

# Les bases moléculaires de la mucoviscidose en France : plus de 300 mutations et 506 génotypes différents sont en cause

Marie Des Georges<sup>1</sup>, Caroline Guittard<sup>1</sup>, Dominique Bozon<sup>2</sup>,  
Françoise Chevalier<sup>2</sup>, Claudine Verlingue<sup>3</sup>, Claude Ferec<sup>3</sup>,  
Emmanuelle Girodon<sup>4</sup>, Cécile Cazeneuve<sup>4</sup>,  
Thierry Bienvenu<sup>5</sup>, Guy Lalau<sup>6</sup>, Viviane Dumur<sup>6</sup>,  
Delphine Feldmann<sup>7</sup>, Éric Bieth<sup>8</sup>, Martine Blayau<sup>9</sup>,  
Christine Clavel<sup>10</sup>, Isabelle Creveaux<sup>11</sup>,  
Marie-Claire Malinge<sup>12</sup>, Nicole Monnier<sup>13</sup>, Perrine Malzac<sup>14</sup>,  
Hervé Mittre<sup>15</sup>, Jean-Paul Bonnefont<sup>16</sup>, Albert Iron<sup>17</sup>,  
Jean-Claude Chomel<sup>18</sup>, Michèle Chery<sup>19</sup>, Mireille Claustres<sup>1</sup>

## ADRESSES

M. Des Georges : *Pharmacien-biologiste, ingénieur d'études au CHU de Montpellier.* Laboratoire de génétique moléculaire, Institut de biologie, boulevard Henri-IV, 34060 Montpellier, France. C. Guittard : *Technicienne au CHU de Montpellier.* Laboratoire de génétique moléculaire, Institut de biologie, boulevard Henri-IV, 34060 Montpellier, France. M. Claustres : *Docteur en médecine, docteur ès sciences, professeur des Universités, praticien hospitalier.* Laboratoire de génétique moléculaire, IGH-Cnrs UP 1142 et CHU, Institut de biologie, boulevard Henri-IV, 34060 Montpellier, France.

<sup>1</sup> Laboratoire de génétique moléculaire, IGH-Cnrs UP 1142 et CHU, Institut de biologie, boulevard Henri-IV, 34060 Montpellier, France.

<sup>2</sup> Laboratoire de biochimie pédiatrique, Hôpital Debrousse, 29, rue Sœur-Bouvier, 69322 Lyon Cedex 05.

<sup>3</sup> Centre de biogénétique, ETSBO, 46, rue Félix-Dante, BP 454, 29275 Brest Cedex.

<sup>4</sup> Laboratoire de biochimie, Hôpital Henri-Mondor, 51, avenue du Maréchal-de-Lattre-de-Tassigny, 94010 Créteil Cedex.

<sup>5</sup> Laboratoire de biochimie et génétique moléculaire, Pavillon Cassini, Groupe hospitalier Cochin, 123, boulevard de Port-Royal, 75014 Paris.

<sup>6</sup> Laboratoire de biochimie et de biologie moléculaire, Hôpital Calmette, Boulevard Jules-Leclercq, 59037 Lille.

<sup>7</sup> Laboratoire de biochimie et de biologie moléculaire, Hôpital Trousseau, 24-26, rue Docteur-Arnold-Netter, 75012 Paris.

<sup>8</sup> Laboratoire de génétique médicale, Hôpital Purpan, Pavillon Lefebvre, place du Docteur-Baylac, 31079 Toulouse Cedex.

<sup>9</sup> Laboratoire de génétique moléculaire, CHU Pontchaillou, 2, rue Henri-le-Guillon, 35033 Rennes Cedex.

<sup>10</sup> Conformations cellulaires et moléculaires, Inserm U. 314, CHR Maison-Blanche, 45, rue Cognacq-Jay, 51092 Reims Cedex.

<sup>11</sup> Laboratoire de biochimie, biologie moléculaire et enzymologie, Faculté de médecine, 28, place Henry-Dunant, 63001 Clermont-Ferrand Cedex.

<sup>12</sup> Service de génétique, CHU d'Angers, 4, rue Larrey, 49033 Angers Cedex.

<sup>13</sup> Biochimie de l'ADN, Hôpital de la Tronche, BP 217, 38043 Grenoble Cedex.

<sup>14</sup> Biologie moléculaire appliquée, Centre de diagnostic prénatal, Hôpital de la Timone, rue Saint-Pierre, 13385 Marseille Cedex 5.

<sup>15</sup> Laboratoire de Biochimie B, CHU Georges-Clemenceau, 14033 Caen Cedex.

<sup>16</sup> Biochimie B, Tour Lavoisier, Hôpital Necker-Enfants Malades, 149, rue de Sévres, 75743 Paris Cedex 15.

<sup>17</sup> Biochimie et biologie moléculaire, Groupe hospitalier Pellegrin, place Amélie-Raba-Leon, 33076 Bordeaux Cedex.

<sup>18</sup> Laboratoire de génétique cellulaire et moléculaire, CHU de Poitiers, BP 577, 86021 Poitiers Cedex.

<sup>19</sup> Laboratoire de génétique, CHU Brabois, rue du Morvan, 54511 Vandœuvre-les-Nancy.

Nous avons collecté auprès de 19 laboratoires impliqués dans le diagnostic moléculaire de la mucoviscidose en France les données alléliques et/ou génotypiques de près de 3 595 patients. L'analyse de 7 190 allèles révèle l'existence de 300 mutations différentes parmi les 6 700 allèles mutés identifiés (taux global de détection = 93,18 %), totalisant près de 40 % des 770 mutations *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) répertoriées à ce jour dans le monde. La délétion  $\Delta F508$  est présente sur 4 833 allèles (67,21 %), avec un gradient décroissant entre le Nord (70 %) et le Sud (61 %) du pays, et une fréquence spécifique de 81 % dans la population celtique de Bretagne. Viennent ensuite G542X (2,89 % ; 1-6,6 %), N1303K (2,05 % ; 0,75-4,5 %), 1717 - 1G > A (1,33 % ; 0-2,7 %), et 2789 + 5G > A (1 % ; 0-2,8 %). Seules 9 autres mutations ont une fréquence supérieure à 0,4 % (G551D, W1282X, R553X,  $\Delta I507$ , 2183AA > G, 1078delT, 711 + 1G > T, R1162X, et Y1092X). 133 mutations ont été identifiées sur un faible nombre de chromosomes (de 28 à 2), et 153 sont présentes en un seul exemplaire. Ce spectre de mutations *CFTR*, le plus large rapporté jusqu'ici pour un seul pays, est à l'origine de 506 génotypes délétères différents. Cette étude souligne l'hétérogénéité allélique de la mucoviscidose en France et met en évidence des disparités régionales et ethniques dans la distribution de certaines mutations. Ces informations seront utiles pour améliorer la détection des mutations et la précision du conseil génétique, ainsi que pour orienter de futures stratégies thérapeutiques.

