



HAL
open science

Mise au point du dosage génique du gène OCRL1 par Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) : application au syndrome de Lowe et à la maladie de Dent

Charles Coutton

► **To cite this version:**

Charles Coutton. Mise au point du dosage génique du gène OCRL1 par Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) : application au syndrome de Lowe et à la maladie de Dent. Sciences pharmaceutiques. 2009. dumas-01059523

HAL Id: dumas-01059523

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01059523>

Submitted on 1 Sep 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SICD1 de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ex. 2



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
UFR DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci – La Tronche

Année : 2009

N° 7036

**MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE
BIOLOGIE MEDICALE**

Conformément aux dispositions du décret N° 90-810 du 10 septembre 1990 tient lieu de

**THESE PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU TITRE
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
DIPLOME D'ETAT**

**Mise au point du dosage génique du gène *OCRL1* par
Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)
Application au syndrome de Lowe et à la maladie de Dent.**

M. Charles COUTTON
Né le 08 Octobre 1982 à Saint Martin d'Hères

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Le 02 Octobre 2009

DEVANT LE JURY COMPOSE DE :

- Pr Renée GRILLOT : Président de jury
- Pr Pierre-Simon JOUK
- Dr Jean BRETON
- Dr Véronique SATRE
- Pr Joël LUNARDI : Directeur de thèse

La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
UFR DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci – La Tronche

Année : 2009

N°

**MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE
BIOLOGIE MEDICALE**

Conformément aux dispositions du décret N° 90-810 du 10 septembre 1990 tient lieu de

**THESE PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU TITRE
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
DIPLOME D'ETAT**

**Mise au point du dosage génique du gène *OCRL1* par
Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)
Application au syndrome de Lowe et à la maladie de Dent.**

M. Charles COUTTON

Né le 08 Octobre 1982 à Saint Martin d'Hères

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Le 02 Octobre 2009

DEVANT LE JURY COMPOSE DE :

- Pr Renée GRILLOT : Président de jury
- Pr Pierre-Simon JOUK
- Dr Jean BRETON
- Dr Véronique SATRE
- Pr Joël LUNARDI : Directeur de thèse

La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.





UFR
de PHARMACIE
de GRENOBLE



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté : Mme le Professeur **Renée GRILLOT**
Vice -Doyen : Mme **Edwige NICOLLE**

Année 2008-2009
Mise à jour : le 6 octobre 2008

PROFESSEURS A L'UFR DE PHARMACIE

BAKRI	Aziz	Pharmacie Galénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (LR)
BOUMENDJEL	Ahcène	Chimie Organique (D.P.M.)
BURMEISTER	Wilhelm	Physique (U.V.H.C.I)
CALOP	Jean	Pharmacie Clinique (CHU)
DANEL	Vincent	Toxicologie (CHU SAMU-SMUR)
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Inorganique (D.P.M.)
DROUET	Emmanuel	Immunologie / Microbiologie (U.V.H.C.I)
FAURE	Patrice	Biochimie (DBI / CHU)
FAVIER	Alain	Professeur Emérite
GODIN-RIBUOT	Diane	Physiologie – Pharmacologie (HP2)
GRILLOT	Renée	Parasitologie - Mycologie Médicale (Directeur UFR et CHU)
MARIOTTE	Anne-Marie	Pharmacognosie (D.P.M.)
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique (D.P.M.)
SEVE	Michel	Biotechnologie (CHU / CRI IAB)
RIBUOT	Christophe	Physiologie - Pharmacologie (HP2)
ROUSSEL	Anne-Marie	Biochimie Nutrition (L.B.F.A)
WOUESSIDJEWE	Denis	Pharmacotechnie (D.P.M.)



UFR
de PHARMACIE
de GRENOBLE



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté : Mme le Professeur **Renée GRILLOT**
Vice -Doyen : Mme **Edwige NICOLLE**

Année 2008-2009
Mise à jour : le 6 octobre 2008

PROFESSEURS ASSOCIES (PAST)

CHAMPON	Bernard	Pharmacie officine
RIEU	Isabelle	Qualitologie (CHU)
TROUILLER	Patrice	Santé Publique (CHU)

PROFESSEUR AGREGE (PRAG)

GAUCHARD	Pierre Alexis	Chimie Inorganique (D.P.M.)
----------	---------------	-----------------------------

CHU : Centre Hospitalier Universitaire
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
LBFA : Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
PRAG : Professeur Agrégé
UVHCI: Unit of Virus Host Cell Interactions



UFR
de PHARMACIE
de GRENOBLE



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté : Mme le Professeur **Renée GRILLOT**
Vice -Doyen : Mme **Edwige NICOLLE**

Année 2008-2009

MAITRES DE CONFERENCES DE PHARMACIE

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie - Mycologie (L.A.P.M)
ALLENET	Benoît	Pharmacie Clinique (ThEMAS TIMC-IMAG / CHU)
BATANDIER	Cécile	Nutrition et Physiologie (L.B.F.A / CHU)
BRETON	Jean	Biologie Moléculaire / Biochimie (L.C.I.B)
BRIANCON-MARJOLLET	Anne	Physiologie Pharmacologie (HP2)
BUDAYOVA SPANO	Monika	Biophysique (U.V.H.C.I)
CAVAILLES	Pierre	Biologie Cellulaire et génétique (L.A.P.M)
CHOISNARD	Luc	Pharmacotechnie (D.P.M)
DELETRAZ-DELPORTE	Martine	Droit Pharmaceutique Economie Santé
DEMEILLIERS	Christine	Biochimie (N.V.M.C)
DURMORT-MEUNIER	Claire	Biotechnologies (I.B.S.)
ESNAULT	Danielle	Chimie Analytique (D.P.M.)
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie (D.P.M.)
GERMI	Raphaële	Microbiologie (I.V.H.C.I / CHU)
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique (D.P.M.)
GROSSET	Catherine	Chimie Analytique (D.P.M.)
HININGER-FAVIER	Isabelle	Biochimie (L.B.F.A)
JOYEUX-FAURE	Marie	Physiologie -Pharmacologie (HP2)
KRIVOBOK	Serge	Biologie Végétale et Botanique (L.C.B.M)
MOUHAMADOU	Bello	Cryptogamie, Mycologie Générale (L.E.C.A)
MORAND	Jean-Marc	Chimie Thérapeutique (D.P.M.)
MELO DE LIMA	Christelle	Probabilités Biostatistiques (LE.C.A)
NICOLLE	Edwige	Chimie Organique (D.P.M.)
PINEL	Claudine	Parasitologie - Mycologie Médicale (CIB / CHU)
RACHIDI	Walid	Biochimie (L.C.I.B)
RAVEL	Anne	Chimie Analytique (D.P.M.)
RAVELET	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M.)
RICHARD	Jean Michel	Service Accueil Handicap (Direction)
SOUARD	Florence	Pharmacognosie (D.P.M)
TARBOURIECH	Nicolas	Biophysique (U.V.H.C.I)
VANHAVERBEKE	Cécile	Chimie organique (D.P.M.)
VILLET	Annick	Chimie Analytique (D.P.M.)



UFR
de PHARMACIE
de GRENOBLE



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté : Mme le Professeur **Renée GRILLOT**
Vice -Doyen : Mme **Edwige NICOLLE**

Année 2008-2009

ENSEIGNANTS ANGLAIS

COLLE Pierre Emmanuel	Maître de Conférence
FITE Andrée	Professeur Certifié
GOUBIER Laurence	Professeur Certifié

ATER

1 ATER	RECHOUM Yassine	Immunologie / DMBMT
1 ATER	GLADE Nicolas	Biophysique
½ ATER	RUTA Joséphine	Chimie Analytique
1 ATER	NZENGUE Yves	Biologie cellulaire / DMBMT
1 ATER	ELAZZOUZI Samira	Pharmacie Galénique
1 ATER	VERON Jean Baptiste	Chimie Organique
1 ATER	HADJ SALEM Jamila	Pharmacognosie
½ ATER	REINICKE Anne Teresa	Pharmacologie
1 ATER	CHENAU Jérôme	DMBMT
1 ATER	NASER EDDINE Abeer	Anglais

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CIB : Centre d'Innovation en Biologie

DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire

DMBMT : Département Mécanismes Biologiques des Maladies et des Traitements

HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire

IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogenèse »

IBS : Institut de Biologie Structurale

LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes

LBFA : Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée

LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux

LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie

LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine

TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition

UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

REMERCIEMENTS

A Madame le Professeur Renée Grillot,

Vous me faites l'honneur de juger ce travail et de présider cette thèse, soyez assurée de ma gratitude et de ma profonde admiration.

A Monsieur le Professeur Joel Lunardi,

Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur de diriger ce travail de thèse. Merci pour vos conseils dans l'élaboration et la rédaction de ce travail et pour les multiples réponses à mes trop nombreuses questions.

A Monsieur le Professeur Pierre Simon Jouk,

Je vous remercie de me faire l'honneur d'accepter de participer à mon jury et de juger ce travail. Merci de m'avoir accordé de votre temps précieux pour me faire sortir des méandres des tests statistiques, paramétriques ou non.

A Madame le Docteur Véronique Satre,

Je te remercie d'avoir accepté (sous la contrainte !!) de participer à mon jury de thèse et de m'avoir fait partager tes connaissances précises sur le sujet. Tes qualités humaines et scientifiques m'ont été d'une aide inestimable. Je suis heureux de pouvoir continuer à assister à tes cotés aux rendez-vous inoubliables du mardi matin.

A Monsieur le Docteur Jean Breton,

Je vous remercie de faire partie de mon jury et de juger (encore une fois) mon travail. Par vos enseignements, vous m'avez transmis le goût pour le monde lumineux des biotechnologies.

A Nicole, pour ta disponibilité, ton dynamisme communicatif et tes conseils précieux qui m'ont si souvent éclairé et aidé à accomplir ce travail. Merci !

A la formidable équipe de la BGM : Joëlle, Jonathan, Genevieve, Marina, Delphine, Laurent, Nadine, Florence, Peggy, Séverine, Christelle, Philippe, Marie Christine, Claudine pour leur gentillesse, leur patience et leur bonne humeur et en souvenir des âpres négociations pour une petite place sur le planning du séquenceur...

A Florence et Françoise pour leur compréhension, leur soutien quotidien et leurs entraînements drastiques! Je suis ravi de continuer l'aventure à vos côtés. Mention spéciale à Françoise et son redoutable stylo correcteur.

A Jérôme, Guillaume, Gaele, Martine, Sandrine, Sylvie, Monique, Edith, Colette, Françoise, Sindy, Gipsy et la fabuleuse « secrétariat team » pour leur gentillesse et leur soutien.

A John, pour toutes les soirées et les dimanches (!) passés ensemble en BGM...à manipuler mais pas que...

A Klaus, partenaire de longues soirées au laboratoire...

Merci à Nathalie pour son aide et ses conseils avisés.

A pipo, pour nos business plans ratés et les parties de baby foot trop facilement gagnées...

A mes co-internes de la première heure, Francis et Yoyo et leurs célèbres photomontages...

A Marie, pour ton amour indispensable à mon équilibre, ta tendresse, ton soutien et surtout ta patience sans égale... J'ai débuté et termine avec bonheur l'internat à tes côtés, qu'il en soit de même pour le reste de ma vie.

A mes parents pour leur amour inconditionnel, leur protection, leur enseignement, leur dévouement sans limite... tout sans quoi rien n'aurait été possible. Je vous dois tout. Vous êtes pour moi des modèles. Vous rendre fiers aujourd'hui est ma plus grande satisfaction.

A ma famille, particulièrement à Carol, Jacques, Océane, Evane et à mon Zinc. Pour votre soutien et tous les bons moments passés à vos côtés. Que cette complicité perdure toujours...

A mes fidèles amis, toujours présents quand il le fallait comme aujourd'hui d'ailleurs !

Je dédie ce travail à la mémoire de mes grands parents.

**Mise au point du dosage génique du gène *OCRL1*
par Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)
Application au syndrome de Lowe et à la maladie de Dent.**

SOMMAIRE

<u>LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX</u>	12
<u>ABBREVIATIONS</u>	15
<u>INTRODUCTION</u>	17
1. Le syndrome de Lowe et la maladie de Dent : description clinique	19
1.1. Le syndrome oculo-cérébro-rénal de Lowe	19
1.2. La maladie de Dent	24
2. OCRL1	25
2.1. Le gène <i>OCRL1</i>	25
2.2. La protéine OCRL1	27
2.2.1. OCRL : structure et interactions protéiques	28
2.2.1.1. Domaine 5-phosphatase et phosphoinositides	28
2.2.1.2. Extrémité C-terminale : domaines ASH et Rho-GAP	30
2.2.1.3. Domaines de liaison à la clathrine	33
3. Description et répartition des mutations d'OCRL1 dans le syndrome de Lowe et la maladie de Dent 2	37
3.1. Corrélation génotype-phénotype	39
4. Syndrome de Lowe et maladie de Dent : stratégie diagnostique	41
4.1. Diagnostic moléculaire	41
4.2. Autres approches diagnostiques	42
4.3. Diagnostic prénatal	43
4.4. Dépistage des femmes conductrices	43
4.5. Détection des réarrangements génomiques : vers une nouvelle stratégie	44

5. Multiplex Ligation-depedent Probe Amplification	47
5.1. Principe général	48
5.2. Contrôle de qualité	51
5.2.1. Quantité d'ADN	51
5.2.2. Dénaturation / Ligation	53
5.2.3. Profil du spectre	54
5.3. Normalisation	55
5.4. MLPA et mutations ponctuelles : détection et faux positifs	56
5.5. MLPA et mosaïques	57
5.6. Variantes de la MLPA	58
5.6.1. MLPA et sondes « entièrement synthétiques »	58
5.6.2. Méthylation-specific MLPA (MS-MLPA)	61
5.6.3. Reverse transcription-LPA (RT-MLPA)	63
5.6.4. MLPA haut débit : Array-MLPA	64
5.6.5. Autres applications	65

MATERIELS ET METHODES **66**

1. Patients	67
2. Modélisation des sondes	68
3. Réaction MLPA	73
4. Analyse des données	75
5. Détection des mosaïques	76

RESULTATS **78**

1. Mise au point de la technique	79
2. Validation des sondes <i>OCRL1</i> spécifiques	82
3. Dépistage des conductrices	84
4. Etude rétrospective de 15 patients par MLPA	85
5. Détection des mosaïques	86

DISCUSSION	88
1. Méthodes	89
2. Résultats	94
3. Perspectives	96
CONCLUSION	98
BIBLIOGRAPHIE	101
ANNEXES	113

TABLES DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Photographie d'enfants atteints du syndrome de Lowe.....	19
Figure 2 : Opacités cristalliniennes observées chez les femmes conductrices du syndrome de Lowe.....	21
Figure 3 : Représentation schématique du gène <i>OCRL1</i>	26
Figure 4 : Séquence de la protéine OCRL1.....	27
Figure 5 : Représentation de la protéine OCRL1 et des ses différemment domaines.....	28
Figure 6 : Schéma d'un phosphoinositide.....	29
Figure 7 : Exemples de processus régulés par PI(4,5)P ₂ au niveau de la membrane plasmique.....	29
Figure 8 : Métabolisme partiel des phosphatidylinositol phosphates.....	30
Figure 9 : Le cycle simplifié des GTPases.....	31
Figure 10 : Différents domaines d'OCRL1 et principales interactions protéiques.....	34
Figure 11 . Localisation et implication d'OCRL1 dans le trafic vésiculaire.....	35
Figure 12 : Représentation des mutations décrites dans la littérature du gène <i>OCRL1</i> (cDNA) dans le syndrome de Lowe et la maladie de Dent.	37
Figure 13 : Distribution des mutations d' <i>OCRL1</i> décrites dans la littérature dans le syndrome de Lowe et la maladie de Dent.....	39
Figure 14 : Stratégie diagnostique du syndrome de Lowe et objectifs de l'étude.....	46
Figure 15 : Schéma et nomenclature conventionnelle d'une sonde MLPA.....	48
Figure 16 : Electrophérogramme de MLPA.....	49
Figure 17 : Principe général de la réaction de MLPA.....	50

Figure 18 : Profil MLPA obtenu chez un patient sain témoin et chez un patient avec une délétion.....	51
Figure 19 : Intensité observée des signaux des sondes quantité ADN-dépendantes en fonction de différentes quantités d'ADN.....	52
Figure 20 : Influence de la dénaturation sur le signal des sondes spécifiques des régions riches en GC ou des îlots CpG.....	53
Figure 21 : Représentation du « sloping effect ».....	54
Figure 22 : Exemples de variations du nombre de copie d'une région cible.....	55
Figure 23 : Principe de détection des mutations ponctuelles par MLPA.....	56
Figure 24 : Représentation et caractéristiques principales des sondes MLPA « toutes synthétiques ».....	60
Figure 25 : Electrophérogramme multi-canaux.....	61
Figure 26 : Principe général de la MS-MLPA.....	62
Figure 27 : Sondes utilisées pour la RT-MLPA.....	64
Figure 28 : Principe général de la technique d'Array MLPA.....	65
Figure 29 : Algorithme de modélisation des sondes MLPA synthétiques utilisé dans notre étude.....	70
Figure 30 : Schéma simplifié de la réaction de MLPA.....	71
Figure 31 : Stratégie de préparation d'échantillons mimant des délétions en mosaïque à différents degrés de mosaïcisme.....	76
Figure 32 : Influence de la combinaison des sondes sur l'intensité du signal de la sonde spécifique de l'exon 19.....	79
Figure 33 : Influence de la quantité de sondes spécifiques de l'exon 19 sur l'intensité de son signal.....	80

Figure 34 : Influence du premier nucléotide adjacent à l'amorce de l'oligonucléotide LPO (left probe oligonucléotide) des sondes spécifiques de l'exon 19 et 22.....	81
Figure 35 : Profil MLPA des 4 mix de sondes spécifiques des exons du gène <i>OCRL1</i> à partir d'échantillons contrôles.....	81
Figure 36 : Exemples d'électrophérogrammes pathologiques obtenus par MLPA.....	83
Figure 37 : Diagramme des ratios normalisés des 24 sondes <i>OCRL1</i> spécifiques chez une femme contrôle et chez 2 femmes conductrices de délétions.....	84
Figure 38 : Représentation en box plot des ratios normalisés en fonction du type de mutation et du degré de mosaïcisme.....	87

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Séquences des oligonucléotides composant les sondes spécifiques des exons du gène <i>OCRL1</i>	71
Tableau II : Principales caractéristiques des sondes synthétiques utilisées dans l'étude par MLPA du gène <i>OCRL1</i>	72
Tableau III : Valeurs extrêmes des ratios normalisés obtenues pour chaque sonde et leurs écart-types calculé à partir de 10 échantillons contrôles.....	82
Tableau IV : Résultats d'analyse MLPA de 7 patients avec une délétion génomique connus du gène <i>OCRL1</i>	83
Tableau V : Résultats du dépistage des conductrices par MLPA chez 5 femmes avec un apparenté atteint et porteur d'une délétion génomique d' <i>OCRL1</i>	84
Tableau VI : Résultats de l'étude rétrospective de 15 patients avec un tableau clinique évocateurs du syndrome de Lowe par MLPA.....	85

ABBREVIATIONS

ΔG : enthalpie libre

ADN : acide désoxyribonucléotide

ADNc : ADN complémentaire

APPL1 : adaptor protein, phosphotyrosine interaction, PH domain and leucine zipper containing 1

ARNm : acide ribonucléotide messenger

ASH : ASPM (abnormal spindle-like microcephaly-associated protein) / SPD2 (spindle pole body 2)/ hydin

AUC : area under curve

CGH-array : Comparative genomic hybridization

CV : coefficient de variation

DAG : diacylglycérol

FAM : 6-carboxyfluorescéine

FISH : fluorescent in situ hybridation

GAP : GTPase activating factor

GC : guanine-cytosine

GEF : guanine nucleotide exchange factor

HPLC : high performance liquid chromatography

INPP5B : inositol polyphosphate-5-phosphatase de 75 kDa

kDa : kiloDalton

LHS : left hybridizing sequence

LPO : left probe oligo

MAPH : Multiplex amplifiable probe hybridization

M : mix

Mb : mégabase

Mg^{2+} : magnésium

MLPA : Multiplex ligation-dependent probe amplification

MS-MLPA : Méthylation-specific MLPA

Na^+ : sodium

ng : nanogramme

nt : nucléotide

OCRL: Oculo-cérébro-rénal de Lowe
P : patient
PCR : Polymerase chain reaction
PI : phosphatidylinositol
PIP₂ : phosphatidyl-inositol-diphosphate
PI(4,5) P2 : phosphatidylinositol 4,5-diphosphate
PI(3,4,5)P3 : phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate
QI : quotient intellectuel
q-PCR : PCR quantitative
R² : coefficient de détermination
Rho-GAP : Rho GTPase activating protein
RHS: right hybridizing sequence
RPO : right probe oligo
RT-MLPA : Reverse transcription-MLPA
S² : variance
SA : semaines d'aménorrhées
SA-PE : Streptavidine-Phycoérythrine.
SNP : Single nucleotide polymorphism
T : témoin
T° : température
TGN : trans Golgi network
Tm : melting temperature
Tot : total
v/v : volume/volume

INTRODUCTION

Le syndrome oculo-cérébro-rénal de Lowe (OCRL) est une maladie génétique rare se transmettant sur le mode récessif lié à l’X. Ce syndrome est décrit pour la première fois en 1952 par Lowe et se caractérise par 3 signes cardinaux : un retard du développement psychomoteur, une cataracte congénitale bilatérale et une tubulopathie complexe de type syndrome de Fanconi. La maladie de Dent est une tubulopathie proximale héréditaire très rare liée à l’X, révélée dans l'enfance ou à l'âge adulte par une protéinurie tubulaire et pouvant évoluer vers une lithiase urinaire calcique, une néphrocalcinose et une insuffisance rénale chronique. Les mutations du gène *OCRL1* ont été associées avec ces deux pathologies mais plus généralement avec OCRL. Le gène *OCRL1* code pour une phosphatidylinositol-4,5-diphosphate 5-phosphatase. Bien que plus de 150 mutations aient été déjà décrites, seulement 5% sont des délétions exoniques. De surcroît, aucune duplication, homogène ou en mosaïque, n’a été encore à ce jour décrite dans les deux pathologies. De nombreuses techniques permettent de détecter les différents réarrangements du gène *OCRL1*, utiles pour le diagnostic et le conseil génétique de ces maladies. Toutefois, ces techniques présentent souvent de nombreux inconvénients limitant leur utilisation. En 2002, Schouten décrit pour la première fois la technique de Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification ou MLPA, technique simple et rapide de quantification génique en multiplex. La MLPA s’est très rapidement imposée comme méthode de choix pour la mise en évidence des délétions ou duplications de nombreux gènes. Malheureusement, aucune trousse commerciale n’était à ce jour disponible pour l’étude par MLPA d’*OCRL1*. Ainsi, l’objectif de ce travail a été dans un premier temps de mettre au point une technique MLPA spécifique du gène *OCRL1*. Validée, notre technique a été ensuite appliquée à l’étude d’une série de patients présentant un tableau clinique évocateur du syndrome de Lowe mais chez lesquels l’analyse par séquençage du gène *OCRL1* s’était révélée non contributive.

1. Le syndrome de Lowe et la maladie de Dent : Description clinique.

1.1. Le syndrome oculo-cérébro-rénal de Lowe

Le syndrome oculo-cérébro-rénal (OCRL, OMIM # 309000) a été décrit pour la première fois en 1952 par Lowe chez 3 garçons non apparentés présentant une cataracte, un retard mental, un rachitisme vitamino-résistant et une aminoacidurie [Lowe et al. 1952] (Figure 1). Le syndrome de Lowe est caractérisé par une atteinte essentiellement oculaire, cérébrale et rénale. Cette pathologie est rare dans toutes les populations. Sa prévalence est estimée de l'ordre de 1/ 500 000 [Loi 2006].



Figure 1 : Photographie d'enfants atteints du syndrome de Lowe (Association Syndrome de Lowe, FRANCE, www.syndrome-lowel.org)

L'évolution du syndrome de Lowe se fait habituellement en trois phases. La phase initiale néonatale est caractérisée par les manifestations ophtalmologiques et généralement associée à une hyperaminoacidurie asymptomatique et une protéinurie. La deuxième phase, qui débute au cours de la petite enfance, regroupe des anomalies métaboliques sévères liées au syndrome rénal de Fanconi et est accompagnée fréquemment d'un rachitisme, parfois responsable d'un fort retentissement sur le développement moteur. Durant la troisième phase, ou phase dite de stabilisation, les symptômes observés sont classiquement liés aux séquelles des deux phases précédentes incluant la cécité, le handicap moteur et l'insuffisance rénale souvent sévère à partir de l'âge adulte [Loughead *et al*, 1992].

L'espérance de vie dans le syndrome de Lowe est de l'ordre de 20 à 40 ans. Le patient le plus âgé jamais décrit est décédé à l'âge de 54 ans [Loi 2006]. Les causes de la mort dans les premières années de vie sont principalement liées aux troubles rénaux, à l'hypotonie et aux infections intercurrentes (respiratoires et intestinales principalement). Plus tardivement, des causes telles que l'épilepsie, les maladies respiratoires et l'insuffisance rénale chronique sont les plus fréquemment impliquées [Loi 2006]. Compte tenu d'une meilleure prise en charge médicale, l'espérance de vie des enfants nés ces vingt dernières années s'est considérablement améliorée mais est encore très difficile à estimer précisément.

- **Atteinte oculaire**

Les signes oculaires sont les plus précoces et les plus constants. La cataracte congénitale présente dans 100 % des cas est en règle générale bilatérale et totale, associée à une acuité visuelle faible. Le moment de la mise en place du traitement est crucial pour le développement visuel de ces enfants. Une chirurgie précoce est donc à envisager. Toutefois

malgré cette mesure de correction, l'acuité visuelle est rarement supérieure à 2/10^{ème} et l'aphakie résultant de la chirurgie, nécessitera le port de lunettes.

De plus un glaucome bilatéral est décrit dans 50 % des cas et peut en l'absence de contrôle et de traitement majorer le handicap visuel du patient. D'autres manifestations ophtalmologiques ont été signalées : l'enophtalmie, l'apparition de tissu cicatriciel sur la cornée (chéloïde) chez environ 25 % des patients, un strabisme et un nystagmus.

Il est important de noter aussi que classiquement, les femmes conductrices pour le syndrome de Lowe ont des opacités punctiformes isolées au niveau du cortex cristallinien révélées à la lampe à fente sans conséquences sur la vision (figure 2).



Figure 2. Opacités cristalliniennes observées chez les femmes conductrices du syndrome de Lowe.

- **Atteinte rénale**

La fonction tubulaire rénale anormale fait partie de la triade clinique à partir de laquelle est établi le diagnostic de syndrome de Lowe. Les anomalies rénales les plus importantes dans le syndrome de Lowe sont en rapport avec un dysfonctionnement tubulaire de type syndrome de Fanconi, qui contrairement à la cataracte, apparaît plus tardivement après la naissance.

Les anomalies clinico-biologiques associées à ce tableau rénal sont nombreuses et complexes, on retrouve notamment [Charnas et al. 1991, Chabaa et al. 2006] une protéinurie tubulaire modérée constante avec une acidose métabolique, une hypophosphatémie avec

phosphaturie élevée et une hyperaminoacidurie généralisée aggravant la perte des phosphates urinaires [Hollerman and Calcagno, 1968].

Cette atteinte rénale est assez variable en intensité et ne justifie pas toujours un traitement [Charnas et Nussbaum, 1995]. Le traitement rénal du syndrome de Lowe est purement symptomatique. Il vise à améliorer les anomalies métaboliques secondaires au syndrome de Fanconi et consiste traditionnellement en l'association d'une alcalinisation orale (correction de l'acidose) et de l'administration de vitamine D et de phosphate (prévention du rachitisme). Toutefois, le développement à long terme d'une insuffisance rénale terminale pose la question de la dialyse et d'une éventuelle transplantation.

- **Atteinte du système nerveux**

Le système nerveux central et le système nerveux périphérique sont atteints dans le syndrome de Lowe.

L'hypotonie néonatale est constante. Elle peut avoir des conséquences graves sur la fonction respiratoire, sur le développement staturo-pondéral (troubles de la succion et de la déglutition) mais aussi sur le développement moteur [Loi 2006]. Généralement, les enfants acquièrent la marche après l'âge de 3 ans [Loi 2006]. L'amélioration de l'hypotonie est lente avec l'âge et nécessite une prise en charge par kinésithérapie.

Les enfants atteints de syndrome de Lowe présentent le plus souvent une déficience intellectuelle modérée (QI entre 40-54). Environ 10 % des patients auraient toutefois une intelligence normale ou sub-normale [Kenworthy et al. 1993].

Les troubles du comportement sont aussi particulièrement fréquents (> 80 %) [Kenworthy et Charnas, 1995] caractérisés entre autres par des accès de colère, une irritabilité et un comportement agressif [Kenworthy et al. 1993]. Une thérapie comportementale peut s'avérer

efficace, mais parfois non suffisante et un traitement médical est alors indispensable [Kenworthy et Charnas, 1995].

Enfin, 50% des enfants vont présenter des convulsions, débutant avant l'âge de 6 ans. Ces crises convulsives répondent habituellement bien au traitement par benzodiazépines [Loi 2006]. L'électroencéphalogramme est généralement non spécifique [Charnas et al. 1988 ; McSpadeen et al. 1991]

- **Autres atteintes**

Par ailleurs d'autres atteintes peuvent être retrouvées dont une dysmorphie faciale associant des bosses frontales, un aspect de macrocrânie, des oreilles grandes et décollées et un rétrognatisme [Lowe et al. 1952]. On observe également des atteintes musculo-squelettiques, dentaires, génitales, cutanées, digestives, biologiques et hématologiques dont une anémie microcytaire (1/3 des cas), une anémie hémolytique auto-immune (4%), et des accidents hémorragiques (16 %) [Baujat 2005, communication personnelle].

1.2. La maladie de Dent

La maladie de Dent très rare de transmission récessive liée à l'X (Dent 1, MIM # 300009), se révèle dans l'enfance ou à l'âge adulte et se caractérise par un dysfonctionnement de l'épithélium tubulaire rénal. La symptomatologie observée est en rapport avec un défaut de réabsorption des solutés filtrés. Les anomalies caractéristiques sont une protéinurie de bas poids moléculaire et d'autres signes du syndrome de Fanconi comme la glucosurie, l'acidosurie, la phosphaturie et une insuffisance rénale chronique vers l'âge de 30-40 ans [Dent, 1964; Wrong et al. 1994; Thakker, 2000]. Fréquemment, on retrouve aussi une hypercalciurie associée à une néphrocalcinose et des lithiases rénales, symptômes plus rarement observés dans le syndrome de Lowe. Les patients ne présentent pas de manifestations extra-rénales mis à part un rachitisme pour une minorité d'entre eux, conséquence probable de l'hypophosphatémie par perte rénale [Hoopes et al. 2005].

Le diagnostic clinique du syndrome de Lowe était auparavant sans équivoque de même que celui de la maladie de Dent. A ces deux entités cliniques se sont ajoutés d'autres patients au phénotype « incomplet » c'est-à-dire ne présentant pas l'ensemble des symptômes cliniques caractéristiques (exemple : absence de cataracte congénitale mais présence de la tubulopathie et d'un retard psychomoteur) [Satre 2007]. Alors que 60% des patients atteints de la maladie de Dent présentent des mutations du gène *CLCN5* (MIM #300008) codant pour le canal rénal chlore voltage dépendant ClC-5 [Lloyd et al. 1996, Hoopes et al. 2004], 20% ont une mutation du gène *OCRL1* (MIM #300535) [Hoopes et al. 2005]. Ces patients présentent alors un phénotype Dent-like (Dent 2 disease, MIM #300555) décrivant un tableau clinique intermédiaire entre le syndrome de Lowe et la maladie de Dent [Bökenkamp et al. 2009] faisant évoquer la possibilité d'un continuum entre ces deux pathologies [Satre 2007].

