

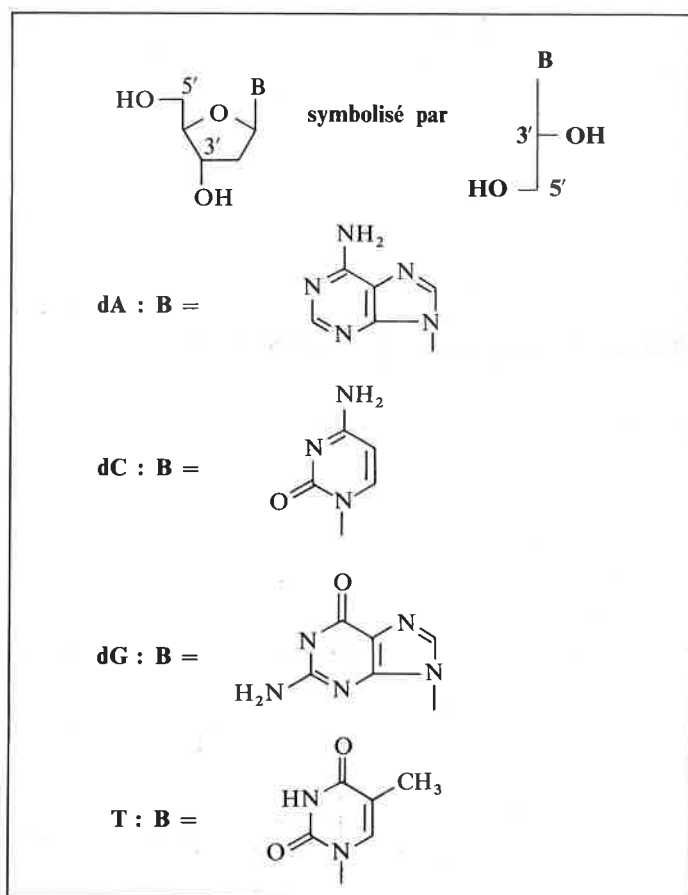
Vers l'automatisation de la synthèse de fragments d'ADN

par **Christophe Morin**

(City of Hope Research Center, Department of Molecular Genetics, 1450 East Duarte Road, Duarte Cal 91010, USA *.)

Il est un domaine dans lequel la chimie organique connaît actuellement une grande richesse d'applications : c'est celui de la synthèse d'oligonucléotides, c'est-à-dire de fragments d'ADN ou d'ARN.

En effet, la construction de séquences définies a permis, en série ADN, d'abord l'élucidation du code génétique, puis la synthèse de fragments de gènes proprement dits codant par exemple, pour la fabrication de la somatostatine, de l'hormone de croissance ou de l'insuline (équipe d'Itakura) et, en série ARN, la synthèse d'ARN_s de transfert (équipes de Khorana et de Ikehara). On peut ainsi utiliser les oligonucléotides de synthèse chaque fois qu'une courte séquence (comportant en général entre 10 et 30 nucléotides) est désirée. Celle-ci peut alors être insérée à la place d'un fragment existant (mutation



Les quatre lettres de l'alphabet de l'ADN

* Adresse actuelle : Unité de chimie organique, Institut Pasteur, 28, rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15.

dirigée) ou simplement ajoutée, par exemple, à de l'ADN extrachromosomal d'une bactérie (plasmide) pour faire fabriquer par cette dernière de « nouveaux » peptides. Ces oligonucléotides de synthèse peuvent également être hybridés (ils ont alors des séquences complémentaires) à de l'ADN ou de l'ARN pour en permettre l'isolement (sondes à ARN messager), la reconnaissance (screening après clonage) ou la détermination de leur séquence complète (1).

Le problème posé par la synthèse d'un fragment donné se pose formellement de manière simple : les quatre lettres de l'« alphabet de l'ADN » (voir encadré), soit la désoxy-2' adénosine (dA), la désoxy-2' cytidine (dC), la désoxy-2' guanosine (dG) et la thymidine (T), doivent être assemblées dans l'ordre déterminé par la séquence à établir, et ce de manière univoque. (Le processus est le même en série ARN mais les progrès ont été plus difficiles en raison de la présence d'un groupe hydroxyle en position 2', c'est-à-dire sur le sucre). En pratique, la construction de ces séquences se pose au chimiste de manière compliquée : les réactions doivent être spécifiques (choix des groupes protecteurs) et les rendements des réactions bons, les synthèses comportant un nombre important d'étapes. La première opération consiste à protéger, lorsqu'elle peut réagir par la suite, la fonction aminée portée par la base, puis

