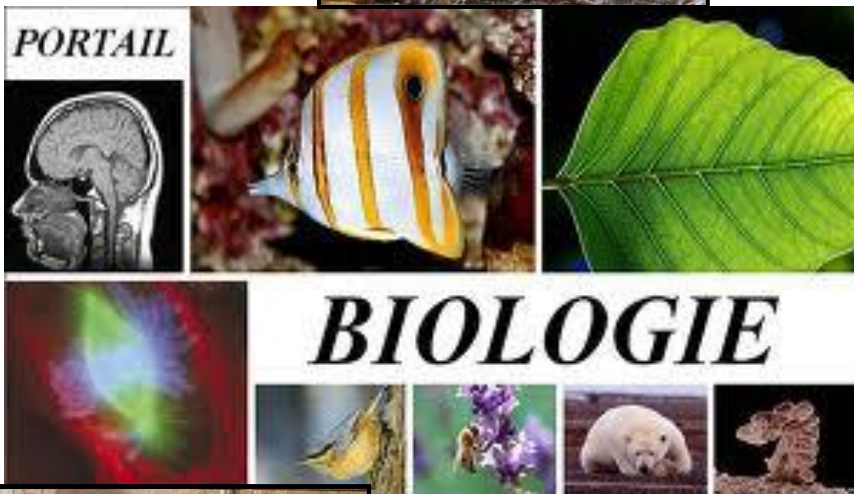
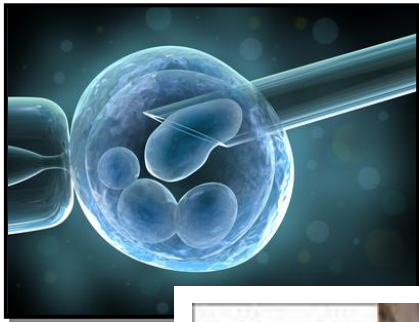


Lycée-Collège de la Planta, Sion

Biologie

Option spécifique (OS) 4<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> (programme maturité)

# Les biotechnologies



## Table des matières

<b>1</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>La recherche.....</b>	<b>4</b>
2.1	Comment fonctionne le génie génétique ? .....	4
2.1.1	Utilisation d'enzymes de restriction dans la fabrication d'ADN recombiné.....	5
2.1.2	Clonage d'un gène dans des vecteurs d'ADN recombiné : une étude détaillée .....	6
2.1.3	Application du clonage d'un gène en médecine.....	11
2.2	La génomique.....	13
2.2.1	L'amplification en chaîne par polymérase (ACP) ou PCR .....	13
2.2.2	Séquençage de l'ADN .....	17
2.2.2.1	Autres stratégies de séquençage d'un génome entier .....	18
2.2.3	L'électrophorèse sur gel .....	19
2.3	La transcriptomique.....	21
2.3.1	Détermination de la fonction des gènes.....	22
2.4	La protéomique.....	22
2.5	Recherche sur les cellules souches .....	23
2.5.1	Les applications potentielles en biomédecine: .....	25
2.6	Les animaux transgéniques.....	26
2.7	Nanobiotechnologie.....	26
<b>3</b>	<b>Médecine.....</b>	<b>27</b>
3.1	Introduction .....	27
3.2	Médicaments .....	27
3.3	Recherche chez l'être humain .....	28
3.4	Thérapie génique .....	28
3.4.1	Les vecteurs.....	31
3.4.1.1	Les vecteurs viraux.....	31
3.4.1.2	Les vecteurs non viraux.....	31
3.4.2	Les méthodes physiques .....	32
3.4.3	Les applications .....	33
3.5	Vaccins et anticorps.....	34
3.6	Méthodes de dépistage .....	36
3.7	Hérédité .....	36
3.8	Tests génétiques .....	36
3.9	Médecine de procréation (vue en DF3).....	36
<b>4</b>	<b>Agriculture et alimentation.....</b>	<b>37</b>
4.1	Génie génétique vert.....	37
4.1.1	Obtentions végétales.....	37
4.1.1.1	Transfert indirect .....	37
4.1.1.2	Transfert direct .....	40
4.1.1.3	Applications des protoplastes .....	41
<b>5</b>	<b>Clonage d'organisme.....</b>	<b>44</b>
5.1	Techniques.....	44
5.1.1	Le clonage par scission d'embryon .....	44
5.1.2	Le clonage par transfert de noyau de cellule somatique.....	44

# 1 INTRODUCTION

« *L'homme est devenu trop puissant pour se permettre de jouer avec le mal. L'excès de sa force le condamne à la vertu.* »

Jean Rostand, biologiste français (1894 – 1977)

La **cartographie** et le **séquençage** du **génom humain**, l'une des grandes réalisations de la science moderne, ont été rendus possibles grâce aux progrès accomplis dans le domaine des biotechnologies, à commencer par l'intervention de techniques de fabrication de l'**ADN recombiné**. Il s'agit d'une molécule d'ADN contenant des gènes regroupés *in vitro* et provenant d'au moins deux sources différentes (souvent d'espèces différentes).

Les techniques de confection d'ADN recombiné jouent également un rôle essentiel dans le domaine du **génie génétique**, qui est un ensemble de techniques portant sur la manipulation directe de gènes à des fins pratiques. Les applications de ce champ touchent à la fabrication de centaines de produits. Les biotechnologies permettent de produire de l'ADN recombiné, puis de l'insérer dans des cellules en culture qui en assurent la réplication, qui en expriment les gènes et qui synthétisent une protéine donnée. La **bactérie *E. coli*** sert souvent d'organisme « hôte » de l'ADN recombiné, parce qu'elle est facile à cultiver et qu'on connaît bien ses caractéristiques biochimiques.

**Les biotechnologies ont engendré une révolution dans le monde scientifique. Au sens large, elles sont l'ensemble des méthodes, des procédés et des techniques qui utilisent les capacités génétiques et physiologiques du monde vivant et qui, appliqués à des microorganismes, cellules humaines, animales ou végétales, visent à concevoir, développer et produire de nouvelles molécules et cellules, de nouveaux organismes et procédés ou encore à améliorer ceux déjà existants, en vue d'une exploitation industrielle, soit la production ou l'amélioration de biens et services et leur mise en marché.**

Certaines pratiques vieilles de plusieurs siècles sont des exemples de biotechnologies : l'utilisation de microorganismes dans la fabrication du vin, de la bière et du fromage, la sélection du bétail ou des végétaux... Elles reposaient toujours sur des mécanismes génétiques naturels, comme la mutation et la recombinaison génétique. Les biotechnologies fondées sur la manipulation de l'ADN *in vitro* et les anciennes pratiques présentent des différences ; en effet, les premières permettent de modifier des gènes spécifiques et de les transférer entre des organismes aussi distincts que des bactéries, des plantes et des animaux.

Les biotechnologies ont maintenant des applications dans des domaines variés, tels que l'**agriculture**, la **médecine** et la **criminologie**, mais les retombées les plus importantes concernent la **recherche fondamentale**. Elle a fourni aux chercheurs de nouveaux outils, qui leur ont permis de s'attaquer à des questions très anciennes. Elle a également mené à des découvertes dans pratiquement tous les sous-domaines de la biologie. En outre, grâce à elle, on acquiert actuellement une connaissance détaillée du génome humain et de ceux de nombreuses autres espèces. Il y a seulement quelques décennies, ce pan de la science était en grande partie inaccessible...

*Ce cours se base sur la revue « le génie génétique » de la fondation Gen Suisse, 6<sup>ème</sup> édition 2018*

## 2 LA RECHERCHE

### 2.1 Comment fonctionne le génie génétique ?

Le biologiste moléculaire qui étudie un gène donné se heurte à un problème : les molécules naturelles d'ADN sont très longues, et une même molécule porte habituellement un grand nombre de gènes. De plus, les gènes n'occupent parfois qu'une petite proportion de l'ADN du chromosome, le reste étant constitué de séquences nucléotidiques non codantes. Un gène humain, par exemple, représente parfois seulement 1/100 000 de la molécule d'ADN chromosomique. De plus, les différences existantes entre le gène lui-même et l'ADN voisin sont subtiles. Pour pouvoir travailler directement avec des gènes spécifiques, les scientifiques doivent mettre au point des méthodes de préparation d'un grand nombre de copies identiques de segments d'ADN bien définis, de la taille d'un gène. Autrement dit, ils doivent disposer de **techniques de génie génétique (clonage génique)**.

Les biotechnologies permettent de cloner des gènes pour la recherche fondamentale et pour des applications commerciales : une vue d'ensemble.

La plupart des méthodes de clonage de segments d'ADN ont un certain nombre de caractéristiques communes. La *figure 1*, qui est une présentation rapide et simplifiée du clonage génique et de ses applications, illustre une approche qui se fonde sur l'utilisation de **bactéries** et de leurs **plasmides**. Les plasmides sont de petites molécules circulaires d'ADN qui se répliquent à l'intérieur de bactéries, indépendamment du chromosome de celles-ci.

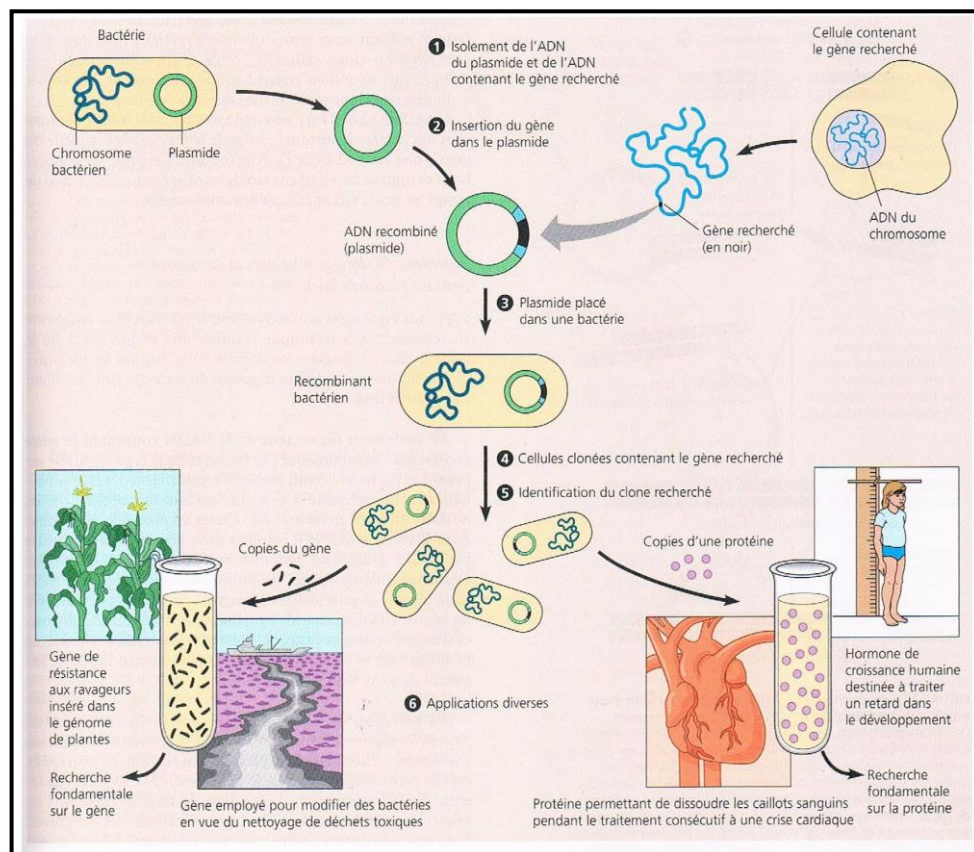


Figure 1 : Vue d'ensemble de l'utilisation des plasmides bactériens en vue du clonage génique

Pour cloner des gènes ou d'autres fragments d'ADN, on commence par **isoler les plasmides** des bactéries. La *figure 1* montre un plasmide dans lequel on **insère un gène étranger**. Le plasmide

devient ainsi une molécule d'ADN recombiné : il contient de l'ADN provenant de deux sources différentes. Il est ensuite **replacé dans une bactérie**, qui se reproduit en formant un **clone cellulaire**. Le gène étranger porté par le plasmide est « cloné » simultanément, puisque la bactérie, en se divisant, réplique le plasmide recombiné et le transmet à ses descendants. Dans des conditions adéquates, le clone bactérien peut produire la protéine codée par le gène étranger.

Il y a deux grandes catégories d'utilisation possible des gènes clonés.

- On peut chercher à **produire une protéine** à des fins **scientifiques** ou **pratiques**. Par exemple, les compagnies pharmaceutiques exploitent des bactéries portant le gène de l'hormone de croissance humaine. Ces bactéries produisent de grandes quantités de l'hormone en question, qui sert au traitement des retards de croissance. D'autres bactéries produisent de l'insuline humaine pour traiter les personnes qui souffrent du diabète.
- A l'inverse, on peut viser à **produire beaucoup de copies du gène lui-même**. L'objectif du chercheur peut être de déterminer la séquence nucléotidique du gène ou de se servir de celui-ci pour doter un organisme de nouvelles capacités métaboliques. Par exemple, il est possible qu'un gène cloné à partir d'une plante et conférant une résistance aux ravageurs soit transféré à une autre espèce. Comme la plupart des gènes ne sont présents qu'en un seul exemplaire dans le génome (ce qui représente environ un millionième de l'ensemble de l'ADN), la possibilité de cloner des fragments d'ADN peu abondants est extrêmement intéressante.

### 2.1.1 Utilisation d'enzymes de restriction dans la fabrication d'ADN recombiné

Le clonage génique et plusieurs techniques du génie génétique ont été rendus possibles grâce à la découverte d'enzymes découpant les molécules d'ADN en un nombre limité de sites bien précis. Ces enzymes, appelées **enzymes de restriction**, ont été identifiées à la fin des années 1960 par des chercheurs étudiant des bactéries. Dans la nature, elles protègent les Bactéries contre de l'ADN étranger provenant d'autres organismes, que ce soit d'autres Bactéries ou de bactériophages (virus spécifiques des bactéries). Leur mode d'action consiste à couper l'ADN intrus grâce à un mécanisme nommé *restriction*. La plupart des enzymes de restriction sont très spécifiques ; elles reconnaissent de courtes séquences nucléotidiques bien précises dans les molécules d'ADN, puis elles coupent celles-ci à des points précis. La bactérie protège son propre ADN en ajoutant des groupements méthyle (-CH<sub>3</sub>) grâce à une enzyme appelée méthylase sur les adénines et les cytosines des séquences pouvant être reconnues par l'enzyme de restriction. On a identifié et isolé des centaines d'enzymes de restriction différentes.

Le schéma du haut de la *figure 2* montre une molécule d'ADN contenant une séquence de reconnaissance, ou **site de restriction**, identifié par une certaine enzyme de restriction. Comme on peut le voir dans cet exemple, la plupart des sites de restriction sont symétriques. Les deux brins portent la même séquence 5' → 3', constitué de quatre à huit nucléotides (il y en a six dans ce cas) et allant dans une direction opposée (les brins sont antiparallèles). Les enzymes de restriction coupent les liaisons phosphodiester des deux brins, habituellement de façon décalée, comme le montre la *figure 2*.

Etant donné que la séquence cible se retrouve plusieurs fois sur une longue molécule d'ADN, l'enzyme coupe celle-ci en de

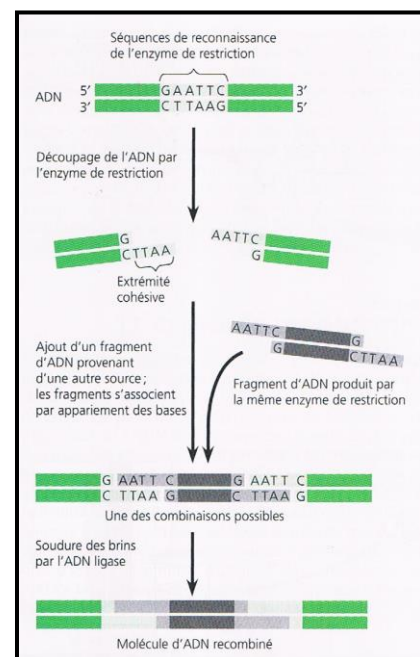


Figure 2 : Enzyme de restriction

nombreux endroits. Le traitement des copies d'une molécule d'ADN par une enzyme donnée produit toujours un même ensemble de **fragments de restriction**.

A la figure 2, remarquez que les fragments de restriction sont des fragments d'ADN bicaténaire ayant au moins une extrémité monocaténaire, appelé **extrémité cohésive**. Les bases de ces courts prolongements forment des liaisons hydrogène avec les parties monocaténaires complémentaires portées par d'autres molécules d'ADN découpées par la même enzyme. Les ensembles ainsi constitués sont temporaires, parce que les fragments ne sont retenus ensemble que par un petit nombre de liaisons hydrogène. Cependant, ces liaisons peuvent devenir permanentes sous l'effet d'une enzyme appelée **ADN ligase**. Celle-ci soude les brins d'ADN en catalysant la formation de liaisons phosphodiester. Il en résulte donc un ADN recombiné.

## 2.1.2 Clonage d'un gène dans des vecteurs d'ADN recombiné : une étude détaillée

Si l'on dispose d'une enzyme de restriction et d'ADN ligase, on peut fabriquer un plasmide recombiné. Le plasmide d'origine est appelé **vecteur de clonage** ; il s'agit d'une molécule d'ADN servant à introduire un ADN étranger dans une cellule et à l'y faire répliquer. Les plasmides bactériens sont largement utilisés en tant que vecteurs de clonage. Des plasmides recombinés sont produits à partir de fragments de restriction issus d'un ADN étranger et insérés dans les plasmides bactériens. Il est relativement facile de replacer les plasmides recombinés dans des bactéries. Lorsqu'une bactérie en portant un se reproduit, elle le réplique également. On crée ainsi un clone ; celui-ci apparaît comme une colonie sur un milieu nutritif solide ; il contient des copies multiples de l'ADN étranger.

Les cellules hôtes les plus employées pour le clonage génique sont des bactéries, surtout à cause de la facilité avec laquelle on peut isoler leur ADN et l'y réintroduire. De plus, les cultures bactériennes se développent rapidement et répliquent en peu de temps les gènes étrangers qu'elles contiennent.

### *Procédure de clonage d'un gène eucaryote dans un plasmide bactérien*

Supposons que nous voulions cloner un certain gène eucaryote. Nous pouvons utiliser les techniques décrites dans les figures 3 (*technique 1*) et 4 (*technique 2*).

## **Technique n°1 :**

### **1.- Isolement du vecteur et de l'ADN contenant le gène recherché.**

On commence par préparer deux types d'ADN : un **plasmide bactérien** (*E.coli*) choisi comme vecteur et de l'ADN contenant le **gène recherché**. Ce dernier est issu de cellules de tissu humain cultivées en laboratoire par exemple.

Le plasmide doit contenir deux gènes importants. L'un de ces gènes est *amp<sup>R</sup>*, qui confère à *E. coli* une résistance à l'ampicilline, un antibiotique ; l'autre gène, *lacZ*, code pour la  $\beta$ -galactosidase, l'enzyme qui catalyse l'hydrolyse du lactose. L'enzyme de restriction choisie ne reconnaît sur le plasmide qu'une seule séquence située à l'intérieur du gène *lacZ* (*figure 3*).

