

La FAMA (fluorescence-assisted mismatch analysis)

Dominique Germain, Livia Poenaru

Le diagnostic moléculaire des maladies génétiques, indispensable au conseil génétique, est particulièrement délicat lorsque les mutations d'un gène sont inconnues et, de surcroît, hétérogènes. En collaboration avec M. Tosi et T. Meo (Inserm U.276), nous avons mis au point, pour le diagnostic de la maladie de Fabry [1], la méthode FAMA (*fluorescence-assisted mismatch analysis*) [2], dérivée de la technique de clivage chimique qui, en objectivant les mésappariements de doubles brins d'ADN hétérologues (*heteroduplexes*) marqués à leurs extrémités par des fluorophores distincts, permet une exploration rapide de l'ensemble du gène. Techniquement, les étapes sont les suivantes (*figure 1*): pour chaque patient, l'ADN génomique est amplifié par une première réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en plusieurs « amplicons » couvrant la totalité des séquences codantes, les jonctions exons-introns et la région promotrice du gène. Pour chaque fragment, une PCR « nichée » est réalisée en réamplifiant une quantité aliquote de la première PCR à l'aide de deux amorces oligonucléotidiques internes portant à leur extrémité 5' des fluorochromes différents (6-FAM et HEX respectivement pour les amorces sens et antisens). Les produits PCR bifluorescents obtenus sont dénaturés par la chaleur puis réhybridés afin de former les doubles brins hétérologues (l'ajout d'un ADN témoin avant cette étape est néces-

saire pour l'étude, chez les hommes, des gènes situés sur le chromosome X). Les doubles brins sont alors traités par l'hydroxylamine, d'une part, et par le tétroxyde d'osmium, d'autre part, réactifs qui ont la propriété de se fixer sur les cytosines (pour l'hydroxylamine) et les thymines (pour le tétroxyde d'osmium) mésappariées. L'ADN est ensuite incubé à 90°C avec la pipéridine qui le clive au niveau des bases ainsi modifiées. Les fragments d'ADN clivés et non clivés sont séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant sur un séquenceur automatique, et les données sont recueillies et analysées à l'aide du logiciel informatique approprié (*figure 2*).

La maladie de Fabry, de transmission récessive liée à l'X, est due à un trouble du métabolisme des glycosphingolipides par déficit en une enzyme lysosomale, l' α -galactosidase A. Dans sa forme classique, elle affecte les hommes qui, étant hémizygotés, ont une activité α -galactosidase A effondrée. Les premiers signes cliniques, angiokératomes et/ou acroparesthésies, surviennent à l'adolescence. Par la suite une atteinte multiviscérale se développe, comportant des signes cardiovasculaires et neurologiques ainsi qu'une insuffisance rénale qui, en l'absence de dialyse ou de transplantation, était classiquement responsable du décès chez l'adulte jeune. Une forme monosymptomatique, limitée au cœur, a été décrite plus récemment; elle s'accompagne d'une activité enzyma-

tique diminuée mais non nulle, et semble corrélée à quelques mutations particulières du gène. Les femmes, hétérozygotes et donc conductrices du trait, sont le plus souvent asymptomatiques, avec parfois une dystrophie cornéenne et quelques angiokératomes. Elles peuvent, occasionnellement, présenter des symptômes aussi sévères que les hommes atteints. La mise en évidence du déficit de l'activité α -galactosidase A dans les leucocytes et/ou le sérum est la méthode de référence pour confirmer le diagnostic chez les hémizygotés. En revanche, chez les hétérozygotes, la concentration de l'enzyme étant très variable, le dépistage des vectrices par dosage enzymatique n'est pas satisfaisant. La détermination du statut des femmes à risque dans les familles où ségrège la maladie est pourtant essentielle pour le conseil génétique, soulignant l'intérêt d'un diagnostic moléculaire de l'affection.

