

Description du produit

SALSA® MLPA® Probemix P055-D1 PAH

A utiliser avec le protocole général MLPA.

Version D1

Voir l'historique complet du produit page 9.

Numéros de catalogue:

- **P055-025R:** SALSA MLPA Probemix P055 PAH, 25 réactions.
- **P055-050R:** SALSA MLPA Probemix P055 PAH, 50 réactions.
- **P055-100R:** SALSA MLPA Probemix P055 PAH, 100 réactions.

A utiliser en combinaison avec les kits de réactifs SALSA MLPA et le logiciel d'analyse de données Coffalyser.Net. Les kits de réactifs MLPA sont fournis avec une amorce PCR marquée d'un fluorochrome FAM ou Cy5.0, adaptée aux séquenceurs capillaire Applied Biosystems et Beckman/SCIEX, respectivement (voir www.mrcholland.com).

Certificat d'analyse

Les informations concernant les conditions de stockage, les tests de qualité et un échantillon d'électrophorégramme du lot de vente actuel sont disponibles sur www.mrcholland.com.

Précautions et avertissements

Pour usage professionnel uniquement. Consultez toujours la description du produit la plus récente ET le protocole général MLPA avant utilisation : www.mrcholland.com. Il est de la responsabilité de l'utilisateur d'être au courant des dernières connaissances scientifiques de l'application avant de tirer des conclusions des découvertes générées avec ce produit.

Destination

Le SALSA MLPA Probemix P055 PAH est un test semi-quantitatif de diagnostic in vitro (IVD)¹ ou à usage de recherche uniquement (RUO)² pour la détection de délétions ou de duplications du gène *PAH* dans l'ADN génomique isolé à partir d'échantillons de sang total périphérique humain et l'ADN de cellules prélevées par écouvillonnage buccal. P055 PAH est destiné à confirmer une cause potentielle et un diagnostic clinique de déficit en phénylalanine hydroxylase chez les patients diagnostiqués avec une phénylcétonurie (PCU) et pour les tests génétiques moléculaires des membres de la famille à risque.

Les variations du nombre de copies (CNV) détectées avec P055 PAH doivent être confirmées avec une technique différente. En particulier, les CNV détectées par une seule sonde nécessitent toujours une confirmation par une autre méthode. La plupart des défauts du gène *PAH* sont des mutations ponctuelles, dont aucune ne sera détectée par la MLPA. Il est donc recommandé d'utiliser ce test en combinaison avec une analyse de séquence.

Les résultats des tests sont destinés à être utilisés conjointement avec d'autres résultats cliniques et diagnostiques, conformément aux normes de pratique professionnelle, y compris la confirmation par des méthodes alternatives, l'évaluation parentale, l'évaluation génétique clinique et le conseil, le cas échéant. Les résultats de ce test doivent être interprétés par un généticien moléculaire clinique ou équivalent.

Ce produit n'est pas destiné à être utilisé pour le diagnostic initial de la PCU, à des fins de diagnostic autonome, de test pré-implantatoire ou prénatal, de dépistage de la population, ou pour la détection ou le dépistage d'aberrations génétiques acquises ou somatiques.

¹Veuillez noter que ce probemix est destiné au diagnostic in vitro (IVD) dans les pays spécifiés à la fin de cette description du produit. Dans tous les autres pays, le produit est destiné à la recherche uniquement (RUO).

²À utiliser en combinaison avec un kit de réactifs SALSA MLPA et le logiciel d'analyse Coffalyser.Net.

Contexte clinique

La phénylcétonurie (PCU), ainsi que les formes moins sévères de la maladie (parfois appelées variantes de la PCU et hyperphénylalaninémie non PCU), est une maladie autosomique récessive entraînant une anomalie métabolique caractérisée par une hyperphénylalaninémie résultant d'un déficit en phénylalanine hydroxylase (98 % des cas) ou altération de la synthèse ou du recyclage de la tétrahydrobioptérine (2 % des cas) (Scriver and Kaufman 2001). La PCU non traitée peut entraîner une microcéphalie, une épilepsie, un retard mental sévère et des problèmes de comportement. Plus d'informations sur la PCU sont disponibles sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1504/>.

La majorité des cas de PCU sont dus à des défauts du gène *PAH*. Parmi ces défauts figurent les délétions et les duplications d'exons complets, qui sont généralement manquées par l'analyse de séquence standard. La technique MLPA permet de détecter la plupart de ces délétions et duplications et complète donc l'analyse de séquence du gène *PAH*. Le nombre attendu de réarrangements chromosomiques de l'HTAP pouvant être détectés avec ce mélange de sondes MLPA est compris entre 1 et 5 % de tous les cas de PCU dans la plupart des populations (voir ci-dessous les publications sur le mélange de sondes P055 *PAH*).

