

# Utiliser les propriétés topologiques de l'ADN :

## une nouvelle arme contre les agents pathogènes



**L**a société Bertin est l'un des fleurons de la recherche-développement de notre pays : on lui doit en particulier la ligne expérimentale du fameux aérotrain qui court le long de la voie ferrée de Paris à Orléans. De nombreuses innovations incontournables des domaines aéronautique, nucléaire et spatial sont sorties de ses bureaux d'études, sans parler des applications au domaine de la défense.

En collaboration avec le célèbre Genethon, la société Bertin a créé il y a une dizaine d'années une filiale dédiée aux biotechnologies : Labimap. Les ingénieurs de Labimap ont su automatiser les techniques clefs des laboratoires de Génétique moléculaire : électrophorèse d'ADN et transfert sur membrane, mais aussi extraction de l'ADN, séquençage automatisé et amplification génique. Lors de leur sortie il y a dix ans, leur gamme d'automates était sans concurrence sur le marché : grâce au travail infatigable de ces robots, le Genethon a pu marquer de nombreux points dans la lutte contre les maladies génétiques (**Figure 6**).

### La polymérisation en chaîne

L'actualité récente nous a rap-  
pelé tragiquement le besoin urgent

**FABRICE DAVID**

de techniques rapides et puissantes d'identification des agents pathogènes. Parmi les méthodes utilisées par les laboratoires, la *Polymerase Chain Reaction* (PCR) occupe une place de choix. Son invention a justement valu le prix Nobel à Kary Mullis, un jeune chercheur américain qui l'a imaginée en 1986. La PCR (en français, *réaction de polymérisation en chaîne*) permet de multiplier un brin d'ADN (acide désoxyribonucléique) plusieurs millions de fois de façon à pouvoir le détecter facilement. Comme chaque fragment d'ADN est particulier à l'organisme qui l'a produit, la méthode permet d'identifier spécifiquement de très faibles quantités de bactéries ou de virus.<sup>1</sup>

La méthode PCR nécessite cependant des réactifs coûteux : en effet, il faut utiliser des enzymes particulières, extraites de bactéries des sources chaudes résistant aux hautes températures. Ces bactéries ont été ramenées du fond des océans par des bathyscaphes lors de campagnes d'études géophysiques, et les molécules d'intérêt ont été clonées pour produire des bactéries génétiquement modifiées. Pour mettre en œuvre la PCR, il faut aussi des appareils relativement complexes, tout ce matériel étant breveté et vendu fort

Fabrice David dirige le Laboratoire de Recherches associatives (Franconville).

cher. En conséquence, cette technique est peu utilisée dans les pays en développement, là où elle serait particulièrement utile.

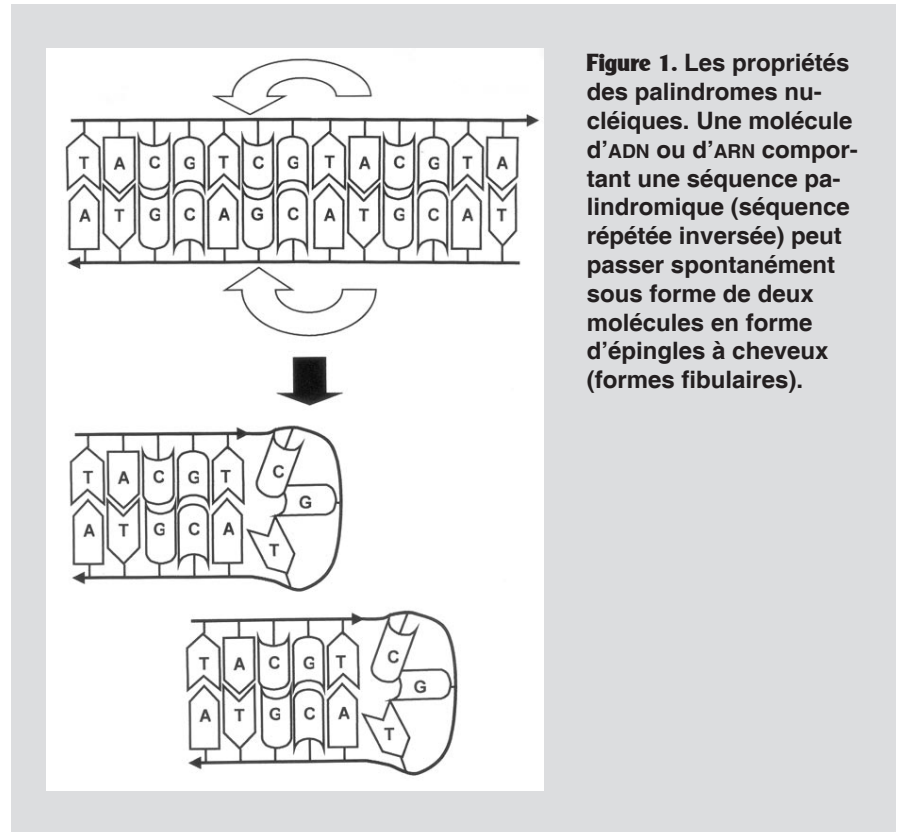
## L'ADN palindromique

Les chercheurs de Labimap sont parvenus à mettre au point une réaction d'amplification génique ressemblant un peu à la PCR, mais pouvant avoir lieu à la température du corps humain. De façon inattendue, ils se sont inspirés d'une technique de la poésie classique : le palindrome. Un palindrome est un vers qui peut se lire dans un sens ou un autre à partir de son milieu, comme les phrases suivantes :

- « Esope reste et se repose »,
- « L'âme des uns n'use de mal »,
- « A man, a plan, a canal, Panama ».

