

Mise au point des conditions d'amplification de l'ADN unicellulaire

Anne Girardet, Franck Pellestor, Mireille Claustres

L'amplification in vitro par la technique de PCR d'une séquence d'ADN, à partir d'une seule cellule, est devenue réalisable grâce aux améliorations apportées aux protocoles d'amplification. L'analyse génique unicellulaire requiert cependant de nombreuses mises au point méthodologiques et une parfaite organisation des

différentes étapes de la technique au sein du laboratoire, afin de garantir l'efficacité et la spécificité de la réaction d'amplification, et d'éviter les problèmes de contamination. Cette démarche est indispensable pour faire de la technique d'amplification de l'ADN unicellulaire un outil de recherche et de diagnostic performant.

Depuis l'avènement des techniques d'amplification *in vitro* par PCR (*polymerase chain reaction*), de nombreuses modifications et d'importantes améliorations ont été apportées, ouvrant ainsi la voie à de nouveaux champs d'application. L'extrême sensibilité de la réaction de PCR autorise l'étude de très petites quantités de matériel génétique, voire l'analyse d'une seule cellule. Les techniques d'amplification de l'ADN unicellulaire permettent d'envisager divers types d'investigations, tant au niveau du diagnostic génétique que de la recherche fondamentale. Compte tenu de la faible quantité d'ADN présente dans une cellule isolée (3 à 6 pg selon l'état haploïde ou diploïde), l'amplification de séquences d'ADN est une entreprise très délicate, essentiellement à cause des problèmes d'efficacité d'amplification et des risques de contamination. Elle nécessite une organisation spécifique du laboratoire et un important travail de mise au point des conditions optimales d'amplification et d'analyse des produits issus de la PCR, pour chaque séquence étudiée.

Déroulement de la technique

L'étude de l'ADN issu d'une cellule unique comprend différentes étapes qui doivent être chacune optimisées: (1) isolement de la cellule à étudier; (2) lyse cellulaire et libération de l'ADN nucléaire; (3) amplification de la (ou des) séquence(s) d'intérêt; (4) analyse des produits issus de l'amplification (*figure 1*).

Selon le type de cellule analysée (blastomère, cellule buccale, spermatozoïde, lymphoblaste, amniocyte, fibroblaste, globule polaire, etc.), la cellule peut être isolée par micromanipulation manuelle sous un microscope inversé [1, 2] ou par cytométrie en flux après mise en suspension [3]. L'étape de lyse est cruciale puisque de son efficacité va dépendre l'accessibilité des séquences d'ADN aux différents constituants du mélange réactionnel de la PCR. Elle peut être réalisée par des cycles de congélation-décongélation suivis d'une dénaturation thermique de 15 à 35 minutes à 95 °C [4, 5], par une solution contenant de la protéinase K et du SDS (Sodium dodecyl sulfate) [6] ou par une incubation de 10 minutes à 65 °C

dans une solution alcaline de potasse et de dithiothréitol [7, 8].

L'amplification par PCR d'une séquence spécifique de l'ADN contenu dans une seule cellule est l'une des difficultés majeures du typage génique unicellulaire puisque la quantité d'ADN disponible (3 pg ou 6 pg) est de 16 000 à 160 000 fois plus faible que dans les conditions standard de la PCR (100 à 500 ng). L'amplification unicellulaire nécessite donc un grand nombre de cycles de PCR et deux étapes d'amplification successives (PCR₁ et PCR₂), la deuxième étant une PCR nichée utilisant deux amorces internes à celles utilisées lors de la PCR₁, ou une amorce interne et l'une des amorces externes. Cette amplification en deux temps est indispensable pour obtenir un bon rendement d'amplification et augmenter la spécificité de la réaction. Les constituants des mélanges réactionnels ne diffèrent généralement pas de ceux d'une PCR standard, mais il s'avère souvent nécessaire de tester différentes concentrations en amorces oligonucleotidiques et en MgCl₂ du tampon de l'enzyme, afin d'optimiser le rendement d'amplification. Un

