

CHAPITRE 17

La biotechnologie

Aperçu du chapitre

- 17.1 L'ADN recombinant
- 17.2 Amplification de l'ADN par la réaction en chaîne de la polymérase
- 17.3 Création, correction et analyse de la variation génétique
- 17.4 Construction et utilisation d'organismes transgéniques
- 17.5 Applications environnementales
- 17.6 Applications médicales
- 17.7 Applications à l'agriculture

Introduction

La biotechnologie implique la manipulation de systèmes biologiques pour l'obtention de produits utiles ou pour l'amélioration de processus environnementaux, médicaux ou agricoles. Il ne s'agit cependant pas d'une entreprise humaine nouvelle. L'utilisation de levure commerciale pour la production du pain levé remonte à l'Égypte ancienne et la production de vin par fermentation l'a probablement précédée de plusieurs milliers d'années. La biotechnologie moderne combine les découvertes récentes de la biologie moléculaire et de la génétique à des technologies plus traditionnelles, comme la sélection et l'hybridation. Elle ne serait cependant pas possible sans les progrès réalisés dans d'autres disciplines. Le perfectionnement des ordinateurs a accéléré le séquençage des génomes et les progrès de l'ingénierie chimique ont permis à la nanotechnologie de quitter le domaine de la science fiction.

Dans ce chapitre, nous explorons la biotechnologie moderne en envisageant d'abord les progrès de la biologie moléculaire et de la génétique, comme l'utilisation des plasmides et d'autres techniques de l'ADN recombinant. Nous verrons ensuite comment la biotechnologie peut résoudre des problèmes importants pour la société dans l'environnement, la médecine et l'agriculture.

17.1 L'ADN recombinant

Objectifs

1. Décrire comment on utilise les endonucléases de restriction et les ligases pour l'obtention d'ADN recombinant.
2. Expliquer comment on peut séparer les fragments d'ADN par électrophorèse en gel et quand celle-ci est utile.
3. Décrire la construction et les applications des banques d'ADN recombinant.

La biotechnologie n'est pas nécessairement une discipline du 20^e siècle. Par exemple, la première domestication des chiens à partir des loups par nos ancêtres chasseurs-cueilleurs, il y a quelque 15 000 ans, et ensuite leur sélection, ont abouti aux 180 races actuelles. Plus tard, nos ancêtres agriculteurs ont commencé à domestiquer les plantes, et le développement du maïs hybride au début du 20^e siècle a notablement augmenté les rendements. Les découvertes récentes en biologie moléculaire et en génétique ont ouvert les portes d'une ère moderne d'innovation et de découverte en biotechnologie. La possibilité d'isoler et de manipuler l'ADN a révolutionné la biotechnologie, accéléré les découvertes et permis de nouvelles applications. La construction de l'**ADN recombinant**, molécule unique construite à partir de deux sources différentes, a débuté au milieu des années 1970.

En 1972, Paul Berg créait la première molécule d'ADN recombinant en insérant un ADN viral dans l'ADN bactérien. En 1973, se basant sur les travaux de Berg, Herbert Boyer et Stanley Cohen introduisirent des gènes d'un crapaud, *Xenopus laevis*, dans des bactéries et montrèrent que les gènes pouvaient passer de génération en génération et s'exprimaient dans les bactéries. C'était la preuve incontestable que les gènes d'animaux à reproduction lente pouvaient se répliquer et s'exprimer dans des bactéries à croissance beaucoup plus rapide. Au cours des trois décennies suivantes, les découvertes de Berg, Boyer et Cohen devaient être à la base de biotechnologies allant du séquençage de génomes complets à la production d'insuline par les bactéries.

Les endonucléases de restriction coupent l'ADN à des sites spécifiques

Ces expériences de clonage furent parmi les premières à utiliser les nouveaux outils que sont les enzymes de restriction. Fruits d'une recherche de base sur la manière dont peut être limitée la gamme d'hôtes d'un virus bactérien, ces enzymes reconnaissent des séquences spécifiques d'ADN et fonctionnent comme nucléases pour couper l'ADN. Identifiée à l'origine par Werner Arber alors qu'il étudiait le phénomène de restriction d'hôtes, la première enzyme coupant l'ADN à son site de reconnaissance fut isolée par Hamilton Smith à partir de la bactérie *Haemophilus influenzae*, et pour cela, appelée HindIII. Arber, Smith et Daniel Nathans se partagèrent, en 1978, le prix Nobel de physiologie et médecine pour

ce travail. La découverte des endonucléases de restriction est importante pour deux raisons. D'abord pour leur faculté de couper l'ADN en fragments spécifiques et, en second lieu, pour leur utilisation dans la création des cartes de génomes (voir chapitre 18).

Comment fonctionnent les endonucléases de restriction

Il existe trois types d'enzymes de restriction, mais seul le type II agit à des endroits précis, permettant la création de molécules recombinantes. Ces enzymes reconnaissent une séquence d'ADN spécifique, longue de 4 à 12 bases, et coupent l'ADN au niveau d'une base particulière de cette séquence (figure 17.1). Les sites de reconnaissance de la plupart des enzymes de type II sont des palindromes. Un palindrome est un mot ou une phrase qui se lisent de façon identique dans un sens comme dans l'autre, comme le mot « Hannah ». Une séquence d'ADN palindrome se lit de 5' à 3' dans un brin et dans le brin complémentaire.

Avec ce type de séquence, la coupure de l'ADN au niveau d'une même base sur les deux brins peut produire des coupures décalées et des « bouts collants », ou extrémités cohésives. Ces courtes séquences non appariées seront les mêmes pour tout ADN coupé par cette enzyme. Ces bouts collants permettent donc de les réunir facilement (voir figure 17.1). Bien que moins fréquentes, certaines enzymes de restriction de type II, comme *PvuII*, peuvent couper les deux brins au même endroit et donner des extrémités émoussées et non collantes. On peut réunir ces extrémités émoussées à d'autres extrémités émoussées.

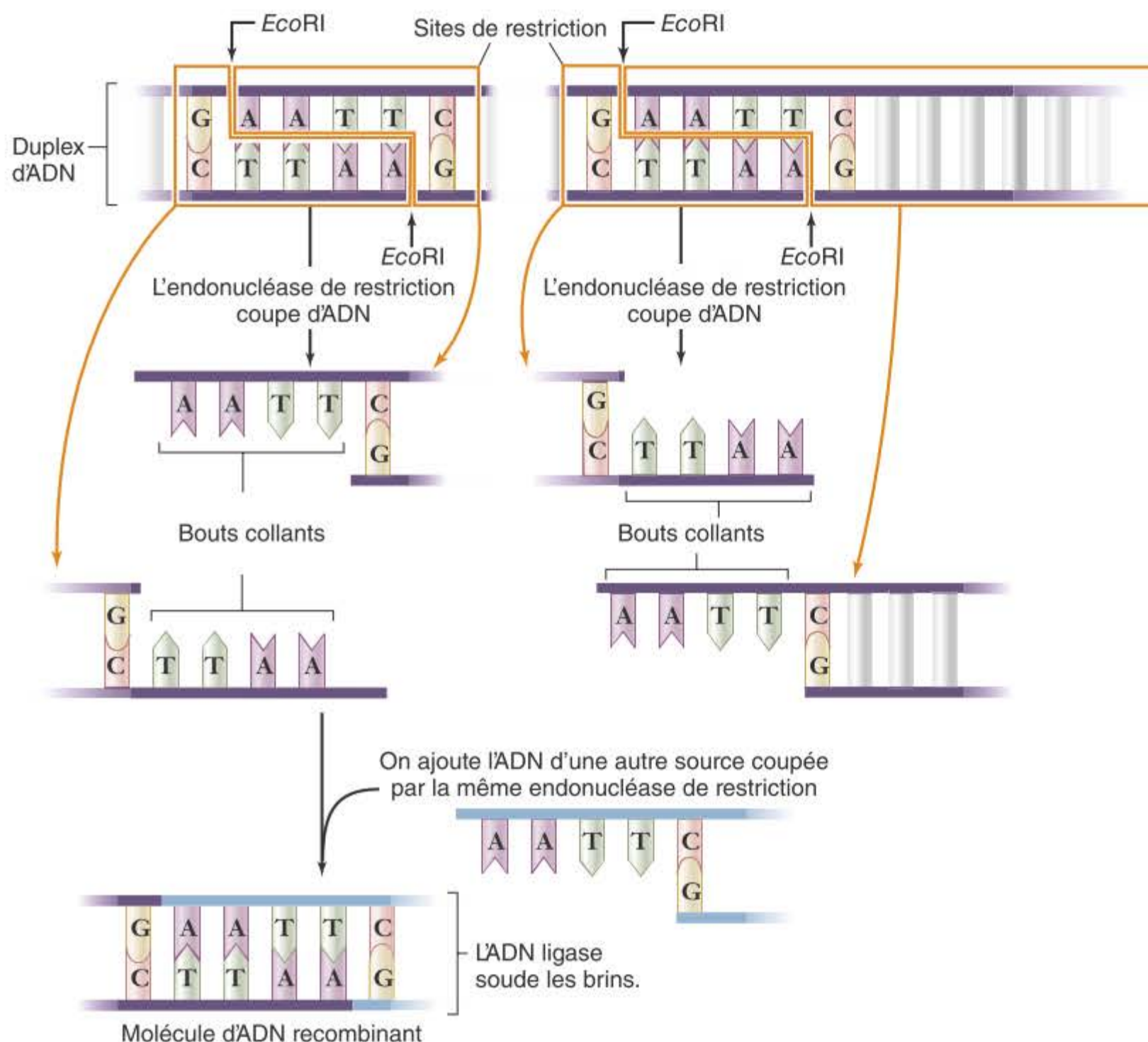


Figure 17.1 Beaucoup d'endonucléases de restriction produisent des fragments d'ADN avec des extrémités cohésives.

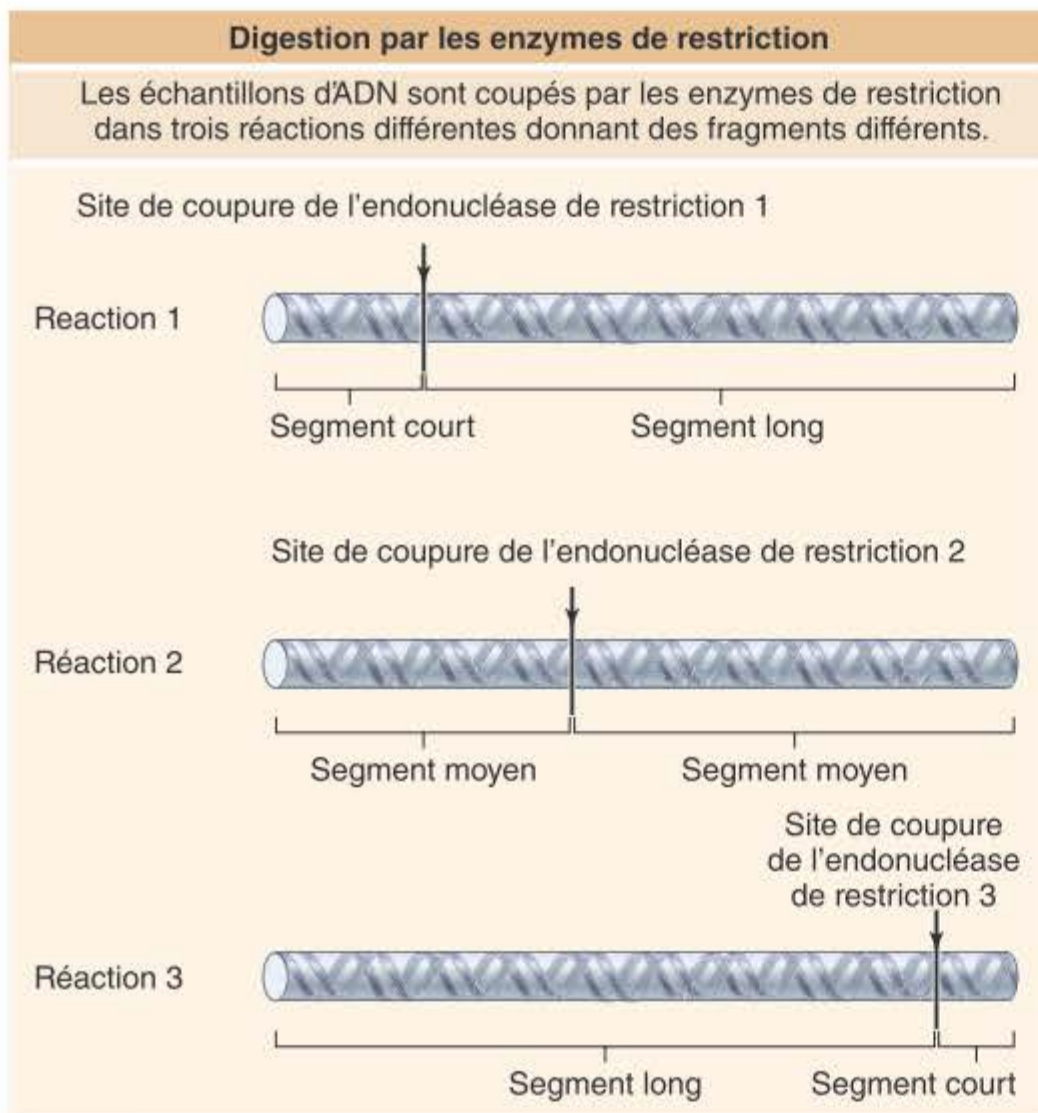
L'endonucléase de restriction *EcoRI* coupe toujours la séquence 5'GAATTC3' entre G et A. La même séquence se retrouvant sur les deux brins, tous deux sont coupés. Cependant, les deux séquences sont orientées différemment dans les deux brins. En conséquence, les queues monocaténaire sont complémentaires, ce sont des extrémités cohésives. Ces extrémités complémentaires peuvent être unies à un fragment d'un autre ADN coupé par la même enzyme. On peut ensuite souder ces deux molécules par l'ADN ligase pour obtenir une molécule recombinante.

L'électrophorèse en gel sépare les fragments d'ADN

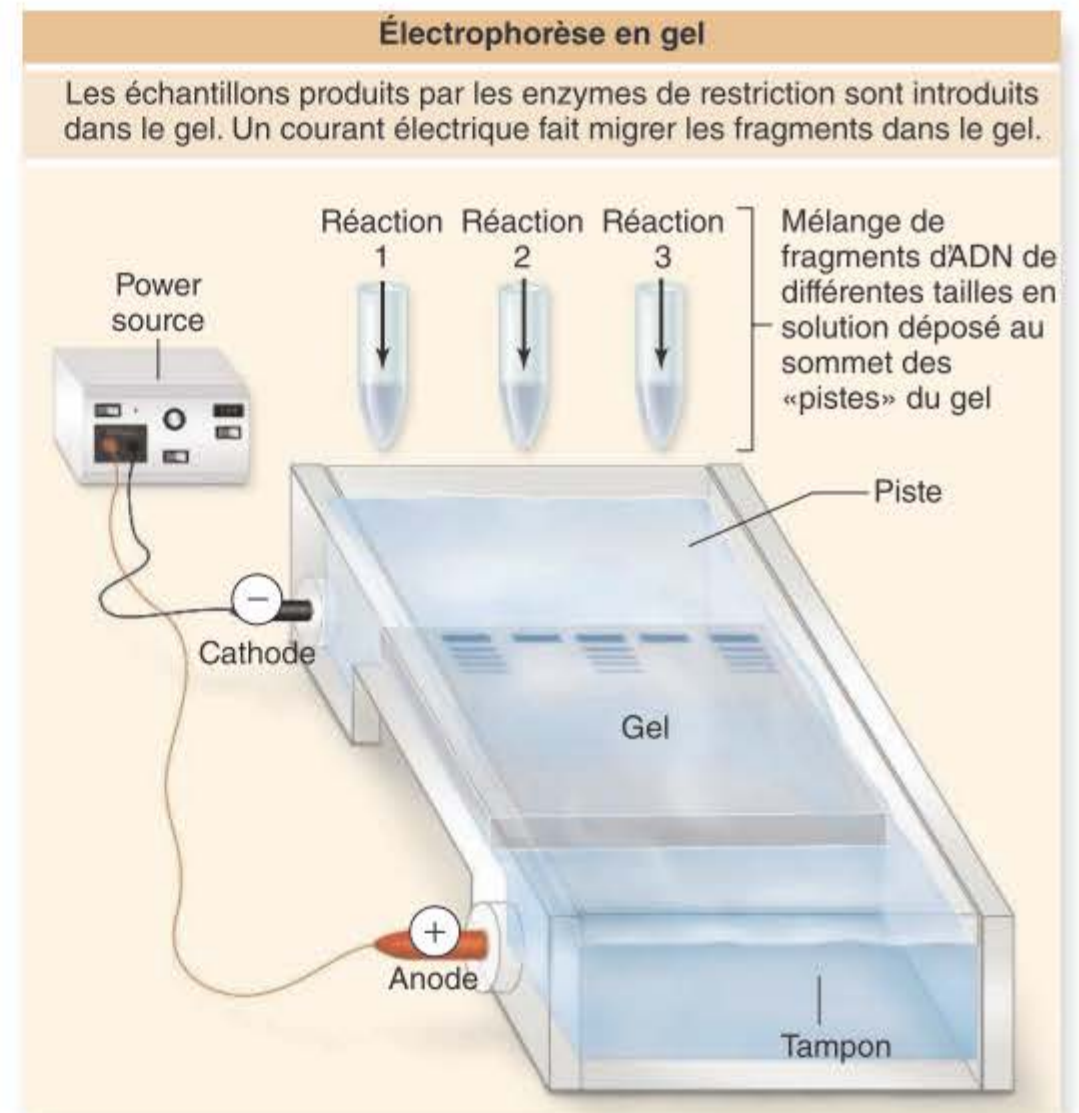
Pour créer un morceau d'ADN recombinant, il faut réunir deux ou plusieurs fragments d'ADN. Auparavant, ces fragments doivent être purifiés, ou isolés. L'électrophorèse en gel est la technique habituelle pour séparer des fragments différents après découpage de l'ADN, et donc pour les isoler. Cette technique tire profit de la charge négative des molécules d'ADN en appliquant un champ électrique pour séparer ces molécules en fonction de leur taille.

Composé d'agarose ou de polyacrylamide, et finement étalé sur un support, le gel constitue une matrice tridimensionnelle qui sépare les

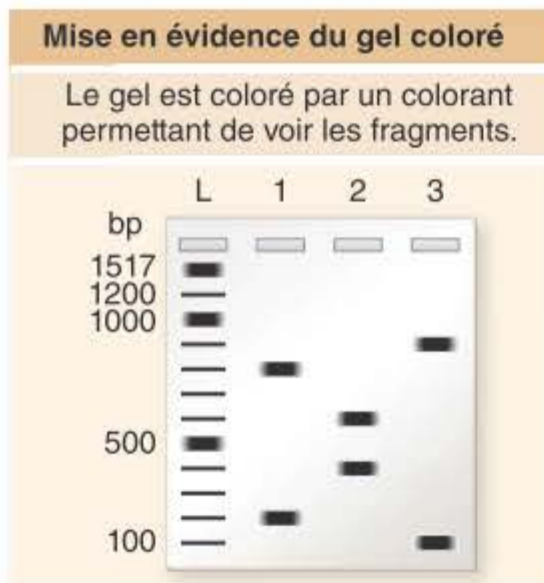
molécules en fonction de leur taille (figure 17.2). Ce gel est plongé dans une solution tampon contenant des ions capables de porter le courant et il est soumis à un champ électrique. Les charges négatives élevées des groupements phosphate de la colonne vertébrale de l'ADN entraînent sa migration vers le pôle positif. Le gel fonctionne comme un filtre et sépare les molécules d'ADN selon leur taille : elles migrent d'autant plus lentement dans le gel qu'elles sont plus longues. Avec le temps, les petites molécules migrent plus loin que les longues. On peut mettre l'ADN en évidence dans le gel par un colorant fluorescent qui s'y unit. Certains gels sont utilisés exclusivement pour déterminer la taille des fragments d'ADN, d'autres pour prélever des fragments individuels, les purifier et les préparer pour une autre application.



a.



b.



c.

Figure 17.2 L'électrophorèse en gel sépare les fragments d'ADN en fonction de leur taille. *a.* On utilise trois endonucléases de restriction pour découper l'ADN en fragments spécifiques qui dépendent de la séquence de reconnaissance de chaque enzyme. *b.* On charge les fragments sur un gel (agarose ou polyacrylamide) et l'on applique un courant électrique. Les fragments d'ADN migrent dans le gel, les plus grands se déplaçant plus lentement. *c.* Les fragments sont ainsi répartis en fonction de leur taille, les petits migrant plus loin que les grands. Une série de fragments de taille connue donne une échelle permettant d'estimer la taille des fragments étudiés (pb = paire de bases ; É = échelle ; 1, 2, 3 = fragments d'une séquence d'ADN coupée par les endonucléases de restriction 1, 2 et 3).

On combine des fragments d'ADN pour construire des molécules recombinantes.

Pour la construction d'une molécule d'ADN recombinant, l'étape suivante est la réunion de morceaux d'ADN d'origines différentes en une seule molécule. L'ADN recombinant peut se répliquer de façon stable dans un organisme hôte, comme la bactérie de l'intestin commune, *Escherichia coli*. La stratégie la plus fréquente pour créer une molécule d'ADN recombinante stable est l'addition d'un fragment d'ADN d'intérêt – par exemple une séquence génique à étudier – dans un plasmide bactérien. On peut ensuite introduire le plasmide recombinant dans *E. coli*, où il peut être répliqué et conservé.

Union des fragments d'ADN par l'ADN ligase

L'ADN ligase permet de réunir des fragments d'ADN coupés par les endonucléases et purifiés en gel d'agarose. Cette enzyme catalyse la formation d'une liaison phosphodiester entre le groupement phosphate 5' d'un brin d'ADN et le groupement hydroxyle d'un autre. C'est la même réaction qui réunit les fragments d'Okazaki pendant la synthèse du brin retardé d'ADN dans la cellule (voir chapitre 14).

Si deux fragments d'ADN possèdent des extrémités cohésives, les deux courtes séquences complémentaires (comme à la figure 17.1) maintiendront les deux brins pendant que l'ADN ligase forme la liaison phosphodiester. Certaines ADN ligases peuvent également unir des fragments d'ADN avec des bouts francs.

À la figure 17.3, un morceau d'ADN étranger est introduit dans un plasmide qui a été coupé par une endonucléase de restriction spécifique. Ce morceau d'ADN aussi a été coupé par cette même endonucléase et possède des extrémités non appariées complémentaires des extrémités coupées du plasmide. Les extrémités cohésives relient les deux molécules et permettent à la ligase de former des liaisons phosphodiester entre eux et de donner un plasmide recombinant. On parle souvent de *clonage moléculaire* pour désigner l'ensemble du processus produisant des molécules d'ADN recombinant.

