

L analyse de l'ARN en médecine

A l'exception notable près des gènes subissant un réarrangement au cours des processus de différenciation (ceux des immunoglobulines et du récepteur des lymphocytes T), l'ADN est le même dans toutes les cellules de l'organisme et peut être analysé au niveau des cellules et tissus les plus aisés à obtenir. Tout autre est le problème des ARN messagers qui ne sont transcrits que dans les cellules exprimant le gène étudié : une étude des ARN du fibrinogène, par exemple, exigera que l'on dispose d'une biopsie hépatique ! Une autre difficulté de ce type d'étude réside en la très grande instabilité des ARN comparée à celle des ADN.

Méthodes de base de l'étude des ARN

(a) *Le « Northern blot »*. Ce terme, intraduisible en français, est un jeu de mot : *Southern* ayant décrit l'hybridation moléculaire sur filtre de l'ADN, le nom de « *Northern blot* » fut donné à l'opération consistant à transférer sur des filtres des ARN séparés par électrophorèse, puis à les révéler par hybridation moléculaire comme nous l'avons indiqué dans le lexique de *m/s n° 1, vol. 2, p. 104-105*. Cette méthode permet d'apprécier la taille de l'ARN (dont dépend sa migration électrophorétique, d'autant plus rapide que l'ARN est petit), et sa concentration. Cette dernière peut aussi être appréciée par l'intensité de l'hybridation d'une sonde radioactive avec un échantillon d'ARN déposé sur un filtre sans séparation électrophorétique préalable (méthode du « *dot blot* »).

(b) *La cartographie à la nucléase S1 ou à la RNA-se A* (figure 1). Cette technique permet de détecter des différences de séquence entre une sonde radioactive et l'ARN étudié. La nucléase S1 clivera une sonde

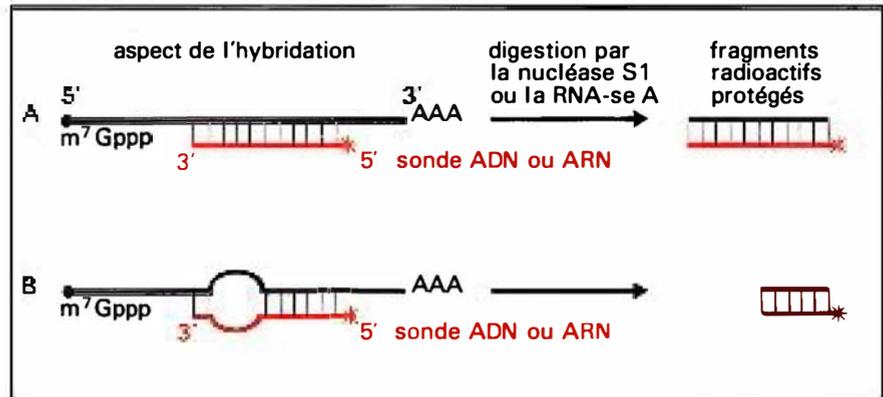


Figure 1. *Principe des réactions de « cartographie » à la nucléase S1 ou à la RNAseA*. Une sonde radioactive simple brin d'ADN ou d'ARN est hybridée avec le messager étudié. En « A », une hybridation parfaite protégera complètement cette sonde contre la digestion par la nucléase S1 (spécifique de l'ADN simple brin) ou par la RNAseA (spécifique de l'ARN simple brin). En « B », un clivage aura lieu au niveau d'une zone non appariée, entraînant une protection partielle de la sonde. La taille des sondes résiduelles obtenues après digestion est analysée par électrophorèse en milieu dénaturant. L'astérisque indique l'extrémité radioactive de la sonde ADN, les sondes ARN utilisées étant habituellement entièrement radioactives.