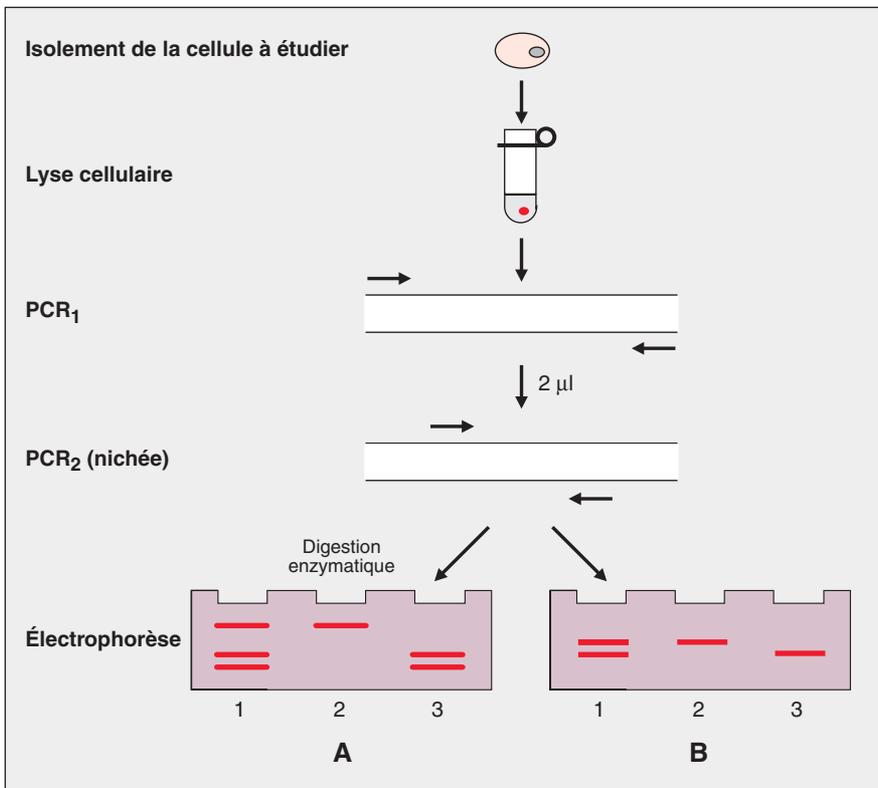


Figure 1. **Principe du déroulement de la technique d'amplification unicellulaire.** Les cellules isolées sont lysées, puis soumises à deux réactions d'amplification. Le mélange réactionnel de la PCR₁ comprend, dans un volume final de 50 µl, la cellule lysée, le tampon de l'enzyme, un mélange des quatre dNTP, les deux amorces externes et la Taq polymérase. Après 30 à 40 cycles d'amplification, 2 µl du produit de la PCR₁ sont utilisés pour la PCR₂ qui comprend les mêmes réactifs que la PCR₁, à l'exception des amorces (soit deux internes, soit une interne et une externe). Trente à 40 cycles d'amplification supplémentaires sont ensuite réalisés. **A.** Dans le cas de l'étude d'une mutation modifiant un site de restriction, les produits d'amplification sont digérés par l'enzyme de restriction adéquate puis déposés dans un gel d'électrophorèse (puits 1: cas d'une cellule diploïde; puits 2 et 3: cas d'une cellule haploïde). **B.** Dans le cas de l'étude de microsatellites, les produits d'amplification sont directement déposés dans un gel d'électrophorèse (puits 1: cas d'une cellule diploïde montrant la présence des deux allèles; puits 2 et 3: cas de cellules haploïdes révélant un seul allèle).

mélange réactionnel de 50 µl comprenant 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl à pH 8,3, 1,5 à 2,5 mM de MgCl₂, 0,1 mg/ml de gélatine, 200 µM de chacun des quatre dNTP (désoxynucleotide phosphate), 10 à 50 pmol de chaque amorce et 1 à 2 unités de Taq ADN polymérase. Dans la PCR₁, on utilise un couple d'amorces externes pour amplifier, en 30 à 40 cycles, un fragment de 150 à 500 paires de bases. Deux microlitres du produit de la PCR₁ servent ensuite de matrice pour la PCR₂, et sont amplifiés pen-

dant 30 à 40 cycles supplémentaires dans un nouveau mélange réactionnel de 50 µl contenant des amorces internes.