Structure du gène

Le gène *PAH* couvre environ 121 kilobases (kb) sur le chromosome 12q23.2 et contient 13 exons. Aucune séquence LRG pour la *PAH* n'est disponible pour le moment. La séquence d'ADN chromosomique de GenBank est NG_008690.2.

Variations du transcrit

Deux variantes du transcrit *PAH* ont été définies. La variante de transcription 1 (NM_000277.3, 3759 nucléotides (nt), séquence codante 115-1473) est le standard de référence dans le projet NCBI RefSeqGene : www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5053.

Numérotation des exons

La numérotation des exons *PAH* utilisée dans cette description de produit P055-D1 *PAH* est la numérotation des exons de la séquence NG_008690.2. Étant donné que des modifications des bases de données peuvent survenir après la publication de cette description de produit, les séquences NG_ et NM_ et la numérotation des exons peuvent ne pas être à jour.

Contenu du Probemix

Le SALSA MLPA Probemix P055-D1 *PAH* contient 38 sondes MLPA avec des produits d'amplification compris entre 128 et 427 nt. Cela comprend 22 sondes pour le gène *PAH* et une sonde en amont et en aval de *PAH*. De plus, 14 sondes de référence sont incluses pour détecter les localisations chromosomiques autosomiques. Les séquences complètes des sondes et l'identité des gènes détectés par les sondes de référence sont disponibles en ligne (www.mrcholland.com).

Plusieurs éléments partiellement conservés et éventuellement régulateurs sont localisés juste en amont de l'exon 1 du gène *PAH*. Ces sites hypersensibles à la DNaseI ont été décrits par Bristeau et al. (2001). Deux sondes sont situées dans ces séquences en amont (418 nt HSS3 et 154 nt HSS2).

Ce mélange de sondes contient neuf fragments de contrôle qualité générant des produits d'amplification entre 64 et 105 nt : quatre fragments de quantité d'ADN (fragments Q), deux fragments de dénaturation d'ADN (fragments D), un fragment de référence et un chromosome X et un fragment spécifique au chromosome Y (voir tableau ci-dessous). Plus d'informations sur la façon d'interpréter les observations sur ces fragments de contrôle peuvent être trouvées dans le protocole général MLPA et en ligne sur www.mrcholland.com.

Longueur (nt)	Nom
64-70-76-82	Fragments Q (visibles uniquement avec <100 ng d'ADN d'échantillon)
88-96	Fragments D (un signal faible indique une dénaturation incomplète)
92	Fragment de référence
100	Fragment X (spécifique du chromosome X)
105	Fragment Y (spécifique du chromosome Y)

Technique MLPA

Les principes de la technique MLPA (Schouten et al. 2002) sont décrits dans le Protocole général MLPA (www.mrcholland.com).

Validation de la technique MLPA

Une validation interne de la technique MLPA utilisant 16 échantillons d'ADN provenant d'individus sains est requise, notamment lors de la première utilisation de la MLPA, ou lors du changement de procédure de manipulation des échantillons, de méthode d'extraction d'ADN ou d'instruments utilisés. Cette expérience de validation devrait entraîner un écart type $\leq 0,10$ pour toutes les sondes au cours de l'expérience.

Échantillons requis

ADN extrait de sang périphérique humain ou d'écouillons buccaux, exempt d'impuretés connues pour affecter les réactions MLPA. Pour plus d'informations, veuillez-vous référer à la section sur le traitement des échantillons d'ADN dans le protocole général de la MLPA.

Échantillons de référence

Un nombre suffisant (≥ 3) d'échantillons de référence doit être inclus dans chaque expérience MLPA pour la normalisation des données. Tous les échantillons testés, y compris les échantillons d'ADN de référence, doivent provenir du même type de tissu, être manipulés selon la même procédure et préparés en utilisant la même méthode d'extraction d'ADN lorsque cela est possible. Les échantillons de référence doivent provenir d'individus non apparentés issus de familles sans antécédents de phénylcétonurie. De plus amples informations concernant la sélection et l'utilisation d'échantillons de référence sont disponibles dans le protocole général de la MLPA (www.mrcholland.com).