L'inventeur du palindrome est Sotadès de Maronée qui vivait en Egypte ptolémaïque. Poète satirique et mathématicien, sorte de Rabelais de l'Antiquité, il a payé de sa vie sa liberté de ton : le pharaon Philadelphie l'a fait précipiter dans la mer roulé dans une feuille de plomb. Seuls des textes mineurs de son œuvre nous sont parvenus.

Les palindromes fascinent les mathématiciens : la date du 20 février



**Figure 1.** Les propriétés des palindromes nucléiques. Une molécule d'ADN ou d'ARN comportant une séquence palindromique (séquence répétée inversée) peut passer spontanément sous forme de deux molécules en forme d'épingles à cheveux (formes fibulaires).

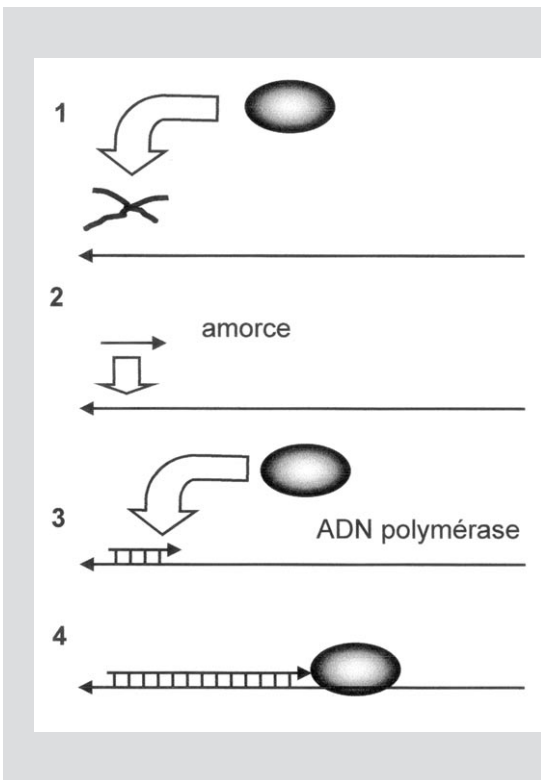
2002 est ainsi un nombre palindrome (20022002). La prochaine date mesurée par un nombre palindrome sera le 11 février 2011 (11022011). Les musiciens classiques apprécient aussi les morceaux palindromiques. Le canon à deux de l'*Offrande Mu-*

*sicale* de Jean-Sébastien Bach, dit *Cancrizans* (c'est-à-dire à l'envers), est composé de deux parties symétriques : une ligne mélodique et la même ligne mélodique prise en mouvement rétrograde. C'est un palindrome musical.

La séquence d'un brin d'ADN est constituée d'une suite de quatre bases nucléiques : A (Adénine), T (Thymine), G (Guanine) et C (Cytosine). Ces quatre bases sont complémentaires deux à deux : A se lie à T, et G à C. Ces quatre bases peuvent être disposées sous forme de séquence palindromique. Dans ce cas, le brin d'ADN va pouvoir se replier spontanément pour prendre la forme d'une « épingle à cheveux » (figure 1).

