

ÉTABLISSEMENT DES HAPLOTYPES DES MARQUEURS D'ADN PROCHES DU LOCUS DE LA MUCOVISCIDOSE : DÉTECTION DES HÉTÉROZYGOTES

F. VASSEUR, F. FONTAINE, J.B. SAVARY,
M.M. DEMINATTI

VASSEUR F., FONTAINE F., SAVARY J.B., DEMINATTI M.M. — Etablissement des haplotypes des marqueurs d'ADN proches du locus de la mucoviscidose : détection des hétérozygotes.
Ann Génét., 1988, **31**, n° 2, 97-101.

RÉSUMÉ : Trois familles présentant un enfant atteint de mucoviscidose ont été analysées au moyen de sondes d'ADN proches du locus de la mucoviscidose. La stratégie de détermination des haplotypes parentaux associés aux gènes normaux ou mutés est présentée, ainsi que leur application à la détection des hétérozygotes parmi les enfants indemnes.

MOTS-CLÉS : Mucoviscidose. — Marqueurs d'ADN. — Détection des hétérozygotes.

La mucoviscidose est l'affection génétique la plus répandue dans la population caucasienne, avec une fréquence de 1 pour 2 000 nouveau-nés. Le déficit biochimique primaire est inconnu. Une liaison génétique étroite a été décrite entre le locus de la mucoviscidose (CF) et les sondes d'ADN suivantes : COLIA2 (Scambler et al., 1985), DOCRI-917 (Knowlton et al., 1985), l'oncogène *met* (White et al., 1985), TCRB et pJ311 (Wainwright et al., 1985), 7c22 (Scambler et al., 1986). Elles sont localisées sur le chromosome 7, à une distance de 1 centimorgan (cM) pour *met* et pJ3.11 (Beaudet et al., 1986) et de 5 cM pour 7c22 (Scambler et al., 1986).

Un couple sonde-enzyme de restriction révèle un marqueur (polymorphisme de restriction) en mettant en évidence deux fragments d'ADN de taille différente appelés allèle 1 et allèle 2. La comparaison de la répartition des allèles dans une famille permet dans les cas favorables d'associer un allèle donné au gène normal (CF+) et/ou au gène muté (CF-) chez les parents. La combinaison des allèles de chaque marqueur permet de définir un haplotype associé aux gènes CF+ et CF-

VASSEUR F., FONTAINE F., SAVARY J.B., DEMINATTI M.M. — Determination of haplotype of DNA markers linked with the cystic fibrosis locus and heterozygote detection. (*In French*).
Ann Génét., 1988, **31**, n° 2, 97-101.

SUMMARY : Linked DNA probes have been used in three families presenting an affected child with cystic fibrosis. The strategy used for the determination of haplotypes associated with parental normal and mutated genes is presented as well as its application to the detection of cystic fibrosis carriers among healthy children.

KEY-WORDS : Cystic fibrosis. — DNA markers. — Carrier detection.

parentaux, et de suivre la transmission de ces gènes dans la descendance.

Nous avons utilisé certains de ces marqueurs dans trois familles présentant un enfant atteint de mucoviscidose.

PATIENTS, MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'ADN de chaque patient est extrait de leucocytes, digéré par les enzymes de restriction *EcoRI*, *TaqI*, *MspI* ou *BanI*, dans les conditions définies par les fabricants (Bethesda Research Laboratories et International Biotechnologies Inc., I.B.I.). Les fragments d'ADN sont ensuite séparés sur gel d'agarose à 0,8 %, transférés en milieu basique (soudé 0,2 N) sur membrane nylon (CompasTM I.B.I.) selon la méthode de Southern (1975). Les membranes sont ensuite hybridées avec les fragments 1,1 kilobases (kb) *metD*, 1,6

Service de Génétique, Faculté de Médecine, 1, place de Verdun, 59045 LILLE cedex.

