

VOS OUTILS INTERACTIFS



Consultez votre MANUEL NUMÉRIQUE, qui vous donne accès aux animations, aux exercices et à la plateforme d'anatomie interactive.

▲ **Figure 20.1** Comment la technique représentée dans ce modèle nous permet-elle d'améliorer le séquençage du génome ?

CONCEPTS CLÉS

- 20.1** Le séquençage et le clonage de l'ADN sont des procédés fort utiles au génie génétique et à la recherche en biologie
- 20.2** Les biotechnologies permettent d'étudier l'expression et la fonction d'un gène
- 20.3** Les organismes clonés et les cellules souches servent à la recherche fondamentale et à d'autres applications
- 20.4** Les applications de la biotechnologie influent sur nos vies de diverses façons

La boîte à outils biotechnologiques

Depuis environ 10 ans, des avancées extraordinaires ont été réalisées en biologie, dont le séquençage complet de l'ADN de plusieurs espèces disparues, y compris le mammouth laineux (voir ci-dessous), le néandertalien et un cheval vieux de 700 000 ans. Sans le séquençage du génome humain, parachevé en 2003, de tels accomplissements auraient été impossibles. Il s'agit en effet d'un tournant décisif qui a ouvert la voie à de prodigieuses avancées scientifiques et technologiques.

Il a fallu plusieurs années et 1 milliard de dollars pour analyser la première séquence du génome humain. Depuis, la durée et le coût du séquençage n'ont fait que diminuer. La **figure 20.1** illustre une technique de séquençage qui consiste à faire passer, un par un, les nucléotides d'un seul brin d'ADN à travers une membrane, par un pore minuscule, puis à analyser les légères variations de courant électrique causées par cette manipulation pour établir la séquence nucléotidique. D'après les scientifiques qui ont mis au point cette technique, que nous décrirons en détail plus loin dans ce chapitre, il ne faudra que 6 heures environ pour séquencer un génome humain à l'aide d'un appareil d'environ 900 \$ et de la taille d'un paquet de gomme à mâcher.

Dans ce chapitre, nous décrirons d'abord les principales techniques utilisées pour le séquençage et la manipulation de l'ADN – des procédés en biotechnologie – et les méthodes d'analyse de l'expression génétique. Nous traiterons ensuite des progrès accomplis dans le domaine du clonage des organismes et de la production

◀ **Le mammouth laineux est un animal disparu dont le génome a été séquençé à partir de restes momifiés.**



des cellules souches, et nous verrons comment ces deux procédés ont contribué à enrichir notre compréhension fondamentale de la biologie et à en tirer parti pour résoudre des problèmes globaux. Dans la dernière partie du chapitre, nous passerons en revue les principales applications pratiques des **biotechnologies**, soit la manipulation des organismes ou de leurs composants pour créer des produits utiles. De nos jours, les applications biotechnologiques touchent tous les domaines, qu'il s'agisse de l'agriculture, du droit criminel ou de la recherche médicale. Enfin, nous nous pencherons sur certaines questions sociales et éthiques découlant de la présence de plus en plus grande des biotechnologies dans nos vies.

CONCEPT 20.1

Le séquençage et le clonage de l'ADN sont des procédés fort utiles au génie génétique et à la recherche en biologie

Le séquençage de l'ADN et d'autres techniques utilisées aujourd'hui en recherche biologique n'auraient pu être mis au point sans la découverte de la structure de l'ADN, et plus particulièrement de la complémentarité de ses deux brins. En effet, l'**hybridation des acides nucléiques**, soit l'appariement d'un brin d'acide nucléique avec la séquence complémentaire d'un deuxième brin, est au cœur de ces techniques. Dans cette section, nous commencerons par décrire les techniques de séquençage de l'ADN. Nous examinerons ensuite d'autres méthodes importantes utilisées en **génie génétique**, soit la manipulation directe des gènes à des fins utilitaires.

Le séquençage de l'ADN

Les chercheurs appliquent le principe de l'appariement des bases complémentaires pour procéder au **séquençage de l'ADN**, une opération qui permet d'établir la séquence nucléotidique complète d'une molécule d'ADN. L'ADN est d'abord découpé en fragments, qui sont ensuite séquencés. Le premier procédé automatisé est une technique appelée *séquençage par terminaison de chaîne de Sanger* (ou *séquençage didésoxy*). Dans cette technique, un brin provenant d'un fragment d'ADN sert de matrice pour synthétiser un ensemble imbriqué de fragments complémentaires; on analyse ensuite ces fragments plus en détail pour en déterminer la séquence. Le biochimiste Frederick Sanger a obtenu un prix Nobel en 1980 pour la mise au point de cette méthode. Le séquençage didésoxy est toujours utilisé pour les tâches courantes de séquençage d'ADN à petite échelle.

Au cours des 15 dernières années, on a mis au point des techniques beaucoup plus rapides qui font appel à des appareils de nouvelle génération (**figure 20.2**). Les fragments d'ADN sont d'abord amplifiés (copiés) pour produire un très grand nombre de fragments identiques (**figure 20.3**). Un brin spécifique de chaque fragment est immobilisé, puis le brin complémentaire est synthétisé, un nucléotide à la fois. Grâce à un procédé chimique ingénieux, des moniteurs électroniques peuvent préciser, en temps réel, lequel des quatre nucléotides est ajouté; cette méthode est connue sous le nom de *séquençage par synthèse*. Il est ainsi possible de séquencer simultanément des milliers voire des centaines de milliers de fragments comptant chacun

▼ **Figure 20.2** Des appareils de séquençage de nouvelle génération. Ces appareils reposent sur le séquençage par synthèse et permettent de séquencer de 70 à 90 millions de nucléotides en une heure.

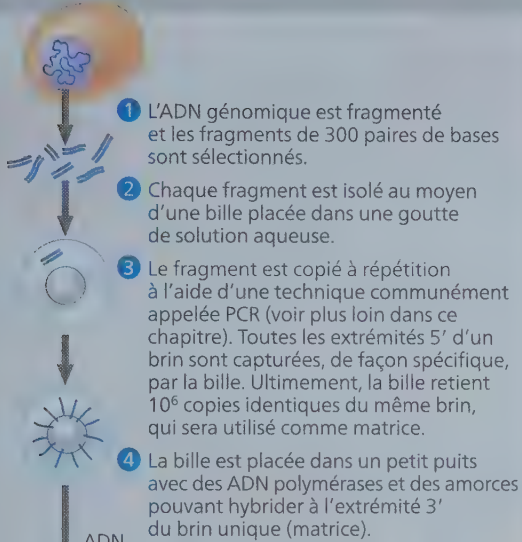


environ 300 nucléotides dans des appareils comme celui de la figure 20.2. C'est un exemple de technique de séquençage de l'ADN à haut débit, car elle permet de séquencer rapidement une très grande quantité de nucléotides. Il s'agit actuellement de la méthode privilégiée pour les études qui exigent le séquençage de quantités phénoménales d'échantillons d'ADN, notamment la multitude de fragments que constitue un génome entier.

