

Le test de troncation des protéines (PTT) : un outil pour la détection de mutations ponctuelles dans l'ADN

**Claude Maugard, Sylvie Tuffery, Laurent Beaufrère,
Corinne Bareil, Mireille Claustres**

La détection de mutations dans l'ADN représente une étape essentielle de la biologie moléculaire, pour la recherche fondamentale comme pour les applications médicales. Les stratégies actuellement disponibles pour déceler les allèles mutés sont fondées, soit sur l'utilisation de méthodes rapides mais limitées à l'identification d'un nombre restreint de mutants déterminés, soit sur l'utilisation de techniques coûteuses et laborieuses mais capables de déceler la moindre altération de séquence dans les portions essentielles des gènes. La détection de mutations est

une démarche complexe et aucune des méthodes disponibles n'est applicable seule à toutes les situations, leur choix dépendant de nombreux critères (nature des mutations, taille et structure du gène, accès à l'ARNm, degrés d'efficacité et de sensibilité recherchés). Nous présentons les avantages relatifs d'une stratégie de recherche spécifique des mutations qui introduisent un signal d'arrêt prématuré de la synthèse protéique, fondée sur le test de troncation des protéines (PTT), par rapport aux techniques classiques de balayage d'un fragment d'ADN ou d'ARN

telles que l'électrophorèse en gel de gradient dénaturant (DGGE), l'analyse d'hétéroduplex (HA), l'analyse de conformation de l'ADN en simple brin (SSCA) ou le clivage chimique ou enzymatique de mésappariements (CCM/EMC). Le PTT, fondé sur l'analyse de fragments d'ARN ou d'ADN transcrits et traduits in vitro, paraît être, pour certaines maladies génétiques, la façon la plus efficace et la moins coûteuse de déceler les mutations de l'ADN responsables de troncation protéique.

La détection de mutations dans l'ADN est une étape incontournable de la biologie moléculaire. En recherche, elle permet d'identifier de nouveaux polymorphismes utiles pour les études de liaison entre un locus chromosomique et un phénotype morbide, d'authentifier la responsabilité d'un gène candidat ou encore d'identifier les composantes génétiques des maladies multifactorielles. La connaissance du spectre mutationnel d'un gène est intéressante en génétique des populations ou encore pour les études de relations structure-fonction. En médecine, le diagnostic génotypique direct fondé sur l'identification des muta-

tions délétères constitue la principale application de la découverte d'un gène, en particulier en matière de diagnostic prédictif présymptomatique ou prénatal. Quand un nombre limité de mutations géniques est en cause, il est facile de développer un test spécifique ciblé sur l'identification de ces mutations qui soit utilisable en diagnostic pour les familles à risque, voire en dépistage de masse pour une population. Cependant, pour la majorité des maladies génétiques, l'hétérogénéité moléculaire est de règle et, même si quelques mutations peuvent être majoritaires dans certains groupes ethniques, la plupart sont privées et ne peuvent être détectées que par des techniques

de balayage ou de criblage, qui explorent la séquence codante du gène exon par exon. En attendant la mise sur le marché des micropuces (*DNA chips*) révolutionnaires qui permettront enfin une automatisation et un changement d'échelle dans l'analyse génétique (*m/s n° 2, vol. 14, p. 225*) [1], la stratégie de détection de mutations inconnues reste artisanale et complexe.

Le séquençage est nécessaire pour identifier les variations de l'ADN, mais ne représente pas la stratégie de choix pour la détection des mutations hétérozygotes inconnues, non seulement pour des raisons de coût et de temps, mais aussi par manque de fiabilité, en particulier pour un

diagnostic humain. Une stratégie en deux temps est nettement préférable, combinant d'abord un criblage exhaustif des exons puis le séquençage des seuls segments suspects. Plusieurs techniques de criblage de la séquence codante d'un gène sont actuellement disponibles, toutes fondées sur la séparation électrophorétique des allèles mutés et normaux, mais aucune n'est applicable seule à toutes les situations. Le choix entre SSCA (*single strand conformation analysis*), DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*), HA (*heteroduplex analysis*) ou CCM/ECM (*chemical* ou *enzymatic mismatch clivage*) dépend essentiellement de la taille et de la structure du gène, de la nature des mutations, du mode de transmission de la maladie, et de l'efficacité recherchée.

Le test de troncation des protéines : technique

Le test de troncation des protéines (PTT, *protein truncation test*) s'avère particulièrement précieux pour la détection spécifique des mutations nonsens ou qui décalent le cadre de lecture de l'ARNm et provoquent une terminaison de traduction prématurée. A la différence des autres techniques de criblage, les mutations ne sont pas détectées au niveau de l'ADN, mais au niveau des produits polypeptidiques obtenus après transcription et traduction *in vitro* des fragments d'ADN génomique ou d'ADNc amplifiés à partir des régions d'intérêt du gène étudié (figure 1). On introduit pour cela une séquence contenant un promoteur de T7 ARN polymérase et un signal de traduction eucaryote dans une des amorces utilisées pour l'amplification. Les produits PCR sont ensuite transcrits et traduits *in vitro* dans un lysat de réticulocytes ou de germes de blé en présence de ³⁵S méthionine ou de ³H leucine. Après séparation électrophorétique des produits de traduction et autoradiographie, la visualisation d'un peptide tronqué de poids moléculaire inférieur au produit normal indique la présence d'une mutation terminatrice dans le fragment d'ADN ou d'ARN constituant le matériel de départ. En général, l'estimation de la taille de la bande anormale permet de localiser

approximativement le site muté dans le fragment analysé, de sorte que le séquençage destiné à identifier la mutation sera limité finalement à une très petite portion du gène.

