

APPEL D'OFFRES 2007

TITRE DU PROJET :

**ANALYSE MOLECULAIRE DE PATIENTS ATTEINTS
D'ALBINISME OCULO-CUTANE**

Pr. Benoît ARVEILER

Laboratoire de Génétique Humaine (EA3669)

Université Victor Segalen Bordeaux 2

146 Rue Léo Saignat

33076 Bordeaux Cedex

Tel 05 57 57 11 63

benoit.arveiler@u-bordeaux2.fr

Etat des connaissances

L'albinisme regroupe un ensemble d'affections héréditaires liées à une anomalie de biosynthèse de la mélanine, pigment élaboré dans des cellules spécialisées de la peau, des cheveux, de l'iris, de l'épithélium pigmenté de la rétine et de l'oreille interne, associé à un nombre et une structure normale des mélanocytes [1].

L'albinisme oculo-cutané [2] comporte une hypopigmentation cutanéophanérienne généralisée et une atteinte ophtalmologique. Les différents types d'AOC non syndromique sont de transmission autosomique récessive et présentent des spécificités cliniques, épidémiologiques et moléculaires [1]. On en connaît quatre types associés à des anomalies géniques spécifiques.

L'albinisme est une affection universelle, la plus fréquente des hypopigmentations généralisées héréditaires, dont la prévalence générale est de 1/20000. Cependant elle varie d'une forme à l'autre et d'un continent à l'autre. La forme la plus fréquente à travers le monde est le type 2 [1].

Au cours des albinismes, le cycle de synthèse de la mélanine peut être bloqué à différents niveaux définissant les différents types de la maladie [3]. Les mélanines produites sont des polymères de 2 types, les eumélanines et les phaeomélanines [4].

La recherche de l'activité tyrosinase du bulbe capillaire [5] permet, selon qu'il développe ou non une pigmentation, de différencier les formes tyrosinase positive des formes tyrosinase négative. La biopsie cutanée peut se substituer à l'analyse du bulbe pileux pour l'étude fonctionnelle mais est peu utilisée. Les colorations histologiques standard montrent des mélanocytes normaux. L'étude en microscopie électronique permet d'évaluer le degré de maturation des mélanosomes.

L'analyse moléculaire est essentielle pour établir un diagnostic précis des différentes formes d'AOC. Quatre gènes ont été à ce jour identifiés.

Le gène *TYR*, impliqué dans la forme la plus sévère d'AOC : le type 1A, mais aussi dans le type 1B, a été le premier gène d'albinisme humain cloné, dans la région 11q14.3, par Barton et al. en 1988 [6]. C'est l'homologue du gène murin *albino* ou *c*. Il s'étend sur 118 Kb et contient 5 exons ; plus de 50% de la région codante du gène se trouve dans l'exon 1. Son promoteur, et les régions régulatrices en 5' sont bien identifiés [7] et étudiés lors du diagnostic

moléculaire. Il code pour une glycoprotéine membranaire de 529 acides aminés (aa), comprenant un peptide signal de 18 aa à l'extrémité amino-terminale, deux sites de liaison au cuivre, une région transmembranaire à l'extrémité carboxy-terminale, et un motif EGF (*epidermal growth factor*)-like. A ce jour, plus de 150 mutations et délétions ont été décrites dans ce gène ainsi que quelques polymorphismes (*Albinism database* <http://albinismdb.med.umn.edu/>). Ces variants nucléotidiques se composent de mutations non-sens, faux-sens, insertions ou délétions de quelques bases entraînant un décalage du cadre de lecture, mutations d'épissage, et de rares cas de délétions de l'ensemble du gène [8-11]. Ils se répartissent tout au long du gène avec une prédominance sur la région codant pour le site B de liaison au cuivre. Il existe un pourcentage non négligeable de patients pour lesquels une seule mutation de *TYR* a été identifiée, variant de 17 à 35% selon les publications [12-14]. De ce fait, certains auteurs ont exploré de manière plus extensive les régions régulatrices en 5' du promoteur (4 Kb) sans pour autant trouver de nouvelle mutation ; en revanche ils ont étudié l'expression des différents allèles parentaux à partir de l'ARN de lymphocytes et ont trouvé un défaut d'expression de l'allèle « non muté »[15], ce qui pourrait indiquer que la mutation sur cet allèle concerne les régions régulatrices. Certains variants de *TYR* sont à interpréter de manière délicate dans la mesure où l'on peut les observer à l'état homozygote chez des sujets non AOC. C'est le cas par exemple du variant thermosensible R402Q décrit comme un polymorphisme dans *Albinism Database* mais dont la pathogénicité a été démontrée par des études fonctionnelles in vitro [16]. S'agit-il d'une expressivité variable avec des patients porteurs de signes oculaires et cutanés à minima, ou le variant n'est-il pathogène qu'associé avec une autre mutation plus sévère ?

Par ailleurs, du fait du nombre relativement important de patients porteurs d'une seule mutation, la recherche d'une délétion intragénique devient indispensable pour chacun des gènes de l'AOC en association avec la recherche de mutations.

Des mutations dans le gène *OCA2* (anciennement appelé gène *P*) entraînent l'apparition d'un AOC de type 2, tyrosinase positive avec une légère pigmentation des cheveux blanc à blond doré ou roux dès la naissance, et une

peau claire. Le type brun plus pigmenté existe chez les noirs Africains et chez les Afro-Américains [17].

Le gène *OCA2* humain a été cloné en 1993 par Rinchik et al. [18] ; il s'étend sur 345 Kb en 15q12q13.1 et contient 25 exons dont le premier n'est pas codant. Son homologue murin est le gène *p* ou *pink-eyed dilution*. Chez l'homme, il existe trois transcrits dont le plus long code pour un polypeptide de 838 aa. La structure de la protéine P, avec ses 12 domaines transmembranaires, est semblable à celle des protéines transportant de petites molécules (famille des transporteurs SLC13A). A ce jour plus de 60 mutations réparties sur l'ensemble du gène et une cinquantaine de polymorphismes ont été décrits [19]. Il s'agit de mutations non-sens, faux-sens, insertions ou délétions de quelques bases entraînant un décalage du cadre de lecture, et de mutations d'épissage. Il existe une délétion africaine récurrente de 2.7 Kb incluant l'exon 7 d'*OCA2*, dont la prévalence peut atteindre plus de 90% des allèles mutés dans certaines populations [20]. Certains des variants polymorphiques sont associés à une prédisposition aux mélanomes malins dans la population générale [21].

