

Les mutations de la mucoviscidose : du génotype au phénotype

Plus de quatre cents mutations ont été décrites dans le gène CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), responsables de la mucoviscidose ou fibrose kystique du pancréas. La caractérisation de ces diverses mutations du gène a permis une meilleure compréhension des relations structure/activité de la protéine CFTR. Certains traits cliniques de la maladie, telle la suffisance pancréatique, sont génétiquement déterminés. La compréhension de ces anomalies moléculaires laisse entrevoir des stratégies thérapeutiques différentes selon le type de mutation observée chez le patient.

Claude Férec
Bernard Mercier
Marie-Pierre Audrézet

La mucoviscidose ou fibrose kystique du pancréas est aujourd'hui l'un des paradigmes de la génétique moléculaire. Illustration exemplaire de la puissance des technologies d'analyse de l'ADN puisque, dès 1985, le gène était localisé sur le bras long du chromosome 7 en 7 q3.1 par une approche de génétique inverse appelée aujourd'hui clonage par positionnement (*m/s n° 6, vol. 3, p. 369, [1]*). Après quatre ans de marches et de sauts successifs dans cette région du chromosome 7, le gène CFTR était cloné et séquencé en septembre 1989 par les équipes de Tsui, Collins et Riordan ([2-4], *m/s n° 8, vol. 5, p. 589*). La réussite, en 1992, de l'inactivation du gène CFTR chez la souris a permis de développer un modèle animal inexistant préalable-

ment (*m/s n° 7, vol. 8, p. 653, [5]*). Dans le même temps étaient créés de nouveaux vecteurs viraux [6] pour le transfert de gène qui allaient conduire au cours de ces derniers mois aux premiers essais de thérapie génique chez l'homme à l'aide d'adénovirus recombinants. C'est dire le chemin parcouru depuis que le gène responsable a été cloné et séquencé en 1989. Ce gène, composé de 27 exons, s'étend sur 230 000 pb et code pour une protéine de 1 480 acides aminés appelée CFTR pour *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*. Dès sa découverte, une délétion de trois paires de bases située dans l'exon 10 fut mise en évidence, délétion correspondant dans la protéine mutée à la perte d'une phénylalanine en position 508 ($\Delta F508$). Aujourd'hui, la connaissance des

ADRESSE

C. Férec : docteur en médecine, docteur ès sciences, directeur du centre de biogénétique, CDTS Brest. B. Mercier : docteur ès sciences, centre de biogénétique, CDTS Brest. M.P. Audrézet : doctorante, centre de biogénétique, CDTS Brest. Centre de biogénétique, CDTS, 46, rue Félix-Le-Dantec, 29275 Brest Cedex, France.

RÉFÉRENCES

1. Tsui LC, Buchwald M, Barker D, *et al.* Cystic fibrosis locus defined by a genetically polymorphic DNA marker. *Science* 1985; 230: 1054-7.
2. Kerem BS, Rommens JM, Buchanan JA, *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989; 245: 1073-80.
3. Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245: 1066-73.
4. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem BS, *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989; 245: 1059-64.
5. Dorin JR, Dickinson P, Alton EFWF, Smith SN, Geddes DM, Stevenson BJ, Kimber WL, Fleming S, Clarke AR, Hooper ML, Anderson L, Beddington RSP, Porteous DJ. Cystic fibrosis in the mouse by targeted insertional mutagenesis. *Nature* 1992; 359: 211-5.
6. Rosenfeld MA, *et al.* *In vivo* transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium. *Cell* 1992; 68: 143-55.
7. Tsui LC. Mutations and sequence variations detected in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene: a report from the Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. *Human Mutation* 1992; 1: 197-203.
8. Worldwide survey of the delta F508 mutation report from the Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. *Am J Hum Genet* 1990; 47: 354-9.
9. Serre JL, Simon-Bouy B, Mornet E, Jaume-Roig B, Balassopoulou A, Schwartz M, Taillandier A, Boué J, Boué A. Studies of RFLP closely linked to the cystic fibrosis locus throughout Europe lead to new considerations in population genetics. *Hum Genet* 1990; 84: 449-54.
10. EWCG: gradient of distribution in Europe of the major CF mutation and of its associated haplotype. *Hum Genet* 1990; 85: 436-46.

anomalies moléculaires du gène *CFTR* s'est enrichie de façon inattendue et spectaculaire puisque plus de quatre cents mutations ont été décrites en quatre ans (*Cystic fibrosis genetic analysis consortium*, communication personnelle). De l'apparente complexité de cette pathologie moléculaire, il est possible de dégager des enseignements concernant: (1) la distribution des mutations dans le gène *CFTR*, (2) la nature des anomalies moléculaires, (3) les relations génotype/phénotype chez les patients atteints de mucoviscidose, (4) les applications diagnostiques apportées par la connaissance des mutations du gène.

Spectre de distribution des mutations dans le gène CFTR

Plus de 20 000 chromosomes CF (provenant de patients atteints de mucoviscidose) ont été analysés par la centaine de laboratoires réunis au sein d'un Consortium international d'étude des mutations du gène coordonné par Lap Chee Tsui à Toronto. La mutation $\Delta F508$ a été retrouvée associée globalement à 68 % de ces chromosomes [7]. Cette valeur moyenne recouvre des disparités importantes de répartition liées à l'origine ethnique et géographique des patients (*m/s n° 1, vol. 8, p. 86*). Ainsi, la mutation $\Delta F508$ est-elle associée à 88 % des chromosomes mutés au Danemark et à 30 % seulement en Turquie [8]. Cette mutation $\Delta F508$ est présente presque exclusivement au sein de la population blanche d'origine européenne, ce qui explique pour une grande part l'incidence élevée de la maladie, proche de 1 sur 2 500, chez les Européens et leurs descendants aux États-Unis et au Canada. Il avait été montré, peu de temps après la découverte du gène, qu'il existait en Europe un gradient Nord Ouest/Sud Est dans la distribution de la mutation $\Delta F508$. Un groupe de travail européen consacré à la génétique de la mucoviscidose avait émis l'hypothèse, pour expliquer cette distribution, que la mutation $\Delta F508$ se serait disséminée en Europe au cours des migrations néolithiques de fermiers venus de l'est

et du centre du continent [9, 10]. En fait, les études du gène réalisées chez les Basques — la plus vieille population européenne qui s'est établie au Paléolithique — montrent sans ambiguïté que la mutation $\Delta F508$ était déjà présente dans cette population. Cela vient d'être confirmé par un travail européen mené à l'initiative du groupe d'Estivill à Barcelone (Espagne) [11]. L'étude des marqueurs intra-géniques très polymorphes de type microsatellite a permis d'étudier la distribution des haplotypes associés à la mutation $\Delta F508$ au travers d'un échantillon significatif de 1 738 chromosomes provenant de quinze régions européennes. Les résultats obtenus confirment l'hypothèse précédemment avancée d'un chromosome ancestral portant la mutation $\Delta F508$ [12]. Ce travail permet de situer à une période de 65 000 à 200 000 ans l'apparition probable de la mutation $\Delta F508$ [13]. Aujourd'hui, la distribution observée de cette mutation serait le reflet des vagues successives de peuplement ayant contribué à la constitution des différentes populations de l'Europe actuelle.

