

Etude des haplotypes associés à la mutation F508del dans une population Tunisienne

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

Résumé

Introduction : Depuis la découverte en 1989 du gène responsable de la mucoviscidose, plus de 1900 mutations ont été rapportées. 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. Nous nous sommes intéressés dans le présent travail à l'étude des haplotypes associés à la mutation F508del dans la population Tunisienne.

Matériels et méthodes : Notre travail a comporté l'étude de 5 marqueurs polymorphes extragéniques (XV2C et KM19) et intragéniques (IVS8CA, IVS17bTA et IVS17bCA) chez 10 patients Tunisiens mucoviscidosiques portant la mutation la plus fréquente en Tunisie la F508del. Une population saine de 30 sujets a été également incluse dans notre étude. Pour cela deux techniques de biologie moléculaire ont été utilisées : le polymorphisme de longueur de fragment de restriction et la technique d'analyse des fragments par électrophorèse capillaire.

Résultats : Les résultats obtenus montrent que la mutation F508del est liée à différents haplotypes : l'haplotype B et le 23-31-13 (IVS8CA, IVS17bTA et IVS17bCA). Ces deux haplotypes ont été retrouvés en Europe associés à la mutation F508del ce qui suggère une origine commune de cette mutation.

Conclusion : L'étude des haplotypes nous paraît très intéressante car elle permet d'une part de déterminer l'origine ethnique des lésions moléculaires responsables de cette pathologie et d'autre part d'augmenter l'informativité génétique lors du diagnostic prénatal.

Mots clés : gène CFTR, F508del, haplotype, marqueurs extragéniques, marqueurs intragéniques.

Study of haplotypes associated with the F508del mutation in the Tunisian population

Abstract : Since the discovery in 1989 of the gene responsible for cystic fibrosis, more than 1900 mutations have been reported. The F508del deletion is found on average two thirds of the mutated alleles, the remaining mutations are characterized by their rarity. We are interested in this work to the study of haplotypes associated with the F508del mutation in the Tunisian population. In this study, we analyzed five extra (XV2C and KM19) and intragenic (IVS8CA, IVS17bTA and IVS17bCA) polymorphic markers in 10 CF Tunisians patients carrying the most common mutation F508del. A healthy population of 30 subjects was also included in our study. For this two molecular

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

Etude des haplotypes associés à la mutation F508del dans une population Tunisienne

biology techniques were used : the length polymorphism restriction fragment (PCR-RFLP) and capillary electrophoresis. The results show that F508del mutation is linked to different haplotypes : the B haplotype for the extragenic markers and 23-31-13 (IVS8CA, IVS17bTA and IVS17bCA) for the intragenic markers. These two haplotypes were found associated with the F508del mutation in Europe. These results suggest a common origin for this mutation. The study of haplotype is very interesting because it allows in one hand to determine the ethnicity of the molecular lesions responsible for this disease, and in the other hand to increase the genetic informativity during prenatal diagnosis.

Key words : CFTR gene, F508del mutation, haplotype, extragenic markers, intragenic markers

Introduction

La mucoviscidose ou fibrose kystique du pancréas est la plus fréquente des maladies héréditaires, transmises selon le mode autosomique récessif et entraînant une diminution de l'espérance de vie chez la population caucasienne. Cette maladie est due à des mutations du gène CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance Regulator) localisé au niveau du chromosome 7. Ce gène formé de 27 exons, s'étend sur près de 250 kb et code pour une protéine transmembranaire de 1480 acides aminés appelée CFTR (1). De nos jours, plus de 1900 mutations différentes ont été identifiées documentant l'extrême hétérogénéité clinique de notre maladie (www.genet.sickkids.on.ca=cftr). La mutation F508del, qui correspond à une délétion de 3 nucléotides CTT au niveau de l'exon 10 du gène CFTR, est considérée comme étant la mutation la plus fréquente de par le monde (2). En Tunisie, elle représente 47.06% (3). L'étude des haplotypes liés à cette mutation permet de déterminer son origine ethnique. Elle permet également d'augmenter l'informativité génétique lors du diagnostic prénatal et la détection de l'anomalie chez certaines familles lorsqu'une ou aucune mutation n'a pas pu être identifiée. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés dans le présent travail à l'étude de cinq marqueurs extra et intragéniques à l'aide de deux techniques performantes de biologie moléculaire : la RFLP (polymorphisme de longueur de fragment de restriction) et la technique d'analyse des fragments par électrophorèse capillaire.