L'albinisme oculocutané de type 3 ou albinisme roux mais aussi certaines formes d'albinisme brun sont liés à des mutations dans le gène *TYRP1* [22]. Il prévaut essentiellement chez les noirs Africains et Afro-Américains et c'est une forme tyrosinase positive d'albinisme. Le gène *TYRP1* a été cloné par Abbott et al., en 1991 [23]; c'est l'homologue du gène *b* ou *brown* chez la souris ; il s'étend sur 17 Kb en 9p23. Il possède 8 exons, dont le premier est non codant. Il code pour la glycoprotéine membranaire la plus abondante du mélanosome, de 537 aa qui présente une grande homologie de structure avec la protéine tyrosinase (environ 50% des acides aminés) d'où son nom : « tyrosinase-related protein ». Elle possède deux sites de liaison au cuivre, deux domaines riches en cystéine (comprenant 17 résidus cystéine), un domaine transmembranaire, une séquence signal amino-terminale, et environ six sites de glycosylation. On attribue à la protéine TYRP1 diverses fonctions enzymatiques dont principalement une activité DHI et DHICA oxydase dans la partie distale du cycle de synthèse de l'eumélanine. Ainsi, en cas d'absence ou de fonctionnement anormal de TYRP1 il y a blocage de formation d'eumélanine et seules les phaeomélanines sont synthétisées. Certains auteurs attribuent à TYRP1 une activité tyrosine hydroxylase en collaboration avec la tyrosinase

[24]. Elle aurait également un rôle de stabilisation de la tyrosinase et de modulation de son activité catalytique [25, 26]. Enfin elle préviendrait la mort prématurée des mélanocytes due à la cytotoxicité médiée par la tyrosinase [27]. Longtemps considéré comme limité aux populations noires d'origine africaine ou afro-américaine, avec deux mutations récurrentes identifiées [22, 28], l'OCA3 a été récemment diagnostiqué, notamment par notre équipe, dans deux familles caucasiennes, avec la mise en évidence de trois nouvelles mutations [29, 30]. Il est considéré comme la forme la plus rare d'AOC. Cependant, sa fréquence est peut-être sous estimée du fait de l'absence d'étude systématique de ce gène chez des patients AOC caucasiens.

L'albinisme oculocutané de type 4 est lié à des mutations dans le gène *AIM-1* (*antigen in melanoma-1*) ou *MATP* (*membrane associated transporter protein*) ou *SCL45A2* [31]. Le phénotype est variable allant d'une hypopigmentation sévère sans amélioration à l'âge adulte, à une atteinte plus modérée avec repigmentation possible au cours du temps. Le gène *MATP* a été cloné par Newton et al., en 2001 [31]. Il s'étend sur 40 Kb dans la région 5p13.3 et est constitué de 7 exons. Il code pour un polypeptide de 530 aa contenant 12 domaines transmembranaires putatifs, uniquement exprimé dans les mélanocytes (antigène de différenciation du mélanocyte). L'homologue *b* du gène *MATP* chez le poisson medaka code pour une protéine formée de douze domaines transmembranaires ayant un rôle de transporteur dans le cycle de synthèse de la mélanine [32]. Dans les mélanocytes de souris mutantes *underwhite* (homologue murin de *MATP*), l'activité de la tyrosinase est diminuée à 20% de son activité normale, et les mélanosomes sécrétés sont immatures. La protéine *MATP* semble avoir un rôle de transport de tyrosinase et de TYRP1 vers les mélanosomes de type II, et dans le processus de maturation des mélanosomes [33]. A ce jour, 24 mutations ont été identifiées dans certaines populations : un patient turc [34], 5 patients allemands [35], un patient coréen [36] et 26 patients japonais [37, 38]. *MATP* est le gène le plus fréquemment impliqué dans les AOC tyrosinase positifs au Japon [37]. On rapporte 8 polymorphismes (*Albinism Database*), dont certains -c.814G>A (p.Glu272Lys) et c.1122C>G (p.Phe374Leu)- sont associés avec des variations de pigmentation chez des individus normaux [39].

Travaux effectués au laboratoire

Nous réalisons le diagnostic moléculaire de l'albinisme oculo-cutané depuis une dizaine d'années au sein du CHU de Bordeaux. A ce jour, nous sommes les seuls en France et en Europe à étudier les quatre gènes de l'AOC. Les demandes sont de plus en plus nombreuses du fait notamment de notre participation au réseau national de génétique moléculaire des maladies neurosensorielles et de notre collaboration avec le Centre de Référence des maladies rares de la peau (Pr TAIEB, Bordeaux) mis en place en 2006 dans le cadre du Plan Maladies Rares. Au niveau international, nous recevons des demandes de divers pays : Espagne, Royaume-Uni, Pays-bas, Allemagne, Belgique, Italie, Turquie.

Nous effectuons d'une part des analyses de liaison génétique lorsque les familles sont informatives, c'est-à-dire avec plusieurs cas atteints et/ou une consanguinité parentale, à l'aide d'un panel de marqueurs microsatellites, afin d'éliminer un locus sans étudier le gène de manière exhaustive.

D'autre part l'étude moléculaire des quatre gènes est réalisée suivant une stratégie d'analyse influencée par l'origine ethnique, l'examen clinique et le test fonctionnel de la tyrosinase sur bulbe de cheveu.