TABLEAU I. — Liste des sondes et des polymorphismes étudiés.

| Sondes | Références bibliographiques | Polymorphismes étudiés | Tailles des allèles détectés (en kb) | |
|------------------|----------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|------------|
| | | | Allèle 1 | Allèle 2 |
| met H | Cooper C.S. et al. (1984) | met H/Msp I | 2,3 | 1,8 |
| | White R. et al. (1985) | met H/Taq I | 7,5 | 4 |
| met D | Cooper C.S. et al. (1984) | met D/Taq I | 6 | 4,3 |
| | White R. et al. (1986) | | | |
| | Spence J.E. et al. (1986) | met D/Ban I | 7,6 | 6,8 |
| pJ3.11 (D7S8) | Wainwright B.J. et al. (1985) | pJ3.11/Msp I pJ3.11/Taq I | 4,2 6,3 | 1,8 3,1 |
| | Scambler P.J. et al. (1986) | 7c22/EcoR I | 7,2 | 5,1 |

kb *metH*, 0,7 kb pJ3.11, 5,1 kb *7c22*, marqués au ^{32}P par la méthode des oligonucléotides primers (Feinberg et Vogelstein, 1983, 1984) à une activité spécifique de $2 \cdot 10^9$ cpm/ μg . Les membranes sont enfin lavées à 65°C (2XSSC, 0,1 % SDS), puis exposées sur film Kodak X-Omat S, 24 h à 48 h à -80°C .

Le tableau I donne la liste des sondes et les polymorphismes étudiés.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Dans la famille 86-01 (fig. 1), l'étude du polymorphisme *metD/TaqI* n'apporte aucune information, puisque les parents et l'enfant atteint sont homozygotes 1/1 pour les allèles détectés.

Les polymorphismes pJ3.11/*MspI* et *7c22/EcoRI* sont partiellement informatifs. L'enfant atteint est 1/2 pour pJ3.11/*MspI*, le père est 1/2, la mère 2/2 : cela permet d'associer l'allèle 1 pJ3.11/*MspI*, au gène CF^- paternel ; l'homozygotie 2/2 maternelle ne permet pas d'établir une association, ni avec CF^+ ni avec CF^- .

Pour *7c22/EcoRI* l'enfant atteint est 2/2, le père 2/2, la mère 1/2 : il est possible d'associer au gène CF^+ l'allèle 1 maternel. L'homozygotie 2/2 du père ne permet pas d'établir une association.

Chacun de ces deux polymorphismes, pJ3.11/*MspI* et *7c22/EcoRI*, n'est que partiellement informatif. Par contre l'enfant atteint est 1/1 pour *metH/MspI* ou *TaqI* et les parents sont l'un et l'autre 1/2. Il nous est possible d'associer l'allèle 1 au gène CF^- et l'allèle 2 au gène CF^+ à la fois chez le père et chez la mère. Les polymorphismes *metH/MspI* ou *TaqI* sont informatifs : un enfant 1/1 sera atteint, un enfant 1/2 sera hétérozygote et un enfant 2/2 sera homozygote normal, avec cependant une marge d'erreur compte tenu de la recombinaison génétique entre le locus *CF* et *metH*.

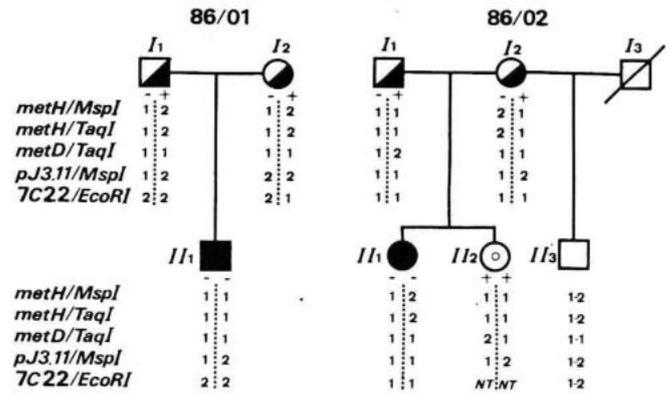


Fig. 1. — Haplotypes des familles 86/01 et 86/02. Sujet hétérozygote s obligatoirement atteint ■ ●. Sujet indemne □ ○. Sujet dépisté hétérozygote □ ○. Sujet dépisté homozygote normal ⊙ ⊚. Gène normal+, gène muté-.

Dans la famille 86-02 (fig. 1) le polymorphisme *7c22/EcoRI* n'est pas informatif puisque tous les sujets étudiés, à l'exception de II₃ issu d'un premier mariage, sont homozygotes 1/1. Les autres polymorphismes permettent d'associer les allèles 2 *metH/MspI* ou *TaqI* maternels à CF^- , l'allèle 2 *metD/TaqI* paternel à CF^+ et l'allèle 2 pJ3.11/*MspI* maternel à CF^+ .

