

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

**Université de Blida 1  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie et Physiologie Cellulaire**



**Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du Diplôme de Master  
en science de la nature et de la vie**

**Filière sciences biologiques**

Spécialité

**Génétique Physiologie**

**THEME :**

**Etude génétique de  
l'Agammaglobulinémie liée à l'X du  
gène Btk**

**Présenté par : Mme Djilali Wissam**

<b>Mme Guessaibia.N</b>	<b>MCB</b>	<b>FSNV</b>	<b>Présidente</b>
<b>Mme Aissani.R</b>	<b>MAA</b>	<b>FSNV</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>Mme Kechout.N</b>	<b>Pf</b>	<b>IPA</b>	<b>Promotrice</b>

**Promotion 2014-2015**

# Remerciements

# Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à remercier Dieu le tout puissant de m'avoir donné le courage et la volonté de continuer.

Tout d'abord je remercie Mr Semar R. et exprime mes sincères remerciements envers Mr Nouas M. pour m'avoir aidé ainsi que l'ensemble du personnel du laboratoire et les enseignants.

# *DEDICACES*

## *Dédicace*

Je dédie ce modeste travail à toute ma famille qui m'a soutenue par sa présence.

A ma très chère mère, à ma grand-mère, à mon oncle à mes tantes, aux Kesraoui et à tous ceux qui occupent une place dans mon cœur.

## Résumé

L'agammaglobulinémie liée à l'X (XLA) est le premier déficit immunitaire identifié par Ogden Bruton en 1952 chez un garçon de huit ans. Elle constitue le modèle de déficit exclusif et total de l'immunité humorale. XLA est l'agammaglobulinémie la plus fréquemment diagnostiquée qui touche quasi-exclusivement les garçons.

La maladie est autosomique récessive portée sur le chromosome sexuel X, elle est causée par des mutations du gène Btk codant une tyrosine kinase Btk, situé sur le locus Xq21.33.

A ce jour, il existe plus de 400 mutations décrites dans les régions codantes et répertoriées dans la Btkbase. Les mutations au niveau de ce gène entraînent un déficit en la protéine Btk et arrêt précoce de la maturation des lymphocytes B. Le processus de maturation et le rôle de Btk sont détaillés dans la partie théorique de notre travail.

Nous avons également compilé dans la partie théorique l'information en ce qui concerne, les aspects épidémiologiques, le diagnostic et le traitement de la maladie.

La partie pratique expose les investigations génétiques menées sur 6 patients au niveau de l'exon 1 et 8-9, elle s'attarde sur l'analyse des résultats à travers deux outils, Blast et mutation Surveyor, le premier nous a permis de tester la validité des résultats obtenus, le second nous a mis sur la voie de recherche des mutations, un certain nombre de mutations ont été détectés avec une probabilité plus ou moins importante, ces résultats méritent néanmoins d'être confirmés avant de les inscrire dans Btkbase.

## **Abstract**

The X-linked agammaglobulinemia (XLA) is the first immune deficiency identified by Ogden Bruton in 1952 on a boy of eight. It is the exclusive and total deficit model of humoral immunity. XLA is the most frequently diagnosed agammaglobulinemia which almost exclusively affects boys.

The disease is gonosomal recessive carried on the X sex chromosome. It is caused by mutations in the Btk gene encoding a Btk tyrosine kinase located on the locus X q21.33. To date, there are over 400 described mutations in the coding regions and listed in the Btkbase. Mutations in this gene lead to a deficiency of Btk protein and early cessation of maturation of B lymphocytes. The maturation process and the role of Btk are detailed in the theoretical part of our work.

We have also compiled in the theoretical part information regarding the epidemiology, diagnosis and treatment of disease.

The practical part describes the genetic investigations on 6 patients; it focuses on the analysis of the results through two tools, “Blast” and “mutation Surveyor”. The first allowed us to test the validity of the results; the second has put us on the way of mutations research. A number of mutations were detected with a greater or lesser likelihood; nevertheless, these results need to be confirmed prior to enrollment in Btkbase.

## ملخص

يعتبر مرض XLA أي فقد غاماغلوبولين الدم المتعلق بالكروموزوم X أول مرض فقدان المناعة تعرف عليه أوجدن بروتن في 1952 عند طفل ذكر سنه ثمن سنوات وسمي على إثر ذلك بأسمه . و يمثل هذا المرض نموذجا لفقدان المناعة التكيفية التام و الإستثنائي . و يعتبر مرض XLA أهم مرض يتعلق بفقدان غاما غلوبولين الدم يتم تشخيصه و هو يصيب في غالبية الأحيان الأولاد.

يعتبر هذا المرض الجيني مرضا متحي recessif متعلقا بطفرات تصيب الجين Btk الذي يعمل على إنتاج أنزيم التيروزين كيناز Btk . يوجد هذا الجين على الموقع Xq21.31. و قد تم لحد الآن التعرف على 400 طفرة متعلقة بالمناطق التي تشرف على التشفير (codage) على مستوى الجين و قد تم تسجيل هذه الطفرات في قاعدة بيانات Btkbase

هذه الطفرات تؤدي إلى نقص أو غياب البروتين Btk و توقف مبكر في نضج اللمفاويات ب . في الجزء النظري من عملنا هذا تجدون تفاصيل حول دور و مسار نضج اللمفاويات ب و دور Btk في ذلك. كما قمنا في الجزء النظري بجمع و تنظيم المعلومات المتعلقة بالجانب الإبيديميولوجي ( أنتشار المرض)، كيفية تشخيصه و معالجته.

في الجزء العملي من بحثنا عرضنا نتائج دراسة متعلقة بستة مرضى و بصفة أدق نتائج تفكيك و قراءة الشفرة الجينية على مستوى مقاطع 1 و 8-9 للحمض النووي ADN ، و تعمقنا في دراسة هذه النتائج من خلال دراسة بيولوجية للمقاطع بواسطة أداتين : التحليل عن طريق Blast الذي مكنا من تقييم مدى سلامة عملية التفكيك و قراءة الشفرة الجينية للمقاطع المستعملة و برنامج mutation Surveyor الذي ساعدنا في البحث عن الطفرات . و قد تمكنا من الحصول على قائمة من الطفرات بنسب متفاوتة من الاحتمالات و علينا في المستقبل تدقيق البحث للتأكد منها و إضافتها لقاعدة Btk base

## Liste des figures

- Figure 01 L'ontogénèse des lymphocytes B
- Figure 02 Recombinaison et expression des gènes de chaîne lourde et légère d'immunoglobuline.
- Figure 03 Schéma de localisation du gène BTK
- Figure 04 Schéma du promoteur de Btk avec les sites de fixation des facteurs de transcription
- Figure 05 Schéma représentatif des différents domaines de Btk
- Figure 06 La voie de signalisation Btk médiée par le BCR.
- Figure 07 La cascade de signalisation Btk
- Figure 08 Schéma récapitulatif des voies de signalisation de Btk via BCR
- Figure 09 Transitions / transversions
- Figure 10 Répertoire des mutations dans la Btkbase
- Figure 11 Réaction de polymérisation en chaîne
- Figure 12 Représentation schématique de dNTP et ddNTP
- Figure 13 Chromatogramme
- Figure 14 profil d'amplification de la PCR de l'exon 8-9
- Figure 15 Chromatogramme de l'exon 1F du patient n°1
- Figure 16 Chromatogramme de l'exon 1R du patient n°1
- Figure 17 Chromatogramme de l'exon 8-9 F du patient n°1
- Figure 18 Chromatogramme de l'exon 8-9 R du patient n°1
- Figure 19 Chromatogramme de l'exon 1F du patient n°2
- Figure 20 Chromatogramme de l'exon 1R du patient n°2
- Figure 21 Chromatogramme de l'exon 8-9 F du patient n°2
- Figure 22 Chromatogramme de l'exon 8-9 R du patient n°2
- Figure 23 Chromatogramme de l'exon 1F du patient n°3
- Figure 24 Chromatogramme de l'exon 1R du patient n°3
- Figure 25 Chromatogramme de l'exon 1F du patient n°4
- Figure 26 Chromatogramme de l'exon 1R du patient n°4
- Figure 27 Chromatogramme de l'exon 8-9 F du patient n°4
- Figure 28 Chromatogramme de l'exon 8-9 R du patient n°4
- Figure 29 Chromatogramme de l'exon 1F du patient n°5
- Figure 30 Chromatogramme de l'exon 1R du patient n°5
- Figure 31 Chromatogramme de l'exon 8-9 F du patient n°5
- Figure 32 Chromatogramme de l'exon 8-9 R du patient n°5

- Figure 33 Chromatogramme de l'exon 1F du patient n°6
- Figure 34 Chromatogramme de l'exon 1R du patient n°6
- Figure 35 Chromatogramme de l'exon 8-9 F du patient n°6
- Figure 36 Chromatogramme de l'exon 8-9 R du patient n°6

## Liste des tableaux

Tableau 1	Types de mutations
Tableau 2	Distribution des mutations
Tableau 3	Distribution des mutations
Tableau 4	Programme d'amplification de la PCR
Tableau 5	Programme d'amplification
Tableau 6	Programme d'amplification lors de la réaction de séquençage
Tableau 7	contrôle qualitatif et quantitatif de l'ADN patient 1
Tableau 8	Analyse Blast Exon 1 patient 1
Tableau 9	Analyse Blast Exon 8-9 patient 1
Tableau 10	Contrôle qualitatif et quantitatif de l'ADN patient 2
Tableau 11	Analyse Blast Exon 1 patient 2
Tableau 12	Analyse Blast Exon 8-9 patient 2
Tableau 13	contrôle qualitatif et quantitatif de l'ADN patient 3
Tableau 14	Analyse Blast Exon 1 patient 3
Tableau 15	Contrôle qualitatif et quantitatif de l'ADN patient 4
Tableau 16	Analyse Blast Exon 1 patient 4
Tableau 17	Analyse Blast Exon 8-9 patient 4
Tableau 18	Contrôle qualitatif et quantitatif de l'ADN patient 5
Tableau 19	Analyse Blast Exon 1 patient 5
Tableau 20	Analyse Blast Exon 8-9 patient 5
Tableau 21	Contrôle qualitatif et quantitatif de l'ADN patient 6
Tableau 22	Analyse Blast Exon 1 patient 6
Tableau 23	Analyse Blast Exon 8-9 patient 6

### **Liste des abréviations :**

BTK : Bruton tyrosine kinase

BCR: recepneur des cellules B

BLNK : la protein de liaison de cellules B

CD (19,21,81,40.....): cluster of differentiation

DIP : déficit immunitaire primitif

DAG: diacylglycerol

Ig : immunoglobuline

ITAM: immunoreceptor tyrosine-based activation motif

LB : lymphocytes B

Pré-B : stade précoce de la maturation lymphocytes B

PLC: phospholipase C

PH:pleckstrin homology

PIP (2,3):phosphatidyinositol (2,3)-phosphate

PKC: protein kinase C

Lyn: proteine tyrosine kinases

Mir-346: micro ARN 346

NF-Kb:nuclear factor-kappa B

NFAT: nuclear factor of activated T-cells

SYK: spleen tyrosine kinase

TEC :protein tyrosine kinases

TH :tec homology

IP3: inositol 3-phosphate

IκB: protein inhibitrice de l'NF-κB

V-DJ:variable diversity joining

XLA : l'agammaglobulinémie liée à l' X

XIST: ARN non codant (X inactive specific transcript).

# Sommaire

## SOMMAIRE

Introduction .....	1
<b>Chapitre I : Rappels bibliographiques</b>	
I.1 Généralités sur l'immunité .....	2
I.1.1 Le système immunitaire .....	2
I.1.2 Les déficits immunitaire .....	2
I.1.3 Les types d'Agammaglobulinémie .....	2
I.2 Présentation de l'Agammaglobulinémie Bruton.....	3
I.3 Epidémiologie .....	3
I.4 Signes révélateurs de la maladie .....	4
I.5 Physiopathologie .....	5
I.5.1 Définition des lymphocytes B .....	5
I.5.2 Rôle des lymphocytes B .....	5
I.5.3 Processus physiologique de maturation des lymphocytes B .....	6
I.5.4 Marqueurs phénotypique de surface des lymphocytes B .....	7
I.6 Diagnostic de l'XLA.....	7
I.7 Mécanisme moléculaire de la protéine Btk .....	7
I.7.1 Présentation de la protéine Btk .....	7
I.7.2 Le gène Btk .....	8
I.7.3 La protéine Btk .....	9
I.7.4 La signalisation de la protéine Btk .....	11
I.8 Autres mécanismes de contrôle épigénétique .....	13
I.9 Mutation du gène Btk .....	13

I.9.1	Btkbase .....	13
I.9.1.1	Types de mutation Btk .....	13
I.9.1.2	Les caractéristiques des mutations affectant la Btk .....	14
I.9.1.3	Distribution des mutations dans les domaines du gène Btk .....	15
I.9.1.4	Les acides aminés .....	16

## **Chapitre II : Matériels et méthodes**

II.1	Les différentes phases de l'étude .....	18
II.1.1	Phase de Prélèvements .....	18
II.1.2	Phase d'extraction de l'ADN .....	18
II.1.3	Phase de contrôle qualitatif et quantitatif de l'ADN .....	20
II.1.4	Phase d'amplification par la PCR .....	20
II.1.5	Phase de séquençage .....	23
II.2	Analyse Bio-informatique .....	27
II.2.1	Utilisation du logiciel Chromas Lite .....	27
II.2.2	Analyse Blast .....	27
II.2.3	Analyse des mutations .....	28

## **chapitre III Résultats**

III.1	Analyse génétique du patient N°1 .....	29
III.1.1	Le contrôle qualitatif et quantitatif de l'ADN extrait par le Nanodrop (Maestrogen)....	29
III.1.2	Le profil d'amplification de la PCR de l'exon 8-9, des patients: P1-P4-P2-P3....	29
III.1.3	Visualisation des séquences de l'exon 1 et de l'exon 8-9 par le logiciel Chromas...	29
III.1.4	Analyse Blast .....	31
III.1.5	Identification des mutations par le logiciel mutation Surveyor .....	31

III.2 Analyse génétique du patient N°2 .....	33
III.2.1 Le contrôle qualitatif et quantitatif de l'ADN extrait par le Nanodrop (Maestrogen) .....	33
III.2.2 Visualisation des séquences de l'exon 1 et de l'exon 8-9 par le logiciel Chromas .....	33
III.2.3 Analyse Blast Exon 1 .....	35
III.2.4 Identification des mutations par le logiciel mutation Surveyor .....	35
III.3 Analyse génétique du patient N°3 .....	37
III.3.1 Le contrôle qualitatif et quantitatif de l'ADN extrait par le Nanodrop (Maestrogen)....	37
III.3.2 Visualisation des séquences de l'exon 1 par le logiciel Chromas .....	37
III.3.3 Analyse Blast de l'exon 1 .....	38
III.3.4 Identification des mutations par le logiciel mutation Surveyor .....	38
III.4 Analyse génétique du patient N°4 .....	39
III.4.1 Le contrôle qualitatif et quantitatif de l'ADN extrait par le Nanodrop (Maestrogen) .....	39
III.4.2 Visualisation des séquences de l'exon 1 et l'exon 8-9 par le logiciel Chromas .....	39
III.4.3 Analyse Blast de l'exon 1 et de l'exon 8-9 .....	40
III.4.4 Identification des mutations par le logiciel mutation Surveyor .....	41
III.5 Analyse génétique du patient N°5 .....	43
III.5.1 Le contrôle qualitatif et quantitatif de l'ADN extrait par le Nanodrop (Maestrogen)...	43
III.5.2 Le profil d'amplification de la PCR de l'exon 1, des patients P5 et P6 .....	43
III.5.3 Visualisation des séquences de l'exon 1 et l'exon 8-9 par le logiciel Chromas .....	44
III.5.4 Analyse Blast de l'exon 1 et de l'exon 8-9 .....	45
III.5.5 Identification des mutations par le logiciel mutation Surveyor .....	46

III.6 Analyse génétique du patient N°6 .....	47
III.6.1 Le contrôle qualitatif et quantitatif de l'ADN extrait par le Nanodrop (Maestrogen)...	47
III.6.2 Visualisation des séquences de l'exon 1 et l'exon 8-9 par le logiciel Chromas .....	47
III.6.3 Analyse Blast de l'exon 1 et de l'exon 8-9 .....	48
III.6.4 Identification des mutations par le logiciel mutation Surveyor .....	49

#### **Chapitre IV interprétations des résultats**

IV interprétations des résultats .....	60
--	----

#### **V. Conclusion générale** 64

Annexe

Références bibliographiques

# *Introduction*

### Introduction

La maladie de Bruton est une maladie grave et rare son incidence est d'environ 1/200 000 naissances (Alain Fischer 2005). Elle constitue le modèle de déficit exclusif et total de l'immunité humorale. L'absence de production d'immunoglobulines dans cette maladie est liée à un blocage précoce de la maturation des lymphocytes B. Cette maladie est provoquée par une mutation du gène codant pour la tyrosine kinase *Btk*. La localisation de ce gène sur le chromosome X explique la transmission héréditaire sur le mode récessif lié à l'X et l'atteinte majoritaire des garçons.

En dehors des classiques infections bactériennes qui apparaissent souvent précocement, dès la première année de vie, l'agammaglobulinémie liée à l'X prédispose aussi au risque d'infections chroniques par les entérovirus. Cette maladie nécessite la mise en place précoce d'un traitement substitutif intensif par perfusions régulières d'immunoglobulines polyvalentes, au long cours.

Le travail a consisté en la recherche des mutations du gène *Btk*, chez 6 patients algériens de sexe masculin atteints de l'agammaglobulinémie liée à X (XLA), en ciblant les exons 1, 8 et 9 par la technique du séquençage.

Ces patients présentaient un déficit immunitaire humoral, qui a été diagnostiqué comme conséquence de la maladie de Bruton et ce, sur la base d'investigations cliniques et immunologiques, qui ont consisté principalement en la recherche des différents isotypes d'immunoglobulines dans le sang, d'une part et la numération des lymphocytes B utilisant un anti-CD19 par cytométrie en flux d'autre part.

# **Rappel bibliographique**

## **I.1 Généralités sur l'immunité**

La défense de l'organisme humain repose sur plusieurs niveaux de défense, intimement intriqués, qui vont coordonner la réponse immunitaire.

### **I.1.1 Les déficits immunitaires**

Un déficit immunitaire (DI) est une situation relativement rare au cours de laquelle le système immunitaire présente un dysfonctionnement. On dit qu'un DI est primitif lorsqu'il est congénital, donc héréditaire. On le différencie ainsi des déficits immunitaires acquis comme le SIDA ou des DI secondaires à des traitements immunosuppresseurs ou chimiothérapies qui sont de loin les plus fréquents.

Il existe plusieurs types de déficits immunitaires primitifs (DIP) qui sont: Déficiences immunitaires combinées, immunodéficiences combinées associées à des syndromes, déficiences en anticorps, maladies de dérégulation immunitaire, déficience des phagocytes en nombre ou en fonction, pathologies de l'immunité innée, troubles auto-inflammatoires et déficience en complément (Al-Herz et al., 2014).

Dans notre étude le déficit immunitaire primitif auquel nous nous sommes intéressés est dit de type humoral, il s'agit de l'agammaglobulinémie liée au chromosome X.

### **I.1.2 Les types d'agammaglobulinémie**

Les différents types d'agammaglobulinémie sont :

- ✓ L'agammaglobulinémie non Bruton: Elle peut être autosomique récessive (Conley, 2003), autosomique dominante (Sawada et al., 2003), liée au sexe avec un déficit en hormone de croissance (Fleisher et al., 1980).
- ✓ L'Agammaglobulinémie de Bruton (liée à l'X) c'est à cette maladie que va s'intéresser notre étude.

## **I.2 Présentation de l'Agammaglobulinémie de Bruton ou maladie de Bruton**

L'agammaglobulinémie liée à l'X (XLA) est le premier déficit immunitaire identifié par Ogden Bruton en 1952 chez un garçon de huit ans. Elle constitue le modèle de déficit exclusif et total de l'immunité humorale. XLA est l'agammaglobulinémie la plus fréquemment diagnostiquée qui touche majoritairement les garçons. (Bruton O.C.1952).

La maladie est gaunosomique récessive portée sur le chromosome sexuel X, elle est causée par des mutations du gène Btk codant une tyrosine kinase Btk, situé au locus X q21.33 - q22. (Tsukada et al., 1993; Vetrie et al., 1993).

Le déficit en la protéine Btk entraîne un arrêt précoce de la maturation des lymphocytes Bau stade pré-B1 de la lymphogénèseB; qui conduit à une lymphopénie B au niveau périphérique < 2%, voir une alymphocytose B avec absence de plasmocytes. Les ganglions lymphatiques sont hypotrophiés, avec absence ou hypoplasie d'amygdales chez 79% des patients XLA (Chun, J.k et al., 2008)

L'arrêt de maturation des lymphocytes B bloque la production d'immunoglobulines, l'absence d'immunoglobulines prédispose au risque d'infections chroniques aux germes à multiplication extracellulaires qui apparaissent souvent précocement, dès la première année de vie. Un traitement de substitution des immunoglobulines est nécessaire (Piiirila et al., 2006).

### **I.3 Epidémiologie**

La maladie de Bruton est une maladie grave et rare son incidence est d'environ 1/200 000 naissances. (Alain Fischer., 2005)

Bien que XLA est un DIP donc héréditaire, certaines études ont montré que 50% des cas de XLA sont sporadiques ou n'ont pas d'antécédents familiaux de cette maladie, cas de mutations de novo. (Plebani et al., 2002).

Il existe un grand nombre de patients en raison de la pénétrance élevée de la maladie liée à l'X chez les garçons.

En Algérie il n'y a pas de registre national des DIP mais compte tenu du caractère récessif de l'XLA et du taux de consanguinité élevé 34% (plus important que celui retrouvé au Maroc et en Tunisie) on doit s'attendre à une incidence plus élevée que dans les pays occidentaux. D'après Benallegue & Kedji 1984.

On peut se demander compte tenu du fait que cette maladie est liée à l'X pourquoi on ne trouve pas de cas rapporté de malades filles, le seul cas à notre connaissance rapporté est celui d'une petite fille japonaise, dont la maladie s'est exprimée du fait d'un problème en rapport avec l'inactivation du chromosome x. (Takada et al., 2004)

Cette maladie est une maladie récessive, un nombre assez important de filles peuvent être porteuses de cette anomalie génétique qui ne s'exprime pas, du fait qu'elles ont deux X, l'X qui porte le gène muté est le plus souvent inactivé.

Néanmoins, la probabilité théorique existe quand les deux parents sont porteurs et/ou malades (combinaisons fréquentes dans les mariages consanguins), mais dans la réalité cette probabilité ne se concrétise pas dans notre pays du fait que les parents décèdent et/ou ne se reproduisent pas (faute de prise en charge médicale appropriée).

Il n'y a pas de corrélation entre le génotype et le phénotype des patients XLA. (Bien que la corrélation génotype-phénotype pour résidus hautement sélectionnés soit extrêmement forte, l'ensemble des corrélations est faible.)

### ✓ **L'âge de diagnostic de la maladie**

La plupart des cas sont diagnostiqués dans la petite enfance (avant 5 ans); Les garçons atteints présentent des infections bactériennes graves après 6 mois (lorsque l'immunité passive maternelle a cessé). (Valiaho et al., 2006).

Cependant, il ya eu des patients diagnostiqués à des âges plus avancés, car ils sont asymptomatiques ou diagnostiquée à tort d'un déficit immunitaire commun variable (Usui et al.,2001)

## **I.4 Signes révélateurs de la maladie**

### ✓ **L'infection**

Les manifestations infectieuses dominent la symptomatologie des nombreux déficits immunitaires. Ces infections sont caractérisées par leur fréquence (infections récurrentes) et leur sévérité. Les principaux types sont : La pneumonie, l'otite moyenne, et aigue, la sinusite, la diarrhée récurrente, la conjonctivite, les infections de la peau, la méningite, les encéphalites, l'arthrite septique, l'hépatite et l'ostéomyélite (Winkelstein et al.,2006).

Les germes incriminés sont à multiplication extracellulaire et entérovirus dont : Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Enterovirus, et EBV(Basile et al., 2009).

### ✓ **Antécédents familiaux**

La piste de la maladie est établie en cas de déficit connu ou suspecté dans la fratrie (décès inexpliqué en bas âge).

### ✓ **Autres manifestations non infectieuses symptomatiques d'un déficit immunitaire**

Le XLA se manifeste aussi parfois avec divers spectres cliniques, tels que :

- Le cancer : La fréquence des tumeurs malignes est de 6%. Les plus répandues sont les maladies lymphoproliférative, adénocarcinome gastrique, cancer colorectal (Salavoura et al., 2008).
- L'auto-immunité: L'Arthrite rhumatoïde juvénile et l'arthrite dermatomyosite rhumatoïde. (Cunningham-Rundles et al, 2011).
- La neutropénie sévère qui survient chez 20% des patients atteints (Farrar et al.,1996).

### **I.5 Physiopathologie**

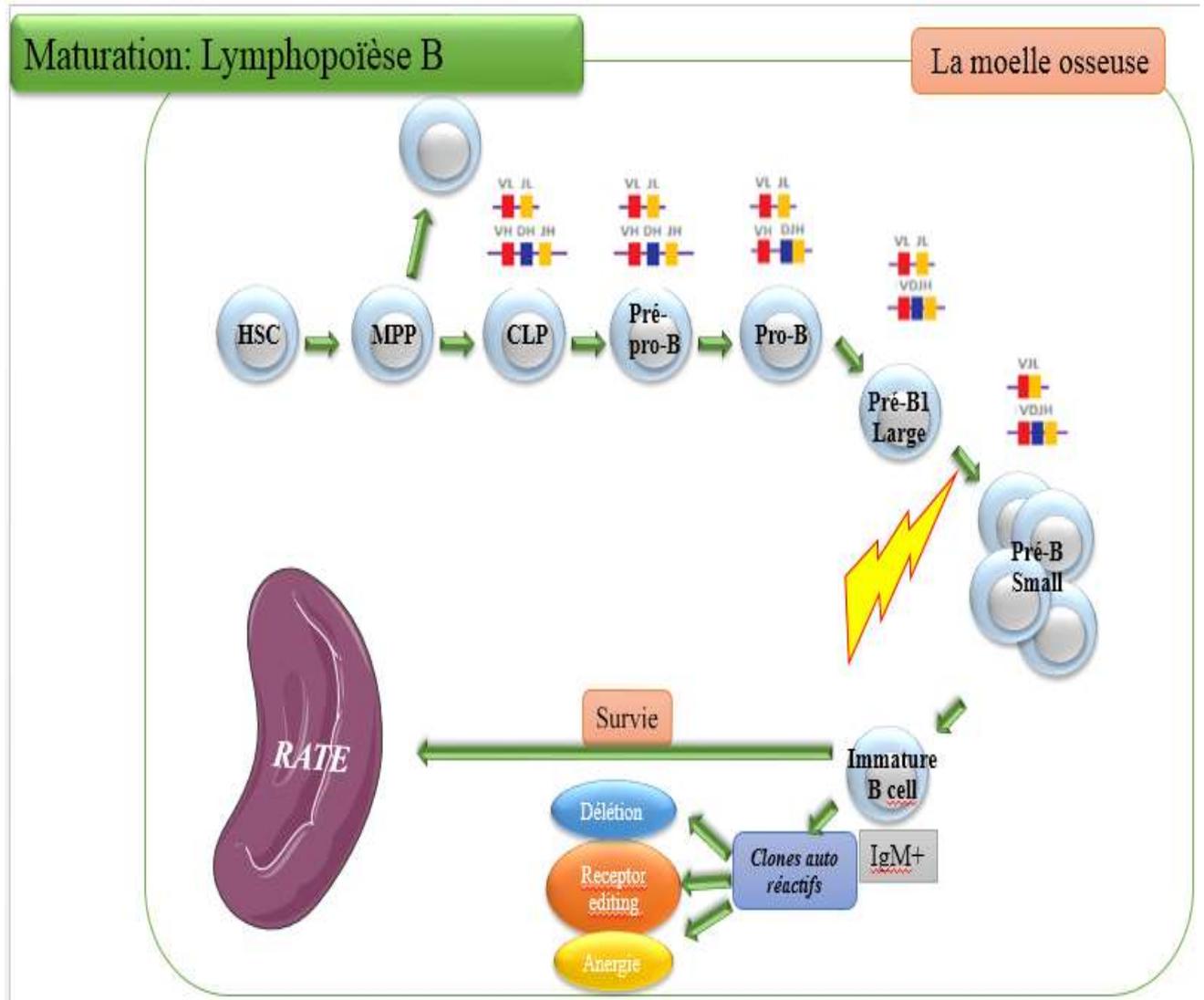
XLA est la résultante d'un problème de maturation des lymphocytes B qui produisent les 5 classes d'anticorps Ac :IgG ,IgA, IgM, IgD, IgE (voir en annexes les normes selon l'âge). L'absence de ces immunoglobulines dans le sang constitue la première étape du diagnostic immunologique de XLA.

