

Programme

- 09h30 Introduction**
Moncef GUENOUNOU, *E.S.A.BIO.*, Paris La Défense
- 09h30 – 10h00 Redécouvrir la cytométrie**
Philippe MÉTÉZEAU, Institut Pasteur, Paris
- 10h00 – 10h30 La cytométrie : Comment ça marche ? A quoi ça sert ?**
Marie-Hélène RATINAUD, Université de Limoges
- 10h30 – 11h00 Le tri de semences animales, intérêts et limites**
Stéphane SERMADIRAS, MÊTiS Biotechnologies, Limoges
- 11h00 – 11h30 Pause café**
- 11h30 – 12h00 Cytométrie en biologie végétales : De la biologie cellulaire à la biodiversité, en passant par le criblage de ploïdie en amélioration végétale**
Spencer BROWN, CNRS, Gif sur Yvette
- 12h00 – 12h30 Analyse des surnageant cellulaires par cytométrie : Exemple du dosage des cytokines**
Vanessa AUVRAY, Clinisciences, Paris
- 12h30 – 14h00 Déjeuner**
- 14h00 – 14h30 Amplification génétique isotherme et cytométrie de flux**
Fabrice DAVID, Laboratoire de Recherches Associatives, Franconville
- 14h30 – 15h00 Sondes et banques génomiques : les possibilités de la cytométrie**
Mustapha BENZAADA, UpGen, Montpellier
- 15h00 – 15h30 Pause café**
- 15h30 – 16h00 Applications de la cytométrie à l'industrie agroalimentaire et l'analyse de l'eau**
Vincent CARRE, MÊTiS Biotechnologies, Limoges
- 16h00 – 16h30 La cytométrie en flux : Un outil de choix pour la découverte et l'étude des molécules anticancéreuses**
Stéphane LÉONCE, Institut de Recherches Servier, Suresnes
- 16h30 – 17h00 Discussion et conclusion**

Amplification génétique isotherme et cytométrie de flux.

Fabrice DAVID

Membre de la Société Française de Physiologie Intégrative.

L.R.A. Boite postale
F95131 FRANCONVILLE cedex

Introduction

D'utilisation courante dans les laboratoires de recherche et de biologie médicale, les techniques d'amplification génique classiques (PCR, NASBA, TAS) sont plus délicates à mettre en œuvre sur les cellules entières, par exemple sur les lames de microscopes (amplification in situ).

La PCR et les techniques classiques sont impossibles à effectuer sur les cellules en suspension, notamment en raison des étapes de chauffage à haute température qui altèrent l'intégrité cellulaire.

Nous décrivons ici une proposition d'application d'une méthode d'amplification isotherme à la détection des cellules infectées par un virus dans des prélèvements sanguins. L'identification des cellules positives s'effectue par cytométrie de flux et permet un suivi de l'infection dans les différents types cellulaires.

Matériels et méthodes.

Nous avons décrit une technique d'amplification génique fonctionnant in vitro dans des conditions isothermes. Nous l'avons appliquée à la détection du virus HIV dans le sérum. (1) Les résultats sont comparables à la PCR en termes de sensibilité.

Une des clefs de cette technique réside dans l'utilisation d'amorces d'ADN comportant une séquence spécifique du DNA cible, ainsi qu'une séquence palindromique pouvant former une structure en « épingle à cheveux ». (Figure 2) La réaction donne lieu à une amplification de la séquence cible en nombre et en taille, conduisant à la formation de

nombreux brins de haut poids moléculaire. Lors d'une électrophorèse sur gel, cet ADN reste bloqué en haut des puits. (Figure 3)

Selon les préceptes de la Physiologie Intégrative, les organismes vivants sont organisés fonctionnellement en compartiments hiérarchisés emboîtés les uns dans les autres, qui échangent de l'information ou bien de la matière entre eux. Le nombre de niveaux de compartimentation étant fini, il est possible de théoriser l'action de la variation d'un paramètre physiologique sur l'ensemble des autres. (2)

Dans l'application ci-dessous, on ne considère que la traversée de deux discontinuités par un réactif (membrane cellulaire et pores de la paroi nucléaire), mais la méthode est générale et susceptible d'applications plus complexes. Cette manière de concevoir les Sciences du Vivant a l'avantage de conduire à une biologie prédictive, et non plus principalement empiriste.

Nous formons l'hypothèse que les enzymes de réplication et de transcription, ainsi que les autres protéines se fixant à l'ADN dans une cellule vivante peuvent initier la réaction dans une cellule, à la condition que quelques amorces réussissent à passer la barrière de la membrane cellulaire, ainsi que les pores nucléaires. (In vitro, deux brèves étapes de chauffage à 95°C sont nécessaires pour faire démarrer la réaction. La température de réaction idéale est relativement élevée, mais nous avons vérifié que la réaction avait lieu dès 20°C.)