Divers kits de marquage permettent maintenant d'éviter l'incorporation de radio-isotopes dans l'étape de traduction. Par exemple, l'utilisation d'un lysat réticulocytaire contenant des ARN de transfert chargés avec une lysine biotinylée permet, après séparation électrophorétique et *western blot*, de révéler les bandes par chimioluminescence ou par colorimétrie.

Le protocole initial de RT-PCR-PTT (*reverse transcription-polymerase chain reaction-PTT*) fut mis au point pour explorer de grands segments chevauchants de séquence codante, rétro-transcrits et amplifiés à partir d'ARNm de gène *DYSTROPHINE* [2] ou de gène *APC* [3]. Grâce au phénomène de transcription illégitime ou ectopique, quelques molécules de transcrits de n'importe quel gène à expression spécifique de tissu sont présentes dans n'importe quel type de tissu, dont les lignées lymphoblastiques, et deviennent accessibles à l'analyse après amplification [4]. Cette observation majeure permet, d'une part, de s'affranchir de l'obstacle de l'accessibilité aux tissus cibles et, d'autre part, d'envisager concrètement le criblage de la totalité de la séquence codante d'un gène à partir d'un simple prélèvement de sang.

Le PTT permet d'analyser des fragments nucléotidiques compris entre 1 et 3 kb en une seule réaction. La taille des exons étant généralement de l'ordre de 100 à 300 paires de bases, il est évident qu'il est plus attirant de cribler la version ADNc en quelques fragments de RT-PCR plutôt que chacun des exons séparément. Cependant, la méthode peut aussi s'appliquer à l'exploration directe d'ADN génomique amplifié lorsqu'on recherche des mutations introduisant un signal prématuré de terminaison de traduction dans des exons dont la taille est exceptionnelle.

Applications

Depuis 1993, une quinzaine de gènes ont été explorés par PTT (Tableau I),

et l'expérience acquise permet de dresser un bilan des avantages et des limites de la méthode.

Myopathie de Duchenne

La recherche des mutations ponctuelles responsables d'un tiers des cas de myopathie de Duchenne (DMD) représente une des meilleures indications de la stratégie RT-PCR-PTT [5-7], pour plusieurs raisons. La taille (2,5 mégabases) et la structure (79 exons au moins) du gène *DYSTROPHINE* dissuadent d'utiliser une des techniques de criblage systématique des exons au niveau de l'ADN génomique. Plusieurs tentatives réalisées par SSCA ou CCM, notamment en utilisant les amplimères de la PCR multiplex, ont, certes, permis de déceler quelques mutations délétères, mais elles ont surtout mis en évidence des polymorphismes ou des variants neutres rares. Les muscles des patients DMD étant dépourvus de dystrophine, il est logique d'analyser l'ADNc pour rechercher des mutations interrompant la traduction. Si la collaboration avec les cliniciens est bien organisée, le même prélèvement de muscle fournit le matériel nécessaire, d'une part, à l'étude de la dystrophine pour le bilan clinique initial et, d'autre part, à l'étude moléculaire à partir des transcrits spécifiques, qui donnent de meilleurs rendements en RT-PCR que les transcrits illégitimes dont le taux dans les lymphocytes sanguins est de l'ordre d'un transcrit/10⁵ cellules [4]. La DMD étant transmise sur le mode récessif lié à l'X, la détection d'un peptide tronqué ou absent est particulièrement aisée chez le mâle hémizygoté; les problèmes dus aux amplifications déséquilibrées d'allèles ne se posent pas. Le contrôle sur gel de la taille des produits de RT-PCR permet de détecter certains grands réarrangements (délétions ou duplications partielles incluses dans le fragment analysé) ainsi que des altérations introniques affectant l'épissage des exons. La mise en évidence de deux produits PTT de taille différente identifie les femmes vectrices, le produit de l'allèle normal servant de témoin interne. Nous utilisons le protocole RT-PCR-PTT depuis 1993 pour le gène *DMD*, dont la