Échantillons d'ADN de contrôle positifs

MRC Holland ne peut pas fournir d'échantillons d'ADN positifs. L'inclusion d'un échantillon positif dans chaque expérience est recommandée. L'Institut Coriell (<https://catalog.coriell.org>) et l'Institut Leibniz DSMZ (<https://www.dsmz.de/>) possèdent une collection diversifiée de ressources biologiques qui peuvent être utilisées comme échantillon d'ADN de contrôle positif dans vos expériences MLPA. La qualité des lignées cellulaires peut changer ; par conséquent, les échantillons doivent être validés avant utilisation.

Caractéristiques de performance

Le nombre attendu de réarrangements chromosomiques du gène *PAH* pouvant être détectés avec ce mélange de sondes MLPA est compris entre 1 et 5 % de tous les cas de PCU, dans la plupart des populations (voir ci-dessous les publications sur le mélange de sondes P055 PAH). La sensibilité et la spécificité analytiques pour la détection des délétions/duplications dans le gène *PAH* sont très élevées et peuvent être considérées $> 95\%$.

Les performances analytiques peuvent être compromises par : des SNV ou d'autres polymorphismes dans la séquence cible d'ADN, des impuretés dans l'échantillon d'ADN, une dénaturation incomplète de l'ADN, l'utilisation d'un échantillon d'ADN insuffisant ou trop important, l'utilisation d'échantillons de référence insuffisants ou inappropriés, des problèmes d'électrophorèse capillaire ou une mauvaise procédure de normalisation des données et d'autres erreurs techniques. Le protocole général de la MLPA contient des directives techniques et des informations sur l'évaluation/la normalisation des données.

Analyse des données

Le logiciel Coffalyser.Net doit être utilisé pour l'analyse des données en combinaison avec la feuille Coffalyser MLPA spécifique au lot appropriée. Pour les deux, la dernière version doit être utilisée. Le logiciel Coffalyser.Net est téléchargeable gratuitement sur www.mrcholland.com. L'utilisation d'autres logiciels non propriétaires peut conduire à des résultats non concluants ou faux. Pour plus de détails sur le contrôle de la qualité MLPA et l'analyse des données, y compris la normalisation, consultez le manuel de référence Coffalyser.Net.

Interprétation des résultats

Les résultats attendus pour les sondes MLPA spécifiques à la région du gène *PAH* sont des nombres de copies d'allèles, 2 (normal), 1 (délétion hétérozygote), 0 (délétion homozygote), 3 (duplication hétérozygote) et parfois 4 (duplication homozygote ou triplication hétérozygote).

L'écart type de chaque sonde individuelle sur tous les échantillons de référence doit être $\leq 0,10$ et le ratio final (RF) de chaque sonde de référence individuelle dans les échantillons de patients doit être compris entre 0,80 et 1,20. Lorsque ces critères sont remplis, les valeurs seuil suivantes pour le RF des sondes peuvent être utilisées pour interpréter les résultats MLPA pour les chromosomes autosomiques ou les régions pseudo-autosomiques :

Nombres de copie	Ratio final (RF)
Normal	$0,80 < FR < 1,20$
Délétion homozygote	FR = 0
Délétion hétérozygote	$0,40 < FR < 0,65$
Duplication hétérozygote	$1,30 < FR < 1,65$
Triplication hétérozygote / Duplication homozygote	$1,75 < FR < 2,15$
Nombre de copie ambigu	Toutes les autres valeurs

Remarque : Le terme « quotient de dosage », utilisé dans les anciennes versions de description du produit, a été remplacé par « ratio final » pour devenir cohérent avec la terminologie du logiciel Coffalyser.Net. (Les calculs, les seuils et l'interprétation restent inchangés.) Veuillez noter que le logiciel Coffalyser.Net affiche également des limites arbitraires dans le cadre de l'analyse statistique des résultats obtenus dans une expérience. En tant que telles, les limites arbitraires sont différentes des valeurs de coupure du ratio final indiquées ci-dessus.