La transcriptase inverse synthétise de l'ADN à partir d'ARN

Selon le « dogme central » de la biologie moléculaire, le flux d'information passe de l'ADN à l'ARN, puis à la protéine, mais il existe plusieurs exemples, en biologie, où l'ADN est synthétisé à partir de l'information présente dans l'ARN. La transcriptase inverse, découverte à l'origine chez un type de virus, les rétrovirus, peut utiliser l'ARN comme matrice pour la synthèse d'une molécule d'ADN (voir chapitre 27).

Les rétrovirus, comme le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), ont des génomes à ARN, mais ils doivent convertir leur ARN en ADN quand ils infectent les cellules. La transcriptase inverse est une ADN polymérase dépendante de l'ARN ; cela signifie qu'elle se sert de l'information présente dans l'ARN pour synthétiser un brin complémentaire d'ADN. La transcriptase inverse est, en même temps, une ADN polymérase dépendante de l'ADN, ce qui signifie qu'elle peut former un double brin en synthétisant un nouvel ADN avec l'information présente dans un brin d'ADN. L'ADN produit à partir de l'information de l'ARNm est appelé **ADN complémentaire (ADNc)**. L'obtention d'un ADNc à partir d'un ARNm provenant de cellules eucaryotes est une application importante de la transcriptase inverse (figure 17.4). Elle permet d'analyser les seules séquences effectivement utilisées pour la synthèse des protéines.

Les banques d'ADN sont des collections de molécules d'ADN recombinant

Une banque est une vaste collection de molécules d'ADN recombinant qui peuvent être conservées de façon stable et répliquées dans un organisme hôte adéquat. Pour créer une banque, les différents fragments d'intérêt sont épicés dans une molécule d'ADN manipulée de manière à permettre la propagation de la banque (figure 17.5). On appelle vecteurs de clonage ces molécules d'ADN spécialisées : ce sont des plasmides et des chromosomes artificiels. Le choix de ces molécules dépend de l'utilisation prévue et de la taille de morceaux d'ADN à

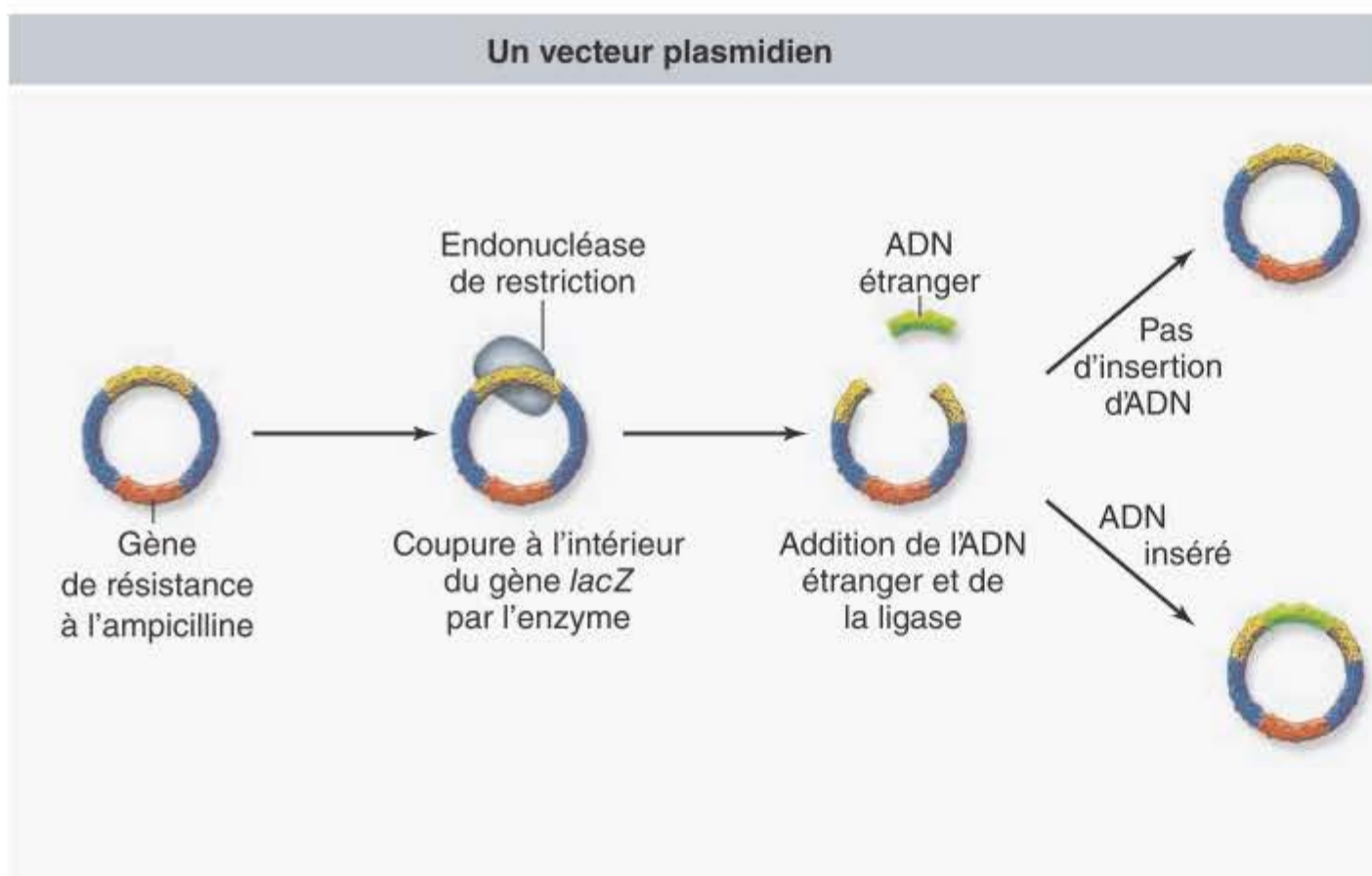


Figure 17.3 Clonage moléculaire avec vecteur. Les plasmides sont coupés par des enzymes de restriction à un site spécifique, et l'on ajoute l'ADN étranger et l'ADN ligase. On a un plasmide recombinant si l'ADN étranger s'y est effectivement incorporé. On peut introduire les plasmides dans les bactéries par le processus de transformation. L'étalement des cellules transformées sur un milieu contenant un antibiotique, l'ampicilline, sélectionne les cellules contenant le plasmide.

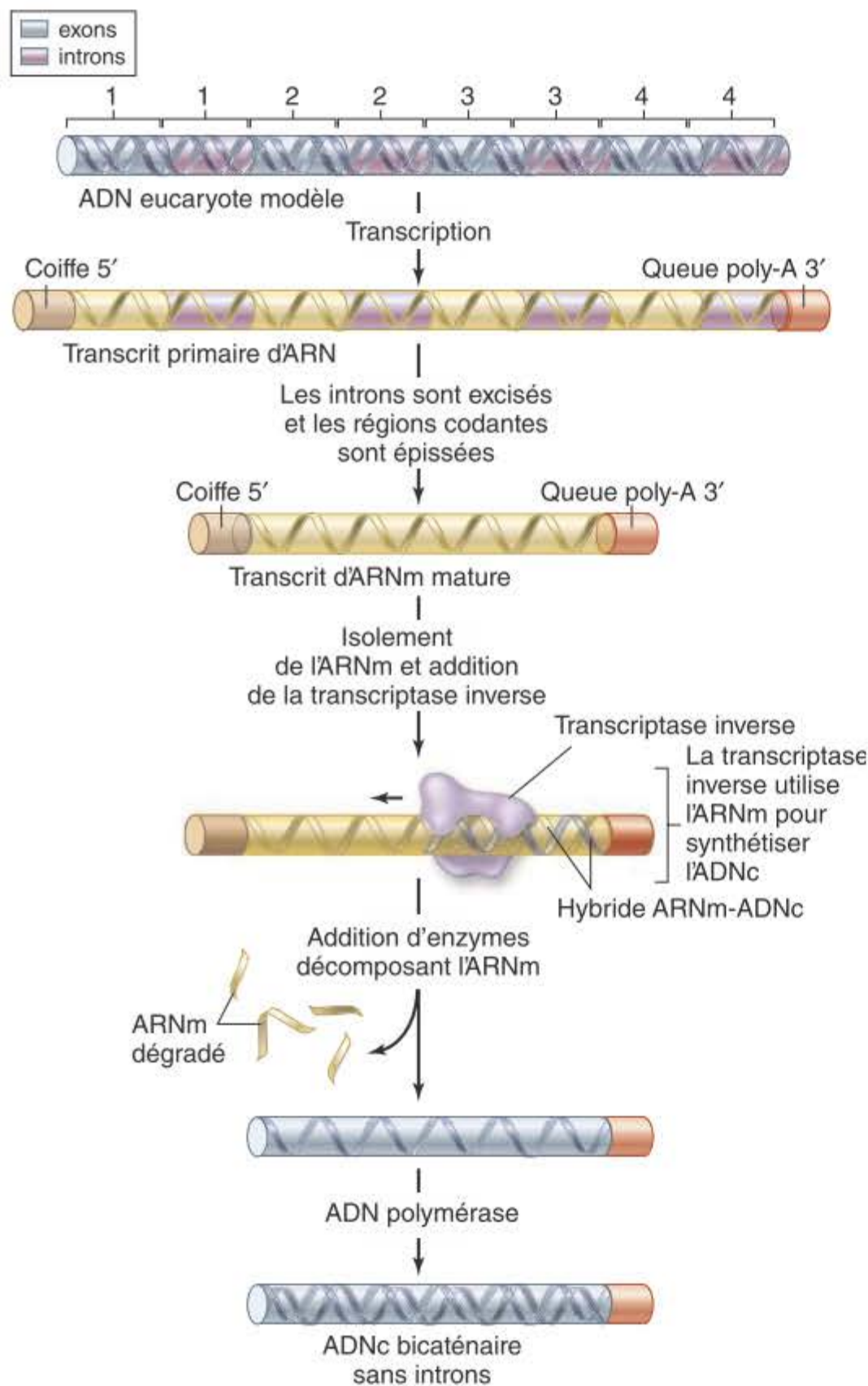


Figure 17.4 Production de l'ADNc par transcription inverse. Le transcrite d'ARNm mature est généralement beaucoup plus court que le gène correspondant à cause de la perte des introns par épissage. On isole l'ARNm du cytoplasme d'une cellule et la transcriptase inverse l'utilise comme matrice pour synthétiser un brin complémentaire de l'ARNm. Ce nouveau brin d'ADN sert de modèle à l'ADN polymérase qui assemble un brin d'ADN complémentaire à son contact : c'est un ADNc – l'ADN bicaténaire correspondant à l'ARNm libéré de ses introns.

conserver. Les vecteurs de clonage ont plusieurs caractéristiques importantes :

1. une séquence permettant la réplication dans un organisme hôte (par exemple *E. coli* ou la levure) ;
2. un marqueur de sélection, comme la résistance à un antibiotique ;
3. des séquences permettant l'addition de fragments d'ADN (sites de recombinaison ou de reconnaissance pour les endonucléases de restriction).

Une fois la banque obtenue, différentes techniques permettent d'identifier et d'isoler les molécules recombinantes spécifiques d'intérêt. On

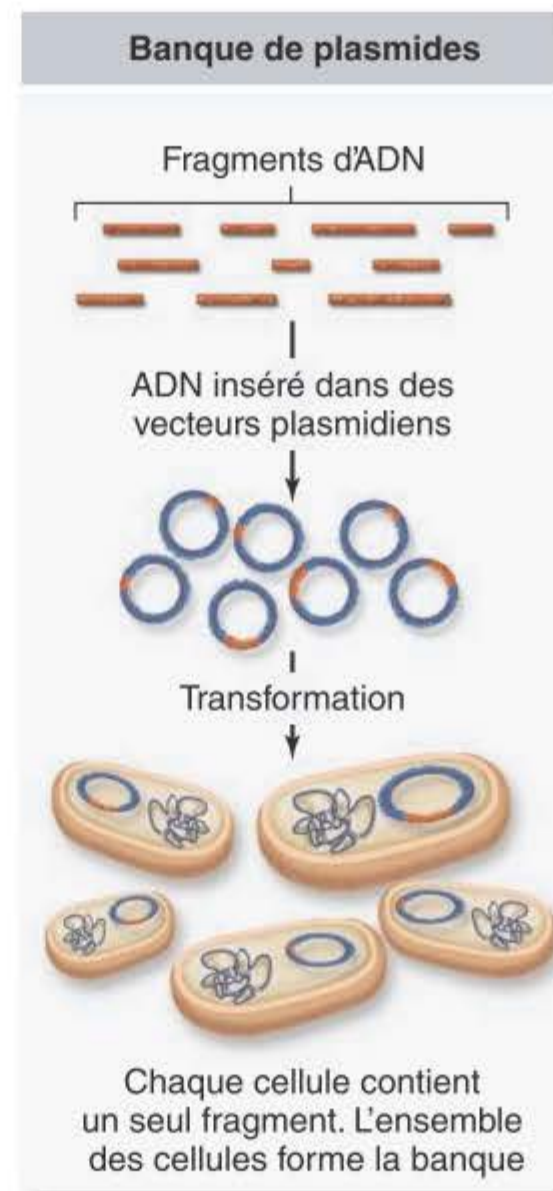


Figure 17.5 Création d'une banque de plasmides. Les fragments d'ADN possédant les extrémités cohésives correctes peuvent s'unir aux vecteurs plasmidiens : chaque plasmide contient ainsi un morceau d'ADN différent. La transformation des plasmides recombinants dans les cellules bactériennes donne une banque de bactéries, chacune contenant un plasmide avec un ADN particulier.

peut créer des banques permettant de synthétiser des protéines à étudier, pour déterminer la séquence et la structure du génome ou pour isoler des gènes particuliers.

On peut conserver les banques en les introduisant dans un organisme hôte approprié (figure 17.5). La prolifération des cellules hôtes « amplifie » ensuite la banque et donnera un nombre important de copies des molécules recombinantes qu'il est possible d'isoler ou d'analyser. On peut introduire les banques dans des bactéries ou des levures en traitant les cellules pour permettre l'entrée de l'ADN par *transformation*. Le choix de l'organisme hôte dépend du vecteur de clonage utilisé et de l'objectif de la banque. Si celle-ci ne contient que des petits morceaux d'ADN, les plasmides bactériens conviennent et chaque cellule bactérienne de la banque possédera un plasmide recombinant particulier. Quand les cellules de la banque sont cultivées, elles répliqueront passivement l'ADN cloné en se multipliant. Si les morceaux d'ADN de la banque sont plus grands (des fragments génomiques par exemple), on utilise des chromosomes artificiels de bactéries ou de levures et la banque d'ADN est stockée dans des bactéries ou des levures.

On peut utiliser la transcriptase inverse pour obtenir des banques d'ADNc

On peut isoler l'ARNm de cellules se trouvant à un stade spécifique du développement ou à un tissu spécifique et les utiliser comme matrice pour synthétiser l'ADNc. Cet ADNc peut ensuite servir à l'obtention d'une banque qui représente exclusivement les gènes exprimés à un moment donné ou dans un tissu particulier. Toutes les banques génomiques provenant de cellules ou tissus différents d'un organisme renferment les mêmes séquences, mais ce ne sera pas le cas des banques d'ADNc. Une banque d'ADNc de cerveau contiendra beaucoup de séquences spécifiques du cerveau qui n'existent pas dans une banque d'ADNc de fibroblaste qui, à son tour, contiendra des séquences spécifiques des fibroblastes absentes des banques d'ADNc de cerveau.

Questions d'apprentissage 17.1

Les endonucléases de type II coupent l'ADN à des endroits spécifiques. L'électrophorèse en gel utilise un champ électrique pour séparer les fragments d'ADN en fonction de leur taille. L'ADN ligase réunira des fragments d'origines différentes pour donner un ADN recombinant. La transcriptase inverse convertit l'ARNm en ADNc. Les banques d'ADN sont des collections de molécules d'ADN recombinant destinées à de nombreux types d'analyses génétiques.

- Pourquoi est-il important de pouvoir convertir l'ARNm en ADNc ?



Analyse des données Le génome humain comprend 3 milliards de paires de bases. Si vous construisez une banque de ce génome à partir de fragments d'ADN de 500 pb, quel sera le nombre minimum de clones dans votre banque ?

17.2 Amplification de l'ADN par la réaction en chaîne de la polymérase

Objectifs

1. Comparer le processus de réplication de l'ADN à la PCR.
2. Montrer les différences entre PCR, RT-PCR et RT-PCR quantitative.

La mise au point de la réaction en chaîne de la polymérase (PCR, pour *polymerase chain reaction*) en 1993 a accéléré la construction des molécules d'ADN recombinant et ouvert la voie à une ère nouvelle de l'ingénierie moléculaire. La PCR imite le processus de la réplication de l'ADN en donnant des millions de copies d'une séquence d'ADN (on parle d'amplification) sans devoir insérer le fragment d'ADN dans un vecteur de clonage et l'introduire dans une cellule hôte.

Le principal avantage de la synthèse de fragments d'ADN par PCR est la possibilité de choisir exactement la séquence d'ADN à amplifier. Quand on clone des molécules d'ADN dans des vecteurs à partir de fragments obtenus par digestion par des endonucléases de restriction, le nombre de fragments disponibles est limité par la localisation des sites de restriction.

Pour amplifier une séquence d'ADN par PCR, on synthétise, par voie chimique, deux séquences d'ADN longues de 20 à 25 nucléotides appelées amorces. Une amorce est complémentaire d'un brin de l'ADN à une extrémité de la séquence choisie, et l'autre est complémentaire du brin opposé à l'autre extrémité de cette séquence. Si on laisse les amorces s'unir aux séquences complémentaires, l'ADN polymérase peut allonger les deux amorces et donner deux nouveaux brins d'ADN comme s'il s'agissait de la réplication dans une cellule. Ces deux brins d'ADN sont complémentaires et comprennent les sites d'union aux amorces d'origine. La répétition de ce processus aboutit à une augmentation exponen-

tielle du nombre de molécules d'ADN. On peut ainsi amplifier une séquence d'ADN atteignant jusqu'à 10 000 paires de bases.

La PCR imite la réplication de l'ADN

La PCR est une imitation du processus de réplication de l'ADN ; chaque réaction passe par une série d'étapes analogues aux étapes de la réplication de l'ADN :

1. **Dénaturation.** Les brins de la double hélice d'ADN sont séparés en les chauffant.
2. **Appariement des amorces.** Les amorces possèdent les OH 3' nécessaires à l'élongation par l'ADN polymérase.
3. **Synthèse.** L'ADN polymérase construit le nouvel ADN.

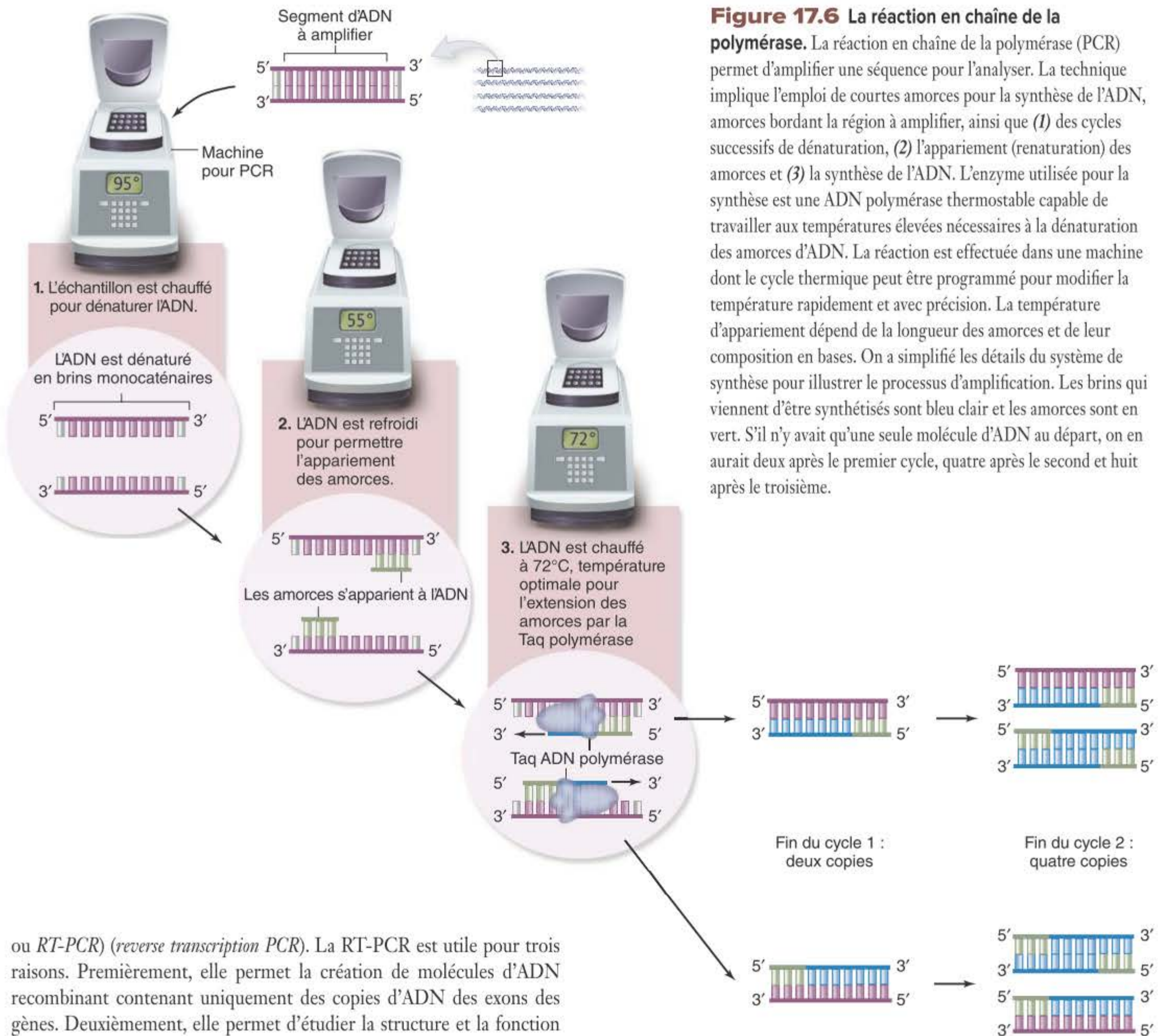
En raison de la répétition cyclique de ces étapes, la synthèse des nouvelles molécules d'ADN est exponentielle ; une PCR de 25 cycles produit 2^{25} molécules d'ADN à partir d'une seule molécule cible ! Au début de l'utilisation de la PCR, les étapes étaient réglées manuellement en utilisant un mélange contenant l'ADN à amplifier (l'ADN matrice) et les amorces spécifiques pour ces séquences. Le mélange était chauffé à 95 °C pour séparer les deux brins d'ADN, refroidi à une température permettant l'appariement des amorces à l'ADN matrice ; une polymérase était ensuite ajoutée pour la synthèse du nouvel ADN. Malheureusement, le chauffage du mélange au cycle suivant provoquait la dénaturation de l'ADN polymérase, qui devait être remplacée. Une PCR typique impliquant de 25 à 30 cycles, le processus était ennuyeux et demandait beaucoup de travail.

