



(22) Date de dépôt/Filing Date: 2007/11/07

(41) Mise à la disp. pub./Open to Public Insp.: 2008/05/07

(30) Priorité/Priority: 2006/11/07 (CA2,565,935)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C12Q 1/68* (2006.01),
C40B 30/00 (2006.01), *C12N 15/12* (2006.01),
C07H 21/00 (2006.01), *C12P 19/34* (2006.01)

(71) Demandeur/Applicant:
BOREAL PHARMA RECHERCHE CLINIQUE, CA

(72) Inventeurs/Inventors:
GAUDET, DANIEL, CA;
PARADIS, FRANCOIS, CA

(74) Agent: FASKEN MARTINEAU DUMOULIN LLP

(54) Titre : METHODE ET TROUSSES DE DETECTION DE MUTATIONS ASSOCIEES A MALADIES GENETIQUES
RECESSIVES

(54) Title: METHOD AND KITS FOR DETECTING RECESSIVE MUTATIONS ASSOCIATED WITH GENETIC DISEASES

(57) **Abrégé/Abstract:**

La présente invention concerne une méthode permettant de déterminer, de manière simultanée, la présence ou l'absence de plusieurs mutations génétiques chez un individu. Les mutations envisagées par la présente invention sont préférentiellement des maladies génétiques récessives, lesquelles incluent l'acidose lactique, connue également sous le nom de variante canadienne française du syndrome de Leigh (LSFC), la tyrosinémie de type 1, la neuropathie sensitivomotrice héréditaire, avec ou sans agénésie du corps calleux (ACCPN) et l'ataxie spastique de Charlevoix-Saguenay (ARSACS). La présente invention concerne aussi des trousse permettant la réalisation de la méthode envisagée.



ABRÉGÉ

La présente invention concerne une méthode permettant de déterminer, de manière simultanée, la présence ou l'absence de plusieurs mutations génétiques chez un individu. Les

5 mutations envisagées par la présente invention sont préférablement des maladies génétiques récessives, lesquelles incluent l'acidose lactique, connue également sous le nom de variante canadienne française du syndrome de Leigh (LSFC), la tyrosinémie de type 1, la neuropathie sensitivomotrice héréditaire, avec ou sans agénésie du corps calleux (ACCPN) et l'ataxie spastique de Charlevoix-Saguenay (ARSACS). La présente invention concerne aussi des

10 trousses permettant la réalisation de la méthode envisagée.

MÉTHODE ET TROUSSES DE DÉTECTION DE MUTATIONS ASSOCIÉES À DES MALADIES GÉNÉTIQUES RÉCESSIVES

DOMAINE DE L'INVENTION

5 [0001] La présente invention concerne une méthode de détection d'une pluralité de mutations dans au moins une région d'ADN ciblée du génome humain, les mutations étant associées à des maladies génétiques récessives. L'invention permet ainsi d'identifier des porteurs de mutations associées à des maladies génétiques récessives.

DESCRIPTION DE L'ART ANTÉRIEUR

10 [0002] La région du Saguenay-Lac-St-Jean (SLSJ) au Canada présente un taux de porteurs de maladies génétiques à caractère récessif plus élevé que dans la majorité des autres régions canadiennes. Cette situation est attribuable à certains phénomènes historiques et démographiques, incluant l'effet fondateur (c.-à-d. la création d'une nouvelle population à partir d'un nombre relativement restreint d'individus provenant d'une population mère) et une
15 certaine homogénéité de la population.

[0003] Les maladies récessives les plus répandues dans cette région incluent l'acidose lactique, connue également sous le nom de variante canadienne française du syndrome de Leigh (LSFC), la tyrosinémie de type 1, la neuropathie sensitivomotrice héréditaire, avec ou sans agénésie du corps calleux (ACCPN) et l'ataxie spastique de Charlevoix-Saguenay
20 (ARSACS).

[0004] Puisque ces maladies génétiques ont un caractère récessif (c.-à-dire que pour être atteint, un individu doit avoir deux allèles inopérants ou être homozygote muté) et que la majorité des individus porteurs de ces mutations sont hétérozygotes et ne développent pas de symptômes associés à ces maladies, l'identification des individus porteurs de telles mutations
25 est difficile. Une telle identification des individus porteurs est toutefois souhaitable, voir essentielle, particulièrement lors de la planification des naissances. En effet, les enfants issus de la procréation entre deux individus hétérozygotes porteurs développent, dans

approximativement 25% des cas, la maladie génétique à caractère récessif. Considérant que le taux de porteurs hétérozygotes de mutations associées à l'une de ces maladies s'élève à environ 1 individu sur 20 dans certaines populations (dont celle du SLSJ), le nombre de descendants atteints de l'une de ces maladies est important.

- 5 [0005] Au cours des dernières années, les percées en matière de génie génétique humaine ont permis d'identifier différentes variations génétiques récessives associées à chacune de ces maladies. Plus spécifiquement, une substitution de la cytosine en position 1119 par une thymidine (1119C/T) sur le gène *LRPPRC* (ou *Leucine-rich PPR motif-containing protein*) est associée avec l'acidose lactique (Mootha VK, *et al.* « Identification of a gene causing
- 10 human cytochrome c oxidase deficiency by integrative genomics». *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jan 21;100(2):605-10). Par ailleurs, la mutation IVS12+5G/A sur le gène *FAH* (ou *Fumarylacetoacetate hydrolase*) est associée à la tyrosinémie de type 1 (Grompe M, *et al.*, « A single mutation of the fumarylacetoacetate hydrolase gene in French Canadians with hereditary tyrosinemia type I». *N. Engl. J. Med.* 1994 Aug 11;331(6):353-7) alors que la
- 15 mutation 2436delG sur le gène *SLC12A6* (ou *Solute carrier family 12 potassium chloride transporters member 6*) est associée à la polyneuropathie (Howard HC, *et.al.*, « The K-Cl cotransporter KCC3 is mutant in a severe peripheral neuropathy associated with agenesis of the corpus callosum». *Nat. Genet.* 2002 Nov;32(3):384-92.) Enfin, une association a été établie entre les mutations 6594delT et 5254C/T sur le gène de *SACS* (ou *Spastic ataxia of*
- 20 *Charlevoix-Saguenay*) et l'ataxie spastique de Charlevoix-Saguenay (Engert JC, *et. al.*, « ARSACS, a spastic ataxia common in Northeastern Quebec, is caused by mutations in a new gene encoding an 11.5-kb ORF». *Nat. Genet.* 2000, Feb;24(2):120-5).

- [0006] L'identification de telles mutations a permis la mise au point de certains tests de dépistage génétique. Les tests existants reposent en grande partie sur l'amplification de
- 25 fragments d'ADN génomique d'intérêt des individus soumis au dépistage et par le séquençage desdits fragments, lesquels test ont été décrits dans l'art. Bien qu'elles suscitent un certain intérêt, les méthodes de dépistage génétique actuelles présentent également certains inconvénients. Par exemple, le dépistage des cinq mutations ci-haut identifiées chez

un individu requiert le prélèvement d'échantillons d'acides nucléiques multiples, lesquels échantillons doivent ensuite être acheminés dans des laboratoires accrédités distincts pour des fins d'analyse.

[0007] De façon usuelle, les échantillons font l'objet de cinq analyses distinctes par séquençage directe, soit une analyse pour chacune des mutations identifiées en lien avec les maladies génétiques récessives décrites ci-haut et les laboratoires dans lesquels sont effectuées les analyses sont généralement situés à l'extérieur de la région du SLSJ. Cette approche nécessite donc un transport d'échantillons et un grand nombre de manipulations techniques, telle l'extraction d'ADN, rendant cette méthodologie onéreuse et contribuant à accroître les délais nécessaires à l'obtention des résultats. En cas d'urgence, comme par exemple lorsqu'une grossesse est en cours, des coûts supplémentaires sont engendrés pour obtenir les résultats de manière expéditive, rendant les méthodologies actuelles peu flexibles. Finalement, le volume de tests à effectuer est variable et le nombre d'échantillons à tester lors de chaque envoi aux laboratoires accrédités est généralement petit, ce qui contribue également à maintenir élevés les coûts associés à de tels tests génétiques.