La fréquence de la mutation $\Delta F508$ est de 70 % en France [14]; cette valeur moyenne masque des variations importantes allant de 81 % en Bretagne occidentale, à 64 % en Languedoc-Roussillon ou 65 % en Normandie [15-17].

Parmi les quatre cents mutations rapportées au travers du Consortium international, seul un petit nombre dépasse le seuil de 1 % dans les différentes populations de patients étudiés. Il s'agit des mutations G542X (3.4 %), G551D (2.4 %), W1282X (2.1 %), N1303K (1.8 %), R553X (1.3 %), 621 + 1 G \rightarrow T (1.3 %), 1717-1 G \rightarrow A (1.1 %) (*Cystic fibrosis genetic analysis consortium*, communication personnelle). Il est important de souligner que le spectre de distribution des mutations du gène *CFTR* est réalisé à partir de la compilation de données obtenues par les cent laboratoires du Consortium et ne reflète en aucun cas leur distribution géographique [18].

Ces mutations peu fréquentes du gène *CFTR* sont le reflet de l'origine ethnique des patients. La fréquence de la mutation G551D est d'envi-

ron 5 % dans les populations d'origine celte (Irlande, Écosse, Bretagne, centre de l'Europe, Tchécoslovaquie) [19]. La mutation G542X est relativement fréquente dans les pays du pourtour méditerranéen [20], la mutation W1282X est associée à 60 % des chromosomes CF dans la population juive ashkénaze [21]. Quelques équipes ont pu mener à bien l'étude complète des 27 exons du gène et de leur région flanquante (jonction intron/exon). Ainsi, en Bretagne, dix-neuf mutations différentes rendent compte de

98 % des mutations du gène, des résultats comparables ont été retrouvés au Québec et au Pays de Galles [15, 22, 23]. A l'inverse, dans les grandes métropoles où le brassage des populations a été plus important, l'analyse exhaustive des régions codantes du gène a permis d'identifier 88 % des anomalies moléculaires à Paris [24] et 91 % à Montpellier [25]. La *figure 1* illustre cette diversité dans la distribution des fréquences des cinq principales mutations de quelques régions françaises. En Europe centrale, il existe assez

peu d'études systématiques des mutations du gène *CFTR*; nous avons récemment étudié des séries de patients originaires de Slovénie et de Bulgarie [26, 27] et montré qu'il n'existait pas d'effet fondateur particulier dans ces pays. L'étude complète du gène a permis d'identifier 84 % des mutations en Slovénie et 90 % en Bulgarie.

La situation reste particulière au sud de l'Europe; ainsi, en Espagne et en Italie, 30 % des mutations sont non identifiées et très probablement situées en dehors de la séquence codante du gène.

Nature des anomalies moléculaires du gène

Le gène *CFTR* code pour une protéine transmembranaire qui est un canal chlore dont l'activité est réglée par l'ATP cytosolique et par des phosphorylations. Les deux sites de fixation de l'ATP (NBF pour *nucleotide binding fold*) jouent un rôle fondamental en interagissant directement avec l'ATP pour l'ouverture du canal. Le domaine R (*regulatory domain*) présente 4 sérines qui sont phosphorylées *in vivo* après activation de la protéine kinase A (PKA) [28]. Il semble que le domaine R inhibe le passage des ions au travers du canal lorsqu'il est non phosphorylé, et que deux étapes soient nécessaires pour le bon fonctionnement du canal chlore. La première étape implique la phosphorylation du domaine R après stimulation de la PKA par l'AMPc; au cours de la seconde étape, cette forme phosphorylée du CFTR se lie à l'ATP et une modification conformationnelle de la protéine intervient, favorisant le passage passif des ions chlorures. Les ions chlorures traversent la membrane selon un gradient électrochimique. Ce n'est là qu'un modèle, proposé aujourd'hui, mais rendant assez bien compte des faits expérimentaux (*m/s n° 8, vol. 5, p. 872, [29, 30]*) (*figure 2*).

Le gène *CFTR* est le siège de nombreuses mutations ponctuelles ou de très courtes insertions-délétions. Les grandes délétions sont, en revanche, peu fréquentes; seules quelques descriptions de chromosomes portant