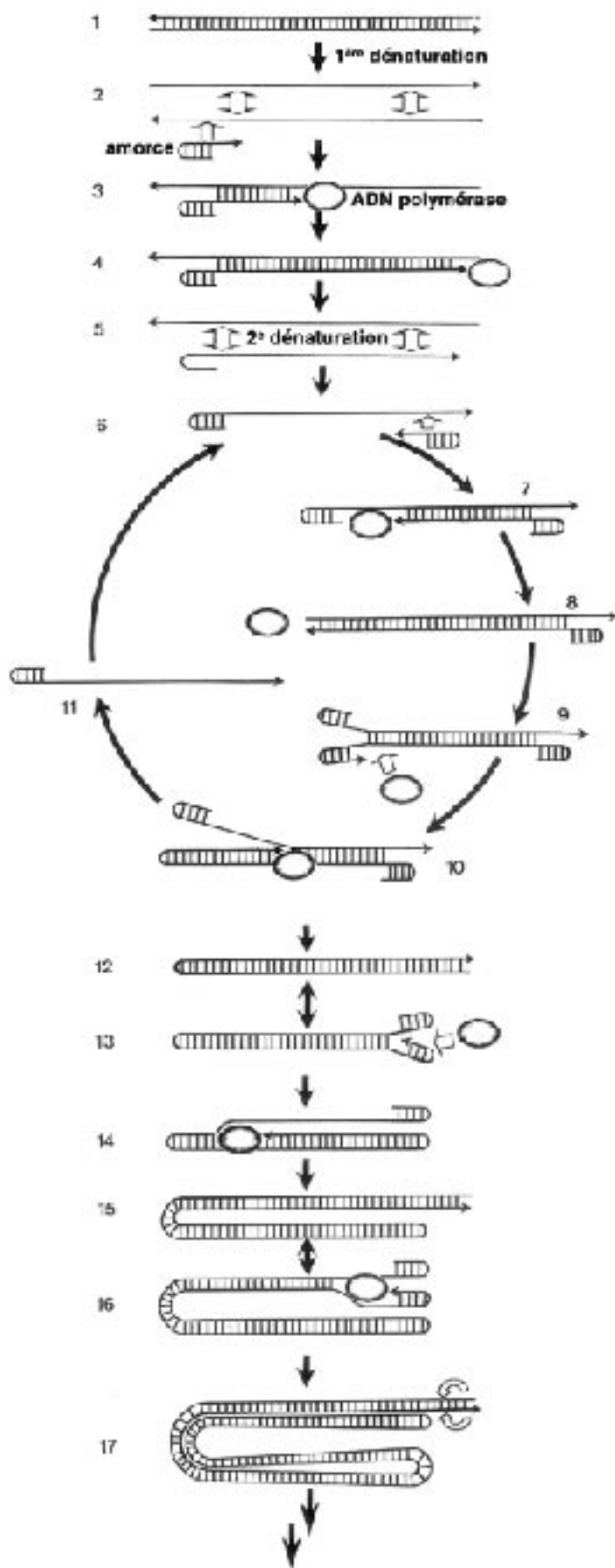
On va mettre à profit cette particularité de la topologie de la molécule d'acide désoxyribonucléique : des enzymes polymérases vont se servir de ces brins d'ADN en forme d'épingle à cheveux comme d'« amorces » qui leur sont indispensables pour copier l'ADN (figure 2).

Une fois amorcée, la réaction de duplication de l'ADN se poursuit jusqu'à l'épuisement des réactifs (nucléotides triphosphates). A partir d'une molécule d'ADN, il se forme des dizaines de milliers de molécules filles.<sup>2</sup> Evidemment, la réaction est spécifique : l'ADN n'est polymérisé et multiplié (on dit : « amplifié ») que



**Figure 2.** Le rôle des amorces.

1. Le substrat exclusif de l'ADN polymérase est une molécule d'ADN double brin incomplète : l'enzyme ne se fixe pas sur l'ADN simple brin.
2. Une petite molécule d'acide nucléique (ADN ou ARN) peut se fixer sur une séquence complémentaire de l'ADN.
3. Cette petite molécule va servir d'amorce à l'action de l'ADN polymérase.
4. L'ADN polymérase va recopier la molécule d'ADN initiale. Sans amorce, la duplication de l'ADN ne peut avoir lieu.



**Figure 3.** La réaction d'amplification isotherme.

1. Les deux brins de l'ADN cible sont séparés par un bref chauffage à 100°C (dénaturation).
2. Une amorce se fixe sur l'ADN.
3. L'enzyme ADN polymérase se fixe sur l'amorce et commence à recopier l'ADN.
4. La réaction de duplication se poursuit.
5. On sépare les deux brins de l'ADN par une dernière étape de chauffage à 100°C.
6. La deuxième amorce se fixe sur l'ADN.
7. L'ADN polymérase se fixe sur l'amorce et commence à dupliquer l'ADN.
8. L'enzyme ouvre la partie en épingle à cheveux et finit de copier l'ADN.
9. Un équilibre s'établit entre l'ADN linéaire et l'ADN bifibulaire (ADN en double épingle à cheveux).
10. Une des deux parties en épingle à cheveux sert de nouvelle amorce : une molécule d'ADN polymérase commence à recopier l'ADN, en déplaçant un brin.
11. Finalement, le brin déplacé se détache : il va servir de cible à une nouvelle molécule d'amorce, et un nouveau cycle recommence.
12. L'ADN linéaire produit à la fin du cycle forme spontanément deux parties en épingle à cheveux (forme bifibulaire).
13. Une des deux parties en épingle à cheveux sert d'amorce à une molécule d'ADN polymérase qui recopie l'ADN.
14. L'enzyme copie l'ADN en déplaçant un brin.
15. On obtient une molécule d'ADN de longueur double.
16. Cet ADN passe spontanément sous forme bifibulaire, et une des épingles à cheveux sert de nouveau d'amorce pour une molécule d'ADN polymérase.
17. A chaque étape, la taille de l'ADN double. On a donc à la fois une augmentation du nombre des molécules d'ADN cible, mais aussi de leur taille.

