

## 8

## Méthodes pour la détection de mutations inconnues : applications aux gènes *BRCA1* et *BRCA2*

M. TOSI

---

La plupart des maladies génétiques sont très hétérogènes au niveau moléculaire. Les méthodes de diagnostic simples, applicables aux mutations déjà connues, sont donc uniquement utilisables pour un criblage préliminaire, lorsque les quelques mutations récurrentes ont déjà été identifiées.

Le choix de la méthode la plus appropriée pour détecter les mutations inconnues dépend de l'équipement et des habitudes du laboratoire ainsi que des marges d'insuccès que l'on accepte de tolérer (Cotton, 1993 ; Grompe, 1993). De nombreux gènes impliqués dans des pathologies génétiques occupent, comme *BRCA1* et *BRCA2*, des régions de très grande taille. Lorsqu'il s'agit de valider l'hypothèse que l'altération d'un gène est responsable d'une pathologie, on préfère souvent utiliser des méthodes rapides, mais non exhaustives, qui ne garantissent pas la détection de toutes les mutations. Les exigences seront bien différentes dans le cadre d'une procédure diagnostique.

La recherche de mutations germinales des gènes de prédisposition au cancer du sein s'inscrit dans une réalité clinique et biologique parfois complexe (voir chapitres précédents). Bien que certaines caractéristiques commencent à se dégager, on manque souvent d'éléments objectifs permettant de distinguer les cas héréditaires et les cas sporadiques. D'autre part, les analyses de liaison génétique ont une place limitée dans la pratique courante, car elles dépendent de l'accès à de nombreux sujets et car elles peuvent être prises en défaut, par exemple par la présence de cas sporadiques dans les familles et même par des situations, rares mais déjà décrites (Stoppa-Lyonnet et coll., 1996), de double hérédité. Certains éléments peuvent orienter dans le choix du gène à tester en priorité. Les mutations germinales du gène *BRCA1* sont les plus fréquentes et prédisposent à la majorité des cancers familiaux du sein et de l'ovaire. Les mutations du gène *BRCA2* sont plus fréquentes dans les populations anglo-saxonnes et nordiques. La présence dans la famille de cancers du sein chez l'homme suggère la présence d'une mutation dans *BRCA2*.

En conséquence, on privilégiera les techniques de recherche de mutations, en criblant les gènes *BRCA1* et *BRCA2*, le plus souvent dans cet ordre. Comme ces gènes ont une taille importante et que les mutations sont dispersées, il convient de réfléchir au choix optimal des techniques de détection de mutations inconnues.

Le séquençage direct de l'ADN, manuel ou à l'aide d'un séquenceur automatique, peut être utilisé pour chercher directement les mutations inconnues. Les mutations à l'état hétérozygote sont mieux détectées en séquençage manuel qu'en séquençage automatique. Le séquençage direct manuel, en utilisant la radioactivité, a été utilisé dans de nombreux travaux, et a permis notamment de décrire un grand nombre de mutations dans le gène *BRCA1* (Shattuck-Eidens et coll., 1995). Cependant, dans une perspective de diagnostic de routine, ni le séquençage direct manuel, ni le séquençage direct automatique, ne semblent représenter la solution idéale pour le criblage de gènes complexes et de grande taille, et ceci pour des raisons de fiabilité, de temps de travail et de coût.

Il est donc préférable d'utiliser d'abord une ou plusieurs méthodes de criblage (voir les Tableaux 8-I à 8-III) et d'établir ensuite, par séquençage ciblé, la nature précise du changement. Nous allons d'abord examiner les caractéristiques de ces méthodes et leurs limites. La contribution de chacune au diagnostic des mutations dans les gènes *BRCA1* et *BRCA2*, ainsi que les stratégies proposées et/ou prévisibles pour un criblage optimal de ces gènes seront discutées à la fin de ce chapitre.