La PCR est devenue plus rapide et moins exigeante en travail grâce à deux innovations. En premier lieu, on a isolé une ADN polymérase thermostable, appelée **Taq polymérase**, à partir d'une bactérie thermophile, *Thermus aquaticus*. Il n'était donc plus nécessaire d'ajouter une nouvelle ADN polymérase à chaque cycle parce que la Taq polymérase n'est pas dénaturée à la température utilisée pour la dénaturation. La seconde innovation fut la mise au point d'appareils pourvus de systèmes de chauffage pouvant faire alterner avec précision et rapidement des températures très différentes.

Actuellement, une PCR typique utilise un tube unique contenant l'ADN matrice, les amorces, les nucléotides et une ADN polymérase thermostable. La Taq polymérase est encore souvent utilisée, mais on se sert aussi d'autres polymérases thermostables plus appropriées. Le tube est placé dans un appareil PCR qui peut faire alterner rapidement la température de dénaturation, la température d'association des amorces et la température nécessaire pour la synthèse de l'ADN (figure 17.6). On peut effectuer 25 cycles de PCR en une heure seulement. Grâce à ces améliorations, la PCR est devenue une des techniques les plus utilisées pour la production de molécules d'ADN spécifiques destinées à des applications diverses. On a mis au point des modifications de la PCR pour le diagnostic des maladies, le séquençage des génomes et l'analyse de l'expression des gènes.

La PCR avec transcription inverse permet d'amplifier l'ADN à partir de l'ARNm

La PCR utilise, comme matrice, des types d'ADN différents (plasmides, ADN génomique), mais elle peut aussi fonctionner avec l'ADNc synthétisé à partir de l'ARNm. L'ARNm isolé est incubé avec la transcriptase inverse, puis l'ADNc est utilisé comme matrice pour la PCR. La combinaison de ces deux techniques est appelée *PCR avec transcription inverse*,



ou RT-PCR) (*reverse transcription PCR*). La RT-PCR est utile pour trois raisons. Premièrement, elle permet la création de molécules d'ADN recombinant contenant uniquement des copies d'ADN des exons des gènes. Deuxièmement, elle permet d'étudier la structure et la fonction des produits des gènes. Troisièmement, elle peut servir à déterminer le niveau relatif d'expression génique dans les cellules et les tissus.

La RT-PCR quantitative peut déterminer le niveau d'un ARNm

Les cellules répondent souvent aux conditions environnementales, internes et externes, par une modification de l'expression des gènes. L'analyse de l'expression génique implique une quantification exacte de l'ARNm cellulaire. Un des moyens les plus rapides et les plus faciles de mesurer les modifications quantitatives de l'expression génique est l'application de la RT-PCR quantitative (RT-qPCR). Celle-ci implique l'isolement de l'ARNm, l'utilisation de la transcriptase inverse pour le transformer en ADNc, puis l'emploi de la PCR pour amplifier les ADNc particuliers avec des amorces spécifiques. On peut mesurer en temps réel la quantité d'ADN produite avec l'appareil à PCR. Pour cette raison, la PCR quantitative est aussi désignée comme PCR en temps réel. On utilise deux techniques habituelles, toutes deux basées sur l'emploi de colorants fluorescents.

Quantification de l'ADN par des colorants fluorescents fixés à l'ADN

Le moyen le plus simple de mesurer la quantité d'ADN produite pendant la RT-qPCR consiste à ajouter, au mélange de la PCR, un colorant qui s'unit non spécifiquement à l'ADN. S'il y a de l'ADN, le colorant s'y fixe et devient fluorescent quand il est éclairé par un laser. Après chaque cycle de PCR, un laser de l'appareil PCR éclaire la réaction et des détecteurs mesurent le niveau de la fluorescence. La quantité d'ADN augmentant à chaque cycle, la quantité de colorant fixé augmente, ainsi que la fluorescence. On peut transférer les résultats sur un ordinateur qui trace une courbe de la fluorescence en fonction du nombre de cycles.

Imaginez deux réactions qPCR à partir d'ADNc provenant de la même quantité d'ARNm isolé de deux types cellulaires différents. Pendant la partie qPCR de l'expérience, la fluorescence pourrait augmenter plus vite dans un échantillon que dans l'autre. Dans la qPCR où la

fluorescence est plus rapide, il y avait à l'origine plus d'ARNm d'un gène particulier parce que les molécules d'ADN produites au cours de la PCR étaient plus nombreuses. Les ordinateurs peuvent quantifier les différences relatives entre les échantillons pour rechercher des différences dans l'expression des gènes sous différentes conditions.

Quantification de l'ADN par sondes fluorescentes fixées à l'ADN

On peut mesurer plus précisément la quantité d'ADN produite par une réaction PCR en introduisant une sonde marquée par fluorescence dans une réaction qPCR. Cette sonde se compose d'une séquence de 20 à 30 nucléotides d'ADN monocaténaire complémentaire d'une portion de l'ADN à analyser. Les sondes sont synthétisées par voie chimique et il est possible de les modifier pour différentes applications ; on peut, par exemple, fixer une molécule fluorescente à l'une de leurs extrémités.

Pour une qPCR, la sonde complémentaire d'une courte région de l'ADNc matrice possède une molécule fluorescente à l'une de ses extrémités. Éclairée sous une longueur d'onde, le fluorophore émet une lumière d'une autre longueur d'onde que l'appareil à PCR peut mesurer. À l'autre extrémité de la sonde, on ajoute une molécule « éteignoir » qui absorbera la lumière émise par le fluorophore et empêchera sa détection. Tant que le fluorophore et l'éteignoir sont fixés à la même sonde, ils sont assez proches pour étouffer la fluorescence du fluorophore. Si le fluorophore et l'éteignoir sont séparés, on peut détecter la fluorescence.

Si la sonde participe à la réaction PCR, elle peut servir à mesurer la quantité d'ADN produite. Après la dénaturation, quand le mélange est refroidi à la température requise pour l'association des amorces à la matrice, la sonde qPCR s'apparie aussi à l'un des brins de la matrice entre les sites d'appariement des deux amorces. Quand la Taq polymérase allongera les amorces, elle arrivera à la sonde appariée. Grâce à son activité d'exonucléase (voir chapitre 14), la Taq polymérase peut dégrader la sonde et achever de copier la matrice. La dégradation de la sonde libère le fluorophore de l'éteignoir et la fluorescence peut être détectée (figure 17.7a). Les cycles de PCR se poursuivent et la fluorescence augmentera chaque fois proportionnellement à la quantité d'ADN synthétisée et donc d'autant plus vite que la quantité de matrice (ADNc copié de l'ARNm) est plus grande.

La PCR est à la base de nombreuses techniques de séquençage

Il a fallu 13 ans, de 1990 à 2003, pour obtenir une version définitive de la séquence du génome humain, pour un coût estimé de 2,7 milliards de dollars. Aujourd'hui, on peut séquencer un génome humain en trois jours seulement, pour environ 1000 \$. Pour séquencer l'ADN, il faut obtenir de nombreuses copies des fragments du génome. Pour le Projet de Génome Humain initial, cela impliquait le clonage de petits fragments de l'ADN génomique dans un vecteur de clonage construit pour faciliter le séquençage manuel de l'ADN (voir chapitre 18). Il fallait ensuite cultiver ces clones dans un hôte approprié et isoler l'ADN pour le séquencer. Ce processus est laborieux et lent.

Avec la PCR, on n'a plus besoin des vecteurs de clonage pour obtenir la quantité d'ADN nécessaire au séquençage. Beaucoup de nouvelles techniques de séquençage (séquençage de dernière génération) se servent

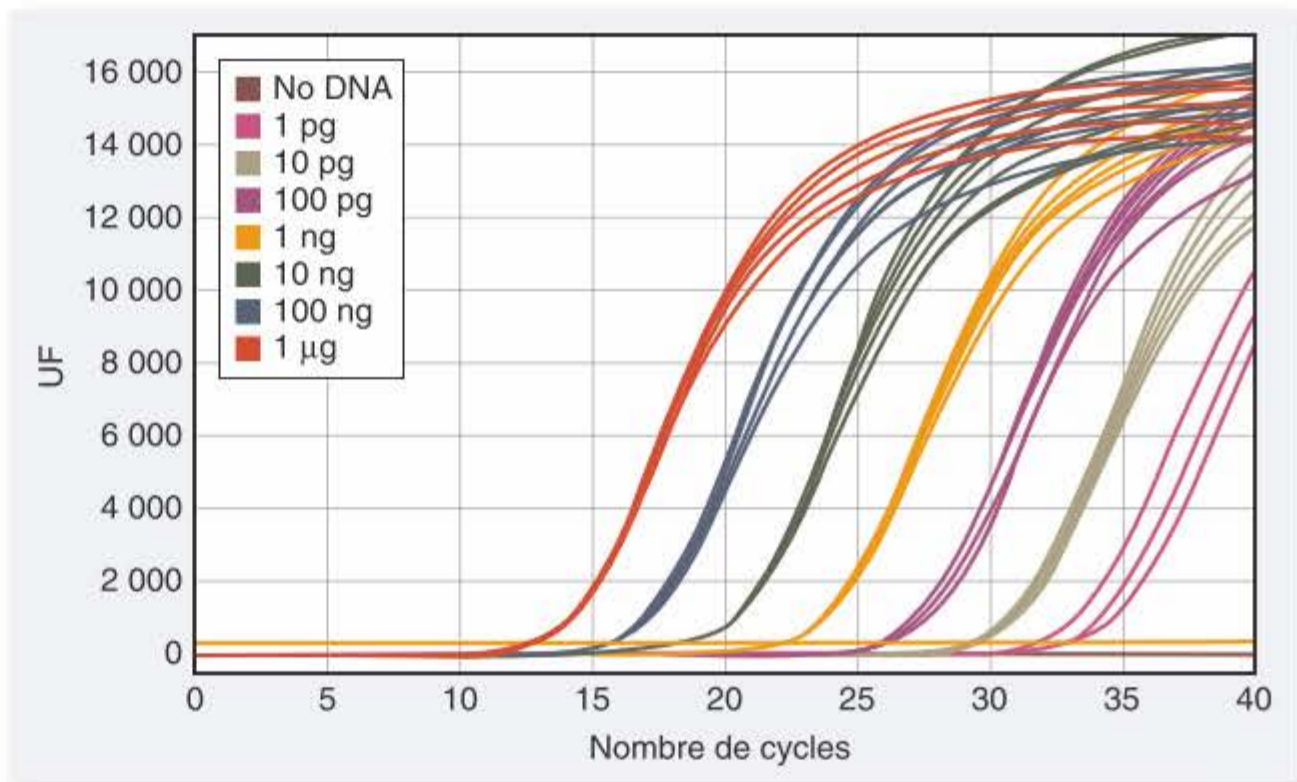
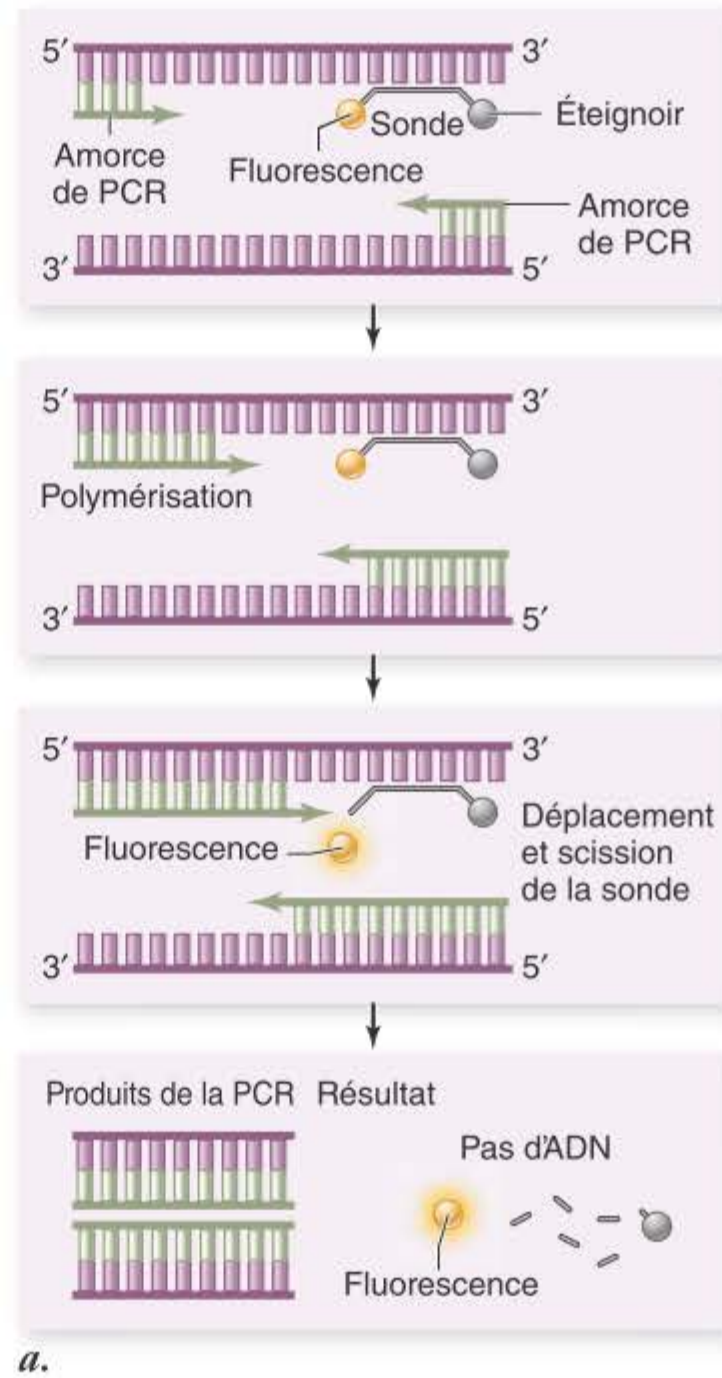


Figure 17.7 Quantification du taux d'ARNm par qRT-PCR *a.* La dégradation d'une sonde fluorescente entraîne une augmentation de la fluorescence. *b.* Avec l'amplification de l'ADN, le niveau de fluorescence augmente proportionnellement au nombre de molécules d'ADN présentes. Plus il y a d'ADN au début de la réaction, plus rapidement la fluorescence apparaît pendant la PCR (pg, picogramme ; ng, nanogramme).

de versions de la PCR pour synthétiser l'ADN à séquencer (voir chapitre 18). Sans la PCR, le séquençage rapide et bon marché des génomes ne serait pas possible. La possibilité de séquencer les génomes rapidement et à coût réduit permet de comparer des génotypes et d'identifier des variations génétiques potentiellement responsables de maladies, de réactions différentes aux médicaments ou impliquées dans l'état de santé.

Questions d'apprentissage 17.2

La réaction en chaîne de la polymérase (PCR) permet d'amplifier rapidement des séquences d'ADN particulières au départ de faibles quantités de matériel. La RT-PCR permet l'amplification d'ADN copié sur les ARNm exprimés et la RT-qPCR permet de mesurer la quantité relative d'ARNm particuliers. L'utilisation de la PCR dans le séquençage de dernière génération a contribué à réduire les délais et le coût du séquençage des génomes.

- Quelles sont les ressemblances entre PCR et réplication de l'ADN ? Quelles sont les différences ?



Question Supposons que vous souhaitiez obtenir une copie d'un morceau de génome eucaryote comprenant des introns et des exons. La création d'ADNc serait-il un bon moyen pour y parvenir ? Expliquez.

17.3 Création, correction et analyse de la variation génétique

Objectifs

1. Montrer comment l'information génétique permet d'identifier une personne inconnue.
2. Montrer comment nous pouvons produire *in vitro* des mutations dans les gènes.
3. Décrire les avantages et les inconvénients de l'interférence de l'ARN et de l'édition directe du génome.

Dans les populations à reproduction sexuée, les individus sont phénotypiquement différents, bien que tous les membres de l'espèce possèdent généralement le même lot de gènes. Dans les populations, la diversité provient majoritairement d'interactions complexes entre variations génétiques, différences épigénétiques et variabilité environnementale. Les progrès réalisés dans la manipulation et l'analyse de l'ADN ont ouvert de nouvelles voies pour étudier la participation des différences génétiques à la diversité phénotypique. L'analyse de la variation génétique est importante parce qu'elle permet de comprendre les différences entre individus au sein de l'espèce et entre les espèces. Grâce aux progrès récents de la technologie de l'ADN, nous pouvons créer ou réparer des allèles mutants pour étudier la fonction des gènes.

Application des empreintes d'ADN en justice pour l'identification des individus

On souhaite parfois pouvoir identifier un individu en partant d'une petite quantité de tissu ou de fluide corporel. C'est le cas pour des recherches criminelles et pour l'identification des victimes de catastrophes. Des techniques plus précises ont été développées (voir

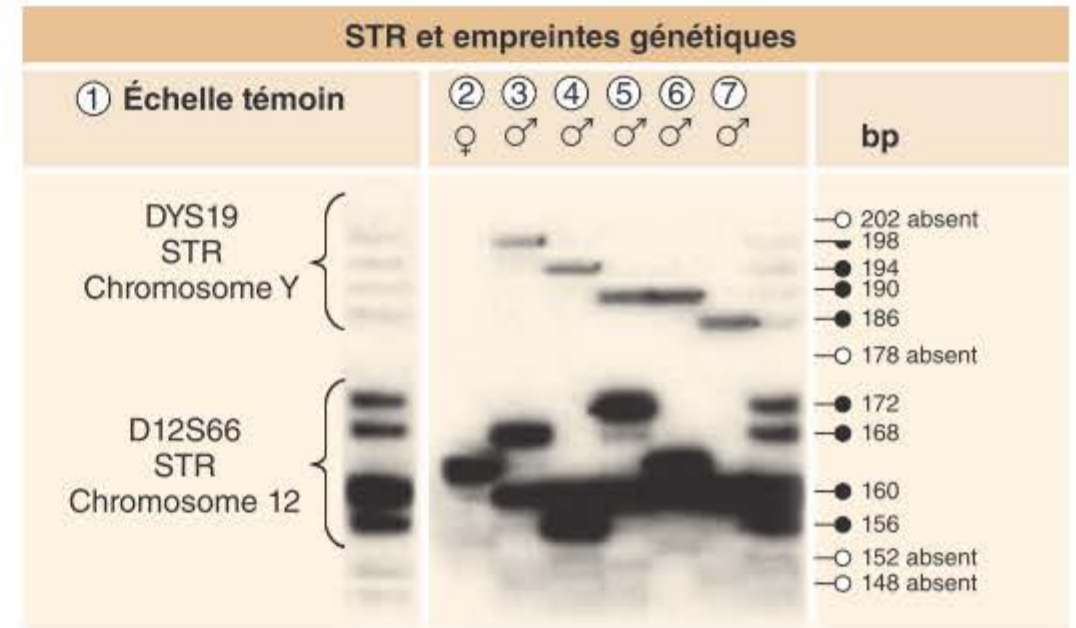


Figure 17.8 Utilisation des STR et des empreintes d'ADN pour l'identification des individus. Un STR de chromosome Y permet de distinguer les hommes des femmes (*en haut*), parce qu'il n'existe pas chez les femmes (*colonne 2*). Le STR a des longueurs différentes chez les hommes, en fonction du nombre de répétitions (*colonnes 3-7*). Un second STR du chromosome 12 apparaît chez les hommes et les femmes (*en bas*).

chapitre 18), mais les empreintes d'ADN font encore partie des principales techniques. C'est, au moins en partie, à cause de l'existence des grandes banques de données dont dispose la justice.

Les empreintes d'ADN sont basées sur de courtes séquences répétées qui diffèrent parmi les individus. Les courtes répétitions en tandem (STR, pour *short tandem repeat*), généralement longues de 2 à 4 nucléotides, ne font pas partie des régions codantes ou régulatrices de gènes et des mutations surviennent au cours des générations, entraînant des différences dans la longueur des répétitions. On peut utiliser une combinaison de ces marqueurs comme « empreinte » d'ADN dans les investigations criminelles et pour d'autres applications d'identification (figure 17.8).

C'est un autre exemple de la flexibilité et de l'utilité de la PCR. On construit des amorces pour encadrer une région où l'on sait qu'il existe des STR. On peut ensuite utiliser ces amorces pour amplifier cette région à partir de très petites quantités de matériel. On peut aussi entreprendre l'analyse en appliquant la technique utilisée pour le séquençage automatique (voir chapitre 18). Depuis 1997, 13 STR sont reconnus comme preuves par les tribunaux et des trousseaux d'identification sont disponibles dans le commerce. Ces 13 STR sont catalogués dans une banque de données CODIS (*Combined DNA Index System*). On peut comparer les nouvelles empreintes à celles d'individus connus dans le CODIS.

Les empreintes d'ADN ont aussi été utilisées pour innocenter des individus accusés à tort, emprisonnés pendant des années avant l'application des analyses d'ADN, ainsi que pour l'identification des victimes de catastrophes. Après l'attentat du 11 septembre 2001 des World Trade Centers à New York, l'empreinte d'ADN était la seule solution permettant d'identifier certaines victimes. Après le terrible tremblement de terre d'Haïti en 2010, cette technique a permis de rendre des enfants à leur famille.

La PCR permet de créer des mutations ponctuelles dans des gènes particuliers

Selon sa localisation dans le génome, une modification d'un ou quelques nucléotides peut avoir ou ne pas avoir d'effet sur le phénotype. Nous considérons comme mutation toute modification du génome qui

entraîne un changement phénotypique. Pendant des années, les généticiens ont créé des mutations aléatoires en utilisant des agents chimiques (mutagènes), mais nous pouvons maintenant créer des mutations *in vitro*. Grâce à l'étude des mutations, nous pouvons mieux comprendre la fonction normale de l'ADN altéré. L'application ultime de cette approche est la possibilité de remplacer un gène de type sauvage par un exemplaire mutant afin de tester la fonction de ce dernier.

Mutagenèse d'un site particulier grâce à la PCR

Nous savons que pour amplifier une région de l'ADN par PCR, on a besoin d'une molécule matrice, souvent un gène ou une copie de gène sous la forme d'ADNc. Si la séquence d'une des amorces est un peu différente de celle de la matrice, la plus grande partie de la molécule produite par PCR pendant l'amplification de l'ADN se terminera par une mutation particulière à un endroit spécifique. De cette façon, on peut introduire différentes mutations dans un gène ou un ADNc et analyser ensuite les conséquences de ces mutations de différentes manières, dont quelques-unes sont explorées dans cette section.

Mutagenèse aléatoire basée sur la PCR

Nous avons déjà vu qu'une des polymérases utilisée dans la PCR s'appelle la Taq polymérase. Contrairement aux polymérases qui répliquent l'ADN dans les cellules, elle n'est pas capable de corriger les erreurs qui surviennent pendant la synthèse de l'ADN. La Taq polymérase placera aléatoirement une mutation à peu près tous les 45 000 nucléotides. Le taux de mutation peut encore augmenter si l'on modifie les conditions chimiques, de telle sorte qu'il est possible d'obtenir des gènes clonés d'ADNc mutés de façon aléatoire à la suite d'une succession de cycles de PCR. On peut ensuite analyser de différentes manières les conséquences de ces mutations sur la fonction du produit du gène.

