

Première description de la mutation mucoviscidique R334W dans la population libyenne

S. HADJ FREDJ,
S. OUESLATI,
M. BOUDAYA,
C. SAHLI,
H. SIALA,
A. BIBI,
T. MESSAOUD

Résumé : Depuis la découverte en 1989 du gène responsable de la mucoviscidose, plus de 1800 mutations ont été identifiées.

Nous rapportons dans le présent travail l'identification d'une mutation mucoviscidique rare R334W chez une famille libyenne.

Notre étude a porté sur un patient originaire de Libye fortement suspect de la mucoviscidose ayant un test de la sueur positif par iontophorèse à la pilocarpine (technique de l'Exsudose). Le balayage total des séquences codantes et les jonctions introns-exons du gène était la stratégie que nous avons adoptée pour l'identification des mutations responsables de la mucoviscidose par l'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant et la chromatographie liquide haute performance en conditions dénaturantes.

L'étude moléculaire établie chez notre patient, nous a permis d'identifier pour la première fois dans la population libyenne la mutation rare R334W localisée au niveau de l'exon 7. L'étude familiale a montré que les deux parents ainsi que le frère et la sœur sont porteurs sains de cette mutation.

Jusqu'à nos jours 4 mutations mucoviscidosiques ont été seulement identifiées en Libye, les résultats obtenus au cours de ce travail ont permis d'élargir les données épidémiologiques dans la population libyenne dont la mucoviscidose a été longtemps considérée comme exceptionnelle.

Mots clés : *Mucoviscidose, Libye et mutation.*

Identification of the cystic fibrosis mutation R334W in a libyan family

Abstract : Since the discovery in 1989 of the gene responsible for cystic fibrosis, more than 1800 mutations have been identified. We report in this work the identification of an uncommon cystic fibrosis mutation R334W in a Libyan family.

Our study involved a patient originally from Libya suspected of cystic fibrosis having a positive sweat test by pilocarpine iontophoresis (technical Exsudose). The full scan of the coding sequences and intron-exon junctions of the gene was the strategy adopted for the identification of mutations causing cystic fibrosis by gel denaturing gradient gel electrophoresis and denaturing high performance liquid chromatography.

Molecular analysis established in our patient, allowed us to identify for the first time in the Libyan population the rare mutation R334W localized in exon 7. The family study showed that both parents and her brother and sister are healthy carriers of this mutation.

Until today, 4 cystic fibrosis mutations were only identified in Libya, the results obtained in this work have expanded epidemiological data in the Libyan population which has cystic fibrosis was long considered as exceptional.

Key words : *Cystic fibrosis, Libya and mutation.*

Laboratoire de biochimie
clinique-Hôpital d'Enfants
de Tunis-Tunisie

Introduction

La mucoviscidose (ou fibrose kystique du pancréas) est la plus fréquente des maladies autosomiques récessives diminuant l'espérance de vie des individus atteints.

L'incidence est d'environ 1/2500 naissances (1); plus rare chez les sujets asiatiques et africains. 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 (2).

Depuis la découverte en 1989 du gène CFTR, responsable de la mucoviscidose, plus de 1800 mutations ont été rapportées (Cystic fibrosis mutation database).

A l'exception de la délétion F508del qui est retrouvée en moyenne sur les deux tiers des allèles mutés, ces mutations sont caractérisées par leur rareté (3).

Aujourd'hui, le développement de méthodes performantes d'identification des mutations ponctuelles permet d'identifier plus de 90% des anomalies moléculaires dans la plupart des populations. Toutefois, dans certains pays comme le sud de l'Europe et le Maghreb, l'analyse de la région codante du gène ne permet de détecter que 70 à 85% des anomalies moléculaires. Ceci est expliqué par le fait que les méthodes de criblage utilisées, bien que performantes, peuvent ne pas détecter certaines mutations ponctuelles (4). Ainsi, les mutations CF pourraient être localisées dans des régions non analysées telles que les introns, la région 3' non codante et la région 5' promotrice. En plus, les mutations pourraient être des grandes délétions d'un ou de plusieurs exons pouvant échapper aux techniques classiques de détection.

