

Les génotypes responsables de mucoviscidose ou d'absence bilatérale des canaux déférents ABCD

M. CLAUSTRES

Laboratoire de Génétique Moléculaire, Institut Universitaire de Recherche Clinique, Montpellier

RÉSUMÉ

La dernière décade a dévoilé la base génétique de l'absence bilatérale des canaux déférents (ABCD) en démontrant son association avec des mutations dans le gène CFTR, de sorte que, dans la majorité des cas, l'ABCD est maintenant considérée comme une forme incomplète de mucoviscidose. Nous résumons dans cet article de revue les principaux résultats de la compilation de l'analyse du gène CFTR réalisée par les laboratoires français pour 3923 patients atteints de mucoviscidose typique et 800 hommes en bonne santé présentant une ABCD. Le degré d'expression clinique dépend de plusieurs variables, en particulier des mécanismes moléculaires par lesquels les diverses mutations altèrent ou interrompent l'activité canal ionique de la protéine CFTR. Le spectre clinique varie de la mucoviscidose sévère avec détérioration pulmonaire progressive et insuffisance pancréatique (CF-PI), aux formes pulmonaires atténuées avec conservation des fonctions pancréatiques (CF-PS) ou encore des formes mono ou pauci-symptomatiques dénommées récemment "maladies du CFTR". Dans la mucoviscidose typique, 310 mutations CFTR différentes avaient été identifiées en France en 1999, représentant 94% des 7846 allèles CF. Près de 500 génotypes mutationnels différents avaient été recensés, composés soit de 2 mutations sévères (88%, CF-PI), soit d'une mutation sévère *en trans* d'une modérée (11%, CF-PS) ou de 2 mutations modérées (1% des génotypes identifiés). Dans le groupe ABCD, 137 mutations éparpillées sur l'ensemble du gène CFTR avaient été identifiées dans 60% des 1600 allèles ABCD. Parmi les 150 génotypes caractérisés, l'hétérozygotie composite était la règle, les combinaisons les plus fréquentes étant $\Delta F508/5T$ (35%), $\Delta F508$ /autre mutation (30%),

incluant $\Delta F508/R117H-7T$, 5,6%), et 5T/autre mutation (17%). Par contraste avec le groupe CF, 88% des génotypes identifiés comprenaient une mutation sévère *en trans* d'une modérée, et 12% 2 mutations modérées. Un total de 22 génotypes étaient communs entre les cohortes CF et ABCD. Le rôle de l'allèle 5T comme variant d'épissage à pénétrance incomplète est rappelé. D'autres variations de séquence, tels l'allèle TG12 ou le polymorphisme exonique M470V peuvent influencer l'épissage et/ou la fonction du CFTR.

Cette étude confirme la très grande hétérogénéité moléculaire CFTR dans l'ABCD et la nécessité d'une étude exhaustive du gène pour détecter les mutations chez ces patients. Des études de suivi à long terme des hommes ABCD sont indispensables pour évaluer les conséquences phénotypiques de nombreux génotypes mutationnel.

Mots clés : Absence bilatérale des canaux déférents, agénésie vésiculo-déférentielle, mucoviscidose, gène CFTR, mutations

Correspondance :

Mireille Claustres (PU-PH, MD, PhD), Laboratoire de Génétique Moléculaire, Institut Universitaire de Recherche Clinique, 641 Avenue du Doyen Gaston Giraud, 34093, Montpellier Cedex 5. Tel 04 67 41 53 60 ; Fax 04 67 41 53 65

Communication au XVIII^e Congrès de la Société d'Andrologie de Langue Française, Montpellier, 13-15 décembre 2001.

I. INTRODUCTION

L'absence congénitale bilatérale des canaux déférents (ABCD, ou CBAVD : congenital bilateral absence of vas deferens; MIM # 277180) chez des hommes par ailleurs en bonne santé est associée dans la majorité des cas à des mutations dans le gène CFTR [8, 12, 18, 29, 37]. L'ABCD avec mutation(s) CFTR est donc considérée comme une forme "incomplète" ou "atypique" de mucoviscidose, qui serait responsable d'au moins 6% des cas d'azoospermie obstructive ; la prévalence n'est pas réellement connue, en l'absence d'étude épidémiologique exhaustive. La mucoviscidose (CF, cystic fibrosis; MIM # 219700) concerne environ 5000 personnes en France. L'allongement de l'espérance de vie des patients conduit à une augmentation importante du nombre de ceux parvenant à l'âge adulte : ils représentent aujourd'hui plus de 35% de la population CF. Les questions liées à la fertilité et à la reproduction se posent donc avec une intensité croissante. Chez les garçons atteints de mucoviscidose, on s'attend à une absence bilatérale de canaux déférents dans 97% des cas. Cependant, comme dans l'ABCD isolée, le recueil de spermatozoïdes permet désormais d'envisager une réponse aux désirs de paternité biologique par fécondation *in vitro* [16, 22, 28]. En raison de la transmission de gènes CFTR mutés par l'homme CF ou ABCD, il est impératif d'évaluer le risque de mucoviscidose pour la descendance grâce à la recherche, chez la conjointe, des principales mutations CFTR responsables de mucoviscidose. Une meilleure connaissance de la distribution et de la nature des mutations CFTR dans diverses populations et dans divers phénotypes apparentés à la mucoviscidose permettra d'affiner ce risque. Grâce à la collaboration des laboratoires, nous avons pendant deux ans (de 1998 à 1999) collecté les résultats de l'analyse du gène CFTR réalisée pour 3923 patients atteints de mucoviscidose et 800 hommes présentant une ABCD isolée. Il a ainsi été possible d'établir la fréquence et la distribution des mutations et génotypes CFTR dans diverses régions françaises [4, 11]. L'objectif de cette revue est de réactualiser les données concernant les anomalies du CFTR impliquées dans la mucoviscidose ou dans l'ABCD.