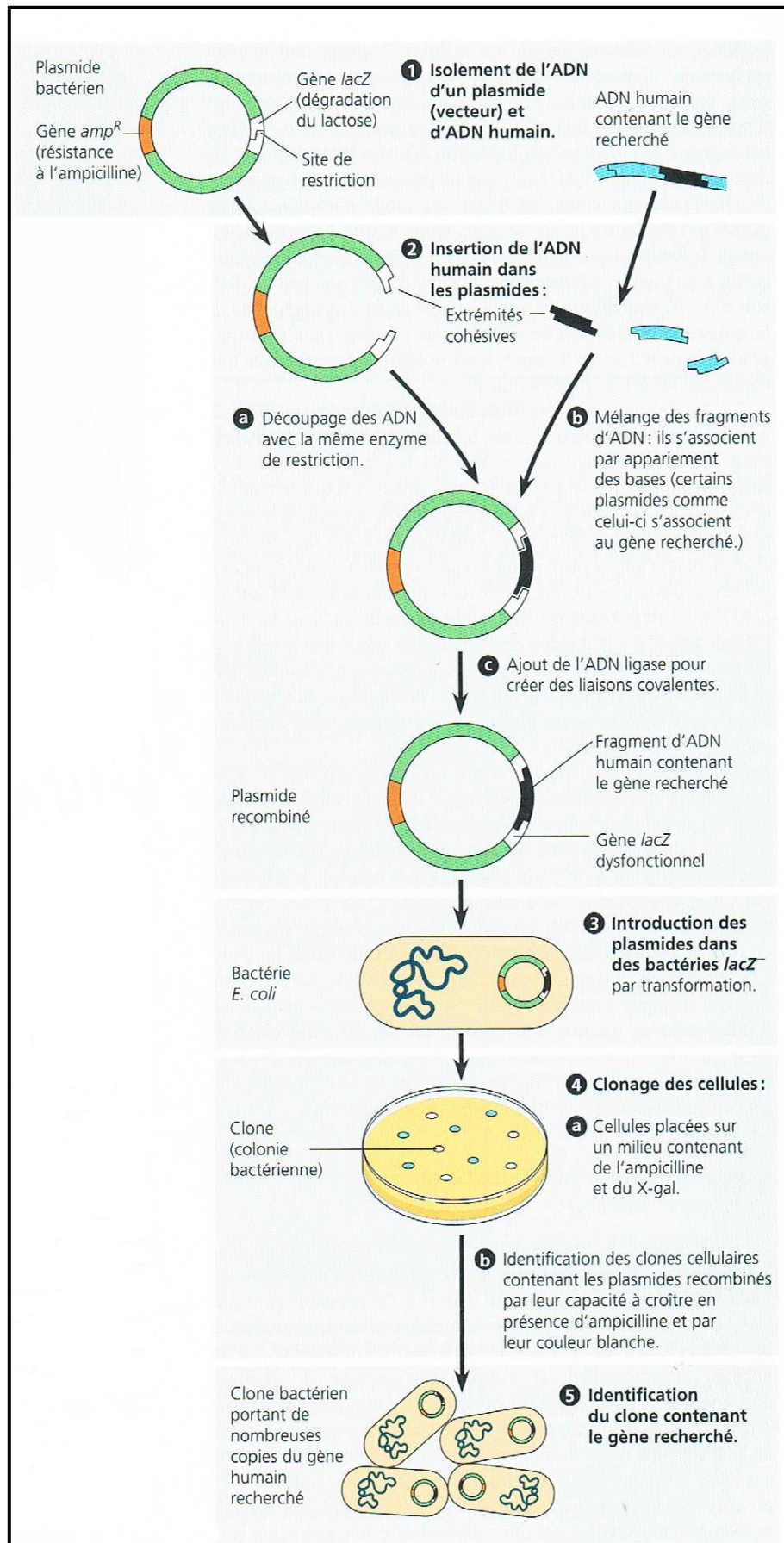


Figure 3 : Clonage d'un gène humain dans un plasmide bactérien : une étude détaillée

## 2.- Insertion de l'ADN dans le vecteur.

A l'étape 2a, on expose le plasmide et l'ADN humain à la même enzyme de restriction. Celle-ci coupe le plasmide au seul site de restriction qu'elle reconnaît, détruisant le gène *lacZ*. Elle découpe également l'ADN humain en des milliers de fragments, dont l'un porte le gène recherché. Tout en effectuant ces coupures, l'enzyme de restriction crée sur les fragments d'ADN et sur le plasmide des extrémités cohésives compatibles. Pour des raisons de simplicité, la *figure 3* ne montre que le traitement, étape par étape, d'un fragment d'ADN humain et d'un plasmide. En réalité, le traitement porte simultanément sur des millions de copies du plasmide et sur un mélange hétérogène contenant des millions de fragments d'ADN humain.

A l'étape 2b, on mélange les fragments d'ADN humain avec les plasmides coupés. Les extrémités cohésives d'un plasmide s'associent par appariement des bases avec les extrémités cohésives complémentaires du fragment d'ADN humain qui nous intéresse. (Une multitude d'autres combinaisons apparaît aussi : des ensembles formés par deux plasmides ou par un plasmide et plusieurs fragments d'ADN ; par ailleurs, de nombreux plasmides non recombinés se reforment.).

A l'étape 2c, des liaisons phosphodiester sont établies entre les molécules d'ADN à l'aide de l'ADN ligase. Il en résulte un mélange de molécules d'ADN recombiné, dont quelques-unes sont identiques à celle qui est illustrée ici.

## 3.- Introduction du vecteur de clonage dans les cellules.

A cette étape, les bactéries absorbent les plasmides recombinés par transformation (prélèvement d'ADN nu à partir de la solution environnante). Les bactéries sont *lacZ* ; la mutation du gène *lacZ* les empêche d'hydrolyser le lactose. Certaines bactéries acquièrent le plasmide recombiné recherché, alors que d'autres absorbent des fragments d'ADN différents, notamment de l'ADN recombiné ou des plasmides non recombinés. Certaines bactéries n'absorbent pas le plasmide.

## 4.- Clonage de bactéries (et de gènes étrangers).

C'est enfin l'étape du clonage proprement dit. Les bactéries transformées sont étalées sur une gélose contenant de l'ampicilline et un glucide appelé X-gal (étape 4a). En se reproduisant, chaque bactérie donne naissance à un clone, qui forme une colonie sur le milieu nutritif. Ce faisant, elle clone également les gènes humains portés par les plasmides recombinés. On profite de l'existence des gènes propres au plasmide pour sélectionner les colonies bactériennes contenant les plasmides recombinés.

Comme le milieu renferme de l'ampicilline, seules les bactéries possédant un plasmide peuvent croître, parce qu'elles ont le gène *amp<sup>R</sup>* de la résistance à l'ampicilline. La présence de X-gal dans le milieu facilite l'identification des colonies bactériennes dont les plasmides portent l'ADN étranger. En effet, la  $\beta$ -galactosidase hydrolyse le X-gal en un produit bleu, de sorte que les colonies bactériennes dotées de plasmides portant les gènes de la  $\beta$ -galactosidase dans leur intégrité sont colorées en bleu. Cependant, dans le cas où un ADN étranger est inséré dans le gène *lacZ* de la colonie, celle-ci a plutôt une couleur blanche, parce que les bactéries en question ne produisent pas de  $\beta$ -galactosidase. Ainsi, il est possible de distinguer dans un milieu contenant de l'ampicilline et du X-gal les bactéries portant des plasmides recombinés et incluant de l'ADN étranger : elles forment des colonies blanches (étape 4b).

Jusqu'ici, cette procédure a permis de cloner un grand nombre de fragments d'ADN humains différents, et pas seulement celui auquel on s'intéresse. La prochaine étape, qui est la plus difficile, consiste à cribler les colonies en vue de trouver le gène humain recherché.



## 5.- Identification des clones cellulaires contenant le plasmide recombiné

Pour cette partie, il faut se référer au PowerPoint du cours (cours 2 Le génie génétique)

### Technique n°2 :

#### 1.- Isolement du vecteur et de l'ADN contenant le gène recherché.

L'un de ces gènes est  $amp^R$  qui confère à *E. coli* une résistance à l'ampicilline, un antibiotique ; l'autre gène est  $tet^R$  qui confère à *E. coli* une résistance à la tétracycline, un autre antibiotique (figure 4).

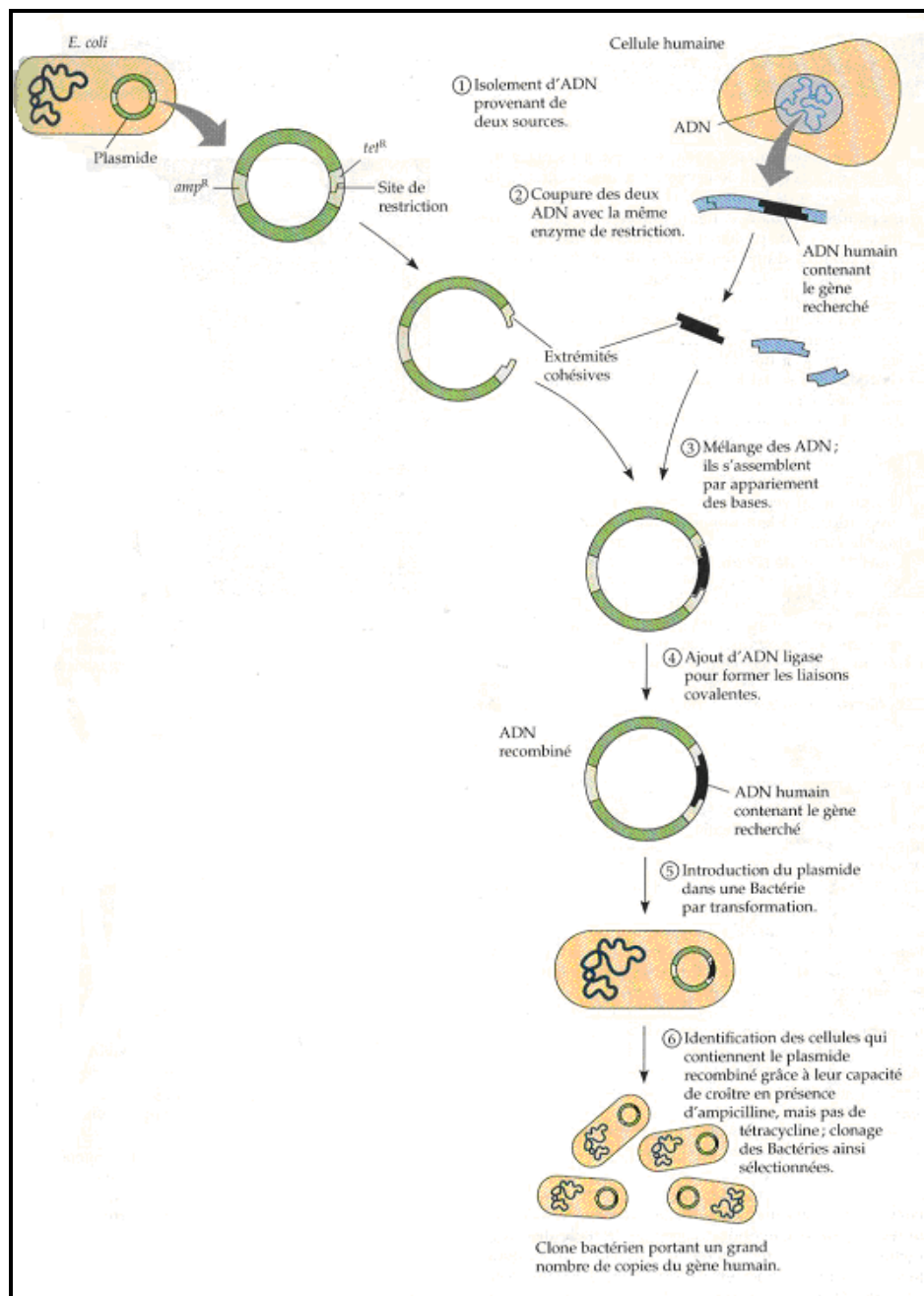


Figure 4 : Clonage d'un gène dans un plasmide bactérien

2.- Insertion de l'ADN dans le vecteur.

3.- Introduction du vecteur de clonage dans les cellules.

4.- Clonage de bactéries (et de gènes étrangers).

5.- Identification des clones cellulaires contenant le plasmide recombiné

*Pour cette partie, il faut se référer au PowerPoint du cours (cours 2 Le génie génétique)*

A la fin, que l'on ait utilisé la technique 1 ou la 2, il faut encore effectuer l'étape suivante :

6.- Identification des clones cellulaires contenant le plasmide recombiné avec le gène recherché ou le gène d'intérêt

Comment reconnaît-on une colonie contenant le gène recherché parmi des milliers de colonies contenant d'autres fragments d'ADN humain ? On peut chercher le gène lui-même ou la protéine qu'il produit. Toutes les techniques de détection directe de l'ADN d'un gène passent par l'appariement des bases de ce dernier et d'une séquence complémentaire portée par une autre molécule d'acide nucléique. Ce procédé est appelé **hybridation moléculaire**. La molécule complémentaire est un court acide nucléique monocaténaire (il s'agit soit d'ARN, soit d'ADN) appelé **sonde nucléique**. Si au moins une partie de la séquence nucléotidique du gène est connue (par exemple, grâce à la protéine qu'il code), il est possible de synthétiser une sonde qui lui est complémentaire.

La sonde s'associe spécifiquement aux brins monocaténaires complémentaires portés par le gène recherché en formant des liaisons hydrogène. Elle est marquée à l'aide d'un isotope radioactif ou d'un marqueur fluorescent qui permet de la repérer. La *figure 5* montre comment on peut sélectionner simultanément, parmi les colonies formées de plusieurs clones bactériens ayant poussé sur un milieu solide, toutes celles qui ont

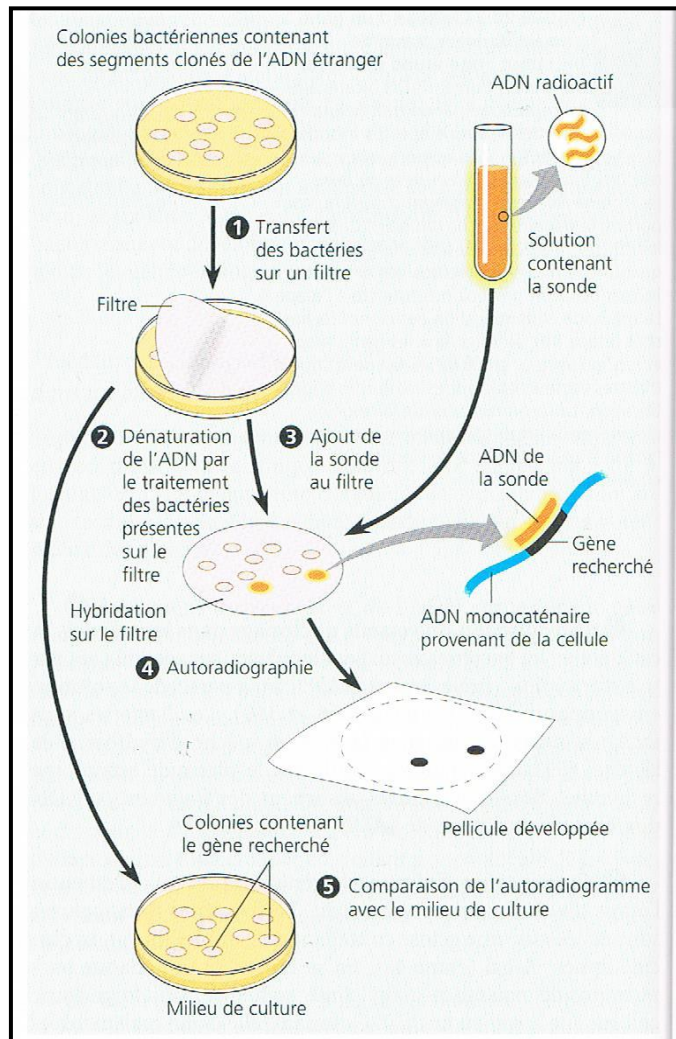


Figure 5 : Identification d'un gène cloné à l'aide d'une sonde nucléique

un ADN complémentaire à la sonde d'ADN. La **dénaturation** de l'ADN (séparation de ses deux brins) des bactéries constitue une étape essentielle. A l'instar des protéines, l'ADN peut être facilement dénaturé par des substances chimiques ou sous l'effet de la chaleur. Les sondes marquées permettent de reconnaître les colonies portant le gène recherché.

Après avoir identifié un clone cellulaire portant le gène recherché, on peut cultiver les bactéries dans une culture liquide, dans un grand réservoir, et isoler facilement une grosse quantité de copies du gène.

Si les bactéries portant un gène recherché traduisent celui-ci en une protéine, il est parfois possible de les identifier en trouvant les clones contenant la protéine en question. La détection de cette dernière peut être fondée sur son activité (dans le cas d'une enzyme), ou sur sa structure (utilisation d'anticorps se liant spécifiquement à l'enzyme).

### 2.1.3 Application du clonage d'un gène en médecine

Le génie génétique a permis de fabriquer de nombreuses protéines d'importance médicale. La fabrication de l'**insuline** est un exemple bien connu (figure 6). Cette hormone abaisse le taux de glucose dans le sang et la plupart des diabétiques dans le monde entier en ont besoin chaque jour. Les porcs possèdent une insuline qui ne diffère que d'un seul acide aminé par rapport à l'insuline humaine. C'est pourquoi, à l'origine, l'insuline pour le traitement des diabétiques était l'insuline porcine. Environ 50 pancréas de porc sont nécessaires aux besoins annuels d'un diabétique. Cependant, l'efficacité de l'insuline animale est souvent faible et beaucoup de patients sensibles développent une allergie.