L'enfant indemne (II₂) présente :

1° Deux allèles 1 *metH/MspI* ou *TaqI*. Il n'a donc pas hérité du chromosome 7 maternel porteur de CF^- . Ce résultat est confirmé par la présence de l'allèle 2 pJ3.11/*MspI* maternel.

2° L'allèle 2 *metD/TaqI* paternel, associé au gène normal CF^+ . On peut considérer que cet enfant est homozygote CF^+/CF^+ , en admettant l'absence de recombinaison.

N'ayant pu étudier l'ADN du sujet I₃ décédé, il n'est pas possible de conclure pour l'enfant II₃ quant à son éventuelle hétérozygotie.

Les résultats de la famille 87-01 sont présentés dans la figure 2.

Dans cette famille, les polymorphismes *metD/TaqI* et pJ3.11/*TaqI* ne sont pas informatifs, tous les sujets étant homozygotes. Par contre il est possible d'associer au gène CF^+ maternel, les allèles 2 *metH/MspI* ou *TaqI* et *metD/BanI* et au gène CF^- maternel l'allèle 2 *7c22/EcoRI*.

Les parents sont tous deux 1/2 pour le polymorphisme pJ3.11/*MspI* ainsi que l'enfant atteint (II₂). L'allèle 1 pJ3.11/*MspI* est donc associé à CF^- soit chez le père soit chez la mère, et s'il l'est à CF^- chez le père il sera associé à CF^+ chez la mère.

Ainsi deux configurations sont possibles pour les parents I₁ et I₂ (fig. 3) :

• Configuration 1 :

Père : allèle 2 pJ3. 11/*MspI*, CF^- ; allèle 1 pJ3.11/*MspI*, CF^+ .