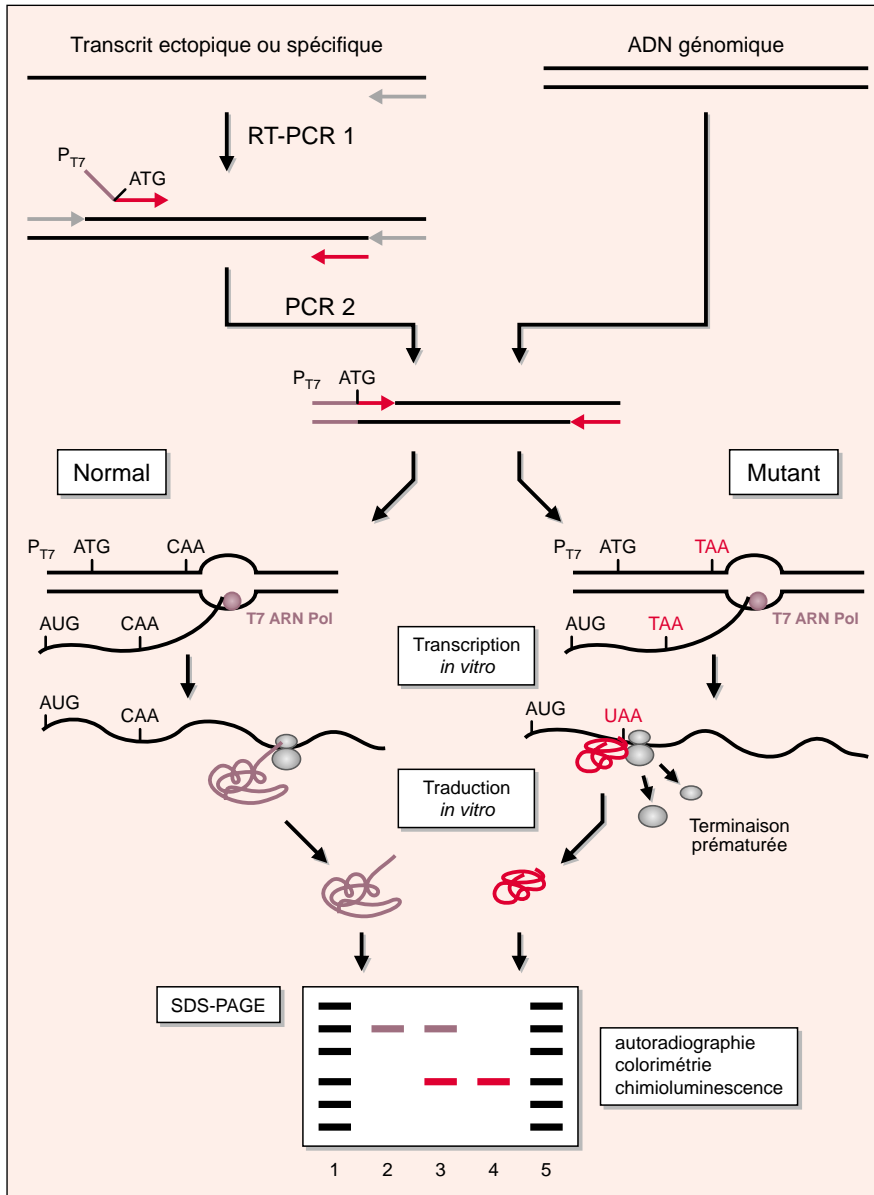


Figure 1. Principe du test de troncation des protéines (PTT). Après extraction d'ARN total spécifique ou illégitime, une transcription inverse est réalisée à l'aide d'une amorce nucléotidique spécifique du fragment à analyser; le brin d'ADNc résultant est ensuite amplifié lors d'une première réaction de polymérisation en chaîne (PCR₁). Une fraction du produit de PCR₁ sert de matrice pour une deuxième réaction d'amplification dite « nichée » (PCR₂) en présence d'amorces internes, afin d'accroître la spécificité et la quantité du fragment d'intérêt. Une des amorces a été modifiée par ajout en 5' d'une séquence contenant le promoteur de la T7 ARN polymérase et un motif eucaryote de début de la traduction (séquence de Kozak précédant un codon AUG), de type (5'-GGATCC-TAATACGACTCACTATAGGAACA-GACCACCATG-3'). L'amorce PT7 se termine en 3' par la séquence spécifique du fragment de gène d'intérêt, choisie de façon telle que le cadre de lecture naturel de l'ARN messager correspondant puisse être lu en phase et dans l'orientation correcte en aval du promoteur de bactériophage. La taille et la spécificité des produits d'amplification sont contrôlés par électrophorèse; des mutations introniques modifiant l'épissage des transcrits peuvent être décelées à cette étape. Il est possible aussi d'utiliser au départ une matrice d'ADN génomique, en particulier lorsque la taille des exons est exceptionnelle. Chaque fragment de gène amplifié au cours des étapes précédentes est ensuite directement soumis à une réaction couplée de transcription et de traduction in vitro, en utilisant un lysat réticulocytaire ou d'extraits de germe de

blé. Les produits protéiques obtenus sont analysés après séparation électrophorétique en gel de polyacrylamide-SDS en présence d'un marqueur de poids moléculaire et après révélation par autoradiographie, colorimétrie ou chimioluminescence selon le marquage utilisé. La présence d'un produit de taille inférieure au produit normal signale une mutation responsable de l'introduction d'un signal stop prématuré dans le fragment correspondant, comme c'est le cas pour la mutation nonsense survenue dans un codon glutamine (CAA->TAA) illustrée ici. Dans de nombreux cas il est possible, d'après la taille calculée du peptide, de localiser approximativement la position de la mutation dans le segment de gène analysé, ce qui permet de limiter le séquençage destiné à identifier l'altération à la seule portion d'ADN suspecte. Pistes 1 et 5: marqueurs de poids moléculaire. Piste 2: peptide de taille normale. Piste 3: hétérozygotie pour un peptide de taille normale et un peptide tronqué (cas d'un individu porteur d'une altération autosomique ou de femme vectrice d'une mutation récessive sur l'X). Piste 4: hémizygotie pour un peptide tronqué (cas d'un sujet de sexe mâle porteur d'une mutation sur l'X).