[0008] Puisque les tests de dépistage actuels sont peu économiques, les programmes de dépistage à grande échelle représentent un défi (p. ex. dans le cadre d'un programme populationnel de dépistage). Ainsi, le processus de dépistage actuellement en usage dans la région du SLSJ pour le dépistage des maladies récessives ne vise que certains groupes d'individus et repose sur la couverture en cascades familiales. Sommairement, lorsqu'un individu d'une cascade familiale se présente au service de conseil génétique de son établissement pour le dépistage d'une maladie génétique récessive, le dépistage des autres maladies génétiques récessives d'intérêt lui est proposé. Ainsi, les individus n'appartenant pas à de telles cascades familiales, mais néanmoins à risque d'être porteurs de certaines mutations génétiques ont un accès plus restreint au dépistage génétique.

[0009] Il serait donc souhaitable de pouvoir bénéficier d'une technologie simple, flexible et économique permettant de déterminer chez un grand nombre d'individus la présence de mutations génétiques récessives. Une telle technologie pourrait

avantageusement permettre de déterminer, de manière simultanée et au sein d'un même laboratoire, la présence ou l'absence de mutations associées à plusieurs maladies génétiques récessives.

SOMMAIRE DE L'INVENTION

5 **[0010]** Selon un mode de réalisation de la présente invention, une méthode pour détecter la présence ou l'absence de mutations dans le génome d'un individu est fournie. La méthode comprend (a) amplifier simultanément une pluralité de fragments d'acides nucléiques de l'individu pour obtenir un produit d'amplification, chacun desdits fragments chevauchant la position de l'une des mutations; (b) hybrider le produit d'amplification avec un premier jeu
10 de sondes incluant un nombre de sondes correspondant à ladite pluralité de fragments; et (c) détecter la présence des marqueurs spécifiques.

[0011] Selon un aspect de l'invention, chacune des sondes du premier jeu est adaptée pour s'hybrider spécifiquement à un des fragments amplifiés lorsqu'il comporte une des mutations. Chacune des sondes est couplée à un marqueur spécifique. La détection d'un
15 marqueur spécifique à une sonde du premier jeu indique la présence d'une mutation correspondante dans le génome de l'individu. Le premier jeu de sondes inclut préférentiellement au moins une sonde ayant une séquence correspondant à l'une des SEQ. ID. NO 12, SEQ. ID. NO 14, SEQ. ID. NO 16, SEQ. ID. NO 18 et SEQ. ID. NO 20.

[0012] Selon un autre aspect de l'invention, la méthode comprend également
20 l'hybridation du produit d'amplification avec un second jeu de sondes, laquelle hybridation a lieu avant de détecter la présence des marqueurs spécifiques. Le second jeu de sondes comprend un nombre de sondes correspondant à la pluralité de fragments et chacune des sondes du second jeu est adaptée pour s'hybrider spécifiquement à un des fragments amplifiés lorsqu'il correspond à un génotype sauvage. Chacune des sondes est couplée à un
25 marqueur spécifique, et la détection d'un marqueur spécifique à une sonde du second jeu indique l'absence d'une mutation correspondante dans le génome de l'individu. Le second jeu de sondes inclut préférentiellement au moins une sonde ayant une séquence correspondant à

l'une des SEQ. ID. NO 11, SEQ. ID. NO 13, SEQ. ID. NO 15, SEQ. ID. NO 17 et SEQ. ID. NO 19.

5 [0013] Selon un aspect additionnel, les fragments d'acides nucléiques sont des fragments d'ADN génomique, et préférentiellement des fragments de gènes et de façon préférentielle des gènes sont choisis parmi *LRPPRC*, *FAH*, *SLC12A6* et *SACS*.

[0014] Selon un autre aspect de la présente invention, l'une des mutations est associée à l'acidose lactique et est préférentiellement une substitution 1119C/T sur le gène *LRPPRC*.

[0015] Selon un autre aspect additionnel, l'une des mutations est associée à la tyrosinémie et est préférentiellement une mutation IVS12+5G/A sur le gène *FAH*.

10 [0016] Selon un aspect supplémentaire de la présente invention, l'une des mutations est associée à la neuropathie sensitivomotrice héréditaire, avec ou sans agénésie du corps calleux et préférentiellement une mutation 2436delG sur le gène *SLC12A6*.

15 [0017] Selon un autre aspect supplémentaire, l'une des mutations est associée à l'ataxie spastique de Charlevoix-Saguenay et est préférentiellement une mutation 6594delT ou une mutation 5254C/T sur le gène *SACS*.

[0018] Selon un aspect additionnel de la présente invention, l'amplification des fragments est réalisée à l'aide d'une des paires d'amorces choisies parmi les SEQ. ID NO. 1 et SEQ. ID. NO. 2; SEQ. ID NO. 3 et SEQ. ID. NO. 4; SEQ. ID NO. 5 et SEQ. ID. NO. 6; SEQ. ID NO. 7 et SEQ. ID. NO. 8; et SEQ. ID NO. 9 et SEQ. ID. NO. 10.

20 [0019] Toujours selon un autre mode de réalisation de l'invention, une trousse pour déterminer simultanément la présence ou l'absence d'une pluralité de mutations dans le génome d'un individu est fournie. La trousse comprend un jeu d'amorces permettant d'amplifier simultanément une pluralité de fragments d'acides nucléiques de l'individu pour obtenir un produit d'amplification. Le jeu d'amorces inclut préférentiellement au moins une

amorce correspondant à l'une des séquences choisie parmi les SEQ. ID. NO. 1 à SEQ. ID. NO. 10.

5 [0020] Selon un aspect additionnel, la trousse comprend également un premier jeu de sondes incluant un nombre de sondes correspondant à la pluralité de fragments. Chacune des sondes du premier jeu est adaptée pour s'hybrider spécifiquement à un des fragments lorsqu'il comporte une des mutations. De manière préférable, le premier jeu de sondes inclut au moins une sonde ayant une séquence correspondant à l'une des SEQ. ID. NO 12, SEQ. ID. NO 14, SEQ. ID. NO 16, SEQ. ID. NO 18 et SEQ. ID. NO 20.

10 [0021] Selon un autre aspect additionnel, la trousse comprend également un second jeu de sondes incluant un nombre de sondes correspondant à la pluralité de fragments. Chacune des sondes du second jeu est adaptée pour s'hybrider spécifiquement à un des fragments lorsqu'il correspond à un génotype sauvage. Le second jeu de sondes inclut préférablement au moins une sonde ayant une séquence correspondant à l'une des SEQ. ID. NO 11, SEQ. ID. NO 13, SEQ. ID. NO 15, SEQ. ID. NO 17 et SEQ. ID. NO 19.

15 [0022] Selon un autre mode de réalisation de l'invention, une trousse pour déterminer simultanément la présence ou l'absence d'une pluralité de mutations dans une pluralité de fragments d'acide nucléiques d'un individu est fournie. La trousse comprend un premier jeu de sondes, chacune des sondes du premier jeu étant adaptée pour s'hybrider spécifiquement à l'un des fragments d'acide nucléique lorsqu'il comporte une des mutations. Le premier jeu
20 de sondes inclut préférablement au moins une sonde ayant une séquence correspondant à l'une des SEQ. ID. NO 12, SEQ. ID. NO 14, SEQ. ID. NO 16, SEQ. ID. NO 18 et SEQ. ID. NO 20.

[0023] Selon un aspect additionnel, chacune des sondes du second jeu est adaptée pour s'hybrider spécifiquement à un des fragments lorsqu'il correspond à un génotype sauvage.
25 Le second jeu de sondes inclut préférablement au moins une sonde ayant une séquence correspondant à l'une des SEQ. ID. NO 11, SEQ. ID. NO 13, SEQ. ID. NO 15, SEQ. ID. NO 17 et SEQ. ID. NO 19.