II. LE GÈNE ET LA PROTÉINE CFTR

Le gène dont les mutations sont responsables de mucoviscidose a été identifié en 1989 sur le bras long du chromosome 7 et dénommé CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) puis ABCC7 (HUGO symbol) car il code pour une protéine transmembranaire appartenant à la famille ABC (*ATP Binding Cassette*). Il est exprimé dans divers tissus, épithéliaux ou non, dont l'épididyme [37]. La principale fonction de la protéine CFTR est le transport AMPc-régulé des chlorures à travers la membrane apicale des cellules épithéliales. Cette protéine est aussi impliquée dans divers processus intracellulaires : régulation d'autres types de canaux

ioniques (en particulier les canaux sodiques ENaC), trafic et recyclage des membranes, ou encore régulation du pH intracellulaire. L'absence ou le dysfonctionnement de la protéine CFTR conduit à des sécrétions épithéliales trop visqueuses et à une obstruction des lumières canalaïres. Des informations détaillées sur la biogénèse, la structure, les fonctions et la physiologie du CFTR sont disponibles dans des articles spécialisés [31, 32].

III. LA DISTRIBUTION DES MUTATIONS CFTR EST DIFFÉRENTE DANS LA MUCOVISCIDOSE ET DANS L'ABCD

La compilation des mutations françaises révèle une extrême hétérogénéité allélique (nombre de mutations différentes) : il s'agit du plus large spectre mutationnel CFTR rapporté à ce jour pour la population d'un seul pays. En ce qui concerne la mucoviscidose, 310 mutations étaient identifiées chez les patients français fin 1999, sur un total de 900 mutations CFTR rapportées à cette époque (Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium (CFGAC)). La mutation majoritaire, $\Delta F508$, représente en moyenne 67% des gènes CF dans les populations françaises ; sa fréquence est maximale (80%) en Bretagne celtique, et minimale (60%) en Languedoc-Roussillon. Seulement 14 mutations ont une fréquence supérieure à 0,5%, tandis que toutes les autres sont rares ou "privées" (identifiées dans une seule famille). Dans le groupe ABCD, l'hétérogénéité allélique est encore plus élevée puisque 137 mutations différentes dispersées dans tout le gène CFTR avaient été recensées, sur un total de 1600 allèles. Il y a ici deux mutations majoritaires, $\Delta F508$ (21,75%) et le variant 5T (16,31%). Trois autres mutations sont relativement fréquentes dans l'ABCD : R117H (4,4%), D1152H (1,2%) et D443Y (1%) ; les 132 mutations restantes sont rares ou privées. La distribution des mutations dans les deux groupes diffère de façon évidente, à la fois dans les fréquences relatives et dans les types de mutations (Figure 1). Par exemple, les faux-sens (substitution d'un acide aminé par un autre dans la protéine) représentent 41,6% des mutations identifiées dans la mucoviscidose, contre 61,3% dans l'ABCD ; à l'inverse, les mutations introduisant prématurément un codon stop (nonsens, frame-shift) représentent 41,9% des mutations CF, contre 19,71% dans l'ABCD. 53,28% des mutations identifiées dans le groupe ABCD sont retrouvées aussi dans la mucoviscidose.

IV. L'EFFET MOLÉCULAIRE DES MUTATIONS CFTR : 5 CLASSES PRINCIPALES

A l'état normal, la protéine codée par le gène CFTR doit maturer dans l'appareil de Golgi puis migrer à travers le cytoplasme pour aller s'insérer dans la membrane apicale des cellules épithéliales où elle sert principalement de canal ionique. Les conséquences pour l'individu qui hérite de gènes CFTR mutés sont plus ou moins graves en fonction des classes de mutations (Figure 2).

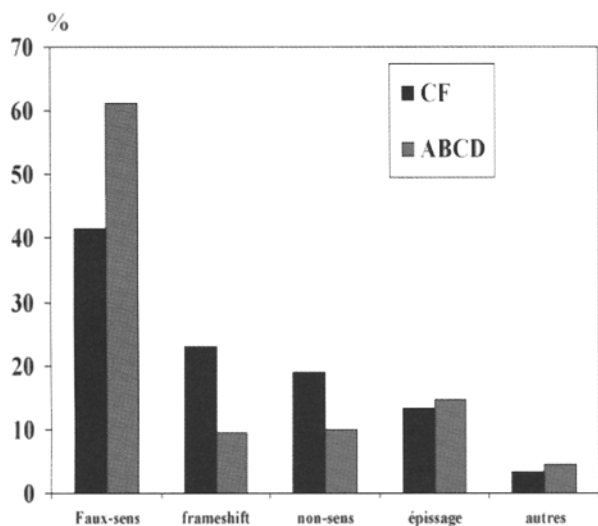
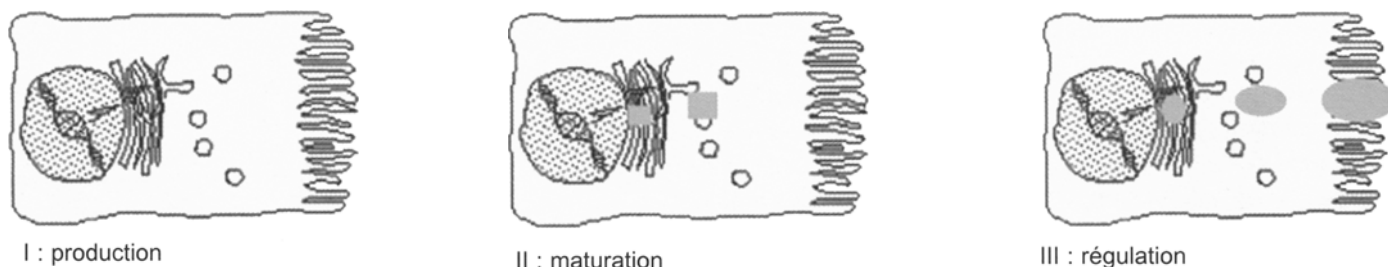


Figure 1 : Distribution des types de mutations *CFTR* dans une série française de 3923 patients atteints de mucoviscidose (CF) et 800 hommes présentant une absence congénitale bilatérale des canaux déférents (ABCD).