Patients et méthodes

Patients

Notre étude a porté sur 10 patients Tunisiens chez qui le diagnostic de la mucoviscidose a été basé sur un tableau clinique très évocateur de la mucoviscidose (atteinte respiratoire et/ou digestive) ainsi que deux tests de la sueur positifs ($[Cl^-] > 60$ mmol/l) par la technique de l'Exsudose.

Les patients étudiés sont tous porteurs de la mutation F508del à l'état homozygote. Elle a été précédemment identifiée par la technique DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography) (3). Une population témoin a été également incluse dans notre étude (30 sujets). Les parents des patients mucoviscidosiques ainsi que les normaux qui ont participé à notre étude ont été informés et un consentement a été obtenu.

Méthodes

Tous les patients et les témoins ont bénéficié de l'étude de 2 marqueurs polymorphes extragéniques (KM19 et XV2C) par la technique RFLP ainsi que l'étude de 3 marqueurs polymorphes intragéniques (IVS8CA, IVS17bTA et IVS17bCA) par la technique d'analyse des fragments par électrophorèse capillaire sur un analyseur génétique (ABI Prism 310 PERKIN ELMER).

L'étude des marqueurs extragéniques

Les marqueurs XV2C et KM19 sont localisés en amont du gène CFTR respectivement à 175Kb et 125kb (4). Ces deux marqueurs ont été validés pour le diagnostic prénatal depuis 1986 et ont été décrits par Estivill en 1987 (5).

L'étude de ces marqueurs polymorphes a été réalisée en

article original

Tableau I : séquences des amorces extragéniques

Marqueurs	Séquences
XV2C	(F) 5'gttgaagtgaattgaatg3' (R) 5'gttcaaacatgtgcaag3'
KM19	(F) 5'gctgcatcatataagttgcc3' (R) 5'aaggtacactgttaatttt3'

Tableau II : Nomenclature de l'haplotype XK (6)

Haplotype	XV2C ^a	KM19 ^b
A	1	1
B	1	2
C	2	1
D	2	2

a. 1 = absence et 2 = présence du site de restriction pour *TaqI*

b. 1 = absence et 2 = présence du site de restriction pour *PstI*

utilisant une amplification par PCR suivie d'une digestion enzymatique. L'ADN génomique a été amplifié en utilisant des amorces décrites précédemment (4) (Tableau I). Les produits de PCR sont ensuite digérés en utilisant l'enzyme de restriction *Taq I* pour le marqueur XV2C et l'enzyme *PstI* pour le marqueur KM19 (4). Les produits de PCR et de la digestion enzymatique ont été séparés sur un gel d'agarose de 1,5%.

La reconstruction de l'haplotype XK a été déterminée suivant le modèle de Beaudet (6) (Tableau II).

L'étude des marqueurs intragéniques

L'analyse des 3 marqueurs polymorphes intragéniques IVS8CA, IVS17bTA et IVS17bCA, localisés respectivement au niveau des introns 8 et 17 du gène CFTR a été réalisée par PCR multiplexe en utilisant des amorces fluorescentes (Tableau III) (7;8).

20µl de formamide désionisé et 0.5µl de marqueur de taille Tamra (Tamra 500) ont été mélangés avec 2 µl de

Tableau III : Séquences d'amorces des marqueurs intragéniques

Marqueurs	Séquences
IVS8CA	(F) Fam 5'aaatctatctcatgtaagtgtgaaga 3' (R) 5'actaagatattgcccattatcaagt 3'
IVS17bCA	(F) Hex 5'tgtcacctctcactactcat 3' (R) 5'aaactaccgacaagaggaa 3'
IVS17bTA	(F) Fam 5'gctgcattctataggtatc3' (R) 5'tgtgaaaacaggataatac3'

produit de PCR. Après une dénaturation à 94°C pendant 4 min, le mélange réactionnel est injecté dans le séquenceur de type ABI Prism 310 (PERKIN ELMER) en mode analyse des fragments (Genscan). Les résultats sont par la suite analysés par le logiciel Genscan 1.1.

Analyse statistique :

Le test khi-deux (X^2) a été utilisé pour comparer les résultats obtenus entre nos deux populations. Si la valeur de P est < 0.05, le résultat est considéré significatif.

