chacune de ces quatre étapes, l'ADN a été purifié à l'aide de billes AMPure, en sélectionnant un tampon de liaison avec la concentration appropriée de PEG et de NaCl.

e. Réparation des extrémités de l'ADN fragmenté

L'ADN fragmenté purifié lié aux billes de l'étape **k** ci-dessus a été utilisé pour la création de l'ADN à extrémités franches par réparation des extrémités.

- Pour chaque échantillon, préparer le mélange réactionnel de réparation d'extrémité comme suit :

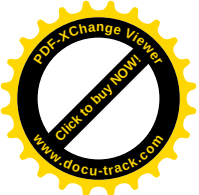
réactifs	volume à ajouter
tampon de réaction de réparation NEB Next End (10 ×)	1µL
mélange d'enzymes de réparation NEBNext End	5µL
ADN fragmenté lié aux billes AMPure	25µL
volume total	30µL

- Incuber dans un thermocycleur ProFlex™ PCR system pendant 30 min à 20 °C pour terminer la réaction de réparation finale.

f. Purification de l'ADN réparé

Avant d'utiliser l'ADN à extrémités réparées, il a été purifié comme suit :

- Ajouter 90µL de solution de tampon de liaison SPRI Agencourt AMPure XP (20% PEG-2,5M NaCl) aux 50 µL du mélange réactionnel de réparation finale pour lier l'ADN aux billes.



- Pipeter de haut en bas 20 fois pour remettre les billes en suspension et incuber à température ambiante pendant 5 min.
- Centrifuger le tube pendant 1 min à 3000 x g. Placer le tube sur le support magnétique pendant 3 min ou jusqu'à ce que la solution soit claire.
- Sans mélanger les billes, retirer 135 µL de surnageant et jeter-le. Un petit volume de surnageant sera laissé dans chaque puits.
- Continuer à maintenir le tube sur le support magnétique et ajouter 200 µL d'éthanol à 70% fraîchement préparé, incubez pendant 30 secondes puis jeter l'éthanol.
- Répéter l'étape (e) pour un total de deux lavages à l'éthanol.
- Sécher les échantillons à température ambiante pendant 10 min ou jusqu'à ce que l'éthanol résiduel s'évapore complètement.
- Ajouter 42 µL de tampon d'élution SPRI et pipeter de haut en bas 15 fois pour remettre les billes en suspension. L'ADN lié aux billes est maintenant prêt pour le dA-tailing.

g. Ajout de désoxyadénine à l'extrémité 3' de l'ADN (dA-Tailing)

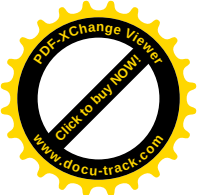
- Préparer le mélange réactionnel dA-tailing à l'aide des réactifs du NEBNext DNA Library Prep Master Mix Set pour Illumina comme suit :

Réactifs	Volume à ajouter
NEBNext dA-Tailing Reaction Buffer (10 ×)	5µL
Fragment de Klenow (3' → 5' exo ⁻)	3µL
Mélange ADN-billes après l'étape de réparation finale	42µL
Volume total	50µL

- Incuber le mélange réactionnel à 37 °C pendant 30 min pour obtenir des fragments d'ADN avec des surplombs (overhangs) de dA à l'extrémité 3'.

h. Nettoyage l'ADN à queue desoxy-Adenine (dA-tailed)

- Ajouter 90 µL de PEG à 20 %, NaCl 2,5 M à environ 50 µL de mélange réactionnel d'ADN à queue dA, puis mélanger soigneusement le contenu à l'aide d'une pipette et incubé à température ambiante pendant 5 min.
- Centrifuger le tube à 3 000 x g. Placer le tube sur le support magnétique pendant 3 min ou jusqu'à ce que la solution soit claire.
- Sans mélanger les billes, retirer 135 µL de surnageant et jeter-le. Un petit volume de surnageant sera laissé dans chaque puits.
- Continuer à maintenir le tube sur le support magnétique et ajouter 200 µL d'éthanol à 70 % fraîchement préparé, incubé pendant 30 secondes puis jeter l'éthanol.



- Répétez l'étape (d) pour un total de deux lavages à l'éthanol.
- Sécher les échantillons à 37 °C pendant 5 min ou jusqu'à ce que l'éthanol résiduel soit complètement évaporé.
- Ajoutez 25 µL de tampon d'élution Qiagen et pipetez de haut en bas 15 fois pour remettre les billes en suspension.

i. Ligation des adaptateurs Illumina à l'ADN à queue dA

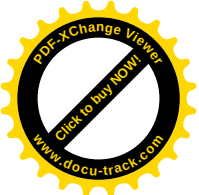
- Préparer le mélange réactionnel de ligation de l'adaptateur comme suit :

Réactifs	Volume à ajouter
Tampon de réaction de ligation rapide NEBNext (5 ×)	10µL
Adaptateur multiplex d'ADN (10 µM)	10µL
ADN ligase Quick T4	5µL
Eau sans nucléases	25µL
Volume total	50µL

Les séquences d'adaptateurs sont présentées dans le **tableau suivant**.

Tableau 11 Séquences de l'adaptateur Illumina ligaturées à l'ADNg à queue dA

Nom de l'amorce	Séquence (5'→3')	Direction
Multiplex adap. 1	P-GATCGGAAGAGCACACGTCT	
Multiplex adap. 2	ACACTCTTTCCCTACACGACGTCTCTTCCGATC*T	
PE PCR amorce-F	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTT CCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	F
PE PCR amorce-R	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT[CGTGAT] GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	R
PE PCR amorce F-BLOCK	AATGATACGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCC TACACGACGCTCTTCCGATCT	F
Idx01-Long-BLOCK	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT[CGTGAT*] GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	R
IS 5	AATGATACGGCGACCACCGA	F
IS 6	CAAGCAGAAGACGGCATACGA	R



NEBNext Universal PCR Primer (F) et un exemple NEBNext Index Primer (R) (lignes 3 et 4). Oligos bloquants utilisés lors de l'étape de capture de l'exome (lignes 5 et 6). Amorces PCR utilisées pour l'amplification post-capture de la bibliothèque WES (lignes 7 et 8). La séquence d'index des oligos bloquants est la même que celle utilisée pour le NEBNext Index Primer dans la préparation de la bibliothèque d'ADNg pour un échantillon donné. Les séquences d'index sont affichées entre crochets. *indique une liaison phosphorothioate

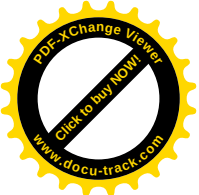
- Incuber pendant 60 min à 20 °C pour permettre la ligation.

j. Nettoyage et sélection de la taille de l'ADN ligaturé par l'adaptateur

- Ajouter 60 µL de tampon de liaison SPRIAgencourt AMPure XP à 50 µL de mélange réactionnel de ligation d'adaptateur pour obtenir un rapport de 1,2X tampon de liaison SPRI/billes au mélange de ligation.
- Bien mélanger en vortexant brièvement chaque tube puis incuber à température ambiante pendant 5 min. Placer les tubes dans le support magnétique pendant 3 min ou jusqu'à ce que la solution devienne claire.
- Sans mélanger les billes, retirer le surnageant et jeter-le. Un petit volume de surnageant sera laissé dans chaque puits.
- Continuer à maintenir le tube sur le support magnétique et ajoutez 200 µL d'éthanol à 70% fraîchement préparé, incuber pendant 30 secondes puis jeter l'éthanol.
- Répétez l'étape d pour un total de deux lavages à l'éthanol.
- Sécher l'échantillon à 37°C pendant 5 min ou jusqu'à ce que l'éthanol résiduel soit complètement évaporé.
- Ajouter 20 µL d'eau sans nucléases et pipeter de haut en bas 15 fois pour remettre les billes en suspension et incuber pendant 5 min à température ambiante, en pipetant par intermittence pour maintenir les billes en suspension.
- Centrifuger puis placer le tube sur le support magnétique pendant 3 minutes ou jusqu'à ce que la solution soit claire.
- Transférez l'éluât (~ 20 µL) dans un nouveau tube PCR et jeter les billes.

k. Amplification de la librairie d'ADNg

La quantité de librairie d'ADNg ligaturée par un adaptateur était trop faible pour procéder à la capture de l'exome par hybridation en solution. Ceci a nécessité une amplification par



quelques cycles de PCR pour obtenir un rendement ≥ 500 ng. Cette amplification a été faite selon les étapes suivantes :

- Préparer le mix PCR dans une hotte pré-PCR (afin de réduire le risque de contamination par des produits PCR en aérosol) comme suit :

Réactifs	Volume à ajouter
KAPA HiFi HotStart ReadyMix	25 μ L
Amorce PCR directe (10 μ M)	2,5 μ L
Amorce inverse indexée amorce (10 μ M)	2,5 μ L
ADN ligaturé par adaptateur	20 μ L
Volume total	50 μ L

Les séquences d'amorces PCR sont présentées dans le tableau précédent.

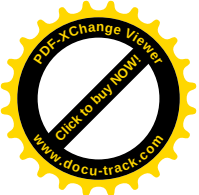
- Placer les tubes dans un thermocycleur ProFlex™ PCR system et effectuez le programme suivant : 98 °C pendant 5 min (dénaturation), suivi de 8 cycles à 98 °C pendant 1 min, 60 °C pendant 30 secondes et 72 °C pendant 45 secondes (amplification), puis terminer par 72 °C pendant 10 min (prolongation). Maintenir à 4 °C jusqu'à l'étape suivante.
- Nettoyage de 50 μ L d'ADN amplifié par PCR en utilisant 60 μ L de billes AMPure XP comme décrit précédemment.
- Éluer l'ADN dans 30 μ L de tampon d'élution SPRI.