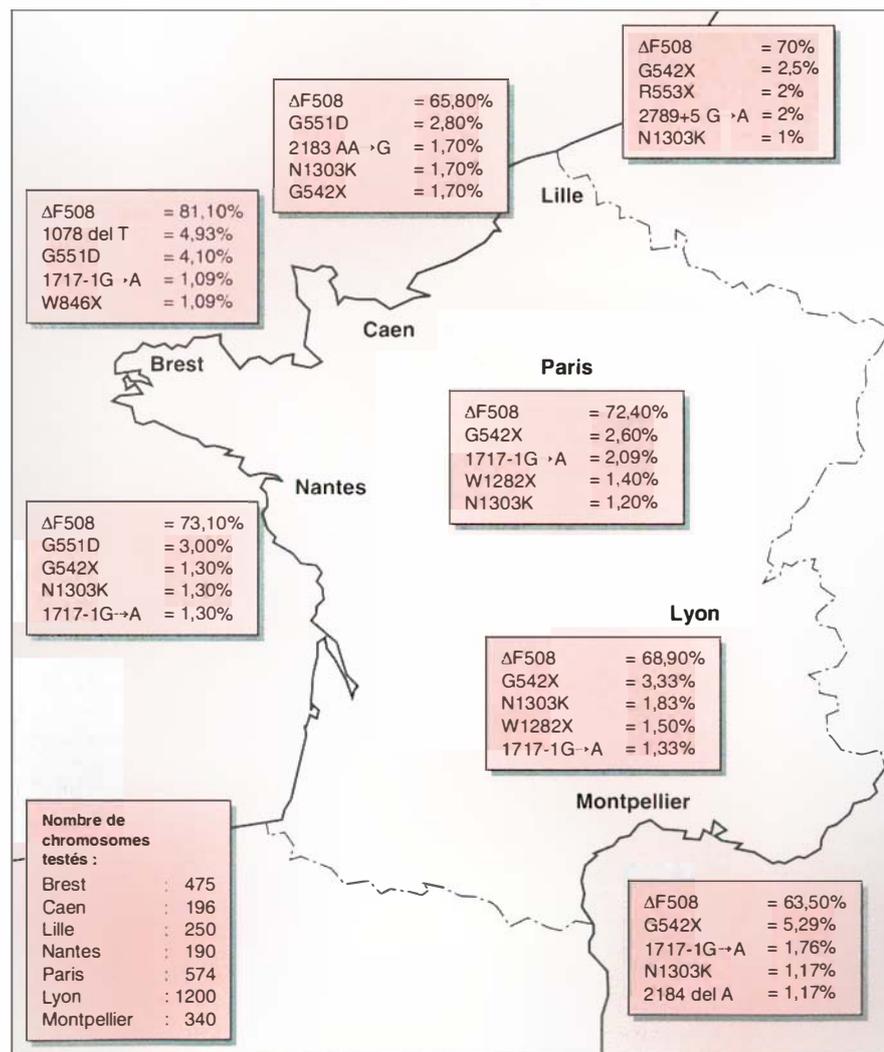


Figure 1. Diversité dans la distribution des fréquences des principales mutations de quelques régions françaises. Les acides aminés sont dénommés par le code à une lettre: A: Ala; C: Cys; D: Asp; E: Glu; F: Phe; G: Gly; H: His; I: Ile; K: Lys; L: Leu; M: Met; N: Asn; P: Pro; Q: Gln; R: Arg; S: Ser; T: Thr; V: Val; W: Trp; Y: Tyr.

RÉFÉRENCES

11. Morral N, Bertranpetit J, Estivill X, *et al.* Tracing the origin of the major cystic fibrosis mutation ($\Delta F508$) in European populations. *Nature Genet* 1994 (sous presse).

12. Estivill X, Scambler PJ, Wainwright BJ. Patterns of polymorphism and linkage disequilibrium for cystic fibrosis. *Genomics* 1987; 1: 257-63.

13. Morral N, Nunes V, Casals T, Chillon M, Giménez J, Bertranpetit J, Estivill X. Microsatellite haplotypes for cystic fibrosis: mutation frameworks and evolutionary tracers. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1015-22.

14. Vidaud M, Férec C, Attree O, *et al.* Frequency of the cystic fibrosis delta F508 mutation in a large sample of the French population. *Hum Genet* 1990; 85: 434-5.

15. Férec C, Audrézet MP, Mercier B, *et al.* Detection of over 98 % cystic fibrosis mutations in a Celtic population. *Nature Genet* 1992; 1: 188-91.

16. Claustres M, Desgeorges M, Kjellberg P, Bellet H, Demaille J, Ramsay M. Cystic fibrosis typing with DNA probes and screening for Delta F508 deletion in families from Southern France. *Hum Genet* 1990; 85: 398-9.

17. Verlingue C, Mercier B, Lecoq I, Audrézet MP, Laroche D, Travert G, Férec C. Retrospective study of the CFTR gene mutations in Guthrie cards from a large cohort of neonatal screening for cystic fibrosis. *Hum Genet* 1993 (sous presse).

18. Serre JL, Mornet E, Simon-Bouy B, Boué J, Boué A. General cystic fibrosis mutations are usually missense mutations affecting two specific protein domains and associated with a specific RFLP marker haplotype. *Eur J Hum Genet* 1993; 1: 287-95.

19. Hamosh A, King TM, Rosenstein BJ, *et al.* Cystic fibrosis patients bearing both the common missense mutation Gly \rightarrow Asp at codon 551 and the F508 mutation are clinically indistinguishable from F508 homozygotes, except for decreased risk of meconium ileus. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 245-50.

20. Nunes V, Gasparini P, Novelli G, *et al.* Analysis of 14 cystic fibrosis mutations in five South European populations. *Hum Genet* 1991; 87: 737-8.

21. Shoshani T, Augarten A, Gazit E, *et al.* Association of a nonsense mutation (W1282X), the most common mutation in the Ashkenazi Jewish cystic fibrosis patients in Israel, with presentation of severe disease. *Am J Hum Genet* 1992; 50: 222-8.

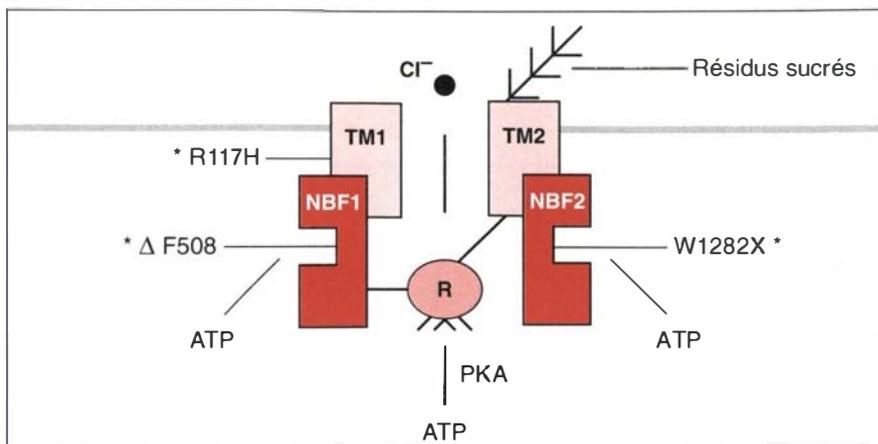


Figure 2. **Structure schématisée de la protéine CFTR.** TM1 et TM2 représentent les domaines transmembranaires amino- et carboxy-terminaux, NBF1 et NBF2 les sites de liaison de l'ATP (nucleotide binding fold), R le domaine régulateur, phosphorylé par la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA). Trois sites de mutations sont marqués sur la figure par un astérisque.

