

RECHERCHE DES MUTATIONS DU GENE *CFTR* CHEZ LES PATIENTS AFFECTES PAR L'ATRESIE BILATERALE DES CANAUX DIFFERENTS (ABCD) DANS L'EST ET SUD ALGERIEN

Reçu le 25/02/2004 – Accepté le 06/01/2005

Résumé

L'absence ou l'atrésie bilatérale des canaux déferents ABCD est une affection congénitale et héréditaire de transmission autosomique récessive : Elle représente 1 – 2% des causes d'infertilité masculine et 9 à 25 % des azoospermies obstructives. De nombreuses recherches ont confirmé que l'ABCD est une conséquence d'anomalies du gène *CFTR*, par ailleurs il a été récemment suggéré que ce même gène pourrait être impliqué dans certaines formes d'azoospermies obstructives non ABCD, et dans certains cas d'oligozoospermies sévères. La présence du variant 5 T dans l'intron 8 du gène en question, et avec l'implication d'autres facteurs génétiques conduit à un niveau d'expression anormalement bas du messenger *CFTR*, ce qui aboutit après l'étape de traduction à la production d'une quantité réduite de la protéine *CFTR* fonctionnelle qui sera à l'origine de cette pathologie. Le peu d'intérêt porté à l'étude de la mucoviscidose et les diverses mutations de son gène en Afrique du Nord particulièrement en Algérie nous a poussé à orienter notre étude sur la recherche des mutations impliquées dans cette forme de stérilité chez une partie de la population de ce pays. A cet effet, nous avons étudié 18 sujets masculins chez qui le diagnostic d'ABCD a été confirmé par des analyses biologiques et biochimiques du sperme et par une échographique approfondie de leur appareil urogénital. Toutes les mutations détectées lors de notre étude ont d'ores et déjà été identifiées chez des patients atteints d'une ABCD dans d'autres populations du monde. Toutefois, une seule d'entre elles semble être spécifique à la maladie (A1364V).

Mots clés : ABCD, mutations *CFTR*, fibrose kystique, symptômes cliniques.

Abstract

The lack or the bilateral Artesia or the vas deferens (CBAVD) is a congenital and hereditary affection of recessif autosomic transmission. It represents 1 – 2% of masculine in infertility causes and 9 to 25% of obstructive azoospermia. Many research confirmed that CBAVD is the consequence of the anomalies of the *CFTR* gene; Furthermore, it has been suggested recently that this same gene will be implicated in certain forms of obstructive azoospermia non CBAVD and in certain cases of severe oligozoospermies. The presence of the 5 T variant in the intron 8 of the gene in question and with the implication of other genetic factors lead to a low abnormal expression level of the *CFTR* messenger, witch conducts after the translation stage to the production of the a low quantity of the *CFTR* fonctionnel protein wich will be at the origin of this pathology. The little interest turned to the study of the mucoviscidosis and the diverses mutations of its gene in North Africa; particularly in Algeria put us to orientate our work on the mutations research implicated in this form of sterility in a part of the population of this country. At this fact, we have studied 18 masculine subjects in wich the diagnostic of CBAVD has been confirmed by biological and biochemical analyses of the sperm, and uro-genital apparatus. All the mutations detected the time of our study have already been identified in patients affected by one of CBAVD in other populations of the world. However, one only seems to be specific of the disease (A 1364V).

Keywords: CBAVD, *CFTR* mutation, cystic fibrosis, clinical symptom.

M. YAHIA^a
D. NAIMI^b

^aLaboratoire de biologie et physiologie cellulaire et moléculaire, Département de la médecine vétérinaire, Université de Batna (05000), Algérie.

^bLaboratoire de biologie et physiologie cellulaire, Département de Biologie, Université de Constantine (25000), Algérie.