L'interférence de l'ARN peut réduire la quantité de produit d'un gène

En dépit de l'extrême efficacité de la production et de l'analyse des mutants *in vitro*, dans de nombreux systèmes expérimentaux, il n'est pas possible de réintroduire ces constructions dans les cellules vivantes pour observer leurs conséquences sur le phénotype. La technique d'interférence de l'ARN permet au chercheur de réduire la quantité de produit d'un gène dans les cellules ou organismes vivants. C'est l'équivalent d'une mutation qui élimine le produit d'un gène. L'interférence de l'ARN dégrade ou bloque la traduction d'un gène particulier dans les cellules, réduisant ainsi le taux de la protéine codée. Cette technique profite de systèmes qui ont évolué dans les cellules en permettant aux petits ARN de contrôler le niveau de l'expression génique après la transcription (voir les détails au chapitre 16).

Pour réduire ou éviter la production d'une protéine particulière en appliquant l'interférence de l'ARN, il faut construire un court ARN bicaténaire complémentaire de l'ARNm codant la protéine. Il existe plusieurs techniques pour créer et introduire de l'ARN bicaténaire dans les cellules ou les organismes. L'interférence repose ensuite sur les mécanismes cellulaires décrits au chapitre 16. Pour tout organisme dont nous disposons d'une séquence génomique complète, on peut créer une banque de molécules de courts ARN bicaténaires capables de cibler tous les gènes du génome. Ces banques peuvent servir à réduire systématiquement l'expression de protéines individuelles ou de combinaisons de protéines afin d'étudier leur rôle dans les cellules et les organismes.

Les nouvelles technologies permettent une édition directe des génomes

La mutagenèse basée sur la PCR permet de modifier *in vitro* les séquences des gènes et l'interférence de l'ARN permet de réduire les produits des gènes ; ces deux méthodes sont cependant des moyens indirects d'étudier la fonction des gènes dans les cellules vivantes. Jusqu'il y a peu, il n'était pas possible de modifier l'ADN dans une cellule vivante : d'éditer le génome. La découverte de plusieurs protéines capables d'interagir avec des séquences spécifiques d'ADN a conduit à des techniques permettant l'édition directe, *in vivo*, du génome de l'organisme. Cela signifie qu'il est désormais possible de modifier rapidement et sans difficulté la séquence d'un gène, de l'inactiver ou d'interférer avec son expression directement dans la cellule. En modifiant ainsi systématiquement les gènes, il est possible de mieux appréhender les fonctions des gènes *in vivo*. Il existe deux moyens d'éditer des gènes *in vivo* : les protéines TALE (pour *transcription activator-like effector*, ou effecteur de transcription de type activateur) et les systèmes CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*, ou courtes séquences répétées groupées et régulièrement espacées) /Cas9.

Les protéines TALE

Les protéines TALE ont été identifiées à cause de leur faculté de s'unir à l'ADN et de leur rôle dans la maladie causée par un pathogène des plantes, *Xanthomonas*. Ces protéines comportent de nombreux lots d'une séquence répétée de 34 acides aminés appelée domaine répété TALE. La paire d'acides aminés qui se trouve au milieu de ce domaine est très variable, alors que les autres sont en général identiques. Le nucléotide qui s'unit à la répétition dépend des deux acides aminés situés au milieu.

En combinant différents domaines répétés TALE, des séquences différentes d'ADN peuvent s'unir à la protéine TALE. Si l'on construit une molécule d'ADN recombinant réunissant l'ADN codant une protéine TALE à un ADN codant une nucléase, elle code désormais une nouvelle nucléase spécifique pour une séquence. On parle de TALE-nucléase, ou TALEN, pour désigner la protéine produite à partir de cet ADN recombinant. On peut introduire une molécule d'ADN recombinant codant la TALEN dans les cellules, et la TALEN s'installera dans un gène particulier du génome : la nucléase peut alors couper l'ADN à cet endroit. Quand la cellule tente de réparer l'ADN coupé, il y a parfois des erreurs, et des séquences peuvent se perdre. Si c'est le cas, le gène peut devenir inactif. On a mis au point des versions de cette stratégie pour remplacer complètement un gène renfermant des séquences reconnues par la TALEN.

Le système CRISPR/Cas9

De même que l'étude de la restriction d'hôte chez les bactéries a abouti à la découverte des endonucléases de restriction, l'étude de la manière dont certaines bactéries deviennent « immunisées » contre l'infection par un virus a conduit à la découverte du système CRISPR/Cas9. Certaines bactéries paraissent posséder une sorte d'immunité adaptative impliquant un système complexe qui a évolué en permettant l'incorporation d'une partie du génome viral au génome bactérien. Cet ADN viral peut ensuite être pris comme cible lors d'une nouvelle infection par un virus possédant la même séquence d'ADN. La bactérie utilise l'ADN viral pour transcrire un ARN utilisé comme « guide » par une nucléase (Cas9) pour cibler l'ADN possédant la même séquence. Comme il est beaucoup plus simple d'imaginer et de synthétiser un ARN guide que de construire une TALEN, ce système paraît plus simple et plus souple.

Une fois à l'intérieur d'une cellule et associés, un ARN guide et la protéine Cas9 sont à même de rechercher un gène qui s'accorde avec

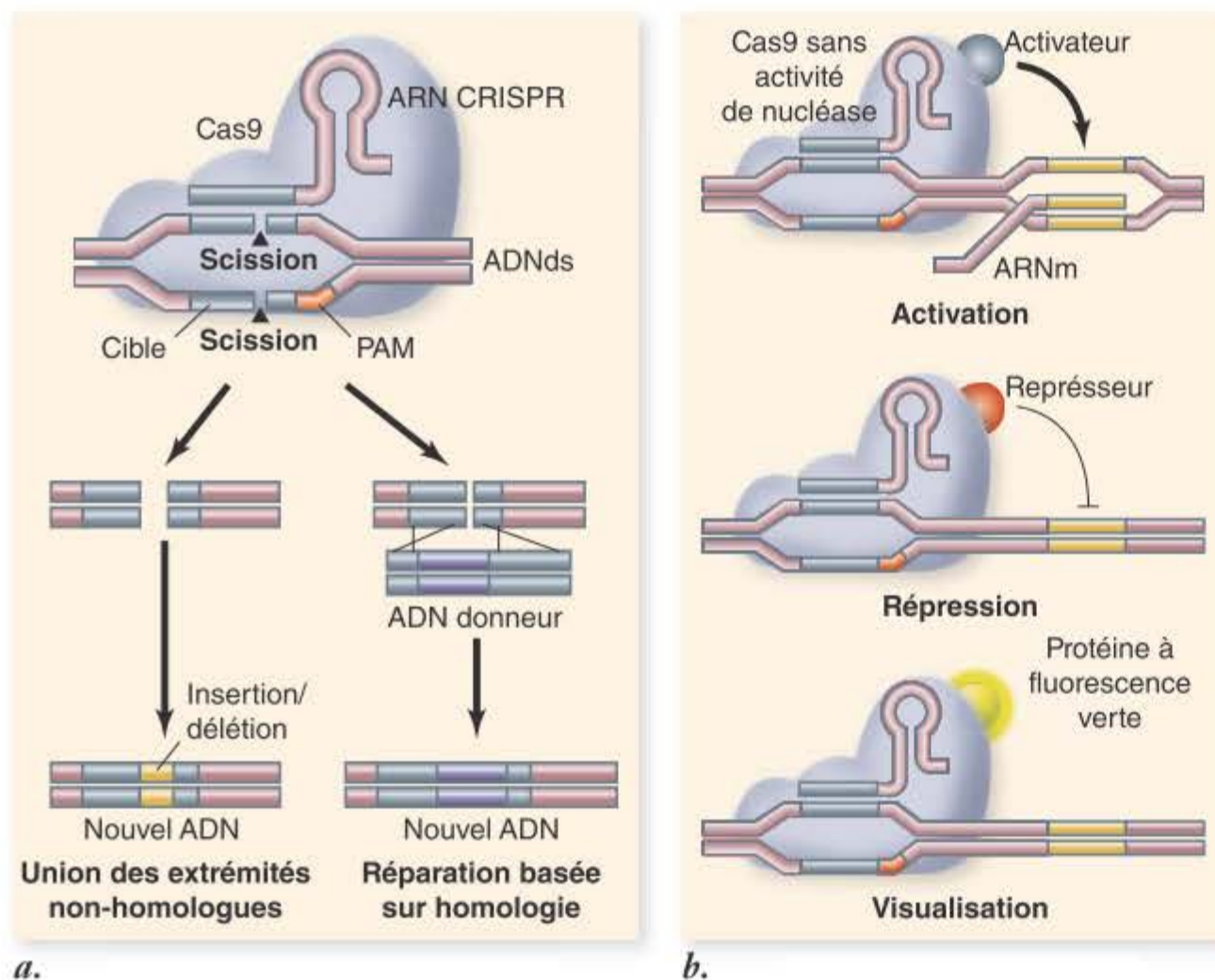


Figure 17.9 Système CRISPR/Cas9 d'édition du génome. *a.* Un ARN guide spécifique d'une séquence dirige Cas9 vers une séquence cible et Cas9 coupe cette séquence. La réparation peut être inexacte, entraînant l'inactivation du gène ou être exacte en présence d'une séquence d'ADN donatrice résultant du remplacement de la séquence d'ADN cible par la séquence donatrice. *b.* On peut utiliser la technologie de l'ADN recombinant pour diriger Cas9 vers un gène et l'allumer (activation), l'éteindre (inactivation) ou révéler sa localisation dans le génome.

Source : New England BioLabs Inc., www.neb.com/tools-and-resources/feature-articles/crispr-cas9-and-targeted-genome-editing-a-new-era-in-molecular-biology

la séquence de l'ARN guide et de s'y associer (figure 17.9a). Cas9 est une nucléase, elle peut couper l'ADN auquel il est associé. Une réparation inappropriée de l'ADN coupé peut entraîner de petites délétions ou des insertions dans la séquence génomique, entraînant la perte de la fonction génique. D'un autre côté, en présence d'un ADN bicaténaire linéaire, la réparation contrôlée par l'homologie peut réparer correctement la coupure. Grâce à un ADN bicaténaire linéaire avec une mutation, il est possible de modifier la séquence du gène. Au contraire, si l'on cible un allèle défectueux d'un gène, il est possible de remplacer une mutation par une séquence normale. Cette technique peut inactiver le génome du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) intégré dans des cellules cultivées *in vitro* et elle pourrait traiter certaines maladies génétiques.

Ce système permet aussi de réguler l'expression génique. On peut activer cette expression ou la réprimer en fusionnant Cas9 dépourvue d'activité de nucléase et un activateur ou un répresseur de la transcription selon le cas. On peut aussi réaliser des fusions entre des protéines fluorescentes et des protéines Cas9 déficientes en tant que nucléase (figure 17.9b). Cela pourrait simplifier la détection et l'analyse des oncogènes, qui sont amplifiés dans certains cancers.

Questions d'apprentissage 17.3

Il est possible d'identifier des personnes à partir des empreintes d'ADN. La banque de données CODIS renferme un ensemble spécifique de locus STR. La PCR peut être utilisée pour créer des mutations dans l'ADN à des sites spécifiques ou aléatoires. L'interférence de l'ARN permet de réduire la quantité de produit génique. Les techniques d'édition du génome permettent de supprimer la fonction génique et d'introduire de nouveaux allèles dans les chromosomes.

- Quelles sont les différences entre l'édition du génome et la création de mutations spécifiques *in vitro* ?
- Comparez les systèmes d'édition TALE et Crisp/Cas9.

17.4 Construction et utilisation d'organismes transgéniques

Objectifs

1. Expliquer comment la nature universelle du code génétique permet la transgénèse.
2. Comparer les souris knock-out, knock-in et conditionnées.
3. Montrer comment on obtient des plantes transgéniques.

Les organismes transgéniques portent un gène provenant d'une autre espèce, appelé *transgène*, qui a été incorporé au génome par ingénierie génétique. On peut ajouter des gènes au génome d'un organisme, mais on peut aussi en enlever ou changer des gènes dans le génome. Les techniques utilisées pour l'obtention des organismes génétiquement modifiés sont différentes des méthodes de sélection traditionnelles. Leur création a mis en évidence la fonction de nombreux gènes et elle a des applications en médecine, en biologie environnementale et en agriculture.

La transgénèse est possible grâce à la nature universelle du code génétique

On peut introduire un gène humain dans un génome de souris, et les cellules de la souris exprimeront ce gène. De même, on peut introduire un gène humain dans le génome de la bactérie *E. coli*, et la bactérie produira la protéine codée. Les cellules d'organismes appartenant à des espèces différentes interprètent en effet de façon identique l'information génétique. Le code génétique utilisé pour déchiffrer l'information d'un gène est le même chez les bactéries, les archées et les eucaryotes. Par exemple, la phénylalanine sera toujours codée par le codon UUU ; c'est

le cas pour le code génétique des humains et d'*E. coli*. Il existe cependant des différences mineures du code génétique. Par exemple, celui des mitochondries est un peu différent du code utilisé pour les gènes nucléaires.

L'élimination ou l'addition de gènes peut révéler leur fonction

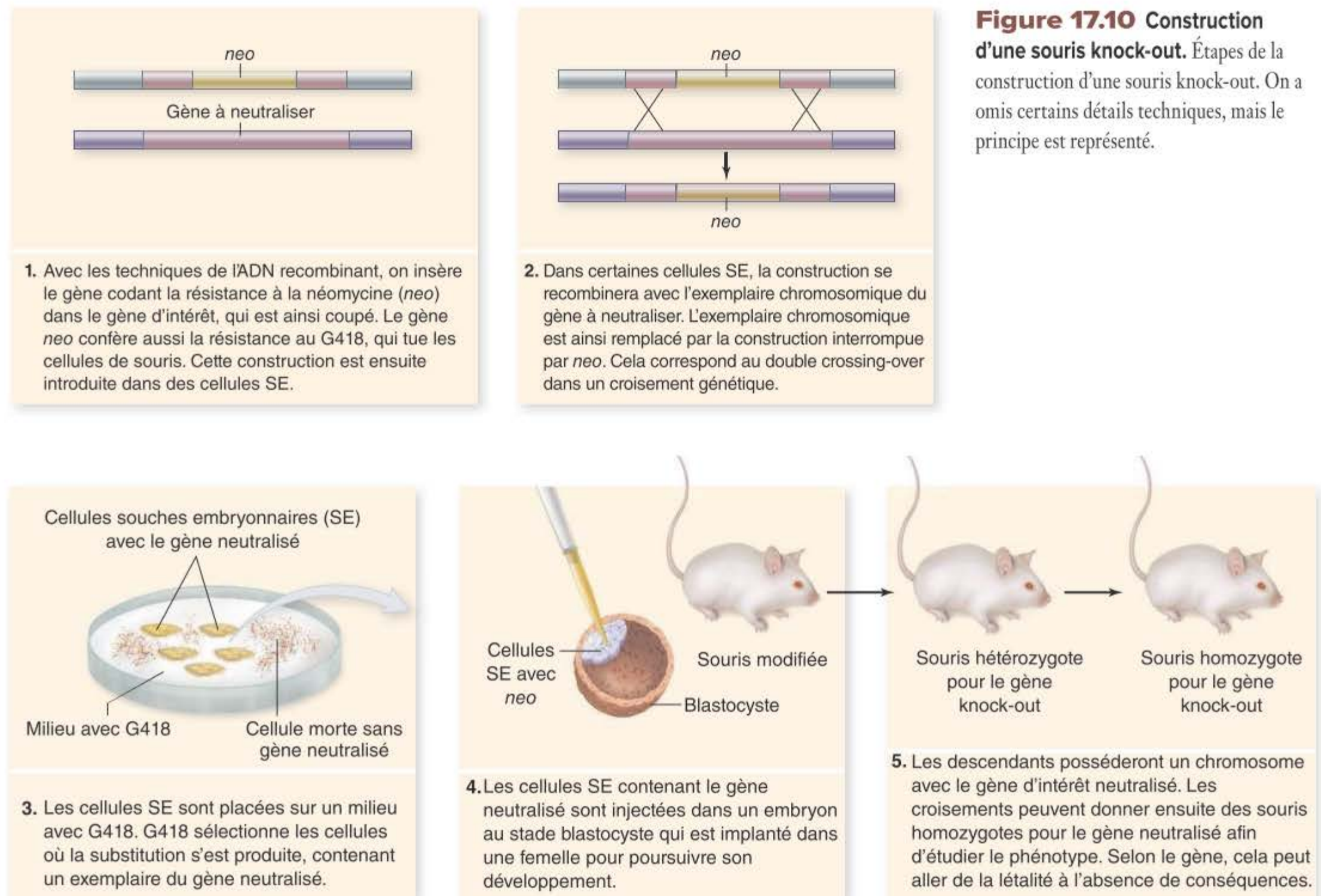
On peut combiner les techniques de l'ADN recombinant avec d'autres techniques pour obtenir des organismes auxquels on a enlevé ou ajouté des gènes. Dans certains cas, il est possible d'enlever un gène et de le remplacer ensuite par une version génétiquement modifiée. L'étude de ces animaux et plantes permet aux scientifiques de mieux comprendre les relations entre génotype et phénotype. En introduisant des allèles mutants dans les organismes, il est possible d'étudier les effets de mutations spécifiques au niveau de l'organisme.

Les souris « knock-out »

Dans un animal « knock-out », un gène a été inactivé, et la fonction de ce gène est perdue. On peut inactiver des gènes chez plusieurs organismes expérimentaux. Le plus utile pour la génétique humaine est la souris, qui possède une riche histoire génétique. On peut se rendre compte des conséquences de l'inactivation d'un gène dans une souris adulte ou, si le gène est indispensable à la survie, on peut identifier le

stade de développement nécessitant la fonction du gène. Voici une description des étapes d'une expérience de ce type, également illustrée à la figure 17.10.

1. Le gène cloné est coupé et une partie est remplacée par un gène marqueur grâce aux techniques de l'ADN recombinant. Pour les bactéries, le marqueur code la résistance à un antibiotique, la néomycine, permettant aux cellules de souris de survivre sur un milieu de culture contenant une substance apparentée, G418. Cette construction est conçue de manière à ce que le gène marqueur soit entouré par l'ADN bordant normalement le gène d'intérêt sur le chromosome.
2. On introduit le gène interrompu dans des **cellules souches embryonnaires (cellules SE)**. Ces cellules proviennent de jeunes embryons et peuvent donner différents tissus adultes. Dans ces cellules, le gène peut se recombiner avec l'exemplaire chromosomique du gène grâce à l'ADN qui les borde. C'est le même type de recombinaison qui est utilisé pour les cartes génétiques (chapitre 13). Le gène knock-out associé au gène de résistance ne possède pas d'origine de réplication et sera donc perdu en l'absence de recombinaison. Les cellules sont cultivées sur un milieu avec G418 pour sélectionner les recombinants. (Seules les cellules possédant le gène marqueur peuvent se développer en présence de G418.)



3. Les cellules SE contenant l'allèle invalidé sont injectées dans un embryon en début de développement qui est ensuite implanté dans une femelle pseudo-enceinte (accouplée à un mâle ayant subi une vasectomie pour que son utérus soit réceptif). Une partie des cellules des jeunes de cette femelle possèdent un exemplaire invalidé du gène d'intérêt. Les souris chimériques sont croisées avec une souris normale et certains descendants seront entièrement hétérozygotes. Dans certains cas, on peut déceler un phénotype et voir si l'hétérozygotie modifie une fonction biologique. Si la mutation est récessive et n'est pas létale, on peut croiser les animaux transgéniques pour obtenir des lignées homozygotes dont on peut analyser le phénotype.

Les souris « knock-in »

Chez les souris knock-in, un allèle normal est remplacé par un allèle porteur d'une altération génétique spécifique. La possibilité d'éliminer des allèles permet d'étudier les conséquences d'une perte complète de la fonction d'un gène, mais l'analyse des allèles qui modifient la fonction sans l'éliminer totalement n'est pas possible. On peut construire in vitro des mutations spécifiques, puis les introduire dans les souris pour vérifier les conséquences des modifications. Le chercheur peut ainsi utiliser des allèles apparus naturellement, des mutations ciblées en fonction d'autres informations ou absolument toutes les modifications possibles. On peut introduire des mutations entraînant la disparition

totale ou partielle de la fonction, ou même l'apparition d'une nouvelle fonction.

L'inactivation conditionnelle permet d'étudier des gènes essentiels

L'inactivation des gènes des souris knock-out présente deux défauts majeurs. En premier lieu, un gène invalidé entraîne l'inactivation dans toutes les cellules de tous les tissus. C'est un problème pour les gènes dont les produits affectent plusieurs tissus. L'analyse phénotypique d'une invalidation affectant de nombreux tissus peut être complexe, voire même impossible. Le second problème concerne les gènes importants pour le développement. Un gène indispensable pour le développement initial entraînera la létalité de l'embryon, et il ne restera rien à analyser. En raison de ces limitations, on a mis au point des moyens permettant d'invalider des gènes dans des tissus particuliers et à des stades spécifiques du développement. L'inactivation conditionnelle permet d'invalider un gène dans des cellules de tissus spécifiques ou à des stades spécifiques du développement.

L'inactivation conditionnelle d'un gène est généralement basée sur le système de recombinaison Cre-Lox à partir du virus bactérien P1. Cre est une enzyme qui catalyse la recombinaison entre de courtes séquences d'ADN appelées Lox. En présence de l'enzyme Cre, si un gène d'intérêt est flanqué par deux sites Lox, la recombinaison entre ces sites élimine la séquence d'ADN intermédiaire (le gène d'intérêt) sous la forme d'un ADN circulaire qui sera dégradé (figure 17.11).