- L'agencement des sondes selon la localisation chromosomique facilite l'interprétation des résultats et peut révéler des changements plus subtils tels que ceux observés dans les cas de mosaïque. L'analyse des échantillons parentaux peut être nécessaire pour une interprétation correcte des résultats complexes.
- Résultats faux positifs : Veuillez noter que les anomalies détectées par une seule sonde (ou plusieurs sondes consécutives) ont toujours une chance considérable d'être un résultat faussement positif. Les changements de séquence (par exemple, SNV, mutations ponctuelles) dans la séquence cible détectée par une sonde peuvent être une cause. Une dénaturation incomplète de l'ADN (par exemple en raison d'une contamination par le sel) peut entraîner une diminution du signal de sonde, en particulier pour les sondes situées dans ou à proximité d'une région riche en GC ou dans ou à proximité du gène *PAH*. L'utilisation d'une étape de purification supplémentaire ou d'une méthode alternative d'extraction d'ADN peut résoudre de tels cas. De plus, la contamination d'échantillons d'ADN par des amplicons d'ADNc ou de PCR d'exons individuels peut entraîner une augmentation du signal de la sonde (Varga et al. 2012). L'analyse d'un échantillon d'ADN secondaire collecté indépendamment peut exclure ces types d'artefacts de contamination.
- La variation normale du nombre de copies chez les individus sains est décrite dans la base de données des variants génomiques : <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>. Les utilisateurs doivent toujours consulter la dernière mise à jour de la base de données et de la littérature scientifique lors de l'interprétation de leurs résultats.
- Toutes les anomalies détectées par MLPA ne sont pas pathogènes. Dans certains gènes, des délétions intragéniques sont connues et entraînent une maladie très légère ou inexistante (comme décrit pour la *DMD* par Schwartz et al. 2007). Pour de nombreux gènes, il existe plus d'une variante de transcrite. Les changements de nombre de copies d'exons qui ne sont pas présents dans toutes les variantes de transcrits peuvent ne pas avoir de signification clinique. Les duplications qui incluent le premier ou le dernier exon d'un gène (par exemple, les exons 1-3) peuvent ne pas entraîner l'inactivation de cette copie du gène.
- Les changements de nombre de copies détectés par les sondes de référence ou les sondes d'accompagnement sont peu susceptibles d'avoir un rapport avec la condition testée.
- Des résultats erronés peuvent être obtenus si un ou plusieurs pics sont hors échelle. Par exemple, une duplication d'un ou plusieurs exons peut être masquée lorsque les pics sont hors échelle, ce qui entraîne un résultat faussement négatif. Le risque sur les pics hors échelle est plus élevé lorsque des mélanges de sondes utilisés contiennent un nombre relativement faible de sondes. Le logiciel Coffalyser.Net signal des pics hors échelle, contrairement aux autres logiciels. Si un ou plusieurs pics sont hors échelle, réexécutez

la technique en utilisant soit : un voltage d'injection plus faible, un temps d'injection plus court, ou une quantité réduite d'échantillon en diluant les produits PCR.

Notes spécifiques P055 :

- La PCU est causée par des défauts du gène de la *PAH* et est une maladie autosomique récessive. L'inactivation des deux copies du gène *PAH* devrait entraîner une PCU. L'inactivation d'une seule copie du gène *PAH* est généralement observée chez les porteurs.
- La suppression d'un ou plusieurs exons entraîne généralement l'inactivation de cette copie du gène. Les suppressions d'exons uniques ont cependant une chance considérable d'être un résultat faussement positif. Une délétion de 3,7 kb dans la région flanquante 5' du gène *PAH*, y compris les sites hypersensibles à la DNaseI (régions HSS2 et HSS3, décrites par Bristeau et al. (2001)) a été trouvée chez un patient hyperphénylalaninémique (Chen et al. 2002).
- La duplication d'une partie interne d'un gène entraîne généralement une copie défectueuse de ce gène, car la séquence dupliquée est généralement située directement à côté de la séquence d'origine, ce qui entraîne un transcrit défectueux. La duplication du gène complet de la *PAH* ne devrait pas entraîner de maladie.
- La suppression ou la duplication des sondes flanquantes pour *ASCL1* et *IGF1* ne devrait pas être la cause de la PCU. Ces sondes n'ont été incluses que pour délimiter l'étendue des grandes délétions et duplications.

Limites de la procédure

- Dans la plupart des populations, la cause principale des défauts génétiques du gène *PAH* sont de petites mutations (ponctuelles), dont la plupart ne seront pas détectées en utilisant SALSA MLPA Probemix P055 PAH.
- MLPA ne peut détecter aucun changement qui se situe en dehors de la séquence cible des sondes et ne détectera pas les inversions ou translocations neutres en nombre de copies. Même lorsque la MLPA n'a détecté aucune aberration, il est possible que des changements biologiques dans ce gène ou cette région chromosomique existent mais restent non détectés.
- Les changements de séquence (par exemple, SNV, mutations ponctuelles) dans la séquence cible détectée par une sonde peuvent provoquer des résultats faussement positifs. Les mutations/SNV (même lorsque > 20 nt du site de ligature de la sonde) peuvent réduire le signal de la sonde en empêchant la ligature des oligonucléotides sondes ou en déstabilisant la liaison d'un oligonucléotide sonde à l'échantillon d'ADN.