#### **I.5.1 Définition les lymphocytes B**

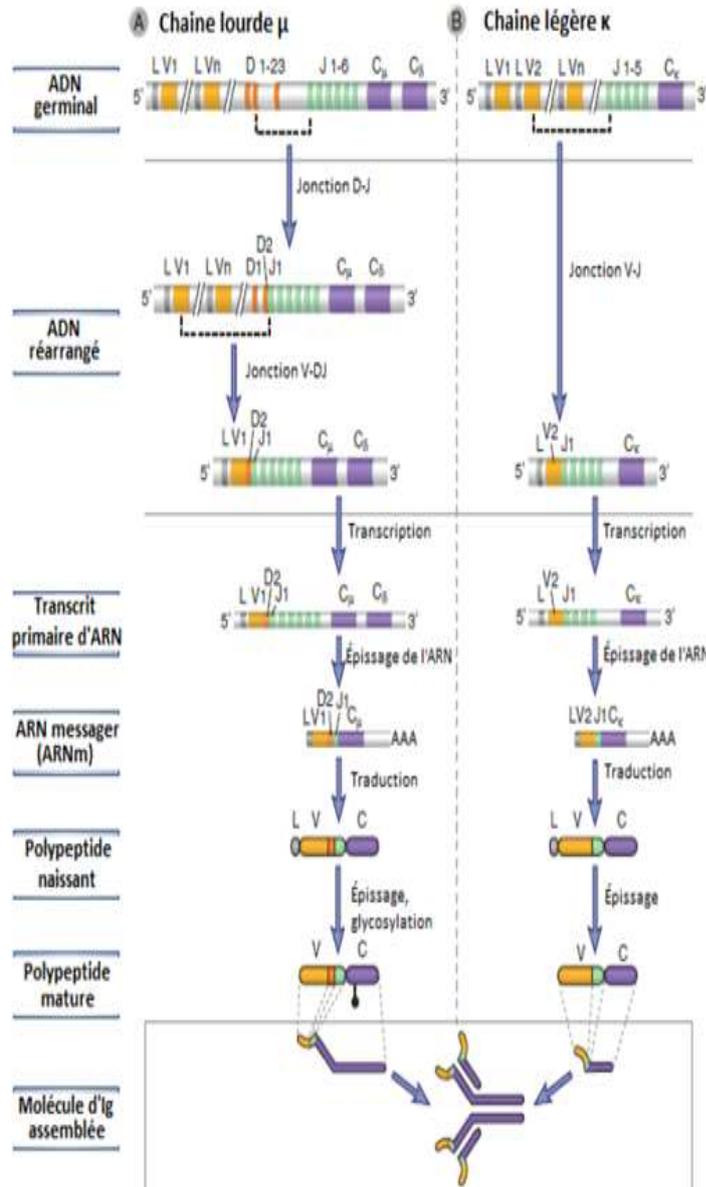
Ils sont issus de la lignée lymphoïde des cellules souches hématopoïétiques CSH. Les lymphocytes B prennent leur origine dans la moelle osseuse, ils acquièrent leur maturation et leur différenciation également dans celle-ci à l'aide de cytokines.

#### **I.5.2 Processus physiologique de maturation des lymphocytes B**

Les cellules souches passent par plusieurs stades de maturations (figure1). Au cours de ce processus un phénomène génétique spécifique aux lymphocytes B et T se produit par un réarrangement des gènes des Immunoglobulines (figure 2).



**Figure 1:** l'ontogénèse des lymphocytes B (*Annu. Rev. Immunol.*2006. 24:287–320)



**Figure 2:** Recombinaison et expression des gènes de chaine lourde et légère d'immunoglobuline.

Adapté d'après Abbas *et al.* (2012).

### I.5.3 Les marqueurs phénotypiques de surface spécifiques aux lymphocytes B

Les cellules B, possèdent un ensemble de marqueurs communs de surfaces. Le plus important est le **BCR** qui est l'élément caractéristique majeur des cellules B. Il est le support de toutes les cascades de signalisation, à l'origine des réponses immunitaires dirigées contre des antigènes capables de stimuler les cellules B. Il se trouve sur une cellule naïve et est composé d'une IgM ou IgD, associées aux molécules Ig $\alpha$  (CD79a) et Ig $\beta$  (CD79b). Ces deux dernières permettent au BCR, grâce à leurs longs domaines cytoplasmiques, d'interagir avec les molécules de signalisation intracellulaires.

les autres marqueurs sont : **CD19, CD21, CD81, CD40** ainsi que les différents **TLR** (Bondadaetal., 2013).

### I.6 Diagnostic de l'XLA

Le diagnostic clinique est complété par le diagnostic immunologique et confirmé par le diagnostic génétique. Le nombre de cellules B (CD19+ et CD20+), ou un taux sérique (IgA, IgG, IgM) en dessous de la fourchette normale selon l'âge; couplé à une histoire de famille: peut servir à établir un diagnostic définitif (Conley et al., 1999). La détection des mutations demeure la méthode la plus fiable d'un diagnostic définitif.

### I.7 Mécanisme moléculaire de la protéine Btk

#### I.7.1 Présentation de la protéine Btk

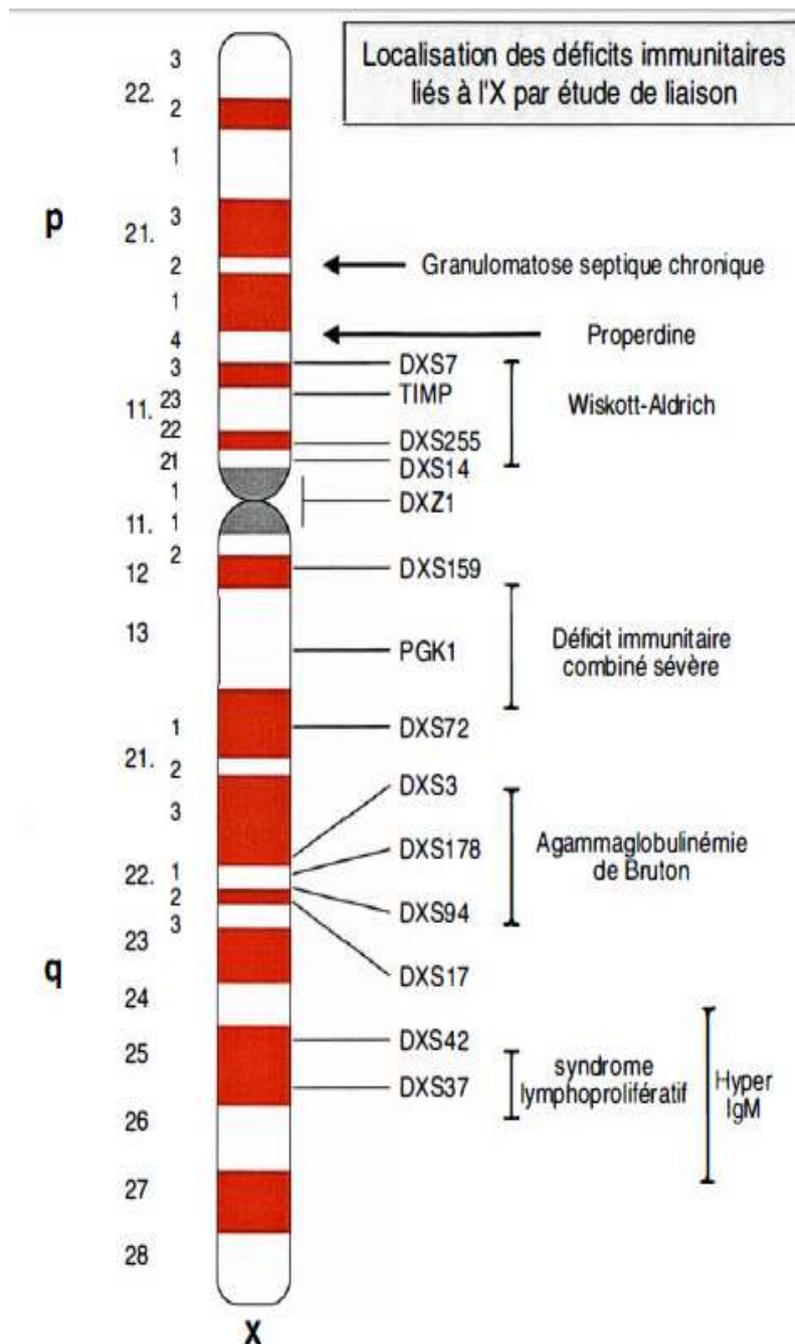
Le rôle central de Btk dans le développement et la maturation du lymphocyte B, a été mis en évidence, par La découverte des mutations génétiques impliquées dans l'agammaglobulinémie; liée à l'X chez l'humain et à l'X ou XID dans le modèle murin immunodéficient (Rawlings et al., 1993, Thomas et al.,1993). Le rôle de Btk dans la maturation lymphocytaire est moins important chez les modèles murins ou elle peut être remplacée par la protéine tyrosine kinase Tec, ce qui n'est pas valable chez l'homme (Ellemeier et al., 2000). Btk est impliquée dans:

- Le contrôle du système immunitaire inné, via la voie des Toll like Receptor (TLR).
- La voie de signalisation du récepteur Fc $\gamma$ R des cellules myéloïdes (Jongstra-Bilen et al.,2008).
- La régulation de la prolifération mastocytaire.
- La physiopathologie de certaines maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde et certaines hémopathies malignes.

- La régulation de la différenciation des ostéoclastes, son absence entrainerait un défaut d'absorption osseuse et une ostéopétrose chez la souris déficiente .(Shinohara et al., 2008)

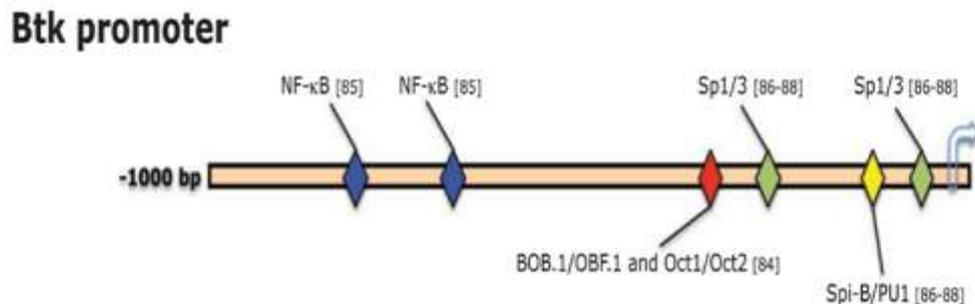
### I.7.2 Le gène *Btk*

Le gène *Btk* est situé sur le locus X q21.33 - q22 (figure 3). se trouvant sur le bras long du chromosome X humain, (Tsukada et al., 1993; Vetrie et al., 1993). Le gène est de 37,5 kb et comporte 19 exons et 18 introns (Sideras et al., 1994).



**Figure 3:** Schéma de localisation du gène *Btk* (G. de saint Basile 1992)

L'identification des régions promotrices du gène *Btk* s'est faite suite au clonage du gène en 1992 (Vetrie et al., 1993). Son promoteur, situé à environ 1000 pb en amont du gène, est régulé par plusieurs facteurs de transcription dont notamment NF- $\kappa$ B, Pu-1, Sp1/3, Spi-B, BOB.1, OBF.1 et Oct1/2 (figure 4).



**Figure 4:** Schéma du promoteur de *Btk* avec les sites de fixation des facteurs de transcription (Mohamed et al., 2009)

Cette figure est la représentation schématique du promoteur de la Bruton tyrosine kinase (Btk) et domaines de Btk avec tous les partenaires connus avec qui elle interagit / régulation.

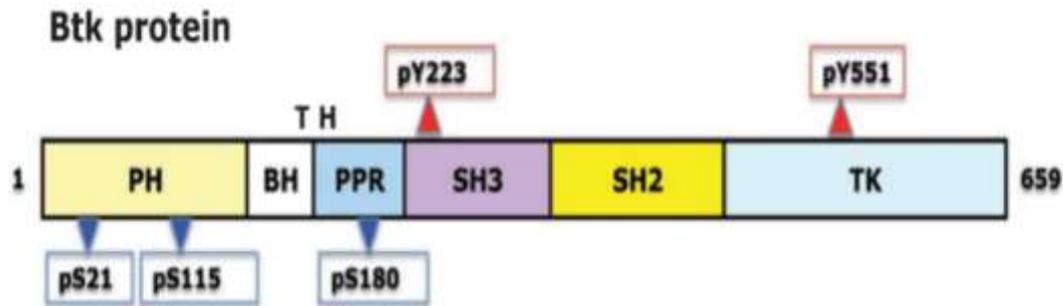
### I.7.3 La protéine Btk

Btk est une protéine tyrosine kinase non récepteur, cytoplasmique. Elle est exprimée en continu pendant le développement des cellules B, et ce, dès le stade pro-B tardif (late pro-B) jusqu'au stade de maturité.

La protéine Btk comporte 659 acides aminés de 77 kDa et se compose à partir de l'extrémité N-terminale, des domaines fonctionnels successifs suivants (figure 5) :

- Un domaine PH ou Plekstrin Homology
- Un domaine TH ou Tec Homology regroupant les régions BH (Btk Homology Region) et PPR (Poly Proline Region)
- Un domaine SH2 ou Src Homology 2 et un domaine SH3 ou Src Homology 3
- Un domaine kinases SH1 ou Src Homology 1 comportant le domaine tyrosine kinase.

C'est à partir de ces différents domaines, que la protéine Btk pourra être activée et ce, par phosphorylation pour interagir avec de nombreuses protéines intervenant dans différentes voies de signalisation.



**Figure 5:** Schéma représentatif des différents domaines de Btk

Ce schéma représente les différents domaines de la protéine Btk avec leurs sites de phosphorylation (flèches rouges et bleues). (Mohamed et al., 2009).

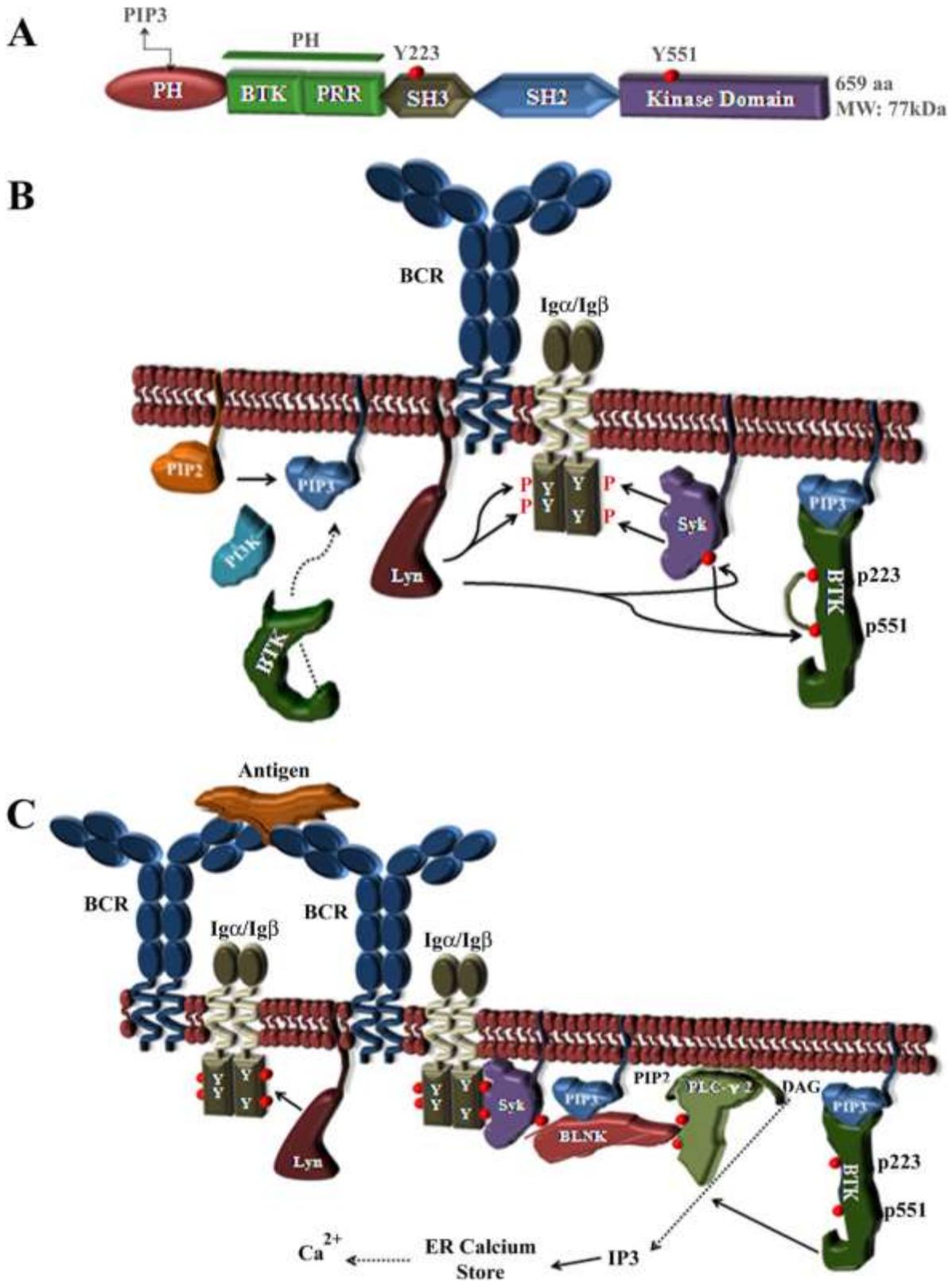
La localisation de la protéine Btk est sous sa forme inactive non phosphorylée, la protéine Btk se localise dans le cytoplasme à proximité du noyau cellulaire. Sa stabilité nécessite la présence de Zinc se fixant au niveau du domaine TH de la protéine. Des mutations dans la région de fixation au zinc amènent à la génération d'une protéine Btk très instable et rapidement dégradable ( Hyvonen et al., 1997).

La protéine Btk appartient à la famille des tyrosines kinases Tec (Jefferies and al., 2003). Btk est exprimée dans toutes les lignées hématopoïétiques à l'exception des lymphocytes T et les cellules NK (Mohamed et al., 2009) ; ainsi que les plasmocytes (Smith et al., 1994).

L'absence de Btk fonctionnelle, conduit à l'échec de plusieurs voies de transduction de signaux, qui régulent d'importants processus physiologiques de la cellule, tels que : l'apoptose, la croissance, le cycle cellulaire, la prolifération, et surtout la transduction du signal médiée par le récepteur antigène.

### I.7.4 La signalisation de la protéine Btk

La signalisation via le BCR se présente comme suit :



**Figure 6:** La voie de signalisation Btk médiée par le BCR.(Lopez-Herrera et al.,2014)

### ✓ Phase 1 : de transduction du signal

L'activation du récepteur du lymphocyte B ou BCR, soit par fixation antigénique ou par maturation, entraîne sa dimérisation. Elle permet de phosphoryler ultérieurement des ITAM  $Ig\alpha / Ig\beta$ , situés dans la région cytoplasmique. Les protéines Lyn et Fyn sont recrutées à ces ITAM par interaction avec leurs domaines SH2.

La protéine Lyn a un rôle central dans la voie de signalisation du BCR, elle va permettre la phosphorylation de Btk sur le site Y551, puis son autophosphorylation au niveau Y223 du domaine SH3. Ces deux processus entraînent la modification de sa conformation spatiale. Ce qui permet à son domaine PH d'interagir notamment avec la PIP3.

La protéine Lyn active la protéine membranaire CD19, directement par phosphorylation et indirectement en activant CD22 (en levant son Inhibition sur CD19). Le CD19 activé, va recruter la protéine PI3K qui elle-même phosphoryle PIP2 en PIP3. Cette dernière sera reconnue par le domaine PH de Btk. (Satterthwhite et al., 2000)

### ✓ Phase 2 de transduction du signal

La protéine Btk activée est recrutée à la membrane plasmique par l'interaction de son Domaine PH avec PIP3. Les cibles de Btk comprennent  $PLC\gamma 2$  et PI3K.

- La  $PLC\gamma$  est également régulée par la protéine kinase Syk, qui avec Btk, phosphoryle et active cette protéine (p- $PLC\gamma 2$ ), à son tour elle catalyse l'hydrolyse de PIP2 en IP3 et DAG. IP3 induit la mobilisation du calcium du RE.
- La PKC va pouvoir intervenir à deux niveaux de voie de signalisation : En levant l'inhibition d' $I\kappa B$  sur  $NF-\kappa B$  par l'intermédiaire de la famille IKK (Petro et al., 2000) et en modifiant le flux calcique intra cellulaire, entraînant l'activation de la protéine phosphatase CaN et celle du facteur de transcription NFAT.

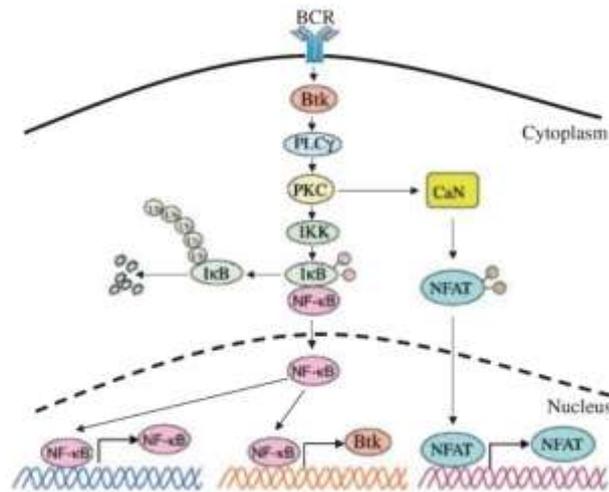
### ✓ Phase 3 de transduction du signal

Une fois activé, Btk peut interagir avec BLNK, qui interagit à son tour avec d'autres protéines fonctionnant comme des substrats de Btk.

L'activation de Btk va donc permettre le recrutement de deux facteurs de transcriptions majeurs :  $NF-\kappa B$  et NFAT. Ces derniers régulent la synthèse de nombreuses protéines, intervenant dans la régulation de la prolifération, de la maturation et de la survie cellulaire.

Les lymphocytes B, déficients en la protéine Btk, ont une activité NF- $\kappa$ B nettement diminuée. ce qui prouve l'importance de cette interaction Btk/ NF- $\kappa$ B (Bajpai et al., 2000). (Figure 6).

La cascade de signalisation Btk se présente comme suit :



**Figure 7:** La cascade de signalisation Btk

Ce schéma montrant le rôle de Btk dans la voie de signalisation du BCR, dans la régulation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et NFAT (Mohamed et al., 2009).

Par ailleurs, le contrôle de NF- $\kappa$ B par Btk, va également permettre l'autorégulation de Btk. Puisque le NF- $\kappa$ B, a des sites d'interactions sur le promoteur du gène Btk. D'autres part, il a également été démontré que Btk pouvait intervenir sur la régulation d'autres facteurs de transcriptions (BAP-135, TFII-I, STAT5A, Bright), ainsi que sur la voie des MAPK ; et ce par interaction indirecte avec RasGRP3, régulant la synthèse du facteur de transcription AP-1 (Mahajan et al., 2001).

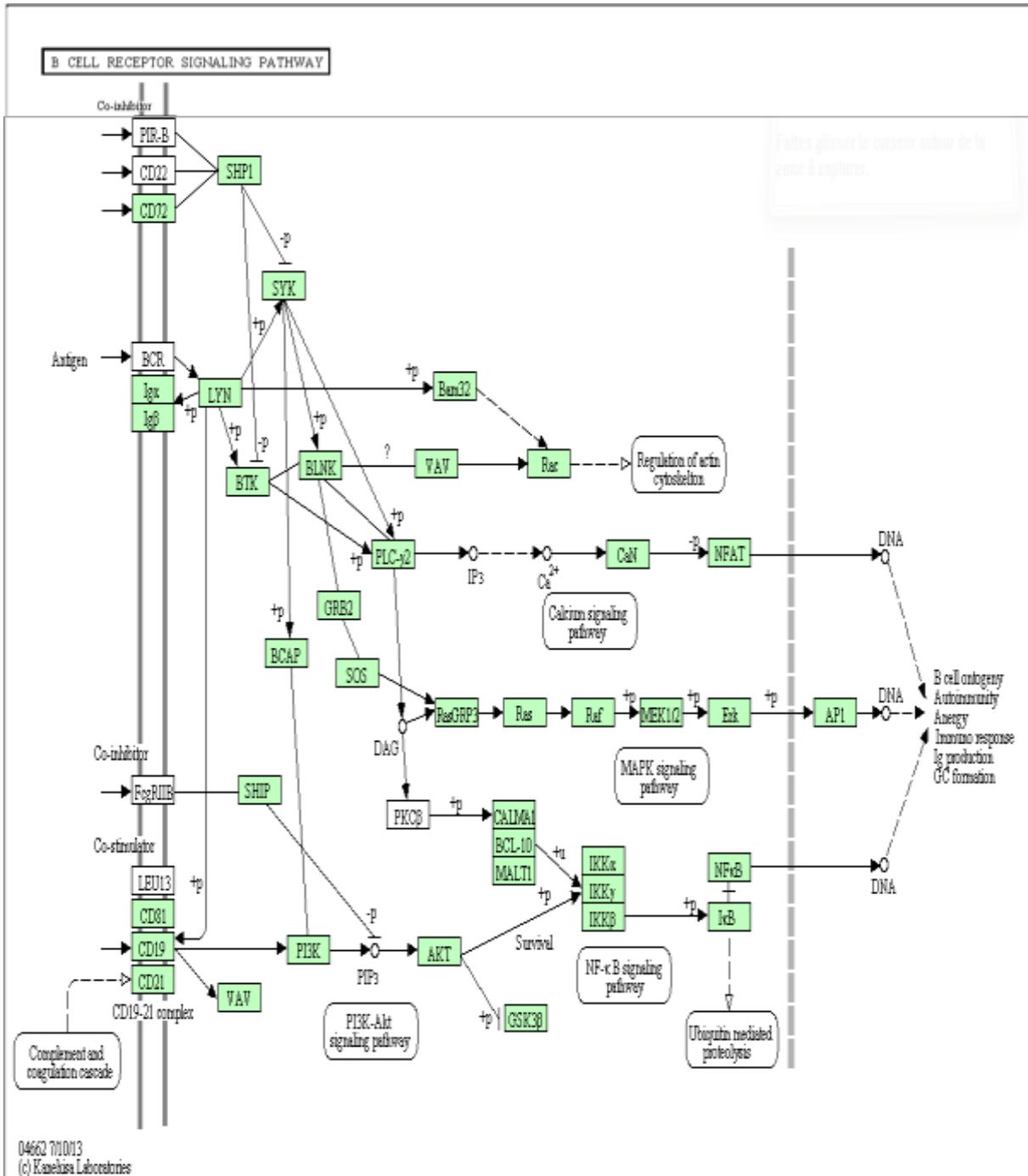
La figure N°8 représente de manière non exhaustive l'ensemble des voies de signalisation en réponse au récepteur BCR faisant intervenir la protéine Btk.

De plus, et en association avec la protéine kinase Syk, recrutée par Lyn ; Btk va réguler la protéine Rac et ce, par l'intermédiaire de BLNK, qui intervient dans la régulation du cytosquelette.

La protéine Btk peut être régulée négativement par :

La protéine Pin1, qui phosphoryle les sites S21 et S115, situés dans le domaine PH et accessoirement S180 dans la région PRR, et entraîne la dégradation de la protéine Btk. et cette

dernière est aussi régulée négativement par les protéines SHP-1 et SHP-2 (Maeda et al., 1999).



**Figure 8:** Schéma récapitulatif des voies de signalisation de Btk via BCR

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosystems/197731>)

### I.8 Autres mécanismes de contrôle épigénétique

La dégradation d'un ARNm est un mécanisme qui permet à toute cellule d'exercer un contrôle au niveau post-transcriptionnel (Mata et al., 2005).

L'ARN non codant le miR-346 module la synthèse de la protéine Btk. (Alsaleh et al., 2009)

L'ARN non codant Xist recouvre la quasi-totalité du chromosome X, et permet son extinction, l'inactivation du chromosome X muté est sélectionné systématiquement à l'X normal (G.de saint basile 1992).

### I.9 Mutation du gène *Btk*

Les mutations du gène codant la Btk pour Bruton tyrosine kinase sont répertoriées dans OMIM # 300300.

La détection de mutations des patients atteints de XLA, a été effectuée dans de nombreux pays. Un grand nombre des mutations de BTK cités dans les publications sont ajoutés dans l'international Btk base (Valiaho et al., 2006).

Les nouvelles mutations introduites sont des mutations de décalage de cadre de lecture (frameshift), faux-sens, une grande partie des patients atteints de l'XLA ont des mutations des novo.

