

PRIX NOBEL DE CHIMIE 1993

NOBEL 93

Les grandes avancées technologiques au service de l'étude des gènes

Kary B. Mullis et Michael Smith

Kary B. Mullis, né le 28 décembre 1944 à Lenoir (Caroline du Nord, USA), a mené les travaux de mise au point de la méthode PCR qui lui valent le prix Nobel aujourd'hui entre 1979 et 1988 dans la Société Cetus, à Emeryville (Californie, USA). Il dirige depuis 1988 la société Xytronyx Inc. à San Diego (Californie, USA).

Michael Smith, né le 16 avril 1932 à Blackpool (Grande-Bretagne), est devenu citoyen canadien et dirige le département de biochimie de l'université de Colombie Britannique de Vancouver (Canada). Il est l'initiateur de la mutagenèse dirigée.

Il n'est pas nécessaire d'être un lecteur assidu de médecine sciences pour savoir quels progrès l'analyse génétique a fait faire à l'ensemble des disciplines biologiques et médicales au cours des trente dernières années. Chaque année menant vers le décryptage du génome a valu à leurs auteurs le couronnement par l'académie Nobel, en 1958 à G.W. Beadle et E.L. Tatum pour avoir découvert que les gènes agissent en contrôlant des événements chimiques précis, et à J. Lederberg pour ses découvertes sur la recombinaison génétique et l'organisation du matériel génétique chez les bactéries, à S. Ochoa et A. Kornberg en 1959 pour leurs travaux sur la biosynthèse des acides nucléiques, suivis en 1962 par F. Crick, J. Watson et M. Wilkins pour leur description de la structure en double hélice des acides nucléiques. Puis ce sera l'étude du contrôle génétique de la

synthèse des protéines qui vaudra le prix Nobel à F. Jacob, A. Lwoff et J. Monod en 1965. En 1968 B.G. Khorana, R.W. Holley et M.W. Nirenberg auront le prix pour leurs travaux sur le code génétique et sa fonction dans la synthèse des protéines. En 1983 B. McClintock est récompensée pour son travail sur les gènes sauteurs. Les avancées techniques vont aussi être saluées : la coupure des gènes par les enzymes de restriction en 1978 (W. Arber, D. Nathans, H. Smith, prix Nobel de chimie), le séquençage des gènes en 1981 (W. Gilbert, F. Sanger, P. Berg, prix Nobel de chimie), aujourd'hui K.B. Mullis pour l'amplification des gènes (PCR) et M. Smith pour la mutagenèse dirigée.

Kary B. Mullis dit avoir eu l'intuition de la PCR (*polymerase chain reaction*) un soir de l'année 1983 alors qu'il circulait sur une autoroute américaine, seul dans son véhicule. A dire vrai, le principe de la PCR peut difficilement être considéré comme une révolution conceptuelle : ni la progression exponentielle d'une fonction 2^n , ni l'extension d'amorces hybridées à de l'ADN double brin dénaturé n'étaient originales. D'ailleurs, H.G. Khorana dit avoir décrit le principe de cette méthode et les conséquences de son utilisation dans son cahier de laboratoire plusieurs années auparavant. Il n'empêche qu'il ne suffit pas que toutes les bases matérielles et conceptuelles d'une invention préexistent pour que celle-ci soit faite : l'inventeur se contente sou-

vent de réarranger des éléments de la réalité préexistante pour réaliser son invention. Effectivement, avant l'article de Randall K. Saiki *et al.*, cosigné par sept auteurs dont Kary B. Mullis est le quatrième [1], l'amplification par réaction en chaîne de polymérisation n'existait pas. L'objectivité oblige à dire que cette technique serait probablement restée d'utilisation assez confidentielle si n'étaient pas très rapidement apparus les outils qui lui donnèrent toute sa puissance, avant tout une ADN polymérase thermostable. En effet, il fallait à l'origine rajouter de l'ADN polymérase thermosensible d'*E. coli* à chaque cycle de polymérisation, cette dernière étant détruite par la dénaturation thermique nécessaire à la fusion des brins d'ADN nouvellement synthétisés. Le deuxième temps fort de l'invention fut donc la purification et l'utilisation d'ADN polymérase thermostable, dont la première fut celle de *Thermus aquaticus* (Taq polymérase) [2]. Ce fut alors l'extraordinaire explosion de la PCR, rendant accessibles, rapidement et pratiquement par chacun, des techniques qui restaient auparavant l'apanage de laboratoires hautement spécialisés de biologie moléculaire (*m/s* n° 8, vol. 4, p. 515). La PCR n'a d'ailleurs pas engendré que de considérables progrès dans tous les domaines de la génétique moléculaire et de ses applications à l'étude génétique des êtres vivants ; elle a aussi fait naître un grand mythe... et à contribué, pour les naïfs, à en détruire un autre. La