2. OCRL1

2.1. Le gène *OCRL1*

Le gène *OCRL1*, responsable du syndrome de Lowe est localisé sur le chromosome X en Xq25 [Silver et al. 1987] de la base 128501933 à la base 128554211 en partant du télomère du bras court du chromosome X (ENSG 00000122126), et est formé de 24 exons (figure 3 et annexe 1). Son transcrit de 5,2 kb est ubiquitaire. Le codon initiateur de la traduction « ATG » longtemps assigné au niveau de l'exon 2, est aujourd'hui plus justement localisé au niveau de l'exon1 [Hyvola et al. 2006 ; Erdmann et al. 2007]. Ainsi, la partie codante s'étend des exons 1 à 23 avec un exon alternatif (18a) exprimé principalement dans les tissus neurologiques [Nussbaum et al. 1997] (annexe 2).

Récemment, des mutations du gène *OCRL1* ont été également mises aussi en évidence dans la maladie de Dent [Hoopes et al. 2005].

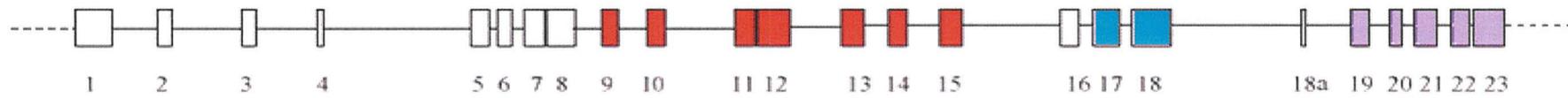


Figure 3: Représentation schématique du gène *OCRL1*. L'échelle de taille est respectée pour les exons et les introns. Les domaines 5-phosphatase, ASH et Rho-GAP sont représentés en rouge, bleu et violet respectivement.

2.2. La protéine OCRL1

La protéine OCRL1 (NP_000 267) composée de 901 acides aminés (figure 4) est une inositol 4,5-diphosphate 5-phosphatase de type II (MW = 103 226 kDa).

```
1  MEPPLPVGAQPLATVEGEMEMKGPLREPCALTLAQRNGQYELIIQLHEKEQHVQDIIPINS
61  HFRCVQEAEEETLLIDIASNSGCKIRVQGDWIRERRFEIPDEEHCLKFLSAVLAAQKAQSQ
121 LLVPEQKDSSSWYQKLDTKDKPSVFSGLLGFDNFSSMNLDDKINSQNPQTGIHREPPPP
181 PFSVNKMLPREKEASNKEQPKVTNTRKLFVPNTQSGQREGLIKHILAKREKEYVNIQTF
241 RFFVGTWNVNGQSPDSGLEPWLNCDFNFPDIYICIGFQELDLSTEAFYFESVKEQEMQMA
301 VERGLHSAKAYKKVQLVRLVGMMLLIIFARRDQCRYIRDIAETFTVGTGIMGFNGKGGVAV
361 RFVFNHTTFCIVNSHLAAHVEDFERFNQYKDI CARMSFVVPWQTLFQLNIMRBEVVIVL
421 GDLNRYRLCMPDANENKSLINKKDLQRLKFDQLNIQRTQKRAFVDFNEGEIKFTIPTYKYD
481 SKTDRWDSGKCRVPAWCDRIILWRGTNVNQLNYSHEMELTSDKFKVSALEHIGVKVVDL
541 RRYRKVFEDSVRIMDRMENDFLPSLELSRREFVFNKFRQLQKRFQISNNGQVPCFHS
601 FIPKLNDSDYCKPWLRAEPEFEGYLEPNETVDISLDVYVSKDSVTILNSGEDKIEDILVLE
661 LDRGKDYELTISGNLPSCTGTSLEALCRMKRFIREVFVTKLIDLEEDSFLEKESLLOM
721 VPLDEGASERPLQVPKEIWLVDHLFKYACHQEDLFTQTFGMOEELQTIIDCLDTSTPETI
781 PGNHNSVAEALLIFLEALPEPVICYELYQRCLDSAYDFRICROVISOLFRCHRIVFRYLM
841 AFLRELLKFEYNSVNVANMIATLFTSLLLRFPFNLMAEQTPSDRQRAIQFLDGLLGSEE
901 D
```

Figure 4 : Séquence de la protéine OCRL1. Le domaine 5-phosphatase est souligné en rouge, le domaine ASH de liaison est souligné en bleu, le domaine Rho-GAP est souligné en violet et un domaine de liaison à la clathrine souligné en jaune. Les séquences LIDLE, LIDIA et FEDNF, impliquées aussi dans la liaison à la clathrine, sont soulignées.

La protéine OCRL1 est exprimée de façon ubiquitaire. Elle est localisée au niveau du réseau trans-golgien (Trans Golgi Network : TGN), des replis membranaires, dans les endosomes précoces ainsi qu'au niveau des vésicules recouvertes de clathrine mais est absente dans les endosomes tardifs et les lysosomes [Olivos-Glander et al. 1995; Faucherre et al. 2003; Ungewickell et al. 2004; Choudhury et al. 2005; Erdmann et al. 2007].

Il existe deux isoformes de la protéine qui sont générées par un épissage alternatif tissu-spécifique. L'isoforme OCRL1-a (NP_000267) comportant 8 acides aminés supplémentaires (exon 18a), est majoritairement présente au niveau cérébral. L'isoforme OCRL1-b (NP_001578), plus courte (sans l'exon 18a), s'exprime de façon majoritaire dans

tous les tissus sauf le cerveau où elle est absente [Lowe, 2005]. Le motif codé par l'exon alternatif est immédiatement adjacent à un site de liaison à la clathrine (acides aminés LIDLE en position 702) suggérant qu'il pourrait exister une différence d'affinité entre ces deux isoformes pour la clathrine. Choudhury émet en 2009 l'hypothèse que seule l'isoforme « a » serait impliquée dans les fonctions clathrine dépendantes de la protéine OCRL1 [Choudhury et al. 2009].

2.2.1. OCRL1 : Structure et interactions protéiques

De par sa structure, son activité et sa localisation, la protéine OCRL1 joue un rôle central dans de très nombreux processus cellulaires.

La protéine OCRL1 s'organise en plusieurs domaines structuraux distincts, tous associés à une fonction individuelle donnée et spécifique (figure.5).



Figure 5. Représentation de la protéine OCRL1 et des ses différemment domaines.

2.2.1.1. Domaine 5-phosphatase et phosphoinositides

L'activité catalytique de la protéine est supportée par un domaine central inositol 5-phosphatase (résidus aminés 238 à 539). Les inositol 5-phosphatases sont des phosphoestérases qui hydrolysent le phosphate en position 5 du cycle inositol de différents messagers secondaires tels que les molécules lipidiques dérivées du phosphatidylinositol ou phosphoinositides (figure 6).

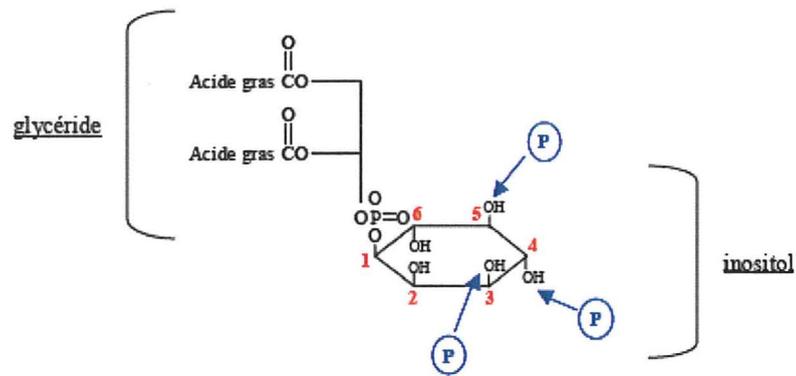


Figure 6 : Schéma d'un phosphoinositide. Les hydroxyles en positions 3, 4 et 5 sont déphosphorylés par des phosphatases spécifiques.

Les phosphoinositides ont un rôle essentiel dans de nombreuses fonctions cellulaires. OCRL1, en hydrolysant préférentiellement le phosphatidylinositol 4,5-diphosphate (PI(4,5)P₂) [Zhang *et al*, 1995] participe à la régulation de son taux cellulaire. Or, le PI(4,5)P₂ est le précurseur de voies majeures de signalisation cellulaire comme la voie de la phospholipase C et de la phosphoinositide 3-kinase [Whisstock *et al*, 2002] mais joue aussi un rôle propre dans de multiples fonctions cellulaires (figure 7) et notamment dans la régulation de la dynamique d'assemblage du cytosquelette d'actine, du trafic membranaire et des canaux ioniques [Di Paolo *et al*. 2006].

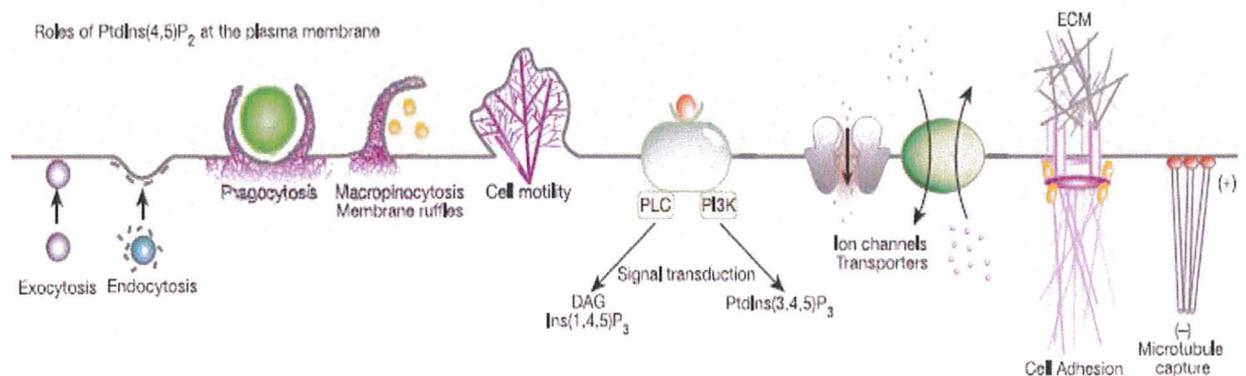


Figure 7 : Exemples de processus régulés par PI(4,5)P₂ au niveau de la membrane plasmique. ECM : matrice extra-cellulaire ; PI3K : PI(3) kinase. [Di Paolo et De Camilli, 2006]

En plus de son action préférentielle sur le $PI(4,5)P_2$, OCRL1 a comme substrat le phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate $PI(3,4,5)P_3$ (figure 8), un lipide de la membrane plasmique qui joue un rôle important dans l'activation de certains facteurs impliqués dans le trafic membranaire. [Lowe, 2005].

Par son action directe sur ces différents phosphoinositides signalétiques, OCRL1 participe et contrôle indirectement tous les processus cellulaires médiés par ces messagers secondaires.

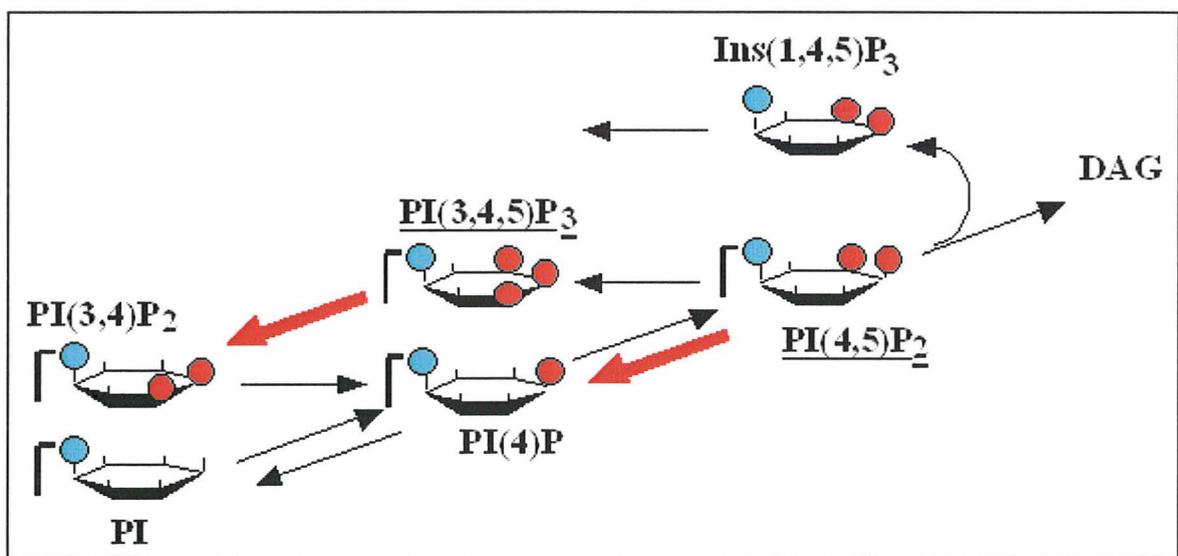


Figure 8 : Métabolisme partiel des phosphatidylinositols. P : phosphate ; PI : phosphatidylinositol ; P : phosphate ; Ins(1,4,5)P₃ : inositol-1,4,5-triphosphate ; DAG : diacylglycérol. Les réactions catalysées par OCRL1 sont indiquées par une flèche rouge.

2.2.1.2. Extrémité C-terminale : domaines ASH et Rho-GAP

En plus de son domaine central 5-phosphatase, la protéine comprend 2 autres domaines à son extrémité C-terminale: un domaine ASH (ASPM (abnormal spindle-like microcephaly-associated protein)/SPD2 (spindle pole body 2)/hydin) récemment identifié (résidus aminés 564 à 678) [Ponting et al 2006 ; Licheter-Konecki et al. 2006 ; Erdmann et al. 2007] et un domaine Rho-GAP (Rho GTPase activating protein) C-terminal catalytiquement inactif (résidus aminés 679 à 901).

➤ Domaine Rho-GAP et interactions protéiques

Par l'intermédiaire de son domaine de type Rho-GAP, OCRL1 se lie à des protéines RhoGTPases, dont Rac1 et Cdc42, qui appartiennent à la superfamille des protéines Ras ou petites protéines G, acteurs majeurs de la signalisation moléculaire intracellulaire. Ces protéines G (G car elles fixent un nucléotide guanylique : GDP ou GTP) permettent la transduction d'un signal transmis par des récepteurs membranaires à différents effecteurs intracellulaires. Schématiquement, les GTPases peuvent être considérées comme des interrupteurs moléculaires : en fonction de leur état d'activation, le signal sera ou non transmis aux effecteurs. L'état d'activation de ces protéines est lié au nucléotide guanylique fixé : inactif avec le GDP, actif avec le GTP (figure 9).

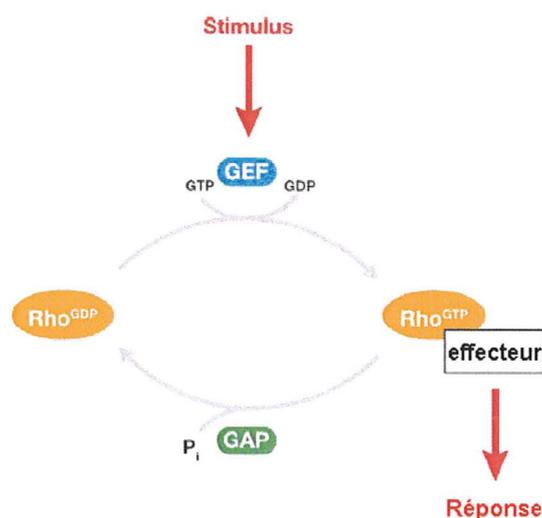


Figure 9 : Le cycle simplifié des GTPases. Les GTPases passent d'un état inactif lié au GDP à un état actif lié au GTP. Ces changements d'état sont régulés par les facteurs d'échange du nucléotide guanylique (GEF) et les protéines GAP.

Brièvement, les protéines avec un domaine GAP (comme OCRL1) participeraient au retour à la forme inactive [Menager 2003] des GTPases en hydrolysant le GTP en GDP [Peck et al. 2002], arrêtant ainsi la transmission du signal. Par le biais de ce domaine Rho-GAP et particulièrement Rac1-GAP, OCRL1 pourrait notamment avoir un rôle important sur la dynamique de l'actine, Rac1 stimulant l'assemblage de l'actine sous sa forme active.

Cependant, il semblerait que la région Rho-GAP d'OCRL1 soit dépourvue d'activité catalytique et donc de réel rôle sur l'activation des GTPases. Ce domaine servirait principalement à lier Rac1 et Cdc42 et ainsi adresser correctement OCRL1 au niveau du TGN et des membranes endocellulaires où sont localisés ces deux protéines [Faucherre et al. 2003 ; Faucherre et al. 2005 ; Lichter-Konecki et al. 2006 ; Erdmann et al. 2007].

Ce domaine faciliterait aussi d'autres interactions protéine-protéine et notamment avec les protéines Arf (Arf1 et Arf 6 principalement), d'autres membres de la famille des petites protéines G. Ces protéines, localisées au niveau du TGN seraient directement impliquées dans la voie de signalisation du PI(4,5)P₂. Cette interaction semble primordiale pour la fonction normale de la protéine OCRL1 [Lichter-Konecki *et al*, 2006].

Enfin, il semble que le domaine Rho-GAP soit essentiel pour l'activité phosphatase de la protéine [Lichter-Konecki *et al*, 2006].

➤ **Domaine ASH et protéines Rab**

Le domaine ASH de la protéine OCRL1 interagit avec les protéines Rab, principalement avec Rab1 et Rab6, autres GTPases de la famille Ras, situées au niveau du Golgi et impliquées entre autres dans les voies d'endocytose et de sécrétion des protéines, ainsi que dans la dynamique du cytosquelette d'actine et des microtubules [Goud, 2002]. Cette liaison aux protéines Rab1 et Rab 6 est essentielle pour l'adressage correct d'OCRL1 au niveau de l'appareil de Golgi et aurait également un effet *in vitro* sur son activité 5-phosphatase [Hyvola *et al*, 2006].

Enfin, une région située entre le domaine ASH et RhoGAP interagirait avec APPL1 (adaptor protein, phosphotyrosine interaction, PH domain and leucine zipper containing 1), un autre effecteur des protéines Rab et notamment de Rab 5 [Erdmann et al. 2007]. Rab5 est

principalement située au niveau des endosomes et est impliquée dans l'endocytose [Goud, communication orale, 2005]. Cette interaction permettrait ainsi l'adressage correct d'OCRL1 au niveau des endosomes [Erdmann et al. 2007].

2.2.1.3. Domaines de liaison à la clathrine

Plusieurs sites de liaisons aux chaînes lourdes de la clathrine ont été identifiés.

Un premier site de liaison a été identifié en C-terminal de la protéine composé par la séquence consensus des boîtes clathrine de type I (séquence LIDLE) (résidus 701 à 705) ainsi qu'un nouveau site décrit en N-terminal représenté par la séquence LIDIA (résidus 73 à 77) [Choudhury 2009].

Il existe également un autre domaine indispensable pour la liaison à la clathrine situé entre le domaine catalytique et le domaine ASH mais ne comporte pas à ce jour de motifs de liaison connus [Choudhury *et al*, 2005].

Enfin, à l'extrémité N-terminal on retrouve le motif FEDNF (résidus 130 à 134) responsable de la liaison avec l'adaptateur de la clathrine AP-2, protéine intervenant dans l'assemblage de la clathrine [Ungwickell et al. 2004].

Les différentes interactions protéiques d'OCRL1 sont résumées figure 10.

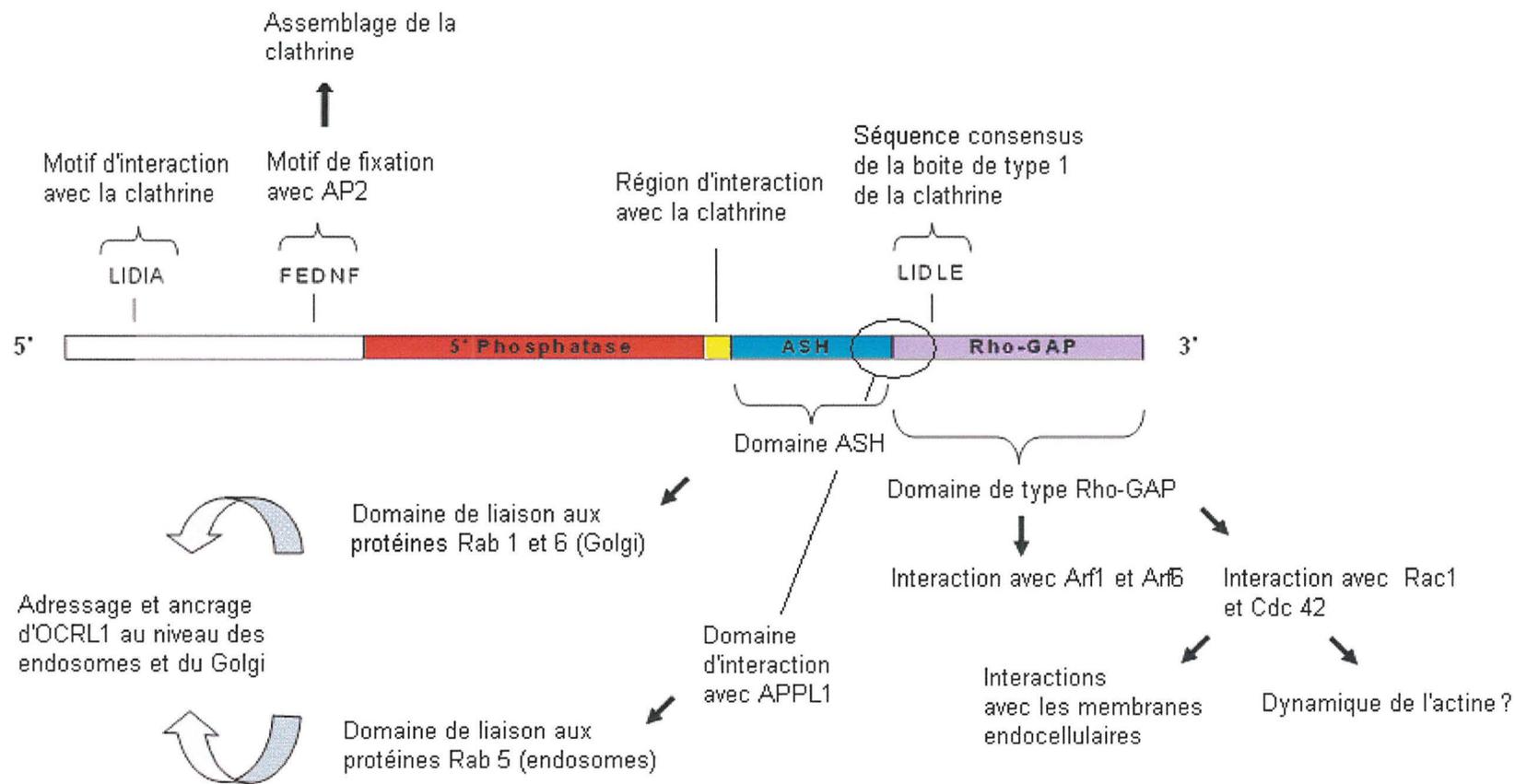


Figure 10 : Différents domaines d'OCRL1 et principales interactions protéiques.

En résumé, la protéine OCRL1, par son activité phosphatidylinositol 5-phosphatase, sa localisation et ses interactions avec de très nombreux effecteurs cellulaires, a un rôle crucial dans de très nombreux processus cellulaires comme l'endocytose clathrine-dépendante, la régulation du transport vésiculaire entre le TGN et les endosomes (figure 11) et la régulation du cytosquelette d'actine [Suchy et al. 2002 Choudhury et al. 2005 ; Lowe et al. 2005 ; Erdmann et al. 2007].

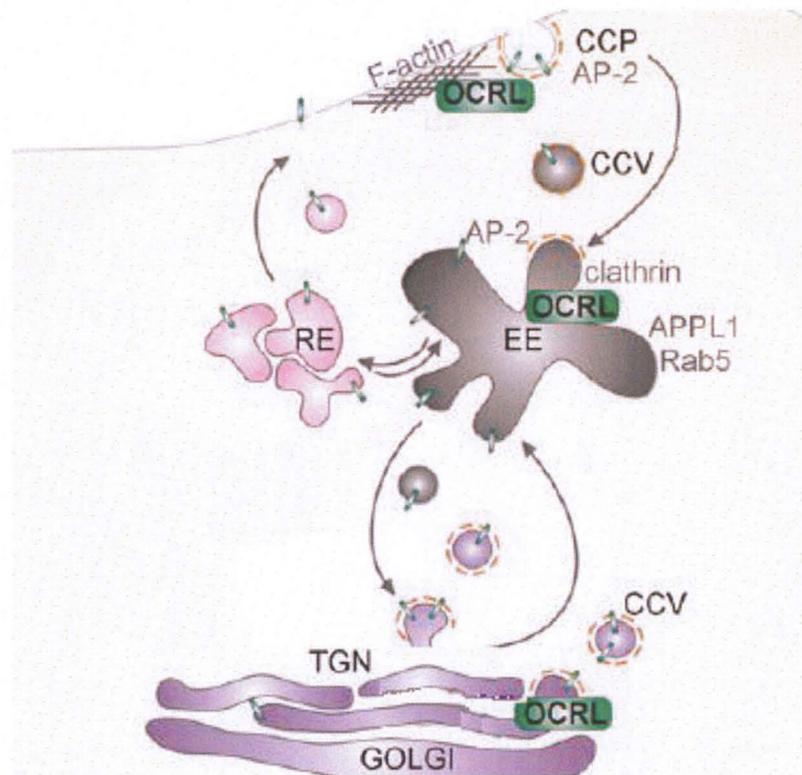


Figure 11. Localisation et implication d'OCRL1 dans le trafic vésiculaire. (RE) endosomes de recyclage; (LE) endosomes tardifs ; (CCV) vésicules recouvertes de clathrine ; (CCP) puits recouverts de clathrine ; (EE) endosomes précoces ; (TGN) trans-golgi network. [Ooms et al. 2009]

Il est alors simple de comprendre que son déficit peut désorganiser complètement les cellules et avoir ainsi des conséquences très délétères sur leur fonctionnement.

La majeure partie des patients atteints de syndrome de Lowe présente soit une absence de transcrit *OCRL1* [Attree *et al*, 1992], soit une perte ou une diminution significative de l'activité 5-phosphatase [Lin *et al*, 1997], suggérant que la perte de fonction d'OCRL1 est bien responsable du syndrome.

Cette absence de protéine fonctionnelle va engendrer de nombreuses anomalies cellulaires. Chez les patients atteints du syndrome de Lowe, il a été en effet rapporté :

- une accumulation du phosphatidylinositol 4,5-diphosphate (PI(4,5)P₂) et un déséquilibre des autres phosphoinositides [Loi 2006].
- une altération de la voie d'endocytose médiée par la clathrine [Berridge *et al*. 1989].
- un cytosquelette d'actine défectueux, acteur très important pour la formation et le fonctionnement adéquat des jonctions serrées dans les cellules épithéliales rénales mais également dans la différenciation du cristallin [Suchy 2002].
- une altération du trafic vésiculaire [Suchy *et al*. 1995].
- un relargage extracellulaire des enzymes lysosomales qui vont altérer les cellules en contact [Chabaâ *et al*. 2006]

Malgré cela, la physiopathologie de la maladie reste mal comprise. Les connaissances actuelles ne permettent pas d'expliquer complètement les conséquences du déficit enzymatique et donc le phénotype de la maladie, notamment la spécificité d'organes. L'hypothèse de compensation du déficit d'OCRL1 par une enzyme de même spécificité comme l'INPP5B dans les autres tissus (inositol polyphosphate-5-phosphatase de 75kDa) n'est pas suffisante [Satre 2007]. De plus, rien aujourd'hui n'explique les variations phénotypiques observées entre les patients atteints de syndrome de Lowe et ceux atteints de maladie de Dent 2.

3. Description et répartition des mutations d'*OCRL1* dans le syndrome de Lowe et la maladie de Dent 2.

Environ 150 mutations du gène *OCRL1* ont été décrites dans le syndrome de Lowe. La grande majorité de ces mutations est des mutations non-sens, faux sens, des délétions ou insertions de quelques nucléotides et des mutations au niveau des sites d'épissage [Leahey et al, 1993; Lin et al, 1997; Lin et al 1998 ; Kawano et al. 1998 ; Kubota et al. 1998 ; Satre et al. 1999; Monnier et al. 2000; Addis et al. 2004].

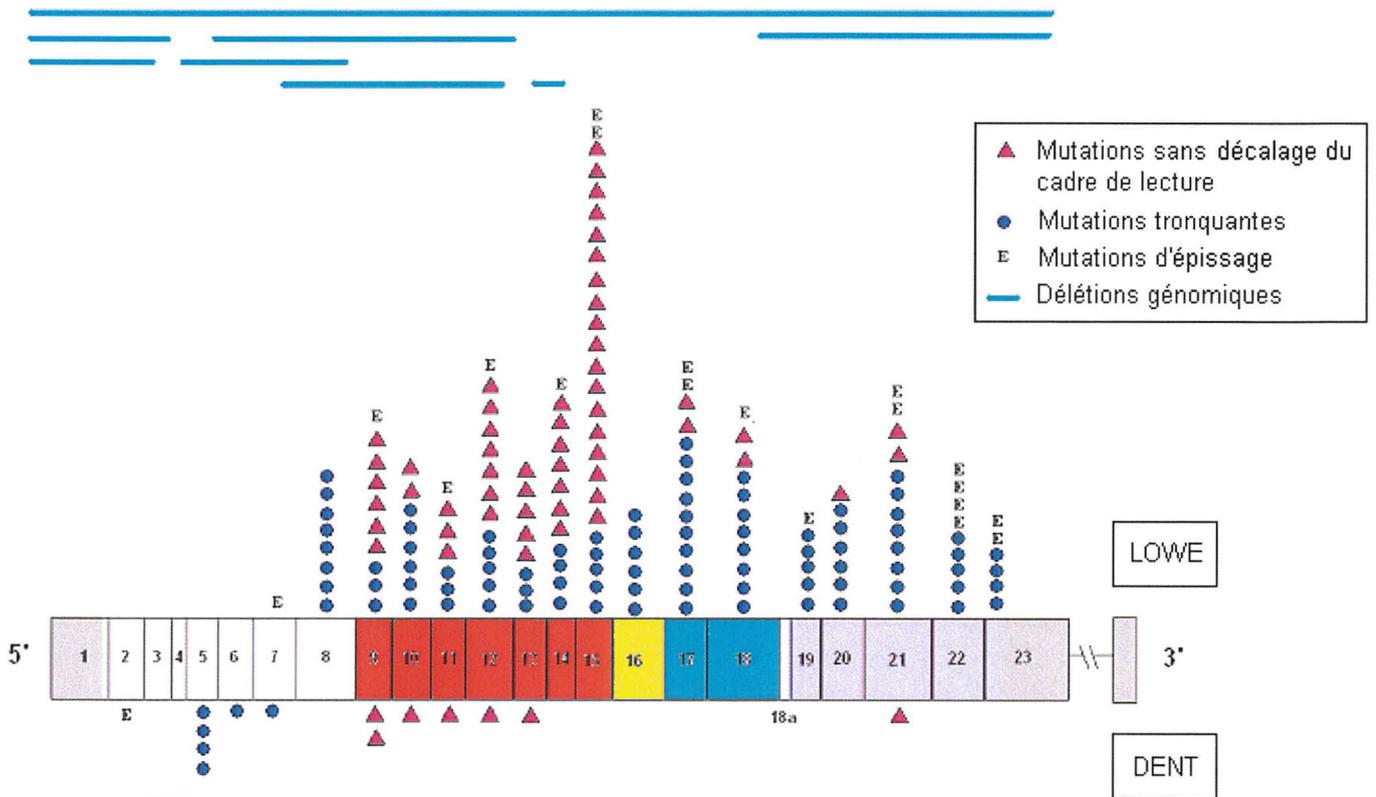


Figure 12 : Représentation des mutations décrites dans la littérature du gène *OCRL1* (cDNA) dans le syndrome de Lowe (haut) et la maladie de Dent (bas). Les mutations sans décalage du cadre de lecture correspondent aux mutations faux sens et aux délétions en phase ; les mutations tronquantes regroupent les mutations non sens, les délétions et insertions avec décalage du cadre de lecture.

Comme le montre la figure 12, les mutations faux-sens sont principalement situées au niveau du domaine catalytique de la protéine. Inversement les mutations tronquantes (non sens, ins/del) sont plutôt décrites au niveau des domaines ASH et Rho-GAP de la protéine.