#### I.9.1 Btkbase

La base de données de mutation (Btkbase), Version 8 (Väliaho et al., 2006 )

Elle contient une liste de 1111 patients de 973 familles non apparentées, rapporte 602 événements moléculaires uniques. Cette liste permet une nouvelle analyse statistique et fournit des résultats plus fiables.

##### I.9.1.1 Types de mutation Btk

- ✓ Les mutations qui touchent le gène *Btk* et provoquent le XLA sont des mutations : faux sens, non-sens, délétions (indels), insertions, mutations dans les sites d'épissage, inversions, duplications, répétitions, expansions, et réarrangements complexes (Tableau1). (Lopez-Herrera et al.,2014)

Les Pourcentages des types de mutations se présentent selon le tableau suivant :

**Tableau I:**Types de mutations

Mutations	Nombres	Pourcentage
Faux sens	389	35%
Codon stop	161	14,5%
Délétions	191	17%
Sites d'épissage	156	14,04%
Insertions	68	6,1%

### I.9.1.2 Les caractéristiques des mutations affectant la Btk

- Les transitions sont plus fréquentes que les transversions (69% contre 31%), idem ID bases (Piirila et al.,2006).
- La grande majorité des substitutions sont des transitions soit : 69%.

Dans XLA, les transitions C en T sont à 29%, moins que dans d'autres immunodéficiences (39%).

- Les mutations sont plus fréquentes au niveau des dinucléotides CpG , touchant souvent les résidus de R. (Lopez-Herrera et al.,2014)
- La plupart des mutations faux-sens sont structurelles, modifiant la forme ou diminuant la stabilité de la protéine (Btk).
- La plupart des mutations au niveau des résidus conservés, affectent de manière significative la fonction de la protéine.
- 32,4% des mutations faux-sens provoquent un changement d'ordre de fréquence.

Le codon du R (Arginine), substitué en : codons stop, W(Tryptophane), Q(Glutamine), H(Histidine), C(Cystéine), G(Glycine), K(Lysine), P(Proline), S(Sérine),T (Thréonine) et L (Leucine). (Lindvall et al., 2005).

Les conséquences de l'ensemble des mutations sur la structure et la fonction de la protéine ont été prévues. Elles sont basées sur la séquence et la structure de l'information. (Holinski-Feder et al., 1998)

From	To	Independent mutations	Type
A	C	17 (4%)	Transversion
<b>A</b>	<b>G</b>	<b>32 (7%)</b>	<b>Transition</b>
A	T	8 (2%)	Transversion
C	A	28 (6%)	Transversion
C	G	8 (2%)	Transversion
<b>C</b>	<b>T</b>	<b>135 (29%)</b>	<b>Transition</b>
<b>G</b>	<b>A</b>	<b>109 (23%)</b>	<b>Transition</b>
G	C	17 (4%)	Transversion
G	T	27 (6%)	Transversion
T	A	19 (4%)	Transversion
<b>T</b>	<b>C</b>	<b>47 (10%)</b>	<b>Transition</b>
T	G	22 (5%)	Transversion
<b>Transitions</b>		<b>325 (69%)</b>	
<b>Transversions</b>		<b>146 (31%)</b>	

**Figure 9:** Transitions / transversions

### I.9.1.3 Distribution des mutations dans les domaines du gène *Btk*

La distribution des mutations dans les cinq domaines structuraux est approximativement proportionnelle à leur longueur, à l'exception du domaine Tec homologie (TH).

- Les mutations entraînant XLA ont été trouvées dans tous les domaines de Btk ainsi que dans les séquences non codantes du gène.
- Toutes sortes de mutations sont dispersées dans tous les domaines, à l'exception du domaine SH3, où les mutations faux-sens n'ont pas été identifiées (Tableau II).
- Les mutations affectent la protéine de plusieurs façons : son activité, sa stabilité, sa fonction, sa structure et ses interactions.
- Les mutations du domaine PH ont un effet désastreux sur la fonction globale de la protéine. Plusieurs modifications de PH domaine, ont déjà été, décrites : par exemple, la substitution de l'arginine 28 modifie la charge positive sur la surface du domaine PH de la protéine Btk ce qui empêche de cibler la membrane plasmique.

Le pourcentage de distribution des mutations dans les domaines de Btk se présente comme suit : (Lopez-Herrera et al., 2014)

**Tableau II:** Distribution des mutations

Domaine	Pourcentage
SH1	44.7%
PH	21.8%
SH2	13.7%
TH	8.3%
SH3	7%

- Des mutations faux-sens dans le domaine SH3 n'ont pas été rapportées.

Les auteurs suggèrent que la stabilité du domaine SH3 pourrait être très réfractaire à des mutations faux-sens.

Le répertoire des mutations dans la Btkbase est représenté selon la figure N°10.

	Upstream	PH	TH	SH3	SH2	TK	Other	Total
Missense	0/0/0	38/75/89	7/7/8	0/0/0	32/70/86	122/231/273	0/0/0	199/389/456
Nonsense	0/0/0	14/30/34	6/10/11	12/34/40	11/20/21	32/67/74	0/0/0	75/161/180
Deletion in-frame	0/0/0	6/6/11	2/2/2	0/0/0	4/5/5	10/13/15	0/0/0	22/26/33
Deletion frameshift	0/0/0	32/37/40	18/19/24	15/17/18	18/19/22	45/54/55	0/0/0	128/146/159
Deletion undefined	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	1/1/1	0/0/0	4/18/18	5/19/19
Insertion in-frame	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	1/1/1	2/2/2	0/0/0	3/3/3
Insertion frameshift	0/0/0	9/16/19	10/15/15	3/3/3	3/3/3	18/22/27	0/0/0	43/59/67
Insertion undefined	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	2/2/2	1/4/4	3/6/6
Splice site in-frame	0/0/0	3/5/5	0/0/0	4/6/9	1/1/1	3/4/5	0/0/0	11/16/20
Splice site frameshift	0/0/0	7/7/9	0/0/0	1/1/1	3/3/6	9/10/13	0/0/0	20/21/29
Splice site undefined	4/7/8	20/26/30	6/9/10	5/7/8	15/19/19	35/51/56	0/0/0	85/119/131
Multiple	0/0/0	2/2/2	2/2/2	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	4/4/4
Upstream	4/4/4	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	4/4/4
Total	8/11/12	131/204/239	51/64/72	40/68/79	89/142/165	278/462/522	5/22/22	602/973/1111

**Figure 10:** Répertoire des mutations dans la Btkbase

- Toutes les mutations faux-sens causant des maladies sont indiquées dans les PH, SH2 et le domaine kinase. De nombreuses mutations faux-sens localisées sur les hélices  $\alpha$ , aux extrémités des feuillets  $\beta$ , et dans les positions où les feuillets  $\beta$  sont antiparallèles, ou ils interagissent avec des protéines.
- Dans le domaine SH2, de nombreuses mutations affectent les résidus formant le site de liaison pour phosphotyrosine et les acides aminés.
- Dans le domaine kinase seulement quelques mutations apparaissent dans la partie supérieure.
- La plupart des mutations sont dans des résidus critiques tels que ceux situés dans des substrats de liaison à l'ATP ou de liaison à d'autres protéines. (voir en annexe 6 les mutations qui causent l'agammaglobulinémie liée à l'X).

### I.9.1.4 Les acides aminés

- Les fréquences de substitution d'acides aminés ont été analysées pour toutes les combinaisons de substitution possible et sont similaires à KinMut-Base (Ortutay et al., 2005) et IDbases (Piiirila et al., 2006).
- L'Arginine R est de loin l'acide aminé le plus muté dans Btk. Un tiers des substitutions remplacent R.
- Les dinucléotides CpG, qui sont contenus dans quatre des six codons de l'arginine sont des hotspots (point chauds) pour les mutations.
- Environ un tiers des substitutions dans les codons pour R mutent pour un codon arrêt.

- Le rapport de mutabilité pour l'arginine est de 59. Il est plus élevé dans la Btk que dans d'autres maladies des immunodéficiences primaires (PID) (Piiirila et al., 2006).

De même, la tendance à ce que les acides aminés soient substitués par le W Tryptophane est beaucoup plus élevée pour le gène *Btk*.

La surreprésentation des R comme résidu mutés, conduit aussi à l'enrichissement par l'acide aminé mutant W. Le R a été remplacé par W à 6,7% dans l'ensemble des substitutions d'acides aminés.

- Les autres résidus à haute fréquence mutationnelle sont Y Tyrosine, P Proline, Q Glutamine, L Leucine et H Histidine.
- Les mutations modifient la structure, la fonction ou l'activité de la protéine. Par conséquent, de grands changements dans les propriétés de la protéine peuvent s'opérer.
- La P Proline diffère de tous les autres acides aminés, elle forme une structure cyclique avec le squelette polypeptidique. Elle limite les angles de torsion du squelette polypeptidique et donc empêche la formation de la structure secondaire. Un grand nombre de mutations entraînent des modifications structurelles. (Wang and Moulton, 2001; Yue et al., 2005).
- Bien que la Btkbase contienne plus de 1000 cas, toutes les modifications possibles d'acides aminés n'ont pas été identifiées chez des patients.
- Seules les mutations de remplacement d'un seul nucléotide sont indiquées.
- Pour l'isoleucine, il n'y a qu'une seule mutation qui cause la maladie par le remplacement par la méthionine.
- Des mutations qui causent la maladie dans la substitution de T Thréonine en soit : P Proline ou I isoleucine.
- Des mutations qui causent la maladie dans la substitution de N Asparagine seulement en K Lysine.
- La fréquence de substitution est supérieure pour les acides aminés G Glycine, L Leucine et R Arginine, par rapport aux acides aminés H et W. Leur fréquence est inférieure dans XLA et les autres immunodéficiences (Piiirila et al., 2006).

# **Matériel et méthodes**

Ce présent travail, s'est déroulé au laboratoire d'immunologie cellulaire du département d'Immunologie de l'Institut Pasteur d'Algérie pendant 8 mois.

Les moyens utilisés sont : Extraction d'ADN par KIT- la spectrophotométrie (NanoDrop) - la PCR - le séquençage - l'utilisation des différents logiciel bio-informatique : Blast - Studio - Chromas - Mutation Surveyor – PolyPhen2.

### **I Matériel**

#### **I.1 Matériel Biologique**

Les échantillons devant servir à l'étude, étaient disponibles au niveau du laboratoire sous forme de prélèvements sanguins ou d'ADN déjà extraits.

Le sang a constitué le matériel biologique de base pour extraire l'ADN. Les prélèvements sanguins ont été réalisés dans des tubes contenant de l'EDTA (Éthylène Diamine Tétracétique), identifiés par : le nom, le prénom et la date du prélèvement du patient. Le reste des renseignements cliniques du patient ont été mentionnés sur une fiche.

#### **I.2 Matériel non Biologique (voir annexe 4)**

### **II Méthodes**

#### **II.1 L'extraction de l'ADN**

L'extraction de l'ADN peut se faire à partir de divers matériels biologiques, essentiellement le sang ainsi que différentes techniques.

Celle utilisé dans cette étude est la méthode kit

##### **✓ Principe**

Cette technique permet l'extraction et la purification de l'ADN génomique par chromatographie échangeuse d'ions, à partir de prélèvements sanguins. Elle est basée sur l'utilisation de tampons optimums pour lyser complètement le prélèvement et augmenter l'adsorption sélective des acides nucléiques. Cette opération est réalisée sur une membrane se trouvant dans une colonne dont la surface est couverte de silice (SiO<sub>2</sub>), ayant une remarquable affinité pour l'ADN.

En additionnant de l'alcool, l'ADN est adsorbé par cette membrane, alors que les contaminants passent à travers. Les inhibiteurs, comme les cations divalents et les protéines,

sont complètement éliminés par deux lavages successifs. L'ADN est alors décroché de cette matrice par élution dans un tampon adéquat (voir en annexe les solutions utilisées).

### ✓ **Protocole opératoire**

- Mettre dans un eppendorf 200µl de sang + 20µl de Protéinase K
- Vortexer pendant 05 secondes.
- Incuber pendant 02 minutes à température ambiante.
- Mettre 200 µl de purlinkgenomiclysis /binding buffer.
- Vortexer pendant 10 secondes jusqu'à ce que la solution devient homogène.
- Mettre dans un bain marie pendant 10 minutes.
- Rajouter 200 µl d'éthanol 96-100%.
- Vortexer pendant 5 secondes.
- Rajouter 640µl lysat.
- Mettre le tri dans les colonnes.
- Centrifuger:7500t /1 mn ≈10000t/1mn.
- Enlever le tube collecteur et placer un autre.
- Rajouter 500µl wash buffer 1.
- Centrifuger : 7500t/1mn.
- Enlever la poubelle.
- Rajouter 500 µl de wash buffer 2.
- Centrifuger : 10000 t/03 mn.
- Mettre les colonnes dans des eppendorf.
- Rajouter 50µl élution buffer.
- Incubation 01 minutes à température ambiante.
- Centrifuger:10 000t/ 01 mn
- Récupérer les eppendorf : c'est la 1<sup>ère</sup> élution.
- Mettre un autre eppendorf
- Rajouter 50 µl élution buffer, laisser 01 minute
- Centrifuger : 10000 t/ 1,5 mn
- Récupérer l'eppendorf: c'est la 2<sup>ème</sup> élution.

## **II.2 Contrôle qualitatif et quantitatif de l'ADN**

L'estimation de la qualité et de la quantité de l'ADN est principalement basée sur deux méthodes : La spectrophotométrie et l'électrophorèse (Sambrook et al., 1989)

Dans notre étude nous avons adopté le **spectrophotométrie avec l'utilisation du NanoDrop.**

### ✓ Principe de la spectrophotométrie

Etant donné que l'acide nucléique et la plupart des macromolécules biologiques ne manifestent aucune absorption dans la gamme visible du spectre, ils sont donc incolores.

En revanche, l'ADN montre une absorbance aux rayons ultraviolets (UV) spécifiques allant de 230 nm à 260 nm. La quantité de radiation ultra violette absorbée par une solution d'ADN est proportionnelle à la quantité d'ADN.

Quant à la qualité de l'extrait, elle est évaluée en calculant le degré de contamination par les protéines et l'ARN.

### ✓ Appareil utilisé

Le NanoDrop (Maestrogen) est un spectrophotomètre qui ne nécessite pas l'utilisation de cuve. 1 µl de l'échantillon est déposé directement à l'extrémité d'un câble de fibre optique. Lorsque celui-ci est mis en contact avec un second câble par fermeture de l'appareil, l'échantillon est maintenu par une tension de surface et traversé par un signal lumineux.

L'estimation de la concentration de l'ADN se fait par la mesure de l'absorbance à 260nm. Sachant qu'une unité de DO à 260nm est l'équivalent de 50 µg/ml d'ADN.

On évalue la quantité d'ADN d'un échantillon par la formule suivante :

Facteur de dilution x 50 x DO à 260nm.

On doit vérifier également, que le rapport DO 260/DO 280 est compris entre 1,8 et 2,2.

Si ce rapport est inférieur à 1,8 : l'ADN est contaminé par les protéines.

S'il est supérieur à 2,2 : il y a contamination par l'ARN.

Dans notre cas la qualité et la quantité des ADN des patients, sujets de notre étude, s'est avérée satisfaisante après avoir été soumise à la spectrophotométrie (voir le chapitre des résultats), ce qui nous a permis de procéder à la phase suivante.

## II.3 Amplification par la PCR

Dans le but de procéder au séquençage de l'ADN, l'amplification de la séquence à analyser est nécessaire.

### ✓ Principe

La PCR ("Polymerase Chain Reaction") ou Réaction de Polymérisation en Chaîne, est une réaction enzymatique basée sur un principe simple : on utilise deux courtes amorces (18-24 nucléotides), complémentaires des deux brins d'une séquence d'ADN cible. Ces amorces s'hybrident dans des sites complémentaires en orientation inversée avec les deux brins de l'ADN cible et encadrent la région que l'on veut amplifier [Raven et al., 2010]. L'élongation des brins complémentaires à partir des amorces est assurée par une enzyme de polymérisation

thermorésistante : la Taq polymérase. Cette dernière est dérivée d'une bactérie thermophile nommée *Thermusaquaticus* qui possède la propriété d'être stable à la chaleur [Mullisetal., 1994].

Cette réaction cyclique, permet d'augmenter la quantité d'ADN d'un cycle à l'autre (théoriquement la quantité d'ADN multipliée par  $2^n$ ). Le nombre des cycles varie entre 30 et 40 comprenant chacun les étapes suivantes :

### ✓ **Dénaturation**

Séparation des deux brins d'ADN par la chaleur (à  $95^{\circ}\text{C}$ ), par la rupture des liaisons non covalentes (ponts hydrogènes) entre les bases appariées.

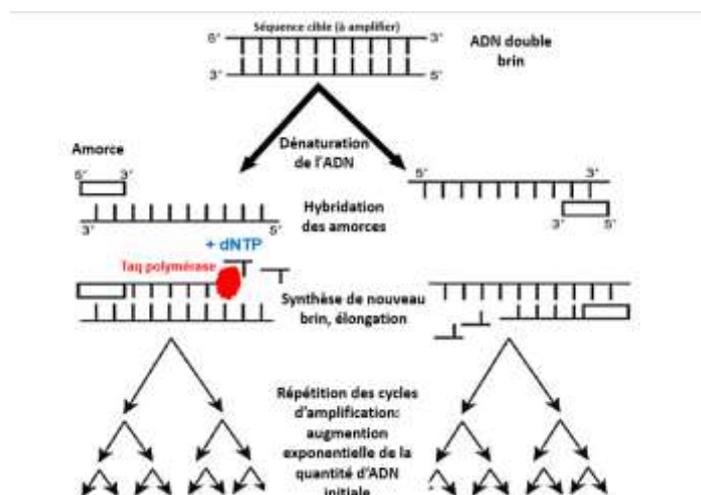
### ✓ **Hybridation**

Au cours de cette étape la température  $T_m$  est dépendante du couple d'amorces (entre  $50$  et  $70^{\circ}\text{C}$ ). Elle se déroule à une température **bien déterminée** et suffisamment élevée pour garantir une hybridation parfaite par la formation de liaisons hydrogènes entre l'amorce et la séquence d'ADN cible (Coquoz et Taroni, 2006).

### ✓ **Élongation**

Au cours de cette étape la température est élevée à nouveau (environ  $72^{\circ}\text{C}$ ) ce qui permet à l'ADN polymérase d'étendre les amorces en synthétisant un nouveau brin complémentaire au brin matrice, par l'ajout des désoxynucléosides triphosphates complémentaires en direction  $5'-3'$  (Garibyan et Avashia, 2013 ; Iglesias, 2009).

**Le schéma suivant résume le principe général de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) (Butler, 2011)**



**Figure 11:** Réaction de polymérisation en chaîne

### ✓ **Mode opératoire**

Préparation du mixe en utilisant l'Ampli Taq Gold

On met dans un eppendorf :

- Eau distillée : 6  $\mu$ l
- Le mélange qui contient la Taq polymérase, dNTP et le  $MgCl_2$  : 10 $\mu$ l
- Primer F : 1 $\mu$ l
- Primer R : 1 $\mu$ l

On prend : 18 $\mu$ l du mixe on le met dans une barrette

On ajoute l'ADN à analyser 2 $\mu$ l

On dépose les barrettes contenant le mixe et l'ADN à amplifier dans le thermocycleur

On choisit le programme selon le kit utilisé, le produit PCR est conservé dans des barrettes à

(-20°C) (Voir en annexe 5-8-9)

### ✓ **Contrôle des produits PCR**

La vérification de la spécificité et du rendement de la réaction est réalisée sur un gel d'agarose à 1% contenant du bromure d'éthidium (BET). 1,5 de colorant (bleu de Bromophénol) et 3,5  $\mu$ l de chaque produit PCR migre dans un champ électrique en parallèle à 5 $\mu$ l d'un marqueur de taille avec un voltage qui est fixé à 120 voltes.

La révélation se fait grâce au transilluminateur UV, qui permet la visualisation de l'ADN.

**Tableau III** : Programme d'amplification de la PCR

Température	Temps	Nombres de cycles
94°C	30 s à 2 mn	1
94°C	30 s	35 cycles
Tm primers	-	
72°C	1 min	
+4°C	$\infty$	-

## II.4 Séquençage

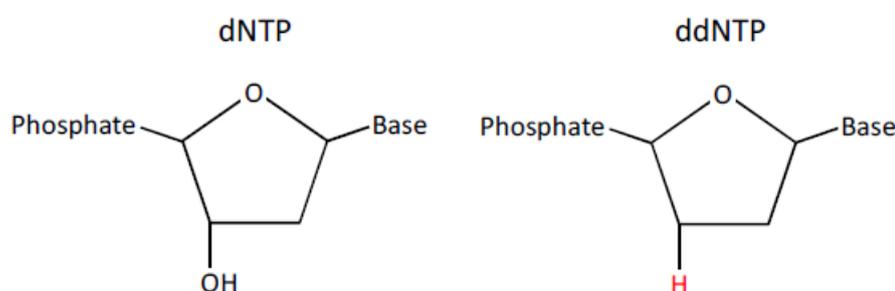
- ✓ **Principe** Le séquençage consiste à déterminer l'enchainement linéaire des nucléotides d'un fragment d'ADN. il repose sur un principe enzymatique développé par Sanger. Cette méthode consiste en un marquage des fragments d'extension par l'incorporation de

didésoxyribonucléotides triphosphates (ddNTP) fluorescents, auxquels il manque un oxygène sur le carbone 3', du sucre désoxyribose.

Avec un tel nucléotide incorporé (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP), aucune liaison phosphodiester ne peut être formée et la polymérisation s'arrête, cela est dû à l'absence d'une extrémité 3'OH libre.

Ceci, aboutit à l'obtention de fragments marqués de différentes tailles

Le kit utilisé est le Big-Dye Terminator, il contient des ddNTP. Chaque ddNTP est marqué par un fluorochrome différent et dont le spectre d'émission est spécifique et chaque base absorbe une couleur précise (T,C,G,A). La séquence est ensuite décodée par l'ordinateur.



**Figure 12:** Représentation schématique de dNTP et ddNTP

### ✓ Protocole expérimental de purification

#### Exo SAP

L'Exo Sap est une méthode de purification enzymatique des produits de PCR, en vue d'avoir de meilleures données de séquençage. Elle a pour but de dégrader les amorces et les dNTP contaminants, pour éviter les interférences dans les applications en aval.

Elle consiste en l'utilisation de deux enzymes hydrolytiques: l'exonucléase I et la phosphatase alcaline rShrimp, dans un tampon spécialement formulé pour supprimer les dNTP et les amorces indésirables.

L'exonucléase I (Exo-I) supprime les amorces simple-brin résiduelles et tous les ADN simple-brin étrangers.

La phosphatase alcaline rShrimp (RSAP), supprime les dNTP restants dans le mélange de la PCR. Elle permet de diminuer le temps et les coûts de l'analyse, tout en augmentant le rendement.

### ✓ Mode opératoire

A 5µl de produit PCR, 5µl du mixte suivant (Master-Mix 1) sont ajoutés dans un micro tube :

- 0.25µl d'exonucléase I.
- 0.5 µl SAP
- 4.25 µl de H<sub>2</sub>O.

Le mélange est incubé pendant 40min à 37°C, permettant l'activité catalytique des enzymes, puis une étape d'inactivation à 80°C est effectuée pendant 20 min,

Programme exécuté lors de la purification par ExoSAP des produits amplifiés

**Tableau IV** : Programme d'amplification

Températures	Temps	Cycles
37°C (activation de l'enzyme)	40 mn	1
80°C (inactivation de l'enzyme)	20 mn	1

### ✓ Réaction de séquençage

- La réaction de séquençage des produits PCR précédemment purifiés se fait à l'abri de la lumière au moyen du kit big bye Terminator V3.1 :
- Préparer le mélange réactionnel de « Mixseq » suivant :
  - Big Dye Terminator: 2 µl.
  - H<sub>2</sub>O: 4 µl
  - Tampon 5X: 2 µl.
- Préparer la plaque de séquençage : pour chaque échantillon, on prévoit deux puits (Forward et reverse) :
  - Mixseq : 8µl
  - Produit PCR purifié : 1µl
  - Primer Forward : 1µl ou
  - Primer Reverse : 1µl

Placer les puits réactionnels dans le thermocycleur et lancer le programme suivant

**Tableaux V** : Programme d'amplification lors de la réaction de séquençage

Cycles	Températures	Temps	Cycles
Dénaturation	96°C	10 secondes	25 cycles
Hybridation	50°C	5 secondes	
Elongation	60°C	7 minutes	
	4°C	∞	-

✓ **Purification à l'éthanol 70% dans chaque puits**

Une dernière étape de purification est effectuée avec l'éthanol :

- Ajouter 70µl d'éthanol à 70% dans chaque puits.
- Mélanger par renversement, 3 fois ;
- Après 15 min d'incubation à température ambiante une centrifugation de la plaque à 4700t/mn pendant 15 min est effectuée ;
- Le surnageant est jeté d'un coup sec ;
- La plaque inversée sur du papier est centrifugée pendant deux minutes à 1000 t/min afin d'éliminer l'éthanol résiduel. Par la suite la plaque recouverte d'un film adhérent est conservée à température ambiante pendant 2 heures.

✓ **Préparation à l'injection des séquences**

- Remettre les échantillons en suspension avec 15µl de formamide.
- Injecter dans l'analyseur de séquence.

✓ **Analyseur des séquences**

▪ **principe**

L'électrophorèse capillaire permet l'utilisation de l'injection électrocinétique pour charger des échantillons dans les capillaires ; les échantillons sont injectés simultanément dans un réseau parallèle de 4 capillaires en moins de 30 secondes. Une différence de potentiel (ddp) d'injection de 1,2 kv permet aux molécules d'ADN de migrer dans les capillaires, puis une autre ddp de 20kv assurée par le tampon de migration est appliquée entre l'anode et la cathode et va permettre aux fragments d'ADN simple brin de migrer vers l'anode. La migration se fait avec le « pop7-ABI® » contenant le polymère de séparation.

▪ **Appareil**

L'analyseur génétique AppliedBiosystems 3130® est un séquenceur à 4 capillaires. L'appareil est composé d'un système d'électrophorèse, d'un laser et d'une caméra CCD (charge-coupled device). Un plateau articulé appelé « autosampler » supporte des plaques de 96 puits contenant les réactions de séquences purifiées, les réservoirs tampon d'eau

nécessaires respectivement à la migration électrophorétique, au rinçage et à l'évacuation des déchets. Le plateau se déplace dans deux dimensions (x,y) et assure ainsi la mobilité des quatre capillaires entre les différents constituants.

### ✓ **Déroulement d'un run**

Quatre capillaires sont physiquement associés pour permettre la Co-migration simultanée pour chaque run :

#### ❖ **Le remplissage des capillaires**

Le polymère est stocké dans deux seringues, l'une sert de réserve, l'autre permet le remplissage des capillaires. L'injection de polymère neuf, sous pression (50-60µl de POP7 par run) dans les capillaires est effectuée au début de chaque run.

Lors du remplissage le polymère va venir effectuer un coating dynamique, il va neutraliser les charges positives de la silice dont sont composés les capillaires pour empêcher, par la suite la fixation de l'ADN monobrin (chargé négativement) aux parois des capillaires.

#### ❖ **L'injection des échantillons**

Les molécules d'ADN sont introduites à une extrémité des capillaires par électro-injection et migrent ensuite, tout au long de ceux-ci sous l'effet d'un très haut voltage (plus de 20 kV), assuré par le tampon de migration, de façon à les séparer en fonction de leur longueur.

#### ❖ **Méthode de détection conçue pour la sensibilité**

Près de l'anode, un rayon laser traverse chaque capillaire afin d'exciter les molécules fluorescentes qui ont été incorporées à l'ADN durant la réaction de séquençage. Une lentille concave (spectrographe) va décomposer pour chacun des capillaires la fluorescence entre 500 et 700 nm et dirige chaque faisceau vers la caméra CCD. La caméra CCD recueille l'information émise par les molécules fluorescentes au fur et à mesure que celles-ci passent devant le rayon laser. Comme chacune des quatre bases nucléiques (A, C, G, T) est associée à un fluorochrome particulier, le système peut les distinguer l'un de l'autre selon la longueur d'onde émise.