La mucoviscidose (ou fibrose kystique du pancréas) est, en France, la plus fréquente des maladies autosomiques récessives diminuant l'espérance de vie des individus atteints. Dans sa forme classique, elle se manifeste par une atteinte pulmonaire obstructive, une insuffisance pancréatique, et des valeurs élevées de chlorure dans la

sueur, conséquences d'une anomalie du transport épithélial des électrolytes due à l'absence à la membrane plasmique de la protéine CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) ou à son dysfonctionnement [1-3]. L'incidence de la maladie est estimée à une naissance sur 2500 mais peut varier de 1/1600 en Bretagne celtique à 1/4000 dans des popula-

tions plus hétérogènes. La maladie est présente aussi dans les populations d'origine africaine ou arabe et, plus rarement, asiatique.

Depuis l'identification, en 1989, du gène responsable de la mucoviscidose [1-3], 770 « mutations » et 150 « polymorphismes » ont été rapportés (au 24 mai 1998) au *Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium*

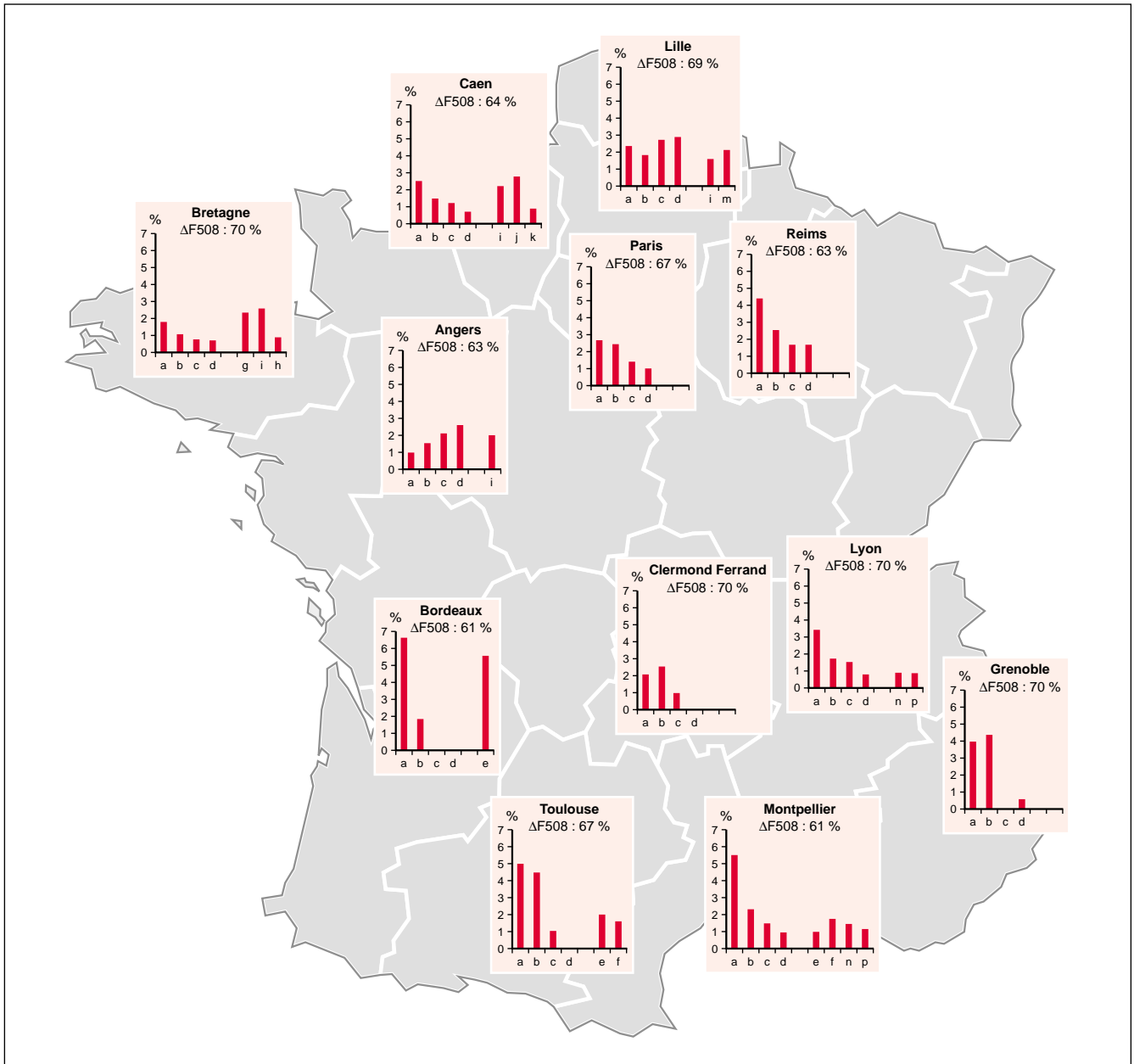


Figure 1. **Distribution des principales mutations responsables de mucoviscidose dans différentes régions de France.** a, G542X; b, N1303K; c, 1717-1G > A; d, 2789 + 5G > A; e, 1811 + 1,6kbA > G; f, R334W; g, 1078delIT; h, W846X; i, G551D; j, ΔI507; k, 3850 - 1G > A; l, 394delITT; m, R553X; n, 711 + 1G > T; p, 2183AA > G.