Le gène codant pour l' α -galactosidase, localisé en Xq22 a été cloné et séquencé. Il comprend 7 exons, s'étend sur 12,5 kilobases et présente la particularité de ne pas comporter de segment 3' non traduit. Un mécanisme original d'édition de son ARN messager a par ailleurs été décrit (*m/s n° 11, vol. 11, p. 1622*). Les réarrangements géniques, mis en évidence par *Southern blot*, ne rendent compte que de 5% des anomalies moléculaires, essentiellement représentées par des mutations ponctuelles et des petites délétions/insertions. Il existe une grande hétérogénéité moléculaire, et

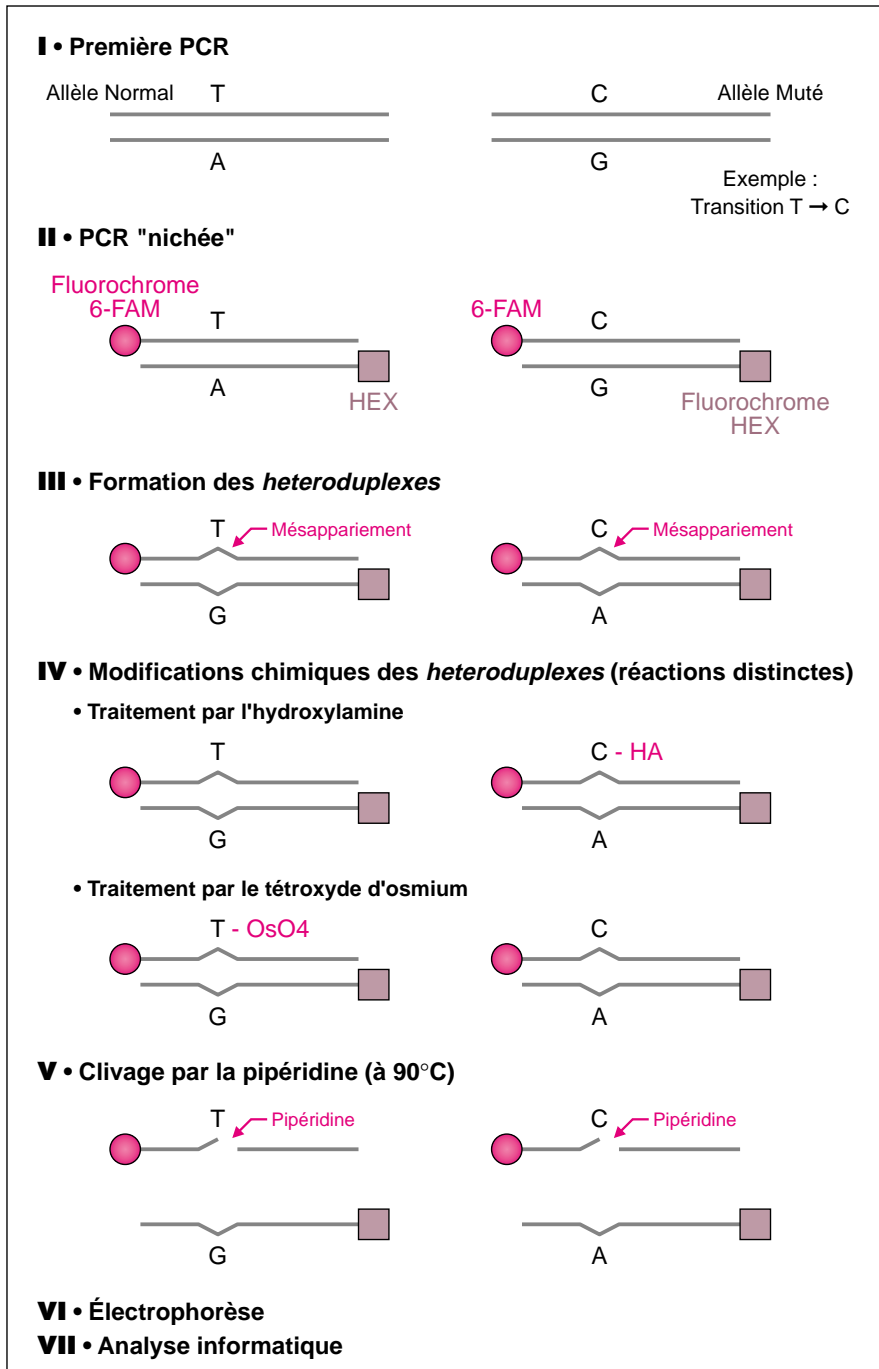


Figure 1. **Principe du clivage chimique fluorescent (FAMA).** Pour chaque région d'intérêt, l'ADN des patients est amplifié par une première réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Une PCR « nichée », qui accroît la spécificité, est réalisée en réamplifiant une quantité aliquote de cette première PCR à l'aide d'amorces nucléotidiques internes marquées à leur extrémité 5' par des fluorophores différents (6-FAM et HEX respectivement pour les amorces sens et anti-sens). Les amplicons bifluorescents obtenus sont soumis à une dénaturation par la chaleur pour former des doubles brins hétérologues (heteroduplex). Dans l'exemple de détection d'une transition hétérozygote thymine (T) vers cytosine (C) illustré ici, l'allèle normal est porteur d'une thymine sur le brin sens avec en regard l'adénine complémentaire tandis que l'allèle muté porte sur le brin antisens une cytosine et sur le brin antisens une guanine. Après réhybridation on obtient, outre les espèces moléculaires précédemment citées, la formation de 2 types de doubles brins hétérologues contenant, pour l'un, un mésappariement C-A et, pour l'autre, un mésappariement T-G (il est nécessaire pour la détection des mutations homozygotes ou hémizygotés