Très peu de délétions génomiques ont été décrites dans la littérature [Lin et al. 1997; Monnier et al. 2000; Peverall et al. 2000; Addis et al. 2007]. Elles ne représentent que 5 % des mutations responsables du syndrome de Lowe et seulement 3 patients ont été rapportés avec une délétion complète du gène *OCRL1* [Peveral et al. 2000, Satre 2007 ; Addis et al. 2007]. Il est également intéressant de noter que ces délétions se repartissent majoritairement au niveau de l'extrémité 5' du gène [Lin et al. 1998; Monnier et al. 2000].

Etant une maladie récessive liée au chromosome X, seuls les hommes sont classiquement atteints. Néanmoins, de très rares cas chez des femmes porteuses d'une translocation X-autosomes ont été décrits [Hodgson et al. 1986 ; Mueller et al. 1991]. Plus récemment, une femme atteinte avec une délétion de 8 paires de bases au niveau de l'exon 14 a été identifiée, avec un caryotype normal associé à un biais complet d'inactivation (ou lyonisation) du chromosome X [Cau et al. 2006].

Comme pour toutes les pathologies de transmission récessive liée à l'X et incompatible avec la procréation chez les garçons, les mères des patients atteints sont conductrices dans 2/3 des cas. Ces mutations sont généralement présentes de façon homogène. Toutefois dans 4 à 5% des cas, des mutations en mosaïque, germinales et/ou somatiques, ont été observées [Monnier et al. 2000]. Ces données doivent être prises en compte lors du conseil génétique notamment chez les mères de cas sporadique retrouvées non conductrices.

Dans la maladie de Dent, les mutations du gène *OCRL1* ont été retrouvées chez seulement 10-20% de patients atteints [Hoopes et al. 2005]. Seulement 16 mutations d'*OCRL1* ont été à ce jour décrites et identifiées comme responsable de la pathologie [Hoopes et al. 2005 ; Utsch et al. 2006 ; Sekine et al. 2007]. Il semblerait que contrairement au syndrome de Lowe, la majorité des mutations d'*OCRL1* décrites dans la maladie de Dent soit plutôt située au niveau de l'extrémité 5' du gène. Une seule délétion génomique a été répertoriée [Satre 2007].

Ces données suggèrent que les délétions exoniques ne sont pas des mécanismes fréquents des mutations dans le syndrome de Lowe et la maladie de Dent (figure 13).

A ce jour, aucune duplication, ni délétion génomique en mosaïque n'a été identifiées dans les deux pathologies.

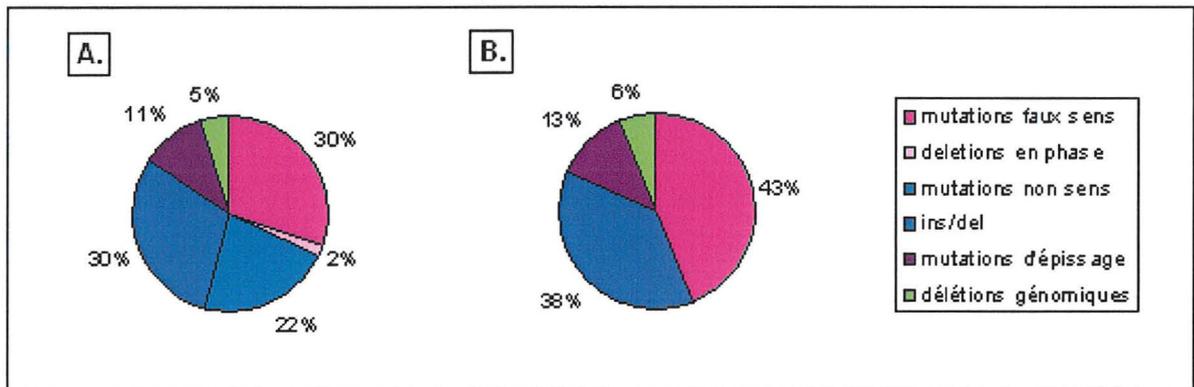


Figure 13 : Distribution des mutations d'*OCRL1* décrites dans la littérature. A. Dans le syndrome de Lowe B. Dans la maladie de Dent.

3.1. Corrélation génotype-phénotype

Il existe une grande variabilité d'expression de la maladie ce qui suggère des corrélations entre la nature du variant moléculaire et le phénotype clinique ou biologique.

Chez les patients atteints de syndrome de Lowe aucune mutation n'a été décrite en début de gène (avant l'intron 7). Par contre pour les patients atteints de maladie de Dent, des mutations ont été identifiées dans cette première partie du gène. Cependant dans la maladie de Dent, des mutations ont également été identifiées en fin de gène et au niveau du site catalytique, il est donc difficile d'établir une relation entre la position de la mutation dans le gène et les conséquences phénotypiques [Satre 2007 ; Baujat 2005]

Le type de mutations ne semble pas non plus influencer le phénotype en faveur d'une ou l'autre pathologie [Satre 2007 ; Baujat 2005].

En somme, la nature de la mutation ne permet pas de déterminer quel va être le phénotype [Satre 2007] comme cela a pu être démontré dans d'autres pathologies comme la dystrophie musculaire de Duchenne et de Becker [Monaco et al. 1988]. Une même mutation peut être responsable d'un syndrome de Lowe ou d'une maladie de Dent [Satre 2007]. Ceci complique le conseil génétique en particulier pour le diagnostic prénatal, les deux maladies ayant un retentissement médico-social très différent, elles nécessiteront alors une prise en charge de la grossesse différente et adaptée.

4. Syndrome de Lowe et maladie de Dent : stratégie diagnostique.

La première démarche du diagnostic est avant tout clinique. Les signes cliniques évocateurs (tubulopathie, cataracte congénitale, hypotonie / retard du développement psychomoteur) doivent orienter le clinicien vers l'une ou l'autre des deux pathologies. Toutefois, le phénotype peut être complexe et incomplet et nécessitera dans tous les cas une confirmation du diagnostic clinique par une analyse moléculaire du gène *OCRL1*.

4.1. Diagnostic moléculaire

Actuellement, la stratégie du diagnostic moléculaire du syndrome de Lowe repose en première intention sur la recherche des mutations par séquençage du gène d'*OCRL1* généralement effectuée à partir d'ADN extrait des leucocytes sanguins.

Chez un garçon, cette approche permet de mettre en évidence une mutation dans 95 % des cas [Monnier et al. 2000] y compris les délétions génomiques, le gène *OCRL1* n'étant présent qu'en un seul exemplaire chez un homme.

De la même façon que pour un homme, le diagnostic exceptionnel du syndrome de Lowe chez une femme [Hodgson et al. 1986 ; Cau et al. 2006] avec une clinique évocatrice se fera par séquençage du gène *OCRL1* en première intention. Mais du fait de la présence de deux chromosomes X et donc de 2 copies du gène *OCRL1*, la mise en évidence des délétions sera plus compliquée que chez un homme et nécessitera des techniques complémentaires.

A noter aussi que pour diagnostiquer de possibles mosaïques germinales et somatiques, une étude des cellules urinaires, de même origine embryonnaire que les cellules germinales, est alors intéressante [Satre 2007].

La démarche diagnostique dans le syndrome de Dent est relativement similaire si ce n'est que l'étude du gène *OCRL1* ne sera réalisée qu'en seconde intention après une analyse négative du gène *CLCN5*.

4.2. Autres approches diagnostiques

En absence d'identification de mutation sur l'ADN génomique, l'étude peut être complétée par l'analyse des transcrits et/ou le dosage de l'activité protéique d'OCRL1 ainsi que par le dosage protéique d'OCRL1 par Western Blot à partir d'extraits protéiques provenant d'une culture de fibroblastes.

La mesure de l'activité enzymatique reste la technique diagnostique de référence pour affirmer le diagnostic de syndrome de Lowe. Elle permet aussi de confirmer ou infirmer un diagnostic lorsqu'aucune mutation n'a été identifiée, et en prénatal, lorsque la recherche de mutation n'a pu être effectuée. L'activité est mesurée en analysant la quantité de phosphatidyl-inositol-4,5 diphosphate (PIP₂) transformé par minute et par mg d'extrait cytoplasmique.

D'une façon générale chez les patients atteints de syndrome de Lowe ou de maladie de Dent l'activité résiduelle d'OCRL1 est inférieure ou égale à 10 - 15 % de l'activité normale [Hoopes et al. 2005 ; Lin et al. 1997 ; Lichter-Konecki et al. 2006]. Cette activité résiduelle pourrait être le reflet d'une activité 5-phosphatase supportée par une autre protéine à activité phosphatase, comme par exemple l'INPP5B.

Contrairement au dosage de l'activité enzymatique ou à l'analyse de la protéine OCRL1 par Western blot, la quantification des transcrits ne permet ni d'affirmer ni d'éliminer un diagnostic de syndrome de Lowe [Satre 2007]. Par contre, la recherche de mutations de la

région codante peut s'effectuer dans un premier temps sur cet ARNm et permettre le diagnostic.

Mais, ces 3 types d'analyses requièrent obligatoirement de travailler à partir d'une culture de fibroblastes, pas toujours accessible. De plus, la mesure de l'activité phosphatase d'*OCRL1* reste une technique extrêmement lourde et coûteuse car elle emploie encore aujourd'hui des réactifs radioactifs limitant de ce fait son utilisation.

4.3. Diagnostic prénatal

Le diagnostic prénatal ne sera réalisé que dans un contexte familial avéré et que si le fœtus est de sexe masculin. Les moyens échographiques actuels ne permettent pas de diagnostiquer ou même de suspecter un syndrome de Lowe au stade fœtal.

La recherche de la mutation familiale sera effectuée par séquençage de l'ADN extrait à partir d'un prélèvement de villosités choriales (entre 11-13 semaines d'aménorrhées (SA)) ou à partir d'une culture de liquide amniotique (à partir de 15 SA). Le dosage de l'activité enzymatique peut être réalisé si l'analyse moléculaire est impossible.

4.4. Dépistage des femmes conductrices

Une fois le syndrome de Lowe diagnostiqué, il est impératif de proposer une étude familiale afin de détecter le statut de conductrice des femmes apparentées pour organiser un conseil génétique adéquat pour les futures grossesses.

Auparavant, le statut de conductrice de ces femmes pouvait être détecté lors d'un examen ophtalmologique à la lampe à fente par la mise en évidence d'opacités ponctiformes caractéristiques [Gardner, 1976 ; Cibis et al.1986]. La sensibilité de dépistage de l'examen est

de l'ordre de 94 % [Lin et al. 1999 ; Röschinger et al. 2000] mais présente une spécificité moindre. Ainsi, ce test a été abandonné au profit de l'analyse génétique seule [Satre 2007 ; Baujat 2005 communication personnelle].

Le dosage de l'activité enzymatique ne permet pas le dépistage des femmes conductrices. L'inactivation au hasard du chromosome X est responsable d'une grande variation de l'activité enzymatique, dépendante de la proportion de cellules dans le prélèvement qui a inactivé le chromosome X porteur du gène *OCRL1* normal [Lin et al. 1997].

Malgré la diminution de la quantité protéique observée chez les patients atteints du syndrome de Lowe et de la maladie de Dent, les mères des cas index ont une quantité protéique superposable à celle de témoins sains. Cette analyse ne se révèle donc pas pertinente pour déterminer le statut des mères conductrices [Satre 2007].

4.5. Détection des réarrangements génomiques : vers une nouvelle stratégie.

Le séquençage du gène *OCRL1* présente quelques limites notamment pour la détection dans certaines situations des petits réarrangements génomiques, telles que les duplications de même que les délétions chez les femmes et imposera l'utilisation de techniques complémentaires. La mise en évidence des ces petits réarrangements est importante à la fois sur le plan diagnostique du syndrome de Lowe et pour le dépistage du statut de conductrice des femmes apparentées à un patient porteur d'une délétion génomique.

Jusqu'alors différentes techniques étaient utilisées pour mettre en évidence ces réarrangements du gène *OCRL1* telles que le Southern blot, les études de liaison (haplotypage), l'étude du fragment jonction, la technique FISH (fluorescent in situ hybridation) ou la CGH-array (comparative genomic hybridization).

Mais ces techniques présentent chacune certains inconvénients :

- Le Southern blot est une technique longue, coûteuse, d'interprétation difficile (artefacts) et qui nécessite une importante quantité d'ADN.
- La technique FISH a une faible résolution (>20kb), détecte difficilement les micro-duplications, reste très onéreuse et peut nécessiter une étape préalable de culture cellulaire pour obtenir des chromosomes en métaphases.
- Les études de liaison requièrent obligatoirement l'ADN des parents du patient atteints voire l'ADN des grands-parents et ne s'avèrent pas systématiquement informatives.
- Les puces CGH-array utilisées en routine dans les laboratoires ne sont généralement pas assez résolutive (≈ 100 kb) pour identifier aisément de petites délétions ou duplications exoniques. Des puces hautes résolutions ou dédiées au chromosome X pourraient constituer un outil performant de détection des petits réarrangements du gène *OCRL1* mais leur coût d'utilisation reste actuellement prohibitif.

En 2002, Schouten décrit une technique de quantification, la MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) qui par son efficacité, sa simplicité et sa rapidité constitue un outil performant pour la détection des délétions et duplications, homogènes et en mosaïque. La MLPA pourrait ainsi facilement se substituer aux autres techniques de quantifications géniques utilisées dans le diagnostic du syndrome de Lowe/maladie de Dent et dans le dépistage des femmes conductrices. Malheureusement, la société commerciale MRC-Holland™ détentrice du brevet de la MLPA n'avait et n'a toujours pas développé à ce jour de trousse dédiée à l'étude du gène *OCRL1*.

Ainsi, l'objectif de l'étude (figure.14) était de mettre au point et de valider un kit « maison » MLPA afin de quantifier simplement le gène *OCRL1* dans le syndrome de Lowe et la maladie de Dent.

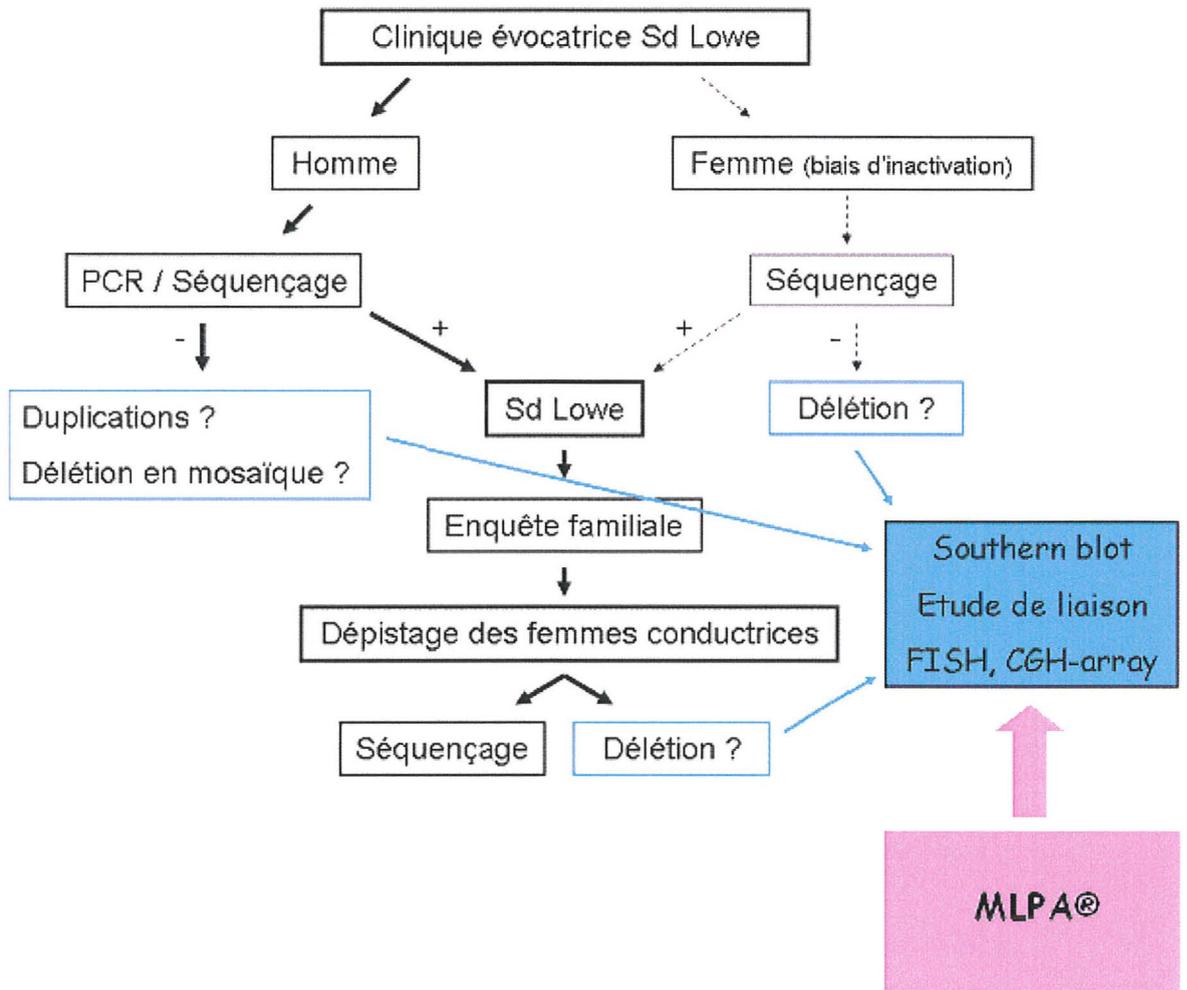


Figure 14. Stratégie diagnostique du syndrome de Lowe et objectifs de l'étude.

5. Multiplex ligation-dependent probes amplification (MLPA)

En 2000, était décrit par White, la MAPH (multiplex amplifiable probe hybridization), technique de détection de la variation et de quantification du nombre de copies de plusieurs exons simultanément. Cette technique nécessite des quantités d'ADN trop importantes (1µg) pour certaines applications et s'avère rapidement beaucoup trop lourde techniquement. En 2002, Schouten décrit pour la première fois une nouvelle méthode simple et rapide de quantification génique en multiplex, la MLPA. Elle se révèle rapidement très supérieure à la MAPH par sa plus grande facilité d'utilisation [Sellner et al. 2004]. Elle fut ensuite appliquée avec succès à l'analyse de multiples gènes pour lesquels les délétions ou les duplications sont fréquentes [Taylor et al. 2003; Rooms et al. 2004] et dans de nombreuses situations différentes [Slater et al. 2003; Hogervorst et al. 2003]. La société MRC-Holland™ commercialise depuis plusieurs kits dans de très nombreuses pathologies, et contribue à sa très large diffusion et son utilisation en routine par les laboratoires de diagnostic.

La MLPA est aujourd'hui la technique de choix pour la quantification des petits réarrangements génomiques. En effet, elle offre de nombreux avantages :

- Une grande sensibilité et une grande capacité de multiplexage (jusqu'à 45 loci).
- Une spécificité élevée car elle emploie deux oligonucléotides adjacents comme sonde.
- Une résolution supérieure à la FISH [Janssen et al. 2005].
- Une utilisation de faibles quantités d'ADN (20 ng suffisent) provenant de tissus différents (sang, liquides amniotiques, trophoblastes, tissus paraffinés).
- Une rapidité de résultats (24-48h), compatible avec une utilisation en routine.
- Un coût moindre que la FISH ou la CGH-array.

5.1. Principe général

Le principe est fondé sur une réaction de ligation de deux oligonucléotides adjacents, formant une sonde après leur hybridation à des séquences cibles spécifiques.

Chaque sonde est ainsi composée de deux oligonucléotides [Schouten 2002] (figure 15) :

- un oligonucléotide synthétique court ou LPO (left probe oligo), composé d'une séquence spécifique de la cible à son extrémité 3' ou LHS (left hybridizing sequence) et une séquence commune à l'une des deux amorces (primers) universelles de PCR en position 5'.
- un oligonucléotide long ou RPO (right probe oligo) obtenu après clonage dans un vecteur (le phage M13 par exemple), composé de trois séquences distinctes : une séquence spécifique de la cible à son extrémité 5' ou RHS (right hybridizing sequence), une séquence commune à l'une des amorces de PCR à son extrémité 3' et entre les deux précédentes une séquence non spécifique de taille variable appelée « stuffer », qui sert à différencier les amplifiats en fonction de leur taille.

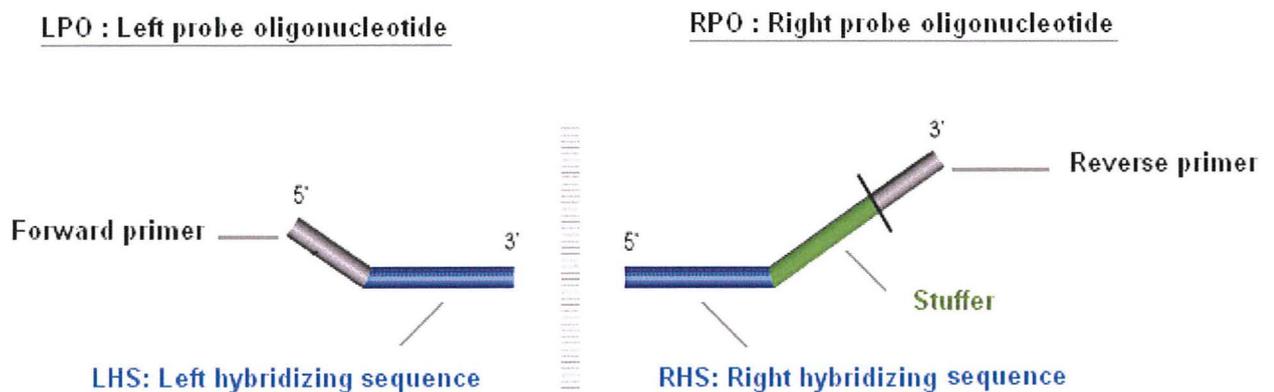


Figure 15. Schéma et nomenclature conventionnelle d'une sonde MLPA selon Schouten 2002.

Sommairement, à partir de 5µl d'une dilution d'ADN (généralement à 50 ng/µl), est réalisée une étape de dénaturation, puis le mélange réactionnel initial contenant les différentes sondes est ajouté. La réaction d'hybridation est réalisée sur une nuit à une température de 60°C. Les sondes hybridées sont ensuite incubées en présence d'une ligase thermostable, et les produits de ligation ainsi formés sont amplifiés par PCR multiplex à l'aide d'amorces universelles. L'une des deux amorces est marquée par un fluorophore, permettant par la suite la détection des amplifiats après séparation électrophorétique sur un automate de séquençage.

Les spectres obtenus ou électrophérogrammes sont représentés ci-dessous (figure. 16) :

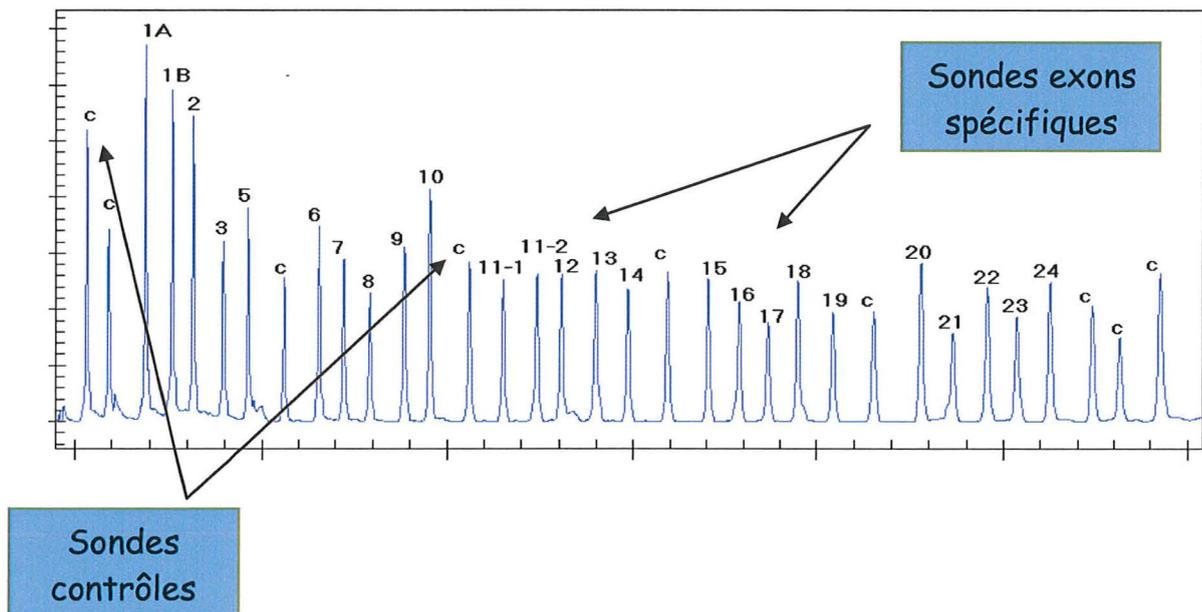
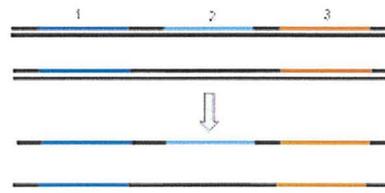


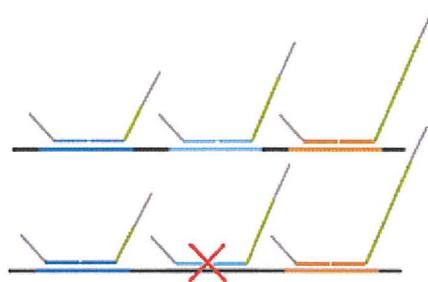
Figure 16. Exemple d'électrophérogramme de MLPA (gène *BRCA1*). Chaque pic représente une sonde exon spécifique. Les pics surmontés d'un (c) (contrôle) représentent les sondes contrôles utiles pour la normalisation.

Chaque pic correspond au signal émis par une sonde spécifique d'une région d'intérêt, par exemple un exon. Clairsemées dans le spectre, on distingue les sondes dites contrôles (c) ou de références, spécifiques de régions réputées constantes dans le génome humain et qui permettront de normaliser les signaux obtenus en fin d'analyse.

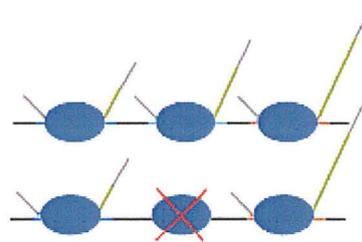
1. Dénaturation



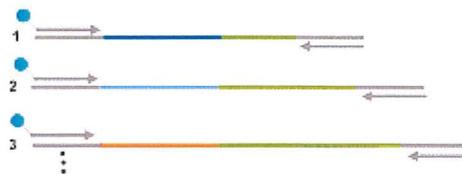
2. Hybridation



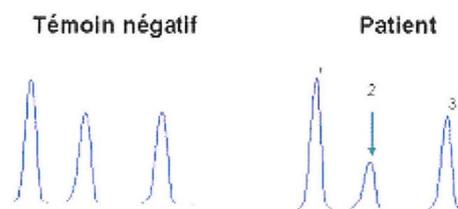
3. Ligation



4. Amplification



5. Séparation électrophorétique



6. Normalisation

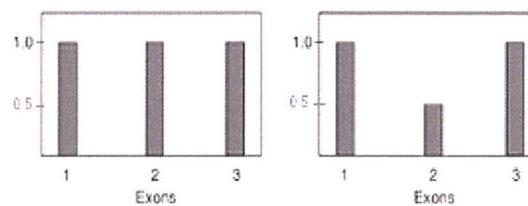


Figure 17. Principe général de la réaction de MLPA.

Les résultats sont ensuite analysés par un logiciel dédié (exemple Genemapper®, Applied Biosystems, Foster City, CA). Ces outils bioinformatiques permettent de visualiser facilement les profils obtenus, d'identifier les pics et de calculer les aires ou les hauteurs des différents pics représentés.

Ces données seront par la suite indispensables pour permettre une quantification « numérique » relative des différents signaux entre eux. Mais d'ores-et-déjà, il est possible de détecter les variations quantitatives. En effet, une différence relative de la hauteur ou surface d'un pic indique une variation du nombre de copie de la séquence cible (figure 18).

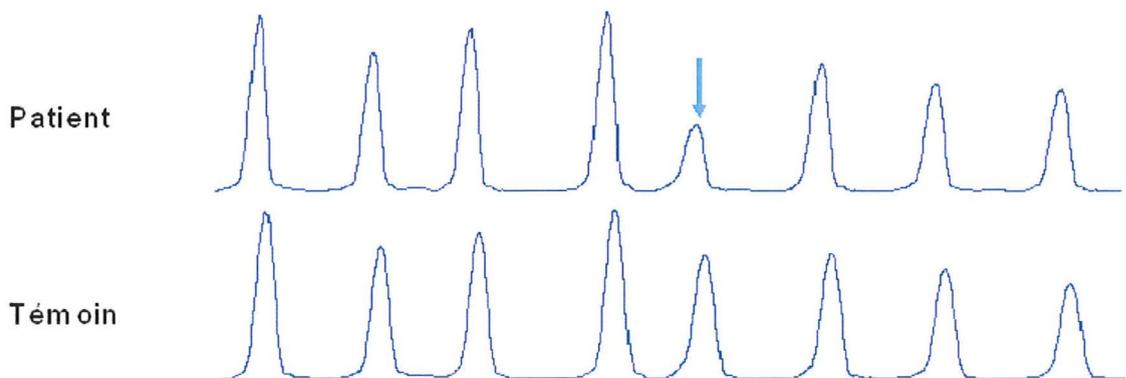


Figure 18. Profil MLPA obtenu chez un patient sain témoin et chez un patient avec une délétion (pic surmonté d'une flèche).

5.2. Contrôle de qualité

Avant de procéder à la normalisation des signaux, différentes étapes de contrôles sont indispensables à une interprétation fiable et correcte des résultats.

5.2.1. Quantité d'ADN

Tout d'abord, un contrôle de la quantité d'ADN doit être utilisé pour la réaction car l'intensité des pics est proportionnelle à la quantité de matériel génétique étudié.

Ainsi, si la quantité de matériel génétique est insuffisante, la grande majorité des pics sera confondue dans le bruit de fond rendant l'interprétation de l'analyse hasardeuse.

A l'inverse, une quantité d'ADN trop importante pourra entraîner une saturation du signal. Toutefois, cela semble moins gênant pour l'interprétation qu'une quantité trop faible d'ADN. Ainsi, de façon systématique, sont incorporées au sein des kits commercialisés par MRC-Holland, 4 sondes quantité d'ADN-dépendantes de tailles respectives de 64, 72, 76 et 82 nucléotides (nt). Le signal de ces sondes doit être à peine perceptible et confondu avec la ligne de base du spectre. En fonction de la quantité d'ADN ajoutée au mélange réactionnel, on observe une variation de l'intensité relative des signaux de ces 4 sondes comme le montre la figure 19.

La quantité d'ADN minimum recommandée est de 50 ng d'ADN mais classiquement il convient de travailler avec 200 ng d'ADN pour assurer un signal de bonne qualité.