Confirmation des résultats

Les changements de nombre de copies détectés par une seule sonde nécessitent toujours une confirmation par une autre méthode. Une délétion apparente détectée par une seule sonde peut être due, par ex. à une mutation/un polymorphisme qui empêche la ligature ou déstabilise la liaison des sondes à l'échantillon d'ADN. L'analyse de séquence peut établir si des mutations ou des polymorphismes sont présents dans la séquence cible de la sonde. La découverte d'une mutation hétérozygote ou d'un polymorphisme indique que deux allèles différents de la séquence sont présents dans l'échantillon d'ADN et qu'un résultat MLPA faussement positif a été obtenu.

Les changements de nombre de copies détectés par plus d'une sonde consécutive doivent être confirmés par une autre technique indépendante telle que la PCR longue portée, la qPCR, la matrice CGH ou le Southern blot, dans la mesure du possible. Les suppressions/duplications de plus de 50 kb peuvent souvent être confirmées par FISH.

Base de données sur les mutations du gène *PAH*

<http://www.biopku.org/home/pah.asp>. Nous encourageons fortement les utilisateurs à déposer les résultats positifs dans la base de données spécifique au locus du gène de la phénylalanine hydroxylase. Des recommandations pour la nomenclature pour décrire les suppressions/duplications d'un ou plusieurs exons peuvent être trouvées sur <http://varnomen.hgvs.org/>.

Veuillez signaler les changements de nombre de copies détectés par les sondes de référence, les résultats faussement positifs dus aux SNV et les résultats inhabituels (par exemple, une duplication des exons 6 et 8 du gène *PAH* mais pas de l'exon 7) à MRC Holland : info@mrcholland.com.

Table 1. SALSA MLPA Probemix P055-D1 PAH

Longueur (nt)	Sonde SALSA MLPA	Position chromosomique (hg18) ^a	
		Référence	PAH
64-105	Fragments de contrôle - voir le tableau dans la section "contenu de probemix" pour plus d'informations		
128	Sonde de référence 00797-L00093	5q	
136	Sonde de référence 07292-L06929	6q	
142	Sonde PAH 02326-L01823		Exon 7
149 « -	Sonde ASCL1 02327-L01835		Exon 2
154	Sonde HSS2 12251-L14053		En amont
161	Sonde PAH 02328-L11413		Exon 8
168	Sonde PAH 16487-L23233		Exon 1
174	Sonde de référence 01823-L23229	16p	
180	Sonde PAH 16488-L23230		Exon 2
187	Sonde PAH 02331-L23231		Exon 9
194	Sonde de référence 05703-L06959	3q	
201 ±	Sonde PAH 16489-L18945		Exon 3
211	Sonde PAH 02333-L01826		Exon 10
220	Sonde de référence 01782-L01346	13q	
227	Sonde PAH 17737-L21083		Exon 6
235	Sonde PAH 02334-L23232		Exon 4
242	Sonde PAH 02335-L14055		Exon 11
247	Sonde de référence 07695-L07419	21q	
256	Sonde PAH 02336-L01821		Exon 5
265	Sonde PAH 02337-L02469		Exon 12
274	Sonde de référence 15473-L17313	1p	
283	Sonde PAH 16491-L18947		Exon 6
292	Sonde PAH 02339-L01829		Exon 13
300	Sonde de référence 01575-L01147	22q	
310 -	Sonde IGF1 02340-L01834		Exon 2
319	Sonde de référence 06440-L05966	3p	
337	Sonde PAH 12254-L14056		Exon 1
346	Sonde PAH 16492-L18948		Exon 5
352	Sonde PAH 12256-L14058		Exon 7
359 Ж	Sonde de référence 13731-SP0136-L15212	15q	
365 Ж ±	Sonde PAH 16493-SP0373-L18949		Exon 3
373	Sonde PAH 16494-L18950		Exon 2
382	Sonde de référence 13974-L15543	7q	
391	Reference probe 12522-L13572	18q	
400	Sonde PAH 12260-L14061		Exon 4
409	Sonde de référence 10063-L10487	8q	
418	Sonde HSS3 12261-L13203		En amont
427	Sonde de référence 05915-L17921	14q	

^a Voir la section "Numérotation des exons" à la page **Error! Bookmark not defined.** pour plus d'informations.

