

ABSENCE CONGÉNITALE DES CANAUX DÉFERENTS : PHÉNOTYPE GÉNITAL DE LA MUCOVISCIDOSE ?

Mireille Claustres

Laboratoire de Biochimie Génétique - INSERM U249/ CNRS UPR 9008. Institut de Biologie. Bd Henri IV, 34060 Montpellier cedex.

CONGENITAL BILATERAL ABSENCE OF THE VAS DEFERENS : A PHENOTYPIC CONCOMITANT OF CYSTIC FIBROSIS ?

Because spermatogenesis is typically normal in men with bilateral agenesis of the vas deferens, epididymal sperm recovery for subsequent use in in-vitro fertilization (IVF) has recently been proposed for such patients. The discovery of the presence of mutations in the cystic fibrosis gene in such patients has indicated that this disease might constitute a genital phenotypic concomitant of cystic fibrosis, and has profound genetic implications if the spouse is heterozygous. Testing for mutations of the cystic fibrosis gene, and the provision of genetic counselling as appropriate, should be performed in patients, and their partners, when IVF is being considered for such couples presenting with infertility. The main characteristics of the cystic fibrosis gene and its mutations are discussed, with particular reference to problems in identifying mutations among the 27 exons encoding the gene's product. **Key words :** Cystic fibrosis, bilateral agenesis of the vas deferens, genetic counselling. **Andrologie 1992, 2 : 53-55.**

La mucoviscidose (Cystic Fibrosis, CF) est une maladie héréditaire à transmission autosomique récessive (11) affectant un sujet sur 2500 dans la race blanche, où un sujet sur 20 à 25 est porteur du gène muté à l'état hétérozygote. Un dysfonctionnement des glandes exocrines est responsable des diverses manifestations et complications liées à cette affection dont l'expression pulmonaire et digestive est habituellement caractéristique. On estime que la plupart des sujets de sexe masculin atteints de mucoviscidose "classique" ont des canaux déférents rudimentaires ou absents.

Par ailleurs, l'agénésie bilatérale des canaux déférents est une affection génétique autosomique récessive (11), décrite chez des patients en bonne santé, sans symptomatologie clinique de mucoviscidose.

La découverte du gène de la mucoviscidose en 1989 (6, 9, 10) ayant rendu possible l'étude de la mutation qui en est principalement responsable ($\Delta F508$), une équipe française a eu l'idée de rechercher la présence de cette mutation dans un groupe de patients présentant une agénésie des déférents (3, 8) : 8 sujets sur 19 étaient hétérozygotes pour la mutation $\Delta F508$, soit 42%, alors que la fréquence de cette mutation dans la population générale est de 2,5 à 4%.

Il fallait cependant identifier deux gènes mutants chez chaque patient et non pas un seulement avant d'affirmer que l'agénésie bilatérale des canaux déférents est liée à des mutations du gène de la mucoviscidose, ce qui vient d'être réalisé (avril 1992) par une équipe américaine (1).

L'agénésie bilatérale des canaux déférents, qui était jusqu'ici une entité clinique distincte, devient ainsi un phénotype "génital" de la mucoviscidose grâce à la génétique moléculaire. Au-delà de l'intérêt scientifique de cette découverte, les conséquences pour la descendance doivent être abordées, puisqu'il est maintenant possible de traiter l'infertilité de ces patients (12).

LE GÈNE RESPONSABLE DE LA MUCOVISCIDOSE ET LA PROTÉINE CFTR.

Le développement spectaculaire des techniques de génétique moléculaire a permis l'utilisation de l'approche dite de "génétique inverse" pour localiser le gène CF. Grâce à une analyse de liaison génétique avec des marqueurs ADN définis par des polymorphismes de longueur de fragments de restriction, le gène CF a pu être localisé en 1985 sur le bras long du chromosome 7 (13), puis cloné et séquencé en septembre 1989 (6, 9, 10).