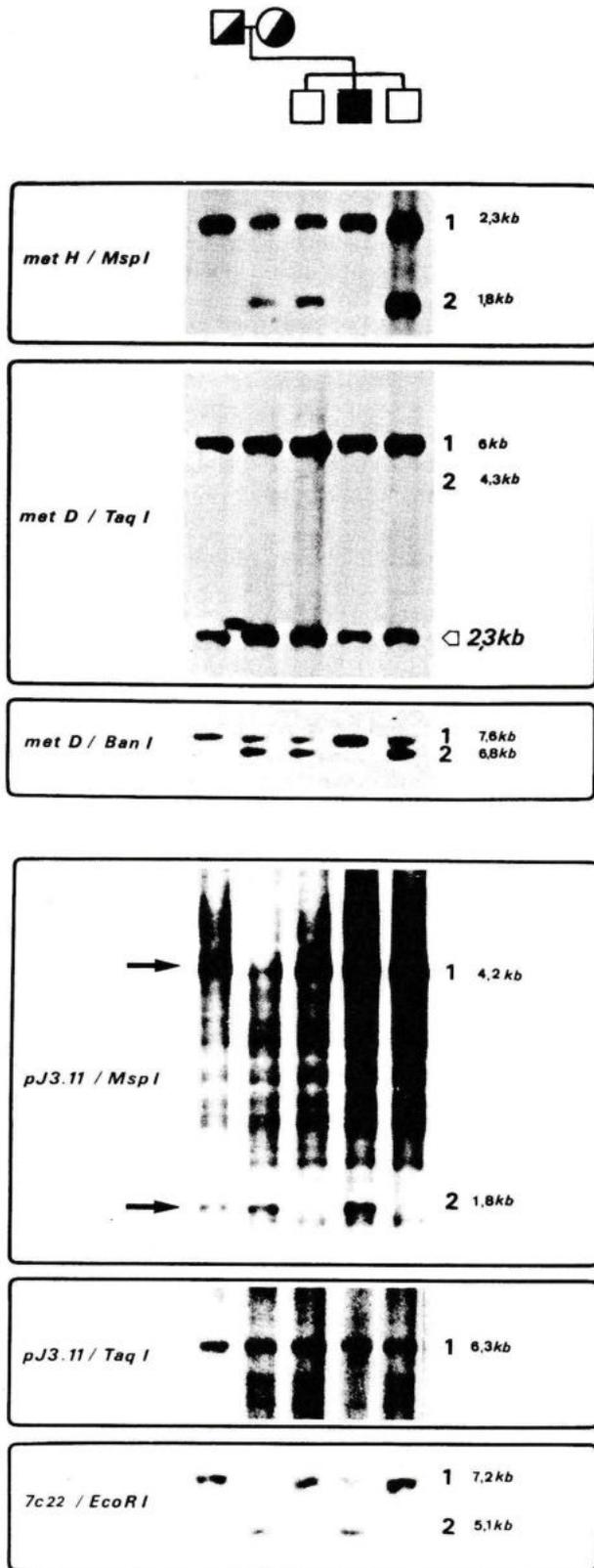


Fig. 2. — Autoradiogrammes des allèles détectés pour plusieurs marqueurs (sonde/enzyme de restriction) dans la famille 87/01. La taille des allèles est exprimée en kilobases (kb). La bande 2.3 kb (□) *metD/TaqI* est une bande non polymorphe.

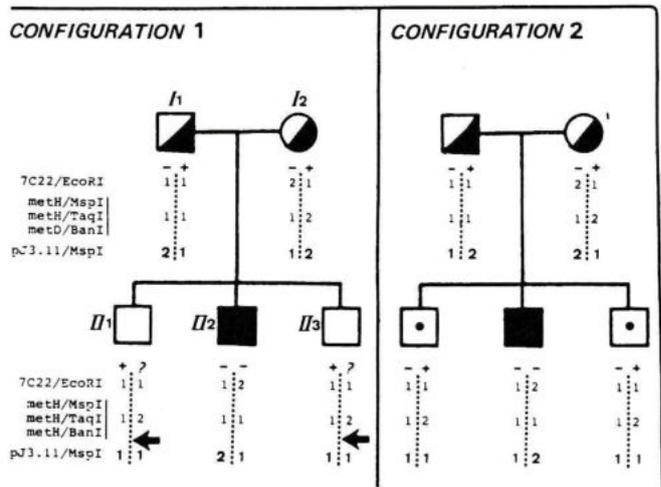


Fig. 3. — Configurations possibles pour la famille 87/01 en fonction de la répartition des allèles 1 et 2 pJ3.11/MspI chez les parents. La configuration 1 suppose une recombinaison (→) entre *met* et pJ3.11 pour chacun des deux enfants indemnes, elle ne permet pas de conclure quant à leur éventuelle hétérozygotie. La configuration 2 n'impliquant pas de recombinaison apparaît plus probable. Légende voir figure 1.

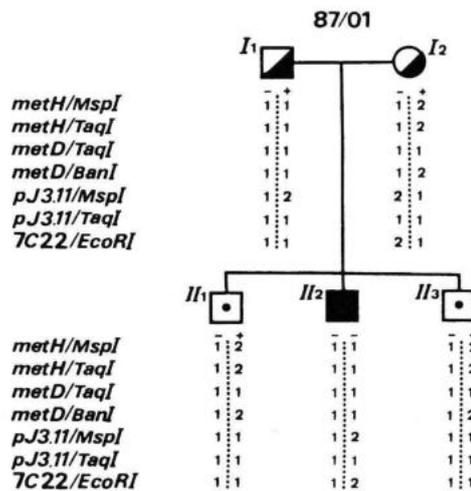


Fig. 4. — Haplotypes définitifs de la famille 87/01 montrant l'hétérozygotie des sujets II-1 et II-3.

Mère : allèle 1 pJ3.11/MspI, CF⁻ ; allèle 2 pJ3.11/MspI, CF⁺.

• Configuration 2 :

Père : allèle 1 pJ3.11/MspI, CF⁻ ; allèle 2 pJ3.11/MspI, CF⁺.

Mère : allèle 2 pJ3.11/MspI, CF⁻ ; allèle 1 pJ3.11/MspI, CF⁺.