**Tableau 8-I Abréviations utilisées pour les méthodes décrites**

Techniques		Références
SSCP	<i>Single-Strand Conformation Polymorphism</i>	Orita, 1989
HMA	<i>Heteroduplex Mobility Assay (Heteroduplex Analysis)</i>	White, 1992
CSGE	<i>Conformation Sensitive Gel Electrophoresis</i>	Ganguly, 1993
DGGE	<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>	Sheffield, 1989
CCM	<i>Chemical Cleavage of Mismatches</i>	Cotton, 1988
ECM	<i>Enzymatic Cleavage of Mismatches</i>	Youil, 1995
FAMA	<i>Fluorescence Assisted Mismatch Analysis</i>	Verpy, 1994
PTT	<i>Protein Truncation Test (in vitro Transcription/Translation)</i>	Hogervorst, 1995
HDOA	<i>High Density Oligonucleotide Arrays</i>	Hacia, 1996

## Détection de mutations dans des produits de PCR de petite taille, sans localisation précise

Le tableau 8-II présente un bilan des méthodes qui permettent de détecter les mutations inconnues dans des fragments-cible de petite taille.

Parmi les méthodes les plus utilisées (étant donné qu'elles sont relativement faciles à mettre en œuvre), l'électrophorèse d'ADN simple brin ou SSCP

**Tableau 8-II Méthodes pour le criblage de fragments d'ADN plus courts que 500 paires de bases**

Techniques	Taille limite <sup>1</sup>	Efficacité	Localisation	Mise en œuvre/contraintes
SSCP	250	moyenne	non	Facile
HMA, CSGE	400-800	moyenne à bonne	non	Facile
DGGE	500	bonne	non	Rapide, demande une analyse informatique de chaque région
Séquençage automatique sans pré-criblage	500	très bonne, sauf pour hétérozygotes	oui	Laborieux et cher pour gènes de grande taille

<sup>1</sup> On indique, en paires de bases, la taille limite actuelle pour une détection efficace.

(*single-strand conformation polymorphism*) (Orita et coll., 1989) exploite la variation de la mobilité électrophorétique de molécules d'ADN simple brin, suite à la présence d'une mutation et au changement de conformation qui en résulte. Lorsqu'il s'agit de chercher des mutations inconnues dans des fragments d'une longueur supérieure à 250 paires de bases (pb), le pouvoir de détection de cette méthode diminue rapidement avec la taille (Sheffield et coll., 1993). Cependant, des produits de PCR de plus grande taille peuvent être coupés par un mélange approprié d'enzymes de restriction, de façon à réduire à 200 pb la taille moyenne des fragments analysés par SSCP.

- L'électrophorèse d'ADN hétéroduplexe, dite HMA (*Heteroduplex Mobility Assay*), permet de détecter les mutations par la présence de mésappariements qui influencent la mobilité dans des conditions particulières d'électrophorèse des molécules double-brin (White et coll., 1992). On dit ADN hétéroduplexe l'ADN double brin, obtenu après dénaturation et renaturation d'un mélange de fragments homologues d'ADN normal et mutant. A l'endroit d'une mutation, cet ADN hétéroduplexe contiendra une ou plusieurs bases mésappariées ou non-appariées. De bons résultats ont été rapportés pour des fragments de 300-400 pb. Plusieurs variations de la méthode HMA ont été proposées. Par exemple, une méthode appelée CSGE (*Conformation Sensitive Gel Electrophoresis*) permettrait de détecter les mésappariements dans des fragments d'ADN d'environ 800 pb (Ganguly et coll., 1993) ; ainsi les mutations germinales du gène *BRCA2* ont été étudiées récemment, en utilisant cette méthode (Couch, Farid et coll., 1996). Pour couvrir tous les exons et les bornes exon/intron, le gène *BRCA2* a été subdivisé en 27 régions, d'une taille comprise entre 250 et 550 pb, qui ont été amplifiées par PCR. On remarque que, dans cette étude, le nombre de fragments chevauchants utilisés pour cribler l'exon central de grande taille de *BRCA2* (exon 11) a été « réduit » à 15, tandis que dans d'autres études 24 réactions différentes de PCR étaient nécessaires (Lancaster et coll., 1996) pour cribler le même exon.