[0024] Enfin, selon un dernier aspect de la présente invention, la trousse comprend également un jeu d'amorces permettant d'amplifier simultanément la pluralité de fragments d'acides nucléiques de l'individu. L'amplification permet d'obtenir un produit d'amplification. Le jeu d'amorces inclut préférablement au moins une amorce correspondant
5 à l'une des séquences choisie parmi les SEQ. ID. NO. 1 à SEQ. ID. NO. 10.

BRÈVE DESCRIPTION DES FIGURES

[0025] Les modes de réalisation de la présente invention devraient être compris de façon plus claire en se référant à la description détaillée des modes de réalisation de l'invention en conjonction avec les dessins l'accompagnant, dans laquelle:

10 [0026] FIG. 1 est un graphique illustrant la valeur médiane de la fluorescence obtenue à partir de différents échantillons en utilisant les sondes spécifiques ALSASS et ALSASM-2;

[0027] FIG. 2 est un graphique illustrant la valeur médiane de la fluorescence obtenue à partir de différents échantillons en utilisant les sondes spécifiques TYRSSS-3 et TYRSSM-3;

15 [0028] FIG. 3 est un graphique illustrant la valeur médiane de la fluorescence obtenue à partir de différents échantillons en utilisant les sondes spécifiques PNPSSS et PNPSSM-3;

[0029] FIG. 4 est un graphique illustrant la valeur médiane de la fluorescence obtenue à partir de différents échantillons en utilisant les sondes spécifiques AS1SSS-3 et AS1SSM-3; et

20 [0030] FIG. 5 est un graphique illustrant la valeur médiane de la fluorescence obtenue à partir de différents échantillons en utilisant les sondes spécifiques AS2SSS et AS2SSM-2.

DESCRIPTION DÉTAILLÉE DE L'INVENTION

[0031] La description qui suit et les modes de réalisation qui y sont décrits, sont fournis par l'illustration d'un ou plusieurs exemple(s) de modes de réalisation de principes et

d'aspects de la présente invention. Ces exemples sont fournis dans un but d'explication et non de limitation des principes de l'invention.

[0032] Dans un premier mode de réalisation de la présente invention, une méthode de détection de la présence ou de l'absence de mutations dans le génome d'un individu est
5 fournie. La méthode de la présente invention est rapide, fiable, relativement abordable et permet de limiter les manipulations expérimentales requises pour la détermination de mutations associées à plusieurs maladies génétiques. Plus particulièrement, la méthode de la présente invention repose sur l'utilisation des outils présentement disponibles dans les domaines de la biologie moléculaire et des nanotechnologies afin de centraliser les analyses,
10 minimiser les frais afférents au transport et aux consommables et limiter les délais requis pour l'obtention des résultats. Ainsi, la présente méthode peut trouver une utilité dans le cadre d'un programme populationnel de dépistage où le volume d'échantillons à traiter par période de temps est important et planifiable.

[0033] De manière générale, la méthode de la présente invention permet l'amplification
15 simultanée de plusieurs fragments d'acides nucléiques d'intérêt et l'hybridation subséquente de ces fragments d'acides nucléiques avec des sondes spécifiques à chacune des mutations, l'hybridation des différents fragments étant réalisée simultanément, à partir d'un seul produit d'amplification et dans les mêmes conditions d'hybridation. La méthode permet également la détection simultanée d'un grand nombre de sondes spécifiques à chacune des mutations,
20 lesquelles sondes sont chacune marquée à l'aide d'un marqueur spécifique et indiquent la présence ou l'absence de mutations associées à des maladies génétiques récessives, tel qu'il sera décrit en détails ci-après. Cette approche est libellée « multiplexe » pour signifier l'application de la méthode pour la détection simultanée, dans un même et unique test, d'au moins deux mutations.

25 [0034] Les maladies génétiques récessives envisagées par la présente invention incluent les maladies génétiques récessives retrouvées plus communément dans la région du SLSJ, soit l'acidose lactique ou variante canadienne française du syndrome de Leigh (LSFC), la tyrosinémie de type 1, la neuropathie sensitivomotrice héréditaire, avec ou sans agénésie du

corps calleux (ACCPN) et l'ataxie spastique de Charlevoix-Saguenay (ARSACS), lesquelles maladies sont décrites plus en détails dans le Tableau 1 ci-dessous. Une personne versée dans l'art appréciera toutefois que la méthode de la présente invention peut aussi trouver une utilité dans la détection de mutations associées à d'autres maladies récessives issues, par exemple, d'un effet fondateur commun, telles la fibrose kystique et la mucopolysaccharidose de type 2. Cette même personne versée dans l'art comprendra que l'invention ne se limite pas seulement à la détection des mutations associées à des maladies génétiques récessives, mais qu'elle s'étend également à la détection d'autres mutations associées à d'autres maladies génétiques, soit à toute maladie associée à au moins une mutation dans au moins une région d'ADN génomique d'un individu.

TABLEAU 1
Liste des maladies récessives à incidence élevée dans la région du Saguenay-Lac-St-Jean

Maladies	OMIM ⁴ (Maladie)	GENE	OMIM (Gène)	Chromosome	Mutation	Références
LSFC ¹	220110	LRPPR C	607544	2p21	1119C/T	Mootha VK et al., (2003)
Tyrosinémie (Type 1)	276700	FAH	276700	15q25.1	IVS12+5G/A	Grompe M et al., (1994)
ACCPN ²	218000	SLC12 A	694878	15q13-q15	2436delG	Howard HC et al.,(2002)
ARSACS ³	270550	SACS	604490	13q12.12	6594delT 5254C/T	Engert JC et al., (2000)

¹LSFC : acidose lactique ou variante canadienne française du syndrome de Leigh.

²ACCPN : Neuropathie sensitivomotrice héréditaire avec ou sans agénésie du corps calleux.

15 ³ARSACS : Ataxie spastique de Charlevoix-Saguenay.

⁴OMIM : numéro dans la base de données *Online Mendelian Inheritance in Man*.

[0035] Selon un mode de réalisation préféré, la méthode de la présente invention inclut l'étape d'amplifier simultanément une pluralité de fragments d'acides nucléiques de l'individu pour obtenir un produit d'amplification. Dans ce mode de réalisation chacun des fragments amplifiés chevauche la position d'une mutation associée à l'une des maladies

génétiqes récessives. Les mutations associées aux maladies récessives sont préférablement choisies parmi la mutation 1119C/T sur le gène *LRPPRC* associée à l'acidose lactique (Leigh syndrome, LSFC), la mutation IVS12+5G/A sur le gène *FAH* associée à la tyrosinémie de type 1, la mutation 2436delG sur le gène *SLC12A6* associée à la polyneuropathie, la mutation
 5 6594delT sur le gène de *SACS* associée à l'ataxie spastique de Charlevoix-Saguenay et la mutation 5254C/T sur le gène de *SACS*, également associée à l'ataxie spastique de Charlevoix-Saguenay.

[0036] L'étape d'amplification est préférablement réalisée par la technique de réaction en chaîne de la polymérase ou PCR, à l'aide d'un jeu d'amorces sélectionné pour permettre
 10 d'amplifier simultanément, dans un même essai et suivant les mêmes conditions d'amplification, cinq (5) fragments d'acides nucléiques, chacun des fragments amplifiés chevauchant l'une des mutations décrites précédemment. Une personne versée dans l'art reconnaîtra que l'amplification peut s'appliquer à un nombre inférieur ou supérieur de fragments d'acides nucléiques, dans la mesure où les amorces sont adaptées pour permettre
 15 une telle amplification simultanée des fragments.

[0037] Les fragments d'acides nucléiques sont préférablement des fragments d'ADN génomique, et plus préférablement des régions géniques où un polymorphisme pour une maladie récessive visée existe. Ainsi, pour chaque maladie récessive visée, la région du gène propre à chacune des maladies considérées, où le polymorphisme pour la maladie récessive
 20 ciblée se retrouve, sera la région amplifiée par PCR. Par conséquent, chacune des séquences des amorces utilisées dans la réaction PCR correspond à une région du génome humain contenant le gène associé à la maladie récessive. L'étape d'amplification est donc réalisée à l'aide d'amorces spécifiques aux régions ciblées du génome.