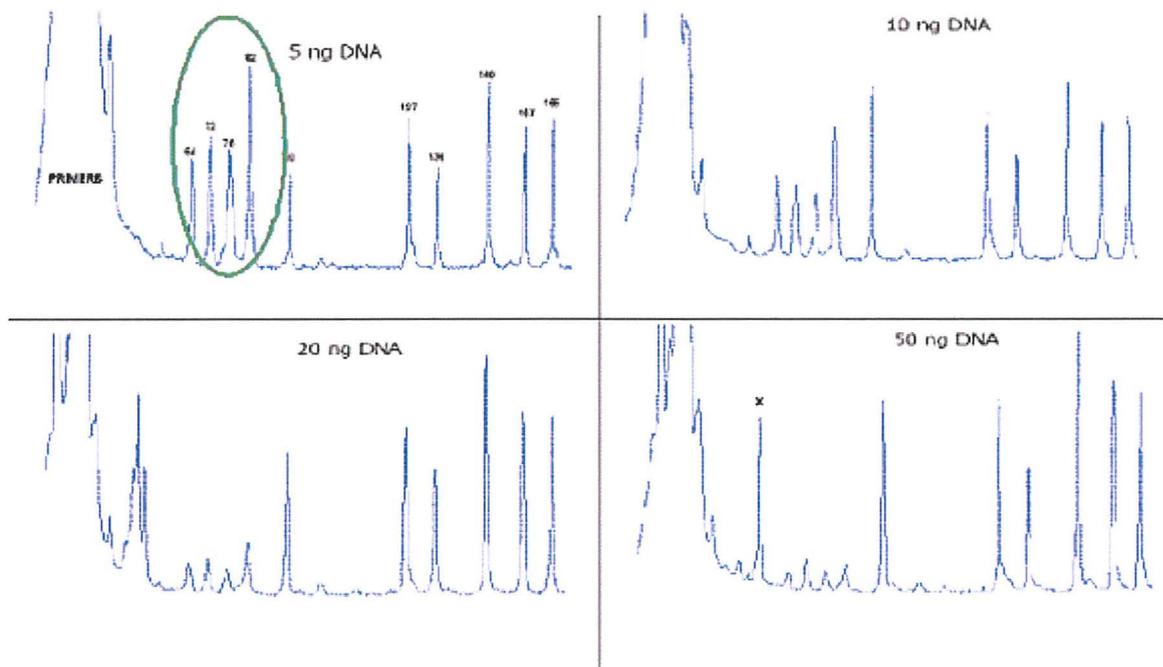


Figure 19. Intensité observée des signaux des sondes quantité ADN-dépendantes (cercle vert) en fonction de différentes quantités d'ADN (5, 10, 20,50 ng). Les sondes contrôles quantité d'ADN dépendantes sont entourées en vert.

5.2.2. Dénaturation / Ligation

Après ce premier contrôle, il est ensuite primordial de vérifier la qualité de l'étape de dénaturation et de ligation de la réaction. De la même façon que pour la quantité d'ADN, différentes sondes contrôles sont introduites dans le mélange, afin de s'assurer du bon déroulement de ces étapes clés. Trois sondes (88, 92, et 96 nt), toutes ligation-dépendantes, sont ajoutées au mélange réactionnel et permettent de contrôler l'étape de ligation et dénaturation. On considère que la ligation est suffisante lorsque la hauteur des pics de ces 3 sondes est à peu près équivalente à la hauteur des premiers pics du spectre.

De plus, 2 des ces sondes (88 et 96 nt) s'hybrident spécifiquement à des séquences très riches en GC (îlots CpG). Ainsi, un signal suffisant des ces sondes témoigne d'une bonne dénaturation de l'ADN, notamment des régions les plus riches en GC. Ce paramètre est extrêmement important à prendre en compte. En effet, pour certains gènes, les premiers exons peuvent être extrêmement riches en GC et être ainsi difficile à dénaturer correctement. Si la dénaturation s'avère insuffisante, l'hybridation des sondes spécifiques des ces régions sera relativement moindre (car moins accessible) que celle des sondes dirigées contre des régions moins riches en GC. Le risque sera alors d'interpréter à tort la baisse du signal comme celui d'une délétion (faux positif) (figure 20).

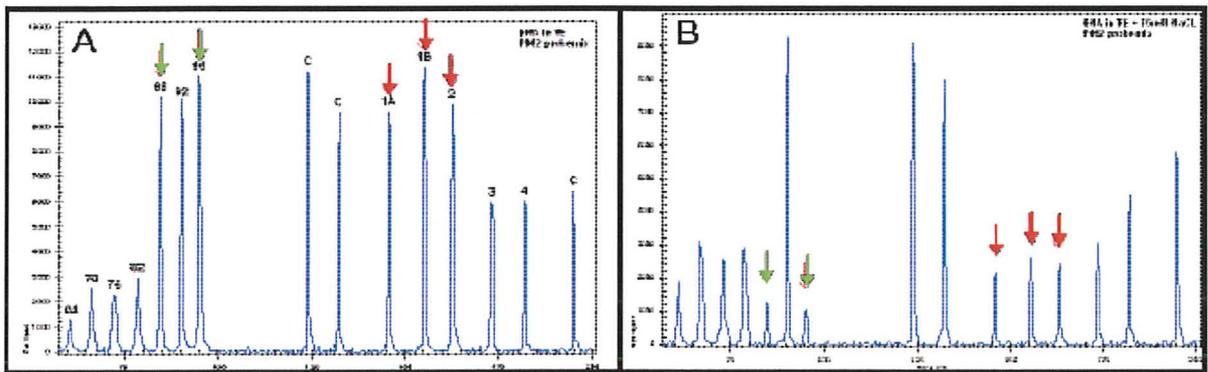


Figure 20. Influence de la dénaturation sur le signal des sondes spécifiques des régions riches en GC ou des îlots CpG. A. Dénaturation correcte. B. Dénaturation insuffisante. Les deux sondes contrôles de la dénaturation des régions riches en GC sont indiquées par les flèches vertes ; En rouge, sont indiquées les sondes spécifiques d'exons (gène *BRCA1*) très riches en GC.

5.2.3. Profil du spectre

Enfin, il sera toujours primordial d'observer l'aspect général du spectre obtenu. Cette étape est utile pour détecter le phénomène du « sloping effect » ou effondrement du signal des sondes des plus courtes aux sondes plus longues, comme le montre la figure 21 ci-dessous.

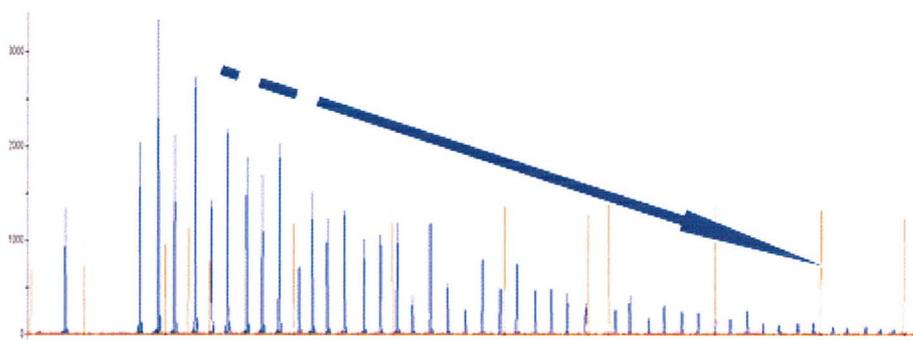


Figure 21. Représentation du sloping effect ou effondrement du signal.

Cet effet va être très gênant pour la bonne normalisation des signaux et il est impératif de le repérer afin d'éviter là encore des erreurs d'interprétation. Il peut être dû à de nombreux facteurs comme une mauvaise qualité de l'ADN, une dénaturation et/ou une hybridation insuffisantes, une efficacité de la PCR moindre pour les grands fragments, un mélange réactionnel non homogène, etc... En présence de cet effet, l'interprétation devient quasiment impossible et il sera indispensable de renouveler la réaction soit dans sa totalité ou à minima à partir de l'étape de PCR. En cas de nouvel échec, on pourra alors essayer de repurifier l'échantillon par du phénol/chloroforme ou en dernier recours demander un nouveau prélèvement.. Du fait de la fréquence du « sloping effect », on tolère un effondrement du signal pour les derniers pics inférieur à 1/3 du signal des premiers pics.

5.3. Normalisation

Afin de préciser numériquement les variations observées, on procédera à la normalisation des signaux des sondes. La normalisation consiste à comparer le signal de chaque sonde spécifique par rapport aux sondes contrôles ainsi que par rapport à un témoin sain. Au terme de la normalisation, nous obtenons un ratio qui nous permet d'apprécier le nombre « relatif » de copie de la région cible (figure 22). Théoriquement, si les deux copies attendues de la région d'intérêt sont présentes, le signal de la sonde sera égal à 1. En cas, de délétion hétérozygote, le signal devrait être de 0,5 et pour une délétion homozygote de 0. Pour une duplication (3 copies), le signal attendu est de 1,5.

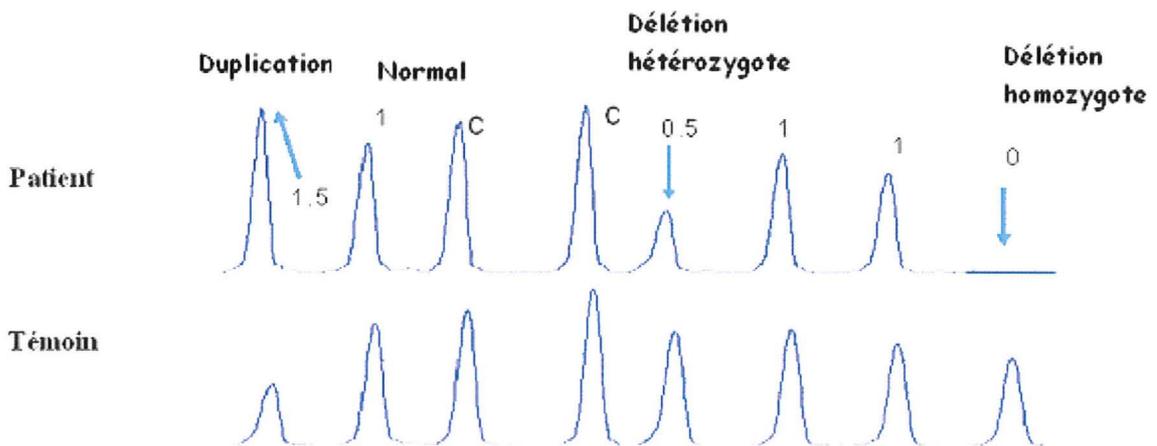


Figure 22. Exemples de variations du nombre de copie d'une région cible et leur ratio respectif.

Il y a une exception à cela pour les gènes situés sur les chromosomes sexuels chez les garçons. En cas de délétion le ratio sera égal à 0 et à 2 pour une duplication. En pratique, les valeurs observées oscillent plus ou moins autour de la valeur théorique. Ainsi, MRC-Holland considère comme ratios normaux des valeurs comprises entre 0,7 et 1,3. Ces valeurs seuils sont discutables en fonction du coefficient de variation (CV) des sondes utilisées dans le mélange et des possibles cas de mosaïcismes.

La normalisation des signaux peut être réalisée selon plusieurs méthodes plus ou moins sensibles et robustes, à sélectionner en fonction de chaque résultat (détails cf. Matériels et Méthodes, chapitre 4, p.75). A noter, que les méthodes de normalisation les plus robustes sont aussi les plus complexes et s'avèrent finalement peu utilisées.

De façon, générale, l'aire sous la courbe est préférée pour les calculs. La hauteur des pics peut être aussi utilisée mais est plus sujette aux variations liées à la résolution des pics ou aux effets du type « sloping effect ».

Dans tous les cas, il sera indispensable de comparer des échantillons provenant du même type tissulaire (échantillon de sang/échantillon de sang etc...) et dont l'ADN a été extrait par des techniques similaires afin d'éviter des variations dans la qualité de l'ADN et améliorer la justesse de la technique.

5.4. MLPA et mutations ponctuelles : détection et faux positifs.

La technique MLPA permet également de détecter des mutations ponctuelles. Cette propriété est basée sur l'absence de ligation et donc d'amplification, des sondes lorsqu'il existe un mésappariement (mismatch) en 3' du site de ligation (figure 23).

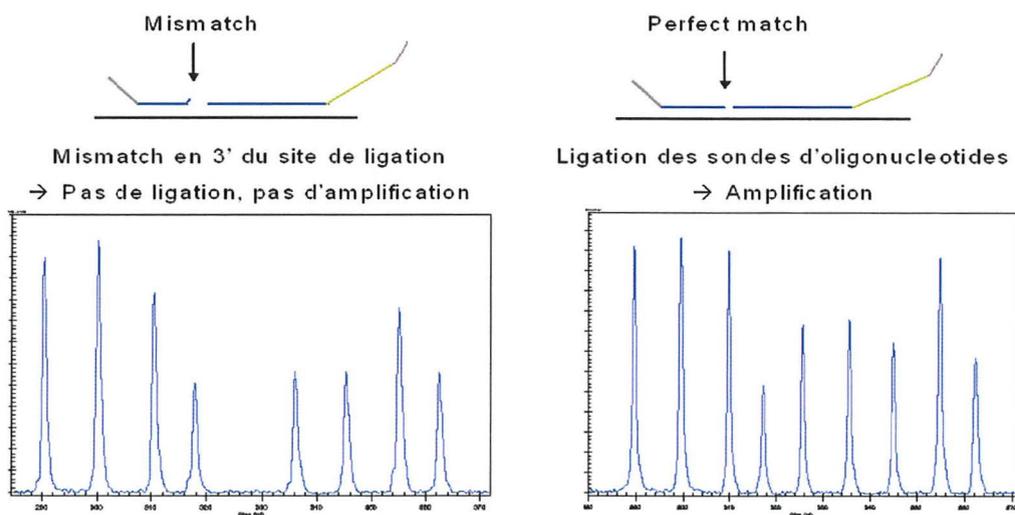


Figure 23. Principe de détection des mutations ponctuelles par MLPA.

Cette propriété est employée pour la détection de certaines mutations ponctuelles connues par exemple dans la mucoviscidose. Toutefois, cette propriété peut conduire à des faux positifs lorsqu'un polymorphisme (SNPs) se situe fortuitement en 3' du site de ligation mimant ainsi une délétion de la région cible. Cet effet « indésirable » est d'autant plus fort que le polymorphisme est proche du site de ligation. Ce phénomène a été décrit pour des SNPs à distance maximum de 11nt du site du site de ligation.

C'est l'inconvénient majeur de la MLPA [Harteveld et al. 2005]

5.5. MLPA et mosaïques

Actuellement, il est admis, de part sa grande sensibilité, que la MLPA peut détecter des mutations en mosaïque.

Une faible variation de signal de l'ordre de 20% (0,2), correspondant à une délétion hétérozygote pour 40% des cellules, peut être détectée avec une très bonne fiabilité par la MLPA [Kozlowski et al. 2007 ; Zeng et al. 2008 ; Wimmer et al. 2006]. Les sondes étant plus ou moins sujettes à des variations de l'intensité de leur signal, la détection des mosaïques sera facilitée lorsque plusieurs sondes consécutives sont affectées par la mutation et si le coefficient des sondes est inférieur à 10%.

5.6. Variantes de la MLPA

5.6.1. MLPA et sondes « entièrement synthétiques »

La synthèse des sondes dérivées du clonage dans différents vecteurs est longue et fastidieuse. Pour pallier à cet inconvénient, la méthode a été simplifiée par l'utilisation d'oligonucléotides uniquement d'origine synthétique [Stern et al. 2004; White et al. 2004; Harteveld et al. 2005; Kozlowski et al. 2007] facilitant la synthèse des sondes à façon. Les sondes exclusivement synthétiques sont relativement similaires aux sondes issues du clonage mais sont généralement plus courtes ce qui limite le nombre de sondes par mélange.

Sommairement, leurs principales caractéristiques (figure 24) et contraintes utiles à respecter pour leur modélisation sont :

- La région spécifique (RHS et LHS) des sondes comprises dans la partie codante du gène cible. Il faut éviter toute homologie avec d'autres séquences non spécifiques. Toutefois, il est toléré une homologie avec des séquences de moins de 15nt et une température de fusion (T_m) inférieure à 30°C.
- Une région cible sans polymorphismes (SNPs) pour éviter le risque de faux positifs. Si ce critère ne peut pas être respecté, il sera alors important de faire en sorte que les possibles SNPs soient très en amont du site de ligation.
- Une taille minimum recommandée de 21 nt pour la partie spécifique de chaque oligonucléotide (RHS et LHS) afin d'assurer une bonne spécificité de la séquence.
- La taille des sondes (amorces universelles comprises) est imposée par la limite des technologies de synthèse des oligonucléotides. Classiquement il est recommandé une

gamme de tailles entre 96-140 nucléotides. Les sondes plus longues auront un signal plus faible du à une qualité de synthèse médiocre et favoriseront l'apparition de phénomènes d'épaulements du pic compliquant alors l'analyse. L'utilisation de « stuffer » est recommandée pour atteindre plus aisément la taille choisie surtout lorsque les séquences cibles sont riches en GC. Toutefois, il semblerait que des « stuffer » trop grands puissent gêner stériquement l'hybridation des sondes [Stern et al., 2004]. La taille finale des deux oligonucléotides d'une même sonde ne doit différer de plus de 20 nt mais ce critère n'est pas exclusif.

- Un minimum de 4nt de différences entre les sondes d'un même mélange pour obtenir une résolution correcte lors de la séparation électrophorétique. Un maximum de 10 - 11 sondes par mix est donc possible sachant qu'il est recommandé un minimum de 5 sondes pour éviter que les amorces en excès ne s'«auto-hybrident», faute de cible.
- Environ 50 % de GC pour les séquences spécifiques de la région d'intérêt, généralement il est accepté un taux entre 35 et 75%.
- Une température de fusion (T_m) supérieure à 70°C (RHS et LHS). Il n'y a pas de limite supérieure pour la T_m des sondes. Plus celle ci est élevée, plus la sonde sera spécifique de sa région cible et de fait moins sensible aux possibles polymorphismes présents. La différence de T_m entre les 2 oligonucléotides doit être inférieure à 15°C mais n'est pas un critère exclusif.
- Une enthalpie libre des 2 oligonucléotides positive ($\Delta G > 0$ kcal/mmol) pour garantir l'absence de structure secondaire (auto-complémentarité des sondes).
- Le 1er nucléotide directement adjacent à l'amorce « sens » ne doit pas être une adénosine (A). Il a été démontré [Schouten et al. 2002] que l'intensité du signal est influencée par le nucléotide à cette position (C>G>T>A par ordre décroissant d'influence sur le signal détecté).

- Un maximum de 3 G/C pour la séquence directement adjacente aux amorces. Les sondes avec trop de G/C sur ces sites présentent souvent un signal plus faible.
- Un maximum de 2 G/C directement adjacents à l'extrémité 3' du site de ligation.

A noter enfin qu'aucun logiciel n'est aujourd'hui suffisamment puissant et satisfaisant pour automatiser cette étape.

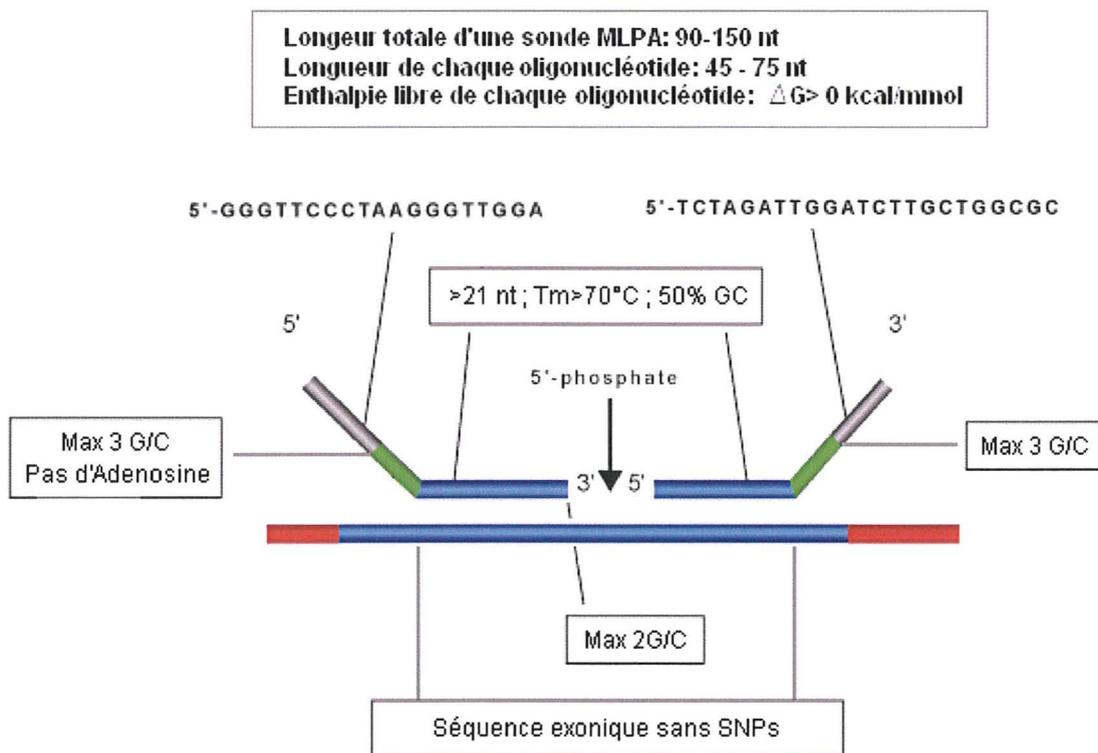


Figure 24. Représentation et caractéristiques principales des sondes MLPA « toutes synthétiques » selon Kozlowski et al. 2008.

Enfin, pour permettre d'améliorer la capacité de multiplexage de la MLPA utilisant des sondes synthétiques, il est possible d'utiliser plusieurs couples d'amorces universelles, chacun marqué par un fluorophore différent. Ainsi, il est possible de détecter, grâce au détecteur multi-canaux des appareils de séquençage, jusqu'à 4 sondes de taille similaire ou voisine sans provoquer d'interférences (figure 25).

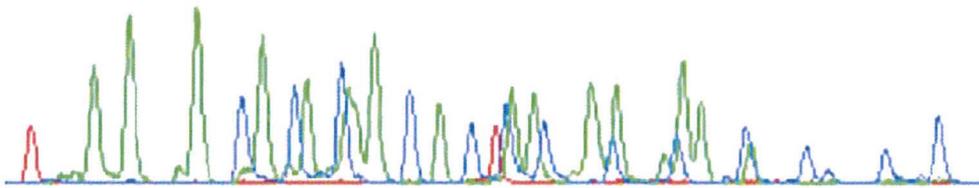


Figure 25. Electrophérogramme multi-canaux (2 couples de primers différents) selon White et al. 2004.

5.6.2. Méthylation-specific MLPA (MS-MLPA)

La MLPA spécifique de méthylation (méthylation-specific MLPA, MS-MLPA) est la principale variante de la MLPA. Son principe (figure 26) combine une réaction de ligation avec une sonde composée de deux oligonucléotides dont un possède un site de restriction pour une endonucléase spécifique, Hha1 sensible à la méthylation. La ligation est suivie d'une étape de digestion des produits de ligation par Hha1. Seules les sondes hybridées sur des régions non méthylées seront digérées par l'action de l'endonucléase. Ainsi, seules les sondes hybridées sur des régions méthylées pourront être amplifiées et donneront un signal en fin de réaction. Il sera ensuite aisé de déterminer le statut de méthylation des régions étudiées.

Cette technique est donc parfaitement appropriée pour détecter des méthylations aberrantes d'ilots CpG. Elle permet d'étudier ainsi les modifications épigénétiques impliquées dans certains cancers [Jeuken et al. 2007 ; Henken et al. 2007] mais aussi l'empreinte génomique, processus de régulation de l'expression des gènes selon leur origine parentale, impliquée entre autres dans les syndromes de Prader-Willi / Angelman [Nygren et al. 2005 ; Shao et al. 2005 ; Procter et al. 2006; Dikow et al. 2007], et de Beckwith-Wiedemann [Schuetzle et al. 2007 ; Priolo et al. 2008].

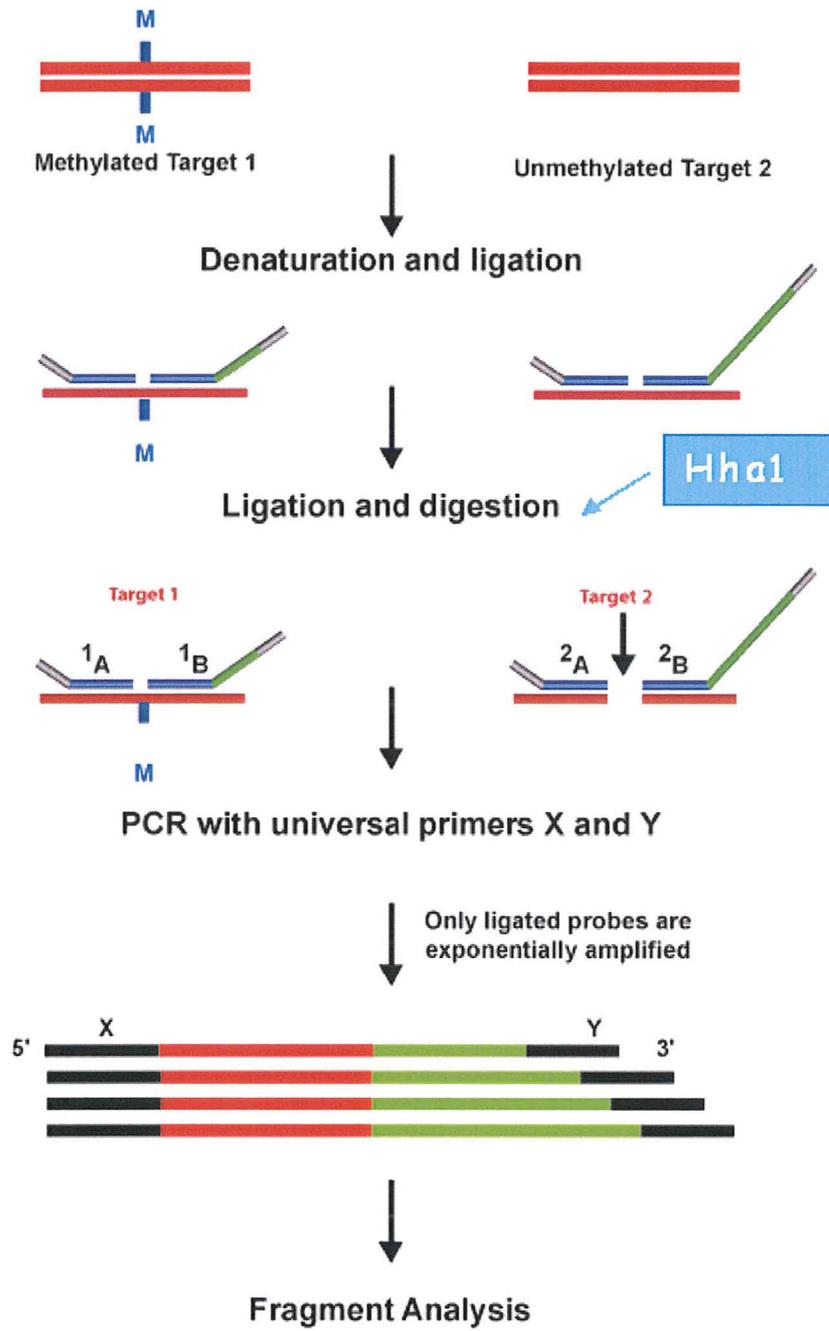


Figure 26. Principe général de la MS-MLPA.

5.6.3. Reverse transcription-MLPA (RT-MLPA)

D'autres variantes de la MLPA moins utilisées existent, comme la Reverse transcription-MLPA (RT-MLPA) qui permet de quantifier jusqu'à 45 transcrits différents [Eldering et al. 2003 ; Hess et al. 2004].

Cette technique présente un avantage certain par rapport à des techniques comme la RT-PCR ou le Northern blot mais reste toutefois très inférieure en termes de débit par rapport aux puces de transcriptomique utilisées aujourd'hui en routine dans de multiples laboratoires. Ces principaux atouts sont sa rapidité (1-2 jours), la faible quantité d'ARNm total nécessaire (150 ng) et son coût.

L'application de la MLPA à la quantification de l'ARNm implique quelques modifications (figure 27). Tout d'abord, l'introduction préalable d'une étape de transcription inverse indispensable pour l'action de la ligase, cette dernière ne pouvant agir sur des duplex ADN/ARN. Deuxièmement, pour éviter les artefacts avec l'ADN génomique, les sondes spécifiques doivent avoir leur site de ligation proche de la jonction entre deux exons. De plus, les signaux doivent être normalisés par rapport à un gène rapporteur, généralement le gène de la beta 2 -microglobuline.

Enfin, l'expression des différents ARNm étudiés pouvant être extrêmement hétérogène sur le plan quantitatif, il est utile d'ajouter des sondes inhibitrices (ou competitor) afin de standardiser et de limiter le signal des sondes spécifiques d'ARNm fortement transcrits, et éviter ainsi un écrasement du signal sur l'électrophérogramme. Classiquement cette sonde s'hybride de façon compétitive avec l'oligonucléotide court (LPO) (extrémité 5').

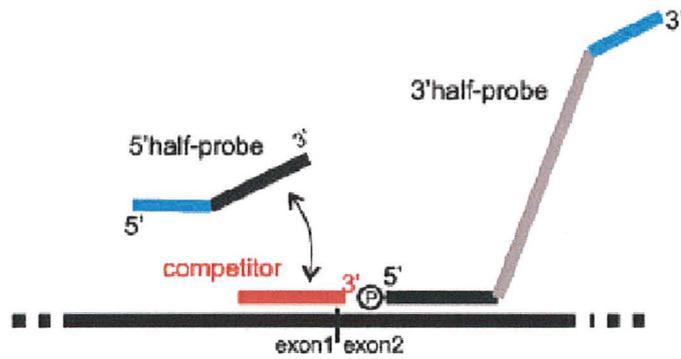


Figure 27. Sondes utilisées pour la RT-MLPA selon Kozlowski et al. 2008.

5.6.4. MLPA haut débit : Array-MLPA.

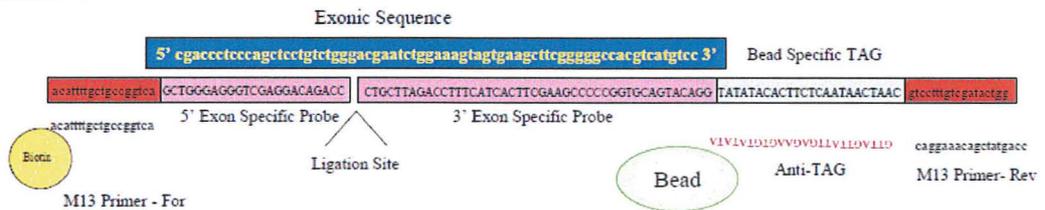
Pour pallier, au faible débit de la technique MLPA par rapport au très haut débit des biopuces type CGH-array, une variante haut-débit de la MLPA est apparue, l'Array-MLPA.

Classiquement, plus d'une centaine de sondes de taille similaire (100-120 nt) sont hybridées et amplifiées simultanément selon la procédure classique de la MLPA. Cependant, dans la MLPA-array, les « stuffers » sont en réalité des séquences « tag » qui seront reconnues ultérieurement par des séquences anti-tag greffées préalablement sur une matrice. La détection des sondes fixées se fera selon les techniques soit par détection de la fluorescence par caméra CCD, soit grâce à l'utilisation d'amorces sens biotinylés en 3' et du couple Streptavidine-Phycoérythrine.

Cette application de la MLPA permet d'augmenter considérablement le débit de la MLPA, de réduire le temps d'hybridation de 16h à moins de 2h et permet de s'affranchir de l'obligation de synthétiser de sondes de taille différentes. Bien que peu utilisée, elle semble être efficace et applicable en routine [Zheng et al. 2008].

Une des premières sociétés à avoir développé cette stratégie est la société Luminex® sous le nom de FlexMAP MLPA® (figure 28). Actuellement d'autres sociétés ont développé et commercialisé d'autres variantes de la MLPA-array notamment la société PamGene™, Den Bosch, Hollande.

Probe Design



Assay Design

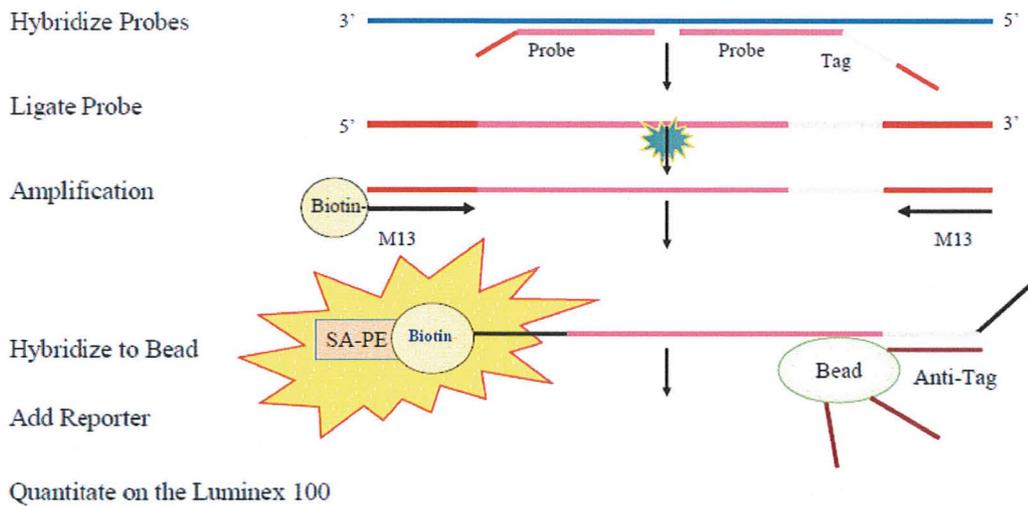


Figure 28. Principe général de la technique d'Array MLPA développée par la société Luminex FlexMAP MLPA®. SA-PE : Streptavidine-Phycoérythrine.