### ✓ **Collecte des données par le logiciel DATA COLLECTION (ABI) (Détection de gamme spectral)**

Lorsque la lumière fluorescente est recueillie et dispersée à travers le CCD, les données sont transférées à l'ordinateur ou elles sont transformées par traitement algorithmique en 4 couleurs électrophorégrammiques (une séquence de pics de quatre couleurs, chaque couleur représente une base nucléotidique : A, C, G, T) ;

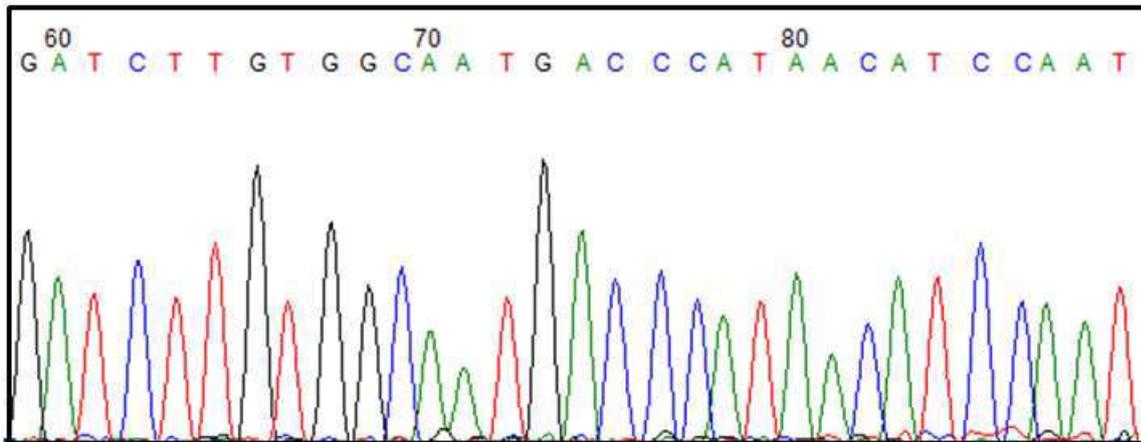


Figure13 : Chromatogramme

Exemple d'assignation des nucléotides aux pics de fluorescence correspondants

## II.5 Analyse Bio-informatique

### II.5.1 Utilisation du logiciel Chroma Lite

La lecture des résultats du séquençage s'est faite à partir de logiciels (Chromas lite, Geospiza) qui visualise les graphes chromatiques et les convertit en séquences de lettres représentant la succession des bases azotées.

### II.5.2 Analyse Blast

L'analyse blast consiste en la recherche de séquences comparables et proches de séquences étudiées au niveau de la base de données NCBI, Cette analyse nécessite une conversion des séquences sous le format genbank (GB).

Elle permet d'évaluer les degrés de proximité et de différence, entre la séquence testée : QUERY et la séquence de la banque de donnée : subject ;

BLAST recherche des coïncidences de mots (segments nucléotidiques) de longueur <<W>>, qui sont communs aux deux séquences. Un point d'ancrage ou <<HIT>> est obtenu quand deux segments identiques sont trouvés dans les deux séquences.

Au final, les résultats de l'alignement sont symbolisés par une barre verticale pour les identités (match) et une barre horizontale (gap) pour un indel (insertion/délétion). Alors que les substitutions (mismatch) ne sont marquées par aucun symbole.

### II.5.3 Analyse des mutations

Le but de cette étape est de détecter de manière efficace les anomalies au niveau des régions codantes du gène d'intérêt pouvant être responsables de la pathologie. Plusieurs logiciels sont disponibles à cet effet.

L'analyse des résultats s'est faite à partir de l'analyse blast complétée et approfondie grâce à un logiciel qui permet l'ajustement des séquences et la détection des mutations, nous avons utilisé à cet effet la version démo du logiciel mutation surveyor, un logiciel spécialisé dans ce genre d'exploration.

L'utilisation du logiciel mutation surveyor, va permettre d'ajuster dans une certaine mesure les courbes pour permettre une identification des mutations, ce logiciel présente l'avantage de nous fournir des informations sur les mutations en calculant leurs degrés de fiabilité et en comparant nos séquences étudiés à des séquences de référence (voir en annexes les différentes séquences). La séquence de référence a été convertie en fichier GB pour les besoins de l'analyse, ce logiciel permet de:

- Localiser les mutations
- Identifier le type de mutation
- Evaluer le niveau de qualité de l'analyse, compte tenu des insuffisances des résultats du séquenceur (bruits de fond, des plateaux indéchiffrables).
- Evaluer le niveau de fiabilité des mutations repérées par un code de couleur significatif
- Evaluer l'impact des mutations sur la protéine.

# **Résultats et discussion**

### I Tableau clinique

Tous les patients partagent des signes cliniques communs. Ils présentent des affections pulmonaires qui se déclenchent en bas âge. Trois d'entre eux sont issus de mariage consanguin.

**Tableau VI :**

Patients	Tableau clinique	
Patient 1	Sexe	Masculin
	Age début troubles	46 jours
	Age au diagnostic	46 jours
	Consanguinité degré	2eme degré
	Histoire familiale	R . A . S
	Signes cliniques	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Infection materno fœtale sévère</li> <li>■ Syndrome infectieux sévère</li> <li>■ Infection cutanée ichtyose</li> <li>■ Diarrhée glaireuse récidivante</li> <li>■ Retard staturo pondéral</li> </ul>
Patient 2	Sexe	Masculin
	Age début troubles	3 ans
	Age au diagnostic	3 ans
	Consanguinité degré	2eme degré
	Histoire familiale	Un frère de 16 ans atteint
	Signes cliniques	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Infection cutanées : gommès</li> <li>■ Disséminé (germe non identifié)</li> <li>■ Déchaussement des dents, altération noir des gencives</li> <li>■ Candidose buccale, Gingivite</li> <li>■ Anémie</li> </ul>
Patient 3	Sexe	Masculin
	Age début troubles	2 ans
	Age au diagnostic	3 ans et ½
	Consanguinité degré	2eme degré
	Histoire familiale	R . A . S
	Signes cliniques	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Bronchopneumopathie à répétition</li> <li>■ Infections ORL récidivantes</li> </ul>

Patients	Tableau clinique	
Patient 4	Sexe	Masculin
	Age début troubles	6 mois
	Age au diagnostic	6 mois
	Consanguinité degré	Non
	Histoire familiale	Non
	Signes cliniques	Infections ORL et pulmonaire à répétition
Patient 5	Sexe	Masculin
	Age début troubles	9 mois
	Age au diagnostic	16 mois
	Consanguinité degré	Non
	Histoire familiale	R . A . S
	Signes cliniques	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Bronchopneumopathie à répétition</li> <li>■ Otite</li> </ul>
Patient 6	Sexe	Masculin
	Age début troubles	8 mois
	Age au diagnostic	18 mois
	Consanguinité degré	Non
	Histoire familiale	Non
	Signes cliniques	Infections ORL et pulmonaire a répétition

### II Analyse immunologique

L'analyse sanguine révèle un déficit en lymphocytes B et un tât anticorps inférieur aux normes. (Voir en annexe 3).

**Tableau VII :**

Patients	Tableau immunologique		
		Valeur mesurée	Norme
Patient 1	<b>LYMPHOCYTES B (%)</b>	< 0,66	6 - 37
	<b>IgG (g/l)</b>	0	4,6 - 8,6
	<b>IgA (g/l)</b>	0	0,1 - 0,3
	<b>IgM (g/l)</b>	0	0,2 - 0,7
Patient 2	<b>LYMPHOCYTES B (%)</b>	< 0,15	14 - 33
	<b>IgG (g/l)</b>	< 0,176	4,8 - 8,9
	<b>IgA (g/l)</b>	< 0,021	0,3 - 1,2
	<b>IgM (g/l)</b>	< 0,101	0,5 - 1,5
Patient 3	<b>LYMPHOCYTES B (%)</b>	< 0,5	14 - 33
	<b>IgG (g/l)</b>	< 1,75	4,8 - 8,9
	<b>IgA (g/l)</b>	< 0,2	0,3 - 1,2
	<b>IgM (g/l)</b>	< 0,3	0,5 - 1,5
Patient 4	<b>LYMPHOCYTES B (%)</b>	< 0,29	6-37
	<b>IgG (g/l)</b>	< 0,49	2,3 - 4,4
	<b>IgA (g/l)</b>	< 0,02	0,2 - 0,6
	<b>IgM (g/l)</b>	< 0,11	0,3 - 0,9
Patient 5	<b>LYMPHOCYTES B (%)</b>	0	16 - 35
	<b>IgG (g/l)</b>	< 1,86	3,3 - 6,2
	<b>IgA (g/l)</b>	< 0,28	0,2 - 0,8
	<b>IgM (g/l)</b>	< 0,29	0,5 - 1,3
Patient 6	<b>LYMPHOCYTES B (%)</b>	0	16 - 35
	<b>IgG (g/l)</b>	< 1,7	3,3 - 6,2
	<b>IgA (g/l)</b>	< 0,02	0,2 - 0,8
	<b>IgM (g/l)</b>	< 0,1	0,5 - 1,3

### III Analyse génétique

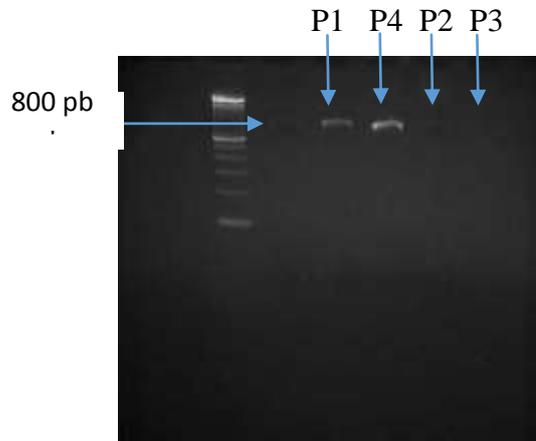
#### III.1 Le contrôle qualitatif et quantitatif de l'ADN extrait par le Nanodrop (Maestrogen) chez les six patients

Tableau VIII:

Patient	DO 1 <sup>ère</sup> élution	Concentration 1 <sup>ère</sup> élution	DO 2 <sup>ème</sup> élution	Concentration 2 <sup>ème</sup> élution
<b>P1</b>	1,98	38,87	2,14	24,08
<b>P2</b>	1,94	1416,47	-	-
<b>P3</b>	2,25	114,43	-	-
<b>P4</b>	1,96	35,28	1,74	26,35
<b>P5</b>	2,08	594	-	-
<b>P6</b>	2,07	208	-	-

Le rapport DO 260/DO 280 est compris entre 1,8 et 2,2.

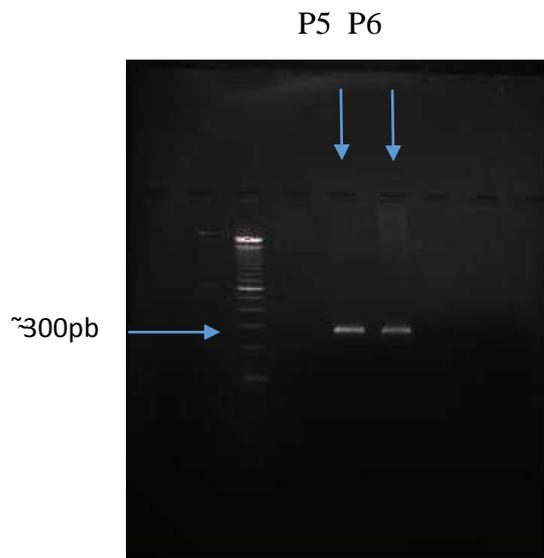
**III.2 Le profil d'amplification de la PCR de l'exon 8-9,des patients : P1-P4-P2-P3**



**Figure 14 :**

Le profil d'amplification de l'exon 8-9 obtenus à partir des patients P1-P4-P2-P3 après électrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits PCR. A gauche de chaque gel sont indiquées les tailles des fragments du marqueur de taille (en pb). PM: Marqueur de poids moléculaire (100-base-pair ladder); Les flèches bleu indiquent les patients P1-P4-P2-P3. Le sens de migration est de haut>bas.

**Le profil d'amplification de la PCR de l'exon 1, des patients : P5-P6**



**Figure 15**

Profils d'amplification de l'exon 1 obtenus à partir des patients P5-P6 après électrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits PCR. A gauche de chaque gel sont indiquées les tailles des fragments du marqueur de taille (en pb). PM: Marqueur de poids moléculaire (100-base-pair ladder); Les flèches bleu indiquent les patients P5-P6. Le sens de migration est de haut>bas.

### III.3 Analyse Blast : de L'exon1 et 8-9 chez les six patients

Tableau IX :

Séquence	Exon/Brin	Identification du gène	Couverture de l'alignement	Score	Identité	Vides (gap)
<b>Patient 1</b>	1F	Btk	41%	390 bits	223/228 (98%)	4/228 (1%)
	1R	Btk	71%	278 bits	209/235(89%)	13/235 (5%)
	8-9F	Btk	Alignement impossible			
	8-9R	Btk	76%	660 bits	559/586 (95%)	17/586 (2%)
<b>Patient 2</b>	1F	Btk	Alignement impossible			
	1R	Btk	Alignement impossible			
	8-9F	Btk	92%	1251 bits	739/765	19/765
	8-9R	Btk	92%	1351 bits	757/768	7/768
<b>Patient 3</b>	1F	Btk	80%	293 bits	240/248 (97%)	4/248
	1R	Btk	Alignement impossible			
<b>Patient 4</b>	1F	Btk	63%	185 bits	187/226	17/226
	1R	Btk	Alignement impossible			
	8-9F	Btk	91%	1362 bits	753/760 (99%)	4/760 (0%)
	8-9R	Btk	90%	1297 bits	747/766 (98%)	14/766 (1%)
<b>Patient 5</b>	1F	Btk	70%	247 bits	215/231 (93%)	6/231 (2%)
	1R	Btk	77%	264 bits	230/246 (93%)	9/246 (3%)
	8-9F	Btk	Alignement impossible			
	8-9R	Btk	91%	1138 bits	712/755 (94%)	19/755 (2%)
<b>Patient 6</b>	1F	Btk	32%	86,9 bits	81/92 (88%)	4/92 (4%)
	1R	Btk	73%	252 bits	220/238 (92%)	4/238 (1%)
	8-9F	Btk	70%	979 bits	691/762 (91%)	37/762 (4%)
	8-9R	Btk	Alignement impossible			

### III.4 Visualisation des séquences

#### III.4.1 Visualisation des séquences de l'exon1 et de l'exon 8-9 par le logiciel Chromas

Le patient n°1 :

##### Exon1

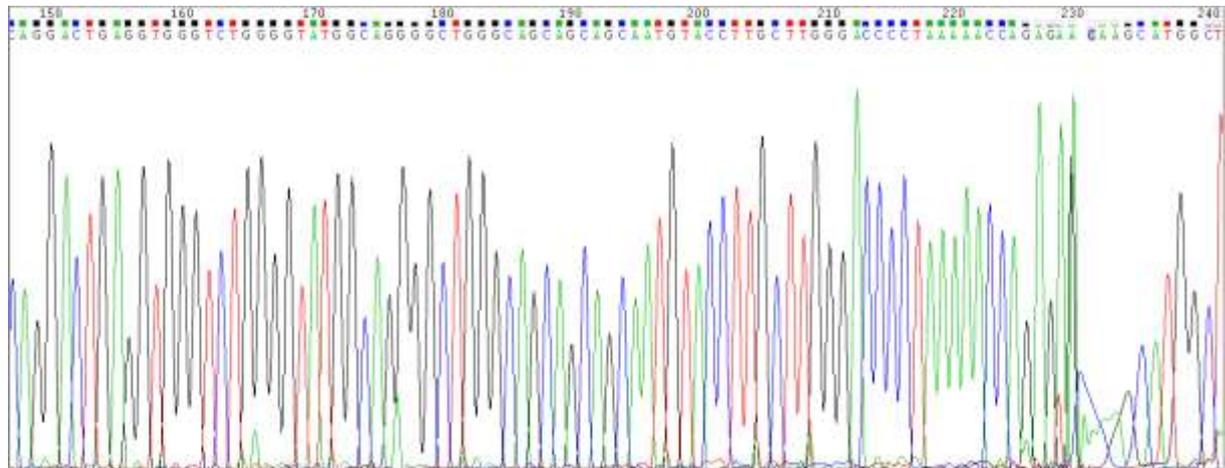


Figure 16:  
Chromatogramme de l'exon 1F du patient n°1 entre la 135 base et la 225 base

G>GA135

231T>TC

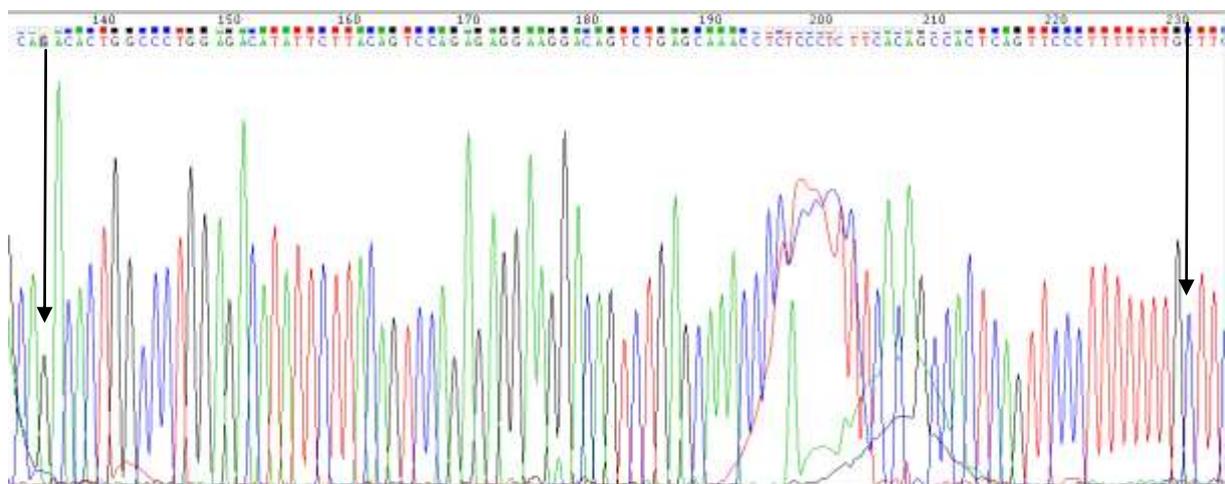


Figure 17:  
Chromatogramme de l'exon 1R du patient n°1 entre la 133 base et la 233 base





**L'exon 8-9R, patient2**

468 A>G



**Figure 23:**

**Chromatogramme de l'exon 8-9R du patient n°2 entre la 458 base et la 551 base**

L'exon 8-9 du patient n°3 n'a pas été séquencé, le patient n°3 est le frère du patient n°2.

**III.4.3 Visualisation des séquences de l'exon1 par le logiciel Chromas**

**Le patient n°3**

**Exon1 : Le brin F sens**



**Figure 24:**

**Chromatogramme de l'exon 1F du patient n°3 entre la 115 base et la 209 base**

**Exon1 : Le brin R antisens**

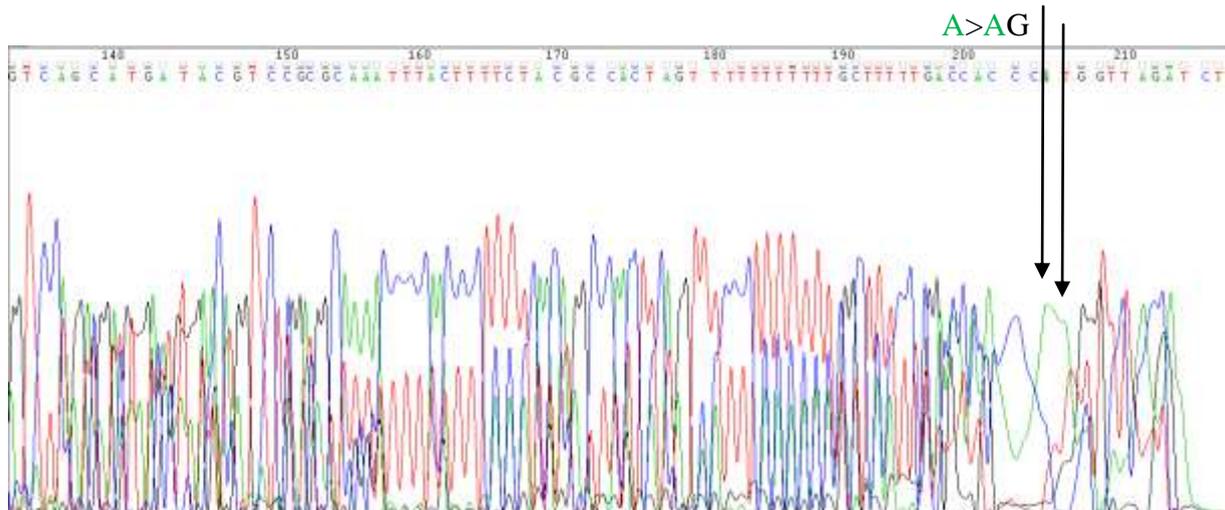


Figure 25:

Chromatogramme de l'exon 1R du patient n°3 entre la 134 base et la 214 base

### III.4.4 Visualisation des séquences de l'exon1 et 8-9 par le logiciel Chromas chez le patient n°4 :

Exon1 : Le brin F sens:

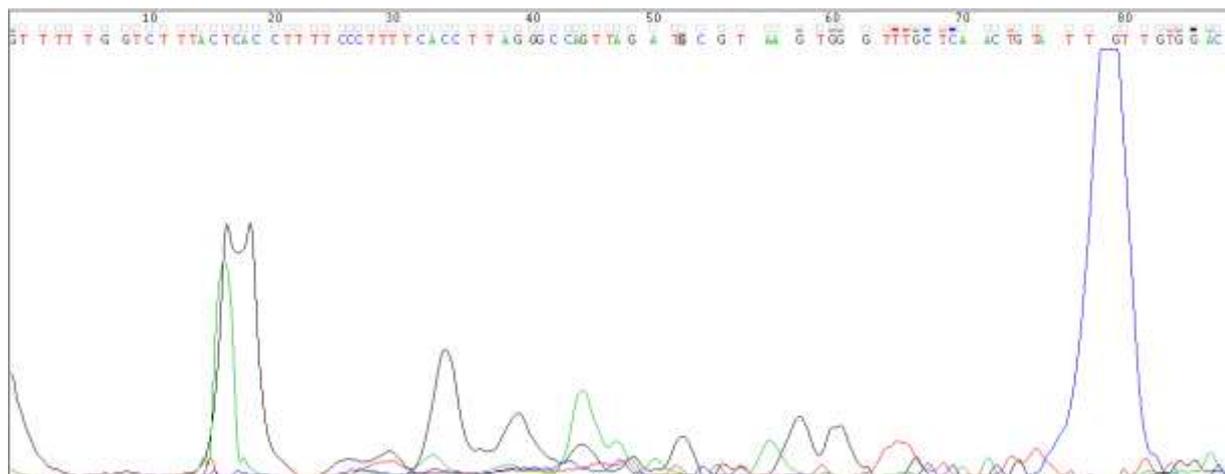


Figure 26:

Chromatogramme de l'exon 1F du patient n°4 entre la 1 base et la 87 base

Exon1 : Le brin R sens



Chromatogramme de l'exon 8-9 R du patient n°4 entre la 653 base et la 743 base

### III.4.5 Visualisation des séquences de l'exon1 et 8-9 par le logiciel Chromas

Le patient n°5

Exon1 patient n°5

Mutation 1: 123A>T

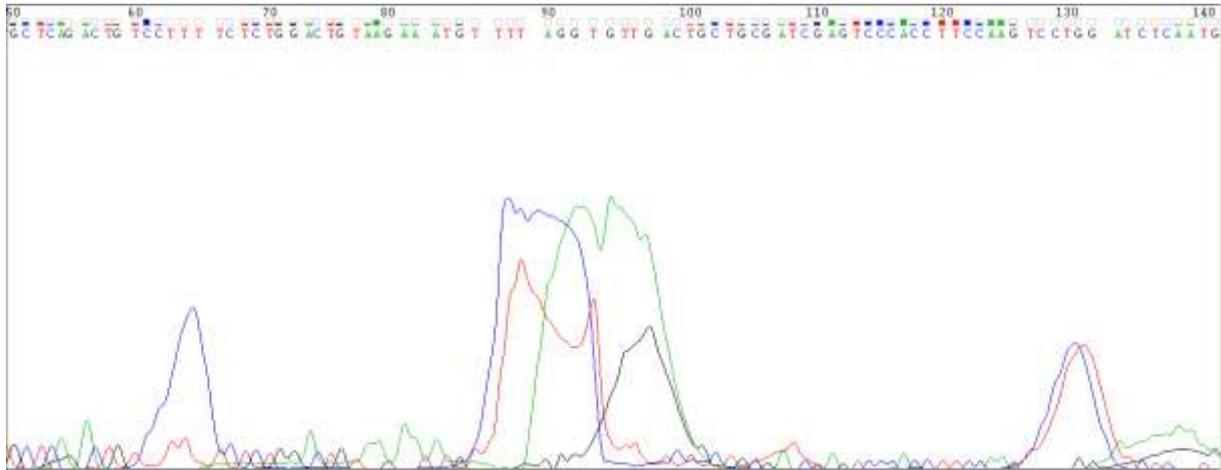


Figure 30:

Chromatogramme de l'exon 1F du patient n°5 entre la 50 base et la 141 base

Exon 1 patient n°5

A>T

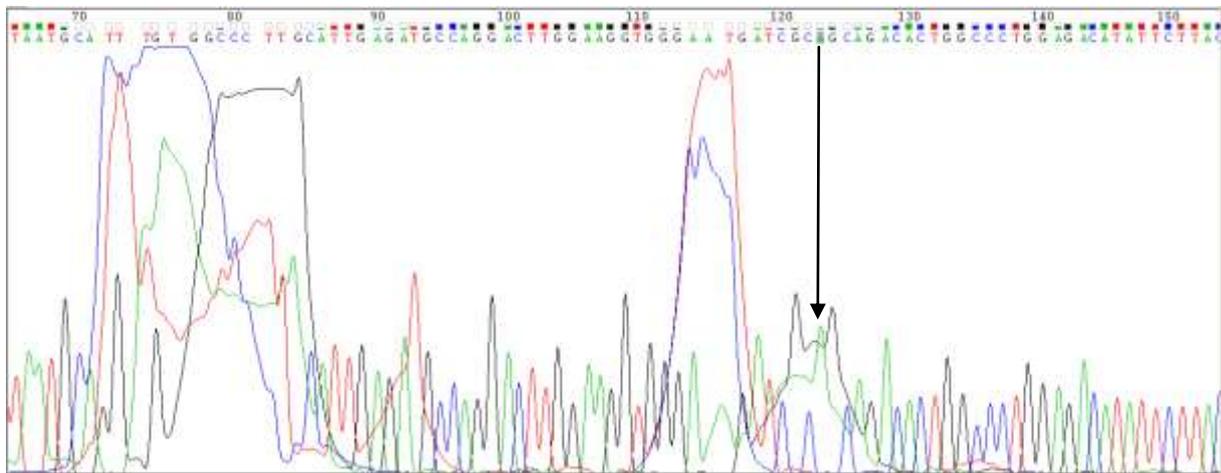


Figure 31:

Chromatogramme de l'exon 1R du patient n°5 entre la 65 base et la 153 base

Exon 8-9 patient 5

\*Mutation 1: 235A>AC\*



Chromatogramme de l'exon 1R du patient n°6 entre la 45 base et la 136 base

Le brin sens 1F

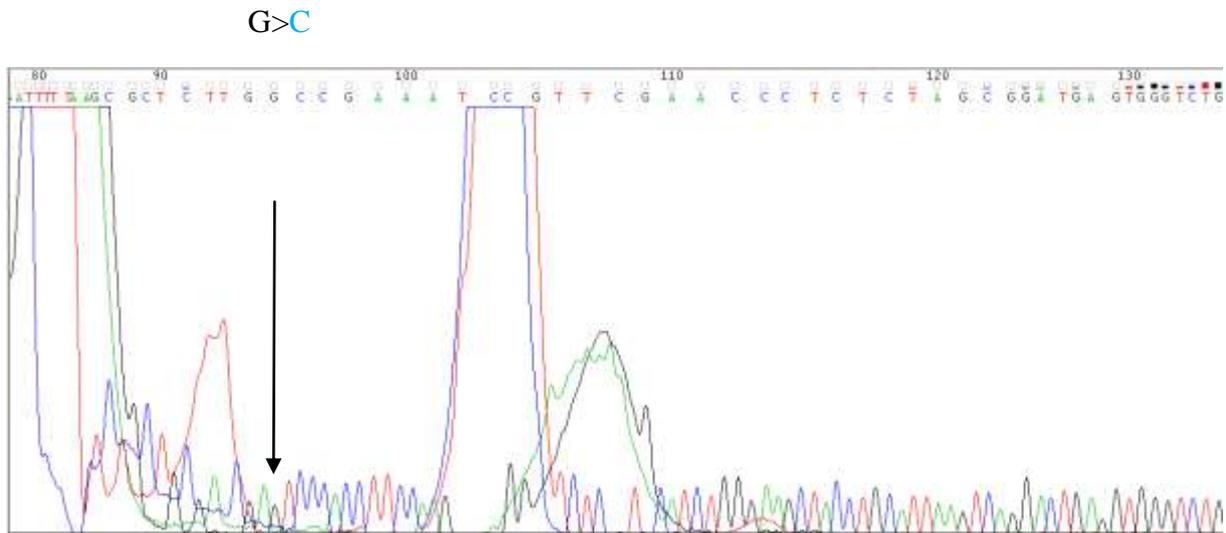


Figure 35:

Chromatogramme de l'exon 1F du patient n°6 entre la 78 base et la 137 base

Exon 8-9 patient 6

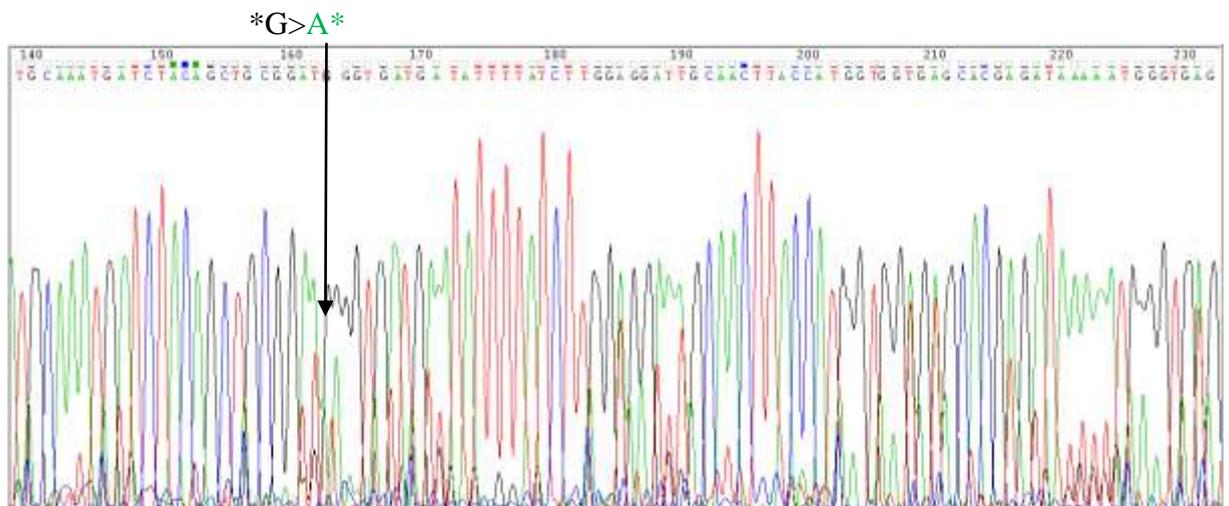
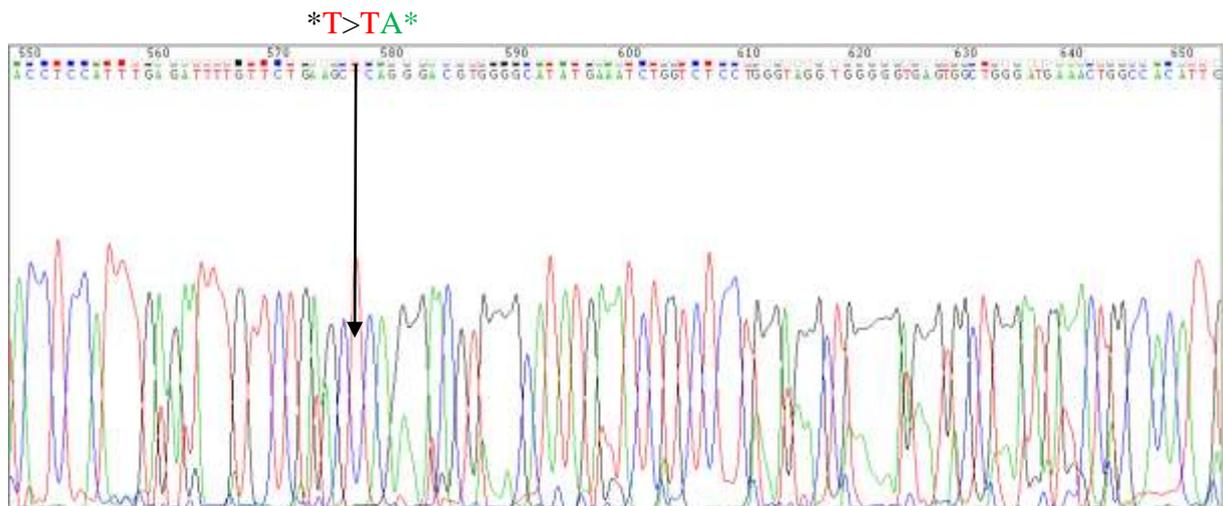


Figure 36:

Chromatogramme de l'exon 8-9F du patient n°6 entre la 139 base et la 232 base



**Figure 37:**

**Chromatogramme de l'exon 8-9F du patient n°6 entre la 549 base et la 652 base**

### III.5.1 Identification des mutations par le logiciel mutation Surveyor

#### Le patient n°1 :

Les mutations les plus probables sont en bleu, les mutations en rouge sont peu probables

#### ✓ Exon1

**Le patient n°1 :** Le logiciel a détecté dans le brin sens et antisens, la présence de 5 mutations.

- **Le brin R (antisens):** sa taille est de 199, il débute en position 83 et la fin est en 281 la qualité est de 32

No.	Sample File	Reference File	Dir	Gene	Exon	RF	Start	End	Size	Qual	Mut#	Mutation1	Mutation2	Mutation3	Mutation4
1	2015-05-26_berbtkexon1R.ab1	exon_F_Synthesis_142	1-F				83	281	199	32	4	135G>GA\$6	229C>CT\$14	231T>TC\$32	232T>TC\$42

**Mutation 1: 135G>GA \$6 :** Une substitution hétérozygote en position 135, les bases GA ont été substituées en G le score est de 6.

**Mutation 3: 231T>TC \$32 :** Une substitution hétérozygote en position 231, les bases TC ont été substituées en T le score est de 32.

**Mutation 4: 232T>TC \$42 :** Une substitution hétérozygote en position 232, les bases TC ont été substitué en T le score est de 42.

- **Le brin F (sens) :** Sa taille est de 209 il débute en position 16, et la fin est en position 224, la qualité est de 37, on a détecté une mutation peu probable.

3	2015-05-26_berbtkexo1F.ab1	exon_R_Synthesis_158	1-R				16	224	209	37	1	176T>G\$14			
---	----------------------------	----------------------	-----	--	--	--	----	-----	-----	----	---	------------	--	--	--

#### ✓ Exon 8-9

**Le patient n°1:** Le logiciel a détecté dans le brin antisens: la présence d'une mutation.

- **Le brin R antisens :** Sa taille est de 378 (début 192- fin 569), la qualité est de 12, une mutation a été détectée.

2	2015-07-19_BENBTK89R.ab1	inc_018334_R_Synthesis_361-R				1	192	569	378	12	1	206dupA			
---	--------------------------	------------------------------	--	--	--	---	-----	-----	-----	----	---	---------	--	--	--

**Mutation 1: 206dupA :** Une duplication homozygote, insertion d'une base A en position 206, où la base précédente de 206 est également A.

- **Le brin F sens :** Sa taille est de 275 (début 1- fin 275), la qualité est de 0, aucune mutation n'a été détectée, la séquence est de mauvaise qualité incomparable.

4	2015-07-19_BENBTK89F.ab1	Unmatched								(1)	(275)	275	0	0	Bad Data
---	--------------------------	-----------	--	--	--	--	--	--	--	-----	-------	-----	---	---	----------

### III.5.2 Identification des mutations par le logiciel mutation Surveyor

#### Le patient n°2

##### Exon1

**Le patients n°2:**Le logiciel a détecté dans le brin antisens R: la présence de 2 mutations

2	2015-05-26_terrabtkexo1R.ab1	exon_F_Synthesis_142.a1-F	69	98	30	18	2	79G>GC\$10	80A>AC\$10
---	------------------------------	---------------------------	----	----	----	----	---	------------	------------

- **Le brin R (antisens):**Sa taille est de 30 (début 69- fin 98), la qualité est de 18, on a détecté 2 mutations peu probables

**le brin F(sens) :**Rien n'a été détecté la séquence étant de mauvaise qualité

6	2015-05-26_terrabtkexo1F.ab1	Unmatched	(1)	(222)	222	0	0	Bad Data
---	------------------------------	-----------	-----	-------	-----	---	---	----------

##### Exon8-9

**Le patients n°2 :** Les mutations détectées dans le brin sens ont été confirmées dans le brin antisens, sauf une mutation **\*Mutation 3: 726C>CG, 242I>I/M \$12\***

No	Sample File	Reference File	Dir	Gene	Exon	Ref	Start	End	Size	Qual	Mut#	Mutation1	Mutation2	Mutation3
1	2015-07-19_TERABTK08F.ab1	nc_018934_F_Synthesis_420.scf	1-F		1	60	557	498	23	2	2	460C>T,154R>W\$41	468A>G,156L>L\$81	
2	2015-07-19_TERABTK08R.ab1	nc_018934_R_Synthesis_420.scf	1-R		1	68	747	680	32	3	3	460C>T,154R>W\$150	468A>G,156L>L\$150	726C>CG,242I>I/M\$12

**Le brin F sens :** Sa taille est de 498 (début 60- fin 557), la qualité est de 23, deux mutations ont été détectées

**\*Mutation 1: 460C>T, 154R>W \$41\* :**Une substitution homozygote en position 460, la base T a été substituée en C, le codons 154 de l'acide aminé normal est "R" et l'acide aminé qui est produit en tant que résultat de cette mutation est l'acide aminé mutant "W". le score de mutation est de 41.

**Mutation 2: 468A>G, 156L>L \$81 :**Une substitution homozygote en position 468, la base G a été substituée en A, le codons 156 de l'acide aminé normal est "L" et l'acide aminé qui est produit en tant que résultat de cette mutation est le même acide aminé. le score de mutation est de 81.

**Le brin R antisens :** Sa taille est de 690 (début 58- fin 747), la qualité est de 32, deux mutations ont été détectées

**\*Mutation 1: 460C>T, 154R>W \$150\* :** Une substitution homozygote en position 460, la base T a été substituée en C, le codons 154 de l'acide aminé normal est "R" et l'acide aminé

qui est produit en tant que résultat de cette mutation est l'acide aminé mutant "W". le score de mutation est de 150.

**Mutation 2: 468A>G, 156L>L \$150 :** Une substitution homozygote en position 468, la base G a été substitué en A, le codons 156 de l'acide aminé normal est "L" et l'acide aminé qui est produit en tant que résultat de cette mutation est le même acide aminé. le score de mutation est de 150.

### III.5.3 Identification des mutations par le logiciel mutation Surveyor

#### Le patient n°3

**Exon1 :** Le logiciel a détecté la présence de deux mutations

No.	Sample File	Reference File	Dir	Gene	Exon	RF	Start	End	Size	Qual	Mut#	Mutation1	Mutation2
1	2015-05-26_terisdbkexon1F.ab1	exon_F_Synthesis_126.seq	1-R				7	223	217	27	2	205A>AG\$44	206A>AG\$51
2	2015-05-26_terisdbkexon1R.ab1	Unmatched					(1)	(217)	217	2	0	Bad Data	

**Le brin F sens :** Sa taille est de 217 (début 7- fin 223), la qualité est de 27, on a détecté 2 mutations

**Mutation1: 205A>AG \$44 :** Une substitution hétérozygote en position 205, les bases AG ont été substituées en A le score est de 44.

**Mutation2: 206A>AG \$51 :** Une substitution hétérozygote en position 206, les bases AG ont été substituées en A le score est de 51.

**Le brin R antisens:** Rien n'a été détecté la séquence était de mauvaise qualité

### III.5.4 Identification des mutations par le logiciel mutation Surveyor

#### Le patient n°4:

##### Exon1

Le logiciel a détecté la présence d'une mutation

4	2015-05-26_hanibkexon1F.ab1	exon_F_Synthesis_158.1-R					52	114	63	3	1	52C>CA46	
5	2015-05-26_hanibkexon1R.ab1	Unmatched					(1)	(208)	208	10	0		

**Le brin F sens :** Sa taille est de 63 (début 52- fin 114), la qualité est de 3, on a détecté 1 mutation peu probable

**Le brin R antisens :** Sa taille est de 208 (début 1- fin 208), la qualité est de 10, on n'a rien détecté comme mutation, la séquence est incomparable

#### Exon 8-9

**Le patient n°4 :** On a détecté pour le brin sens et antisens: la présence de six mutations, trois d'entre elle sont probables

No.	Sample File	Reference File	Dir	Gene	Exon	RF	Start	End	Size	Qualit	Mut#	Mutation1	Mutation2	Mutation3	Mutation4
1	2015-07-19_HAMBTX89F.ab1	nc_018934_F_Synthesi_48	1-F				63	696	634	32	4	97A>AC299>S/S\$14	111G>C37X>Y\$38	151A>AC51G>S/R\$10	154A>AC52T>T/P\$35

**Le brin F sens :** Sa taille est de 634 (début 63- fin 696), la qualité est de 32, quatre mutations ont été détectées, parmi elle deux sont probables

**\*Mutation 2\*:** 111G>C, 37X>Y \$38 : Une substitution homozygote en position 111, la base C a été substituées en G, le codon 37 de l'acide aminé normal est "X" et l'acide aminé qui est produit en tant que résultat de cette mutation est un acide aminé mutant Y. le score est de 38.

**\*Mutation 4\*:** 154A>AC, 52T>T/P \$36 : Une substitution hétérozygote en position 154, les bases AC ont été substituées en A, le codon 52 de l'acide aminé normal est "T" et l'acide aminé qui est produit en tant que résultat de cette mutation est un mélange de l'acide aminé normal "T" et de l'acide aminé mutant "P". le score de mutation est de 36.

**Le brin R antisens :** Sa taille est de 656 (début 184- fin 748), la qualité est de 26, deux mutations ont été détectées.

3	2015-07-19_HAMBTX89R.ab1	nc_018934_R_Synthesi_381-R					184	748	565	26	2	727T>TG,243Y>Y/D\$12	728A>AG,243Y>Y/C\$27		
---	--------------------------	----------------------------	--	--	--	--	-----	-----	-----	----	---	----------------------	----------------------	--	--

**\*Mutation 2\*:** 728A>AG, 243Y>Y/C \$27 : Une substitution hétérozygote en position 728, les bases AG ont été substituées en A, le codon 243 de l'acide aminé normal est "Y" et l'acide aminé qui est produit en tant que résultat de cette mutation est un mélange de l'acide aminé normal "Y" et de l'acide aminé mutant "C". Le score de mutation est de 27.

### III.5.5 Identification des mutations par le logiciel mutation Surveyor

**Le patient n°5**

**l'exon 1**

Le logiciel a détecté la présence d'une mutation dans le brin sens F

No.	Sample File	Dir	Gene	Exo	RF	Start	End	Size	Qualit	Mut#	Mutation1	Mutation2	Mutation3	Mutation4
1	2015-06-17_GHEMEXDN1R.ab1	1-F				48	281	234	22	0				

**Le brin R antisens :** Sa taille est de 234 (début 48- fin 281), la qualité est de 22, aucune mutation détectée

**Le brin F sens :** Sa taille est de 135 (début 18- fin152), la qualité est de 0, une mutation détectée

3	2015-06-17_GHEMEXDN1F.ab1	1-R				18	152	135	0	1	123A>T\$47			
---	---------------------------	-----	--	--	--	----	-----	-----	---	---	------------	--	--	--

**Mutation 1: 123A>T \$51 :** Une substitution homozygote en position 123, la base A a été substituée en T le score est de 51.

**Le patient n°5 :** Le logiciel a détecté la présence d'une mutation

No.	Sample File	Reference File	Dir	Gene	Exon	RF	Start	End	Size	Quali	Mut#	Mutation1	Mutation2	Mutation3	Mutation4
1	2015-07-06_GHBTKE\XN89R	nc_018934_F_Synthesis_420.scf	1-F			1	171	558	388	8	1	235A>AC,79M>M/L\$7			

**Le brin R antisens :** Sa taille est de 388 (début 171- fin 558), la qualité est de 8, une mutation a été détectée

**\*Mutation 1: 235A>AC, 79M>M/L \$7\* :** Une substitution hétérozygote en position 235, les bases AC ont été substituées en A, le codon 79 de l'acide aminé normal est "M" et l'acide aminé résultant de cette mutation est un mélange de l'acide aminé normal M et l'acide aminé mutant L. Le score est de 7.

**Le brin F sens :** Sa taille est de 651 (début 9- fin 659), la qualité est de 1, aucune mutation n'a été détectée, la séquence est incomparable.

3	2015-07-06_GHBTKE\XN89F	Unmatched							(9)	(659)	651	1	0		
---	-------------------------	-----------	--	--	--	--	--	--	-----	-------	-----	---	---	--	--

### III.5.6 Identification des mutations par le logiciel mutation Surveyor

**Le patient n°6 :** Le logiciel a détecté la présence de plusieurs mutations dans les exons : 1 et 8-9.

#### L'exon1

2	2015-06-17_HAMEXON1R.ab1	1-F					49	260	212	8	2	106G>C\$31	107G>GC\$14		
---	--------------------------	-----	--	--	--	--	----	-----	-----	---	---	------------	-------------	--	--

**Le brin R antisens :** Sa taille est de 212 (début 49- fin 260), la qualité est de 8, deux mutations détectées, une d'entre elle est probable et confirmée sur le chromatogramme

**Mutation 1: 106G>C \$31 :** Une substitution homozygote en position 106, la base C a été substituée en G le score est de 31.

**Mutation 2: 107G>GC \$14 :** Une substitution hétérozygote en position 107, les bases GC ont été substituées en G le score est de 14.(confirmée sur le brin F)

**le brin F sens :** Sa taille est de 165 (début 62- fin 226), la qualité est de 0, 29 mutations ont été détectées

4	2015-06-17_HAMBTKE\XN1F.ab1	1-F	62	226	165	0	29	96_96deACTCAG	99C>A\$21	94T>TG\$22	95G>C\$24	95A>C\$12	97C>G\$17	98T>TC\$13	104A>G\$16	102T>A\$15
4	2015-06-17_HAMBTKE\XN1F.ab1		104C>A\$15	105A>C\$8	106G>T\$16	107G>C\$13	108T>G\$9	110_113deAGCTT	114C>T\$16	124T>TG\$7	125T>A\$6	131G>A\$13	130C>A\$11	145_155deGGTGGGACTCG		
4	2015-06-17_HAMBTKE\XN1F.ab1		145_155deGGTGGGACTCG	159_162deGCAG	167_176deCACTGGCCCTGG	181A>AG\$9	182C>CG\$6	183_185deATA	187T>TA\$23	188C>T\$18	189T>TC\$6					

**Mutation 1: 86-90del CTCAG** :Une délétion homozygote en position 86, de cinq bases CTCAG entre la base 86 et 90.

**Mutation 2: 93C>A \$21** :Une substitution homozygote en position 93, la base A a été substituée en C le score est de 21.

**Mutation 3: 94T>TG \$22** :Une substitution hétérozygote en position 94, les bases TG ont été substituées en T le score est de 22.

**Mutation 4: 95G>C \$24** :Une substitution homozygote en position 95, la base C a été substituée en G le score est de 24.

**Mutation 12: 106G>T \$16** :Une substitution homozygote en position 106, la base T a été substituée en G, le score est de 16.

**Mutation 15: 109-113delAGCTT** :Une délétion homozygote en position 109, de cinq bases AGCTT entre la base 109 et 113.

**Mutation 21: 145-155delGGTGGGACTCG** :Une délétion homozygote en position 145, de onze bases entre les bases 145 et 155.

**Mutation 22: 159-162delGCAG** :Une délétion homozygote en position 159, de quatre bases GCAG entre les bases 159 et 162.

**Mutation 23: 167-178delCACTGGCCCTGG** :Une délétion homozygote en position 167, de douze bases CACTGGCCCTGG entre les bases 167 et 178.

**Mutation 24: 181A>AG \$59** :Une substitution hétérozygote en position 181, les bases AG ont été substituées en A le score est de 59.

**Mutation 26: 183-185delATA** :Une délétion homozygote en position 183, de trois bases ATA entre les bases 183 et 185.

**Mutation 27: 187T>TA \$23** :Une substitution hétérozygote en position 187, les bases TA ont été substituées en T, le score est de 23.

**L'exon 8-9, patient n°6** : Le logiciel a détecté la présence de plusieurs mutations sur le brin sens uniquement, le brin antisens R est de mauvaise qualité

**Le brin R antisens** : Sa taille est de 726 (début 1- fin 726), la qualité est de 0, aucune mutation détectée, la séquence était de mauvaise qualité, incomparable



## Résultats et discussion

**\*Mutation 8 : 163G>A,55A>T \$22\*** :Une substitution homozygote en position 163, la base A a été substituée en T, le codon 55 de l'acide aminé normal est "A" et l'acide aminé résultant de cette mutation est acide aminé mutant "T". Le score est de 22.

**Mutation 11: 166-167insAC** : Une insertion homozygote en position 166, de deux bases AC entre la base 166 et la 167.

**Mutation 13 : 180dupT** : Indique l'insertion d'une base T en position 180, où la base précédente de 180 est également T.

Mutation8	Mutation9	Mutation10	Mutation11	Mutation12	Mutation13	Mutation14	Mutation15	Mutation16	Mutation17
163G>A,55A>T\$22	164C>CG,55A>A/G\$6	165T>TC,56S>S/P\$13	166_167insAC	169C>CA,56P>P/Q\$11	180dupT	189dupC	202T>TA,68L>L/H\$21	211dupA	214T>TA,72S>S/S\$11

**Mutation 14 : 189dupC** : Indique l'insertion d'une base C en position 189, où la base précédente de 189 est également C.

**\*Mutation 15 : 202T>TA,68L>L /H \$21\***:Une substitution hétérozygote en position 202, les bases TA ont été substituées en T, le codon 68 de l'acide aminé normal est "L" et l'acide aminé résultant de cette mutation est un mélange de l'acide aminé normal "L" et l'acide aminé mutant "H". le score est de 21.

**Mutation 16 : 211dupA** : Indique l'insertion d'une base A en position 211, où la base précédente de 211 est également A.

Mutation15	Mutation17	Mutation18	Mutation19
211dupA	214T>TA,72S>S/S\$11	239A>AC,80T>T/P\$38	242T>TA,81S>S/T\$12

**\*Mutation 18: 239A>AC,80T>T/P \$38\*** :Une substitution hétérozygote en position 239, les bases AC ont été substituées en A, le codon 80 de l'acide aminé normal est "T" et l'acide aminé résultant de cette mutation est un mélange de l'acide aminé normal "T" et l'acide aminé mutant "P". Le score est de 38.

No	Sample File	Mutation20	Mutation21	Mutation22	Mutation23	Mutation24	Mutation25
1	2015-07-06_GHBT1E>DN89F.ab1						
2	2015-07-06_HABTKE>DN89F.ab1	263T>TA,88S>S/T\$11	288C>CT,96P>P/L\$20	311C>CT,104H>H/V\$15	319A>C,107A>A\$9	338C>CT,113Q>Q/X\$43	347C>CT,116L>L/F\$16

**\*Mutation 24 : 338C>CT,113Q>Q/X \$43\*** :Une substitution hétérozygote en position 338, les bases CT ont été substituées en C, le codon 113 de l'acide aminé normal est "Q" et l'acide aminé résultant de cette mutation est un mélange de l'acide aminé normal "Q" et l'acide aminé mutant "X". Le score est de 43.

Mutation25	Mutation26	Mutation27	Mutation28	Mutation29	Mutation30
347C>CT,116L>L/F\$16	348T>TA,116L>L/H\$38	360C>CT,120A>A/V\$27	367dupC	388T>TA,130W>W/R\$5	398T>TA,133L>L/H\$14

**\*Mutation26: 348T>TA,116L>L/H \$38\*** :Une substitution hétérozygote en position 348, les bases TA ont été substituées en T, le codon 116 de l'acide aminé normal est "L" et l'acide aminé résultant de cette mutation est un mélange de l'acide aminé normal "L" et l'acide aminé mutant "H". Le score est de 38.

**\*Mutation27:360C>CT,120A>A/V \$27\***: Une substitution hétérozygote en position 288, les bases CT ont été substituées en C, le codon 96 de l'acide aminé normal est "P" et l'acide aminé résultant de cette mutation est un mélange de l'acide aminé normal "P" et l'acide aminé mutant "L". Le score est de 20.

**Mutation 28: 367 dup C** : Indique l'insertion d'une base C en position 367, où la base précédente de 367 est également C.

No.	Sample File	Mutation31	Mutation32	Mutation33	Mutation34	Mutation35	Mutation36	Mutation37
1	2015-07-06_GHBTKEZQW9RF_ab1							
2	2015-07-06_HABTKEDQNR9F_ab1	417A>AG,139S>S/S\$11	419T>TA,146V>V/D\$11	438T>TA,146S>S/P\$8	440T>TA,147L>L/H\$11	479A>AT,360T>T/S\$12	481T>TA,161F>F/H\$5	513T>TA,171A>AA\$11

Mutation36	Mutation37	Mutation38	Mutation39	Mutation40
481T>TA,161F>F/H\$5	513T>TA,171A>A/A\$11	515A>AG,172Q>Q/R\$7	534T>TA,178T>T/T\$38	540A>AC,180P>P/P\$8

**Mutation 39: 534T>TA,178T>T/T \$38** :Une substitution hétérozygote en position 534, les bases TA ont été substituées en T, le codon 178 de l'acide aminé normal est "T" et l'acide aminé résultant de cette mutation est le même acide aminé "T". le score est de 38.

Mutation41	Mutation42	Mutation43	Mutation44	Mutation45	Mutation46
549T>TA,183S>S/S\$11	555T>TA,185A>A/A\$21	557T>TA,186L>L/H\$12	563A>AC,188H>H/P\$17	575T>TA,192L>L/H\$21	576T>TA,192L>L/L\$8

**Mutation42: 555T>TA,185A>A/A \$21** : Une substitution hétérozygote en position 555, les bases TA ont été substituées en T, le codon 185 de l'acide aminé normal est "A" et l'acide aminé résultant de cette mutation est le même acide aminé "A". Le score est de 21.

Mutation41	Mutation42	Mutation43	Mutation44	Mutation45	Mutation46
549T>TA,183S>S/S\$11	555T>TA,185A>A/A\$21	557T>TA,186L>L/H\$12	563A>AC,188H>H/P\$17	575T>TA,192L>L/H\$21	576T>TA,192L>L/L\$8

**\*Mutation 43: 557T>TA,186L>L/H \$12\*** :Une substitution hétérozygote en position 557, les bases TA ont été substituées en T, le codon 186 de l'acide aminé normal est "L" et l'acide aminé résultant de cette mutation est un mélange de l'acide aminé normal "L" et de l'acide aminé mutant "H". le score est de 12.

**\*Mutation 45: 575T>TA,192L>L/H \$21\*** :Une substitution hétérozygote en position 575, les bases TA ont été substituées en T, le codon 192 de l'acide aminé normal est "L" et l'acide aminé résultant de cette mutation est un mélange de l'acide aminé normal "L" et de l'acide aminé mutant "H". le score est de 21.

## Résultats et discussion

Mutation46	Mutation47	Mutation48	Mutation49
576T>TA,192L>L/L\$8	577T>TA,193S>S/T\$30	580T>TA,194S>S/T\$27	583A>AC,195K>K/Q\$37

**\*Mutation 47: 577T>TA,193S>S/T \$30\*** : Une substitution hétérozygote en position 577, les bases TA ont été substituées en T, le codon 193 de l'acide aminé normal est "S" et l'acide aminé résultant de cette mutation est un mélange de l'acide aminé normal "S" et de l'acide aminé mutant "T". Le score est de 30.

**\*Mutation 48: 580T>TA,194S>S/T \$27\*** : Une substitution hétérozygote en position 580, les bases TA ont été substituées en T, le codon 194 de l'acide aminé normal est "S" et l'acide aminé résultant de cette mutation est un mélange de l'acide aminé normal "S" et de l'acide aminé mutant "T". Le score est de 27.

**\*Mutation 49: 583A>AC,195K>K/Q \$37\*** : Une substitution hétérozygote en position 583, les bases AC ont été substituées en A, le codon 195 de l'acide aminé normal est "K" et l'acide aminé résultant de cette mutation est un mélange de l'acide aminé normal "K" et de l'acide aminé mutant "Q". Le score est de 37.

Mutation49	Mutation50	Mutation51	Mutation52	Mutation53	Mutation54
583A>AC,195K>K/Q\$37	595T>TA,199S>S/T\$9	598E>TA,200S>S/T\$8	603C>CA,201P>P/P\$7	604T>TA,202F>F/I\$7	610A>AT,204S>S/C\$19

**\*Mutation 50: 595T>TA,199S>S/T \$9\*** : Une substitution hétérozygote en position 595, les bases TA ont été substituées en T, le codon 199 de l'acide aminé normal est "S" et l'acide aminé résultant de cette mutation est un mélange de l'acide aminé normal "S" et de l'acide aminé mutant "T". Le score est de 9.