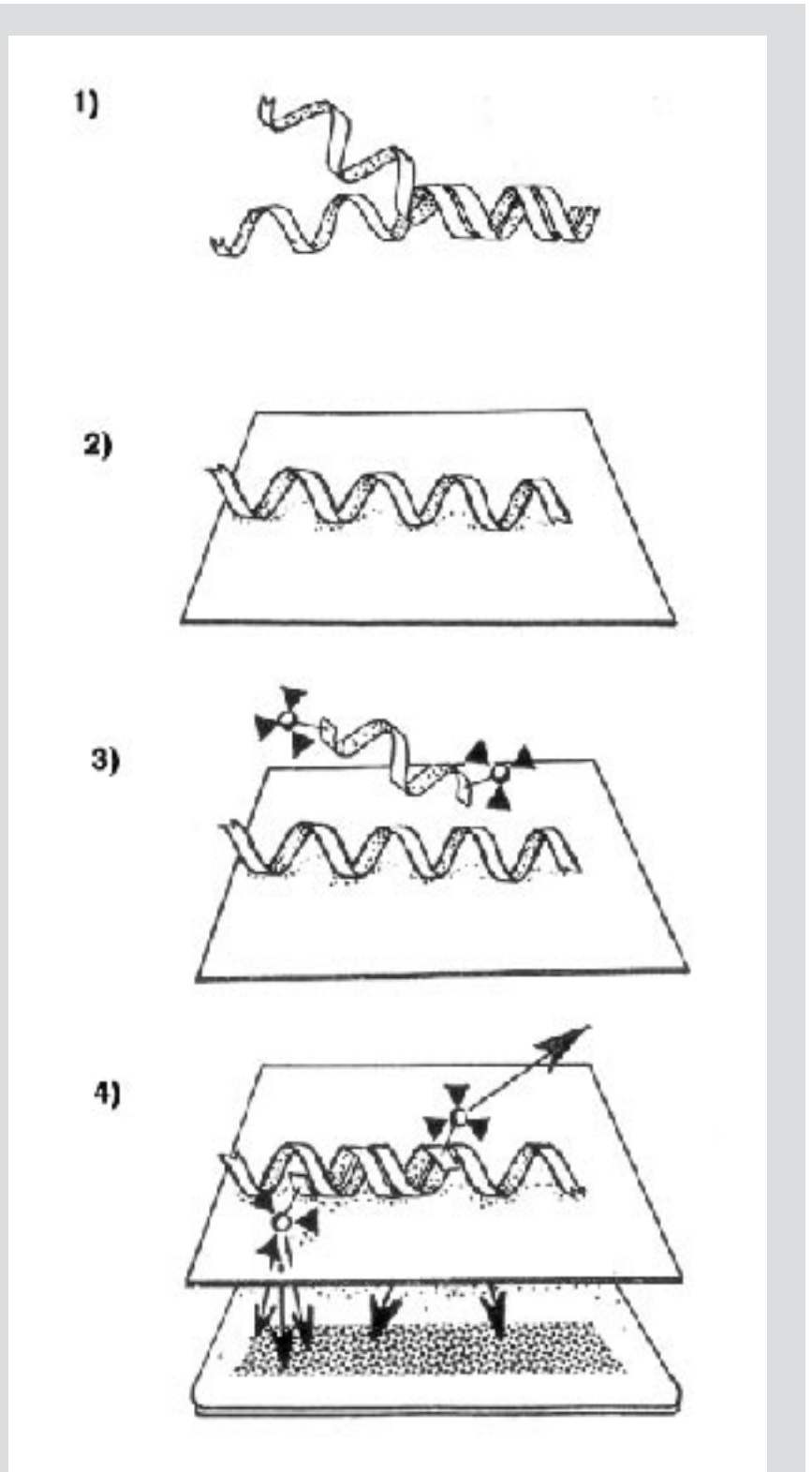
↗ s'il est complémentaire d'une partie des deux amorces palindromiques utilisées, de la même façon que le signal d'une station de radiodiffusion n'est amplifié que si la fréquence des circuits résonnants du récepteur est accordée à celle de l'onde porteuse. La réaction a lieu à température constante. En quelques heures, à partir de microquantités d'ADN équivalentes à quelques molécules, on voit se former suffisamment d'ADN amplifié pour être visible à l'œil nu en présence de colorants fluorescents (**figure 3**).

On peut aussi détecter l'ADN amplifié par « hybridation » spécifique avec une sonde marquée par un radioélément (**figure 4**).

L'amplification « *in situ* » est une application particulièrement intéressante de cette technique. On appelle amplification *in situ* une réaction de polymérisation en chaîne effectuée sur des cellules fixées sur une lame de microscope. On se sert par exemple de cette technique pour mettre en évidence des cellules infectées par des virus.

Malheureusement, il s'agit d'une technique délicate à mettre en œuvre : chauffées et refroidies alternativement à 0°C et à 95°C plusieurs dizaines de fois, les fragiles cellules fixées sur les lames ont tendance à se décoller et à se mettre à flotter dans le tampon d'amplification. Dans le cas où l'adhésion au verre est maintenue, les délicates structures cellulaires se déforment souvent sous l'effet de ce traitement qui tient plus de la cuisine à la vapeur que de la coloration microscopique classique. C'est dommage car l'amplification *in situ* est théoriquement une technique prometteuse. Colorer spécifiquement des cellules porteuses d'un virus particulier est un vieux rêve de microscopiste, et cela explique que de nombreuses équipes travaillent sans relâche dans le but d'améliorer les résultats.