Il est de plus en plus fréquent de compléter ou, dans certains cas, de remplacer une technique de séquençage par une autre plus récente, chaque nouvelle technique se montrant plus rapide et moins onéreuse que la précédente. Avec certaines des nouvelles méthodes, il n'est plus nécessaire de découper une molécule d'ADN en fragments ou de l'amplifier: on procède plutôt au séquençage d'une très longue molécule d'ADN telle quelle. Plusieurs groupes de scientifiques ont mis au point des techniques permettant de déplacer un brin d'ADN à travers une membrane, par un pore de très petite taille (un nanopore). De tels procédés permettent d'identifier les bases une par une en se fondant sur la façon distincte dont chacune interrompt un courant électrique. La figure 20.1 présente un modèle de ce concept, dans lequel le pore est un canal protéique ancré dans une membrane lipidique. (D'autres chercheurs utilisent des membranes et des nanopores artificiels.) Le premier séquenceur d'ADN par nanopore a fait son entrée sur le marché en 2015, après avoir été testé durant un an par les scientifiques. L'appareil, de la taille d'un bonbon, se connecte à un ordinateur par un port USB. Le logiciel qui lui est associé permet une identification et une analyse de séquence instantanées. Il s'agit là d'une des nombreuses méthodes actuelles qui accélère le séquençage de l'ADN et en diminue le coût. De plus, ces procédés peuvent maintenant être utilisés sur le terrain, c'est-à-dire à l'extérieur des laboratoires.

Grâce à l'amélioration des techniques de séquençage de l'ADN, les scientifiques n'abordent plus de la même façon les questions biologiques fondamentales concernant l'évolution et le fonctionnement de la vie (voir la figure 5.26, Faites des liens). Un peu plus de 15 ans se sont écoulés depuis l'annonce du séquençage du génome humain; aujourd'hui, les chercheurs ont séquencé des milliers de génomes et des dizaines de milliers d'autres le seront bientôt. De plus, on connaît maintenant le génome complet des cellules de différents types de cancers, de même que celui de certains de nos ancêtres humains et de plusieurs bactéries qui vivent dans l'intestin humain. Au chapitre 21, vous en apprendrez plus sur la façon dont les avancées rapides dans le séquençage de l'ADN ont révolutionné notre étude de l'évolution des espèces et du génome. Pour l'instant, voyons comment on étudie les gènes individuels.

Le séquençage par synthèse : un séquençage de nouvelle génération

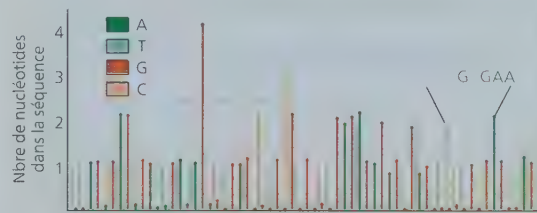


- 1 L'ADN génomique est fragmenté et les fragments de 300 paires de bases sont sélectionnés.
- 2 Chaque fragment est isolé au moyen d'une bille placée dans une goutte de solution aqueuse.
- 3 Le fragment est copié à répétition à l'aide d'une technique communément appelée PCR (voir plus loin dans ce chapitre). Toutes les extrémités 5' d'un brin sont capturées, de façon spécifique, par la bille. Ultérieurement, la bille retient 10⁶ copies identiques du même brin, qui sera utilisé comme matrice.
- 4 La bille est placée dans un petit puits avec des ADN polymérases et des amorces pouvant hybrider à l'extrémité 3' du brin unique (matrice).

■ APPLICATION ■ Chaque fragment utilisé dans le cadre des techniques actuelles de séquençage de nouvelle génération compte environ 300 nucléotides; en séquençant les fragments simultanément, il est possible de séquençer près de 2 milliards de nucléotides sur une période de 24 heures.

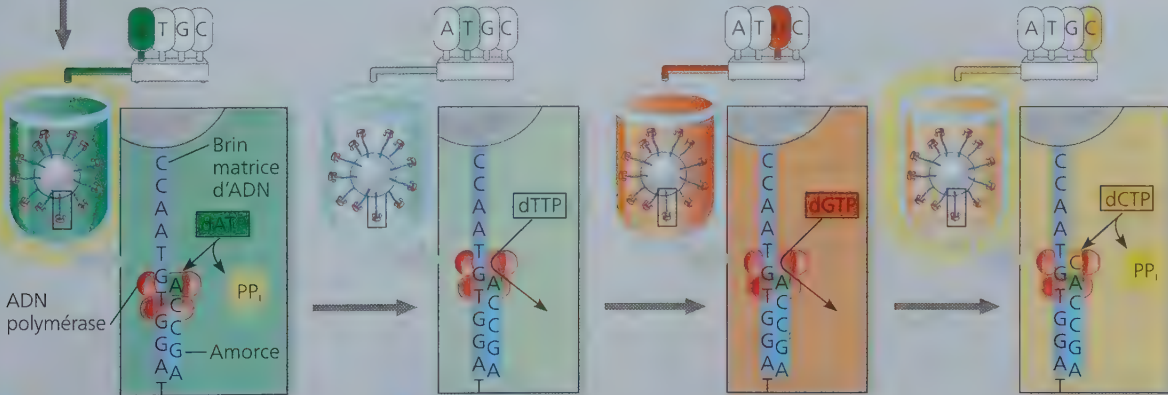
■ TECHNIQUE ■ Voir les étapes numérotées et les schémas correspondants.

■ RÉSULTATS ■ Chaque puits de la plaque multipuits, qui compte 2 millions de puits, contient un fragment différent et produit une séquence différente. Les résultats obtenus pour un seul fragment sont présentés dans le diagramme ci-dessous. Les séquences de l'ensemble des fragments sont analysées à l'aide d'un logiciel qui les «raccorde» pour former une séquence complète (dans le cas présent, un génome entier).



INTERPRÉTEZ LES DONNÉES ► Si le brin matrice possède deux ou plusieurs nucléotides identiques consécutifs, les nucléotides complémentaires s'ajouteront l'un après l'autre à la même étape. Comment peut-on cibler deux ou plusieurs nucléotides identiques (consécutifs) dans un diagramme ? (Voir l'exemple à droite sur le diagramme.) Écrivez la séquence des 25 premiers nucléotides du diagramme ci-dessous en commençant par la gauche. (Ignorez les bandes très courtes.)

- 5 Une seule plaque multipuits compte 2 millions de puits, chacun contenant un fragment d'ADN distinct à séquencer. On ajoute dans tous les puits une solution incluant l'un des quatre nucléotides nécessaires à la synthèse de l'ADN (triphosphate de désoxyribonucléotide, ou dNTP), puis on rince. On effectue cette étape successivement pour les quatre nucléotides : dATP, dTTP, dGTP et dCTP. On répète ensuite le processus entier.



- 6 Dans chacun des puits, si la base suivante sur le brin matrice (T, dans cet exemple) est complémentaire au nucléotide ajouté (ici, A), le nucléotide se joint au brin en croissance, ce qui libère un PP_i. Un signal lumineux est alors émis et enregistré.
- 7 Le nucléotide est rincé et un autre nucléotide (ici, dTTP) vient s'ajouter. Si le nucléotide n'est pas complémentaire à la base suivante sur le brin matrice (ici, G), il ne se joindra pas au brin et aucun signal lumineux ne sera émis.
- 8 On répète le processus qui consiste à ajouter et à rincer les quatre nucléotides jusqu'à ce que tous les fragments disposent d'un brin complémentaire complet. Le schéma des signaux lumineux met en évidence la séquence du fragment original dans chaque puits.