A- Mutations engendrant une perte de fonction totale : « mutations sévères » (CF-PI)



B- Mutations engendrant une perte de fonction partielle : « mutations modérées » (CF-PS)

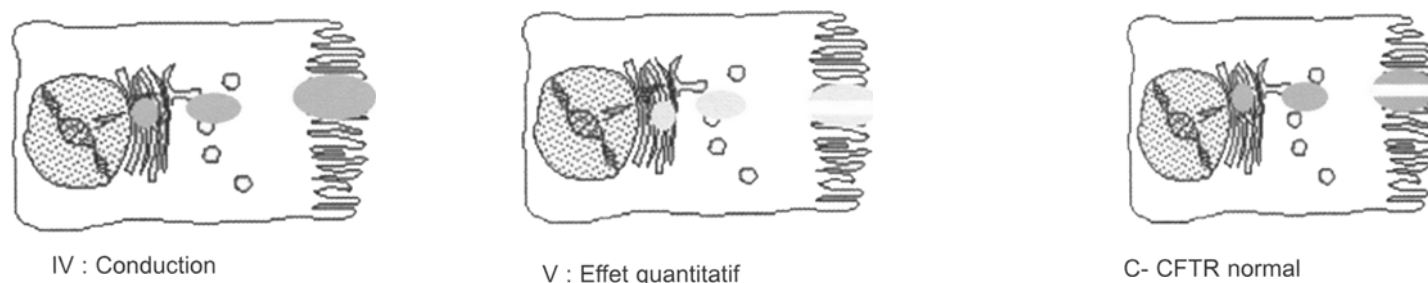


Figure 2 : les 5 principales classes de mutants *CFTR*

- Les mutations de classe I affectent la production de protéine, suite à une mutation *non-sens* (substitution d'un codon d'acide aminé par un codon stop, ex. G542X), à une microdélétion ou microinsertion de nucléotides décalant le cadre de lecture naturel du mRNA *CFTR* et introduisant un codon stop (*mutation frameshift*, ex. 2184delA), ou encore à une substitution nucléotidique altérant l'épissage d'un exon et décalant les codons (ex. 1717-1G>A), prédisant dans tous les cas un arrêt prématuré de la traduction du mRNA *CFTR* en protéine.

- Les mutations de classe II affectent la maturation post-traductionnelle de la protéine *CFTR*. C'est le cas de la protéine $\Delta F508$, qui, suite à un repliement moléculaire incorrect du à l'absence de la phénylalanine en position 508, est détruite avant d'atteindre la membrane apicale de la cellule.

- Les mutations de classe III affectent la régulation de l'activité du canal ionique *CFTR*; il s'agit le plus souvent de mutations faux-sens localisées dans les domaines de liaison de l'ATP de la protéine (ex. N1303K).

Ces trois classes résultent en une perte de fonction CFTR totale ("*allèles nuls*") : les ions chlorure et l'eau ne passent pas à travers les membranes apicales ; il en résulte un déséquilibre hydro-électrolytique des sécrétions exocrines, entraînant une déshydratation majeure du mucus à l'origine de l'obstruction puis de la destruction des tissus, notamment au niveau des poumons ou du pancréas. Les mutants de classe I à III sont dits "sévéres" par référence à l'insuffisance pancréatique exocrine qu'ils entraînent chez un individu qui a hérité de deux mutations de ce type.

- Les mutations de classe IV affectent la conduction ionique CFTR ; il s'agit essentiellement de mutations faux-sens localisées dans les domaines transmembranaires de la protéine (ex. R117H).

- Les mutants de classe V sont dits "quantitatifs" parce qu'ils résultent en la production chez un même individu de deux types d'ARNm CFTR : complets et incomplets, générant par conséquent une certaine proportion (variable selon les mutations, les individus et les tissus) de protéine CFTR normale. Le prototype en est l'allèle 5T, caractéristique de l'ABCD.

Ces deux dernières classes d'altérations engendrent donc une perte de fonction CFTR partielle seulement et sont dites "mild" (mutations "atténuées"). On retrouve ce type de mutants préférentiellement dans les formes incomplètes ou atypiques de mucoviscidose, dont l'ABCD. Plus il y a d'activité résiduelle CFTR, moins sévère est le phénotype clinique. Diverses revues récentes font le point des connaissances concernant les corrélations phénotype-génotype CFTR [17, 26, 38].

V. L'ALLÈLE 5T, UN VARIANT D'ÉPISSAGE À PÉNÉTRANCE INCOMPLÈTE

Dans un gène, seuls les exons portent le message codé (constitué d'une succession de codons) qui sert à synthétiser les protéines. Après transcription du gène en ARN, ces exons, qui sont séparés par des introns, doivent être mis bout à bout au nucléotide près et dans un ordre parfait grâce au processus complexe d'épissage, afin de constituer l'ARNm qui, lui, passera dans le cytoplasme pour être traduit en protéine. Dans l'espèce humaine (seulement), le gène CFTR présente une particularité juste avant l'exon 9 : une séquence de thymidines (T) est "polymorphe" dans la population, ayant une longueur variable selon les individus : 9T, 7T (les plus fréquentes) ou 5T (la plus rare) (Figure 3). Cette séquence intronique intervient dans la machinerie enzymatique complexe chargée de reconnaître l'exon 9 et de l'intercaler entre les exons 8 et 10 dans l'ARNm CFTR. L'allèle 5T est un mauvais substrat pour ce processus, de sorte que l'exon 9 est "sauté" et n'est pas inclus dans certains ARN messagers. Les gènes CFTR portant 5T génèrent ainsi une grande proportion de transcrits incomplets, dépourvus d'exon 9. En conséquence, si on a hérité d'un gène qui porte l'allèle 5T, on fabrique deux types d'ARNm CFTR : des ARNm complets qui seront traduits en protéines CFTR normales, et des ARNm incomplets sans exon 9, qui seront traduits en protéines amputées de 62 acides aminés, non fonctionnelles. La fréquence du 5T ayant été trouvée 4 fois plus élevée chez les hommes ABCD (40%) que dans la population générale (10%), il a été suggéré dès 1995 que ce variant pourrait se comporter comme une mutation délétère dans certaines circonstances [5], sa pathogénicité éventuelle étant directement liée à la propor-