Tableau I			
PRINCIPAUX GÈNES EXPLORÉS PAR PTT			
Gène Locus	Taille (séquence codante)	Mutations ponctuelles introduisant un codon de terminaison de traduction	Références
<i>DMD</i> Xp21	2 400 kb (14 kb) 79 exons	98 %	[2, 5-8]
<i>NF1</i> 17q11.2	350 kb (13 kb) 56 exons	80 %	[15]
<i>APC</i> 5q21-q22	10 kb (8,5 kb) 15 exons	97 %	[3]
<i>BRCA1</i> 17q12-21	100 kb (7,5 kb) 24 exons	81 %	[10, 11]
<i>BRCA2</i> 13q12.3	70 kb (11,4 kb) 27 exons	91 %	[11]
<i>AT</i> 11q22.3	150 kb (12 kb) 66 exons	90 %	[13, 14]
<i>hMLH1</i> 3p21-3	100 kb (2,5 kb) 19 exons	42 %	[12]
<i>hMSH2</i> 2p22-21	73 kb (2,9 kb) 16 exons	71 %	[12]
<i>CHM</i> Xq21.2	150 kb (4,5 kb) 15 exons	90 %	[16]
<i>FVIII</i> Xq28	186 kb (9 kb) 26 exons	57 % (HA sévères)	[17]
<i>Pig-A</i> Xp22.1	17 kb (1,6 kb) 6 exons	70 %	[18]

séquence codante est étudiée en seulement dix fragments chevauchants. L'expérience acquise a permis de maîtriser les difficultés dues aux épissages alternatifs et de standardiser les étapes pour transférer la technique en diagnostic [6, 7]. Pour 20 patients analysés, la mutation responsable a pu être identifiée dans 90 % des cas;

pour les cas restants, des réarrangements plus complexes ont été détectés dont l'étude est en cours. Le PTT a permis d'identifier des altérations dans les transcrits *dystrophine* extraits de fibroblastes qui ont été forcés en myodifférenciation par transfection du gène *MYOD* [8, 9]. Ce procédé pourrait connaître une

application spectaculaire en diagnostic prénatal lorsque les procédures habituelles sont inutilisables, puisqu'il a été démontré que la myotransformation est possible aussi à partir d'amniocytes [8, 9].

Cancers du sein

Le PTT est principalement utilisé pour détecter des mutations germinales ou somatiques dans les affections cancéreuses, en particulier dans les formes héréditaires de cancer du sein, puisque 90 % à 99 % des mutations germinales identifiées sont responsables de l'introduction d'un codon stop prématuré dans l'ARNm. Bien que les transcrits soient amplifiables en cinq (*BRCA1*) ou en huit (*BRCA2*) fragments chevauchants, le PTT est appliqué en général à l'étude d'un ou de deux exons à partir d'ADN génomique [10]. En effet, l'exon 11 dans *BRCA1*, et les exons 10 et 11 dans *BRCA2* représentent environ 60 % des séquences codantes. L'étude de ces gènes au niveau de l'ADN, même partielle, est préférée aussi en raison de possibles difficultés d'interprétation dues à leur faible expression dans les lymphocytes, de la présence d'épissages alternatifs, et de l'instabilité de certains transcrits mutés. Malgré des critères phénotypiques de sélection plus restrictifs, les fréquences de mutation *BRCA1* et *BRCA2*, quoique variables selon les populations, sont relativement faibles, même lorsque plusieurs techniques de criblage sont combinées avec le séquençage [11]. Des mutations régulatrices de *BRCA* ou d'autres gènes de susceptibilité au cancer du sein sont probablement en cause. Cependant, lorsque les familles sont préalablement sélectionnées à l'aide de critères d'inclusion stricts plus un *lod score* positif, l'exploration complète de l'ADNc *BRCA1* est informative dans plus de 80 % des cas [10].

Cancers du côlon

Environ 98 % des mutations *APC* (*adenomatous polyposis coli*) sont des mutations introduisant un signal de terminaison de traduction. Les transcrits *APC* sont amplifiables en cinq

fragments chevauchants [3]. Cependant, les mutations étant particulièrement fréquentes dans la partie 5' de l'exon 15, le PTT est appliqué en priorité à une portion de 2,8 kb d'ADN génomique amplifié, ce qui permet de détecter environ 50 % des mutations germinales *APC* dans la polypose colique familiale et 70 % des mutations somatiques *APC* dans certains cancers colorectaux.

Dans les cancers coliques héréditaires de type HNPCC (*hereditary non polyposis colon cancer*), on retrouve chez la majorité des patients une mutation germinale dans l'un des gènes impliqués dans la réparation des mésappariements de l'ADN (*m/s n° 11, vol. 10, p. 1178*). Le test PTT sur ADNc total a révélé des mutations *MLH1* dans 42 % et *MSH2* dans 71 % des cas analysés; ces taux modérés s'expliquent par la présence de mutations faux-sens et l'implication probable d'autres gènes [12].