Avant de procéder à l'enrichissement de l'exome, la vérification de la quantité et la taille de la librairie d'ADNg sur le bioanalyseur Agilent™ 2100 et que les amorces PCR ont été supprimées. Les caractéristiques suivantes sur l'électrophérogramme ont été fournies par le bioanalyseur :

- Concentration de chaque librairie.
- Taille moyenne de la librairie.
- Tous les autres sommets en dehors de la librairie.

Pour la plupart des échantillons, la majorité de l'ADNg obtenu après la fragmentation initiale aurait dû avoir une taille comprise entre 200 et 250 pb. Ainsi, la taille moyenne du pic de la librairie finie doit être entre 325 à 350 pb, ce qui convient au séquençage.

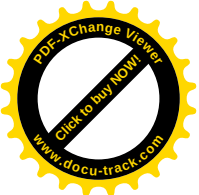
Si, pour une raison quelconque, la librairie présente une large plage de poids moléculaires ou présente un pic supérieur à 400 paires de bases, il faut utiliser un autre protocole pour supprimer l'ADN de poids moléculaire élevé de la librairie gDNA Seq.



l. Élimination de l'ADN de poids moléculaire élevé de la librairie d'ADNg

- Retirer un tube de stock de billes AMPure XP du stockage à 4 °C et le laisser s'équilibrer à température ambiante.
- Centrifuger la plaque d'échantillon à 300 x g pendant 30 secondes pour s'assurer que tous les composants sont collectés au fond de chaque puits.
- À 30 µL de librairie WES amplifiée par PCR, ajouter 19,5 µL de billes AMPure. Il s'agit d'un rapport de 0,65X entre les billes et le volume de l'échantillon optimal pour lier l'ADN de haut poids moléculaire dans la librairie.
- Pipeter de haut en bas 20 fois pour remettre les billes en suspension.
- Incuber à température ambiante pendant 5 min en mélangeant de manière intermittente par pipetage doux.
- Centrifuger le tube pendant 1 min à 3000 x g puis placer le tube sur le support magnétique pendant 3 min ou jusqu'à ce que la solution soit claire.
- Transférer le surnageant contenant environ 350 pb non-liées de l'ADN de la librairie WES dans un nouveau tube Eppendorf. Ajouter 16,5 µL de billes AMPure à l'ADN présent dans le surnageant pour obtenir un rapport de 1,2X entre les billes et le volume de l'échantillon.
- Répéter les étapes (e) et (f).
- Sans mélanger les billes, retirer 40 µL de surnageant et le jeter. Un petit volume de surnageant sera laissé dans le tube.
- Maintenir le tube sur le support magnétique et ajouter 200 µL d'éthanol à 70 % fraîchement préparé, incubez pendant 30 secondes puis jeter l'éthanol.
- Répétez l'étape (j) pour un total de deux lavages à l'éthanol.
- Sécher les échantillons dans un incubateur à 37 °C pendant 5 min ou jusqu'à ce que l'éthanol résiduel soit évaporé.
- Ajouter 20 µL d'eau sans nucléase et pipetez de haut en bas 15 fois pour remettre les billes en suspension.
- Répéter les étapes (e) et (f).
- Transférer l'éluât (~20 µL) dans un nouveau tube Eppendorf de 1,5 mL. Passer une partie de l'ADN élué sur un bioanalyseur pour déterminer la taille et estimer la concentration. Il s'agit de la dernière librairie d'ADNg prête pour l'enrichissement de l'exome).
- Conserver la librairie d'ADNg à -20 °C jusqu'à l'étape d'enrichissement de l'exome.

m. Enrichissement du contenu exonique de la librairie d'ADNg



La procédure d'enrichissement de l'exome a été effectuée à l'aide du kit de réactifs Roche SeqCap EZ Exome v3. Cette méthode de capture est basée sur une solution utilisant une conception de capture de séquence de 64 mégabases basée sur la construction du génome humain GRCh37/hg19.

n. Hybridation de la librairie d'ADNg avec le système de capture Exome

Avant de commencer la procédure de capture de l'exome, les étapes suivantes ont été effectuées :

- Régler un bloc chauffant à 95 °C et le laisser s'équilibrer.
- Retirer un nombre approprié d'aliquotes du pool SeqCap Exome Oligo de 4,5 µL (1 par capture) du stockage à -65 °C et les laisser décongeler sur la glace. Décongeler à température ambiante l'ADN COT et les oligos bloquants stockés au congélateur. Mettre en place une pré-hybridation comme suit :

réactifs	volume à ajouter
DN COT (1 mg/mL)	µL
ligo bloquant F (1 mM)	µg
ligo bloquant inverse indexé (1 mM)	µL
10 à 750 ng de librairie d'ADNg	1-15 µL

- Lyophiliser la librairie d'échantillons amplifiés/COT DNA/PE-HE Oligos dans un concentrateur d'ADN sous vide à 65 °C.
- Ajouter 7,5 µL de tampon d'hybridation SC 2X et 3 µL de composant d'hybridation SC.
- Boucher et vortexer le tube pendant 10 secondes puis centrifuger pendant 10 secondes.
- Placer les échantillons dans un bloc chauffant à 95 °C pendant 10 min pour dénaturer l'ADN, puis centrifuger par impulsion dans une microcentrifugeuse.
- Transférer environ 10,5 µL de librairie d'échantillons amplifiés/COT DNA/PE-HE Oligos/Cocktail d'hybridation vers l'aliquote de 4,5 µL du pool d'oligonucléotides SeqCap EZ Exome v3 qui a décongelé sur la glace.
- Vortexer brièvement le contenu du tube et centrifuger à vitesse maximale pendant 10 secondes.
- Incuber dans un thermocycleur (avec un couvercle chauffant) à 47 °C pendant 64 à 72h

o. Lavage et récupération des échantillons hybridés

Étape 1 : Préparer les tampons de lavage de capture de séquence

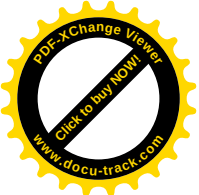
- Diluer le tampon de lavage strict, les tampons de lavage concentré (I, II et III) et le tampon de lavage de billes pour créer 1 solution de travail, comme indiqué dans le **tableau ci-dessous**. Les valeurs du tableau concernent une seule capture d'exome. Pour plus de captures d'exomes, multipliez simplement chaque volume par le nombre d'échantillons.
- Préchauffer le tampon de lavage strict 1x et un tiers du volume du tampon de lavage I à 47°C dans un bain-marie.

Tableau 12 Préparation de tampons de lavage pour le lavage et la récupération d'échantillons hybridés à l'aide de Streptavidine Dynabeads.

Stock tampon concentré	Volume de tampon concentré pour 1×	Volume d'eau pour 1×	Volume total
Tampon de lavage strict 10X (flacon 4)	40 µL	360µL	400µL
Tampon de lavage I 10x (flacon 1)	30 µL	270µL	300µL
Tampon de lavage II 10x (flacon 2)	20 µL	180µL	200µL
Tampon de lavage III 10x (flacon 3)	20 µL	180µL	200µL
Tampon de lavage des billes 2,5X (flacon 7)	200 µL	300µL	500µL

Étape 2 : Préparer les Streptavidine Dynabeads

- Laisser les Streptavidine Dynabeads M270 s'équilibrer à température ambiante pendant 20 minutes avant utilisation.
- Mélanger soigneusement les billes au vortex pendant 1 min.
- Aliquoter 100 µL de billes par capture dans un seul tube de 1,5 mL (c-à-d, pour une capture)
- Centrifuger le tube de 1,5 mL à vitesse maximale pendant 10 secondes dans une microcentrifugeuse, puis placer le tube sur un support magnétique. Lorsque les billes se séparent et que le liquide devient clair, retirer et jeter soigneusement le liquide sans mélanger les billes. Toutes les traces restantes de liquide seront éliminées lors des étapes de lavage ultérieures.
- Retirer le tube de 1,5 mL du support magnétique et ajouter deux fois le volume initial de billes de 1× Bead Wash Buffer (c-à-d que pour une capture, ajouter 200 µL de tampon)
- Vortexer pendant 10 secondes, puis centrifuger à pleine vitesse pendant 10 secondes.
- Remettre le tube sur le support magnétique pour lier les billes. Encore une fois, une fois clair, retirer et jeter le liquide.



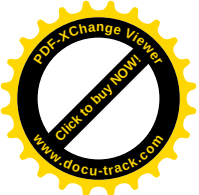
- Répéter les étapes (**e** à **g**) pour un total de deux lavages.
- Après avoir retiré le tampon après le 2^{ème} lavage, remettre les billes en suspension en les mélangeant au vortex dans 1× le volume d'origine en utilisant le tampon de liaison et de lavage Streptavidine Dynabead préparé à l'étape 1 (c-à-d que pour une capture, utiliser 100 µL de tampon).
- Aliquoter 100 µL de billes remises en suspension dans un nouveau tube PCR individuel ou un tube en bandelette.
- Utilisez la plaque magnétique à 96 puits pour lier les billes en plaçant le tube sur l'aimant pendant 5 min. Retirer et jeter le liquide lorsqu'il est clair.
- Les Streptavidine Dynabeads sont maintenant prêtes à se lier à l'ADN capturé. Retirer les tubes contenant les billes de la plaque magnétique.