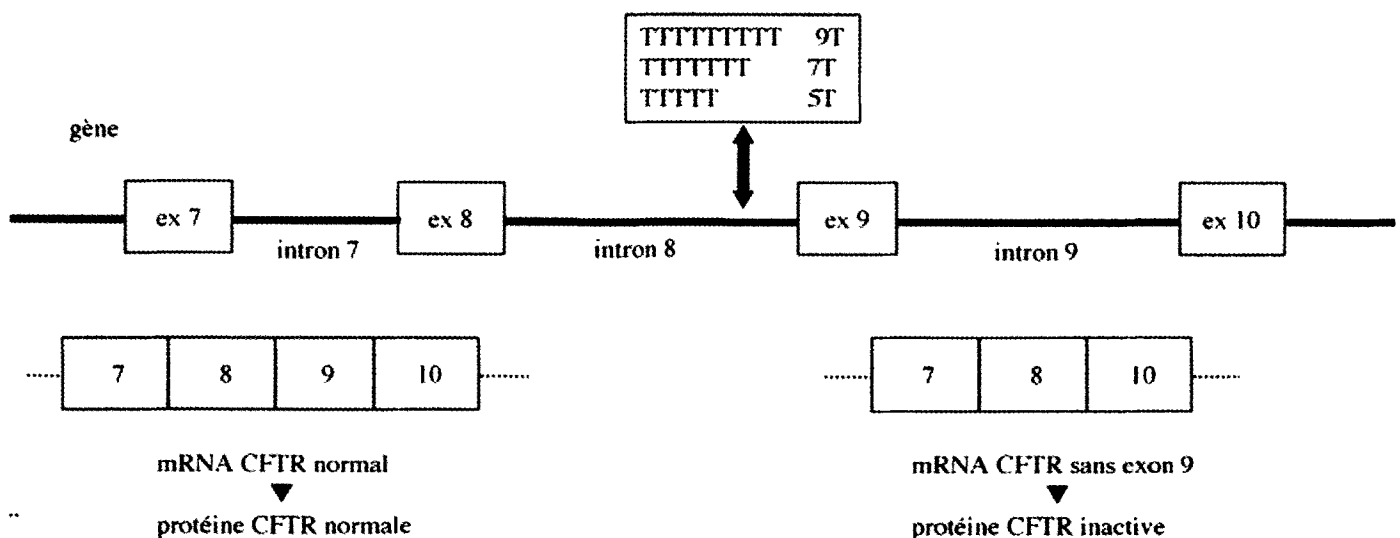


Figure 3 : L'allèle 5T : un variant d'épissage

tion de protéine CFTR active que l'individu peut produire dans les différents tissus.

La pénétrance de l'allèle 5T dans l'ABCD est incomplète, puisqu'on connaît des hommes ΔF508/5T fertiles ; elle a été estimée à 60%.

VI. LES BASES MOLÉCULAIRES DE LA PÉNÉTRANCE VARIABLE DES MUTANTS CFTR

Les connaissances en ce domaine ont énormément bénéficié des résultats des études de corrélations génotype/phénotype et de l'analyse des transcrits CFTR produits dans divers tissus. Deux types de facteurs semblent prédominer.

1- Les facteurs modificateurs hétéroalléliques (situés “*en cis*” par rapport à la mutation)

L'exemple le mieux connu est la mutation faux-sens R117H, survenue sur deux contextes génétiques différents : 5T ou 7T sur le même gène (*en cis*). R117H-7T, associée à une mutation sévère *en trans*, affecte presque exclusivement le tractus reproducteur mâle et ne suffit pas pour altérer les autres tissus. Chez l'homme, cette combinaison peut être associée à une ABCD ; chez la femme, elle peut être associée à des manifestations respiratoires monosymptomatiques très atténuées ou rester totalement asymptomatique. Par contre, si cette combinaison implique R117H-5T, elle déterminera une mucoviscidose avec insuffisance pancréatique, car à l'altération qualitative du canal CFTR muté R117H se surajoute le défaut quantitatif de CFTR engendré par l'allèle 5T.

Certains polymorphismes du gène CFTR pourraient faire varier la quantité et/ou la qualité du canal CFTR. Des chercheurs ont démontré dans des systèmes d'expression *in vitro* que le tract TG de longueur variable situé juste en amont du polyT dans l'intron 8 influence l'épissage de l'exon 9, et que la variation M470V située dans l'exon 10 (substituant une méthionine par une valine) altère la maturation de la protéine correspondante [6]. Nous avons par ailleurs remarqué que l'allèle 5T est préférentiellement associé à l'allèle V470 dans l'ABCD [10]. Cuppens a montré qu'un gène CFTR portant la combinaison [TG12-5T-V470] produit moins de protéine fonctionnelle que les autres haplotypes, ce qui a conduit à la notion de “mutants polyvariants” [6].

Ces données permettent de comprendre qu'un fils consultant pour infertilité due à une ABCD présente le même génotype mutationnel que son père biologique (Figure 4) : tous deux sont hétérozygotes composites pour ΔF508/5T. L'analyse fine du gène CFTR révèle cependant de subtiles différences concernant la combinaison des allèles associés au 5T : l'haplotype paternel [11TG-5T-M470] est différent de l'haplotype maternel qu'a reçu le fils [12TG-5T-V470].

2- Le taux de production des ARNm CFTR complets dans les différents tissus des sujets ABCD. Trois études indépendantes ont démontré que, chez un même individu, les taux d'ARNm CFTR aberrants (dépourvus d'exon 9) sont beaucoup plus élevés dans les tissus dérivés du canal de Wolff que dans l'épithélium nasal, et ce quelle que soit la longueur du polyT-IVS8 [20, 30, 34].