L'**insuline humaine** fut le premier médicament conçu par génie génétique qui est arrivé sur le marché, en 1982. L'insuline humaine est composée de deux chaînes polypeptidiques. La chaîne A est longue de 21 acides aminés et la chaîne B de 30 acides aminés. L'hormone ne devient active qu'après la formation de deux ponts disulfures entre les deux chaînes A et B. Comme la structure primaire de l'insuline était déjà connue, on a pu synthétiser chimiquement les séquences d'ADN correspondant aux deux chaînes polypeptidiques. Un plasmide a été utilisé comme vecteur, dans lequel a été inséré le gène de la galactosidase et le gène de résistance à un antibiotique. Les deux gènes de la chaîne A et B ont été insérés dans des plasmides différents à chaque fois derrière le gène de la galactosidase. Les deux plasmides recombinés ont été ensuite transférés séparément dans des bactéries *E. coli* et les bactéries transgéniques ont été amplifiées

Le promoteur du gène de la galactosidase est activable par le lactose, C'est pourquoi, lorsque l'on ajoute du lactose dans la culture de bactérie, le promoteur est activé et le gène est exprimé. Chaque

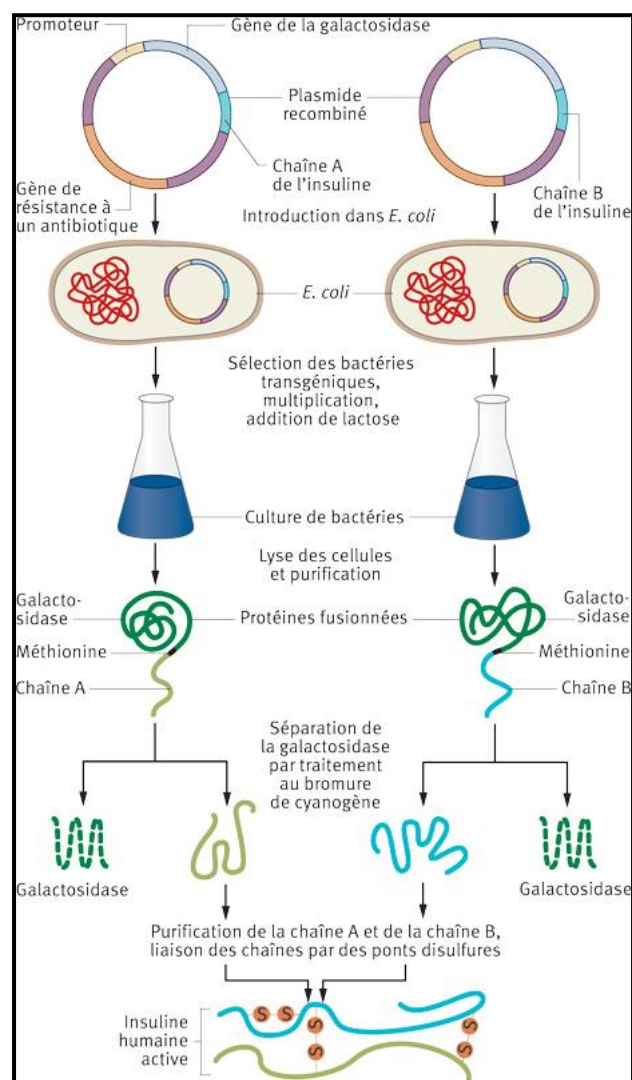


Figure 6 : Fabrication de l'insuline humaine par génie génétique avec *E. coli*

bactérie synthétise jusqu'à 100'000 molécules d'une protéine de fusion formée par la combinaison de la galactosidase et d'une chaîne d'insuline. Après la lyse des bactéries et la purification, ces protéines sont spécifiquement clivées par un traitement au bromure de cyanogène. Ce composé coupe les liaisons peptidiques après la méthionine et sépare ainsi les chaînes d'insuline de la galactosidase. Les chaînes A et B sont une nouvelle fois purifiées et la réaction entre les cystéines permet de former des ponts disulfures entre les chaînes A et B, rendant ainsi l'insuline humaine active.

*Voir aussi la méthode de fabrication se trouvant dans la brochure « le génie génétique » de la fondation Gen Suisse.*

## 2.2 La génomique

Le projet de recherche le plus ambitieux rendu possible par les biotechnologies est le **programme Génome Humain**, officiellement lancé en 1990. Il vise à cartographier tout le génome humain et à déterminer l'ensemble de la séquence nucléotidique de chacun des chromosomes (les 22 autosomes et les chromosomes sexuels X et Y). Ce projet a été mis sur pied par un consortium internationale publiquement financé et regroupant 20 équipes de chercheurs employés par des universités et des instituts de recherche. Il a suivi trois étapes centrées sur une étude de plus en plus approfondie de l'ADN :

Le projet prévoit aussi de cartographier et de séquencer le génome d'autres espèces importantes pour la recherche biologique : il s'agit notamment :

- *E.Coli* et d'autres procaryotes
- *Saccharomyces cerevisiae* (une levure)
- *Caenorhabditis elegans* (un Nématode ou Ver rond)
- *Drosophila melanogaster* (la Mouche du vinaigre)
- *Mus musculus* (la Souris commune)

Ces génomes sont très intéressants en eux-mêmes, ils nous fourniront également des renseignements précieux sur la biologie en général. De plus, les premiers travaux effectués sur eux ont facilité l'élaboration de stratégies, de méthodes et de nouvelles techniques en vue de décoder le génome humain, qui est beaucoup plus vaste. Les outils technologiques mis au service de cette tâche monumentale résultent en grande partie des progrès accomplis dans le domaine de la cybernétique, et sont des applications de l'électronique et de l'informatique.

### 2.2.1 L'amplification en chaîne par polymérase (ACP) ou PCR

Elle permet d'effectuer des copies d'ADN entièrement *in vitro*.

Le clonage d'ADN dans des cellules demeure la meilleure méthode de production de grandes quantités d'un gène ou d'une autre séquence d'ADN. Cependant, il existe une méthode plus rapide et plus sélective lorsque la source d'ADN est peu abondante ou impure : la technique de **l'amplification en chaîne par polymérase** ou **ACP** (en anglais, *polymerase chain reaction*, ou *PCR*). Elle permet l'amplification (soit la production de nombreuses copies) rapide de n'importe quel segment d'ADN sans passer par des cellules (*figure 7*). L'ADN est mis à incuber dans une éprouvette avec un type particulier d'ADN polymérase, une certaine quantité de nucléotides et de courts segments d'ADN monocaténaire artificiel servant d'amorce pour la synthèse de l'ADN. Les ADN polymérases ne peuvent fonctionner sans amorces, parce qu'elles ne peuvent ajouter de nucléotides qu'à une chaîne nucléotidique existante. L'amplification en chaîne par polymérase automatisée permet de produire des milliards de copies d'un segment donné en quelques heures, alors qu'il faut plusieurs jours pour cloner un segment d'ADN par confection d'un plasmide recombiné et répliqué dans une bactérie. La multiplication d'un minuscule échantillon d'ADN à un milliard d'exemplaires ne produit pas de grandes quantités d'ADN, mais elle peut être suffisante pour certaines utilisations, telles que la prise d'une empreinte d'ADN dans une affaire de meurtre.

La procédure de l'amplification en chaîne par polymérase (*figure 7*) est la répétition cyclique d'une réaction en chaîne qui se déroule en **trois étapes** et qui accroît une population de molécules d'ADN de façon exponentielle. La clé qui permet d'automatiser facilement l'ACP est une ADN polymérase, la Taq Polymerase (Taq Pol), peu commune, isolée pour la première fois à partir de bactéries (*Thermus aquaticus*) vivant dans des sources hydrothermales. Contrairement à la plupart des protéines, cette

enzyme résiste aux fortes températures nécessaires pour séparer les brins d'ADN au début de chaque cycle.

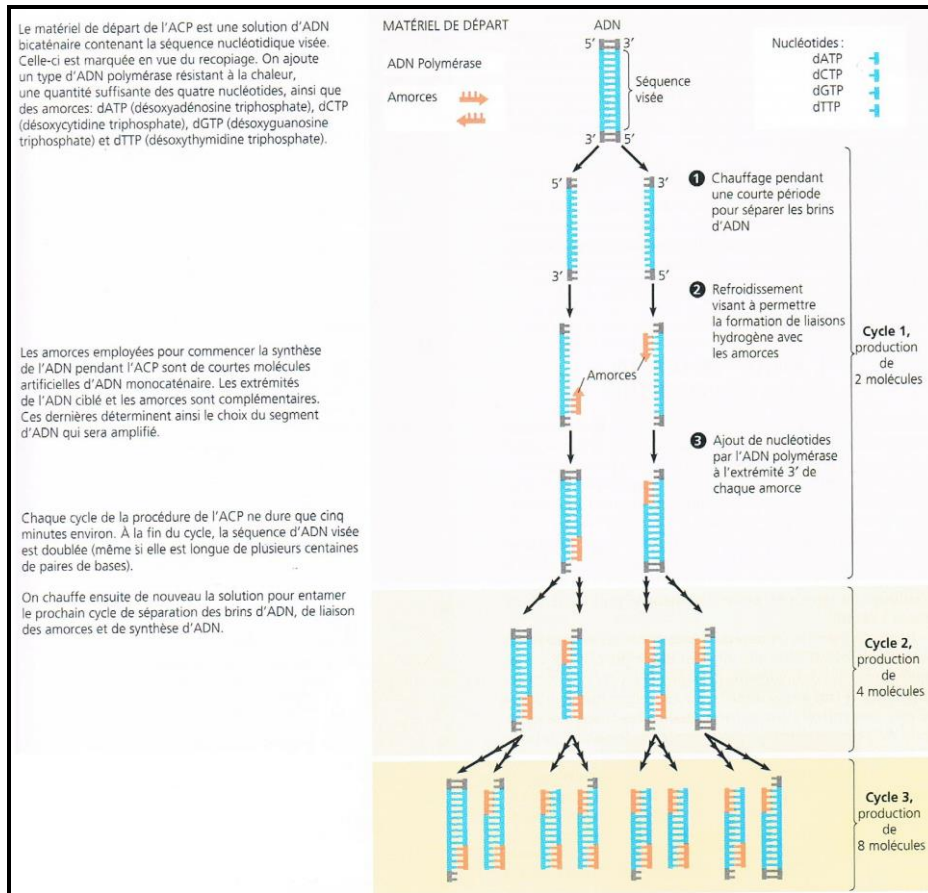


Figure 7 : L'amplification en chaîne par polymérase (ACP)

### Le principe de la PCR

Il consiste à utiliser, de manière répétitive, l'une des propriétés des ADN polymérases : celle de ne pouvoir synthétiser un brin complémentaire d'ADN qu'à partir d'une amorce.

### Ingrédients nécessaires à la PCR

#### 1) L'ADN

Généralement sous forme de double-brin, contient le fragment à amplifier.



Figure 7a : l'ADN

#### 2) Deux amorces, sens et anti-sens

Ce sont de petits brins d'ADN d'environ 20 bases capables de s'hybrider de façon spécifique, grâce à la complémentarité des bases, sur le brin d'ADN ou sur son brin complémentaire. Les amorces sont choisies de façon à encadrer la séquence d'ADN à amplifier.

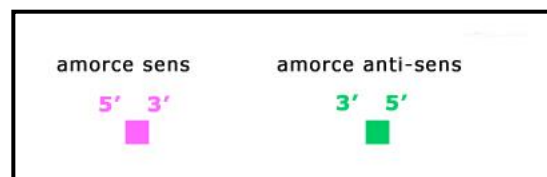


Figure 7b : les amorces

### 3) Une enzyme

La Taq Polymerase (Taq Pol), une ADN polymérase thermorésistante extraite de la bactérie *Thermus aquaticus*. Sa température optimale d'action est de 72°C et elle est capable de résister à des passages successifs à 95°C, ce qui a rendu possible l'automatisation de la procédure.

### 4) 4 nucléotides

Ils sont les éléments de base utilisés par la Taq Pol pour synthétiser les brins d'ADN complémentaires.

#### Les étapes d'un cycle

Une réaction de PCR correspond à la succession d'une trentaine de cycles comportant chacun 3 étapes :

#### Dénaturation - Hybridation - Elongation

Tous les éléments nécessaires à la réaction sont regroupés dans un tube qui sera soumis aux différentes températures correspondant à chaque étape.

##### a) Dénaturation

Le tube est chauffé quelques secondes à 94° C. Les doubles brins d'ADN se séparent. On dit alors que l'ADN est dénaturé.

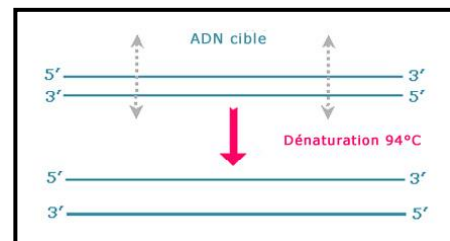


Figure 7c : la dénaturation

##### b) Hybridation

La température est rapidement abaissée à 55°C. Les amorces « reconnaissent » leur séquence complémentaire sur les brins d'ADN cibles. Elles s'hybrident chacune sur leur brin respectif. Cette étape dure une minute afin de laisser le temps aux amorces de s'hybrider correctement. L'ADN total étant plus long, n'aura pas le temps de se réhybrider.

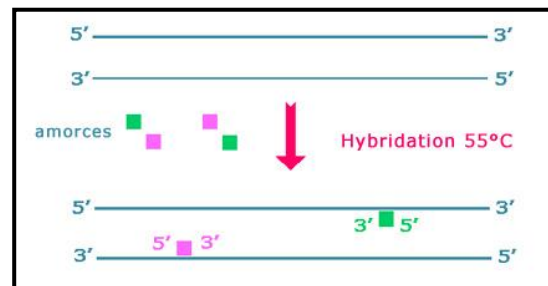


Figure 7d : l'hybridation

##### c) Élongation

La température du tube est ensuite augmentée à 72°C, ce qui permet à la Taq Polymérase d'ajouter des nucléotides aux amorces hybridées, dans le sens 5' vers 3'. Les nucléotides ne sont pas incorporés de façon aléatoire mais en fonction de la séquence cible (nucléotide complémentaire). Cette étape dure 1 minute. Un nouveau brin d'ADN, dont la séquence est complémentaire de celle du brin cible, vient d'être synthétisé.

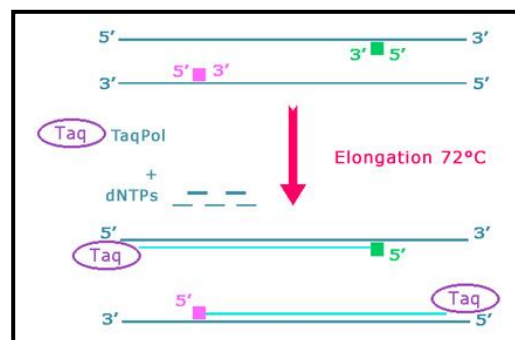


Figure 7e : l'élongation

*Que se passe-t-il à chaque cycle ?*

**Le premier cycle**

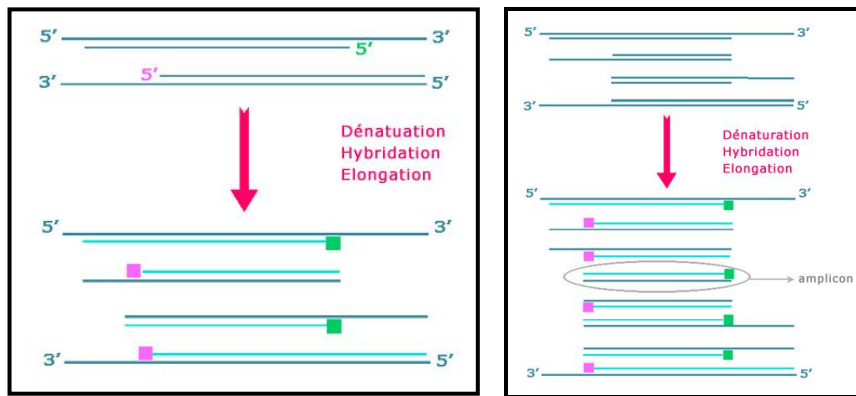
Il a permis de synthétiser autant de brins complémentaires (plus courts puisque bornés par une amorce) que de brins cibles présents dans le tube. Ils deviennent à leur tour des ADN cibles.

**Le deuxième cycle**

La quantité d'ADN continue de doubler et les premiers brins, dont la taille est limitée par les deux amorces, font leur apparition.

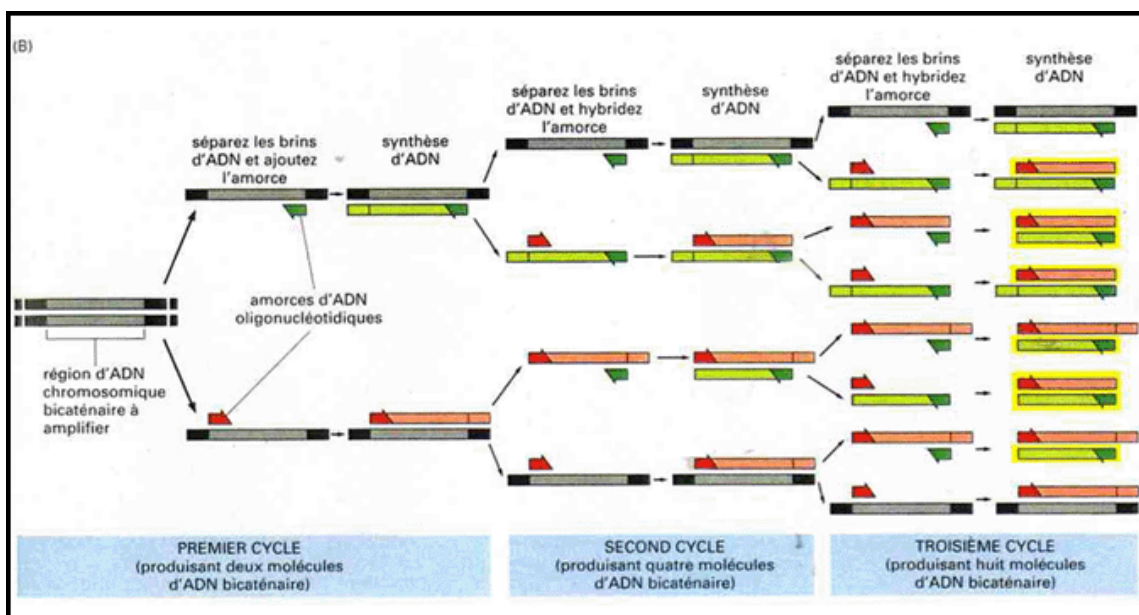
**Le troisième cycle**

Les premiers amplicons apparaissent, ADN double-brins bornés par les amorces, correspondants au fragment d'ADN recherché. La taille des fragments varie généralement de 50 paires de bases (pb) à 2 kilobases (Kb).



*Figure 7f : les cycles de PCR*

Au fil des cycles la quantité d'amplicons va augmenter de façon exponentielle.



*Figure 7g : résultats de la PCR*



La spécificité de l'amplification en chaîne par polymérase est tout aussi étonnante que sa rapidité. Les amorces et les séquences encadrant la séquence visée sont complémentaires ; de ce fait, les amorces déterminent le choix de la séquence d'ADN qui sera amplifiée. (En fait l'ACP exige que l'on connaisse les séquences en question.) On peut se servir de l'ACP pour amplifier, par exemple, un gène spécifique, avant de poursuivre le clonage des cellules. Sous l'effet de l'ACP, le gène visé devient de loin le fragment d'ADN le plus abondant, ce qui simplifie l'étape ultérieure d'identification du clone qui le contient. L'ACP est tellement spécifique et puissante que le matériel de départ n'a même pas besoin d'être de l'ADN purifié. Il suffit de minuscules quantités d'ADN (même s'il n'est pas intact) dans le matériel de départ. Remarquez, cependant, que l'ACP ne peut pas remplacer le clonage d'un gène qui doit être produit en grande quantité. Des erreurs occasionnelles surviennent pendant la réplication, ce qui limite le nombre de copies exactes fournies grâce à cette technique.

L'amplification en chaîne par polymérase, mise au point en 1985, a eu de grandes répercussions sur les domaines de la recherche biologique et de la biotechnologie. On s'en sert pour amplifier de l'ADN de provenance très diverses : d'un Mammouth laineux congelé depuis 40 000 ans, de minuscules échantillons de sang, de tissus ou de sperme prélevés sur les lieux de crimes violents, d'une cellule embryonnaire unique dans le but de poser un diagnostic prénatal rapide de maladies génétiques, de gènes viraux provenant de cellules infectées par des virus difficiles à détecter (comme le VIH), ...

