

Hybridation moléculaire :

Les polymorphismes de taille des fragments de restriction (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphisms)

L'ADN diffère entre les individus, tant au niveau des gènes qui constituent la base de leur individualité, que des séquences intergéniques. La variabilité est même beaucoup plus forte pour les séquences non codantes et non régulatrices (où les mutations peuvent s'accumuler sans conséquences) qu'au niveau des exons des gènes et des zones de contrôle de leur expression. Cette variabilité de l'ADN d'un même locus entre deux individus peut modifier les sites de reconnaissance des enzymes de restriction et donc les points de clivage. La figure 1A montre ainsi que la mutation

C/G → T/A fait disparaître un site de clivage par l'enzyme de restriction Msp-1, de telle sorte que la digestion par cette enzyme donne en « Southern blot » hybridé avec la sonde 1, un fragment de 3 kilobases (kb) au lieu de 2 kb. Une autre cause importante de polymorphisme des régions non codantes est la répétition variable d'éléments d'ADN, représentée dans la figure 1B. Ici, après digestion par l'enzyme EcoR 1, la sonde 2 hybride avec un fragment de 9 kb si le motif de base est répété 9 fois, et avec un fragment de 7 kb s'il est répété 7 fois. Dans les deux

types de polymorphisme, le résultat est une modification de la taille d'un fragment d'ADN analysé par « Southern blot », d'où le nom anglais de RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphism*. La figure 2 montre un exemple simple de l'utilisation de tels polymorphismes pour étudier la transmission d'un gène pathologique. Une maladie récessive est liée à la transmission d'un gène situé à proximité d'un site polymorphe. L'étude familiale a permis de démontrer que le caractère pathologique était lié au polymorphisme A, donnant un fragment d'ADN de 9 kb, alors

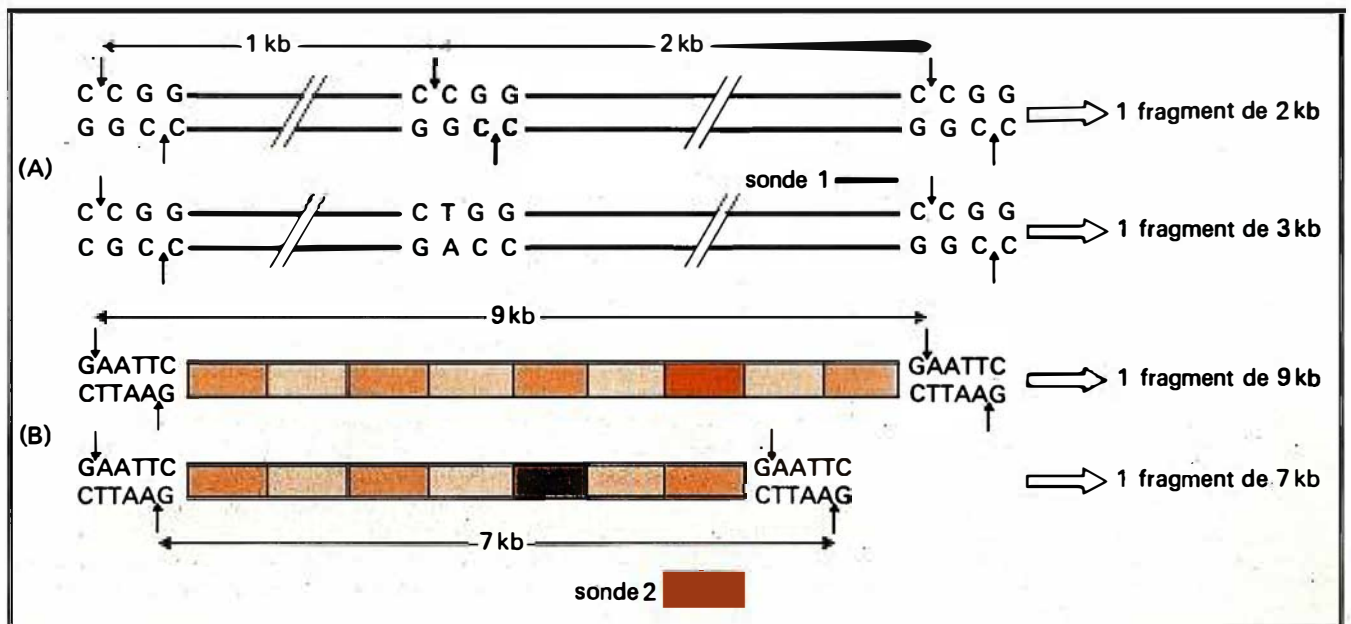


Figure 1. Mécanismes possibles du polymorphisme de taille des fragments de restriction.

(A) : Au niveau d'un allèle, 3 sites de restriction clivés par l'enzyme Msp-1 sont espacés de 1 et 2 kilobases. Après coupure par l'enzyme, électrophorèse et transfert sur filtre (voir « Southern blot », Lexique médecine/sciences n° 2, vol. 2), la sonde 1 reconnaît un fragment de 2 kb. Au niveau de l'autre allèle le site Msp-1-central a été modifié, un C|G étant remplacé par T|A. L'enzyme de restriction ne clive plus ce site et la sonde 1 hybride donc avec un fragment de 3 kb.