5.6.5. Autres applications

Enfin, D'autres utilisations plus anecdotiques de la technologie MLPA ont été récemment décrites notamment dans le génotypage des souris transgéniques [Kozlowski et al. 2007] et dans le criblage des polymorphismes (SNPs) [Schouten et al. 2002 ; Kozlowski et al. 2008].

MATERIELS ET METHODES

1. Patients

27 patients ont été recrutés pour cette étude après obtention des consentements éclairés et signés.

7 témoins positifs, atteints du syndrome de Lowe (n=6) ou de la maladie de Dent (n=1), et connus pour être porteurs d'une délétion génomique préalablement détectée par séquençage, ont été étudiés pour valider dans un premier temps notre méthode.

Ensuite, afin de déterminer leur statut de conductrice, 5 femmes avec un parent malade et porteur d'une délétion génomique, ont été analysées.

Quinze autres patients ont été inclus dans l'étude, 11 hommes et 4 femmes, présentant un tableau clinique incomplet du syndrome de Lowe pour 13 d'entre eux et typique pour les deux autres. Une précédente analyse par séquençage du gène *OCRL1* n'avait révélé chez eux aucune mutation ponctuelle.

Un panel de 10 témoins négatifs (7 hommes et 3 femmes) sains choisis au hasard a été également étudié afin d'évaluer la fiabilité et la robustesse de notre méthode.

La plupart des échantillons d'ADN (n=19) a été extrait au sein de notre laboratoire à partir de culots lymphocytaires avec une technique au chlorure de guanidine [Jeanpierre 1987]. D'autres échantillons d'ADN ont été extraits directement dans le centre médical d'origine puis envoyés au laboratoire.

2. Modélisation des sondes

Pour cette étude 24 sondes toutes synthétiques et spécifiques des 24 exons du gène d'intérêt, *OCRL1* (ENSG 00000122126), ont été modélisées (Tableau I). Afin de simplifier la modélisation et accroître la résolution et la répétabilité de notre technique, nous avons décidé de répartir ces 24 sondes en 4 mélanges (mix) différents.

La répartition des sondes dans les différents mix a été faite en fonction de la taille de chaque sonde et du risque de complémentarité entre les différentes sondes du même mélange. Après l'évaluation de plusieurs combinaisons de sondes et de l'influence sur la qualité du signal de différents paramètres (quantité de sondes initiale, séquence des sondes), seuls les mélanges de sondes donnant les signaux les plus intenses ont été retenus.

A ces 24 sondes, 15 sondes classiques (issues du clonage en phage M13) spécifiques de différents gènes dispersés dans le génome (SALSA P300 probemix; MRC-Holland™, Amsterdam, Hollande) ont été ajoutées pour servir de sondes contrôles et ainsi permettre la normalisation des signaux obtenus à l'issue de la réaction. De plus, des sondes utiles au contrôle de qualité des différentes étapes de la réaction (concentration ADN, dénaturation et ligation), ont été également ajoutées. Les informations sur les gènes ciblés par ces sondes contrôles ainsi que leurs séquences et leur site de ligation sont disponibles auprès de la société MRC-Holland™ (www.mlpa.com).

La modélisation des sondes MLPA a été faite à partir des recommandations de la société MRC-Holland™ pour les sondes entièrement synthétiques ([www.mlpa.com/synthetic protocol](http://www.mlpa.com/synthetic_protocol)) et selon un algorithme que nous avons élaboré (figure 29).

Les séquences sélectionnées spécifiques des exons sont d'au moins 22 nt avec un pourcentage de GC compris entre 38 et 75 % (Tableau II).

Toutes les sondes sont libres de polymorphismes et d'éléments répétés (SNP database (snp129) UCSC BLAT server ([http:// genome.ucsc.edu](http://genome.ucsc.edu))).

Leur température de fusion ($\geq 70^{\circ}\text{C}$) a été calculée avec le logiciel RaW-Probe v.0.15b utilisant l'algorithme Go-Oli-Go (<http://www.mrc-holland.com/>).

Aucune structure secondaire n'a été détectée ($\Delta G \text{ min} \geq -1,1 \text{ kcal/mmol}$) d'après le mFOLD server (www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold) (avec $t^{\circ} : 60^{\circ}\text{C}$, $[\text{Na}^{+}] = 0,35\text{M}$ et $[\text{Mg}^{2+}] = 0\text{M}$).

La spécificité stricte des séquences spécifiques a été vérifiée avec le programme de BLAT (University of California Santa Cruz website : [http:// genome.ucsc.edu](http://genome.ucsc.edu)).

Le maximum de G/C directement adjacent aux amorces ainsi qu'en 3' du site de ligation a été respecté pour les 48 oligonucléotides. De plus, aucun oligonucléotide ne comporte une adénosine au niveau du premier nucléotide suivant l'amorce « sens ».

Les sondes ont été modélisées pour générer des amplifiats d'une taille de 97 à 133 nt (Tableau II). Certaines sondes ont la même longueur afin de simplifier leur permutation au sein des 4 mix (en cas d'interactions inter-sondes) et ce sans modifier les paramètres d'analyse. Des « stuffers » ont été ajoutés à certains oligonucléotides de telle sorte que la taille des sondes diffère d'au moins 4 nt. Les séquences des « stuffers » ont été sélectionnées à partir de la base de données décrite par Zhi et al. 2008 ou à partir du génome du phage M13 (RefSeq NC_003287). Tous les « stuffers » utilisés ne présentent aucune inter ou auto-complémentarité.

Tous les oligonucléotides ont été commandés chez Eurofins MWG Biotech (Les Ulis, France), purifiés par HPLC et synthétisés à une échelle de 50 nmol. Les oligonucléotides RPO (right probe oligo) sont phosphorylés à leur extrémité 5' pour permettre la formation par la ligase, d'un lien phosphodiester avec le 3'OH de l'oligonucléotide LPO (left probe oligo).

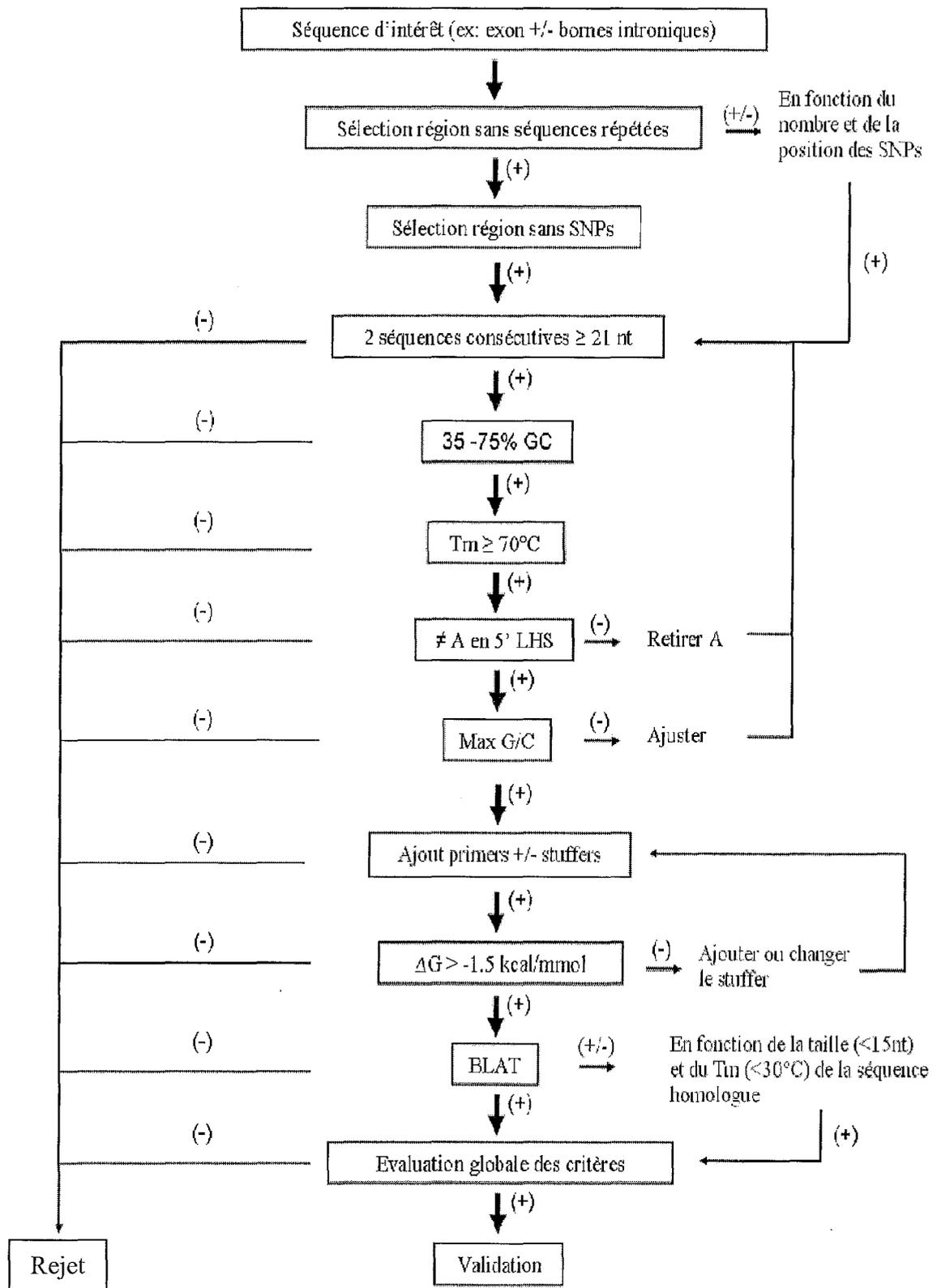


Figure 29. Algorithme de modélisation des sondes MLPA synthétiques utilisé dans notre étude. SNP : single nucléotide polymorphism ; nt : nucléotides ; Tm : température de fusion ; LHS : left hybridizing sequence ; Max G/C : nombre maximum admis de G/C directement adjacents aux amorces (3) et en 3' du site de ligation (2) ; ΔG : enthalpie libre.

Site de ligation



Exons	5'-oligonucléotide	oligonucléotide-3'
1	TCTGGACCCGTGATGG	GGAGCCCAGCCGCTTGCCGTAT
2	CATACTGTTCGAGGGTATGGAGATGAAGGGTCTCTCC	GGGAGCCCTGCGCCCTGACCCTAGCCCAGAGGAACGGGCAATATGAGTAAGTAA
3	CCAGTTGCATGAGAAGGAACAGCATGTTCAAGATATCATTCTTA	TAAATAGCCACTTCAGATGTGTTCAAGGTAAGCCCTTATCTGGTT
4	TAGGCC	GATTGACATAGCTTCTAACAGTGAGTATCTTTCTGAATGTGC
5	TGGCTGCAAAATTCGGGTTTCAGGGGACTGGATCAGAG	AGCGCCGCTTTGAAATCCCTGATGAGGAACACTGTTTG
6	CTCAGTCACAGCTTCTTGTTCAGAGCAA	AAGGACTCATCTAGCTGGTACCAGAAATTAGACACTAAGGAC
7	CACAAAATCAGCCTACTGGGATTCATCGGGA	ACCCCCACCTCCACCCTTTTCAGTGAATAAA
8	TTCTAACAAGGAGCAGCCAAAGTGACCAACACCATGCGGA	AGCTCTTTGTACCAAATACCAATCTGGGCAGCGGGAGGGT
9	TTGGAATGTGAATGGCCAGTCTCCAGATAGCGGGTTAGAAC	CTTGGCTGAACTGTGATCCCAATCCTCCTGATATCTACTGC
10	CTGTGAAGGAACAAGAATGGTCCATGGCT	GTAGAGAGAGGTTTGCATTCCAAAGCC
11	TCAACTGGTGCGCCTTGTGGGATGATGCTTCTTAT	ATTTGCCAGAAAGGATCAGTGTCGATACATTCGTG
12	GTGCGAGAATGAGTTTTGTGGTCCA	AATCAGACCCTCCCGCAGTTGAACATCATG
13	GGGTTGTCAATTTGGTTGGGAGATTTG	AATTATAGACTTTGCATGCCTGATGCCAATGAGGTG
14	TAGGCC	ATCAAGTTCATCCCCACTTATAAGTATGACTCTAAAACAGACC
15	TCGGAGTCACATGGAAGTGAACAGCGAC	CACAAGCCTGTTAGCGCCCTTCCATATTGGTTCCGGAA
16	GTGTACGCATCATGGACAGAATGAAAATGAC	TTCTTCCTTCCTTAGAACTCAGCAGGAGGGTTCCGGAA
17	TAGGCC	TCTTTCATCCCTAACTTAATGACAGCCAGTACTGCAAGCCATGG
18	TCTCGTCCTTACCTGGATCGAGGCAAAGATTACTTCTTACTAT	CAGTGGAAATTACCTCCCAAGTTGTTTTGGCACATCCTTAGAGGCT
18a	TCCTGCTCCGCTCTCAGGAAGAAGACAGCTT	CCTAGAAAAGGTAATGCAATCCATTGGTGGT
19	CGACAGAT	GACCCCTTCAGGTTCCCAAGGAGATCTGGCTTCTAGTA
20	TGTGAATGGG	TCTGGATAACCAGCATTCTGAGACAATCCTTCCGGAA
21	CTCTGTGGCTGAAGCACTGCTCATT	TTCTTGGAAGCCCTGCCAGAGCCAGTCATCT
22	CCCAGCTTCCGAGATGCCATAGAAAT	GTTTTCCGTTACTTGATGGCATTCTTCG
23	TTATGGCAAGACAGACTCCAAGTGACCGCCAGCGTGCTATT	CAGTTCCTTCTGGGCTTTCTGCTTGGGAGCGAAGAAGACTA

Tableau I. Séquences des oligonucléotides composant les sondes spécifiques des exons du gène *OCRL1*. Séquences exoniques. Séquences introniques. **Stuffer**. Pour des raisons de lisibilité les amorces ne sont pas représentés : 5'-GGGTTCCCTAAGGGTTGGA et TCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC-3'

Exons	5'-Oligonucléotides							Oligonucléotides-3'							Sondes finales
	%GC LHS	Tm(°C) LHS	Taille(nt) LHS	ΔG kcal/mmol	SNP	BLAT	Taille (nt)	% GC RHS	Tm(°C) RHS	Taille(nt) RHS	ΔG kcal/mmol	SNP	BLAT	Taille (nt)	Taille (nt)
1	75	84.3	24	-1.11	N	OK	59	68	77.9	22	0.554	N	OK	45	104
2	54	81	37	0.962	N	OK	56	59	90.9	54	-0.907	N	OK	77	133
3	41	79.2	44	-0.59	N	OK	63	40	71.1	35	0.085	N	OK	70	133
4	43	70	34	0.016	N	OK	53	38	74.8	42	0.876	N	OK	65	118
5	55	85.1	38	0.919	N	OK	57	50	82.08	38	0.583	N	OK	61	118
6	48	74.2	29	0.988	N	OK	48	43	75.3	42	0.639	N	OK	65	113
7	48	77.3	31	0.662	N	OK	50	48	76.6	31	0.992	N	OK	54	104
8	51	84.3	41	0.526	N	OK	60	54	84.1	41	-0.326	N	OK	64	124
9	49	81.4	41	0.911	N	OK	60	49	80.9	41	0.612	N	OK	64	124
10	48	75.4	29	-0.404	N	OK	48	48	71.6	27	0.028	N	OK	50	98
11	47	79.6	36	0.988	N	OK	55	43	75.8	35	0.324	N	OK	58	113
12	50	74.3	26	0.988	N	OK	45	50	76.6	30	0.984	N	OK	53	98
13	46	72.5	26	0.82	N	OK	45	42	75.6	36	0.291	N	OK	59	104
14	41	70.9	27	0.931	N	OK	52	37	73.8	43	0.868	N	OK	66	118
15	52	78.1	31	0.955	N	OK	50	53	79	32	0.907	N	OK	63	113
16	44	74.8	32	0.988	N	OK	51	52	76	31	0.854	N	OK	62	113
17	48	82.5	40	0.212	N	OK	65	44	80.4	45	0.854	N	OK	68	133
18	44	80	45	0.643	N	OK	64	46	82.3	46	0.24	N	OK	69	133
18a	55	78.4	31	0.336	N	OK	50	42	73.1	31	0.574	N	OK	54	104
19	47	80.6	36	0.601	N	OK	63	53	81.3	38	0.475	N	OK	61	124
20	48	74.4	29	0.374	N	OK	58	48	73.3	29	0.608	N	OK	60	118
21	52	72.3	25	-0.127	N	OK	44	55	79.6	31	-0.127	N	OK	54	98
22	50	73	26	0.988	N	OK	45	45	73.7	29	0.992	N	OK	52	97
23	51	82.9	41	0.798	N	OK	60	51	82.9	41	0.819	N	OK	64	124

Tableau II. Principales caractéristiques des sondes synthétiques utilisées dans l'étude par MLPA du gène *OCRL1*. LHS : Left hybridizing sequence ; RHS : Right hybridizing sequence; Tm: température de fusion ; SNP: single nucleotide polymorphism; N : non ; nt : nucléotides ; ΔG : enthalpie libre.

En rouge : les valeurs extrêmes de certains paramètres.

3. Réaction MLPA

La réaction de MLPA a été réalisée selon les conditions décrites dans la publication princeps de Schouten et al. 2002 (figure 30). Tous les réactifs, excepté les sondes, proviennent de la société MRC-Holland.

5 µl d'ADN génomique [50 ng/µl] en solution dans du TE [10mMTris-HCl (pH 8,5), 1 mM EDTA] sont d'abord dénaturés 5 min à 98°C. Après addition de 1,5 µl de tampon A [1,5M KCl, 300mM Tris-HCl pH 8,5, 1mM EDTA] et de 1,5 µl du mix contenant les 6 sondes (1-4 fmol) MLPA spécifiques (M1, M2, M3 ou M4), le mélange est incubé 1 min à 95°C suivi d'une hybridation sur la nuit.

Puis l'étape de ligation est réalisée en diluant les échantillons avec 6 µl de tampon B [2,6 mM MgCl₂, 5mM Tris-HCl pH 8,5, 0,013% de détergent non-ionique, 0.2mM NAD], 25 µl d'eau déminéralisée et 1 µl d'enzyme Ligase-65® suivie d'une incubation à 54°C pendant 15 min. Après inactivation de la ligase à 98°C pendant 5 min, 10 µl de produits de ligation sont mélangés à 30 µl de tampon C (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, 1,6 mM MgCl₂ et 0,01% de détergent non-ionique).

A ce mélange à 60°C, est ensuite ajouté 10 µl de mix de PCR (amorces 10 pmol, dNTPs 2,5 nmol, 2,5U SALSA polymerase®). La séquence de l'amorce universelle « sens » marquée en 3' avec la 6-carboxyfluorescéine (FAM) est 5'-GGGTTCCCTAAGGGTTGGA-3' et celle de l'amorce « anti-sens » non marquée 5'-GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA-3'.

Une étape d'amplification par PCR est ensuite réalisée : 30s à 95°C (dénaturation), 30s à 60°C (hybridation) et 1min 72°C pendant 35 cycles, suivie d'une étape finale d'élongation de 20 min à 72°C.

Un volume de 1 μl d'amplifiats est mélangé à 10 μl de formamide et 0,5 μl de marqueurs de taille (GeneScan 500 LIZ Size Standard, Applied Biosystems) puis chauffé 2 min à 95°C et brutalement refroidi dans la glace.

Ce mélange sera ensuite analysé par électrophorèse capillaire, réalisée sur l'automate de séquençage ABI 3130XL Genetic Analyzer (capillaire 50 cm ; polymère POP 7™) (Applied Biosystems).

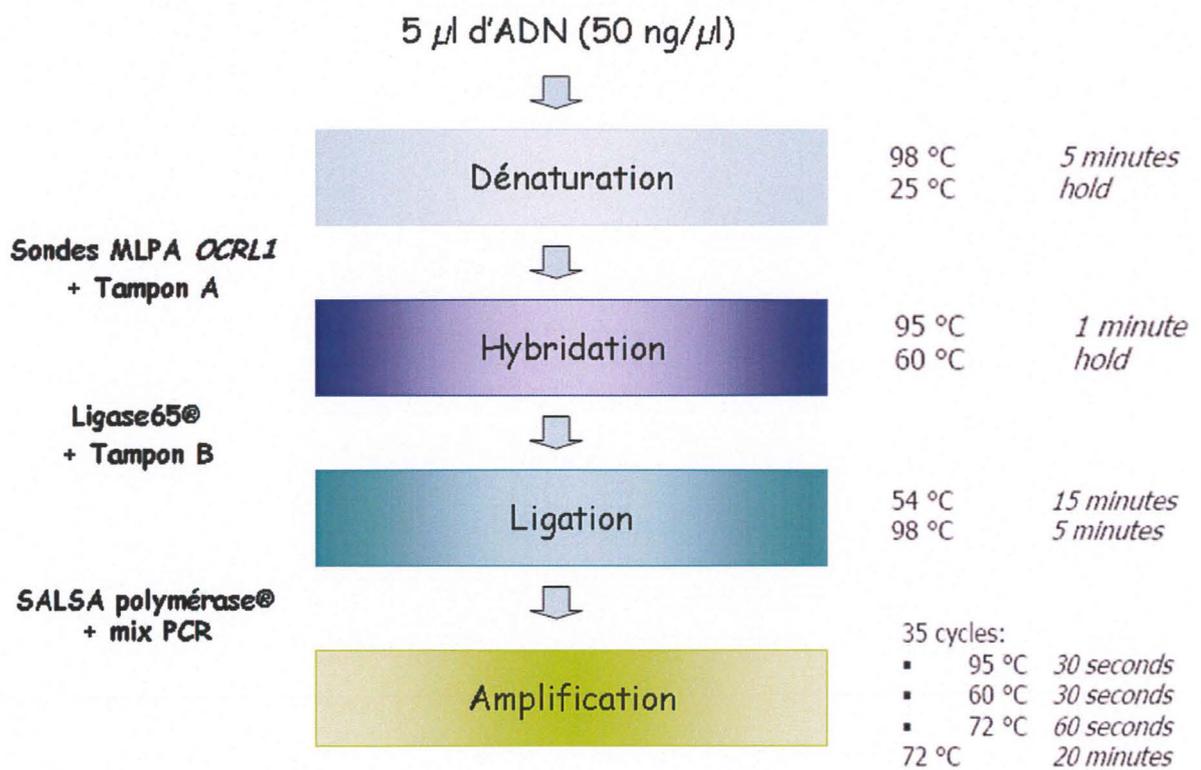


Figure 30. Schéma simplifié de la réaction de MLPA.

4. Analyse des données

Les électrophérogrammes sont édités avec le logiciel GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Deux techniques complémentaires sont ensuite utilisées pour la normalisation.

La première est la méthode la plus simple dite de normalisation globale. Le signal relatif de chaque sonde est calculé en divisant l'aire sous la courbe de son pic (AUC_{exP}) par la somme des aires sous la courbe de tous les pics de l'échantillon ($\sum AUC_{totP}$). Ce premier ratio ($AUC_{exP} / \sum AUC_{totP}$) est ensuite divisé par le ratio obtenu à partir de notre témoin ($AUC_{exT} / \sum AUC_{totT}$) soit au final $(AUC_{exP} / \sum AUC_{totP}) / (AUC_{exT} / \sum AUC_{totT})$.

La deuxième méthode ou « block normalisation » est également fréquemment utilisée car plus robuste pour détecter des délétions ou duplications multiples. On compare les surfaces des signaux obtenus (AUC_{exP}) aux surfaces des signaux combinés obtenus à partir des sondes contrôles ($\sum AUC_{cP}$). Le ratio ainsi obtenu ($AUC_{exP} / \sum AUC_{cP}$) sera ensuite divisé par son équivalent obtenu à partir de notre témoin ($AUC_{exT} / \sum AUC_{cT}$) selon la formule $(AUC_{exP} / \sum AUC_{cP}) / (AUC_{exT} / \sum AUC_{cT})$. De cette façon le dénominateur (calculé à partir de la somme des surfaces des sondes contrôles) n'est pas influencé par le nombre de délétions ou duplications observées dans l'échantillon (à l'inverse du dénominateur de la première méthode calculé à partir de toutes les sondes) et ainsi rend la méthode plus juste et plus sensible aux délétions ou duplications multiples.

La comparaison des résultats est faite de préférence avec des échantillons issus de la même expérience et extraits si possible avec la même technique.

Dans le but d'automatiser cette étape, les surfaces des pics obtenus furent exportées dans un tableur Excel (Microsoft, <http://www.microsoft.com>) et normalisées à l'aide d'une macro Excel mise au point dans le laboratoire.

5. Détection des mosaïques

Afin d'évaluer la capacité de notre méthode à détecter et quantifier d'éventuelles mosaïques (délétions ou duplications), jusqu'alors jamais décrites, nous avons du utiliser des échantillons artificiels.

Pour mimer une délétion en mosaïque, une solution d'ADN génomique [50ng/ μ l] d'un sujet sain a été diluée (volume à volume) dans différentes proportions avec une deuxième solution d'ADN [50ng/ μ l] provenant d'un patient avec une délétion complète du gène *OCRL1* (011s14) (figure 31). De cette façon, nous avons obtenu des dilutions représentant des mosaïcismes de 20, 40, 60 et 80%.

La même stratégie a été employée pour mimer des duplications en mosaïque excepté que l'ADN utilisé pour la dilution provenait d'une femme saine [50ng/ μ l]. Les dilutions ainsi obtenues représentaient des duplications à 20, 40, 60 et 80%.

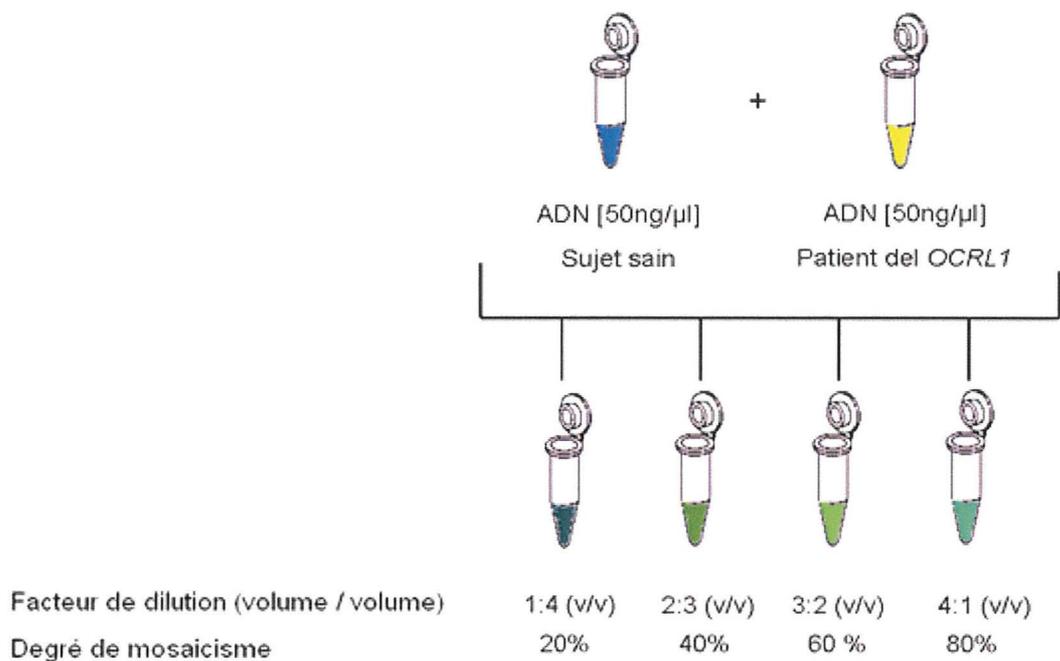


Figure 31. Stratégie de préparation d'échantillons mimant des délétions en mosaïque à différents degrés de mosaïcisme.

Le signal relatif normalisé moyen des sondes calculé pour les deux échantillons représentant un mosaïcisme à 20% (délétion et duplication) a été comparé au signal moyen obtenu chez un individu sain utilisant le test de rang non paramétrique de Wilcoxon (StatView software, Abacus Concepts, Berkeley, Calif, USA) $p < 0.001$ étant retenu comme significatif.

RESULTATS

1. Mise au point de la technique

Avant de commencer l'évaluation de la qualité des sondes, il a fallu déterminer la composition optimale des 4 mélanges (mix) afin d'obtenir des signaux suffisamment résolus et intenses pour être correctement interprétés.

Pour la grande majorité des sondes, le signal obtenu était très satisfaisant. Toutefois, les sondes spécifiques des exons 22 et 19 présentaient un signal plus faible que les autres. Afin d'améliorer la qualité du signal, nous avons fait évoluer 3 paramètres réputés pour influencer l'intensité du signal : la combinaison des sondes d'un même mix, la quantité de sonde ajoutée au mix et enfin la séquence des sondes.

Tout d'abord, nous avons évalué l'influence de la combinaison de sondes au sein d'un même mélange et observé l'effet produit sur le signal des sondes spécifiques des exons 19 et 22. Comme le montre la figure 32, la combinaison ne semble pas jouer un rôle sur l'intensité du signal des sondes.

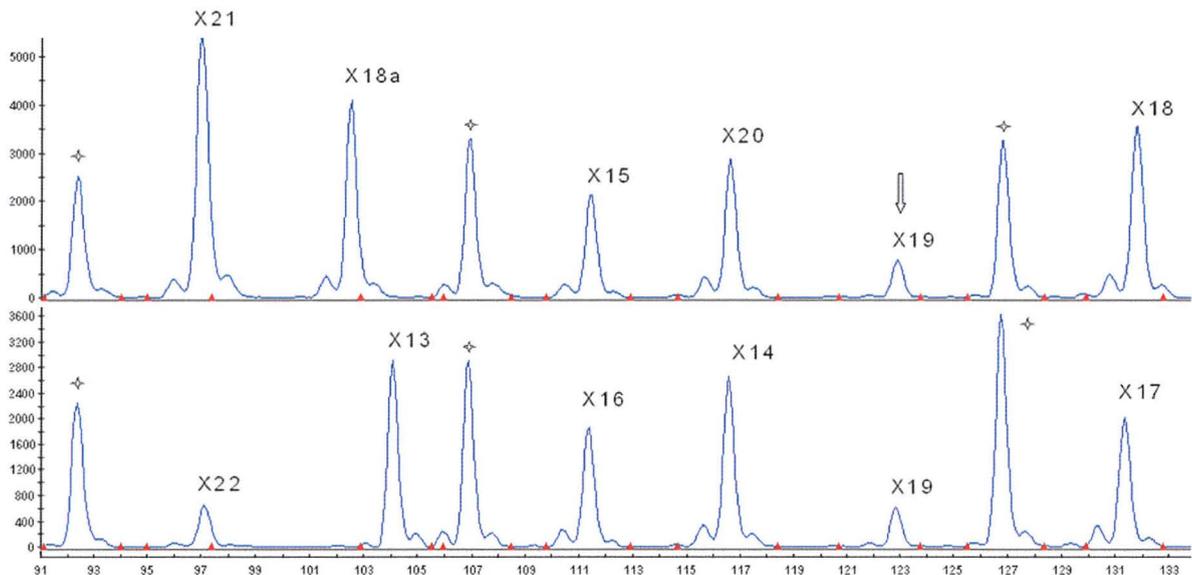


Figure 32. Influence de la combinaison des sondes sur l'intensité du signal de la sonde spécifique de l'exon 19 (flèche bleue). Chaque pic représente un exon (X) du gène *OCRL1*. Les pics surmontés d'une * correspondent aux sondes contrôles.

