

## ARTICLE ORIGINAL

# Première étude du marqueur polymorphe MP6D9 chez une population d'enfants mucoviscidosiques

Chaïma Sahli \*,  
Sondess Hadj Fredj,  
Taieb Messaoud

Laboratoire de Biochimie Clinique  
Hôpital d'Enfants de Tunis-Tunisie

### Résumé

Depuis 1989, date de découverte du gène CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator) responsable de la mucoviscidose, plus de 1900 mutations ont été décrites. Cette grande hétérogénéité des mutations mucoviscidosiques permet d'expliquer en partie l'importante variabilité clinique de cette affection. Nous nous sommes intéressés dans le présent travail à l'étude pour la première fois du polymorphisme extragénique MP6D9 dans une population Tunisienne mucoviscidosique.

Notre étude a porté sur 60 patients ayant un test de la sueur positif ( $[Cl^-] > 60 \text{ mmol/L}$ ). Une population témoin de 45 sujets sains a été également incluse. L'étude du marqueur polymorphe MP6D9 a été réalisée par la technique PCR-RFLP.

Les résultats obtenus ont montré la prédominance du génotype 2/2 chez les patients étudiés (73.33% vs 15.55%) et du génotype 1/2 chez nos témoins analysés (53.33% vs 18.33%). Nos résultats sont en accord avec ceux retrouvés dans la littérature ce qui confirme l'implication de ce marqueur dans la présentation clinique et l'évolution de la mucoviscidose. Notre travail, portant sur l'intérêt du polymorphisme MP6D9 sur le gène CFTR, constitue l'un des premiers travaux effectués dans la population mucoviscidosique Tunisienne et confirme l'utilité de ce marqueur dans l'étude de l'origine du locus CFTR et dans la variabilité de l'expression clinique.

**Mots-clés :** Mucoviscidose, gène CFTR, polymorphisme MP6D9.

### Abstract

Since the identification of the CFTR gene (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator) responsible for cystic fibrosis (CF), over 1900 mutations are described. This large molecular heterogeneity can explain in part the significant clinical variability of the disease which may be due to environmental or genetic factors. With the development of molecular biology techniques, more and more genetic markers can be tested to study the clinical variability of cystic fibrosis.

In this work, we are interested for the first time to study the extragenic polymorphic marker MP6D9 in a CF Tunisian population.

Our study involved 60 CF Tunisian patients with a positive sweat test ( $[Cl^-] > 60 \text{ mmol/L}$ ). A cohort of 45 healthy controls was also enrolled. The analysis of the polymorphic marker MP6D9 was performed by PCR-RFLP.

The distribution of MP6D-9 genotypes and alleles was significantly different between CF and healthy subjects. We noted that the 2/2 genotype was higher in CF patients than in controls (73.33% vs 15.55%), whereas the frequency of the 1/2 genotype was lower in our patients (53.33% vs 18.33%).

Our results are consistent with those found in the literature which confirms the involvement of this marker in the clinical presentation and evolution of cystic fibrosis.

The study of polymorphism MP6D9 is one of the first research in the CF Tunisian population which allowed us to show the involvement of this marker in the expression of cystic fibrosis in our population.

**Key words:** Cystic Fibrosis, CFTR gene, MP6D9 marker.

## INTRODUCTION

La mucoviscidose ou «fibrose kystique du pancréas» est une maladie héréditaire de transmission autosomique récessive. Elle est considérée dans les populations caucasiennes comme étant la plus fréquente des maladies génétiques potentiellement graves dès l'enfance (1). Elle résulte d'un dysfonctionnement d'une protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator) intervenant dans la régulation du transport des chlorures au niveau de la membrane cellulaire. Les principales manifestations cliniques concernent les voies respiratoires, le tube digestif et les glandes sudoripares (2). Depuis 1989, date de découverte du gène CFTR, plus de 1900 mutations ont été découvertes dans le monde dont la plus fréquente est la mutation F508del (3). En Tunisie, les travaux sur la mucoviscidose ont débuté depuis 1990 permettant d'établir le spectre de mutations responsable de la maladie (4).