A l'heure actuelle, nous réalisons l'analyse moléculaire selon différentes techniques :

➤ *TYR* en QMF-PCR (*Quantitative Multiplex Fluorescent PCR*) [40] à la recherche de délétion puis en séquençage direct à la recherche de mutations (région proximale du promoteur -0.5 Kb, 5 exons).

Il existe un pseudogène situé en 11p11.2, constitué des exons 4 et 5 de *TYR* et de régions adjacentes non codantes. Les séquences communes au gène *TYR* et au pseudogène *TYRL* diffèrent pour 2.6% des bases seulement, ceci situant la duplication du premier gène il y a environ 24 millions d'années [41]. Nous réalisons donc l'amplification spécifique de *TYR* en utilisant des amorces dont les bases en 3' sont complémentaires de *TYR* et non de *TYRL*.

➤ *OCA2* (24 exons codants), *TYRP1* (promoteur, 8 exons) en QMF-PCR à la recherche d'une délétion hétérozygote, puis en DHPLC (*Denaturing High Pressure Liquid Chromatography*) suivie du séquençage des variants, à la recherche de mutations ponctuelles.

La technique de DHPLC est peu rentable pour certains exons du gène *OCA2* du fait du nombre important de polymorphismes connus. Le séquençage direct est donc réalisé pour plusieurs exons de ce gène.

La technique de recherche de délétion par PCR semi-quantitative est réalisée en testant 5 à 8 points par gène selon les cas.

➤ *MATP* en DHPLC suivie du séquençage des variants à la recherche de mutations ponctuelles.

Notons que l'identification de deux mutations dans le gène *TYRP1* chez un patient allemand a mené à une publication décrivant le deuxième cas caucasien porteur d'un AOC de type 3, avec un phénotype cutané-phanérien particulier [29].

Objectifs

Nous avons la volonté de réaliser un diagnostic moléculaire plus exhaustif de l'AOC. Pour cela, nous voulons développer de nouveaux outils moléculaires permettant l'analyse de liaison au locus de *MATP*, et la recherche de délétion dans les gènes *TYRP1* et *MATP*. En effet, la recherche de délétion intragénique est un outil devenu indispensable pour chacun des gènes, en complément de la recherche de mutations ponctuelles.

De plus, l'étude extensive des régions régulatrices proximales et distales de *TYR* et des autres gènes serait débutée. Comme nous l'avons vu, la recherche de mutations dans les régions régulatrices du gène *TYR* semble particulièrement pertinente pour deux raisons. D'une part il existe, dans notre série de patients, mais aussi dans les séries rapportées dans la littérature, une proportion assez importante (5/21 dans notre série) de patients chez lesquels une seule mutation (hétérozygote) de *TYR* a été mise en évidence : dans le cadre d'une maladie récessive, il est probable que la seconde mutation réside dans les régions inexplorées du gène, telle que les éléments régulateurs. Par ailleurs il a été montré [15] chez des patients possédant une seule mutation à l'état hétérozygote que seul l'ARNm porteur de cette mutation était trouvé dans les lymphocytes. Ceci indique l'existence soit d'une mutation altérant la stabilité

de l'ARNm, soit d'une mutation dans les régions régulatrices, abolissant l'expression.

De plus, devant le nombre important de nouvelles mutations identifiées dans les différents gènes, il devient nécessaire de faire la preuve de leur pathogénicité. Ainsi nous rechercherons la présence de ces mutations sur un pool de 200 témoins, afin d'éliminer les éventuels polymorphismes, c'est-à-dire les variants qui seraient présents à l'état homozygote chez des personnes indemnes d'AOC. Puis dans l'optique de vérifier l'impact des variants ou mutations identifiés sur le développement de la maladie, l'effet des mutations sur l'expression du gène ou la fonction de la protéine concernée sera analysé par différentes approches fonctionnelles.

Chez les patients sans aucune mutation identifiée à ce jour, nous allons étudier un nouveau gène : le gène *TYRP2*. En effet ce gène peu exploré à ce jour (pas de données publiées sur des cohortes de patients AOC) semble être un bon gène candidat dans l'AOC du fait du rôle de l'enzyme TYRP2 ou dopachrome tautomérase dans le cycle de synthèse de la mélanine (voie de synthèse des eumélanines).

Méthodologie

Analyse du gène *MATP*.

Pour compléter l'étude du gène *MATP*, nous allons rechercher, par des outils bioinformatiques, des marqueurs microsatellites à proximité ou à l'intérieur du gène *MATP* pour l'analyse de liaison au locus AOC4 dans les familles informatives, et dériver des fragments autour des exons de *MATP* pour mettre au point une PCR semi-quantitative (QMF-PCR ou MPLC), à la recherche de délétions intragéniques.

Analyse des régions régulatrices des *TYR* et *OCA2*.

L'étude des régions régulatrices des différents gènes passera également par une étape d'analyse bioinformatique de ces régions avec choix pertinent d'amorces pour amplifier et séquencer les régions d'intérêt à la recherche de nouvelles mutations. La région régulatrice proximale de *TYR* s'étend sur 2.5 Kb en amont du site d'initiation de la transcription et comprend une TATA box, une

CAAT box, une séquence de 236 nucléotides (nt) riches en purines autour de -800 nt, pouvant correspondre à une structure d'ADN articulée, et hautement polymorphique [42, 43], trois CRE putatifs (*cAMP-responsive elements*) entre -247 nt et -627 nt [43], un TDE (*terminal distal element*) à -1.8 Kb contenant un motif CATGTG, site de liaison du facteur de transcription MITF (*microphthalmia-associated transcription factor*) [44]. Une région régulatrice distale de *TYR* a été également identifiée comme LCR (*locus control region*) par homologie avec la souris ; sa taille est de 2 Kb, elle possède un site d'hypersensibilité à la Dnase et joue un rôle important dans le contrôle de l'expression de *TYR* dans les mélanocytes [45, 46].

Le promoteur du gène *OCA2* a été également identifié avec une région d'intérêt minimale de 250 pb en amont du site d'initiation de la traduction [47].