- La méthode dite DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*) a été appliquée avec succès à de nombreux gènes (Sheffield et coll., 1989 ; Fanen et

coll., 1992 ; Hamelin et coll., 1993 ; Costes et coll., 1993 ; Olschwang et coll., 1993). Elle permet la détection efficace de mutations dans des fragments de taille inférieure à 500 pb environ, mais demande une adaptation à chaque nouvelle région, qui peut être assez longue. En effet, le choix des conditions d'électrophorèse dépend, pour chaque région amplifiée, d'une étude informatique approfondie des domaines de stabilité de la séquence. Lorsque ces conditions sont bien établies, cette méthode est à la fois rapide et très efficace. La méthode DGGE est aussi utilisée pour le diagnostic des mutations dans le gène *BRCA1* (Stoppa-Lyonnet et coll., 1997).

## **Recherche de mutations au niveau génomique ou au niveau de l'ARN messager**

Le choix dépend de façon importante de la taille et de la structure du gène cible. Dans certaines situations la complexité de la cible peut être réduite en limitant l'analyse aux régions codantes (si l'ARN messager correspondant est présent, même à des taux faibles, dans les cellules circulantes) de façon à permettre l'utilisation de l'amplification enzymatique, par RT-PCR (transcriptase inverse-Réaction de polymérisation en chaîne). Les méthodes qui permettent de cribler des produits de PCR de grande taille, et que nous allons décrire plus loin, présentent un avantage considérable lorsque la recherche est au niveau de l'ARN.

Toutefois, les techniques basées sur l'analyse de l'ARN messager sont très dépendantes de la qualité des préparations d'ARN et de la quantité de l'ARN messager dans les cellules circulantes. Il faudra donc porter une attention particulière au mode de prélèvement, au conditionnement et au transport, et il faudra tenir compte de l'état du malade dont le prélèvement sanguin pourrait par exemple présenter une cellularité faible.

De plus, dans les situations hétérozygotes, une recherche limitée aux séquences exprimées au niveau de l'ARN comporte un risque non négligeable d'insuccès à cause de l'interférence du produit normal. Lorsque la recherche de mutations est faite par RT-PCR sur l'ARN messager, il est donc important de vérifier que la méthode de criblage choisie est capable de détecter les variations nucléotidiques portées par un ARN messager rare. On peut par exemple exploiter des polymorphismes dans les exons pour vérifier s'il y a déséquilibre quantitatif de l'expression des deux allèles, au niveau des ARN messagers. Un tel déséquilibre suggère la présence de mutations, qui conduisent à une forte diminution ou même à l'absence de l'ARN messager correspondant (et qui peuvent être dans les introns, les régions de régulation ou même dans la séquence codante).

## Méthodes permettant le criblage de fragments d'ADN de grande taille

Les méthodes disponibles pour le criblage de produits de PCR de grande taille sont résumées sur le tableau 8-III. On remarquera une caractéristique commune à la plupart de ces méthodes, c'est-à-dire la possibilité de localiser la mutation à l'intérieur du fragment cible (à des degrés différents de précision).

**Tableau 8-III Méthodes pour le criblage de fragments d'ADN de grande taille**

	Limite <sup>1</sup>	Efficacité	Localisation	Mise en œuvre/contraintes
PTT	2 500 pb	bonne, pour les terminaisons de la synthèse protéique	approximative	Demande plusieurs étapes
CCM	2 000 pb	bonne	oui	Synthèse de sondes radioactives (sauf Haris et coll., 1994 et Verpy et coll., 1994)
ECM	1 500 pb	bonne	oui	Simple
FAMA	1 500 pb	très bonne	oui	Utilisation d'un détecteur de fluorescence (séquenceur)
HDOA	?	bonne	oui	Technologie en développement

<sup>1</sup>Non indique, en paires de bases, la taille limite approximative actuelle pour une détection efficace.