La mucoviscidose était longtemps considérée comme exceptionnelle dans les populations Nord-africaines ce qui était à l'origine de la méconnaissance de divers aspects de diagnostic de cette pathologie et en particulier dans la population libyenne où seulement 10 patients mucoviscidosiques ont été rapportés (5).

Nous rapportons dans le présent travail la première

description de la mutation R334W chez un malade libyen et sa présentation clinique.

Matériels et méthodes

Patients

Notre étude a porté sur une famille libyenne qui s'est présentée au laboratoire de Biochimie et de biologie moléculaire à l'Hôpital d'Enfants de Tunis pour suspicion de mucoviscidose chez leur enfant de sexe masculin, âgé de 4 ans. Il est issu d'un mariage consanguin et sans antécédents familiaux de la mucoviscidose.

Son histoire remonte à l'âge de quatre mois, marquée par la survenue d'une bronchopneumopathie à répétition.

L'évolution a été marquée par la récurrence des bronchopneumopathies, à raison de un à deux épisodes par mois nécessitant souvent le recours à l'hospitalisation. En dehors de ces épisodes aigus, il présente un encombrement bronchique permanent avec une toux chronique.

Méthodes

L'étude phénotypique a été effectuée par le biais du test de la sueur selon la technique de l'Exsudose. Le test est considéré comme positif pour des concentrations des chlorures > 60 mmol/l.

L'extraction de l'ADN a été effectuée par la méthode de Salting out (6). La mutation la plus fréquente F508del est la première recherchée suivie par l'exploration des exons qui sont le siège des mutations les plus fréquentes (3, 4, 5, 10, 11, 17b, 19, 20 et 21) puis finalement l'analyse du reste des 27 exons du gène CFTR. L'étude moléculaire a été menée au préalable sur les cas index; confirmée par la suite par l'étude des deux parents.

Le balayage total des séquences codantes et les jonctions introns-exons du gène CFTR était la stratégie que nous avons adoptée pour l'identification des mutations responsables de la mucoviscidose. Deux techniques sont utilisées pour détecter toute altération de séquence dans un fragment d'ADN amplifié : l'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE) (7) et la chromatographie liquide haute performance en conditions dénaturantes (DHPLC) (8). En cas de présence d'anomalie de

séquence, nous avons eu recours au séquençage automatique de l'ADN sur ABI Prism 310 pour identifier l'altération nucléotidique responsable.

DGGE :

La technique DGGE est basée sur la migration électrophorétique d'un fragment d'ADN double brin sur un gel de polyacrylamide où il rencontre des concentrations croissantes d'agents dénaturants (Urée et formamide) permettant la détection de variations de séquence au sein d'un fragment d'ADN donné (7).

Des amorces clampées sont employées pour la création d'un domaine artificiel de haute stabilité pour que la région d'intérêt devienne le domaine où la T_m est la plus basse. Les amorces clampées utilisées au cours de ce travail sont des GC clamp (amorce riche en G et C).

Les exons étudiés par DGGE sont les exons 5, 11, 17b, 19, 20 et 21.

DHPLC :

La DHPLC est une méthode chromatographique à conditions dénaturantes permettant la détection de substitutions de bases, de petites délétions ou d'insertions au niveau de l'ADN en séparant les hétéroduplexes des homoduplexes (9). Elle met en oeuvre une chromatographie en phase inversée avec couplage d'ions. L'affinité différentielle des homoduplexes et des hétéroduplexes pour la colonne permet de les séparer.

Le choix de la température reste le critère le plus important pour le bon déroulement de l'analyse DHPLC. Pour cela, un logiciel WAVEMAKER Software intégré à l'appareil propose les différentes températures d'analyses. En effet, l'algorithme utilise la séquence sauvage homozygote pour tracer les courbes de fusion.

Le reste des 27 exons du gène CFTR a été étudié par DHPLC.