L'analyse de ces régions régulatrices reposera sur une recherche de délétion par QMF-PCR et sur une recherche de mutations ponctuelles par DHPLC-séquençage ou séquençage direct si nécessaire.

Chaque nouvelle mutation mise en évidence sera recherchée chez 200 témoins afin de s'assurer qu'il ne s'agit pas d'un polymorphisme.

Analyse fonctionnelle des mutations d'épissages et des mutations touchant les régions régulatrices.

Les mutations touchant des sites d'épissage seront analysées sur l'ARN extrait des leucocytes. Il a déjà été démontré par Fryer et al. [48] qu'il était possible d'analyser l'ARN du gène *TYR* sur des globules blancs. Un buffy coat obtenu à partir de 5-10 ml de sang total prélevé sur héparine permet d'obtenir suffisamment de matériel pour réaliser les tests.

A l'instar des études [15] ayant montré chez des patients possédant une seule mutation à l'état hétérozygote que seul l'ARNm porteur de cette mutation était trouvé dans les lymphocytes, nous effectuerons l'analyse de l'expression de l'ARN messager de *TYR* au niveau des lymphocytes chez deux types de patients :

1. patients porteurs d'une mutation hétérozygote, afin d'orienter la recherche de la seconde mutation vers les éléments régulateurs (promoteur, LCR)

2. patients chez lesquels un variant nucléotidique aura été trouvé dans les éléments régulateurs, afin de montrer qu'il s'agit (ou non) d'une mutation altérant l'expression du gène.

En plus de la mutation servant de marqueur, ces études pourront tirer également profit de polymorphismes très fréquents mis en évidence dans le gène, tels que c.575A>C/p.Tyr192Ser dans l'exon 1 ou c.-301C/T et c.-199C/A dans le promoteur ; ceci sera bien entendu restreint aux sujets hétérozygotes pour ces polymorphismes au niveau génomique.

Il est à noter que pour les autres gènes (*OCA2*, *TYRP1* et *MATP*), les mutations sur les deux allèles sont le plus souvent identifiées chez les patients. Cependant dans l'hypothèse où une mutation des régions régulatrices de l'un ou l'autre de ces gènes serait suspectée, l'approche décrite ci-dessus pour *TYR* serait mise en œuvre, en particulier si nous arrivons à montrer que l'ARNm de ces gènes peut être exploré dans les lymphocytes (études en cours au laboratoire).

L'effet des mutations trouvées dans les éléments régulateurs sera également étudié par des tests de transfection transitoire avec des plasmides d'expression plaçant l'élément régulateur en amont d'un gène rapporteur tel que l'EGFP. La transfection sera faite dans des mélanocytes en culture (savoir-faire dans l'équipe du Pr Taieb, immédiatement voisine de la notre). Les versions sauvage et mutées seront testées en parallèle, de façon à comparer le niveau d'expression du gène rapporteur et observer ainsi l'éventuel effet de la mutation.

Cette stratégie sera commune pour l'analyse des mutations régulatrices des différents gènes étudiés.

Autres tests fonctionnels.

D'autres types d'analyses fonctionnelles ont été décrites pour le gène *TYR*. Si nécessaire, ces tests seront mis en place pour étudier plus avant l'effet de certaines mutations sur la fonction de la protéine Tyrosinase.

Il s'agit :

- de tests des trois activités enzymatiques de TYR (tyrosine hydroxylase, dopa oxydase et DHI oxydase) [49] ;

- de tests de liaison au Cu après transfection de la version mutée de l'ADNc de TYR (obtenue par mutagenèse dirigée) dans des cellules type HeLa ;
-des tests visant à mettre en évidence une anomalie de la maturation et du processing de la protéine dans la cellule, aboutissant à la dégradation de la protéine mutée. Il est en effet maintenant accepté que l'AOC lié à des mutations de TYR fait partie des maladies dites de « rétention dans le réticulum endoplasmique » [50, 51]. Ces tests reposent sur l'immuno-localisation intracellulaire de la protéine TYR après transfection de la version mutée de l'ADNc de TYR (obtenue par mutagenèse dirigée) dans des mélanocytes : colocalisation avec des protéines chaperon spécifiques soit du réticulum endoplasmique (la calnexine), soit de l'appareil de Golgi (alpha1,2 mannosidase II) [51, 52] ou sur la sensibilité/résistance à l'action de l'Endoglycosidase H [51].

Etude d'un gène candidat : *TYRP2*.

Du fait du rôle de l'enzyme TYRP2 ou dopachrome tautomérase dans le cycle de synthèse de la mélanine (voie de synthèse des eumélanines), le gène *TYRP2* apparaît comme un bon candidat à tester à explorer dans les cas d'AOC demeurant non expliqués malgré l'analyse extensive des quatre gènes *TYR*, *OCA2*, *TYRP1* et *MATP*.

L'étude du gène *TYRP2* nécessitera une analyse bioinformatique pour vérifier la structure introns-exons, dériver des amorces permettant d'amplifier les différents exons, les jonctions introns-exons, et éventuellement les régions régulatrices. L'étude moléculaire des patients se fera par DHPLC suivie du séquençage des variants à la recherche de mutations, et par QMF-PCR à la recherche de réarrangements (délétions, duplications).

Faisabilité du projet :

- Maîtrise quotidienne de la recherche des mutations ponctuelles et des microréarrangements à type de délétion ; le laboratoire a beaucoup investi dans ce domaine dans les dernières années, avec la mise en place de la CGH-array et de la QMF-PCR notamment, que nous utilisons maintenant largement ; voir aussi publications de l'équipe.

