

# Gène CFTR et infertilité masculine en 2001

## Conseil génétique, diagnostic prénatal, diagnostic pré-implantatoire

M. DES GEORGES

Laboratoire de génétique Moléculaire, Institut Universitaire de Recherche Clinique (IURC), Montpellier.

### RÉSUMÉ

80 % des patients ABCD (Absence Bilatérale Congénitale des Canaux Déférents) portent des mutations du gène CFTR. En raison de la possibilité de procréation médicalement assistée et de la fréquence élevée de porteurs hétérozygotes dans la population générale (1/25 chez les caucasiens), il existe un risque réel pour ces couples de transmettre la mucoviscidose à l'enfant à naître.

Après une évaluation rigoureuse clinique et biologique, le patient est adressé à une consultation spécialisée de conseil génétique qui informe le couple sur le risque de transmission des maladies génétiques et organise les prélèvements en vue d'une analyse moléculaire.

Le génotypage complet du patient est complété par une recherche de 20 à 30 mutations parmi les plus sévères chez la conjointe et choisies en fonction de ses origines ethniques. Cette analyse permet dans nos populations de couvrir plus de 80 % des mutations responsables de la mucoviscidose et, en l'absence de détection, de réduire le risque résiduel d'être porteuse d'une anomalie de 1/25 à 1/120.

Pour les couples infertiles où le patient ABCD ainsi que sa conjointe sont porteurs de mutations du gène CFTR, un diagnostic prénatal (DPN) à partir d'un prélèvement de villosité choriales ou de liquide amniotique peut être proposé. Cependant, dans certains cas, il est difficile de prévoir le phénotype de l'enfant.

Comme ces couples sont engagés dans une démarche de procréation médicalement assistée (ICSI), le diagnostic pré-implantatoire (DPI) paraît une option particulièrement appropriée. Le statut génétique de l'embryon est alors obtenu après analyse de deux blastomères et seuls les embryons

ayant hérité de l'allèle maternel non muté seront transférés.

Un examen clinique des enfants nés après procréation médicalement assistée dans les couples ABCD est recommandé avec dosage de la trypsine immunoréactive à la naissance, test de la sueur et suivi médical.

L'identification des mutations CFTR chez un patient CBAVD a des conséquences importantes pour sa famille. Chaque frère ou sœur du patient a une chance sur deux d'être porteur d'une mutation et une sur quatre d'avoir le même génotype. Le conseiller génétique les informera sur le risque d'avoir un enfant atteint de mucoviscidose s'ils ont hérité de l'une ou des deux mutations familiales et si leur conjoint est lui-même porteur hétérozygote.

**Mots clés :** Absence congénitale bilatérale des canaux déférents, mucoviscidose, gène CFTR, conseil génétique.

Correspondance :

M. des Georges. Laboratoire de génétique moléculaire, Institut Universitaire de Recherche Clinique (IURC), 641 Avenue du Doyen Gaston Giraud, 34093 Montpellier Cedex 5

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

## I. INTRODUCTION

Par analogie avec les problèmes de stérilité rencontrés par les hommes atteints de mucoviscidose, dès 1990 les mutations du gène CFTR ont été recherchées chez les patients porteurs d'une ABCD (Absence Bilatérale Congénitale des Canaux Déférents). Cette pathologie représente 2 % des infertilités masculines. Des études extensives du gène ont permis de mettre en évidence des mutations CFTR chez 80 % à 85 % des patients et confirment que l'ABCD est bien une forme incomplète de mucoviscidose.

En raison de la possibilité de procréation médicalement assistée ainsi que de la fréquence élevée de porteurs hétérozygotes dans la population générale, il existe un risque réel de transmettre la mucoviscidose à l'enfant à naître.

Il est recommandé, avant toute étape de fécondation in vitro, d'adresser le couple à une consultation spécialisée de génétique afin de l'informer sur la transmission des gènes mutés, d'évaluer le risque de l'enfant à naître et d'organiser l'étude familiale qui permettra l'accès à un diagnostic prénatal.

## II. LA MUCOVISCIDOSE ET LES MUTATIONS DU GÈNE CFTR

La mucoviscidose est la plus fréquente des maladies graves transmises sur le mode autosomique récessif chez les caucasiens : son incidence est approximativement de 1 naissance sur 2500 et la fréquence des hétérozygotes porteurs sains est de 1 sur 25 [8].

L'incidence de la mucoviscidose varie considérablement selon les origines ethniques et géographiques. A titre d'exemple, aux USA elle est d'une naissance sur 600 dans un isolat géographique, les Amish dans l'état de l'Ohio, alors qu'elle est de 1/17000 dans la population noire et 1/90000 dans les populations indiennes.