### 2.2.2 Séquençage de l'ADN

La meilleure cartographie imaginable d'un génome est sa séquence nucléotidique complète. Comme nous l'avons déjà dit – et cet aspect est essentiel –, c'est la technologie du clonage des fragments d'ADN qui a rendu possible le séquençage de très longues molécules d'ADN et de génomes. Un séquenceur permet de déterminer la séquence nucléotidique d'un fragment d'ADN relativement court à partir d'une préparation purifiée d'un grand nombre de copies de ce fragment. La technique habituelle de séquençage décrite à la *figure 8* combine le marquage de l'ADN, la synthèse d'ADN à partir des nucléotides particuliers situés à la fin des chaînes et une électrophorèse sur gel à haute résolution. Toutefois, même lorsqu'il est automatisé, le séquençage des 3,2 milliards de paires de nucléotides d'un jeu haploïde de chromosomes humains représente une tâche monumentale. Parmi les événements qui ont eu un impact décisif sur le programme Génome humain figurent la mise au point d'une technique de séquençage plus rapide et le perfectionnement des programmes informatiques d'analyse et d'assemblage des séquences partielles.

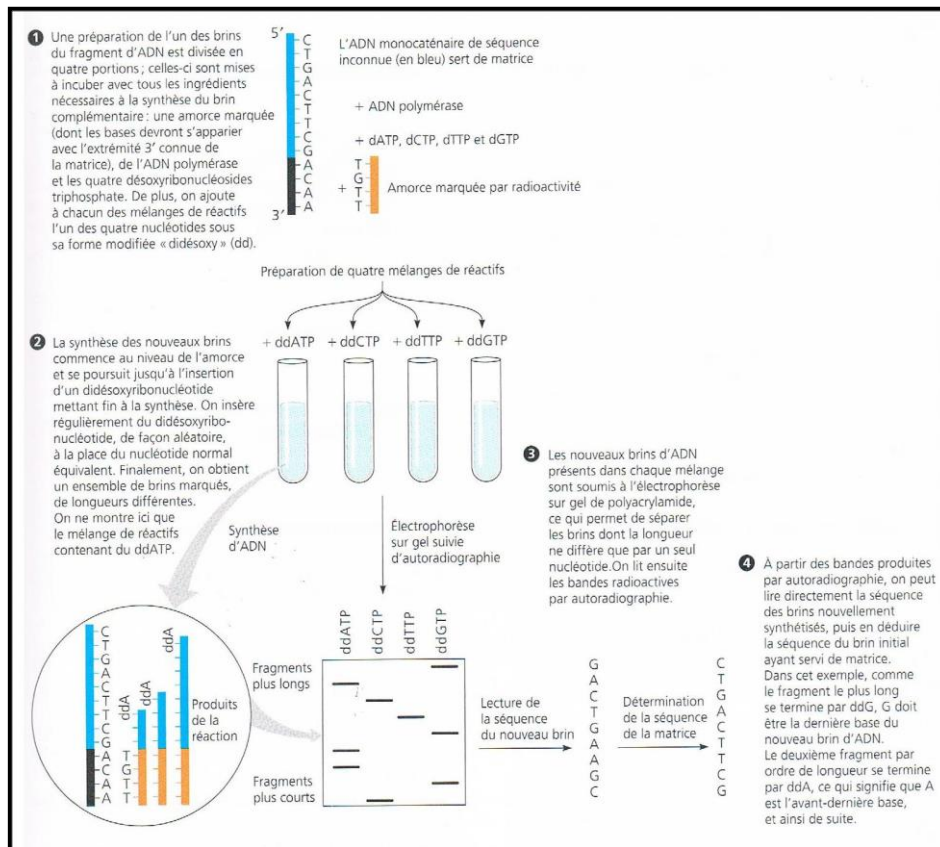


Figure 8 : Séquencage de l'ADN par la méthode Sanger

La figure 9a résume cette approche hiérarchisée, constituée de trois étapes, qui permet de séquencer le génome. Dans la pratique, ces trois étapes se recoupent, ce que ce schéma simplifié ne montre pas ; elles ont constitué la stratégie globale du consortium public de recherche.

### 2.2.2.1 Autres stratégies de séquencage d'un génome entier

En 1992, encouragé par les progrès dans le domaine des séquenceurs et de l'informatique, le biologiste moléculaire J.Craig Venter a proposé une autre stratégie de séquencage de génomes entiers. Son idée était essentiellement de sauter les étapes de la cartographie génétique et de la cartographie physique, et de passer directement au séquencage de fragments d'ADN pris au hasard. Ensuite, de puissants programmes informatiques regrouperaient les courtes séquences, très nombreuses, ainsi produites et se recouvrant partiellement de sorte à former une seule séquence continue (figure 9b). Malgré le scepticisme de beaucoup de ses collègues, Venter a quitté le consortium public pour poursuivre son idée. Les mérites de son approche ont été démontrés en 1995, du moins en ce qui concerne les génomes de procaryotes. Cette année-là, Venter et ses collaborateurs ont publié la première séquence complète du génome de la Bactérie *Haemophilus influenzae*. En 1998, il a créé sa propre société, Celera Genomics, et a promis de déterminer la séquence du génome humain en trois ans. La valeur de son approche en aveugle sur l'ensemble du génome a été confirmée en mars 2000, lors de la publication de la séquence du génome de *Drosophila melanogaster*, établie en collaboration avec des chercheurs universitaires. Tels que promis, en février 2001, Celera a annoncé avoir séquencé plus de 90% du génome humain (le consortium public a fait en même temps une annonce similaire)

Le consortium public a souligné que la société Celera s'était abondamment servie de ses cartes et de ses séquences, qui sont toutes rendues publiques immédiatement (contrairement à celles de Celera). Il a également affirmé que les fondements établis grâce à l'approche du consortium faciliteraient grandement la phase de finition du projet en question. Venter, pour sa part, souligne l'aspect rentable

et économique de ses méthodes, et il est exact que le consortium public en a fait un certain usage. Il est évident que les deux approches sont valables et que la concurrence apparue entre les deux groupes a stimulé les progrès (figure 9, qui résume les deux stratégies).

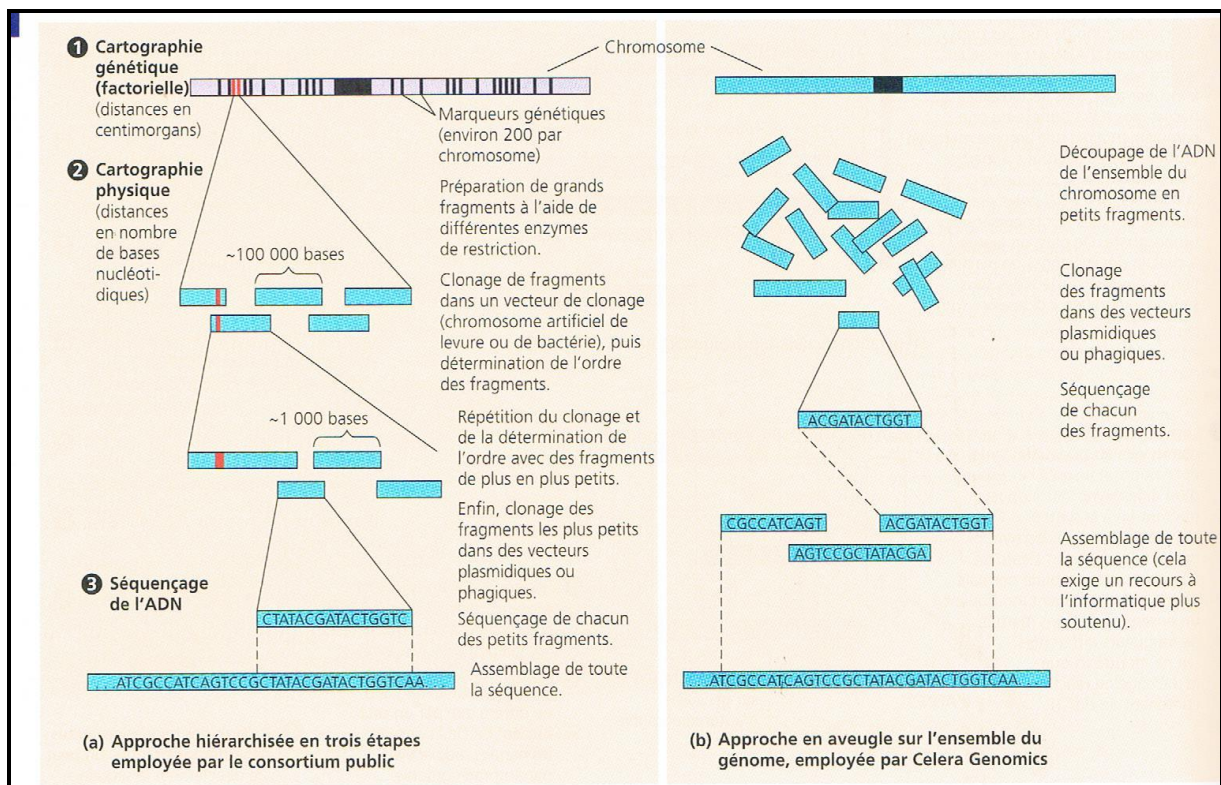


Figure 9 : Autres stratégies de séquençage d'un génome entier

A l'été 2001, les génomes d'environ 50 espèces étaient déjà entièrement ou presque entièrement séquencés. Il s'agit surtout de procaryotes (y compris de *E. coli*), d'un certain nombre d'autres bactéries (dont plusieurs présentent un certain intérêt médical), et d'une dizaine d'Archéobactéries. Le premier eucaryote dont le génome a été entièrement séquencé est la levure du boulanger, *Saccharomyces cerevisiae*, et le premier organisme multicellulaire est le Nématode *Caenorhabditis elegans*, un ver rond rudimentaire. On a aussi entièrement séquencé le génome de l'Arabette des dames, *Arabidopsis thaliana*, une plante très employée en recherche. Le séquençage du génome humain a été achevé en 2004, grâce au Projet Génome Humain (PGH). Il s'agit, en fait, d'une compilation de données recueillies sur plusieurs individus. Le premier séquençage fait sur un seul individu a été publié en septembre 2007.

A un certain niveau, les séquences en question ne sont que des listes monotones de bases nucléotidiques (une succession interminable de millions de A, de T, de C et de G). A un autre niveau, rendu possible par l'analyse informatique, elles ont déjà mené à certaines découvertes très intéressantes.

### 2.2.3 L'électrophorèse sur gel

En raison de son grand pouvoir séparateur, l'électrophorèse sur gel est une méthode de choix pour l'analyse des acides nucléiques et des mélanges de protéines (figure 10).

La séparation est fondée sur les différences de vitesse de migration des macromolécules dans un gel sous l'effet d'un champ électrique. Les molécules chargées négativement, les anions, migrent en direction de l'anode, chargée positivement, et les molécules chargées positivement, les cations, vers la cathode, chargée négativement.

Dans l'électrophorèse sur gel, on utilise un gel comme support. Ce matériau est constitué d'un réseau de polymères qui entravent le déplacement des molécules durant leur migration. C'est la raison pour laquelle ce procédé sépare les molécules en fonction de leur taille : les grosses molécules sont davantage ralenties que les petites. En général, on utilise des gels d'agarose ou de polyacrylamide. La ligne de départ dans le gel est composée de plusieurs puits, dans lesquels sont disposés les échantillons à analyser. Plusieurs échantillons peuvent être testés en parallèle dans le même gel.

L'ADN est chargé négativement en raison des groupes phosphate. Par conséquent, les fragments d'ADN migrent dans le gel vers l'anode. Plus les fragments sont courts, plus ils peuvent migrer rapidement et facilement dans le gel. Les fragments d'ADN sont incolores. Un colorant de référence doit être ajouté pour suivre la progression de l'électrophorèse sur gel. Une fois qu'il a atteint le bout du gel, l'électrophorèse est arrêtée. Après l'électrophorèse, les molécules d'ADN de chaque échantillon sont disposées en bandes le long de leur voie de migration, en fonction de leur taille. Les molécules ayant la même vitesse de migration ont la même taille. Pour les rendre visibles, on les traite avec des réactifs de détection appropriés. Le bromure d'éthidium est le réactif fluorescent le plus souvent utilisé aujourd'hui. Mais c'est une substance cancérigène, qui doit être manipulée avec précaution. Les bandes d'ADN colorées au bromure d'éthidium émettent une lumière rose par fluorescence lorsqu'elles sont exposées aux rayons UV. Lorsqu'on compare les bandes d'un échantillon avec les bandes de fragments d'ADN de référence de tailles moléculaires connues, la taille des fragments inconnus peut être déterminée.

En ce qui concerne les protéines, la charge dépend des acides aminés constitutifs. Leur analyse n'est pas aussi simple que l'analyse de l'ADN. Des molécules de protéines de la même taille peuvent se déplacer à des vitesses différentes et dans des directions différentes. Pour faciliter l'analyse, les protéines sont dénaturées et les chaînes polypeptidiques sont chargées avec des anions spécifiques, qui permettent de masquer la propre charge de la protéine. Ainsi, la protéine, comme l'ADN, possède une charge négative et migre en fonction de la masse moléculaire à travers le gel.

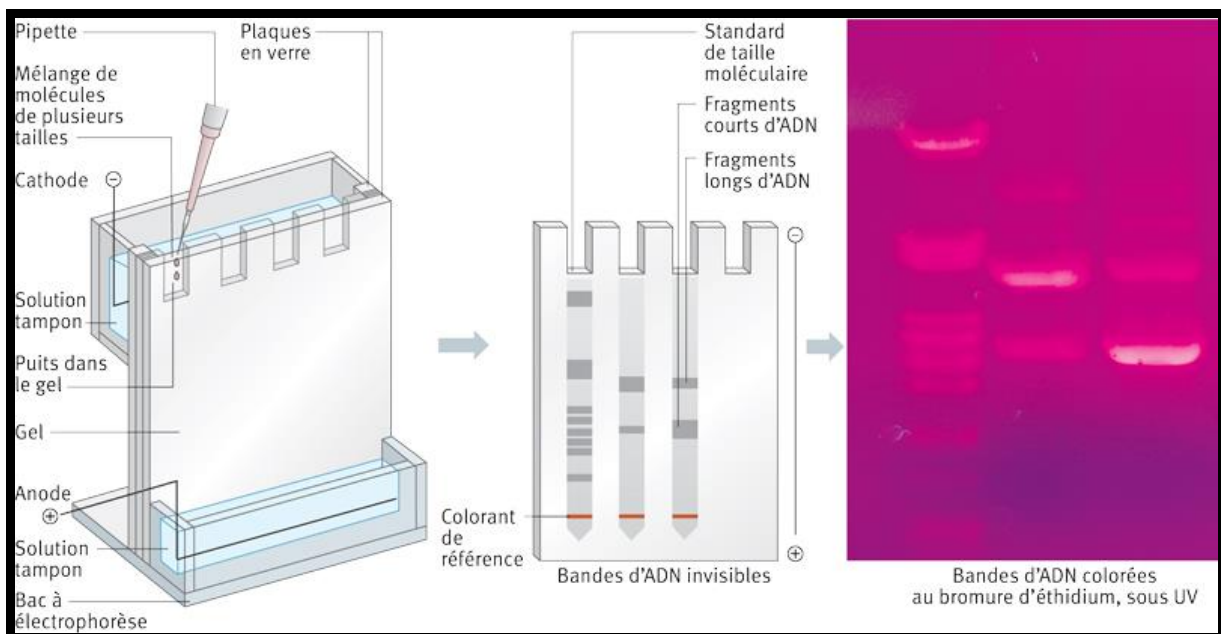


Figure 10 : Electrophorèse sur gel

## 2.3 La transcriptomique

L'étude de l'expression permet non seulement de connaître les gènes individuels et leur évolution, mais aussi de comprendre comment ceux-ci interagissent de façon à créer un organisme et à assurer son fonctionnement. L'existence de réseaux extrêmement complexes d'interactions entre les gènes et leurs produits explique probablement en grande partie pourquoi un si petit nombre de gènes nous suffit. Pendant que certains scientifiques travaillent à séquencer des gènes et à analyser leur structure, d'autres partent des séquences déjà établies pour étudier les modes d'expression génique dans une nouvelle perspective globale. Ils tentent de déterminer quels gènes sont transcrits et dans quelles circonstances. Leur stratégie générale consiste à isoler l'ARNm produit par certaines cellules particulières, à fabriquer une génothèque d'ADNc par transcription inverse à partir de ces matrices, puis à comparer les ADNc en question avec d'autres génothèques d'ADN à l'aide de l'hybridation. Il est ainsi possible de savoir quels gènes sont actifs à divers stades de développement, dans différents tissus ou dans des tissus plus ou moins affectés par la maladie.

Ce sont les biotechnologies qui rendent possible ce genre d'études sur l'expression des gènes. Quant à l'automatisation, elle permet d'en effectuer toutes les étapes facilement et à grande échelle. On peut aujourd'hui détecter et mesurer l'expression de milliers de gènes à la fois. Une technique révolutionnaire, présentée à la *figure 11*, consiste à effectuer des essais sur microréseau à ADN. De minuscules quantités d'un grand nombre de fragments d'ADN monocaténaire représentant différents gènes sont fixés sur une plaque de verre sous forme de réseau dense. (Le réseau est également appelé puce à ADN). Idéalement, ces fragments représentent l'ensemble des gènes d'un organisme ; cela est possible dans le cas d'organismes dont le génome a déjà été entièrement séquencé. Les fragments sont mis en présence de divers échantillons de molécules d'ADNc marquées par un colorant fluorescent, avec lesquelles ils peuvent s'hybrider ou non. L'un des premiers tests effectués par cette technique comparait les gènes exprimés dans les racines et les feuilles d'*Arabidopsis thaliana*. Ensuite, les chercheurs ont séquencé les gènes plus fortement exprimés dans un type de tissu que dans l'autre. Les résultats se sont avérés conformes à ce qui était prévu. Les gènes codant pour des enzymes

connues de la photosynthèse, par exemple, étaient activés dans les feuilles, mais pas dans les racines.