(CFGAC, <http://genet.sickkids.on.ca>). Près de 36 % des mutations ont été découvertes par des laboratoires français, qui apportent ainsi une contribution majeure à l'effort international de caractérisation des anomalies responsables de mucoviscidose et des phénotypes apparentés. L'analyse de plus de 43 000 chromosomes mutés issus des différents continents a montré que seules 5 mutations ont une fréquence supérieure à 1 % [ $\Delta F508$  (66 %), G542X (2,4 %), G551D (1,6 %), N1303K (1,3 %) et W1282X (1,2%)], 19 mutations ont une fréquence comprise entre 1 % et 0,1 % [4] tandis que la majorité des mutations sont présentes en un seul exemplaire. Une étude exhaustive de l'origine de 27 177 chromosomes mutés a révélé une distribution différente des mutations dans les populations Européennes selon les origines géographiques et ethniques des allèles [5]. Afin de connaître la distribution des mutations *CFTR* responsables de mucoviscidose en France, nous avons collecté les allèles et génotypes de 3 595 patients. Cette compilation révèle une très grande hétérogénéité allélique, avec déjà 300 mutations différentes identifiées pour un taux global de détection de 93,18 % des allèles mutés. Il s'agit du plus large spectre mutationnel *CFTR* rapporté à ce jour pour la population d'un pays.

## Matériel et méthodes

### Recueil des allèles et génotypes responsables de mucoviscidose

Une demande de participation a été envoyée aux 24 laboratoires impliqués dans le diagnostic moléculaire de la mucoviscidose (recensés lors d'une réunion BIOMED, Créteil, avril 1997). S'agissant d'une étude pilote sur les allèles *CFTR*, il était demandé d'indiquer, sur une seule page, (1) la stratégie d'analyse des mutations; (2) les principales caractéristiques phénotypiques associées au génotype (sexe, âge au diagnostic, forme pulmonaire ou digestive, suffisance ou insuffisance pancréatique exocrine, valeurs du test de la sueur); et (3) l'origine géographique des parents et grands-parents. Le

recueil des données, limité à six mois (d'août 1997 à janvier 1998) concernait uniquement les cas de mucoviscidose classique confirmée par les signes cliniques et/ou biologiques.

Dix-neuf laboratoires ont envoyé au total 3 933 fiches. Nous avons décelé les cas analysés deux fois ( $n = 178$ ), trois fois ( $n = 12$ ) ou quatre fois ( $n = 1$ ) dans des laboratoires différents, ainsi que 64 fiches concernant des frères ou sœurs de patients. Nous avons aussi exclu 69 fiches pour diagnostic clinique trop incertain ou analyse génétique insuffisante. On peut donc considérer que les 3 595 fiches retenues représentent la majorité des demandes de génotypage *CFTR*.

### Techniques de détection et d'identification des mutations *CFTR*

La mucoviscidose étant due à des mutations ponctuelles de l'ADN, le diagnostic moléculaire est fondé sur l'analyse de segments du gène amplifiés par PCR, à partir d'ADN génomique extrait, le plus souvent, du sang périphérique. Les techniques disponibles peuvent être classées en deux groupes selon que les laboratoires recherchent des mutations préalablement connues ou non.

La détection de mutations connues est réalisée à l'aide de cinq méthodes différentes. L'analyse des produits PCR de l'exon 10 par électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE) permet de rechercher rapidement la délétion  $\Delta F508$  et de la différencier de  $\Delta I507$  grâce aux profils différents des hétéroduplex engendrés chez l'hétérozygote. La séparation électrophorétique de produits PCR après digestion enzymatique permet de déceler les mutations qui modifient des sites de restriction naturels ou introduits dans le produit d'amplification. L'analyse de produits PCR par hybridation avec des sondes oligonucléotidiques spécifiques (ASO, *allele specific oligonucleotide*) ou par le procédé RDB (*reverse dot blot*, dans lequel les oligosondes sont immobilisées sur des bandelettes) est utilisée pour identifier rapidement 8 à 16 mutations (par exemple, le *kit* Inno-Lipa CF-8, Innogenetics NV, Belgium, détecte  $\Delta F508$ ,  $\Delta I507$ , G551D, G542X, R553X, N1303K,

W1282X et 1717 – 1G > A). Enfin quelques mutations peuvent aussi être révélées facilement par la méthode d'amplification spécifique d'allèle (ARMS, *amplification refractory mutation system*, Johnson & Johnson Clinical Diagnostics Ltd, Amersham, UK).

Le balayage partiel ou total des séquences codantes et flanquantes du gène *CFTR* est la stratégie de choix pour la recherche des mutations connues et inconnues. Trois techniques fondées sur la discrimination électrophorétique des ADN normaux et mutés sont utilisées pour détecter une altération de séquence dans un fragment d'ADN amplifié: DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*), SSCA (*single strand conformation analysis*) et HET (analyse d'hétéroduplex contenant des mésappariements). Les portions du gène qui migrent anormalement sont ensuite séquencées pour identifier l'altération nucléotidique responsable.

### Nomenclature des mutations

Nous avons utilisé la nomenclature initialement établie par Beaudet et Tsui [6], récemment révisée [7] (<http://ariel.ucl.ac.uk/~cotton/~antonara.htm>).

## Résultats

### Principales stratégies de détection des mutations *CFTR*

En raison de la structure complexe du gène *CFTR*, le dépistage des mutations s'effectue en plusieurs étapes. Pour 74 % des laboratoires, on recherche d'abord la  $\Delta F508$  (le plus souvent par PAGE) puis les mutations « fréquentes » ou détectables par PCR-restriction, ASO, ou *kit* RDB commercialisé. Quatre laboratoires recherchent uniquement les mutations les plus fréquentes, huit explorent un nombre restreint d'exons par une technique de balayage (DGGE, SSCA ou HET) et seulement trois pratiquent le séquençage fluorescent systématique de quelques segments du gène sans précriblage préalable. Enfin quatre laboratoires sont spécialisés dans le balayage complet des 27 exons *CFTR* et leurs bordures

introniques (ce qui nécessite l'étude de 32 à 33 fragments génomiques), limitant le séquençage aux fragments de migration anormale. En pratique, ces équipes sont souvent sollicitées pour poursuivre l'analyse des allèles non typés par les stratégies précédentes, ce qui explique que le taux global de détection (93,18 %) soit exceptionnellement élevé pour une population de 3 595 patients dans laquelle les 5 principales mutations ne représentent que 74,50 % des allèles mutés.

### Spectre des mutations responsables de mucoviscidose en France

Sur 7 190 gènes *CFTR* analysés, 6 700 allèles mutés (93,18 %) ont pu être caractérisés, 490 allèles (6,81 %) restant non identifiés. Le pourcentage de mutations inconnues varie cependant, selon les méthodes utilisées par les laboratoires, de 2,06 % (balayage des 27 exons par DGGE) à 17,74 % (recherche de 12 mutations). 300 mutations différentes ont été répertoriées (la liste sera prochainement accessible *via* Internet). Nous avons noté cependant que quatre

d'entre elles (R31C, R75Q, F508C, G576A) ont été inscrites comme « mutations » dans les fiches, mais sont classées en « polymorphismes » par le Consortium CFGAC. D'autre part, douze des mutations sont des combinaisons en *cis* (sur le même allèle) de deux altérations de séquence, telles que 3737delA + K1200E,  $\Delta$ F508 + L467F, ou S1235R + 5T.