Étape 3 : Lier l'ADN aux streptavidine Dynabeads

- Transférer environ 15 µL de librairie d'échantillons amplifiés/COT DNA/PE-HE Oligos/Cocktail d'hybridation aux Streptavidin Dynabeads préparées à l'étape 2.
- Mélanger soigneusement en pipetant de haut en bas 10 fois.
- Lier l'échantillon capturé aux billes en plaçant les tubes contenant les billes et l'ADN dans un thermocycleur à 47 °C pendant 45 min. Mélanger les échantillons au vortex pendant 3 secondes toutes les 15 min pour garantir que les billes restent en suspension

Étape 4 : Laver l'ADN lié à la streptavidine Dynabeads Plus

- Si plus de huit captures sont lavées, transférer la totalité du contenu (~ 115 µL) de chaque tube dans une plaque à 96 puits profonds. Si moins de huit captures sont lavées, les échantillons peuvent rester dans des tubes en bandelettes.
- Placer le tube barrette ou la plaque à 96 puits profonds sur l'aimant. Retirez le surnageant immédiatement une fois clair.
- Ajoutez 100 µL de tampon de lavage I préchauffé à 47 °C.
- Boucher les tubes ou sceller la plaque et mélanger au vortex pendant 10 secondes.
- Placer les tubes ou la plaque sur l'aimant pour lier les billes. Retirer et jeter le liquide immédiatement une fois clair.
- Retirer les tubes ou la plaque de l'aimant et ajoutez 200 µL de tampon de lavage rigoureux préchauffé à 47 °C. Pipeter de haut en bas 5 fois pour mélanger.
- Incuber à 47 °C pendant 5 min. Si les captures se font dans une plaque de 96 puits de profondeur, utiliser une chambre d'incubation. Si les échantillons sont dans un tube en bandelette, utiliser un bloc PCR avec couvercle chauffant.



- Répéter les étapes (e à g) pour un total de deux lavages avec le tampon de lavage strict chauffé à 47 °C.
- Placer les tubes ou la plaque sur l'aimant pour lier les billes. Après 5 minutes, retirer et jeter le surnageant.
- Ajouter 200 µL de tampon de lavage I à température ambiante et mélanger au vortex pendant 2 min. Si du liquide s'est accumulé dans le bouchon du tube, centrifuger pour collecter le liquide au fond du tube avant de passer à l'étape suivante.
- Placer les tubes ou la plaque sur l'aimant pour lier les billes. Retirer et jeter le liquide une fois clair.
- Ajouter 200 µL de tampon de lavage II à température ambiante et mélanger au vortex pendant 1 min.
- Placer les tubes ou la plaque sur l'aimant pour lier les perles. Retirer et jeter le liquide une fois clair.
- Ajouter 200 µL de tampon de lavage III à température ambiante et mélanger au vortex pendant 30 secondes.
- Placer les tubes ou la plaque sur l'aimant pour lier les billes. Retirer et jeter le liquide une fois clair.
- Retirer les tubes ou la plaque de l'aimant et ajouter 20 µL d'eau sans nucléases à chaque tube de la librairie d'exome capturée liée aux billes.

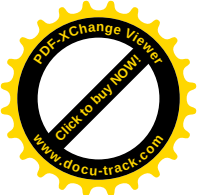
Amplification finale de la librairie capturée

La quantité de librairie enrichie en exome est généralement inférieure à 1 ng, ce qui est trop faible pour être utilisée directement pour le séquençage sur le séquenceur Hiseq™ 2000 Illumina et doit être amplifiée à l'aide d'un nombre limité de cycles PCR.

- Générer un Master Mix PCR avec les composants suivants :

réactifs	volume à ajouter
APA HiFi HotStart ReadyMix	5 µL
5 Primer (10 µM)	5 µg
6 Primer (10 µM),	5 µL
librairie d'exome capturée avec des billes	1 µL
volume total	10 µL

- Exécuter la réaction PCR sur le thermocycleur ProFlex™ system en utilisant le programme suivant : 98 °C pendant 10 min (dénaturation), suivi de 12 cycles à 98 °C pendant 1 min,



60 °C pendant 30 secondes et 72 °C pendant 45 secondes, puis terminer par 72 °C pendant 10 min. Maintenir à 4 °C jusqu'à l'étape suivante.

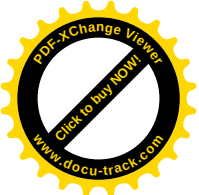
- Nettoyer le produit PCR post-capture à l'aide de billes AMPure XP comme indiqué dans la les étapes précédentes.
- Éluer l'ADN de la librairie WES dans un volume final de 30 µL d'eau sans nucléases.
- Évaluer la taille de la librairie sur le bioanalyseur AgilentTM2000 et la quantifier à l'aide du kit de test Qubit dsDNA BR.

Évaluation de la qualité de l'enrichissement exonique par qPCR

- Détermination la concentration de chacun des échantillons à l'aide du Qubit ou du Bioanalyseur. Chaque 15 µL de réaction qPCR contiendra 0,5 ng d'ADN de librairie. Effectuer des dilutions de travail de toutes les librairies à une concentration de 0,1 ng/µL.
- Pour quantifier l'enrichissement en amplicons pour une réaction qPCR donnée, chaque test qPCR doit inclure une courbe standard générée à l'aide d'une série de dilutions d'ADN génomique humain normal avec une concentration déterminée par quantification basée sur la fluorescence à l'aide d'un fluoromètre Qubit. Dans chaque dilution doivent être inclus 5 ng/µL d'ADN de phage lambda (ADN porteur non humain) pour garantir une PCR efficace dans toute la série de dilutions. La série de dilutions doit comprendre les concentrations d'ADNg suivantes : 5, 0,5 et 0,05 ng/µL. Le contrôle négatif ne contiendra que les 5 ng/µL d'ADN lambda (porteur).
- Préparation du mélange qPCR comme suit : 7,5 µL de SYBR Green PCR Master Mix, 0,3 µL de mélange d'amorces sens/inverse (5 µM), 5 µL d'ADN matrice (0,1 ng/µL) (volume total de 10 µL).
- Exécuter la qPCR sur le système QuantStudioTM 5 en utilisant les conditions de cycle suivantes: 95 °C pendant 10 min (dénaturation), suivi de 40 cycles à 95 °C pendant 15 sec et 60 °C pendant 1 min (amplification), puis 1 cycle de 95 °C pendant 15 sec, 60 °C pendant 15 s et 95 °C pendant 15 s (étape finale pour générer une courbe de dissociation).

Séquençage par synthèse (SBS) sur HiSeq2000TM illumina

Permet la lecture de la séquence des fragments d'ADN en ajoutant des nucléotides et en capturant les signaux émis lors de l'incorporation selon les étapes suivantes :



- a. Un cycle de séquençage commence par l'ajout d'un nucléotide fluorescent à chaque position du fragment d'ADN.
- b. À chaque cycle, un nucléotide est incorporé dans un brin complémentaire, et chaque nucléotide est marqué par un fluorophore spécifique (A, C, G, T).
- c. La plateforme HiSeq™ 2000 utilise une caméra CCD pour détecter la fluorescence émise par chaque nucléotide qui est incorporé, ce qui permet de déterminer la base correspondante à chaque position.

Ce processus est répété de manière itérative pour lire la séquence de chaque fragment d'ADN sur plusieurs cycles. Après chaque cycle d'incorporation, l'éclairage de la Flow Cell est capturée par un système d'imagerie. Chaque image représente la fluorescence émise par les nucléotides ajoutés à chaque cluster. Cela permet de déterminer l'identité de la base ajoutée à chaque cycle et donc de reconstituer la séquence.

Analyse de données

Une fois le séquençage terminé, les données sont soumises à un traitement de qualité pour évaluer la couverture du séquençage, la qualité des lectures et détecter d'éventuelles erreurs. Les séquences brutes (au format FASTQ) sont ensuite prêtes à être analysées pour l'identification des variants, l'assemblage de novo ou d'autres applications de la génomique. L'analyse bio-informatique de l'exome a été effectué en suivant les étapes suivantes :

- Contrôle qualité des données brutes,
- Prétraitement ou preprocessing,
- Mappage,
- Traitement post-alignement,
- Détection des variantes,
- Annotation et priorisation.

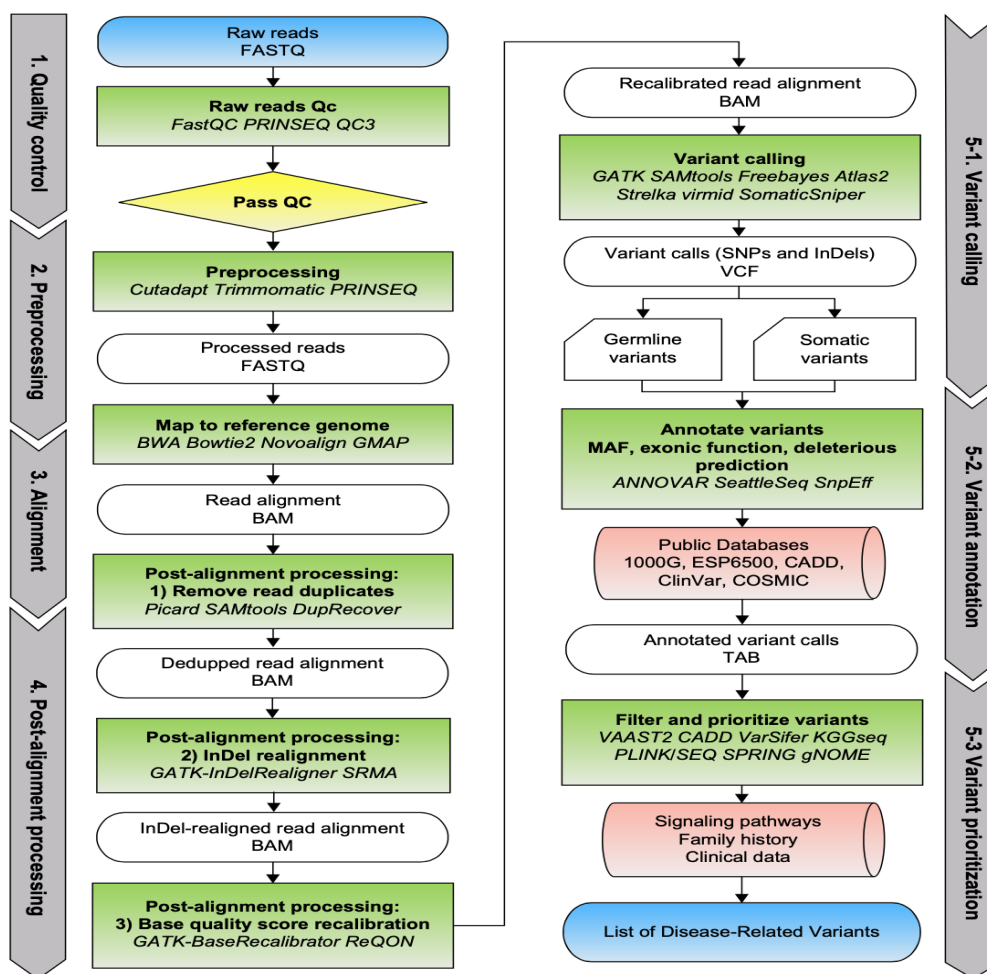


Figure14 : 13schéma général d'analyse des données de l'exome.