Selon la séquence amplifiée, le produit PCR peut être ensuite : (1) déposé dans un gel d'agarose ou d'acrylamide (recherche d'une délétion); (2) digéré par une enzyme de restriction adéquate puis déposé dans un gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium (recherche d'une mutation créant ou supprimant un site de restriction); (3) déposé dans un gel

d'acrylamide dénaturant et analysé à l'aide d'un séquenceur automatique (typage de microsatellites). Avant d'amplifier l'ADN d'une seule cellule, les conditions de réaction peuvent être mises au point à partir de petites quantités d'ADN génomique extrait des lymphocytes circulants. Par expérience, on considère que si l'amplification de 10 pg d'ADN (correspondant à environ 3 cellules haploïdes) est suffisamment efficace pour donner lieu à un signal d'amplification, l'analyse d'une seule cellule doit également le permettre.

Les contaminations : un problème majeur

Les contaminations par de l'ADN exogène sont une cause d'erreur préoccupante dans les techniques d'amplification unicellulaire, qu'il s'agisse de produits PCR issus de précédentes amplifications ou d'ADN provenant des propres cellules de l'opérateur. La grande sensibilité de la réaction PCR en fait sa force mais aussi sa faiblesse puisque toute molécule d'ADN contaminante sera amplifiée en même temps que la séquence cible et pourra empêcher un génotypage correct de la cellule étudiée. Pour éviter ces contaminations, des mesures draconiennes sont nécessaires, depuis l'étape de recueil et de tri des cellules, jusqu'à l'étape de PCR : les précautions élémentaires (port de gants, masque, charlotte, filtration, autoclavage ou traitement des réactifs par les UV) ne suffisent pas. Toutes les manipulations « pré-PCR » (préparation des solutions de lyse, de neutralisation et des mélanges réactionnels) doivent être réalisées dans une pièce et à l'aide d'un matériel strictement réservés à cet usage, y compris les congélateurs de stockage des cellules et des réactifs. L'ensemble des manipulations pré-PCR doit être effectué dans une hotte dans laquelle le petit matériel (pipettes, microcentrifugeuse, boîtes de pointes à filtre hydrophobe et gants) est systématiquement exposé aux UV pendant 30 minutes. Il est évidemment indispensable d'inclure dans chaque expérimentation plusieurs témoins négatifs (sans ADN) judicieusement placés entre les

échantillons à analyser pour vérifier l'absence de contamination, et des témoins positifs (ADN provenant de plusieurs cellules) pour contrôler l'efficacité de l'amplification.

Des problèmes spécifiques de l'analyse moléculaire d'un blastomère peuvent être rencontrés. En effet, lors de la biopsie d'une cellule embryonnaire par micromanipulation, des spermatozoïdes fixés à la zone pellucide de l'embryon ou des cellules péri-ovocytaires de la *corona radiata* peuvent être prélevés accidentellement et contaminer les mélanges réactionnels en faussant ainsi les résultats des réactions d'amplification. La technique d'injection directe d'un spermatozoïde dans le cytoplasme d'un ovocyte (ICSI, *intracytoplasmic sperm injection*) [9] permet de pallier, en évitant la co-incubation des gamètes, la contamination par les spermatozoïdes et une série de lavages après la biopsie permet généralement d'éliminer les cellules résiduelles de la *corona radiata*.

Les amplifications non spécifiques et les défauts d'amplification

L'amplification d'une séquence en exemplaire unique peut être inhibée par la formation de produits PCR non spécifiques et/ou de dimères d'amorces. La séquence d'intérêt est une cible de très petite taille dans le volume réactionnel de la PCR et ne représente qu'une portion infime du génome (150 à 500 paires de bases). Pendant les phases d'amplification, toute hybridation de l'extrémité 3' des amorces à des séquences d'ADN non spécifiques peut entraîner une extension des amorces. Une fois engendrés, ces fragments peuvent à leur tour s'hybrider à de nouvelles amorces et être allongés. Par ailleurs, s'il existe une complémentarité de séquence entre les amorces, surtout au niveau de leur extrémité 3', elles auront tendance à s'hybrider entre elles et non à la séquence cible. La formation de ces complexes semble être liée à la concentration en enzyme et en amorces, à leur stabilité, à la température d'hybridation et au degré de complémentarité entre séquences. Il peut donc être

nécessaire de définir de nouveaux couples d'amorces pour les PCR unicellulaires, comportant le moins de bases complémentaires possible et ayant une température d'hybridation élevée, ce qui réduit la stabilité des dimères d'amorces éventuels et l'interaction des amorces avec des séquences d'ADN non spécifiques.