- Savoir-faire large des techniques de génétique moléculaire, notamment dans le domaine du clonage ;
- Savoir faire en terme de transfections de cellules et d'analyse de gènes rapporteurs ; voir aussi publications de l'équipe.
- Equipements disponibles : l'Equipe dispose des locaux adaptés à la réalisation du projet ; elle dispose également des gros équipements nécessaires pour la recherche de mutations (DHPLC, séquençage), la culture de cellules, la microscopie en fluorescence, notamment.
- L'Equipe est constituée de :
 - Benoît Arveiler, PU-PH (20%)
 - Caroline Rooryck-Thambo, AHU (50%)
 - Guénaëlle Lancelot, Technicienne (30%)
 - Ingrid Burgelin, Adjointe Technique (10%)
 - Michèle Marche, Ingénieur de Recherche (10%)

Les membres de l'équipe combinent l'expertise aux différents niveaux : analyse des mutations, culture cellulaire, transfection, analyse de l'ARN, bioinformatique.

L'équipe pourra également bénéficier de l'expertise de l'Equipe immédiatement voisine du Pr. Alain Taieb pour la réalisation de tests d'activité de la Tyrosinase, et pour la culture des mélanocytes.

Retombées attendues

Nos travaux permettront d'accroître le taux de détection des mutations et ainsi d'améliorer la qualité du diagnostic des patients atteints.

L'identification de nouvelles mutations dans les gènes connus et peut être l'identification d'un nouveau gène de l'AOC (*TYRP2*), permettront de compléter l'analyse chez des patients partiellement génotypés, ou d'établir un diagnostic de certitude chez des patients sans aucune mutation identifiée à ce jour. Ainsi, le risque de transmission aux générations suivantes pourra être établi et un conseil génétique adapté pourra être proposé aux familles.

La mise en évidence d'un éventuel digénisme, avec deux gènes porteurs de mutations hétérozygotes, viendrait d'une part enrichir la connaissance sur ces phénomènes d'oligogénisme fortement suspectés dans ce type de pathologies portant sur une voie de synthèse métabolique commune, et, d'autre part,

préciser notre connaissance sur les modes d'hérédité de cette pathologie, avec des conséquences pour le conseil génétique.

La mise en évidence de la pathogénicité de certaines mutations ainsi que les résultats des analyses fonctionnelles permettront de mieux connaître les mécanismes physiopathologiques de la maladie et, plus généralement, des désordres du cycle de synthèse de la mélanine.

Aspects financiers et justification de la demande.

Fonctionnement : 7500 € TTC

Réactifs de biologie moléculaire et culture cellulaire :

PCR : amorces, Taq Polymerase

Analyse DHPLC

Séquençage

Clonage

Extraction d'ARN, Kits RT-PCR

Culture cellulaire

Consommables (tubes à essais, pointes, flacons de culture cellulaire, ...)

Personnels : 7500 € TTC

L'emploi d'un technicien à mi-temps pendant six mois est nécessaire pour aider à la mise en place des aspects d'analyse des ARN, les études de fonction des promoteurs mutés à l'aide de gènes rapporteurs, et les études fonctionnelles de la protéine TYR.

Bibliographie

1. King RA, Hearing VJ, Creel D, Oetting WS. Albinism. In: CR Scriver, AL Beaudet, WS Sly, and DV Valle, editors. The metabolic and molecular basis of inherited disease. New York: Mc Graw-Hill; 1995. p. 4353-92.
2. Anderson MG, Libby RT, Mao M, Cosma IM, Wilson LA, Smith RS, et al. Genetic context determines susceptibility to intraocular pressure elevation in a mouse pigmented glaucoma. *BMC Biol.* 2006;4: 20.
3. Okulicz JF, Shah RS, Schwartz RA, Janniger CK. Oculocutaneous albinism. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2003;17: 251-6.
4. Tobin D, Quinn AG, Ito S, Thody AJ. The presence of tyrosinase and related proteins in human epidermis and their relationship to melanin type. *Pigment Cell Res.* 1994;7: 204-9.
5. Kugelmann TP, Van Scott EJ. Tyrosinase activity in melanocytes of human albinos. *J Invest Dermatol.* 1961;37: 73-6.
6. Barton DE, Kwon BS, Francke U. Human tyrosinase gene, mapped to chromosome 11 (q14---q21), defines second region of homology with mouse chromosome 7. *Genomics.* 1988;3: 17-24.
7. Oetting WS. The tyrosinase gene and oculocutaneous albinism type 1 (OCA1): A model for understanding the molecular biology of melanin formation. *Pigment Cell Res.* 2000;13: 320-5.
8. Coupry I, Taine L, Goizet C, Soriano C, Mortemousque B, Arveiler B, et al. Leucodystrophy and oculocutaneous albinism in a child with an 11q14 deletion. *J Med Genet.* 2001;38: 35-8.
9. Goizet C, Coupry I, Rooryck C, Taine L, Dormoy V, Lacombe D, et al. Molecular characterization of an 11q14.3 microdeletion associated with leukodystrophy. *Eur J Hum Genet.* 2004;12: 245-50.
10. Schnur RE, Sellinger BT, Holmes SA, Wick PA, Tatsumura YO, Spritz RA. Type I oculocutaneous albinism associated with a full-length deletion of the tyrosinase gene. *J Invest Dermatol.* 1996;106: 1137-40.
11. Chaki M, Sengupta M, Mukhopadhyay A, Subba Rao I, Majumder PP, Das M, et al. OCA1 in different ethnic groups of India is primarily due to founder mutations in the tyrosinase gene. *Ann Hum Genet.* 2006;70: 623-30.
12. King RA, Pietsch J, Fryer JP, Savage S, Brott MJ, Russell-Eggitt I, et al. Tyrosinase gene mutations in oculocutaneous albinism 1 (OCA1): definition of the phenotype. *Hum Genet.* 2003;113: 502-13.
13. Oetting WS, King RA. Molecular basis of albinism: mutations and polymorphisms of pigmentation genes associated with albinism. *Hum Mutat.* 1999;13: 99-115.
14. Opitz S, Kasmann-Kellner B, Kaufmann M, Schwinger E, Zuhlke C. Detection of 53 novel DNA variations within the tyrosinase gene and accumulation of mutations in 17 patients with albinism. *Hum Mutat.* 2004;23: 630-1.
15. Oetting WS, Fryer JP, Shriram S, King RA. Oculocutaneous albinism type 1: the last 100 years. *Pigment Cell Res.* 2003;16: 307-11.
16. Berson JF, Frank DW, Calvo PA, Bieler BM, Marks MS. A common temperature-sensitive allelic form of human tyrosinase is retained in the endoplasmic reticulum at the nonpermissive temperature. *J Biol Chem.* 2000;275: 12281-9.