L'amplification isotherme apporte un progrès de taille : on travaille à température constante, et cette température peut être réglée en agissant sur la longueur et la séquence des amorces. De plus, les produits de réaction sont des brins d'ADN de haut poids moléculaire, et ils ne diffusent pas au dehors des cellules positives, comme le font souvent les produits de PCR. Au lieu de cellules pâles entourées d'un halo, on peut



**Figure 4.** L'« hybridation » de l'ADN.

On ouvre les molécules double brin d'ADN par la chaleur ou par l'action d'une base forte : c'est la dénaturation. On fixe l'ADN simple brin sur une membrane de nitrocellulose. On place la membrane au contact d'une petite molécule d'ADN marquée par un isotope radioactif. Cette molécule, appelée « sonde », va se fixer spécifiquement sur les molécules d'ADN complémentaires. On appelle cette réaction l'« hybridation ».

La membrane est placée au contact d'une pellicule photographique. La pellicule est impressionnée aux endroits où la sonde s'est fixée.

s'attendre de façon reproductible à observer de belles cellules à la fluorescence nettement contrastée.

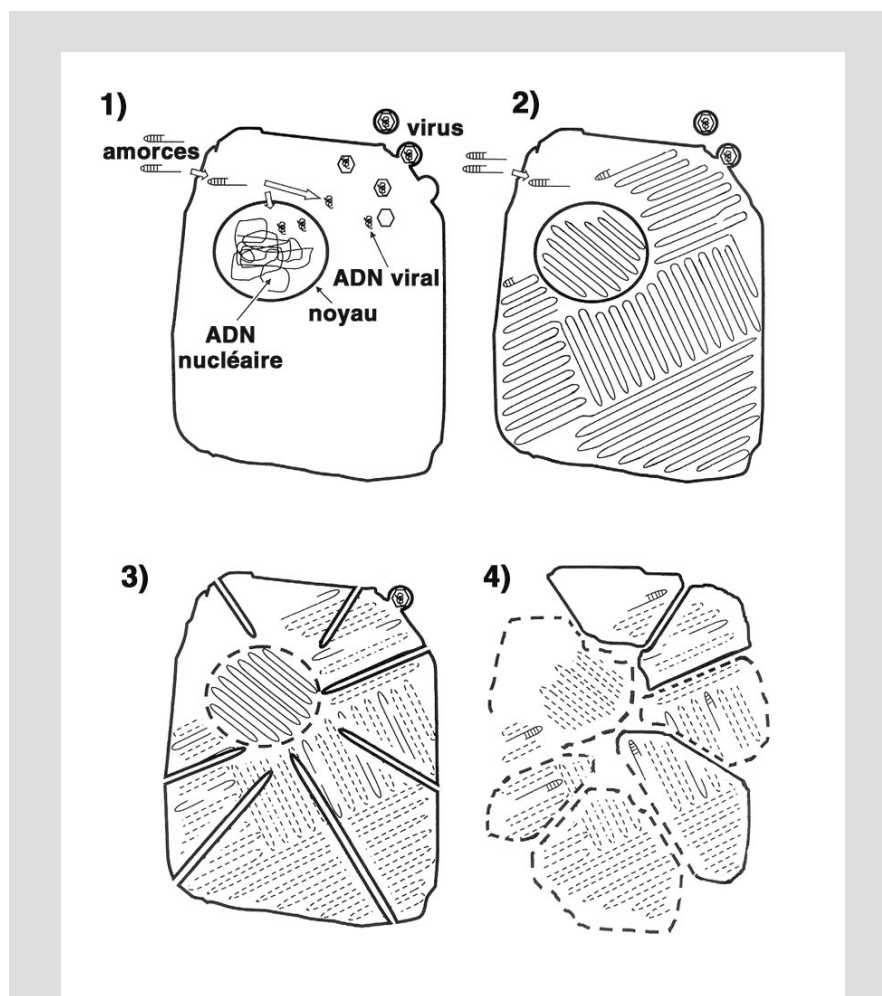
Concrètement, le mode opératoire est le suivant : après fixation et éventuellement une première coloration, les lames sont recouvertes d'une goutte de tampon contenant les quatre nucléotides triphosphates (dATP, dTTP, dGTP, dCPT), dont un nucléotide marqué avec une molécule fluorescente, une enzyme ADN polymérase thermostable, les ions nécessaires au bon déroulement de la réaction et quelques additifs éventuels. Des petites lentilles de plastique de la taille d'une lentille cornéenne sont placées sur les gouttes de façon à éviter l'évaporation de la solution. On chauffe brièvement deux fois à 95°C puis on place les lames sur une plaque métallique thermostatée, dans une enceinte saturée en vapeur d'eau. Au bout d'une heure environ, on remplace le tampon de réaction par un médium de montage, et l'on observe la lame dans un microscope à épifluorescence. On peut aussi éclairer directement la lame en utilisant une de ces nouvelles diodes électroluminescentes émettant dans l'ultraviolet. On place la diode au contact de la lame, éventuellement plongée dans le liquide d'immersion. On distingue les cellules positives, mais la qualité d'observation n'est pas optimale, comparée avec un véritable microscope à fluorescence. On observe à travers un filtre coloré de bande passante adaptée au fluorophore (filtre vert pour la fluorescéine).