L'injection des échantillons commence par un prélèvement de 5 μ l du produit amplifié. Elle s'effectue dans un flux contenant du TEAA et de l'ACN. L'ADN, chargé négativement, interagit avec le TEAA lié aux billes de la colonne, placée dans un four.

Un flux d'ACN de concentration croissante diminue l'interaction ADN-TEAA. Les hétéroduplexes, moins affins pour le TEAA, sont élués en premier, Les homo-

duplexes en second. La détection des fragments étudiés en sortie de la colonne se fait par mesure de l'absorbance à 260 nm par une lampe UV.

L'interprétation des résultats nécessite l'utilisation d'un témoin normal pour chaque fragment étudié. Ainsi, tous les profils obtenus devront être superposés aux profils de ce témoin afin d'identifier leurs génotypes.

D'autre part, le profil normal et le profil homozygote atteint sont identiques (un seul pic). Cela impose donc, de procéder à un mélange entre le produit de PCR d'un témoin normal et celui du patient étudié. Afin de créer les hétéroduplexes, ce mélange est soumis à une dénaturation suivie par une renaturation lente. Si le profil obtenu diffère de celui du témoin normal, on peut à ce moment conclure que l'échantillon analysé correspond à un homozygote muté.

Réaction de séquençage :

Les produits PCR sont purifiés par le kit Wizard SV Gel and PCR clean system Promega. La réaction de séquençage est réalisée grâce à un coffret ABI Prism Big Dye Terminator cycle sequencing Ready Reaction en utilisant l'une des deux amorces de la PCR.

Le produit de séquençage est purifié pour éliminer l'excès de l'amorce et des ddNTPs marqués. Cette étape est accomplie par des colonnes de gel prêtes à l'emploi (Pincetion separation. Applied Biosystems).

Résultats

L'étude clinique du malade analysé a montré qu'il présente des bronchopneumopathies récidivantes nécessitant des séances de kinésithérapie de l'ordre d'une fois par semaine. L'histoire de la maladie remonte à l'âge de 6 mois. Nous n'avons pas noté de diarrhée chronique ni d'antécédents familiaux de mucoviscidose. Dans le présent travail, le test de la sueur a été pratiqué selon la méthode de l'Exsudose par iontophorèse à la pilocarpine ($[Cl^-] = 95\text{mmol/l}$). C'est une technique simple et rapide permettant de distinguer les sujets indemnes et mucoviscidosiques. En effet, seules les concentrations supérieures à 60 mmol/l d'ions chlorures sont considérées comme pathologiques.

Le diagnostic de la mucoviscidose est essentiellement suggéré par des symptômes cliniques et un taux élevé de chlorures déterminé par le test de la sueur, c'est encore aujourd'hui l'examen le plus fiable pour dépister la maladie. Cependant, il doit être complété par la recherche des mutations responsables de la maladie.

En raison de la structure complexe du gène CFTR, l'identification des mutations a été effectuée en plusieurs étapes. Nous avons tout d'abord recherché la mutation délétionnelle (F508del) la plus fréquente dans le monde suivie par l'exploration des exons qui sont le siège des mutations les plus fréquentes (3, 4, 5, 10, 11, 17b, 19, 20 et 21) puis finalement l'analyse du reste des 27 exons du gène CFTR.

La mutation délétionnelle F508del, correspondant à une délétion de trois nucléotides CTT au niveau de l'exon 10 du gène CFTR entraînant l'amputation de l'acide aminé phénylalanine à la position 508 de la séquence protéique, n'a pas été identifiée chez notre patient en utilisant la technique de DHPLC en conditions non dénaturantes appelée également «mode sizing» où les fragments analysés sont séparés en fonction de leurs tailles. L'étude moléculaire du reste des 27 exons du gène CFTR réalisée en combinant deux techniques performantes de biologie moléculaire (DGGE et DHPLC), nous a permis d'identifier pour la première fois dans la population libyenne la mutation R334W localisée au niveau de l'exon 7 par la technique de DHPLC suivie par une réaction de séquençage (Figure 1 et 2). La mutation

correspond à une substitution d'une cytosine par une thymine aboutissant au remplacement de l'acide aminé arginine par le tryptophane à la position 334 de la séquence protéique.

