

Biologie moléculaire : exemple d'application à la néphrologie

Docteur C. FEREC - Centre de Biogénétique - Centre Départemental de Transfusion Sanguine - BREST

Les grandes avancées de la recherche fondamentale en biologie ces dernières années ont été réalisées grâce à l'apport technologique du génie génétique, qu'il s'agisse du clonage et de la cartographie de nouveaux gènes, de la compréhension des mécanismes de régulation, des interactions gènes-protéines ou des mécanismes de l'oncogénèse.

I) LA STRUCTURE DE LA MOLECULE D'ADN

A) La Double Hélice :

La molécule d'acide désoxyribonucléique ou ADN est une macromolécule dont la structure en double hélice a été décrite par Watson et Crick dans les années 1950.

Quatre molécules de base appelées nucléotides s'assemblent pour constituer ce polymère. Chaque nucléotide est constitué d'un groupe phosphate, d'un sucre le désoxyribose et d'une base azotée l'Adénine (A), la Thymine (T), la Guanine (G), ou la Cytosine (C).

Les nucléotides de chaque brin de la double hélice sont liés par des liaisons phosphodiester qui servent de pont entre deux sucres adjacents. Les deux brins de la double hélice réalisent leur appariement grâce à des liaisons hydrogènes qui spécifient la liaison Adénine-Thymine, Cytosine-Guanine.

L'un des brins de la molécule sert de modèle pour la synthèse de l'ARN porteur de l'information vers le cytoplasme. La structure de l'ARN est identique à celle de l'ADN à ceci près que l'Uracile (U) remplace la Thymine, que la molécule est simple brin et enfin que le sucre est un ribose.

B) Le Message Génétique

Chaque groupe de trois nucléotides appelé triplet, constitue un codon et spécifie pour un acide aminé déterminé (figure 1). Le transfert de l'information de l'ADN est médié par l'ARN messager où la séquence de trois nucléotides spécifie un acide aminé déterminé.

C) Le Gène des Eucaryotes

La génétique formelle, dont le but est l'étude de la transmission des caractères génétiques, est basée sur la réplication des caractères au cours de la mitose, la transmission de ceux-ci au cours de la méiose et l'étude du polymorphisme dû aux mutations. La génétique formelle analyse des différences entre les individus, différences exprimées par le produit des gènes à la surface de la cellule. La génétique moléculaire étudie directement le gène et son polymorphisme est accessible par les techniques du génie génétique.

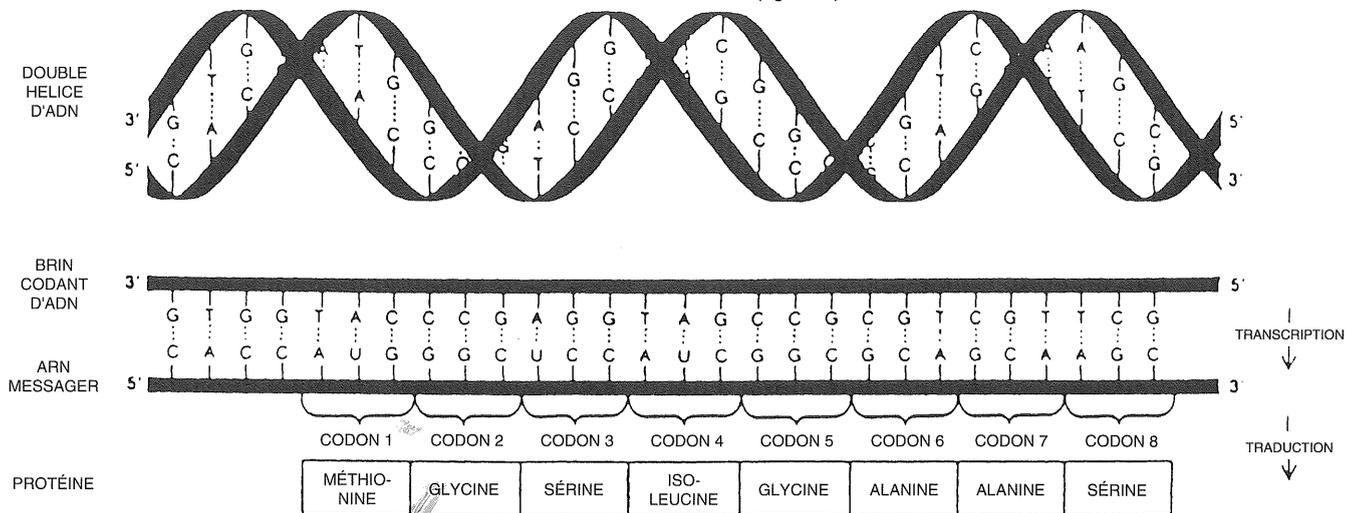
Le gène des eucaryotes est constitué d'exons et d'introns entourés de régions flanquantes. La séquence codante, constituée des exons est la partie du gène qui persiste dans l'ARN messager, elle débute par un codon signal AUG et se termine par les codons stop UAA, UAG, UGA. L'intron est la partie du gène qui sera excisée lors de la maturation des ARN pré-messagers en ARN messagers.