Ces corrélations très subtiles entre phénotype et génotype

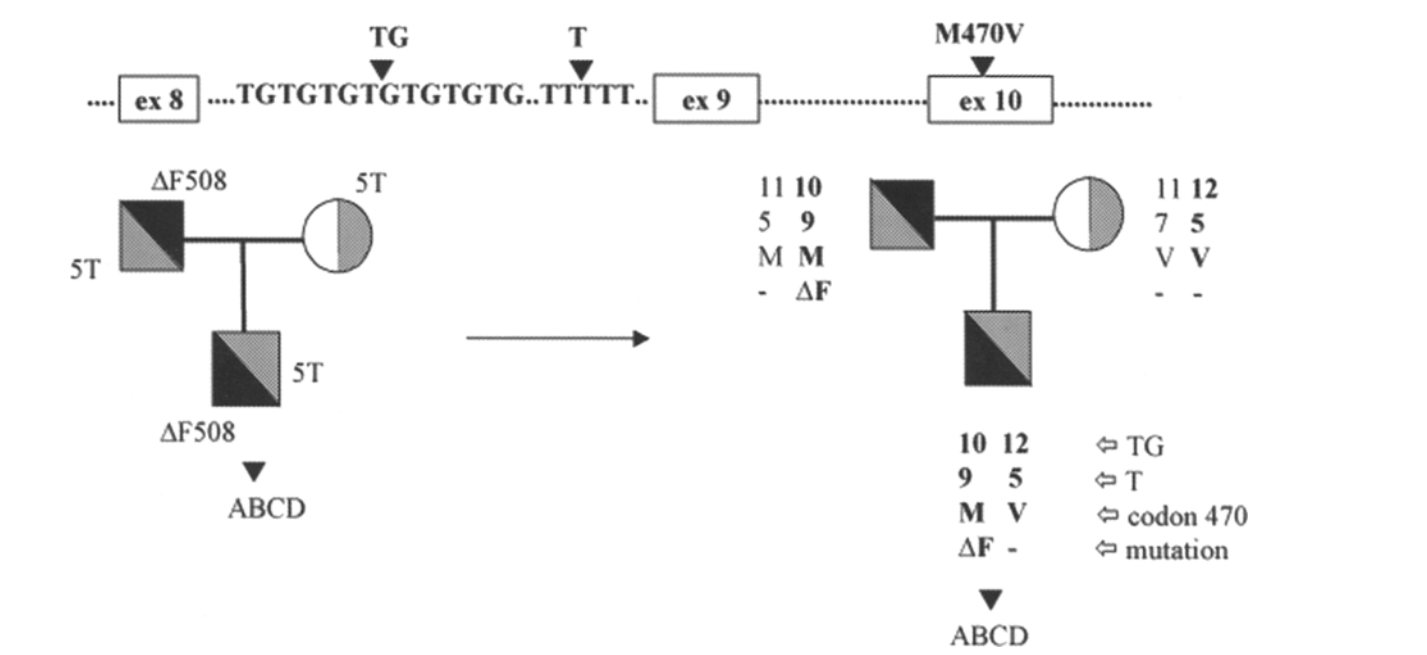


Figure 4 : Les bases moléculaires de la pénétrance variable de l'allèle 5T : les allèles variants polymutants

ont conduit à émettre les deux concepts suivants : a) il existe une valeur-seuil de production de CFTR normal, variable selon les individus et, chez un même individu, selon les tissus ; b) les tissus dérivés du canal de Wolff sont les plus sensibles aux dysfonctionnements du gène CFTR parce que, constitutionnellement, ce sont eux qui expriment les taux les plus bas de transcrits complets générant des protéines fonctionnelles. Cela permet d'expliquer qu'un hétérozygote pour une mutation sévère reste porteur sain toute sa vie parce qu'il produit suffisamment de CFTR dans ses tissus pulmonaires, pancréatiques ou Wolffiens. Par contre un sujet hétérozygote pour la même mutation sévère mais qui a hérité sur l'autre gène d'un allèle 5T aura une ABCD si le taux de production de protéine CFTR normale est en-dessous du seuil toléré par les tissus dérivés du canal de Wolff ; les autres tissus ne seront pas affectés, car la production de CFTR sera largement en-dessus du seuil.

VII. LA DISTRIBUTION DES GÉNOTYPES CFTR EST DIFFÉRENTE DANS LA MUCOVISCIDOSE ET L'ABCD

S'agissant d'une maladie transmise sur le mode autosomique récessif, la mucoviscidose requiert la présence de deux allèles mutés "*en trans*" (hérités de chacun des parents : ex. ΔF508/N1303K), dont le type et la classe influent sur le phénotype. Chez un sujet ayant hérité de deux mutations de classes I à III, il n'y a pas de protéine fonctionnelle, et le phénotype sera une mucoviscidose sévère, dite "CF-PI" (cystic fibrosis with *pancreatic insufficiency*). Un individu qui hérite d'une mutation mild et d'une mutation sévère, ou qui, *a fortiori*, hérite de deux mutations mild, présentera une "CF-PS" (cystic fibrosis with *pancreatic sufficiency*) ou des formes incomplètes, telles l'ABCD (Figure 5).

En ce qui concerne la mucoviscidose, les deux mutations avaient été identifiées, en 1999, chez 90% des 3923 patients CF. Cinq génotypes sont responsables de 57,30% des cas de mucoviscidose en France : l'homozygotie [2 mutations identiques *en trans*] ΔF508/ΔF508 (47,75%), l'hétérozygotie composite [2 mutations différentes *en trans*] ΔF508/G542X (3,4%), ΔF508/N1303K (2,7%),

ΔF508/1717-1G->A (2,02%) et ΔF508/2789+5G->A (1,43%). Les 42,7% restants comprenaient des hétérozygotes composites pour la ΔF508 et une autre mutation (32,89%) et des homozygotes ou des hétérozygotes composites pour des mutations rares (9,81%). Les diverses combinaisons de mutations ont engendré un total de 500 génotypes mutationnels CFTR différents. Dans le groupe ABCD, l'hétérozygotie composite est la règle : ΔF508/5T (35%), ΔF508/autre mutation (30%), 5T/autre mutation (17%), autres combinaisons (18%) avec au total 150 génotypes différents recensés pour les 381 hommes ABCD chez qui deux altérations CFTR avaient été identifiées lors de la compilation des résultats. Il est intéressant de noter que 22 génotypes sont retrouvés à la fois dans le groupe CF et ABCD, témoignant d'un chevauchement certain entre les formes dites "CF-PS" de mucoviscidose et l'ABCD. La composition des génotypes est différente dans les deux groupes : 88% des génotypes CF sont composés de 2 mutations sévères, situation jamais rencontrée dans l'ABCD, où 88% des génotypes sont composés d'une sévère *en trans* d'une "mild" et 12% de deux "mild" (Figure 5). Au total, 7 hommes ABCD sur 800 étaient homozygotes pour l'allèle 5T; cette proportion peut être beaucoup plus élevée dans d'autres populations, égyptiennes par exemple [19].