17. Lee ST, Nicholls RD, Schnur RE, Guida LC, Lu-Kuo J, Spinner NB, et al. Diverse mutations of the P gene among African-Americans with type II (tyrosinase-positive) oculocutaneous albinism (OCA2). *Hum Mol Genet.* 1994;3: 2047-51.
18. Rinchik EM, Bultman SJ, Horsthemke B, Lee ST, Strunk KM, Spritz RA, et al. A gene for the mouse pink-eyed dilution locus and for human type II oculocutaneous albinism. *Nature.* 1993;361: 72-6.
19. Oetting WS, Garrett SS, Brott M, King RA. P gene mutations associated with oculocutaneous albinism type II (OCA2). *Hum Mutat.* 2005;25: 323.
20. Puri N, Durbam-Pierre D, Aquaron R, Lund PM, King RA, Brilliant MH. Type 2 oculocutaneous albinism (OCA2) in Zimbabwe and Cameroon: distribution of the 2.7-kb deletion allele of the P gene. *Hum Genet.* 1997;100: 651-6.
21. Jannot AS, Meziani R, Bertrand G, Gerard B, Descamps V, Archimbaud A, et al. Allele variations in the OCA2 gene (pink-eyed-dilution locus) are associated with genetic susceptibility to melanoma. *Eur J Hum Genet.* 2005;13: 913-20.
22. Boissy RE, Zhao H, Oetting WS, Austin LM, Wildenberg SC, Boissy YL, et al. Mutation in and lack of expression of tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) in melanocytes from an individual with brown oculocutaneous albinism: a new subtype of albinism classified as "OCA3". *Am J Hum Genet.* 1996;58: 1145-56.
23. Abbott C, Jackson IJ, Carritt B, Povey S. The human homolog of the mouse brown gene maps to the short arm of chromosome 9 and extends the known region of homology with mouse chromosome 4. *Genomics.* 1991;11: 471-3.
24. Olivares C, Jimenez-Cervantes C, Lozano JA, Solano F, Garcia-Borrón JC. The 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) oxidase activity of human tyrosinase. *Biochem J.* 2001;354: 131-9.
25. Sarangarajan R, Boissy RE. Tyrp1 and oculocutaneous albinism type 3. *Pigment Cell Res.* 2001;14: 437-44.
26. Manga P, Sato K, Ye L, Beermann F, Lamoreux ML, Orlow SJ. Mutational analysis of the modulation of tyrosinase by tyrosinase-related proteins 1 and 2 in vitro. *Pigment Cell Res.* 2000;13: 364-74.
27. Luo D, Chen H, Jimbow K. Cotransfection of genes encoding human tyrosinase and tyrosinase-related protein-1 prevents melanocyte death and enhances melanin pigmentation and gene expression of Lamp-1. *Exp Cell Res.* 1994;213: 231-41.
28. Manga P, Kromberg JG, Box NF, Sturm RA, Jenkins T, Ramsay M. Rufous oculocutaneous albinism in southern African Blacks is caused by mutations in the TYRP1 gene. *Am J Hum Genet.* 1997;61: 1095-101.
29. Rooryck C, Roudaut C, Robine E, Musebeck J, Arveiler B. Oculocutaneous albinism with TYRP1 gene mutations in a Caucasian patient. *Pigment Cell Res.* 2006;19: 239-42.
30. Forsheew T, Khaliq S, Tee L, Smith U, Johnson CA, Mehdi S, et al. Identification of novel TYR and TYRP1 mutations in oculocutaneous albinism. *Clin Genet.* 2005;68: 182-4.
31. Newton JM, Cohen-Barak O, Hagiwara N, Gardner JM, Davisson MT, King RA, et al. Mutations in the human orthologue of the mouse underwhite

- gene (uw) underlie a new form of oculocutaneous albinism, OCA4. *Am J Hum Genet.* 2001;69: 981-8.
32. Fukamachi S, Shimada A, Shima A. Mutations in the gene encoding B, a novel transporter protein, reduce melanin content in medaka. *Nat Genet.* 2001;28: 381-5.
 33. Costin GE, Valencia JC, Vieira WD, Lamoreux ML, Hearing VJ. Tyrosinase processing and intracellular trafficking is disrupted in mouse primary melanocytes carrying the underwhite (uw) mutation. A model for oculocutaneous albinism (OCA) type 4. *J Cell Sci.* 2003;116: 3203-12.
 34. Ritland K, Newton C, Marshall HD. Inheritance and population structure of the white-phased "Kermode" black bear. *Curr Biol.* 2001;11: 1468-72.
 35. Rundshagen U, Zuhlke C, Opitz S, Schwinger E, Kasmann-Kellner B. Mutations in the MATP gene in five German patients affected by oculocutaneous albinism type 4. *Hum Mutat.* 2004;23: 106-10.
 36. Suzuki T, Inagaki K, Fukai K, Obana A, Lee ST, Tomita Y. A Korean case of oculocutaneous albinism type IV caused by a D157N mutation in the MATP gene. *Br J Dermatol.* 2005;152: 174-5.
 37. Inagaki K, Suzuki T, Shimizu H, Ishii N, Umezawa Y, Tada J, et al. Oculocutaneous albinism type 4 is one of the most common types of albinism in Japan. *Am J Hum Genet.* 2004;74: 466-71.
 38. Inagaki K, Suzuki T, Ito S, Suzuki N, Adachi K, Okuyama T, et al. Oculocutaneous albinism type 4: six novel mutations in the membrane-associated transporter protein gene and their phenotypes. *Pigment Cell Res.* 2006;19: 451-3.
 39. Graf J, Hodgson R, van Daal A. Single nucleotide polymorphisms in the MATP gene are associated with normal human pigmentation variation. *Hum Mutat.* 2005;25: 278-84.
 40. Niel F, Martin J, Dastot-Le Moal F, Costes B, Boissier B, Delattre V, et al. Rapid detection of CFTR gene rearrangements impacts on genetic counselling in cystic fibrosis. *J Med Genet.* 2004;41: e118.
 41. Giebel LB, Strunk KM, Spritz RA. Organization and nucleotide sequences of the human tyrosinase gene and a truncated tyrosinase-related segment. *Genomics.* 1991;9: 435-45.
 42. Morris SW, Muir W, St Clair D. Dinucleotide repeat polymorphism at the human tyrosinase gene. *Nucleic Acids Res.* 1991;19: 6968.
 43. Kikuchi H, Miura H, Yamamoto H, Takeuchi T, Dei T, Watanabe M. Characteristic sequences in the upstream region of the human tyrosinase gene. *Biochim Biophys Acta.* 1989;1009: 283-6.
 44. Yasumoto K, Yokoyama K, Shibata K, Tomita Y, Shibahara S. Microphthalmia-associated transcription factor as a regulator for melanocyte-specific transcription of the human tyrosinase gene. *Mol Cell Biol.* 1994;14: 8058-70.
 45. Regales L, Giraldo P, Garcia-Diaz A, Lavado A, Montoliu L. Identification and functional validation of a 5' upstream regulatory sequence in the human tyrosinase gene homologous to the locus control region of the mouse tyrosinase gene. *Pigment Cell Res.* 2003;16: 685-92.
 46. Fryer JP, Oetting WS, King RA. Identification and characterization of a DNase hypersensitive region of the human tyrosinase gene. *Pigment Cell Res.* 2003;16: 679-84.