A titre d'exemple, nous indiquons la séquence nucléotidique d'amorces destinées à mettre en évidence le virus du papillome humain de type 16. (HPV 16) dans les frottis gynécologiques :

Amorce 1. papillomavirus sont une



Amorce 2.



**Figure 5. Le mécanisme de l'apoptose contrôlée.**

1. Quelques amorces palindromiques pénètrent dans une cellule infectée par un virus en traversant la membrane plasmique.
2. Les amorces se lient spécifiquement à l'ADN viral. La réaction d'amplification s'enclenche : le noyau et le cytoplasme se remplissent d'ADN de haut poids moléculaire.
3. La cellule réagit en mettant en branle le processus d'apoptose, ou « suicide cellulaire » : l'ADN nucléaire et l'ADN amplifié sont clivés, la membrane nucléaire disparaît, les lysosomes se rompent, les organites se lysent, la cellule se fractionne. (Les lysosomes sont des poches remplies d'enzymes. On appelle organites des structures subcellulaires telles les mitochondries.)
4. Les débris cellulaires sont résorbés. Une partie de l'ADN, coupé au hasard en fragments de faible longueur, est relarguée dans le milieu intercellulaire. Parmi ces fragments, on retrouve statistiquement des amorces palindromiques semblables à celles de départ. Celles-ci peuvent initier la réaction dans d'autres cellules.

famille de virus provoquant notamment les divers types de verrues bénignes, ainsi que plusieurs affections dermatologiques. Certains sont à l'origine de cancers. Le virus HPV de type 16 est connu pour être l'une des principales causes du cancer du col de l'utérus. Chaque année, de nombreux frottis du col de l'utérus sont observés par les anatomopathologistes de façon à

↳ détecter les cellules cancéreuses ou bien les cellules en voie de cancérisation. L'expertise microscopique, délicate, prend en compte un certain nombre de paramètres et demande de l'expérience, car certains types de papillomavirus conduisent à des dysplasies cellulaires mais pas à une cancérisation. Réussir à colorer et à rendre spécifiquement fluorescentes les cellules infectées par un type donné de papillomavirus représente sans aucun doute un progrès important car cela permettra de détecter des cancers à un stade très précoce.

Autre application : dans les dispensaires de brousse, on recherche le parasite du paludisme dans le sang par observation microscopique directe d'une goutte de sang. En cas de faible infestation, il est malheureusement possible de passer à côté d'un diagnostic. L'amplification isotherme *in situ* rendra possible l'identification des

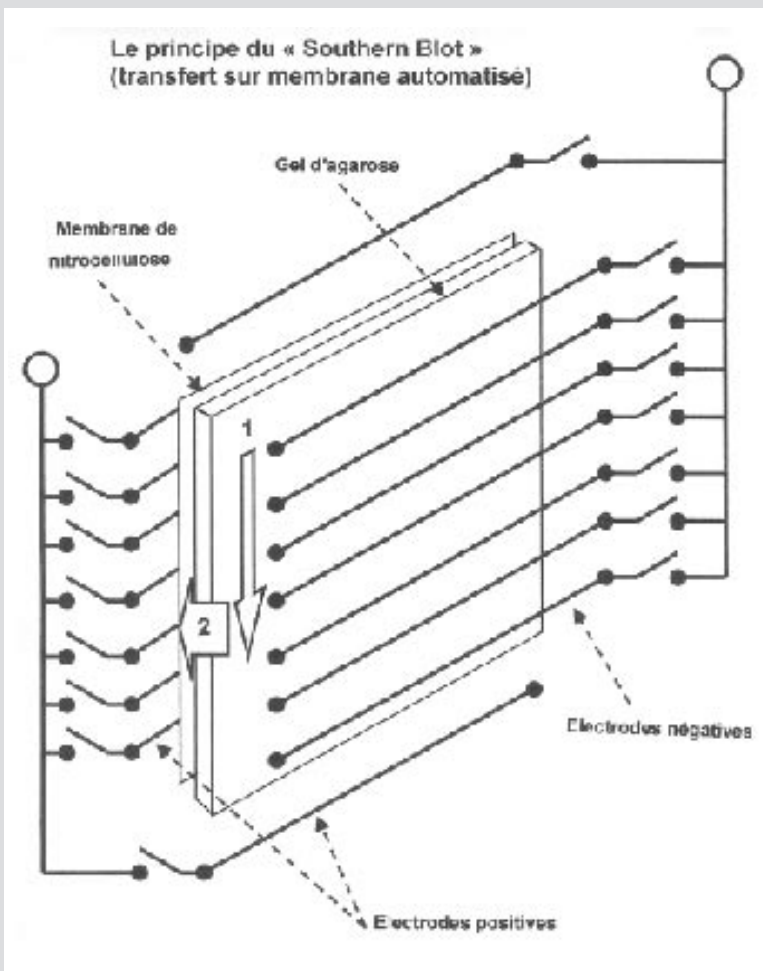
rare parasites présents dans le sang de certains malades en les rendant fluorescents.