La production d'un grand nombre de copies d'un gène ou d'un autre segment d'ADN

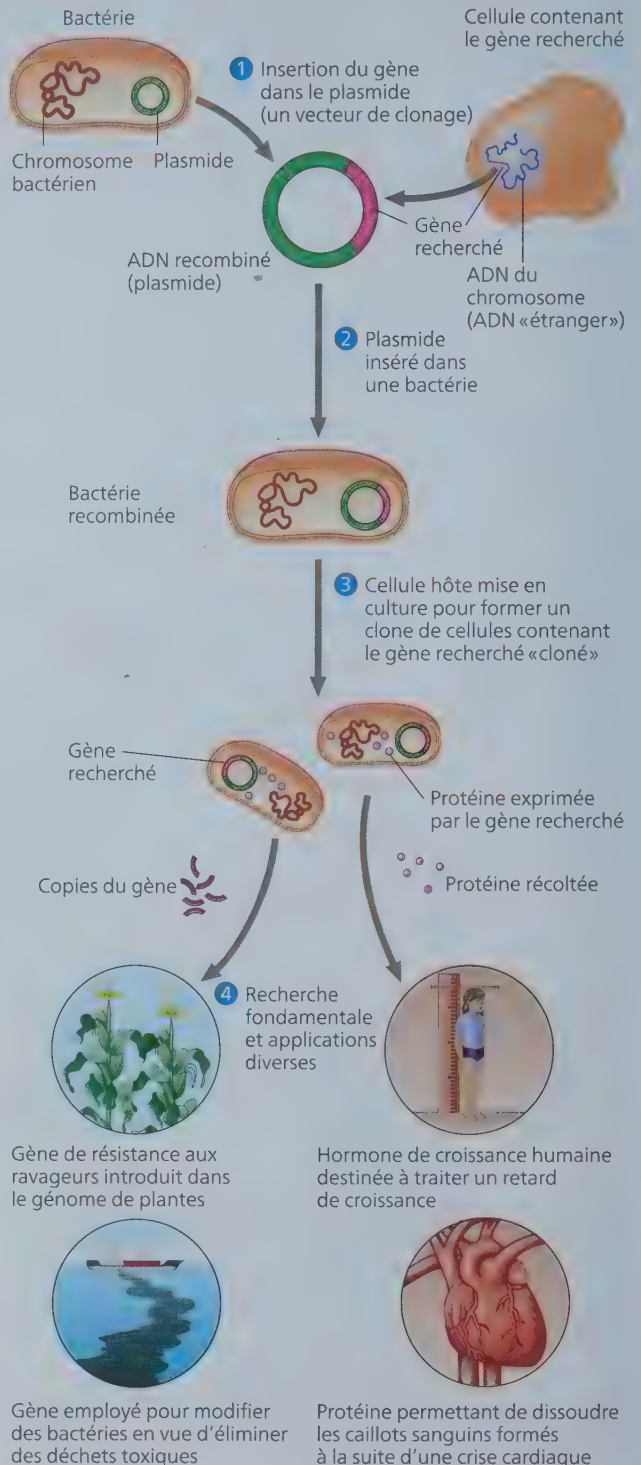
Quand un biologiste moléculaire étudie un gène donné ou un groupe de gènes, la longueur des molécules naturelles d'ADN et la présence de centaines voire de milliers de gènes sur une même molécule compliquent son travail. En outre, dans de nombreux génomes eucaryotes, les gènes codant pour une protéine n'occupent parfois qu'une petite proportion de l'ADN du chromosome, le reste étant constitué de séquences nucléotidiques non codantes. Un gène humain, par exemple, représente parfois seulement le 1/100 000^e de la molécule d'ADN d'un chromosome. Pour compliquer les choses encore un peu plus, le gène lui-même et l'ADN voisin ne se distinguent que par de subtiles différences touchant les séquences nucléotidiques. Pour pouvoir travailler directement sur des gènes bien précis, les scientifiques ont mis au point des méthodes qui leur permettent d'obtenir un grand nombre de copies identiques de segments d'ADN spécifiques; ce processus est nommé **clonage** de l'ADN.

La plupart des méthodes de clonage de segments d'ADN utilisées en laboratoire ont un certain nombre de caractéristiques communes. Une technique courante fait appel aux bactéries, le plus souvent *Escherichia coli* (*E. coli*). Comme nous l'avons vu à la figure 16.12, le chromosome d'*E. coli* se compose d'une grosse molécule d'ADN circulaire. De plus, *E. coli* et de nombreuses autres bactéries contiennent aussi des **plasmides**, de petites molécules circulaires d'ADN qui se répliquent séparément. Un plasmide ne possède qu'un petit nombre de gènes. Même si ces gènes ne sont pas essentiels à la survie ou à la reproduction de la bactérie en général, ils peuvent lui être utiles quand celle-ci se trouve dans des conditions particulières.

Pour cloner des fragments d'ADN en laboratoire à l'aide de bactéries, les chercheurs commencent par récupérer un plasmide d'une cellule bactérienne et le modifient pour faciliter le clonage. Ils y insèrent ensuite un ADN « étranger », c'est-à-dire un ADN provenant d'une autre source (**figure 20.4**). Le plasmide devient ainsi une molécule d'**ADN recombiné**, soit une molécule contenant l'ADN de deux sources différentes, le plus souvent de différentes espèces. Il est ensuite replacé dans une bactérie. Cette première cellule bactérienne recombinée se multiplie grâce à des divisions cellulaires répétées pour former une population de clones, des cellules toutes génétiquement identiques entre elles. L'ADN étranger et tous les gènes qu'il porte sont clonés simultanément, puisqu'en se divisant la bactérie réplique le plasmide recombiné et le transmet à ses descendants. La production d'un grand nombre de copies du gène est appelée **clonage génique**.

Dans la figure 20.4, le plasmide agit en tant que **vecteur du clonage**; sa molécule d'ADN sert à introduire un ADN étranger dans une cellule hôte en facilitant sa répllication. Les plasmides bactériens sont largement utilisés en tant que vecteurs de clonage pour plusieurs raisons. On peut aisément les obtenir de fournisseurs commerciaux, les manipuler pour former des plasmides recombinés par insertion d'ADN étranger dans une éprouvette (une technique dite *in vitro*, expression latine qui signifie « dans le verre ») et ensuite les replacer dans des cellules bactériennes. L'ADN étranger représenté à la figure 20.4 est un gène provenant d'une cellule eucaryote; plus loin dans cette section, nous décrirons plus en détail la technique utilisée pour obtenir un segment d'ADN étranger.

▼ **Figure 20.4** Un aperçu du clonage génique et de quelques usages des gènes clonés. Dans ce schéma simplifié du clonage génique, on isole d'abord un plasmide (provenant d'une cellule bactérienne) et le gène recherché à partir d'un autre organisme. Dans le haut de la figure, on a représenté un seul plasmide et une seule copie du gène recherché, mais, en réalité, les produits de départ contiennent de nombreuses copies de chacun.



Le clonage génique sert à deux fins importantes : fabriquer un grand nombre de copies d'un gène particulier par *amplification*, et produire une protéine par l'*expression* de ce gène (voir la figure 20.4). À partir des bactéries, les chercheurs peuvent donc isoler de nombreuses copies d'un gène cloné dont ils se serviront pour procéder à des recherches fondamentales. Ils pourront également tenter de doter un organisme de nouvelles capacités métaboliques, par exemple lui conférer une résistance aux ravageurs. Ainsi, il est possible d'isoler un gène de résistance présent dans une plante donnée et de le transférer à une autre espèce. (On dit de ces organismes qu'ils sont *génétiquement modifiés* ; nous aborderons ce sujet plus loin dans le présent chapitre.) C'est aussi grâce à ce procédé que l'on a réussi à récolter de grandes quantités d'une protéine utile en médecine, l'hormone de croissance humaine, à partir de cultures bactériennes contenant le gène cloné pour cette protéine. Comme un gène constitue généralement une infime partie de l'ADN total contenu dans une cellule, il est crucial de pouvoir amplifier des fragments d'ADN pour toute application mettant en jeu un gène unique.