5 étapes principales : contrôle qualité des reads brutes, pré-traitement, alignement, post-traitement et analyse des variants (détection des variants, annotation et priorisation). Remarques : FASTQ, BAM, format d'appel de variantes (VCF) et TAB (délimité par des tabulations) font respectivement référence au format de fichier standard des données brutes, de l'alignement, des appels de variantes et des variantes annotées. Une sélection d'outils prenant en charge chaque étape d'analyse est présentée en italique.

a. Contrôle de Qualité et prétraitement des données brutes

Plusieurs outils informatiques (FastQC, FastQ Screen, FASTX-Toolkit, NGS QC Toolkit, PRINSEQ, QC-Chain et QC3.) peuvent être utilisés pour l'évaluation de la qualité des données brutes (Raw data). Le FastQC a été le plus utilisé dans l'analyse de qualité des données brutes de l'exome de nos patients. Le FastQC génère de nombreux tracés de données utiles tels que la distribution des scores Phred le long des reads, la distribution du contenu GC, la distribution de la longueur d'une read et le niveau de duplication de séquence. Il détecte

également les séquences surreprésentées qui peuvent indiquer une contamination par une amorce ou un adaptateur. Grâce à un rapport complet de contrôle qualité des reads brutes généré par FastQC (on peut déterminer si des étapes de prétraitement telles que le découpage de la base, le filtrage de lecture ou le découpage de l'adaptateur sont nécessaires avant l'alignement.

Rapport

FastQC

Bonne qualité des données brutes

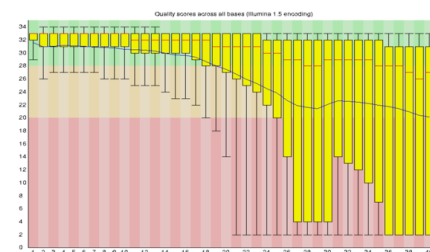
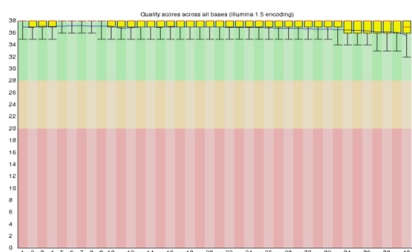
Mauvaise qualité des données brutes

Statistiques de base

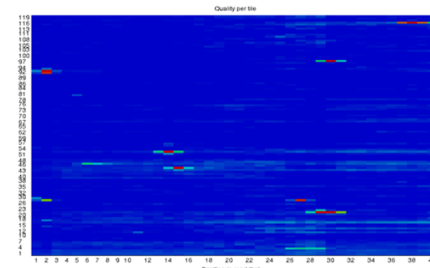
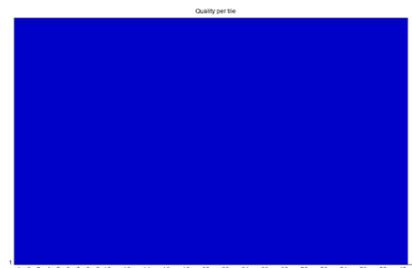
Measure	Value
Filename	good_sequence_short.txt
File type	Conventional base calls
Encoding	Illumina 1.5
Total Sequences	250000
Total Bases	10 Mbp
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	40
%GC	45

Measure	Value
Filename	bad_sequence.txt
File type	Conventional base calls
Encoding	Illumina 1.5
Total Sequences	395288
Total Bases	15.8 Mbp
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	40
%GC	47

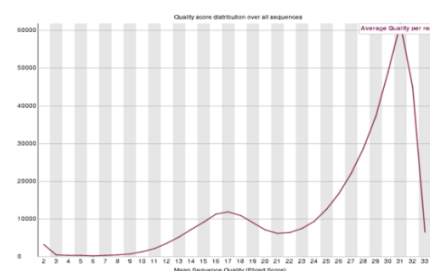
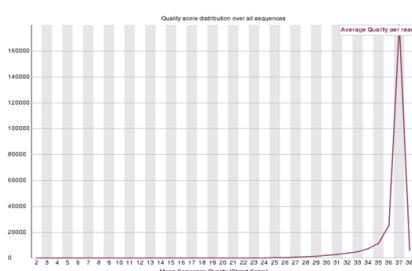
Qualité de séquence de bases



Qualité de séquence par tuile



Scores de qualité par séquence



Contenu
par
séquence
de bases

Contenu
GC par
séquence

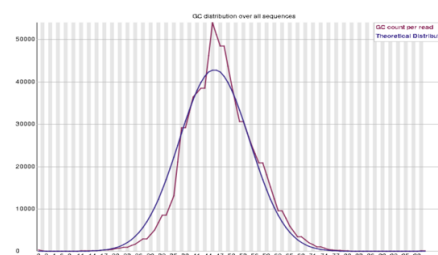
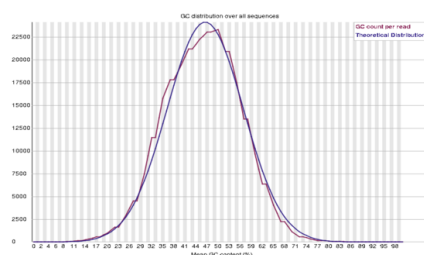
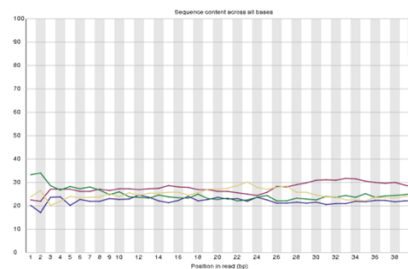
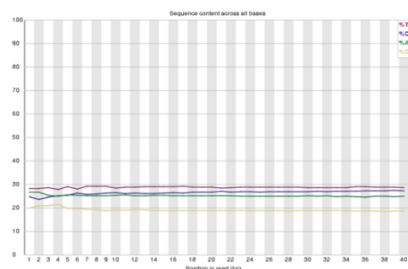


Figure15 : rapports de FastQC des données brutes de l'exome.

La procédure de prétraitement standard comprend le retrait de l'adaptateur d'extrémité 3' et le découpage des bases de mauvaise qualité aux extrémités des reads. Les reads redondantes et les séquences indésirables telles que la contamination par les amorces, les adaptateurs ou d'autres espèces ont été supprimées à ce stade grâce à des outils disponibles pour effectuer ces tâches, tels que Cutadapt, Trimmomatic, PRINSEQ et QC3. Chaque programme est équipé de ses propres fonctionnalités personnalisées.

b. Alignement de séquence

Après le contrôle qualité et le prétraitement des données brutes, les reads ont été mappées sur le génome de référence, avec une précision et efficacité élevées grâce aux deux outils d'alignement (Bowtie2 et BWA) bien connus qui implémentent l'algorithme de Transformation de Burrows-Wheeler (BWT).

c. Traitement post-alignement

Après le mapping des reads sur le génome de référence, une procédure de traitement post-alignement en 3 étapes était nécessaire pour minimiser les artefacts susceptibles d'affecter la qualité de détection des variants en aval. Il comprend la suppression des doublons de read, le réalignement des indels et le recalibrage du score de qualité de base (BQSR).

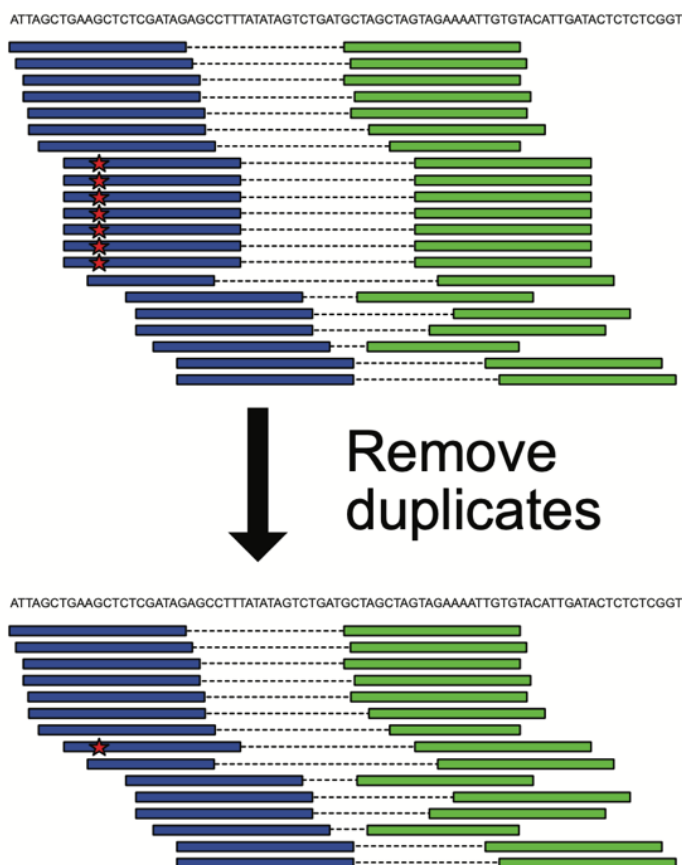


Figure 15 : suppression des duplicates

Pour l'analyse WES, nous avons procédé premièrement à la suppression des doublons avant l'appel de variants, dans le but d'éliminer les biais introduits par la PCR dus à une amplification inégale des fragments d'ADN. Nous avons utilisé les programmes Picard MarkDuplicates (<http://broadinstitute.github.io/picard/>) et SAM-tools pour détecter les doublons de reads en fonction de leurs coordonnées de cartographie 5' identiques et de leur orientation sur le génome. Les coordonnées de cartographie 3' ne sont pas prises en compte pour deux raisons. Premièrement, la qualité des bases générées par le séquenceur a tendance à diminuer vers l'extrémité 3' d'une read ; son alignement est donc moins fiable par rapport aux bases 5'.