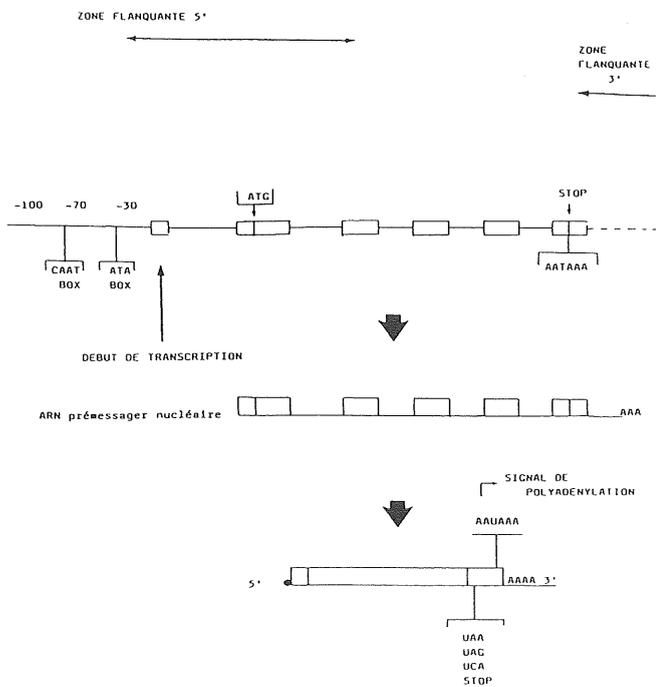
Les régions intergéniques comprennent le promoteur et les régions régulatrices en amont du gène ainsi que les hypothétiques signaux de fin de transcription en aval (régions flanquantes 3').

Les régions flanquantes 5' contiennent des séquences qui sont reconnues par les hormones et leur récepteur et par des facteurs diffusibles intervenant dans l'expression du gène. Les régions flanquantes en 3' contiennent des signaux probablement multiples au niveau desquels cesse la transcription en aval du gène.

Les transcrits primitifs sont les ARN initiaux débutant au signal d'initiation et s'interrompant en différents sites en aval du gène. Ces transcrits sont ensuite coupés, environ 18-20 bases après un signal AAT AAA, l'extrémité 3' ainsi formée étant allongée par des résidus d'acide adénylique (figure 2).

LE CODE GENETIQUE (figure 1)





REPRESENTATION SCHEMATISEE D'UN GENE D'EUCARYOTE Figure 2

II) LES SONDAS ET LE CLONAGE DES GENES

Les premiers gènes humains ont été clonés en 1977. A l'heure actuelle, plusieurs milliers de gènes codant pour des protéines connues ont été clonés. Le clonage consiste à introduire dans un vecteur (phage ou plasmide) un fragment d'ADN, cet ensemble vecteur + fragment d'ADN (= insert) peut être amplifié par expansion clonale de colonies bactériennes transformées par ces plasmides.

Les stratégies de clonage sont simples dans le principe, assez difficiles en pratique et illustrent parfaitement le vieil adage de la poule et de l'œuf : pour cloner un gène il faut une sonde, pour obtenir une sonde, il faut avoir cloné le gène... Trois outils sont indispensables pour réaliser toutes les manipulations en génie génétique.

- Les endonucléases de restriction, enzymes isolées à partir de micro-organismes ont la propriété de reconnaître des séquences spécifiques de la molécule d'ADN double brin (4, 5 ou 6 bases). Cette coupure est extrêmement spécifique, elle ne dépend que du nombre de sites présents sur cette molécule. Le nombre et la taille des fragments obtenus ne dépendent que de ce facteur. Ainsi, si l'on prend l'ensemble de l'ADN génomique humain, il est fragmenté en 10^6 morceaux par l'enzyme Eco RI, car il existe 10^6 sites Eco RI dans le génome.

5' G A A T T C 3'

3' C T T A A G 5'

- Il existe actuellement plusieurs centaines d'endonucléases reconnaissant chacune un site polymorphe.

- La transcription inverse in vitro d'une séquence d'ARNm en son équivalent en ADN (ADNc) s'effectue grâce à une enzyme spécifique, la transcriptase inverse.

- L'insertion de fragment de petite taille ou de moyenne taille d'ADN dans des fragments ayant une répllication autonome (plasmides, phages, cosmides) permet une recombinaison génétique; ce vecteur recombiné est introduit dans une cellule hôte, en général, une souche affaiblie d'Escherichia Coli. Le résultat de cette greffe est une possibilité fantastique d'amplification de fragment d'ADN inséré dans ce vecteur.

Il existe schématiquement deux approches pour aboutir au clonage d'un gène. La première consiste à isoler l'ensemble des ARNm d'une cellule, en général par immunoprécipitation des polysomes; ces ARNm sont alors transcrit en cDNA grâce à une enzyme spécifique la Transcriptase inverse.