L'utilisation d'enzymes de restriction dans la fabrication d'ADN recombiné

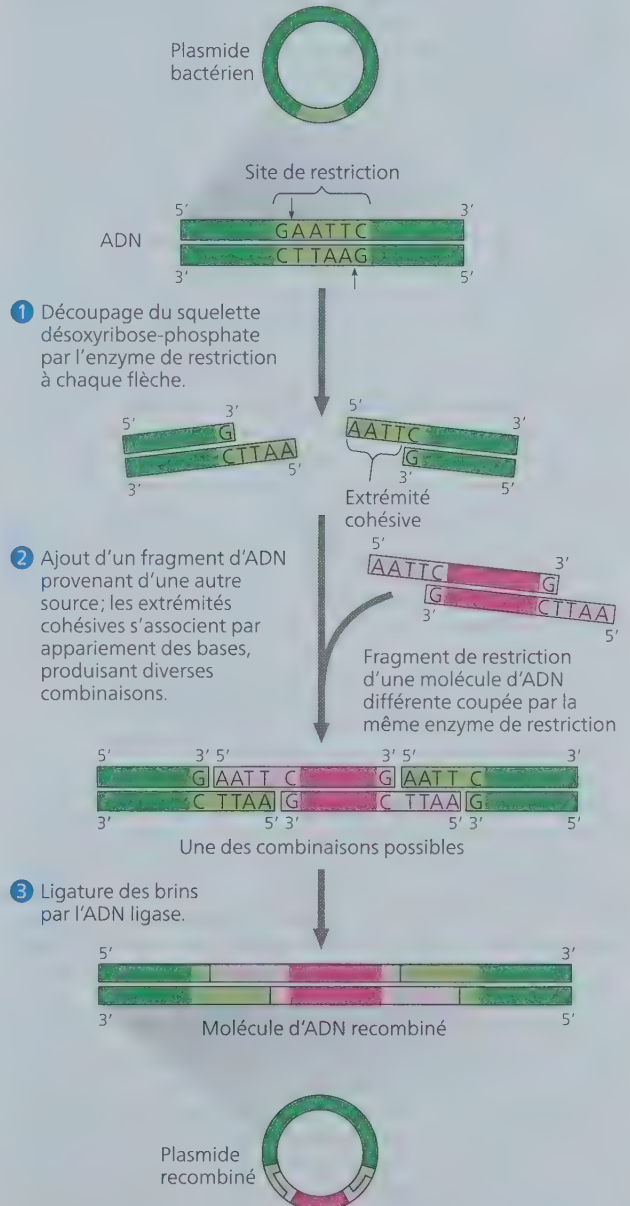
Le clonage génique et plusieurs techniques du génie génétique font généralement appel à des enzymes qui découpent les molécules d'ADN en des sites cibles spécifiques, ce qui donne un nombre limité de segments bien précis. Ces enzymes, nommées **enzymes de restriction** ou endonucléases de restriction, ont été identifiées à la fin des années 1960 par des biologistes effectuant des recherches fondamentales sur des bactéries. Ils ont alors montré que ces enzymes particulières protégeaient la cellule bactérienne en coupant l'ADN étranger provenant de phages ou d'autres organismes (voir le concept 19.2).

À ce jour, on a trouvé et isolé des centaines d'enzymes de restriction différentes. Chaque enzyme de restriction est très spécifique ; elle reconnaît une courte séquence particulière d'ADN, nommée **site de restriction**, et coupe les deux brins d'ADN en des points précis dans ce site. L'ADN d'une cellule bactérienne est protégé de ses propres enzymes de restriction par l'ajout, au cours de la réplication de l'ADN, de groupements méthyle ($-CH_3$) aux adénines et aux cytosines des séquences pouvant être reconnues par les enzymes.

La **figure 20.5** montre comment on utilise les enzymes de restriction pour cloner un fragment d'ADN étranger dans un plasmide bactérien. Dans le haut de la figure, on peut voir un plasmide bactérien (comme celui de la figure 20.4) doté d'un site de restriction reconnu par une certaine enzyme isolée chez *E. coli*. La plupart des sites de restriction sont symétriques et donnent des palindromes (ou séquences pouvant être lues dans les deux sens, tel le mot *kayak*), comme c'est le cas ici. Autrement dit, les deux brins portent la même séquence de nucléotides lue dans la direction 5' → 3'. Les enzymes de restriction les plus couramment utilisées reconnaissent des séquences contenant de quatre à huit nucléotides. Étant donné qu'une séquence aussi courte se répète habituellement (par hasard) plusieurs fois sur une longue molécule d'ADN, l'enzyme coupe celle-ci en de nombreux endroits, produisant un ensemble de **fragments de restriction** de différentes longueurs. Chacune des copies d'une molécule d'ADN traitée par une enzyme donnée produit toujours le même ensemble de fragments de restriction.

▼ Figure 20.5 La production d'un plasmide d'ADN recombiné à l'aide d'une enzyme de restriction et d'ADN ligase.

Dans cet exemple, l'enzyme de restriction *EcoRI* (pour «*Escherichia coli* restriction 1 ») reconnaît un site de restriction unique sur le plasmide, formé de six paires de bases. *EcoRI* effectue des coupures décalées dans le squelette désoxyribose-phosphate et produit ainsi des fragments aux extrémités cohésives. Grâce à cette propriété, les bases des fragments d'ADN étranger dotés d'extrémités cohésives complémentaires peuvent s'apparier aux bases du plasmide ; une fois la ligature complétée par l'ADN ligase, il s'est formé un plasmide recombiné. Si les bases des extrémités cohésives de deux plasmides s'apparient sans intégrer un fragment d'ADN étranger, le plasmide original est alors reconstitué (plasmide non recombiné).



FAITES UN DESSIN ► L'enzyme de restriction *Hind III* reconnaît la séquence 5'-AAGCTT-3', et coupe entre les deux adénines (A). Dessinez la séquence à double brin (bicaténaire) avant et après les coupures de l'enzyme.

Certaines enzymes de restriction coupent l'ADN au même endroit sur les deux brins, au niveau d'une paire de bases (coupure franche), mais celles qui sont les plus utiles coupent les squelettes désoxyribose-phosphate dans les deux brins d'ADN de façon décalée, comme le montre la figure 20.5; les fragments de restriction bicaténaire ont alors au moins une extrémité monocaténaire, nommée **extrémité cohésive**. Les bases de ces courts prolongements forment des liaisons hydrogène avec les parties monocaténaire complémentaires portées par d'autres molécules d'ADN découpées par la même enzyme. Les ensembles ainsi constitués sont temporaires. Cependant, ces liaisons peuvent devenir permanentes sous l'effet d'une enzyme nommée ADN ligase, qui catalyse la formation de liaisons covalentes rattachant le squelette désoxyribose-phosphate des brins d'ADN (voir la figure 16.16). Comme on peut le voir au bas de la figure 20.5, l'association catalysée par la ligase de l'ADN provenant de deux sources distinctes produit une molécule d'ADN recombiné stable (dans cet exemple, un plasmide recombiné).