- Lorsqu'une partie importante de la séquence codante peut être amplifiée par PCR, sur l'ARN messager, ou sur un exon de grande taille, un premier criblage peut être effectué par transcription et traduction *in vitro* (PTT = *Protein Truncation Test*). Un promoteur artificiel pour une polymérase procaryote et un site artificiel d'initiation de la traduction sont introduits, lors de l'amplification par PCR, à l'extrémité 5' du brin sens de chaque fragment. Dans un contexte de recherche, cette méthode a par exemple été utilisée pour trouver la mutation *Tfm* dans le récepteur des androgènes de souris (Gaspar et coll., 1991). Plus récemment, elle a été appliquée à la détection des mutations d'arrêt de la synthèse protéique, par exemple dans les gènes *APC* (Powell et coll., 1993) et *BRCA1* (Hogervorst et coll., 1995).

Des techniques d'hybridation sur des « puces d'ADN » (ainsi appelées par analogie avec les microprocesseurs de l'informatique) sont à l'état de développement (voir au tableau 8-I, HDOA pour *High Density Oligonucleotide Arrays*). Mises à part ces nouvelles techniques d'hybridation, qui sont toujours à l'étude, seules les méthodes basées sur la reconnaissance de mésappariements et le criblage partiel par synthèse protéique *in vitro* permettent actuellement la détection efficace de mutations inconnues dans des fragments d'ADN d'une taille supérieure à 1 000 paires de bases.

On peut par exemple mettre en évidence les mésappariements dans des molécules double brin hybrides ARN : ADN, dans lesquelles un ARN synthétique radiomarqué représente la séquence de référence et une RNase est

utilisée pour le couper, aux endroits des mésappariements. Dans les premières études l'efficacité de détection était de 50 % seulement – en utilisant la RNase A (Myers et coll., 1995) – mais une meilleure efficacité de détection est obtenue en utilisant d'autres RNases ou des combinaisons de RNases. Cette méthode est peu utilisée, car d'autres méthodes de détection des mésappariements, chimiques ou enzymatiques, sont plus fiables.

- Parmi ces méthodes, celle qui a été utilisée avec plus de succès est la technique dite CCM (*Chemical Cleavage of Mismatches*). Les mésappariements dans des molécules d'ADN double brin sont détectés par modification chimique des cytosines ou des thymines non appariées ou mésappariées et par clivage, dans un milieu basique, du brin d'ADN au niveau de la base modifiée (Cotton et coll., 1988). Dans sa version originale, cette technique présente l'inconvénient d'associer l'utilisation de la radioactivité et de certains produits qui peuvent être toxiques. De plus, malgré une efficacité de détection élevée, certains mésappariements dans un contexte particulier (notamment les mésappariements T.G) pouvaient échapper à la détection (Smoker et Cotton, 1993). Récemment, la fluorescence a remplacé le marquage radioactif dans plusieurs applications de la méthode CCM (Haris et coll., 1994 ; Rowley et coll., 1995).

- Une méthode plus sensible (Verpy et coll., 1994), appelée FAMA (*Fluorescence Assisted Mismatch Analysis*), élimine plusieurs limites des méthodes basées sur le clivage de mésappariements, grâce à l'utilisation d'une nouvelle stratégie de marquage fluorescent. La méthode FAMA se prête particulièrement bien à l'étude de mutations à l'état hétérozygote, mais elle est aussi facilement adaptable à des situations homozygotes (Verpy et coll., 1996) ou hémizygotés (Germain et coll., 1996). La région choisie, d'une taille comprise entre 500 et 1 500 pb, est amplifiée par PCR à partir d'un échantillon d'ADN génomique ou d'ADN complémentaire (si la recherche est faite au niveau de l'ARN). Dans une deuxième PCR, les fragments produits sont marqués à leurs extrémités avec des fluorescences spécifiques pour le brin sens et pour le brin antisens. On dénature et renature ces fragments d'ADN double-brin, qui contiennent à la fois les produits d'amplification de l'allèle normal et de l'allèle mutant. Deux types d'ADN hétéroduplex sont alors formés, chacun représentant 1/4 des molécules. Le clivage des mésappariements est effectué de façon efficace, précise et facilement reproductible en utilisant un protocole simplifié de clivage chimique (Tosi et coll.). Des méthodes de clivage enzymatiques proposées récemment (mais non encore établies parfaitement) (Lu et Hsu, 1992 ; Youil et coll., 1995 ; Mashal et coll., 1995 ; Smith et Modrich, 1996) devraient profiter, dans l'avenir, de la même stratégie de marquage fluorescent. Les produits des réactions de clivage sont analysés dans un séquenceur automatique, qui détecte quantitativement les ADN simple-brin marqués par différentes fluorescences et en détermine la taille (programme GENESCAN<sup>TM</sup> du séquenceur d'ADN de Perkin Elmer/ABD). Outre l'avantage d'utiliser des marquages fluorescents à la place de la radioactivité, cette méthode permet d'augmenter de façon importante l'efficacité de détection,