Résultats

La mutation F508del fut identifiée en 1989 en même temps que le gène CFTR (1). C'est la mutation la plus fréquente dans le monde avec 66% (2), ainsi qu'en Tunisie avec 47,06% (3). La F508del correspond à une délétion de 3 paires de bases (CTT) au niveau de l'exon 10 du gène CFTR précisément entre 1652 pb et 1655 pb, entraînant la perte d'une phénylalanine en position 508 de la protéine CFTR (4). Chez les 80 chromosomes étudiés, dont 60 normaux, différents haplotypes ont été identifiés (Tableau IV et V).

Etude des marqueurs extragéniques

La distribution des haplotypes XK chez les patients mucoviscidosiques et les normaux est regroupée dans le tableau IV.

Tableau IV : La distribution des haplotypes XK chez les deux populations

Haplotypes	MALADES		NORMAUX			P
	Nombre de chromosomes	%	Haplotypes	Nombre de chromosomes	%	
A	4	20	A	14	23.33	0.07
B	10	50	B	14	23.33	0.02
C	2	10	C	13	21.66	0.30
D	4	20	D	19	31.66	

Avec :% pourcentage

Etude des haplotypes associés à la mutation F508del dans une population Tunisienne

Tableau V : Distribution des haplotypes intragéniques dans les deux populations

Nom des haplotypes	Malades		Normaux		P
	Nombre de chromosomes	%	Nombre de chromosomes	%	
23-31-13	8	40	5	8,33	0,0088
16-31-13	4	20	1	1,66	0,0033
28-31-13	4	20	-	-	0,0003
28- 29-13	2	10	-	-	0,013
32-31-13	2	10	-	-	0,013
17-07-17	-	-	8	13,33	
22-31-14	-	-	3	5	
18-7-13	-	-	3	5	
23-44-15	-	-	2	3,33	
18-31-13	-	-	2	3,33	
22-44-13	-	-	2	3,33	
16-38-13	-	-	2	3,33	
16-33-13	-	-	2	3,33	
22-48-13	-	-	2	3,33	
18-41-13	-	-	2	3,33	
22-43-13	-	-	2	3,33	
23-28-17	-	-	2	3,33	
22-30-13	-	-	2	3,33	
23-32-15	-	-	1	1,66	
16-44-13	-	-	1	1,66	
17-44-11	-	-	1	1,66	
18-29-16	-	-	1	1,66	
19-7-17	-	-	1	1,66	
22-33-13	-	-	1	1,66	
16-41-17	-	-	1	1,66	
16-40-15	-	-	1	1,66	
15-30-13	-	-	1	1,66	
16-47-14	-	-	1	1,66	
16-48-13	-	-	1	1,66	
17-42-14	-	-	1	1,66	
23-47-13	-	-	1	1,66	
16-33-15	-	-	1	1,66	
16-40-17	-	-	1	1,66	
17-45-13	-	-	1	1,66	
17-31-11	-	-	1	1,66	
18-31-15	-	-	1	1,66	
16-45-13	-	-	1	1,66	
15-37-13	-	-	1	1,66	

Le nom des haplotypes est défini selon le nombre de répétition au niveau des différents loci IVS8CA, IVS17bTA et IVS17bCA respectivement
Avec : % pourcentage

article original

Les différents haplotypes A, B, C et D ont été retrouvés aussi bien chez les normaux que chez les patients (Tableau IV).

L'haplotype B a été retrouvé chez 50% des chromosomes portant la mutation F508del. Une différence significative a été notée entre les normaux et les mucoviscidosiques portant cet haplotype ($P=0.02$).

Etude des marqueurs intragéniques

Les haplotypes établis à l'aide des marqueurs IVS8CA, IVS17bTA et IVS17bCA sont regroupés dans le tableau V. Pour les 80 chromosomes analysés, 38 haplotypes différents ont été trouvés ; Cinq d'entre eux associés aux chromosomes portant la mutation F508del avec un haplotype (23-31-13) représentant 40%. Une différence significative a été notée entre les deux groupes pour cet haplotype ($p=0.00088$).

Discussion

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à l'étude des haplotypes liés à la mutation F508del en utilisant des marqueurs extra et intragéniques. Ces différents marqueurs ont été utilisés compte tenu de leur grande informativité.