Ce gène de grande taille comprend 250.000 nucléotides et renferme 27 régions codantes (exons) séparées par des régions non codantes (introns). Le message ARN est constitué d'environ 6.500 nucléotides et contient un cadre de lecture ouvert (4.500 nucléotides) correspondant à un polypeptide de 1480 acides aminés (Fig. 1). La structure de cette protéine, appelée CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) présente de fortes similitudes avec une famille de transporteurs membranaires ATPdépendants. Le CFTR contient, comme ces derniers, deux régions transmembranaires ainsi que deux sites de liaison à l'ATP, les "nucleotide binding fold" (NBF). Un domaine supplémentaire (R) renfermant de nombreux sites de phosphorylation par les protéines kinases est spécifique du CFTR. On lui attribue un rôle régulateur dans le fonctionnement du

CFTR, qui présente les caractéristiques d'une protéine jouant un rôle dans la régulation du transport transmembranaire des ions.

LES MUTATIONS DU GÈNE CFTR.

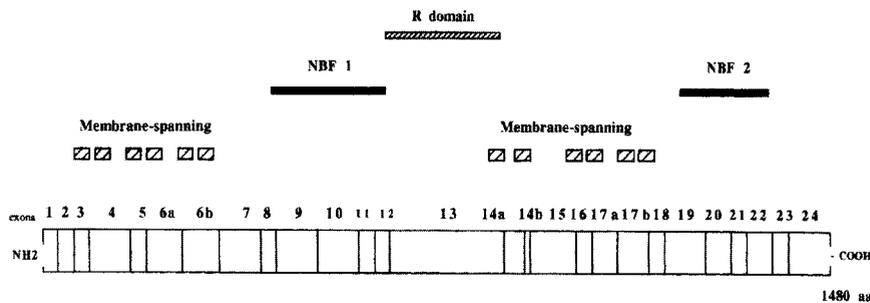
Une délétion de trois paires de bases (un codon) dans l'exon 10 est la cause majeure de la mucoviscidose. Cette altération de la séquence codante, appelée $\Delta F508$, a pour effet de faire disparaître une phénylalanine dans le premier NBF du CFTR (Fig. 2). Les études collaboratives internationales ont démontré que la fréquence de la $\Delta F508$ varie selon un gradient décroissant Nord-Sud : elle est présente sur 80% des chromosomes mutés en Angleterre et au Danemark, et seulement sur 40 à 50% des chromosomes dans les populations originaires d'Italie ou d'Espagne (4). En France, la $\Delta F508$ est associée à 80% des chromosomes CF en Bretagne-Ouest, et seulement à 63% des chromosomes dans le Languedoc-Roussillon.

A l'initiative du Professeur Lap-Chee Tsui de Toronto, un Consortium International d'étude des mutations du gène CFTR a été créé en 1989, mettant en communication télécopiée les laboratoires du monde entier admis au sein de ce Consortium. Grâce à un effort de collaboration internationale sans précédent, plus de 200 mutations différentes ont déjà été répertoriées dans l'ensemble du gène CFTR, et en particulier dans les deux NBF. Il s'agit essentiellement de mutations ponctuelles, affectant le plus souvent un seul nucléotide sur les 4500 que comporte la séquence codante, sauf exceptions. Approximativement la moitié de ces mutations sont des mutations "faux-sens", conduisant à des substitutions d'un acide aminé par un autre dans la protéine CFTR : exemple : G551D (exon 11), remplaçant une glycine par un acide aspartique.

Les mutations "non-sens" sont dues au remplacement d'un codon d'acide aminé par un codon "stop", aboutissant à une terminaison prématurée du polypeptide CFTR et résultant en une protéine tronquée, non fonctionnelle :

exemple : G542X (exon 11), où il manque 938 acides aminés dans la protéine.

Fig. 1 : Le gène responsable de la Mucoviscidose : correspondance entre les exons et les domaines structuraux déduits de la séquence codante.



Plusieurs études sont actuellement en cours pour tenter de déterminer les mutations des sujets qui ne présentent que l'agénésie bilatérale des canaux déférents. S'agit-il de mutations "spécifiques" à ce phénotype génital ou bien va-t-on retrouver les mêmes mutations que dans la population "classique" des sujets mucoviscidiques ?