car tous les produits de PCR sont marqués (brins sens et antisens de l'allèle normal et de l'allèle mutant). Le marquage de chaque brin d'ADN avec une fluorescence différente permet aussi de superposer les tracés de plusieurs pistes du même gel et de les comparer. Les mutations sont ainsi détectées même en présence d'un excès important (environ 10 fois) de la séquence normale, ce qui peut être le cas, lors d'un criblage au niveau de l'ARN, ou lors de la recherche de mutations somatiques. De plus, la stabilité de la fluorescence permet une organisation optimale du travail, car le marquage fluorescent peut avoir lieu dans tout laboratoire. De ce fait, les produits de PCR marqués à la fluorescence peuvent être envoyés à un service central pour être analysés dans un séquenceur automatique. Les progrès récents de l'informatique permettent un retour rapide soit des données brutes, soit de leur interprétation. Les modifications apportées récemment au protocole de clivage chimique (Tosi et coll., 1997) ont d'ailleurs permis d'éliminer les craintes qui étaient associées autrefois à la toxicité de certains produits utilisés.

## Perspectives concernant la détection de mutations dans les gènes *BRCA1* et *BRCA2*

Quelques mutations récurrentes, avec une fréquence importante, ont été décrites dans *BRCA1* (par exemple, 185delAG dans l'exon 2, 4184del4bp dans l'exon 11 et 5382insC dans l'exon 20 ; Couch et coll., 1996). On peut donc envisager un criblage préliminaire de ces mutations et éventuellement d'autres mutations récurrentes.

La méthode idéale pour chercher les mutations inconnues devrait être à la fois :

- fiable à 100 %,
- d'utilisation facile,
- économique,
- capable de cribler un grand nombre d'échantillons.

Pour certaines méthodes les limites de détection sont bien documentées : la taille des fragments-cibles utilisés en SSCP doit être par exemple inférieure à 250 pb, afin de réduire le risque de faux négatifs. Pour chaque gène complexe (ou ARN messager de grande taille), comme dans le cas des gènes *BRCA1* et *BRCA2*, le nombre d'amplifications nécessaires est donc très grand. Outre le problème de l'efficacité de détection, qui n'est pas absolue, la nécessité de réaliser un grand nombre d'amplifications pour chaque individu à tester peut représenter un inconvénient majeur dans une perspective d'application au diagnostic, malgré l'avantage apparent de la simplicité et la rapidité de mise en œuvre.

La possibilité de cribler des fragments d'ADN d'1 kb ou plus est intéressante, notamment dans les cas relativement fréquents de gènes qui, comme *BRCA1*

et *BRCA2*, contiennent un ou plusieurs exons de grande taille ou assez rapprochés pour être amplifiés en une seule PCR. Par exemple, des études en cours dans notre laboratoire, utilisant la méthode FAMA, ont montré que 5 produits de PCR chevauchants permettent de cribler l'exon 11 du gène *BRCA2* (4 pour l'exon 11 de *BRCA1*, qui est plus court). Cette méthode a une très grande efficacité de détection (pratiquement 100 %) et fournit la position précise de la mutation.

Plusieurs méthodes enzymatiques (Lu et Hsu, 1992 ; Youil et coll., 1995 ; Mashal et coll., 1995 ; Smith et Modrich, 1996) sont à l'étude dans différents laboratoires, et devraient être d'utilisation plus rapide. En général ces méthodes présentent encore plusieurs inconvénients, notamment la grande variabilité de l'intensité de clivage (selon le type de mésappariement et le contexte nucléotidique) et la tendance à produire parfois des clivages intenses, également sur les témoins d'ADN homoduplex.