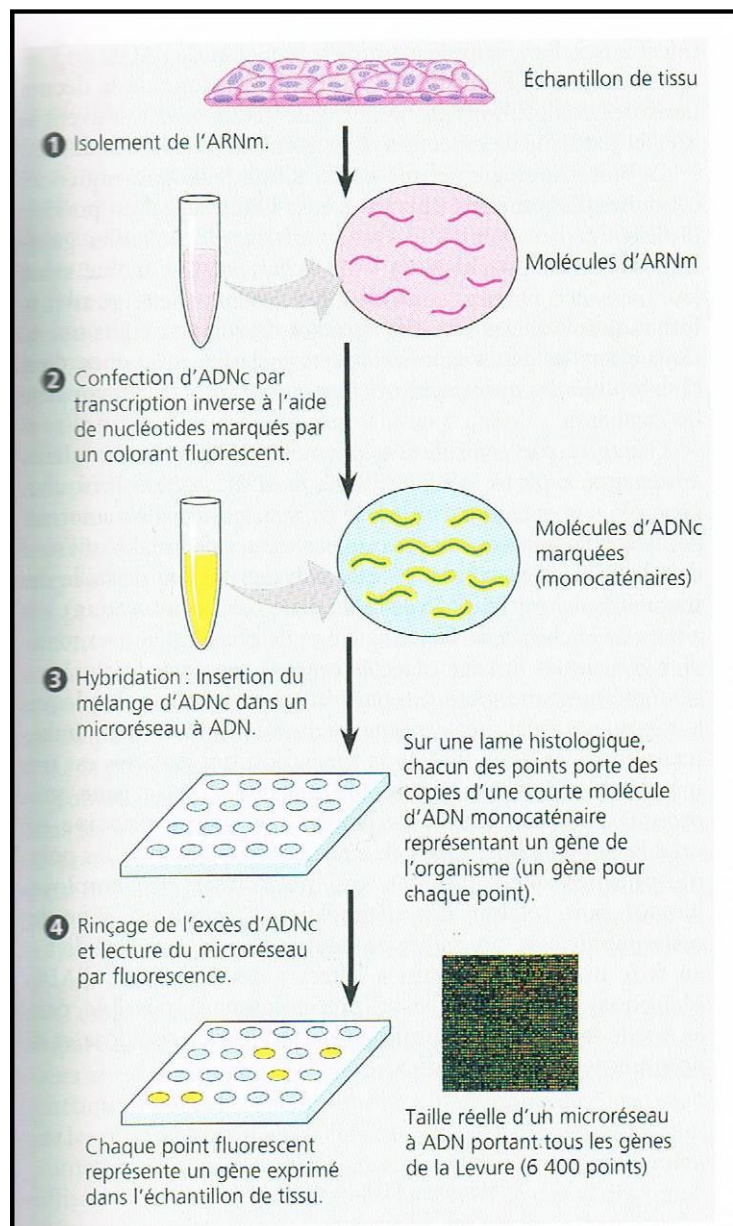


Figure 11 : Essai d'expression génique sur un microréseau à ADN

Cette technique devrait permettre de découvrir de nouveaux gènes et de nouvelles interactions entre les gènes, et aussi de mieux connaître le fonctionnement de ceux-ci, ce qui est plus important que de confirmer simplement des prédictions. Par exemple, on effectue des essais sur des microréseaux à ADN pour comparer des tissus cancéreux et non cancéreux. L'étude des différences au niveau de l'expression des gènes pourrait mener à l'élaboration de nouvelles techniques de diagnostic, à la découverte de traitements à ciblage biochimique et à une meilleure compréhension du cancer. En fin de compte, l'information obtenue grâce aux essais sur microréseaux devrait nous donner une meilleure vision globale du domaine et nous faire mieux comprendre comment les gènes interagissent pour former un être vivant.

### 2.3.1 Détermination de la fonction des gènes

Les gènes les plus intéressants découverts au cours du séquençage du génome et des recherches sur l'expression génique sont peut-être ceux dont on ignore complètement les fonctions. Comment les chercheurs s'y prennent-ils pour déterminer leurs fonctions ? Ils neutralisent le gène à l'étude et espèrent que les conséquences qui se manifesteront dans la cellule ou dans l'organisme permettront de mieux comprendre son fonctionnement normal. Une approche puissante à cet égard est la **mutagenèse *in vitro***, une technique permettant de modifier spécifiquement la séquence d'un gène cloné. Les mutations ainsi obtenues risquent d'altérer ou de neutraliser complètement le fonctionnement de la protéine codée par le gène. Par conséquent, lorsque le gène muté est de nouveau inséré dans une cellule, on est en mesure de déterminer la fonction de la protéine normale manquante en examinant le phénotype du mutant. Les chercheurs peuvent même introduire un gène ainsi muté dans les cellules de l'embryon d'un organisme multicellulaire (comme une souris) pour étudier le rôle du gène dans le développement et le fonctionnement de l'ensemble de l'organisme.

Des chercheurs travaillant sur des organismes autres que des mammifères exploitent une technique plus simple et plus rapide de blocage de l'expression de gènes sélectionnés. Cette technique appelée interférence par ARN, consiste à déclencher la dégradation de l'ARN messager au moyen de molécule d'ARN bicaténaire artificielles, dont la séquence correspond à celle du gène visé. On ignore dans une large mesure comment l'ARN bicaténaire exerce cet effet dans la cellule. Cependant, il s'agit d'un processus naturel, probablement apparu comme une forme de protection des cellules contre les Virus. Les chercheurs ont réussi à bloquer, dans une certaine mesure, l'expression de gènes dans les cellules de Mammifères. Chez d'autres types d'organismes, comme les Nématodes, l'interférence par ARN avait déjà fait ses preuves.

## 2.4 La protéomique

Les succès enregistrés dans le domaine de la cartographie et du séquençage des génomes ont incité les scientifiques à passer à la **protéomique** : il s'agit de l'étude systématique de jeux complets de protéines (*protéomes*) codés par un génome. La protéomique pose des difficultés d'un genre nouveau. Comme l'ARN subit un épissage différentiel et que les protéines sont modifiées après avoir été traduites, il est probable que le nombre de protéines présentes chez l'Humain et chez les espèces voisines dépasse de loin celui des gènes. En outre, la collecte de toutes ces substances sera difficile, parce que les protéines produites varient selon le type de cellule et son état. De plus, contrairement à l'ADN, les protéines diffèrent énormément par leur structure, ainsi que par leurs propriétés chimiques et physiques. Cependant, les protéines sont les molécules qui assurent les diverses fonctions cellulaires, et il faut les étudier si l'on veut comprendre le fonctionnement des cellules et des organismes. Les progrès techniques en cours (comme l'invention récente de microréseaux servant à l'étude des interactions entre protéines) mèneront à la création d'outils permettant de relever ce défi.

Grâce à la génomique et à la protéomique, les biologistes ont maintenant une vision de plus en plus globale du monde vivant.

Durant ce siècle, la science portera de plus en plus sur les systèmes biologiques complets, c'est-à-dire qu'elle cherchera à comprendre comment différentes composantes interagissent pour former un tout.

Les progrès du domaine de la **bio-informatique**, qui est l'application de l'informatique et des mathématiques à la génétique et aux autres spécialités de la biologie, joueront un rôle essentiel dans le traitement des données innombrables à collecter et à analyser.

## 2.5 Recherche sur les cellules souches

Tout d'abord, une **cellule souche** est une **cellule précurseur non différenciée** capable de se **renouveler** et de **se différencier**. Il existe différents types de cellules souches :

Les cellules souches **totipotentes** : Cellules embryonnaires jusqu'au stade 8 cellules au maximum. Ces cellules sont capables de se développer jusqu'au stade complet d'un individu.

Les cellules souches **pluripotentes** : Cellules embryonnaires à partir du stade 16 cellules jusqu'au stade blastocyste (100 cellules environ). Ces cellules sont capables de se développer en tous les types de cellules de l'organisme.

Les cellules souches **multipotentes** : Cellules adultes qui ne peuvent générer qu'un éventail limité de cellules. Les cellules souches de la moelle osseuse, par exemple, à partir desquelles se forment les cellules sanguines.

Peu de branches de la recherche au sein des biosciences se développent avec autant de dynamisme que la recherche sur les cellules souches.

Le 6 novembre 1998 une équipe américaine révèle qu'elle a réussi à **isoler** et à **mettre en culture** des "**cellules souches embryonnaires**" **humaines**. Ces cellules se multiplient à l'infini *in vitro*. La mise en culture des cellules ES humaines laisse envisager la création d'embryons-clone humains destinés à produire des tissus spécialisés sains, qui remplaceraient leurs homologues chez un adulte malade.

Fin 2007, il a fallu définitivement abandonner un dogme biologique, à savoir l'impossibilité de reprogrammer des cellules. Deux équipes de chercheurs, au Japon et aux Etats-Unis, ont en effet réussi, grâce à l'adjonction de quatre gènes, à ramener une des cellules de la peau mature à un stade quasi embryonnaire. Ces cellules souches pluripotentes induites (dites cellules iPS), très similaires aux cellules embryonnaires, ont suscité de nombreuses vagues bien au-delà du monde scientifique.

La fascination exercée par les cellules souches embryonnaires réside dans leur aptitude à se transformer en chacun des quelques 200 types de cellulaires de l'organisme humain. Or, c'est précisément cette aptitude qui intéresse les chercheurs. Ils étudient quelles sont les conditions nécessaires pour que les cellules souches se développent en cellules cardiaques, nerveuses, musculaires ou productrice d'insuline. La compréhension de ces processus biologiques fondamentaux ouvre de nouvelles possibilités à la médecine : grâce à des thérapies dites de « remplacement cellulaire », les chercheurs veulent à l'avenir traiter des maladies comme le diabète, dans lesquelles certains types cellulaires sont absents ou ne fonctionnent pas.

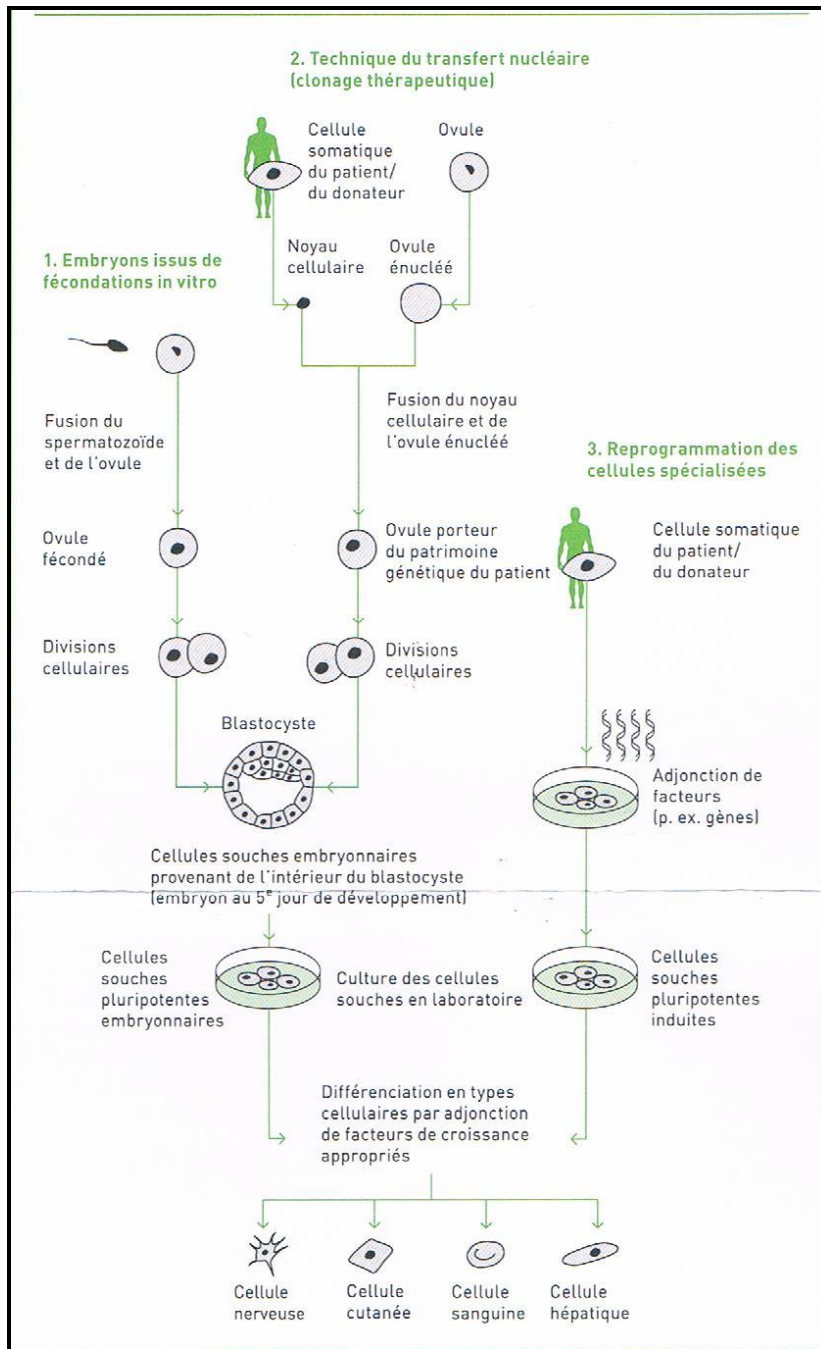


Figure 12 : Production de cellules souches pluripotentes

Le chemin menant de la recherche fondamentale sur les cellules souches embryonnaires à des thérapies efficaces est semé d'embûches. Les chercheurs sont conscients qu'un long travail de laboratoire sera nécessaire avant que nous puissions compter sur des applications cliniques. Et la culture des cellules iPS n'a pas non plus rendu plus simple les questions éthiques qui se posent. Ce serait un tort de penser que la science pourrait désormais renoncer aux cellules souches embryonnaires que certains contestent. Seules des analyses détaillées et des comparaisons à long terme avec des cellules souches embryonnaires montreront s'il est effectivement possible de les remplacer par des cellules iPS.



## 2.5.1 Les applications potentielles en biomédecine :

### 1. La biologie de la reproduction et du développement humain.

L'étude des cellules ES humaines et de leur différenciation *in vitro* représente un moyen privilégié d'**analyse du développement embryonnaire humain** et des **événements qui régulent le processus de différenciation**, la **croissance** des tissus et leur **maturation**.

### 2. La recherche et le développement pharmaceutique.

Les cellules ES humaines constituent un système biologique de choix pour **tester de nouveaux candidats-médicaments**, évaluer leur **efficacité**, leur **toxicité** et **identifier de nouvelles cibles** sur lesquelles agir. Par ailleurs, grâce à leur capacité de prolifération indéfinie à un stade indifférencié, les cellules ES humaines se prêtent à **l'introduction de gènes défectueux**, afin de développer des modèles simples de maladies humaines *in vitro*, utiles pour le développement de médicaments.

### 3. La transplantation de cellules et d'organes.

En théorie, les cellules ES humaines sont susceptibles de fournir des quantités illimitées de tissus ou cellules spécifiques, destinés à **remplacer les tissus malades** ou les **populations de cellules affectées** par une chimiothérapie, par exemple.

## **2.6 Les animaux transgéniques**

Voir brochure « génie génétique » et PowerPoint n°6

## **2.7 Nanobiotechnologie**

Voir brochure « génie génétique » et PowerPoint n°6

## 3.1 Introduction

Voir brochure « génie génétique » et Power Point n°7

## 3.2 Médicaments

### ➤ *Animaux transgéniques produisant des molécules pharmaceutiques.*

Il s'agit d'utiliser des animaux d'élevage comme "bio-réacteurs" pour obtenir des molécules indispensables dans le traitement de certaines maladies. On avait déjà commencé à produire des molécules d'insuline pour le diabète grâce à des bactéries transgéniques. On est passé récemment à des animaux de grande taille comme les ovins et caprins. En 1997, on obtient 6 brebis transgéniques clonées dans le but de leur faire produire en quantité, dans leur lait, le facteur IX, protéine de coagulation déficiente chez les personnes souffrant de l'hémophilie B.

La première génération de médicaments produits par génie génétique, comme l'insuline, a été fabriquée dans des procaryotes. Cependant, les procaryotes ne sont pas capables d'épisser l'ARNm ou d'effectuer les modifications post-traductionnelles nécessaires pour la synthèse des protéines eucaryotes. C'est pourquoi on utilise aujourd'hui des cultures de cellules eucaryotes transgéniques pour la production de ces médicaments, ainsi que des animaux et des plantes transgéniques. Pour créer un **animal transgénique**, on introduit le gène étranger, généralement par micro-injection, dans un ovocyte fécondé. Le moment propice pour le transfert de gènes lors d'une fécondation *in vitro*, c'est quand les pronucléi maternel et paternel n'ont pas encore fusionné. L'injection du gène étranger a lieu dans l'un des deux pronucléi. Lors de la fusion des pronucléi, le gène étranger peut être intégré dans le génome du zygote. Le lieu exact de l'intégration est aléatoire. Après quelques divisions cellulaires, l'embryon est transféré dans l'utérus d'une mère porteuse et un animal transgénique peut ainsi se développer.

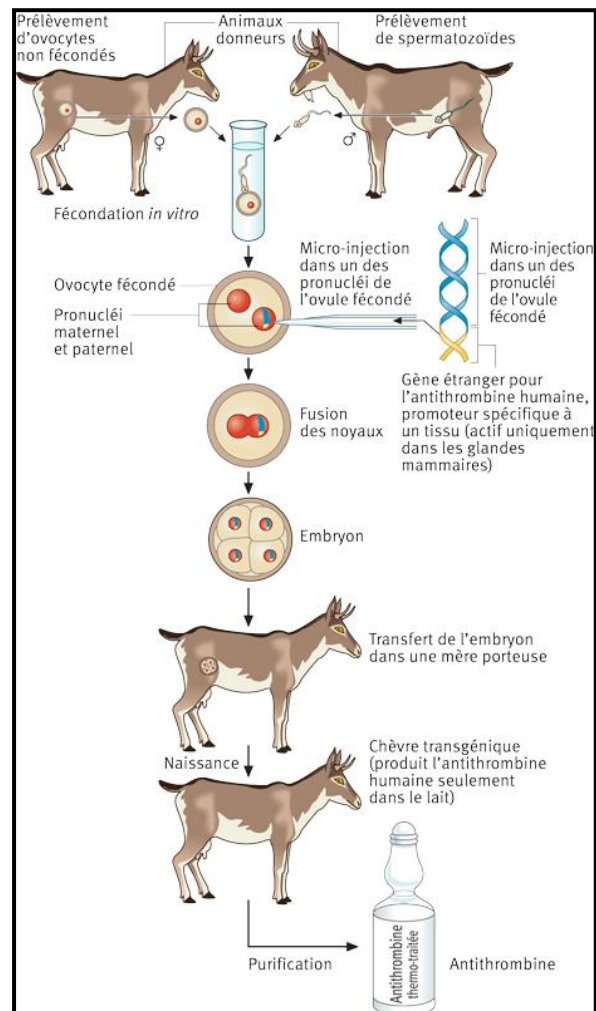


Figure 13 : Obtention de chèvre transgénique par la méthode de la micro-injection

L'antithrombine est le premier médicament produit par des animaux transgéniques qui a été autorisée en Europe, en 2008. Cette protéine plasmatique est un inhibiteur de la coagulation sanguin et protège les individus atteints d'un

déficit héréditaire antithrombine contre l'apparition de thrombose. Le gène pour l'antithrombine a été introduit dans le génome d'une chèvre. Il est couplé au promoteur d'un gène qui n'est exprimé que dans les glandes mammaires de chèvre. Par conséquent, l'antithrombine n'est exprimée que dans les glandes mammaires. Le médicament est finalement purifié à partir du lait de l'animal. Une chèvre transgénique peut produire chaque année autant d'antithrombine qu'on pourrait en extraire de 90'000 dons de sang.

La production de médicaments dans les animaux transgéniques est appelée **gene pharming**. Le gene pharming utilise principalement des moutons, des chèvres, des vaches et des porcs. Le taux de succès de la méthode est néanmoins très faible. Seul 1% des zygotes micro-injectés se développent en un animal qui possède le caractère désiré. En outre, moins de 10% de ces animaux portent le gène étranger dans leur lignée germinale et pourront le transmettre à leur descendance. La création d'animaux transgéniques vise aussi à produire un lait avec un meilleur rendement ou une viande de meilleure qualité.

### 3.3 Recherche chez l'être humain

Voir brochure « génie génétique ».

### 3.4 Thérapie génique

La thérapie génique vise à remplacer un **allèle mutant défectueux** (gène) par un allèle fonctionnel afin que la **cellule cible** produise une protéine fonctionnelle ou à surexprimer une protéine dont l'activité aurait un impact thérapeutique. Elle vise aussi à faire produire à une cellule infectée ou cancéreuse, un signal qui conduirait à la mort cellulaire.