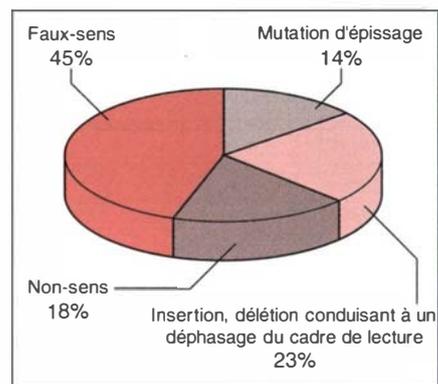


Figure 3. **Répartition des anomalies moléculaires dans le gène.**

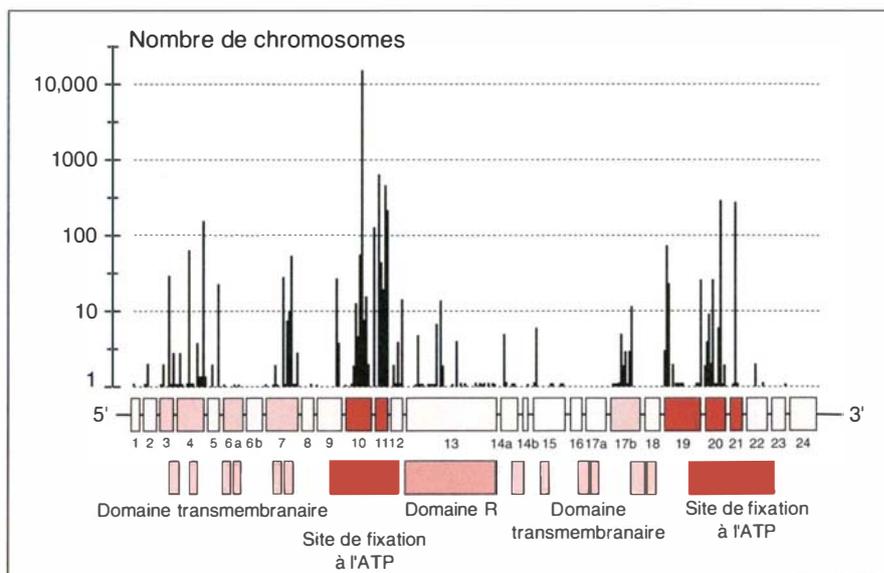


Figure 4. **Localisations et fréquences des mutations dans le gène CFTR.** Source: L.C. Tsui. Consortium international d'étude des mutations du gène CFTR [57].

des délétions de 50kb ont été rapportées [31].

L'essentiel des mutations se répartit en mutations faux sens (45 %), non sens (18 %), insertions-délétions conduisant à un déphasage du cadre de lecture (23 %) et des mutations d'épissage (14 %) (figure 3). La dispersion des mutations dans le gène n'est pas homogène, avec des exons qui semblent, plus fréquemment que d'autres, être le siège de mutations ponctuelles (en particulier ceux codant pour les deux sites de liaison à l'ATP, NBF) (figures 4, 5). C'est le cas des exons 10 et 11, 19, 20 et 21 codant respectivement pour le premier et le second NBF. A l'heure actuelle, les mutations situées dans les exons codant pour les régions transmembranaires du gène, en particulier les exons 3, 4 et 17b, sont aussi le siège de nombreuses mutations bien que leur fréquence respective soit peu élevée.

L'étude systématique des messagers du gène *CFTR* a montré, chez les sujets normaux, de très fréquents épissages alternatifs se traduisant par la présence d'allèles dont le transcrit peut être délété d'un ou plusieurs exons. Ces épissages alternatifs mettent fréquemment en jeu l'exon 9 du gène. Chu *et al.* ont en effet montré que le transcrit exon 9 pouvait représenter jusqu'à 90 % des

messagers chez un sujet normal [32]. Cet épissage alternatif incomplet est dû à la présence d'un polymorphisme de séquence polypyrimidique (suite de 5T, 7T ou 9T), situé dans le site accepteur de l'intron 8. Ainsi, une séquence de 5T conduit à un épissage très incomplet.

Ces anomalies d'épissage du gène peuvent, très probablement, rendre compte des variations phénotypiques importantes observées chez des patients porteurs de mêmes mutations. Cela a été montré récemment pour la mutation R117H [33]. Les auteurs ont montré que cette mutation pouvait être une mutation récurrente portée par des haplotypes différents. L'un des haplotypes, portant un polymorphisme de répétition de 5T dans l'intron 8, conduit à un épissage incomplet; dans l'autre haplotype, un polymorphisme de 7T induit un épissage correct. Le premier haplotype est retrouvé en majorité chez des malades présentant une forme clinique de mucoviscidose avec suffisamment pancréatique, le second est retrouvé uniquement chez des patients présentant une agénésie des canaux déférents. Cela souligne bien la complexité des corrélations génotype/phénotype lorsque la même mutation est portée par des haplotypes différents. Il a

également été montré que l'association de plusieurs mutations sur le même allèle pouvait conduire à des réversions du phénotype, et qu'une seconde mutation pouvait moduler l'effet de la première [34].

Afin d'analyser et de tirer des enseignements de cette très riche pathologie moléculaire, Welsh et Smith ont récemment proposé une répartition des mutations en quatre classes en fonction du type d'anomalie moléculaire [35] (figure 6).

Classe 1. Les mutations affectant la production de la protéine

Elles se traduisent par une absence totale ou partielle de la protéine. Sont incluses dans cette catégorie : les mutations non sens, les mutations d'épissage, les mutations entraînant un déphasage du cadre de lecture. La mutation W1282X, fréquente chez les malades d'origine juive ashkénaze, est un bon exemple de ce type de mutation. Cette mutation ponctuelle en position 3978, G → A, conduit au changement du codon TGG (Tryptophane = W) en TGA (codon stop).

Classe 2. Les mutations affectant la maturation cellulaire de la protéine CFTR, telles la ΔF508 ou la ΔI507 où des anomalies de la glycosylation conduisent à une mauvaise circulation intracellulaire et à un mauvais positionnement de la protéine dans la partie apicale de la cellule épithéliale pulmonaire.

Classe 3. Les mutations affectant la régulation du canal chlore

Il s'agit de mutations faux sens, situées au niveau des sites de liaison de l'ATP (NBF I ou II). Ces mutations entraînent une altération de la fonction du CFTR qui est réglé par la concentration en ATP cytosolique. Un exemple de mutation conduisant à de telles dérégulations du canal chlore est la mutation G551D, provoquant au sein du premier NBF le remplacement d'une glycine en acide aspartique.