ملخص

إن الغياب الثنائي الجوانب للقناة الناقلة للنطاف (ABCD) هو مرض وراثي متنحي تنقله كروموزومات جسمية، ويمثل من 1 إلى 2 % من أسباب العقم عند الرجال ومن 9 إلى 25% من حالات الغياب الكلبي للحيوانات المنوية بسبب الانسداد الكلبي لهذه القنوات. إن قلة الاهتمام بهذا المرض ومختلف طفراته في شمال إفريقيا وبالأخص في الجزائر دفعتنا إلى تركيز بحثنا لإيجاد مختلف الطفرات الخاصة بهذا المرض. ولهذا الغرض تمت الدراسة على 18 رجلا عقيما تم التأكد من إصابتهم عن طريق الفحوص المعقمة لأجهزتهم التناسلية وكذلك الدراسة البيولوجية والبيوكيميائية لنطافهم. إن كل الطفرات التي وجدت سبق وأن تم اكتشافها عند شعوب أخرى من العالم ومن بينها طفرة واحدة خاصة بهذا المرض A1364V.

الكلمات المفتاحية : غياب القناة الناقلة للنطاف ABCD، طفرات *CFTR*، ميكروفيسيدوز، أعراض الإصابة.

L'absence bilatérale congénitale des canaux déferents est due à une régression bilatérale du canal mesonéphrotique, elle est observée chez un homme adulte sur 1000 après autopsie testiculaire (Mack et al. 1993). Son expression phénotype est variable, dans certains cas, il s'agit d'une absence complète et bilatérale des canaux déferents, associée à l'absence de la partie distale de l'épididyme et une hypoplasie des vésicules séminales, dans d'autres cas, l'atteinte est asymétrique avec absence unilatérale complète, ou le déferent controlatéral est présent mais atrophié. Parfois l'atteinte est plus discrète avec uniquement une absence de connexion entre les déferents ainsi que leurs épididymes ou entre les testicules et l'épididyme (Oates and Amos. 1994).

Sur le plan biochimique : L'éjaculat est de faible volume $< 1\text{cm}^3$ est de pH acide ; le liquide séminal se caractérise par une azoospermie, et une forte réduction ou une absence de fructose. Cependant, les valeurs des dosages des gonadotrophines apparaissent normales, et les spermatozoïdes prélevés dans la tête de l'épididyme conservent leur pouvoir fécondant (Silber et al. 1994).

Il a été montré que l'ABCD est une forme incomplète de la mucoviscidose à expression génitale, et dont les bases moléculaires ne sont pas complètement comprises (Holsclaw et al. 1971). Le même gène semblait pouvoir être impliqué dans des maladies à formes aussi diverses que l'ABCD isolée et la fibrose kystique (Dumur et al. 1990, Anguiano et al. 1992, Patrizio et al. 1993, Culard et al. 1994, Jarvi et al. 1995, Rave-Harel et al. 1995).

Nos résultats ont permis de classer les patients en deux groupes : Ceux qui ont 2 mutations alléliques (7/18) et ceux qui ont une seule mutation identifiée (11/18).

La mutation ΔF 508 est la plus fréquente (6/25) suivie par R-117H (3/25), cette dernière est très souvent rencontrée chez les patients atteints par l'ABCD (Gervais et al. 1993).

Selon nos résultats, l'implication de l'allèle 5 T de l'intron 8 du gène CFTR dans cette pathologie est confirmée dans la population algérienne.

MATERIELS ET METHODES

Patients

Notre étude a été effectuée sur 18 sujets masculins d'origines différentes et chez qui le diagnostic d'ABCD avait été clairement établi par l'échographie de l'appareil urogénital et par la biochimie du sperme ; sachant qu'aucun des patients n'avait signalé avoir des symptômes évocateurs de mucoviscidose (tableaux 2 et 3).

Protocole d'analyse génétique des mutations CFTR

Pour la réalisation de cette étude, nous avons effectué une extraction d'ADN à partir des leucocytes périphériques (Miller et al. 1988), puis cet ADN est amplifié par la technique de PCR dont les conditions ont été décrites par (Fanen et al. 1992, Claustres et al. 1993).