Puis, nous avons testé l'influence de la quantité initiale de sonde ajoutée dans le mélange et constaté que malgré l'ajout de plus de 3 fois la quantité recommandée (soit environ 12 fmol), l'intensité des signaux reste identique au mélange initial (figure 33).

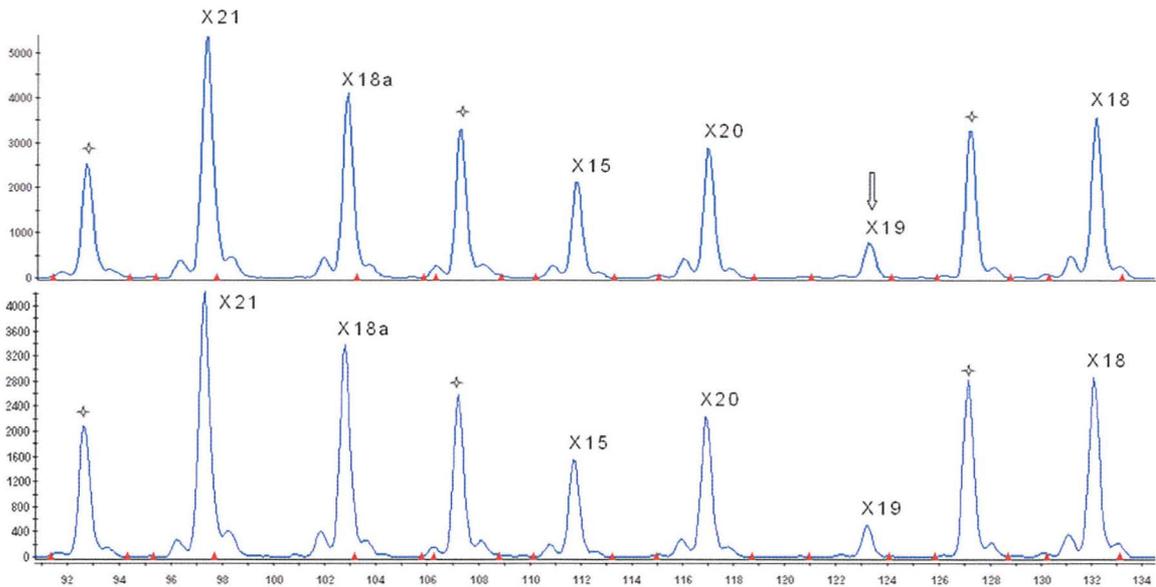


Figure 33. Influence de la quantité de sondes spécifiques de l'exon 19 (flèche bleue) sur l'intensité de son signal. Chaque pic représente un exon (X) du gène *OCRL1*. Les pics sur montés d'une * correspondent aux sondes contrôles. Le spectre du haut représente le mix initial ; le spectre du bas représente le mix avec une quantité de sonde de l'exon 19 trois fois supérieure au mix initial.

Enfin, nous avons modifié une partie de la séquence des sondes 19 et 22 sur la base des observations faites de l'influence du premier nucléotide directement adjacent à l'amorce de l'oligonucléotide LPO (left probe oligonucleotide) sur l'intensité du signal (cf. Introduction paragraphe 5.6.1 « MLPA et sondes synthétiques » p58). La séquence initiale de la sonde de l'exon 22 a été ajustée et un « stuffer » a été rajouté à la sonde de l'exon 19, de façon à obtenir un nucléotide cytosine directement adjacent au primer de l'extrémité 5'. Les sondes 19 et 22 avaient initialement une thymine à cet emplacement et comme observé sur la figure 34, le signal est franchement augmenté pour l'exon 22 et plus modestement pour l'exon 19.

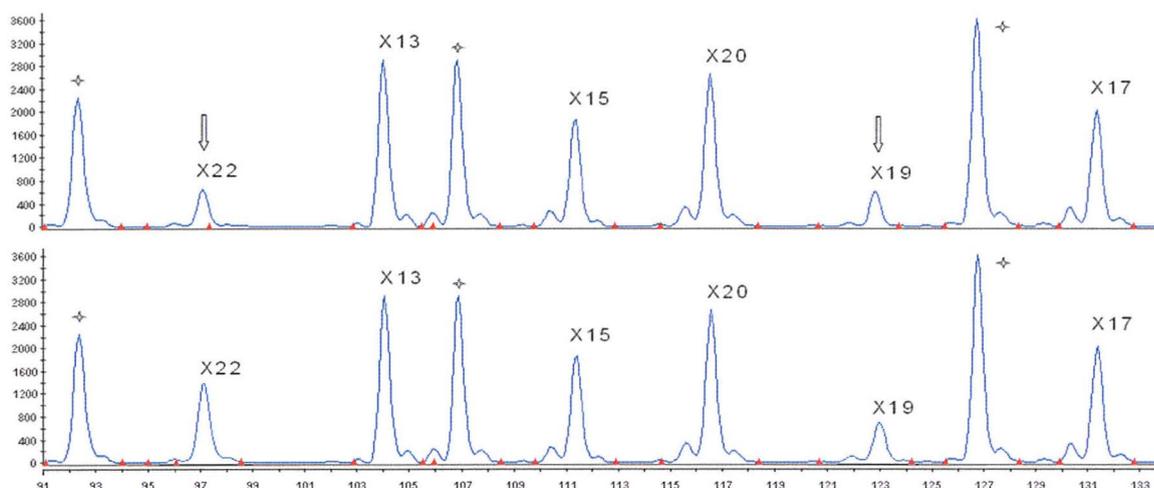


Figure 34. Influence du premier nucléotide adjacent à l'amorce de l'oligonucléotide LPO (left probe oligonucleotide) des sondes spécifiques de l'exon 19 et 22 (flèches bleues).

Au final, après cette étape d'optimisation du signal, 4 mélanges ou mix de sondes ont été composés : le premier mix ou M1 regroupe les sonde spécifiques des exons 2,5,6,7,8,10, le second (M2): les exons 1,3,4,9,11,12, le troisième (M3): les exons 22,13,15,20,19,17, et le quatrième (M4): les exons 21,18a,16,14,23,18. Les pics obtenus (figure.35) peuvent être facilement distingués et attribués à un exon donné sur la base de leur différence de taille.

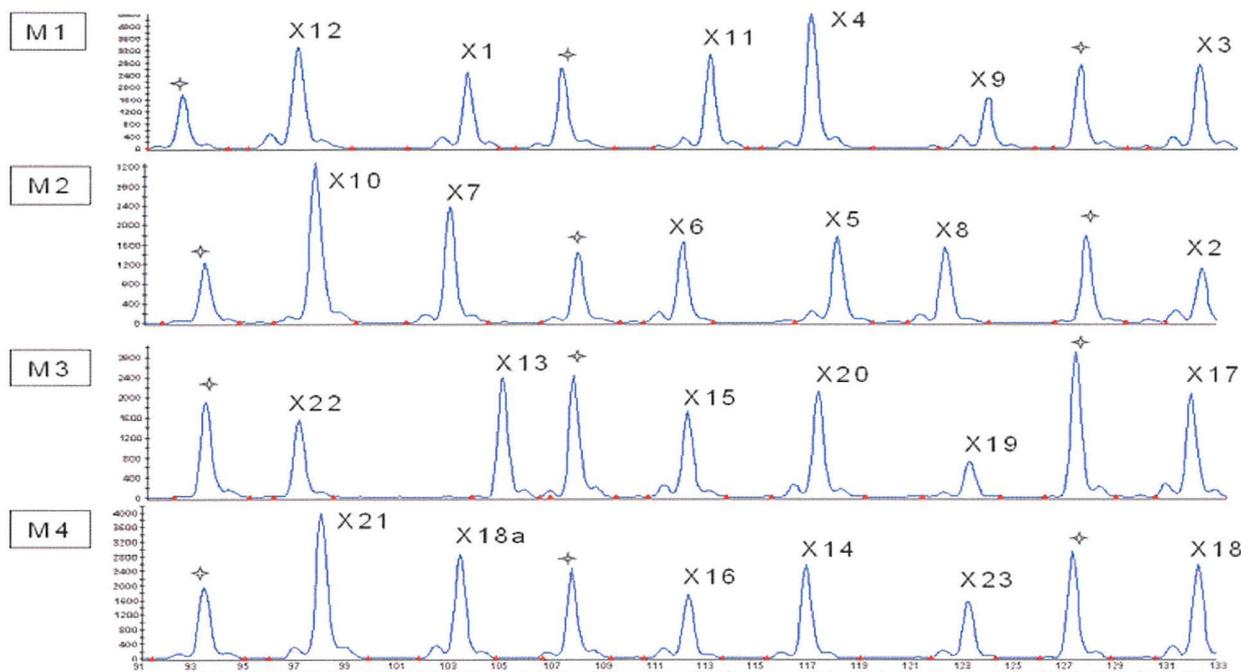


Figure 35. Profil MLPA des 4 mix de sondes spécifiques des exons du gène *OCRL1* à partir d'échantillons contrôles (sain). Chaque pic représente un exon (X) du gène *OCRL1*. Les pics surmontés d'une * correspondent aux sondes contrôles utilisées pour la normalisation des signaux. M1, M2, M3, M4 indiquent le numéro du mix. En abscisse, est représentée la longueur des sondes (de 97 à 133 nt) et en ordonnée l'intensité des signaux (unité arbitraire).

2. Validation des sondes MLPA *OCRL1* spécifiques

Tous les mélanges de sondes ont été testés sur 10 échantillons contrôles sains (témoins négatifs) pour évaluer leur précision, leur robustesse et leur fiabilité. Des 24 sondes exoniques utilisées, aucune ne présente un écart type supérieur à 0,06 soit un coefficient de variation de son signal maximum de l'ordre de 6% (moyenne des signaux proche de 1). Le coefficient de variation maximum (6%) est observé pour la sonde spécifique de l'exon 19 (Tableau III). Ceci s'explique en partie par la moindre intensité de son signal et donc un plus fort retentissement des variations « techniques » sur le calcul de sa surface. Toutes les sondes peuvent être ainsi retenues pour l'analyse, aucune ne présentant une trop forte variabilité de son signal. A noter que les variations les plus faibles ont été observées pour les échantillons extraits par des méthodes similaires.

Sondes	Valeurs extrêmes (min-max)	Ecart type	Sondes	Valeurs extrêmes (min-max)	Ecart type
1	0.93-1.09	0.04	13	0.9-1.08	0.04
2	0.94-1.10	0.04	14	0.97-1.05	0.02
3	0.93-1.09	0.04	15	0.92-1.08	0.04
4	0.93-1.09	0.03	16	0.92-1.10	0.05
5	0.92-1.04	0.03	17	0.94-1.07	0.04
6	0.93-1.09	0.04	18	0.95-1.07	0.03
7	0.93-1.10	0.05	18a	0.96-1.11	0.05
8	0.95-1.11	0.05	19	0.90-1.12	0.06
9	0.95-1.10	0.04	20	0.95-1.03	0.02
10	0.95-1.08	0.03	21	0.95-1.10	0.04
11	0.94-1.04	0.03	22	0.93-1.09	0.05
12	0.94-1.06	0.04	23	0.96-1.08	0.04

Tableau III. Valeurs extrêmes des ratios normalisés obtenues pour chaque sonde et leurs écart-types calculés à partir de 10 échantillons contrôles (sains). En rouge, l'écart type maximum observé.

L'ADN de 7 patients atteints du syndrome de Lowe (n=6) ou de la maladie de Dent (n=1) et chez lesquels une délétion avait été identifiée ont été étudiées pour évaluer la spécificité de la méthode. Les sondes spécifiques des exons inclus dans la délétion n'ont présenté aucun signal confirmant les données précédentes (figure. 36).

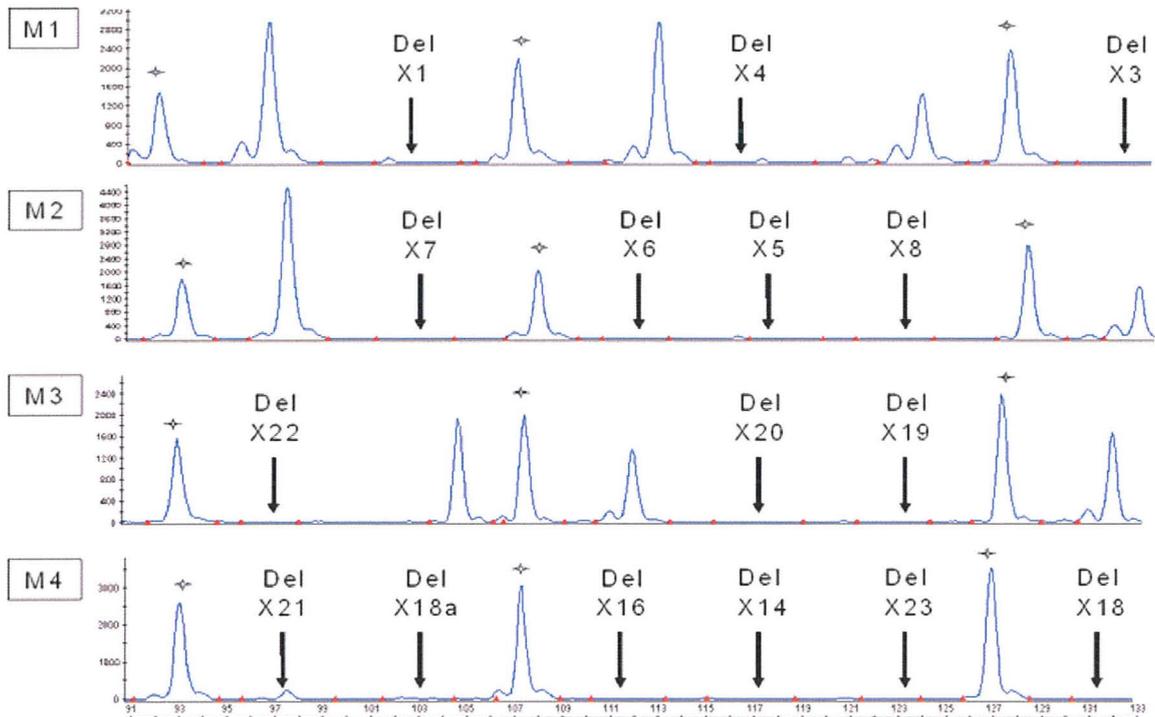


Figure 36. Exemples d'électrophérogrammes pathologiques obtenus par MLPA.

Les flèches indiquent une absence de signal représentant une délétion. Chaque mix contient des sondes contrôles utiles à la normalisation des signaux. (surmontés d'une *). M1, M2, M3, M4 correspondent au mix utilisé. (M1) Délétion des exons 1,3 et 4 chez un patient avec une délétion 1-4. (M2) Délétion des exons 5 à 8 chez un patient avec une délétion 5-8. (M3) Délétion des exons 19,20 et 22 chez un patient avec une délétion 18a-23. (M4) Délétion des exons 14, 16, 18,18a, 21 et 23 chez un patient avec une délétion complète du gène *OCRL1*.

Toutes les délétions ont été détectées sans équivoque et leurs bornes ont été confirmées (Tableau IV). Les sondes MLPA modélisées sont donc parfaitement spécifiques des exons cibles du gène *OCRL1*.

Patient	Sexe	Signes cliniques			Résultats PCR/Séquençage	Résultats MLPA	Phénotype
		Oculaire	Rénal	Retard Mental			
98ls18	homme	+	+	+	Del 1-4	Del 1-4	LOWE
99ls56	homme	+	+	+	Del 8-12	Del 8-12	LOWE
99ls67	homme	+	+	+	Del 5-8	Del 5-8	LOWE
00ls05	homme	+	+	+	Del 18a-23	Del 18a-23	LOWE
00ls41	homme	+	+	+	Del 6-12	Del 6-12	LOWE
01ls14	homme	+	+	+	Del 1-23	Del 1-23	LOWE
06den06	homme	-	+	-	Del 3-4	Del 3-4	DENT

Tableau IV. Résultats d'analyse MLPA de 7 patients avec une délétion génomique connue du gène *OCRL1*, identifiées au préalable après séquençage du gène.

3. Dépistage des conductrices

Nous avons ensuite analysé 5 femmes ayant un apparenté atteint et porteur d'une délétion génomique du gène *OCRL1* afin d'étudier leur statut de conductrice. Comme présenté dans le tableau V, seules 2 des 5 femmes étudiées sont conductrices pour la mutation identifiée chez le cas index.

Patient	Sexe	Degré de parenté	Délétion cas index	Résultats séquençage	Résultats MLPA	Statut
98ls17	femme	mère 98ls18	del 1-4	(-/-)	(-/-)	Non conductrice
04ls02	femme	sœur 98ls18	del 1-4	(-/-)	(-/-)	Non conductrice
99ls84	femme	tante 99ls56	del 8-12	(-/-)	del 8-12 (+/-)	Conductrice
00ls06	femme	mère 00ls05	del 18a-23	(-/-)	(-/-)	Non conductrice
01ls15	femme	mère 01ls14	del 1-23	(-/-)	del 1-23 (+/-)	Conductrice

Tableau V. Résultats du dépistage des conductrices par MLPA chez 5 femmes avec un apparenté atteint et porteur d'une délétion génomique d'*OCRL1*.

Les femmes conductrices, hétérozygotes pour la délétion, présentent un signal normalisé caractéristique de l'ordre de 0,5 pour les sondes correspondant aux exons compris dans la délétion (figure. 37).

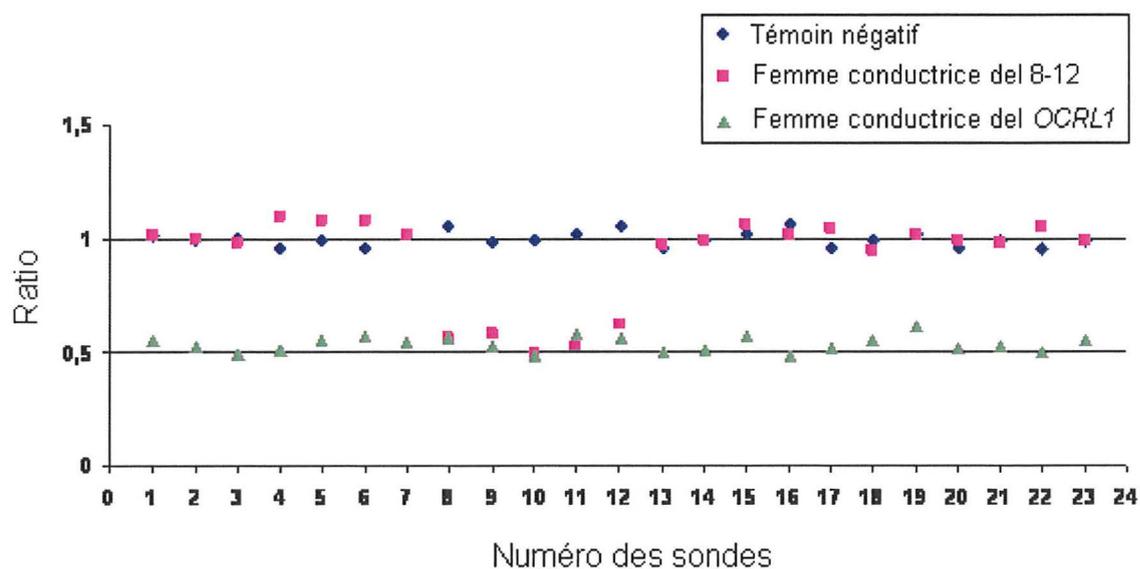


Figure 37. Diagramme représentant les ratios normalisés (ordonnée) des 24 sondes spécifiques des exons d'*OCRL1* (abscisse) chez une femme contrôlée (bleu) et chez une femme conductrice (99ls84) de la délétion des exons 8-12 (rose) et une femme conductrice (01ls15) d'une délétion complète du gène *OCRL1* (vert).

4. Etude rétrospective de 15 patients par MLPA

L'étude par MLPA des 15 patients (11 hommes et 4 femmes) avec un tableau clinique évocateur du syndrome de Lowe mais incomplet pour la plupart des patients (13/15) n'a révélé aucune délétion ni duplication, homogène ou en mosaïque. De même, aucune mutation n'a été trouvée chez les deux patients présentant un tableau typique (98ls57 et 08ls29). Auparavant, l'analyse par séquençage du gène *OCRL1* s'était avérée aussi non contributive pour l'ensemble des ces patients.

Ces résultats écartent encore un peu plus l'implication d'*OCRL1* chez ces patients. Tous ces résultats sont résumés dans le tableau VI.

Patient	Sexe	Signes cliniques			Résultats séquençage	Résultats MLPA	Diagnostic
		Oculaire	Rénal	Retard mental			
98ls57	homme	+	+	+	(-)	(-)	?
98ls67	homme	+	-	+	(-)	(-)	?
02ls05	homme	+	-	+	(-)	(-)	?
02ls45	homme	+	-	+	(-)	(-)	?
05ls01	homme	+	+	-	(-)	(-)	?
05ls05	homme	+	-	-	(-)	(-)	?
05ls23	homme	+	-	+	(-)	(-)	?
06ls10	homme	+	-	+	(-)	(-)	?
06ls31	homme	+	-	-	(-)	(-)	?
07ls08	femme	+	-	-	(-/-)	(-/-)	?
07ls15	homme	+	-	+	(-)	(-)	?
07ls16	homme	+	-	+	(-)	(-)	?
08ls28	femme	+	+	-	(-/-)	(-/-)	?
08ls04	femme	+	-	-	(-/-)	(-/-)	?
08ls29	femme	+	+	+	(-/-)	(-/-)	?

Tableau VI. Résultats de l'étude par MLPA de 11 hommes et 4 femmes avec un tableau clinique évocateur du syndrome de Lowe mais incomplet pour la plupart (13/15). L'analyse préalable par séquençage du gène *OCRL1* s'était avérée non contributive pour l'ensemble des patients du panel.

5. Détection des mosaïques

Les ratios normalisés moyens des 24 sondes obtenus pour les échantillons représentant une délétion en mosaïque à 20, 40, 60 ou 80 % sont respectivement de 0,76, 0,55, 0,37 et 0,23 (coefficient de détermination $R^2_{del} = 0,993$) et de 1,25, 1,43, 1,55 et 1,76 respectivement pour les échantillons mimant une duplication en mosaïque ($R^2_{dup} = 0,991$). Les ratios moyens obtenus pour chaque échantillon sont donc linéaires au pourcentage de mosaïcisme de l'échantillon.

Le ratio normalisé moyen des 24 sondes des échantillons représentant une délétion en mosaïque à 20 % (del 20%, 0,76) est significativement inférieur ($p < 0,0001$) au ratio moyen de l'échantillon contrôle (1,01) (fig. 5). Pour l'échantillon représentant une duplication en mosaïque à 20% (dup 20%), le ratio moyen (1,25) s'avère aussi logiquement supérieur ($p < 0,0001$) au ratio moyen de l'échantillon contrôle (figure. 38).

Ces données démontrent que notre technique peut détecter de très faibles variations du nombre de copies du gène *OCRL1*, de l'ordre de 20% chez un homme. Chez une femme, la technique ne pourra détecter une délétion (ou une duplication) hétérozygote en mosaïque qu'à partir de 40 % (les femmes ayant 2 copies du gène *OCRL1* dans chacune de leur cellule).

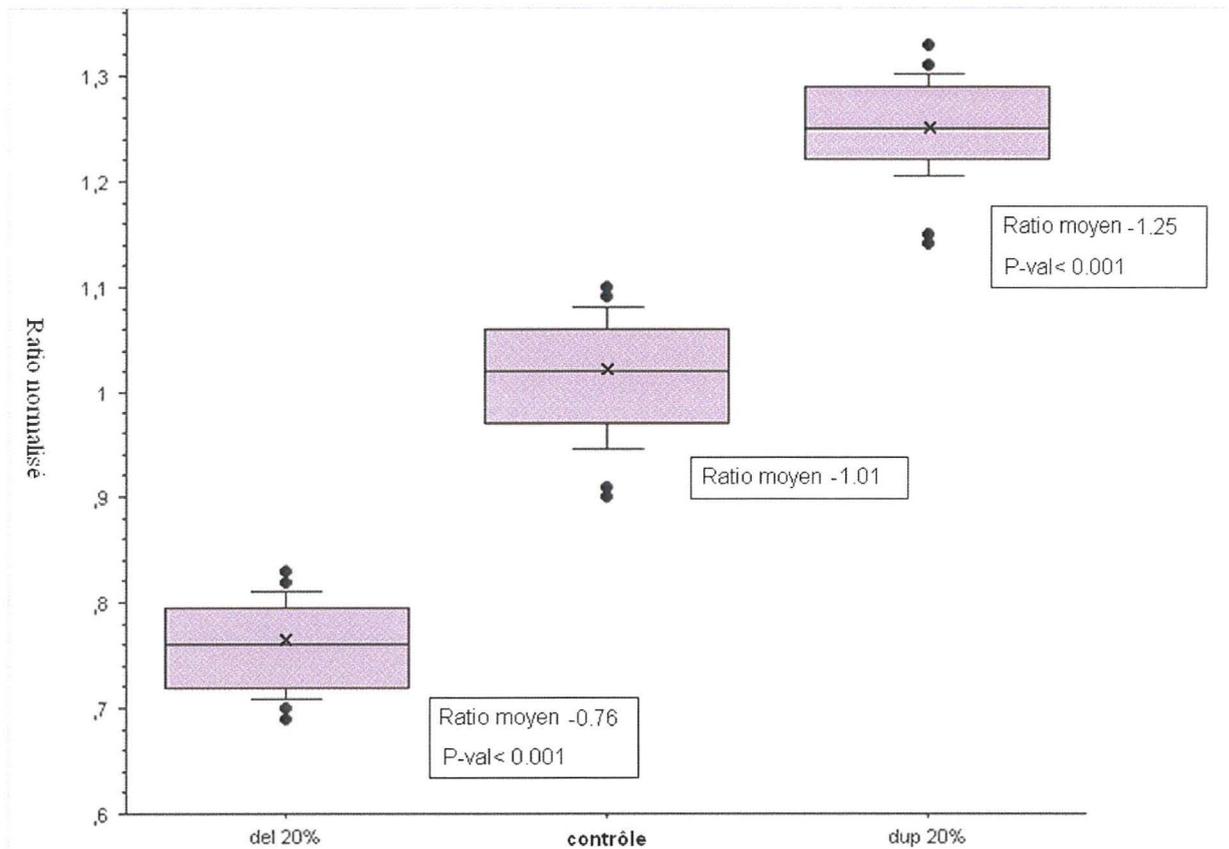


Figure 38. Représentation en box plot des ratios normalisés (ordonnée) en fonction du type de mutation et du degré de mosaïcisme (abscisse); del 20% : délétion en mosaïque à 20%; dup : duplication en mosaïque à 20%. La ligne horizontale au milieu de la boîte représente la valeur médiane des ratios des 24 sondes. La croix au centre représente la moyenne de ces ratios. La limite haute de chaque boîte représente le 75^{ème} percentile et la limite basse le 25^{ème} percentile. Les moustaches des boîtes indiquent la dispersion des valeurs comprises à moins de 1,5 fois la longueur de la boîte. Les valeurs hors limites sont représentées par de points noirs. Le ratio moyen des 24 sondes est indiqué ainsi que la P-value obtenue lors de la comparaison avec l'échantillon contrôle.

Au final, nous avons mis au point une technique MLPA spécifique du gène *OCRL1* à la fois fiable et sensible. Cette méthode est facilement applicable en routine dans la démarche diagnostique du syndrome de Lowe et de la maladie de Dent de même que lors du conseil génétique pour les femmes à risque d'être conductrices d'une délétion.

DISCUSSION

1. Méthodes

Les délétions du gène *OCRL1* chez une femme sont difficiles à mettre en évidence.

Des techniques récentes comme la PCR multiplex quantitative (q-PCR) auraient pu être utilisées pour le dosage génique du gène *OCRL1* au lieu de la MLPA mais un inconvénient de cette technique est la complexité de sa mise au point. En effet, l'association de multiples amorces est un véritable casse-tête, toutes n'ayant pas les mêmes caractéristiques et donc la même efficacité pour une condition de PCR donnée. Ainsi, de très petites variations des conditions de réactions peuvent entraîner d'énormes variations dans les résultats. De multiples essais sont donc souvent nécessaires pour obtenir un résultat correct et acceptable. La MLPA, par l'utilisation d'amorces universelles court-circuite cette étape difficile de mise au point des PCR multiplex et facilite la quantification simultanée des variations du nombre de copies de nombreux gènes. De plus, il a été démontré que la MLPA était nettement plus sensible que la q-PCR pour la détection des micro-réarrangements génomiques [Lai et al. 2006].

➤ Variations du signal

Dans cette étude, nous avons décidé de répartir les 24 sondes spécifiques d'*OCRL1* dans quatre mélanges différents. En effet, il apparaît que ceux contenant des sondes plus courtes et en moins grand nombre ont une meilleure fiabilité [Kozłowski et al. 2007] et produisent moins d'effet indésirable du type « sloping effect ». Une des explications retenues est une efficacité moindre et inconstante de la réaction d'amplification par PCR pour les fragments de plus grandes tailles [Kozłowski et al. 2008]. Enfin, l'utilisation de petites sondes présente aussi l'avantage de simplifier la modélisation des sondes en limitant le risque de complémentarité inter-sondes au sein d'un même mélange.

Cependant, cette stratégie est plus longue et onéreuse. Le coût en réactifs est ainsi multiplié par quatre et cela allonge le temps technique pour la réalisation de l'analyse, de sorte qu'il peut être discuté de la mise au point à l'avenir d'un mix unique.

Les sondes sélectionnées dans cette étude ont toutes été validées. Toutefois, on peut constater une hétérogénéité dans les intensités de signaux obtenus et dans les coefficients de variation de certaines d'entre elles. De façon surprenante, le signal le plus faible et le CV de variation le « moins bon » ont été observés avec la sonde spécifique de l'exon 19, qui à l'analyse de ses paramètres techniques semblait être « parfaite ». S'ajoute à cela le fait que certaines sondes avec des paramètres très limites comme la sonde de l'exon 1, ont un signal de forte intensité et un excellent coefficient de variation. Cette observation remet en question l'importance des paramètres et contraintes imposés pour la synthèse de ces sondes.

Mais comment expliquer alors ces différences? Plusieurs hypothèses peuvent être avancées :

- Une qualité moindre ou un défaut lors de la synthèse de certains oligonucléotides. Hypothèse peu probable, sachant que les oligonucléotides sont purifiés par HPLC et soumis à un contrôle qualité drastique.
- Un problème de spécificité des sondes. Les sondes s'avèrent être toutes parfaitement spécifiques de leur région cible d'après les logiciels d'alignement. Toutefois, il faut noter qu'un logiciel comme le logiciel BLAT (UCSC) ne révèle que les séquences homologues avec une taille supérieure à 20 nt. Et même s'il existait une hybridation non spécifique de petite taille (< 20nt), au vue de la T_m des régions spécifiques et de la température d'hybridation, cela ne devrait que très peu influencer le signal.
- Un problème d'inter-complémentarité entre les différentes sondes. Ce paramètre est très difficile à évaluer et pourrait notamment survenir avec les sondes contrôles fournies par MRC dont les séquences ne sont pas connues. Ce phénomène devrait

toutefois disparaître en modifiant la combinaison de sondes ce qui n'a pas été observée dans notre étude.

- La quantité de sondes. Lors de la mise au point nous avons constaté que l'intensité du signal n'est pas corrélée à l'augmentation de la quantité de sondes. D'après MRC-Holland, une quantité de sondes en excès pourrait même avoir un effet délétère sur le signal [Synthetic probes protocol v10. www.mlpa.com].
- La formation de dimères de sondes après l'étape d'amplification est aussi peu envisageable car avant le passage sur séquenceur, les amplifiats sont dénaturés 2 min à 95°C dans de la formamide puis refroidi brutalement dans la glace afin d'éviter leur hybridation.
- La séquence de la sonde et notamment la composition en GC directement adjacent au primer « sens ». Ce paramètre appliqué à l'exon 22 a effectivement permis d'optimiser le signal. Toutefois, cela n'a pas été le cas pour l'exon 19.

A l'heure actuelle, il n'y a donc pas d'hypothèses complètement satisfaisantes pour expliquer les variations de signal observées entre les différentes sondes. Ce phénomène est par ailleurs observé dans les kits commerciaux de la société MRC. L'influence d'un ou plusieurs autres paramètres non encore identifiés est à envisager et à investiguer.