Les mutations non  $\Delta$ F508 se répartissent en faux-sens (39,59 %), microdélétions ou micro-insertions décalant le cadre de lecture (21,50 %), non-sens (17,77 %), et altérations des sites d'épissage (12,28 %) (figure 2). Les autres types d'anomalies sont rares : délétions d'acides aminés (3195del6), mutations dans le codon de début de traduction (M1K), substitution nucléotidique intronique créant un site d'épissage (3849 + 10 kbC > T), variation d'épissage à effet quantitatif à pénétrance variable (allèle 5T), variations exoniques dont le rôle pathogène reste indéterminé (S1235R, R75Q) ou associations *en cis* de deux altérations de séquence ( $\Delta$ F508 + F508C). Nous avons répertorié seulement trois grandes délétions, dont une à l'état homozygote.

### Distribution des mutations selon leur fréquence

Nous avons distingué quatre groupes (I à IV) selon les fréquences (Tableau I). Dans le groupe des mutations principales, la  $\Delta$ F508 est retrouvée sur 4 833 allèles (67,21 %), avec deux fréquences extrêmes de 81 % (population celtique de Bretagne) et 61 % (populations du sud de la France); seules quatre mutations ont une fréquence supérieure ou égale à 1 % : G542X (2,89 %), N1303K (2,05 %), 1717 – 1G > A (1,33 %) et 2789 + 5G > A (1 %). Un deuxième groupe rassemble 9 mutations dont les fréquences respectives sont comprises entre 0,99 % et 0,40 % : G551D, W1282X, R553X,  $\Delta$ I507, 2183AA > G, 1078delT, 711 + 1G > T, R1162X, et Y1092X. L'ensemble des 14 mutations précédentes représente 80,55 % des 7 190 allèles. Toutes les autres mutations *CFTR* sont rares. Les 133 mutations du groupe III n'apparaissent qu'en 2 à 28 exemplaires. Enfin, les 153 mutations du groupe IV

n'ont été identifiées qu'une seule fois et représentent 2,12 % des allèles.

Les données concernant les origines géographiques des parents étaient insuffisantes pour être exploitables. Nous avons donc choisi de présenter la distribution des principales mutations *CFTR* en fonction des régions de résidence des patients lors de la demande initiale de typage (figure 1), même si les allèles ont été secondairement identifiés par un autre laboratoire. On observe généralement un gradient décroissant de la  $\Delta$ F508 entre le nord (70 %) et le sud (61 %), ainsi que des disparités régionales dans la distribution de certaines mutations. G542X prédomine dans le sud (5,6 % à Montpellier) et le sud-ouest (6,7 % à Bordeaux),  $\Delta$ I507 à Caen (2,76 %), 1078delT en Bretagne (2,4 %), N1303K à Grenoble (4,8 %). D'autres mutations sont visiblement plus « nordiques », telles 394delTT (1,61 %), R553X (2,15 %) ou 2789 + 5G > A (2,87 %) identifiées principalement à Lille.

### Distribution des mutations dans le gène *CFTR*

Les mutations sont inégalement réparties parmi les 27 exons (figure 3).  $\Delta$ F508 et G542X étant particulièrement fréquentes, il n'est pas surprenant que 73,51 % des mutations françaises soient situées dans les exons 10 et 11, codant pour le domaine NBD1 (*nucleotide binding fold-1*) de la protéine CFTR; 10 mutations représentant 68,33 % des allèles totaux (dont 67,21 % dus à  $\Delta$ F508) sont présentes dans l'exon 10, et 16 mutations dans l'exon 11, où prédominent les non-sens. Nous avons dénombré 8 autres exons pour lesquels la fréquence des mutations est voisine de 1 % : exons 3, 4, 7 et 17b codant pour des domaines transmembranaires dans lesquels 55,18 % des mutations sont des faux-sens; exon 13 (domaine R) avec 30 mutations dont 72,97 % décalent le cadre de lecture; exons 19 et 20 avec 29 mutations, dont 54,54 % de non-sens; et exon 21 qui, avec seulement 6 mutations représente 2,27 % des allèles à cause de la fréquence élevée de N1303K. Les exons 19, 20 et 21, codant pour NBD2, totalisent 5,17 % des allèles.

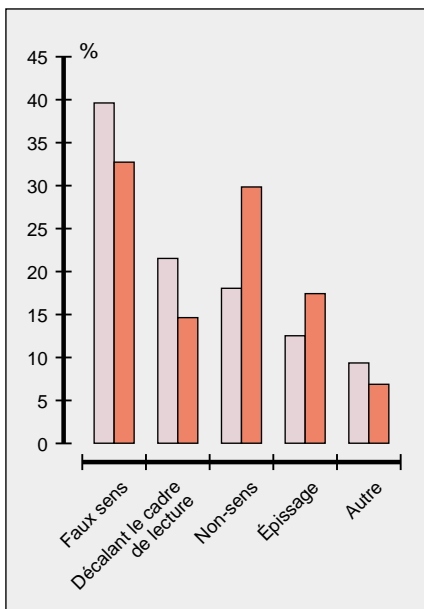


Figure 2. Répartition des mutations *CFTR* non  $\Delta$ F508 selon la nature de l'altération (en bistre), et en intégrant leurs fréquences respectives dans la population des 7 190 allèles analysés (en rouge).

Tableau I

DISTRIBUTION DE 300 MUTATIONS *CFTR* EN QUATRE GROUPES DE FRÉQUENCES DÉCROISSANTES  
(NOMBRE TOTAL D'ALLÈLES MUTÉS = 7 190)

Groupe	Mutations	Nombre d'allèles	% <sup>a</sup>	Fréquences cumulées % <sup>b</sup>
I	ΔF508	4 833	67,21 (61-72)	74,50
	G542X	208	2,89 (1-6,6)	
	N1303K	148	2,05 (0,75-4,5)	
	1717 - 1G > A	96	1,33 (0-2,7)	
	2789 + 5G > A	72	1 (0-2,8)	
II	G551D	70	0,97	6,05
	W1282X	66	0,91	
	R553X	63	0,87	
	ΔI507	48	0,66	
	2183AA > G	48	0,66	
	1078delT	47	0,65	
	711 + 1G > T	32	0,44	
	R1162X	32	0,44	
	Y1092X	29	0,40	
	III	12 mutations	28 à 15	
18 mutations		14 à 8	0,19-0,10	
10 mutations		7 à 6	0,09-0,08	
8 mutations		5	-	
12 mutations		4	-	
28 mutations		3	-	
45 mutations		2	-	
IV	153 mutations	1	-	2,12
Total				93,18

<sup>a</sup> Les variations dans la fréquence des mutations principales selon les régions de France sont indiquées entre parenthèses.