Après clonage de ces cDNA, on obtient une banque ou bibliothèque qui doit être criblée pour identifier les clones recherchés. Ces criblages sont réalisés par hybridation de la banque à l'aide de sondes nucléotidiques, dont la séquence est déduite de la structure de la protéine correspondante.

Lorsque le cDNA a été identifié, il est nécessaire, pour repérer le gène qui l'a spécifié, de cribler une banque d'ADN génomique à l'aide de ce cDNA marqué, utilisé comme sonde. Cette stratégie ne s'applique, bien sûr, qu'aux cas où la structure primaire de la protéine est connue. Par contre, lorsque cette démarche est impossible, lorsque le produit d'expression du gène est inconnu, il faut avoir recours à une stratégie de génétique inverse. Ceci nécessite dans un premier temps de localiser le gène par des études de liaison génétique grâce à des marqueurs polymorphes de l'ADN qui constituent autant de bornes, autant de jalons permettant de se rapprocher du gène pour enfin le cloner. Cette démarche s'est brillamment illustrée par le clonage du gène de la myopathie de DUCHENNE.

III) LA REACTION D'HYBRIDATION MOLECULAIRE

C'est la réaction clé pour toutes les techniques de biologie moléculaire. Elle repose sur la liaison très affinée de deux brins complémentaires d'ADN ou d'ADN-ARN (la constante d'affinité du duplex est très forte). Certains agents chimiques comme la soude ou la chaleur peuvent dissocier le complexe qui conserve sa faculté de réappariement.

Tout le problème consiste à utiliser un fragment d'ADN monobrin (la sonde), le marquer par un procédé soit radioactif soit chimique et utiliser ce traceur pour localiser, repérer sa cible qui n'est autre que le fragment complémentaire que l'on isole généralement sur un support solide en nylon.

De ce principe, déroulent les techniques de SPOT test où l'ADN est déposé sur un filtre, les techniques de SOUTHERN où l'ADN est visualisée après électrophorèse en gélose et migration sur une feuille de nylon et, enfin, les techniques de NORTHERN où l'ARN migre dans le gel et où la réaction mise en œuvre est une liaison ARN-ADN.

APPLICATION A LA POLYKYSTOSE RENALE AUTOSOMIQUE DOMINANTE

La polykystose de l'adulte illustre parfaitement les apports au diagnostic clinique de ce qu'il est convenu d'appeler la génétique inverse ou la génétique reverse. La finalité de cette nouvelle génétique est d'aboutir à l'isolement du gène en utili-

sant toute une série de techniques issues du génie génétique permettant, dans un premier temps, de localiser le gène puis de progresser vers ce dernier en se déplaçant sur le chromosome. En ce qui concerne le gène PKD, la première étape a été franchie puisque nous disposons maintenant de marqueurs génétiques qui le flanquent sur la partie distale du bras court du chromosome 16. Ces marqueurs sont mis en évidence par l'utilisation de sondes que révèle la présence de sites polymorphes d'autant plus importants et intéressants qu'ils sont situés à proximité du gène.

Ces sites polymorphes sont objectivés par un polymorphisme de taille des fragments de restriction de l'ADN, fragments obtenus après digestion de la molécule d'ADN par des enzymes de restriction, migration de l'échantillon dans un gel d'agarose et hybridation par la sonde, d'où le nom de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). La transmission mendélienne de ces fragments permet d'identifier la contribution paternelle et maternelle de ces marqueurs.

En 1985, Reeders rapporte la coségrégation d'un marqueur polymorphe situé sur le bras court du chromosome 16 et du gène de la polykystose familiale de type adulte. Ceci a été réalisé à partir de 9 familles de 3 générations, la force de la liaison au locus de la globine α est traduite par un lod-score à 25,85 ($\theta = 0,05$). Cette liaison a été confirmée sur un nombre plus important de familles par Reeders en 1987 et par d'autres équipes au sein d'autres ethnies. La localisation, en 1987, d'un nouveau marqueur 24-1, situé de l'autre côté du gène par rapport à 3'HVR, améliore considérablement les performances diagnostiques de ces sondes puisque, à l'heure actuelle, c'est la transmission d'une même unité contenant le gène PK que l'on peut suivre dans les familles. L'utilisation conjointe des deux sondes augmente l'informativité, en effet les premiers résultats obtenus avec 3'HVR limitaient l'informativité à 7 familles sur 9 étudiées.

Ces nouveaux marqueurs polymorphes permettent, dans les familles où plusieurs patients sont affectés de la PKD, de repérer le chromosome portant le gène muté et de proposer par là même un diagnostic précoce de porteur ou de non porteur aux sujets à risque pour lesquels le diagnostic clinique ou échographique est négatif (figure 3). Un diagnostic anténatal, réalisé sur prélèvement de villosités chorionales, à la dixième semaine d'aménorrhée a pu être effectué par certaines équipes, bien qu'une telle approche ne nous paraisse pas justifiée au stade actuel de nos connaissances sur l'évolution de cette maladie.

ETUDE FAMILIALE ILLUSTRANT LA TRANSMISSION DES MARQUEURS DE 3'HVR ET DU LOCUS PKD1