± Le SNP rs192439649 pourrait influencer le signal de la sonde 365 nt et le SNP rs542737289 pourrait influencer la sonde 201 nt. En cas de délétions apparentes, il est recommandé de séquencer la région ciblée par cette sonde.

« Sonde située dans ou à proximité d'une région riche en GC. Un signal faible peut être causé par une contamination par le sel dans l'échantillon d'ADN conduisant à une dénaturation incomplète de l'ADN, en particulier des régions riches en GC.

Ж Cette sonde se compose de trois parties et possède deux sites de ligature. Un signal faible de cette sonde peut être dû à la dépurination de l'ADN de l'échantillon, par ex. en raison d'une capacité tampon insuffisante ou d'un temps de dénaturation prolongé. Lorsque cela se produit dans les échantillons de référence, cela peut ressembler à une augmentation du signal dans les échantillons de test.

- Sonde de flanquement. Inclus pour aider à déterminer l'étendue d'une suppression/duplication. Il est peu probable que les altérations du nombre de copies des sondes flanquantes et de référence soient liées à la condition testée.

Les SNV situés dans la séquence cible d'une sonde peuvent influencer l'hybridation de la sonde et/ou la ligature de la sonde. Remarque : tous les SNV connus ne sont pas mentionnés dans les tableaux ci-dessus. Chaque aberration de sonde(s) doit être confirmés par une autre méthode.

Table 2. Sondes PAH disposées selon la localisation chromosomique

Longueur (nt)	Sondes SALSA MLPA	Gène / exon ^a	Site de ligature NM_000277.3	Séquence partielle ^b (24 nt adjacent au site de ligature)	Distance de la prochaine sonde
149 « -	02327-L01835	Gène ASCL1		ACCTGCATCTTT-AGTGCTTTCTTG	38.9 kb
418	12261-L13203	Région HSS3	3238 nt avant l'exon 1	CAATGTTGGGT-AATCTTCAACTT	2.0 kb
154	12251-L14053	Région HSS2	1280 nt avant l'exon 1	GTGGTAGAACCA-AGAGTTAAACCA	1.0 kb
		Codon start PAH	115-117 (Exon 1)		
337	12254-L14056	PAH exon 1	291 nt avant l'exon 1	GGCTTAGTCCAA-TTGCAGAGAACT	0.4 kb
168	16487-L23233	PAH exon 1	72-73	CTGCCTGTACCT-GAGGCCCTAAAA	4.1 kb
373	16494-L18950	PAH exon 2	191 nt avant l'exon 2	GTAGCATCATTG-ATCATTTAATTG	0.4 kb
180	16488-L23230	PAH exon 2	73 nt après l'exon 2	AGTTAGATGCAA-TGAAAAGAACAC	17.6 kb
365 Ж ±	16493-SP0373-L18949	PAH exon 3	235 et 201 nt avant l'exon 3	ATTTTCATGTGA-34 nt spanning oligo-CCTGCCACTTAG	0.4 kb
201 ±	16489-L18945	PAH exon 3	33 nt après l'exon 3	CAACATAAGTAA-CTCCACACTGTC	17.2 kb
235	02334-L23232	PAH exon 4	484-485	GTTCCCAAGAA-CCATTCAAGAGC	0.1 kb
400	12260-L14061	PAH exon 4	3 nt après l'exon 4	GACCACCCTGTG-AGTCCATGGCCC	10.7 kb
346	16492-L18948	PAH exon 5	104 nt avant l'exon 5	CCAAGGGAAGGA-GACATGCACTGT	0.2 kb
256	02336-L01821	PAH exon 5	613-614	ACATTGCCTACA-ACTACCGCCAGT	11.2 kb
283	16491-L18947	PAH exon 6	106 nt avant l'exon 6 anti-sens	TGAGCTGCCATC-ACTTGCTACAGT	0.1 kb
227	17737-L21083	PAH exon 6	665-664 anti-sens	CCCATGTTTTCT-TTTCTTCTCCA	2.4 kb
142	02326-L01823	PAH exon 7	877-878	CTCGGGATTCT-TGGGTGGCTGG	0.1 kb
352	12256-L14058	PAH exon 7	37 nt après l'exon 7	TTGCCAGGCACA-ATGAGCGCCATC	1.1 kb
161	02328-L11413	PAH exon 8	986-987	GTTGGACATGT-GCCCTTGTITTC	4.8 kb
187	02331-L23231	PAH exon 9	1067-1066 anti-sens	CGAGCTTTCAA-TGTATTCATCAG	2.5 kb
211	02333-L01826	PAH exon 10	1142-1143	CATAAAGGCATA-TGGTGCTGGCT	0.6 kb
242	02335-L14055	PAH exon 11	1230-1231	CTGGAGAAGACA-GCCATCCAAAAT	3.3 kb
265	02337-L02469	PAH exon 12	1385-1386	GATTGAGGTCTT-GGACAATACCCA	1.3 kb
292	02339-L01829	PAH exon 13	1471-1472	AGAAAATAAAGT-AAAGCCATGGAC	363.4 kb
		Codon stop PAH	1471-1473 (Exon 13)		
310 ~	02340-L01834	Gène IGF1		AGGTAGAAGAGA-TGCGAGGAGGAC	