d'ajouter préalablement à cette étape, en quantité égale, un ADN témoin). Les doubles brins hétérologues sont alors soumis à un traitement par deux réactifs chimiques, l'hydroxylamine et le tétr oxyde d'osmium, dans des réactions distinctes. L'hydroxylamine a la propriété de se fixer sur les cytosines mésappariées – ou non appariées – et permettra dans l'exemple choisi la détection du mésappariement C-A au niveau du brin sens, porteur à son extrémité 5' du fluorophore 6-FAM. Le tétr oxyde d'osmium, en présence de pyridine, se greffe, lui, sur les bases thymines mésappariées (ici la thymine impliquée dans le mésappariement T-G). Les échantillons sont

alors incubés avec la pipéridine qui a la propriété de cliver l'ADN au niveau des bases ainsi modifiées. Les fragments d'ADN clivés et non clivés sont séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant sur un séquenceur automatique. Les données sont collectées et analysées à l'aide du logiciel informatique approprié. Chaque substitution nucléotidique donne lieu à deux informations. Dans le cas de la transition T → A décrite, il y aura un signal sur le brin d'ADN sens (fluorophore 6-FAM) pour la réaction hydroxylamine et une autre information sous forme d'un deuxième signal, également sur le brin sens, mais correspondant à la détection du deuxième type de double brin hétérologue (T-G) par la chimie du tétr oxyde d'osmium. Une transversion T → A aurait donné lieu à 2 signaux, l'un sur le brin sens et l'autre sur le brin antisens mais uniquement avec le tétr oxyde d'osmium détectant alors le mésappariement T-T. Une transversion T → G entraînerait, elle, la formation d'un mésappariement d'osmium G-A non détecté et d'un mésappariement T-C détecté par un signal sur le brin antisens pour l'hydroxylamine et par un signal en position complémentaire sur le brin sens pour le tétr oxyde d'osmium.