Ce n'est que la répartition des allèles chez les deux enfants indemnes (II₁ et II₃) qui permet de lever cette ambiguïté. En effet la configuration 1 suppose une recombinaison entre *met* et pJ3.11 pour les deux enfants indemnes alors que la configuration

2 n'implique pas de recombinaison. L'étude des haplotypes dans cette famille permet de conclure à l'hétérozygotie des enfants II₁ et II₃ (fig. 4), dans la mesure où l'on admet que la configuration 2 est la plus probable. Par contre dans la configuration 1, compte tenu de l'ordre des loci : *met*/CF/pJ3.11, si la recombinaison a lieu entre *met* et CF, les enfants II₁ et II₃ sont hétérozygotes ; si la recombinaison a lieu entre CF et pJ3.11, les enfants II₁ et II₃ sont homozygotes normaux.

CONCLUSION

L'établissement des haplotypes est permis grâce à l'existence d'une liaison génétique entre les marqueurs 7c22, pJ3.11, *met* et le locus de la mucoviscidose.

Pour la famille 86-01 l'étude d'un seul polymorphisme (*metH*/*MspI* ou *TaqI*) a été suffisante pour typer les chromosomes parentaux. Cependant toutes les familles ne peuvent être typées avec un seul marqueur : pour la famille 86-02 l'utilisation de deux polymorphismes (pJ3.11/*MspI* et *metD*/*TaqI*) a été nécessaire.

En principe il faut étudier les parents et un enfant atteint. Cependant l'étude des parents et d'un enfant atteint peut être insuffisante pour le typage des chromosomes parentaux : c'est le cas de la famille 87-01 où la répartition des allèles 1 et 2 pJ3.11/*MspI* ne peut être précisée. Ce n'est que l'étude des deux enfants indemnes qui permet d'établir les haplotypes parentaux de façon définitive.

Par ailleurs, Law et al. (1987) ont récemment montré, dans deux cas particuliers, que le typage était possible même s'il n'y a plus de sujet atteint : l'une des familles avait présenté des sujets atteints dans deux branches issues de deux sœurs, l'autre une double consanguinité.

L'établissement des haplotypes familiaux permet de dépister et de prévoir le génotype des sujets : hétérozygotes ou homozygotes. Plus le nombre de polymorphismes étudiés est important plus on augmente les possibilités de typer les chromosomes parentaux et de les suivre dans la descendance. Les haplotypes seront enfin d'autant plus fiables que le risque d'interférence avec une éventuelle recombinaison est faible : la distance génétique entre chaque marqueur et le gène muté doit donc être la plus faible possible. Les marqueurs que nous avons utilisés sont pour les plus proches à 1cM du locus CF. D'autre part les fragments de l'oncogène *met* et pJ3.11 que nous avons utilisés pour établir les haplotypes des familles étudiées, seraient situés de part et d'autre du locus de la mucoviscidose (Beaudet et al. 1986 ; Naylor et al., 1986) : cette disposition permet de déceler une éventuelle recombinaison intéressant ce locus.

Deux nouveaux marqueurs récemment décrits par Estivill et al. (1987), très proches du locus CF devraient améliorer la précision de la méthode. En effet ces marqueurs (révélés par les sondes XV2c et CS7) montrent un fort déséquilibre de liaison génétique à la fois avec CF⁺ et CF⁻ : 94 % des chromosomes CF⁻ portent l'haplotype CS7/allèle 2, XV2c/allèle 1. Dans ces conditions la détection des hétérozygotes reposerait alors non plus sur l'étude familiale d'une liaison génétique entre un marqueur donné et le locus CF, mais sur la présence ou l'absence d'un haplotype présentant un fort déséquilibre de liaison génétique avec CF⁺ ou CF⁻.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le P^r Cousin (Hôpital Saint-Antoine, Lille) de nous avoir confié l'étude des familles 86/01 et 86/02. Ils remercient également le D^r J. Schmidtke (Institut für Humangenetik, Göttingen RFA) de leur avoir fourni la sonde pJ3.11, le P^r R. White et le D^r C. Cooper de leur avoir fourni les clones *metH* et *metD*, le P^r B. Williamson de leur avoir fourni le clone 7C22. Ils remercient également M.N. Sturque et J.P. Tietard pour leur collaboration technique.