Classe 4. Les mutations produisant un dysfonctionnement de la conduction

Les régions transmembranaires de la

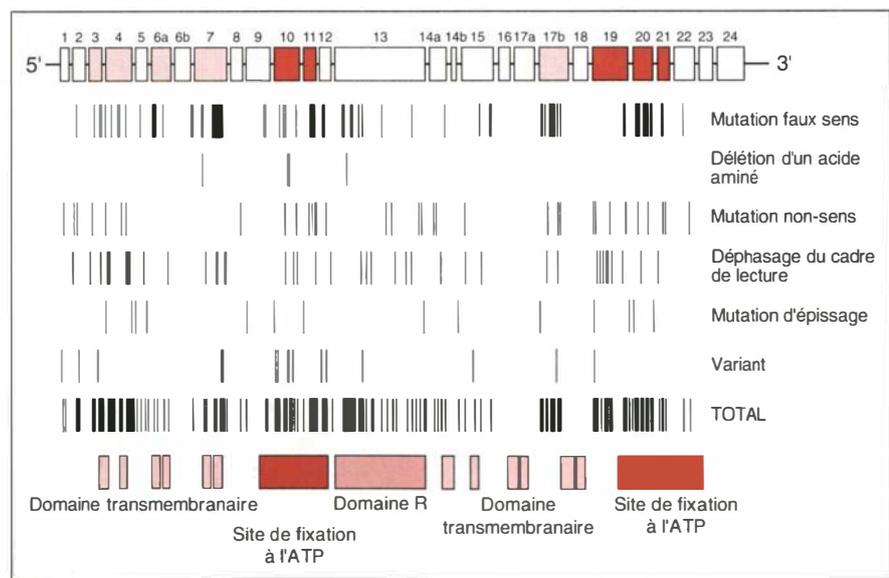


Figure 5. **Distribution des mutations dans le gène CFTR.** Source : L.C. Tsui. Consortium international d'étude des mutations du gène CFTR [58].

RÉFÉRENCES

22. Rozen R, Schwartz RH, Hilman BC, *et al.* Cystic fibrosis mutations in North American populations of French ancestry: analysis of Quebec French-Canadian and Louisiana Acadian families. *Am J Hum Genet* 1990; 47: 606-10.
23. Cheadle JP, Goodchild MC, Meredith AL. Direct sequencing of the complete CFTR gene: the molecular characterisation of 99.5% of CF chromosomes in Wales. *Hum Mol Genet* 1993; 2, 10: 1551-6.
24. Fanen P, Ghanem N, Vidlaud M, Besmond C, Martin J, Costes P, Plassa F, Goossens M. Molecular characterization of cystic fibrosis: 16 novel mutations identified by analysis of the whole cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) coding regions and splice site junctions. *Genomics* 1992; 13: 770-6.
25. Claustres M, Laussel M, Desgeorges M, Giansily M, Culard JF, Razakatsara G, Demaille J. Analysis of the 27 exons and flanking regions of the cystic fibrosis gene: 4* different mutations account for 91.2% of the mutant alleles in Southern France. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1209-13.
26. Savov A, Mercier B., Kalaydjieva I., Férec C. Identification of six novel mutations in the CFTR gene of patients from Bulgaria by screening the twenty seven exons and exon/intron boundaries using DGGE and direct DNA sequencing. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 57-60.
27. Audrézet MP, Canki Klain N, Mercier B, Bravar D, Verlingue C, Férec C. Identification of three novel mutations in the Slovenian population. *Hum Genet* 1994 (sous presse).
28. Cheng SH, Rich DP, Marshall J, Gregory RJ, Welsh MJ, Smith AE. Phosphorylation in the R domain by cAMP-dependant protein kinase regulates the CFTR chloride channel. *Cell* 1991; 66: 1027-36.
29. Collins FS. Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science* 1992; 256: 774-9.
30. Goossens M. Biologie de la mucoviscidose: progrès récents et perspectives. *médecine/sciences* 1991; 7: 1048-51.
31. Morral N, Nunes V, Casals T, Cobos N, Asensio O, Dapena J, Estivill X. Uniparental inheritance of microsatellite alleles of the cystic fibrosis gene (CFTR): identification of a 50 kilobase deletion. *Hum Mol Genet* 1993; 2, 6: 677-81.
32. Chu SC, Trapnel BC, Curristin S, Cutting GR, Crystal RG. Genetic basis of variable exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA. *Nature Genet* 1993; 3: 151-6.
33. Kiesewetter S, Macek M Jr, Davis C, Curristin SM, Chu CS, Graham C, Shrimpton AE, Cashman SM, Tsui LC, Mickle J, Amos J, Highsmith WE, Shuber A, Witt DR, Crystal RG, Cutting GR. A mutation in CFTR produces different phenotypes depending on chromosomal background. *Nature Genet* 1993; 5: 274-8.
34. Teem JL, Berger HA, Ostedgaard LS, Rich DP, Tsui LC, Welsh MJ. Identification of revertants for the cystic fibrosis F508 mutation using STE6-CFTR chimeras in yeast. *Cell* 1993; 73: 335-46.
35. Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 1993; 73: 1251-4.
36. Sheppard DN, Rich DP, Ostedgaard LS, Gregory RJ, Smith AE, Welsh M. Mutations in CFTR associated with mild-disease-form Cl⁻ channels with altered pore properties. *Nature* 1993; 362: 160-4.
37. Boat TF, Welsh MJ, Beaudet AL. *The Metabolic basis of inherited disease*. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. New York: McGraw Hill, 1989: 2649-80.
38. Kerem E, Corey M, Kerem BS, *et al.* The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis: analysis of the most common mutation (F508). *N Engl J Med* 1990; 323: 1517-22.
39. Santis G, Osborne L, Knight RA, Hodson ME. Independent genetic determinants of pancreatic and pulmonary status in cystic fibrosis. *Lancet* 1990; 336: 1081-4.
40. Santis G, Osborne L, Knight RA, Hodson ME. Linked marker haplotypes and the F508 mutation in adults with mild pulmonary disease and cystic fibrosis. *Lancet* 1990; 335: 1426-9.
41. Kristidis P, Bozon D, Corey M, Markiewicz D, Rommens J, Tsui LC, Durie P. Genetic determination of exocrine pancreatic function in cystic fibrosis. *Am J Hum Genet* 1992; 50: 1178-84.
42. Guillermit H, Jehanne M, Quéré I, Audrézet MP, Mercier B, Férec C. A novel mutation in exon 3 of the CFTR gene. *Hum Genet* 1993; 91: 233-5.
43. Mercier B, Lissens W, Novelli G, *et al.* Identification of eight novel mutations in a collaborative analysis of a part of the second transmembrane domain of the CFTR gene. *Genomics* 1993; 16: 296-7.
44. Férec C, Verlingue C, Mercier B, Guillermit H, Quéré I, Raguénès O, Audrézet MP. Genotype analysis of adult cystic fibrosis patients. *Hum Mol Genet* 1993; 2, 10: 1557-60.
45. Tabcharani JA, Rommens JM, Hou YX, Chang XB, Tsui LC, Riordan JR, Hanrahan JW. Multi-ion pore behaviour in the CFTR chloride channel. *Nature* 1993; 366: 79-82.

protéine constituant un canal ayant un rôle important dans la conduction et la sélectivité ionique. Il est maintenant établi que les mutations faux sens situées dans ces régions transmembranaires affectent la sélectivité du canal chlore. Il a été montré récemment par Sheppard que ce type de mutant CFTR transfecté en système cellulaire hétérologue produit un CFTR correctement positionné et contrôlé par l'AMPC mais dont la conductance est diminuée [36]. Le prototype de ces mutations est la R117H ou la R334W.