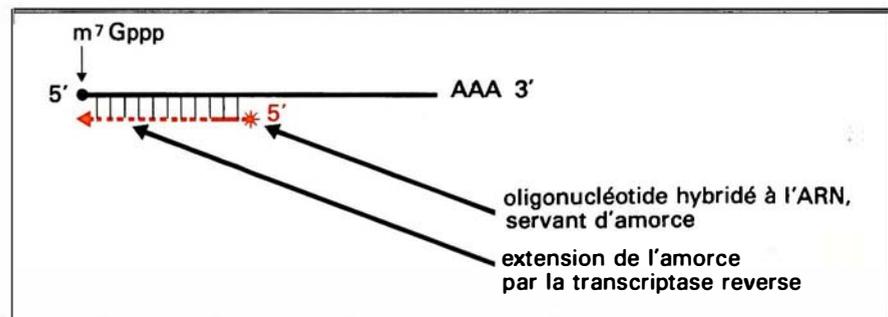


Figure 2. *Principe de l'extension d'amorce*. Un oligonucléotide radioactif (marqué à son extrémité 5', comme l'indique l'astérisque) est hybridé à l'ARN étudié; il sert d'amorce pour une extension par la transcriptase reverse qui, en présence des 4 nucléotides dans le milieu, recopie l'ARN en ADN complémentaire. La longueur du fragment allongé est mesurée par électrophorèse en milieu dénaturant.