Les produits PCR sont ensuite séparés par électrophorèse puis visualisés aux UV après action du bromure d'éthidium (Chehab et al. 1992).

Les séquences polypyrimidiniques de l'intron 8 ont été identifiées par la technique d'électrophorèse en gradient de gel dénaturant (DGGE) (Ficher et al. 1983, Kieseewetter et al. 1993). Les conditions d'électrophorèse ont été choisies de façon à explorer que les trente paires de bases qui précèdent l'exon 9. Une fois séquencées, elles nous ont permis d'identifier chacune par le motif de répétition $(TG)_n$ m(T) ou n et m présentent respectivement le nombre de TG et de T. n étant égal à 9, 10, 11, 12 ou 13 et m égal à 5, 7 ou 9. Les allèles observés après migration dans un gel 10 – 60% se rangent, selon une échelle progressivement dénaturée, c'est-à-dire du moins stable au plus stable. Sachant que, plus un allèle est composé de TG, plus il est stable et inversement, plus un allèle a de T, moins sa stabilité est forte (Chu et al. 1993).

RESULTATS ET DISCUSSION

L'analyse des résultats biochimiques (Tableau 1) nous a révélé que l'éjaculat de ces patients est de faible volume ($< 1\text{cm}^3$ après trois jours d'abstinence) est de pH < 7 , leur liquide séminal se caractérise par une azoospermie et une très forte diminution de fructose. L'acidification du liquide séminal reflète l'absence de sécrétions des vésicules séminales qui contribuent normalement à produire un liquide alcalin très riche en fructose. Cependant, ils ne présentaient aucun autre signe, tant au niveau pulmonaire que digestif, et les résultats du test de la sueur étaient normaux (Tableau 2).

Les résultats biochimiques sont confirmés par les images échographiques : Les épididymes ont augmenté d'épaisseur en raison de l'accumulation du liquide séminal et les vésicules séminales sont anormales, et hypoplasiques dans la plupart des cas voir absentes (Oates and Amos. 1994).

Néanmoins, la majorité des spermatozoïdes prélevés dans la tête de l'épididyme conservent leur pouvoir fécondant. A noter aussi que certaines anomalies des spermatozoïdes sont décrites et qui sont attribuées beaucoup plus à un dysfonctionnement de l'épididyme qu'à un problème primaire des testicules (Silber et al. 1994).

A l'issue de la recherche des mutations du gène CFTR de ces sujets ABCD (Tableau 3), l'analyse des 36 chromosomes ABCD a donné : 7/18 (38,88%) des patients présentant une double mutation hétérozygote, et 11/18 (61,12%) avec une seule mutation ce qui explique la grande fréquence des mutations du gène CFTR dans cette pathologie (Patricio et al. 1993, Oates and Amos. 1994, Braekeleer et al. 1996), par ailleurs, aucune mutation homozygote n'a été révélée.

La fréquence de la délétion ΔF 508 est la plus élevée (24 %) (Dumur et al. 1990, Anne D M et al. 1997), et a été identifiée sur 6 chromosomes. En plus de la mutation ΔF 508, de nombreux autres défauts moléculaires ont été observés, tel que la R 117 H décelée sur 3 chromosomes confirmant son apparition régulière dans cette pathologie (Gervais et al. 1993). Les autres mutations n'ont pas affecté plus d'un chromosome ; tandis que 11 chromosomes ne présentent aucune mutation.

En fait, tous les types de mutations obtenus lors de notre étude ont été retrouvés chez les sujets présentant une ABCD isolée, et la plupart de ces mutations ont été déjà identifiées chez des patients atteints de mucoviscidose, (Anne DM et al. 1997, Dohle GR et al. 1999). Ceci a permis à de nombreux auteurs de définir l'ABCD comme étant une mucoviscidose à expression génitale (Anguiano et al. 1992, Ferec et al. 1996).