VIII. LE DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE DES MUTATIONS CFTR

On distingue deux types d'approches, très différentes en terme de coût et d'efficacité. La détection ciblée des mutations les plus fréquentes de la mucoviscidose (méthodes de "*screening*") est facilement réalisable grâce à un kit commercial et d'un coût modeste (de l'ordre de 800 à 1500 F selon le nombre de mutations couvertes par le kit : de 8 à 31). Par contre, la recherche de toute anomalie de séquence du gène CFTR par balayage de 35 régions du gène (méthodes de "*scanning*") n'est réalisable que dans un laboratoire spécialisé, mobilisant un personnel hautement qualifié pendant plusieurs semaines, et dont le coût élevé ne fait pour l'instant l'objet d'aucune cotation officielle. Les résultats de l'étude concernant le génotypage de 3923 patients français atteints de mucoviscidose ont permis de montrer que les kits actuels détectent 75 à 83% des allèles CF selon les diverses régions de France (où l'hétérogénéité des populations est plus ou moins importante) ; le balayage additionnel de tous les exons CFTR permet d'atteindre des taux maximum de 96 à 98%.

Dans l'ABCD, une proportion très importante d'altérations CFTR sont non détectées par les analyses de routine [4, 21]. En effet, si on utilise un "kit CF à 31 mutations plus l'allèle 5T", on identifie 2 mutations chez 48% et 1 mutation chez 24% des sujets ABCD (Figure 6). Les laboratoires qui rajoutent à ce kit un balayage exhaustif du gène permettent d'identifier 2 mutations chez 71% des ABCD; restent donc

Mutations CFTR	CF classique	ABCD
sévère/sévère	88% CF-PI	0
sévère/mild	11% CF-PS	88%
mild/mild	1% atypique	12%

Figure 5 : Les génotypes mutationnels CFTR dans la Mucoviscidose (CF) et dans l'absence congénitale bilatérale des canaux déférents (ABCD)

CFTR	Kit «CF» 31 mutations plus le variant 5T	Scanning du gène (DGGE, dHPLC*)
2 mutations	48%	71%
1 mutation	24%	16%
0 mutation	28%	13%

*DGGE, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis ; dHPLC, denaturing High Pressure Liquid Chromatography

Figure 6 : La détection des mutations CFTR dans l'ABCD

seulement 16% de patients chez qui on ne détecte qu'une mutation ; au total, 87% des ABCD peuvent ainsi être rattachées à un dysfonctionnement du CFTR. Il est impératif de vérifier la ségrégation des allèles mutés CFTR chez les deux parents du sujet CF ou ABCD, ce qui permet de confirmer l'identité des mutations. En outre, c'est le seul moyen pour déterminer si deux altérations de séquence sont situées sur le même gène (mutations "en cis") ou sur les deux gènes parentaux homologues (mutations alléliques ou "en trans"). Cette démarche fait donc partie du diagnostic génotypique et permet en outre d'identifier ou d'exclure formellement les hétérozygotes dans les branches maternelles et paternelles de la famille [15]. Il reste donc seulement 13% d'ABCD où l'on ne retrouve aucune altération du gène CFTR malgré un criblage intense: ces formes relèvent vraisemblablement d'altérations d'autres gènes et d'autres processus physiopathologiques.

Le test de la sueur doit faire partie intégrante du protocole diagnostique de l'ABCD : il est positif dans 40 à 50% des cas ; de plus, ses résultats sont précieux pour la classification de certaines mutations ou de certains génotypes CFTR.

Diverses études ont montré que l'absence unilatérale de canal déférent (AUCD) peut être associée au dysfonctionnement du CFTR, en particulier s'il y a une obstruction du canal controlatéral [3, 12, 21, 25]. D'autres types d'azoospermie obstructive avec canaux déférents intacts, telle l'obstruction épидидymaire ou l'obstruction bilatérale des canaux éjaculateurs, sont associés à des mutations CFTR [14, 24]. Par contre, la fréquence des mutations CFTR ne semble pas augmentée chez les patients présentant des anomalies isolées des vésicules séminales [24].

IX. QUELLE EST L'IMPLICATION DES MUTATIONS CFTR DANS L'ABCD ASSOCIÉE À L'AGÉNÉSIE RÉNALE UNILATÉRALE OU DANS LES ANOMALIES DE LA SPERMATOGÉNÈSE ?

Le rôle du gène CFTR dans les 5 à 10% d'ABCD associées à une agénésie rénale unilatérale (ABCD-ARU) reste inconnu à ce jour. En effet, aucune mutation CFTR n'ayant

été identifiée dans l'ABCD-ARU, il était logique de penser qu'elle a une base génétique différente de l'ABCD-CFTR, conduisant au développement anormal de la totalité du canal mésonéphrique et ses dérivés (système rein/uretère, et système canal déférent/vésicule séminale/2/3 distaux de l'épididyme) à un stade très précoce de l'embryogénèse (avant la septième semaine de gestation) [1, 9, 23]. On admet que l'ABCD-CFTR n'affecte que le système "reproductif" (canal déférent/vésicule séminale/2/3 distaux de l'épididyme) après la septième semaine (date de la séparation des deux systèmes), voire après la naissance puisqu'une étude anatomopathologique de deux fœtus atteints de mucoviscidose a révélé la présence de canaux déférents normaux [13]. Il est même préconisé de ne pas explorer le gène CFTR dans l'ABCD-ARU. Ces données viennent d'être perturbées par la description de quelques cas d'ABCD-ARU porteurs d'une ou de deux mutations CFTR [3, 7, 12, 21]. Des études sur des cohortes beaucoup plus importantes sont nécessaires pour déterminer si la fréquence des mutations CFTR dans l'ABCD-ARU est supérieure à celle qu'on trouverait dans la population générale d'où sont issus les sujets étudiés.

Enfin, des résultats contradictoires ont été rapportés récemment concernant l'implication du CFTR dans diverses anomalies du sperme : les fréquences élevées de mutations CFTR rapportées par certains auteurs [36] ne sont pas retrouvées dans d'autres populations [2, 27, 35].