L'étude a été menée au préalable sur notre malade; complétée par la suite par l'étude des deux parents, le frère et la sœur qui sont tous porteurs sains.

Discussion

La mutation R334W localisée au niveau de l'exon 7, a été décrite pour la première fois en 1991 par Estivill chez un patient espagnol (Cystic fibrosis mutation database). Cette mutation rare est surtout observée au niveau de la population européenne et surtout au sud de l'Espagne où elle atteint son maximum (4.9%) [10].

A notre connaissance, cette mutation présente la première description dans les populations Nord africaines et arabes et en particulier en Libye.

Jusqu'à ce jour, 4 mutations seulement ont été identifiées parmi les patients libyens mucoviscidosiques dont la mutation E1104X localisée au niveau de l'exon 17b est la plus fréquente (40%) ceci témoigne de l'homogénéité de cette population (5).

La mutation R334W appartient à la classe IV des mutations mucoviscidosiques, cette classe regroupe essentiellement des mutations faux-sens altérant la conductance du canal CFTR et sa sélectivité ionique localisées dans les domaines transmembranaires. Il en résulte une quantité

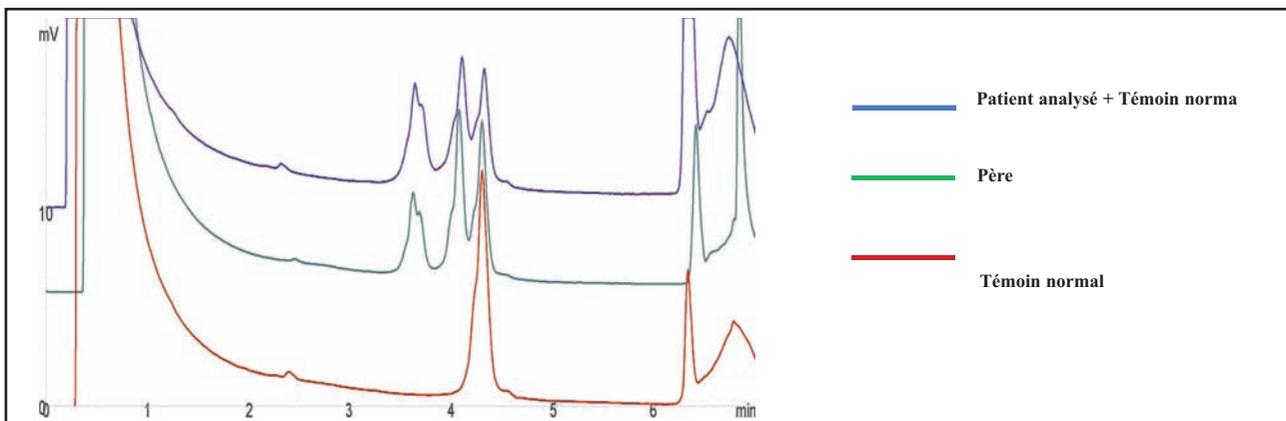


Figure 1 : Chromatogramme obtenu lors de l'analyse de l'exon 7

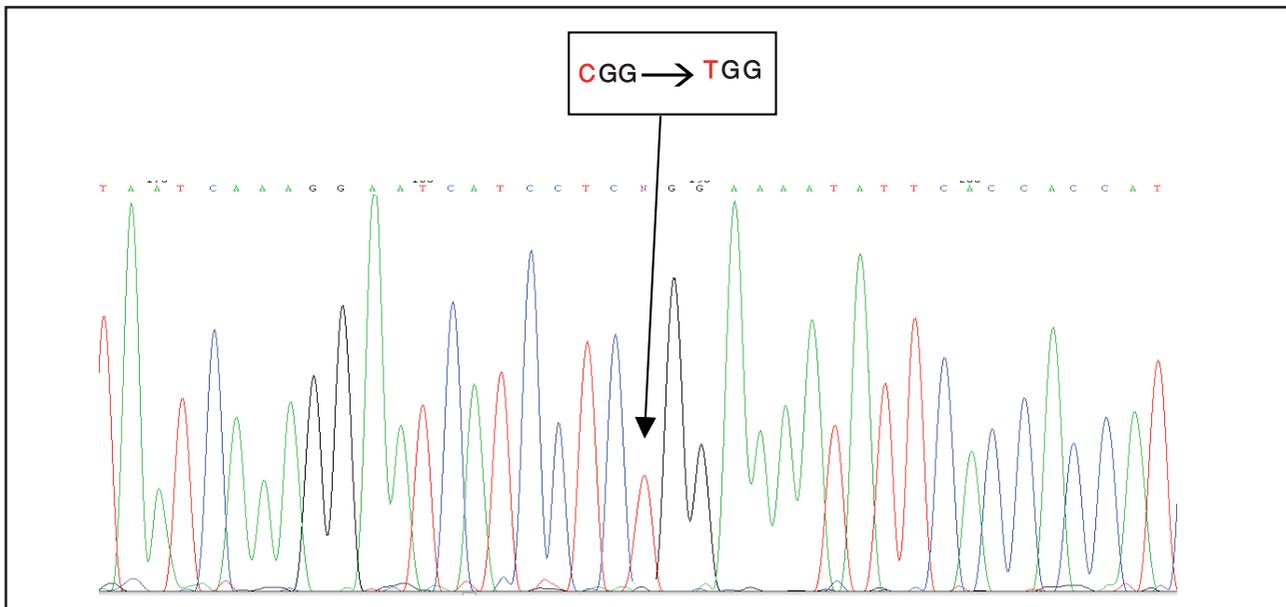


Figure 2 : Profil de séquence de la mutation R334W à l'état homozygote (brin direct)

normale de protéine CFTR mutée présentant une activité résiduelle dans la membrane apicale ce qui explique le phénotype modéré observé chez notre malade. En effet, cette mutation est généralement associée à une expression moins sévère de la pathologie avec une apparition plus tardive des premiers symptômes (10) (11).