La réalisation de « tests d'ADN » dans le cadre de la prédisposition génétique aux cancers du sein et de l'ovaire est rendue complexe par l'existence d'une hétérogénéité génétique et par la taille des gènes impliqués. L'hétérogénéité génétique implique de cribler plusieurs loci (*BRCA1*, *BRCA2* et, éventuellement d'autres). L'interprétation des résultats négatifs à un locus donné est donc cruciale, avant de passer au criblage du locus suivant. Dans le cadre d'une procédure diagnostique, il est donc important d'utiliser des méthodes ayant une efficacité optimale de détection, et donc, si possible, sans faux négatifs. En effet, contrairement aux situations « simples », où la totalité des mutations est attendue à un seul locus, l'utilisation successive d'une méthode rapide, mais avec une efficacité limitée, suivie d'une méthode plus performante pour réexaminer les patients négatifs au premier criblage ne serait pas appropriée dans ce contexte (Cotton, 1996). Par exemple, hormis les situations rares où une liaison génétique a été établie, la probabilité que la mutation soit dans le gène *BRCA1*, est inférieure à 50 %, même lorsque l'histoire familiale suggère fortement une prédisposition (elle est plus élevée dans les familles de cancer sein-ovaire). Les doutes sur les résultats négatifs obligeraient donc à réexaminer, avec une méthode plus performante, plus de la moitié des patients.

Les nombreux travaux publiés, concernant notamment *BRCA1*, montrent néanmoins qu'un grand nombre de mutations a été détecté soit par l'utilisation d'une seule technique, soit, le plus souvent, par des combinaisons de plusieurs méthodes. Le séquençage direct, et les méthodes SSCP, HMA ou PTT, ont été de loin les plus utilisées. Elles ont probablement un bon pouvoir de détection pour les mutations de type micro-insertion ou micro-délétion, qui sont les plus fréquentes dans les gènes *BRCA1* et *BRCA2*, mais une fraction non négligeable des substitutions nucléotidiques pourrait échapper à la détection. L'utilisation parallèle de plusieurs techniques est possible (voir par exemple une discussion récente dans Serova, 1996), mais risque d'être plus laborieuse que le choix, pour chaque locus, d'une seule méthode assurant

une détection optimale. Un autre élément important dans la définition de stratégies de criblage applicables au diagnostic est d'ordre pratique et économique, car la grande taille des régions à cribler et la multitude des gènes qui devront être examinés ont tendance à multiplier de façon exorbitante, pour chaque individu, le nombre de réactions de PCR à effectuer et à analyser. Ce chiffre peut être réduit au moins 5 fois, en utilisant des méthodes (CCM, FAMA) capables de cribler efficacement des produits de PCR dont la taille se situe entre 1,2 kb et 1,5 kb.

Le développement complet et la commercialisation éventuelle des « puces d'ADN » (voir les tableaux 8-I et 8-III, méthode HDOA) pourrait permettre un criblage des mutations encore plus rapide. Comme il a été montré dans une étude préliminaire, l'utilisation d'environ  $10^5$  oligonucléotides immobilisés sur une surface de l'ordre du centimètre carré permet déjà le criblage d'une partie du gène *BRCA1* (Hacia et coll., 1996).

Enfin, on ne doit pas oublier la possibilité que la lésion moléculaire cherchée peut échapper, par sa nature même, à des stratégies basées sur le seul criblage des exons et de leurs bornes. Des délétions d'exons à l'état hétérozygote peuvent par exemple passer inaperçues. Afin d'assurer leur détection il faudrait effectuer des analyses structurales de l'ADN, de type Southern blot, ou exploiter la possibilité récente d'amplifier par PCR des régions de grande taille (jusqu'à 10 kb environ), permettant donc au moins de mettre en évidence les délétions internes de quelques kilobases.