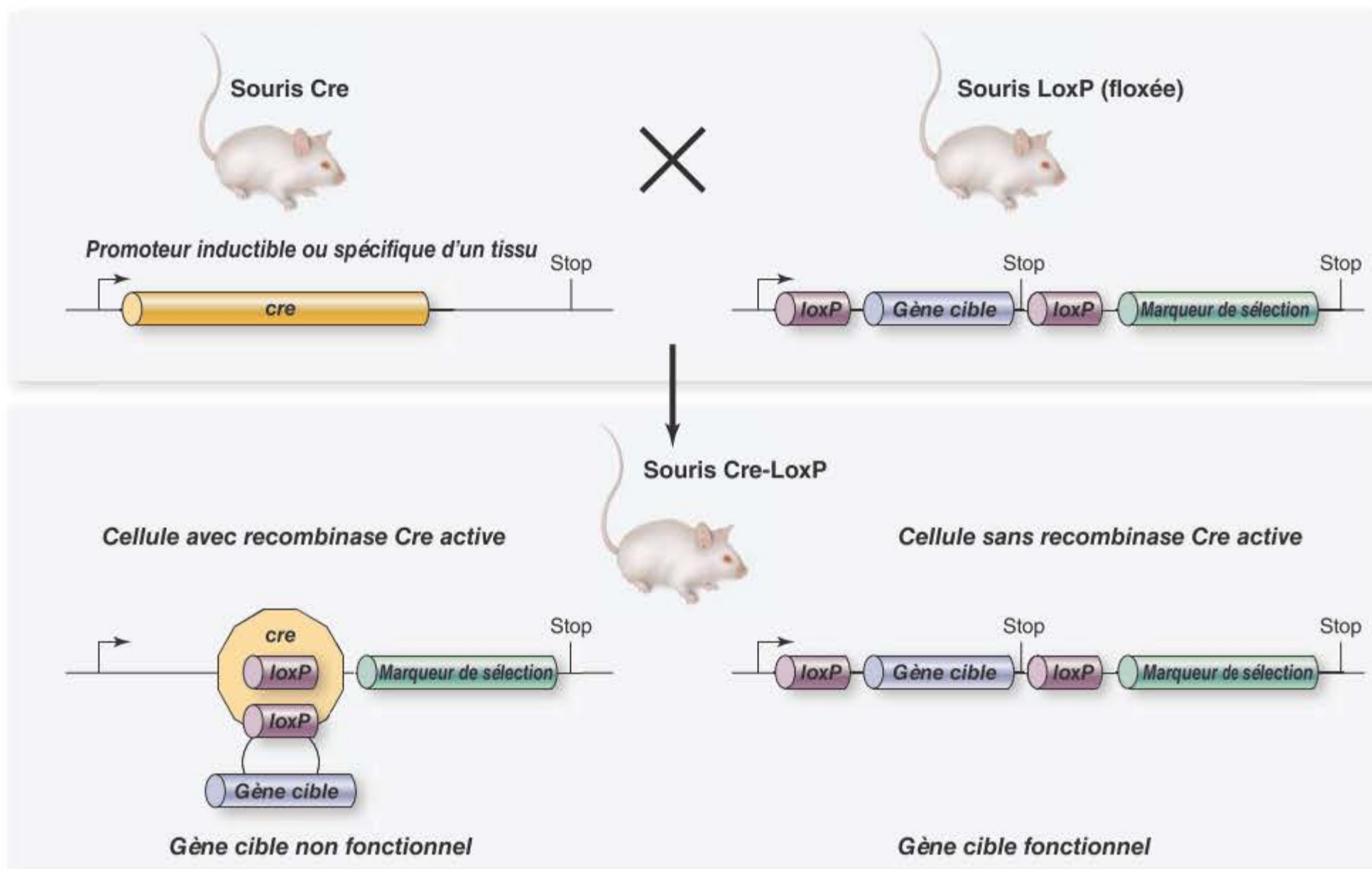


Figure 17.11 Obtention de souris knock-out conditionnelles et spécifiques des tissus. Une souris Cre exprimant la Cre recombinase à partir d'un promoteur inductible ou spécifique d'un tissu est croisée avec une souris possédant un gène cible « floqué ». La souris « floquée » est obtenue par la technique utilisée pour l'obtention d'une souris knock-in. Les descendants posséderont à la fois le gène exprimant Cre et le gène cible « floqué ». Le promoteur exprimant Cre est allumé en présence d'une molécule inductrice ou dans un tissu particulier.

Invalidation de gènes spécifiques des tissus

Deux lignées de souris transgéniques ont été construites pour effectuer une inactivation conditionnelle avec Cre-Lox. La première exprime l'enzyme Cre à partir d'un promoteur qui n'est actif que dans le tissu d'intérêt. Dans ces souris, Cre ne sera produite que dans ce tissu. La seconde lignée est une souris knock-in contenant le gène d'intérêt flanqué des séquences Lox. Une séquence d'ADN flanquée de sites Lox est dite « floxée ».

Une fois les deux lignées obtenues, les croisements génétiques donnent des descendants dont toutes les cellules possèdent la recombinaise Cre et l'allèle à invalider. Cependant, la recombinaison n'éliminera l'ADN « floxé » que dans les tissus qui expriment l'enzyme Cre. Les conséquences de la perte de la fonction du gène floxé ne se manifesteront donc que dans le tissu analysé. Les autres tissus de la souris conserveront l'allèle normal et ne devraient pas subir les conséquences de la perte du gène (figure 17.11).

Invalidations développementales

Pour invalider un gène à un stade particulier du développement, la stratégie est la même que pour l'inactivation dans un tissu particulier. La seule différence est que la lignée transgénique sera manipulée de manière à exprimer Cre à un stade du développement plutôt que dans un tissu spécifique. Une variante de cette stratégie consiste à unir Cre à un promoteur qui peut être mis en route quand la souris ingère un produit particulier avec sa nourriture ou avec l'eau. On peut ainsi analyser les étapes du développement après la naissance.

Différentes techniques permettent de modifier génétiquement les plantes

On obtient des plantes génétiquement modifiées grâce à des techniques très différentes de celles qui sont utilisées pour l'obtention des animaux génétiquement modifiés. On peut obtenir des plantes transgéniques en introduisant l'ADN étranger par électroporation, bombardement physique, traitement chimique et transfert bactérien. Quelle que soit la technique utilisée, il n'est généralement pas possible de cibler spécifiquement une

séquence génique particulière, et l'intégration des transgènes dans le génome de la plante est aléatoire. On peut ainsi introduire un transgène pour qu'il s'exprime dans la plante, mais l'inactivation d'un gène particulier pose problème. On souhaite introduire des transgènes capables d'améliorer la résistance des plantes cultivées aux maladies, au gel, aux herbicides et à la sécheresse ; des modifications du profil nutritionnel seraient également utiles pour les populations confrontées à un déficit alimentaire.

Transformation des plantes par une bactérie pathogène

On peut transférer des transgènes au génome de certaines espèces végétales à partir d'un pathogène des plantes, *Agrobacterium tumefaciens*. Cette bactérie héberge le **plasmide Ti (inducteur de tumeurs)**. Ce plasmide possède des gènes qui provoquent normalement la formation d'une tumeur – une galle – dans les tissus des plantes infectées. Le plasmide contient aussi des séquences génétiques permettant le transfert d'une partie du plasmide de la bactérie aux cellules végétales. On peut isoler le plasmide Ti d'*Agrobacterium* et éliminer les gènes responsables de la formation des galls et les remplacer par le gène d'intérêt. On peut réintroduire les plasmides Ti recombinants contenant un gène d'intérêt dans *Agrobacterium* et utiliser celui-ci pour infecter des cellules isolées des plantes. Pendant l'infection, la bactérie transfère à la cellule végétale la partie de son plasmide Ti où se trouve le gène d'intérêt et ce morceau d'ADN s'intègre au génome de la cellule (figure 17.12). On parle d'une transformation. Si le milieu de culture et les substances de croissance sont adéquats, on peut induire la production de racines et de tiges à partir des cellules infectées. Une plante adulte dont toutes les cellules contiennent le transgène se développe enfin.

Transformation par bombardement de particules

Agrobacterium ne peut infecter toutes les plantes et la méthode qui vient d'être décrite ne permet donc pas de transformer toutes les espèces. Quand il n'est pas possible de transformer les cellules par *Agrobacterium*, on peut introduire l'ADN dans les cellules par des techniques physiques. Une technique fréquente consiste à revêtir des nanoparticules d'or ou de tungstène d'ADN recombinant et de tirer ces particules sur des frag-

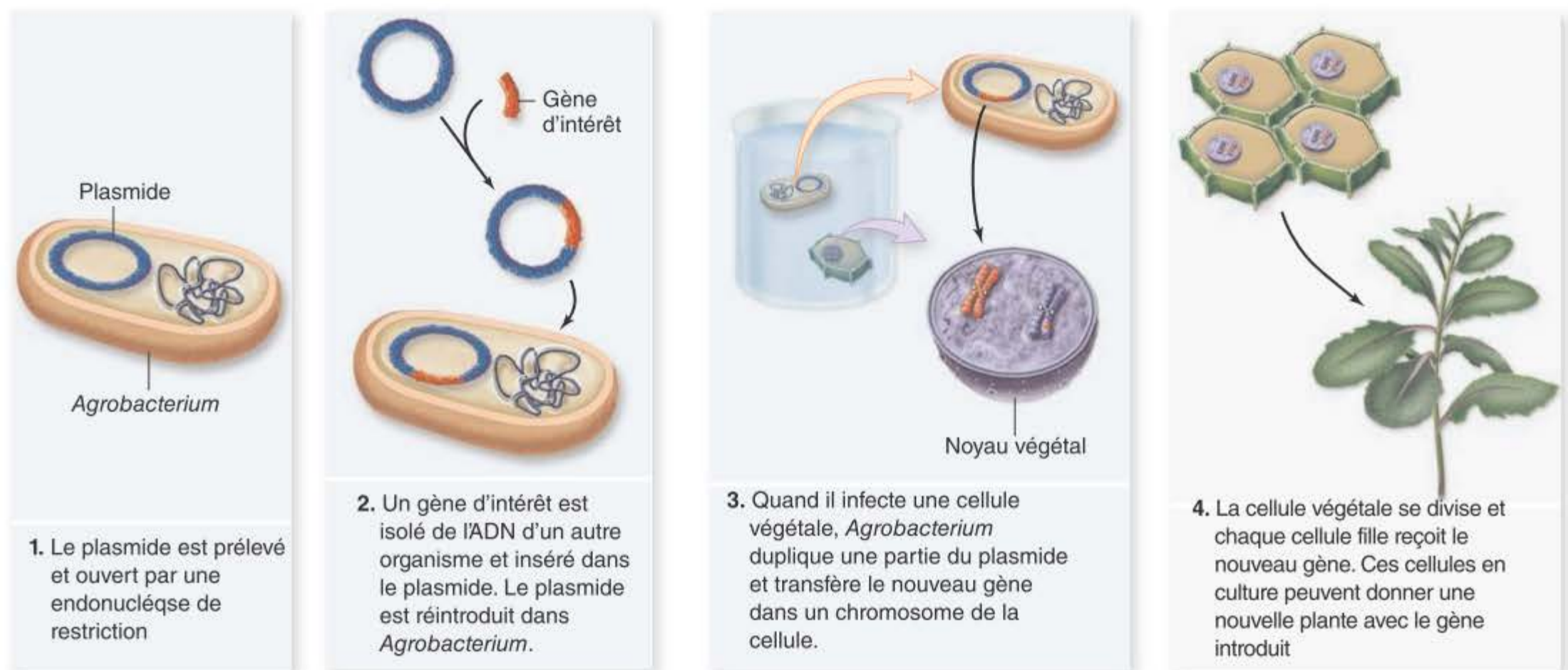


Figure 17.12 Obtention de plantes transgéniques après transformation d'*Agrobacterium*. Étapes de l'obtention de plantes transgéniques basée sur la transformation d'*Agrobacterium tumefaciens*.

ments de tissus végétaux. L'ADN est introduit dans les cellules sur ces minuscules particules et, une fois dans les cellules, l'ADN peut s'intégrer au génome. On peut ensuite cultiver le tissu *in vitro*, induire la différenciation et finalement obtenir une plante adulte.

Questions d'apprentissage 17.4

La nature quasi-universelle du code génétique permet le transfert des gènes entre espèces différentes. Des allèles particuliers sont enlevés du génome des souris knock-out. Chez les souris knock-in, des allèles particuliers sont remplacés par des exemplaires modifiés. Après une invalidation conditionnelle, les allèles peuvent être activés dans des tissus spécifiques ou à des stades spécifiques du développement. On peut transformer les plantes avec le plasmide Ti d'*Agrobacterium* ou par bombardement de nanoparticules.

- Dans quelles circonstances serait-il justifié de créer des souris knock-out conditionnelles plutôt que des souris knock-out normales et quand pourriez-vous avoir besoin de créer des souris knock-in ?

17.5 Applications environnementales

Objectifs

1. Montrer l'intérêt de la production de biocarburant à partir d'algues.
2. Décrire les facteurs qui limitent la dégradation microbienne des hydrocarbures dans les milieux naturels.
3. Expliquer l'importance des micro-organismes dans le traitement des eaux usées.

La biotechnologie environnementale est l'utilisation de processus biologiques pour la protection, la réparation et la limitation de l'impact de l'homme sur l'environnement, ou pour augmenter la durabilité des ressources actuelles. Dans les domaines de l'environnement, beaucoup d'applications de la biotechnologie concernent le recyclage des déchets et leur utilisation comme matière première pour d'autres processus. En

outre, on s'intéresse aujourd'hui beaucoup à l'application de processus biologiques comme sources renouvelables de combustible. La biotechnologie n'est pas une nouveauté, puisque les processus biologiques ont été utilisés pour le traitement des eaux usées depuis le milieu du 19^e siècle. Les progrès techniques en chimie, génomique, génétique et physique ont permis d'accélérer le développement de technologies nécessaires pour s'attaquer aux problèmes environnementaux dus à l'homme, comme la disponibilité globale de l'énergie et de l'eau.

On peut utiliser des algues pour produire des biocarburants

Les **biocarburants** sont produits à partir de la biomasse provenant de sources de carbone récemment fixé, par opposition aux carburants provenant de la biomasse « ancienne », comme les combustibles fossiles. Les sources habituelles de biomasse sont les plantes cultivées et les algues. Il existe deux formes communes de biocarburant liquide : l'éthanol provenant de la fermentation des glucides et le biodiesel produit par transformation chimique des lipides de plantes ou d'algues. Plusieurs espèces d'algues peuvent servir à la production de biodiesel, mais ce sont toujours des micro-algues dont les cellules ont un diamètre compris entre 3 et 30 μm .

Les biocarburants dérivés de micro-algues présentent plusieurs avantages par rapport aux carburants fossiles à base de pétrole. Ils sont plus favorables à l'environnement parce que le carbone provient du dioxyde de carbone atmosphérique, gaz à effet de serre qui contribue au changement climatique. La production de biodiesel à partir de micro-algues peut en outre être combinée à des processus tels que le traitement des eaux usées ou couplée aux systèmes de fixation du dioxyde de carbone des usines utilisant des combustibles fossiles.

On peut cultiver les micro-algues de différentes façons. Le mode de culture le plus simple repose sur la création de grands étangs ouverts. De construction et maintenance bon marché, ces étangs souffrent cependant de la contamination par des micro-organismes ou des prédateurs. Ils demandent aussi un espace considérable et ne permettent pas des cultures très denses. Plus coûteux, mais plus faciles à contrôler sont les vastes systèmes de culture fermés qui apportent de l'eau avec des nutriments dissous et sont combinés à un système de collecte de la lumière dans lequel la culture d'algues circule (figure 17.13). Ces photobioréacteurs sont plus faciles à contrôler et ils peuvent être alimentés en eau usée. On peut faire barboter le dioxyde de carbone dans le système : le carbone est constamment disponible et fixé par la photosynthèse. La

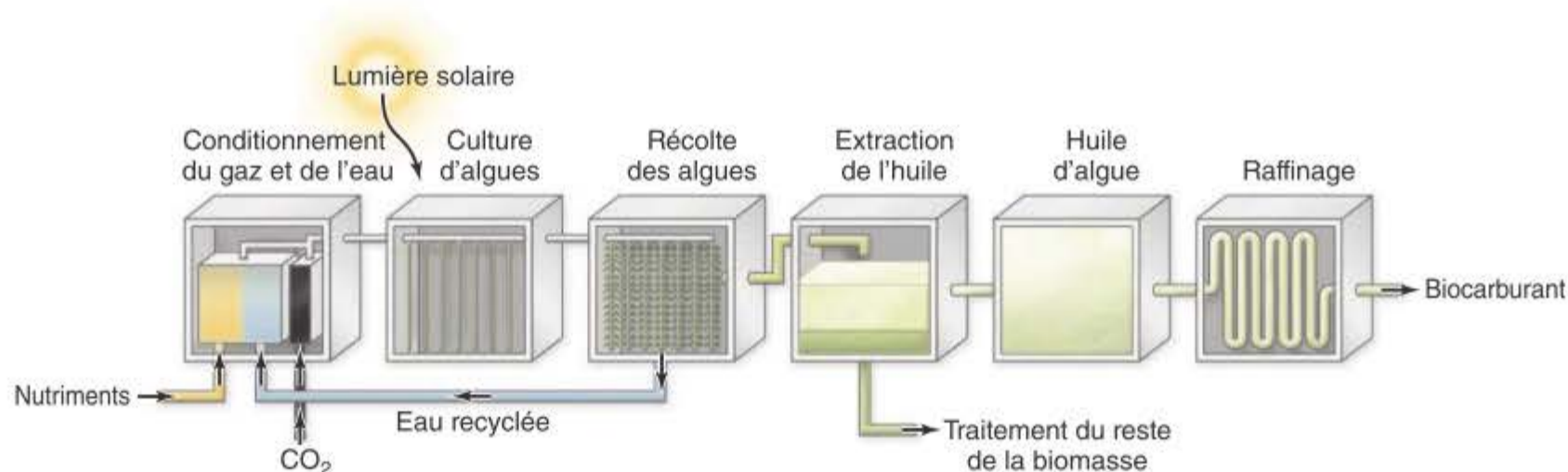


Figure 17.13 Utilisation de micro-algues pour la production de biocarburant. Cultivées dans certaines conditions, les micro-algues accumulent jusqu'à 50 % de leur biomasse sous forme de lipides. On peut les cultiver dans des étangs ou, comme on le voit ici, dans des photobioréacteurs. Dans certains cas, des usines peuvent alimenter les photobioréacteurs en dioxyde de carbone. Les lipides récoltés sont traités et raffinés sous forme de biocarburant.

photosynthèse produit du carbone réduit qui peut être transformé métaboliquement en acétyl-coA, matière première des acides gras.

Certaines espèces de micro-algues ont aussi des stratégies alimentaires hétérotrophes. Ces espèces absorbent les sucres du milieu de culture et les utilisent pour le développement de la biomasse ou pour la production de lipides. D'autres espèces encore disposent à la fois de stratégies hétérotrophes et photo-autotrophes et produisent, dans leurs cellules, les plus fortes concentrations de lipides. En condition de stress, les cellules d'algues peuvent contenir de 40 à 50 % de triglycérides.

Plusieurs techniques permettent de récolter les lipides d'algues ; c'est une des étapes les plus coûteuses dans la production du biodiesel par les algues. Une fois que les lipides ont été isolés des algues, le glycérol est séparé des chaînes d'acides gras des triglycérides par traitements chimiques. Le biodiesel est obtenu après un nouveau raffinage.

? **Question** Comment pourriez-vous manipuler génétiquement des micro-algues pour une synthèse plus efficace de lipides destinés à la production de biocarburants ?

Les micro-organismes peuvent dégrader les hydrocarbures présents dans l'environnement

Notre dépendance des carburants dérivés des hydrocarbures – qu'ils proviennent du pétrole ou qu'ils soient d'origine biologique – a des conséquences inévitables et graves. Ces carburants peuvent envahir les écosystèmes et provoquer des dommages environnementaux. Certains hydrocarbures persistent pendant des décennies dans les écosystèmes terrestres, aquatiques et marins et ils peuvent s'accumuler sur et dans les organismes et les faire périr.

Les hydrocarbures persistant dans l'environnement peuvent se dissiper lentement par évaporation de composés volatiles, par dissolution et dispersion dans les milieux aqueux et par oxydation en présence de lumière. Il est important de savoir que certains micro-organismes sont capables de métaboliser les polluants hydrocarbonés. La dégradation ou la métabolisation de ces polluants par les micro-organismes est la *bioremédiation*. Ces micro-organismes métabolisent les hydrocarbures à une vitesse qui dépend de plusieurs variables, comme la température, les propriétés physiques et chimiques du polluant, l'oxygénation, le pH, la salinité, la présence d'autres micro-organismes et peut-être surtout, l'alimentation disponible.

Les recherches en laboratoire montrent qu'un supplément alimentaire augmente significativement la vitesse de métabolisation des polluants hydrocarbonés par certains micro-organismes. L'addition de certains nutriments et d'autres substances chimiques au milieu pollué permet d'accélérer la bioremédiation des polluants hydrocarbonés. Malheureusement, l'augmentation de la décontamination ne semble pas aussi efficace dans l'environnement qu'en laboratoire. Une possibilité intéressante pour accélérer la décontamination par micro-organismes est l'amélioration, par ingénierie génétique, des voies impliquées dans l'accès aux hydrocarbures et leur métabolisation.

La bioremédiation des hydrocarbures est un volet important des projets de décontamination. En cas de métabolisation par les microorganismes, il est important que les hydrocarbures soient finalement transformés en biomasse ou catabolisés en dioxyde de carbone, pour éviter la libération, dans l'environnement, de tout autre composé toxique.

Le traitement des eaux usées repose sur l'action de micro-organismes

Le traitement des eaux usées industrielles et domestiques est un autre exemple d'utilisation de micro-organismes pour décontaminer une ressource naturelle. Les eaux usées peuvent provenir des égouts et contenir des matières fécales humaines et animales aussi bien que des contaminants industriels. Le rejet de ces eaux usées sans traitement provoquerait des ravages dans les écosystèmes et la propagation de maladies.

Le traitement des eaux usées passe par deux ou trois stades : les traitements primaire, secondaire et final. Les micro-organismes jouent un rôle essentiel dans l'étape secondaire, et parfois dans le traitement final. Le traitement primaire fait appel à des techniques physiques et chimiques pour éliminer des particules de différentes tailles. Le traitement secondaire peut comporter une digestion par des bactéries anaérobies, des bactéries aérobies ou les deux (figure 17.14).

Traitement aérobie des eaux usées

Après le premier traitement, les eaux sont mises dans de grands réservoirs aérés et continuellement agités pour dégrader le reste de la matière organique. Les bactéries et autres organismes s'agglomèrent en paquets appelés floc. La dégradation des composés hydrocarbonés restants se poursuit dans ce floc, qui est ensuite prélevé. On traite aussi les eaux usées sur des lits de cailloux contenant des communautés bactériennes, ou biofilms. Ceux-ci jouent le même rôle que le floc des réservoirs avec agitation.

On peut rejeter dans l'environnement l'eau traitée dans un digesteur aérobie ou lui faire subir un nouveau traitement pour la rendre potable. Le traitement final permet d'éliminer les contaminants inorganiques, comme le phosphore. Pour cela, il faut ajouter des produits chimiques ou faire appel à des espèces de bactéries capables de métaboliser le phosphore en solution. Le phosphore métabolisé s'accumule dans les bactéries sous la forme de granules cytoplasmiques qui peuvent être collectés et éliminés.

Traitement anaérobie des eaux usées

On réalise la digestion anaérobie des eaux usées dans des réacteurs fermés appelés digesteurs de boues. Dans ces digesteurs, des bactéries anaérobies catabolisent en monomères les polysaccharides, lipides et protéines restant après le traitement primaire. Les acides gras, acides aminés et sucres qui en résultent sont métabolisés en molécules telles que l'acétate, l'hydrogène gazeux et le dioxyde de carbone. Les archées du digesteur peuvent transformer ces molécules en méthane, dioxyde de carbone et eau. On peut brûler le méthane pour chauffer et alimenter l'usine de traitement des eaux. Une partie des boues produites par le digesteur est recyclée dans le système pour maintenir la population de bactéries nécessaire à la digestion.

Questions d'apprentissage 17.5

La biotechnologie environnementale applique des processus biologiques pour protéger ou restaurer l'environnement. On peut utiliser des micro-algues pour produire du biocarburant. Parmi les avantages, on peut citer une meilleure durabilité et la liaison de la production du carburant au traitement des eaux usées. L'addition de nutriments aux milieux contaminés peut stimuler la dégradation des hydrocarbures. Les processus de traitement des eaux usées par les micro-organismes passent par plusieurs étapes pendant lesquelles la digestion aérobie et anaérobie repose sur des micro-organismes.