Elle est basée sur la construction de **vecteurs** de transfert permettant l'administration de gènes thérapeutiques aux cellules cibles du patient.

La thérapie génique consiste donc à faire pénétrer des gènes dans les **cellules** ou les **tissus** d'un individu pour traiter une maladie. L'utilisation à l'origine de la thérapie génique visait surtout à corriger les **maladies héréditaires monogéniques**, telles l'hémophilie (trouble de la coagulation sanguine) ou les myopathies (maladie neuromusculaire se traduisant par une dégénérescence du tissu musculaire), mais les espoirs suscités par cette nouvelle technique se sont vite répandus aux maladies acquises, tels les cancers ou la maladie de Parkinson.

#### La thérapie génique en 4 étapes :

**1. Isoler et cloner le gène d'intérêt thérapeutique.**

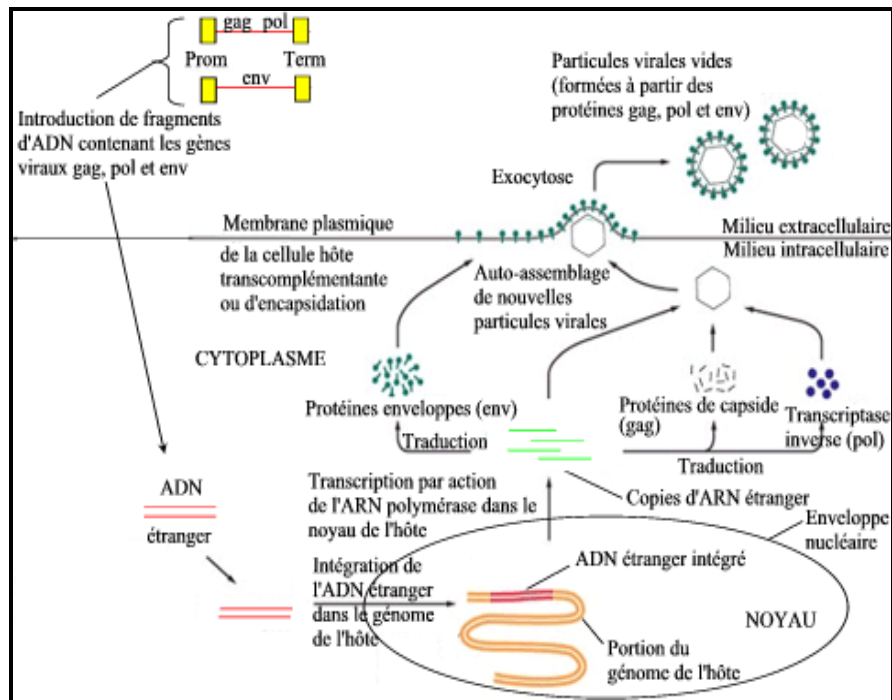
Les connaissances du génome humain permettent de réaliser cette étape sans difficulté.

**2. Réaliser un vecteur**

Il est chargé d'amener le transgène dans le noyau cellulaire. Il est impossible d'introduire efficacement un gène directement dans une cellule humaine. Pour y arriver il faut se servir d'un véhicule, appelé un vecteur. La plupart des vecteurs utilisés sont des virus vu que l'évolution de ces derniers vise justement à atteindre ce but, soit celui de livrer leur matériel génétiquement dans les cellules ciblées. On utilise des **virus qui sont transformés** : toutes les séquences nécessaires à sa répllication et à sa pathogénicité sont ôtées. On laisse les gènes nécessaires à la formation de l'enveloppe... Ainsi les vecteurs viraux génétiquement modifiés ne peuvent se reproduire ni infecter le patient.

*Comment procède-t-on en laboratoire pour produire des vecteurs viraux s'ils ont perdu la capacité de générer de multiples copies d'eux-mêmes ?*

Les chercheurs ont créé des cellules spéciales qui contiennent tous les gènes viraux nécessaires à la production de particules virales vides. Ces cellules sont appelées des **cellules d'encapsidation**. Une cellule modifiée d'encapsidation exprime donc de façon stable les protéines virales formant la capsidite, l'enveloppe et la transcriptase inverse. Ces cellules ne produisent donc que des particules virales vides.



*Figure 14 : Production de cellules d'encapsidation*

L'introduction dans ces cellules d'une construction génétique contenant le génome viral porteur du gène thérapeutique conduit à la formation de particules virales complètes contenant le gène thérapeutique. Cette cellule sera donc capable de fabriquer des quantités de particules virales inoffensives mais contenant le gène thérapeutique.

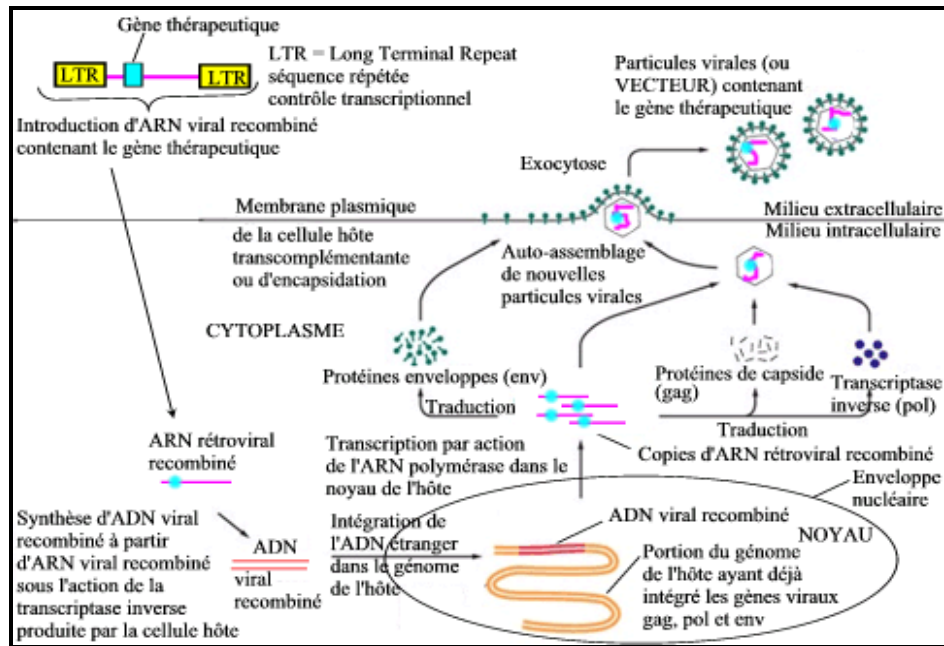


Figure 15 : Production de vecteurs viraux par les cellules d'encapsulation

Comment un virus ou un vecteur viral pénètre-t-il dans les cellules ?

- Pour infecter une cellule, la particule virale se fixe d'abord à la membrane cellulaire. Les gènes viraux sont libérés dans le noyau et, qu'ils soient intégrés ou non au génome cellulaire, ils utilisent la machinerie de réplication de la cellule pour produire de nouvelles particules virales. Ces dernières pourront aller infecter d'autres cellules.
- Lorsque le virus est modifié pour être utilisé comme vecteur de transfert, les gènes codant pour les protéines virales sont remplacés par le gène d'intérêt thérapeutique. Ce vecteur pénètre dans la cellule de la même façon que le virus naturel. Il permet la synthèse de la protéine d'intérêt thérapeutique, sans production de particules virales.

### 3. Administrer le vecteur selon un protocole

♣ **La thérapie génique « ex vivo » (in vitro)** : elle consiste à prélever sur le patient les cellules porteuses de gènes défectueux, à les cultiver, à les multiplier en cultures cellulaires et à les modifier génétiquement avec le vecteur viral porteur du gène d'intérêt thérapeutique, puis à les réintroduire chez le patient. Cette méthode est utilisée en particulier pour les cellules sanguines qui sont faciles à prélever et à réintroduire.

♣ **La thérapie génique in situ** : le vecteur de transfert est directement injecté au sein du tissu cible.

♣ **La thérapie génique « in vivo » ou directe** : elle consiste à injecter le vecteur portant le gène d'intérêt thérapeutique directement dans la circulation sanguine, celui-ci devant atteindre spécifiquement les cellules cibles.

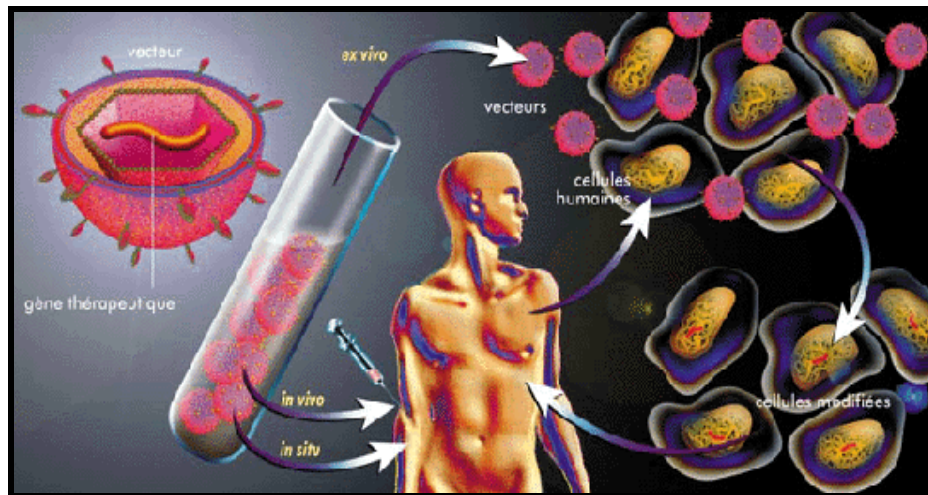


Figure 16 : Les différents protocoles

4. Vérifier l'intensité et la durée de l'expression du gène thérapeutique ainsi que les éventuels effets secondaires.

Aujourd'hui, l'évolution de la thérapie génique repose essentiellement sur le développement de systèmes de transfert de gènes : ils doivent être sûrs, efficaces, spécifiques à un type cellulaire et capables de fonctionner dans des cellules qui ne se divisent pas en assurant la stabilité de l'expression du gène d'intérêt thérapeutique. De plus, leur production industrielle doit être fiable et rentable.

### 3.4.1 Les vecteurs

Les vecteurs sont répartis en 2 catégories :

#### 3.4.1.1 Les vecteurs viraux

Ce sont des virus transformés : **rétrovirus** (pour les cellules de la moelle osseuse, en général pour les cellules qui se multiplient), **adénovirus** (pour les cellules des bronches, des muscles, du cerveau). Le virus doit d'abord être modifié pour qu'il ne provoque aucune infection, pour l'empêcher de se reproduire. On le modifie aussi en introduisant dans son génome le gène humain normal de la maladie que l'on veut traiter.

#### 3.4.1.2 Les vecteurs non viraux

Il en existe deux classes principales :

- ✓ **L'ADN plasmidique (ADN nu)** (contenant la séquence thérapeutique) est injecté sous forme de plasmide (molécule circulaire) dans le tissu cible. Il est ensuite intégré dans les cellules par des mécanismes encore inconnus.
  - *Avantages* : facilité et faibles coûts de production, de stockage et de contrôle-qualité ; faible immunogénicité, efficacité clinique démontrée pour le traitement d'atrophie des vaisseaux sanguins d'un membre.
  - *Inconvénients* : très courte durée d'expression dans la plupart des tissus, transduction inefficace *in vitro* et *in vivo*, difficultés pour en faire un vecteur plus spécifique.

L'ADN nu est un vecteur prometteur pour les patients atteints de problèmes cardiovasculaires car il semble efficace pour transférer le gène promoteur de l'angiogenèse. De plus, il peut avoir un rôle de vaccin en transférant en faible quantité une portion de gène d'un parasite (exemple, *Plasmodium falciparum*, agent de la malaria). En créant une réaction immunitaire primaire faible, il permet une meilleure protection en cas d'infection réelle.

- ✓ **Les liposomes** : L'ADN est une molécule chargée négativement, d'où l'idée de la complexer avec des molécules chargées positivement (lipides ou autres polymères). On insère le gène thérapeutique compacté dans une sphère formée par une double membrane lipidique, le tout étant chargé positivement. Un liposome est donc une minuscule vésicule creuse de molécule lipidique capable de véhiculer de l'ADN en elle. Ce liposome fusionne avec la membrane cellulaire après liaison aux protéines membranaires négatives et l'ADN est intégré par endocytose en évitant toute dégradation extracellulaire. L'ADN doit ensuite sortir de l'endosome et échapper aux lysosomes pour atteindre le noyau. Pour améliorer leur efficacité, les scientifiques tentent d'intégrer certaines protéines virales dans les surfaces extérieures des liposomes, en particulier les protéines virales qui reconnaissent certaines molécules à la surface de la cellule hôte et s'y lient.
  - *Avantages* :  
Facilité de production, contrôle qualité et stockage ; transfection efficace *ex vivo* ; faible réponse immunitaire, sécurité pour le patient (pas d'effet secondaire).
  - *Inconvénients* :  
Faible taux d'insertion de l'ADN thérapeutique, transfection inefficace *in vivo* ; très courte durée d'expression.

Ils sont peu immunogènes, ce qui autorise les administrations répétées, n'ont pas de limite théorique quant à la taille du gène d'intérêt.

### 3.4.2 Les méthodes physiques

- ✓ **L'électroporation** : de l'ADN plasmidique est injecté dans le tissu cible (par exemple le muscle de la patte d'une souris) puis on applique 2 plaques d'acier contre la patte qui servent ainsi d'électrodes. On envoie ensuite des impulsions électriques répétées, en essayant de trouver les fréquences et intensité correspondant au meilleur transfert. En effet, cette méthode permet une transduction 100 fois plus efficace qu'une simple injection car elle rend la membrane momentanément poreuse et semble "attirer" l'ADN vers l'intérieur de la cellule.
  - *Avantages* :  
Transduction améliorée *in vitro* dans les cellules de la peau et de tumeurs chez la souris.
  - *Inconvénients* :  
Cellules non viables à l'issue de cette méthode, un seul essai clinique.



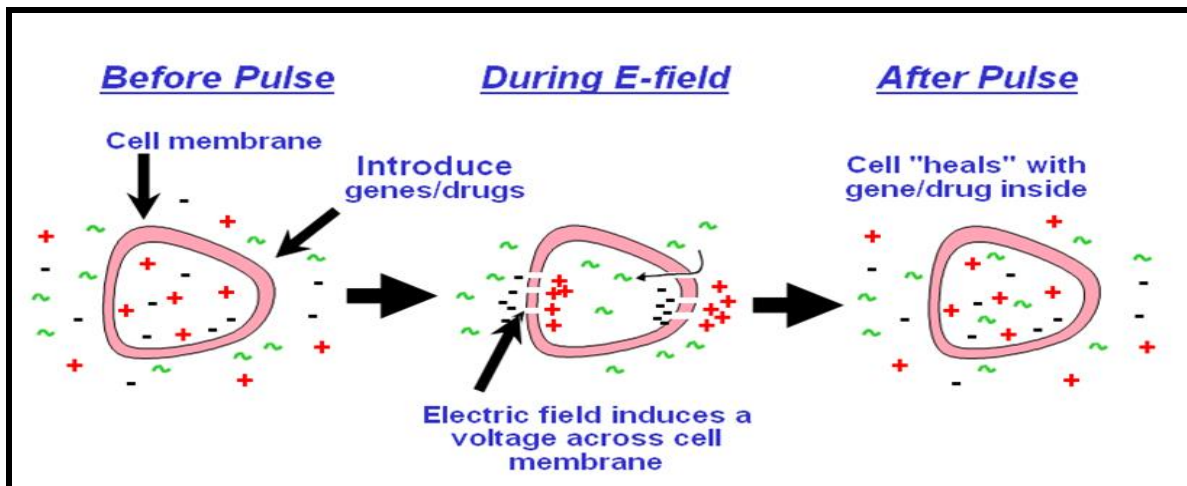


Figure 17 : l'électroporation

### 3.4.3 Les applications

Le **premier cas de thérapie génique** remonte à **1990** aux Etats-Unis, chez une fillette de quatre ans qui souffrait d'une **immunodéficience congénitale**. Cette maladie est due à une anomalie d'un gène qui code pour l'enzyme adénosine désaminase (ADA). En l'absence de cette enzyme, des produits de dégradation nocifs s'accumulent dans le sang, ce qui entraîne la destruction de cellules importantes du système immunitaire. Toute infection devient alors potentiellement mortelle. Grâce à la thérapie génique, les enfants atteints ont pu être guéris. Toutefois, quelques-uns développèrent par la suite une leucémie, à la suite de quoi les traitements furent stoppés. Cet exemple montre à quel point il est important de peser soigneusement les avantages et les inconvénients avant toute thérapie génique. Depuis lors, les interrelations ont été analysées, et des améliorations ont été apportées au traitement.

En *décembre 1999*, après des années de recherches et de doutes, est survenu le premier succès probant par l'équipe du professeur Alain Fischer de l'hôpital Necker (Paris). En effet, des "**enfants bulles**" (vie dans un environnement stérile), c'est-à-dire atteints d'une grave maladie génétique du système immunitaire combinée sévère (DICS) liée au chromosome X (5 cas / 800'000 naissances), ont pu être soignés, par la thérapie génique. Cet essai consistait à prélever des cellules souches de la moelle des patients, d'y introduire un gène fonctionnel en laboratoire, puis de les réinjecter à ces mêmes patients. Ainsi, ces enfants étaient capables de se défendre contre les antigènes extérieurs par l'expression du gène introduit.

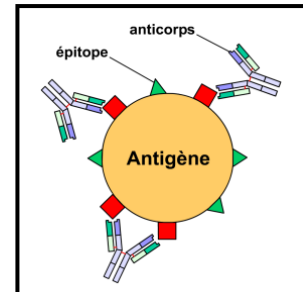
Au cours des quinze dernières années, la thérapie génique a connu de nombreuses améliorations. On n'en continue pas moins encore de chercher le taxi génétique idéal. L'un des défis à relever porte sur l'introduction des gènes thérapeutiques dans la cellule somatique. De plus, l'intégration dans le génome ne doit pas retentir sur la fonction d'un autre gène. Il existe aujourd'hui des traitements qui réussissent en faisant appel à des taxis génétiques sans virus. Exemple : le traitement de la gangrène sénile. Dans cette maladie, les vaisseaux sanguins des jambes s'obstruent, ce qui entraîne la nécrose des tissus. Dans le traitement par thérapie génique, on injecte directement dans le muscle un gène synthétisant un facteur de croissance de l'endothélium vasculaire. Des études montrent que, grâce à ce type de thérapie génique, le nombre d'amputations de la jambe qui étaient nécessaires a été divisé par deux. Jusqu'à présent, quelques 6000 personnes ont été traitées à l'échelle mondiale dans le cadre de projets de recherche menés avec des thérapies géniques.

### 3.5 Vaccins et anticorps

*La fusion cellulaire* (entre une cellule cancéreuse et un lymphocyte) a par exemple permis, entre autres, la production d'**anticorps monoclonaux**. Cette hybridation (qui donne naissance à des *hybridomes*) est très courante dans la recherche et permet d'obtenir des lignées rendues comme « immortelles » grâce à la fusion avec des cellules cancéreuses.

Les anticorps monoclonaux sont des anticorps issus d'un seul clone de plasmocytes, reconnaissant qu'un seul type d'**épitope** sur un antigène donné, donc très spécifique.