Le diagnostic de la mucoviscidose repose sur le dosage du chlore sudoral et est confirmé par une étude génétique à la recherche de la mutation en cause. Toutefois, l'expression de la maladie reste très variable d'un individu à l'autre, aussi bien sur le plan clinique que moléculaire. Les thérapeutiques actuelles purement symptomatologiques se contentent de traiter les conséquences du dysfonctionnement de la protéine, afin d'améliorer la qualité et la durée de vie des patients.

Compte tenu de cette variabilité génotypique et phénotypique, plusieurs approches ont permis d'identifier les rôles des polymorphismes du gène CFTR dans l'expression et l'évolution de la maladie. De ce fait, nous sommes intéressés à l'étude du polymorphisme extragénique MP6D9 au niveau d'une population Tunisienne malade et saine.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Patients

Notre étude a porté sur 60 sujets mucoviscidosiques adressés à notre laboratoire de Biochimie et de biologie moléculaire à l'Hôpital Béchir Hamza de Tunis de différents hôpitaux tunisiens, dont l'âge varie entre 3 jours et 12 ans (avec une médiane de 5 mois), présentant des

concentrations élevées en chlorures avec une moyenne ( $\pm$ DS)= $97.5 \pm 42,5$ mmol/l obtenues à l'aide d'un test de la sueur. Le recensement des informations concernant les malades étudiés a été mené par l'interrogatoire de l'un ou des deux parents. En parallèle, une cohorte de 45 sujets sains sans antécédents de mucoviscidose a été également incluse dont l'âge varie entre un mois et 15 ans, ils sont originaires de différentes régions de la Tunisie.

## 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 précipitation saline classique (*salting out*) (5).

Les conditions de l'amplification de PCR et les séquences des amorces ont été précédemment décrites. Le fragment amplifié est de 377pb (6). Le génotypage consiste à la recherche du marqueur MP6D9 par la technique PCR-RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism). Le polymorphisme de restriction est mis en évidence dès qu'une variation de séquence d'ADN est révélée par une modification de la carte de restriction (création ou abolition d'un site de restriction enzymatique). La digestion enzymatique a été effectuée à l'aide de l'enzyme de restriction MspI à une température d'incubation de 37°C pendant 3h. Une simple électrophorèse sur gel d'agarose à 2% des produits digérés a permis de visualiser la présence ou non de coupure en présence d'un marqueur de taille moléculaire (100 pb Promega®). Les tailles des deux fragments obtenus sont respectivement 204 et 173 pb.

L'ensemble des données statistiques a été analysé avec le logiciel SPSS (STATISTICAL PACKAGE FOR SOCIAL SCIENCES) version 20. La comparaison des variables qualitatives a été réalisée par le test chi2 selon le nombre de sujets par groupe. Ce test nous a permis de comparer des variables quantitatives et de tester l'adéquation d'une série de données à une famille de lois de probabilité ou de tester l'indépendance entre deux variables. Une différence est notée significative pour une valeur de  $p < 0.05$ .

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

Notre étude a été menée sur une population malade portant sur 60 sujets mucoviscidosiques composée de 28 patients de sexe masculin et 32 patients de sexe féminin avec une sex-ratio de 0.74, il existe donc une répartition inégale en faveur des filles. L'âge du diagnostic des patients étudiés varie selon l'âge d'apparition des symptômes qui varie entre trois jours et 12 ans avec une médiane de 5 mois. De plus, nous avons remarqué que 77% des patients ont été diagnostiqués avant l'âge d'un an, ceci s'explique par le fait que la mucoviscidose s'exprime dès les premières années de vie. Notre population malade peut être donc qualifiée comme infantile. Le taux de consanguinité est de 58%. La répartition géographique a montré que les patients mucoviscidosiques ont été répertoriés sur tous les gouvernorats de la Tunisie ceci témoigne de la grande hétérogénéité des origines des patients étudiés. Toutefois, nous avons noté une abondance au niveau de la région du Centre Ouest avec 22.3% suivie des régions du Centre Est avec 19.6% et du Sud Est avec 15.2%.

Le tableau clinique des malades mucoviscidosiques est le premier signe indicateur de la présence de la maladie, mais les diagnostics biochimique et moléculaire restent un outil indispensable pour le diagnostic de la mucoviscidose.