X. CONCLUSION

En conclusion, il est essentiel de prévoir un suivi clinique à long terme de chaque patient ABCD par un pneumologue spécialisé dans la mucoviscidose adulte. La littérature médicale et scientifique ne cesse de rapporter l'implication des mutations CFTR dans un nombre croissant de formes monosymptomatiques, incluant la polypose nasale, les bronchiectasies diffuses, certaines formes d'aspergillose allergique bronchopulmonaire, de pancréatites chroniques idiopathiques, ou encore d'anomalies du sperme. Nos connaissances sur l'évolution et le pronostic des phénotypes engendrés par certaines combinaisons de mutations CFTR ne pourront progresser que grâce à l'étude clinique exhaustive des personnes qui en ont hérité. De plus, ces informations sont indispensables pour informer les couples à risque dans le cadre des consultations spécialisées de conseil génétique.

RÉFÉRENCES

1. AUGARTEN A., YAHAV Y., KEREM B.S., et al. : Congenital bilateral absence of vas deferens in the absence of cystic fibrosis [see comments]. *Lancet.*, 1994, 344 : 1473-1474.
2. BOUCHER D., CREVEAUX I., GRIZARD G., JIMENEZ C., HERMABESSIERE J., DASTUGUE B. : Screening for cystic

- fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations in men included in an intracytoplasmic sperm injection programme. *Mol. Hum. Reprod.*, 1999, 5 : 587-593.
3. CASALS T., BASSAS L., EGOZCUE S., et al. : Heterogeneity for mutations in the CFTR gene and clinical correlations in patients with congenital absence of the vas deferens. *Hum. Reprod.*, 2000, 15 : 1476-1483.
 4. CLAUSTRES M., GUITTARD C., BOZON D. et al. : Spectrum of CFTR mutations in cystic fibrosis and in congenital absence of the vas deferens in France. *Hum. Mutat.*, 2000, 16 : 143-156.
 5. CHILLON M., CASALS T., MERCIER B., et al. : Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N. Engl. J. Med.*, 1995, 332 : 1475-1480.
 6. CUPPENS H., LIN W., JASPERS M., et al. : Polyvariant mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes. The polymorphic (TG)_m locus explains the partial penetrance of the T5 polymorphism as a disease mutation. *J. Clin. Invest.*, 1998, 101 : 487-496.
 7. DAUDIN M., BIETH E., BUJAN L., MASSAT G., PONTONNIER F., MIEUSSET R. : Congenital bilateral absence of the vas deferens: clinical characteristics, biological parameters, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations, and implications for genetic counseling. *Fertil. Steril.*, 2000, 74 : 1164-1174.
 8. DE BRAEKELEER M., FEREC C. : Mutations in the cystic fibrosis gene in men with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Mol. Hum. Reprod.*, 1996, 2 : 669-677.
 9. DE LA TAILLE A., RIGOT J.M., MAHE P., et al. : Correlation between genito-urinary anomalies, semen analysis and CFTR genotype in patients with congenital bilateral absence of the vas deferens [published erratum appears in *Br. J. Urol* (1998), 82, 777]. *Br. J. Urol.*, 1998, 81 : 614-619.
 10. DE MEEUS A., GUITTARD C., DESGEORGES M., CARLES S., DEMAILLE J., CLAUSTRES M. : Linkage disequilibrium between the M470V variant and the IVS8 polyT alleles of the CFTR gene in CBAVD. *J. Med. Genet.*, 1998, 35 : 594-596.
 11. DES GEORGES M., GUITTARD C., BOZON D., et al. : Les bases moléculaires de la mucoviscidose en France : plus de 300 mutations et 506 génotypes différents sont en cause. *Médecine-Sciences.*, 1998, 14 : 1413-1421.
 12. DORK T., DWORNICZAK B., AULEHLA-SCHOLZ C., et al. : Distinct spectrum of CFTR gene mutations in congenital absence of vas deferens. *Hum. Genet.*, 1997, 100 : 365-377.
 13. GAILLARD D.A., CARRE-PIGEON F., LALLEMAND A. : Normal vas deferens in fetuses with cystic fibrosis. *J. Urol.*, 1997, 158 : 1549-1552.
 14. JARVI K., ZIELENSKI J., WILSCHANSKI M., et al. : Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and obstructive azoospermia. *Lancet.*, 1995, 345 : 1578.
 15. GIRODON-BOULANDET E., CAZENEUVE C., GOOSSENS M. : Screening practices for mutations in the CFTR gene ABCC7. *Hum. Mutat.*, 2000, 15 : 135-149.
 16. JOSSERAND R.N., BEY-OMAR F., ROLLET J., LEJEUNE H., BOGGIO D., DURAND DV., DURIEU I. : Cystic fibrosis phenotype evaluation and paternity outcome in 50 males with congenital bilateral absence of vas deferens. *Hum. Reprod.*, 2001, 16 : 2093-2097.
 17. KEREM B., KEREM E. : The molecular basis for disease variability in cystic fibrosis. *Eur. J. Hum. Genet.*, 1996, 4 : 65-73.
 18. LISSENS W., LIEBAERS I. : The genetics of male infertility in relation to cystic fibrosis. *Baillieres Clin. Obstet. Gynaecol.*, 1997, 11 : 797-817.
 19. LISSENS W., MAHMOUD K.Z., EL-GINDI E., et al. : Molecular analysis of the cystic fibrosis gene reveals a high frequency of the intron 8 splice variant 5T in Egyptian males with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Mol. Hum. Reprod.*, 1999, 5 : 10-13.
 20. MAK V., JARVI K.A., ZIELENSKI J., DURIE P., TSUI L.C. : Higher proportion of intact exon 9 CFTR mRNA in nasal epithelium compared with vas deferens. *Hum. Mol. Genet.*, 1997, 6 : 2099-2107.
 21. MAK V., ZIELENSKI J., TSUI L.C., et al. : Proportion of cystic fibrosis gene mutations not detected by routine testing in men with obstructive azoospermia. *JAMA.*, 1999, 281 : 2217-2224.
 22. MCCALLUM T.J., MILUNSKY J.M., CUNNINGHAM D.L., HARRIS D.H., MAHER T.A., OATES R.D. : Fertility in men with cystic fibrosis: an update on current surgical practices and outcomes. *Chest.*, 2000, 118 : 1059-1062.
 23. MCCALLUM T., MILUNSKY J., MUNARRIZ R., CARSON R., SADEGHI-NEJAD H., OATES R. : Unilateral renal agenesis associated with congenital bilateral absence of the vas deferens: phenotypic findings and genetic considerations. *Hum. Reprod.*, 2001, 16 : 282-288.
 24. MESCHÉDE D., DWORNICZAK B., BEHRE H.M., KLIESCH S., CLAUSTRES M., NIESCHLAG E., HORST J. : CFTR gene mutations in men with bilateral ejaculatory-duct obstruction and anomalies of the seminal vesicles. *Am. J. Hum. Genet.*, 1997, 61 : 1200-1202.
 25. MICKLE J., MILUNSKY A., AMOS J.A., OATES R.D. : Congenital unilateral absence of the vas deferens: a heterogeneous disorder with two distinct subpopulations based upon aetiology and mutational status of the cystic fibrosis gene. *Hum. Reprod.*, 1995, 10 : 1728-1735.
 26. MICKLE J.E., CUTTING G.R. : Genotype-phenotype relationships in cystic fibrosis. *Med. Clin. North. Am.*, 2000, 84 : 597-607.
 27. PALLARES-RUIZ N., CARLES S., DES GEORGES M., GUITTARD C., ARNAL F., HUMEAU C., CLAUSTRES M. : Complete mutational screening of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene: cystic fibrosis mutations are not involved in healthy men with reduced sperm quality. *Hum. Reprod.*, 1999, 14 : 3035-3040.
 28. PHILLIPSON G.T., PETRUCCO O.M., MATTHEWS C.D. : Congenital bilateral absence of the vas deferens, cystic fibrosis mutation analysis and intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 2000, 15 : 431-435.
 29. QUINZII C., CASTELLANI C. : The cystic fibrosis transmembrane regulator gene and male infertility. *J. Endocrinol. Invest.*, 2000, 23 : 684-689.
 30. RAVE-HAREL N., KEREM E., NISSIM-RAFINIA M., et al. : The molecular basis of partial penetrance of splicing mutations in cystic fibrosis. *Am. J. Hum. Genet.*, 1997, 60 : 87-94.
 31. RIORDAN J.R. : Cystic fibrosis as a disease of misprocessing of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator glycoprotein. *Am. J. Hum. Genet.*, 1999, 64 : 1499-1504.
 32. SHEPPARD D.N., WELSH M.J. : Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol. Rev.*, 1999, 79 : S23-S24.
 33. STUHRMANN M., DORK T. : CFTR gene mutations and male infertility. *Andrologia.*, 2000, 32 : 71-83.
 34. TENG H., JORISSEN M., VAN POPPEL H., LEGIUS E., CASSIMAN J.J., CUPPENS H. : Increased proportion of exon 9