Deuxièmement, si les reads sont taillées à des bases de mauvaise qualité de 3' pieds avant l'alignement, elles auront des longueurs de lecture différentes, ce qui entraînera des coordonnées de mappage 3' différentes. Après la suppression des doublons, la deuxième étape a consisté à identifier les régions génomiques qui contiennent des indels et à améliorer la qualité de l'alignement dans la région cible. Cependant, le mappage des reads composées d'indels nécessitent un alignement espacé qui est plus sujet au bruit.

La qualité de l'alignement espacé résultant a été améliorée en considérant toutes les lectures alignées dans la même région après le mappage grâce à deux algorithmes (SRMA et IndelRealigner du Genome Analysis Toolkit (GATK) qui ont été développés pour réaliser cette tâche :

- Le réalignement local des reads espacées sur le génome de référence ou sur des haplotypes candidats alternatifs ;
- Assemblage local de novo des reads alignées autour de la région cible suivi de la construction d'une séquence consensus pour la découverte d'indel.

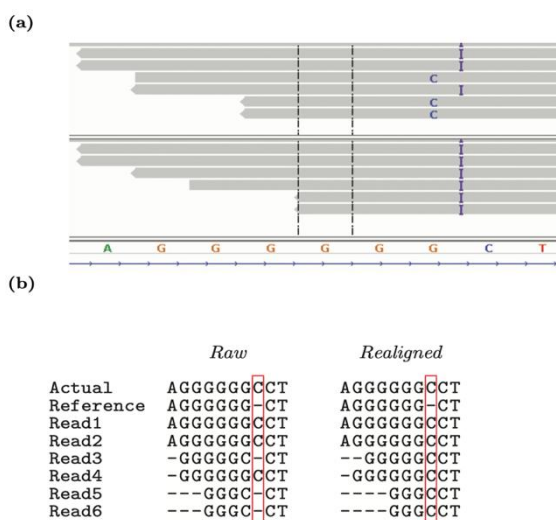


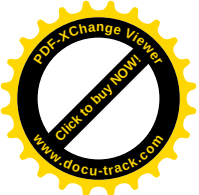
Figure 16 Insertion réalignée

Dans cet exemple, il y a une insertion d'un résidu cytosine directement en 3' d'une étendue de 6 résidus guanine. Autrement dit, l'insertion change la séquence AGGGGGGCT en AGGGGGGCCT. (a) Le panneau supérieur montre une capture d'écran IGV de l'alignement avant l'étape de réalignement, et le panneau inférieur (b) montre les mêmes lectures après l'étape de réalignement local GATK.

L'analyse des variants comprend le génotypage, l'appel des variants, l'annotation et la priorisation. Différents types de variants génomiques, notamment les SNV (single nucleotide variants), les indels (Single base pair insertion and deletions), les CNV (copy number variant) et les grands SV (structural variants), peuvent être détectés à partir de l'échantillon en comparant les lectures alignées au génome de référence.

a. Appel des variants

Plusieurs programmes ont été utilisés pour l'appel de variants germinaux incluant GATK, SAM Tools, FreeBayes et Atlas2. GATK est une suite d'analyse NGS qui utilise un framework

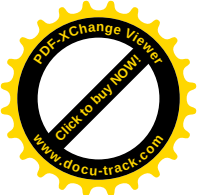


MapReduce pour accélérer le traitement de grandes quantités de fichiers d'alignement de séquences en parallèle. Il implémente un modèle bayésien simple pour estimer la probabilité d'un génotype dans l'échantillon sur la base des lectures de séquence observées qui couvrent le locus spécifié. GATK se compose de deux principaux programmes d'appel de variants, UnifiedGenotyper et HaplotypeCaller. UnifiedGenotyper appelle les SNV et les indels séparément en supposant que chaque locus variant est indépendant. HaplotypeCaller détecte simultanément les SNV, les indels et certains SV avec une précision accrue en effectuant un assemblage local de novo des lectures alignées. SAM tools contient un ensemble d'utilitaires pour la manipulation de lectures de séquences alignées au format SAM/BAM. FreeBayes est un appelant de polymorphisme court basé sur des haplotypes qui peut détecter simultanément les SNV, les indels, les mésappariements multi-bases, les sites polyalléliques, la polyploidie, ainsi que les CNV dans un échantillon unique, des échantillons groupés ou des populations mixtes.

b.Annotation des variants

Une fois les variants détectés, les attributs d'annotation tels que la caractéristique génomique, le symbole du gène, la fonction exonique et le changement d'acide aminé ont été attachés à la liste des variants.

De nombreux programmes ont été développés pour intégrer des bases de données publiques pour obtenir des informations supplémentaires sur les variants, y compris la fréquence des allèles mineurs (MAF) dans les populations normales, les preuves expérimentales issues d'essais cliniques, la prédiction délétère de la fonction des variants et la collecte de variants et de gènes dans des études connues sur le cancer ou les maladies génétiques. Le contenu génomique détaillé, y compris l'expression spécifique aux tissus, les sites de liaison aux facteurs de transcription, les modifications des histones, les sites hypersensibles à la DNase I, les activateurs et les eQTL, peut être récupéré à partir du projet ENCODE⁶⁴ et des bases de données publiques telles que RegulomeDB et HaploReg et ajouté à l'annotation des variantes. Alors que la plupart de ces outils ne fournissent qu'un petit nombre d'annotations, quelques programmes ont été développés pour combiner les annotations provenant de nombreuses sources. L'un des programmes d'annotation de variantes les plus couramment utilisés est ANNOVAR, qui propose trois modes d'annotation, basés sur les gènes, sur les régions et sur les filtres, avec une collection de plus de 4 000 bases de données publiques pour l'annotation.⁶⁷ Il intègre dbSNP, 1000Genomes, ESP6500, génomes personnels Complete Genomics et

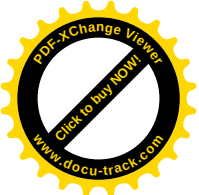


données de séquençage d'exome du panel de cellules tumorales humaines NCI-60 pour accéder aux informations MAF, sept programmes de la base de données LJB2368 plus la base de données Combined Annotation Dependent Depletion (CADD)⁶⁹ pour la prédiction délétère, PhyloP⁷⁰ et Genomic Evolutionary Rate. Score de profilage (GERP)⁷¹ pour indiquer la conservation du site muté chez 29 espèces de mammifères, ainsi que des preuves expérimentales de la pathogenèse du variant provenant de bases de données de variants de maladies telles que COSMIC⁷² et ClinVar.⁷³ CADD utilise un score unifié pour la suppression potentielle. - la gravité des 8,6 milliards de mutations humaines possibles en comparant les variantes qui ont survécu à la sélection naturelle avec des mutations simulées.⁶⁹ La base de données combine 63 annotations via un cadre d'apprentissage automatique. Ces annotations consistent en des scores de prédiction de GERP, PolyPhen et d'autres programmes. Cette métrique simple fournit une approche directe pour interpréter les mutations à forte pénétrance de la maladie mendélienne et les variantes à faible pénétrance trouvées dans les études d'association à l'échelle du génome. SeattleSeq, un système d'annotation de variantes basé sur le Web, propose le téléchargement direct de listes de variantes via le site Web et annote avec des bases de données publiques telles que dbSNP et des programmes de prédiction délétères tels que PolyPhen.⁷⁴ Il intègre les bases de données de KEGG Pathways, des îles CpG, les sites de liaison à la transcription et les interactions protéine-protéine et fournissent des informations utiles concernant le réseau de régulation des gènes et la régulation des gènes mutés. D'autres programmes de variantes autonomes incluent VariantAnnotator du GATK³⁰ et SnpEff.⁷⁵ Ils sont équipés de divers filtres de lecture ou de fonctionnalités uniques telles que l'analyse d'enrichissement d'ensembles génétiques pour une analyse en aval.

c. Filtration et priorisation des variants

Ce sont des étapes cruciales dans l'analyse des données de séquençage génomique, notamment lorsqu'on cherche à identifier des mutations susceptibles d'être responsables de maladies, de traits phénotypiques ou d'autres phénomènes biologiques. Voici une vue d'ensemble des étapes et des méthodes de filtration et de priorisation des variants après séquençage.

- **Filtration initiale des variants** : Après avoir obtenu les variants (fichier VCF - Variant Call Format) à partir de l'alignement des lectures sur un génome de référence, une première étape de filtration est réalisée pour éliminer les variants qui sont peu fiables ou susceptibles d'être des erreurs. Cette étape est cruciale pour ne conserver que les variants qui ont un potentiel biologique ou clinique.



