m/s MINI-SYNTHÈSE

médecine/sciences 1988 ; 8 : 515-518

L'amplification in vitro des fragments d'ADN par PCR (polymerase chain reaction) : un tournant en génétique

La biologie est une science typiquement expérimentale. De ce fait, ses progrès se sont faits au rythme de la mise au point de nouveaux outils dont l'ensemble le plus élaboré et le plus cohérent est aujourd'hui la technologie des recombinants d'ADN, ou génie génétique. Ce n'est pas, par exemple, l'absence d'imagination ou l'étroitesse intellectuelle qui empêchaient les biologistes moléculaires des années 1960 d'aller plus vite et plus loin dans l'étude des gènes mais l'impossibilité qu'il y avait alors à isoler en quantité suffisante un gène cellulaire et à déterminer sa séquence nucléotidique. Les enzymes de restriction, l'hybridation moléculaire sur filtre (le *Southern blot*), le clonage d'ADN et son séquençage ont permis le développement de la génétique moléculaire moderne.

Malgré cet arsenal technique d'une exceptionnelle puissance (à l'origine de la quasi-totalité des progrès récents en génétique, cancérologie, immunologie, virologie, etc.), des difficultés d'ordre quantitatif et économique persistaient quant à l'utilisation large du génie génétique en médecine. Analyser un gène anormal responsable d'une maladie héréditaire ou peut-être d'un cancer restait un gigantesque travail si l'anomalie en cause était très petite (mutation ponctuelle, délétion minime créant un décalage de phase de lecture). (*Voir m/s suppl. au n° 7, vol. 3, p. 6 et 8*). Parfois, le matériel biologique disponible (par exemple le prélèvement fait sur un malade), était trop peu abondant pour autoriser un «clonage moléculaire». D'autres fois, enfin, la représentativité d'un fragment d'ADN étudié parmi tout l'ADN de l'échantillon biologique était trop petite pour permettre aisément son «clonage». Prenons l'exemple d'un gène humain porté par un fragment d'ADN de 15 000 bases de long. Puisqu'il y a trois milliards de bases dans un exemplaire d'ADN humain, il faudra, après avoir fragmenté cet ADN et l'avoir intégré dans des microorganismes, analyser au moins 200 000 clones pour détecter — en moyenne — un clone contenant le gène recherché. Compte tenu des lois de répartition aléatoire, c'est en fait un million de clones qui sont couramment analysés (*m/s suppl. au n° 7, vol. 3, p. 10*). Si maintenant le gène étudié a été modifié dans quelques cellules seulement d'un organisme... cellules à l'origine d'une tumeur cancéreuse, son «clonage» peut devenir impossible et sera de toutes façons si difficile qu'il ne pourrait jamais être appliqué à un grand nombre de malades.

• **Le principe de la méthode d'amplification par PCR.** Décrite en décembre 1985 par R.K. Saïki et ses collaborateurs de la firme Cetus Corporation (Emeryville, Californie, USA) [1], la méthode a été décrite il y a plus de deux ans dans *m/s (n° 7, vol. 2, p. 398)* ; nous reproduisons ici le schéma explicatif présenté à l'époque (*figure 1*). L'expérience consiste à rajouter à la préparation d'ADN contenant la séquence à amplifier deux amorces oligonucléotidiques