Le diagnostic biochimique de cette pathologie est confirmé par un test de la sueur positif par la technique de l'exsudose avec une moyenne des chlorures sudorales ( $\pm$ DS)= $97.5 \pm 42.5$  mmol/l (étant donné que  $[Cl] > 60$  mmol/L est considérée comme pathologique) suivi par une étude moléculaire du gène CFTR à la recherche des mutations en cause.

Une population témoin mixte de 45 sujets sains a été également incluse dans notre étude.

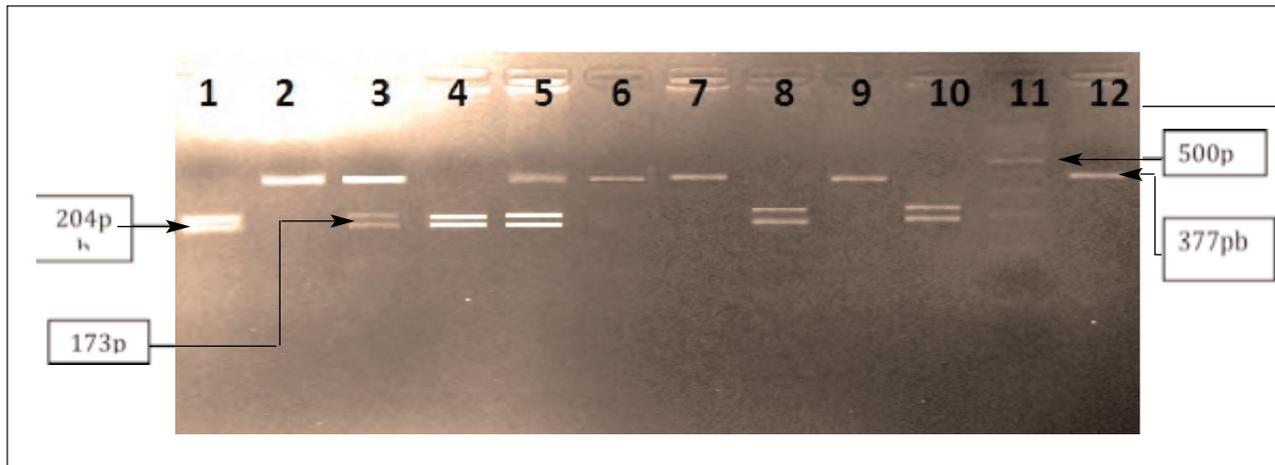
Les malades mucoviscidosiques analysés sont caractérisés par une hétérogénéité génotypique et phénotypique, ils sont pour la majorité diagnostiqués précocement au cours de la première année de la vie (77%), pour 23% de nos patients la maladie est diagnostiquée plus tardivement. Les signes respiratoires et l'infection des voies aériennes aux quels s'ajoute également une atteinte digestive dominant considérablement

le tableau clinique chez nos sujets étudiés. L'étude clinique des patients analysés nous ont permis de classer nos malades en trois groupes: malades avec une atteinte respiratoire, malades avec une atteinte digestive et malades avec une atteinte mixte (digestif et respiratoire). En effet, 45% de nos malades ont présenté une atteinte respiratoire et une atteinte digestive. Le syndrome respiratoire se manifeste par des bronchites récurrentes, une toux chronique, sèche et quinteuse, un encombrement bronchique et une expectoration mucopurulente. Une infection chronique par *Pseudomonas aeruginosa* (bacille pyocyanique) constitue la complication infectieuse principale de la maladie. L'atteinte digestive est caractérisée par une insuffisance pancréatique exocrine accompagnée par une diarrhée chronique avec émission de selles volumineuses et grasses, des douleurs abdominales et une insuffisance pondérale contrastant avec un appétit conservé. Cette diarrhée chronique est responsable d'une hypotrophie pondérale puis staturale chez les patients mucoviscidosiques. 35% de nos patients présentent uniquement une atteinte digestive. On observe également une atteinte pulmonaire chez 20 % de nos malades.

Dans le présent travail, nous avons procédé à l'étude du polymorphisme extragénique MP6D9 situé à 40 kb en amont du début du gène CFTR. Ce polymorphisme touche le site de restriction de l'endonucléase MSPI. Il a été étudié par PCR RFLP. Il s'agit d'une technique simple à réaliser et rapide car elle nous a permis d'avoir des résultats dans moins de 6 heures. C'est une méthode fiable et ses possibilités d'application sont très étendues. C'est une technique bien qu'elle est très utilisée, elle n'est pas automatisable.