RÉFÉRENCES

1. BEAUDET A., BOWCOCK A., BUCHWALD M., CAVALLISFORZA L., FARRALL M., KING M.C., KLINGER K., LA LOUEL J.M., LATHROP G., NAYLOR S., OTT J., TSUI L.C., WAINWRIGHT B., WATKINS P., WHITE R., WILLIAMSON R. — Linkage of cystic fibrosis to two tightly linked DNA markers : joint report from a collaborative study. *Am J Hum Genet*, 1986, 39, 681-693.
2. COOPER C.S., PARK M., BLAIR D.G., TAINSKY M.A., HUEBNER K., CROCE C.M., VANDE WOUDE G. — Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature*, 1984, 311, 29-33.
3. ESTIVILL X., FARRALL M., SCAMBLER P.J., BELL G.M., HAWLEY K.M.F., LENCH N.J., BATES G.P., KRUYER H.C., FREDERICK P.A., STANIER P., WATSON E.K., WILLIAMSON R., WAINWRIGHT B.J. — A candidate for the cystic fibrosis locus isolated by selection for methylation-free islands. *Nature*, 1987, 326, 840-845.
4. FEINBERG A.P., VOGELSTEIN B. — A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem*, 1983, 132, 6-13.
5. FEINBERG A.P., VOGELSTEIN B. — A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity (Addendum). *Anal Biochem*, 1984, 137, 266-267.
6. KNOWLTON R.G., COHEN-HAGUENAUER O., VAN-CONG N., FREZAL J., BROWN A., BARKER D., BRAMAN J.C., SCHUMM J.W., TSUI L.C., BUCHWALD M., DONIS-KELLER H. — A polymorphic DNA marker linked to cystic fibrosis is located on chromosome 7. *Nature*, 1985, 318, 380-382.
7. LAW H.Y., STANIER P., WILLIAMSON R., MODELL B., WARD R.H.T., PETROU M., OLD J., FARRALL M. — Two unusual cases of first trimester prenatal diagnosis of cystic fibrosis using DNA probes. *Prenat Diagn*, 1987, 7, 215-221.

8. NAYLOR S.L., DON BARNETT R., BUCHANAN J.M., LATIMER J., WIEDER K., MARSHALL S., GARDNER J., DENNING C.R., GLUCKSON M., PINERO R., RENDON H., MIRANDA L.I., KAMMERER C., ZANSKY S.M., KING R.H., BOWMAN B.H., MAC CLUER J.W. — Linkage of cystic fibrosis locus and polymorphic DNA markers in 14 families. *Am J Hum Genet*, 1986, 39, 707-712.
9. SCAMBLER P.J., WAINWRIGHT B.J., FARRALL M., BELL J., STANIER P., LENCH N.J., BELL G., KRUYER H., RAMIREZ F., WILLIAMSON R. — Linkage of COL 1 A 2 collagen gene to cystic fibrosis, and its clinical implications. *Lancet*, 1985, ii, 1241-1242.
10. SCAMBLER P.J., WAINWRIGHT B.J., WATSON E., BATES G., BELL G., WILLIAMSON R., FARRALL M. — Isolation of a further anonymous informative DNA sequence from chromosome seven closely linked to cystic fibrosis. *Nucl Ac Res*, 1986, 14, 1951-1956.
11. SOUTHERN E. — Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, 1975, 98, 503-521.
12. SPENCE J.E., ROSENBLUM C.L., O'BRIEN W.E., SEILHEIMER D.K., COLE S., FERRELL R.E., STERN R.C., BEAUDET A.L. — Linkage of DNA markers to cystic fibrosis in 26 families. *Am J Hum Genet*, 1986, 39, 729-734.
13. WAINWRIGHT B.J., SCAMBLER P.J., SCHMIDTKE J., WATSON E.A., LAW H.Y., FARRALL M., COOKE H.J., EIBERG H., WILLIAMSON R. — Localisation of cystic fibrosis locus to human chromosome 7 cen-q22. *Nature*, 1985, 318, 384-385.
14. WHITE R., WOODWARD S., LEPPERT M., O'CONNELL P., HOFF M., HERBST J., LALOUEL J.M., DEAN M., VANDEWOUDE G. — A closely linked genetic marker for cystic fibrosis. *Nature*, 1985, 318, 382-384.
15. WHITE R., LEPPERT M., O'CONNELL P., NAKAMURA Y., WOODWARD S., HOFF M., HERBST J., DEAN M., VANDEWOUDE G., LATHROP G.M., LALOUEL J.M. — Further linkage data on cystic fibrosis : the Utah study. *Am J Hum Genet*, 1986, 39, 694-698.