Autres gènes explorés par PTT

Le gène *AT* (*ataxia telangectasia*) est une indication intéressante du PTT dans la mesure où 90 % des mutations identifiées chez les enfants atteints sont responsables d'une terminaison prématurée de la traduction. Appliqué aux 5,9 kb terminaux de l'ADNc (56 % de la séquence codante), le test permet d'identifier 43 % des chromosomes mutés [13]. Par ailleurs, l'analyse exhaustive du gène *AT* par RT-PCR-PTT a permis d'exclure sa responsabilité dans le cancer du sein chez la femme jeune, 0,5 % de mutations à l'état hétérozygote ayant été retrouvées dans un groupe de 401 patientes et 1 % dans le groupe des 202 femmes de la population générale [14].

La recherche de mutations *NFI* (*neurofibromatosis 1*) par les techniques de criblage génomique de type SSCA ou HA était restée particulièrement ardue et décevante depuis 1990; aussi la mise au point d'un essai PTT détectant d'emblée 71 % de mutations [15] a connu un succès particulier.

L'efficacité du PTT s'est également illustrée dans le criblage de gènes multicopies. Malgré la présence de trois transcrits issus de gènes homologues de *PKD1* (*polycystic kidney*

disease), huit mutations ont pu être identifiées par RT-PCR-PTT dans la région répétée du gène [9].

La liste des anomalies génétiques détectées par PTT ne cesse de s'accroître, parmi lesquelles les mutations germinales responsables de choroïdémie [16] ou d'hémophilie A sévère [17], ou encore les mutations somatiques responsables d'hémoglobinurie nocturne paroxysmique [18]. Enfin le PTT peut servir à valider un gène candidat, comme le gène *CBP* (*CREB binding protein*) dans le syndrome Rubinstein-Taybi (*m/s n° 10, vol. 12, p. 1113*) [19].

Un outil pour la recherche fondamentale

Indépendamment de son application en génétique humaine pour la détection de mutations provoquant un arrêt prématuré de traduction, le PTT est aussi un outil de la recherche fondamentale. Par exemple, le PTT peut être utilisé pour cribler des banques de cosmides afin de faciliter la détection d'exons dans de grands territoires génomiques [20]. Le système adéquat a été mis au point avec des fragments du gène *DMD*. Les auteurs ont construit un vecteur capable de cloner des régions génomiques de 25 à 40 kb, insérées dans l'intron 2 du gène *hGH* (*human growth hormone*) dont la transcription est sous le contrôle d'un puissant promoteur ubiquitaire. Après transfection, l'ARN extrait des cultures cellulaires est analysé par RT-PCR-PTT à l'aide d'amorces judicieusement choisies pour tester la présence de grands cadres de lecture ouverts dans les séquences insérées [20]. Cette élégante stratégie permet d'éviter les aléas habituels de la chasse aux exons, en particulier la nécessité de sous-clonages et de reconstitution de l'ordre et de la continuité des exons dans l'ADNc. Par ailleurs, le PTT est utilisé dans la synthèse et la purification des protéines pour la production d'anticorps monoclonaux [9].

Quelques difficultés ont été rencontrées par les utilisateurs du test PTT. Certains produits de traduction peuvent échapper à la détection si les mutations sont situées dans les extré-

mités 5' (produits trop courts) ou 3' (bandes co-migrant avec le produit normal). Cet inconvénient est résolu par un choix d'amorces permettant d'obtenir des fragments chevauchants. La mise au point d'électrophorèses en gradient devrait améliorer la séparation des produits polypeptidiques de poids moléculaires voisins. Pour certaines séquences, l'interprétation des résultats en PTT peut être compliquée par la présence de produits de traduction intermédiaires ou de bandes non spécifiques. Pour pallier ce problème, Rowan et Bodmer (Londres, GB) [21] proposent d'inclure dans l'amorce 5' une séquence de 36 nucléotides codant pour une partie de la protéine c-Myc humaine. L'utilisation d'un anticorps monoclonal spécifique permet, après immunoprécipitation, de détecter les produits attendus.

Enfin on peut retrouver en PTT les difficultés communes aux méthodes fondées sur la procédure RT-PCR, liées notamment à l'amplification non équilibrée des allèles mutant et normal, à une moindre efficacité de transcription des transcrits mutés ou encore à leur instabilité. En réalisant un deuxième cycle de transcription/traduction *in vitro*, les peptides mutants sont mis en évidence de manière non équivoque [22].

La place du PTT dans la détection des mutations

Quelle est la place du PTT parmi les autres techniques de détection des mutations ? S'il s'agit de rechercher des mutations faux-sens aussi bien que des mutations altérant le cadre de lecture, la technique la plus fiable en diagnostic est l'analyse DGGE de chaque exon au niveau génomique car elle peut être utilisée de façon reproductible pour des centaines ou des milliers d'allèles. En recherche, la SSCA (et dérivés) continuera pendant longtemps d'être la technique préférée en raison de son extrême facilité, malgré un taux de détection de l'ordre de 80 % seulement et des problèmes techniques agaçants dus à l'absence de prédictibilité du comportement des conformères.