La littérature indique que la relation entre le génotype et le phénotype est complexe. Elle est mieux identifiée en ce qui concerne la fonction pancréatique. Les formes avec insuffisance pancréatique sont le plus souvent en rapport avec des mutations de classes I, II et parfois III, et sont en général associées à une forme sévère de la maladie. Les classes IV et V conduisent en général à des phénotypes plus modérés de mucoviscidose. La sévérité de l'atteinte pulmonaire est très variable y compris chez les personnes ayant un génotype identique. Kerem et al ont émis l'hypothèse selon laquelle un enfant développerait une insuffisance pancréatique, s'il porte deux mutations dites «sévères» (S). En revanche, s'il porte seulement une mutation S et une mutation dite «modérée» (M) ou deux mutations M, il n'y aurait pas d'insuffisance pancréatique. Cette hypothèse a été ultérieurement confirmée et a permis de classer les muta-

tions en mutations sévères et modérées (12). D'une façon générale, les mutations non-sens telles que les mutations G542X, W1282X et E1104X, celles affectant les séquences consensus d'épissage telle que la mutation intronique 711+1 T□G et celles entraînant un décalage du cadre de lecture sont considérées des mutations sévères. En revanche, les mutations faux-sens peuvent être soit sévères ou modérées. Toutefois, l'existence d'homozygotes R334W ou d'hétérozygotes composites R334W/autre mutation insuffisants pancréatiques, même s'ils sont rares, représente un obstacle à une généralisation absolue de cette théorie (11).