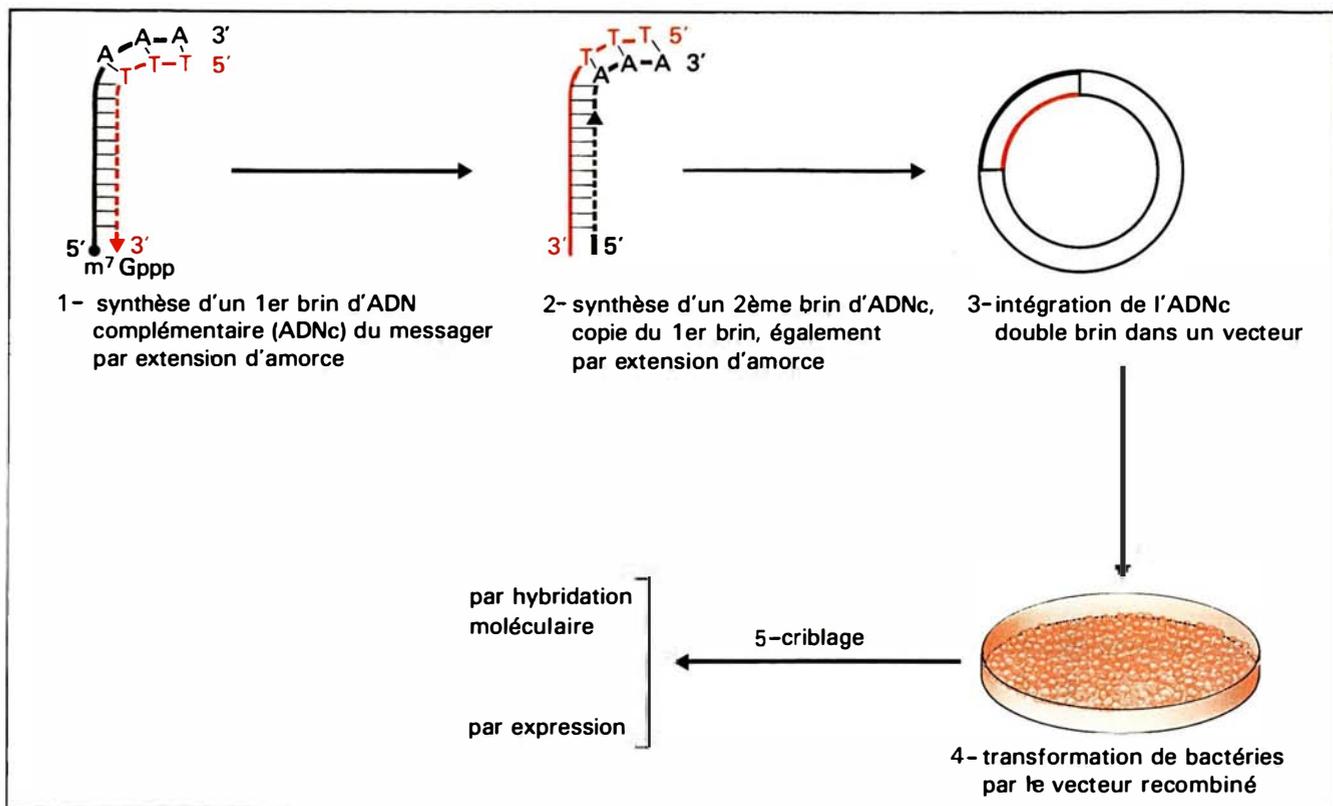


Figure 3. **Principe de la confection de banques d'ADN complémentaires.**

Étape 1 : Les ARN messagers d'un tissu sont recopiés en un brin complémentaire d'ADN par extension d'amorce à l'aide de la transcriptase reverse, comme cela est expliqué dans la figure 2. L'amorce la plus souvent utilisée est ici un homopolymère d'acide thymidilique, complémentaire de l'extension d'acide polyadénylique prolongeant généralement les ARN messagers eucaryotiques.

Étape 2 : Après destruction des ARN, ou simplement dénaturation des hybrides ARN/ADN, les premiers brins sont eux-mêmes recopiés en un deuxième brin par extension d'amorce. Les amorces sont ici diverses selon les méthodes et ne seront pas détaillées.

Étape 3 : L'ADNc double brin est intégré dans un vecteur qui est soit un plasmide (c'est-à-dire un élément génétique à répllication autonome dans la bactérie), soit, comme indiqué dans le lexique « Clonage de gènes » (m/s, n° 6, vol. 2, p. 333), un phage.

Étape 4 : Des bactéries sont « transformées » par intégration du vecteur recombiné, chacune d'entre elle, qui sera à l'origine d'une colonie, ne pouvant intégrer qu'une seule molécule de vecteur... et donc un seul type d'ADNc. Ces bactéries transformées sont diluées et étalées sur des boîtes de milieu de culture de telle sorte qu'elles soient à l'origine de colonies séparées.

Étape 5 : Le criblage, c'est-à-dire la détection parmi les colonies de celles transformées par le vecteur ayant intégré l'ADNc complémentaire du messenger étudié, se fait de différentes façons qui peuvent être ramenées à deux groupes principaux : le criblage par hybridation moléculaire, souvent à l'aide d'oligonucléotides synthétisés d'après une portion connue de la séquence de la protéine codée par le messenger étudié, se fait comme cela est indiqué dans le lexique « Clonage de gènes » (m/s, n° 6, vol. 2, p. 333); le criblage par expression consiste à reconnaître à l'aide d'anticorps, et parfois par son activité biologique, la protéine codée par l'ADNc intégré dans le vecteur transformant les colonies recherchées.

d'ADN si le mauvais appariement est de plus de 3 bases, alors que la RNase A sera capable de cliver une sonde d'ARN ne différant de l'ARN étudié que par une seule base; cette dernière est donc particulièrement précieuse pour étudier des mutations ponctuelles, héréditaires ou acquises (activation d'un oncogène). L'appréciation de l'intensité de la bande protégée est également une méthode extrêmement sensible de détection et de quantification des ARN très minoritaires.

(c) *L'extension d'amorce (figure 2).* Moins sensible que la précédente pour détecter des messages minoritaires, cette technique a deux intérêts principaux: elle permet de préciser la localisation de l'extrémité 5' des messagers, et donc les sites d'initiation de la transcription des gènes correspondants, qui peut être anormale au cours de phénomènes de remaniement génique; elle est aussi, et surtout, une méthode irremplaçable pour établir la séquence nucléotidique d'un ARN non cloné s'il n'est pas trop minoritaire. Le fragment allongé d'ADN complémentaire peut en effet être séquencé par l'une ou l'autre des méthodes disponibles.

(d) *L'hybridation in situ sur coupes histologiques.* Toutes les méthodes résumées ci-dessus utilisent de l'ARN purifié après broyage de tissus... ce qui peut en fait entraîner le mélange entre des populations de messagers de cellules très différentes composant des tissus comme le cerveau ou le rein ou, plus encore, des embryons entiers. L'hybridation in situ consiste à détecter par hybridation moléculaire les ARN à l'intérieur des cellules les contenant, reconnaissables par les techniques histologiques habituelles. Elle s'applique aussi bien à la caractérisation des ARN transcrits normalement par des populations cellulaires parfois très minoritaires dans un organe donné qu'à la recherche de séquences virales.