### Discussion des résultats

Chez l'ensemble des malades explorés, l'analyse des séquençages de l'exon 1 a révélé des mutations silencieuses, donc ne provoquant pas de changement d'acides aminés, la protéine reste inchangée.

L'analyse des mutations pour l'exon 1 chez les 6 patients a détecté la présence de 43 mutations. La majorité de ces mutations sont des substitutions, dont le nombre est de 36 substitutions.

- ✓ D'où 11 parmi elles sont probables (rapportées en bleu)
- ✓ Les 25 substitutions restantes sont peu probables (rapportées en rouge).

On retrouve parmi les substitutions homozygotes détectés (probables et peu probables)

- ✓ 15 transversions
- ✓ 4 transitions

Ces substitutions sont des variations silencieuses, il y a changement de nucléotides sans pour autant amener à un changement d'acide aminé. Elles sont dites mutations silencieuses.

Le reste des mutations sont des délétions toutes probables, détectées seulement chez le patient n°6. La 1<sup>ère</sup> mutation détectée chez ce dernier était une délétion probable de cinq bases, qui a engendré 29 différentes mutations. Cette délétion est **86-90del CTCAG** est une délétion (*frameshift*) qui peut décaler le cadre de lecture. Mais dans notre cas aucun changement d'acide aminé n'a été rapporté.

Certaines mutations détectées par le logiciel mutation surveyor, ont été confirmées par le chromatogramme Chromas, exemple : la transversion **A>T** en position 123 sur le brin F chez le patient n°5.

Les mutations de l'exon1 qui sont confirmées dans les deux brins sens/antisens, chez le patient6 sont: **Mutation 1: 106G>C \$31**, **Mutation 2: 107G>GC \$14** qui sont présentes dans les deux brins sens et antisens et qui sont même confirmées sur les deux chromatogrammes.

Tableau récapitulatif des résultats des mutations de l'exon 1

**Tableau X :**

Patients	Brin F/R	Type de mutation	Bleu	Rouge	Modification Acide Aminé	Totaux
P1	R	Substitution	2	2	/	5
	F	Substitution	0	1	/	
P2	R	Substitution	0	2	/	2
	F		∅	∅	/	
P3	F	Substitution	2	0	/	2
	R		∅	∅	/	
P4	F	Substitution	0	1	/	1
			0	0	/	
P5	R		0	0	/	1
	F	Substitution	1	0	/	
P6	R	Substitution	1	1	/	32
	F	Substitution	5	18	/	
	F	Délétion	7	0	/	

En ce qui concerne l'exon 8-9, on a détecté un nombre plus important de mutations proportionnelles à la taille :

- ✓ exon 8 est de 188
- ✓ intron8 est de 417
- ✓ exon 9 est de 63

Et ce, comparativement à l'exon 1 qui est de 163.

La majorité de ces mutations sont des substitutions, dont le nombre est de 59 sur 67.

21 d'entre elles sont probables.

Les mutations qui ont induit des modifications de l'acide aminé sont des mutations faux sens.

Les deux confirmées sur les deux brin sont : C>T à la 460 base, elles provoquent un changement R→W dans le codon 154.

Les autres mutations qui peuvent décaler le cadre lecture sont : ([Mutation 6 :157-158insCA](#), [Mutation 11: 166-167insAC](#)) chez le patient 6. Ce sont des insertions de deux bases, insertion *frameshift*.

Les 22 mutations qui induisent un changement de l'acide aminé, peuvent être des variations neutres qui ne provoquent pas la maladie.

Donc, on ne connaît pas l'impact des mutations sur la protéine. Le logiciel polyphèneII permet de conclure si les mutations causent la pathologie. On n'a pas pu réaliser cette étape.

La seule mutation rapportée dans la base de données est celle du codon 113. Elle induit un changement V→D causant la pathologie.

Dans le cas de notre étude seul la mutation **\*Mutation 24 : 338C>CT, 113Q>Q/X \$43\*** chez le patient n°6 a été révélée. Néanmoins nous n'avons pas pu établir la relation avec la pathologie. L'ensemble des mutations répertoriées causant l'XLA sont en annexes.

### Tableau récapitulatif des résultats des mutations de l'exon 8-9

**Tableau XI :**

Patients	Brin F/R	Type de mutation	Bleu	Rouge	Modification Acide Aminé	Totaux
P1	R	duplication	1	0	/	1
	F		∅	∅	/	
P2	F	Substitution	2	0	154 R-->W	5
	R	Substitution	2	1	154 R-->W	
P4	F	Substitution	1	2	37X-->Y	6
	F	Substitution	1	0	52 T-->T/P	
	R	Substitution	1	1	243 Y-->Y/C	
P5	R	Substitution	0	1	/	1
	F		0	0	/	
P6	R		0	0	/	54
	F	Substitution	3	32	52 H>P, 52 H>H/Q, 53L>L/P	
	F	Substitution	3	0	55 A>T, 68 L>L/H, 80 T>T/P	
	F	Substitution	3	0	113 Q>Q/H, 116L>L/H, 120A>A/V	
	F	Substitution	4	0	192 L>L/H, 193 S>S/T, 194 S>S/T	
	F	Substitution	2	0	195 K>K/Q	
	F	duplication	5	0		
F	insertion	2	0	/		

En ce qui concerne les changements d'acides aminés cela a été décelé seulement dans l'exon 8-9, chez les patients n° :2-4-5-6.

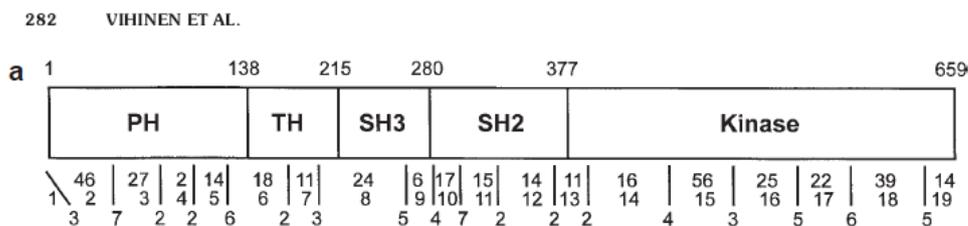
On compte 18 changements qui sont probables et 26 peu probables. Toutes ces modifications d'acides aminés sont causées par des substitutions. Ce sont des mutations faux-sens.

L'impact de ces mutations faux-sens (substitutions) dépend de la nature de l'acide aminé qui est inséré et du rôle joué par celui remplacé dans la fonction de la protéine. Si l'acide aminé inséré manifeste des propriétés physico-chimiques semblables à celle de l'originale, on peut les considérer comme des mutations neutres.

Aussi l'impact de la mutation dépend de la région ou la substitution s'est produite selon son implication dans la fonction de la protéine, comme les mutations répertoriées dans la Btkbase qui touchent le domaine PH. Elles ont un effet désastreux sur la fonction globale de la protéine.

Exemple :

- ✓ La substitution de l'arginine R28 modifie la charge positive sur la surface du domaine PH de la protéine Btk, ce qui empêche de cibler la membrane plasmique et donc sa perte de fonction de Btk.
- ✓ Les mutations dans des positions clé empêche l'activité signalétique de Btk, comme celle de Y551, Y223 [Park et al., 1996; Rawlings et al., 1996].



Dans notre étude les acides aminés modifiés chez les patients : 2- 4-5-6 les plus probables débutent à partir du 37<sup>ème</sup> codon jusqu'à 243<sup>ème</sup> codon. Les mutations recouvrent les domaines de la Btk majoritairement :

- Le domaine PH (1-138)
- Le domaine TH :(138-215)

Le domaine PH se lie à phosphatidylinositols et peut être considéré comme le module de localisation à la membrane. Le domaine TH contient un motif de liaison  $Zn^{2+}$  ( $Zn^{2+}$  binding motif) (Hyvönen et Saraste, 1997; Vihinen et al., 1997b).

Ces domaines lient la Btk à ses associés moléculaires. Les mutations au niveau des résidus conservés, affectent de manière significative la fonction de la protéine.

Selon la Btkbase, la plupart des mutations faux-sens sont structurelles, modifiant la forme ou diminuant la stabilité de la protéine (Btk) Bruton tyrosine kinase

Cette étude a présenté des insuffisances pour les raisons suivantes:

- ✓ Le séquençage n'a pas pu être réalisé pour les 16 exons.
- ✓ Les insuffisances constatées dans les résultats des séquençages
- ✓ La maîtrise insuffisante des outils d'analyse.

Néanmoins, ce travail nous a permis d'approcher une des techniques de base de la génétique, et de prendre conscience de la délicatesse des manipulations dans ce domaine de biologie moléculaire. Cette étude nous a permis également d'approcher l'utilisation des logiciels bioinformatiques.

**Tableau récapitulatif des résultats des acides aminés modifiés les plus probables**  
**Tableau XII:**

Patients	Brin F/R	N° du codon de l'acide aminé	Transformation	Position de la base	Mutation
P2	F	154	R → W	460	C>T
	R	154	R → W	460	C>T
P4	F	37	X → Y	111	G>C
	F	52	T → T/P	154	A>AC
	R	243	Y → Y/C	728	A>AG
P6	F	52	H → P	154	A>C
	F	116	L → L/H	348	T>TA
	F	120	A → A/V	360	C>CT
	F	192	L → L/H	575	T>TA
	F	52	H → H/Q	155	C>CA
	F	53	L → L/P	157	T>TC
	F	55	A → T	163	G>A
	F	68	L → L/H	202	T>TA
	F	80	T → T/P	239	A>AC
	F	<b><u>113</u></b>	Q → Q/X	388	C>CT
	F	193	S → S/T	577	T>TA
	F	194	S → S/T	580	T>TA
	F	195	S → S/C	610	A>AT

# Conclusion

### Conclusion

Notre étude, a fait ressortir que l'échantillon analysé présente plus fréquemment des mutations silencieuses, suivies par des faux-sens, ce qui est statistiquement conforme à la Btkbase.

Néanmoins, l'impact de ces mutations sur la maladie de Bruton, n'a pu être prouvé à cause des difficultés rencontrées dans l'utilisation du logiciel Polyphène II (dont le rôle est d'établir une relation causale entre la mutation et la pathologie).

L'investigation doit être poursuivie en utilisant ce logiciel. S'il confirme cette relation, l'existence de cette mutation doit être à son tour confirmée dans le répertoire de la Btkbase. Dans le cas échéant elle sera introduite comme donnée nouvelle.

Si la relation n'est pas confirmée, il est nécessaire de poursuivre les investigations : exon par exon, jusqu'à déceler la mutation à l'origine de la maladie.

Néanmoins une analyse génétique complète (exons et introns), est nécessaire pour cerner éventuellement d'autres causes méconnues de la maladie.

Cliniquement, le but de l'investigation de la maladie de Bruton est le conseil génétique, et la préconisation de solutions (sélection d'embryons de sexe féminin), pour une éventuelle grossesse. Un arbre généalogique doit être établi pour déterminer si la mutation est *de novo* ou transmise.

# ***ANNEXE***

## **Annexe 1 : Fonctionnement et exploitation du logiciel mutation Surveyor**

### **✓ Terminologie**

- Exemple de fichier (Sample File): Séquences à étudier.
- Le fichier de référence (Reference File): La séquence de référence répertoriée dans les banques de données
- La direction: La direction sens F (forward) ou antisens R (Reverse)
- Le gène: Le nom du gène comme indiqué dans le fichier de référence GenBank.
- L'exon: L'exon comme indiqué dans le fichier de référence GenBank.
- Le R/F: Le cadre de lecture de l'exon.
- Le début/Fin: Les bases de début et de fin de la zone de comparaison marquée par deux barres verticales bleues.
- La taille (size): Le nombre de bases
- la qualité: Mesure du rapport (signal/bruit) S / N
- Mut #: Le nombre de mutation
- Mutation: Type de mutation selon un code précis

### **✓ Le code de mutation**

C'est un code unique qui identifie chaque mutation dans la séquence étudiée. Le format du code indique le type de mutation: substitution, insertion /délétion ou duplication.

Pour un événement de substitution il comporte quatre volets: la position de la base, la mutation, la séquence d'acides aminés qui est affecté par la mutation, et le score.

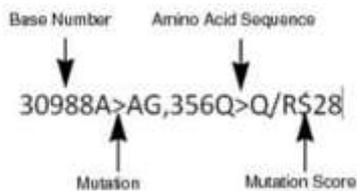
La couleur d'un code de substitution de mutation indique des informations sur la fiabilité du résultat à savoir :

- Le texte bleu : Mutation d'une grande confiance.
- Le texte rouge : Mutation d'une faible confiance.
- Le fond Rose: Modification de la séquence d'acides aminés.
- Aucune couleur de fond: Pas de changement dans la séquence d'acides aminés.

La mutation peut être : homozygote : tel que A> C ; hétérozygotes : tel que A> AC; de substitution ; de délétion/insertion et de duplication.

#### **▪ Exemple de mutations de substitution**

Substitution hétérozygote en position 30988, les bases AG ont été substituées en A, le codon 356 de l'acide aminé normal est "Q" et l'acide aminé qui est produit en tant que résultat de cette mutation est l'acide aminé mutant "R". Le score de mutation est de 28.



**Figure 16 : Code de mutation**

Substitution homozygote en position 293ème base. La base C a été remplacé par la base G le score de mutation est de 34.

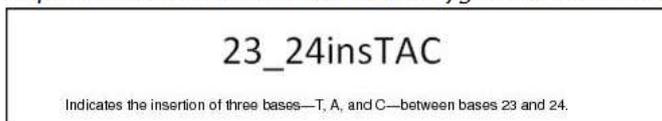


**Figure 17 : substitution homozygote**

Exemple de mutation d'insertion homozygote

Insertion de trois bases TAC entre la base 23 et 24.

*Example of a mutation code for a homozygous insertion event*



**Figure 18 : insertion**

Exemple de mutation d'insertion hétérozygote

Insertion hétérozygote de trois bases TAG entre les positions 98-99

*Example of a mutation code for a heterozygous insertion event*

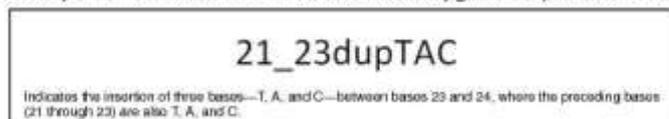


**Figure 19 : insertion**

**Exemple de mutation de duplication homozygote**

Insertion de trois bases TAC entre les bases 23 et 24, où les bases précédentes (21 à 23) sont également TAC

*Example of a mutation code for a homozygous duplication event*



**Figure 20 : duplication homozygote**

**Exemple de mutation de duplication hétérozygote**

Insertion d'une base T entre 1316 et 1317, la base qui précède 1316 est également T

Example of a mutation code for a heterozygous duplication event



**Figure 21** : duplication hétérozygote

**Exemple de mutation de délétion homozygote**

Indique une délétion de quatre bases TGCA

Example of a mutation code for a homozygous deletion event



**Figure 22** : délétion homozygote

**Exemple de mutation de délétion hétérozygote**

Délétion hétérozygote de quatre bases entre la 123 et 127 bases

Example of a mutation code for a heterozygous deletion event

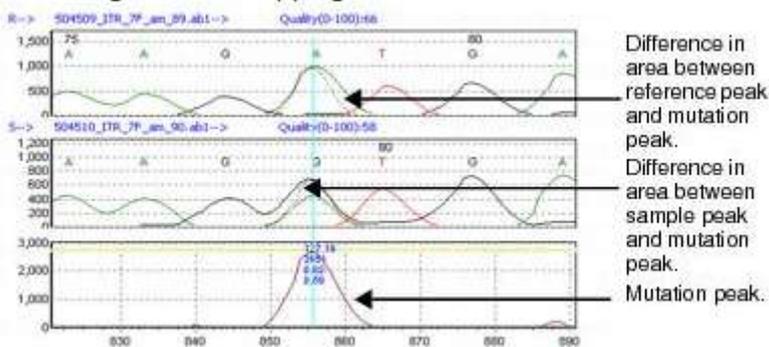


**Figure 23** : délétion hétérozygote

✓ **Le score:** Indique le niveau de confiance, qui est calculé par le logiciel en prenant en considération trois paramètres : la qualité de la séquence (S/N), le facteur d'enveloppement (mesurant l'écart moyen des surfaces entre la courbe de références et la séquence étudiée); et le facteur de chute (qui mesure la différence entre le niveau de crête de la séquence de référence et le niveau de la séquence étudiée après ajustement du niveau de crête).

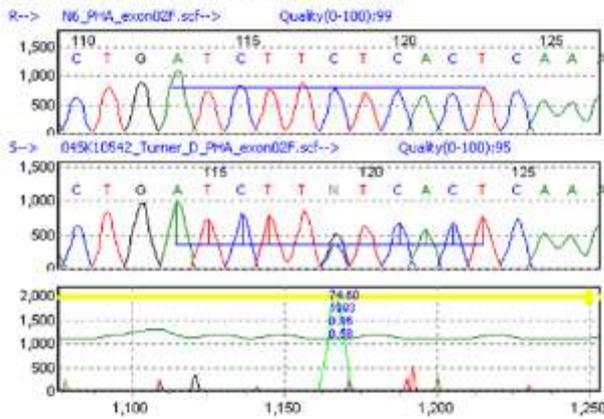
**Exemple schématique de calcul du facteur d'enveloppement**

Calculating the Overlapping Factor



**Figure 24** : Exemple schématique de calcul du facteur de chute

### Calculating the Dropping Factor



**Figure 25 :**

Ces exemples montrent que dans la configuration du processus d'alignement, le score de mutation est variable ainsi que les trois paramètres, (on peut choisir le niveau d'exigence de l'analyse).

Le rapport entre le score et la fiabilité est proportionnel (plus ce score est faible, plus la fiabilité est réduite et inversement). La valeur par défaut est fixée à 5 pour notre étude.

## Annexe 2 : Alignement Blast de l'exon 1 et 8-9 des 06 patients :

### Alignement de l'exon 1 F patient1

```
Query 74      TGGGGTTTGCTCA-CTGTCCTTCCTCTCTGGACTGTAAGAATATGTCT-TAGGGCCAGT 131
Sbjct 100534671 TGGGGTTTGCTCAGACTGTCCTTCCTCTCTGGACTGTAAGAATATGTCTCCAGGGCCAGT 100534612

Query 132     GTCTGCTGCGATCGAGTCCCACCTTCCAAGTCTGGCATCTCAATGCATCTGGGAAGCTA 191
Sbjct 100534611 GTCTGCTGCGATCGAGTCCCACCTTCCAAGTCTGGCATCTCAATGCATCTGGGAAGCTA 100534552

Query 192     CCTGCATTAAGTCAGGACTGAGGTGGGTCTGGGGTATGGCAGGGGCTGGGCAGCAGCAGC 251
Sbjct 100534551 CCTGCATTAAGTCAGGACTGAGGTGGGTCTGGGGTATGGCAGGGGCTGGGCAGCAGCAGC 100534492

Query 252     AATGTACCTTGCTTGGGACCCCTAAAAACCAGAGA-ACAAGCATGGCT 298
Sbjct 100534491 AATGTACCTTGCTTGGGACCCCTAAAAACCAGAGAGACA-GCATGGCT 100534445
```

### Figure 30

### Alignement de l'exon 1R patient 1

```
Query 90      CTGCTGCTCCG-CCCT-CC-T-CCCC-GACCCACCTCAGTCCTGACTTAATGCAATAAG- 143
Sbjct 100534496 CTGCTGCCAGCCCTGCCATACCCAGACCCACCTCAGTCCTGACTTAATGCAGGTAGC 100534555

Query 144     GTCCC-TA-GCATTGAGATGCCAGGACTTGGAAAGCGGGA---GAGTCTCTACAGACACT 198
Sbjct 100534556 TTCCCAGATGCATTGAGATGCCAGGACTTGGAAAGTGGGACTCGA-TCGCAGCAGACACT 100534614

Query 199     GGCCCTGGAGACATATTCTTACAGTCCAGAGAGGAAGGACAGTCTGAGCAAACCTCTCCC 258
Sbjct 100534615 GGCCCTGGAGACATATTCTTACAGTCCAGAGAGGAAGGACAGTCTGAGCAAACCCACCC 100534674

Query 259     TCTTCACAGCCACTCAGTTCCTTCCCCtttttttGCTTCCTGACCTAAACCAATGTCTTT 313
Sbjct 100534675 T-TTCACAGCCACTCAGTTCCTTTTTTTGCTTCCTGACCTAAACCAATGTCTTT 100534728
```

### Figure 31

## Analyse Blast

### L'exon 8-9

#### Le brin sens F de l'exon 8-9 : Alignement impossible

#### Alignement Exon 8-9, brin antisens R

```
Query 174      TATAGA-TAC-TG-AAATGAATGCAAATGATCTACAGCTGCGGAAGGGTGTGAATATTT 230
Sbjct 100509149 TAT-GATTACATGCCAATGAATGCAAATGATCTACAGCTGCGGAAGGGTGTGAATATTT 100509091

Query 231      TATCTTGTAGGAAAGCAACTTACCATGGTGGAGAGCACGAGATAAAAAATGGGTGAGTCCA 290
Sbjct 100509090 TATCTTGGAGGAAAGCAACTTACCATGGTGGAGAGCACGAGATAAAAAATGGGTGAGTCCA 100509031

Query 291      CACCAGCCCTTCTGAGCCTGGTGCCTGCCCACTCCCTACACGCAAAAAGTGTGCGGCA 350
Sbjct 100509030 CACCAGCCCTTCTGAGCCTGGTGCCTGCCCACTCCCTACACGCAAAAAGTGTGCGGCA 100508971

Query 351      TAATCCCCTGATCAGCATCCTCATCAGAGACTGTTCTTCCCACACCAGACTGAACATGC 410
Sbjct 100508970 TAATCCCCTGATCAGCATCCTCATCAGAGACTGTTCTTCCCACACCAGACTGAACATGC 100508911

Query 411      TCTCCCTCCAAGTACTTCCCAGCGTGCAGCTCCCTATACATGGCCTCTGCCACATCTCTT 470
Sbjct 100508910 TCTCCCTCCAAGTACTTCCCAGCGTGCAGCTCCCTATACATGGCCTCTGCCACATCTCTG 100508851

Query 471      AGCCTCTGTTGTTGGGCACATATAACCAATGCAACATGTGCATAAGCTCTGCACCTCACT 530
Sbjct 100508850 AGCCTCTGTTGTTGGGCACATATAACCAATGCAACATGTGCATAAGCTCTGCACCTCACT 100508791

Query 531      GGCTCACTGCCTAACCATGCATCAGAGACATGATTGTCTTTGAGGGAGGTGCATGATACA 590
Sbjct 100508790 GGCTCACTGCCTAACCATGCATCAGAGACATGATTGTCTTTGAGGGAGGTGCATGATACA 100508731

Query 591      TATACCTCCATTTGAGATTTGTTTCTGAGCTCAGGGACGTGGGCA-ATGAATTTGTCTCC 649
Sbjct 100508730 TATACCTCCATTTGAGATTTGTT-CTGAGCTCAGGGACGTGGGCATATGAATCTGTCTCC 100508672

Query 650      TGGATGCTGGGGAGGTGCTGGATGAAACTGCCACATTGTTTTCTTCCCAGGCAGGGAA 709
Sbjct 100508671 TGGAGGCTGGGGAGGTGCTGGATGAA-CTGCC-ACATTG-TTTCCTTACAGGCAGG-AA 100508616

Query 710      AGGCTTACTTTCCCTAGTTAACTATGGTCATTGAAAGCAAAA-ACT 754
Sbjct 100508615 -GGCT-ACATTCC-TAGT-AACTATG-TCACTGAA-GCAGAAGACT 100508576
```

Figure : 32

## Alignement Blast de l'exon8-9 patient2

### Exon 8-9

#### Le brin F

```
Query 61 ACAT-AAC-TACTTACTCATACATTTCTATGGAGTCTTCTGCTTCAGTGACATAGTTACT 118
Sbjct 100508544 ACATAAACATACTTACTCATACATTTCTATGGAGTCTTCTGCTTCAGTGACATAGTTACT 100508603
Query 119 AGGAATGTAGCTTAATTGCCGTGGAAGGAAACAATGTGGCAGTTCATCCAGCACCTCCCC 178
Sbjct 100508604 AGGAATGTAGCTTCTGCTGTGGAAGGAAACAATGTGGCAGTTCATCCAGCACCTCCCC 100508663
Query 179 AGCCTCCAGGAGACAGATTTCATATGCCACGTCCTGAGCTCAGAACAAATCTCAAATGG 238
Sbjct 100508664 AGCCTCCAGGAGACAGATTTCATATGCCACGTCCTGAGCTCAGAACAAATCTCAAATGG 100508723
Query 239 AGGTATATGTATCATGCACCTCCCTCAAAGACAATCATGTCTCTGATGCATGGTTAGGCA 298
Sbjct 100508724 AGGTATATGTATCATGCACCTCCCTCAAAGACAATCATGTCTCTGATGCATGGTTAGGCA 100508783
Query 299 GTGAGCCAGTGAGGTGCAGAGCTTATGCACATGTTGCATTGGTTATATGTGCCAACCAAC 358
Sbjct 100508784 GTGAGCCAGTGAGGTGCAGAGCTTATGCACATGTTGCATTGGTTATATGTGCCAACCAAC 100508843
Query 359 AGAGGCTCAGAGATGTGGCAGAGGCCATGTATAGGGAGCTGCACGCTGGGAAGTACTTGG 418
Sbjct 100508844 AGAGGCTCAGAGATGTGGCAGAGGCCATGTATAGGGAGCTGCACGCTGGGAAGTACTTGG 100508903
Query 419 AGGGAGAGCATGTTCAAGTCTGGTGTGGGAAGAACAAGTCTCTGATGAGGATGCTGATCATG 478
Sbjct 100508904 AGGGAGAGCATGTTCAAGTCTGGTGTGGGAAGAACAAGTCTCTGATGAGGATGCTGATCACG 100508963
Query 479 GGAATTGTGCCGAGCACTTTTTGCGTGTAGGGAGTGGGCAGGCACCAAGGCTCAGGAAGG 538
Sbjct 100508964 GGAATTATGCCGAGCACTTTTTGCGTGTAGGGAGTGGGCAGGCACCAAGGCTCAGGAAGG 100509023
Query 539 GCTGGTGTGGACTCACCCATTTTTATCTCGTGCTCTCCACCATGGTAAGTTGCTTTCTC 598
Sbjct 100509024 GCTGGTGTGGACTCACCCATTTTTATCTCGTGCTCTCCACCATGGTAAGTTGCTTTCTC 100509083
Query 599 CAAGATAAAATATTCATCACCCCTCCGAGCTGTAGATCATTGTCATTATTGGCATGTA 658
Sbjct 100509084 CAAGATAAAATATTCATCACCCCTCCGAGCTGTAGATCATTGTCATTATTGGCATGTA 100509143
Query 659 ATCATAAAGGGCCACAACCTTTTTAGCTCACT-GTG-AGACT-GTGCTGCTGCTGGCTC 715
Sbjct 100509144 ATCATAAAGGGCCACAACCTTTTTAGCTCACTGTGGGAGACTGGTCTGCTGCTGGCTC 100509203
Query 716 AGGCG-TAGTGGCTTTT-C-AGATCTATGTAGT-AGGAGAAA-G-TAGGAGG-TTTGTCA 768
Sbjct 100509204 AGGCGGTAGTGGCTTTTCAAGATCTATGTAGTTAGGAGAAAAGGTAGGAGGGTTTGTCA 100509263
Query 769 -GA-AC--AGCACTCTTCTCTTTCTCTCC-AACTTT-TGGCTTAC 807
Sbjct 100509264 AGATACCAAGCACTCTTCTCTT-CTCTCCCAACTCTCTGGCTTAC 100509307
```