(B) : Deux allèles diffèrent par le nombre d'éléments répétés entre deux sites de clivage par l'enzyme EcoR 1. Après digestion par cette enzyme, un « Southern blot » hybridé par la sonde 2 montrera une bande de 9 kb pour le premier allèle et de 7 kb pour le second. Dans les deux exemples donnés les flèches verticales indiquent les sites de coupure.

que l'allèle normal était associé au polymorphisme B donnant un fragment d'ADN de 7 kb. L'examen de l'ADN d'un fœtus issu de deux sujets hétérozygotes permettra de prévoir si l'enfant à naître sera normal (présence du seul fragment de 7 kb), hétérozygote (présence des deux fragments) ou homozygote malade (présence du seul fragment de 9 kb). Cette méthode sera sûre si le gène étudié est très proche du site polymorphe; s'il est trop éloigné, des recombinaisons survenant à la méiose (crossing over) modifieront l'association entre eux et entraîneront de fausses prédictions. La figure 2 montre un hétérozygote dont l'ADN se comporte comme celui d'un homozygote malade car un événement de recombinaison est survenu.

La puissance de la méthode réside en ce qu'elle constitue l'une des voies pour localiser, puis identifier des gènes inconnus responsables de maladies. Si des études génétiques familiales montrent en effet qu'un site polymorphe, éventuellement testé au hasard, est associé à la transmission d'une maladie, cela signifie que le gène modifié dans cette maladie est génétiquement proche du site étudié. Il restera alors à détecter d'autres sites polymorphes de plus en plus proches du locus morbide, puis le gène lui-même. Avant même cette étape ultime, les sondes reconnaissant les sites polymorphes seront des outils précieux de détection pré et post-natale des malades et des porteurs. C'est grâce à cette approche qu'ont pu être localisés les gènes dont les mutations sont responsables de la chorée de Huntington, de la myopathie de Duchenne, de la fibrose kystique du pancréas, etc. De nombreuses équipes tentent d'analyser selon ce principe les gènes de susceptibilité aux cancers familiaux ou à l'athérosclérose.

A. K.

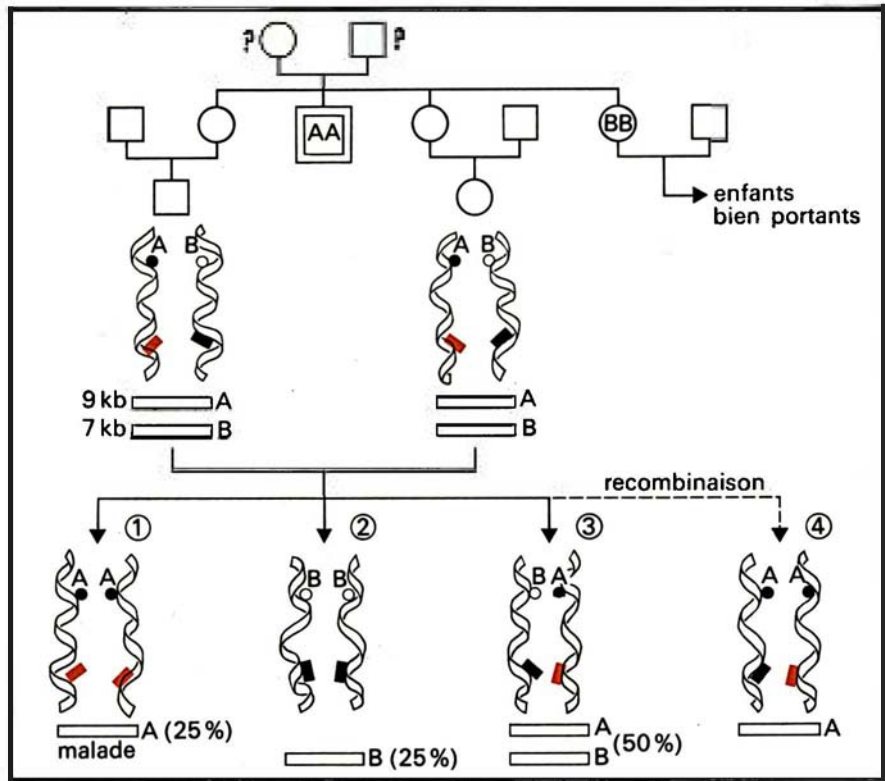


Figure 2. Exemple d'utilisation d'un polymorphisme de taille des fragments de restriction pour détecter des hétérozygotes d'une maladie autosomale récessive et pour faire un diagnostic prénatal de l'affection.

Rectangle noir : gène normal; Rectangle rouge : gène pathologique; A : allèle d'un site polymorphe donnant un fragment de 9 kb; B : allèle du même site donnant un fragment de 7 kb.

De haut en bas, des parents cousins germains ont un oncle malade (double carré), et une tante bien portante dont tous les enfants sont également bien portants. L'étude des polymorphismes de restriction indique que l'oncle n'a que l'allèle A donnant un fragment de 9 kb; il est donc homozygote AA. La tante est elle homozygote BB. L'affection est donc génétiquement liée à l'allèle A. Les deux parents sont hétérozygotes AB (l'étude de leur ADN montre deux fragments de 7 et 9 kb). Un quart des enfants risque d'être malade; le prélèvement de cellules du liquide amniotique ou d'une villosité choriale permettra d'isoler de l'ADN du fœtus et donc de prédire s'il est homozygote pour la maladie (1 présence du seul fragment de 9 kb), tout à fait normal (2, présence du seul fragment de 7 kb), ou bien hétérozygote (3, présence des deux fragments). Si le site polymorphe est trop éloigné du gène morbide, des recombinaisons pourront survenir, schématisées en 4 : le polymorphisme A se trouve ici associé au gène normal, conduisant au faux diagnostic d'homozygotie pathologique d'un fœtus en fait hétérozygote. Ces faux diagnostics peuvent être évités en utilisant des sondes très proches du locus morbide, ou bien en combinant l'utilisation de deux sondes reconnaissant des polymorphismes situés de part et d'autre du gène morbide. A la limite, le site polymorphe se trouve dans le gène lui-même, et les recombinaisons deviennent hautement improbables.