<sup>b</sup> Les fréquences sont cumulées pour chacun des groupes.

### Spectre des génotypes *CFTR* responsables de mucoviscidose

Les 300 mutations recensées sont à l'origine de 506 génotypes différents, dont 86,74 % comportent au moins un allèle ΔF508. Cinq génotypes sont responsables de 57,48 % des cas de mucoviscidose en France: ΔF508/ΔF508 (47,84 %), ΔF508/G542X (3,42 %), ΔF508/N1303K (2,67 %), ΔF508/1717 - 1G > A (2,08 %), et ΔF508/2789 + 5G > A (1,47 %). Les combinaisons de mutations avec ou sans ΔF508 sont présentées selon leur effet sur le gène *CFTR* (figure 4). La diversité des associations responsables de mucoviscidose est évidente si l'on détaille les génotypes dépourvus de ΔF508 (figure 4B): faux-sens (45,74 %), non-sens (43,78 %), déca-

lage du cadre de lecture (28,27 %) et perturbation d'épissage (22,05 %). Au total, il reste 9,16 % de patients pour lesquels une seule mutation *CFTR* a été identifiée et 2,2 % de patients pour lesquels aucune mutation n'est rapportée. Il est intéressant de comparer ces données avec celles qu'obtiendraient les laboratoires s'ils utilisaient seulement un *kit* de détection de huit mutations : dans 31,36 % des cas, une seule mutation serait identifiée, et dans 7,27 % des cas le génotype resterait totalement inconnu (figure 4C).

Nous avons recensé 34 génotypes non-ΔF508 homozygotes, 68 patients sur 1873 (3,63 %) ayant reçu 2 mutations identiques. Bien que les données sur l'origine ethnique et géographique soient incomplètes, on

observe que plus de 50 % des cas d'homozygotie se rencontrent dans des populations originaires de Turquie ou d'Afrique du Nord.

### Mutations *CFTR* chez des patients originaires d'Afrique du Nord

Sur l'ensemble des fiches, 148 allèles ont été mentionnés provenir d'Afrique du Nord (Tunisie, Algérie, Maroc) (Tableau II). Le pourcentage de mutations restant inconnues (14,19 %) est le double de celui obtenu pour la totalité des 3 595 patients de l'étude, mais un plus grand nombre d'allèles a été analysé par des laboratoires détectant seulement quelques mutations. Au total, 30 mutations différentes ont été mises en évidence, dont 16 en un

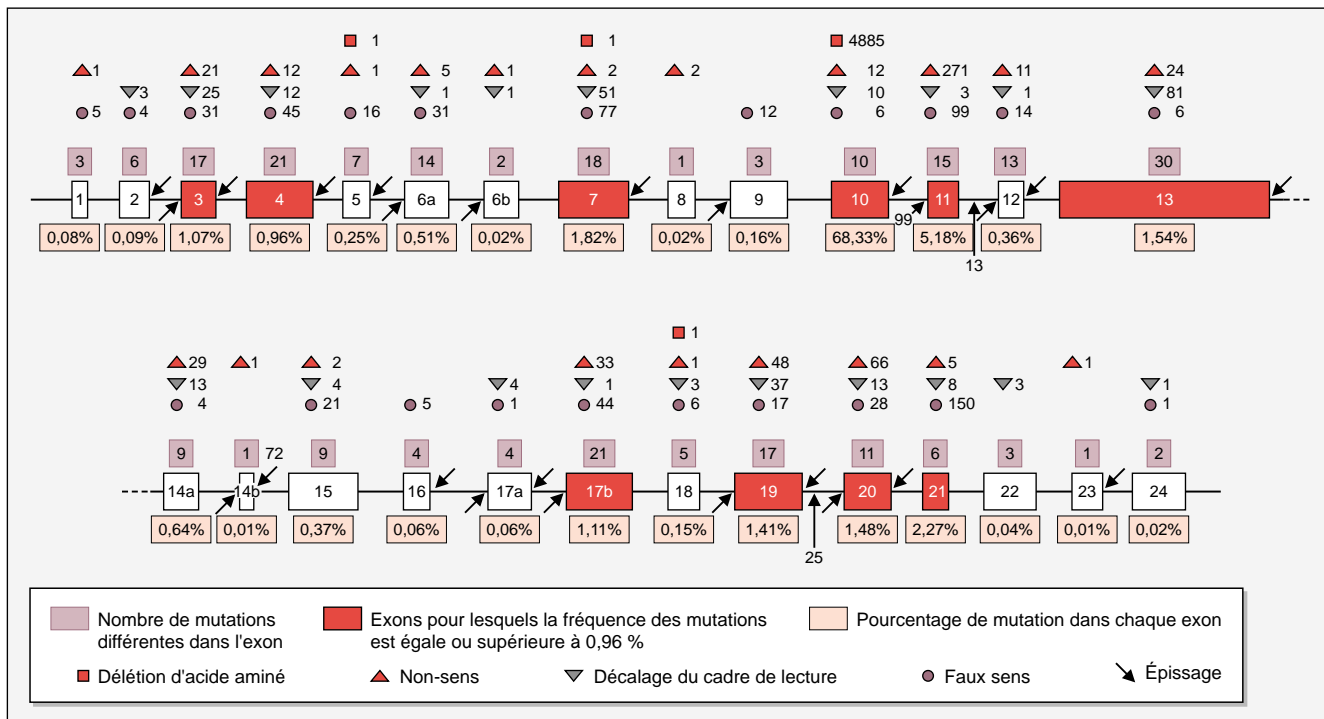


Figure 3. Distribution des mutations dans le gène CFTR.

seul exemplaire. Les principales mutations de ce groupe sont  $\Delta F508$  (32,43 %), 711+1G>T (10,81 %), W1282X (6,75 %), G542X (5,4 %), R1162X (4,05 %), et N1303K (3,37 %). Ce spectre, très différent de celui présenté dans le *Tableau I*, montre l'intérêt pour un laboratoire de connaître l'origine géographique et/ou ethnique des patients pour mieux cibler la recherche des anomalies *CFTR*, en particulier dans le contexte du diagnostic prénatal. En effet, le taux de couverture passera de 50 % (*kit* à 8 mutations) à 67,56 % si l'on explore les 10 exons les plus fréquemment mutés en France ; cependant, un taux de 78,37 % serait atteint si l'on ajoutait l'exploration de l'exon 5 par la DGGE.