Les marqueurs XV2C et KM19 sont étroitement liés au gène CFTR, la reconstruction des haplotypes à l'aide de ces deux marqueurs peut considérablement faciliter l'étude moléculaire du gène CFTR (9).

Dans le présent travail, l'étude de ces deux marqueurs montre une association entre la mutation F508del et l'haplotype B (50%). Une différence significative a été notée entre les sujets normaux et mucoviscidosiques portant l'haplotype B ($p=0.02$). Ce résultat concorde avec ceux décrits dans la littérature. En effet, l'haplotype B est souvent associé à la mutation F508del dans différentes populations telles que l'Allemagne (10), l'Italie (11), la Serbie (12), la Turquie (13) et l'Angleterre (14), ce qui est en faveur de la théorie d'une origine commune de cette mutation.

L'association de la mutation F508del avec le même haplotype est susceptible de refléter une origine unique de la mutation, qui a probablement été introduite il y a

environ 52.000 ans, durant l'ère paléolithique dans la population «caucasioïde», après la divergence des grands groupes continentaux (15).

La recherche des mutations mucoviscidosiques a été facilitée par l'utilisation des marqueurs microsatellites, en effet une forte association a été identifiée entre les mutations du gène CFTR et les haplotypes construits à l'aide de ces marqueurs (16).

Dans notre travail suite à l'étude des marqueurs intragéniques, la mutation F508del a été associée à 5 haplotypes différents. Une différence de distribution de ces haplotypes entre les deux populations a été notée.

L'haplotype le plus fréquent chez les sujets malades 23-31-13 (40%) a été trouvé seulement chez 8.33% dans la population normale ($P=0.00088$). Cette association peut considérablement faciliter la recherche de la mutation F508del. Le même haplotype a été retrouvé en Angleterre (17), en France (9), en Irlande du Nord (19), en Turquie (20), en Espagne (21) et en Italie (22). Le reste des haplotypes associés à la mutation F508del (16-31-13, 28-31-13, 28- 29-13 et 32-31-13) peuvent être le produit de recombinaisons génétiques produites au cours du temps (9).

La reconstruction des haplotypes par le biais des marqueurs extra et intragéniques est un outil très important lors du diagnostic moléculaire de la mucoviscidose. En effet, l'étude des haplotypes permet d'orienter l'identification des défauts moléculaires, la détection d'anomalie chez certaines familles lorsqu'une ou aucune mutation n'a pas été identifiée, d'exclure l'existence d'une contamination fœto-maternelle lors du diagnostic prénatal. Elle permet également de déterminer l'origine de chaque mutation ainsi que de suivre son évolution au cours du temps. Cette étude préliminaire doit être complétée sur un nombre plus important de patients mucoviscidosiques à fin de confirmer les résultats trouvés.

Références

1. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989; 245: 1073-80.

Etude des haplotypes associés à la mutation F508del dans une population Tunisienne