^a Voir la section "Numérotation des exons" à la page **Error! Bookmark not defined.** pour plus d'informations.

^b Seules les séquences de sonde partielles sont présentées. Des séquences de sondes complètes sont disponibles sur www.mrcholland.com. Merci de nous signaler toute erreur : info@mrcholland.com.

± Le SNP rs192439649 pourrait influencer le signal de la sonde 365 nt et le SNP rs542737289 pourrait influencer la sonde 201 nt. En cas de délétions apparentes, il est recommandé de séquencer la région ciblée par cette sonde.

« Sonde située dans ou à proximité d'une région riche en GC. Un signal faible peut être causé par une contamination par le sel dans l'échantillon d'ADN conduisant à une dénaturation incomplète de l'ADN, en particulier des régions riches en GC.
Ж Cette sonde se compose de trois parties et possède deux sites de ligature. Un signal faible de cette sonde peut être dû à la dépurination de l'ADN de l'échantillon, par ex. en raison d'une capacité tampon insuffisante ou d'un temps de dénaturation prolongé. Lorsque cela se produit dans les échantillons de référence, cela peut ressembler à une augmentation du signal dans les échantillons de test.

- Sonde de flanquement. Inclus pour aider à déterminer l'étendue d'une suppression/duplication. Il est peu probable que les altérations du nombre de copies des sondes flanquantes et de référence soient liées à la condition testée.

Les SNV situés dans la séquence cible d'une sonde peuvent influencer l'hybridation de la sonde et/ou la ligature de la sonde. Remarque : tous les SNV connus ne sont pas mentionnés dans les tableaux ci-dessus. Chaque aberration de sonde(s) doit être confirmée par une autre méthode.

Mélanges de sondes SALSA MLPA associés

P076 ACADVL-SLC22A5 Contient des sondes pour le gène *ACADVL*, impliquées dans le déficit en Acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne très longue (VLCAD).

Références

- Bristeau A et al. (2001). Conserved as well as divergent regulatory elements account for expression of the human and rodent phenylalanine hydroxylase genes. *Gene*. 274:283-291.
- Chen KJ et al. (2002). Identification and characterization of a novel liver-specific enhancer of the human phenylalanine hydroxylase gene. *Human genetics*. 110:235-243.
- Schouten JP et al. (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic acids research*. 30:e57.
- Schwartz M et al. (2007). Deletion of exon 16 of the dystrophin gene is not associated with disease. *Human mutation*. 28:205.
- Scriver CR et al. (2001) Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly SW, Valle D, editors. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8 ed. New York, NY: McGraw-Hill. pp. 1667-1724.
- Varga RE et al. (2012). MLPA-based evidence for sequence gain: pitfalls in confirmation and necessity for exclusion of false positives. *Analytical biochemistry*. 421:799-801.