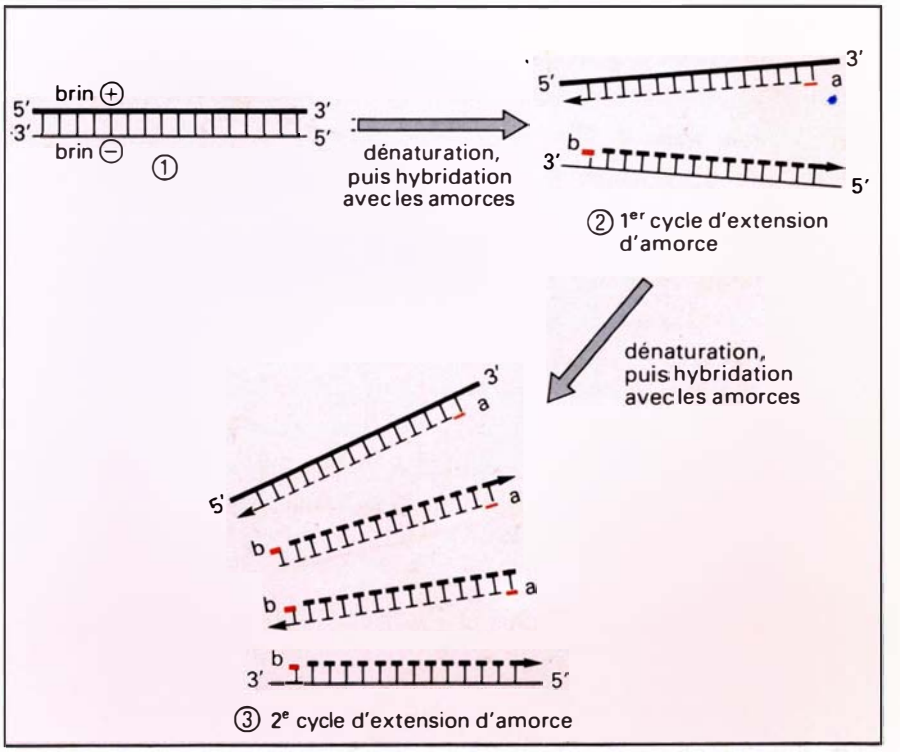

Figure 1. ***Amplification d'une région particulière de l'ADN génomique.*** *L'ADN en 1 est dénaturé, chacun des brins étant hybridé avec un oligonucléotide de synthèse (traits rouges). En 2, les oligonucléotides «a» (complémentaires du brin +, épais) et «b» (complémentaires du brin -, fin) servent d'amorce pour la synthèse de chaînes complémentaires d'ADN sous l'action de l'ADN polymérase. Cette réaction est appelée «extension d'amorce». En 3, l'opération est recommencée, aboutissant à une amplification des régions comprises entre les séquences reconnues par les 2 oligonucléotides de synthèse. Les brins initiaux d'ADN sont représentés en traits continus et les brins amplifiés en lignes discontinues. Les flèches indiquent le sens de synthèse des molécules d'ADN.*

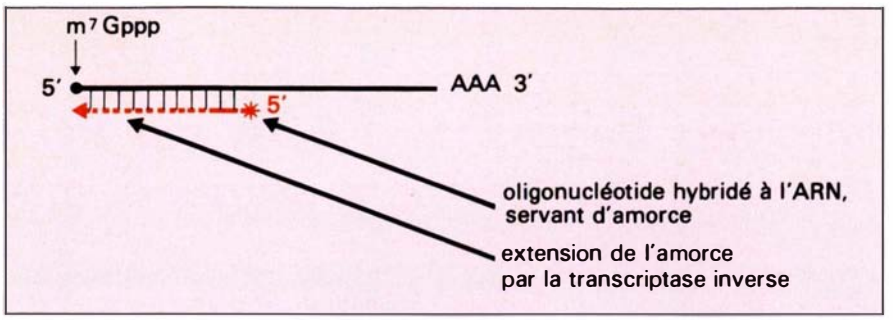

Figure 2. ***Principe de l'extension d'amorce.*** *Un oligonucléotide radioactif (marqué à son extrémité 5', comme l'indique l'astérisque) est hybridé à l'ARN étudié; il sert d'amorce pour une extension par la transcriptase inverse qui, en présence des 4 nucléotides dans le milieu, recopie l'ARN en ADN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

d'une vingtaine de bases (oligonucléotides de synthèse) complémentaires respectivement de l'un et de l'autre des deux brins d'ADN au niveau de séquences délimitant la longueur du fragment qui sera amplifié. On procède alors à des cycles successifs d'allongement des amorces par de l'ADN polymérase, puis de séparation des brins (par la chaleur). La *figure 1* montre qu'en partant de deux brins, on a quatre fragments après un cycle, huit après deux cycles, seize après trois cycles, 2^{n+1} après n cycles ; c'est-à-dire, après 30 cycles, plus de deux milliards de copies... théoriquement. En fait, le rendement de la réaction n'étant pas de 100 %, la multiplication est moindre. La formule réelle figurant le nombre Y de copies obtenues à partir de A copies initiales pour n cycles, le rendement de l'amplification étant R, s'écrit $Y = A(1 + R)^n$ [2]. Cet effet du rendement influe énormément sur le niveau de l'amplification finale. Ainsi, pour une valeur R = 0,5 (50 % de rendement), les deux brins initiaux seront devenus environ $3{,}8 \times 10^4$ après 30 cycles, au lieu de 2×10^9 (deux milliards) pour un rendement de 100 %. Ce rendement, ainsi que la rapidité et le coût de l'amplification, ont été considérablement augmentés par l'utilisation d'une ADN polymérase d'une bactérie thermophile *(thermus aquaticus)* vivant dans les eaux chaudes, jusqu'à 95° C [3]. Cette enzyme n'est pas détruite par le chauffage nécessaire à chaque cycle pour dissocier les doubles brins d'ADN ; fonctionnant à très haute température (70° C), elle recopie un ADN dont les superstructures ont toutes les chances d'être effacées, ce qui diminue les risques d'arrêt prématuré de la polymérisation.