AGÉNÉSIE DÉFÉRENTIELLE, ÉTUDE DE L'ADN ET CONSEIL GÉNÉTIQUE.

Puisqu'une agénésie congénitale des canaux déférents peut être la manifestation génitale d'une authentique mucoviscidose, il est prudent de rechercher d'éventuelles mutations dans le gène CF chez les patients et leur conjointe avant de proposer une aspiration du sperme avec FIV pour remédier à l'infertilité. En pratique, il convient d'organiser pour ces couples une consultation de conseil génétique auprès d'un généticien compétent en biologie moléculaire et capable de calculer, selon les résultats du laboratoire, le risque de transmission des gènes mutés à la descendance.

Toute analyse de génétique moléculaire est "familiale", et requiert l'ADN du sujet atteint, de ses éventuels frères et soeurs, de ses parents, et de son épouse. L'ADN est extrait des cellules nucléées du sang total (10 ml) recueilli sur EDTA.

Deux types d'études de l'ADN sont réalisés conjointement :

- l'étude de marqueurs proches du gène CF, appelés "polymorphismes de longueur de fragments de restriction" ou RFLPs, qui permettent de définir des "haplotypes" (combinaisons d'allèles) à risque. Certains allèles de ces marqueurs sont en effet en déséquilibre de liaison avec certaines mutations du gène CF, ce qui peut orienter le biologiste moléculaire vers la recherche de certaines mutations plutôt que d'autres. D'autre part, la détermination de ces haplotypes est nécessaire aux calculs de risque.

Cette partie de l'étude moléculaire est rapide (quelques jours ou semaines) mais nécessite une étude familiale de l'ADN.

- la recherche des mutations CFTR.

Il n'est pas possible de rechercher toutes les mutations déjà répertoriées. En pratique, on commence par rechercher les mutations les plus répandues dans une population donnée. Les laboratoires régionaux sont donc indispensables pour connaître les mutations locales. Dans la région Languedoc-Roussillon, nous testons systématiquement les cinq mutations qui, pour l'instant, semblent le plus fréquentes :

ΔF508 (exon 10): (63%)

G542X (exon 11): (5.6%)

ΔI507 (exon 10), 1078 delT (exon 7), N1303K (exon 21): 4%.

Notre laboratoire a entrepris cette année, en collaboration avec le service d'Urologie du Professeur H. Navratil (Nîmes), l'étude du gène CF chez les patients atteints d'agénésie déférentielle consultant pour infertilité. Sur une série de 9 patients, les premiers résultats sont les suivants: trois patients portent

des mutations CFTR à l'état hétérozygote (2 ΔF508 et 1 G542X). Un patient présente la ΔF508 sur un chromosome et la substitution R347H sur l'autre chromosome. Il convient cependant d'être certain que la mutation R347H est bien une mutation pathogène et non un variant très rare.

Afin d'identifier les autres mutations (rares) du gène CFTR qui permettront d'établir définitivement que l'agénésie des canaux déférents est un phénotype génital de la mucoviscidose, il faut explorer systématiquement toute la séquence codante du gène CFTR, exon après exon, ainsi que les parties introniques adjacentes. Nous avons choisi la technique SSCP, et ce travail, mené par Marie Desgeorges, a déjà révélé des anomalies dans plusieurs exons. La séquence des ADN correspondants est en cours.

Cette seconde étape est particulièrement longue et difficile: les patients doivent être avertis des délais très importants de ce type de recherche, d'autant qu'il faudra ensuite déterminer si la mutation trouvée est pathogène ou non.

Par ailleurs, une étude collaborative avec l'équipe de Lille nous a permis de mettre en évidence une mutation particulièrement fréquente chez ces patients.

Chaque fois qu'une mutation pathogène est identifiée chez un patient, il convient de la rechercher aussi chez ses frères et soeurs, dont le risque d'hétérozygotie est de 2/3 avant l'étude de l'ADN. Pour la fratrie, le risque de transmettre la mucoviscidose lors d'une grossesse est en effet loin d'être négligeable :

$2/3 \times 1 \times 1 = 1/150$ (avant étude de l'ADN)

25	4

Risque d'hétérozygotie de la fratrie du patient

Risque d'hétérozygotie du conjoint

Risque de transmission au foetus.