Cette pathologie est caractérisée par une extrême hétérogénéité allélique : 1000 mutations sont actuellement décrites au consortium international (CFGAC, <http://genetsickkids.on.ca/cftr>). En France, une vaste étude multicentrique a permis de recenser 310 mutations différentes avec une répartition très inégale sur le territoire [2, 4]. La mutation la plus fréquente,  $\Delta F508$ , représente 80 % des allèles responsables de la mucoviscidose en Bretagne celtique alors que ce taux n'est que de 61 % dans le sud de la France, avec une moyenne de 67 % au niveau national. D'autres mutations, rares au niveau national ou international, ont une fréquence élevée dans certaines régions. C'est le cas de la mutation 1811+1,6kbA>G, responsable de 0,18 % des allèles mutés en France, mais qui est la troisième mutation la plus fréquente en Aquitaine. [6]

## III. BILAN DE L'ABCD : ÉVALUATION CLINIQUE

Le patient ABCD doit bénéficier d'une évaluation clinique uro-andrologique rigoureuse : canaux déférents non palpables, azoospermie, biochimie du sperme, spermatogénèse, échographie endo-rectale, échographie rénale.

Ce bilan doit être complété par une recherche de signes mineurs de la mucoviscidose au travers d'un examen approfondi, respiratoire et digestif, effectué par un spécialiste de la mucoviscidose adulte, accompagné de trois tests de la sueur. [7]

## IV. ANALYSE DU GÈNE CFTR

Les mutations sont recherchées à partir d'ADN extrait d'un prélèvement de sang périphérique. Les exons et leurs séquences flanquantes sont explorés par des techniques de balayage basées sur la migration différentielle des fragments amplifiés normaux et mutés : DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis), SSCA (single strand conformation analysis), méthode des hétéroduplex, DHPLC (denaturing high-performance liquid chromatography), suivies d'un séquençage pour tous les fragments présentant une anomalie de migration. Trois régions introniques (IVS8, IVS11, IVS19) sont explorées par PCR digestion.

## V. CONSULTATION SPÉCIALISÉE DE CONSEIL GÉNÉTIQUE

- Le patient ABCD bénéficie d'une consultation spécialisée de conseil génétique au cours de laquelle le risque a priori d'avoir un enfant atteint de mucoviscidose est évalué. Le conseiller génétique effectue une enquête familiale qui permet de préciser les origines géographiques et ethniques de chaque sujet et la présence ou non d'autres membres de la famille porteurs d'une ABCD ou d'une mucoviscidose. Après avoir informé le couple sur la transmission des maladies génétiques et avoir recueilli leur consentement, il organise, en collaboration étroite avec le laboratoire, les prélèvements du patient et des membres de la famille indispensables pour l'analyse moléculaire.
- Les conjoints et apparentés sont reçus en consultation spécialisée de génétique avant toute demande d'analyse moléculaire.

## VI. GÉNOTYPAGE CFTR ET SÉGRÉGATION FAMILIALE DES MUTATIONS

Après un diagnostic clinique rigoureux, l'analyse par biologie moléculaire permet d'identifier plus de 80 % de génotypes complets. 88 % d'entre eux sont constitués de l'association d'une mutation « sévère » et d'une mutation « modérée » et 12 % de deux mutations « modérées ».

Les mutations « modérées » sont très souvent des faux-sens (remplacement d'un acide aminé par un autre) qui, la plupart du temps, sont peu fréquents voire décrits pour la première fois. Dans ce cas, le caractère pathogène de ces anomalies ne peut être clairement défini. Une étude de ségrégation familiale est donc indispensable pour assigner chaque altération de séquence à un allèle et vérifier leur position *en cis* ou *en trans*. Par ailleurs, ces analyses familiales révèlent un nombre sans cesse croissant « d'allèles complexes » (une mutation associée *en cis* avec une ou plusieurs autres altérations sur le même gène). Des études fonctionnelles peuvent permettre de mettre en évidence que l'association *en cis*, c'est-à-dire sur un même allèle, de certaines altérations de séquence peut moduler la sévérité d'une anomalie isolée. [1, 5]

## VII. ANALYSE DE LA CONJOINTE ET RISQUE FŒTAL

Dans la population générale, le risque *a priori* pour un enfant d'être atteint de mucoviscidose est de  $R = (1/25 \times 1/2) \times (1/25 \times 1/2) = 1/2500$ . Ce calcul tient compte pour chaque partenaire du risque d'être porteur d'une mutation dans une population donnée (1/25 chez les caucasiens) et du risque de la transmettre (1/2).