• **Les performances de la PCR.** Il est possible grâce à cette méthode de multiplier *in vitro* un nombre considérable de fois n'importe quel fragment de séquence d'ADN connu, sans recourir au clonage moléculaire. La taille de la séquence amplifiée peut être assez grande (plusieurs kilobases), mais le rendement diminue linéairement avec l'augmentation de taille, si bien que si une sensibilité maximum est recherchée, il est préférable de choisir des amorces correspondant à des séquences distantes de seulement cent à quelques centaines de bases (J. Chelly *et al.* en préparation).

Dans ces dernières conditions, des amplifications ont été entreprises avec succès à partir de l'ADN d'une seule cellule, ou du bulbe d'un seul cheveu. Une tache de sang séché d'un test de Guthrie [4] peut également suffire. Le matériel amplifié est généralement assez abondant pour que puisse être déterminée directement, sans clonage préalable, sa séquence nucléotidique [5]. Cette non nécessité du clonage permet d'éviter les erreurs de séquences secondaires aux incorporations de bases mal appariées par la polymérase de *thermus aquaticus* : environ une tous les 9 000 résidus [6], ce qui peut faire, au terme d'une amplification de 30 cycles et compte tenu que ces erreurs sont cumulatives, une aberration toutes les 400 à 500 bases [7]. Les erreurs sont cependant réparties au hasard, chacune d'entre elles n'intéressant qu'une partie infime de la population amplifiée. Une séquence nucléotidique déterminée sur la population dans son ensemble donnera, à chaque position, la base présente au niveau d'environ 499 fragments sur 500, c'est-à-dire la base réellement présente dans l'ADN d'origine. La polymérase utilisée pourrait également créer un décalage de phase de lecture environ toutes les 41 000 bases [5].

Il faut noter enfin que la totalité de la procédure d'amplification est très aisément automatisable, ce qui permet de conduire parallèlement un grand nombre d'expériences indépendantes. Chaque cycle dure environ 3,5 minutes, l'expérience dans son ensemble étant achevée en moins de deux heures.

• **Amplification d'ADN génomique en médecine.** La PCR permet aisément, à partir de l'ADN de cellules d'accès facile (globules blancs, villosités choriales, fibroblastes, cellules de la muqueuse buccale ou de l'urine) de vérifier une anomalie de l'ADN d'une région connue quelconque d'un gène : mutation à l'origine d'une maladie génétique répandue comme la drépanocytose ou une autre hémoglobinopathie [1, 8], polymorphisme d'ADN associé à une maladie (région du gène HLA-DQ α associée à la susceptibilité au diabète) [9, 10], ou oncogène activé par mutation ponctuelle [11, 12].

Une situation particulièrement favorable est celle de translocations chromosomiques bien définies, par exemple associées à des hémopathies malignes. Il existe ainsi, chez 90 % des malades atteints de lymphome folliculaire, une translocation t (14 ; 18) réarrangeant l'oncogène bcl-2 dans les cellules leucémiques. Il est possible à l'aide d'amorces reconnaissant les régions des chromosomes 14 et 18 immédiatement adjacentes à la cassure, d'amplifier très spécifiquement l'ADN du chromosome hybride 14-18 à travers le point de cassure. Aucun fragment ne peut être amplifié à partir de l'ADN des cellules non leucémiques ne comportant pas la translocation. Il serait ainsi possible de repérer une cellule leucémique résiduelle avec translocation t (14 ; 18) parmi 1 000 cellules saines [13].

