

Analyse directe des anomalies de l'ADN chez l'homme

Une maladie en rapport avec une mutation congénitale ou acquise (cas des cancers) d'un gène peut être analysée au niveau du produit du gène muté et de son ARN, quand ils sont présents, ou bien directement au niveau du gène. C'est ce dernier point que nous analyserons ici, l'étude sur les ARN faisant l'objet du « Lexique » du prochain numéro.

1. Les délétions ou les insertions d'un nombre suffisant de bases (plus d'une centaine): elles sont aisées à détecter par *Southern blot*; elles entraînent la disparition ou le changement de taille d'un fragment révélé par hybridation moléculaire avec les sondes radioactives spécifiques du gène normal.

2. Les mutations ponctuelles, microdélétions ou microinsertions: leur identification nécessite en revanche l'utilisation de méthodes beaucoup plus complexes.

- Confection d'une banque d'ADN génomique, détection du clone muté, détermination de la séquence nucléotidique (voir *Lexique de médecine|sciences* n° 6, vol. 2). La méthode est extrêmement lourde pour des gènes qui peuvent être immenses (près de 200 kilobases pour le gène du facteur VIII!). Si l'on dispose de sondes reconnaissant tous les exons (par exemple une copie d'ADN complémentaire complète du messager), il est alors possible de n'étudier qu'eux en faisant l'impasse sur une mutation intronique qui pourrait entraîner des anomalies d'épissage.

- Digestion de l'ADN par toute une batterie d'enzymes de restriction reconnaissant des séquences différentes, et hybridation du *Southern blot* avec des sondes spécifiques. Quoique plus d'une centaine d'enzymes de restriction soient connues à l'heure actuelle, cette méthode n'explore pas toutes les séquences possibles!... et elle est de

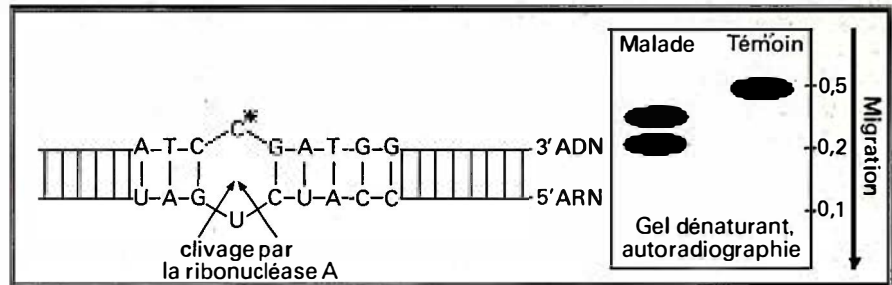


Figure 1. **Protection d'hybrides ADN-ARN contre la digestion par la ribonucléase A.** A gauche, un fragment d'ADN génomique inconnu est dénaturé (c'est-à-dire que ses brins sont dissociés), l'un des brins étant hybridé avec une sonde d'ARN radioactif connue. S'il existe un seul mauvais appariement entre les brins d'ADN et d'ARN (sur la figure, un C, marqué d'un astérisque, au lieu d'un A), la ribonucléase A pourra cliver l'ARN à ce niveau. A droite, la sonde ARN est analysée, après traitement, par migration en gel dénaturant: elle est entière si l'ADN est « normal » et clivée si l'ADN est « muté ».