Lorsque les plasmides ont été copiés plusieurs fois dans des cellules hôtes (voir la figure 20.4), il est possible de les couper à nouveau au moyen de la même enzyme de restriction. On obtient ainsi deux fragments d'ADN, l'un de la taille du plasmide et l'autre de la taille de l'ADN inséré. Pour séparer et visualiser les différents fragments, les chercheurs utilisent l'**électrophorèse sur gel**, une technique qui consiste à utiliser un gel constitué d'un polymère comme tamis moléculaire pour séparer un mélange de fragments d'acides nucléiques en fonction de leur longueur (figure 20.6). L'électrophorèse sur gel est utilisée conjointement avec différentes techniques en biologie moléculaire.

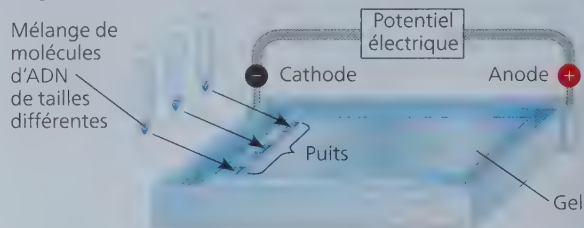
Maintenant que nous avons expliqué en détail en quoi consiste un vecteur de clonage, examinons les différentes techniques utilisées pour l'insertion d'ADN étranger. La technique de l'amplification en chaîne par polymérase, que nous allons décrire maintenant, est la plus souvent utilisée pour obtenir plusieurs copies d'un gène à cloner.

L'amplification de l'ADN par la réaction en chaîne par polymérase (PCR) et son utilisation dans le clonage de l'ADN

La plupart des chercheurs qui souhaitent cloner un gène ou un segment d'ADN possèdent déjà certains renseignements sur sa séquence. Grâce à ces renseignements, ils peuvent utiliser dès le départ la banque d'ADN génomique complète d'une espèce d'intérêt pour obtenir plusieurs copies du gène souhaité à l'aide de la technique de l'**amplification en chaîne par polymérase**, communément appelée **PCR** (pour *Polymerase Chain Reaction*, en anglais). La figure 20.7 illustre les étapes de cette technique qui, en quelques heures, permet de produire des milliards de copies d'un segment spécifique d'ADN dans un échantillon, même si ce segment représente moins de 0,001 % de l'échantillon d'ADN total.

La PCR repose sur la répétition cyclique d'une réaction en chaîne qui se déroule en trois étapes et qui accroît le nombre de molécules d'ADN de façon exponentielle. Au cours de chaque cycle, qui ne dure que quelques minutes, on chauffe le mélange réactionnel afin de dénaturer (séparer) les deux brins d'ADN. Ensuite, on refroidit pour permettre la renaturation (ou reformation) des liaisons hydrogène entre de courtes amorces d'ADN monocaténaire et leur séquence complémentaire sur chacun des

▼ **Figure 20.6 L'électrophorèse sur gel.** Un gel constitué de polymères agit comme tamis moléculaire pour séparer les acides nucléiques ou les protéines en fonction de leur taille, de leur charge électrique et d'autres propriétés physiques quand elles se déplacent dans un champ électrique. Dans l'exemple ci-dessous, les molécules d'ADN sont séparées selon leur longueur dans un gel composé d'agarose, un polysaccharide.



(a) Chaque échantillon, constitué d'un mélange de molécules d'ADN, est placé dans un puits situé à une des extrémités d'une mince couche de gel d'agarose (à gauche, sur l'image et la photo). Le gel est maintenu en place dans un petit support de plastique qui baigne dans un bac rempli d'une solution tampon. À chaque extrémité du dispositif se trouvent des électrodes. Lorsqu'on applique le courant à travers le gel, les molécules d'ADN de charge négative se dirigent vers l'électrode positive.



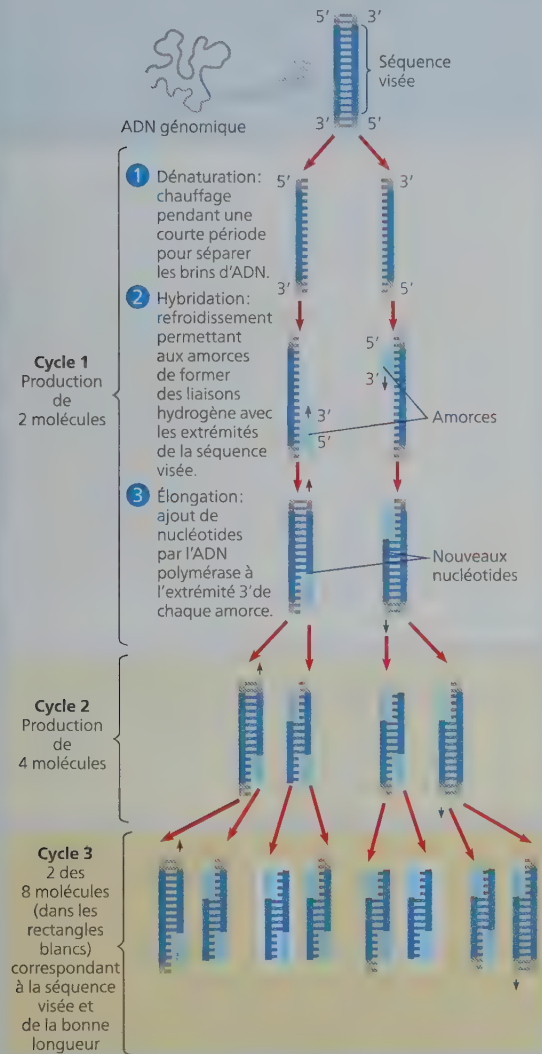
(b) Quand elles traversent le gel, les molécules les plus courtes se déplacent plus rapidement que les molécules les plus longues, car elles sont moins ralenties. Après avoir coupé le courant, on ajoute un colorant qui se lie à l'ADN. Ces fragments émettent une lumière rose lorsqu'ils sont exposés à une lumière UV. Chaque bande rose correspond à plusieurs milliers de molécules d'ADN de la même longueur. Les bandes verticales situées du côté gauche du gel (au bas de la photo) servent de référence (témoin): elles correspondent à l'ensemble des fragments de restriction de tailles connus utilisés à des fins de comparaison avec les échantillons de taille inconnue.

deux brins, au début de la séquence visée. Enfin, une ADN polymérase résistante à la chaleur allonge les amorces dans le sens 5' → 3' de chaque brin. Si on utilisait une ADN polymérase normale, la protéine qui constitue cette enzyme serait dénaturée en même temps que l'ADN au moment du chauffage de la première étape, et il faudrait la remplacer après chaque cycle. En fait, l'automatisation de la PCR a été possible grâce à la découverte de la *Taq* polymérase, une ADN polymérase peu commune. Le nom de cette enzyme est une abréviation de *Thermus aquaticus*, l'espèce bactérienne dont on l'a isolée initialement. Cette bactérie vit dans des sources hydrothermales et la stabilité de

L'amplification en chaîne par polymérase (PCR)

■ **APPLICATION** ■ La PCR permet de produire dans une éprouvette un très grand nombre de copies d'un segment donné d'ADN (la séquence visée), ce qui facilite le travail des chercheurs.