- alternatively spliced CFTR transcripts in vas deferens compared with nasal epithelial cells. *Hum. Mol. Genet.*, 1997, 6 : 85-90.
35. TUERLINGS J.H., MOL B., KREMER J.A., et al. : Mutation frequency of cystic fibrosis transmembrane regulator is not increased in oligozoospermic male candidates for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 1998, 69 : 899-903.
 36. VAN DER VEN K., MESSER L., VAN DER VEN H., JEYENDRAN R.S., OBER C. : Cystic fibrosis mutation screening in healthy men with reduced sperm quality. *Hum. Reprod.*, 1996, 11 : 513-517.
 37. WONG P.Y. : CFTR gene and male fertility. *Mol. Hum. Reprod.*, 1998, 4 : 107-110.
 38. ZIELENSKI J. : Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration.*, 2000, 67 : 117-133.

ABSTRACT

Genotypes Responsible For Cystic Fibrosis (CF) or CBAVD (Congenital Bilateral Absence of Vas Deferens) in France

M. CLAUSTRES

Over the last decade, the genetic basis for CBAVD has been identified by its association with CFTR gene mutations, and CBAVD is now generally considered to be a mild or incomplete form of CF. In this review, the author summarizes the main results of compilation of CFTR gene analysis conducted in French laboratories for 3,923 patients with CF and 800 males with CBAVD. The degree of clinical expression can be affected by several variables, including the molecular mechanisms by which the various CFTR mutations impair or disrupt the function of the CFTR chloride channel. Phenotypic expression of CFTR mutational genotypes varies from severe, progressive pulmonary disease with pancreatic insufficiency (CF-PI), to mild pulmonary disease with pancreatic sufficiency (PS) or single-organ forms of "CFTR-opathies". In CF, a total of 310 different CFTR mutations accounting for 94% of 7,846 CF alleles have generated almost 500 different genotypes, comprising 2 severe mutations in 88% of cases (CF-PI), one severe mutation in trans to a mild mutation in 11% (CF-PS), and 2 mild mutations in 1% of identified genotypes. In CBAVD, 137 mutations scattered over the whole gene were identified in 60% of 1,600 CBAVD alleles during the study. Among the 150 characterized mutational CFTR genotypes, compound heterozygosity was the rule, and the most frequent CBAVD combinations were $\Delta F508/5T$ (35%), $\Delta F508$ /other mutation (30%, including $\Delta F508/R117H-7T$: 5,6%), and $5T$ /other mutation (17%). No combina-

tion of two severe mutations was found in CBAVD (0%); by contrast with the CF population, 88% of genotypes identified in CBAVD comprised a severe mutation in trans to a mild mutation, and 12% consisted of 2 mild mutations. A total of 22 genotypes were shared by both CF and CBAVD. The role of the 5T allele as a splicing variant with variable, incomplete disease penetrance in CBAVD is reviewed. Other haplotype backgrounds, such as the TG12 sequence and the M470V polymorphism, may influence CFTR splicing and/or function. This study confirms the high molecular heterogeneity of CFTR mutations in CBAVD and emphasizes the importance of extensive CFTR analysis in these patients. Long-term follow-up studies of CBAVD patients are necessary in order to predict the phenotypic consequences of numerous CFTR mutational genotypes.

Key words: CBAVD, CF, CFTR gene, mutation detection