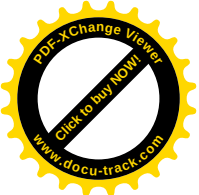
- **Critères de filtration courants** : Qualité de l'appel de variant (QUAL) : Seules les variants ayant une qualité d'appel suffisante sont retenues. Par exemple, un score de qualité (QUAL) supérieur à un certain seuil (souvent ≥ 20) est exigé pour garantir que le variant est fiable.
- **Profondeur de lecture (DP)** : Une profondeur de lecture suffisante est nécessaire pour valider l'existence d'un variant. Par exemple, on pourrait filtrer les variants avec une profondeur de lecture inférieure à 10 ou 20x.
- **Fréquence allélique** : Les variants rares sont souvent d'un intérêt plus élevé, surtout dans le contexte de certaines pathologies. Les variants fréquents (tels que ceux observés dans des populations de contrôle comme 1000 Genomes ou gnomAD) sont généralement filtrés. Par exemple, on pourrait exclure les variants avec une fréquence allélique supérieure à un seuil spécifique (par exemple 1% dans la population générale).
- **Phénotype des populations de contrôle** : L'utilisation des bases de données de contrôle comme gnomAD ou ExAC permet d'éliminer les variants observés fréquemment dans les populations sans pathologie, car elles sont moins susceptibles d'être responsables de maladies rares.
- **Type de variant** : Certains types de variants sont souvent filtrés pour réduire le bruit, comme les variants synonymes (qui ne modifient pas la séquence protéique) et qui ont moins de chances d'être pathogènes, bien que ce ne soit pas systématique.
- **Qualité du génotype** : On peut aussi filtrer en fonction de la qualité du génotype des variants (par exemple, en s'assurant que le génotype est bien appelé, sans ambiguïté).
- **Résultat de la filtration initiale** : Après cette première étape, le nombre de variants est souvent réduit de manière significative, ce qui permet de se concentrer sur les variants les plus susceptibles d'être biologiquement pertinents.

d. Priorisation des variants

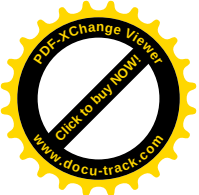
Une fois la filtration effectuée, la priorisation des variants est l'étape suivante pour identifier ceux qui ont un potentiel pathogénique ou fonctionnel. Cette étape implique plusieurs stratégies pour trier les variants selon leur impact potentiel.

❖ Critères de priorisation courants

- **Conservation évolutive (score de conservation)**

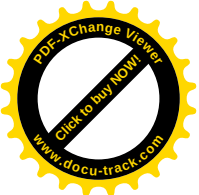


- Les variants affectant des sites hautement conservés dans l'évolution (par exemple, dans des gènes ou des régions régulatrices critiques) sont souvent priorisées.
- Les scores de conservation comme PhyloP, PhastCons, ou GERP aident à évaluer à quel point une position est conservée au cours de l'évolution. Les variants qui touchent des sites très conservés sont plus susceptibles d'avoir un impact fonctionnel.
- **Impact fonctionnel des variants**
 - Variants non synonymes (faute de codon), comme les délétions, insertions, mutations faux-sens, mutations non-sens, ou épissage affectent généralement la fonction du gène et sont donc plus susceptibles d'être pathogènes.
 - Des outils comme SIFT, PolyPhen-2, CADD (Combined Annotation Dependent Depletion) et MutationTaster permettent de prédire si un variant modifie la fonction de la protéine en fonction de l'impact sur la structure et la fonction de la protéine.
- **Contexte clinique et phénotypique**
 - Dans des projets orientés vers la découverte de variants responsables de maladies, les variants retrouvés dans des gènes candidats en lien avec la pathologie étudiée doivent être priorisés.
 - Les bases de données comme ClinVar, OMIM, ou HGMD sont des ressources utiles pour obtenir des informations sur les variants déjà associés à des maladies.
 - La prise en compte du phénotype clinique des patients permet de guider la priorisation des variants dans des gènes déjà associés à des maladies rares ou à des syndromes connus.
- **Fréquence des variants dans les populations de contrôle**
 - Les variants rares (par exemple, avec une fréquence allélique inférieure à 1% dans la population générale) sont souvent plus intéressants, en particulier dans des études de maladies rares.
 - Les bases de données comme gnomAD, 1000 Genomes, ou ExAC permettent de comparer la fréquence des variants dans la population étudiée par rapport à des populations de contrôle.
- **Phénotype des variants**
 - Les variantes localisées dans des régions codantes et des régions régulatrices (comme les promoteurs, enhancers, etc.) sont souvent considérées comme ayant un impact plus fort, par rapport aux variants situés dans des zones introniques ou intergéniques.
 - Les variantes affectant des éléments régulateurs comme les sites d'épissage, les boîtes TATA, ou d'autres motifs de régulation, peuvent également être significativement priorisées.



- **Fréquence allélique dans des cohortes de cas**

- Les variants retrouvés chez des individus présentant des traits phénotypiques ou des maladies spécifiques doivent être priorités. Si un variant est observé fréquemment dans une cohorte de cas mais pas dans les contrôles, cela pourrait être un signe de son implication dans la pathologie.



Annexe 4

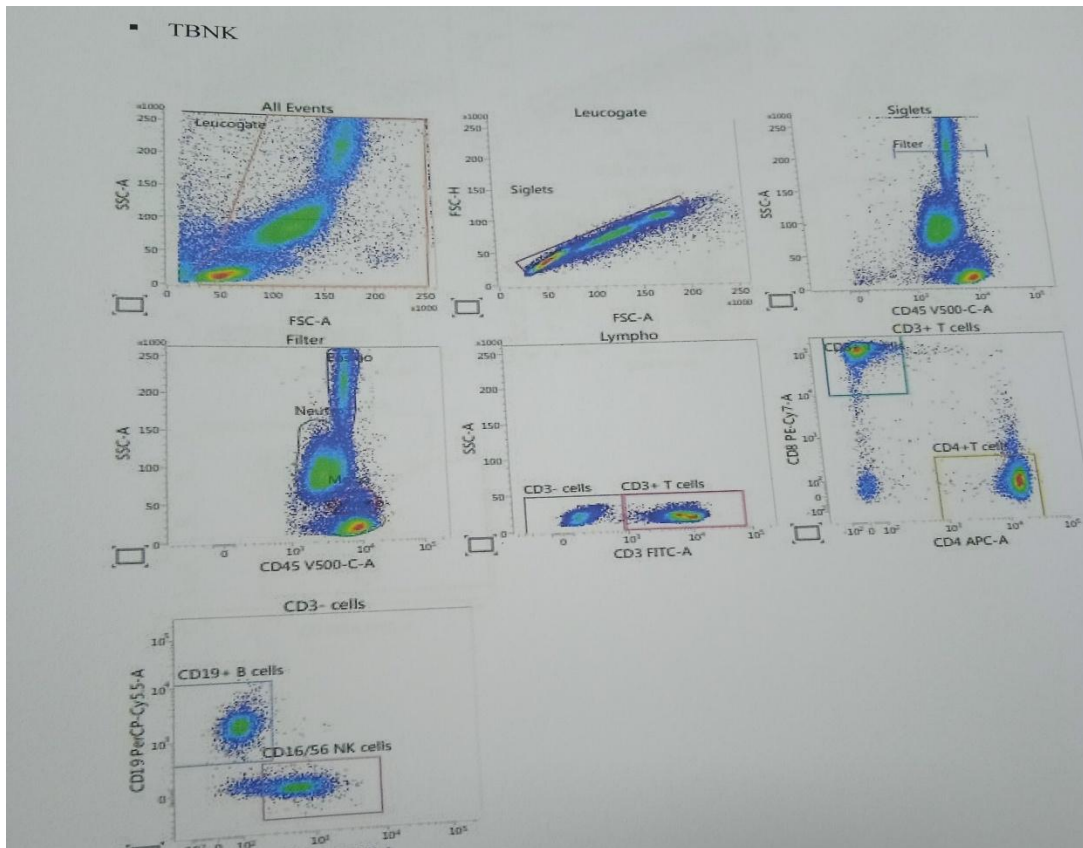


Figure 13: lecteur dans le systeme de cytometrie

CENTRE HOSPITALO-UNIVERSITAIRE DE BENI MESSOUS
HOPITAL ISSAAD HASSANI
SERVICE D'IMMUNOLOGIE MEDICALE
CHEF DE SERVICE : Pr. DJIDJIK.R
UNITE D'IMMUNO-ALLERGOLOGIE

FICHE DE RENSEIGNEMENTS D'EXPLORATION IMMUNOLOGIQUE DE L'ALLERGIE

Nom : Prénom(s) : Sexe : M ☐ F ☐

Date de naissance : Adresse/N° de téléphone : Service : Date du prélèvement :/...../.....

➤ **Réactions cliniques observées :** (urticaire, œdème, érythème, choc anaphylactique, asthme allergique...etc.)