Figure : 37

## Exon 8-9, patient2

### Le brin R

```
Query 64      TGGGATCTTG-CCAACCTCCTACCTTTTCTCCTAACTACATAGATCTTGAAAAAGCCAC 122
Sbjct 100509271 TGGTATCTTGACAAACCTCCTACCTTTTCTCCTAACTACATAGATCTTGAAAAAGCCAC 100509212

Query 123     TACCGCCTGAGCCAGCAGCAGCACCAGTCTCCACAAGTGAGCTGAAAAAGGTTGTGGCCC 182
Sbjct 100509211 TACCGCCTGAGCCAGCAGCAGCACCAGTCTCCACAAGTGAGCTGAAAAAGGTTGTGGCCC 100509152

Query 183     TTTATGATTACATGCCAATGAATGCAAAATGATCTACAGCTGCGGAAGGGTGATGAATATT 242
Sbjct 100509151 TTTATGATTACATGCCAATGAATGCAAAATGATCTACAGCTGCGGAAGGGTGATGAATATT 100509092

Query 243     TTATCTTGGAGGAAAGCAACTTACCATGGTGGAGAGCAGAGATAAAAAATGGGTGAGTCC 302
Sbjct 100509091 TTATCTTGGAGGAAAGCAACTTACCATGGTGGAGAGCAGAGATAAAAAATGGGTGAGTCC 100509032

Query 303     ACACCAGCCCTTCTGAGCCTGGTGCCTGCCCACTCCCTACACGCAAAAAGTGCTGCGGC 362
Sbjct 100509031 ACACCAGCCCTTCTGAGCCTGGTGCCTGCCCACTCCCTACACGCAAAAAGTGCTGCGGC 100508972

Query 363     ACAATTCCTCATGATCAGCATCCTCATCAGAGACTGTTCTTCCACACCAGACTGAACATG 422
Sbjct 100508971 ATAATTCCTCATGATCAGCATCCTCATCAGAGACTGTTCTTCCACACCAGACTGAACATG 100508912

Query 423     CTCTCCCTCCAAGTACTTCCCAGCGTGCAGCTCCCTATACATGGCCTCTGCCACATCTCT 482
Sbjct 100508911 CTCTCCCTCCAAGTACTTCCCAGCGTGCAGCTCCCTATACATGGCCTCTGCCACATCTCT 100508852

Query 483     GAGCCTCTGTTGTTGGGCACATATAACCAATGCAACATGTGCATAAGCTCTGCACCTCAC 542
Sbjct 100508851 GAGCCTCTGTTGTTGGGCACATATAACCAATGCAACATGTGCATAAGCTCTGCACCTCAC 100508792

Query 543     TGGCTCACTGCCTAACCATGCATCAGAGACATGATTGTCTTTGAGGGAGGTGCATGATAC 602
Sbjct 100508791 TGGCTCACTGCCTAACCATGCATCAGAGACATGATTGTCTTTGAGGGAGGTGCATGATAC 100508732

Query 603     ATATACCTCCATTTGAGATTTGTTCTGAGCTCAGGGACGTGGGCATATGAATCTGTCTCC 662
Sbjct 100508731 ATATACCTCCATTTGAGATTTGTTCTGAGCTCAGGGACGTGGGCATATGAATCTGTCTCC 100508672

Query 663     TGGAGGCTGGGGAGGTGCTGGATGAACTGCCACATTTGTTTCTTTCACAGGCAGGAAGG 722
Sbjct 100508671 TGGAGGCTGGGGAGGTGCTGGATGAACTGCCACATTTGTTTCTTTCACAGGCAGGAAGG 100508614

Query 723     CTACATTCCTAGTAACCTATGTCAGTGAAGCAGAAAGACTCCATAGAAATGTATGAGTAAGT 782
Sbjct 100508613 CTACATTCCTAGTAACCTATGTCAGTGAAGCAGAAAGACTCCATAGAAATGTATGAGTAAGT 100508554

Query 783     ATGTTTATGTTCAGTCCACAATTTCTTCCAGGAGGAAC-CTCTCT-TCT 828
Sbjct 100508553 ATGTTTATGTTCAGTCCACAAT-CTT-CCAGGAGGAACCTCTCTCTCT 100508508
```

Figure : 38



## Alignement Blast de l'exon8-9, patient 4

### Exon 8-9 Le brin F

```

Query 63          CATAAAAATACGTTACTCATACATTTCTATGGAGTCTTCTGCTTCAGTGACATAGTTACT 122
                |||
Sbjct 100508545  CATAAACATAC -TTACTCATACATTTCTATGGAGTCTTCTGCTTCAGTGACATAGTTACT 100508603

Query 123         AGGAATGTAG -TTACCTGCCTGTGAAGGAAACAATGTGGCAGTTTATCCAGCACCTCCCC 181
                |||
Sbjct 100508604  AGGAATGTAGCCTTCTGCCTGTGAAGGAAACAATGTGGCAGTTTATCCAGCACCTCCCC 100508663

Query 182         AGCCTCCAGGAGACAGATTCATATGCCACGTCCTGAGCTCAGAACAATCTCAAATGG 241
                |||
Sbjct 100508664  AGCCTCCAGGAGACAGATTCATATGCCACGTCCTGAGCTCAGAACAATCTCAAATGG 100508723

Query 242         AGGTATATGTATCATGCACCTCCCTCAAAGACAATCATGTCTCTGATGCATGGTTAGGCA 301
                |||
Sbjct 100508724  AGGTATATGTATCATGCACCTCCCTCAAAGACAATCATGTCTCTGATGCATGGTTAGGCA 100508783

Query 302         GTGAGCCAGTGAGGTGCAGAGCTTATGCACATGTTGCATTGGTTATATGTGCCAACAAAC 361
                |||
Sbjct 100508784  GTGAGCCAGTGAGGTGCAGAGCTTATGCACATGTTGCATTGGTTATATGTGCCAACAAAC 100508843

Query 362         AGAGGCTCAGAGATGTGGCAGAGGCCATGTATAGGGAGCTGCACGCTGGGAAGTACTTGG 421
                |||
Sbjct 100508844  AGAGGCTCAGAGATGTGGCAGAGGCCATGTATAGGGAGCTGCACGCTGGGAAGTACTTGG 100508903

Query 422         AGGGAGAGCATGTTCAAGTCTGGTGTGGGAAGAACAAGTCTCTGATGAGGATGCTGATCACG 481
                |||
Sbjct 100508904  AGGGAGAGCATGTTCAAGTCTGGTGTGGGAAGAACAAGTCTCTGATGAGGATGCTGATCACG 100508963

Query 482         GGAATTATGCCGCAGCACTTTTTGCGTGTAGGGAGTGGGCAGGCACCAAGGCTCAGGAAGG 541
                |||
Sbjct 100508964  GGAATTATGCCGCAGCACTTTTTGCGTGTAGGGAGTGGGCAGGCACCAAGGCTCAGGAAGG 100509023

Query 542         GCTGGTGTGGACTCACCCATTTTTATCTCGTGCTCTCCACCATGGTAAGTTGCTTTCTC 601
                |||
Sbjct 100509024  GCTGGTGTGGACTCACCCATTTTTATCTCGTGCTCTCCACCATGGTAAGTTGCTTTCTC 100509083

Query 602         CAAGATAAAATATTCATCACCCCTCCGAGCTGTAGATCATTTGCATTATTGGCATGTA 661
                |||
Sbjct 100509084  CAAGATAAAATATTCATCACCCCTCCGAGCTGTAGATCATTTGCATTATTGGCATGTA 100509143

Query 662         ATCATAAAGGGCCACAACCTTTTTAGCTCACTTGTGGAGACTGGTGCTGCTGCTGGCTC 721
                |||
Sbjct 100509144  ATCATAAAGGGCCACAACCTTTTTAGCTCACTTGTGGAGACTGGTGCTGCTGCTGGCTC 100509203

Query 722         AGGCGGTAGTGGCTTTTTCAAGATCTATGTAGTTAGGAGAAAAAGGTAGGAGGGTTTGTG 781
                |||
Sbjct 100509204  AGGCGGTAGTGGCTTTTTCAAGATCTATGTAGTTAGGAG -AAAAGGTAGGAGGGTTTGTG 100509262

Query 782         AAGATACCAAGCACTTCTCTCTCTCCCAAC -CTCTGG 820
                |||
Sbjct 100509263  AAGATACCAAGCACTTCTCTCTCTCCCAACTCTCTGG 100509302

```

Figure : 46

## Alignement Blast de l'exon8-9, patient 4

### Exon 8-9 Le brin R

```
Query 71      AACCCCTCCTACCTTTTCTCCTAACTACATAGATCTTGAAAAAGCCACTACCGCTTGATCC 130
           |||
Sbjct 100509258 AACCCCTCCTACCTTTTCTCCTAACTACATAGATCTTGAAAAAGCCACTACCGCTTGAGCC 100509199

Query 131     AGCAGCAGCACCAGTCTCCACAAGTGAGCTGAAAAAGGTTGTGGCCCTTTATGATTACAT 190
           |||
Sbjct 100509198 AGCAGCAGCACCAGTCTCCACAAGTGAGCTGAAAAAGGTTGTGGCCCTTTATGATTACAT 100509139

Query 191     GCCAATGAATGCAAAATGATCTACAGCTGCGGAAGGGTGATGAATATTTTATCTTGGAGGA 250
           |||
Sbjct 100509138 GCCAATGAATGCAAAATGATCTACAGCTGCGGAAGGGTGATGAATATTTTATCTTGGAGGA 100509079

Query 251     AAGCAACTTACCATGGTGGAGAGCACGAGATAAAAAATGGGTGAGTCCACACCAGCCCTTC 310
           |||
Sbjct 100509078 AAGCAACTTACCATGGTGGAGAGCACGAGATAAAAAATGGGTGAGTCCACACCAGCCCTTC 100509019

Query 311     CTGAGCCTGGTGCCTGCCCACTCCCTACACGCAAAAAGTGCTGCGGCATAAATCCCCTGA 370
           |||
Sbjct 100509018 CTGAGCCTGGTGCCTGCCCACTCCCTACACGCAAAAAGTGCTGCGGCATAAATCCCCTGA 100508959

Query 371     TCAGCATCCTCATCAGAGACTGTTCTTCCCACACCAGACTGAACATGCTCTCCCTCCAAG 430
           |||
Sbjct 100508958 TCAGCATCCTCATCAGAGACTGTTCTTCCCACACCAGACTGAACATGCTCTCCCTCCAAG 100508899

Query 431     TACTTCCCAGCGTGCAGCTCCCTATACATGGCCTCTGCCACATCTCTGAGCCTCTGTTGT 490
           |||
Sbjct 100508898 TACTTCCCAGCGTGCAGCTCCCTATACATGGCCTCTGCCACATCTCTGAGCCTCTGTTGT 100508839

Query 491     TGGGCACATATAACCAATGCAACATGTGCATAAGCTCTGCACCTCACTGGCTCACTGCCT 550
           |||
Sbjct 100508838 TGGGCACATATAACCAATGCAACATGTGCATAAGCTCTGCACCTCACTGGCTCACTGCCT 100508779

Query 551     AACCATGCATCAGAGACATGATTGTCTTTGAGGGAGGTGCATGATACATACCTCCATT 610
           |||
Sbjct 100508778 AACCATGCATCAGAGACATGATTGTCTTTGAGGGAGGTGCATGATACATACCTCCATT 100508719

Query 611     TGAGATTTGTTCTGAGCTCAGGGACGTGGGCATATGAATCTGTCTCCTGGAGGCTGGGGA 670
           |||
Sbjct 100508718 TGAGATTTGTTCTGAGCTCAGGGACGTGGGCATATGAATCTGTCTCCTGGAGGCTGGGGA 100508659

Query 671     GGTGCTGGATGAACTGCCACATTGTTTCCTTACAGGCAGGAAGGCTACATTCCCTAGTA 730
           |||
Sbjct 100508658 GGTGCTGGATGAACTGCCACATTGTTTCCTTACAGGCAGGAAGGCTACATTCCCTAGTA 100508600

Query 731     ACTTATGTCCACTGAAGCAGAAAGACTCCATAGAAAATGTTATGGAGTAAGTATTGTTTT 790
           |||
Sbjct 100508599 ACT-ATGTC-ACTGAAGCAG-AAGACTCCATAGAAAAT-GT-ATG-AGTAAGTAT-GTTT- 100508548

Query 791     TATTGTCAGTCCAACAATTCTTCCAGAGAAGAAATCTCTCTTTCTA 836
           |||
Sbjct 100508547 -AT-GTCAGTCCA-CAAT-CTTCCAG-GAGGAACTCTCTCTCTA 100508507
```

Figure : 47

## Alignement Blast de l'exon1, patient5

### L'exon 1, le brin sens F

```
Query 93      AGGGTGGGGTTTGCTCAGACTGTCCTT-TTCTCTGGACTGTAAGAA-ATGT-TTTA-GG- 147
          |||
Sbjct 100534675 AGGGTGGGGTTTGCTCAGACTGTCCTTCTCTCTGGACTGTAAGAATATGTCTCCAGGGC 100534616

Query 148     TGTTGACTGCTGCGATCGAGTCCCACCTTCCAAGTCTGG-ATCTCAATGCATCTGGGAA 206
          |||
Sbjct 100534615 CAGTGTCTGCTGCGATCGAGTCCCACCTTCCAAGTCTGGCATCTCAATGCATCTGGGAA 100534556

Query 207     GCTACCTGCATTAAGTCAGGACTGAGGTGGGTCTGGGGTATGGCAGGGGCTGGGCACCCG 266
          |||
Sbjct 100534555 GCTACCTGCATTAAGTCAGGACTGAGGTGGGTCTGGGGTATGGCAGGGGCTGGGCAGCAG 100534496

Query 267     CAACAATGTACCTTGCTTGGGACCCCTAAAAACCCAGAGAGACAGCATGGCT 317
          |||
Sbjct 100534495 CAGCAATGTACCTTGCTTGGGACCCCTAAAAACCCAGAGAGACAGCATGGCT 100534445
```

Figure : 53

### Alignement exon 1 Le brin R

```
Query 64      AGAGT-CATTGCTGCTGCTGCC-AG-CCCTGCCATACCCCAGA-CCACCTCAGTCCTGAC 119
          |||
Sbjct 100534483 AG-GTACATTGCTGCTGCTGCCAGCCCTGCCATACCCCAGACCCACCTCAGTCCTGAC 100534541

Query 120     TTAATGCA-TTTGTGGCCC--TTGCATTGAGATGCCAGGACTTGGAAAGGTGGGAAT-GAT 175
          |||
Sbjct 100534542 TTAATGCAGGTAGCTTCCCAGATGCATTGAGATGCCAGGACTTGGAAAGGTGGGACTCGAT 100534601

Query 176     CGCAGCAGACACTGGCCCTGGAGACATATTCTTACAGTCCAGAGAGGAAGGACAGTCTGA 235
          |||
Sbjct 100534602 CGCAGCAGACACTGGCCCTGGAGACATATTCTTACAGTCCAGAGAGGAAGGACAGTCTGA 100534661

Query 236     GCAAACCCACCCCTTTCACAGCCACTCAGTTCCTtttttttGCTTCTTGACCTAAACCAA 295
          |||
Sbjct 100534662 GCAAACCCACCCCTTTCACAGCCACTCAGTTCCTTTTTTGTCTTCTTGACCTAAACCAA 100534721

Query 296     TGTCTT 301
          |||
Sbjct 100534722 TGTCTT 100534727
```

Figure : 54

## Alignement Blast de l'exon8-9, patient5

### Alignement exon 8-9, patient n°5

#### Le brin F : Alignement impossible

### Alignement exon 8-9, patient n°5

#### Le brin R

```
Query 70      CTTGCTGATACGTCTCTATGGA-TCTTCTGCTT-AGTGACATAGGTTACTAGGAAAGGAG- 126
          |||
Sbjct 100508555 CTTACTCATAcATTCTATGGAGTCTTCTGCTTcAGTGACATAGTTACTAGGAATGTAGC 100508614

Query 127     -ATGGTGTCC-T-ACCGACACAATGTGGTAGCTCATCC-G--TTGACACACCCTCCAGGA 180
          |||
Sbjct 100508615 CTTCTGCTGTGAAGGAAACAATGTGGCAGTTcATCCAGCACCTCCCCAGCCTCCAGGA 100508674

Query 181     GACAGATTCATATGCCcACGTCCCTGAGCTCAGAACAATCTCAAATGGAGGTATATGTA 240
          |||
Sbjct 100508675 GACAGATTCATATGCCcACGTCCCTGAGCTCAGAACAATCTCAAATGGAGGTATATGTA 100508734

Query 241     TCATGCACCTCCCTCAAAGACAATCATGTCTCTGATGCATGGTTAGGCAGTGAGCCAGTG 300
          |||
Sbjct 100508735 TCATGCACCTCCCTCAAAGACAATCATGTCTCTGATGCATGGTTAGGCAGTGAGCCAGTG 100508794

Query 301     AGGTGCAGAGCTTATGCACATGTTGCATTGGTTATATGTGCCCAACAACAGAGGCTCAGA 360
          |||
Sbjct 100508795 AGGTGCAGAGCTTATGCACATGTTGCATTGGTTATATGTGCCCAACAACAGAGGCTCAGA 100508854

Query 361     GATGTGGCAGAGGCCATGTATAGGGAGCTGCACGCTGGGAAGTACTTGGAGGGAGAGCAT 420
          |||
Sbjct 100508855 GATGTGGCAGAGGCCATGTATAGGGAGCTGCACGCTGGGAAGTACTTGGAGGGAGAGCAT 100508914

Query 421     GTTCAGTCTGGTGTGGGAAGAAGCAGTCTCTGATGAGGATGCTGATCACGGGAATTATGCC 480
          |||
Sbjct 100508915 GTTCAGTCTGGTGTGGGAAGAAGCAGTCTCTGATGAGGATGCTGATCACGGGAATTATGCC 100508974

Query 481     GCAGCACTTTTTGCGTGTAGGGAGTGGGCAGGCACCAGGCTCAGGAAGGGCTGGTGTGGA 540
          |||
Sbjct 100508975 GCAGCACTTTTTGCGTGTAGGGAGTGGGCAGGCACCAGGCTCAGGAAGGGCTGGTGTGGA 100509034

Query 541     CTCACCCATTTTTATCTCGTGCTCTCCACCATGGTAAGTTGCTTTCCTCCAAGATAAAAT 600
          |||
Sbjct 100509035 CTCACCCATTTTTATCTCGTGCTCTCCACCATGGTAAGTTGCTTTCCTCCAAGATAAAAT 100509094

Query 601     ATTCATCACCTTTCCGCAGCTGTAGATCATTTCATTGTCATTGATGTAATCATAAAGG 660
          |||
Sbjct 100509095 ATTCATCACCC-TTCCGCAGCTGTAGATCATTTCATTGTCATTGATGTAATCATAAAGG 100509153

Query 661     GCCACAACCTTTTTcAGCTCACTTGTGGAGACT-GTGCTGCTGCTGGCTCAGGCGGTAGT 719
          |||
Sbjct 100509154 GCCACAACCTTTTTcAGCTCACTTGTGGAGACTGGTGTGCTGCTGCTGGCTCAGGCGGTAGT 100509213

Query 720     GGCTTTTTcAGGATCTATGTAGT-AGGAGAAA--GTAGGAGGGTTGTCAAGATAC-A-G 774
          |||
Sbjct 100509214 GGCTTTTTcAAGATCTATGTAGTtAGGAGAAAAGGTAGGAGGGTTGTCAAGATACCAAG 100509273

Query 775     -ACTCTTCTTCTCTCC-AACTCTTGGCTTAC 807
          |||
Sbjct 100509274 CACTCTTCTTCTCTCCAACTCTCT-GGCTTAC 100509307
```

Figure :55



## Alignement Blast de l'exon8-9, patient n°6

### Exon 8-9 Le brin F

```
Query 70 AAACCCCTCCTACCTTTTCTCCTTGCTACATAGATCTTG-TGGTGCCACTACCGCCCTAG- 127
Sbjct 100509259 AAACCCCTCCTACCTTTTCTCCTAACTACATAGATCTTGAAAAAGCCACTACCGCCTGAGC 100509200

Query 128 AATGTGCAGCACCTGTCTCCACATGTGAGCTGAAGTTGATTGT--CCCATTATGATTACA 185
Sbjct 100509199 CAGCAGCAGCACCAAGTCTCCACAAGTGAAGTTGTTGGCCCTTTATGATTACA 100509140

Query 186 TGCCAATGA-TGCAAATGATCTACAGCTGCGGATGGGTGATGA-TATTTTATCTTGGAGG 243
Sbjct 100509139 TGCCAATGAATGCAAATGATCTACAGCTGCGGAAGGGTGAATATTTTATCTTGGAGG 100509080

Query 244 ATTGCAACTTACCATGGTGGTGAAGCAGAGATAAAAAATGGGTGAGTCCACACCAGCCCTT 303
Sbjct 100509079 AAAGCAACTTACCATGGTGGAGAGCAGAGATAAAAAATGGGTGAGTCCACACCAGCCCTT 100509020

Query 304 CCTGTGCCTGAGTGCCTGCCCACTCCCTACACGCAAAATAGTGTGCGGCATAATTCCCCT 363
Sbjct 100509019 CCTGAGCCTG-GTGCCTGCCCACTCCCTACACGCAAAAAGTGTGCGGCATAATTCCCCT 100508961

Query 364 GATCAGCATCCTCATCAGTGACTGTTCTTCCCACACCAGACTGAACATGCTCTCCCTCCA 423
Sbjct 100508960 GATCAGCATCCTCATCAGAGACTGTTCTTCCCACACCAGACTGAACATGCTCTCCCTCCA 100508901

Query 424 AGTACTTCCCAGCGTGCAGCTCCCTATACATGGGCTCTGCCACATCTCTGAGCCTCTGT 483
Sbjct 100508900 AGTACTTCCCAGCGTGCAGCTCCCTATACATGG-CCTCTGCCACATCTCTGAGCCTCTGT 100508842

Query 484 TGTTGGGGCACATATAACCAATGCAACATGTGCATAAAGCTCTGCACCTCACTGGGCTCAC 543
Sbjct 100508841 TGTTGGG-CACATATAACCAATGCAACATGTGCATAAAGCTCTGCACCTCACTGG-CTCAC 100508784

Query 544 TGGCCTAAACCATGGCATCAGTGACATGGATTGTCTTTTGAGGGAAGGGCATGATACATA 603
Sbjct 100508783 TG-CCTAA-CCAT-GCATCAGAGACATG-ATTGTCTTT-GAGGGAGGTGCATGATACATA 100508729

Query 604 TACCTCCATTTGAGATTTTGTCTGAAGCTCAGGGACGTGGGCATATGAAATCTGGTCT 663
Sbjct 100508728 TACCTCCATTTGAGATTT-GTTCTG-AGCTCAGGGACGTGGG-CATATGAA-TCTG-TCT 100508674

Query 664 CCTGGGTAGGTGGGGGTGAGTGGCTGGGATGAAACTGGCCACATTGGTTTCCCTTCACAG 723
Sbjct 100508673 CCTGG--AGGCTGGGGAG-GTG-CTGG-ATGAA-CTG-CCACATTG-TTTCC-TTCACAG 100508623

Query 724 GGCAGGGATGAGCTACATTTCTTAGTAACATATGTCAGTCAAAGCAGAAAGACTCCATAGA 783
Sbjct 100508622 G-CAGGAA-G-GCTACATT-CC-TAGTAACATATGTCAGTCAA-GCAGAAAGACTCCATAGA 100508569

Query 784 AATGTATGTGTAAGTATTGTTTATTGTCAGTCCACAATCTTC 825
Sbjct 100508568 AATGTATGAGTAAGTAT-GTTTA-TGTCAGTCCACAATCTTC 100508529
```

Figure : 61

### Exon 8-9

Le brin : Alignement impossible

Annexe 3 :

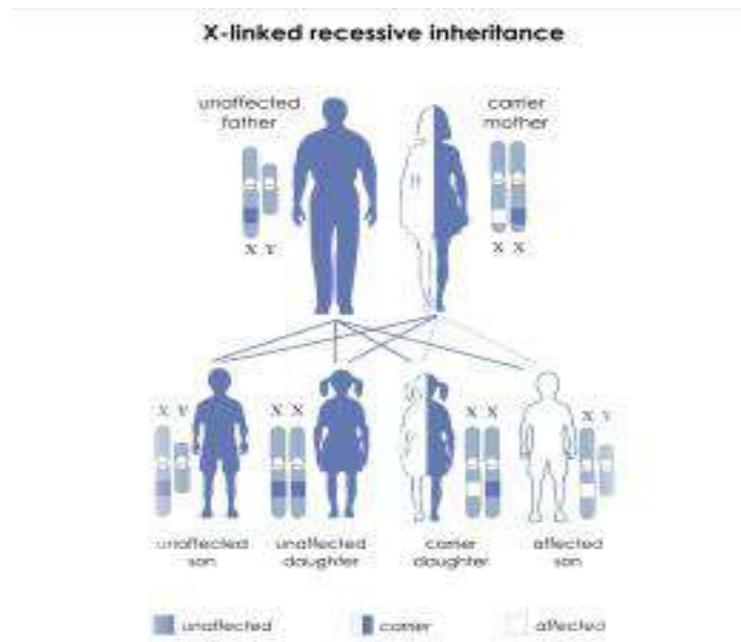
Tableau III. Valeurs normales des Immunoglobulines A, G, M en fonction de l'âge selon l'IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) [Bertrand & Baleyrier, 2010]

Age	IgG (g/L)					IgA (g/L)	IgM (g/L)
	IgG totaux	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4		
0 – 1 m	6.2 – 13	2.4-10.6	0.87-4.1	0.14-0.55	0.039-0.56	0.07 – 0.22	0.04 – 0.65
1-6 m	2.9-8.6	1.8-7.0	0.34-2.1	0.14-0.80	0.017-0.36	0.1- 0.62	0.25 – 0.85
6 m – 1 an	2.4 – 4.4	2.0-7.7	0.34-2.3	0.15-0.97	0.012-0.43	0.27 – 0.86	0.34 – 1.14
1 – 3 ans	3.4 – 6.2	2.5-9.0	0.38-2.8	0.14-1.20	0.011-1.06	0.33 – 1.22	0.48 – 1.43
3 – 9 ans	4.8 – 9.0	3.5-10.8	0.63-4.1	0.13-1.42	0.015-1.89	0.41 – 1.57	0.54 – 1.53
9 – 12 ans	6.2 – 11.5	4.0-11.5	0.98-4.8	0.15-1.49	0.030-2.10	0.5 – 1.7	0.55 – 1.55
12 – 18 ans	6.6 – 12.2	3.7-12.8	1.06-6.1	0.18-1.63	0.035-2.30	0.56 – 2.03	0.57 – 1.62
Adulte	6.6 -12.8	4.9-11.4	1.50-6.4	0.20-1.10	0.080-1.40	0.7 -3.4	0.5 -2.1

Tableau IV. Valeurs normales des sous-populations lymphocytaires ( $10^3/\mu\text{L}$ ) en fonction de l'âge [Shearer *et al.*, 2003]

Sous-population	0 - 3 mois	3 - 6 mois	6 -12 mois	1 - 2 ans	2 - 6 ans	6 - 12 ans	12-18 ans
GB	7.20-18.00	6.70-14.00	6.40-13.00	6.40-12.00	5.20-11.00	4.40-9.50	4.40 -8.10
Lymphocytes	3.40 -7.60	3.90 -9.00	3.40 -9.00	3.60 -8.90	2.30 -5.40	1.90-3.70	1.40 -3.30
LT CD3	2.50 -5.50	2.50 -5.60	1.90 -5.90	2.10 -6.20	1.40 -3.70	1.20-2.60	1.00 -2.20
LB CD19	0.30 -2.00	0.43 -3.00	0.61 -2.60	0.72 -2.60	0.39 -1.40	0.27-0.86	0.11 -0.57
NK CD16/56	0.17 -1.10	0.17 -0.83	0.16 -0.95	0.18 -0.92	0.13 -0.72	0.10-0.48	0.07 -0.48
LT CD4	1.60 -4.00	1.80 -4.00	1.40 -4.30	1.30 -3.40	0.70 -2.20	0.65-1.50	0.53 -1.30
LT CD8	0.56 -1.70	0.59- 1.60	0.50 -1.70	0.62- 2.00	0.49 -1.30	0.37-1.10	0.33 -0.92

Annexe 9 :



Arbre généalogique d'une maladie récessive portée sur le chromosome X

## **Annexe 4:**

### **Matériels labo :**

- Plaque à PCR 96 puits.
- Tube 15 ml pour extraction.
- Eppendorf.
- Colonnes.
- Micropipettes (P20, P100, P200, P1000) et pointes adaptées (embouts jaune, bleu...).
- Pipette pasteur.
- Pipette crémaillère.