Lors des techniques d'amplification de l'ADN unicellulaire, peut également se poser le problème de défaut d'amplification. Dans le cas de cellules diploïdes hétérozygotes, l'amplification préférentielle de l'un des deux allèles (ADO ou *allele drop out*) [10] peut entraîner une mauvaise détermination du génotype de la cellule étudiée et, dans le cas de l'analyse d'un blastomère, un mauvais diagnostic. Ce phénomène peut être détecté en amplifiant simultanément la séquence d'intérêt avec des marqueurs polymorphes proches [11]. Par ailleurs, il semblerait que l'utilisation d'un tampon de lyse contenant du SDS et de la protéinase K permette de diminuer ce défaut d'amplification spécifique d'allèle [6].

Les défauts d'amplification sont d'autant plus gênants qu'un résultat ne peut pas être vérifié puisqu'une cellule ne peut être analysée qu'une seule fois. Une technique de préamplification totale du génome (PEP ou *primer extension preamplification*), décrite en 1992 [12], permet de contourner cette limitation. Elle est fondée sur l'utilisation d'oligonucléotides non spécifiques de 15 bases (chacune des 4 bases pouvant occuper n'importe quelle position) dont l'appariement aléatoire aboutit à l'amplification d'au moins 78 % du génome en une trentaine de copies. Des cycles d'amplification (PCR₁ et PCR₂) sont ensuite réalisés à l'aide d'amorces spécifiques des locus analysés, à partir d'échantillons du produit de la PEP. Cette technique est potentiellement très intéressante car elle permet de confirmer un résultat en relançant des cycles de PCR à partir d'un autre échantillon du produit de la PEP.

Applications

Divers types d'investigations sont rendus possibles par les techniques d'amplification de l'ADN unicellulaire.

D'un point de vue diagnostique, il est possible de réaliser un diagnostic préimplantatoire (DPI*) pour des couples susceptibles de transmettre une maladie génétique létale ou lourdement handicapante à leur descendance. Le DPI est fondé sur l'analyse génétique d'un ou de deux blastomères d'embryons de 6 à 10 cellules, obtenus dans le cadre de procréations médicalement assistées. Seuls les embryons non atteints par l'anomalie génétique considérée seront transférés dans l'utérus maternel. L'étude de l'ADN après amplification par PCR est utilisée pour déterminer le sexe des embryons [1] mais surtout pour rechercher la (ou les) mutation(s) responsable(s) de la maladie génétique dont le risque de récurrence a motivé la demande du couple [4, 13, 14]. Ce type d'examen requiert une efficacité et spécificité parfaites des réactions d'amplification de manière à assurer un résultat sans ambiguïté dont va dépendre l'avenir de l'embryon analysé, à savoir le transfert dans l'utérus de la mère ou le rejet.

Les techniques d'amplification de l'ADN unicellulaire ont également été largement appliquées à l'étude de spermatozoïdes isolés, à des fins de recherche. Des expérimentations de typage génique réalisées sur des spermatozoïdes humains et bovins ont permis d'aborder des problèmes génétiques difficilement accessibles par les méthodes d'analyse génétique traditionnelles, permettant ainsi d'améliorer la cartographie génétique de haute résolution [15, 16]. Un article de synthèse consacré aux applications de cette méthodologie a déjà été publié dans ces mêmes colonnes en 1996 [17].

L'amplification de faibles quantités d'ADN trouve également sa place en criminologie, dès lors que peu de matériel biologique est à la disposition des investigateurs (cheveu, fragment de peau, sperme, etc.) [18].