Tableau II

ÉVALUATION DU COÛT MINIMAL EN RÉACTIFS ET DU TEMPS NÉCESSAIRE À LA DÉTECTION DE MUTATIONS PONCTUELLES DANS LE GÈNE *DYSTROPHINE* PAR SSCA OU PAR PTT

STRATÉGIE A : balayage par SSCA de chacun des 79 exons amplifiés à partir d'ADN génomique				
	<i>Temps</i> <i>manipulateur</i>	<i>Coût</i> <i>unitaire</i>		<i>Coût</i> <i>du test</i>
JOURS 1-2				
Extraction ADN (technique manuelle) (x 2 : patient + témoin)	2 h	20 F	x 2	40 F
Purification et quantification ADN	2 h			
JOURS 2-3				
79 PCR radioactives ^a (³² P) (158 amorces) (x 2)	6 h	20 F	x 158	3 160 F
Digestion enzymatique si taille > 300 pb	6 h			1 500 F
JOURS 3-6				
5 gels SSCA (30 dépôts/gel) x 3 conditions de migration = 15 gels		50 F	x 15	750 F
Traitement des gels, autoradiographie, interprétation	32 h	50 F	x 15	750 F
JOURS 6-10				
Séquençage radioactif (³⁵ S) ^b de toutes les anomalies de migration en SSCA, soit au minimum 20 fragments (2 brins) (x 2)	24 h	70 F	x 80	5 600 F
JOUR 11				
Confirmation de la mutation par analyse de restriction ou autre technique	4 h			500 F
	TOTAL	76 h		12 300 F
<i>Bilan : 20% de mutations non identifiées</i> <i>Ambiguïté des variants rares</i> <i>Mutations d'épissage non détectées si séquences introniques inconnues</i>				
STRATÉGIE B : balayage de 11 kb de séquence codante par RT-PCR-PTT à partir d'ARN extrait d'un fragment de muscle				
	<i>Temps</i> <i>manipulateur</i>	<i>Coût</i> <i>unitaire</i>		<i>Coût</i> <i>du test</i>
JOUR 1				
Extraction ARN (x 2) et contrôles	7 h	20 F	x 2	40 F
JOURS 2-3				
RT-PCR en 10 fragments chevauchants (x 2)	2 h 30	30 F	x 20	600 F
PCR1 (20 amorces) (10 réactions x 2)	1 h 30	20 F	x 20	400 F
PCR2 (20 amorces) (10 réactions x 2)	1 h 30	15 F	x 20	300 F
contrôle électrophorèse agarose	1 h			
détection possible de mutation d'épissage ^c				
JOUR 3				
PTT (10 réactions x 2)	2 h	30 F	x 20	600 F
SDS-PAGE	3 h	20 F		20 F
Fixation/amplification-séchage-autoradiographie	1 h 30	200 F		200 F
JOURS 4-5				
Détection non ambiguë et localisation de la mutation				
Séquençage du fragment RT correspondant (2 brins) (x 2)				
2 à 3 essais nécessaires, avec amorces internes	6 h	70 F	x 8	560 F
JOURS 6-7				
Confirmation de la mutation par séquençage de l'exon correspondant amplifié à partir d'ADN génomique	3 h	70 F	x 2	140 F
	TOTAL	29 h		2 860 F
<i>Bilan : mutations de l'ADN responsables d'une terminaison prématurée de la traduction identifiées</i>				

Dans un souci d'objectivité et de faisabilité, seuls les coûts en réactifs ont été évalués dans les deux stratégies de détection, appliquées à l'étude d'un patient et d'un témoin; les paramètres suivants: coût technicien/encadrement, amortissement du matériel et consommables divers n'ont pas été inclus. De même, le coût des amorces (158 au minimum, soit 158 x 200 F = 31 600 F) nécessaires aux deux stratégies pour détecter ou confirmer la mutation n'a pas été pris en compte puisque l'évaluation ne concerne qu'un seul patient.

^a Les PCR sont réalisées en présence de ³²PdCTP pour accroître la sensibilité de la SSCA. Pour détecter des variations de migration en SSCA chez un sujet hémizyote, un ADN témoin doit être analysé pour chacun des 79 exons du patient.

^b Le séquençage automatique dans les conditions de cette étude (PCR standard préalable et purification sur Centricon) coûte 130 F/séquence en dye terminator et 180 F/séquence en dye primer.

^c Certains mutants d'épissage peuvent être détectés à ce stade par la taille anormale des transcrits; le PTT n'étant pas nécessaire, l'étape suivante sera le séquençage.

Remarque: cette évaluation se place dans le contexte du diagnostic génotypique à visée de diagnostic prénatal, dont les analyses sont souvent réalisées au coup par coup, ce qui limite considérablement les possibilités d'économie coût/temps. Les lecteurs intéressés pourront trouver une comparaison chiffrée des coûts en réactifs et en personnel entre deux stratégies (séquençage systématique versus précriblage préalable) appliquées au gène COL2A1 (52 exons analysables en 26 produits PCR génomiques) dans une étude américaine récente s'inscrivant dans un contexte de rentabilisation [24].