à différencier les deux fonctions alcools de la partie sucre (l'une, primaire en 5', l'autre secondaire en 3') afin de permettre une réaction univoque de phosphorylation (schéma 1). Les mononucléotides ainsi obtenus vont alors pouvoir être assemblés entre eux par un groupement phosphate entre la position 3' de l'un et la position 5' de l'autre pour former d'abord des dinucléotides puis des trinucléotides (schéma 2). Le choix des différents groupes protecteurs R, R' et R'', ainsi que des conditions propres au couplage (agent phosphorylant, agent de couplage) a reçu des solutions générales (2, 3) bien que chacune des équipes engagées dans de telles synthèses ait souvent ses propres préférences.

Le premier progrès majeur vers l'efficacité et la rapidité des synthèses a été l'utilisation, maintenant généralement adoptée, de la méthode au triester dans laquelle les trois fonctions du groupement phosphate sont estérifiées, au contraire de la méthode au diester dans laquelle une fonction phosphate est libre, donc sous forme d'acide (R'' = H). Ceci présente en effet le gros avantage de permettre, pour des questions de solubilité, l'utilisation des solvants organiques et d'aboutir rapidement avec de très bons rendements à des nucléotides faciles à isoler.

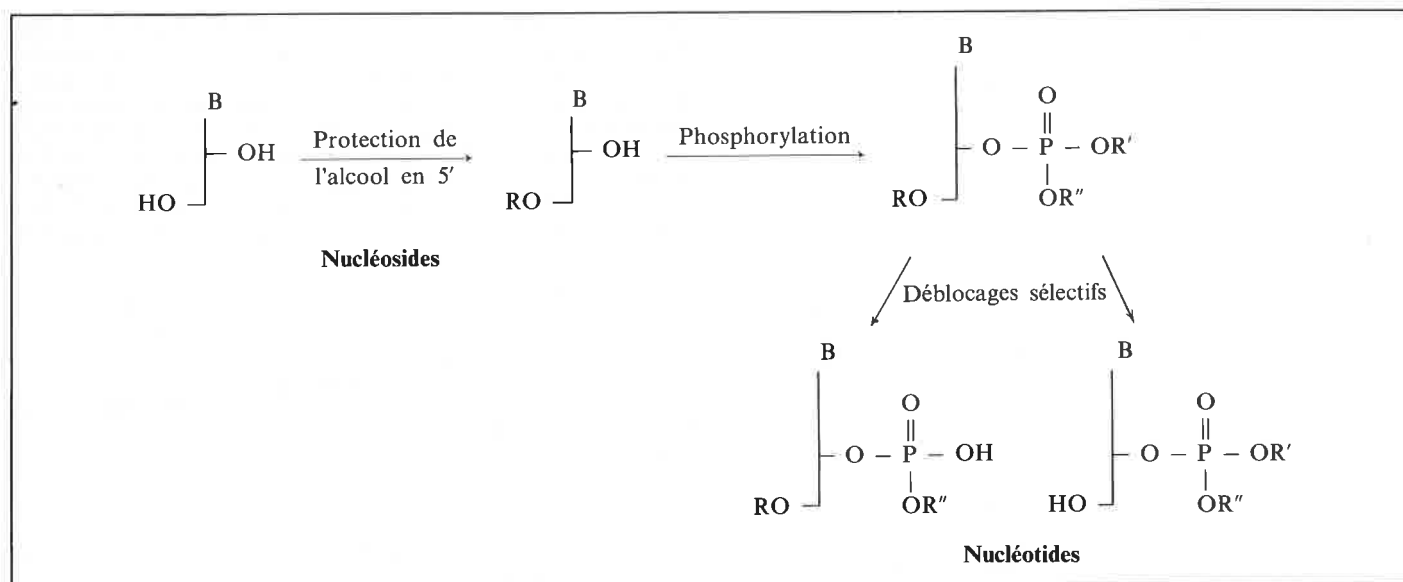


Schéma 1. Préparation des unités de base

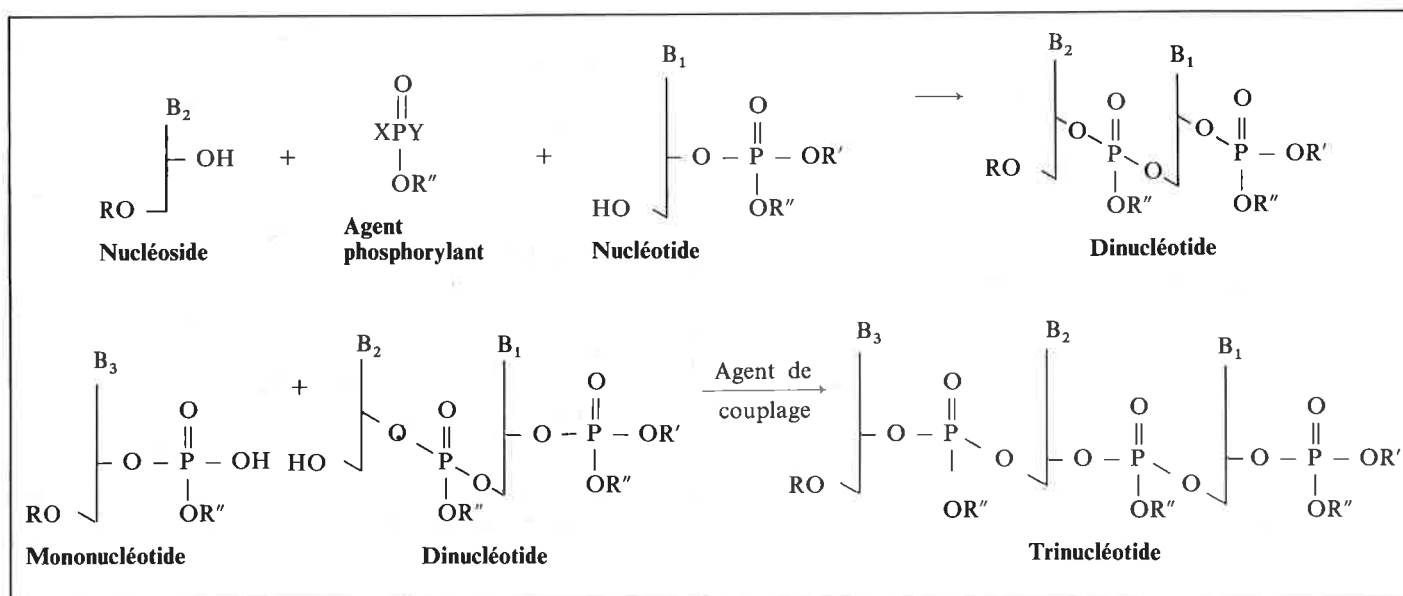


Schéma 2. Exemples de formation de blocs di- ou trinucleotides