- L'ingénierie génétique pourrait-elle améliorer le traitement des eaux usées ?

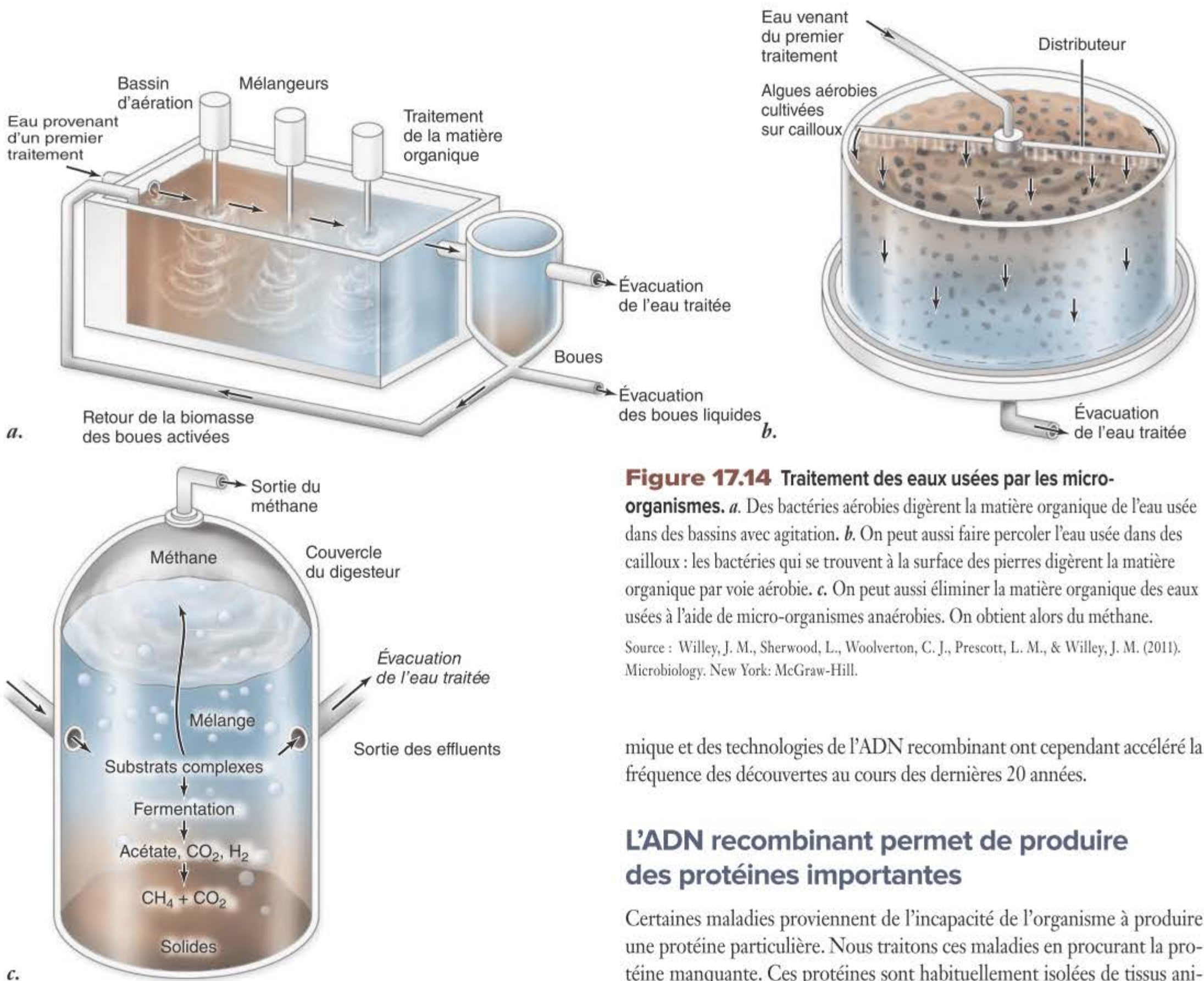


Figure 17.14 Traitement des eaux usées par les micro-organismes. *a.* Des bactéries aérobies digèrent la matière organique de l'eau usée dans des bassins avec agitation. *b.* On peut aussi faire percoler l'eau usée dans des cailloux : les bactéries qui se trouvent à la surface des pierres digèrent la matière organique par voie aérobie. *c.* On peut aussi éliminer la matière organique des eaux usées à l'aide de micro-organismes anaérobies. On obtient alors du méthane.

Source : Willey, J. M., Sherwood, L., Woolverton, C. J., Prescott, L. M., & Willey, J. M. (2011). Microbiology. New York: McGraw-Hill.

mique et des technologies de l'ADN recombinant ont cependant accéléré la fréquence des découvertes au cours des dernières 20 années.

L'ADN recombinant permet de produire des protéines importantes

Certaines maladies proviennent de l'incapacité de l'organisme à produire une protéine particulière. Nous traitons ces maladies en procurant la protéine manquante. Ces protéines sont habituellement isolées de tissus animaux, mais elles peuvent aujourd'hui être exprimées dans des bactéries et d'autres systèmes grâce à l'ADN recombinant. C'est le cas de l'insuline, premier produit médical obtenu de cette manière. L'insuline est produite dans le pancréas, puis transportée par le sang. Dans les tissus ciblés, l'insuline se fixe à un récepteur et entame un processus permettant l'accès au glucose. Le diabète de type I résulte d'une production insuffisante d'insuline par le pancréas et, finalement, d'une augmentation du taux de sucre dans le sang. La soif, une urination fréquente et la faim sont des symptômes d'une teneur élevée du sang en glucose. La cécité, des dégâts nerveux, le coma et finalement la mort sont les complications à long terme. Le diabète de type I est traité par des injections quotidiennes d'insuline.

L'insuline a longtemps été prélevée chez les porcs, purifiée et prescrite pour le traitement du diabète de type I. Dans les années 1980, il a été possible d'exprimer l'insuline humaine dans *E. coli* et la levure *S. cerevisiae*. On pouvait purifier l'insuline et l'utiliser à la place de la protéine provenant du porc pour traiter le diabète de type I. Dans les cellules humaines, l'insuline s'exprime sous la forme d'un ARNm simple qui est traduit en une protéine simple. Le polypeptide est scindé dans le cytoplasme en deux petites chaînes qui s'unissent par des liaisons disulfure (figure 17.15a).

Si l'ADNc correspondant aux régions codantes du gène de l'insuline s'exprime chez *E. coli*, un long polypeptide est produit, parce qu'*E. coli* est incapable de transformer les protéines après la traduction comme le font les cellules humaines (figure 17.15a). Plutôt que d'exprimer l'in-

17.6 Applications médicales

Objectifs

1. Montrer comment l'ADN recombinant a été utilisé en médecine, pour les traitements et le diagnostic.
2. Comparer les technologies FISH et gene chip pour le diagnostic des maladies.
3. Montrer comment les immuno-essais peuvent servir au diagnostic des infections virales.

La manipulation des systèmes biologiques a permis des avancées importantes dans les soins de santé. En particulier, la biotechnologie est à l'origine de nouveaux outils diagnostiques, elle a permis le traitement de maladies génétiques et infectieuses jusqu'alors impossibles à soigner et ouvert la voie vers de nouveaux médicaments. L'application de la biotechnologie à la médecine n'est pas une nouveauté ; les progrès de la génétique, de la géno-

insuline à partir d'un seul ADNc correspondant à tout le gène de l'insuline, on utilise deux ADNc. Chaque ADNc correspond à la séquence génique d'un des deux polypeptides composant la molécule d'insuline fonctionnelle. Chaque ADNc est isolé et incorporé à un plasmide vecteur qui peut s'exprimer chez *E. coli*.

On peut purifier les protéines des deux souches d'*E. coli* exprimant les deux polypeptides de l'insuline et les mélanger pour obtenir la molécule d'insuline fonctionnelle. Après purification pour éviter toute contamination par d'autres protéines, on obtient une insuline très concentrée. À ces fortes concentrations, malheureusement, les molécules d'insuline s'agglutinent et perdent en grande partie leur faculté d'activer les transporteurs de glucose à la surface de la cellule. Des techniques d'ingénierie génétique, comme celles qui ont déjà été décrites, ont été utilisées pour muter des codons spécifiques dans les séquences d'ADNc de l'insuline pour éviter l'agglutination des protéines produites. On peut ainsi obtenir une insuline concentrée très efficace.

L'hybridation avec fluorescence in situ permet de détecter des réarrangements chromosomiques grossiers

L'hybridation avec fluorescence in situ (FISH, pour *fluorescent in situ hybridization*) est basée sur la faculté de dénaturation et renaturation réversible de l'ADN. En biologie moléculaire, beaucoup de techniques utilisent l'hybridation pour détecter un ADN particulier dans un

mélange complexe. L'hybridation utilise une sonde, la séquence que vous recherchez, marquée par fluorescence ou radioactivité. Sonde et ADN cible sont dénaturés et mélangés. Quand les conditions permettant la renaturation sont rétablies, la sonde trouvera toute séquence complémentaire présente dans le mélange et un hybride se formera. Dans le cas de FISH, l'ADN cible est un étalement de chromosomes métaphasiques, ou de cellules avec des chromosomes intacts. On peut ainsi détecter des anomalies chromosomiques grossières, comme de grandes délétions, inversions, duplications et translocations (voir chapitre 15).

L'aneuploïdie et les anomalies chromosomiques sont associées à de nombreuses formes de cancer. Dans 25 % environ des cancers du sein invasifs, le gène *HER2* est dupliqué. Au lieu des deux exemplaires habituels attendus dans une cellule diploïde, il peut y en avoir des centaines. *HER2* est une protéine réceptrice qui active une voie de transduction des signaux entraînant la prolifération cellulaire. Un nombre plus grand d'exemplaires de *HER2* peut donc entraîner la croissance incontrôlée des cellules et la formation de tumeurs. Certains médicaments peuvent bloquer les signaux cellulaires passant par la protéine *HER2* et stopper ou empêcher le développement de ce type de tumeur. Ces médicaments ne sont cependant utiles que pour le traitement des cancers du sein où le gène *HER2* est dupliqué. Il est donc essentiel, pour la prescription de ce médicament, de savoir si *HER2* a été dupliqué. On peut ainsi personnaliser le traitement en se basant sur le profil génétique spécifique de la patiente.

On peut utiliser FISH pour détecter *HER2* dans les cellules d'une biopsie de tumeur. Les cellules tumorales sont collectées et traitées de

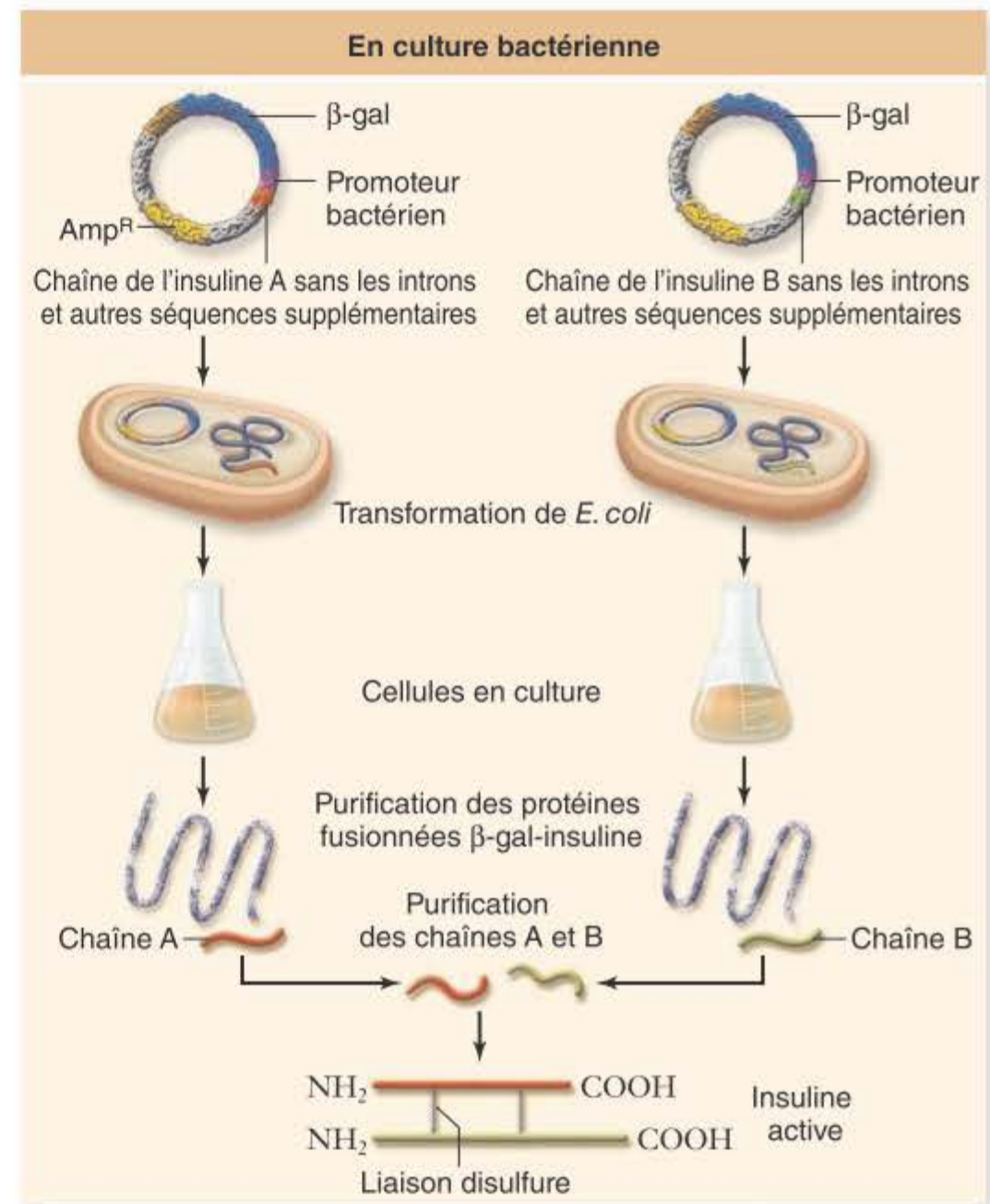
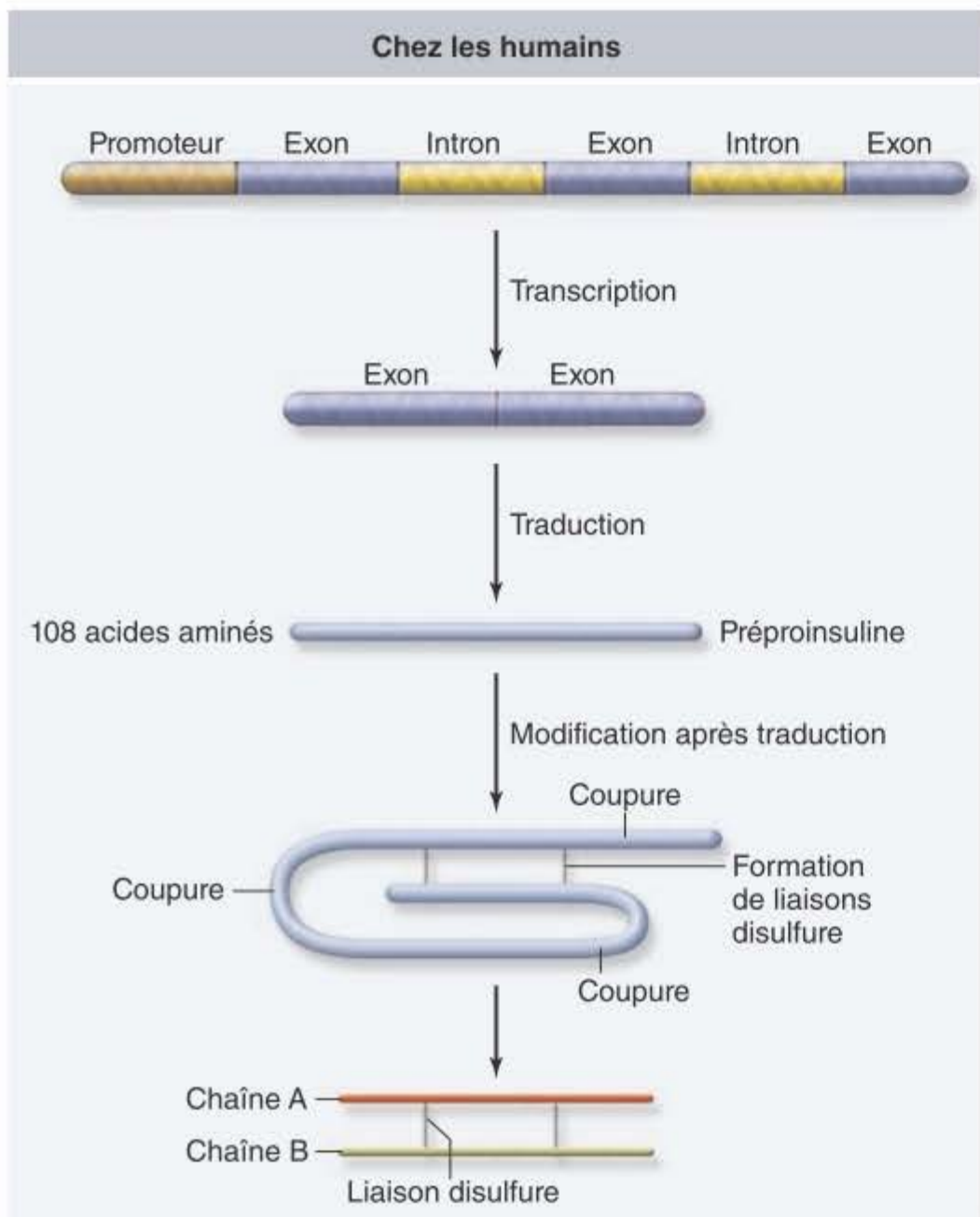


Figure 17.15 Synthèse de l'insuline par *E. coli* génétiquement transformé. *a.* Dans les cellules humaines, un polypeptide précurseur de l'insuline est transformé, après la traduction, pour donner les chaînes d'insuline A et B qui s'associent en insuline par des liaisons disulfure. *b.* Deux ADNc correspondant aux séquences géniques pour les chaînes A et B de l'insuline sont clonés dans des plasmides et introduits dans des *E. coli* différents. Les cultures de ces deux souches d'*E. coli* expriment soit la chaîne A, soit la chaîne B. Ces chaînes sont purifiées à partir des deux souches d'*E. coli* ; quand elles sont mélangées, elles s'associent en molécules d'insuline active.

manière à observer les chromosomes. On ajoute une sonde *HER2* fluorescente dont les brins s'hybrident aux séquences complémentaires de l'ADN chromosomique (figure 17.16a). On peut ensuite observer les cellules au microscope à fluorescence : la sonde sera alors fluorescente.

Dans les cellules normales et dans celles qui proviennent de cancers du sein sans copies multiples du gène *HER2*, on ne verrait que deux petites taches fluorescentes au microscope (figure 17.16b). Si les cellules provenant du cancer du sein possèdent plus de deux exemplaires de ce gène, on observera de nombreuses taches fluorescentes beaucoup plus grandes (figure 17.16c). Avec d'autres tests, cette information permet de personnaliser la médecine et de n'administrer que les médicaments nécessaires.



Question Si vous effectuez une analyse FISH sur des cellules humaines en phase G₂ du cycle cellulaire avec une sonde qui reconnaît l'ADN télomérique (ADN localisé aux extrémités des chromosomes), combien de taches pensez-vous observer au microscope ?

Les puces à ADN permettent l'identification de marqueurs génétiques de maladie

Les puces à ADN (*gene chips*) ou micro-alignements d'ADN (*DNA microarrays*) sont des ensembles réunissant des centaines ou de milliers de séquences d'ADN différentes disposées sur une surface solide comme une lame de microscope. Ces séquences sont généralement des petits morceaux d'ADN synthétisés chimiquement, ou de courtes séquences d'ADN amplifiées par PCR ou RT-PCR. On peut répondre à différentes questions avec des puces à ADN différentes ou utilisées dans des conditions différentes.

Un indicateur de maladie, ou biomarqueur, est une molécule biologique qui n'est observée que dans certaines conditions. Par exemple, certaines molécules ne sont produites qu'en cas de maladie, tandis que

d'autres ne sont présentes que chez les personnes en bonne santé. Les biomarqueurs peuvent donc diagnostiquer l'état de santé ou vérifier la réponse à une thérapie. Dans le cas des puces à ADN, le biomarqueur est l'ARNm synthétisé à partir d'un gène particulier. Par exemple, les individus atteints de certaines maladies auto-immunes ou inflammatoires chroniques exprimeront, dans les cellules immunes, des gènes différents de ceux des individus sains. Les puces à ADN permettent d'identifier les gènes exprimés et le niveau relatif de l'expression de différents gènes.

On peut également utiliser les puces à ADN pour le diagnostic des maladies génétiques. Certaines de ces maladies dépendent d'un seul gène, tandis que, pour d'autres, plusieurs gènes sont concernés. On peut construire des puces à ADN pour identifier des mutations d'un seul gène ou détecter des modifications génétiques nombreuses qui, ensemble, entraînent la susceptibilité à une maladie génétique particulière. Il est même possible de construire une puce à ADN capable d'identifier une espèce bactérienne particulière responsable de maladies infectieuses. Dans certains cas, il est possible de déterminer la résistance aux antibiotiques du pathogène. Connaissant le pathogène et sa résistance aux antibiotiques, on peut administrer les antibiotiques qui ont le plus de chance d'éliminer le pathogène et de soigner la maladie.

Ensemble, des technologies comme FISH et les puces à ADN ont révolutionné l'administration des soins médicaux. Ces soins peuvent être d'autant plus spécifiques et personnalisés que les causes de la maladie sont mieux connues au niveau des individus. Ces technologies doivent cependant faire face à plusieurs défis. En premier lieu, leur succès implique une grande compétence, elles sont ensuite relativement coûteuses et, enfin, toutes les maladies ne sont pas induites ou influencées par des facteurs individuels. Par exemple, certaines maladies auto-immunes et inflammatoires sont provoquées par une perturbation de la relation entre les bactéries qui vivent sur et dans votre organisme et votre organisme lui-même. Dans ce cas, la seule étude de votre génétique ou de votre physiologie risque de ne pas répondre entièrement à votre problème.