Les méthodes fondées sur le clivage ou la reconnaissance des mésappariements de doubles brins d'ADN hétérologues ont atteint une efficacité comparable à la DGGE mais ne sont pas rentables en pratique pour l'exploration des petits exons génomiques. Le principal intérêt des techniques de type FAMA (*fluorescence-assisted mismatch analysis*) réside dans l'étude de grands fragments d'ADNc dans lesquels tout type de mutation ponctuelle sera en principe détecté [23]. Cependant, le nombre de manipulations et la toxicité de certains réactifs en limitent pour l'instant les applications, en particulier en diagnostic. Le PTT présente comme principaux avantages le fait d'être rapide (peu de manipulations), facile (*kits* commerciaux disponibles), et de faible coût; il ne détecte que les mutations affectant le cadre de lecture, évitant les séquençages fastidieux et répétés des polymorphismes et des mutations silencieuses. D'après notre expérience, si le but est de rechercher les mutations de l'ADN responsables de l'introduction d'un signal de terminaison de traduction caractéristiques d'une affection, il est plus rentable actuellement d'utiliser le PTT plutôt que la FAMA, qui pourra être réservée à un deuxième criblage restreint aux cas négatifs en PTT. Dans l'étude des transcrits, deux étapes restent cependant délicates, quelle que soit la technique de balayage: d'une part, la rétrotranscription, dont les conditions optimales peuvent être difficiles à établir pour certains gènes et, d'autre part, le séquençage des transcrits tronqués qui nécessite le plus souvent un choix judicieux d'amorces internes destinées à éviter les transcrits alternatifs et autres produits parasites. A cause de la variabilité de certains paramètres (dimensions du gène, nombre et longueur des exons, efficacité recherchée, et nature des mutations à identifier), toute tentative de comparaison coût/temps entre les différentes techniques de détection ne peut être objective que dans les cas où elles ont été appliquées au même gène et au même phénotype. A titre d'exemple, nous avons comparé deux stratégies utilisées consécutivement dans notre

laboratoire pour rechercher les mutations responsables de myopathie de Duchenne, la SSCA sur ADN génomique (de 1991 à 1992) et la RT-PCR-PTT (depuis 1993). Les données résumées dans le *Tableau II* montrent clairement qu'il est plus rentable d'étudier les transcrits par PTT que chacun des 79 exons par SSCA en ce qui concerne les coûts en réactifs, le temps, l'efficacité et la spécificité de la détection. Dans le contexte du diagnostic génotypique et du diagnostic prénatal, les deux derniers critères pèsent lourd dans le choix des stratégies disponibles ■

RÉFÉRENCES

1. Bellis M, Casellas P. La puce-ADN: un multiréacteur de paillasse. *Med Sci* 1997; 13: 1317-24.
2. Roest PAM, Roberts RG, Sugino S, van Ommen GJB, den Dunnen JT. Protein truncation test (PTT) for rapid detection of translation-terminating mutations. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1719-21.
3. Powell SM, Petersen GM, Krush AJ, Booker S, Jen J, Giardiello FM, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW. Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 1993; 30: 1982-7.
4. Chelly J, Concordet JP, Kaplan JC, Kahn A. Illegitimate transcription: transcription of any cell type. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2617-21.
5. Gardner RJ, Bobrow M, Roberts RG. The identification of point mutations in Duchenne muscular dystrophy patients by using reverse-transcription PCR and the protein truncation test. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 311-20.
6. Tuffery S, Lenk U, Roberts R, Coubes C, Demaille J, Claustres M. Protein truncation test: analysis of two novel point mutations at the carboxy-terminus of the human dystrophin gene associated with mental retardation. *Hum Mutat* 1995; 6: 126-35.
7. Tuffery S, Bareil C, Demaille J, Claustres M. Four novel dystrophin point mutations: detection by protein truncation test and transcript analysis in lymphocytes from Duchenne muscular dystrophy patients. *Eur J Hum Genet* 1996; 4: 143-52.
8. Sancho S, Mongini T, Tanji K, Tapscott SJ, Walker WF, Weintraub H, Miller AD, Miranda AF. Analysis of dystrophin expression after activation of myogenesis in amniocytes, chorionic-villus cells, and fibroblasts. A new method for diagnosing Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 1993; 13: 915-20.
9. Van Ommen GJB, Roest P, van der Luijt R, Hogervorst F, Devilee P, Petri F, Roelfsema J, Breuning MH, den Dunne JT, Bakker E, Ginjaar HB, Kneppers S. PTT, a versatile and sensitive mutation detection tool. *Mutation Detection '97*, 4th International Workshop, Brno, Czech Republic, May 1997.
10. Hogervorst FBL, Cornelis RS, Bout M, van Vliet M, Oosterwijk JC, Olmer R, Bakker B, Klin JGM, Vasen HFA, Meijers-Heijboer H, Menko FH, Cornelisse CJ, den Dunnen JT, Devilee P, van Ommen GJB. Rapid detection of *BRCA1* mutations by the protein truncation test. *Nat Genet* 1995; 10: 208-12.
11. Hakansson S, Johannsson O, Johansson U, Sellberg G, Loman N, Gerdes AM, Holmberg E, Dahl N, Pandis N, Kristofferson U, Olsson H, Borg A. Moderate frequency of *BRCA1* and *BRCA2* germ-line mutations in scandinavian familial breast cancer. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 1068-78.
12. Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, Nicolaidis NC, Lynch HT, Watson P, Jass JR, Dunlop M, Wylie A, Peltomäki P, de la Chapelle A, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW. Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat Med* 1996; 2: 169-74.
13. Telatar M, Wang Z, Udar N, Liang T, Bernatowska-Matuszkiewicz E, Lavin M, Shiloh Y, Concannon P, Good RA, Gatti RA. Ataxia-Telangiectasia: mutations in ATM cDNA detected by protein truncation screening. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 40-4.
14. FitzGerald MG, Bean JM, Hedge SR, Unsal H, Mac Donald DJ, Harkin DP, Finkelstein DM, Isselbacher KJ, Haber DA. Heterozygous ATM mutations do not contribute to early onset of breast cancer. *Nat Genet* 1997; 15: 307-10.
15. Heim RA, Silverman LM, Farber RA, Kam-Morgan LN, Luce MC. Screening for truncated NF1 proteins. *Nat Genet* 1994; 8: 218-9.
16. Beaufriere L, Tuffery S, Hamel C, Bareil C, Arnaud B, Demaille J, Claustres M. The protein truncation test (PTT) as a method of detection for choroideremia mutations. *Exp Eye Res* 1997; 65: 849-54.
17. Maugard C, Tuffery S, Aguilar-Martinez P, Schved JF, Gris JC, Demaille J, Claustres M. Severe Haemophilia A in southern France: detection of three novel mutations and analysis of factor VIII transcripts. *Hum Mutat* 1998; 11: 18-22.
18. Maugard C, Marguerite G, Tuffery S, Rabesandratana H, Demaille J, Claustres M. Recurrent Pig-A mutation (IVS5+1G>A) in a paediatric case of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: detection by protein truncation test. *British J Haematol* 1997; 98: 21-4.
19. Petrij F, Giles RH, Dauwerse HG, Saris JJ, Hennekam RCM, Masuno M, Tommerup N, van Ommen GJB, Goodman RH, Peters DJM, Breuning MH. Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP. *Nature* 1995; 376: 348-51.