L'amplification de l'ADN à partir d'une seule cellule reste une méthode d'analyse génétique très délicate dont la pratique en labora-

* Le terme anglais de « diagnostic génétique préimplantation », DGPI, est infiniment mieux approprié.

toire nécessite de nombreuses étapes de mise au point technique et de contrôle, ainsi qu'une organisation draconienne des différentes étapes de la technique au sein du laboratoire. C'est à ce prix seulement que ce type d'analyse peut être fiable et constituer un outil de recherche et de diagnostic extrêmement performant ■

RÉFÉRENCES

1. Handyside A, Kontogianni E, Hardy K, Winston R. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990; 344: 768-70.
2. Li H, Gyllensten U, Cui X, *et al.* Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. *Nature* 1989; 335: 414-7.
3. Li H, Cui X, Arnheim N. Analysis of DNA sequence variation in single cells. In: Abelson J, Simon M, eds. *Methods: a companion to methods in enzymology*. San Diego: Academic Press, 1991: 49-59.
4. Handyside A, Lesko J, Tarin J, Winston R, Hugues M. Birth of a normal girl after *in vitro* fertilization and preimplantation diagnostic testing for cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1992; 327: 905-9.
5. Liu J, Lissens W, Devroey P, Van Steirteghem A, Liebaers I. Polymerase chain reaction analysis of the cystic fibrosis $\Delta F508$ mutation in human blastomeres following oocyte injection of a single sperm from a carrier. *Prenat Diagn* 1993; 13: 873-80.
6. El-Hashemite N, Delhanty J. A technique for eliminating allele specific amplification failure during DNA amplification of heterozygous cells for preimplantation diagnosis. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 975-8.
7. Cui X, Li H, Goradia T, *et al.* Single-sperm typing: determination of genetic distance between the α -globin and parathyroid hormone loci by using the polymerase chain reaction and allele-specific oligomers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 9389-93.
8. Kristjansson K, Chong S, Van den Veyver I, *et al.* Preimplantation single cell analyses of dystrophin gene deletions using whole genome amplification. *Nat Genet* 1994; 6: 19-23.
9. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem A. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340: 17-8.
10. Findlay I, Ray P, Quirke P, Rutherford A, Lilford R. Allelic drop-out and preferential amplification in single cells and human blastomeres: implications for preimplantation diagnosis of sex and cystic fibrosis. *Hum Reprod* 1995; 10: 1609-18.
11. Rechitsky S, Strom C, Verlinsky O, Amet T, Ivakhnenko V, Kukharenko V, Kuliev A, Verlinsky Y. Allele dropout in polar bodies and blastomeres. *J Assist Reprod Genet* 1998; 15: 253-7.
12. Zhang L, Cui X, Schmitt K, *et al.* Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 5847-51.
13. Liu J, Lissens W, Van Broeckhoven C, *et al.* Normal pregnancy after preimplantation DNA diagnosis of a dystrophin gene deletion. *Prenat Diagn* 1995; 15: 351-8.
14. Viville S, Ray P, Viville B, Handyside A, Gerlinger P. Diagnostic génétique préimplantatoire: techniques et résultats. *Med Sci* 1996; 12: 1378-88.
15. Goradia T, Stanton V, Cui X, *et al.* Ordering three DNA polymorphisms on human chromosome 3 by sperm typing. *Genomics* 1991; 10: 748-55.
16. Girardet A, Lien S, Leeftang E, *et al.* Direct estimation of the recombination frequency between the RB1 gene and two microsatellites using sperm typing. *Eur J Hum Genet* 1999 (sous presse).
17. Girardet A, Claustres M, Pellestor F. Typage génique des spermatozoïdes: application à l'étude du génome. *Med Sci* 1996; 12: 1389-93.
18. Findlay I, Taylor A, Quirke P, Frazier R, Urquhart A. DNA fingerprinting from single cells. *Nature* 1997; 389: 555-6.

TIRÉS À PART

A. Girardet.

Anne Girardet

Étudiante en thèse de sciences de l'université Montpellier I.

Mireille Claustres

Professeur des universités, praticien hospitalier. Laboratoire de génétique moléculaire, Cnrs UPR 1142, 141, rue de la Cardonille, 34396 Montpellier Cedex 5, France et Institut de Biologie, 4, boulevard Henri-IV, 34060 Montpellier Cedex, France.

Franck Pellestor

Chargé de recherches au Cnrs. Institut de génétique humaine, Cnrs UPR 1142, 141, rue de la Cardonille, 34396 Montpellier Cedex 5, France.

Summary

Development of DNA amplification techniques from single cells

Amplification of specific DNA sequences from a single cell has been possible for a few years thanks to the development of PCR protocols. However, a unicellular genetic analysis requires to perfectly set up all the steps of the technique in order to ensure a high efficiency and a good specificity of the amplification reaction and to avoid contamination problems. Thus, the genetic study of single cells will be a good tool for research and diagnosis purposes.