Corrélation génotype/phénotype

La diversité des signes cliniques de la mucoviscidose et les profils évolutifs très différents d'un patient à l'autre ont naturellement conduit à rechercher des corrélations entre le génotype et le phénotype des patients (*m/s n° 12, vol. 9, p. 1431*). Il avait été noté depuis longtemps que 10% à 15% d'entre eux présentaient une fonction pancréatique externe conservée et ces patients étaient qualifiés de « pancréatiques suffisants » [37].

La connaissance de la mutation principale, la $\Delta F508$ en 1989-1990, permit dès cette époque de montrer la relative homogénéité clinique des patients homozygotes pour cette mutation [38]. Ceux-ci avaient, dans leur très grande majorité, une forme classique de la maladie avec atteinte pulmonaire importante et insuffisance pancréatique. Une différence apparaissait dans la présentation clinique des malades homozygotes $\Delta F508$ et des sujets hétérozygotes composites (porteurs d'une ou de deux mutations non identifiées) [39, 40]. Ces patients hétérozygotes composites avaient, en règle générale, une atteinte moins sévère de la fonction pulmonaire.

Un rôle important pour les mutations autres que la mutation $\Delta F508$ avait été proposé dès la découverte du gène par Lap Chee Tsui; il avait estimé qu'au moins un facteur clinique, la suffisance pancréatique, était génétiquement déterminé, et que les chromosomes porteurs d'une mutation qualifiée de non sévère (*mild*) avaient un effet domi-

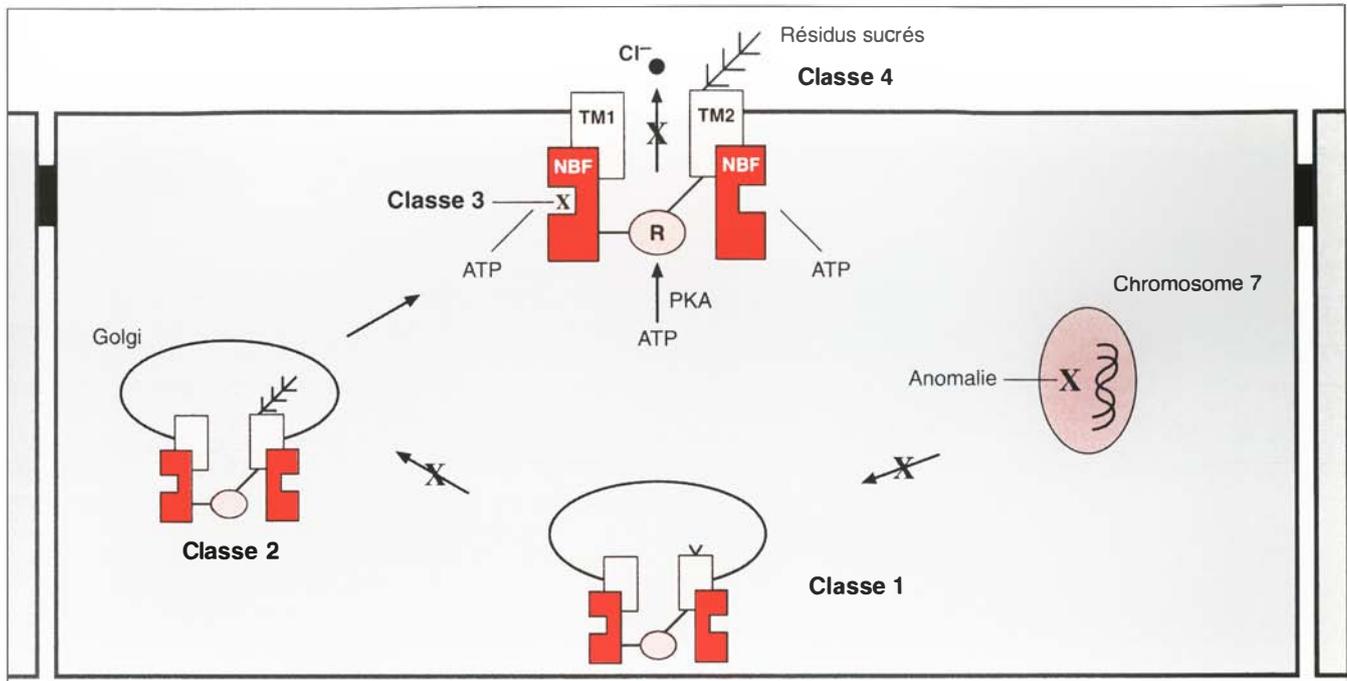


Figure 6. **Structure et fonction du CFTR.** Les mutations du CFTR ont été divisées en quatre classes. Classe 1 : mutations affectant la production de la protéine (déphasage du cadre de lecture, codon stop, mutation d'épissage) ; classe 2 : mutations affectant la maturation de la protéine, les anomalies de glycosylation conduisent à une mauvaise circulation intracellulaire et à un mauvais positionnement de la protéine dans la partie apicale de la cellule épithéliale pulmonaire ; classe 3 : mutations affectant la régulation du canal chlorure par la concentration cellulaire d'ATP ; classe 4 : mutations affectant la sélectivité du canal ionique et entraînant des troubles de la conduction.

nant par rapport aux autres mutations qualifiées de sévères, la mutation $\Delta F508$ en étant le chef de file. Ce modèle a été très largement confirmé par le groupe de Toronto [41] dès que l'identification des mutations rares a été plus complète. Nous avons également identifié quelques nouveaux allèles *CFTR* chez des patients sans insuffisance pancréatique (G91R, H1054D) [42, 43]. Par ailleurs, nous nous sommes intéressés à l'étude du génotype de patients âgés de plus de 35 ans porteurs d'une forme fruste de la maladie. Une exploration systématique et exhaustive de l'ensemble de la séquence codante du gène par la technique d'électrophorèse en gradient de gel dénaturant nous a permis d'identifier le génotype complet de sept patients. Il s'agit, pour l'essentiel, de mutations faux sens situées dans les domaines transmembranaires, conduisant à des troubles de la conduction du canal chlorure [44]. L'approche génétique qui a conduit à l'identification précise

de ces mutations associées à des formes frustes a été confirmée récemment par Sheppard [36] qui a construit des mutants *CFTR* (R334W, R347H) par mutagenèse dirigée et les a fait s'exprimer dans un système cellulaire hétérologue ; il a montré que cette protéine *CFTR* mutée conservait environ 10 % de conductance du chlore. L'exploration de ces mutations transmembranaires a été encore récemment complétée par Tabcharani. Par la même approche, il a montré que l'arginine en position 347 mutée en histidine, proline ou leucine conduisait à la modification de la fonction de la protéine *CFTR*, qui de canal multi-ionique devenait simplement capable d'assurer le passage d'un seul ion [45]. Ces résultats soulignent l'intérêt de la définition précise des génotypes des patients ; cette connaissance pourrait, dans les prochaines années, être d'une importance capitale dans le choix, pour un malade donné, d'une thérapeutique spécifique de la mucoviscidose.