47. Lee ST, Nicholls RD, Jong MT, Fukai K, Spritz RA. Organization and sequence of the human P gene and identification of a new family of transport proteins. *Genomics*. 1995;26: 354-63.
48. Fryer JP, Oetting WS, Brott MJ, King RA. Alternative splicing of the tyrosinase gene transcript in normal human melanocytes and lymphocytes. *J Invest Dermatol*. 2001;117: 1261-5.
49. Tripathi RK, Hearing VJ, Urabe K, Aroca P, Spritz RA. Mutational mapping of the catalytic activities of human tyrosinase. *J Biol Chem*. 1992;267: 23707-12.
50. Petrescu SM, Branza-Nichita N, Negroiu G, Petrescu AJ, Dwek RA. Tyrosinase and glycoprotein folding: roles of chaperones that recognize glycans. *Biochemistry*. 2000;39: 5229-37.
51. Toyofuku K, Wada I, Valencia JC, Kushimoto T, Ferrans VJ, Hearing VJ. Oculocutaneous albinism types 1 and 3 are ER retention diseases: mutation of tyrosinase or Tyrp1 can affect the processing of both mutant and wild-type proteins. *Faseb J*. 2001;15: 2149-61.
52. Halaban R, Svedine S, Cheng E, Smicun Y, Aron R, Hebert DN. Endoplasmic reticulum retention is a common defect associated with tyrosinase-negative albinism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97: 5889-94.

**LISTE DE PUBLICATIONS 2000-2006
DE L'EQUIPE.**

Vaysse L., **Arveiler B.** - Transfection using synthetic peptides : comparison of three DNA-compacting peptides and effect of centrifugation.
Biochimica Biophysica Acta, 1474, 244-250 (2000).

Vaysse L., Burgelin I., Merlio J.P., **Arveiler B.**- Improved transfection using epithelial cell line-selected ligands and fusogenic peptides.
Biochim Biophys Acta: 1475, 369-376 (2000).

Dupuy D., Aubert I., Guyonnet Dupérat V., Petit J., Taine L., Stef M., Bloch B., **Arveiler B.**- Mapping, characterization and expression analysis of the SM-20 human homologue, C1orf12, and identification of a novel related gene, SCAND2.
Genomics, 69, 348-354 (2000).

Goizet C., Excoffier E., Taine L., Taupiac E., Abd El Moneim A., **Arveiler B.**, Bouvard M, Lacombe D.- Case with autistic disorder and chromosome 22q13.3 deletion identified by FISH.
Am. J. Med. Genet. (Neuropsychiatric Genetics), 96, 839-844 (2000).

Coupy I., Taine L., Goizet C., Soriano C., Mortemousque B., **Arveiler B.**, Lacombe D.- Leukodystrophy and oculocutaneous albinism in a child with an 11q14 deletion.
J. Med Genet, 38, 35-8 (2001).

Millar J.K., Christie S., Anderson S., Lawson D., Loh D. H.-W., Devon R.S., **Arveiler B.**, Muir W.J., Blackwood D.H.R., Porteous D.J.- Genomic structure and localisation within a linkage hotspot of Disrupted in Schizophrenia 1, a gene disrupted by a translocation segregating with schizophrenia.
Molecular Psychiatry, 6, 173-178 (2001).

Boisseau-Garsaud A.-M., Saint-Cyr I., Quist D., **Arveiler B.**, Garsaud P.- Familial aggregation of vitiligo in the French West Indies (Isle of Martinique).
Eur. J. Dermatol., 11, 554-556 (2001).

Dupuy D., Guyonnet-Dupérat V., Vaysse L., Aubert I., Bloch B., **Arveiler B.** – SCAND2, a novel gene derived from a zinc finger protein gene by exon shuffling.
Gene, 289, 1-6 (2002).

Coupy I., Roudaut C., Stef M., Delrue M.-A., Marche M., Burgelin I., Taine L., Lacombe D., **Arveiler B.** – Molecular analysis of the CBP gene in 63 patients with Rubinstein-Taybi syndrome.
J. Med. Genet., 39, 415-21 (2002).

