

médecine/sciences a présenté dans ses premiers numéros une série de brèves mises à jour conceptuelles sur la structure et l'expression du génome eucaryote. La génétique moléculaire n'est cependant pas seulement une nouvelle discipline destinée à approfondir nos connaissances fondamentales des processus biologiques. Elle est aussi un ensemble de techniques qui ont commencé à modifier l'exploration de certaines maladies et dont on peut prévoir que la place augmentera encore considérablement dans l'arsenal préventif, diagnostique et, ultérieurement thérapeutique des médecins. Nous commençons donc la présentation des méthodes de base de génétique moléculaire qui s'appliquent dès aujourd'hui à l'exploration de multiples problèmes pathologiques.

L'hybridation moléculaire

Le « Southern blot »

Principe

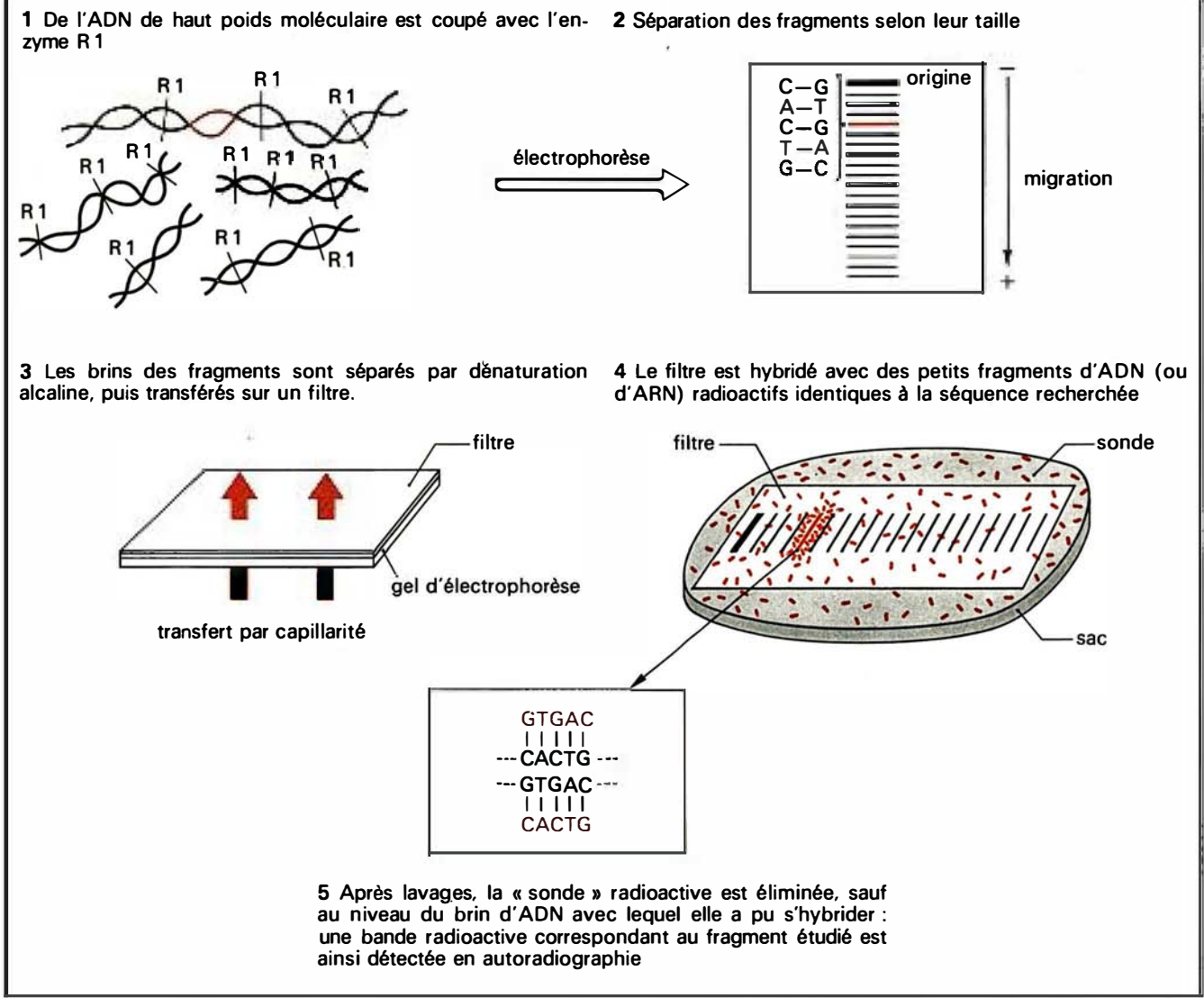
C'est en 1975 qu'E.M. Southern décrit la méthode consistant à détecter très spécifiquement des fragments d'ADN transférés sur filtre par leur hybridation à des séquences identiques radioactives. Le schéma montre le principe de cette technique appliquée à la détection d'une séquence particulière d'ADN génomique total. L'ADN purifié de cellules quelconques, par exemple de leucocytes circulants, est coupé en des sites très spécifiques par des enzymes de restriction qui reconnaissent des séquences nucléotidiques bien particulières, dispersées au hasard sur l'ADN. Une très grande variété de fragments est ainsi produite, dont l'un (ou un tout petit nombre) correspond à une partie ou à la totalité du gène étudié. La longueur totale de l'ADN humain est de l'ordre de $2,5 \times 10^6$ kilobases (kb) si bien qu'un fragment de 10 kb portant la séquence étudiée ne représentera que $1/250\,000$ de l'ADN. Les fragments sont séparés selon leur taille par électrophorèse dans un gel d'agarose, puis dénaturés par un traitement alcalin : le gel est immergé dans une solution de soude qui sépare les deux brins d'ADN de chaque fragment. Les fragments, maintenant simples brins, sont transférés par capillarité sur un filtre de nitrocellulose ou de nylon. Le filtre est alors incubé dans des conditions bien déterminées avec des petits fragments d'ADN (ou parfois