• **Détection de séquences virales.** De par sa sensibilité, la PCR est d'ores et déjà devenue la méthode la plus fine pour détecter des infections virales. Les virus sont des agents infectieux dont le génome (ARN ou ADN) peut en effet être aisément amplifié, souvent à partir du sang. Cette approche est déjà utilisée par plusieurs laboratoires pour l'hépatite virale et le SIDA. Dans ce dernier cas, la positivité du test PCR précède de plusieurs semaines l'apparition des anticorps, c'est-à-dire la conversion à la « séropositivité » [14]. S'il était possible d'appliquer cette méthode aux donneurs de sang, on supprimerait probablement le très petit pourcentage de cas où la contamination est due à la transfusion du sang d'un donneur très récemment infecté et encore séronégatif.

• **Application à l'ARN.** Après recopiage de l'ARN en ADN complémentaire par la transcriptase inverse, la PCR peut parfaitement être appliquée. La première étape de l'expérience est donc une extension d'amorce, telle que nous la décrivions dans *m/s (n° 9, vol. 2, p. 518) (figure 2).* La seconde amorce est alors ajoutée, et la réaction d'amplification entreprise. Cette procédure peut être utilisée pour étudier, au niveau de l'ARN, le même type d'anomalies qu'au niveau de l'ADN. Par exemple, le messager chimérique issu du remaniement chromosomique t (9 ; 22) (donnant le chromosome philadelphie dans la forme typique) caractéristique de la leucémie myéloïde chronique peut être détecté avec sûreté et sensibilité [15, 16]. Mieux, même : du fait de sa sensibilité, la méthode permet de détecter des ARN dont il n'existe qu'une seule copie dans une cellule sur 1 000, ce qui semble être le cas des transcrits correspondant à des gènes spécifiques d'un type particulier de différenciation tissulaire hors des cellules où ils s'expriment normalement. C'est ainsi qu'ont pu être détectés dans des fibroblastes ou des lymphoblastes des transcrits de dystrophine, β-globine, hormone antimüllérienne, facteur VIII, etc. [2, 17]. Ce phénomène, appelé « transcription illégitime » par J. Chelly *et al.* pourrait permettre d'analyser dans n'importe quelle cellule d'accès facile n'importe quel transcrit d'un gène présomptivement pathologique [17].

• **La PCR, technique de base des laboratoires de génétique moléculaire.** Pour être complet, il faudrait ajouter aux usages possibles de la PCR toutes les manipulations de l'ADN effectuées dans les laboratoires de génétique moléculaire : constructions génétiques, séquençage d'ADN, mutagenèse dirigée. Je voudrais commenter une application particulière, très riche de promesses. Nous avons déjà vu *(m/s n° 3, vol. 4, p. 190)* que l'on pouvait maintenant, une fois sur 1 000 environ, insérer à sa place normale un gène transféré dans une cellule. Tout fragment d'ADN contenant des séquences homologues de celles d'un gène endogène peut, par recombinaison homologue, être semblablement intégré de manière « ciblée » et ainsi inactiver un gène au milieu duquel il s'insérera.

La difficulté de l'approche réside en la mise au point d'un crible destiné à reconnaître les cellules ayant subi une recombinaison homologue, en moyenne 999 fois moins nombreuses que celles ayant subi un événement de recombinaison au hasard. S'il est possible d'amplifier un fragment d'ADN à partir d'une amorce reconnaissant l'ADN exogène et d'une amorce reconnaissant l'ADN endogène cible, on pourra détecter une petite minorité de cellules contenant un tel ADN cible remanié parmi des cellules ayant intégré au hasard l'ADN exogène. Si on a ainsi à tester 1 000 clones indépendants résultant d'une expérience de transformation par de l'ADN exogène « ciblé » vers une séquence endogène, on réalisera une réaction de PCR sur 10 groupes de 100 clones. Puis, le groupe positif sera lui-même subdivisé et l'on pourra parvenir au clone recherché...

• **PCR, médecine légale et paléontologie**. Comme *m/s* l'a rapporté à de maintes reprises *(m/s n° 6, vol. 1, p. 333 ; n° 3, vol. 2, p. 155),* il est possible désormais de caractériser tout individu grâce à ses « empreintes génétiques », c'est-à-dire à l'organisation extrêmement variable d'un individu à l'autre de certaines régions de l'ADN. Une telle recherche peut — en théorie — être faite à partir de sperme ou de sang séchés... de fragments de peau ou de poils. On risque cependant de buter souvent sur l'insuffisance de matériel, et la possibilité de multiplier la quantité infinétisimale d'ADN présente dans un échantillon, avant de l'étudier, étend considérablement le champ d'application de la méthode. L'ADN, contrairement à l'ARN, est chimiquement très stable. Il est de ce fait maintenant sûrement possible de caractériser grâce à des résidus de sang séché sur un vêtement, très à distance de l'événement en cause (accident, crime, catastrophe, guerre) l'empreinte génétique de l'individu d'où provient ce sang.