➤ **Faux positifs**

Lors de l'observation d'une délétion unique, le risque de faux positifs suite à la présence d'un polymorphisme inconnu proche du site de ligation est possible et doit être systématiquement écarté. Pour cette raison les référentiels des bonnes pratiques

recommandent l'application de deux techniques pour confirmer chaque génotype [Dequeker et al. 2001].

Classiquement, la vérification est faite par une « long range » PCR (LR-PCR : PCR longue distance) et le séquençage des bornes de la délétion. D'autres techniques peuvent être utilisées telles que la qPCR, la FISH (si la taille de la délétion est suffisante) ou une deuxième technique MLPA avec des sondes dirigées sur des régions différentes de la première [Nosaied et al. 2009].

Les duplications uniques doivent de la même façon faire l'objet d'une attention particulière mais sont plus difficiles à contrôler. Il existe en effet de possibles faux positifs (fausses duplications) lors de l'utilisation fortuite d'un témoin avec une délétion inconnue. Cette situation ne devrait pas se produire chez un homme dans le cas du gène *OCRL1* du fait de sa localisation sur le chromosome X, mais peut être envisagée chez une femme. D'autres causes de faux positifs sont possibles, suite à une contamination de l'échantillon ou encore par la présence d'un pseudogène inconnu.

➤ **Détection des mosaïques**

La MLPA est capable de détecter une très faible variation du nombre de copie d'un gène et ainsi de détecter des mosaïques. La sensibilité de la technique a toutefois une limite. Pour de très faibles mosaïcismes (<20%) il est alors très difficile d'imputer la variation observée à une mutation en mosaïque et non à une variation artefactuelle. Dans ce cas, les coefficients de variation de sondes utilisées peuvent être un outil utile pour apprécier la limite entre une variation liée à la technique ou réellement pathologique. Par exemple, pour une sonde ayant un coefficient de variation de l'ordre de 5%, un ratio à 1,15 doit attirer l'attention vis-à-vis d'une éventuelle mosaïque. De plus, cette aptitude à détecter de faibles mosaïques

est renforcée lorsque plusieurs exons consécutifs présentent le même type de variation. Ainsi, pour distinguer un mosaïcisme d'une simple variation artefactuelle de signaux, la meilleure méthode semble de comparer statistiquement les ratios des exons impliqués avec les ratios des sondes ne présentant pas de variation.

Dans tous les cas, la mosaïque doit être confirmée par une deuxième technique (FISH ou qPCR) et par des études portant éventuellement sur plusieurs tissus.

On peut alors se demander si la MLPA pourrait être utilisée pour quantifier précisément le mosaïcisme observé et remplacer des techniques comme la FISH dans cette application? Quand on compare par des tests statistiques les valeurs moyennes obtenues des signaux pour un degré de mosaïcisme donné à la valeur théorique attendue, on constate que la valeur observée diffère significativement de la valeur seuil. Ceci est du en partie à la très faible variance (s^2) des ratios calculés dans chaque série. De façon plus pragmatique, on considère que les signaux moyens obtenus sont très proches des valeurs attendues. On estime ainsi une approximation de l'ordre de +/- 10 % du degré de mosaïcisme.

➤ **Autres limites de la MLPA**

Les résultats sont très dépendants de la qualité d'extraction et de conservation de l'ADN. Les impuretés comme les traces d'éthanol ou de phénol, les ions et les sels diminuent l'activité de la polymérase. Cette baisse d'activité se fera d'autant plus ressentir sur les plus longs fragments (« sloping effect »).

De même, de faibles variations de la concentration en Mg^{2+} peuvent influencer l'étape initiale de dénaturation. Paradoxalement, la qualité intrinsèque de l'ADN (fragmentation) influence peu la force du signal : les sondes MLPA étant relativement courtes par rapport aux sondes utilisées dans d'autres techniques comme la FISH [Kozłowski et al. 2007].

La modélisation des sondes est relativement longue et fastidieuse car il n'existe aucun logiciel complètement satisfaisant, car trop ou pas assez restrictif. Les logiciels proposés doivent être utilisés avec beaucoup de prudence. Le logiciel mis au point par Zhi et al. 2008 semble le plus apte à être utilisé en routine bien qu'il ne prenne pas en compte la présence et surtout la position des SNPs dans la modélisation des sondes.

La durée d'hybridation (16h environ) est un inconvénient « mineur » de la technique. Ce délai est difficilement compressible car il est nécessaire pour une hybridation totale de l'ensemble des sondes du mix. Un temps plus court pourrait entraîner une perte de reproductibilité de la technique, les sondes ne s'hybridant pas toutes à la même vitesse.

En dehors des limites d'ordre technique, il existe également des limites plus générales à l'utilisation de la MLPA. Celle-ci ne permet pas détecter des réarrangements chromosomiques équilibrés pouvant interrompre un gène, déjà décrites dans le syndrome de Lowe [Hodgson et al. 1986 ; Mueller et al. 1991]. De plus, notre kit ciblé sur les exons du gène *OCRL1* ne peut détecter une mutation située dans une région promotrice ou intronique. Enfin, il ne permettra pas à fortiori de dépister les mutations situées dans d'autres gènes qu'*OCRL1*.

2. Résultats

➤ Sujets atteints

Par notre technique nous avons confirmé tous les cas de délétions identifiées préalablement chez les sujets atteints. Elle est donc applicable en routine en complément de la recherche des mutations ponctuelles.

Notre étude corrobore les précédents résultats publiés dans la littérature indiquant que les duplications du gène *OCRL1* sont des événements probablement exceptionnels. Le nombre

de patients étudiés rétrospectivement est encore trop limité pour conclure formellement sur l'absence des duplications dans le syndrome de Lowe.

➤ **Mutations en mosaïque**

Les anomalies en mosaïque (mutations, délétions, duplications) n'ont jamais été identifiées chez des hommes atteints. Chez les patients présentant un phénotype incomplet sans anomalie retrouvée au séquençage on peut imaginer l'implication d'un tel mécanisme.

Notre technique MLPA est capable de détecter de très faibles mosaïcismes de l'ordre de 20 % chez un homme. Dans notre étude aucune mosaïque n'a été identifiée chez les patients étudiés.

Ces résultats sont à l'encontre de l'implication des duplications ou des délétions en mosaïque chez les patients avec un phénotype plus ou moins complet du syndrome de Lowe mais pour lesquels aucune mutation n'a pu être identifiée avec les techniques conventionnelles.

Pour aller plus loin dans les analyses et exclure définitivement l'implication d'*OCRL1* dans les symptômes de ces patients, il est alors nécessaire de proposer la réalisation d'une biopsie cutanée afin de permettre l'analyse de l'activité 5-phosphatase et des transcrits.

➤ **Dépistage des conductrices**

L'étude du statut de conductrices de femmes apparentées à un patient atteint et porteur d'une délétion génomique a démontré que la mutation survenait *de novo* dans 50% des cas (2/5, 2 étant de la même famille). Dans les pathologies récessives liées à l'X le taux de

néomutations est de 1/3. Notre résultat est probablement lié au très faible échantillonnage étudié.

3. Perspectives

Il serait avantageux de mettre au point un mix unique au lieu de 4 afin de faciliter l'analyse et d'en diminuer le coût. Ceci peut se faire en augmentant la taille des sondes mais expose au risque de voir la qualité du signal s'effondrer. Il faudra privilégier plutôt la stratégie visant à utiliser un mode de détection multi-couleurs des sondes.

Cette dernière option semble la plus réalisable et la moins délétère pour la qualité du signal. Pour cela, il suffirait d'intégrer différents couples d'amorces universelles (jusqu'à 4) marqués chacun avec un fluorophore différent. La seule difficulté sera alors de déterminer la séquence de ces amorces afin qu'elles soient spécifiques et d'éviter leur dimérisation.

De même, afin de diminuer au maximum le coût de la réaction, on pourrait envisager d'utiliser des sondes contrôles « maisons » voire nos propres réactifs. Il devrait être possible de modéliser entre 4 à 5 sondes spécifiques de régions invariables et de les introduire ensuite dans nos mix. En plus du gain financier, cela raccourcirait le temps de passage sur le séquenceur (réduction de 17 sondes contrôles à 5 et donc une gamme de taille plus réduite) et améliorerait la force du signal des sondes les moins intenses et donc la qualité de l'analyse.

La modélisation manuelle des sondes est longue et très contraignante. Afin de l'automatiser, il serait intéressant de développer et de mettre au point un logiciel de conception des sondes MLPA fiable et performant. Ce nouvel outil bioinformatique en aidant à la modélisation des sondes permettrait d'étendre l'application de la MLPA à d'autres gènes d'intérêt de notre laboratoire.

Actuellement, il n'y a pas d'indications à utiliser la MLPA *OCRL1* spécifique dans le cadre du diagnostic prénatal.

Nous avons donc pu mettre en place une nouvelle méthode diagnostique complémentaire du séquençage pour le syndrome de Lowe et la maladie de Dent au sein du laboratoire, par ailleurs centre de référence pour ces pathologies. C'est un outil simple et performant pour la détection des conductrices de délétions utile lors du conseil génétique chez ces femmes. Notre technique facilitera ainsi l'étude en routine des réarrangements d'*OCRL1*.

Cette méthode validée sera mise à la disposition de la communauté scientifique internationale.

CONCLUSION

THESE SOUTENUE PAR : Charles COUTTON

TITRE : Mise au point du dosage génique du gène *OCRL1* par Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA). Application au syndrome de Lowe et à la maladie de Dent.

CONCLUSION

Le syndrome de Lowe et la maladie de Dent sont deux maladies génétiques très rares de transmission récessive liée au chromosome X chez lesquelles des délétions du gène *OCRL1* ont été décrites. Bien que simple à détecter chez un homme, ces réarrangements sont délicats à mettre en évidence chez les femmes potentiellement conductrices de la maladie avec les techniques de diagnostic de première intention (ex : séquençage) en raison de la présence des deux chromosomes X et donc de 2 copies du gène *OCRL1*. Leur détection, de même que la détection d'autres réarrangements génomiques potentiellement causals de la maladie tels que les duplications ou les délétions en mosaïque, imposent l'utilisation de techniques complémentaires généralement longues, fastidieuses et souvent peu résolutive.

Depuis peu, l'essor de nouvelles technologies quantitatives comme la MLPA a permis de répondre efficacement à cet écueil diagnostique. Déjà éprouvée sur de nombreux gènes différents, la MLPA se distingue des autres techniques par son excellente sensibilité et spécificité, sa grande capacité de multiplexage ainsi que par sa rapidité. Mais cette technique, relativement récente, n'est toutefois que trop peu employée et pas encore suffisamment généralisée notamment pour les maladies ou syndromes les plus rares. Ainsi, l'objectif de ce travail aura été de mettre au point et de valider une technique MLPA fiable et efficace pour la détection des réarrangements génomiques du gène *OCRL1* dans le syndrome de Lowe et la maladie de Dent.

Après avoir modélisé l'ensemble des 24 sondes MLPA spécifiques des 24 exons d'*OCRL1*, 4 mélanges différents de 6 sondes ont été retenus et validés sur un panel de patients



sains. La spécificité de la méthode a été ensuite évaluée et validée sur 6 patients atteints du syndrome de Lowe et un de la maladie de Dent, tous porteurs d'une délétion d'*OCRL1* auparavant identifiée par séquençage. Par la suite, notre technique a permis de préciser le statut de 5 femmes avec un apparenté atteint et porteur d'une délétion génomique d'*OCRL1*. Seulement deux de ces femmes étaient conductrices de la délétion familiale. Enfin, malgré la sensibilité de notre technique, aucune délétion ou duplication (homogène ou en mosaïque) n'a été retrouvé chez 11 hommes et 4 femmes présentant un tableau incomplet du syndrome de Lowe voire typique pour deux d'entre eux et chez lesquels l'analyse préalable par séquençage du gène *OCRL1* s'était révélée non contributive.

Ainsi, les résultats de notre étude corroborent les précédents résultats publiés dans la littérature démontrant que les duplications du gène *OCRL1* sont des événements probablement exceptionnels. De plus, ils fragilisent un peu plus l'hypothèse que les réarrangements génomiques en mosaïque ou les duplications contribueraient à expliquer la fraction de patients avec un phénotype plus ou moins complet et pour lesquels aucune mutation n'avait pu être identifiée avec les techniques conventionnelles de diagnostic.

Bien qu'aucune nouvelle mutation n'ait pu être décrite dans ce travail, la technique MLPA spécifique du gène *OCRL1* est fiable et robuste et ainsi applicable en routine comme méthode diagnostique complémentaire du séquençage pour le syndrome de Lowe et la maladie de Dent. C'est un outil simple et performant pour déterminer le statut des femmes potentiellement conductrices de délétions.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le

8 Sept 2009

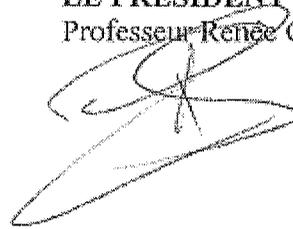
LE DOYEN

Professeur Renée GRILLOT



LE PRESIDENT DE LA THESE

Professeur Renée GRILLOT



BIBLIOGRAPHIE

- Addis M, Loi M, Lepiani C, Cau M, Melis MA. OCRL mutation analysis in Italian patients with Lowe syndrome. 2004. *Hum Mutat.* 23:524-5.

- Addis M, Meloni C, Congiu R, Santaniello S, Emma F, Zuffardi O, Ciccone R, Cao A, Melis MA, Cau M. A novel interstitial deletion in Xq25, identified by array-CGH in a patient with Lowe syndrome. 2007. *Eur J Med Genet.* 50:79-84.

- Attree O, Olivos IM, Okabe I, Bailey LC, Nelson DL, Lewis RA, McInnes RR, Nussbaum RL. The Lowe's oculocerebrorenal syndrome gene encodes a protein highly homologous to inositol polyphosphate-5-phosphatase. 1992. *Nature* 358:239-42.

- Baujat G. Communication personnelle. 2005.

- Berridge MJ, Irvine RF. Inositol phosphates and cell signalling. 1989. *Nature.*341:197-205.

- Bökenkamp A, Böckenhauer D, Cheong HI, Hoppe B, Tasic V, Unwin R, Ludwig M. Dent-2 disease: a mild variant of Lowe syndrome. 2009. *J. Pediatr* 155:94-9.

- Cau M, Addis M, Congiu R, Meloni C, Cao A, Santaniello S, Loi M, Emma F, Zuffardi O, Ciccone R, Sole G, Melis MA. A locus for familial skewed X chromosome inactivation maps to chromosome Xq25 in a family with a female manifesting Lowe syndrome. 2006. *J Hum Genet.* 51:1030-6.

- Chabaa L, Monnier N, Dahri S, Jorio M, Lunardi J, Chabraroui L: Oculo-cerebro-renal Lowe syndrome: Clinical, biochemical and molecular studies in a Moroccan patient. 2006. *Ann Biol Clin.* 64:53-59.

- Charnas L, Bernar J, Pezeshkpour GH, Dalakas M, Harper GS, Gahl WA. MRI findings and peripheral neuropathy in Lowe's syndrome. 1988. *Neuropediatrics.* 19:7-9.

- Charnas L, Bernardini I, Rader D, Hoeg J, Gahl W. Clinical and laboratory findings in the oculocerebrorenal syndrome of Lowe, with special reference to growth and renal function. 1991. *N Engl J Med.* 324: 1318-1325.

- Charnas L, Nussbaum R. 1995. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D, eds, McGraw-Hill, New York, vol III, pp : 3705-3716.
- Choudhury R, Diao A, Zhang F, Eisenberg E, Saint-Pol A, Williams C, Konstantakopoulos A, Lucocq J, Johannes L, Rabouille C, Greene LE, Lowe M. Lowe syndrome protein OCRL1 interacts with clathrin and regulates protein trafficking between endosomes and the trans-Golgi network. 2005. *Mol Biol Cell*.16:3467-79.
- Choudhury R, Noakes CJ, McKenzie E, Kox C, Lowe M. Differential clathrin binding and subcellular localization of OCRL1 splice isoforms. 2009. *J Biol Chem*. 284:9965-73.
- Cibis GW, Waeltermann JM, Whitcraft CT, Tripathi RC, Harris DJ. Lenticular opacities in carriers of Lowe's syndrome. 1986. *Ophthalmology*. 93:1041-5.
- Dequeker E, Ramsden S, Grody WW, Stenzel TT, Barton DE. Quality control in molecular genetic testing. 2001. *Nat Rev Genet*. 2:717–23.
- Dent CE, Friedman M. Hypercalciuric rickets associated with renal tubular damage. 1964. *Arch Dis Child* 39:240-249.
- MRC-Holland web site - Designing synthetic MLPA probe – URL: http://www.mrcholland.com/pages/support_desing_synthetic_probespag.html - Février 2009.
- Di Paolo G, De Camilli P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. 2006. *Nature*. 443:651-7.
- Dikow N, Nygren AO, Schouten JP, Hartmann C, Krämer N, Janssen B, Zschocke J. Quantification of the methylation status of the PWS/AS imprinted region: comparison of two approaches based on bisulfite sequencing and methylation-sensitive MLPA. 2007. *Mol Cell Probes*. 21:208-15.
- Eldering E, Spek CA, Aberson HL, Grummels A, Derks IA, de Vos AF, McElgunn CJ, Schouten JP. Expression profiling via novel multiplex assay allows rapid assessment of gene regulation in defined signalling pathways. 2003. *Nucleic Acids Res*. 1:31:e153.

- Erdmann KS, Mao Y, McCrea HJ, Zoncu R, Lee S, Paradise S, Modregger J, Biemesderfer D, Toomre D, De Camilli P. A role of the Lowe syndrome protein OCRL in early steps of the endocytic pathway. 2007. *Dev Cell*. 13:377-90.
- Faucherre A, Desbois P, Satre V, Lunardi J, Dorseuil O, Gacon G. Lowe syndrome protein OCRL1 interacts with Rac GTPase in the trans-Golgi network. 2003. *Hum Mol Genet*. 12:2449-56.
- Gardner RJ, Brown N. Lowe's syndrome: identification of carriers by lens examination. 1976. *J Med Genet*. 13:449-54.
- Goud B. How Rab proteins link motors to membranes. 2005. *Nat Cell Biol*. 4: E77-8
- Goud B. Communication personnelle. 2005.
- Hartevelde CL, Voskamp A, Phylipsen M, Akkermans N, den Dunnen JT, White SJ, Giordano PC. Nine unknown rearrangements in 16p13.3 and 11p15.4 causing alpha-and beta thalassaemia characterised by high resolution multiplex ligation-dependent probe amplification. 2005. *J Med Genet*. 42:922-31.
- Henken FE, Wilting SM, Overmeer RM, van Rietschoten JG, Nygren AO, Errami A, Schouten JP, Meijer CJ, Snijders PJ, Steenberg RD. Br Sequential gene promoter methylation during HPV-induced cervical carcinogenesis. 2009. *J Cancer*. 97:1457-64.
- Nosaeid M, Mahdian R, Jamali S, Maryami F, Babashah S, Maryami F, Karimipoor M, Zeinali S. Validation and comparison of two quantitative real-time PCR assays for direct detection of DMD/BMD carriers. 2009. *Clin Biochem*.
- Hess CJ, Denkers F, Ossenkoppele GJ, Waisfisz Q, McElgunn CJ, Eldering E, Schouten JP, Schuurhuis GJ. Gene expression profiling of minimal residual disease in acute myeloid leukaemia by novel multiplex-PCR-based method. 2004. *Leukemia*. 18:1981-8.

- Hodgson SV, Heckmatt JZ, Hughes E, Crolla JA, Dubowitz V, Bobrow M. A balanced de novo X/autosome translocation in a girl with manifestations of Lowe syndrome. 1986. *Am J Med Genet.* 23:837-47.

- Hogervorst FB, Nederlof PM, Gille JJ, et al. Large genomic deletions and duplications in the BRCA1 gene identified by a novel quantitative method. 2003. *Cancer Res.* 63:1449–53.

- Hollerman C, Calcagno. Aminoaciduria-renal transport. 1968 *Am J Dis Child.* 115: 169-178.

- Hoopes RR Jr, Raja KM, Koich A, Huebber P, Reid R, Knohl SJ, Scheinmann SJ. 2004. Evidence for genetic heterogeneity in Dent's disease. *Kidney Int* 65:1615-1620.

- Hoopes RR Jr, Shrimpton AE, Knohl SJ, Hueber P, Hoppe B, Matyus J, Simckes A, Tasic V, Toenshoff B, Suchy SF, Nussbaum RL, Scheinman SJ. Dent Disease with mutations in OCRL1. 2005. *Am J Hum Genet.* 76(2):260-7. Erratum in: 2007. *Am J Hum Genet.* 81:634.

- Hyvola N, Diao A, McKenzie E, Skippen A, Cockcroft S, Lowe M. Membrane targeting and activation of the Lowe syndrome protein OCRL1 by rab GTPases. 2006. *EMBO J.* 25:3750 61.

- Janssen B, Hartmann C, Scholz V, Jauch A, Zschocke J. 2005. MLPA analysis for the detection of deletions, duplications and complex rearrangements in the dystrophin gene: potential and pitfalls. *Neurogenetics.* 6:29-35.

- Jeanpierre M. A rapid method for the purification of DNA from blood. 1987. *Nucleic Acids Res* 15:9611.

- Jeuken JW, Cornelissen SJ, Vriezen M, Dekkers MM, Errami A, Sijben A, Boots-Sprenger SH, Wesseling P. MS-MLPA: an attractive alternative laboratory assay for robust, reliable, and semiquantitative detection of MGMT promoter hypermethylation in gliomas. 2007. *Lab Invest.* 87:1055-65.

- Kawano T, Indo Y, Nakazato H, Shimadzu M, Matsuda I. Oculocerebrorenal syndrome of Lowe: three mutations in the OCRL1 gene derived from three patients with different phenotypes. 1998. *Am J Med Genet.* 77:348-55.

- Kenworthy L, Park T, Charnas L. Cognitive and behavioral profile of the oculocerebrorenal syndrome of Lowe. 1993. *Am J Med Genet* 46: 297-303.

- Kenworthy L, Charnas L. Evidence for a discrete behavioral phenotype in the oculocerebrorenal syndrome of Lowe. 1995. *Am J Med Genet.* 59: 283-290.

- Kozlowski P, Roberts P, Dabora S, Franz D, Bissler J, Northrup H, Au KS, Lazarus R, Domanska-Pakiela D, Kotulska K, Jozwiak S, Kwiatkowski DJ. Identification of 54 large deletions/duplications in TSC1 and TSC2 using MLPA, and genotype-phenotype correlations. 2007. *Hum Genet.* 121:389-400.

- Kozlowski P, Jasinska AJ, Kwiatkowski DJ. New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification. 2008. *Electrophoresis.* 29:4627-36.

- Kubota T, Sakurai A, Arakawa K, Shimazu M, Wakui K, Furihata K, Fukushima Y. Identification of two novel mutations in the OCRL1 gene in Japanese families with Lowe syndrome. 1998. *Clin Genet.* 54:199-202.

- Lai KK, Lo IF, Tong TM, Cheng LY, Lam ST. Detecting exon deletions and duplications of the DMD gene using Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA). 2006. *Clin Biochem.* 39:367-72.

- Leahey AM, Charnas LR, Nussbaum RL. Nonsense mutations in the OCRL-1 gene in patients with the oculocerebrorenal syndrome of Lowe. 1993. *Hum Mol Genet.* 2:461-3.

- Lichter-Konecki U, Farber LW, Cronin JS, Suchy SF, Nussbaum RL. The effect of missense mutations in the RhoGAP-homology domain on ocr11 function. 2006. *Mol Genet Metab.* 89:121-8.

- Lin T, Orrison BM, Leahey AM, Suchy SF, Bernard DJ, Lewis RA, Nussbaum RL. Spectrum of mutations in the OCRL1 gene in the Lowe oculocerebrorenal syndrome. 1997. *Am J Hum Genet.* 60:1384-8.
- Lin T, Orrison BM, Suchy SF, Lewis RA, Nussbaum RL. Mutations are not uniformly distributed throughout the OCRL1 gene in Lowe syndrome patients. 1998. *MolGenet Metab.* 64:58-61.
- Lin T, Lewis R, Nussbaum R. Molecular confirmation of carriers for Lowe syndrome. *Ophthalmology.* 1999. 106: 119-122.
- Lloyd SE, Pearce SHS, Fisher SE, Steinmeyer K, Schwappach B, Scheinman SJ, Harding B, Bolino A, Devoto M, Goodyer P, Rigden SPA, Wrong O, Jentsch TJ, Craig IW, Thakker RV. A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases. 1996. *Nature.* 379:445-449.
- Loi M. Lowe syndrome. 2006. *Orphanet J Rare Dis.* 1:16.
- Loughhead J, Mimouni F, Shiling S, Wood B. Radiological cases of the month. 1992. *Am J Dis Child.* 146: 1209-1210.
- Lowe C, Terrey M, MacLachan E (1952) Organic aciduria, decreased renal ammonia production, hydrophthalmos, and mental retardation : a clinical entity. *Am J Dis Child.* 83 : 164-184.
- Lowe M. Structure and function of the Lowe syndrome protein OCRL1. 2005. *Traffic.* 6: 711-719.
- Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H, Kunkel LM. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. 1988. *Genomics.* 2:90-5.
- McSpadden K, Dolinsky Z, Schroerlucke K: Report on the Lowe's syndrome comprehensive survey West Lafayette. 1991. Lowe Syndrome Association.

- Ménager C, Kaibuchi K. Les protéines Rho: leur rôle dans les neurones *Med Sci.* 2003. 19 : 358-363.

- Monnier N, Satre V, Lerouge E, Berthoin F, Lunardi J. OCRL1 mutation analysis in French Lowe syndrome patients: implications for molecular diagnosis strategy and genetic counseling. 2000. *Hum Mutat.* 16:157-65.

- Mueller OT, Hartsfield JK Jr, Gallardo LA, Essig YP, Miller KL, Papenhausen PR, Tedesco TA. Lowe oculocerebrorenal syndrome in a female with a balanced X;20 translocation: mapping of the X chromosome breakpoint. 1991. *Am J Hum Genet.* 49:804-10.

- Nussbaum RL, Orrison BM, Jänne PA, Charnas L, Chinault AC. Physical mapping and genomic structure of the Lowe syndrome gene OCRL1. 1997. *Hum Genet.* 99:145-50.

- Nygren AO, Ameziane N, Duarte HM, Vijzelaar RN, Waisfisz Q, Hess CJ, Schouten JP, Errami A. Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. 2005. *Nucleic Acids Res.* 33:e128.

- Olivos-Glander IM, Jänne PA, Nussbaum RL. The oculocerebrorenal syndrome gene product is a 105-kD protein localized to the Golgi complex. 1995. *Am J Hum Genet.* 57:817-23.

- Ooms LM, Horan KA, Rahman P, Seaton G, Gurung R, Kethesparan DS, Mitchell CA. The role of the inositol polyphosphate 5-phosphatases in cellular function and human disease. 2009. *Biochem J.* 419:29-49.

- Peck J, Douglas G 4th, Wu CH, Burbelo PD. Human RhoGAP domain containing proteins: structure, function and evolutionary relationships. 2002. *FEBS Lett.* 528: 27-34.

- Peverall J, Edkins E, Goldblatt J, Murch A. Identification of a novel deletion of the entire OCRL1 gene detected by FISH analysis in a family with Lowe syndrome. 2000. *Clin Genet.* 58:479-82.

- Ponting CP. A novel domain suggests a ciliary function for ASPM, a brain size determining gene. 2006. *Bioinformatics*. 22:1031-5.

- Priolo M, Sparago A, Mammi C, Cerrato F, Laganà C, Riccio A. MS-MLPA is a specific and sensitive technique for detecting all chromosome 11p15.5 imprinting defects of BWS and SRS in a single-tube experiment. 2008. *Eur J Hum Genet*. 16:565-71.

- Procter M, Chou LS, Tang W, Jama M, Mao R. Molecular diagnosis of Prader-Willi and Angelman syndromes by methylation-specific melting analysis and methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification. 2006. *Clin Chem*. 52:1276-83.

- Rooms L, Reyniers E, van Luijk R, Scheers S, Wauters J, Ceulemans B, VanDen Ende J, Van Bever Y, Kooy RF. Subtelomeric deletions detected in patients with idiopathic mental retardation using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). 2004. *Hum Mutat*. 23:17-21.

- Röschinger W, Muntau AC, Rudolph G, Roscher AA, Kammerer S: Carrier assessment in families with Lowe oculocerebrorenal syndrome: Novel mutations in the OCRL1 gene and correlation of direct DNA diagnosis with ocular examination. 2000. *Mol Genet Metab* 69:213-222.

- Satre V, Monnier N, Berthoin F, Ayuso C, Joannard A, Jouk PS, Lopez-Pajares I, Megabarne A, Philippe HJ, Plauchu H, Torres ML, Lunardi J. Characterization of a germline mosaicism in families with Lowe syndrome, and identification of seven novel mutations in the OCRL1 gene. 1999. *Am J Hum Genet*. 65:68-76.

- Satre V. Analyse génétique et fonctionnelle du gène *OCRL1* associé au syndrome de Lowe. 2007. Th PhD, Grenoble.

- Schuetzle MN, Uphoff TS, Hatten BA, Dawson DB. Utility of microsatellite analysis in evaluation of pregnancies with placental mesenchymal dysplasia. 2007. *Prenat Diagn*. 27:1238-44.

- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation dependent probe amplification. 2002. *Nucleic Acids Res.* 30:e57.
- Sekine T, Nozu K, Iyengar R, Fu XJ, Matsuo M, Tanaka R, Iijima K, Matsui E, Harita Y, Inatomi J, Igarashi T. OCRL1 mutations in patients with Dent disease phenotype in Japan. 2007. *Pediatr Nephrol.* 22:975-80.
- Sellner LN, Taylor GR. MLPA and MAPH: new techniques for detection of gene deletions. 2004. *Hum Mutat.* 23:413-9.
- Shao H, Lip V, Wu BL. Effectiveness of multiplex ligation-dependent probe amplification assay used for detecting deletion of Prader-Willi syndrome. 2005. *Beijing Da Xue Xue Bao.* 37:64-7.
- Silver D, Lewis R, Nussbaum R. Mapping the Lowe oculocerebrorenal syndrome to Xq24-q26 by use of restriction fragment length polymorphisms. 1987. *J Clin Invest* 79 : 282-285.
- Suchy SF, Olivos-Glander IM, Nussbaum RL. Lowe syndrome, a deficiency of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 5-phosphatase in the Golgi apparatus. 1995. *Hum Mol Genet.* 4:2245-50.
- Suchy SF, Nussbaum RL. The deficiency of PIP2 5-phosphatase in Lowe syndrome affects actin polymerization. 2002. *Am J Hum Genet.* 71:1420-7.
- Slater HR, Bruno DL, Ren H, Pertile M, Schouten JP, Choo KH. Rapid, high throughput prenatal detection of aneuploidy using a novel quantitative method (MLPA). 2003. *J Med Genet.* 40:907-12.
- Stern RF, Roberts RG, Mann K, Yau SC, Berg J, Ogilvie CM. Multiplex ligation-dependent probe amplification using a completely synthetic probe set. 2004. *Biotechniques.* 37:399-405.

- Taylor CF, Charlton RS, Burn J, Sheridan E, Taylor GR. Genomic deletions in MSH2 or MLH1 are a frequent cause of hereditary non-polyposis colorectal cancer: identification of novel and recurrent deletions by MLPA. 2003. *Hum Mutat.* 22:428–33.

- Thakker RV. Pathogenesis of Dent's disease and related syndromes of X-linked nephrolithiasis. 2000. *Kidney Int* 57:787-793.

- Ungewickell AJ, Majerus PW. Increased levels of plasma lysosomal enzymes in patients with Lowe syndrome. 1999. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:13342-4.

- Ungewickell A, Ward ME, Ungewickell E, Majerus PW. The inositol polyphosphate 5 phosphatase Ocri associates with endosomes that are partially coated with clathrin. 2004. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:13501-6.