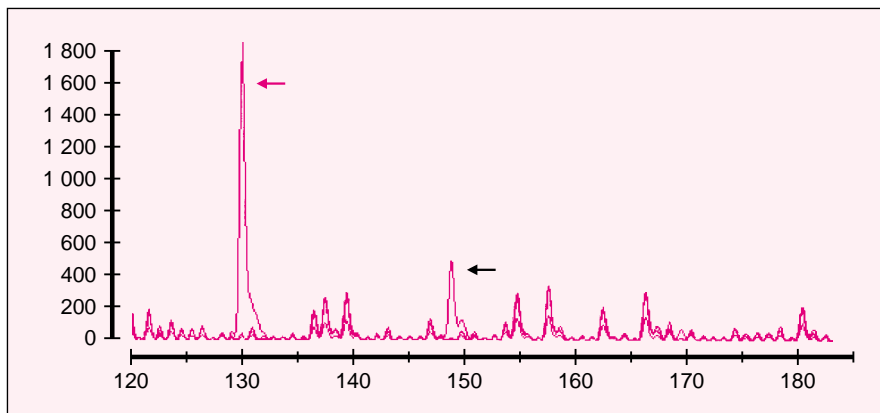


Figure 2. **Analyse moléculaire du gène de l'α-galactosidase par clivage chimique fluorescent (FAMA) dans la maladie de Fabry.** Une réaction FAMA après modification chimique par le tétroxyde d'osmium des doubles brins hétérologues bifluorescents est présenté ici. Les profils électrophorétiques de 4 patients sont superposés. La mutation IVS4 A(-2) → T chez l'un des patients est détectée par le grand pic de clivage (flèche rouge). L'oligonucléotide sens utilisé pour la PCR nichée a son extrémité 5' marquée par le fluorophore 6-FAM, en position 9998 sur la séquence génomique. L'addition de cette coordonnée au chiffre 130 donné par l'analyse informatique (en abscisse de la figure) indique la position exacte de la mutation (A 10129 → T). L'apparition d'une thymine explique le pic de clivage pour la modification par le tétroxyde d'osmium (OT) présentée ici. Une autre mutation donnant lieu à un pic de clivage d'intensité plus modérée chez un autre patient est toutefois aisément mise en évidence par la superposition des profils de différents malades puisque le pic (flèche noire) se détache alors nettement du bruit de fond. Il s'agit de la substitution C 10149 → T, également mise en évidence par la réaction avec l'hydroxylamine du fait de l'implication d'une cytosine (donnée non montrée). Cette transition C → T conduit à l'apparition d'un codon stop (R220X). Noter que les autres petits pics indiquent la position des thymines normalement appariées permettant ainsi de se positionner très précisément sur la séquence du gène étudié.

les nombreuses mutations « privées » (c'est-à-dire présentes dans une seule famille), exigent la mise au point d'une technique fiable pour leur détection et le dépistage des conductrices.

Le recours à la FAMA a été particulièrement efficace : dans toutes les familles étudiées, le défaut génétique [1], extrêmement divers, fut identifié : des microdélétions exoniques avec ou sans décalage du cadre de lecture, des anomalies de l'épissage de l'ARNm et des substitutions nucléotidiques faux sens et non sens furent retrouvées, confirmant l'hétérogénéité moléculaire de la maladie de Fabry. La plupart des mutations étaient situées dans la partie 3' du gène et furent détectées par l'analyse d'un amplicon de 1,5 kb – le plus long étudié à ce jour – sans difficulté technique. Pour certaines familles, la détection d'un polymorphisme intro-

nique, outre l'anomalie spécifique dans cet amplicon de grande taille, illustre la capacité de la méthode FAMA de mettre en évidence plusieurs substitutions nucléotidiques simultanément, de les positionner les unes par rapport aux autres, et de distinguer les nouvelles mutations des polymorphismes (ou mutations) récurrents. En outre, dans les familles où aucun cas masculin n'était disponible, le diagnostic de maladie de Fabry a pu être définitivement porté par la mise en évidence de l'anomalie moléculaire. Dans un autre cas, en excluant formellement l'hétérozygotie chez une femme apparentée à un homme malade, la méthode fut très précieuse pour le conseil génétique puisqu'elle permit d'éviter un diagnostic prénatal devenu injustifié.

La sensibilité de la FAMA fut par ailleurs étudiée en la comparant à la

méthode de référence de détection des mutations inconnues : le séquençage de l'ADN ; un séquençage automatique systématique de tous les exons du gène fut réalisé parallèlement à l'étude par FAMA. Malgré la bonne qualité technique du séquençage, des ambiguïtés et des faux-négatifs furent observés. Pour obtenir des résultats optimaux, il fallut répéter les réactions de séquence et souvent séquencer les deux brins, au prix d'un travail d'optimisation répétitif et coûteux, contrastant avec la sensibilité de détection des mutations par FAMA. Ces données confirment d'autres travaux [3] et suggèrent que, malgré des améliorations constantes, le séquençage automatique de l'ADN n'est pas encore adapté à la recherche des mutations hétérozygotes inconnues dans un cadre diagnostique.