Dans les couples où l'homme présente une ABCD, le risque d'avoir un enfant porteur de deux mutations du gène CFTR est de  $R = (1) \times (1/25 \times 1/2) = 1/50$ . En effet, au moins 80 % des patients ABCD portent 2 mutations du gène CFTR, donc ils en transmettent obligatoirement une à l'enfant à naître.

Ce risque étant très élevé, il est recommandé de proposer à la conjointe une recherche des mutations CFTR les plus sévères choisies en fonction de ses origines ethniques. Les kits actuellement disponibles permettent de détecter simultanément 20 à 30 mutations sévères parmi les plus fréquentes et offrent une couverture d'environ 80 % des allèles responsables de la mucoviscidose dans la population française. Lorsqu'aucune de ces mutations n'a été mise en évidence, le risque résiduel Z de la conjointe d'être porteuse hétérozygote passe alors de 1/25 à 1/120 :  $Z = h(1-a)/(1-ah)$ , avec h (risque *a priori* d'être hétérozygote) = 1/25 chez les caucasiens et a (taux de détection des mutations CFTR par le kit utilisé) = 80 % [3]. Les valeurs des paramètres utilisés pour ce calcul sont variables en fonction des origines géographiques et ethniques de la conjointe.

## VIII. DIAGNOSTIC PRÉNATAL (DPN)

Pour les couples infertiles où le patient ABCD ainsi que sa conjointe sont porteurs de mutations du gène CFTR, un diagnostic prénatal est proposé. Le conseiller génétique organise le prélèvement, informe le couple des risques encourus, fait signer les consentements. Le prélèvement de villosités

choriales est programmé à 10 semaines d'aménorrhée.

Les mutations préalablement identifiées chez le couple sont recherchées dans l'ADN fœtal. En parallèle, plusieurs marqueurs polymorphes (polymorphismes bi-alléliques et micro-satellites) sont analysés. Ils permettent de suivre la ségrégation de l'allèle muté et de vérifier la non-contamination de l'ADN fœtal par de l'ADN maternel. (Figure 1)

Lorsque le fœtus est porteur de 2 mutations CFTR sévères, il est atteint de mucoviscidose ce qui justifie de proposer au couple une interruption de grossesse. Si le fœtus a hérité de l'allèle maternel non muté, il sera porteur sain hétérozygote : il ne développera pas la maladie, mais pourra la transmettre ; la grossesse est donc poursuivie.

Le cas est plus difficile à interpréter lorsque le fœtus est porteur d'une mutation sévère d'origine maternelle et d'une mutation modérée ou à effet variable d'origine paternelle. Le phénotype futur est alors impossible à prévoir : mucoviscidose modérée, ABCD, forme à expression phénotypique tardive ou forme asymptomatique ?

## IX. DIAGNOSTIC PRÉ-IMPLANTATOIRE (DPI)

Les patients porteurs d'une ABCD cumulent hypofertilité et risque génétique. Le mode de procréation passe obligatoirement par une ICSI qui sera suivie d'un transfert d'embryon puis d'un DPN à 12 semaines d'aménorrhée. Selon le résultat de la biologie moléculaire réalisée pour le DPN, une interruption de grossesse sera envisagée. Cette stratégie est donc excessivement lourde de sorte que la voie du DPI paraît alors la plus appropriée : ICSI, diagnostic pré-implantatoire et transfert d'embryon ne portant pas la mutation maternelle. Cette conduite permet d'éviter l'écueil du DPN après une étape de procréation médicalement assistée.

Les indications du DPI ne peuvent être que très limitées car ce diagnostic présente deux difficultés majeures :

1. l'analyse génétique se fait à partir d'un à deux blastomères ce qui implique une quantité d'ADN 15000 fois inférieure à celle utilisée lors d'un DPN classique.
2. le résultat doit être rendu en moins de 20 heures.

## X. SUIVI DE L'ENFANT NÉ APRÈS PMA

Lorsque la grossesse est menée à son terme, un examen clinique est recommandé pour tout enfant né après PMA. Quel que soit son génotype, il devra bénéficier d'un dosage de la trypsine immunoréactive, marqueur biochimique du dysfonctionnement pancréatique, dès sa naissance. Cette analyse sera complétée par un test de la sueur à trois mois.