## L'apoptose contrôlée

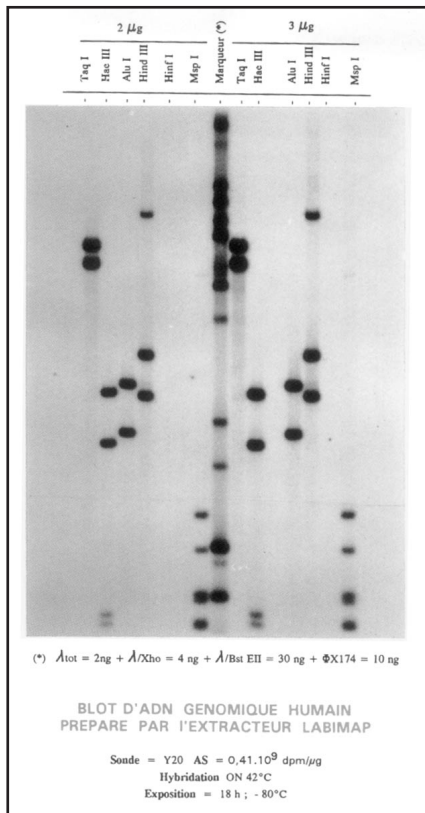
De façon surprenante, les chercheurs de Labimap ont observé que la réaction, une fois amorcée, se poursuivait à température ambiante, dans des tubes oubliés sur un coin de paille. Dans ce cas, pourquoi ne pas essayer d'initier la réaction dans des cellules vivantes ? En effet, tous les réactifs nécessaires à la réaction sont naturellement présents dans une cellule vivante : enzymes ADN polymérase, nucléotides triphosphates, enzymes modifiant la topologie de l'ADN, enzyme ouvrant les doubles hélices d'ADN et protéines stabilisant les molécules monocaténares d'ADN. Il manque juste les amorces.

Il existe des techniques qui permettent à des molécules d'ADN de traverser les membranes cellulaires. En théorie, si un nombre suffisant d'amorces pénètrent dans la cellule, la polymérisation de l'ADN peut se déclencher. Dirigée contre l'ADN d'un virus, la réaction remplirait le cytoplasme des cellules infectées avec de l'ADN amplifié, ceci en peu de temps. Il est probable que le résultat de cette « amplification *in vivo* » sera la mort de la cellule, par initiation des processus d'apoptose. (L'apoptose est un « suicide » cellulaire programmé qui a lieu dans certaines circonstances précises de dysfonctionnement de la cellule, par exemple pour enrayer la croissance de cellules cancéreuses. Malheureusement, l'apoptose devient dans certains cas un processus pathologique, comme dans le cas de la maladie d'Alzheimer, **figure 5**).

Cette réaction de polymérisation autonome d'acides nucléiques et d'apoptose contrôlée mimerait en



**Figure 6.** Le Multiblottter, un robot à faire les empreintes génétiques. Le Multiblottter utilisé par les chercheurs du Genethon sépare tout d'abord les molécules d'ADN par leur taille grâce à une électrophorèse verticale (1). Déposées par un bras robot sur un gel d'agarose contenu dans une cassette, les molécules d'ADN contenues dans les échantillons sont entraînées par un champ électrique. Les petites molécules migrent rapidement vers l'électrode positive, les longues molécules restent en haut du gel. De façon à pouvoir les soumettre facilement à une série de tests, les molécules d'ADN sont automatiquement fixées dès la fin de la première électrophorèse. Une seconde migration électrophorétique (2) horizontale cette fois-ci, entraîne les molécules sur une membrane de nitrocellulose où elles s'accrochent. Une série de relais isole alternativement les électrodes horizontales et verticales, de façon à obtenir un champ homogène. La membrane de nitrocellulose, traitée par les réactifs convenables laisse apparaître une série de bandes horizontales qui évoquent les fameux « codes-barres ». Il s'agit des empreintes génétiques de l'organisme d'où proviennent les échantillons. Ces empreintes sont utilisées par la justice, mais aussi par la médecine et l'agriculture.



**Blot d'ADN génomique humain préparé par l'extracteur Labimap, conçu par une filiale de la société Bertin.**

quelque sorte l'immunité à médiation cellulaire. On sait que cette immunité, due aux cellules tueuses qui détruisent les cellules infectées (lymphocytes T), est fortement altérée dans le cas du SIDA. Rappelons qu'il y a environ 30 millions de personnes infectées par le VIH dans le monde et que 16 000 personnes sont contaminées chaque jour.<sup>3</sup> La grande majorité de celles-ci n'a pas accès aux médicaments antiviraux, en raison de leur prix. Le coût des amorces palindromiques de la méthode décrite ici est extrêmement faible, et l'industrialisation de la production de ces oligonucléotides ne poserait aucun problème. Est-il besoin d'ajouter que les molécules d'ADN sont des produits biologiques parfaitement tolérés par voie injectable, ne donnant qu'une faible réponse immunitaire chez certains individus.