La mutation (A 1364 V) qui semble être parmi celles qui sont spécifiques à l'ABCD selon de nombreux auteurs (Anne DH et al. 1997) a été détectée chez un seul patient. En plus, on constate qu'aucun patient ne porte un génotype homozygote pour ΔF 508, ou un génotype hétérozygote pour deux mutations sévères. Ce qui confirme l'idée qu'un phénotype ABCD hétérozygote résulte de la combinaison de deux allèles, un de nature sévère et l'autre de nature modérée ou peu sévère « Mild ».

Ainsi, les mutations peu sévères ont un effet dominant par rapport aux mutations sévères (Braeckeleer et al. 1996, Dohle et al. 1999). A propos du variant 5T, 16,16% des chromosomes ABCD analysés (6/36) sont porteurs d'une séquence répétée 5T.

Cet allèle 5T n'est pas retrouvé chez les sujets porteurs de 2 mutations sur le gène CFTR. En revanche, 6/11 des patients chez qui nous n'avons pu trouver qu'une seule mutation sont porteurs de cet allèle 5T. La présence du variant 5T en question au niveau du site de branchement de l'intron 8 est considéré comme le défaut moléculaire le plus commun chez les patients ABCD, (Chu et al. 1993, Chillon et al. 1995), conduisant à certains transcrits CFTR délités de l'exon 9, ce qui peut permettre l'expression d'une quantité suffisante de protéine CFTR pour éviter le phénotype de mucoviscidose, mais pas réellement suffisante pour éviter l'apparition de formes frontières comme l'absence de déférents.

L'explication physiopathologique mise en avant serait un épaissement muqueux à l'intérieur du canal déférent conduisant à une obstruction précoce intracanalalaire et une involution intra-utérine de ces canaux (Chillon M et al. 1995). La pénétrance de ce variant n'est pas totale et des

études de transmission des haplotypes dans ces familles montrent que d'autres gènes ou d'autres facteurs génétiques sont probablement impliqués dans cette maladie comme le variant M470V (Estivill X.1996, Anne de Meeus et al. 1998).

Tableau 1 : Analyse biologique et biochimique du liquide séminal chez les 18 patients ayant une ABCD.

	ABCD n=18	Témoin (valeurs de référence)
Spermatozoïdes	0	10 à 20 x 10 ⁶ SPZ / ml
Volume du liquide séminal (ml) après 3 jours d'abstinence	0,97 ± 0,3	1,8 à 5,8
Citrate (μ moles)	58,43±12,10	> 47
Fructose (μ moles)	0,17±0,12	> 21
pH du liquide séminal	6,52 ±0,2	7,4

Tableau 2 : Observations échographiques de l'appareil urogénital des patients ayant une ABCD, et après le test de la sueur.

Patients	Origine	Age (ans)	Test de la sueur mEq/l	Vésicules séminales (ml) D / G	Epididyme m.m D / G	Anomalies rénales
P1	Ouargla	26	50	2,5 /0,7	11/12	RAS
P2	Djelfa	34	68	5/6	10/12	RAS
P3	Ain Beida	27	49	0,5/1,1	10/11	RAS
P4	Annaba	38	55	nv/2	11/13	RAS
P5	Ghardaia	33	38	1,3/0,9	10/10	Kyste sur le rein droit.
P6	Biskra	30	38	2,7/1,1	9/11	RAS
P7	Ain mlila	39	62	0,8/nv	10/10	RAS
P8	Setif	29	60	nv/nv	10/12	RAS
P9	Ghardaia	31	53	0,8/0,4	8/10	RAS
P10	Batna	27	36	6/0,6	11/13	RAS
P11	Batna	28	39	8/0,5	9/11	RAS
P12	Batna	40	53	7/ nv	13/10	Kyste sur le rein droit.
P13	Tebessa	29	48	nv/1,5	11/9	RAS
P14	Tougourt	37	40	2/nv	12/11	RAS
P15	Batna	32	45	2/0,5	9/9	RAS
P16	Khenchela	25	49	2,8/0,6	11/11	RAS
P17	Souk ahras	39	39	0,4/nv	12/12	RAS
P18	Guelma	41	48	3,3/3,5	9/11	Kyste sur le rein gauche et droit.