[0038] Ainsi, puisque chacune des séquences des amorces utilisées dans la réaction PCR
 25 correspond à une région du gène associé à une maladie récessive (voir Tableau 2), lors de la réaction PCR, les amorces spécifiques aux régions déterminées contribuent à l'amplification de cette région du gène, et ce, dans des conditions d'amplification favorisant la production de

grandes quantités de fragments d'ADN afin d'obtenir des produits du PCR. Ces derniers peuvent être d'une longueur d'environ 200 nucléotides.

[0039] Dans un mode de réalisation de l'invention, le jeu d'amorces comprend cinq paires d'amorces, soit les amorces comprenant les séquences SEQ. ID. NO. 1 et SEQ. ID. NO. 2; SEQ. ID. NO. 3 et SEQ. ID. NO. 4; SEQ. ID. NO. 5 et SEQ. ID. NO. 6; SEQ. ID. NO. 7 et SEQ. ID. NO. 8; et SEQ. ID. NO. 9 et SEQ. ID. NO. 10, lesquelles séquences sont décrites plus en détails dans le Tableau 2 ci-dessous.

TABEAU 2
LISTE DES AMORCES ET LONGUEUR DES FRAGMENTS PRODUITS

Gène	Mutation	Amorces	Séquences	Modification	Longueur du fragment (pbs)	SEQ. ID. NO.
LRPPRC	1119C/T	AL5'-2bio	CTTCCCAGATGCAATGAACC	5'-biotine	155	1
	(A354V)	AL3'-2	CCGTATTTCATAGTCACACAGTG			2
FAH	IVS12+5G/A	TYR5'	CAGCAGCTCACTCACCACTC		237	3
		TYR3'bio	GCACCCAGAGAGAAAGGCTA	5'-biotine		4
SLC12A6	2436delG	PNP5'-2	CAGCTCAAAGCAGGAAAAGG		201	5
		PNP3'-2bio	CCTCCTAGATCACTCAGGAACAA	5'-biotine		6
SACS	6594delT	1AS5'	CTGTGGCGTGATGATAATGG		215	7
		1AS3'bio	CGGTTAACCTGGGAAAAACGA	5'-biotine		8
	5254C/T	2AS5'	TGCTGACATACCCAGGGAAG		114	9
		2AS3'-2bio	CCAAATTCTGTGCCAAGTGTT	5'-biotine		10

[0040] Dans un autre mode de réalisation préférentiel, au moins une des amorces utilisées dans la réaction de PCR a été modifiée préalablement à la réaction de PCR afin de comprendre une modification terminale à l'extrémité 5'. Selon ce mode de réalisation, l'extrémité 5' de l'amorce est liée à une molécule terminale, préférentiellement la biotine. Dans ce mode de réalisation préféré, la biotine est ultérieurement couplée à la streptavidine afin de permettre la liaison éventuelle d'un chromophore à l'extrémité 5' de chacun des fragments amplifiés par PCR. Le chromophore couplé à la streptavidine est préférentiellement la R-phycoérythrine (aussi connu sous le nom d'"Alexa 532" ou "Cy3"), laquelle est excitée à une longueur d'onde de 532 nm-13 mW par un laser yttrium aluminium garnet (YAG) de couleur verte. Tel qu'il sera décrit en détails ci-après, l'accouplement d'un chromophore aux fragments amplifiés par PCR permettra de détecter la fluorescence des brins d'acide nucléiques ayant une séquence complémentaire aux sondes d'hybridation utilisées et par le fait même, d'évaluer indirectement la liaison de ces brins d'acides nucléiques aux sondes spécifiques fixées à des microsphères.

[0041] Bien que la molécule terminale soit préférentiellement la biotine, une personne versée dans l'art comprendra que la molécule terminale est choisie parmi des molécules ayant des affinités particulières et connues pour d'autres molécules et que d'autres modifications terminales peuvent être apportées aux amorces de la réaction de PCR afin de coupler, à leur extrémité 5', une molécule permettant un accouplement avec d'autres molécules.

[0042] Il est entendu que l'étape d'amplification est réalisée à partir d'un échantillon d'acides nucléiques de l'individu, et préférentiellement à partir d'un échantillon d'ADN génomique. Ainsi, l'étape d'amplification peut inclure les étapes consistant à obtenir un échantillon d'ADN de l'individu et à préparer l'échantillon afin de le rendre utilisable pour la réaction de PCR. Un tel échantillon peut inclure tout type d'échantillon d'ADN, incluant un échantillon de sang, de salive ou de tissus. L'échantillon obtenu est préférentiellement traité afin d'isoler l'ADN génomique, de préférence par lyse cellulaire à l'aide d'une solution à base de détergents. Une personne versée dans l'art connaîtra d'autres méthodes d'isolement et

de purification d'ADN, lesquelles peuvent également être utilisées pour la réalisation de la méthode de la présente invention.

[0043] La méthode de la présente invention inclut également l'étape consistant à hybrider le produit d'amplification de la réaction de PCR avec un premier jeu de sondes. Le premier
5 jeu de sondes inclut un nombre de sondes correspondant au nombre de fragments amplifiés, et préférentiellement cinq (5) sondes. Chacune des sondes du premier jeu est adaptée pour s'hybrider spécifiquement à un des fragments amplifiés lorsque ce fragment comporte une des mutations ciblées. Dans ce mode de réalisation, les sondes du premier jeu sont
10 préférentiellement les sondes ALSASM-2 (SEQ. ID. NO. 12), TYRSSM-3 (SEQ. ID. NO. 14), PNPSSM (SEQ. ID. NO. 16), AS1SSM-3 (SEQ. ID. NO. 18) et AS2SSM-2 (SEQ. ID. NO. 20) décrites dans le Tableau 3 ci-dessous.

[0044] Dans un mode de réalisation alternatif, la méthode de la présente invention comprend également l'hybridation des fragments amplifiés par la réaction de PCR avec un second jeu de sondes. Une telle hybridation du second jeu est préférentiellement effectuée
15 simultanément à l'hybridation du premier jeu de sondes.

[0045] Le second jeu de sondes inclut préférentiellement cinq (5) sondes, soit un nombre de sondes correspondant au nombre de fragments amplifiés. Chacune des sondes du second jeu est adaptée pour s'hybrider spécifiquement à un desdits fragments lorsqu'il correspond au génotype sauvage, ou en d'autres mots, lorsque la mutation est absente. Dans ce mode de
20 réalisation, les sondes du second jeu sont préférentiellement les sondes ALSASS (SEQ. ID. NO. 11), TYRSSS-3 (SEQ. ID. NO. 13), PNPSSS (SEQ. ID. NO. 15), AS1SSS-3 (SEQ. ID. NO. 17) et AS2SSS (SEQ. ID. NO. 19) décrites dans le Tableau 3 ci-dessous.

[0046] Une personne versée dans l'art appréciera que le nombre, la séquence et la combinaison des sondes peuvent varier en fonction du nombre de mutations à détecter.
25 Ainsi, une seule sonde ayant une séquence correspondant à l'une des SEQ. ID. NO. 11 à SEQ. ID. NO. 20 ci-haut décrites pourrait être utilisée en combinaison avec des sondes ayant des séquences autres.