Les bactéries, ou bien les cellules parasitaires, pourraient elles-mêmes constituer les cibles d'une telle réaction spécifique d'amplification *in vivo*. Les médicaments disponi-

bles à l'heure actuelle font face à des phénomènes de résistance de plus en plus marqués (c'est le cas du paludisme, par exemple), ou bien sont chers ou d'usage délicat (trypanosomiases, échinococcose). Par ailleurs, certaines bactéries comme *Bacillus anthracis* peuvent être l'objet de modifications destinées à les rendre résistantes à la majorité des familles d'antibiotiques connues. Une nouvelle classe d'agents thérapeutiques basée sur un principe totalement nouveau serait la bienvenue.

La publication de cette nouvelle méthode n'a entraîné pour le moment qu'un intérêt modéré de la part de ses utilisateurs potentiels. Il faut espérer que cette découverte ne subira pas le sort des antibiotiques. Rappelons-nous que la description de l'antagonisme entre le pénicillium (la moisissure qui produit la pénicilline) et les bactéries date de 1897 ! Cette année-là, Ernest Duchesne, étudiant en médecine à l'École de Santé Militaire de Lyon en avait fait son sujet de thèse. L'idée de combattre les microbes responsables des infections qui décimaient le genre humain avec des extraits de moisissures dépassait l'entendement des sommités médicales de l'époque et le pauvre Duchesne, devenu médecin militaire, devra renoncer à ses chimères : envoyé exercer dans un hôpital de garnison, il ne tarda pas à mourir de la tuberculose. Sa thèse restera des années à se couvrir de poussière sur un rayonnage de bibliothèque. Il faudra attendre plus de vingt ans pour que Fleming retrouve par hasard la découverte de Duchesne. Il publiera soigneusement ses observations et s'empressera de passer à un autre sujet de recherche. Pour lui, cette observation intrigante ne pouvait être qu'une curiosité de laboratoire. Décidément, l'idée avait du mal à s'imposer... Nouvelle éclipse de trente années pour les antibiotiques. Il faudra toute l'énergie d'un jeune français parti étudier aux Etats-Unis, René Dubos, pour sortir de l'oubli ces merveilleuses substances. René Dubos, chercheur à l'Institut Rockefeller, fit l'hypothèse audacieuse qu'il devait exister dans le sol des bactéries capable de contrôler la croissance des autres espèces bactériennes. A intervalles réguliers, il « nourrit » de nombreux échantillons de terre avec des staphylocoques. Il décrira en 1938 un

principe soluble dans l'alcool extrait de souches de bactéries du sol. Ce composé était capable d'agir sur les infections bactériennes frappant des animaux. C'est ainsi que les premiers antibiotiques volontairement recherchés furent mis en évidence, en partant d'une hypothèse de travail et non d'une pratique empiriste : ils furent appelés tyrocidine et gramicidine. Suivant son exemple, Florey, l'assistant de Fleming, se remettait au travail sur le pénicillium. Dès la fin des années 40, les antibiotiques bouleversaient la thérapeutique et sauvaient des millions de personnes chaque année. La prophétie de Louis Pasteur s'était réalisée : « *Le temps viendra où l'on pourra utiliser les microbes inoffensifs pour lutter contre les microbes nuisibles.* » Il est dommage qu'il ait fallu plus de soixante-dix ans entre la première découverte et l'utilisation massive de ces substances miraculeuses dans tous les hôpitaux. Bienfaiteur de l'humanité, Dubos est bien oublié aujourd'hui dans son pays natal. Il est vrai que sa conception de l'écologie était aux antipodes du malthusianisme « politiquement correct » qui prévaut aujourd'hui : « *La Terre a besoin des hommes* » n'était-elle pas sa maxime préférée ?

A l'aube du troisième millénaire, nous sommes aussi démunis contre les virus que les médecins du début du siècle dernier l'étaient contre le bacille de Koch. Des millions de personnes sont abandonnées dans le tiers monde aux ravages du SIDA et des parasitoses.

Les palindromes permettront-ils de lutter contre les agents pathogènes résistants aux traitements traditionnels ? Si cet espoir se concrétisait, ce serait une belle contribution de la poésie classique à la biologie et à la médecine. ■

#### Références

- 1) Mullis K.B., Faloona F.A., *Methods in Enzymology*, vol. 155, Academic Press, San Diego, 1987, pp. 335-350.
- 2) David F., Turlette E., *C. R. Acad. Sci. Paris, Life Science* 1998, 321, pp. 909-914.
- 3) Entretien avec J.-C. Chermann, *Fusion*, Paris, 1998, n°71, pp. 56-60.