Par ailleurs, si les parents ont décidé de ne pas interrompre la grossesse lorsque l'enfant est porteur d'une mutation sévère et d'une mutation à effet variable, ce dernier doit

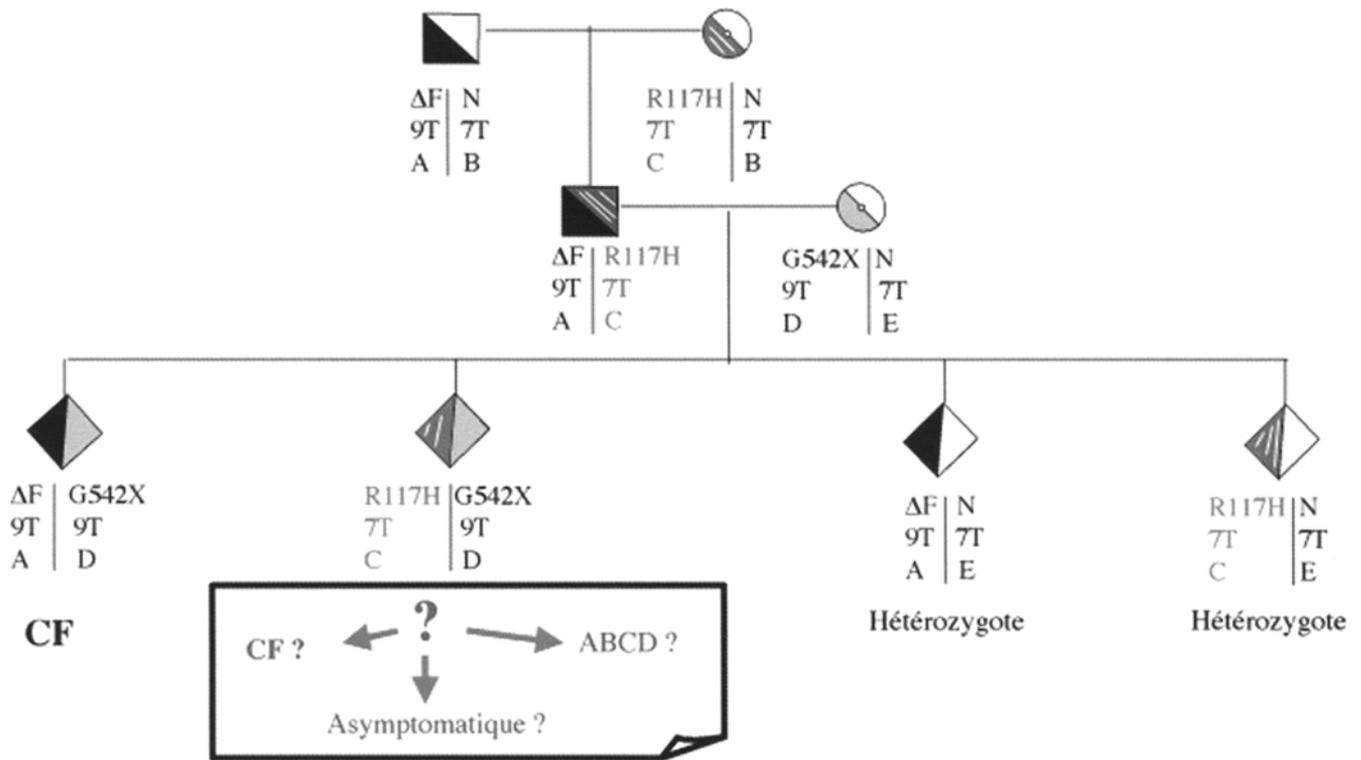


Figure 1 : Diagnostic prénatal : recherche des mutations du gène CFTR préalablement identifiées chez les parents et étude de deux marqueurs polymorphes

bénéficier d'un suivi médical digestif et pulmonaire sur le long terme. En effet, si des signes évocateurs d'une mucoviscidose surviennent, une prise en charge thérapeutique interviendra très rapidement et permettra un meilleur pronostic pour l'enfant.

## XI. EXTENSION DE L'ANALYSE AUX APPARENTÉS : DÉPISTAGE EN CASCADE

Après analyse du gène CFTR, le conseiller génétique explique aux patients porteurs de mutations l'intérêt d'informer les membres de leur famille sur le risque d'être porteur et de transmettre eux-mêmes ces anomalies à leur descendance. Les apparentés peuvent bénéficier à leur tour d'une consultation spécialisée de conseil génétique, suivie d'une analyse moléculaire et d'une évaluation du risque d'un enfant à naître si le couple a un projet parental.