En dehors de l'hétérogénéité allélique et des mutations multiples dans un même gène, divers facteurs sont susceptibles de modifier le phénotype comme les facteurs environnementaux et les gènes modificateurs. Plusieurs études se sont intéressées aux facteurs environnementaux : compliance au traitement, précocité du traitement, nutrition et tabagisme passif. En effet, le tabagisme passif a été relié à une altération de la fonction respiratoire, la suppression de l'exposition des patients mucoviscidosiques à la fumée du tabac est une mesure relativement simple pour améliorer l'évolution

(13). Des études ont montré qu'une intervention nutritionnelle intensive modifiait également l'évolution de la maladie (14). Il est intéressant de noter que la réponse des patients au traitement nutritionnel est variable, ce qui suggère que d'autres facteurs génétiques et/ou environnementaux peuvent intervenir. Une colonisation des voies respiratoires par *Pseudomona aeruginosa* est un événement lié à l'environnement et est associée à une réduction de la longévité. Ici encore, des modifications de facteurs environnementaux, tels que le contrôle des infections, peuvent prévenir la dissémination de sous types virulents de ces bactéries.

La mucoviscidose est une maladie héréditaire fortement invalidante de prise en charge lourde et coûteuse. Les résultats obtenus dans le présent travail ont contribué à enrichir les bases de données épidémiologiques dans la population libyenne et à établir des corrélations entre le phénotype clinique et le génotype. L'étude des RFLPs et des microsatellites permettra de construire les haplotypes liées à la mutation R334W et de déterminer son origine.

Références

1. Bobadilla JL, Macek M, Fine J P, Farrell P M. Cystic Fibrosis : A worldwide analysis of CFTR mutations. correlation with incidence data and application to screening. Hum Mutat 2002; 19:575-606.
2. Bienvenu T. Les bases moléculaires de l'hétérogénéité phénotypique dans la mucoviscidose. Ann Biol Clin 1997; 55: 113-21.
3. Girodon-Boulandet E, Costa C. Génétique de la mucoviscidose. mt pédiatrie 2005 ; 8: 126-34.
4. Des Georges M, Guittard C, Bozon D. Les bases moléculaires de la mucoviscidose en France, plus de 300 mutations et 506 génotypes sont en cause. Med Sci 1998 ; 14 : 1413-21.
5. Hadj Fredj S, Fattoum S, Chabchoub A, Messaoud T. First report of CF mutations in Libyan cystic fibrosis Patients. Ann Hum Biol 2011; 38: 561-63.
6. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988; 16: 1215.
7. 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: 770-76.
8. Le Maréchal C, Audrezet MP, Quere I, Raguene O, Langonne S, Ferec C. Complete and rapid scanning of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene by denaturing high performance liquid chromatography (D-HPLC): major implications for genetic counselling. Hum Genet 2001; 108: 290-98.
9. Kuklin A, Munson K, Gjerde D, Haefele R, Taylor P. Detection of single nucleotide polymorphisms with the WAVE DNA fragment analysis system. Genet Test 1998; 1: 201-6.
10. Estivill X, Ortigosa L, Perez-Frias J, Dapena J, Ferrer J, Pena L, Pena L, Llevadot R, Gimenez J, Nunes V. Clinical characteristics of 16 cystic fibrosis patients with the missense mutation R334W, a pancreatic insufficiency mutation with variable age of onset and interfamilial clinical differences. Hum Genet 1995; 95: 331-6.
11. Antinolo G, Borrego S, Gili M, Dapena J, Alfageme I, Reina F. Genotype-phenotype relationship in 12 patients carrying cystic fibrosis mutation R334W. J Med Genet. 1997; 34:89-91.
12. Kerem E, Corey M, Kerem BS, Rommens J, Markiewicz D, Levison H, Tsui LC, Durie P. The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis--analysis of the most common mutation (delta F508). N Engl J Med 1990; 323:1517-22.
13. Collaco JM, Vanscoy L, Bremer L, McDougal K, Blackman SM, Bowers A, Naughton K, Jennings J, Ellen J, Cutting GR. Interactions between secondhand smoke and genes that affect cystic fibrosis lung disease. JAMA 2008; 299: 417-24.
14. Zemel BS, Jawad AF, Fitzsimmons S, Stallings VA. Longitudinal relationship among growth, nutritional status, and pulmonary function in children with cystic fibrosis: analysis of the cystic fibrosis foundation national CF patient registry. J Pediatr 2000; 137:374-80.