## Discussion

### Diagnostic moléculaire de la mucoviscidose en France

L'efficacité de la stratégie en deux étapes (balayage puis confirmation par séquençage) n'est plus à démontrer, puisque 300 mutations différentes ont été identifiées dans cette

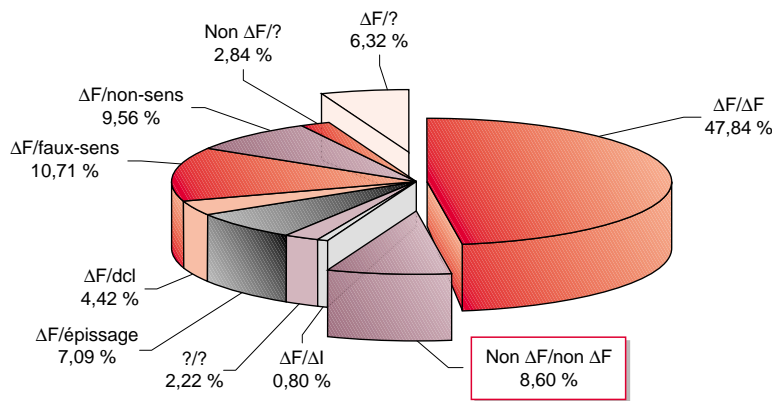
étude, dont 197 (65,66 %) décrites initialement par un laboratoire français. Cette procédure s'avère moins onéreuse que le séquençage systématique et procure une sécurité supplémentaire dans l'analyse génotypique. Selon les conclusions d'un contrôle de qualité *CFTR* organisé récemment à l'échelon européen, 35 % des

136 laboratoires participants ont incorrectement typé un ou plusieurs des 12 allèles inclus dans le test, ce qui paraît inacceptable [8]. Curieusement, en France, les propositions actuelles de cotation, fondées exclusivement sur le diagnostic prénatal, et à effet non cumulatif, ne permettent ni la vérification de la ségrégation fami-

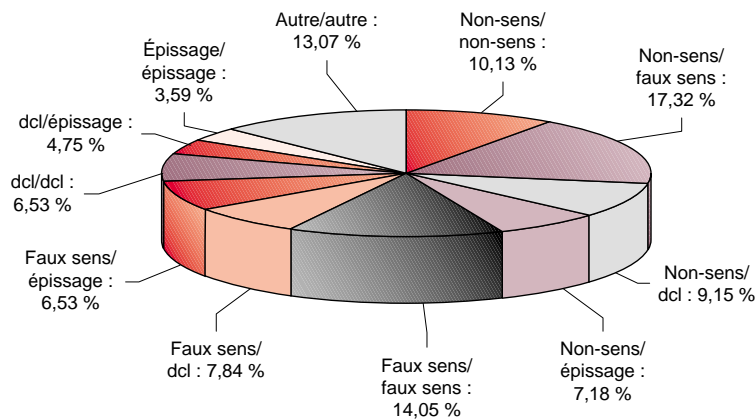
Mutations	Nombre d'allèles avec la mutation	%	Fréquences cumulée %
$\Delta F508$	48	32,43	
711 + 1G > T	16	10,81	43,24
W1282X	10	6,75	50,00
G542X	8	5,40	55,40
R1162X	6	4,05	59,45
N1303K	5	3,37	62,83
24 mutations différentes*	de 3 à 1	22,97	85,81

\* L227R, 2183AA > G, R334W, R347P, V562I, 2113delA, R1158X, 3849 + 10kbC > T, R74W + D1270N,  $\Delta I507$ , S549R, G551D, 1812 - 1G > A, A561E, 2184ins A K710X, R764X, R851X, 2789 + 5G > A, S945L, E1104X, del17b, 3600G > A, N1303H.

### A • Distribution des génotypes (techniques diverses)



### B • Génotypes non ΔF/non ΔF



### C • Distribution des génotypes (recherche de 8 mutations)

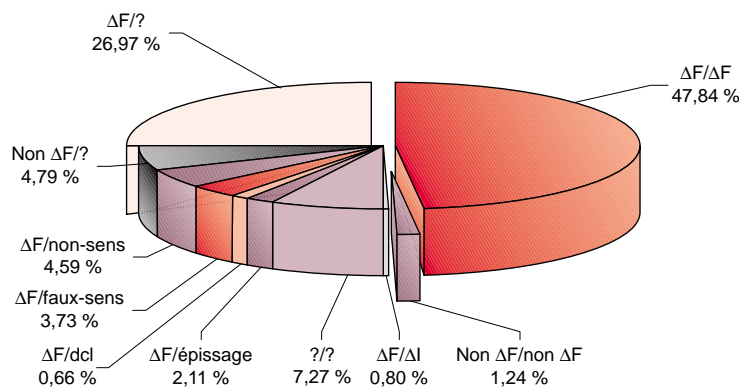


Figure 4. **Diversité des génotypes CFTR responsables de mucoviscidose en France.** A. Distribution des génotypes identifiés dans une population de 3 595 patients par des techniques diverses. B. Détail des génotypes non ΔF508/non ΔF508. C. Simulation de la distribution des génotypes qui seraient caractérisés dans la même population si les 19 laboratoires utilisaient seulement un kit de détection à 8 mutations; ?, mutation inconnue, dcl, mutation entraînant un décalage de phase du cadre de lecture.