Puisque nous introduisons ici la notion d'étude à distance, il faut signaler que la « PCR » commence aussi à être largement utilisée par les paléontologistes. Dans des résidus d'os d'animaux fossiles, de peau de momies, il persiste des traces d'ADN très dégradé, fragmenté... mais qu'il est possible d'amplifier. La détermination de la séquence de ces fragments permet d'améliorer considérablement le positionnement d'un animal fossile dans l'arbre évolutif des espèces, ou d'apprécier la vitesse d'accumulation des changements génétiques survenus depuis les premières dynasties de l'ancienne Égypte.

En conclusion après les méthodes de base du génie génétique développées entre 1972 et 1976, un nouveau pas technique essentiel a été accompli en décembre 1985 : la mise au point de l'amplification fidèle, rapide et massive de n'importe quel fragment connu d'acide nucléique. Cette méthode rend d'ores et déjà aisément accessible à l'analyse par les méthodes de l'hybridation moléculaire et du séquençage nucléotidique des fragments d'ADN humain dont on soupçonne qu'ils pourraient être responsables d'une maladie génétique héréditaire ou acquise (cancer) ; elle est aussi la méthode la plus sensible pour détecter précocément et fidèlement tout agresseur, viral (pathologie tumorale ou infectieuse) ou humain (médecine légale).

Nul doute que la puissance de ce nouvel outil fera rapidement progresser les connaissances dans tous les domaines nécessitant l'analyse ou la manipulation d'un acide nucléique. ▶

Axel Kahn

RÉFÉRENCES

1. Saïki RK, Scharf S, Faloona F, *et al.* Enzymatic amplification of β-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985 ; 230 : 1350-4.
2. Chelly K, Kaplan JC, Maire P, Gautron S, Kahn A. Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissues. *Nature* 1988 : 333 : 858-60.
3. Saïki RK, Gelfand DH, Stoffel S, *et al.* Primer-directed amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988 ; 239 : 487-91.
4. Lyonnet S, Rey F, Caillaud C, Abadie V, Munnich A, Rey J. Bases moléculaires de la phénylcétonurie en France. *médecine/sciences* 1988 (sous presse).
5. Stoflet ES, Kœberl DD, Sarkar G, Sommer SS. Genomic amplification with transcript sequencing. *Science* 1988 ; 239 : 491-4.
6. Tindall KR, Kunkel TA. Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* 1988 ; 27 : 6008-13.
7. Higuchi R, Krummel B, Saïki RK. A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments : study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res.* 1988 ; 16 : 7351-67.
8. Amselem S, Vidaud M, Vidaud D, *et al.* Determination of the spectrum of beta-thalassemia genes in Spain by use of dot-blot analysis of amplified beta-globin DNA. *Am J Hum Genet* (sous presse).
9. Saïki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified β-globin and HLA-DQα DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 1986 ; 324 : 163-6.
10. Gu XF, Elion J, Ouagued M, Clauser E, Assan R, Krishnamoorthy R. A simple strategy to amplify specifically the HLA-DQβ gene region with genomic DNA as template. *Febs Lett,* 1988 ; 236 : 23-6.
11. Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant *c-K-ras* genes. *Cell* 1988 ; 53 : 549-54.
12. Farr CJ, Saïki RK, Erlich HA, Mc Cormick F, Marshall CJ. Analysis of RAS gene mutations in acute myeloid leukemia by polymerase chain reaction and oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988 ; 85 : 1629--33.
13. Lee MS, Chang KS, Cabanillas F, Freireich EJ, Trujillo JM, Stass SA. Detection of minimal residual cells carrying the t (14 ; 18) by DNA sequence amplification. *Science* 1987 ; 237 : 175-8.
14. Loche M, Mach B. Identification of HIV-infected seronegative individual by a direct diagnostic test based on hybridisation to amplified viral DNA. *Lancet* 1988 ; 11 : 418-21.
15. Kawasaki ES, Clark SS, Coyne MY, *et al.* Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemia by detection of leukemia-specific mRNA sequences amplified *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988 ; 85 : 5698-702.
16. Delfau MH, Garbarz M, Chaveroche I, Grandchamp B. Detection du messager chimérique abl-bcr dans la leucémie myéloïde chronique. *médecine/sciences* 1988 ; 4 : 402-3.
17. Chelly J, Concordet JP, Kaplan JC, Kahn A. Analyzing any transcript in any cell-type. Soumis pour publication.