Désormais, on n'obtient plus des populations d'anticorps différents (en prenant le sérum d'un animal immunisé par exemple) dirigés contre une multitude d'éléments caractéristiques de la protéine (de l'antigène), mais on peut, par cette technique, isoler des anticorps dirigés contre un seul épitope et pas un autre ; comme si, au lieu de reconnaître l'ensemble d'un visage, un système de détection reconnaissait le coin d'un œil, une ride de la joue ou la forme d'une oreille.



Produire des anticorps monoclonaux *in vitro* a longtemps été difficile, en raison de la faible durée de vie des cellules sécrétrices d'anticorps, les plasmocytes. Les anticorps étaient alors obtenus *in vivo* en injectant chez l'animal un antigène donné et en recueillant les anticorps dans son sang. Cette méthode coûteuse ne donnait qu'une faible quantité d'anticorps, pollués par de nombreuses impuretés. A la fin des années 1970, César Milstein et Georges Köhler ont développé **la technique des hybridomes**. L'antigène est injecté chez l'animal, et des cellules de rate en sont prélevées après quelques semaines. Dans ces cellules se trouvent des plasmocytes sécrétant des anticorps dirigés spécifiquement contre l'antigène choisi. Ces plasmocytes sont alors fusionnés *in vitro* avec des myélomes, qui sont des cellules tumorales ayant la propriété de se multiplier indéfiniment. Les cellules hybrides obtenues (dites « *hybridomes* ») sont sélectionnées.

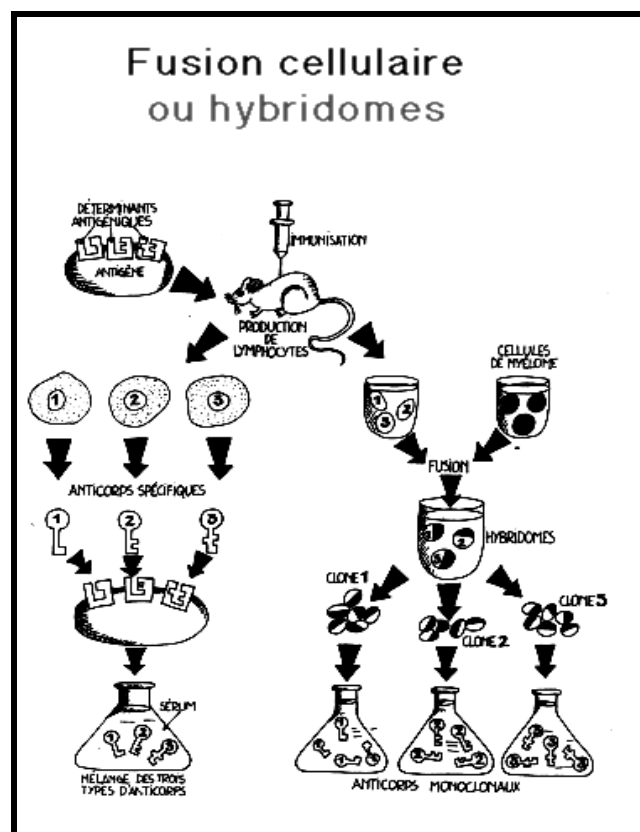


Figure 18 : Les hybridomes

## La sélection des hybridomes :

Après la fusion cellulaire, il y a **trois catégories** de cellules :

- 1) Les cellules de myélome non fusionnées ou fusionnées entre elles.
- 2) Les plasmocytes non fusionnés ou fusionnés entre eux.

### 3) Les hybridomes

Il faut donc sélectionner les hybridomes. Cette sélection se fait sur un milieu de culture spécifique, milieu HAT (Hypoxanthine Aminoptérine Thymidine) car les cellules cancéreuses (cellules de myélome) utilisées sont des cellules qui, par sélection génétique, ont perdu la faculté de produire une enzyme impliquée dans la synthèse de nucléotide. Sans cette enzyme, la cellule ne peut pas vivre dans ce milieu.

Après quelques jours de culture :

- Les cellules de myélome qui n'ont pas fusionné meurent.
- Les plasmocytes qui n'ont pas fusionné meurent car leur espérance de vie est limitée.
- Les hybridomes sont les seules cellules qui peuvent survivre dans ce milieu.

Une fois les hybridomes sélectionnés, il faut sélectionner les anticorps monoclonaux. Pour cela :

1. On isole au hasard quelques hybridomes que l'on met en culture séparément sur une plaque contenant des puits (un hybridome par puit).
2. On laisse les cellules se diviser pendant quelques jours. On obtient un clone d'hybridomes dans chacune des puits et chaque clone produit un type d'anticorps (anticorps monoclonaux).
3. Les anticorps monoclonaux se trouvent dans le surnageant de chaque puit.
4. Il faut ensuite vérifier la compatibilité des anticorps avec l'antigène.

Le génie génétique permet aujourd'hui de produire des anticorps monoclonaux utilisables en pratique clinique humaine. Mais la plupart des anticorps étant produits dans des cellules de rongeurs (souris, rat, hamster, lapin), ils déclenchent une réaction immunitaire lors de leur injection à un patient. Cette immunité inactive progressivement l'action bénéfique de l'anticorps. Pour éviter cela, on cherche à produire des anticorps chimériques "humanisés", modifiés par génie génétique pour remplacer au maximum les fragments constants de l'espèce d'origine par des fragments humains.

Les applications des anticorps monoclonaux sont nombreuses. Ils sont très largement utilisés à la fois comme outils de diagnostic et dans des buts thérapeutiques. Dans le domaine du diagnostic, ils permettent, par exemple, de détecter la présence de virus (hépatite B, herpès ou SIDA), de bactéries ou de cellules tumorales. Couplés à des toxines puissantes, ils permettent de détruire sélectivement des cellules malades. On peut les cultiver pour occuper la place d'un agent infectieux, sur son récepteur cellulaire, et lui fermer ainsi la porte d'entrée des cellules.

On estime qu'un tiers des entreprises de biotechnologie dans le monde commercialise des produits à base d'anticorps monoclonaux.

### **3.6 Méthodes de dépistage**

Voir brochure « Le génie génétique »

### **3.7 Hérité**

Voir brochure « Le génie génétique »

### **3.8 Tests génétiques**

Voir brochure « Le génie génétique » + PowerPoint n° 8 cours Médecine partie II

### **3.9 Médecine de procréation (vue en DF3)**

La procréation médicalement assistée est l'ensemble des méthodes permettant d'induire une grossesse en dehors de l'union naturelle de l'homme et de la femme, en particulier **l'insémination artificielle**, la **fécondation in vitro avec transfert d'embryons (FIVETE)** et la **fécondation par micro-injection**.

Louise Brown, de nationalité britannique, née le 25 juillet 1978 est le premier « bébé éprouvette » au monde, c'est-à-dire conçu par fécondation in vitro (FIV). La naissance de Louise a ouvert un nouveau chapitre de la médecine relatif au traitement de la stérilité. Depuis cette naissance, les techniques de procréation médicalement assistée se sont banalisées.

### 4.1 Génie génétique vert

#### 4.1.1 Obtentions végétales

##### 4.1.1.1 Transfert indirect

*Agrobacterium tumefaciens* est une bactérie qui induit une tumeur chez les plantes qu'elle infecte. Lors de l'infection de la plante, cette bactérie détourne le métabolisme de la cellule végétale à son profit (figure 19a et 19b). Ce piratage cellulaire est le fruit d'une véritable opération de génie génétique. La bactérie possède en plus de son unique chromosome un plasmide appelé plasmide Ti (figure 20). Lorsqu'une plante est blessée, ses cellules libèrent des composés qui induisent l'expression des gènes de virulence du plasmide Ti (figure 21). Les protéines synthétisées permettent le transfert d'un fragment du plasmide vers le noyau de la cellule végétale où il est intégré au génome. Les gènes de l'ADN du plasmide sont alors exprimés et ils codent pour la synthèse de facteurs de croissance des végétaux. Lorsque leur concentration est trop élevée, cela entraîne des divisions cellulaires incontrôlées et la formation d'une tumeur.

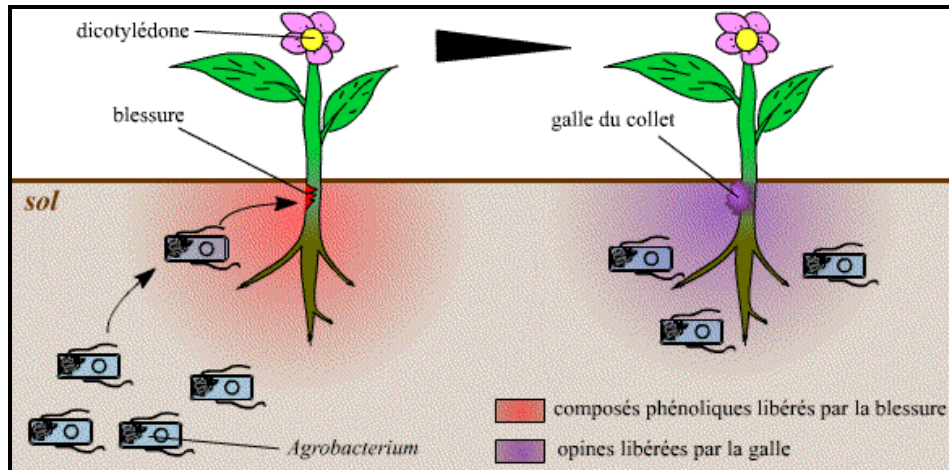


Figure 19a : Infection d'une plante par *Agrobacterium tumefaciens*

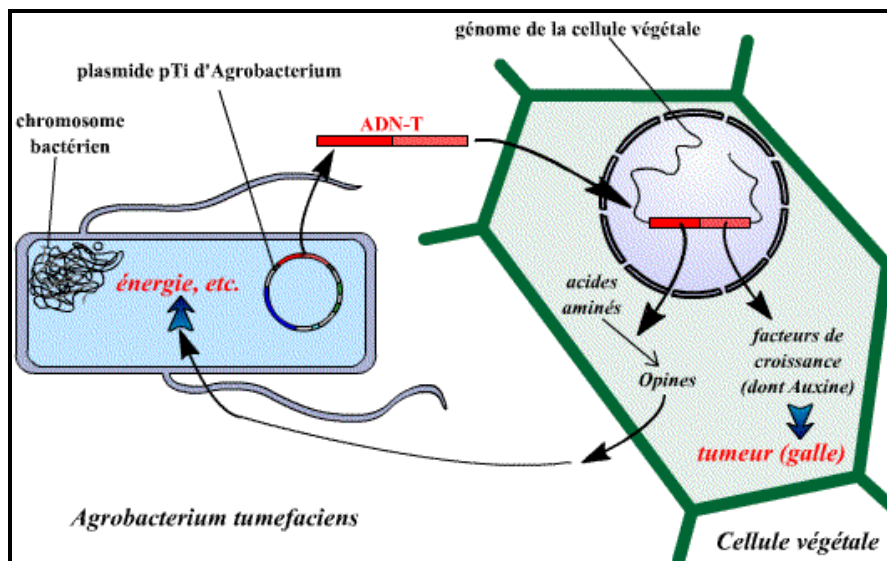


Figure 19b : Infection par *Agrobacterium tumefaciens*

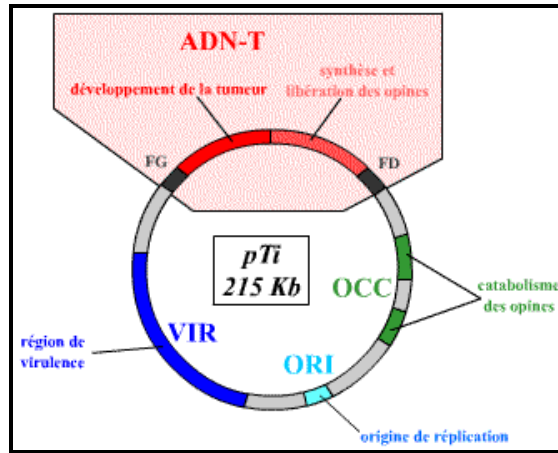


Figure 20 : Plasmide Ti

L'idée est donc de modifier cette bactérie. L'ADN du plasmide Ti est remplacé par un gène d'intérêt qui code pour les protéines qu'on veut faire produire à la plante puis on cultive cette dernière avec des fragments de plantes (fragment de feuille, de tige, embryon...) (figure 21a et 21b). Le gène d'intérêt sera alors intégré dans la plante. Les cellules transformées sont alors cultivées pour donner un cal (amas de cellules non différenciées) (figure 22).

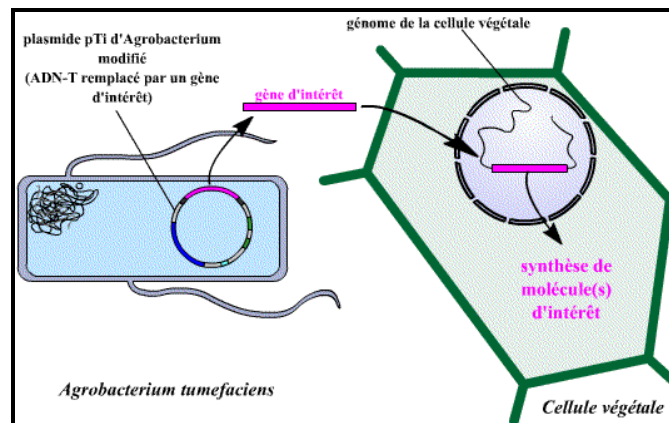


Figure 21a : Modification d'Agrobacterium tumefaciens

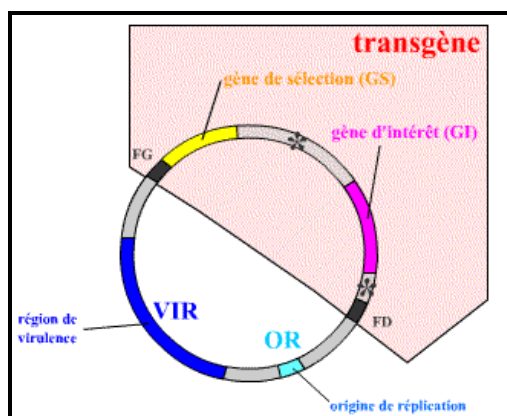


Figure 21b : Modification du plasmide Ti

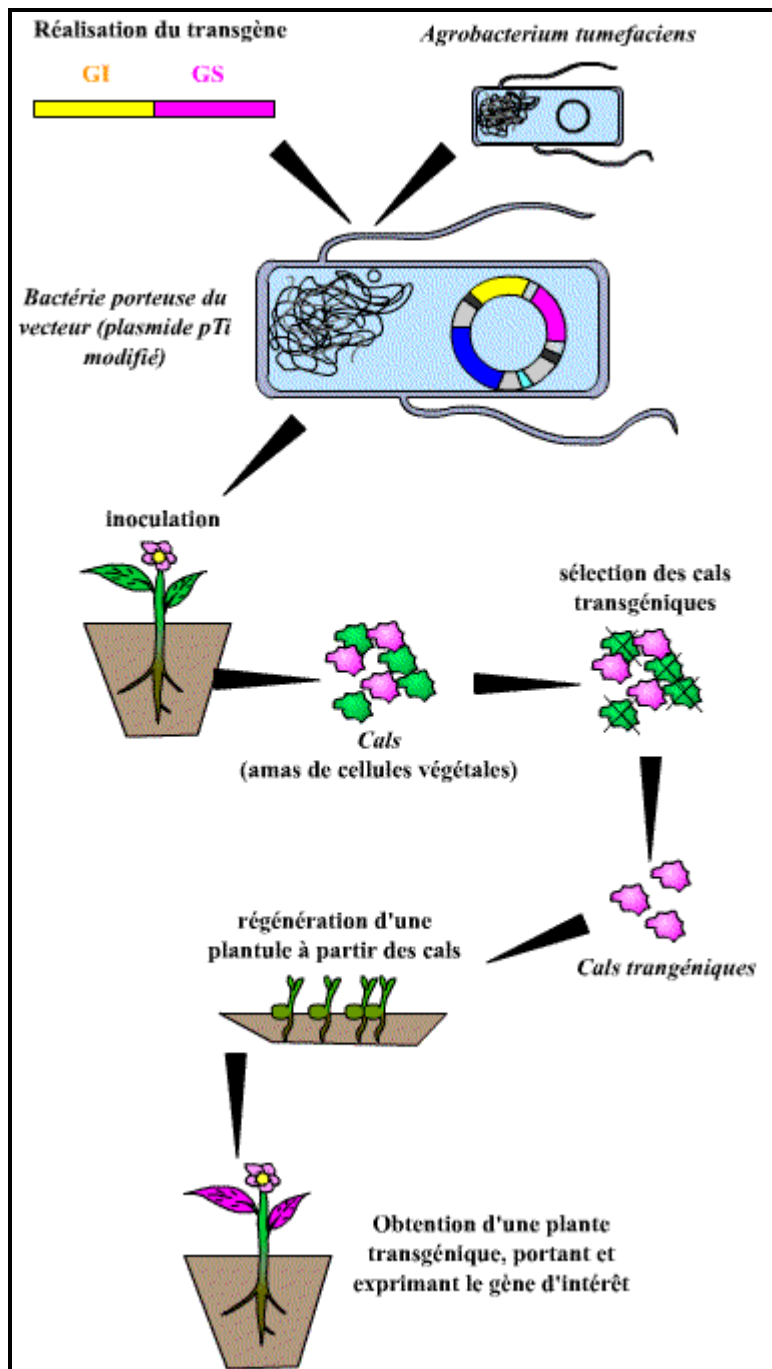


Figure 22 : Développement de plantes transgéniques

Le tabac fut la première plante dans laquelle on a inséré un gène étranger, avec *Agrobacterium tumefaciens* comme moyen de transfert de gène. Le gène inséré permet au tabac de résister à certaines chenilles qui dévorent les plantes de tabac jusqu'à la tige. Cette méthode de transfert a été ensuite élargie à de nombreux autres végétaux : tomate, pomme de terre, salade pommée, soja, céleri, lin, coton, betterave, asperge, pommier, noyer, peuplier.

A l'énumération des végétaux modifiés par génie génétique à l'aide d'*Agrobacterium tumefaciens*, on s'aperçoit qu'il n'y a pas de céréales. *Agrobacterium tumefaciens* n'induit donc pas de tumeurs chez toutes les plantes. Il a donc fallu élaborer une autre méthode pour modifier les céréales.

#### 4.1.1.2 Transfert direct

La première méthode de transfert direct fut l'introduction mécanique d'ADN dans des **protoplastes** (cellules végétales dont on a ôté la paroi cellulosique). La cellule peut alors être facilement transformée par des techniques chimiques ou physiques :

- **Le polyéthylèneglycol (PEG)**, qui est un agent chimique possédant la faculté de déstabiliser la membrane plasmique des protoplastes, permettant ainsi la pénétration des molécules d'ADN.

- **L'électroporation**, plus délicate à maîtriser, consiste à appliquer de courts chocs électriques de fort voltage aux protoplastes, ce qui permet l'ouverture de pores facilitant le passage de l'ADN (figure 23). Le principal problème de ces deux méthodes est la faible capacité de régénération des protoplastes ainsi que le risque de voir apparaître un transfert de plusieurs copies, ce qui entraînera des répercussions sur la stabilité de l'insert ou de son expression.