- Utsch B, Bökenkamp A, Benz MR, Besbas N, Dötsch J, Franke I, Fründ S, Gok F, Hoppe B, Karle S, Kuwertz-Bröking E, Laube G, Neb M, Nuutinen M, Ozaltin F, Rascher W, Ring T, Tasic V, van Wijk JA, Ludwig M. Novel OCRL1 mutations in patients with the phenotype of Dent disease. 2006. *Am J Kidney Dis.*48:942.e1-14.

- White SJ, Vink GR, Kriek M, Wuyts W, Schouten J, Bakker B, Breuning MH, den Dunnen JT. Two-color multiplex ligation-dependent probe amplification: detecting genomic rearrangements in hereditary multiple exostoses.2004. *Hum Mutat.* 24:86-92.

- Whisstock JC, Wiradjaja F, Waters JE, Gurung R. The structure and function of catalytic domains within inositol polyphosphate 5-phosphatases. 2002. *IUBMB Life.* 53: 15-23.

- Wimmer K, Yao S, Claes K, Kehrer-Sawatzki H, Tinschert S, De Raedt T, Legius E, Callens T, Beiglböck H, Maertens O, Messiaen L. Spectrum of single- and multiexon NF1 copy number changes in a cohort of 1,100 unselected NF1 patients. 2006. *Genes Chromosomes Cancer.* 45:265-76.

- Wrong O, Norden AGW, Feest TG. Dent's disease: a familial proximal renal tubular syndrome with low-molecular-weight proteinuria, hypercalciuria, nephrocalcinosis, metabolic bone disease, progressive renal failure and a marked male predominance. 1994. *QJM* 87:473-493.

- Zeng F, Ren ZR, Huang SZ, Kalf M, Mommersteeg M, Smit M, White S, Jin CL, Xu M, Zhou DW, Yan JB, Chen MJ, van Beuningen R, Huang SZ, den Dunnen J, Zeng YT, Wu Y. Array-MLPA: comprehensive detection of deletions and duplications and its application to DMD patients. 2008. *Hum Mutat.* 29:190-7.

- Zhang X, Jefferson AB, Auethavekiat V, Majerus PW. The protein deficient in Lowe syndrome is a phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 5-phosphatase. 1995. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:4853-6.

- Zhi J, Hatchwell E. Human MLPA Probe Design (H-MAPD): a probe design tool for both electrophoresis-based and bead-coupled human multiplex ligation-dependent probe amplification assays. 2008. *BMC Genomics.* 9:407.

ANNEXES

Exons Introns	Start	End	Length	Sequence
5'NTR + Exon 1	128,674,252	128,674,455	204	TCTCAGCTCCCAGCTCCCCGCTCCCGGCTCCCGGCGCCCGGCGCCCGGCGCGGAGCTGTT CCTCAAACGACACGCAGCCGAGGTGGGTGGGTGTGGGACGCGGGAGCCAGTGTCTCGG ATCGGCCCGCAGTCCGCTGTCTGCTGAGCCCGGAGGCCGCCTGGATGGAGCCCGCCTC CCGGTCCGAGCCCAGCCGCTTGCC
Intron 1-2	128,674,456	128,674,720	265	gtatccgccggagagaagggagagg.....ggagacccttgactagcgcgccgcat
Exon 2	128,674,721	128,674,800	80	ACTGTCGAGGGTATGGAGATGAAGGGTCCTCTCCGGGAGCCCTGCGCCCTGACCCTAGCC CAGAGGAACGGGCAATATGA
Intron 2-3	128,674,801	128,678,934	4,134	gtaagtaaccacctgattcccacag.....tttgatgcgcttcttctgtttcctag
Exon 3	128,678,935	128,679,014	80	GTTAATAATCCAGTTGCATGAGAAGGAACAGCATGTTCAAGATATCATTCCTATAAATAG CCACTTCAGATGTGTTCAAG
Intron 3-4	128,679,015	128,682,539	3,525	gtactagctttaattccttagctag.....tactctctttttttcccctctcag
Exon 4	128,682,540	128,682,578	39	AAGCAGAAGAAACTCTTTTGATTGACATAGCTTCTAACA
Intron 4-5	128,682,579	128,691,301	8,723	gtgagtatctttctgaatgtgcttg.....atgtatggatttcaattctttttag
Exon 5	128,691,302	128,691,412	111	GTGGCTGCAA AATTCCGGTT CAGGGGACTGGATCAGAGAGCGCCGCTTTGAAATCCCTG ATGAGGAACACTGTTTGAAGTTCCTCTCAGCTGTCCTTGCTGCTCAGAAAG
Intron 5-6	128,691,413	128,691,837	425	gtaactaaagactcagcgattttct.....ctgaccatgaaccttatctctctag
Exon 6	128,691,838	128,691,927	90	CTCAGTCACAGCTTCTTGTTCAGAGCAAAGGACTCATCTAGCTGGTACCAGAAATTAG ACACTAAGGACAAACCTTCTGTTTTTTCAG
Intron 6-7	128,691,928	128,692,609	682	gtactaaaaagttcctggtttcctt.....tgactttggggctctgtgtctttcag

Exons Introns	Start	End	Length	Sequence
Exon 7	128,692,610	128,692,730	121	GGCTTCTTGGATTTGAAGACAATTTTTCTTCTATGAATTTGGACAAGAAAATAAATTCAC AAAATCAGCCTACTGGGATTCATCGGGAACCCCCACCTCCACCCTTTTCAGTGAATAAAA T
Intron 7-8	128,692,731	128,692,816	86	<i>gtaagtcccatgtgaaaacatattt.....tttgaatctctcatttatttgctag</i>
Exon 8	128,692,817	128,692,978	162	GCTTCCACGTGAAAAAGAAGCTTCTAACAAGGAGCAGCCCAAAGTGACCAACACCATGCG GAAGCTCTTTGTACCAAATACCCAATCTGGGCAGCGGGAGGGTCTCATCAAACATATCCT GGCAAAGCGAGAGAAAGAATATGTCAACATTCAGACTTTCAG
Intron 8-9	128,692,979	128,694,526	1,548	<i>gttagtgtctcttttgcttcctgag.....attatcttttcgtattatgtattag</i>
Exon 9	128,694,527	128,694,628	102	ATTTTTTGTGGAACTTGGAAATGTGAATGGCCAGTCTCCAGATAGCGGGTTAGAACCTTG GCTGAACTGTGATCCCAATCCTCCTGATATCTACTGCATTGG
Intron 9-10	128,694,629	128,695,155	527	<i>gtaaagaacacttctggaatttct.....gatctcatatcccttttttctcag</i>
Exon 10	128,695,156	128,695,270	115	ATCCAAGAACTGGACTTGAGCACAGAAGCCTTCTTCTACTTTGAATCTGTGAAGGAACA AGAATGGTCCATGGCTGTAGAGAGAGGTTTGCATTCAAAGCCAAGTATAAGAAA
Intron 10-11	128,695,271	128,696,360	1,090	<i>gtaagccgcatttaattatctttt.....ttttgtaactccccggaactcatag</i>
Exon 11	128,696,361	128,696,477	117	GTTCAACTGGTGCGCCTTGTGGGATGATGCTTCTTATATTTGCCAGAAAGGATCAGTGT CGATACATTCGTGATATTGCTACAGAAACAGTTGGAACTGGAATCATGGGGAAAATG
Intron 11-12	128,696,478	128,696,575	98	<i>gtgagttactttggaatgagcttg.....attgaataattactcttgctaacag</i>
Exon 12	128,696,576	128,696,763	188	GGAAACAAAGGTGGGGTAGCTGTGAGATTTGTATTTACAACACCACCTTTTGCATTGTC AATCCCATCTGGCTGCACACGTGGAGGACTTTGAGAGAAGGAATCAAGATTATAAGGAC ATTTGTGCGAGAATGAGTTTTGTGGTCCCAAATCAGACCCTCCCGCAGTTGAACATCATG AAACATGA
Intron 12-13	128,696,764	128,699,748	2,985	<i>gtaagtggttaactcacctgtagcc.....gttcatacatttttttgatccttag</i>
Exon 13	128,699,749	128,699,860	112	GGTTGTCATTTGGTTGGGAGATTTGAATTATAGACTTTGCATGCCTGATGCCAATGAGGT GAAAAGTCTTATTAATAAGAAAGACCTTCAGAGACTCTTGAAATTCGACCAG
Intron 13-14	128,699,861	128,701,230	1,370	<i>gtaagtaagtttcattttatagga.....attgatgcttctttctatctgtag</i>

Exons Introns	Start	End	Length	Sequence
Exon 14	128,701,231	128,701,340	110	CTAAATATTCAGCGCACACAGAAAAAGCTTTTGTGACTTCAATGAAGGGGAAATCAAG TTCATCCCCACTTATAAGTATGACTCTAAAACAGACCGGTGGGATTCCAG
Intron 14-15	128,701,341	128,703,240	1,900	gtaaagtaataagaaccttctcaca.....ttataactcgtttctttacttacag
Exon 15	128,703,241	128,703,376	136	TGGGAAATGCCGGTTCACGCCTGGTGTGACCGAATTCCTTGGAGAGGAACAAATGTTAA TCAGCTTAATTATCGGAGTCACATGGAACGAAAACCAGCGACCACAAGCCTGTTAGCGC CCTCTTCCATATTGGG
Intron 15-16	128,703,377	128,709,116	5,740	gtaaacacttgtttgtacattcatt.....gaaaagaggatacattttctttcag
Exon 16	128,709,117	128,709,227	111	GTGAAGGTTGTGGATGAACGAAGGTACCGGAAAGTCTTTGAAGATAGTGTACGCATCATG GACAGAATGGAAAATGACTTCCTTCCTTCCTTAGAACTCAGCAGGAGGGAG
Intron 16-17	128,709,228	128,709,873	646	gtgagcaaaaatacatgatctccct.....tttgtgtctgtctgttattccccag
Exon 17	128,709,874	128,710,039	166	TTTGTGTTTAAAATGTGAAGTTTCGGCAACTACAAAAGGAGAAGTTCAGATCAGCAAC AATGGACAGGTTCCCTGCCATTTTTCTTTCATCCCTAACTTAATGACAGCCAGTACTGC AAGCCATGGCTTCGGGCTGAACCTTTTGAGGGCTACTTGGAGCCAA
Intron 17-18	128,710,040	128,710,293	254	gtgagttttccctttaccattgtct.....ccatgtatcatctcttacatttcag
Exon 18	128,710,294	128,710,529	236	ATGAGACAGTGGACATTTCTCTTGATGTGTATGTCAGCAAAGACTCTGTAACCATCCTGA ACTCGGGAGAAGATAAGATTGAAGATATTCTCGTCCTTCACCTGGATCGAGGCAAAGATT ACTTCTTGACTATCAGTGGAAATTACCTCCCAAGTTGTTTTGGCACATCCTTAGAGGCTC TGTGCCGTATGAAAAGACCAATCCGAGAAGTTCCTGTTACCAAACCTCATAGACTTG
Intron 18-18a	128,710,530	128,718,320	7,791	gtaagaactgtcccaagacataaac.....ctttctttcctgctccgctctcag
Exon 18a	128,718,321	128,718,344	24	GAAGAAGACAGCTTCCTAGAAAAG
Intron 18a-19	128,718,345	128,720,978	2,634	gtaatgcaatccattggtggttatg.....attctcatacttttccatctattag
Exon 19	128,720,979	128,721,095	117	GAGAAATCCCTTCTGCAAATGGTTCCTTTGGATGAAGGTGCCAGTGAGAGACCCCTTCAG GTTCCCAAGGAGATCTGGCTTCTAGTAGATCACCTATTCAAATACGCTGTACCAG
Intron 19-20	128,721,096	128,722,155	1,060	gtaagtgagagtagaccttccctac.....cccttcattctgacttctttggtag

Exons Introns	Start	End	Length	Sequence
Exon 20	128,722,156	128,722,240	85	GAGGACCTGTTCCAGACCCCTGGAATGCAGGAAGAGCTCCAGCAGATCATTGATTGTCTG GATACCAGCATTCCCTGAGACAATCC
Intron 20-21	128,722,241	128,722,862	622	gtatcctttgcgaccaaagcttaag.....tttcccttgacttaagttgattcag
Exon 21	128,722,863	128,722,990	128	CTGGCAGCAACCACTCTGTGGCTGAAGCACTGCTCATTTTCTTGGAAAGCCCTGCCAGAGC CAGTCATCTGTTACGAGCTGTATCAGCGATGTCTTGACTCTGCTTATGATCCCCGGATCT GCCGACAG
Intron 21-22	128,722,991	128,723,821	831	gtgggttctactgacctggggatgt.....tgctgcccctatTTTTAAAAACAG
Exon 22	128,723,822	128,723,933	112	GTGATCTCCCAGCTTCCGAGATGCCATAGAAATGTTTTCCGTTACTTGATGGCATTCCCTT CGAGAACTCTTAAAATTCTCTGAATACAATAGCGTCAATGCCAACATGATCG
Intron 22-23	128,723,934	128,724,122	189	gtaagagtgttcatgcaacacggg.....cgcttgtctttctctcgtcttgtag
Exon 23 + 3'NTR	128,724,123	128,726,528	2,406	CTACTCTCTTCACTAGTCTTCTCCTGAGGCCTCCACCCAACCTTATGGCAAGACAGACTC CAAGTGACCGCCAGCGTGCTATT CAGTTCCTTCTGGGCTTTCTGCTTGGGAGCGAAGAAG ACTAAGGCTTTTACTGTTCTCTGATATTCTAGAAGCAGACGATCTCGGGCTCCAAGTATT TCAGAATGATTTAAAAAGTCATGCCACAGGAAGGGTCTATTGCAGAATTTCAAGTTCGT TTATAGTAAAAAGGAAGAGCGTTTTCTAATCCCTCCTTTACCATATCCTACACAGAAAAA TACTTTTAGACTTATATTGCCAAGCCAAAGTTACCATATTTTGGTGTTTTTGTGTTTTCT CTTTATAAGGCAAAAAGATCTGTATTTACACTCCTCACCTAGGGATGTGTTTGTGCCC TCCTACCCAATTGTCATGATTGTCCTTAGTACCCTAGGCCTAGATTCTGAGATCTTCCCA TTCTAGGCCTACAAGCACTACTTGCTGTAGCTGAGACTTGTCTAGAGTCCTTTGTTTTGC ACTTTTGACCCACCCCTTCCCTGGATCACTCCTTTGCACTCCACTCCCCTCGTTCTGTCAC TTTGAACGAAGTCTGAGTGAGGCTAGTGA CTCTTGGGTGTCTCAACAGTGAATTCAC T GTCTGCGTGCAGTTATTACATGCATTTGTGCATTTCTACTACAATGGCATCTTTATGTCT CTGTAACATTGGCCTTTTCATGGCTCCACACTGGGTGGAACCATATTCTCTTAGATCACA TTTAGTAGCATAACTGTAGGACTATTAGAGATGGCATCTCATCGATGAGAGAGAATCAC ...

Annexe 1 : Séquence des exons du gène *OCRL1* (en noir), de leurs bornes introniques (en bleu) et des extrémités 5' et 3' non traduites (5'-NTR ; 3'NTR en violet) (ENSG00000122126). Le nucléotide n°1 correspond au A de l'ATG souligné en rouge, début de la traduction. La taille (length) des exons et des introns est indiquée en nombre de paires de bases (pb). La position de la première (start) et de la dernière (end) base des exons et des introns est indiquée en partant du télomère du bras court du chromosome X.

5'-non traduit

-165 TCTCA GCTCCCAGCT CCCCCTCCC GGCTCCCAGC GCCCGGCGCC
 -120 CGGCGCGGAG CTGTTCCCTCA AACGACACGC AGCCGAGGTG GGTGGGTGTG GGGACGCGGG
 -60 AGCCAGTGTC GTCGGATCGG CCCGCAGTCC GCTGTCTGCT TGAGCCCGGA GGCCGCTTGG

ADNc codant

1	ATG GAGCCGC	CGCTCCCAGT	CGGAGCCAG	CCGCTTGCCA	TGTCGAGGG	TATGGAGATG	Exon 1
61	AAGGGTCCTC	TCCGGGAGCC	CTGCGCCCTG	ACCCTAGCCC	AGAGGAACGG	GCAATATGAG	Exon 2
121	TAAATAATCC	AGTTGCATGA	GAAGGAACAG	CATGTTCAAG	ATATCATTCC	TATAAATAGC	Exon 3
181	CACCTCAGAT	GTGTTCAAGA	AGCAGAAGAA	ACTCTTTTGA	TTGACATAGC	TTCTAACAGT	Exon 4
241	GGCTGCAAAA	TTCGGGTTCA	GGGGGACTGG	ATCAGAGAGC	GCCGCTTTGA	AATCCCTGAT	Exon 5
301	GAGGAACACT	GTTTGAAAGT	CCTCTCAGCT	GTCCTTGCTG	CTCAGAAAAG	TCAGTCACAG	Exon 6
361	CTTCTTGTTT	CAGAGCAAAA	GGACTCATCT	AGCTGGTACC	AGAAATTAGA	CACTAAGGAC	Exon 7
421	AAACCTTCTG	TTTTTTTCAGG	GCTTCTTGGA	TTTGAAAGACA	ATTTTTCTTC	TATGAATTTG	Exon 8
481	GACAAGAAAA	TAAATTCACA	AAATCAGCCT	ACTGGGATTC	ATCGGGAACC	CCCACCTCCA	Exon 9
541	CCCTTTTTCAG	TGAATAAAAT	GCTTCCACGT	GAAAAAGAAG	CTTCTAACAA	GGAGCAGCCC	Exon 10
601	AAAGTGACCA	ACACCATGCG	GAAGCTCTTT	GTACCAAATA	CCCAATCTGG	GCAGCGGGAG	Exon 11
661	GGTCTCATCA	AACATATCCT	GGCAAAGCGA	GAGAAAGAAT	ATGTCAACAT	TCAGACTTTC	Exon 12
721	AGATTTTTTTG	TTGGAACCTG	GAATGTGAAT	GGCCAGTCTC	CAGATAGCGG	GTTAGAACCT	Exon 13
781	TGGCTGAACT	GTGATCCCAA	TCCTCCTGAT	ATCTACTGCA	TTGGATTCCA	AGAAGTGGAC	Exon 14
841	TTGAGCACAG	AAGCCTTCTT	CTACTTTGAA	TCTGTGAAGG	AACAAGAATG	GTCCATGGCT	Exon 15
901	GTAGAGAGAG	GTTTGCAATC	CAAAGCCAAG	TATAAGAAAAG	TTCAACTGGT	GCGCCTTGTT	Exon 16
961	GGGATGATGC	TTCTTATATT	TGCCAGAAAAG	GATCAGTGTC	GATACATTCC	TGATATTGCT	Exon 17
1021	ACAGAAACAG	TTGGAACCTGG	AATCATGGGG	AAAATGGGAA	ACAAAGGTGG	GGTAGCTGTG	Exon 18
1081	AGATTTGTAT	TTCAACAAC	CACCTTTTGC	ATTGTCAATT	CCCATCTGGC	TGCACACGTG	Exon 19
1141	GAGGACTTTG	AGAGAAGGAA	TCAAGATTAT	AAGGACATTT	GTGCGAGAAT	GAGTTTTGTG	Exon 20
1201	GTCCCAAATC	AGACCCTCCC	GCAGTTGAAC	ATCATGAAAC	ATGAGGTTGT	CATTTGGTTG	Exon 21
1261	GAGGATTTGA	ATTATAGACT	TTGCATGCCT	GATGCCAATG	AGGTGAAAAG	TCTTATTAAT	Exon 22
1321	AAGAAAAGACC	TTCAAGAGACT	CTTGAAATTC	GACCAGCTAA	ATATTAGCGC	CACACAGAAA	Exon 23
1381	AAAGCTTTTG	TTGACTTCAA	TGAAGGGGAA	ATCAAGTTCA	TCCCCACTTA	TAAGTATGAC	Exon 24
1441	TCTAAAACAG	ACCGGTGGGA	TTCCAGTGGG	AAATGCCGGG	TTCCAGCCTG	GTGTGACCGA	Exon 25
1501	ATTCTTTTGG	GAGGAACAAA	TGTTAATCAG	CTTAATTATC	GGAGTCACAT	GGAAGTGAAG	Exon 26
1561	ACCAGCGACC	ACAAGCCTGT	TAGCGCCCTC	TTCCATATTG	GGGTGAAGGT	TGTGGATGAA	Exon 27
1621	CGAAGGTACC	GGAAAGTCTT	TGAAGATAGT	GTACGCATCA	TGGACAGAAT	GGAAAATGAC	Exon 28
1681	TTCTTTCCTT	CCTTAGAACT	CAGCAGGAGG	GAGTTTGTGT	TTGAAAATGT	GAAGTTTCGG	Exon 29
1741	CAACTACAAA	AGGAGAAGTT	CCAGATCAGC	AACAATGGAC	AGGTTCCCTG	CCATTTTTCT	Exon 30
1801	TTCATCCCTA	AACTTAATGA	CAGCCAGTAC	TGCAAGCCAT	GGCTTCGGGC	TGAACCTTTT	Exon 31
1861	GAGGGTACT	TGGAGCCAAA	TGAGACAGTG	GACATTTCTC	TTGATGTGTA	TGTCAGCAAA	Exon 32
1921	GACTCTGTAA	CCATCCTGAA	CTCGGGAGAA	GATAAGATTG	AAGATATTCT	CGTCCTTCAC	Exon 33
1981	CTGGATCGAG	GCAAAGATTA	CTTCTTGACT	ATCAGTGGAA	ATTACCTCCC	AAGTTGTTTT	Exon 34
2041	GGCACATCCT	TAGAGGCTCT	GTGCCGTATG	AAAAGACCAA	TCCGAGAAGT	TCCTGTTACC	Exon 35
2101	AAACTCATAG	ACTTGGAAAG	AGACAGCTTC	CTAGAAAAGG	AGAAATCCCT	TCTGCAAATG	Exon 36
2161	GTTCCTTTGG	ATGAAGGTGC	CAGTGAGAGA	CCCCTTCCAGG	TTCCCAAGGA	GATCTGGCTT	Exon 37
2221	CTAGTAGATC	ACCTATTCAA	ATACGCCTGT	CACCAGGAGG	ACCTGTTCCA	GACCCCTGGA	Exon 38
2281	ATGCAGGAAG	AGCTCCAGCA	GATCATTGAT	TGTCTGGATA	CCAGCAATCC	TGAGACAATC	Exon 39
2341	CTTGGCAGCA	ACCCTCTGTT	GGTGAAGCA	CTGCTCATTT	TCTTGGAAAGC	CCTGCCAGAG	Exon 40
2401	CCACTCATCT	GTTACGAGCT	GTATCAGCGA	TGTCTTGACT	CTGCTTATGA	TCCCCGGATC	Exon 41
2461	TGCCGACAGG	TGATCTCCCA	GCTTCCGAGA	TGCCATAGAA	ATGTTTTCCG	TTACTTGATG	Exon 42
2521	GCATTCCTTC	GAGAACTCTT	AAAATTTCTCT	GAATACAATA	GCGTCAATGC	CAACATGATC	Exon 43
2581	GCTACTCTCT	TCACTAGTCT	TCTCCTGAGG	CCTCCACCCA	ACCTTATGGC	AAGACAGACT	Exon 44
2641	CCAAGTGACC	GCCAGCGTGC	TATTCAGTTC	CTTCTGGGCT	TTCTGCTTGG	GAGCGAAGAA	Exon 45
2701	GACTAA						

3'-non traduit

```

2667      GGCT TTTACTGTTC TCTGATATTC TAGAAGCAGA CGATCTCGGG CTCCAAGTAT
2721  TTCAGAATGA TTTAAAAAGT CATGCCACAG GAAGGGTCTA TTGCAGAATT TCAAGTTCTG
2781  TTTATAGTAA AAAGGAAGAG CGTTTCCTAA TCCCTCCTTT ACCATATCCT ACACAGAAAA
2841  ATACTTTTAG ACTTATATTG CCAAGCCAAA GTTACCATAT TTTGGTGTTT TTGTGTTTTC
2901  TCTTTATAAG GCAAAAAGAT CTGTATTTAC ACTCCTTCAC CTAGGGATGT GTTTGTGGCC
2961  CTCCTACCCA ATTGTCATGA TTGTCCCTAG TACCCTAGGC CTAGATTCTG AGATCTTCCC
3021  ATTCTAGGCC TACAAGCACT ACTTGCTGTA GCTGAGACTT GTCTAGAGTC CTTTGTTTTG
3081  CACTTTTGAC CCACCCCTTC CTGGATCACT CCTTTGCACT CCACTCCCCT CGTTCTGTCA
3141  CTTTGAACGA AGTCTGAGTG AGGCTAGTGA CTCCTTGGGT GTCCTCAACA GTGAATTCAC
3201  TGTCTGCGTG CAGTTATTAC ATGCATTTGT GCATTTCTAC TACAATGGCA TCTTTATGTC
3261  TCTGTAACAT TGGCCTTTTC ATGGCTCCAC ACTGGGTGGA ACCATATTCT CTTAGTACAC
3321  ATTTAGTAGC ATAACTGTAG GGACTATTAG AGATGGCATC TCATCGATGA GAGAGAATCA
3381  CAATCAGAAT GGAAGCACTT TGAGTATCTG AAGAGTGAGA GCATTCATGT TTGACAGGTC
3441  CTGCTTCCCA CTATCCTTTT CCTGTTATTA TTCAAATTTT ACACAAGGAC TAATCCTGGG
3501  TGTCTCTGAG ACCCATCTCC TGCCTAGACA TCCACCTCCA GAGCAACACT GGCCCCACAG
3561  TAAAAGAGGA AGTCTTGAC  CTCAGGCAGG CCCATCTAGA GCTATTGCTC CTTCCACAG
3621  CAAAGGTATT GTGGATGACC CTTAGAATCC ATTCTCTGGT CTTCTGAAAT ACCAAGGGCA
3681  GATGTCACCT CCTTCCTCAG CAGGACTGAC TCTGGGCTCT ACAACCAGCT CCTTCACATA
3741  AAGGGTTTAG AGACTCCCCT TGGCTCCCAG TCACCATATC CAGTGTGTGT TAAAGAGACT
3801  GGCCAACAGG ACCAACCAAG CACCTTACCT CTCCCATACA AGATGACCCT CTGAGCTTTT
3861  CATTATTCA  AGCTCTGTGG TACAGCCTTT TTTTAAAATA AATTAATCTA TATTGGTTGA
3921  CAAACAAGCC ACCAACCCT  GACTGCAAAA CTGCCTGATG CAGTTGGGTT CCTCCTGGTT
3981  TTCTTTTGT  ACAACCACC  TTGCCTGTTT ACATTAATTG CAAGGAGCAT AACGTACAGG
4041  CTGTATGTAC AATCCTGGGC ATTGACTCTG TGACATTTCT AGCATATCCA AGGCACCACC
4101  AGTGATTTCT CCTGTTTCTT GGTGGGGGTG GGGGGGAAGG TACGTATTCT GCAATATGGC
4161  TAAACCCTTT CCTGATTGAG AGTTAAAGCA ATAGGAGTCA AGTTACTGGT GCCACAGATC
4221  TGGAGGTATG ATAGGTCAGG GGCTAGGTGT TGAACTTAGT TAATGGAAGA CTGAGAGCAG
4281  AACAGGTTTG TCATCTCCGC AAGGCCAGAA AGTGATCACA AAAAGAGGCA GATGATAGAC
4341  ACTGGGGTAG GGTCATACCA CAGGGAAATA CCTTTCCTGG GCTTGTTTTC TAGCATATCA
4401  CTGACCTGGG ATCTTTGGGT GATCAAGGTT GTGGTTAGTG GAGGCTCTGT CTGTCACGTA
4461  TGCAGTATCC TATCTCTTTC TACATCAGAT CAAAACACTA AGTTGGTGTA CTGCCTCGAC
4521  CTTTTTTCAG CTCATCCTGG AACATATACA GAGTTGAGAG TTTTAGACAA TCTCTAGGTA
4581  GAGGAGACAA GATGTAGACC CAGACAGAAG AAATCTGCTT CCCTACCATG GCTATTCCAG
4641  CACCCAACC  TGTAATTGCC AAGTCTCTA  AGGTAATAAT TTGTAGCTGC TCTGAAGTAA
4701  GGATTTCCGA TTCAGCTGGT AGGGAAAGAC TCTGCACCTG CTGTCTTAGG GAAGAAATGG
4761  TTCAAATCCA TGTGGTGACA TTGCATTAGT CTCCCTTCA CTGTTTTCTT ATTCTGTAAT
4841  TGTTTGTAT  ATTTCCAAA AACGCTTGA TCACTAAGCA AAGCTGCTAG TGGGATTCTA
4901  TATTTCTGTG CATCTTTTTT ATTATAATTT ATTGCAAATT TTTTCTGAA TAAATATATG
4961  TTGTGTGAAA AA

```

Annexe 2 : Séquence de l'ADNc codant d'*OCRL1* (NM_000276) ainsi que ses extrémités 5' et 3' non traduites. La séquence des différents exons est alternativement représentée en noir et en bleu au niveau de l'ADNc codant. En rouge sont représentés le codon start ATG et le codon stop TAA. Les polymorphismes de la région codante sont surlignés en **bleu** : c.51 C>T.



Serment des Apothécaires

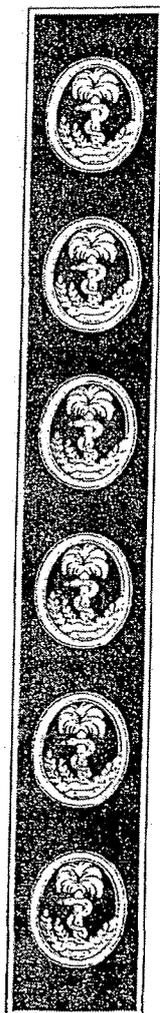
Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



COUTTON Charles

Mise au point du dosage génique du gène *OCRL1* par Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA). Application au syndrome de Lowe et à la maladie de Dent.

RESUME

Le syndrome de Lowe et la maladie de Dent sont deux maladies génétiques très rares de transmission récessive liée au chromosome X chez lesquelles des délétions du gène *OCRL1* ont été décrites. Bien que simple à détecter chez un homme, ces réarrangements sont délicats à mettre en évidence chez les femmes potentiellement conductrices de la maladie avec les techniques de diagnostic de première intention (ex : séquençage) en raison de la présence des deux chromosomes X et donc de 2 copies du gène *OCRL1*. Leur détection, de même que la détection d'autres réarrangements génomiques potentiellement causaux de la maladie tels que les duplications ou les délétions en mosaïque, imposent l'utilisation de techniques quantitatives complémentaires souvent longues, fastidieuses et peu résolutive.

La technique de Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) se distingue des autres techniques quantitatives par sa rapidité et son excellente résolution. Ainsi, 24 sondes MLPA spécifiques ont été modélisées et validées pour quantifier rapidement et simplement le gène *OCRL1*. Cette technique a permis de préciser le statut de conductrice de 5 femmes avec un apparenté atteint porteur d'une délétion génomique d'*OCRL1*. Enfin, malgré sa sensibilité, aucune délétion ou duplication n'a été retrouvée chez 15 patients présentant un tableau incomplet voire typique du syndrome de Lowe pour deux d'entre eux, et chez lesquels l'analyse préalable par séquençage d'*OCRL1* s'était révélée non contributive.

Notre technique MLPA spécifique du gène *OCRL1* est fiable et robuste et ainsi applicable en routine comme méthode diagnostique complémentaire du séquençage pour le syndrome de Lowe et la maladie de Dent. C'est un outil simple et performant pour déterminer le statut des femmes potentiellement conductrices de délétions. De plus les résultats de notre étude démontrent que les duplications du gène *OCRL1* sont des événements probablement exceptionnels. Ils fragilisent un peu plus l'hypothèse que les réarrangements génomiques en mosaïque ou les duplications contribueraient à expliquer la fraction de patients avec un phénotype plus ou moins complet et pour lesquels aucune mutation n'avait pu être identifiée avec les techniques conventionnelles.

MOTS CLES

Syndrome oculo-cérébro-rénal de Lowe, maladie de Dent, *OCRL1*, MLPA, délétions, duplications.

JURY

Pr. Renée GRILLOT
Pr. Joël LUNARDI
Pr. Pierre-Simon JOUK
Dr. Jean BRETON
Dr. Véronique SATRE

DATE DE SOUTENANCE

2 Octobre 2009