Publications sélectionnées utilisant SALSA MLPA Probemix P055 PAH

- Birk Moller L et al. (2007). Low proportion of whole exon deletions causing phenylketonuria in Denmark and Germany. *Human mutation*. 28:207.
- Cali F et al. (2010). Exon deletions of the phenylalanine hydroxylase gene in Italian hyperphenylalaninemics. *Experimental & molecular medicine*. 42:81-86.
- Desviat LR et al. (2006). Identification of exonic deletions in the PAH gene causing phenylketonuria by MLPA analysis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 373:164-167.
- Gemperle-Britschgi C et al. (2016). A novel common large genomic deletion and two new missense mutations identified in the Romanian phenylketonuria population. *Gene*. 576:182-188.
- Groselj U et al. (2012). Five novel mutations and two large deletions in a population analysis of the phenylalanine hydroxylase gene. *Molecular genetics and metabolism*. 106:142-148.
- Ji CY et al. (2011). [The research of combining high resolution melting with multiplex ligation-dependent probe amplification technology in the mutation scanning for PAH gene]. *Zhonghua yi xue yi chuan xue za zhi = Zhonghua yixue yichuanxue zazhi = Chinese journal of medical genetics*. 28:649-653.
- Kozak L et al. (2006). Identification and characterization of large deletions in the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene by MLPA: evidence for both homologous and non-homologous mechanisms of rearrangement. *Molecular genetics and metabolism*. 89:300-309.
- Lee YW et al. (2008). Mutation analysis of PAH gene and characterization of a recurrent deletion mutation in Korean patients with phenylketonuria. *Experimental & molecular medicine*. 40:533-540.
- Lu CX et al. (2011). [Mutation analysis of phenylalanine hydroxylase gene in 55 patients with phenylketonuria from Hebei province]. *Zhonghua yi xue za zhi*. 91:2971-2976.
- Maruo Y et al. (2015). A novel large deletion (exons 12, 13) and a missense mutation (p.G46R) in the PAH in a Japanese patient with phenylketonuria. *World journal of pediatrics : WJP*. 11:181-184.
- Okano Y et al. (2011). Molecular characterization of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency in Japan. *Journal of human genetics*. 56:306-312.
- Polak E et al. (2013). Phenylalanine hydroxylase deficiency in the Slovak population: genotype-phenotype correlations and genotype-based predictions of BH4-responsiveness. *Gene*. 526:347-355.
- Tao Y et al. (2021). Spectrum of PAH gene mutations and genotype-phenotype correlation in patients with phenylalanine hydroxylase deficiency from Shanxi province. *Brain Dev*. 43:220-229.
- Yan YS et al. (2016). [Analysis of large deletion of phenylalanine hydroxylase gene in Chinese patients with phenylketonuria]. *Zhonghua yi xue za zhi*. 96:1097-1102.

P055 Historique du produit	
Version	Modification
D1	Une sonde PAH exon 6 ajoutée, une sonde PAH exon 12 (séquence de type sauvage à mutation R408W) retirée. Une sonde de référence remplacée.
C1	Sept sondes PAH et huit sondes de référence remplacées. Nouveaux fragments de contrôle 88 et 96 nt (QDX2).
B1	Une augmentation des sondes PAH, de 13 à 22. Nouveaux fragments témoins.
A1	Première sortie.

Modifications apportées à la description du produit
<p>Version D1-05-FR1 – 15 octobre 2021 (04P)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Les versions précédentes de ce document ne sont disponibles qu'en anglais. - Description du produit adaptée à un nouveau modèle. - Un avertissement pour SNP (sonde 201 nt) est ajouté sous les tableaux 1 et 2. - Une correction mineure a été apportée aux sites de ligature des sondes 187 nt et 283 nt dans le tableau 2. - La section de publication sélectionnée est mise à jour . - Royaume-Uni ajouté à la liste des pays d'Europe acceptant le marquage CE. <p>Version D1-04 – 29 juin 2020 (02P)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Description du produit adaptée à un nouveau modèle. - Israël a été ajouté en tant que pays avec le statut de IVD. - Sites de ligature des sondes ciblant le gène <i>PAH</i> mis à jour selon la nouvelle version de la séquence de référence NM_. - La séquence de référence NG_ a été mise à jour. - Remarque ajoutée à la sonde <i>PAH</i> exon 3 365 nt concernant l'influence potentielle d'un SNP . <p>Version D1-03 – 17 juillet 2018 (04)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Description du produit restructurée et adaptée à un nouveau modèle. - L'utilisation du IVD inclut désormais le Maroc. - Informations sur les sondes nouvelles et modifiées dans la version D1 par rapport à C1 supprimées des tableaux 1 et 2. <p>Version D1-02 – 04 avril 2017 (03)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Description du produit adaptée à un nouveau modèle. - Ajout de nouvelles publications utilisant P055. <p>Version D1-01 - 18 janvier 2016 (02)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Description du produit restructurée et adaptée à un nouveau modèle. - Liste des publications sélectionnées mise à jour.

Plus d'informations : www.mrcholland.com ; www.mrcholland.eu	
	MRC Holland bv; Willem Schoutenstraat 1 1057 DL, Amsterdam, The Netherlands
E-mail	info@mrcholland.com (informations & questions techniques) order@mrcholland.com (commandes)
Téléphone	+31 888 657 200

	EUROPE*  0344 ISRAEL MAROC
	TOUS LES AUTRES PAYS

*comprenant les États membres de l'UE (candidats), les membres de l'Association européenne de libre-échange (AELE), et le Royaume-Uni. Le produit est destiné à RUO dans tous les autres pays européens.