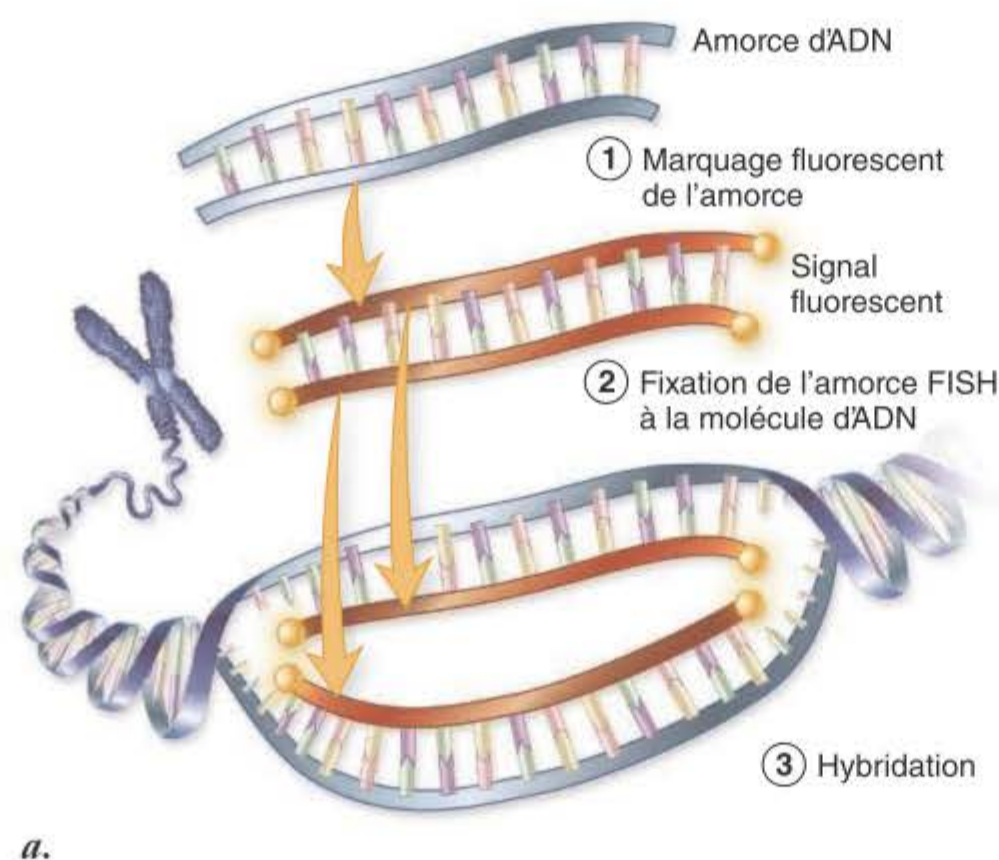
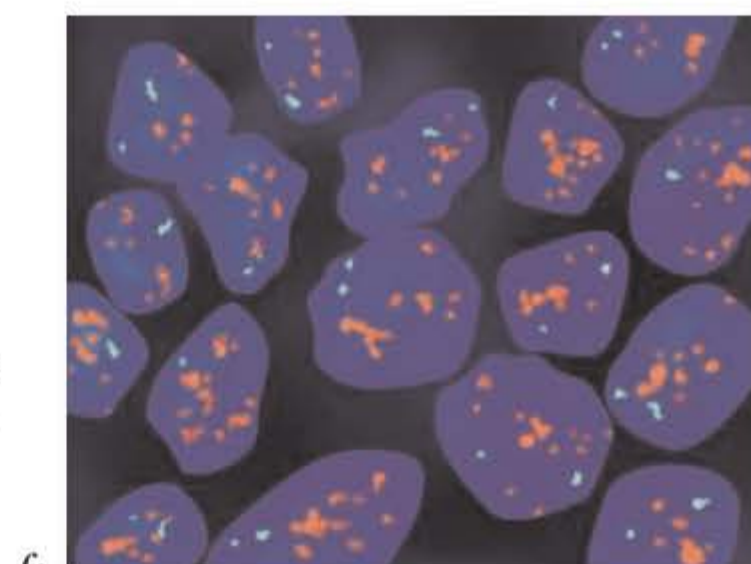
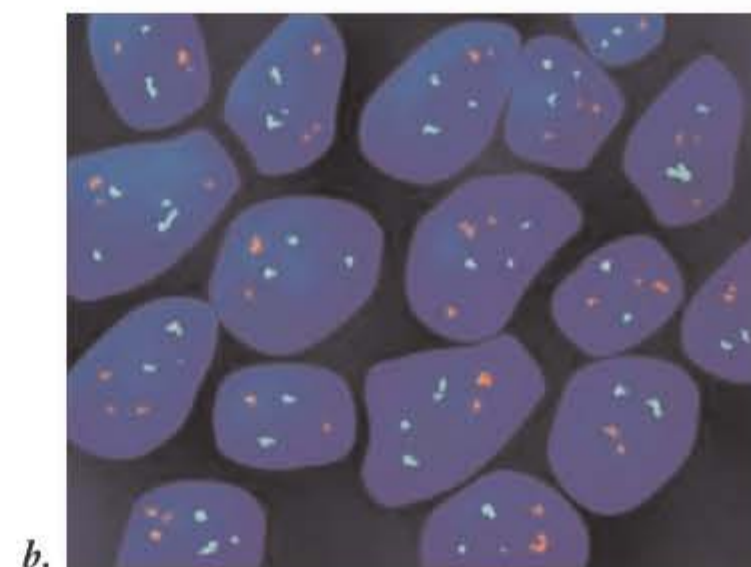
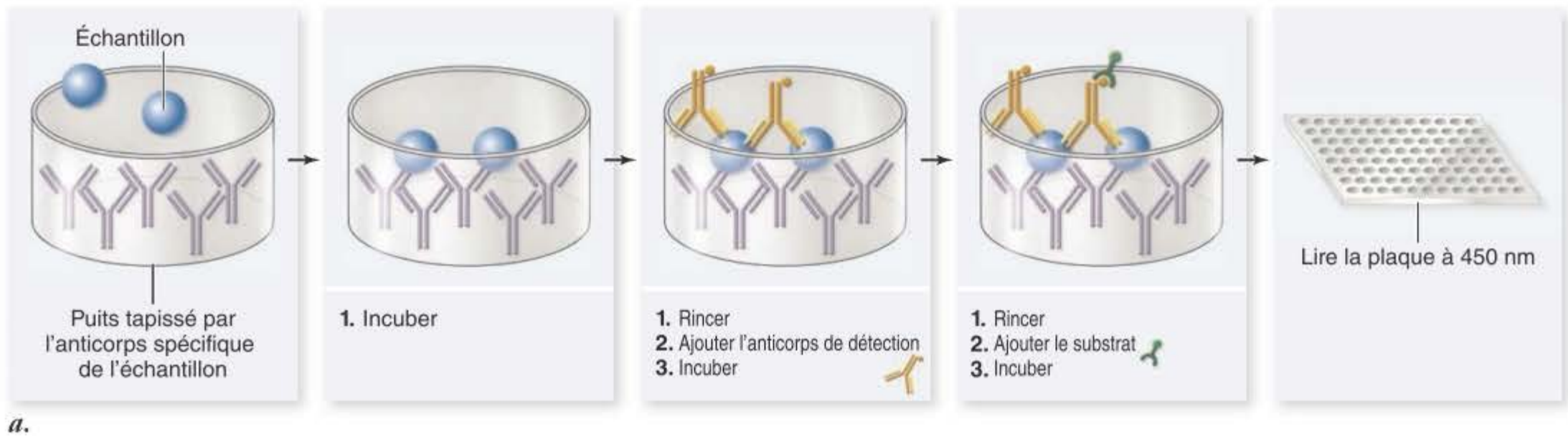
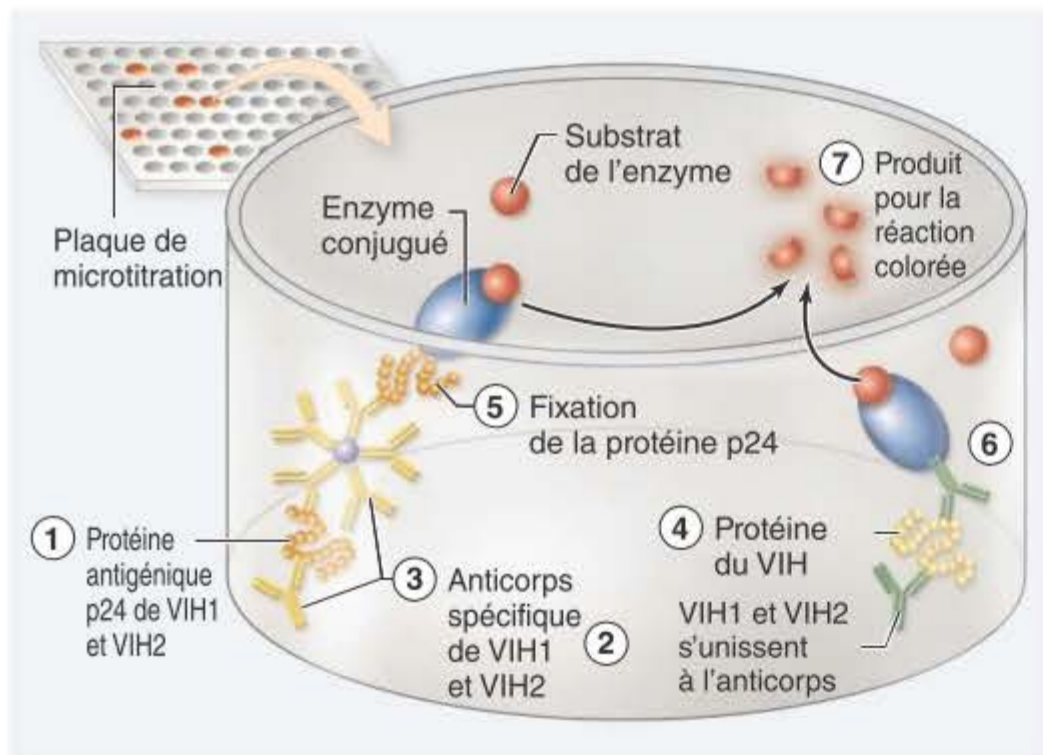


Figure 17.16 Hybridation avec fluorescence in situ. *a.* Les sondes fluorescentes s'unissent à des segments spécifiques dans les chromosomes. *b.* On ne voit que deux taches fluorescentes dans les noyaux des cellules de la tumeur, montrant que *HER2* n'est pas amplifié. *c.* Les nombreuses taches fluorescentes dans les cellules de la tumeur indiquent l'amplification de *HER2*.





a.



b. Test ELISA de l'antigène p24 du VIH. Les anticorps spécifiques des VIH1 et VIH2 sont fixés dans le puits (3) ; si le sang du patient est infecté, le VIH (2) ou l'antigène p24 (1) se fixe à l'anticorps ; on ajoute un deuxième anticorps qui s'unit à un autre site de l'antigène, puis un troisième anticorps uni à une enzyme, qui se fixe au deuxième anticorps (5, 6) ; l'addition du substrat de l'enzyme est ajoutée (7) et transformé en produit coloré en cas d'infection.

Les immuno-essais peuvent diagnostiquer rapidement des infections virales

Les immuno-essais sont des tests permettant la détection d'une molécule grâce à un anticorps. Comparés aux puces à ADN et FISH, ils sont relativement peu coûteux et d'application facile. Les anticorps sont des protéines produites par la plupart des animaux en réponse à une infection par un pathogène. Les anticorps reconnaissent très spécifiquement le pathogène et le prennent comme cible pour sa destruction par le système immunologique.

Les firmes de biotechnologie sont capables de produire des anticorps contre une série de virus et de bactéries. On peut utiliser ces anticorps dans des immuno-essais pour détecter la présence d'un virus dans un prélèvement réalisé chez un patient. On peut mettre un anticorps pour un virus spécifique dans un puits d'une plaque de microtitration (figure 17.17a). Quand on place un échantillon inconnu dans le puits, le virus éventuellement présent s'unira à l'anticorps. Il est possible de détecter ce virus par un second anticorps lié à une molécule fluorescente ou à une enzyme qui donne une substance colorée à partir d'un substrat adéquat. L'intensité de la fluorescence ou de la coloration est proportionnelle à la quantité de virus présent.

Une variante de cette technique est appliquée au diagnostic de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (figure 17.17b).

Figure 17.17 Détection d'un virus par immuno-essai. a. Étapes d'un immuno-essai destiné à la détection d'un virus dans un prélèvement. b. Les immuno-essais modernes pour le VIH impliquent simultanément des protéines et des anticorps du virus réunis dans le puits. Le virus et les anticorps dirigés contre lui présents dans le prélèvement se fixeront à la plaque et pourront être détectés par un autre anticorps produisant une substance colorée.

Dans les immuno-essais VIH, un anticorps reconnaissant le VIH est fixé au puits d'une plaque de microtitration. Quand on ajoute un échantillon prélevé chez un patient, le virus et sa protéine antigénique (p24) s'unissent à l'anticorps. Après rinçage, on ajoute, dans le puits, un mélange d'anticorps reconnaissant la protéine VIH et une protéine unie à une enzyme. Après un nouveau rinçage, toutes les enzymes unies aux anticorps pour les protéines VIH qui restent fixées entraînent une modification de couleur facile à détecter.

La thérapie par cellules souches pourrait traiter des maladies chroniques

Chaque année, des millions de personnes souffrent d'un fonctionnement anormal de tissus ou d'organes, déficience à laquelle on ne peut remédier que par le remplacement ou la réparation du tissu, ou par un traitement médicamenteux prolongé. Par exemple, la sclérose en plaques provient d'une attaque du système nerveux central par le système immunitaire. Il peut en résulter une perte de la vue, de la parole et de la mobilité. Les personnes atteintes peuvent souffrir de ces symptômes pendant de nombreuses années, puis nécessiter des soins permanents. On parle de *médecine régénérative* pour désigner le domaine médical s'occupant de ce type de maladie ou infirmité. Il y a de plus en plus d'arguments montrant que les cellules souches sont à même de réparer avec succès ou de remplacer les tissus atteints.

Les cellules souches sont des populations de cellules capables de se propager et de donner naissance à des cellules pouvant se différencier en d'autres types cellulaires. Les **cellules souches embryonnaires** sont pluripotentes, ce qui signifie qu'elles sont capables de se différencier en tous les types de cellules présentes dans un organisme adulte (voir les détails au chapitre 19). On ne trouve ces cellules que pendant les tout premiers stades du développement embryonnaire. Par la suite, le potentiel de différenciation des populations de cellules souches diminue. Certains types de cellules souches peuvent donner seulement un ou deux types de cellules. On trouve aussi des cellules souches chez les adultes, elles sont responsables de la régénération naturelle d'un tissu dont les cellules perdues ou endommagées doivent être remplacées. Plus récemment, on a pu obtenir des cellules souches à partir de types cellulaires adultes grâce à des techniques d'ingénierie génétique utilisées pour

exprimer des lots spécifiques de facteurs de transcription. Ce mécanisme de reprogrammation sera étudié au chapitre 19.

La presse populaire a largement fait écho à l'utilisation thérapeutique des cellules souches ; on ne connaît cependant que quelques réussites lors de traitements de maladies ou déficiences spécifiques. La transplantation de moelle osseuse, qui renferme des cellules souches capables de donner de nombreux types de cellules sanguines, est utilisée depuis les années 1960 pour le traitement de plusieurs maladies du sang, comme divers types de leucémie et d'anémie. Cette forme de transplantation de cellules souches a aussi réussi à arrêter la progression de la sclérose en plaques chez certains patients parce qu'elle entraîne une reprogrammation totale du système immunitaire attaquant le système nerveux central. Les dégâts nerveux ne sont pas réparés chez ces patients, mais d'autres types de traitements par cellules souches pourraient réduire les symptômes neurologiques.

La plupart des thérapies par cellules souches adoptées font usage de **cellules souches mésenchymateuses**. Ces cellules souches peuvent se différencier en certains types cellulaires formant des tissus conjonctifs, comme l'os et le cartilage. Ces thérapies peuvent induire la production et la réparation des tissus conjonctifs et réduire l'inflammation. Un autre domaine dans lequel des essais cliniques par cellules souches ont été entrepris est le traitement des crises cardiaques et des tissus lésés qui en découlent. Malgré quelques réussites, les thérapies par cellules souches doivent faire face à de sérieux obstacles avant de pouvoir réaliser les promesses des chercheurs. Il faut près de 10 ans et plus d'un milliard de dollars pour mettre sur le marché un nouveau médicament ; pour les essais cliniques de la thérapie par cellules souches, il est difficile de trouver des patients, les contrôles sont rigoureux et la réaction du public reste influencée par des facteurs politiques et sociaux.

Questions d'apprentissage 17.6

La biotechnologie de l'ADN recombinant a permis de produire à grande échelle des molécules humaines. Il est possible d'utiliser FISH pour détecter des réarrangements chromosomiques grossiers. On peut ainsi avoir une bonne information diagnostique permettant une personnalisation du traitement. Les puces à ADN permettent de déterminer le mode d'expression de lots comprenant des centaines de gènes. Les immuno-essais représentent un moyen rapide et peu coûteux de diagnostiquer des infections virales comme le VIH. Il est possible de transplanter des cellules souches pour traiter des maladies chroniques et dégénératives ; cette technologie se heurte cependant à des défis politiques et sociaux.

- Montrez comment les techniques d'ingénierie génétique pourraient servir à la production de protéines spécifiques.

17.7 Applications à l'agriculture

Objectifs

1. Montrer les avantages des plantes transgéniques
2. Identifier les formes les plus répandues de plantes transgéniques
3. Exposer les controverses concernant les OGM.

C'est peut-être par son application à l'agriculture que la biotechnologie a eu le plus d'impact. On a créé des plantes transgéniques résistantes aux maladies, tolérantes aux herbicides et à la sécheresse, et avec une meilleure qualité alimentaire. On utilise aussi les plantes pour synthétiser des médicaments, et des animaux domestiques sont modifiés génétiquement pour produire des substances biologiquement actives.

Les plantes cultivées résistantes aux herbicides permettent d'éviter le labour

Le labour consiste à retourner le sol avant la plantation. On élimine ainsi les mauvaises herbes qui entrent en compétition avec les plantes cultivées pour les nutriments et on améliore l'irrigation. Les sols qui ne sont pas labourés contiennent plus de matière organique et d'éléments inorganiques favorables au développement, ils retiennent mieux la pluie et ils sont moins sujets à l'érosion. Le labour a un coût, parce qu'il exige un équipement coûteux et qu'il prend du temps. On peut aussi éliminer les adventices des champs en appliquant des herbicides, mais la plupart des herbicides habituels ne sont pas particulièrement sélectifs et peuvent tuer différentes espèces. Si l'on peut éviter le labour, les exploitations peuvent être plus efficaces, et cela se traduit par des gains économiques.

Des plantes à larges feuilles importantes en agriculture, comme le soja, ont été génétiquement manipulées pour la résistance au glyphosate, herbicide puissant et biodégradable, qui tue les plantes en croissance active (figure 17.18). Le glyphosate agit par inhibition d'une enzyme, la 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate (EPSP) synthétase, dont les plantes ont besoin pour la synthèse des acides aminés aromatiques. Les animaux ne synthétisent pas d'acides aminés aromatiques, ils les trouvent dans leur alimentation : les animaux vivant dans et près des plantes cultivées ou dans les cours d'eau collectant les eaux de ruissellement des champs ne sont donc pas affectés par le glyphosate. Pour obtenir des plantes résistantes au glyphosate, les scientifiques ont pris un plasmide Ti pour insérer des exemplaires supplémentaires du gène de la EPSP synthétase dans les plantes. Ces plantes transformées produisent 20 fois le taux normal d'EPSP synthétase, ce qui leur permet de synthétiser les acides aminés aromatiques et de se développer en dépit de l'inhibition de l'enzyme par le glyphosate.

Cette avancée est très intéressante pour les agriculteurs, parce qu'une plante résistante au glyphosate ne doit pas être sarclée par labour. Le glyphosate étant un herbicide à large spectre d'action, les agriculteurs n'ont pas besoin de plusieurs herbicides, dont la plupart ne tuent que quelques espèces d'adventices. En outre, contrairement à beaucoup d'autres herbicides, le glyphosate est facilement dégradé dans l'environnement.

On a modifié six espèces cultivées importantes pour la résistance au glyphosate : le maïs, le cotonnier, le soja, le colza, la betterave sucrière et la luzerne. Le soja résistant au glyphosate est particulièrement populaire : il représente 60 % des surfaces totales de plantes transgéniques cultivées dans le monde. Aux États-Unis, 90 % du soja actuellement cultivé est transgénique. On a obtenu des plantes transgéniques résistantes à une gamme d'autres herbicides chez des plantes cultivées importantes comme l'orge, le riz et le blé.

Les plantes Bt sont résistantes à certains insectes nuisibles

Beaucoup de plantes commercialement importantes sont attaquées par des insectes et la défense traditionnelle contre ces attaques est l'application d'insecticides. Plus de 40 % des insecticides chimiques utilisés actuellement sont destinés aux charançons, aux vers de la capsule et

DÉMARCHE SCIENTIFIQUE

Hypothèse: les pétunias peuvent devenir résistants à l'herbicide glyphosate par une surexpression de l'EPSP synthétase.

Prédiction: les plantes de pétunia transgéniques avec un gène chimérique de l'EPSP synthétase possédant un promoteur fort seront tolérantes au glyphosate.

Test:

1. Utiliser les enzymes de restriction et la ligase pour « coller » le promoteur (35S) du virus de la mosaïque du chou-fleur au gène de l'EPSP synthétase et insérer cette construction dans les plasmides Ti.

2. Transformer *Agrobacterium* par le plasmide recombinant.

3. Infecter des cellules de pétunia et régénérer des plantes. Régénérer des plantes non infectées comme témoins.

4. Tester les plantes par le glyphosate.



Résultat: le glyphosate tue les plantes témoins, mais pas les plantes transgéniques.

Conclusion: l'EPSP supplémentaire procure la tolérance au glyphosate.

Autres expériences: les plantes transgéniques sont tolérantes, mais pas résistantes (notez le blanchissement de l'extrémité de la plante). Comment pourrait-on savoir si des copies supplémentaires du gène augmenteraient la tolérance ? Pensez-vous que la synthèse d'une trop grande quantité d'EPSP synthétase pourrait entraîner des problèmes collatéraux chez le pétunia

Figure 17.18 Manipulation génétique de la résistance à un herbicide

autres insectes qui s'attaquent aux cotonniers. Les chercheurs ont maintenant obtenu des plantes résistantes aux insectes nuisibles, échappant ainsi à la nécessité d'appliquer de nombreux insecticides externes.

Cette approche consiste à insérer dans les plantes cultivées des gènes codant des protéines nuisibles pour les insectes qui se nourrissent sur les plantes, mais inoffensives pour les autres organismes. La protéine le plus souvent utilisée est une toxine produite par une bactérie du sol, *Bacillus thuringiensis* (la toxine Bt). Quand les insectes ingèrent cette toxine, des enzymes endogènes la transforment en un insecticide, provoquant la paralysie et la mort de l'insecte. Ces enzymes n'existant pas chez les autres animaux, la protéine est sans danger pour eux.

Les quatre plantes modifiées pour la résistance aux herbicides ont aussi été transformées pour la résistance aux insectes par la toxine Bt. Globalement, le maïs Bt est, en importance, la seconde plante génétiquement modifiée : il représente 14 % des cultures d'OGM dans neuf pays. La répartition de ces cultures dans le monde est la même que pour les plantes résistantes à l'herbicide.