Valeurs prises comme références : Vésicules séminales 5 à 6 ml, Epididymes : environ 10 mm d'épaisseur, nv : non vu, RAS : Rien à signaler, D : droit G : Gauche.

Tableau 3 : Différentes mutations CFTR chez 18 patients ayant une ABCD.

	Patients	Caractéristiques cliniques	Mutations du gène CFTR	Etalement de T sur l'intron 8
Deux mutations détectées 38,88%	P3	RAS	ΔF508 / M952 I	9/7
	P7	Sinusite chronique	A445 E / R 117H	9/7
	P8	RAS	I 556V / Q 1352 H	7/7
	P10	RAS	D 443Y / G 542 X	7/9
	P13	RAS	ΔF 508 / A 1364 V	9/7
	P14	Diarrhées	ΔF 508 / R117 H	9/7
	P15	RAS	W 1282X / D1152 H	7/7
Une seule mutation détectée 61,12%	P1	RAS	ΔF 508 / -	9/5
	P2	RAS	R553 X / -	7/7
	P4	RAS	V 232 D / -	9/5
	P5	RAS	V562 I / -	7/5
	P6	RAS	D1152 H / -	7/7
	P9	RAS	2184 del A / -	7/5
	P11	RAS	G1069 R / -	7/7
	P12	RAS	R 117H / -	7/7
	P16	RAS	ΔF 508 / -	9/5
	P17	Allergie	ΔF 508 / -	9/5
	P18	RAS	E 60X / -	9/7

CONCLUSION

En Algérie, le test de la sueur, reste le seul moyen de diagnostic clinique de la mucoviscidose (test de la sueur considéré pathologique au delà de 60 mEq/l).

En fait, la maladie ne sera évoquée que si le patient présente une atteinte pulmonaire typique ou bien une insuffisance pancréatique exocrine associée ou non à l'atteinte pulmonaire.

La détection des formes frontalières de cette pathologie telle que l'atrésie bilatérale des canaux déferents ou le patient ne présente souvent aucune anomalie sudorale n'est qu'à son début.

Notre travail constitue un pas vers l'instauration au sein de nos hôpitaux d'un diagnostic fiable. D'autant plus que les résultats obtenus de l'étude du gène CFTR de quelques patients ABCD confirment la présence de ses mutations au sein de la population algérienne.

Par ailleurs, d'autres mutations restent à rechercher et qui seraient probablement spécifiques à l'Algérie.