TABEAU 3
LISTE, SÉQUENCES ET LONGUEURS DES SONDES PAR MUTATION

GÈNE	MUTATION	SONDES	SÉQUENCE	LONGUEUR (NT)	MICROSPHÈRE S	SEQ. ID. NO.
LRPPRC	1119C/T	ALSAS	ATTTGCAACGCTACACTT	20	033	11
		ALSASM-2	ATTTGCAACACTACATCTTC	20	034	12
FAH	IVS12+5G/A	TYRSSS-3	GGCCGGTGAGTATCTGGCT	19	035	13
		TYRSSM-3	GGCCGGTGAATATCTGGCT	19	036	14
SLC12A6	2436DELG	PNPSSS	GCTGAGCAGGTAAGAGTCA	19	037	15
		PNPSSM-3	TGCTGAGCAGTAAGAGTCAG	20	038	16
SACS	6594DELT	AS1SSS-3	CAGAACACCCCTATTTCATGT	20	042	17
		AS1SSM-3	ACAGAACACCCCATTCATGT	20	043	18
SACS	5254C/T	AS2SSS	GTCCCAAAGCGACACAAA	18	044	19
		AS2SSM-2	GTCCCAAAGTGACACAAAG	19	045	20

[0047] Selon un aspect de la présente invention, chacune des sondes est couplée à un marqueur spécifique permettant de déterminer simultanément la présence de chacune des sondes dans l'échantillon. Ainsi, l'étape de l'hybridation des produits du PCR peut être précédée par la liaison de chacune des sondes à des marqueurs spécifiques, telles des
5 microsphères. De préférence, une modification à l'extrémité 5' est apportée à chacune des sondes. Cette modification est préférablement de type "5'Uni-link amino" afin de permettre aux sondes de se lier aux groupements hydroxyles à la surface des microsphères spécifiques.

[0048] Plus particulièrement, chacune des microsphères peut se définir généralement comme étant un excipient sous forme de petite sphère dont le diamètre est compris entre
10 quelques microns et un millimètre, solide et pleine, ayant à sa surface une substance adhésive, de préférence le polystyrène. Des principes actifs, de préférence au nombre de deux, sont dissous ou dispersés dans les microsphères, lesquels sont généralement ajoutés selon une quantité prédéfinie, selon la technique de marquage de la microsphère qui s'ensuivra. De telles microsphères sont disponibles chez de nombreux fournisseurs et sont
15 choisies parmi 100 microsphères disponibles. Le choix des microsphères couplé à chacune des sondes est généralement déterminé de façon aléatoire puisque ces dernières sont très similaires et donc généralement interchangeables. De plus, il est à noter qu'une personne versée dans l'art saura que la substance adhésive à la surface de la microsphère peut être d'un autre type de molécule, comme par exemple un ligand, un anticorps ou une protéine.

20 [0049] Selon un mode préféré de l'invention, les principes actifs qui sont dissous ou dispersés dans chacune des microsphères sont des chromophores. Les chromophores sont généralement des molécules colorées, pouvant faire partie de la famille des nitrés, des monoazoïques, des diazoïques, des triphenylméthanes, des quinoneimines, des xanthènes et des anthraquinones. La liste de ces familles de chromophores n'est pas exhaustive. Par
25 exemple, les principes actifs, de préférence des chromophores rouge et orange sont mélangés dans la microsphère et excités à l'aide d'un laser diode à 635 nM-10mW, de couleur rouge, lors de l'étape de la détection par l'appareil cytofluorométrique, tel qu'il sera décrit en détails ci-après. La couleur qui sera observée lors de l'étape de la détection et de la quantification

des microsphères est due à un phénomène de résonance entre une double liaison chimique et la lumière d'excitation du chromophore choisi et est spécifique à chacune des sondes utilisée. Dans un mode de réalisation préféré, les sondes ALSAS, ALSASM-2, TYRSSS-3, TYRSSM-3, PNPSSS, PNPSSM, AS1SSS-3, AS1SSM-3, AS2SSS et AS2SSM-2 sont
5 couplées aux microsphères commercialisées par LUMINEX® sous les numéros 033, 034, 035, 036, 037, 038, 042, 043, 044 et 045, respectivement. Ainsi, une fois qu'elles seront liées aux microsphères, les sondes spécifiques auront pour tâche de se lier, par hybridation, aux produits du PCR obtenus lors de l'étape de l'amplification et de permettre la détermination de la présence ou l'absence de mutations sur les fragments.

10 [0050] L'utilisation d'un chromophore pour la liaison à la microsphère n'est pas l'unique moyen de marquer ces microsphères. Effectivement, si un appareil de détection le permet, un autre type de principe actif pourra être utilisé. Par exemple, une personne versée dans l'art reconnaîtra qu'un principe actif de nature radioactive, thermique ou autre, par exemple, peut être utilisé afin de détecter un produit PCR/sonde. Une personne versée dans l'art
15 comprendra également que d'autres types de modifications sur les sondes utilisées peuvent réaliser le même objectif.

[0051] Les techniques relatives à l'hybridation de sondes sont généralement connues dans l'art et ne nécessitent pas de description exhaustive. L'étape de l'hybridation des produits du PCR aux sondes couplées à des microsphères peut ensuite être complétée afin de
20 produire des complexes comprenant les produits du PCR liés aux sondes couplées à des microsphères. Après l'hybridation, ces complexes sont récupérés par centrifugation et re-suspendus dans une solution contenant un agent combiné. À des fins de précision donc, il est entendu que l'étape d'hybridation inclut une étape de purification visant à éliminer les sondes n'ayant pas hybridé avec un fragment complémentaire d'acide nucléique amplifié et que lors
25 de la détection, seules les sondes ayant hybridé avec de tels fragments complémentaires seront détectées. Une personne versée dans l'art comprendra que le terme « hybridation spécifique » ou tout autre terme similaire indique une hybridation généralement spécifique suivant les conditions d'expérimentation et qu'une telle hybridation peut néanmoins

impliquer un certain nombre d'hybridations non spécifiques définissant un certain « bruit de fond » lors de l'expérimentation.

[0052] La méthode de la présente invention comporte enfin une étape de détection de la présence des marqueurs spécifiques à chacune des sondes du premier jeu et, le cas échéant, des marqueurs spécifiques à chacune des sondes du second jeu. Il sera compris que la
5 détection d'un marqueur spécifique à une sonde du premier jeu indique la présence d'une mutation correspondante dans le génome dudit individu, alors que la détection d'un marqueur spécifique à une sonde du second jeu indique l'absence de mutation correspondante.

[0053] Selon un mode préféré de l'invention, la détection des complexes produits du
10 PCR/sonde s'effectue dans un appareil permettant la détection simultanée par laser d'un complexe lié à un agent combiné. Cet appareil est de préférence un cytofluoromètre. Ainsi, l'étape de la détection permet d'identifier, de préférence par mesure de la fluorescence des chromophores, la présence simultanée des différentes microsphères et des produits de PCR (c.-à-d. le produit d'amplification par PCR comprenant une molécule de biotine, de
15 streptavidine et un chromophore). Ainsi, la détection simultanée d'une microsphère liée à une sonde spécifique (laquelle sonde peut être hybridée ou non avec un fragment complémentaire d'ADN) et du fragment complémentaire d'ADN est indicatif de l'hybridation du brin d'ADN concerné à la sonde. précisément.

[0054] Une personne dans le domaine comprendra que l'étape de détection de la présente
20 méthode implique une étape de quantification des complexes produits de PCR/sondes, laquelle peut être calculée, par exemple, par une valeur médiane de la fluorescence des chromophores. Dans le cas où l'invention est réalisée à l'aide d'un cytofluoromètre de marque LUMINEX®, la réalisation simultanée, dans une seule réaction, de 100 tests sur 96 échantillons différents, sera permise, ce qui en fait un calibre idéal pour les besoins de
25 dépistage populationnel d'un nombre restreint de gènes ou régions géniques. Une personne versée dans l'art comprendra qu'un autre type d'appareil peut réaliser le même objectif et que le type d'appareil utilisé dépendra de la nature de la modification terminale à l'extrémité 5' effectuée sur les amorces et sur le premier élément de l'agent combiné.