■ **TECHNIQUE** ■ La PCR nécessite un ADN bicaténaire contenant la séquence visée, une ADN polymérase résistante à la chaleur, les 4 nucléotides en quantité suffisante ainsi que des brins d'ADN de 15 à 20 nucléotides qui servent d'amorces. Il y a deux séquences d'amorce: la première est complémentaire à une extrémité de la séquence recherchée sur un brin, et la seconde est complémentaire à l'autre extrémité de la séquence sur l'autre brin.



■ **RÉSULTATS** ■ Après trois cycles, deux molécules correspondent exactement à la séquence visée. Après 30 autres cycles, le nombre de molécules correspondant à la séquence visée dépasse le milliard (10^9).

son ADN polymérase à des températures élevées est une adaptation évolutive qui lui permet de résister à des températures de l'ordre de 95 °C. Aujourd'hui, les chercheurs utilisent également l'ADN polymérase de *Pyrococcus furiosus*, une archée. Cette enzyme, connue sous le nom de *Pfu* polymérase, est plus précise et plus stable, mais elle est toutefois plus onéreuse que la *Taq* polymérase.

La PCR est une technique rapide, très spécifique et peut démarrer avec d'infimes quantités d'ADN même s'il n'est pas intact ou s'il est fortement dégradé; il suffit que quelques copies complètes de la séquence visée soient présentes. La clé de cette grande spécificité réside dans la paire d'amorces utilisée pour chaque PCR. Les séquences des amorces sont choisies afin qu'elles forment des liaisons hydrogène *seulement* avec les séquences situées aux extrémités opposées du segment visé (une amorce fixée sur l'extrémité 3' de chaque brin). Pour une spécificité élevée, les amorces doivent avoir une longueur d'environ 15 nucléotides ou plus. À la fin du troisième cycle, le quart des molécules est identique au segment visé, les deux brins ayant la longueur appropriée. À l'issue de chaque cycle successif, le nombre de molécules de la bonne longueur du segment visé a doublé; ce nombre s'élève à 2^n , où n représente le nombre de cycles. Après 30 autres cycles, on obtient environ un milliard de copies de la séquence visée!

Malgré sa vitesse et sa spécificité, la PCR ne peut pas remplacer le clonage d'un gène dans des cellules quand on doit produire ce gène en entier et en grande quantité. En effet, les erreurs occasionnelles qui surviennent pendant la répllication limitent le nombre de copies exactes ainsi que la longueur des fragments d'ADN qu'il est possible de copier. C'est pourquoi on utilise plutôt la PCR pour multiplier un fragment d'ADN spécifique afin de le cloner. Les amorces utilisées pour la PCR sont synthétisées de manière que chaque extrémité du fragment d'ADN comporte un site de restriction correspondant à celui du vecteur de clonage. Une fois coupés avec l'enzyme de restriction reconnaissant ce site, le fragment et le vecteur sont ensuite ligaturés (figure 20.8). Les plasmides recombinés ainsi obtenus sont séquencés afin de choisir ceux qui ne contiennent aucune erreur.

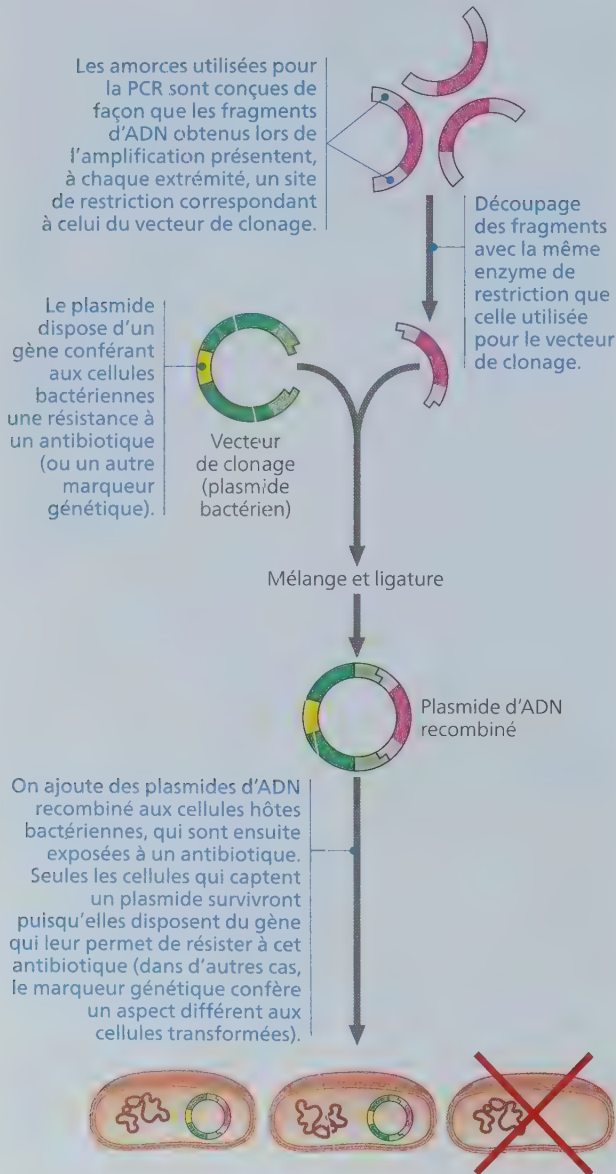
L'expression des gènes eucaryotes clonés

On peut synthétiser de grandes quantités de protéines à partir d'un gène lorsque celui-ci est cloné dans des cellules hôtes, que ce soit pour des recherches ou pour des applications intéressantes, ce que nous examinerons au concept 20.4. L'expression des protéines codées par les gènes clonés peut s'effectuer soit dans des cellules bactériennes, soit dans des cellules eucaryotes; chacun de ces choix présente des avantages et des inconvénients.

Les systèmes d'expression bactériens

L'expression d'un gène eucaryote cloné dans des cellules hôtes bactériennes risque de présenter quelques difficultés, car certains aspects de l'expression génétique sont différents chez ces deux types de cellules. Pour contourner le problème que posent les différences de promoteurs et autres séquences de contrôle entre procaryotes et eucaryotes, on se sert habituellement d'un **vecteur d'expression**, c'est-à-dire d'un vecteur de clonage contenant un promoteur bactérien hautement actif situé juste en amont d'un site de restriction, à l'endroit où le gène eucaryote peut être inséré, dans le bon cadre de lecture. La cellule

▼ **Figure 20.8 L'utilisation d'une enzyme de restriction et de la PCR pour le clonage d'un gène.** Si on observe de plus près le processus illustré dans le haut de la figure 20.4, on constate qu'on peut utiliser la PCR pour multiplier les copies d'un fragment d'ADN ou un gène d'intérêt qui sera joint à un plasmide de façon à former un vecteur de clonage (ici, un plasmide bactérien recombiné). Les extrémités des fragments présentent un site de restriction identique à celui du plasmide. Les deux ADN sont découpés avec la même enzyme de restriction; ils sont alors combinés par hybridation et ligature des extrémités cohésives (grâce à la ligase). Les vecteurs de clonage (plasmides recombinés) ainsi obtenus sont alors introduits dans les cellules hôtes bactériennes. Les plasmides contiennent également un marqueur génétique, par exemple un gène de résistance à un antibiotique, pour faciliter la sélection des clones. En effet, seules les cellules disposant d'un plasmide portant ce gène peuvent survivre en présence de cet antibiotique. Notez qu'il est possible d'utiliser d'autres marqueurs (tels que la production de pigments ou la fluorescence) pour repérer les clones et éliminer les cellules dont les plasmides ne sont pas recombinés.



hôte bactérienne reconnaît alors le promoteur et exprime le gène étranger qui lui est associé. De tels vecteurs d'expression permettent de synthétiser une grande variété de protéines eucaryotes par des cellules bactériennes.