La taille du fragment amplifié est de 377 pb. Le fragment amplifié est ensuite incubé avec l'enzyme de restriction MSPI. Les produits de la digestion sont contrôlés par la suite sur un gel d'agarose de 2% en présence d'un marqueur de taille moléculaire (100 pb Promega) et d'un témoin non digéré (Figure 1).

Le polymorphisme MP6D9 est un locus biallélique où l'allèle 1 se traduit par l'absence de site de restriction et l'allèle 2 se traduit par sa présence. Les résultats de la migration des fragments digérés montrent trois profils électrophorétiques différents: le premier marque la présence d'une seule bande de 377 pb de taille moléculaire, ce qui correspond à un génotype homozygote normal (1/1).



**Figure 1 : Profil de migration électrophorétique des produits digérés par l'endonucléase MspI des fragments amplifiés.**

- Puits 1, 4,8 et 10: Sujets ayant le génotype 2/2
- Puits 3 et 5: Sujets ayant le génotype 1/2
- Puits 2, 6,7 et 9 : Sujets ayant le génotype 1/1
- Puits 12: Témoin non digéré
- Puits11: Marqueur de taille moléculaire (100 pb Promega ®)

Le second profil présente trois bandes de taille moléculaire différente; la première bande correspond à un fragment de 377 pb et les deux autres bandes correspondent aux deux fragments de 204 et 173 pb; il s'agit d'un profil correspondant à un génotype hétérozygote (1/2). Le troisième profil électrophorétique montre la présence de deux bandes correspondant aux deux fragments de tailles moléculaires 204 et 173 pb chacun qui sont issus de la digestion du fragment amplifié. Ce profil correspond à celui d'un homozygote dont le génotype est (2/2).

L'analyse de la distribution génotypique et allélique du

polymorphisme MP6D9 montre une différence significative entre le groupe de contrôle et le groupe des patients ( $p < 0,001$ ) (tableau I et tableau II). En effet, au niveau des patients, le génotype homozygote malade (2/2) est majoritairement dominant avec un taux de 73.33% suivi des génotypes hétérozygote (1/2) et homozygote normal (1/1) avec des fréquences respectives de 18.33% et 8.33%. A l'opposé, l'analyse génotypique au niveau des témoins montre une légère dominance du génotype hétérozygote (1/2) avec une fréquence de 53.33% suivi des génotypes homozygote normal (1/1) et homozygote malade (2/2) avec des fréquences

**Tableau I : Répartition génotypique du polymorphisme MP6D9 chez les malades et les témoins étudiés**

Génotypes	Nombre des sujets		Pourcentages (%)		Degré de signification de p
	Malades	Témoins	Malades	Témoins	
1/2	11	24	18.33	53.33	0.001
2/2	44	7	73.33	15.55	4.56 10 <sup>-9</sup>
1/1	5	14	8.33	31.11	0.002
<b>Total</b>	<b>60</b>	<b>45</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	

NB : Le seuil de signification considéré est de 5%

**Tableau II: Répartition allélique du polymorphisme MP6D9 chez les malades et les témoins étudiés**

Allèles	Nombre de chromosomes		Pourcentages (%)		Degré de signification de p
	Malades	Témoins	Malades	Témoins	
1	21	52	17.5	57.77	1.31 10 <sup>-9</sup>
2	99	38	82.5	42.22	
Total	120	90	100	100	

NB : Le seuil de signification considéré est de 5%

respectives de 31.11% et 15.55%. Selon l'expression clinique des patients analysés, nous avons observé une association entre le génotype (2/2) et l'atteinte digestive (p=0.046) mais aucune association n'a été retrouvée concernant l'atteinte pulmonaire et la colonisation par *Pseudomonas aeruginosa* (p=0.8). Toutefois, nous avons noté une association entre les génotypes 1/1 et 1/2 avec l'atteinte mixte (p=0.044) (tableau III). Cet avantage sélectif du MP6D9 chez le groupe CF est révélé dans de nombreux travaux à travers le monde avec lequel nos résultats sont conformes. En effet, Gasparini et ses collaborateurs (7) ont trouvé une association significative entre le génotype muté 2/2 et l'atteinte digestive ce qui confirmerait l'implication du marqueur extragénique MP6D9 dans la présentation clinique et l'évolution de la mucoviscidose (7, 8).