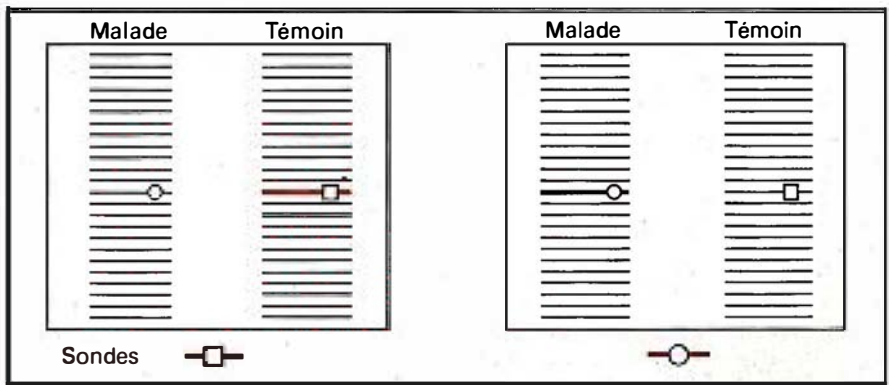


Figure 2. **Détection d'une mutation particulière par hybridation de Southern blots avec des oligonucléotides de synthèse.** Des oligonucléotides de 17 résidus complémentaires de la région à explorer sont synthétisés. Ils sont conçus de telle sorte que la base éventuellement modifiée se trouve au milieu de l'oligonucléotide. De telles sondes spécifiques du gène normal hybrident mieux avec un fragment de ce dernier qu'avec le fragment équivalent du gène muté. Par contre un oligonucléotide complémentaire du gène muté hybridera mieux avec lui qu'avec le gène normal. —□—: oligonucléotide complémentaire du gène normal (□: base éventuellement modifiée); —○—: oligonucléotide complémentaire du gène muté (○: base mutée). Le trait rouge indique le fragment d'ADN hybridant avec la sonde, les traits fins représentant les nombreux fragments d'ADN transférés sur les filtres mais non reconnus par les sondes.

plus aussi fastidieuse qu'onéreuse. Enfin, il n'est pas possible devant la découverte d'un site de clivage anormal (ou la disparition d'un site normal) de prédire si l'anomalie est vraiment la cause de la maladie ou bien ne représente qu'un polymorphisme sans retentissement fonctionnel.

- Protection d'hybrides ADN génomique ARN contre la digestion par la ribonucléase A (figure 1). Cette méthode utilise des sondes ARN faciles à obtenir depuis deux ans, grâce à la construction de plasmides contenant un site d'initiation de la transcription par une ARN polymérase très spécifique. Lorsque cet ARN rendu radioactif est hybridé avec un brin d'ADN parfaitement complémentaire, il devient insensible à la digestion par la ribonucléase A. Par contre le mauvais appariement d'une seule base crée à ce niveau un site de clivage aisé à caractériser par l'analyse de la taille de la sonde d'ARN ainsi traitée. Cette méthode, de description récente, est sûrement extrêmement prometteuse; elle devrait permettre d'étudier tout fragment d'ADN génomique non cloné pour peu que l'on dispose de sondes complémentaires. Par contre, si la méthode indique le site d'une mutation, elle n'en indique pas la nature dont la précision reste du ressort du séquençage nucléotidique du fragment muté préalablement cloné.

- Recherche d'une mutation en un site connu par hybridation à des oligonucléotides de synthèse (figure 2). Certaines mutations particulières sont fréquentes (cas de nombreuses thalassémies, ou bien des mutations des codons 12 et 61 des gènes *c-ras* au cours de cancers) et le problème est alors de les détecter chez des individus donnés, et non d'explorer la totalité du gène. Des oligonucléotides de synthèse de 17 ou 18 résidus sont alors utilisés. Leur hybridation avec une séquence totalement homologue étant significativement plus stable que celle avec une séquence ne comportant qu'une seule base modifiée, ils permettent d'explorer rapidement l'existence d'une mutation de cette séquence, et également d'en identifier fermement

la nature (voir figure 2).

- Amplification de la région mutée (figure 3). Cette méthode consiste à amplifier des dizaines de milliers de fois la région mutée en la recopiant à partir d'amorces nucléotidiques. Une telle opération facilite évidemment toute opération ultérieure de caractérisation fine de cette région. Comme dans la technique précédente, il s'agit ici de rechercher des mutations particulières préalablement caractérisées chez d'autres malades.