RÉFÉRENCES

20. Datson NA, van de Vosse E, Dauwerse HG, Bout M, van Ommen GJB, den Dunnen JT. Scanning for genes in large genomic regions: cosmid-based exon trapping of multiple exons in a single product. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 1105-11.
21. Rowan AJ, Bodmer WF. Introduction of a *myc* reporter tag to improve the quality of mutation detection using the protein truncation test. *Hum Mutat* 1997; 9: 172-6.
22. Binnie CG, Kam-Morgan LN, Cayouette MC, Marra G, Boland CR, Luce M. Rapid identification of RT-PCR clones containing translation-terminating mutations. *Mutat Res* 1997; 388: 21-6.
23. Germain D, Poenaru L. La FAMA (fluorescence-assisted mismatch analysis). *Med Sci* 1997; 13: 846-9.
24. Ganguly A, Williams C. Detection of mutations in multi-exon genes: comparison of conformation sensitive gel electrophoresis and sequencing strategies with respect to cost and time for finding mutations. *Hum Mutat* 1997; 9: 339-43.

Claude Maugard

Pharmacien-biologiste, attachée au CHU de Montpellier-Nîmes et doctorante de l'Université Montpellier I.

Sylvie Tuffery

Docteur ès sciences, Ingénieur de recherches de l'Université Montpellier I.

Corinne Bareil

Étudiante en sciences, doctorante de l'Université Montpellier I.

Mireille Claustres

Docteur en médecine, docteur ès sciences, professeur des Universités, praticien hospitalier. Laboratoire de biochimie génétique, Institut de biologie, boulevard Henri-IV, 34060 Montpellier, France.

Laurent Beaufrère

Docteur en médecine, praticien hospitalier et doctorant de l'université Montpellier I. Laboratoire de biochimie génétique, Institut de biologie, boulevard Henri-IV, 34060 Montpellier, et service d'ophtalmologie, CHU de Montpellier, France.

TIRÉS À PART

M. Claustres.

Summary

Protein truncation test: a tool for the detection of point mutations in DNA

Mutation detection is one of the most important areas of molecular biology today, allowing the identification of new alleles for diagnostic, population genetics and structure/functions studies. Strategies for mutation detection can be divided into two groups: those that rely on cheap techniques that efficiently identify a small number of known disease alleles and those that rely on expensive and time-consuming techniques capable of scanning the genes for unknown mutations. Mutation detection is a field of considerable complexity and no single method is applicable for all situations. The most appropriate procedures are influenced by the expected nature of mutations, size and structure of genes, availability of mRNA, efficiency requested and resources available. In this study we present the relative advantages of the protein truncation test (PTT) among the other scanning methods such as denaturing gel electrophoresis (DGGE), heteroduplex analysis (HA), single strand conformational analysis (SSCA) or chemical/enzymatic mismatch clivage (CCM/EMC). The PTT, based on *in vitro* transcription/translation of stretches of DNA or RNA, appears as one of the most efficient and cost effective way to detect mutations that result in premature protein translation.



VI^e Congrès International Francophone de Gériatrie

**19-22
avril
1998
Palexpo
Genève**

Le VI^e Congrès International Francophone de Gériatrie se tiendra à Genève, du 19 au 22 avril 1998, à Palexpo.

Cette manifestation – qui a lieu tous les quatre ans – a une importance considérable compte tenu du thème *Âge, cerveau et autonomie*, qui est d'actualité et concerne une population à laquelle nous appartiendrons tous un jour. Elle réunira des professionnels de la santé venant des pays francophones. Elle est organisée avec le soutien de la Société Suisse de Gériatrie, des Hôpitaux Universitaires de Genève et de l'Organisation Mondiale de la Santé.

Département de gériatrie
Route de Mon-Idée
CH 1226 Thônex/Genève
Tél. ++41 22 305 61 11
Fax ++41 22 305 61 15

HUG
Hôpitaux Universitaires de Genève
Belle-Idée