L'utilisation d'une méthode de pré-criblage des gènes, suivie d'un séquençage limité à la région où une mutation a été localisée, semble donc une meilleure stratégie. Parmi les méthodes de criblage de segments d'ADN, aucune n'est parfaitement adaptée à toutes les situations [4, 5] mais celles fondées sur le clivage chimique [6] ou enzymatique [7] des doubles brins hétérologues se sont révélées constamment efficaces pour l'étude de fragments de grande taille (jusqu'à 1,6 kb). Cette approche est encore potentialisée, dans la méthode FAMA, par le marquage fluorescent simultané des deux brins d'ADN par des fluorophores distincts. Chaque substitution nucléotidique donne lieu à au moins deux signaux. La mutation est localisée avec précision et la nature de la substitution peut souvent être immédiatement déduite en considérant le brin d'ADN clivé et le réactif chimique (hydroxylamine et/ou tétroxyde d'osmium) ayant donné lieu au clivage. L'analyse informatique en permettant la superposition des profils électrophorétiques de plusieurs patients, peut révéler des pics de clivage d'intensité faible qui, classiquement, ne sont pas détectés par la méthode de clivage chimique radioactive conventionnelle. Enfin les modifications minimales mais reproductibles survenant à chaque

cytosine ou thymine normalement appariée permettent un positionnement précis en fournissant la séquence en cytosines (réactions avec l'hydroxylamine) ou thymine (réactions avec le tétr oxyde d'osmium) de la séquence d'ADN étudiée.

La FAMA, dans la configuration de clivage chimique utilisée dans cette étude, s'est donc révélée être une technique fiable et rapide pour la détection de mutations inconnues. Elle permet l'analyse de longs fragments d'ADN et, du fait de sa sensibilité, est particulièrement bien adaptée à l'étude des transcrits après RT-PCR, même dans les situations où l'ARNm muté est instable et/ou sous-exprimé par rapport au messager normal. Si la méthode a été initialement utilisée pour l'étude du gène CIINH [2] et du gène de l' α -galactosidase [1], elle peut en pratique être aisément adaptée à l'analyse moléculaire d'autres gènes impliqués dans diverses maladies génétiques [8, 9] ou processus néoplasiques et peut aussi être utilisée pour la validation de gènes candidats nouvellement identifiés [10] ■

RÉFÉRENCES

1. Germain D, Biasotto M, Tosi M, Meo T, Kahn A, Poenaru L. Fluorescence-assisted mismatch analysis for exhaustive screening of the α -galactosidase A gene and detection of carriers in Fabry disease. *Hum Genet* 1996; 98: 719-26.
2. Verpy E, Biasotto M, Meo T, Tosi M. Efficient detection of point mutations on color-coded strands of target DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 1873-7.
3. Phelps RS, Chadwick RB, Conrad MP, Kronick MN, Kamb A. Efficient automatic detection of heterozygous bases during large-scale DNA sequence screening. *Biotechniques* 1995; 19: 984-9.
4. Grompe M. The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nat Genet* 1993; 5: 111-7.
5. Dreyfus JC, Akli S, Poenaru L. Maladies de Tay-Sachs et de Sandhoff. Les déficits en β -hexosaminidases, modèles des maladies des lysosomes. *Med Sci* 1992; 8: 797-803.
6. Cotton RGH, Rodrigues NR, Campbell RD. Reactivity of cytosine and thymine in single-base-pair mismatches with hydroxylamine and osmium tetroxide and its application to the study of mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 4397-401.
7. Youil R, Kemper B, Cotton RGH. Detection of 81 of 81 known Mouse b-globin promoter mutations with T4 endonuclease VII-The EMC method. *Genomics* 1996; 32: 431-5.
8. Veitia R, Ion A, Barbaux S, Jobling MA, Soleyreau N, Ennis K, Oster H, Tosi M, Chibani J, Fellous M, McElreavey K. Mutations and sequence variants in the testis determining region of the Y chromosome in individuals with a 46,XY female genotype. *Hum Genet* (in press).
9. Germain D, Tosi M, Puech JP, Poenaru L. Fluorescence-assisted mismatch analysis for the detection of unknown mutations in Gaucher disease. HUGO's Mutation Detection 97 Workshop, Brno, Czech Republic.
10. Cecchi C, Biasotto M, Tosi M, Avner P. The mottled mouse as a model for human Menkes disease: identification of mutations in the Atp7a gene. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 425-33.

Dominique Germain
Livia Poenaru

Laboratoire de génétique et pathologie métabolique, CHU Cochin-Port-Royal et Inserm U. 129, 24, rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75014 Paris, France.

TIRÉS À PART

D. Germain.