Des éléments situés en dehors des régions qui sont étudiées couramment, en particulier dans les régions extragéniques qui définissent le taux de transcription et sa précision d'initiation (régions promotrices), peuvent également être affectés. L'utilisation parallèle d'analyses qualitatives et quantitatives au niveau de l'ARN messager devrait cependant mettre en évidence la plupart de ces anomalies. Par ailleurs, les méthodes de criblage mutationnel de régions cibles de grande taille (par exemple la méthode FAMA) offrent maintenant la possibilité d'étudier plus facilement les régions régulatrices extragéniques (Verpy et coll., 1996).

## BIBLIOGRAPHIE

COSTES B, GIRODON E, GHANEM N, CHASSIGNOL M, THUONG NT, DUPRET D and GOOSSENS M. Psoralen-modified oligonucleotide primers improve detection of mutations by denaturing gradient gel electrophoresis and provide an alternative to GC-clamping. *Hum Molec Genet* 1993 2 : 393-397

COTTON RGH. Current methods of mutation detection. *Mutation Research*. 1993, 285 : 125-144. GROMPE M. The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nature Genet* 1993 5 : 111-117

COTTON RGH, RODRIGUEZ NR and 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** : 4397-4401

COTTON RHG. Detection of unknown mutations in DNA : a catch-22. *Am J Hum Genet* 1996 **59** : 289-291

COUCH JC, FARID LM, DE SHANO ML, TAVTIGIAN SV et al. BRCA2 Germline mutations in male breast cancer cases and breast cancer families. *Nature Genet* 1996 **13** : 123-125

COUCH FJ, WEBER BL. Mutations and polymorphisms in the familial early-onset breast cancer (BRCA1) gene. *Hum Mutat* 1996 **8** : 8-18

FANEN P, GHANEM N, VIDAUD M, BESMOND C, MARTIN J, COSTES B, PLASSA F and GOOSSENS M. Molecular characterization of cystic fibrosis : 16 novel mutations identified by analysis of the whole cystic fibrosis conductance transmembrane regulator (CFTR) coding regions and splice site junctions. *Genomics* 1992 **13** : 770-776

GANGULY A, M ROCK and D PROCKOP J. Conformation-sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single-base differences in double-stranded PCR products and DNA fragments : evidence for solvent-induced bends in DNA heteroduplexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 **90** : 10325-10329

GASPAR M-L, MEO T, BOURGAREL P, GUENET J-L and TOSI M. A single base deletion in the Tfm androgen receptor gene creates a short-lived messenger RNA that directs internal translation initiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 **88** : 8606-8610

GERMAIN D, BIASOTTO M, TOSI M, MEO T, KAHN A and POENARU L. Fluorescence-Assisted Mismatch Analysis (FAMA) for exhaustive screening of the  $\alpha$ -galactosidase A gene and detection of carriers in Fabry disease. *Hum Genet* 1996 **98** : 719-726

HACIA JG, BRODY LC, CHEE MS, FODOR SPA and COLLINS FS. Detection of heterozygous mutations in BRCA1 using high density oligonucleotide arrays and two-colour fluorescence analysis. *Nature Genet* 1996 **14** : 441-447

HAMELIN R, JEGO N, LAURENT-PUIG P, VIDAUD M and THOMAS G. Efficient screening of p53 mutations by denaturing gradient gel electrophoresis. *Oncogene* 1993 **8** : 2213-2220

HARIS JI, BENTLEY DR, GIANNELLI F. Mutation detection by fluorescent chemical cleavage : application to hemophilia B. *PCR Methods and Applications* 1994 **3** : 268-271

HOGERVORST FB, CORNELIS RS, BOUT M, VAN VLIET M, OOSTERWIJK JC, OLMER R, BAKKER B, KLIJN JG, VASEN HF, MEIJERS-HEIJBOER H et al. Rapid detection of BRCA1 mutations by the protein truncation test. *Nature Genet* 1995 **10** : 208-212

LANCASTER JM, WOOSTER R, MANGION J, PHELAN CM, COCHRAN C, GUMBS C et al. BCRA2 mutations in primary breast and ovarian cancers. *Nature Genet* 1996 **13** : 238-240

LU AL, HSU IC. Detection of single DNA base mutations with mismatch repair enzyme. *Genomics* 1992 **14** : 249-255