possibilité d'amplifier de l'ADN fossile, notamment d'insectes vieux de 130 millions d'années, englobés dans des petits blocs d'ambre (*m/s n° 8-9, vol. 9, p. 985*), est à la base du mythe de la recréation *de novo* des vies anciennes tel qu'il explose aujourd'hui sur les écrans cinématographiques du monde entier dans le film *Jurassic Park* de Stephen Spielberg. Quant aux illusions perdues, elles sont celles du caractère toujours désintéressé de la science. Kary B. Mullis a, dès l'origine, travaillé dans des sociétés biotechnologiques privées, et la découverte de la PCR ainsi que la première utilisation de l'ADN polymérase thermostable sont des réalisations de la société Cetus. Tout cela a été breveté et, depuis 1991, les droits du brevet ont été vendus à un géant international des biotechnologies (Hoffmann-La Roche). Ce dernier a bien l'intention de faire valoir tous ses droits à la perception de redevances pour toutes utilisations de la PCR dans le circuit économique, et d'attaquer pour contrefaçon tous les laboratoires ayant, sans contracter de licence préalable, produit des appareils ou des enzymes permettant de réaliser cette réaction. Ainsi, dans le coût de tout test génétique pratiqué demain retrouverait-on, outre ce qui correspond aux produits et matériels utilisés et à la rémunération du laboratoire, les redevances correspondant aux brevets sur la PCR, ainsi que, dans la plupart des cas, aux brevets sur le gène faisant l'objet du test génétique.

Les travaux qui ont valu à Michael Smith le Prix Nobel remontent, quant à eux, à 1981 et ont été bien présentés dans leur forme initiale dans un article de *Trends in Biochemical Sciences*, de décembre 1982 [3], puis revus dans un volume de *Annual Review of Genetics* en 1985 [4]. Michael Smith a montré que l'on pouvait créer des mutations à volonté sur un brin d'ADN en utilisant comme amorce d'une réaction d'élongation de chaîne un oligonucléotide comportant un ou plusieurs appariements de bases défectueux. Malgré ces mauvais appariements, l'oligonucléotide peut encore hybrider dans certaines conditions à la séquence initiale complémentaire, et il suffit alors de l'allonger par une ADN polymérase pour, dans le cas d'un ADN circulaire (par exemple, un fragment cloné dans un plasmide), recopier un gène entier ne différant du gène d'origine qu'au niveau des nucléotides qui ont été sciemment modifiés. La mutagenèse dirigée a une importance considérable dans l'analyse des relations structure/fonction des gènes. Elle permet de rendre compatibles des codes génétiques légèrement différents (par exemple mitochondrial et nucléaire), de modifier de manière dirigée telle ou telle propriété d'un gène et de la protéine pour laquelle il code..., etc. Par conséquent, cette méthode est, elle aussi, l'une de celles méritant d'être rangées dans l'arsenal des outils essentiels du généticien moléculaire des temps modernes. D'ailleurs, la facilité d'obtention de polynucléo-

tides mutants par des procédés du type de ceux décrits par Michael Smith s'est considérablement accrue grâce à l'utilisation de la PCR. Peut-être, cependant, la PCR sera-t-elle, par elle-même, une cause de dépérissement partiel de la méthode de mutagenèse *in vitro* dans le futur : l'ensemble des techniques d'évolution moléculaire dirigée, décrites, par exemple, par les laboratoires de Jack W. Szostak et Gerald F. Joyce [5, 6], permettent, en effet, de remplacer la mutagenèse dirigée par la sélection, à partir d'une multitude de polynucléotides, de celui qui possède les propriétés recherchées. Faisons le pari que ce sont là des noms et un thème dont on reparlera à l'occasion de prochains prix Nobel.

Axel Kahn
Élisabeth Bursaux

1. Saiki RS, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of β -Globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985 ; 230 : 1350-4.
2. Saiki RS, Gelfand DH, Stoffel F, Schare SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988 ; 239 : 487-91.
3. Smith M. Site-directed mutagenesis. *Trends Biochem Sci* 1982 ; 7 : 440-2.
4. Smith M. *In vitro* mutagenesis. *Annu Rev Genet* 1985 ; 19 : 423-62.
5. Szostak JW. *In vitro* genetics. *Trends Biochem Sci* 1992 ; 17 : 89-93.
6. Beaudry AA, Joyce GF. Directed evolution of an RNA enzyme. *Science* 1992 ; 257 : 635-41.