Vaysse L., Guillaume C., Burgelin I., Gorry P., Férec C., **Arveiler B.** – Proteolipidic vectors for gene transfer to the lung.
Biophysical and Biochemical Research Communications, 290, 1489-1498 (2002).

Boisseau-Garsaud A.M., Garsaud P., Lejoly-Boisseau H., Robert M., Quist D., **Arveiler B.** – Increase in total blood antioxidant status and selenium levels in black patients with active vitiligo.
Int. J. Dermatol., 41, 640-642 (2002).

Delrue M.A., **Arveiler B.**, Lacombe D. - Costello syndrome: clinical aspects and tumor risk.

Arch. Pediatr. 10, 1059-63 (2002).

Delrue M.A., Chateil J.F. **Arveiler B.**, Lacombe D. - Costello syndrome and neurological abnormalities

Am. J. Med. Genet. 123A(3), 301-305 (2003).

Coupry I, Monnet L, Abd El Moneim Attia A, Taine L, Lacombe D, **Arveiler B.** - Analysis of CBP (CREBBP) gene deletions in Rubinstein-Taybi Syndrome patients using real-time quantitative PCR.

Human Mut, 23, 278-284 (2004).

Goizet C., Coupry I., Rooryck C., Taine L., Dormoy V., Lacombe D., **Arveiler B.** - Molecular characterization of a 11q14.3 microdeletion associated with a new type of leukodystrophy.

Eur J Hum Genet, 12, 245-250 (2004).

Rodríguez-Martínez A.B., Barreau C., Coupry I., Yagüe J., Galdós-Alcelay L., Ibáñez A., Digón A., Fernández-Manchola J.I., Goizet C., Castro A., Cuevas N., Alvarez-Alvarez M., de Pancorbo M.M., **Arveiler B.**, Zarranz J.J.: Ancestral origin of the prion protein gene D178N mutation in the Basque Country.

Hum. Genet, 117, 61-69 (2005).

Chassaing N, Siani V, Carles D, Delezoide AL, Alberti EM, Battin J, Chateil JF, Gilbert-Dussardier B, Coupry I, **Arveiler B.**, Saura R, Lacombe D. X-linked dominant chondrodysplasia with platyspondyly, distinctive brachydactyly, hydrocephaly, and microphthalmia.

Am J Med Genet A. 136:307-312 (2005).

Costaglioli P., Joubes J., Garcia C., Stef M., **Arveiler B.**, Lessire R., Garbay B. Profiling candidate genes involved in wax biosynthesis in Arabidopsis thaliana by microarray analysis.

Biochim Biophys Acta, 1734, 247-258 (2005).

Kerr B, Delrue M-A, Sigaudy S, Perveen R, Marche M, Burgelin I, Stef M, Tang B, Eden OB, O'Sullivan J, De Sandre-Giovannoli A, Reardon W, Brewer C, Bennett C, Quarell O, Fryer A, Donnai D, Stewart F, Raoul Hennekam, Hélène Cavé, Alain Verloes, Philip N, Lacombe D, Levy N, **Arveiler B.**, Black G. Genotype- phenotype correlation in Costello syndrome; HRAS mutation analysis in 43 cases.

J. Med. Genet., 43, 401-405 (2006).

Galéra C, Delrue M-A, Goizet C, Etchegoyhen K, Taupiac E, Sigaudy S, **Arveiler B.**, Philip N, Bouvard M, Lacombe D. Behavioral and temperamental features of children with Costello syndrome.

Am. J. Med Genet., 140, 968-974 (2006).

Rooryck C, Roudaut C, Robine E, Müsebeck J, **Arveiler B.** Oculocutaneous Albinism Type 3 in a Caucasian Patient.

Pigment Cell Research, 19, 239-242 (2006).

Delaherche A, Bon E, Dupé A, Lucas M, **Arveiler B.**, de Daruvar A, Lonvaud-Funel A Intraspecific diversity of Oenococcus oeni strains determined by sequence analysis of target genes.

Appl Microbiol Biotechnol. Aug 16th. [Epub ahead of print] (2006).

Rondeau V., Iron A., Letenneur B., Commenges D., Duchene F., **Arveiler B.**, Dartigues J.F. Analysis of the effect of aluminum in drinking water and transferring C2 allele on Alzheimer's disease.

Eur J Neurosciences,13, 1022-1025 (2006).

Reboul MP, Tandonnet O, Biteau N, Belet-de-Putter C, Rebouissoux L, Moradkhani K, Qi-Wen Z, Saura R, **Arveiler B**, Lacombe D, Taine L, Iron A. Mosaic maternal uniparental isodisomy for chromosome 7.

Clin Genet, 70, 207-213 (2006).

Stef M, Simon D, Burgelin I, Guisle I, Catherine C, Delrue MA, Lacombe D, Léger J, **Arveiler B**. Testing and improving experimental parameters for the use of low molecular weight targets in array-CGH experiments.

Human Mutation, 27, 1143-1150 (2006).

Bloch-Zupan A, Stachtou J, Emmanouil D, **Arveiler B**, Griffiths D, Lacombe D. Oro-Dental Features as Useful Diagnostic Tool in Rubinstein-Taybi Syndrome.

Am J Med Genet, sous presse.

Rooryck-Thambo C, Morice F, Mortemousque B, Lacombe L, Taïeb T, **Arveiler B**. Albinisme oculo-cutané. Revue générale.

Ann Dermatol Vénérol, sous presse.

Rooryck C, Goizet C, Marchand S, Chateil JF, Cances C, **Arveiler B**, Verloes A, Lacombe D. Bardet-Biedl Syndrome and Brain Abnormalities. *Am J Med Genet*. Soumis pour publication.

Stef M, Simon D, Mardirossian B, Delrue M-A, Burgelin I, Hubert C, Bonnet F, Gorry P, Longy M, Lacombe D, Coupry I, **Arveiler B**. Spectrum of CREBBP gene dosage anomalies in Rubinstein-Taybi Syndrome patients. *Eur J Hum Genet* (soumis pour publication).