➤ **Antécédents d'allergie et allergène(s) suspecté(s) :**

➤ **Résultats des tests cutanés et d'examen biologiques (Eosinophilie) :**
(Joindre une copie des résultats si possible)

❖ **IgE spécifiques de(s) :**

Pneumallergènes	Trophallergènes	Autres
Mélange (aéroall.) ☐	Mélanges ☐	Médicaments :
Mélange (aqu.) ☐	Thon ☐	Pénic-G ☐
Mélange (mollusques) ☐	Calamar ☐	Pénic-V ☐
Phléole (pne.) ☐	Crevette ☐	α-amylase ☐
Pâturin (pne.) ☐	Figues ☐	Amox. ☐
Ivraie vivace ☐	Fraise ☐	Ampi. ☐
Seigle sauvage ☐	Pomme ☐	Insuline bovine ☐
Laine ☐	Melon ☐	Insuline humaine ☐
Soie ☐	Kiwi ☐	Insuline porcine ☐
Cafard ☐	Ananas ☐	Piqure d'insecte :
Blatte (américaine) ☐	Bromélaïne ☐	Venin de frelon ☐
Euroglyphus ☐	Pêche ☐	Moustique ☐
Noisetier ☐	Banane ☐	Venin guêpe ☐
Dattier ☐	Haricot ☐	Venin d'abeille ☐
Olivier ☐	Avocat ☐	Mite ☐
Eucalyptus ☐	Vanille ☐	Ver de vase ☐
Mimosa ☐	Lentilles ☐	Professionnels :
Pin blanc ☐	Noix ☐	Mélange ☐
Cyprès ☐	Noisette ☐	Isocyanate TDI ☐
Frêne ☐		Isocyanate MDI ☐
		Isocyanate HDI ☐
		Formaldéhyde ☐
		Latex ☐
		Anhydride maléique ☐
		Tetrachlorophthalic ☐

❖ **Autres examens et marqueurs biologiques :**

■ IgE totales..... ☐ ■ ECP..... ☐ ■ IgG spécifiques d'allergènes..... ☐

■ IgG4 sériques..... ☐ ■ Test d'activation des basophiles..... ☐

■ Autres :

Cachet du médecin

NB : Le prélèvement doit être effectué sur un tube sec en verre

Figure 14: fiche de renseignements de l'allergie

CENTRE HOSPITALO-UNIVERSITAIRE ISSAAD HASSANI DE BENI MESSOUS Laboratoire d'immunologie médicale
Chef de service : **Professeur DJIDJIK Réda**
Unité d'immunologie cellulaire et de cytométrie en flux
Responsable d'unité : **Dr BELAID. B**

Rendez-vous le :/...../.....
A 8h00, A jeun

Fiche de renseignement d'exploration des déficits immunitaires

Nom : Prénom(s) : Sexe : F ☐ / M ☐ Date de naissance :
Hôpital/Service : Date prélèvement :/...../.....
Wilaya d'origine : N° de Tél : Email :

- « IMPORTANT »
- Prière de remplir correctement la fiche (**une fiche mal remplie sera refusée**)
 - Seul un compte-rendu médical ou une lettre bien détaillée qui pourront remplacer cette fiche.
 - Prière de mentionner **le N° de Tél et l'e-mail** du prescripteur pour demander plus de renseignements en cas de besoin et lui envoyer le résultat.
 - Une **FNS** récente est indispensable.
 - Prélèvements nécessaires : **2 tubes EDTA, 2 tubes à héparine.**
 - Transport à température ambiante (**éviter les glacières ou poches de glace**).
 - **Les RDV sont ouverts de Dimanche au Mercredi pour les cas urgents (hospitalisés).**

➤ SÉROLOGIES VIRALES :

HIV : Autres sérologies :

➤ ANTECEDANTS FAMILIAUX :

Parents consanguins : Oui ☐ (degré de consanguinité ème degré); Non ☐

Cas évocateurs de déficit dans la famille : Oui ☐ Non ☐

Décès dans la famille fratrie en bas âge : Oui ☐ Non ☐ (Si oui joindre l'arbre généalogique)

➤ MANIFESTATIONS CLINIQUES :

Age de début des troubles :

❖ En cas d'infection, préciser la **nature**, la **récidive** et le **germe isolé** :

- Infections ORL (préciser) :
- Infections pulmonaires (préciser) :
- Infections cutanées (préciser) :
- Infections urinaires (préciser) :
- Diarrhée (préciser) :
- Autres (préciser) :

Pneumopathie interstitielle	Oui ☐ Non ☐	Eczéma	Oui ☐ Non ☐
Candidose buccale	Oui ☐ Non ☐	Ataxie	Oui ☐ Non ☐
Candidose digestive	Oui ☐ Non ☐	Télangiectasie	Oui ☐ Non ☐
Retard de la chute du cordon ombilical	Oui ☐ Non ☐	Gingivite	Oui ☐ Non ☐
Hypertrophie gingivale	Oui ☐ Non ☐	Anémie	Oui ☐ Non ☐
Accidents vaccinaux BCGite	Oui ☐ Non ☐	Adénopathies	Oui ☐ Non ☐
Albinisme partiel	Oui ☐ Non ☐	Splénomégalies	Oui ☐ Non ☐

Manifestations auto-immunes : oui ☐ Non ☐ Si oui la(s)quelle(s) préciser :

Autres manifestations :

- Neurologiques :
- Faciès particulier :
- Autres :

➤ EXAMENS BIOLOGIQUES :

➤ **Formule numération sanguine (FNS)** : date :(indispensable.):

GB :	Plaquettes :
Neutrophiles :%	VPM :
Monocytes :%	Eosinophiles :%
Lymphocytes :%	

➤ **Dosage pondéral des immunoglobulines** : IgG : IgA : IgM : IgE :

➤ EXAMENS RADIOLOGIQUES :

Ombre thymique Oui ☐ Non ☐ Pneumopathie interstitielle Oui ☐ Non ☐

Autres anomalies :

➤ TRAITEMENT :

- IVIG (dernière perfusion d'immunoglobulines) :
- Corticoïdes, Biothérapie et/ou immunosuppresseurs depuis :

➤ EXAMENS DEMANDES :

➤ DIAGNOSTICS SUSPECTES :

Figure 15: fiche de renseignements de deficit immunitaire.

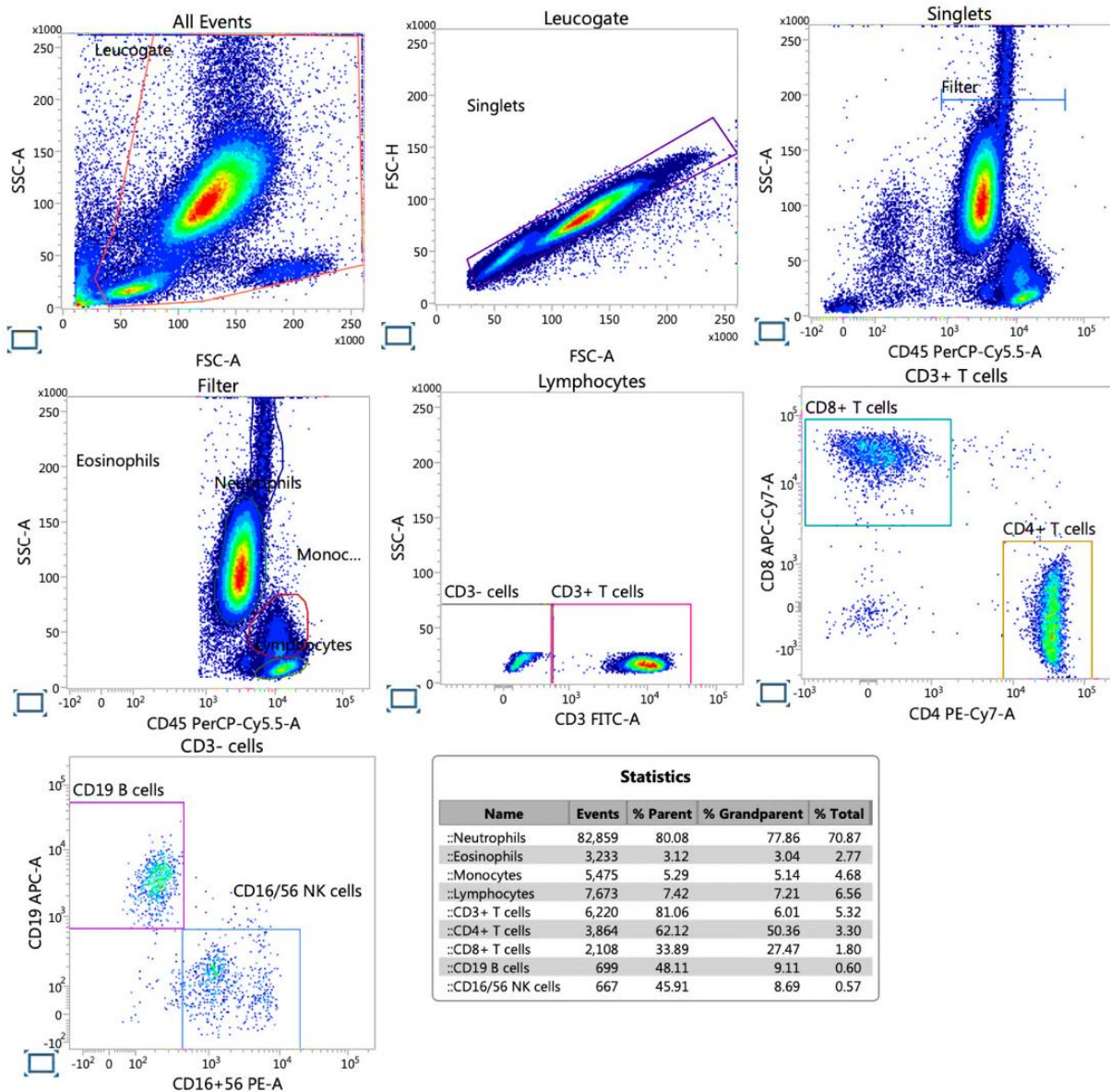


Figure15 : lecteur dans le systeme de cytométrie pour les sous-populations T, B, NK