Enfin, il semble logique d'entreprendre, chez les patients atteints d'agénésie des canaux déférents, une investigation poussée des poumons et du système digestif, afin d'établir une description phénotypique aussi complète que possible. De même, la réalisation d'un ou plusieurs tests à la sueur s'impose.

Remerciements : Nous remercions l'Association Française de Lutte contre la Mucoviscidose (AFLM), pour son aide financière et ses encouragements continus depuis 1989. Le manuscrit a été tapé par Thérèse Bousquet et Michel Nicolas.

REFERENCES

- 1 - Anguiano A, Oates RD, Amos JA, et al.: Congenital bilateral absence of the vas deferens. A primarily genital form of cystic fibrosis. JAMA 1992, 267: 1794-1797.
- 2 - The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. World wide survey of the ΔF508 mutation: report from the CFGAC. Am J Genet, 1990, 47: 354-359.
- 3 - Dumur V, Gervais R, Rigot JM, et al. : Abnormal distribution of CF ΔF508 allele in azoospermic

men with congenital aplasia of epididymis and vas deferens. Lancet 1990, 336: 512.

- 4 - European working group on CF genetics (EWGCFG): Gradient of distribution in Europe of the major CF mutation and of its associated haplotypes. Hum Genet 1990, 85: 436-445.
- 5 - Kerem E, Corey M, Kerem B, et al. : The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis: analysis of the most common mutation (ΔF508). N Engl J Med, 1990, 323: 1517-1522.
- 6 - Kerem BS, Rommens JM, Buchanan JA, et al.: Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. Science 1989, 245: 1073-1080.
- 7 - Orita M, Suzuki Y, Sekiya T et al : Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. Genomics, 1989, 5: 874-879.
- 8 - Rigot JM, Laffitte JJ, Dumur V, et al. : Cystic fibrosis and congenital absence of the vas deferens. N Engl J Med, 1991, 325: 65-66.
- 9 - Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, et al.: Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. Science 1989, 245: 1066-1073.
- 10 - Rommens J, Ianuzzi MC, Kerem BC, et al.: Identification of the cystic fibrosis: chromosome walking and jumping. Science 1989, 245: 1059-1065.
- 11 - Scheller TM, Van Stratten A. : Autosomal recessive hereditary congenital aplasia of the vas deferens in four siblings. Fertil. Steril. 1980, 35 : 401-404.
- 12 - Silber J, Ord T, Balmaceda J, Patrizio P, Ash RH.: Congenital absence of the vas deferens. The fertilizing capacity of human epididymal sperm. N Engl J Med, 1990, 323: 1788-1792.
- 13 - Tsui LC, Buchwald M, Barker D, et al. : Cystic fibrosis locus defined by a genetically polymorphic DNA marker. Science 1985, 230: 1054-1057.
- 14 - Zielenski J, Rozmahel R, Bozon D, et al. : Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. Genomics, 1991, 10: 214-228.

RESUME : La spermatogénèse des sujets atteints d'agénésie bilatérale des canaux déférents étant habituellement normale, un prélèvement de sperme au niveau de l'épididyme suivi d'une fécondation in vitro vient d'être récemment proposé aux couples concernés. La démonstration, (publiée en avril 1992), chez ces patients, de la présence de mutations dans le gène de la mucoviscidose, identifie cette maladie comme un phénotype génital probable de mucoviscidose et pose le problème du risque pour la descendance si l'épouse est hétérozygote. Nous rappelons les principales caractéristiques de ce gène et de ses mutations, et attirons l'attention sur la nécessité de prévoir un conseil génétique adapté à ces couples qui consultent pour infertilité. **Mots-clés :** Mucoviscidose, Agénésie bilatérale des canaux déférents, Conseil génétique. **Andrologie 1992, 2 : 53-55.**