



## Détection de variants en nombre submicroscopique sur micro-array par hybridation génomique comparative

Dr Eva Klopocki, MBA

Institut de Médecine génétique et génétique humaine, Charité – Université de Berlin, Allemagne

Il y a quelques années, les duplications et les délétions du nombre de copies de variants (NCVs) ont été reconnues comme des variations structurales fréquentes dans le génome humain. NCVs participent bien plus au phénotype et aux maladies humaines que le polymorphisme d'un simple nucléotide (SNPs). L'état de art des technologies tel que array-HGC permet un screening large du génome humain en une seule expérience et a été défini comme l'outil pour le diagnostic en génétique humaine chez les patients présentant des infirmités intellectuelles, un retard du développement et/ou des malformations

référence pour obtenir des résultats fiables lors des expériences micro-array. Quotidiennement, nous utilisons le NanoPhotomètre multifonction d'Implen (fig. 1) qui nous permet de mesurer l'absorbance à 260 nm de très petits volumes d'échantillon (de 0,3 à 1,5 µl). Le NanoPhotomètre d'Implen (fig. 1), avec son trajet optique unique, permet d'évaluer la pureté et l'intégrité de l'ADN de façon simple et rapide grâce au rapport 260/280 nm (impureté protéique). Après ce marquage par réaction d'amorçage aléatoire et colonne, chaque échantillon est à nouveau mesuré avec le NanoPhotomètre. Un petit aliquot ( $\leq 1 \mu\text{l}$ ) suffit pour vérifier que la quantité de marqueur incorporée est identique dans les échantillons test et l'ADN référence. La mesure de très petit volume est grandement appréciée car cela évite de gaspiller des échantillons marqués précieux. Les fluorochromes sont dosés à 550 nm (Cy3) et à 650 nm (Cy5), (fig. 2). Grâce à la possibilité de réaliser un spectre complet de 200 à 950 nm, l'analyse est réalisée en 3,5 sec. seulement. Les applications pré-programmées du NanoPhotomètre permettent de mesurer la fréquence d'incorporation (FI). Les valeurs sont transférées à l'ordinateur et peuvent être éditées avec l'imprimante thermique intégrée à l'appareil. Ainsi, l'instrument procure une analyse facile, rapide et précise de réaction de marquage.



La dernière génération du NanoPhotomètre : le P-Class NanoPhotomètre Implén.

congénitales. **Micro-array pour hybridation génomique comparative (array HGC)** L'array-HGC a été développé en 1997 par Solina Toldo et col. C'est un outil de recherche en cancérologie. Le diagnostic concerne aussi bien les tests pré que post natal. Pour mesurer les variations du nombre de copies, l'ADN génomique du patient (échantillon test) et l'ADN référence sont marqués avec des fluorochromes (Cy3 et Cy5 respectivement) par réaction d'amorçage aléatoire puis hybridés à un oligonucléotide array. Avant le marquage, il est obligatoire de quantifier avec précision la concentration d'ADN et de garantir une très grande qualité de l'ADN échantillon ainsi que l'ADN

**Mesure de la fréquence d'incorporation (FI)** Comme souligné précédemment, les résultats de marquage d'amorce aléatoire sont vérifiés en mesurant l'incorporation des nucléotides marqués avec le NanoPhotomètre pour petit volume et fonction scan. Hormis la mesure initiale du blanc, le NanoPhotomètre ne nécessite aucune calibration. En calculant le FI, nous sommes capables d'éliminer les échantillons avec un très faible FI. Les résultats sont meilleurs et sans effort de normalisation, contrairement à la technique de l'array-HGC. De plus, nous avons très peu d'expériences manquées grâce au dépôt facile d'une simple goutte d'échantillon et

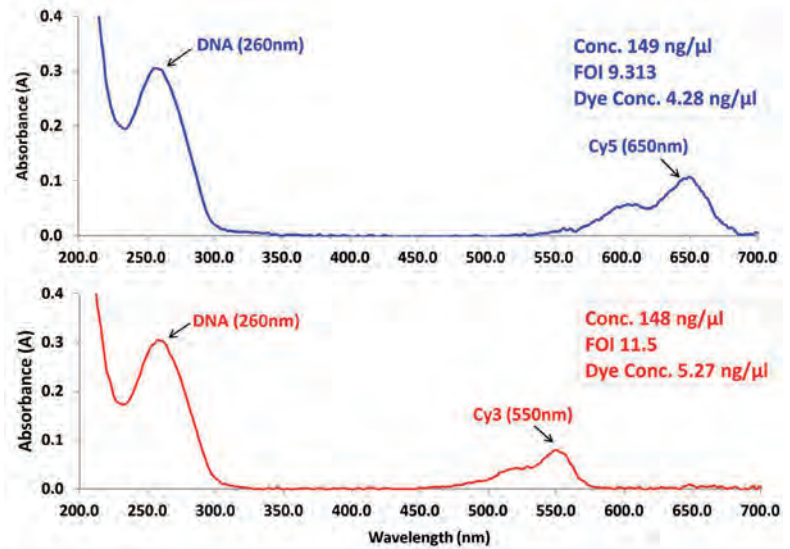


Figure 2 : Mesure de l'efficacité de marquage avec le NanoPhotomètre pour un échantillon de patient marqué avec Cy3 (550 nm, courbe rouge en bas) et un échantillon référence marqué avec Cy5 (650 nm, courbe bleue en haut)

par conséquent une meilleure efficacité. Cette technique est moins couteuse en temps et plus économique que l'analyse array-HGC.