MASHAL RD, KOONTZ and SKLAR J. Detection of mutations by cleavage of DNA duplexes with bacteriophage resolvases. *Nature Genet* 1995 **9** : 177-183

MYERS RM, LARIN Z and MANIATIS T. Detection of single base substitutions by ribonuclease cleavage at mismatches in RNA : DNA duplexes. *Science* 1985 **230** : 1242-1246

OLSCHWANG S, TIRET A, LAURENT-PUIG P, MULERIS M, PARC R, THOMAS G. Restriction of ocular fundus lesions to a specific subgroup of APC mutations in adenomatous polyposis coli patients. *Cell* 1993 **75** : 959-968

ORITA M, IWAHANA H, KANAZAWA H, HAYASHI K, SEKIYA T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 **86** : 2766-2770

POWELL SM, PETERSEN GM, KRUSH AJ, VOGELSTEIN B and KINZLER KW. Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 1993 **329** : 1982-1987

ROWLEY G, SAAD S, GIANNELLI F and GREEN PM. Ultrarapid mutation detection by multiplex, solid-phase chemical cleavage. *Genomics* 1995 **30** : 574-582

SEROVA O, MONTAGNA M, TORCHARD D, NAROD SA, TONIN P, SYLLA B, LYNCH HT, FEUNTEUN J, LENOIR GM . A high incidence of BRCA1 mutations in 20 breast-ovarian cancer families. *Am J Hum Genet* 1996 **58** : 42-51

SHATTUCK-EIDENS D, McCLURE M, SIMARD J, LABRIE F, NAROD S, COUCH F, HOSKINS K, WEBER B, CASTILLA L, ERDOS M et al. A collaborative survey of 80 mutations in the BRCA1 breast and ovarian cancer susceptibility gene. *JAMA* 1995 **273** : 535-541

SHEFFIELD VC, BECK JS, KWITEK AE, SADSTROM DW and STONE EM. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for detection of single base substitutions. *Genomics* 1993 **16** : 325-332

SHEFFIELD VC, COX DR, LERMAN LS and MYERS RM. Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 **86** : 232-236

SMITH J and MODRICH P. Mutation detection with MuthH, MutL and MutS mismatch repair proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 **93** : 4374-4379

SMOKER PM and COTTON RGH. The use of chemical reagents in the detection of DNA mutations. *Mutation Res* 1993 **288** : 65-77

STOPPA-LYONNET D, FRICKER J-M, ESSIUX L, PAGES S, LIMACHER J-M, SOBOL H, LAURENT-PUIG P and THOMAS G. Segregation of two BRCA1 mutations in a single family. *Am J Hum Genet* 1996 **59** : 479-481

STOPPA-LYONNET D, LAURENT-PUIG P, ESSIUX L, PAGES S, ITHIER G, LIGOT L et al. BRCA1 sequence variations in 160 individuals referred to a breast/ovarian family cancer clinic. *Am J Hum Genet* 1997 **60** : 1021-1030

TOSI M, VERPY E and MEO T. Fluorescence-Assisted Mismatch Analysis (FAMA) for the chemical detection and identification of mutations. In : C Seidman, D Moiz et D Smith, *Current Protocols in Human Genetics*, J Wiley and sons (Eds), New York, 1997, 7.8.1-7.8.11

VERPY E, BIASOTTO M, BRAI M, MISIANO G, MEO T and TOSI M. Exhaustive mutation scanning by fluorescence assisted mismatch analysis discloses new genotype-phenotype correlations in angioedema. *Am J Hum Genet* 1996 **59** : 308-319

VERPY E, BIASOTTO M, MEO T and TOSI M. Efficient detection of point mutations in color-coded strands of target DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 **91** : 1873-1877

WHITE MB, M CARVALHO, D DERSE, S O'BRIEN J and M DEAN. Detecting single base substitutions as heteroduplex polymorphisms. *Genomics* 1992 **12** : 301-306

YOUIL R, KEMPER BW and COTTON RGH. Screening for mutations by enzyme mismatch cleavage with T4 endonuclease VII. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 **92** : 87-91