[0055] Selon un mode préféré de l'invention, la quantification des complexes produit PCR/sonde permet d'établir un rapport de la fluorescence entre les complexes formés avec le produit de PCR comportant une mutation (ou « complexe muté ») et les complexes formés avec le produit de PCR comportant le génotype sauvage (ou « complexe sauvage ». De
5 préférence, les valeurs de ces rapports permettent, à leur tour d'établir un diagnostic clinique de la présence de la mutation récessive dans un spécimen et ainsi d'identifier les porteurs de cette mutation. Par exemple, une valeur de rapport complexe muté/complexe sauvage variant entre 0.4 et 0.6 tend à indiquer que l'individu diagnostiqué est homozygote pour les allèles sauvage (c.-à-d. qu'il n'est pas porteur de la mutation concernée), alors
10 qu'une valeur du rapport s'approchant de 1.0 (p. ex. variant de 0.9 à 1.0) indique la présence de la mutation sur un des allèles de l'individu diagnostiqué. Enfin, une valeur du rapport complexe muté/complexe sauvage s'approchant de 2 tend à indiquer un génotype homozygote muté chez l'individu. Une personne versée dans l'art appréciera que la valeur de ces rapports est arbitraire et qu'elle peut être modifiée sans s'éloigner de l'esprit de
15 l'invention. Cette même personne versée dans l'art appréciera que l'établissement de cette valeur de rapport peut prendre en considération certains facteurs, dont notamment le bruit de fond et la valeurs des contrôles positifs et négatifs.

[0056] Ainsi, selon un mode de réalisation, chacun des puits contient les réactifs nécessaires au dépistage d'au moins une des mutations concernées. Chaque plaque inclut les
20 échantillons de 40 personnes en duplicata, des contrôles positifs représentés par au moins un porteur de chacune des mutations ciblées, un homozygote sauvage connu en plus d'un contrôle négatif composé d'une réaction de PCR en absence d'ADN génomique. L'invention s'étend à la méthode exécutée dans des plaques de différentes grandeurs et ne se limite pas à son exécution sur une plaque de 96 puits.

25 [0057] Dans un autre mode de réalisation préféré, une trousse pour déterminer simultanément la présence ou l'absence d'une pluralité de mutations dans le génome d'un individu est fournie. La trousse comprend préférentiellement un jeu d'amorces permettant d'amplifier simultanément une pluralité de fragments d'acides nucléiques de l'individu. Tel

que décrit précédemment, les fragments d'acides nucléiques concernés sont préférablement des fragments d'DDN génomique de l'individu. Ainsi, la trousse permet l'obtention de plusieurs fragments amplifiés distincts en effectuant une seule réaction de PCR, dans un même tube réactionnel. Le jeu d'amorces auquel il est fait référence peut inclure, par
5 exemple, une ou plusieurs amorces correspondant aux SEQ. ID. NO. 1 à SEQ. ID. NO. 10. Une personne versée dans l'art appréciera que la nature, le nombre et la combinaison d'amorces est adaptée en fonction des mutations devant être identifiés.

[0058] La trousse peut également inclure un jeu de sondes capables de s'hybrider aux produits de PCR. Le jeu de sondes inclut un nombre de sondes correspondant à au nombres
10 de fragments amplifiés et chacune des sondes est adaptée pour se lier de manière relativement spécifique aux fragments amplifiés lorsqu'ils comporte une des mutations d'intérêt. Ainsi, le jeu de sonde peut inclure une ou plusieurs sondes ayant une séquence correspondant à l'une des SEQ. ID. NO 12, SEQ. ID. NO 14, SEQ. ID. NO 16, SEQ. ID. NO 18 et SEQ. ID. NO 20.

[0059] Similairement, la trousse peut comprendre un second jeu de sondes. Contrairement au premier jeu de sondes, le second jeu inclut des sondes adaptées pour s'hybrider aux fragments amplifiés lorsque ceux-ci présente le génotype sauvage ou, en d'autres mots, lorsque les fragments sont exempts de mutations. Le second jeu de sondes inclut préférablement une ou plusieurs sondes ayant une séquence correspondant à l'une des
15 SEQ. ID. NO 11, SEQ. ID. NO 13, SEQ. ID. NO 15, SEQ. ID. NO 17 et SEQ. ID. NO 19.
20

[0060] Alternativement, une trousse pourrait n'inclure que l'un ou l'autre des premier et second jeux de sondes décrits ci-haut. Une telle trousse pourrait trouver une utilité, par exemple, lorsque les fragments d'acides nucléiques sont amplifiés à l'aide d'amorces autres que celles décrites ci-haut. Également, une personne versée dans l'art appréciera que
25 l'établissement d'un rapport complexe muté/complexe sauvage peut ne pas être désirée dans toutes les situations. Ainsi, il peut être utile, dans certaines circonstances, de n'utiliser qu'un seul des jeux de sondes. Cette même personne versée dans l'art comprendra que la trousse

peut donc inclure un ou plusieurs des (1) jeux d'amorces, (2) premier jeu de sonde et (3) second jeu de sonde ou encore certains uniquement certaines de leurs composantes (p. ex. 2

[0061] Ayant décrit les principes généraux de l'invention, une méthode pour déterminer la présence ou l'absence de mutations dans le génome d'un individu va maintenant être
5 décrite à l'aide d'un exemple.

EXEMPLE 1:

MÉTHODE DE DÉPISTAGE OU DE DÉTECTION DE PORTEURS DE MALADIES RÉCESSIVES À L'AIDE DE SONDES COUPLÉES À DES MICROSPHÈRES

10 Matériels et méthodes:

Extraction de l'ADN génomique (ADNg)

[0062] Selon un mode préférentiel de l'invention, l'extraction de l'ADN génomique (ADNg) a été effectuée selon une modification de la méthode standard à partir de papier FTA® (Whatman®). La méthode utilisée est celle décrite par Caggana et ses collaborateurs
15 en 1998 (Caggana M. Conroy J.M., Pass K.A. « Rapid efficient method for multiplex amplification from filterpaper ». *Human mutation* 11: [M. Conroy] 404-409 (1998)). Plusieurs méthodes d'extraction d'ADN génomique sont accessibles. Les échantillons de sang prélevé sur papier FTA® permettent d'obtenir à partir d'un cercle de 2 mm une quantité acceptable d'ADNg. Les cercles ou punches sont mis en présence de méthanol et laissés à
20 l'air libre pendant toute la nuit auxquels 25 µL d'eau stérile sont ajoutés. Les échantillons sont chauffés à 95°C pendant 10 minutes, puis centrifugés et le surnageant contenant l'ADN est transféré dans un tube stérile. Une fraction de cet échantillon est utilisée dans la réaction PCR, exécutée en multiplex.

Préparation du mastermix

[0063] Selon un mode préféré de l'invention, la préparation du mastermix pour la réaction PCR pour l'amplification des régions du génome visées par la présente invention se détaille ainsi:

- a. Dégeler les réactifs (tampon, dNTPs, amorces, ADNg) et conserver à 4°C;
- 5 b. Diluer et combiner les amorces pour obtenir une concentration finale de 10 μ M pour chacune des amorces (voir Tableau 2). Les amorces sont conçues pour amplifier la région mutée du génome où un polymorphisme pour chacune des maladies récessives ciblées est déjà identifié;
- c. Calculer le volume requis selon le nombre de réactions à effectuer en utilisant
10 une valeur de 25 μ L par réaction de PCR;
- d. Mélanger les réactifs dans l'ordre suivant :

	<u>Réactifs</u>	<u>volume</u>	<u>conc. finale</u>
15	Tampon 10X	10 μ L	1X
	25 mM dNTPs	1 μ L	250 μ M
	10 μ M Amorces	3 μ L	0.3 μ M
	H ₂ O *	75 μ L	
	Taq polymérase	<u>1 μL</u>	5 unités
20	Volume final	90 μ L	

- e. Mettre 18 μ L de mastermix par puits
- f. Ajouter 2 μ L d'ADN génomique
- g. Sceller la plaque et la déposer dans l'appareil de PCR lorsque la température
25 atteint 94°C

Programmation de l'appareil de PCR.