Les formes particulières de la mucoviscidose

L'agénésie déférentielle

La description de plus de quatre cents allèles *CFTR* mutés rend compte de l'hétérogénéité génotypique de la maladie et les formes frontières ou particulières de la maladie sont aujourd'hui réexaminées avec une attention toute particulière à la lumière des informations que nous apporte la connaissance du gène *CFTR*. Ainsi, en 1990, l'équipe de Roussel à Lille (*m/s* n° 3, vol. 9, p. 344 [46]) a-t-elle recherché systématiquement la présence d'éventuelles anomalies moléculaires du gène *CFTR* chez des patients suivis pour des problèmes de stérilité due à une agénésie des canaux déférents. On savait, en effet, depuis longtemps, d'une part, que les hommes atteints de mucoviscidose présentaient une stérilité excrétoire liée à une agénésie déférentielle, d'autre part, que cette forme de stérilité

RÉFÉRENCES

46. Rigot JM, Lafitte JJ, Dumur V, Gervais R, Manouvrier S, Biserte J, Mazeman E, Roussel P. Cystic fibrosis and congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med* 1991; 325, 1: 64-5.
47. Gervais R, Dumur V, Rigot JM, Lafitte JJ, Roussel P, Claustres M, Demaille J. High frequency of the R117H cystic fibrosis mutation in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med* 1993; 328: 447-57.
48. Simon-Bouy B, Stern M, Taillandier A, Mornet E, Boué A, Caubarrère I. Increased frequency of the F508 mutation in patients with bronchiectasis. *Pediatric Pulmonology*, 1993, Seventh Annual North American Cystic Fibrosis Conference. Suppl. 9, 127.
49. Strong TV, Smit LS, Turpin SV, Cole JL, Tom Hon C, Markiewicz D, Petty TL, Craig MW, Rosenow EC, Tsui LC, Iannuzzi MC, Knowles MR, Collins FS. Cystic fibrosis gene mutation in two sisters with mild disease and normal sweat electrolyte levels. *N Engl J Med* 1991; 325: 1630-4.
50. Augarten A, Kerem BS, Yahav Y, Noiman S, Rivlin Y, Tal A, Blau H, Ben-Tur L, Szeinberg A, Kerem E, Gazit E. Mild cystic fibrosis and normal or borderline sweat test in patients with the 3849+10kb CAET mutation. *Lancet* 1993; 342: 25-6.
51. Férec C, Verlingue C, Audrézet MP, et al. Prenatal diagnosis of cystic fibrosis in different European populations: application of denaturing gradient gel electrophoresis. *Fetal Diagnosis and Therapy* 1993; 8: 341-50.
52. Morral N, Girvau E, Zielinski J, Nunes V, Casals T, Tsui LC, Estivill X. Dinucleotide (CA/GT) repeat polymorphism in intron 17b of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Hum Genet* 1992; 88: 356.
53. Audrézet MP, Costes B, Ghanem N, et al. Screening for cystic fibrosis in dried blood spots of newborns. *Molecular and Cellular Probes* 1993; 7: 101-6.
54. Williamson R. Universal community carrier screening for cystic fibrosis? *Nature Genet* 1993; 3: 195-201.
55. Mennie ME, Gilfillan A, Compton M, et al. Prenatal screening for cystic fibrosis. *Lancet* 1992; 340: 214-6.
56. Brambati B, Tului L, Fattore S, Férec C. First trimester fetal screening of cystic fibrosis in a low-risk population. *Lancet* 1993; 342, 8871: 624.
57. White MB, Leppert M, Nielsen D, Zielinski J, Gerrard B, Stewart C, Dean M. A de novo cystic fibrosis mutation: CGA (Arg) to TGA (Stop) at codon 851 of the CFTR gene. *Genomics* 1991; 11: 778-9.
58. Tsui LC. Personal communication.
- (6 % des stérilités masculines) était héréditaire, de transmission autosomique récessive. La mise en évidence dans la série lilloise de huit sujets hétérozygotes $\Delta F508$ parmi dix-huit patients azoospermiques, suivie de l'observation, au moins dans leur série, de quelques sujets portant la mutation faux sens R117H [47], conforte l'hypothèse évoquée dès 1968 que les patients atteints d'agénésie déférentielle pouvaient avoir une forme très bénigne à expression uniquement génitale de mucoviscidose.
- Il a maintenant été confirmé par différents groupes que 50 % à 60 % des patients agénésiques sont hétérozygotes $\Delta F508$ et qu'environ 10 % d'entre eux sont hétérozygotes composites. Ces patients sont asymptomatiques au niveau respiratoire ou digestif; le test de la sueur est normal chez ces sujets, tout au plus retrouve-t-on assez souvent des valeurs de $[Cl^-]$ de 40 à 50 mEq/l, c'est-à-dire discrètement supérieures à celles observées chez les sujets normaux (en général entre 20 et 30 mEq/l). Au total aujourd'hui, si le CFTR est clairement impliqué dans cette maladie, d'importantes questions sont soulevées mais non réglées. Existe-t-il une hétérogénéité génétique qui impliquerait d'autres gènes que le CFTR chez les sujets stériles par agénésie des déférents? N'y aurait-il pas des mutations situées à l'extérieur de la région codante du gène CFTR — mutations introniques, mutations situées dans le promoteur — pouvant influencer les sites de régulation du gène? Doit-on aujourd'hui considérer l'agénésie déférentielle comme un « phénotype génital » de mucoviscidose? Quoi qu'il en soit, les conséquences pratiques de la définition moléculaire de ce syndrome sont importantes et impliquent que l'on propose, dès à présent, aux sujets apparentés à ces patients ainsi qu'à leur partenaire (en cas de fécondation *in vitro* par ponction épидидymaire) une recherche des mutations fréquentes du gène CFTR.