On peut éventuellement inclure les amorces dans des liposomes (traitement à la lipofectamine)

La réaction attendue est détaillée sur la figure 1 :

On incube tout d'abord les cellules avec une solution contenant une quantité suffisante des amorces 1 et 2, et contenant éventuellement les quatre nucléotides triphosphates. Si les cellules sont mortes, la concentration des réactifs peut être augmentée. (Figure 1 a)

L'amorce 1 vient s'intercaler au niveau de la séquence cible et les enzymes de réplication présentes dans la cellule vont commencer l'élongation, en déplaçant l'autre brin. (Figure 1 b et 1 c)

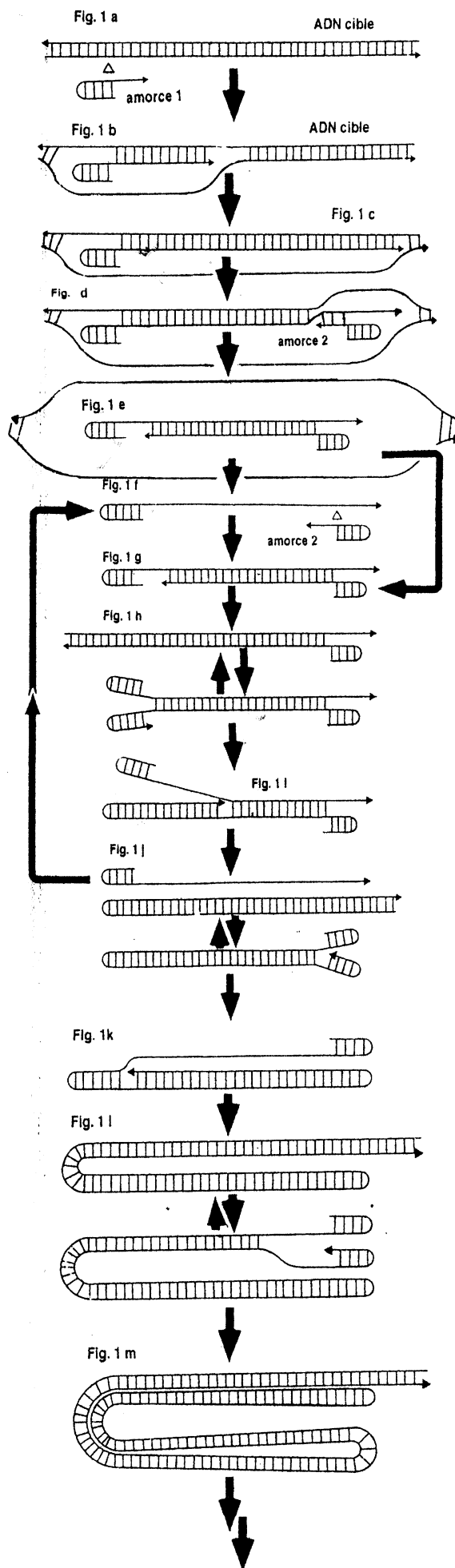


Figure 1. Détail de la réaction.

L'amorce 2 vient se fixer sur le brin néosynthétisé et les enzymes cellulaires vont commencer l'élongation en sens inverse. (Figure d)

Lorsque la fourche de réplication atteint la partie palindromique de l'amorce 1, le double brin néosynthétisé se détache spontanément. (Figure 1 e). L'ADN cible redevient disponible pour une nouvelle fixation de nouvelles amorces de type 1 et 2.

La réplication de l'ADN s'achève sur le brin néosynthétisé : la séquence palindromique s'ouvre, et est recopiée. (Figures 1 g et 1 h) Ce brin, copie de l'ADN cible, pourrait fixer lui aussi une amorce de type 1, mais il va subir une évolution encore plus rapide : la forme linéaire va s'équilibrer spontanément avec une forme en double épingle à cheveux, puisque l'extrémité est palindromique. (Figure 1 h) La forme linéaire est plus stable, mais l'équilibre va être déplacé : en effet, une des épingle à cheveux possède une extrémité 3' libre, laquelle peut servir d'amorce à une nouvelle réaction de réplication.

L'ADN s'allonge dans le sens 5' vers 3'. (Figure 1 i)

Lorsque la fourche de réplication atteint la partie palindromique, un brin se détache spontanément. (Figure 1 j). Dans le même temps, la partie palindromique s'ouvre et est recopiée.

Le brin qui s'est détaché donne lieu à un nouveau cycle de réplication qui commence à la figure 1 f : en effet, ce brin monocaténaire va fixer rapidement une amorce de type 2, et la réaction va continuer pour un nouveau cycle.

Revenons au brin bicaténaire de la figure 1 j : lui aussi va subir la réaction équilibrée suivante :

forme linéaire \longleftrightarrow forme en double épingle à cheveux

Cette dernière forme bifibulaire permet à la réaction de réplication de s'enclencher de nouveau sur l'extrémité 3'. (Figure 1 k)

La réaction se poursuit jusqu'à que l'ADN double de longueur. (Figure 1 l), et une nouvelle réaction équilibrée a lieu entre la forme linéaire et bifilubaire.