### **Appareillage :**

- Centrifugeuse (à tubes, à Eppendorf, à plaque PCR).
- Bain-marie à 55°C ou 37°C.
- Réfrigérateur (+4°C, -20°C, - 80°C).
- L'appareil ABI 7500 (Applied Biosystems) couplé à un ordinateur.
- NanoDrop.
- Vortex.
- Thermocycleur
- Agitateur
- Séquenceur AppliedBiosystems3130®
- Ordinateur (traitement des données)

### **Solution:**

- Protéinase K
- Purlinkgenomiclysis/ binding buffer
- Ethanol
- Wash buffer1 et 2
- Elution buffer
- Taq polymérase
- Bleu de bromophénol
- Bromure d'éthidium
- Big-dye Terminator
- ExonucléaseI
- Sap
- Mixseq
- Formamide

## Annexe 6

Position(s)	Length	Description
<a href="#">11 – 11</a>	1	<a href="#">L → P in XLA.</a>
<a href="#">12 – 12</a>	1	<a href="#">K → R in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">14 – 14</a>	1	<a href="#">S → F in XLA.</a>
<a href="#">19 – 19</a>	1	<a href="#">K → E in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">25 – 25</a>	1	<a href="#">F → S in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">27 – 27</a>	1	<a href="#">K → R in XLA.</a>
<a href="#">28 – 28</a>	1	<a href="#">R → C in XLA; no effect on phosphorylation of GTF2I.</a>
<a href="#">28 – 28</a>	1	<a href="#">R → H in XLA; moderate. 3 Publications</a>
<a href="#">28 – 28</a>	1	<a href="#">R → P in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">33 – 33</a>	1	<a href="#">T → P in XLA; severe. 2 Publications</a>
<a href="#">39 – 39</a>	1	<a href="#">Y → S in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">40 – 40</a>	1	<a href="#">Y → C in XLA.</a>
<a href="#">40 – 40</a>	1	<a href="#">Y → N in XLA.</a>
<a href="#">61 – 61</a>	1	<a href="#">I → N in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">64 – 64</a>	1	<a href="#">V → D in XLA.</a>
<a href="#">64 – 64</a>	1	<a href="#">V → F in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">103 – 103</a>	1	<a href="#">Q → QSVFSSTR in XLA.</a>
<a href="#">113 – 113</a>	1	<a href="#">V → D in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">115 – 115</a>	1	<a href="#">S → F in XLA.</a>
<a href="#">117 – 117</a>	1	<a href="#">T → P in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">127 – 127</a>	1	<a href="#">Q → H in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">154 – 154</a>	1	<a href="#">C → S in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">155 – 155</a>	1	<a href="#">C → G in XLA.</a>
<a href="#">155 – 155</a>	1	<a href="#">C → R in XLA. 2 Publications</a>
<a href="#">184 – 184</a>	1	<a href="#">T → P in XLA.</a>
<a href="#">260 – 280</a>	21	<a href="#">Missing in XLA; severe. 1 Publication</a>
<a href="#">288 – 288</a>	1	<a href="#">R → Q in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">288 – 288</a>	1	<a href="#">R → W in XLA. 4 Publications</a>
<a href="#">295 – 295</a>	1	<a href="#">L → P in XLA. 2 Publications</a>
<a href="#">302 – 302</a>	1	<a href="#">G → E in XLA. 2 Publications</a>
<a href="#">302 – 302</a>	1	<a href="#">G → R in XLA.</a>
<a href="#">302 – 302</a>	1	<a href="#">Missing in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">307 – 307</a>	1	<a href="#">R → G in XLA; loss of activity. 1 Publication</a>
<a href="#">307 – 307</a>	1	<a href="#">R → T in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">308 – 308</a>	1	<a href="#">D → E in XLA.</a>
<a href="#">319 – 319</a>	1	<a href="#">V → A in XLA; moderate.</a>
<a href="#">334 – 334</a>	1	<a href="#">Y → S in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">358 – 358</a>	1	<a href="#">L → F in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">361 – 361</a>	1	<a href="#">Y → C in XLA; mild. 1 Publication</a> Corresponds to variant rs28935478 [ <a href="#">dbSNP</a>   <a href="#">Ensembl</a> ].
<a href="#">362 – 362</a>	1	<a href="#">H → Q in XLA.</a>

<a href="#">364 – 364</a>	1	<a href="#">H → P in XLA.</a>
<a href="#">365 – 365</a>	1	<a href="#">N → Y in XLA.</a>
<a href="#">366 – 366</a>	1	<a href="#">S → F in XLA.</a>
<a href="#">369 – 369</a>	1	<a href="#">L → F in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">370 – 370</a>	1	<a href="#">I → M in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">372 – 372</a>	1	<a href="#">R → G in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">408 – 408</a>	1	<a href="#">L → P in XLA; moderate. 1 Publication</a>
<a href="#">414 – 414</a>	1	<a href="#">G → R in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">418 – 418</a>	1	<a href="#">Y → H in XLA.</a>
<a href="#">429 – 429</a>	1	<a href="#">I → N in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">430 – 430</a>	1	<a href="#">K → E in XLA; loss of phosphorylation of GTF2I. 1 Publication</a>
<a href="#">430 – 430</a>	1	<a href="#">K → R in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">445 – 445</a>	1	<a href="#">E → D in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">462 – 462</a>	1	<a href="#">G → D in XLA.</a>
<a href="#">462 – 462</a>	1	<a href="#">G → V in XLA.</a>
<a href="#">476 – 476</a>	1	<a href="#">Y → D in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">477 – 477</a>	1	<a href="#">M → R in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">502 – 502</a>	1	<a href="#">C → F in XLA.</a>
<a href="#">502 – 502</a>	1	<a href="#">C → W in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">506 – 506</a>	1	<a href="#">C → R in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">506 – 506</a>	1	<a href="#">C → Y in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">508 – 508</a>	1	<a href="#">A → D in XLA.</a>
<a href="#">509 – 509</a>	1	<a href="#">M → I in XLA.</a>
<a href="#">509 – 509</a>	1	<a href="#">M → V in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">512 – 512</a>	1	<a href="#">L → P in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">512 – 512</a>	1	<a href="#">L → Q in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">518 – 518</a>	1	<a href="#">L → R in XLA.</a>
<a href="#">520 – 520</a>	1	<a href="#">R → Q in XLA; severe; prevents activation due to absence of contact between the catalytic loop and the regulatory phosphorylated residue. 4 Publications</a>
<a href="#">521 – 521</a>	1	<a href="#">D → G in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">521 – 521</a>	1	<a href="#">D → H in XLA; severe. 1 Publication</a>
<a href="#">521 – 521</a>	1	<a href="#">D → N in XLA; severe.</a>
<a href="#">523 – 523</a>	1	<a href="#">A → E in XLA.</a>
<a href="#">525 – 525</a>	1	<a href="#">R → G in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">525 – 525</a>	1	<a href="#">R → P in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">525 – 525</a>	1	<a href="#">R → Q in XLA; severe; disturbs ATP-binding. 2 Publications</a>
<a href="#">526 – 526</a>	1	<a href="#">N → K in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">535 – 535</a>	1	<a href="#">V → F in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">542 – 542</a>	1	<a href="#">L → P in XLA; growth hormone deficiency. 1 Publication</a>
<a href="#">544 – 544</a>	1	<a href="#">R → G in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">544 – 544</a>	1	<a href="#">R → K in XLA. 1 Publication</a>

<a href="#">559 – 559</a>	1 <a href="#">F → S in XLA. 1 Publication</a>
	<a href="#">R → P in XLA. 2 Publications</a>
<a href="#">562 – 562</a>	1 <a href="#">Corresponds to variant rs28935176 [ dbSNP   Ensembl].</a>
<a href="#">562 – 562</a>	1 <a href="#">R → W in XLA. 4 Publications</a>
<a href="#">563 – 563</a>	1 <a href="#">W → L in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">567 – 567</a>	1 <a href="#">E → K in XLA; severe. 1 Publication</a>
<a href="#">578 – 578</a>	1 <a href="#">S → Y in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">581 – 581</a>	1 <a href="#">W → R in XLA.</a>
<a href="#">582 – 582</a>	1 <a href="#">A → V in XLA. 2 Publications</a>
<a href="#">583 – 583</a>	1 <a href="#">F → S in XLA.</a>
<a href="#">587 – 587</a>	1 <a href="#">M → L in XLA; mild. 1 Publication</a>
<a href="#">589 – 589</a>	1 <a href="#">E → D in XLA.</a>
<a href="#">589 – 589</a>	1 <a href="#">E → G in XLA; moderate; interferes with substrate binding. 2 Publications</a>
<a href="#">589 – 589</a>	1 <a href="#">E → K in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">592 – 592</a>	1 <a href="#">S → P in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">594 – 594</a>	1 <a href="#">G → E in XLA; mild; interferes with substrate binding. 2 Publications</a>
<a href="#">594 – 594</a>	1 <a href="#">G → R in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">598 – 598</a>	1 <a href="#">Y → C in XLA.</a>
<a href="#">607 – 607</a>	1 <a href="#">A → D in XLA; mild. 1 Publication</a>
<a href="#">613 – 613</a>	1 <a href="#">G → D in XLA; mild; interferes with substrate binding and/or domain interactions. 2 Publications</a>
<a href="#">619 – 619</a>	1 <a href="#">P → A in XLA.</a>
<a href="#">619 – 619</a>	1 <a href="#">P → S in XLA.</a>
<a href="#">619 – 619</a>	1 <a href="#">P → T in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">622 – 622</a>	1 <a href="#">A → P in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">626 – 626</a>	1 <a href="#">V → G in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">630 – 630</a>	1 <a href="#">M → K in XLA. 2 Publications</a>
<a href="#">630 – 630</a>	1 <a href="#">M → T in XLA.</a>
<a href="#">633 – 633</a>	1 <a href="#">C → Y in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">641 – 641</a>	1 <a href="#">R → C in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">641 – 641</a>	1 <a href="#">R → H in XLA; severe. 2 Publications</a>
<a href="#">644 – 644</a>	1 <a href="#">F → L in XLA.</a>
<a href="#">644 – 644</a>	1 <a href="#">F → S in XLA. 1 Publication</a>
<a href="#">647 – 647</a>	1 <a href="#">L → P in XLA.</a>
<a href="#">652 – 652</a>	1 <a href="#">L → P in XLA. 1 Publication</a>

*Références  
bibliographiques*

Annexe7

## BTK Exon1

AAGACATTGGTTTAGGTCAGGAa  
gcaaaaaaaggg**aactgagtggctgtga**  
**aagggtggggtttgctcagactgtccttcc**  
**tctctggactgtaagaatatgtctccaggg**  
**ccagtgtctgctgcgatcgagtcccaccttc**  
**caagtcctggcatctcaatgcatctgggaa**  
**gctacctgcattaagtcaggactgaggtg**  
ggtctgggggtatggcaggggctgggacagc  
agcagcaatgtaccttgcttgggacccta  
aaaACCAGAGAGACAGCATGGCT

## Annexe 8

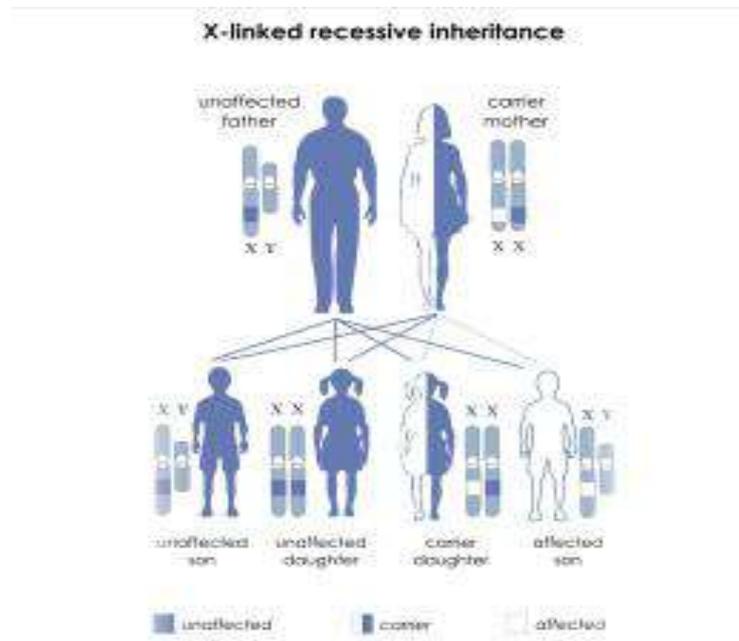
### **BTK EXON 8-9**

F:GTAAGCCAGAGAGTTGGGAGA (T°58.5°C)

R:AGAGAGAGTTCCTCCTGGAAG (T°56.8°C)

GTAAGCCAGAGAGTTGGGAGAgagagaagagtgcttggtatc  
ttgacaaaccctcctaccttttctcctaactacatag**atcttg**  
**aaaagccactaccgctgagccagcagcaccagtctcca**  
**caagtgagctgaaaaaggttgtggccctttatgattacatgcc**  
**aatgaatgcaaatgatctacagctgcggaagggtgatgaatat**  
**tttatcttggaggaaagcaactaccatggtggagagcacgag**  
**ataaaaatgg**gtgagtccacaccagcccttctgagcctgggtg  
cctgcccactccctacacgcaaaaagtgctgcggcataattcc  
cgtgatcagcatcctcatcagagactgttcttcccacaccaga  
ctgaacatgctctcctccaagtacttcccagcgtgcagctcc  
ctatacatggcctctgccacatctctgagcctctgttggtggg  
cacatataaccaatgcaacatgtgcataagctctgcacctcac  
tggctcactgcctaaccatgcatcagagacatgattgtctttg  
agggaggtgcatgatacatatacctccatttgagatttgttct  
gagctcagggacgtgggcatatgaatctgtctcctggaggctg  
gggaggtgctggatgaactgccacattgtttccttcacag**gca**  
**ggaaggctacattcctagtaactatgtcactgaagcagaagac**  
**tccatagaaatgtatga**gtaagtatgtttatgtcagtcacaa  
tCTTCCAGGAGGAACTCTCTCT

## Annexe 9



Arbre généalogique d'une maladie récessive portée sur le chromosome X

## Références bibliographiques :

### A

ABBAS AK, LICHTMAN AH, PILLAI S. (2012). Cellular and molecular immunology. Elsevier/Saunders, Philadelphia.

Al-Herz Waleed, Aziz Bousfiha, Jean-Laurent Casanova, Talal Chatila, Mary Ellen Conley, Charlotte Cunningham-Rundles, Amos Etzioni, Jose Luis Franco, H. Bobby Gaspar, Steven M. Holland, Christoph Klein, Shigeaki Nonoyama, Hans D. Ochs, Erik Oksenhendler, Capucine Picard, Jennifer M. Puck, Kate Sullivan, and Mimi L. K. Tang (2014). Primary Immunodeficiency Diseases: An Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency. *Frontiers in immunology* | Volume 5 | Article 162 | 1

Alain Fischer. (2005). Agammaglobulinémie liée à l'X. Inserm.

Alsaleh Ghada, Suffert G, Semaan N, Juncker T, Frenzel L, Gottenberg JE, Sibilia J, Pfeffer S, Wachsmann D.(2009). Bruton's tyrosine kinase is involved in miR-346-related regulation of IL-18 release by lipopolysaccharide-activated rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *J Immunol.* 182(8): 5088-97.

### B

Bajpai, U.D., Zhang, K., Teutsch, M., Sen, R., Wortis, H.H., (2000). Bruton's tyrosine kinase links the B cell receptor to nuclear factor kappaB activation. *J. Exp. Med.* 191, 1735-1744.

Basile, N., Danielian, S., Oleastro, M., Rosenzweig, S., Prieto, E., Rossi, J., Roy, A., Zelazko, M. (2009) Clinical and molecular analysis of 49 patients with X-linked agammaglobulinemia from a single center in Argentina. *J. Clin. Immunol.* **29**, 123–129.

Benallegue A, Kedji F, (1984), Consanguinity and public health. Algerian Study. *Arch Fr Pediatr*, 41: 435-440

BONDADA S, CHELVARAJAN RL, GURURAJAN M. (2013). B Lymphocytes. eLS. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.

Bruton, O. C. (1952) Agammaglobulinemia. *Pediatrics* **9**, 722–728. Cooper, M. D., Lawton, A. R. (1972) Circulating B-cells in patients with immunodeficiency. *Am. J. Pathol.* **69**, 513–528.

BUTLER John M. Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology. Academic Press; 2011, pp 15-192

## C

Chun, J. K., Lee, T. J., Song, J. W., Linton, J. A., Kim, D. S. (2008) Analysis of clinical presentations of Bruton disease: a review of 20 years of accumulated data from pediatric patients at Severance Hospital. *Yonsei Med. J.* **49**, 28–36.

COQUOZ Raphaël et TARONI Franco. Preuve par l'ADN : la génétique au service de la justice. 2eme ed. France : PPUR presses polytechniques, **2006**, pp 11-89.

Conley ME, Minegishi Y, Rohrer J. (1999). Recent progress in the diagnosis and treatment of patients with defects in early B-cell development. *Curr Opin Pediatr.* 11(6): 528-32.

Conley Mary Ellen, (2003). Genes required for B cell development, *The Journal of Clinical Investigation* . 2003 Dec 1; 112(11): 1636–1638.

Cunningham-Rundles C, Hernandez-Trujillo VP<sup>1</sup>, Scalchunes C, Ochs HD, Bonilla FA, Paris K, Yel L, Sullivan KE. (2011). Autoimmunity and inflammation in X-linked agammaglobulinemia. *J Clin Immunol.* 34(6): 627-32.

## E

Ellmeier, W., Jung, S., Sunshine, M.J., Hatam, F., Xu, Y., Baltimore, D., Mano, H., Littman, D.R., (2000). Sever B cell deficiency in mice lacking the tec kinase family members tec and Btk. *J. Exp. Med.* 192, 1611-1624.

## F

Farrar JE, Rohrer J, Conley ME. (1996). Neutropenia in X-linked agammaglobulinemia. *Clin Immunol Immunopathol.* 81(3): 271-6.

Fleisher TA, White RM, Broder S, Nissley SP, Blaese RM, Mulvihill JJ, Olive G, Waldmann TA. (1980). X-linked hypogammaglobulinemia and isolated growth hormone deficiency. *N Engl J Med.* 302(26):1429-34.

## G

GARIBYAN Lilit et AVASHIA Nidhi . Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology* **2013**; pp 133

Geneviève de Saint Basile Alain Fischer. (1992). Un modèle d'étude de la différenciation lymphocytaire : les déficits immunitaires héréditaires liés au chromosome X. *médecine/sciences.* 8 : 562- 71

## H

Holinski-Feder E, Weiss M, Brandau O, Jedele KB, Nore B, Backesjö CM, Vihinen M, Hubbard SR, Belohradsky BH, Smith CIE, Meindl A. (1998). Mutation screening of the BTK gene in 56 families with X-linked agammaglobulinemia (XLA): 47 unique mutations without correlation to clinical course. *Pediatrics* 101:276–284.

Hyvonen, M., Saraste, M. (1997) Structure of the PH domain and Btk motif from Bruton's tyrosine kinase: molecular explanations for X-linked agammaglobulinaemia. *EMBO J.* **16**, 3396–3404.

## I

IGLESIAS Miriam sous la supervision du Dr Raphaël Coquoz. (2009). Ajout d'un contrôle d'inhibition dans des kits STR multiplex .Laboratoire AURIGEN, Lausanne.

## J

Jefferies, C. A., Doyle, S., Brunner, C., Dunne, A., Brint, E., Wietek, C., Walch, E., Wirth, T., O'Neill, L. A. (2003) Bruton's tyrosine kinase is a Toll/interleukin-1 receptor domain-binding protein that participates in nuclear factor kappaB activation by Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.* **278**, 26258–26264.

Jongstra-Bilen, J., Puig Cano, A., Hasija, M., Xiao, H., Smith, C.I.E., Cybulsky, M.I., (2008). Dual functions of Bruton's tyrosine kinase and Tec kinase during Fcγ receptor-induced signaling and phagocytosis. *J. Immunol.* 181, 288-298.

## L

Lindvall, J. M., Blomberg, K. E., Valiaho, J., Vargas, L., Heinonen, J. E., Berglof, A., Mohamed, A. J., Nore, B. F., Vihinen, M., Smith, C. I. (2005) Bruton's tyrosine kinase: cell biology, sequence conservation, mutation spectrum, siRNA modifications, and expression profiling. *Immunol. Rev.* **203**, 200–215.

López-Herrera Gabriela, Alexander Vargas-Hernández, Maria Edith González-Serrano, Laura Berrón-Ruiz, Juan Carlos Rodríguez-Alba, Francisco Espinosa-Rosales, and Leopoldo Santos-Argumedo. (2014). Bruton's tyrosine kinase—an integral protein of B cell development that also has an essential role in the innate immune system. *Journal of Leukocyte Biology. Volume 95*.

## M

Maeda, A., Scharenberg, A.M., Tsukada, S., Bolen, J.B., Kinet, J.P., Kurosaki, T., (1999). Paired immunoglobulin-like receptor B (PIR-B) inhibits BCR- induced activation of Syk and Btk by SHP-1. *Oncogene* 18, 2291-2297.

Mahajan, S., Vassilev, A., Sun, N., Ozer, Z., Mao, C., Uckun, F.M., (2001). Transcription factor STAT5A is a substrate of Bruton's tyrosine kinase in B cells. *J. Biol. Chem.* 276, 31216- 31228.

Mata, J., Marguerat, S., Bahler, J. (2005). Post-transcriptional control of gene expression : a genomewide perspective. *Trends Biochem. Sci.* 30, 506-514.

Mohamed, A. J., Yu, L., Backesjo, C. M., Vargas, L., Faryal, R., Aints, A., Christensson, B., Berglof, A., Vihinen, M., Nore, B. F., Smith, C. I. (2009) Bruton's tyrosine kinase (Btk): function, regulation, and transformation with special emphasis on the PH domain. *Immunol. Rev.* 228, 58–73.

Mullis KB, Ferra F, Gibbs RA, (1994). The Polymerase Chain Reaction. Birkhauser Press

## O

Ortutay C, Valiaho J, Stenberg K, Vihinen M. (2005). KinMutBase: a registry of disease-causing mutations in protein kinase domains. *Hum Mutat* 25:435–442.

## P

Park, H., Wahl, M.I., Afar, D.E., Turck, C.W., Rawlings, D.J., Tam, C., Scharenberg, A.M., Kinet, J.P., Witte, O.N., (1996). Regulation of Btk function by a major autophosphorylation site within the SH3 domain. *Immunity* 4, 515-525.

Petro, J.B., Rahman, S.M., Ballard, D.W., Khan, W.N., (2000). Bruton's tyrosine kinase is required for activation of IkappaB kinase and nuclear factor kappaB in response to B cell receptor engagement. *J. Exp. Med.* 191, 1745-1754.

Piirila H, Väliäho J, Vihinen M. (2006). Immunodeficiency mutation databases (IDbases). *Human Mutation.* *Hum Mutat* 27:1200–1208.

Plebani, A., Soresina, A., Rondelli, R., Amato, G. M., Azzari, C., Cardinale, F., Cazzola, G., Consolini, R., De Mattia, D., Dell'Erba, G., Duse, M., Fiorini, M., Martino, S., Martire, B., Masi, M., Monafo, V., Moschese, V., Notarangelo, L. D., Orlandi, P., Panei, P., Pession, A., Pietrogrande, M. C., Pignata, C., Quinti, I., Ragno, V., Rossi, P., Sciotto, A., Stabile, A. (2002) Clinical, immunological, and molecular analysis in a large cohort of patients with X-linked agammaglobulinemia: an Italian multicenter study. *Clin. Immunol.* 104, 221–230.

## R

Rawlings, D. J., Saffran, D. C., Tsukada, S., Largaespada, D. A., Grimaldi, J. C., Cohen, L., Mohr, R. N., Bazan, J. F., Howard, M., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Witte, O. N. (1993) Mutation of unique region of Bruton's tyrosine kinase in immunodeficient XID mice. *Science* 261, 358–361.

RAVEN Peter H. , GEORGES B. Johnson, KENNETH A. Mason, JONATHAN B. Losos et SUSAN S. Singer. *Biologie*. **2010**, pp 275-359

## S

Salavoura K, Kolialexi A, Tsangaris G, Mavrou A. (2008). Development of cancer in patients with primary immunodeficiencies. *Anticancer Res.* 28(2B):1263-9.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> edition, New York, Cold Spring Harbor Laboratory.

Satterthwaite, A. B., Willis, F., Kanchanastit, P., Fruman, D., Cantley, L.C., Helgason, C.D., Humphries, R.K., Lowell, C.A., Simon, M., Leitges, M., Tarakhovsky, A., Tedder, T.F., Lesche, R., Wu, H., Witte, O.N., (2000). A sensitized genetic system for the analysis of murine B lymphocyte signal transduction pathways dependent on Bruton's tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 6687-6692.

Sawada Akihisa, Yoshihiro Takihara, Ji Yoo Kim, Yoshiko Matsuda-Hashii, Sadao Tokimasa, Hiroyuki Fujisaki, Keiko Kubota, Hiroko Endo, Takashi Onodera, Hideaki Ohta, Keiichi Ozono, and Junichi Hara. (2003). A congenital mutation of the novel gene *LRRC8* causes agammaglobulinemia in humans. *J Clin Invest.* 112(11): 1707–1713.

Shinohara, M., Koga, T., Okamoto, K., Sakaguchi, S., Arai, K., Yasuda, H., Takai, T., Kodama, T., Morio, T., Geha, R. S., Kitamura, D., Kurosaki, T., Ellmeier, W., Takayanagi, H. (2008) Tyrosine kinases Btk and Tec regulate osteoclast differentiation by linking RANK and ITAM signals. *Cell* **132**, 794–806.

Sideras, P., Muller, S., Shiels, H., Jin, H., Khan, W.N., Nilsson, L., Parkinson, E., Thomas, J.D., Branden, L., Larsson, I., (1994). Genomic organization of mouse and human Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase (Btk) loci. *J. Immunol.* 153, 5607-5617.

Smith CI, Baskin B, Humire-Greiff P, Zhou JN, Olsson PG, Maniar HS, Kjellén P, Lambris JD, Christensson B, Hammarström L, et al. (1994) Expression of Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase gene, BTK, is selectively down-regulated in T lymphocytes and plasma cells. *J Immunol.* 152(2): 557-65.

## T

Takada Hidetoshi, Hirokazu Kanegane, Akihiko Nomura, Ken Yamamoto, Kenji Ihara, Yasuhiko Takahashi, Satoshi Tsukada, Toshio Miyawaki, and Toshiro Hara. (2004). Female agammaglobulinemia due to the Bruton tyrosine kinase deficiency caused by extremely skewed X-chromosome inactivation. *BLOOD*, 1 JANUARY 2004. VOLUME 103, NUMBER 1

Thomas, J. D., Sideras, P., Smith, C. I., Vorechovsky, I., Chapman, V., Paul, W. E. (1993). Colocalization of X-linked agammaglobulinemia and X-linked immunodeficiency genes. *Science* 261: 355-358.

Tsukada, S., Saffran, D. C., Rawlings, D. J., Parolini, O., Allen, R. C., Klisak, I., Sparkes, R. S., Kubagawa, H., Mohandas, T., Quan, S., Belmont, J. W., Cooper, M. D., Conley, M. E., Witte, O. N. (1993) Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell* 72, 279–290.

## U

Usui, K., Sasahara, Y., Tazawa, R., Hagiwara, K., Tsukada, S., Miyawaki, T., Tsuchiya, S., Nukiwa, T. (2001) Recurrent pneumonia with mild hypogammaglobulinemia diagnosed as X-linked agammaglobulinemia in adults. *Respir. Res.* 2, 188–192.

## V

Väliäho, J., Smith, C. I., Vihinen, M. (2006) BTKbase: the mutation database for X-linked agammaglobulinemia. *Human Mutat.* 27, 1209–1217.

Vetrie, D., Vorechovsky, I., Sideras, P., Holland, J., Davies, A., Flinter, F., Hammarstrom, L., Kinnon, C., Levinsky, R., Bobrow, M., Smith, C. I., Bentley, D. R. (1993) The gene involved in X-linked agammaglobulinaemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases. *Nature* 361, 226–233.

## W

Wang Z, Moulton J. (2001). SNPs, protein structure, and disease. *Hum Mutat* 17:263–270.

Winkelstein, J. A., Marino, M. C., Lederman, H. M., Jones, S. M., Sullivan, K., Burks, A. W., Conley, M. E., Cunningham-Rundles, C., Ochs, H. D. (2006) X-Linked agammaglobulinemia: report on a United States registry of 201 patients. *Medicine* 85, 193–202.

## Y

Yue P, Li Z, Moulton J. (2005). Loss of protein structure stability as a major causative factor in monogenic disease. *J Mol Biol* 353: 459–473.

## **Sites internet consultés :**

<http://atlasgeneticsoncology.org/>

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

<http://bioinf.uta.fi/>

<http://bioinf.uta.fi/BTKbase/>

[http://www.germaco.net/RettMecp2mutations2\\_fr.html](http://www.germaco.net/RettMecp2mutations2_fr.html) II

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosystems/197731>

<http://www.weballergies.com/bases/spip.php?article69>

<http://www.larecherche.fr/savoirs/dossier/2-chromosome-x-maitre-du-silence-01-04-2005-88187>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/view/?q=BTK#>

[http://pfam.xfam.org/protein/BTK\\_HUMAN#tabview=tab2](http://pfam.xfam.org/protein/BTK_HUMAN#tabview=tab2)

<http://www.microbiologybook.org/French-immuno/immchapter11.htm>

[https://grenada.lumc.nl/LOVD2/MR/home.php?select\\_db=BTK](https://grenada.lumc.nl/LOVD2/MR/home.php?select_db=BTK)

## **Sites internet consultés :**

<http://bioinf.uta.fi/>

<http://bioinf.uta.fi/BTKbase/>

[http://www.germaco.net/RettMecp2mutations2\\_fr.html](http://www.germaco.net/RettMecp2mutations2_fr.html) II

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosystems/197731>

<http://www.weballergies.com/bases/spip.php?article69>