REFERENCES

- [1]- Anguiano A, Oates RD, Arnus JA. et al. - Congenital bilateral absence of the vas deferens : a primarily genital form of cystic fibrosis. JAMA, 1992, **267**, 1794-1797.
- [2]- Anne DM, Caroline G, Marie D. et al. -Genetic findings in congenital bilateral aplasia of vas deferens patients and identification of six novel mutation, journals wiley, 1997, **14**, 1059-7794.
- [3]- Anne DM, Caroline G, Marie D. et al. -Linkage disequilibrium between the M470V variant and the IVS8 poly T allele of the CFTR gene in CBAVD. J Med Genet, 1998, **35**, 0-0.
- [4]- Brackleer de, Férec C. -Mutations in the cystic fibrosis gene in men with congenital bilateral absence of vas deferens. Mol Hum Reprod, 1996, **2**, 669-677.
- [5]- Chehab F, Wall J. -Detection of multiple cystic fibrosis mutations by reverse dot blot hybridisation : A technology for carrier screening. Hum Genet, 1992, **89**, 163-168.
- [6]- Chillon M, Casals T, Mercier B. et al. -Mutations in the cystic fibrosis gene in patient with congenital absence of the vas deferens. N Engl, J Med, 1995, **332**, 1475-1480.
- [7]- Chu CS, Trapnell BC, Curristin SM. et al. -Genetic basis of variable exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA. Nat Genet, 1993, **3**, 151-156.
- [8]- Claustres M, Laussel M, Desgeorges M. et al. - Analysis of the 27 exons and flanking region of the cystic fibrosis gene: 40 different mutations account for 92,1% of the mutant alleles in southern France. Hum Mol Genet 2, 1993, **8**, 1209-1213.
- [9]- Culard JF, Desgeorges M, Costa P. et al. -Analysis of the whole CFTR coding regions and splice junctions in azoospermic men with congenital bilateral aplasia of epididymis or vas deferens. Hum Genet, 1994, **93**, 467-470.
- [10]- Dohle GR, Veeze HJ, Overbeek SE. et al. -The complex relationships between cystic fibrosis and congenital bilateral absence of the vas deferens: clinical, electrophysiological and genetic data, Hum Rep vol 14, 1999, **2**, 371-374.
- [11]- Dumur V, Gervais R, Rigot JM. et al. - Abnormal distribution of CF ΔF 508 allele in azoospermic men with congenital aplasia of epididymis and vas deferens, Lancet, 1990, **336**, 512.
- [12]- Estivill X. -complexity in a monogenic disease, Nature Genet, 1996, **12**, 348-350.
- [13]- Fanen P, Ghanem N, Vidaud, M. et al. -Molecular characterisation of cystic fibrosis : 16 novel mutations identified by analysis of the whole cystic fibrosis conductance transmembrane regulator (CFTR) coding region and splice junctions. Genomics, 1992, **13**, 770-776.

- [14]- Ferec C, Verlingue C, Mercier B. –Le gène CFTR : Agénésie des déférents et mucoviscidose, deux maladie pour un même gène. *M/S*, 1996, **12**, 485-490.
- [15]- Fischer SG, Lerman LS. – DNA Fragment differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels correspondence with melting theory. *Proc Natl Academic Sci USA*, 1983, **80**, 1579-1583.
- [16]- Gervais R, Dumur V, Rigot JM. et al. –High frequency of the R 117H cystic fibrosis mutation in patients congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med*, 1993, **328**, 446-447.
- [17]- Holsclaw DS, Perlmutter AD, Shwachman H. – Genital abnormalite in male patients with cystic fibrosis. *J Urol*, 1971, **106**, 568-574.
- [18]- Jarvi K, Zielenski J, Wilschanski M. et al. –Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and obstructive azoospermia, *Lancet*, 1995, **345**, 1578.
- [19]- Kieswetter S, Macek M, Davis C. et al. – A mutation in CFTR produces different phenotypes depending on chromosomal background. *Nat genetics*, 1993, **5**, 274-278.
- [20]- Ma K, Inglis JD, Sharkey A. et al. –A Y chromosome gene family with RNA binding protein homology: candidates for the azoospermia factor AZF controlling human spermatogeneis. *Celle*, 1993, **75**, 1287-1295.
- [21]- Miller SA, Dykes DD, Polesky HG. –A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acid Res*, 1988, **16**, 1215.
- [22]- Oates RD and Amos JA. –The genetic basis of congenital absence of the vas deferens and cystic fibrosis. *J Androl*, 1994, **15**, 1-8.
- [23]- Patrizio P, Asch RH, Handelin B. et al. - Aetiology of congenital absence of vas deferens : Genetic study three generations. *Hum Reprod*, 1993, **8** : 215-222.
- [24]- Rave – Harel N, Madgar I, Goshen R. et al. –CFTR haplotype analysis reveals genetic heterogeneity in the etiology of congenital bilateral aplasia of the vas deferens. *Am J Hum Genet*, 1995, **56**, 1359-1366.
- [25]- Silber SJ, Nagy Z, Liu J. et al. – Conventional in vitro fertilization versus intra cytoplasmic sperm injection for patients requiring microsurgical sperm aspiration. *Hum Reprod*, 1994, **9**, 1705-1709.