Etant donné l'hétérogénéité phénotypique et génotypique de la mucoviscidose, plusieurs études ont cherché à mettre en évidence le rôle des marqueurs génétiques (intra et extragénique) liés au gène CFTR dans l'expression et l'évolution de la maladie.

L'étude des marqueurs génétiques dans une population est un outil intéressant non seulement pour l'analyse de la corrélation phénotype génotype, mais également pour la détermination de l'origine ethnique de chaque mutation identifiée. En effet, depuis l'identification du gène CFTR, un nombre important de mutations a été rapporté au Consortium International de Mucoviscidose. Il a été montré que certaines mutations sont associées à des marqueurs spécifiques (9). L'étude des variants génétiques paraît importante pour augmenter l'informativité génétique lors du diagnostic prénatal et la détection de l'anomalie chez certaines familles lorsque une ou aucune mutation n'a été identifiée (10).

Une meilleure complétude des bases de données sur les marqueurs génétiques, notamment grâce à un développement important des techniques moléculaires et des bases de données informatiques, ainsi que des tailles d'échantillons importantes sont des facteurs essentiels pour l'étude de la composante génétique de la mucoviscidose.

**Tableau III : Implication du marqueur MP6D9 dans la variabilité clinique des patients CF**

Génotypes	Atteinte pulmonaire	Atteinte digestive	Atteinte mixte
2/2	5	12	7
1/1+ 1/2	7	9	20
Degré de signification de p	0.8	<b>0.046</b>	<b>0.044</b>

NB : Le seuil de signification considéré est de 5%  
Atteinte mixte : atteintes respiratoire + digestive

## CONCLUSION

Notre travail, portant sur l'intérêt du polymorphisme MP6D9 du gène CFTR, constitue l'un des premiers travaux effectués dans la population mucoviscidose Tunisienne et confirme son utilité d'une part dans le diagnostic moléculaire de la mucoviscidose dans notre pays et d'autre part dans l'étude de la variabilité de son expression clinique. Cette étude préliminaire devra être complétée sur un nombre plus important de patients mucoviscidosiques afin de confirmer les résultats trouvés.

## Références bibliographiques

1. Giniès JL, Urban T. Prise en charge du patient mucoviscidose. *Revue Francophone Des Laboratoires* 2007; 397: 73-7.
2. Girodon-Boulandet E, Costa C. Génétique de la mucoviscidose. *Médecine Thérapeutique* 2005 ; 8 (3) : 126-135.
3. Consortium international d'étude des mutations du gène CFTR. [En ligne]. [mis à jour 2011; consulté le 25 Avril 2011]. Disponible: <http://genet.sickkids.on.ca/cftr>
4. Messaoud T, Bel Haj Fredj S, Bibi A, Elion J, Férec C, Fattoum S. Épidémiologie moléculaire de la mucoviscidose en Tunisie. *Ann Biol Clin* 2005; 63 (6) : 627-630
5. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*. 1988;16(3):1215.
6. Huth A, Estivill X, Grade K, Billwitz H, Speer A, Rosenthal A, et al. Polymerase chain reaction for detection of the pMP6d-9/MspI RFLP, a marker closely linked to the cystic fibrosis mutation. *Nucleic acids research*. 1989;17(17):7118.
7. Gasparini P, Novelli G, Estivill X, Olivieri D, Savoia A, Ruzzo A, et al. The genotype of a new linked DNA marker, MP6d-9, is related to the clinical course of cystic fibrosis. *Journal of medical genetics*. 1990;27(1):17-20.
8. Dork T, Neumann T, Wulbrand U, Wulf B, Kalin N, Maass G, et al. Intra- and extragenic marker haplotypes of CFTR mutations in cystic fibrosis families. *Human genetics*. 1992;88(4):417-25.
9. De Boeck K. Méthodes diagnostiques, caractéristiques cliniques et conseil dans la mucoviscidose. *Ann Nestlé*. 2006; 64: 119-130.
10. Hughes D, Dörk T, Stuurman M, Graham C. Mutation and analysis haplotypes of the CFTR gene in atypically mild fibrosis patients from North Ireland. *J Med* 2001; 38(2): 136-139.