Par ailleurs, si le frère ou la sœur du patient ABCD a hérité du même génotype que ce dernier, un bilan complet à la recherche de signes mineurs de mucoviscidose doit être effectué. Ce bilan est réalisé de préférence par un clinicien spécialisé dans le suivi de patients adultes atteints de mucoviscidose. Il comporte au minimum une exploration complète sur le plan respiratoire et digestif et plusieurs tests de la sueur.

## X. CONCLUSION

**Toute analyse de biologie moléculaire doit être précédée d'un diagnostic clinique rigoureux car la validité du conseil génétique repose entièrement sur cette évaluation.**

**En raison du risque majeur des patients ABCD de transmettre la mucoviscidose, de la complexité des génotypes et de la difficulté d'interprétation du caractère pathogène des mutations CFTR, le patient, sa conjointe et sa famille doivent être adressés à une consultation spécialisée de conseil génétique.**

## RÉFÉRENCES

1. CLAIN J, FRITSCH J, LEHMANN-CHE J et al. : Two mild cystic fibrosis-associated mutations result in severe cystic fibrosis when combined in cis and reveal a residue important for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator processing and function. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276 : 9045-9049.
2. 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.
3. DEQUEKER E, CUPPENS H, DODGE J et al. : Recommendations for quality improvement in genetic testing for cystic fibrosis. *European Concerted Action on Cystic Fibrosis. Eur. J. Hum. Genet.*, 2000, 8 (Suppl 2) : S2-24.
4. 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.

5. DORK T, WULBRAND U, RICHTER T et al. : Cystic fibrosis with three mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. Hum. Genet., 1991, 87: 441-446.
6. FEDERICI S, IRON A, REBOUL MP et al. : CFTR gene analysis in 207 patients with cystic fibrosis in southwest France: high frequency of N1303K and 1811+1.6bA>G mutations. Arch. Pediatr., 2001, 8 :150-157.
7. JOSSERAND RN, BEY-OMAR F, ROLLET J et al., Cystic fibrosis phenotype evaluation and paternity outcome in 50 males with congenital bilateral absence of vas deferens. Hum. Reprod., 2001, 16: 2093-2097.
8. WELSH MJ, TSUI L, BOAT TF et al. : Cystic fibrosis. In :Scriver CL, Beaudet AL, Sly WS, Valle D eds. The metabolic and molecular bases of inherited disease, 7th edn. McGraw-Hill, New-York, 1995, pp 3799-3876.

## ABSTRACT

### CFTR gene and male infertility in 2001.

Genetic counselling, antenatal diagnosis and pre-implantation genetic diagnosis.

Des GEORGES M.

**As the vas deferens is also absent in the majority of CF (cystic fibrosis) males, it has been proposed that CBAVD (Congenital Bilateral Absence of Vas Deferens) males may present an incomplete or mild form of CF. Many studies using more extensive mutation analysis have confirmed the role of CFTR gene defects: 80% of CBAVD patients carry one or two mutations.**

**Each patient with a diagnosis of CBAVD should also be examined for pulmonary and pancreatic signs, and sweat tests should be performed.**

**In couples with CBAVD linked to CFTR mutations, the risk of having children with CF or infertility is increased if the female is also a carrier. The woman should be screened for the most frequent CFTR mutations according to her ethnic background. After screening for 80% of the mutations responsible for CF, the residual risk of being a carrier with negative screening is:  $Z=h(1-a)/(1-ah) = 1/120$  considering a carrier frequency of 1/25 in the general population.**

**In the case of positive screening, antenatal diagnosis by chorionic villus sampling may be proposed. However, in some situations, it is difficult to predict the phenotypic consequences for the child, particularly when a severe trans mutation of a variable alle-**

**le is identified. As these couples require medically-assisted reproduction techniques, pre-implantation genetic diagnosis appears to be more appropriate than antenatal diagnosis. Only embryos that inherit the non-mutated maternal CFTR allele are replaced in the uterus.**

**Examination of children born to couples with CBAVD is mandatory: immunoreactive trypsinogen assay at 3 days of age, sweat test at 3 months and clinical examination, especially looking for signs of CF.**

**Identification of CFTR mutations in a CBAVD patient has important consequences for his family. Each sibling has a 50% risk of being a carrier and a 25% risk of inheriting the same genotype. The genetic counsellor must inform these siblings about the possible risk of having CF children if they carry CFTR mutations and if their partner is also a carrier.**

*Key words: CBAVD (Congenital Bilateral Absence of Vas Deferens), CF (Cystic Fibrosis), CFTR, genetic counselling.*