Les formes frustes

L'analyse systématique du gène chez des patients adultes porteurs d'une dilatation des bronches et dont le

test de la sueur était normal a permis également de montrer un excès d'hétérozygotes $\Delta F508$ et d'identifier clairement quelques hétérozygotes composites [48]. Ces formes de mucoviscidose *a minima* n'impliquent très probablement pas une mutation particulière du gène mais doivent correspondre à un discret dysfonctionnement de la protéine CFTR. Ainsi, la mutation G551S a été décrite chez deux sœurs présentant des valeurs à la limite de la normale pour un test de la sueur, associées à une forme très modérée de la maladie, d'expression uniquement pulmonaire [49]. Le groupe de Kerem a également rapporté récemment, dans une série de quinze patients, l'association de formes modérées de mucoviscidose à la mutation intronique 3849 + 10kb (intron 19) sur un allèle (33 % de ces malades avaient un test de la sueur normal) [50].

De la connaissance du gène aux applications cliniques

Diagnostic prénatal

La connaissance de la plupart, sinon de toutes, les anomalies moléculaires du gène dans certaines populations permet de proposer, aux couples à risque d'avoir un enfant atteint, un diagnostic anténatal précoce et fiable à onze semaines d'aménorrhée. La technique de l'électrophorèse en gradient de gel dénaturant permet un choix spécifique des régions du gène à analyser, améliore la performance diagnostique et peut être modulée et adaptée selon l'origine des différentes populations [51]. La connaissance actuelle des principales mutations présentes dans un pays ou une région donnés permet de mettre en place des systèmes analytiques plus souples ou plus simples, comme par exemple l'amplification spécifique d'allèles ou le *dot blot reverse** qui permettent très rapidement de rechercher jusqu'à trente mutations

* *Dot blot reverse*: hybridation du produit d'amplification, marqué par exemple par la biotine, à un filtre où l'on a fixé une batterie de sondes (oligonucléotides) correspondant aux différents allèles de la région amplifiée.

différentes. Grâce à l'étude familiale des polymorphismes de type micro-satellite, il est possible de proposer un diagnostic lorsque les mutations ne sont pas identifiées, comme par exemple dans les populations d'Europe du Nord où près de 10 % des allèles CFTR n'ont pas été caractérisés. Mais surtout, au sein des populations du sud de l'Europe où 30 % des allèles CFTR sont non identifiés, le diagnostic repose sur la mise en évidence de marqueurs intragéniques et nécessite de pouvoir disposer d'un prélèvement de l'enfant atteint [52].

Diagnostic néonatal

L'analyse directe des mutations du gène, de la mutation $\Delta F508$ mais également des autres mutations non rares, a permis de mettre en place dans certaines régions un test de dépistage néonatal en une seule étape couplant le dosage de la trypsine immunoréactive à la recherche de mutations [53]. Le dépistage de la maladie a lieu dans les premières semaines de vie des nouveau-nés atteints, évitant ainsi le fort taux de rappel qui était observé lors de l'utilisation de la seule trypsine immunoréactive.

Diagnostic des porteurs

Le problème du dépistage des hétérozygotes dans la population générale a été un sujet largement débattu au sein des diverses sociétés de génétique [54]. La recherche des mutations fréquentes permet de dépister 80 % à 90 % des mutations dans beaucoup de pays d'Europe et aux États-Unis et, bien que cette sensibilité ne soit pas parfaite, ces résultats ont conduit à la mise en place d'expériences pilotes de dépistage des hétérozygotes en Angleterre et au Danemark. Différentes stratégies ont été proposées, par exemple la recherche des cinq mutations les plus fréquentes chez les femmes en début de grossesse [55] ou l'analyse des mutations les plus fréquentes chez les jeunes couples avant toute grossesse dans les régions à risque. Une recherche systématique de mutations fréquentes a même été réalisée en Italie à partir des cellules fœtales obtenues par prélève-

ment de liquide amniotique réalisé en vue du diagnostic caryotypique [56]. Tout cela exige la mise en place de structures de prise en charge médicale spécialisée, de consultations de conseil génétique en particulier, pour qu'une information claire et détaillée puisse être offerte aux sujets dépistés.

Les résultats de ces diverses expériences et les perspectives qu'ils ouvrent vont devoir être largement débattus; les impératifs socio-économiques et éthiques devront être pris en compte avant que ces études pilotes ne soient généralisables.

Conclusion

Plus de quatre cents mutations dans le gène *CFTR* ont été rapportées depuis quatre ans et ce nombre sera très probablement dépassé dans les prochains mois. À côté d'une mutation fréquente, probablement ancestrale, la délétion $\Delta F508$, seules quatre ou cinq autres ont été retrouvées dans les différentes populations à une fréquence supérieure à 1 %. La très grande majorité des autres anomalies moléculaires sont des mutations privées, présentes sur quelques-uns des chromosomes examinés. Pour l'essentiel, il s'agit d'anomalies ponctuelles conduisant à des mutations faux sens ou non sens, ou à de courtes insertions/délétions; les délétions de taille moyenne ou de grande taille sont exceptionnelles. Exceptionnelles semblent également les néo-mutations: à ce jour il n'en a été rapporté qu'une seule [57]. Les mutations connues peuvent être regroupées en au moins quatre classes distinctes qui permettent de rassembler les allèles *CFTR* mutés conduisant à des dysfonctionnements au niveau du canal chlorure. Il est ainsi possible de mieux étayer les relations phénotype/génotype montrant à l'évidence que certains signes cliniques, telles la suffisance pancréatique ou les formes cliniques de sévérité modérée observée chez des adultes, sont génétiquement déterminés. Cela permet aussi d'augurer pour l'avenir une approche thérapeutique différente selon le génotype des patients. Ainsi, à côté de la thérapie génique (*m/s n° 1*,

vol. 7, p. 84) aux États-Unis, en particulier, avec les premiers essais chez l'homme de transfert du gène *CFTR* à l'aide d'adénovirus génétiquement modifiés, la place pour une approche pharmacologique est très largement ouverte pour certains patients, en particulier ceux qui présentent des mutations conduisant à des troubles de la conduction canalaire. Il suffit de se rappeler qu'en 1985 on ignorait la localisation chromosomique du gène de la mucoviscidose pour apprécier les progrès réalisés depuis huit ans et mesurer combien l'étude du gène *CFTR* est un modèle d'étude de maladie monogénique chez l'homme ■

Remerciements

Les auteurs remercient l'Association française de lutte contre la mucoviscidose pour son soutien financier.

Summary

Cystic fibrosis gene mutations

The gene responsible for cystic fibrosis was cloned in 1989 and extensive analyses have been performed since showing that the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) is a chloride channel regulated by a cAMP dependent phosphorylation. The identification of more than 400 different mutated alleles shows now a precise distribution of these mutations in the gene which varies with geographic origin of patients. These molecular analyses have permitted genotype/phenotype correlation to be established and it is evident that some clinical symptoms are genetically determined. The precise characterization of gene defects has led to a better knowledge of CFTR's channel function and to a better understanding of how CF associated mutations disrupt CFTR function.