[0064] La programmation de l'appareil de PCR utilisé pour l'amplification des fragments d'acides nucléiques est résumée ci-après:

- 23 -

	<u>étape</u>	<u>température</u>	<u>temps</u>
	1.	94°C	10 min
	2.	94°C	30 sec
	3.	54°C	60 sec
5	4.	72°C	60 sec
	5. Répéter 35 fois étapes 2 à 4		90 min
	6.	72°C	10 min
	7. conserver	4°C	

10 *Hybridation*

[0065] Selon un mode préféré de l'invention, l'hybridation des fragments amplifiés aux sondes qui ont été préalablement couplées à une microsphère spécifique sélectionnée parmi 100 microsphères différentes est effectuée. Ces sondes correspondent aux séquences conservées ou mutées des régions où l'on retrouve les polymorphismes responsables de l'une
15 des 4 maladies récessives à l'étude (voir Tableau 3). L'appareil Luminex® possède un laser qui a pour fonction de détecter les chromophores et donc d'identifier avec précision une des 100 sphères disponibles.

- a. Re-suspendre les microsphères par vortex pendant 20 secondes et par sonication pendant 20 secondes.
- 20 b. Diluer les microsphères à une concentration de 50 microsphères par μL de solution TMAC à 1.5X (3M TMAC, 50 mM Tris-HCl, pH8.0, 4 mM EDTA, pH8.0, 0.1% sarkosyl);
- c. Mettre 10 μL de tampon TE par puits.
- d. Ajouter 25 μL de la solution diluée de microsphères.
- 25 e. Ajouter 2.5 μL de la réaction de PCR et mélanger à l'aide d'un pipeteur multipuits
- f. Sceller la plaque.
- g. Incuber à 95°C pendant 5 min et à 52°C +/- 5°C pendant 15 min.
- h. Centrifuger la plaque à 3000 x g pendant 5 min à 22°C.

- i. Enlever le surnageant par inversion.

Marquage d'une protéine, la biotine, à un chromophore, la phycoérythrine.

[0066] Une fois l'hybridation complétée, les complexes comprenant les microsphères
5 couplées aux sondes avec les produits PCR, sont récupérés par centrifugation et re-suspendus dans une solution contenant une protéine, de préférence la biotine, liée à un chromophore, de préférence la phycoérythrine. Cette étape de l'invention se détaille comme suit:

- 10 a. Ajouter 75 μ L d'une solution de TMAC 1X contenant de la streptavidine-phycoérythrine à 4 μ g par mL.
- b. Re-suspendre les culots à l'aide d'une pipette multipuits.
- c. Incuber 10 minutes à la température ambiante dans l'obscurité.

Analyse

- 15 a. Préparer le fichier d'exécution de l'appareil LUMINEX® en utilisant, par exemple un volume de 50 μ L analysé pendant 45 secondes à la température ambiante afin de détecter un minimum de 100 microsphères pour chacune des sondes utilisées.
- b. Déposer la plaque dans l'appareil.
- 20 c. Démarrer l'analyse.

[0067] L'appareil cytofluorométrique de marque LUMINEX® possède un laser qui a pour fonction de détecter les chromophores et donc d'identifier avec précision une des 100 microsphères disponibles. Le plateau d'échantillonnage propre à l'appareil LUMINEX® a été retenu parce qu'il permet simultanément la réalisation dans une seule réaction de 100 tests
25 sur 96 échantillons différents, ce qui en fait un calibre idéal pour les besoins de dépistage. De plus, les coûts d'acquisition de l'appareil et celui des réactions sont inférieurs à ceux déjà utilisés. Les conditions expérimentales sont uniques, rapides et spécifiques à un coût nettement inférieur à ce qui existe présentement. Cet appareil permet de mesurer la présence

de deux éléments fluorescents simultanément. Ainsi, la présence des principes actifs dissous dans la microsphère d'une part, et le chromophore constituant le deuxième élément de l'agent combiné d'autre part, signalera la présence des régions d'ADN ciblées, correspondant à la séquence d'ADN des première et deuxième sous-régions.

5

Rapport (Étape optionnelle mais préférable pour l'analyse des résultats)

- a. Transférer et enregistrer les résultats dans un fichier Excel ou autre.
- b. Utiliser les valeurs de fluorescence médiane d'intensité afin de générer un histogramme.

10

- c. Interprétation automatisée du résultat;
 - a. Validation du résultat par personne accréditée.

[0068] L'appareil de détection produit donc les données brutes qu'il faut ensuite analyser. Le transfert et l'enregistrement des données peuvent se faire dans un fichier de type Excel™. Un tel transfert est illustré dans les FIG. 1 à FIG. 5, lesquelles figures démontrent les résultats de la méthode effectuée dans le cadre de la détermination du génotype d'un grand nombre d'individus pour les mutations 1119C/T sur le gène *LRPPRC*, IVS12+5G/A sur le gène *FAH*, 2436delG sur le gène *SLC12A6*, 6594delT sur le gène *SACS* et 5254C/T et sur le gène *SACS*, respectivement.

[0069] La compilation des données générées permet l'établissement d'un rapport complexe muté/complexe sauvage, tel que décrit précédemment. Dans cet exemple, une valeur de rapport complexe muté/complexe sauvage variant entre 0.4 et 0.6 tend à indiquer que l'individu diagnostiqué est homozygote pour les allèles sauvages (c.-à-d. qu'il n'est pas porteur de la mutation concernée), alors qu'une valeur du rapport s'approchant de 1.0 (p. ex. variant de 0.9 à 1.0) indique la présence de la mutation sur un des allèles de l'individu diagnostiqué. L'interprétation des rapports complexe muté/complexe sauvage permet d'établir le diagnostic clinique.

[0070] Ainsi, une valeur d'intensité médiane de fluorescence supérieure ou égale à 100 est considérée comme étant une valeur positive et indicative que l'origine du spécimen d'ADN prélevé est porteur de la mutation d'une maladie récessive ciblée.

[0071] L'invention permet aussi de dépister ou de détecter au moins une mutation dans au moins une région d'ADN ciblée du génome humain, ladite mutation étant associée à une maladie récessive, caractérisée en ce que la méthode est exercée afin de dépister ou de détecter au moins deux mutations simultanément, c'est-à-dire, dans un même et unique test. Ainsi, l'invention permet de mettre au point un test de détection de porteurs de maladies récessives qui est aussi rapide et efficace et ce, à un coût nettement inférieur à ce qui existe
5
10
présentement sur le marché.

[0072] Même si un mode de réalisation préférentiel de la présente invention a été décrit en détail ci-dessus et illustré dans les dessins accompagnant la demande, il doit être compris que l'invention n'est pas limitée à ce mode de réalisation particulier et que plusieurs changements et modifications peuvent y être effectués sans s'éloigner de la portée ou l'esprit
15
de la présente invention.

Les réalisations de l'invention, au sujet desquelles un droit exclusif de propriété ou de privilège est revendiqué, sont définies comme il suit :

1. Une méthode pour déterminer la présence ou l'absence de mutations dans le génome d'un individu, ladite méthode comprenant :

- (a) amplifier simultanément une pluralité de fragments d'acides nucléiques dudit individu pour obtenir un produit d'amplification, chacun desdits fragments chevauchant la position de l'une desdites mutations;
- (b) hybrider le produit d'amplification avec un premier jeu de sondes incluant un nombre de sondes correspondant à ladite pluralité de fragments, chacune desdites sondes du premier jeu étant adaptée pour s'hybrider spécifiquement à un desdits fragments amplifiés lorsqu'il comporte une desdites mutations, chacune desdites sondes étant couplée à un marqueur spécifique; et
- (c) détecter la présence desdits marqueurs spécifiques, la détection d'un desdits marqueurs spécifiques à une sonde dudit premier jeu indiquant la présence d'une mutation correspondante dans le génome dudit individu.

2. La méthode de la revendication 1, comprenant également l'hybridation dudit produit d'amplification avec un second jeu de sondes avant de détecter la présence desdits marqueurs spécifiques, ledit second jeu de sondes comprenant un nombre de sondes correspondant à ladite pluralité de fragments, chacune desdites sondes du second jeu étant adaptée pour s'hybrider spécifiquement à un desdits fragments amplifiés lorsqu'il correspond à un génotype sauvage, chacune desdites sondes étant couplée à un marqueur spécifique, dans laquelle la détection d'un desdits marqueurs spécifique à une sonde dudit second jeu indique l'absence d'une mutation correspondante dans le génome dudit individu.