### Hétérogénéité allélique de la mucoviscidose

Cette étude démontre la diversité des mutations *CFTR* en France et la complexité des stratégies et techniques qui permettent de les identifier. Seule la Bretagne celtique bénéficie d'un taux de détection proche de 99 % avec l'exploration de 10 exons *CFTR* seulement [10]. A l'inverse, dans les zones où le brassage des populations a été intense, en particulier en région parisienne et sur les bords de la Méditerranée, seule l'exploration complète des séquences *CFTR* par une technique de balayage de type DGGE permet d'approcher ou de dépasser 96 % [11-13]. Les grandes délétions [14] sont rares, même en considérant qu'elles échappent aux méthodes fondées sur l'amplification d'exons à partir d'ADN génomique (la zone délétée est masquée par l'allèle normal). Il est probable que certaines mutations siègent dans les introns ou dans les séquences exoniques non traduites. Enfin, il est possible que des combinaisons de « polymorphismes » et autres « mutants polyvariants » jouent aussi un rôle dans certaines formes de mucoviscidose [15].

### Intérêt d'identifier les mutations CFTR

La caractérisation des mutations présente de nombreux avantages: (1) confirmation du diagnostic lorsque deux mutations délétères sont identifiées; (2) possibilité d'offrir aux familles concernées un diagnostic prénatal précoce, rapide et fiable; (3)

liale des mutations (démarche cependant fortement recommandée [9]), ni le financement des labora-

toires qui réanalysent l'ADN (DGGE/27 exons) pour compléter le typage.

dépistage possible des hétérozygotes parmi les apparentés lorsque le cas index n'a pu être analysé; (4) réduction du risque d'hétérozygotie des conjoints en cas de test négatif; (5) possibilité d'étudier les corrélations entre phénotypes et génotypes; (6) meilleure compréhension des domaines fonctionnels de la protéine CFTR. La connaissance du spectre des mutations caractéristiques d'une population constitue aussi le prérequis d'une argumentation sur la faisabilité d'un dépistage de masse des hétérozygotes.

Nous déduisons de cette étude qu'une recherche de mutation étendue aux 10 exons le plus souvent mutés dans la population française permet de diminuer de façon notable le risque résiduel d'hétérozygotie chez un conjoint de patient ou de porteur hétérozygote. Si la recherche des 8 mutations fréquentes (taux de couverture 76,81 %) est négative, ce risque est de 1/108 (1/25 x 23,19/100); si le test des 14 mutations (80,61 %) est négatif, il passe à 1/129 (1/25 x 19,39/100); si le balayage des 10 exons (87,24 %) est négatif, le risque sera de 1/196 (1/25 x 12,76/100). Une meilleure connaissance de l'incidence de la mucoviscidose et des mutations caractéristiques de chaque région permettra d'affiner les risques de transmission.

Le spectre des manifestations cliniques atypiques ou variables associées à certaines mutations *CFTR* s'est élargi [16], de sorte qu'une révision des critères cliniques et biologiques pour confirmer ou exclure le diagnostic de mucoviscidose a été récemment proposée [17]. Bien qu'il n'existe pas de corrélation absolue entre les phénotypes et les génotypes *CFTR*, on observe une corrélation raisonnable entre le pourcentage résiduel de fonction CFTR normale et l'atteinte des différents organes. On admet que des taux de transcrits *CFTR* normaux compris entre 20 % et 50 % ne sont associés à aucune symptomatologie connue. Au-dessous de 10 % à 20 %, il peut apparaître une stérilité masculine par absence de canaux déférents (*m/s* 1993, n° 3, p. 344); en dessous de 5 %, le test de la sueur est anormal; vers 3-4 % apparaît une maladie pulmonaire, et quand le taux de CFTR est inférieur à 1 %, une insuffisance pancréatique se surajoute [16, 17].

Les canaux à chlorures sont des transporteurs si efficaces (jusqu'à 10<sup>7</sup> ions/seconde) qu'une très petite quantité de CFTR totalement ou partiellement fonctionnelle correctement insérée dans la membrane cellulaire peut suffire pour améliorer considérablement le pronostic vital des patients. Il est donc essentiel de recenser les phénotypes dus à des substitutions d'acide aminé et d'étudier les corrélations phénotype/génotype d'un nombre suffisant de patients afin de compléter les études fonctionnelles d'expression *in vitro* qui, seules, ne sont pas un critère suffisant pour classer définitivement ce type de mutation. De même, l'évaluation des taux de transcrits *CFTR* normaux persistant dans les tissus permet de mieux comprendre la diversité des phénotypes associés à certaines anomalies d'épissage.

En conclusion, l'analyse des allèles et génotypes de 3595 patients révèle la diversité des défauts moléculaires responsables de mucoviscidose en France. Cette étude apporte des informations sur la distribution des principales mutations *CFTR* pour l'ensemble du territoire ainsi que pour certaines régions, qui permettront de préciser les risques de transmission à la descendance. Il devient nécessaire de recenser toutes les altérations de séquence *CFTR* identifiées chez les individus indemnes ou qui manifestent un phénotype clinique, grâce à l'établissement d'une base de données commune *via* Internet entre les laboratoires participants, afin de préciser la pénétrance d'un nombre croissant de combinaisons alléliques actuellement problématiques, en particulier pour le conseil génétique ■

#### Remerciements

Les allèles et génotypes ont été collectés puis analysés par Marie Des Georges et Caroline Guittard entre août 1997 et juin 1998. Cette étude a été initiée et coordonnée par Mireille Claustres. Nous remercions l'AFLM (Association Française de Lutte contre la Mucoviscidose) pour ses encouragements, ainsi que le CHU de Montpellier. Nous sommes reconnaissants au Pr Lap-Chee Tsui (Hospital for Sick Children, Toronto, Canada) pour l'accès privilégié aux mutations *CFTR* et à tous nos collègues cliniciens pour les informations phénotypiques associées aux mutations.