2. Zielenski J, Markiewicz D, Chen HS, Schappert K, Seller A, Durie P, Corey M, Tsui LC. Identification of six mutations (R31L, 441delA, 681delC, 1461ins4, W1089R, E1104X) in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Hum Mut* 1995; 5: 43-7.
3. Fredj SH, Messaoud T, Templin C, Des Georges M, Fattoum S, Claustres M. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Mutation Spectrum in Patients with Cystic Fibrosis in Tunisia. *Genet Test Mol Biomark* 2009; 13: 577-81.
4. Repetto M, Gabriel AM, Alonso R, Delgado I. XV-2c and KM: 19 haplotype analysis in Chilean patients with cystic fibrosis and unknown CFTR gene mutations. *Biol Res* 2007; 40: 223-29.
5. Estivill X, Scambler PJ, Wainwright BJ. Patterns of polymorphism and linkage disequilibrium for cystic fibrosis. *Genomics* 1987b; 1: 257-63.
6. Beaudet AL, Feldman GL, Fernbach SD, Buffone GJ, O'Brien WE. Linkage disequilibrium, cystic fibrosis and genetic counseling. *Am J Hum Genet* 1989; 44: 319-26.
7. Morral N, Nunes V, Casals T. CA/GT Microsatellite alleles within the CFTR gene are not generated by unequal crossing-over. *Genomics* 1991; 10: 692-98.
8. Zielenski J, Markiewicz D, Rininsland J, Tsui LC. A cluster of highly polymorphic dinucleotide repeats in intron 17b of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Am J Hum Genet* 1991; 49: 1256-62.
9. Claustres M, Desgeorges M, Moine P, Morral N, Estivill X. CFTR haplotypic variability for normal and mutant genes in cystic fibrosis families from southern France. *Hum Genet* 1996; 98: 336-44.
10. Dork T, Neumann T, Wulbrand U, Wulf B, Kalin N, Maass G, Krawczak M, Guillermit H, Ferec C, Horn G. Intra- and extragenic marker haplotypes of CFTR mutations in cystic fibrosis families. *Hum Genet* 1992; 88: 417-25.
11. Castaldo G, Rippha E, Sebastio G, Raia V, Ercolini P, De Ritis G, Salvatore D, Salvatore F. Molecular epidemiology of cystic fibrosis mutations and haplotype in Southern Italy evaluated with an improved semiautomated robotic procedure. *J Med Genet* 1996; 33: 475-79.
12. Radivojevic D, Lalic T, Djuricic M, Guc-scekic M, Minic P, Sovitic A. Analysis of extra- and intragenic marker haplotypes as part of molecular diagnosis of cystic fibrosis in patients from Serbia. *Arch Biol Sci Belgrade* 2008; 60: 5-10.
13. Hundrieser J, Bremer S, Peinemann F, Stuhmann M, Hoffknecht N, Wulf B, Schmidtke J, Reiss J, Maab G, Tummeler B. Frequency of the F508 deletion in the CFTR gene in Turkish cystic fibrosis patients. *Hum Genet* 1990; 85: 409-10.
14. Watson EK, Edward SM, Simova EM, Thompson JO, Williamson RW, Williams C. The incidence of F508 CF mutation, and associated haplotypes, in a sample of English CF families. *Hum Genet* 1990; 85: 435-36.
15. Morral N, Bertranpetot J, Estivill X, Nunes V, Casals T, Gimenez J, Reis A, Varon-Mateeva R, Macek M Jr, Kalaydjieva L, Angelicheva D, Dancheva R, Romeo G, Russo MP, Garnerone S, Restango G, Ferrari M, Magnani C, Clauster M, Desgeorges M, Schwartz M, Dallapiccola B, Novelli G, Ferec C, De Arce M, Nemeti M, Kere J, Anvret M, Dahl N, Kadasi L. The origin of the major cystic fibrosis mutation (F508) in European populations. *Nat Genet* 1994; 7: 169-75.
16. Morral N, Nunes V, Casals T, Chillon M, Gimhez J, Bertranpetit J, Estivill X. Microsatellite haplotypes for cystic fibrosis: Mutations framework and evolutionary tracers. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1015-22.
17. De Braekeleer M, Chaventré A, Bertorelle G, Verlingue C, Raguénés O, Mercier B, Ferec C. Linkage disequilibrium between the four most common cystic fibrosis mutations and microsatellite haplotypes in the Celtic population of Brittany. *Hum Genet* 1996; 98: 223-27.
18. Hughes D, Hill A, Redmond A, Nevin N, Graham C. Fluorescent multiplex microsatellites used to identify haplotype associations with 15 CFTR mutations in 124 Northern Irish CF families. *Hum Genet* 1995; 95: 462-64.
19. Onay T, Zielenski J, Topaloglu O, Gokgoz N, Kayserili H, Apak MY, Camcioglu Y, Cokugras YH, Akcakaya N, Tsui LC, Kirdar B. Cystic Fibrosis Mutations and Associated Haplotypes in Turkish Cystic Fibrosis Patients. *Hum Biol* 2001; 73: 191-203.
20. Morral N, Dork T, Llevadot R. Haplotype analysis of 94 cystic fibrosis mutations with seven polymorphic CFTR DNA markers. *Hum Mutat* 1996; 8: 149-59.
21. Russo MP, Romeo G, Devoto M, Barbujani G, Cabrini G, Giunta A, D'Alcamo E, Leoni G, Sangiuolo F, Magnani C, Cremonesi L, Ferrari M. Analysis of linkage disequilibrium between different cystic fibrosis mutations and three intragenic microsatellites in the Italian population. *Hum Mut* 1995; 5: 23-27.