(e) *La confection de banques d'ADN complémentaires.* Les méthodes permettant de cloner les copies ADN des messagers sont maintenant si nombreuses que la figure 3

ne fera qu'en donner le principe. Il s'agit en dernière analyse de la seule méthode permettant de déterminer la structure d'un ARN messager très minoritaire; elle est dans l'immense majorité des cas la première étape de l'étude moderne d'un gène codant pour une protéine connue.

Principales indications de l'analyse des ARN en médecine

(a) *Caractérisation d'une cellule normale ou pathologique par l'expression de gènes spécifiques.* Chaque cellule a un « phénotype » qui est fonction des gènes qu'elle transcrit en messagers. Certains d'entre eux peuvent constituer de forts marqueurs de types particuliers de différenciation normale ou pathologique. De telles sondes reconnaissant des messagers spécifiques de certaines cellules sont déjà utilisées pour l'analyse de l'oestrogénodépendance des cancers du sein. Appliquée à des coupes de tissu, une telle caractérisation par « hybridation in situ » des populations d'ARN messagers de certains types de cellule est probablement appelée à un très grand avenir en anatomie pathologique.

(b) *Recherche de messagers anormaux.* L'étude quantitative et qualitative des messagers d'oncogènes a déjà quitté le domaine exclusif de la recherche et pourrait constituer un outil utile pour le diagnostic et le suivi de certains cancers. De même, la détection de transcrits viraux est-elle particulièrement importante pour l'étude pathogénique, voire pour la détection de certains types d'infections.

(c) *Analyse des mécanismes d'une maladie héréditaire.* L'étude des ARN au cours d'une maladie héréditaire ne comportant pas d'anomalie structurales évidentes du gène impliqué permet de déterminer si ce gène est transcrit, si les ARN subissent une maturation normale et si le messager est traductible en protéine. Le clonage moléculaire de l'ADN complémentaire du message muté permettra, par séquençage nucléotidique, de parvenir à la reconnaissance de la mutation ponctuelle éventuellement en cause. A. K.

SIDA, enfin une drogue semblant active !

L'Azidothymidine (ou AZT) est le premier agent thérapeutique qui semble prometteur dans le traitement du SIDA. La firme Burroughs Wellcome et les services officiels américains ont révélé, le 19 septembre 1986, les premiers résultats d'une étude portant sur 282 malades séparés en deux groupes, l'un recevant le produit et l'autre un placebo. Après 6 mois de traitement, 16 malades sont morts dans le groupe recevant le placebo et seulement un dans le groupe traité par l'AZT. Dans ce dernier groupe, de plus, la fréquence des sarcomes de Kaposi et des lymphomes a été particulièrement faible, la fonction immunitaire et l'état général de plusieurs malades s'améliorant. Ces résultats semblent si intéressants que les services officiels américains ont décidé de supprimer le groupe placebo dont le maintien n'était plus éthiquement concevable et d'autoriser la réalisation d'essais thérapeutiques de phase II chez des malades atteints de formes graves de la maladie. L'AZT, analogue des nucléosides pyrimidiques, est un inhibiteur de la transcriptase reverse: incorporé au cours de la transcription reverse de l'ARN génomique viral, il est incapable de s'apparier correctement à une base complémentaire et bloque donc l'élongation de l'ADN complémentaire proviral. Malgré le caractère très encourageant des premiers essais, il faut savoir raison garder: rien ne dit en effet que les malades traités seront guéris et la toxicité du produit reste mal connue. De plus le produit de base du médicament, la thymidine, est rare et une demande brutale de ce traitement ne pourrait probablement pas, à l'heure actuelle, être satisfaite. Il n'en reste pas moins que voici la première confirmation qu'il est possible d'opposer à l'extension de la maladie des produits antiviraux! Il s'agit probablement d'un moment essentiel de l'histoire du SIDA. A. K.