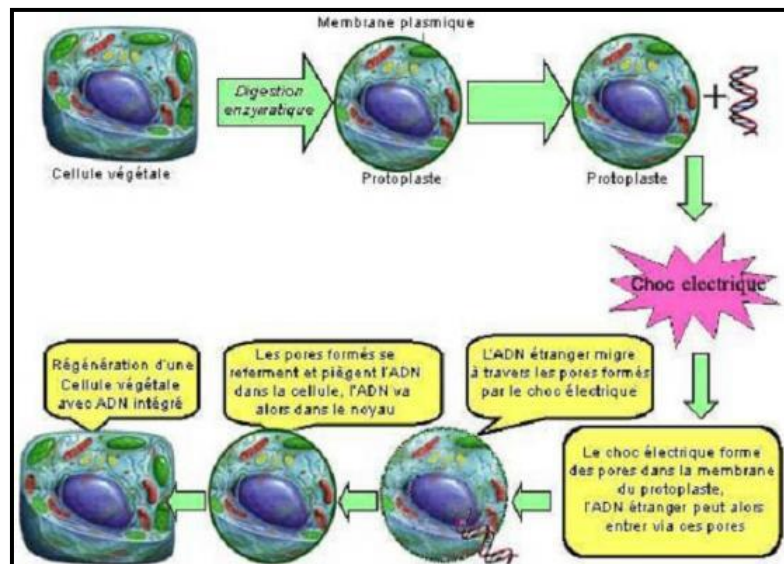


Figure 23 : L'électroporation

- **La microinjection** est une autre méthode de transfert physique, basée sur l'utilisation de microseringues manipulées sous microscope et permettant l'introduction directe de molécules, voire d'organites entiers, dans des cellules isolées (figure 24). Cependant, cette méthode ne s'applique que dans des cas particuliers car elle est complexe et lourde à utiliser.

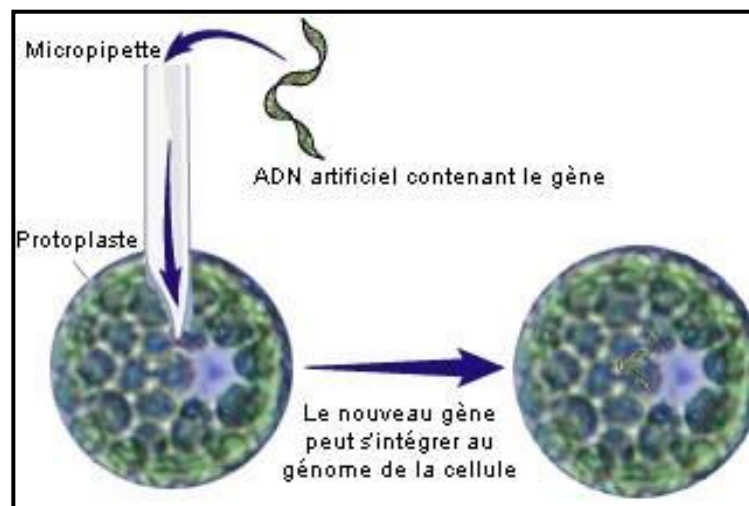


Figure 24 : La microinjection

- Le "**canon à gènes**", également appelée **méthode biolistique** est la technique la plus couramment utilisée. Cette méthode consiste à propulser le transgène à l'intérieur de cellules végétales, isolées ou appartenant à un tissu ou à un organe. Les constructions moléculaires sont adsorbées à la surface de projectiles microscopiques (billes d'or de 0,6 à 2 µm de diamètre), qui seront bombardés sur les cellules végétales (figure 25). Ces billes seront progressivement freinées en traversant les différentes couches



cellulaires. Quelques unes des cellules atteintes vont alors insérer spontanément les transgènes dans leur génome. La biolistique a ainsi été employée sur de nombreuses espèces végétales : blé, maïs, riz, soja, tabac.

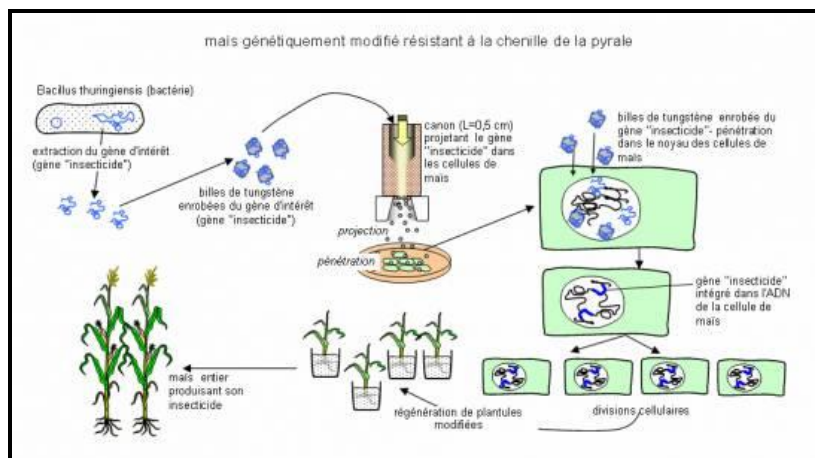


Figure 25 : La méthode biolistique

#### 4.1.1.3 Applications des protoplastes

##### *L'hybridation somatique.*

La propriété la plus importante des protoplastes est leur capacité à fusionner entre eux lorsqu'ils sont placés dans un milieu approprié. Cette technique permet de surmonter **les barrières liées à la reproduction sexuée et de créer de nouvelles combinaisons entre noyau et cytoplasme**. Le but de telles expériences est de créer des plantes à très grande productivité, combinant plusieurs qualités : résistances supplémentaires, et à l'avenir fixation d'azote atmosphérique.

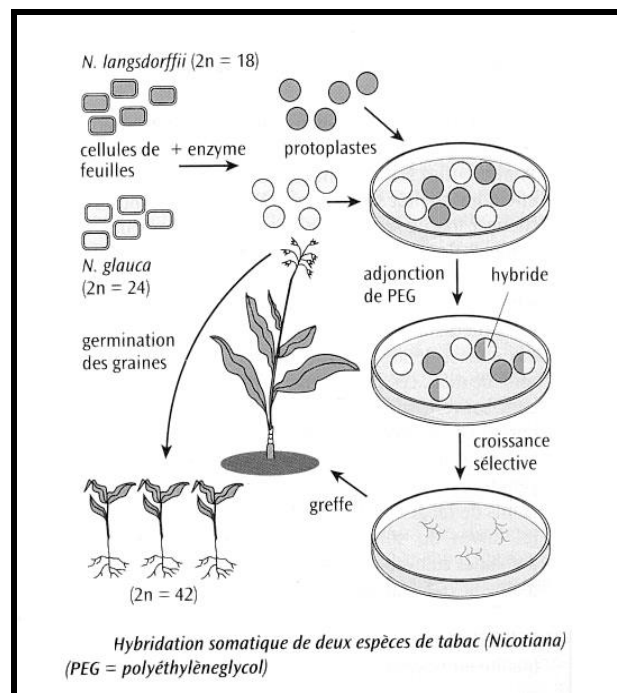


Figure 26 : L'hybridation somatique

Cette technique d'hybridation est illustrée par le tabac (ci-dessus). Des cellules des feuilles (riches en chloroplastes) de deux sortes de tabac sont traitées par des enzymes qui dissolvent la paroi cellulaire.

Les protoplastes qui en résultent sont placés dans une solution de polyéthèneglycol qui diminue la tension superficielle, ce qui facilite la fusion. Après centrifugation, les cellules sont placées sur un milieu de culture spécial sur lequel seules les cellules hybrides vont se multiplier. Plus tard, elles se différencieront en tige et feuilles. On les greffe alors sur un des plants parents. Les graines de ces hybrides germent, se développent en jeunes pousses puis en plantes adultes. Dans ces dernières, les génomes des deux plantes de départ sont présents.

La première démonstration de fusion entre des protoplastes différents, remonte aux travaux de Melchers en 1978. Il recherchait des tomates cultivables à basse température et réalisa, à cette fin, des hybrides entre la tomate et la pomme de terre par fusion de protoplastes : la pomate. Cette nouvelle espèce est malheureusement un exemple théorique, car elle est stérile.

La pomme de terre cultivée (*Solanum tuberosum*) est une espèce chez laquelle l'introduction de caractères par fusion de protoplastes est facilement réalisable. Ainsi, on a pu introduire des gènes de résistance à certains virus, au mildiou et à la pourriture bactérienne, à partir des espèces sauvages d'Amérique du Sud, notamment *Solanum brevidens*.

Au cours de la reproduction sexuée, les informations génétiques contenues dans le cytoplasme (mitochondrie) sont transmises par la mère. En revanche, la fusion de protoplastes conduit à une hybridation des noyaux, mais aussi à celle des cytoplasmes. Ceci est très intéressant pour le transfert et l'amélioration de caractères à hérédité cytoplasmique, comme la stérilité mâle. On parle alors d'hybridation somatique (car issue de cellules non reproductrices de la plante).

Les protoplastes sont des cellules chargées négativement et la fusion spontanée n'est que très rarement observée. La fusion peut être obtenue de deux manières :

- Grâce à **divers agents chimiques** (cations  $\text{Ca}^{2+}$  et pH élevé) on peut neutraliser la charge électrique des protoplastes. On utilise ensuite le polyéthylène glycol (PEG) qui provoque une forte agrégation des cellules et déstabilise la membrane plasmique. Après retour aux conditions initiales, les protoplastes fusionnent.
- **L'électrofusion**, plus récente, utilise des champs électriques intenses et de courte durée, qui en déstabilisant les membranes entraînent la fusion des protoplastes. Ce système semble être plus efficace.

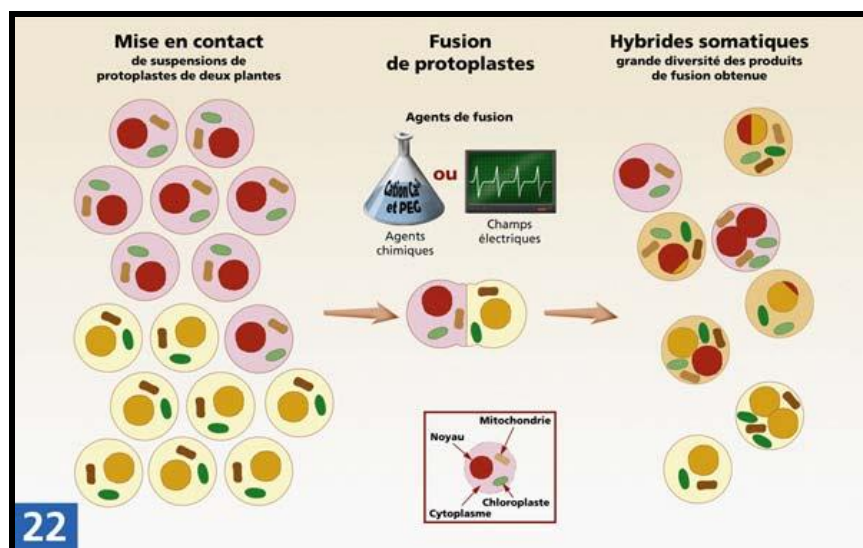


Figure 27 : Techniques de fusion des protoplastes

Lors de la fusion, tous les échanges sont possibles entre deux protoplastes. On peut ainsi obtenir des degrés de fusion très variables :

- **Fusion des noyaux et des cytoplasmes** : lorsque la fusion des noyaux a lieu, il peut y avoir une recombinaison plus ou moins importante entre les chromosomes des deux parents. Ce phénomène peut être utilisé pour transférer des gènes nucléaires. On cherchera notamment à obtenir des hybrides somatiques asymétriques, où seuls quelques fragments d'ADN du parent donneur seront introduits dans l'espèce receveuse. En effet, les cas de fusion importante de génomes entre espèces conduisent à des plantes souvent stériles comme la pomate. Pour favoriser ce transfert partiel, l'ADN du parent donneur est déstabilisé par irradiation ménagée des protoplastes avant la fusion.
- **Fusion unique des cytoplasmes : les cybrides** : très souvent, la fusion des noyaux n'a pas lieu et au cours des divisions successives, il ne subsistera que l'un des noyaux parentaux. Celui-ci sera associé à un cytoplasme composite ou recombiné. Il contient les organites cytoplasmiques de l'un ou l'autre parent. On constate souvent une recombinaison des mitochondries. En revanche, les chloroplastes de l'un des deux parents sont souvent éliminés. Il y a alors modification des relations nucléo-cytoplasmiques. L'obtention de ces cybrides peut être également provoquée. On utilise dans ce cas des doses létales d'irradiation pour les cellules du parent donneur, afin d'inactiver complètement le noyau. Seuls seront transférés ses mitochondries et ses chloroplastes. Le parent receveur peut en plus être traité à l'iodo-acétate, entraînant le blocage de ses organites. Ainsi, les cybrides issus de la fusion seront constitués du noyau du parent receveur et des organites du parent donneur.

Les caractères sous la dépendance de l'ADN mitochondrial ou chloroplastique ne sont pas à négliger. La résistance aux herbicides est codée par exemple par l'ADN chloroplastique.

Les hybrides retenus :

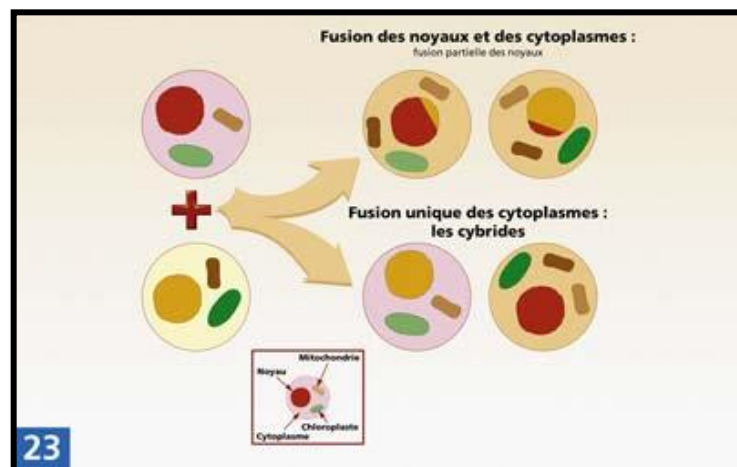


Figure 28 : Les différents hybrides obtenus

## 5 CLONAGE D'ORGANISME

Le clonage est la production d'individus génétiquement identiques. L'ensemble de ces individus génétiquement identiques forme un clone.

Dans le domaine végétal, le clonage est un phénomène naturel de reproduction (la reproduction par fragmentation des lentilles d'eau, par stolons des fraisiers, par tubercules des pommes de terre, par bulbe des jonquilles n'est rien d'autre que du clonage) qui accompagne la reproduction sexuée. C'est cette propriété naturelle de multiplication à l'identique qui a été mis à profit dans le bouturage, le marcottage.

Dans le domaine animal, le clonage est aussi un phénomène naturel de reproduction qui accompagne la reproduction sexuée, mais dans une moindre mesure (division, bourgeonnement, parthénogenèse). Chez l'homme, le clonage naturel touche uniquement les jumeaux monozygotes (vrais jumeaux provenant d'un seul œuf fécondé).

### 5.1 Techniques

#### 5.1.1 Le clonage par scission d'embryon

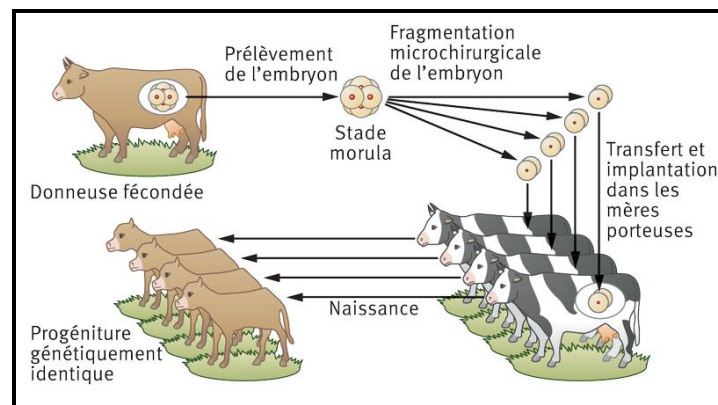


Figure 29 : Clonage par fragmentation d'embryons

#### 5.1.2 Le clonage par transfert de noyau de cellule somatique

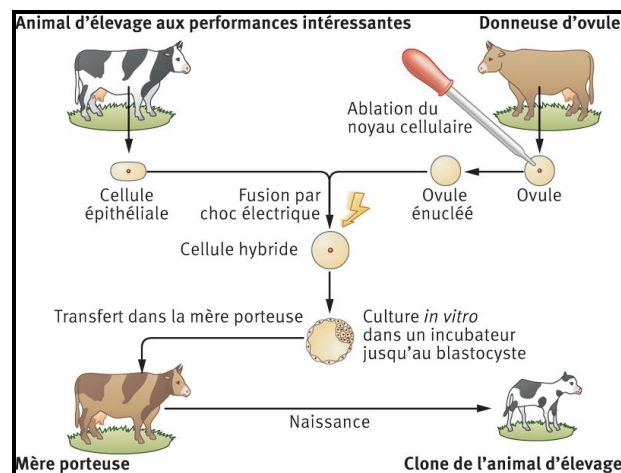


Figure 30 : Transplantation de noyau somatique

En réalité, les clones obtenus ne sont pas rigoureusement génétiquement identiques. En effet, les ovules énucléés contiennent de l'ADN extra-chromosomique (mitochondrial dans ce cas) : les clones obtenus possèdent l'ADN nucléaire du donneur de cellules (embryon, fœtus, ou individu) et de l'ADN mitochondrial de la donneuse d'ovules.

La naissance de la brebis **Dolly**, en Écosse (1996), a causé un émoi sur toute la planète. Dolly est le **premier Mammifère** à avoir été cloné à partir d'une cellule d'un animal adulte. Depuis 1986, il était possible de cloner des cellules d'embryons de moutons, mais pas de cellules d'adultes.

Il est plus facile de cloner des cellules d'embryons que des cellules d'adultes. En effet le destin de la cellule prélevée dans le pis de la brebis est de contribuer à fabriquer du lait. C'est ce qu'on appelle une cellule différenciée, spécialisée pour remplir une tâche précise, comme une autre cellule fabriquera de l'insuline. Dans ces cellules, l'ADN comporte des marqueurs qui dirigent l'expression de l'embryon, au tout début de son développement, la différenciation n'est pas encore survenue et ces cellules sont dites non différenciées.

Le Dr Wilmut a fusionné près de 1000 cellules de pis et d'ovules. Moins du tiers ont survécu (277), 29 se sont développées suffisamment pour être transplantées dans l'utérus de 13 brebis. Dolly est la seule naissance qui a résulté de cette expérience.

Par contre, personne ne peut dire si la cellule de pis qui est à l'origine de Dolly était une cellule différenciée. Il est en effet possible que des cellules, même chez des individus adultes, n'aient pas encore de destin précis.

La naissance de Dolly fut annoncée de façon triomphale par ses réalisateurs. Or, les échecs qui surviennent ne font pas autant de bruit. La population est toujours très bien informée des progrès scientifiques, mais très peu des échecs. Ainsi, plus de deux clones sur cinq sont voués à l'échec et meurent prématurément.