En raison du succès de ces deux types de modifications, il ne faut pas s'étonner de leur combinaison, dans le maïs et le coton. Les surfaces réservées à ces variétés combinées représentent 9 % des cultures d'OGM.

Le riz doré illustre les possibilités des plantes transgéniques

Le riz doré est un cultivar transgénique de riz génétiquement modifié pour exprimer le β -carotène, précurseur de la vitamine A. Après son ingestion, le β -carotène peut être transformé en vitamine A dans l'or-

ganisme pour réduire les symptômes de carence en vitamine A. L'Organisation Mondiale de la Santé estime que la carence en vitamine A affecte de 140 à 250 millions d'enfants avant l'âge scolaire, dont 250 000 à 500 000 deviennent aveugles. Cette carence est particulièrement sévère dans les pays en développement où la principale nourriture de base est le riz.

Le riz doré doit son nom à sa couleur particulière due à la présence du β -carotène dans l'albumen (portion amyliacée du grain décortiqué). Le riz ne synthétise normalement pas de β -carotène dans son albumen, mais un précurseur, le géranylgeranyl diphosphate (GGPP), qui peut être transformé en β -carotène par trois enzymes, la phytoène synthétase, la phytoène désaturase et la lycopène β -cyclase. Les trois gènes correspondants ont été modifiés pour s'exprimer dans l'albumen et introduits dans le riz afin de compléter la voie de biosynthèse du β -carotène dans l'albumen (figure 17.19).

Cet exemple d'ingénierie génétique est intéressant pour deux raisons. En premier lieu, c'est l'introduction d'une nouvelle voie biosynthétique dans un tissu de plante transgénique. En second lieu, c'était impossible par sélection traditionnelle parce qu'on ne connaît aucune variété de riz produisant ces enzymes dans l'albumen. On a aussi obtenu une seconde version produisant plus de β -carotène en remplaçant le gène originel de la phytoène synthétase de jonquille par celui du maïs.

Au départ, le riz doré a été obtenu dans une institution publique en Suisse et il a été mis gratuitement à disposition sans engagements commerciaux. Depuis son origine, le riz doré a été amélioré par des groupes publics et privés, et ces formes améliorées sont également disponibles sans entraves commerciales.

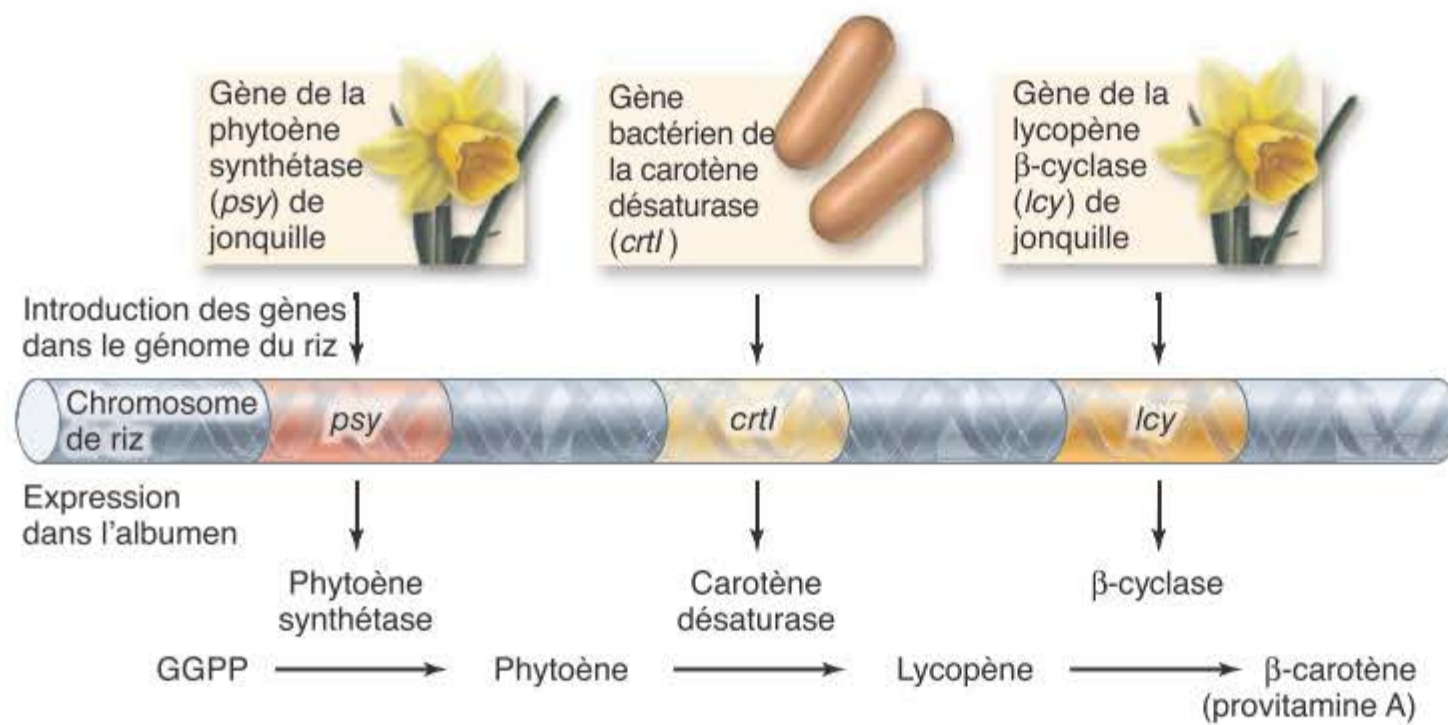


Figure 17.19 Construction du riz doré. On a ajouté trois gènes de bactérie et de jonquille au génome du riz pour permettre la synthèse du β -carotène dans l'albumen. On voit l'origine de ces gènes et la voie de synthèse du β -carotène. Le résultat est le riz doré, qui contient des taux plus élevés en β -carotène dans l'albumen.

Les plantes transgéniques soulèvent plusieurs problèmes de société

L'adoption des plantes cultivées GM a soulevé des oppositions dans certaines régions pour diverses raisons. Certains se sont posés des questions concernant la sécurité de ces plantes pour la consommation humaine, la possibilité d'un transfert des gènes introduits à des espèces sauvages apparentées et la perte de biodiversité liée à ces plantes.

D'une part, les multinationales appliquant cette technologie pour la production des graines des différentes plantes transgéniques sont en faveur de leur utilisation. Dans ce camp se trouvent aussi ceux qui font état des avantages de plantes transgéniques comme le riz doré pour l'alimentation du Tiers Monde et pour prévenir certaines carences alimentaires. De l'autre côté, on trouve diverses organisations politiques et citoyennes qui s'inquiètent des effets des aliments génétiquement modifiés sur l'écologie et la santé. On retrouve des scientifiques dans les deux camps.

À l'origine, la controverse s'est focalisée sur la sécurité des aliments contenant des gènes introduits. Aux États-Unis, cette question a été « réglée » pour les plantes dont il a déjà été question et, dans ce pays, on consomme de grandes quantités de soja et de maïs transgéniques. Quelques opposants posent encore des questions à propos de leur utilisation sur le long terme et des réactions allergiques, mais on n'a jusqu'à présent signalé aucune conséquence négative. Les cultures actuelles seront surveillées pour leurs effets négatifs éventuels et toute nouvelle modification exigera une autorisation avant une consommation par l'homme.

Un autre problème concerne la crainte de voir les transgènes passer des plantes transgéniques aux plantes non transformées. L'importance de la pollinisation croisée entre plantes de la même espèce diffère. Le soja est surtout autopollinisé, avec des croisements limités, mais les croisements sont la règle chez le maïs et les gènes des plantes transgéniques passent donc plus fréquemment aux maïs non modifiés. C'est un problème pour les agriculteurs dont les cultures biologiques sont proches de cultures de maïs transgénique parce que la réglementation actuelle concernant les cultures biologiques exclut les plantes transgé-

niques. La fréquence des croisements dépend de la proximité des cultures, de la vitesse et de la direction du vent, ainsi que de la température et de l'humidité. Pour les plantes dont la reproduction repose sur des pollinisateurs, la nature de ces derniers et la distance parcourue interviennent aussi.

Les gènes peuvent aussi passer à des espèces voisines par hybridation. Aux États-Unis, au moins 15 espèces adventices se sont croisées avec des plantes cultivées. Pour deux grandes cultures, le maïs et le soja, il n'existe pas d'espèces sauvages capables de s'y croiser et la résistance aux herbicides n'est pas susceptible de se répandre. Cependant, le tournesol a été domestiqué à l'origine aux États-Unis et un transgène pourrait passer à des populations adventices. Un travail a montré que 10 à 33 % des tournesols se sont croisés avec des variétés domestiques.

Pour les plantes transgéniques résistantes aux herbicides, l'application répétée d'un seul herbicide au cours des ans soumet les plantes adventices à une pression de sélection. Avec le temps, la fréquence des plantes résistantes à l'herbicide augmentera et le produit deviendra inefficace. Dans le monde, près de 200 espèces d'adventices sont devenues résistantes à un ou plusieurs herbicides. Des pratiques permettant de réduire l'application des herbicides et de les varier peuvent ralentir l'évolution de la résistance.

Questions d'apprentissage 17.7

Jusqu'à présent, la résistance aux herbicides, la protection contre les pathogènes, la valeur nutritionnelle et la production de vaccins et médicaments ont été les objectifs de l'ingénierie génétique en agriculture. La controverse concernant l'utilisation des plantes transgéniques est centrée sur les effets imprévisibles éventuels pour la santé humaine et pour l'environnement.

- On a obtenu des céréales résistantes au glyphosate, mais elles n'ont jamais été commercialisées. Que faudrait-il pour qu'un producteur de semences puisse le faire ?

17.1 L'ADN recombinant

Les endonucléases de restriction coupent l'ADN à des sites spécifiques.

Les fragments d'ADN découpés par les endonucléases de restriction de type II peuvent être recombinés à d'autres ADN coupés avec les mêmes enzymes (figure 17.1)

L'électrophorèse en gel sépare les fragments d'ADN.

On peut séparer les fragments d'ADN en fonction de leur taille dans un gel grâce à un champ électrique (figure 17.2).

On combine des fragments d'ADN pour construire des molécules recombinantes.

Une molécule d'ADN recombinant est un hybride formé d'ADN provenant de deux sources différentes. L'ADN ligase catalyse la formation d'une liaison phosphodiester entre les nucléotides pour donner une molécule recombinante (figure 17.3).

La transcriptase inverse synthétise de l'ADN à partir d'ARN.

La transcriptase inverse utilise un ARN comme matrice pour construire une molécule d'ADN : on parle d'un ADNc (figure 17.4).

Les banques d'ADN sont des collections de molécules d'ADN recombinant.

Les banques d'ADN contiennent des fragments d'ADN qui peuvent être stockés et répliqués dans un organisme hôte (figure 17.5).

17.2 Amplification de l'ADN par la réaction en chaîne de la polymérase

La PCR imite la réplication de l'ADN.

La réaction en chaîne de la polymérase (PCR) amplifie un petit fragment simple d'ADN avec l'aide de deux petites amorces flanquant la région à amplifier. Elle implique des cycles de chauffage et refroidissement, et l'utilisation de la Taq polymérase thermostable pour la synthèse (figure 17.6).

La PCR avec transcription inverse permet d'amplifier l'ADN à partir de l'ARNm.

On peut utiliser la transcriptase inverse pour la synthèse de l'ADNc copié sur une molécule d'ARNm. Cette synthèse peut être combinée à la PCR pour amplifier une séquence génique spécifique dépourvue de ses éléments de régulation et de ses introns.

La RT-PCR quantitative peut déterminer le niveau d'un ARNm.

On peut quantifier un ARNm spécifique en combinant la transcription inverse pour produire l'ADNc et l'amplification par PCR en présence de colorants fluorescents se fixant à l'ADN ou d'amorces fluorescentes spéciales (figure 17.7).

La PCR est à la base de nombreuses techniques de séquençage.

Le séquençage des génomes est devenu beaucoup moins coûteux avec la mise au point de nouvelles technologies. Beaucoup de ces technologies reposent sur des variantes de la PCR utilisées pour l'obtention du matériel à séquencer.

17.3 Création, correction et analyse de la variation génétique

Application des empreintes d'ADN en justice pour l'identification des individus.

Pour obtenir les empreintes d'ADN, on utilise de courtes répétitions en tandem dont le nombre varie parmi les individus d'une population. La banque de données CODIS utilise 13 locus STR pour stocker les empreintes d'ADN (figure 17.8).

La PCR permet de créer des mutations ponctuelles dans des gènes particuliers.

On peut obtenir des mutations à un site particulier dans une séquence d'ADN spécifique en modifiant des nucléotides dans une amorce utilisée pour l'initiation de la réplication de l'ADN par PCR. Le taux d'erreur inhérent à certaines ADN polymérases utilisées en PCR peut aussi entraîner la création de mutations aléatoires.

L'interférence de l'ARN peut réduire la quantité de produit d'un gène.

On peut introduire de courtes séquences d'ADN bicaténaire dans les cellules de certains organismes pour réduire l'expression de gènes spécifiques. Il est possible d'analyser les banques de molécules d'ARN bicaténaires pour identifier les protéines intervenant dans des processus biologiques particuliers.

Les nouvelles technologies permettent une édition directe des génomes.

On peut éditer des gènes in vivo avec les enzymes TALEN et le système CRISPR/Cas9. Il est possible ainsi de couper l'ADN à un site spécifique, ce qui entraîne des modifications du gène par erreurs lors de la réparation. Si l'on introduit en même temps un fragment d'ADN spécifique, il peut contrôler la réparation et l'édition du génome.

7.4 Construction et utilisation d'organismes transgéniques

La transgénèse est possible grâce à la nature universelle du code génétique.

À quelques exceptions près, tous les organismes utilisent le même code génétique. Cette universalité du code génétique signifie que les gènes d'un organisme peuvent s'exprimer dans d'autres organismes.

L'élimination ou l'addition de gènes peut révéler leur fonction.

Dans les souris « knock-out », on a inactivé un gène pour étudier sa fonction (figure 17.10). Dans les souris « knock-in », un gène est remplacé par une variante pour apprécier les conséquences de modifications génétiques spécifiques.

L'inactivation conditionnelle permet d'étudier des gènes essentiels.

L'inactivation conditionnelle permet d'observer les conséquences de l'élimination d'une fonction génique dans un tissu spécifique ou à un stade de développement particulier. On peut ainsi étudier des gènes essentiels. Le système Cre-Lox est une technologie utilisée (figure 17.11).

Différentes techniques permettent de modifier génétiquement les plantes.

On peut obtenir des plantes transgéniques possédant les caractères souhaités en les transformant par *Agrobacterium* et un plasmide Ti recombinant, ou par bombardement par des particules (figure 17.12). L'inactivation des gènes ciblés n'est généralement pas possible.

17.5 Applications environnementales

On peut utiliser des algues pour produire des biocarburants.

On peut transformer en biodiesel les lipides extraits de micro-algues. Plusieurs espèces de micro-algues peuvent produire jusqu'à 50 % de leur biomasse sous forme de lipides (figure 17.13).

Les micro-organismes peuvent dégrader les hydrocarbures présents dans l'environnement.

L'addition d'un supplément alimentaire à des milieux aquatiques, terrestres et marins peut stimuler la dégradation des hydrocarbures par certaines espèces de bactéries. On peut ainsi éliminer de l'environnement les produits toxiques dérivés du pétrole.

Le traitement des eaux usées repose sur l'action de micro-organismes

Les eaux usées doivent être décontaminées avant d'être déversées dans l'environnement ou réutilisées. La masse de matière organique est éliminée

par des bactéries anaérobies ou aérobies. Des traitements ultérieurs peuvent éliminer certains contaminants inorganiques (figure 17.14).

17.6 Applications médicales

L'ADN recombinant permet de produire des protéines importantes.

On a utilisé la technologie de l'ADN recombinant pour obtenir des bactéries et des levures qui expriment l'insuline humaine pour le traitement du diabète (figure 17.15). La technologie de l'ADN recombinant a amélioré l'efficacité de cette insuline.

L'hybridation avec fluorescence in situ permet de détecter des réarrangements chromosomiques grossiers.

Dans FISH, des sondes fluorescentes s'hybrident aux séquences complémentaires dans les chromosomes. On peut utiliser FISH pour identifier des altérations chromosomiques intervenant dans des maladies. L'identification d'amplifications du gène *HER2* participe à la définition des traitements personnalisés (figure 17.16).

Les puces à ADN permettent l'identification de marqueurs génétiques de maladie.

On peut analyser le mode d'expression génique correspondant à une maladie en se basant sur des puces à ADN.

Les immuno-essais peuvent diagnostiquer rapidement des infections virales.

Il est possible de se servir d'anticorps pour détecter la présence de molécules spécifiques dans des échantillons cliniques ou expérimentaux. Des anticorps étalés sur une surface solide s'unissent à des molécules spécifiques, et un second anticorps lié à une molécule fluorescente ou à une enzyme permet leur détection (figure 17.17).

La thérapie par cellules souches pourrait traiter des maladies chroniques.

Les transplantations de moelle osseuse ont été utilisées avec succès pour le traitement de certains cancers du sang, des anémies et certains cas de sclérose en plaque. Les cellules souches mésenchymateuses peuvent être utilisées pour réparer les tissus conjonctifs endommagés. Il reste des oppositions politiques, sociales et logistiques.

17.7 Applications à l'agriculture

Les variétés résistantes aux herbicides permettent d'éviter le labour.

Largement utilisées aux États-Unis, les plantes résistantes aux herbicides réduisent la nécessité du labour et donc la consommation de carburant (figure 17.18).

Les plantes Bt sont résistantes à certains insectes nuisibles.

Les plantes Bt résistantes aux insectes réduisent l'utilisation des insecticides.

Le riz doré illustre les possibilités des plantes transgéniques.

Le riz doré produit du β -carotène, précurseur de vitamine A (figure 17.19). Son utilisation dans l'alimentation peut réduire l'incidence de la cécité dans les pays en développement où le riz est à la base de l'alimentation.

Les plantes transgéniques soulèvent plusieurs problèmes de société.

On soupçonne l'utilisation des plantes transgéniques d'entraîner des réactions allergiques, bien qu'aucun effet néfaste n'ait été prouvé. La dissémination de transgènes étrangers dans les plantes non cultivées est suivie de près. Jusqu'à présent, près de 200 adventices dans le monde sont devenues résistantes aux herbicides.



Questions

COMPRÉHENSION

- Vous étudiez un gène que l'on sait être important pour le développement initial du cœur. On pense également que la perte de ce gène peut jouer un rôle dans le déclenchement du cancer du poumon. Quel type de souris transgénique utiliseriez-vous pour étudier ce gène in vivo ?
 - Knock-out
 - Knock-in
 - Knock-out conditionnelle
 - Tous ces choix sont valables
- Sur quelle base les fragments d'ADN différents sont-ils séparés dans l'électrophorèse en gel ?
 - La charge négative de l'ADN
 - La taille des fragments d'ADN
 - La séquence des fragments
 - La présence d'un colorant
- Si l'on entame une PCR avec 10 pièces d'ADN matrice, combien de pièces aurait-on après 10 cycles ?
 - Environ 100
 - Environ 1000
 - Environ 10 000
 - Environ 10^{10}
- L'analyse FISH d'une biopsie de tumeur du sein pour le gène *HER2* montre deux taches fluorescentes dans les cellules. Quelle conclusion peut-on en tirer à propos de la tumeur ?
 - Elle contient probablement un taux élevé de l'ARNm *HER2*.
 - Elle contient probablement un taux élevé de la protéine *HER2*.
 - Le gène *HER2* est amplifié, et les traitements ciblant la protéine *HER2* peuvent ne pas convenir.
 - Le gène *HER2* n'est pas amplifié et les traitements particuliers ciblant la protéine *HER2* peuvent ne pas convenir.
- Pour l'étude de la fonction d'un gène, quel est le principal intérêt de l'édition du génome par rapport à l'interférence de l'ARN ?
 - L'édition du génome peut éliminer la fonction du gène ; l'interférence de l'ARN réduit seulement la quantité de produit du gène.
 - On ne doit pas produire de l'ADN recombinant pour l'édition du génome, mais il le faut toujours pour l'interférence de l'ARN.
 - L'édition du génome marche toujours mais l'interférence de l'ARN fonctionne rarement.
 - L'édition du génome est réalisée dans des bactéries, qui sont plus faciles à manipuler que les eucaryotes utilisés pour l'interférence de l'ARN.

6. Le plasmide Ti d'*Agrobacterium* induit généralement des tumeurs, ou galles, dans les plantes infectées. Quand on utilise *Agrobacterium* pour obtenir des plantes transgéniques, pourquoi ne se forme-t-il pas de galles ?
- Le transgène introduit bloque les gènes induisant les tumeurs.
 - Les gènes induisant les tumeurs sont éliminés et remplacés par le transgène.
 - Le plasmide Ti est éliminé de l'*Agrobacterium* utilisé pour l'obtention des plantes transgéniques.
 - Le plasmide Ti est muté par PCR et ne peut donc se répliquer dans les plantes infectées.

3. Quels problèmes doit-on envisager lors de la création d'une bactérie transgénique avec le gène de l'insuline humaine isolé de l'ADN génomique pour produire de l'insuline ?
- Le code génétique des bactéries est très différent de celui des humains.
 - La cellule bactérienne sera incapable d'assurer la maturation du peptide d'insuline après la traduction.
 - Il n'y a pas moyen d'obtenir la transcription efficace d'un gène humain par la bactérie.
 - Les propositions a et b posent problème.

APPLICATION

1. Vous entreprenez quatre réactions qRT-PCR, toutes avec la même quantité d'ADN. Quand les réactions sont terminées, vous trouvez 10 000 unités de fluorescence après 20 cycles pour l'échantillon A, après 25 cycles pour l'échantillon B, après 18 cycles pour l'échantillon C et après 22 cycles pour l'échantillon D. Lequel des échantillons avait le plus grand nombre de copies de l'ARNm au début de la qRT-PCR ?
- | | |
|--------------------|--------------------|
| a. L'échantillon A | b. L'échantillon B |
| c. L'échantillon C | d. L'échantillon D |
2. Laquelle des propositions suivantes peut-on appliquer à la répllication de l'ADN dans vos cellules, mais pas à la PCR ?
- Les amorces d'ADN sont nécessaires.
 - L'ADN polymérase est stable à haute température.
 - La ligase est essentielle.
 - Les dNTP sont nécessaires.

RÉVISION

1. Beaucoup de protéines humaines, comme l'hémoglobine, ne fonctionnent qu'après l'assemblage de nombreuses sous-unités. Cet assemblage s'effectue dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi de la cellule eucaryote. Quelles sont les limitations éventuelles de la production à grande échelle d'une hémoglobine génétiquement modifiée.
2. La bêta-amyloïde est un produit protéolytique de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP). À haute concentration, la bêta-amyloïde s'agglutine et peut causer la maladie d'Alzheimer. Comment pourriez-vous, sur des souris, voir si des mutations particulières maintiennent la fonction de l'APP, mais empêchent l'agglutination de la bêta-amyloïde dérivée de l'APP ?