d'ARN), eux aussi dénaturés, de séquence identique à celle d'une partie du fragment recherché; ces fragments radioactifs sont appelés « sonde ». Les bases complémentaires forment alors des hybrides stables qui persistent après lavages répétés du filtre pour éliminer toute trace de sonde radioactive non spécifiquement liée à une séquence complémentaire.

Le ou les fragments correspondant au gène ou aux séquences intergéniques étudiés apparaît alors en autoradiographie sous la forme d'une bande radioactive dont la position dépend de la taille du fragment qui migre d'autant plus vite qu'il est plus petit.

Utilisation en médecine

La technique du « Southern blot » est d'ores et déjà d'application très large. Elle permet d'étudier la présence et la structure de gènes particuliers impliqués dans des maladies congénitales, de rechercher des séquences virales (par exemple du virus de l'hépatite B), de mettre en évidence le remaniement et l'amplification d'oncogènes dans des cancers, de caractériser des lignées dérivées de lymphocytes B ou T par le remaniement des gènes d'immunoglobuline dans le premier cas et du récepteur T dans le deuxième (voir la Nouvelle sur ce sujet dans le prochain n° de m/s). Plus précisément que les techniques classiques de cytogénétique, cette méthode permet de détecter et d'explorer des



remaniements chromosomiques, des délétions de petite taille, etc. Enfin, par l'utilisation des polymorphismes d'enzymes de restriction dont nous reparlerons dans le *Lexique* du prochain numéro, le « Southern blot » constitue une méthode de choix pour prévoir la susceptibilité à des affections dont la lésion génétique précise n'est souvent pas connue et fournit donc un outil précieux pour un nombre croissant de diagnostics prénataux. Il s'agit dans l'ensemble d'une technique simple qui peut être mise en œuvre avec peu de moyens et qui peut s'appliquer à l'ADN purifié à partir de 10 ml de sang total ou de 10 mg de tissu placentaire prélevé par biopsie.

A. K.

Principe du « Southern blot » d'ADN génomique. L'encart situé après la quatrième étape du schéma montre comment la sonde radioactive (ici un fragment d'ADN double brin dénaturé) s'hybride spécifiquement sur le filtre avec le fragment d'ADN dénaturé comportant la même séquence.