### Détection de nouveaux syndromes de microdélétion

Un des atouts majeurs de l'array-HGC par rapport à la cytogénétique conventionnelle est la possibilité de détecter des aberrations sous-microscopiques (aberration < 5 Mb). Ceci permet l'identification de nouveaux syndromes de microdélétion/duplication. L'étude de patients avec un retard du développement (RD), une infirmité intellectuelle (II) et épilepsie démontre une grande incidence sur le NCVs sous-microscopique de cette population. En utilisant l'array-HGC, nous démontrons une délétion interstitielle homozygote sur le chromosome 15q13.3 pour 2 sibs sévèrement affectés accompagnés de IR, DD, non développement de la parole, déficience musculaire et malformation congénitale des yeux (Spielmann et col. 2011). Cette microdélétion concerne le gène *CHRNA7* qui a été identifié précédemment comme un gène impliqué dans l'épilepsie (fig. 3).

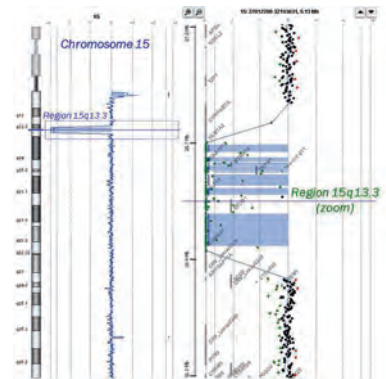


Figure 3 **Syndrôme de microdélétion 15q13.3** Courbe array-HGC d'une délétion homozygote (log 2 rapport 4) : chromosome 15 entier montré sur la gauche et grossissement de la région d'aberration 15q13.3 le bras long du chromosome 15 montré à droite.

quantité d'échantillon étant souvent faible et limitée, nous apprécions beaucoup la possibilité de pouvoir mesurer avec précision de très petits volumes. Le grand nombre d'applications, la simplicité et la rapidité d'utilisation, la précision des performances sans maintenance du NanoPhotomètre, font de cet instrument l'outil indispensable pour l'activité quotidienne des laboratoires travaillant sur la recherche ou le diagnostic du génome humain.

Au groupe array-HGC de l'Institut de Médecine Génétique et Génétique Humaine, Charité, Université de Berlin, le NanoPhotomètre Implén est utilisé en routine pour mesurer l'ADN et déterminer l'efficacité de marquage pour de très petits volumes d'échantillons. La

## En Bref ...

### Découverte d'un nouveau gène impliqué dans la cécité nocturne

Un nouveau gène, appelé *GPR179*, a été corrélé à la présence d'une forme de cécité nocturne d'origine génétique, une maladie de la rétine qui s'accompagne d'une vision basse et empêche de voir dans des conditions de faible luminosité. Il a été mis en évidence à l'Institut de la Vision (UPMC/CNRS/Inserm) par l'équipe de recherche d'Isabelle Audo et de Christina Zeitz. Ces résultats ont été obtenus grâce à une technique de séquençage de nouvelle génération permettant d'étudier l'ensemble des gènes d'une personne. Les mutations du gène *GPR179* sont très spécifiques de cette pathologie, ce qui pourrait en faire un marqueur de diagnostic performant. Cette étude, la première

publiée sur le gène *GPR179*, ouvre la voie à des recherches sur sa fonction précise, qui pourraient conduire à une meilleure compréhension des mécanismes de traitement de l'information visuelle et à des pistes thérapeutiques. Elle est parue le 10 février 2012 dans la revue *American Journal of Human Genetics*.

La cécité nocturne congénitale stationnaire est une maladie rare, d'origine génétique, qui se déclare dès la naissance. Elle est causée par une transmission défectueuse du signal lumineux dans la rétine, particulièrement handicapante dans des conditions de faible luminosité. Aucun traitement n'est pour l'instant disponible.

Pour comprendre l'origine génétique de la maladie, l'étude a été centrée sur des familles atteintes de la forme « complète » de la maladie qui entraîne la cécité nocturne la plus sévère. Dans un premier temps, les

scientifiques ont réalisé pour un petit nombre de patients un séquençage exomique complet, une technique de nouvelle génération qui permet de décoder l'ensemble des gènes d'une personne. Cette analyse a révélé la présence de mutations du gène *GPR179*, encore jamais observées.

Dans un deuxième temps, des mutations de *GPR179* ont été recherchées pour une large cohorte de malades suivis par des centres cliniques du monde entier. Ces travaux, menés en particulier, au Centre de Référence Maladies Rares / Centre d'Investigation Clinique du CHNO des Quinze-Vingts, ont confirmé la présence de mutations du gène *GPR179* pour trois familles supplémentaires.

La fonction du gène *GPR179* est pour l'instant inconnue mais les résultats préliminaires suggèrent un rôle cellulaire unique, distinct des autres gènes impliqués jusqu'à présent dans la cécité nocturne congénitale stationnaire. L'identification de son

implication dans cette pathologie en fait un candidat de choix comme marqueur biologique. Il facilitera le diagnostic permettant d'écarter d'autres pathologies se manifestant aussi par une cécité nocturne, comme la rétinopathie pigmentaire, plus fréquente et plus sévère.

Fruit d'une collaboration internationale de grande ampleur, ces travaux ont été réalisés grâce au soutien de Rétina France, la Fondation Voir & Entendre, la Fondation Fighting Blindness et du GIS-maladies rares.

**Référence de la publication :** Whole exome sequencing identifies mutations in *GPR179* leading to autosomal recessive complete congenital stationary night blindness, I. Audo et al., *American Journal of Human Genetics*, February 10, 2012.

**Contact chercheur :** Christina Zeitz  
01 53 46 25 40 - christina.zeitz@inserm.fr