Un autre obstacle à l'expression de gènes eucaryotes clonés par des bactéries est la présence de longues régions non codantes (introns) dans la plupart des gènes (voir le concept 17.3). En effet, les gènes eucaryotes contenant des introns sont souvent très longs et, de ce fait, difficiles à manipuler. De plus, comme les cellules bactériennes sont dépourvues d'outils d'épissage de l'ARN, elles sont incapables de traduire ces gènes correctement. On peut résoudre toutefois ce problème en utilisant une forme du gène qui ne contient que les exons, soit l'*ADN complémentaire*, ou *ADNc* (voir la figure 20.10.)

Les systèmes d'expression eucaryotes

Les biologistes moléculaires peuvent pallier l'incompatibilité entre eucaryotes et bactéries en utilisant des cellules eucaryotes en tant qu'hôtes pour le clonage ou l'expression (ou les deux) de gènes eucaryotes. Les levures (mycètes unicellulaires) offrent plusieurs avantages à cet égard : elles sont aussi faciles à cultiver que les bactéries et, de plus, elles contiennent des plasmides, ce qui est rare chez les eucaryotes.

En plus de permettre l'épissage de l'ARN, les cellules hôtes eucaryotes présentent un autre avantage. En effet, pour être fonctionnelles, de nombreuses protéines eucaryotes doivent être modifiées après leur traduction, par exemple par l'incorporation d'un glucide (glycosylation) ou d'un lipide. Les bactéries sont incapables d'effectuer de telles transformations, et si le gène provient d'un mammifère, même les levures sont parfois incapables de modifier correctement les protéines qu'il encode. Il est toutefois possible de faire effectuer ces modifications post-traduction par différents types de cellules hôtes mises en culture. On a obtenu des résultats satisfaisants avec certaines lignées cellulaires de mammifères et avec une lignée cellulaire d'insectes infectées par un virus particulier (baculovirus) contenant de l'ADN recombiné.

En plus des vecteurs, les scientifiques ont mis au point d'autres méthodes permettant d'introduire de l'ADN recombiné dans les cellules eucaryotes. C'est le cas de l'**électroporation**, qui consiste à soumettre une suspension de cellules à une brève impulsion électrique de haut voltage. Le courant électrique crée dans la membrane plasmique des trous temporaires, par lesquels l'ADN peut pénétrer. (On emploie couramment cette technique dans le cas de bactéries également.) Il est aussi possible d'injecter l'ADN directement dans les grosses cellules eucaryotes, comme les ovocytes, au moyen d'aiguilles microscopiques. Pour insérer l'ADN dans des cellules végétales, on peut utiliser *Agrobacterium tumefaciens*, une bactérie du sol, comme nous le verrons plus loin. On peut aussi insérer l'ADN dans des vésicules lipidiques nommées *liposomes* qui fusionnent avec la membrane de la cellule et la traversent. Enfin, on peut introduire mécaniquement de l'ADN dans une cellule animale ou végétale à l'aide d'un « canon à gènes », un appareil qui bombarde une cellule de particules de tungstène ou d'or recouvertes d'ADN. Peu importe la méthode utilisée, si l'ADN inséré est incorporé dans le génome d'une cellule par recombinaison génétique, il peut alors être exprimé par la cellule. L'expression de différentes versions de gènes dans les cellules permet aux chercheurs d'étudier le fonctionnement d'une protéine, un sujet que nous aborderons au concept 20.2.

L'expression génétique interspécifique et l'ascendance évolutive

ÉVOLUTION La capacité à exprimer des protéines eucaryotes dans des bactéries (même si les protéines ne sont pas correctement glycosylées) est une propriété absolument remarquable quand on considère à quel point les cellules eucaryotes et les cellules bactériennes sont différentes. En fait, il existe de nombreux exemples de gènes issus d'une espèce donnée qui demeurent complètement fonctionnels après avoir été transférés dans une autre espèce très différente, dont un gène de la luciole qui a été transféré dans un plant de tabac, et celui d'une méduse, transféré dans un porc (voir la figure 17.7). Ces observations soulignent l'ascendance évolutive commune d'espèces vivant aujourd'hui.

Pour illustrer cette affirmation, prenons l'exemple du gène *Pax-6*, présent chez des animaux aussi divers que des vertébrés et des drosophiles. Chez les vertébrés, le produit du gène *Pax-6* (la protéine Pax-6) déclenche un programme complexe d'expression génétique qui aboutit à la formation d'un œil pourvu d'un seul cristallin. Par contre, chez la drosophile, l'expression du gène *Pax-6* provoque la formation d'un œil composé très différent de celui des vertébrés. Lorsque les scientifiques ont introduit dans un embryon de drosophile le gène préalablement cloné *Pax-6* de la souris en vue de remplacer le gène *Pax-6* de la drosophile, ils ont constaté avec étonnement que le gène de la souris conduisait tout de même à la formation d'un œil composé de mouche (voir la figure 50.16). Inversement, le transfert du gène *Pax-6* de la drosophile dans un embryon de vertébré (une grenouille, dans ce cas) entraînait la formation d'un œil de grenouille. Bien que les programmes génétiques déclenchés chez les vertébrés et chez les drosophiles génèrent des types d'yeux très différents, les deux versions du gène *Pax-6* peuvent se substituer l'une à l'autre pour stimuler le développement du cristallin propre à l'espèce; c'est là une preuve de leur évolution à partir d'un gène présent chez un ancêtre commun. Étant donné leurs racines évolutives anciennes, tous les organismes présentent les mêmes mécanismes fondamentaux de l'expression génétique. Cette similitude est à la base des nombreuses techniques d'ADN recombiné décrites dans le présent chapitre.

RETOUR SUR LE CONCEPT 20.1

1. **FAITES DES LIENS** ► Le site de restriction pour une enzyme nommée *PvuI* est la séquence suivante:



On effectue des coupures décalées entre T et C sur chaque brin. Quels types de liaisons ont été rompues? (Voir le concept 5.5.)

2. **FAITES UN DESSIN** ► La séquence d'un brin d'ADN est la suivante:



Dessinez l'autre brin. L'enzyme *PvuI* peut-elle couper cette molécule (voir la question 1)? Si oui, dessinez les produits.

3. Quelles sont les difficultés potentielles qu'entraîne l'utilisation de vecteurs plasmidiques de cellules hôtes bactériennes pour produire de grandes quantités de protéines à partir de gènes eucaryotes clonés?

4. **HABILITÉS VISUELLES** ► Comparez les figures 20.7 et 16.20. Comment la réplication d'extrémités d'ADN au cours de la PCR se déroule-t-elle sans que les fragments soient raccourcis chaque fois?

Voir les réponses proposées à l'appendice A.

CONCEPT 20.2

Les biotechnologies permettent d'étudier l'expression et la fonction d'un gène

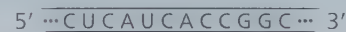
Pour déterminer comment fonctionne un système biologique, les scientifiques étudient les mécanismes de chaque composant du système. En déterminant où et quand un gène (ou un groupe de gènes) est exprimé, on peut obtenir de précieux indices sur le fonctionnement des gènes.