La deuxième étape importante a consisté à effectuer la construction des séquences par l'assemblage des blocs de deux ou trois nucléotides (au lieu de les ajouter un par un); les réactions sont rapides, les rendements bons et la séparation des oligonucléotides, obtenus en fin de synthèse, beaucoup plus facile alors qu'elle commençait à devenir problématique lorsque les séquences comportaient plus d'une vingtaine de nucléotides (il est, en effet, plus facile de séparer, par exemple, une séquence de 24 nucléotides de long en présence de seulement une séquence de 21 nucléotides qu'en présence de séquences de 21, 22 et 23 nucléotides).

Le troisième facteur enregistré ces dernières années, qui a maintenant permis d'envisager de manière sérieuse l'automatisation, a été l'introduction de la synthèse en phase solide, c'est-à-dire sur un support qui est un polymère (et non plus en phase liquide homogène). Le principe général de cette synthèse (schéma 3) consiste à greffer le premier nucléoside sur un polymère et à ajouter les blocs de 2 ou 3 nucléotides au fur et à mesure. Ainsi, à n'importe quel stade de la synthèse, le produit désiré (c'est-à-dire la chaîne des oligonucléotides) est toujours lié chimiquement au support solide et l'on peut ainsi éliminer par simple filtration et lavages les excès de réactifs et d'agent de couplage. Ce principe de synthèse sur phase solide, semblable à celui bien connu de la synthèse polypeptidique selon Merrifield, avait déjà été précédemment envisagé pour la préparation des oligonucléotides sans que cela aboutisse toutefois à une exploitation de la méthode; le choix de la