3. La méthode de la revendication 1, dans laquelle lesdits fragments d'acides nucléiques sont des fragments d'ADN génomique.

4. La méthode de la revendication 3 dans laquelle lesdits fragments d'ADN génomique sont des fragments de gènes.
5. La méthode de la revendication 4, dans laquelle lesdits gènes sont choisis parmi *LRPPRC*, *FAH*, *SLC12A6* et *SACS*.
6. La méthode de la revendication 5, dans laquelle l'une desdites mutations est associée à l'acidose lactique.
7. La méthode de la revendication 6 dans laquelle ladite mutation est une substitution 1119C/T sur le gène *LRPPRC*.
8. La méthode de la revendication 7 dans laquelle l'amplification d'un desdits fragments est réalisé à l'aide d'une paire d'amorces correspondant à SEQ. ID NO. 1 et SEQ. ID. NO. 2.
9. La méthode de la revendication 1 dans laquelle une desdites sondes dudit premier jeu a une séquence correspondant à SEQ. ID. NO. 12.
10. La méthode de la revendication 2 dans laquelle une desdites sondes dudit second jeu a un séquence correspondant à SEQ. ID. NO. 11.
11. La méthode de la revendication 4 dans laquelle l'une desdites mutations est associée à la tyrosinémie.
12. La méthode de la revendication 11 dans laquelle ladite mutation est une mutation IVS12+5G/A sur le gène *FAH*.
13. La méthode de la revendication 12 dans laquelle l'amplification d'un desdits fragments est réalisé à l'aide d'une paire d'amorces correspondant à SEQ. ID NO. 3 et SEQ. ID. NO. 4.
14. La méthode de la revendication 1 dans laquelle une desdites sondes dudit premier jeu a une séquence correspondant à SEQ. ID. NO. 14.

15. La méthode de la revendication 2 dans laquelle une desdites sondes dudit second jeu a une séquence correspondant à SEQ. ID. NO. 13.
16. La méthode de la revendication 4 dans laquelle l'une desdites mutations est associée à la neuropathie sensitivomotrice héréditaire.
17. La méthode de la revendication 16 dans laquelle ladite neuropathie sensitivomotrice héréditaire est la neuropathie sensitivomotrice héréditaire avec agénésie du corps calleux ou la neuropathie sensitivomotrice héréditaire sans agénésie du corps calleux.
18. La méthode de la revendication 16 dans laquelle ladite mutation est une mutation 2436delG sur le gène *SLC12A6*.
19. La méthode de la revendication 18 dans laquelle l'amplification d'un desdits fragments est réalisé à l'aide d'une paire d'amorces correspondant à SEQ. ID NO. 5 et SEQ. ID. NO. 6.
20. La méthode de la revendication 1 dans laquelle une desdites sondes dudit premier jeu a une séquence correspondant à SEQ. ID. NO. 16.
21. La méthode de la revendication 2 dans laquelle une desdites sondes dudit second jeu a une séquence correspondant à SEQ. ID. NO. 15.
22. La méthode de la revendication 4 dans laquelle l'une desdites mutations est associée à l'ataxie spastique de Charlevoix-Saguenay.
23. La méthode de la revendication 22 dans laquelle ladite mutation est une mutation 6594delT sur le gène *SACS*.
24. La méthode de la revendication 23 dans laquelle l'amplification d'un desdits fragments est réalisé à l'aide d'une paire d'amorces correspondant à SEQ. ID NO. 7 et SEQ. ID. NO. 8.

25. La méthode de la revendication 1 dans laquelle une desdites sondes dudit premier jeu a une séquence correspondant à SEQ. ID. NO. 18.
26. La méthode de la revendication 2 dans laquelle une desdites sondes dudit second jeu a une séquence correspondant à SEQ. ID. NO. 17.
27. La méthode de la revendication 22 dans laquelle ladite mutation est une mutation 5254C/T sur le gène de *SACS*.
28. La méthode de la revendication 27 dans laquelle l'amplification d'un desdits fragments est réalisé à l'aide d'une paire d'amorces correspondant à SEQ. ID NO. 9 et SEQ. ID. NO. 10.
29. La méthode de la revendication 1 dans laquelle une desdites sondes dudit premier jeu a une séquence correspondant à SEQ. ID. NO. 20.
30. La méthode de la revendication 2 dans laquelle une desdites sondes dudit second jeu a une séquence correspondant à SEQ. ID. NO. 19.
31. Une trousse pour déterminer simultanément la présence ou l'absence d'une pluralité de mutations dans le génome d'un individu, la trousse comprenant un jeu d'amorces permettant d'amplifier simultanément une pluralité de fragments d'acides nucléiques dudit individu pour obtenir un produit d'amplification, ledit jeu d'amorces incluant au moins une amorce correspondant à l'une des séquences choisie parmi SEQ. ID. NO. 1 à SEQ. ID. NO. 10.
32. La trousse de la revendication 31, comprenant de plus un premier jeu de sondes incluant un nombre de sondes correspondant à ladite pluralité de fragments, chacune desdites sondes du premier jeu étant adaptée pour s'hybrider spécifiquement à un desdits fragment lorsqu'il comporte une desdites mutations, ledit premier jeu de sondes incluant au moins une sonde ayant une séquence correspondant à l'une des SEQ. ID. NO 12, SEQ. ID. NO 14, SEQ. ID. NO 16, SEQ. ID. NO 18 et SEQ. ID. NO 20.

33. La trousse de la revendication 32 comprenant de plus un second jeu de sondes incluant un nombre de sondes correspondant à ladite pluralité de fragments, chacune desdites sondes du second jeu étant adaptée pour s'hybrider spécifiquement à un desdits fragment lorsqu'il correspond à un génotype sauvage, ledit second jeu de sondes incluant au moins une sonde ayant une séquence correspondant à l'une des SEQ. ID. NO 11, SEQ. ID. NO 13, SEQ. ID. NO 15, SEQ. ID. NO 17 et SEQ. ID. NO 19.

34. Une trousse pour déterminer simultanément la présence ou l'absence d'une pluralité de mutations dans une pluralité de fragments d'acide nucléiques d'un individu, la trousse comprenant un premier jeu de sondes, chacune desdites sondes dudit premier jeu étant adaptée pour s'hybrider spécifiquement à l'un desdits fragments d'acide nucléique lorsqu'il comporte une desdites mutations, ledit premier jeu de sondes incluant au moins une sonde ayant une séquence correspondant à l'une des SEQ. ID. NO 12, SEQ. ID. NO 14, SEQ. ID. NO 16, SEQ. ID. NO 18 et SEQ. ID. NO 20.

35. La trousse de la revendication 34 comprenant de plus un second jeu de sondes, chacune desdites sondes du second jeu étant adaptée pour s'hybrider spécifiquement à un desdits fragment lorsqu'il correspond à un génotype sauvage, ledit second jeu de sondes incluant au moins une sonde ayant une séquence correspondant à l'une des SEQ. ID. NO 11, SEQ. ID. NO 13, SEQ. ID. NO 15, SEQ. ID. NO 17 et SEQ. ID. NO 19.

36. La trousse de la revendication 34 comprenant de plus un jeu d'amorces permettant d'amplifier simultanément ladite pluralité de fragments d'acides nucléiques dudit individu pour obtenir un produit d'amplification, ledit jeu d'amorces incluant au moins une amorce correspondant à l'une des séquences choisie parmi SEQ. ID. NO. 1 à SEQ. ID. NO. 10.

Application number / numéro de demande: 2610057

Figures: 1 to 5

Pages: _____

Unscannable item(s)

received with this application

To inquire if you can order a copy of the unscannable items, please visit the
CIPO WebSite at [HTTP://CIPO.GC.CA](http://CIPO.GC.CA)

Item(s) ne pouvant être balayés

Documents reçus avec cette demande ne pouvant être balayés.

Pour vous renseigner si vous pouvez commander une copie des items ne
pouvant être balayés, veuillez visiter le site web de l'OPIC au [HTTP://CIPO.GC.CA](http://CIPO.GC.CA)