#### RÉFÉRENCES

1. Kerem BS, Rommens JM, Buchanam JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989; 245: 1073-80.
2. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245: 1066-73.
3. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989; 245: 1059-65.
4. Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. Population variation of common cystic fibrosis mutations. *Hum Mut* 1994; 4: 167-77.
5. Estivill X, Bancells C, Ramos C, and the Biomed CF Mutation Analysis Consortium. Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. *Hum Mut* 1997; 10: 135-54.
6. Beaudet AL, Tsui LC. A suggested nomenclature for designating mutations. *Hum Mutat* 1996; 2: 245-8.
7. Antonarakis SE, and the Nomenclature working group. Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. *Hum Mutat* 1998; 11: 1-3.
8. Dequeker E, Cassiman JJ. Evaluation of *CFTR* gene mutation testing methods in 136 diagnostic laboratories: report of a large European external quality assessment. *Eur J Hum Genet* 1998; 6: 165-75.
9. Cotton RGH, Scriver CR. Proof of disease causing mutation. *Hum Mutat* 1998; 12: 1-3.
10. Ferec C, Audrezet MP, Mercier B, Guillermit H, Moullier P, Quere I, Verlingue C. Detection of over 98 % cystic fibrosis mutations in a Celtic population. *Nat Genet* 1992; 1: 188-91.
11. Claustres M, Laussel M, Des Georges M, Giansily M, Culard JF, Razakatsara G, Demaille J. Analysis of the 27 exons and flanking regions of the cystic fibrosis gene: 40 different mutations account for 91,2 % of the mutant alleles in Southern France. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1209-13.
12. Fanen P, Ghanem N, Vidaud M, Besmond C, Martin J, Costes B, Plassa F, Goossens M. Molecular characterization of cystic fibrosis: 16 novel mutations identified by analysis of the whole cystic fibrosis conductance transmembrane regulator (*CFTR*) coding regions and splice site junctions. *Genomics* 1992; 13: 770-6.
13. Bienvenu T, Cazeneuve C, Kaplan JC, Beldjord C. Mutation heterogeneity of cystic fibrosis in France: screening by denaturing gradient gel electrophoresis using psoralen-modified oligonucleotide. *Hum Mutat* 1995; 6: 23-9.
14. Chevalier-Porst F, Bonardot AM, Chazallette JP, Mathieu M, Bozon D. 40 kilobase deletion (CF44kdel4-10) removes exons 4 to 10 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Hum Mutat* 1998 (Suppl. 1): S291-4.



## RÉFÉRENCES

15. Cuppens H, Lin W, Jaspers M, Costes B, Teng H, Vankeerberghen A, Jorissen M, Droogmans G, Reynaert I, Goossens M, Nillius B, Cassiman JJ. Polyvariant mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes. The polymorphic (TG)<sub>m</sub> locus explains the partial penetrance of the T5 polymorphism as a disease mutation. *J Clin Invest* 1998; 101: 487-96.
16. Estivill X. Complexity in a monogenic disease. *Nat Genet* 1996; 12: 348-50.
17. Stern RC. The diagnosis of cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1997; 336: 487-91.

## Summary

### **Molecular basis of cystic fibrosis in France: more than 300 different mutations and 506 genotypes are involved**

We have collated the results of cystic fibrosis (CF) mutation analysis conducted in 19 laboratories in France. 7,190 CF alleles have been analyzed, demonstrating a total of 300 different mutations so far observed and accounting for 93.18% of CF genes in patients living in France. This mutational spectrum represent 40% of the 770 mutations described worldwide.  $\Delta F508$  is the most common at 67.21% of CF mutations (range 61-70 between Northern and Southern regions) including a unique frequency of 81% in the Celtic Brittany, followed by G542X (2.89%; range 1-6.6%), N1303K (2.05%; range 0.75-4.5%), 1717-1G > A (1.33%; range 0-2.7%), and 2789 + 5G > A (1%; range 0-2.8%). Only 9 mutations had relative frequency > 0.4% (G551D, W1282X, R553X,  $\Delta I507$ , 2183AA>G, 1078delT, 711 + 1G > T, R1162X and Y1092X). 133 mutations were found on a small number of CF alleles (from 28 to 2), and 153 were unique. There was a clear geographical and/or ethnic variation in the distribution of several mutations. Overall, at least 506 different genotypes were found responsible for CF. These data demonstrate a high allelic heterogeneity of CF in France and illustrate that the mutations present within a particular population need to be defined in order to provide meaningful carrier screening and testing for rare mutations in affected individuals.

## TIRÉS À PART

M. Claustres.

*m/s n° 12, vol. 14, décembre 98*

# Cours de Biologie Moléculaire de la Cellule

## Enseignement pratique

### 8 mars-9 avril 1999

Ce cours, conjointement organisé par l'Institut Pasteur et l'Institut Curie, se déroulera du 8 mars au 9 avril 1999 à plein temps, à l'Institut Pasteur à Paris. Il est destiné à des chercheurs du secteur public et privé, ayant une formation des facultés de sciences, de médecine, de pharmacie ou des écoles vétérinaires. Les candidats doivent avoir une bonne connaissance, niveau maîtrise, en biologie moléculaire. Les techniques de base de biologie moléculaire ne seront pas enseignées (exemple : clonage, séquençage de gènes, etc.). Ce cours donne lieu à un diplôme de l'Institut Pasteur suite à un examen qui se déroulera à la fin du mois d'avril.

**Le thème central de ce cours concerne l'étude de la cellule eucaryote. Cet enseignement est très orienté vers l'initiation expérimentale, et fera une large place aux nouvelles techniques ainsi qu'à la démarche scientifique actuelle pour l'étude des fonctions cellulaires. Les travaux pratiques seront accompagnés de conférences théoriques sur les thèmes suivants :**

- Organisation fonctionnelle de la cellule : compartiments membranaires, cytosquelette, polarité cellulaire
- Les routages intracellulaires : transport des protéines membranaires et sécrétées, endocytose des macromolécules
- Les contacts et la communication entre cellules
- La différenciation cellulaire
- La signalisation et la transduction des messagers cellulaires
- Le cycle cellulaire

Les techniques mises en œuvre seront celles de l'analyse génétique, la transfection et l'expression de gènes clonés, la culture cellulaire, la reconstitution *in vitro* des fonctions cellulaires, la visualisation des constituants cellulaires y compris par les techniques les plus récentes de microscopie confocale et d'imagerie.

**Avec la participation de :** S. Amigorena, Ch. Babinet, M. Bornens, R. Bruzzone, P. Cossart, A. Dautry-Varsat, F. Dautry, M. Dubois-Dalcq, S. Dufour, E. Fabre, B. Goud, B. Hoflack, C. Hopkins, E. Karsenti, O. Kellerman, P. Lazarow, P. Legrain, D. Louvard, P. Mangeat, J.-C. Olivo, J. Pouyssegur, J.P. Thiéry et M. Weiss. Les cours théoriques seront assurés par des enseignants français et européens.

*Responsables du cours : A. Dautry-Varsat et D. Louvard*

## Renseignements et inscriptions

*Mme Banisso*

Secrétariat des Enseignants et des Stages

Institut Pasteur, 28, rue du Dr-Roux, 75724 Paris Cedex 15, France

Tél. : 01 45 68 81 41 ou 01 40 61 33 62 – Fax : 01 40 61 30 46

E-mail : rbanisso@pasteur.fr