BRÈVES

pH et prolifération cellulaire. Un des événements les plus rapides survenant lorsqu'une cellule est stimulée à proliférer est l'alcalinisation du milieu intracellulaire, probablement due à l'activation de l'antiporteur sodium-proton [1]. Les arguments indiquant que cette alcalinisation joue un rôle dans la stimulation de la division cellulaire, et n'y est pas simplement associée, étaient nombreux, mais indirects [1]. Chez les plantes et les champignons, le système assurant l'alcalinisation est une pompe à protons couplée à une ATPase dont le gène a été cloné chez la levure. Lorsqu'une cellule de mammifère est transformée par un gène de levure codant pour cette pompe à proton, gène placé sous le contrôle d'un promoteur viral fort, elle subit une alcalinisation de son pH intracellulaire (de pH 7 à pH 7,2) et acquiert des propriétés tumorigènes [2]. Le gène de levure peut donc être considéré comme un « oncogène ». La cellule transformée prolifère en l'absence de sérum, comme cela pouvait être attendu si l'on considérait que les facteurs du sérum agissaient par l'intermédiaire de l'antiporteur sodium-proton. Des recherches ultérieures détermineront si des oncogènes viraux ou cellulaires sont les équivalents de l'un de ces systèmes d'alcalinisation cellulaire. L'utilisation de ces systèmes pour transformer des cellules en culture pourrait avoir d'intéressantes applications biotechnologiques.

[1. L'Allemain G, Pouysségur J. *médecine/sciences* 1987 ; 3 : 582-8.]

[2. Perona R, Serrano R. *Nature* 1988 ; 334 : 438-40.]

BRÈVES

Le peptide des plaques de la maladie d'Alzheimer dérive-t-il d'un protéoglycane à tropisme nerveux ? Au cours de la maladie d'Alzheimer les plaques neuritiques qui s'accumulent dans le cerveau contiennent un peptide d'environ 4000 Da. Ce peptide, appelé A4, ou protéine β, dérive d'un précurseur d'environ 79000 Da *(m/s n° 5, vol 4, p. 323).* Une équipe de San Diego (Californie, USA) [1] a isolé d'une lignée de cellules nerveuses de rat (PC 12) un protéoglycane à héparane sulfate dont la taille est comparable à celle du précurseur, dont la séquence est la même que celle du peptide A4 dans la zone correspondante et qui réagit avec un antisérum dirigé contre la protéine β. Cette protéine immunoréactive est absente d'une lignée mutante de PC 12 qui ne sécrète pas le protéoglycane. De telles protéines à héparane sulfate sont présentes dans des vésicules synaptiques et aux contacts synaptiques. Une altération du métabolisme de ces protéines pourrait avoir des conséquences sur le fonctionnement de la synapse. Quant au peptide A4, les auteurs suggèrent qu'il pourrait provenir d'une déglycosylation du fragment de dégradation du précurseur lorsque sa taille avoisine 5000 Da, déglycosylation qui en entraînerait la précipitation.

[1. Schubert D, *et al. Science* 1988 ; 241 : 223-6.]

La mutation du codon 12 de l'oncogène *c-K-ras* pourrait être constante dans les cancers du pancréas chez l'homme. La méthode d'amplification des séquences d'ADN par cycles successifs d'allongement d'amorce *(m/s suppl au n° 7, vol. 3, p. 13)* appelée PCR *(polymerase chain reaction)* peut être appliquée à des échantillons histologiques fixés et inclus dans la paraffine. Une telle approche a permis de montrer que dans 21 observations sur 22, l'oncogène *c-K-ras* était muté au niveau du codon 12 dans des cancers du pancréas et leurs métastases, mais non dans les tissus sains du même malade [1].

[1. Almoguera C, *et al. Cell* 1988 ; 53 : 549-54.]