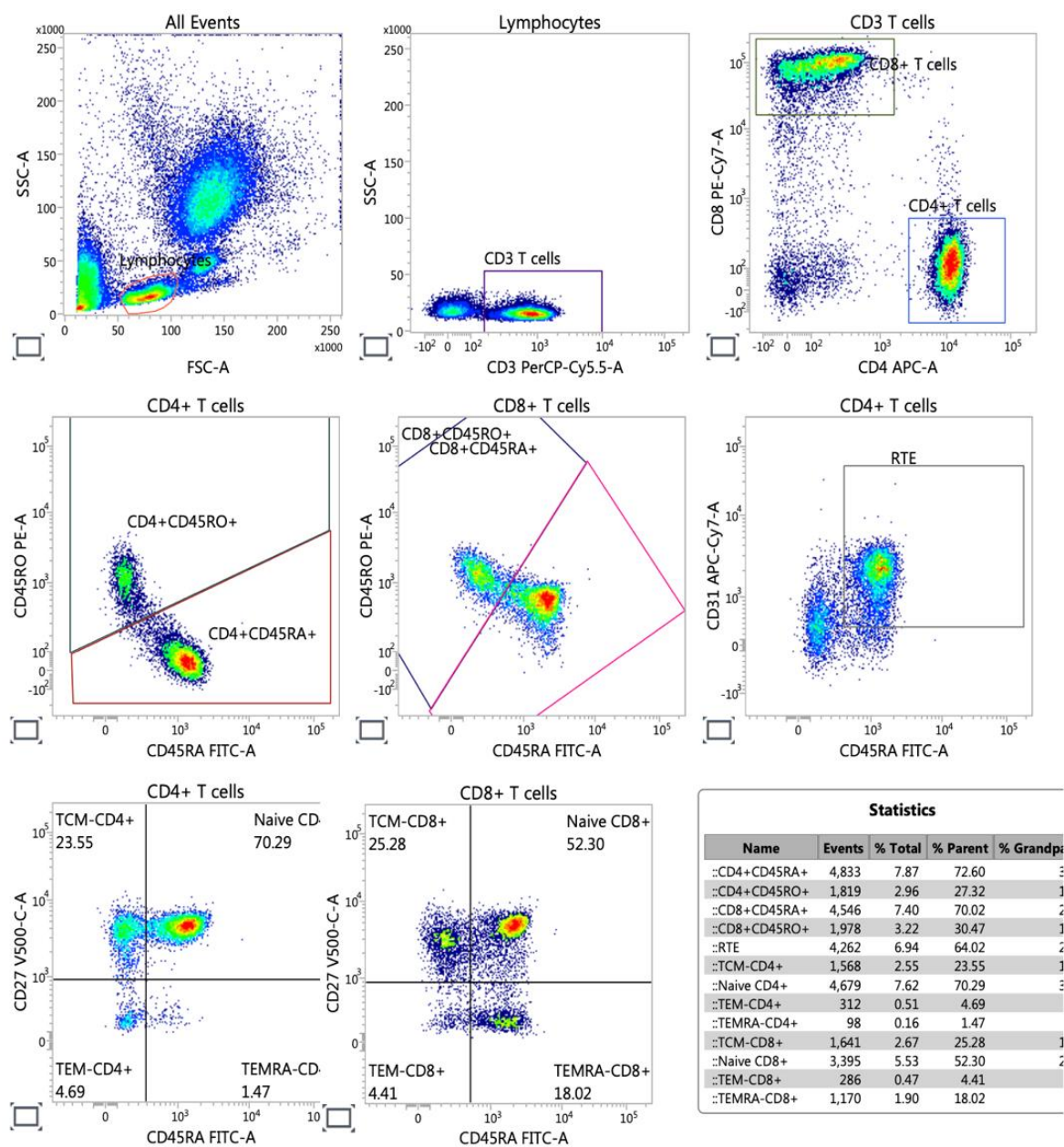
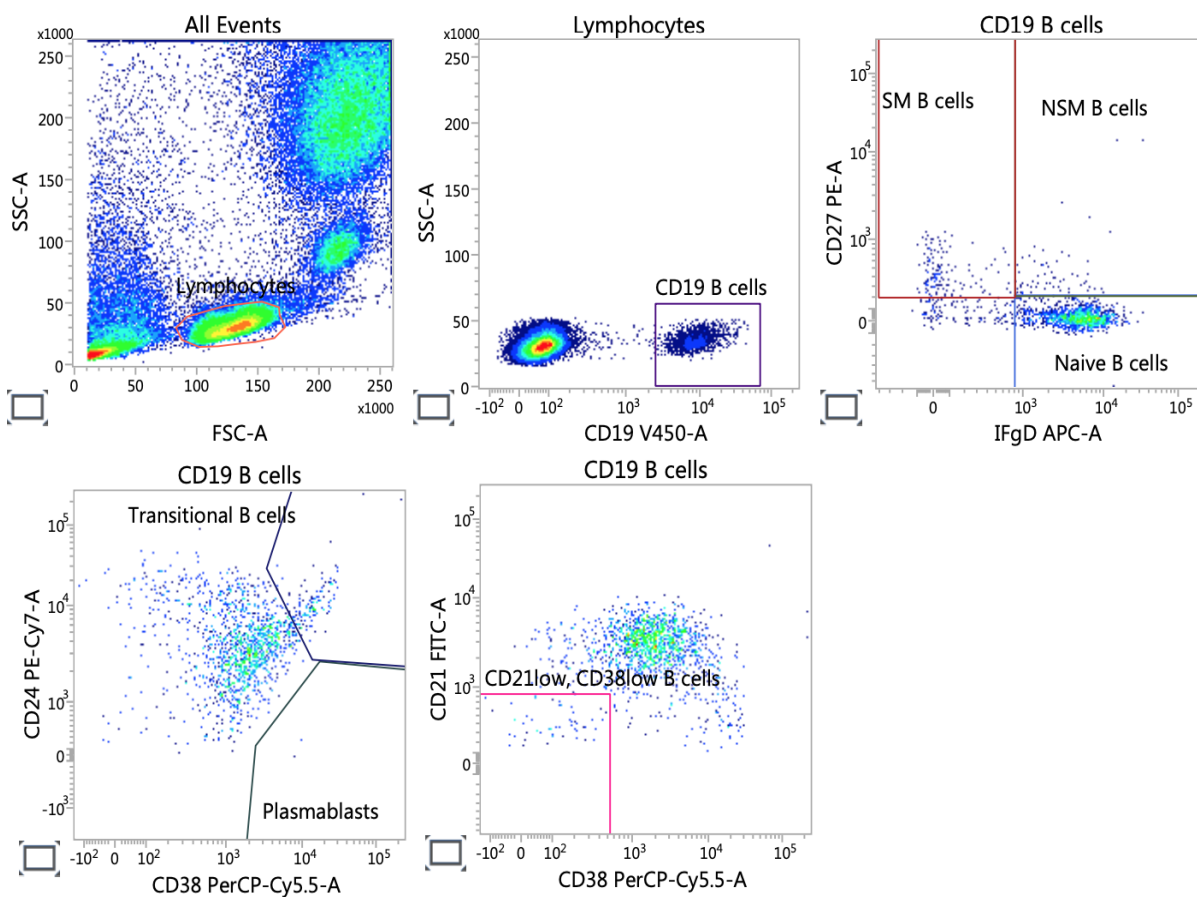


Figure16 : lecteur dans le systeme de cytométrie pour les sous-populations T



Statistics				
Name	Events	% Parent	% Grandparent	% Total
::Naive B cells	1,133	77.92	4.83	1.39
::NSM B cells	62	4.26	0.26	0.08
::SM B cells	137	9.42	0.58	0.17
::Transitional B cells	132	9.08	0.56	0.16
::Plasmablasts	2	0.14	0.01	0.00
::CD21low, CD38low B cells	53	3.65	0.23	0.06

Figure17 : lecteur dans le système de cytométrie pour les sous-populations B

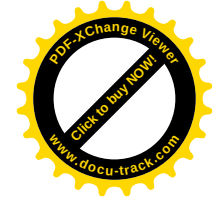
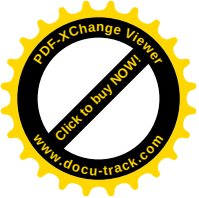
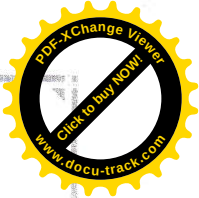
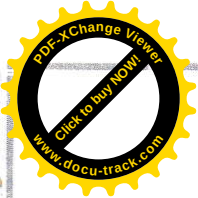


Tableau VI: Caractéristiques des Populations Lymphocytaires T et B chez les Patients SCN

CD4 /CD 45R A	CD4 /CD 45R O	CD8/ CD45 RA	CD8/ CD45 RO	RTE CD4+	CD8+ CCR 7+	TEMRA	CD19+ CD27+ IgM+	CD19+ CD27+ IgM-	CD19+ CD24+ +CD38 ++	CD19+ CD24- CD38+ +	CD19+ CD21lo w CD38lo w
82.5 %	16.5 %	87.0%	10.0%	67.5%	74.0%	13.0%	1.7%	6.1%	6.8%	1.3%	3.4%
68.0 %	31.5 %	86.0%	13.0%	46.0%	66.0%	20.0%	9.8%	10.7%	6.7%	1.1%	4.0%
60.5 %	39.0 %	83.0%	16.5%	37.0%	74.0%	9.0%	4.5%	6.4%	3.8%	5.3%	4.8%
45.5 %	50.0 %	52.0%	48.0%	31.0%	13.5%	38.5%	9.0%	17.5%	1.6%	1.9%	6.8%
76.0 %	23.0 %	86.0%	20.0%	61.0%	26.0%	54.0%	9.0%	6.0%	9.2%	0.4%	5.8%



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique 1
جامعة سعد دحلب البليدة
Université SAAD DAHLEB-Blida1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie
Mémoire de fin d'études
En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV
Filière : Sciences Biologiques
Option : Génétique fondamentale.

Thème

Profil clinique, immunologique et génétique des patients atteints du syndrome de Comel Netherton

Présenté par :

Soutenu le : 02/07/2025

♦ BEKKOUCHE Aicha
♦ GHEMATI Achouak

Noms	Garde/Lieu	Qualité
Dr BENAOU .N	MCB/USDB1	Presidente
Dr ZERROUTI .K	MCB/USDB1	Examinatrice
Pr BELAID .B	MCB/CHU Beni Messous	Promoteur
Dr AISSANI.R	MCB/USDB1	Co-promotrice

Avis favorable
ZERROUTI K.

Année universitaire:

2024/2025