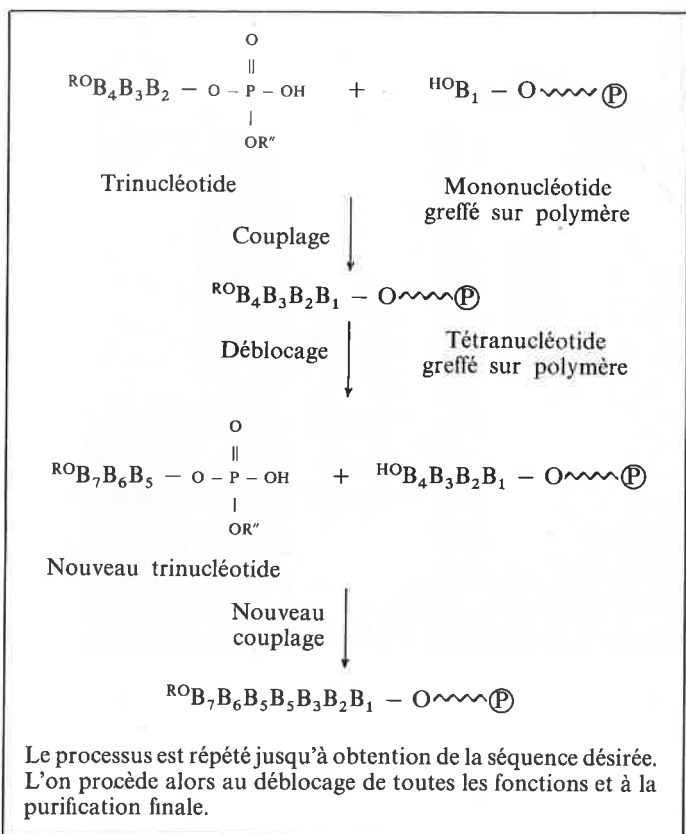


Schéma 3. Synthèse d'oligonucléotides sur polymère

Les blocs précédemment préparés peuvent être successivement condensés avec la fonction alcool terminale des nucléotides greffés sur polymère. La chaîne ainsi obtenue croît avec chaque nouvelle addition jusqu'à obtention de la longueur désirée; l'ordre des bases est bien sûr déterminé par la séquence à synthétiser.



Synthétiseur d'oligonucléotides

Premier appareil à apparaître sur le marché, le synthétiseur d'oligonucléotides Model 280 de Vega; de gauche à droite : imprimante et mémoire, puis (marqué d'une flèche) le réacteur et le dispositif d'introduction des réactifs, enfin le terminal.

phase solide est en effet de première importance : compatibilité avec les conditions de réactions (solvants, réactifs), réversibilité de l'adsorption et accessibilité des sites quelle que soit la longueur de la chaîne des nucléotides. Mais, l'on assiste maintenant, depuis quelque temps, à un regain d'activités dans ce domaine avec des résultats beaucoup plus prometteurs. Ainsi, par exemple, les travaux récents de l'équipe d'Itakura (4, 5) ont permis par la conjonction des trois progrès : méthode au triester, couplages par blocs et assemblage sur polymère, de sélectionner des conditions adaptées à la synthèse rapide d'oligonucléotides, les réactions s'effectuant avec de bons rendements et à température ordinaire; les seules opérations mécaniques consistent en l'introduction des solvants et réactifs, agitation et lavages.

L'on conçoit alors aisément que l'on puisse maintenant procéder à l'automatisation (5) des synthèses : plusieurs équipes de pointe travaillent activement en ce sens et l'on assiste, parallèlement, à l'apparition sur le marché de synthétiseurs d'oligonucléotides. Il est tout à fait clair maintenant que ces derniers vont acquérir une place de choix.

Bibliographie

- (1) R. Wu, C. P. Bahl et S. A. Narang, *Progr. Nucl. Acid. Res.*, 1978, **21**, 101.
- (2) C. B. Reese, *Tetrahedron Report n° 56*, *Tetrahedron*, 1978, **34**, 3143.
- (3) M. Ikehara, E. Ohtsuka et A. F. Markham, *Adv. Carbo. Chem. Biochem.*, 1979, **36**, 135.
- (4) K. Miyoshi et K. Itakura, *Tetrahedron Letters*, 1979, p. 3635.
- (5) K. Itakura et coll., à paraître.