3. Conclusion

L'énumération qui précède n'est pas exhaustive et comporte une part de parti pris en fonction du sentiment que l'auteur a de l'avenir réservé à différentes techniques continuellement publiées. N'a pas été citée, par exemple, une méthode

électrophorétique jouant sur la migration différentielle dans un gradient d'agents dénaturants d'hybrides ADN/ADN parfaits ou partiellement mal-appariés.

Il faut retenir, en résumé, que l'identification précise de la mutation d'un gène connu est, aujourd'hui, toujours possible. Mais si certaines techniques sont relativement simples et peuvent être appliquées à un grand nombre d'échantillons (mise en évidence d'une délétion ou bien détection d'une mutation « connue » à l'aide d'oligonucléotides de synthèse), d'autres restent extrêmement lourdes et du domaine exclusif de laboratoires importants. C'est le cas chaque fois qu'il s'agit de rechercher une mutation ponctuelle en un site inconnu du gène.

A. K.

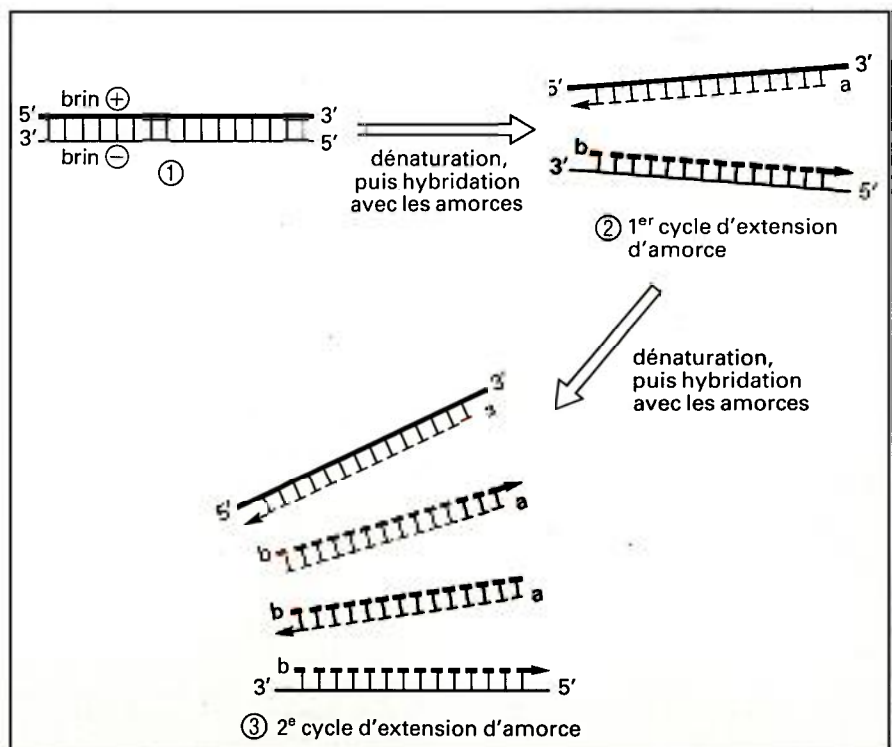


Figure 3. Amplification d'une région particulière de l'ADN génomique. L'ADN en 1 est dénaturé, chacun des brins étant hybridé avec un oligonucléotide de synthèse (traits rouges). En 2, les oligonucléotides « a » (complémentaires du brin +, épais) et « b » (complémentaires du brin -, fin) servent d'amorce pour la synthèse de chaînes complémentaires d'ADN sous l'action de l'ADN polymérase. Cette réaction est appelée « extension d'amorce ». En 3, l'opération est recommencée, aboutissant à une amplification des régions comprises entre les séquences reconnues par les 2 oligonucléotides de synthèse. Les brins initiaux d'ADN sont représentés en traits continus et les brins amplifiés en lignes discontinues. Les flèches indiquent le sens de synthèse des molécules d'ADN.