L'analyse de l'expression génétique

Lorsqu'ils souhaitent étudier l'assortiment des cellules d'un organisme multicellulaire, la croissance des cellules cancéreuses ou les tissus en développement d'un embryon, les biologistes tentent d'abord de découvrir quels gènes expriment les cellules en question. Le moyen le plus direct pour y arriver consiste généralement à déterminer l'ARNm produit. D'abord, nous examinerons les techniques permettant d'établir les schémas d'expression de gènes spécifiques. Ensuite, nous étudierons différents moyens utilisés pour caractériser les groupes de gènes exprimés par les cellules ou les tissus visés. Comme vous pourrez le constater, toutes ces approches reposent, d'une façon ou d'une autre, sur l'appariement des bases entre des séquences nucléotidiques complémentaires.

L'expression de gènes uniques

Supposons que nous avons cloné un gène dont nous présumons qu'il pourrait jouer un rôle important dans le développement embryonnaire de *Drosophila melanogaster* (la drosophile). Nous voudrions d'abord savoir dans quelles cellules embryonnaires ce gène est exprimé – en d'autres mots, où se trouve l'ARNm correspondant dans l'embryon. On peut détecter l'ARNm par hybridation moléculaire à l'aide de molécules d'une séquence complémentaire qu'il est possible de retracer. Cette molécule complémentaire est un court acide nucléique monocaténaire (de l'ARN ou de l'ADN), qu'on nomme **sonde nucléique**. En utilisant le gène cloné comme matrice, il est possible de synthétiser une sonde complémentaire à l'ARNm du gène. Ainsi, si une partie de la séquence d'un brin du gène recherché se présente comme suit:



On synthétise alors cette sonde d'ADN monocaténaire ayant pour séquence:



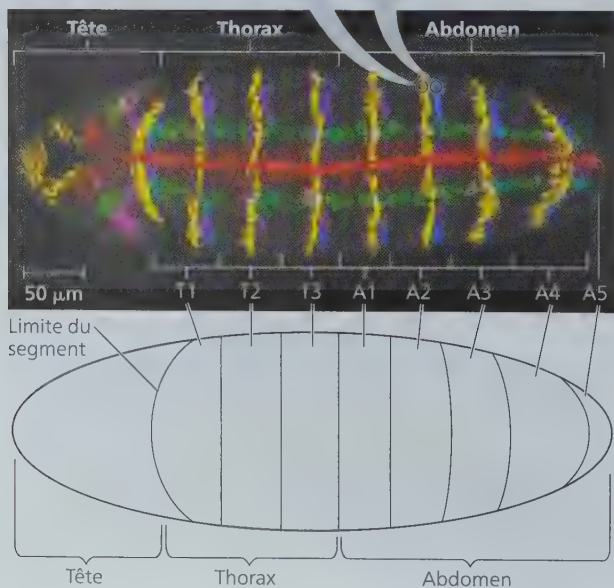
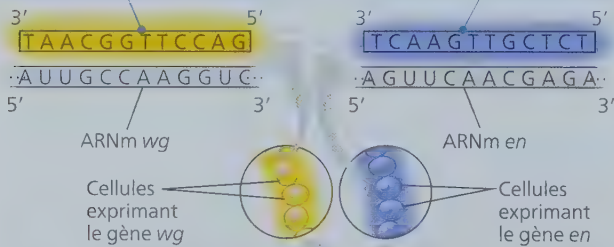
Ensuite, pendant la synthèse, on fixe à chaque molécule de la sonde un isotope fluorescent qu'il est possible de révéler. On incube ensuite les embryons de drosophile dans une solution contenant des sondes qui peuvent s'hybrider de façon spécifique

avec toutes les séquences complémentaires des ARNm de cellules embryonnaires dans lesquelles le gène est transcrit. Cette technique, qui permet de visionner l'ARNm sur place (*in situ* en latin) dans l'organisme intact, porte le nom d'**hybridation *in situ***. On peut ainsi associer différentes sondes à des marqueurs fluorescents de différentes couleurs, ce qui produit parfois des résultats d'une beauté saisissante (figure 20.9).

▼ **Figure 20.9** La localisation de l'expression de gènes uniques par analyse d'hybridations *in situ*. Un embryon de *Drosophila melanogaster* a été incubé dans une solution contenant des sondes d'ADN pour cinq ARNm différents, chaque sonde étant associée à un marqueur fluorescent différent. L'embryon a alors été examiné sous microscopie à fluorescence; la micrographie fluorescente est présentée ci-dessous. Chaque couleur indique l'endroit où un gène spécifique est exprimé sous forme d'ARNm. Les flèches en provenance des groupes de cellules jaunes et bleues situés au-dessus de la micrographie représentent une vue amplifiée de l'hybridation des acides nucléiques de la sonde d'ADN de la couleur correspondante et de l'ARNm complémentaire. Les cellules jaunes (qui expriment le gène *wg*) interagissent avec les cellules bleues (qui expriment le gène *en*); leur interaction permet d'établir le schéma d'expression dans un segment du corps. Le diagramme situé au bas de la figure représente plus clairement les huit segments visibles sous cet angle.

La sonde d'ADN jaune s'hybride avec les ARNm dans les cellules qui expriment le gène «sans ailes» (*wg*), lequel encode une protéine de signalisation qui est sécrétée.

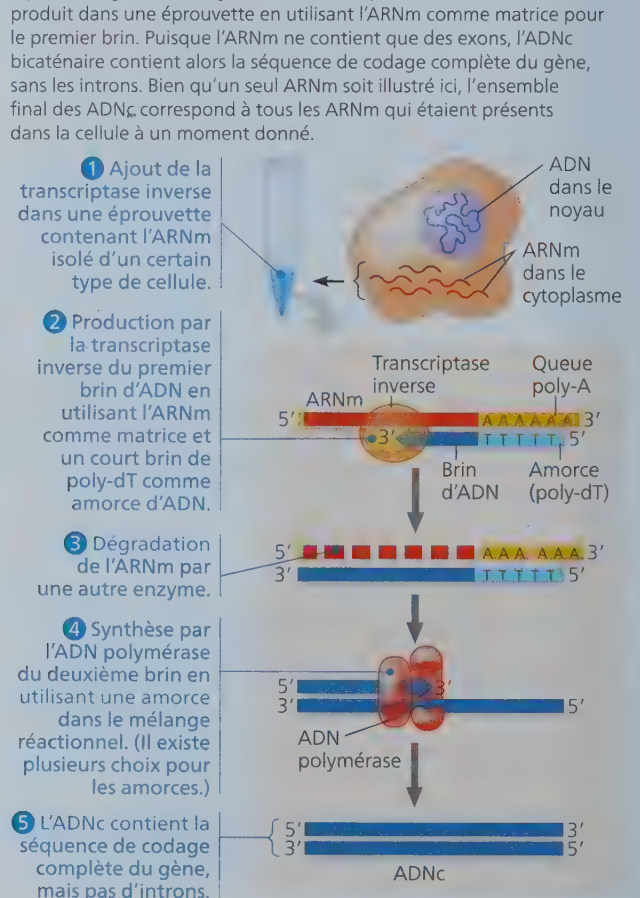
La sonde d'ADN bleue s'hybride avec les ARNm dans les cellules qui expriment le gène «engrêlé» (*en*), lequel encode un facteur de transcription.



Pour comparer simultanément les quantités d'ARNm spécifiques dans plusieurs échantillons, par exemple dans différents types de cellules ou dans des embryons à divers stades du développement, il peut être préférable de recourir à d'autres techniques de dépistage de l'ARNm. À cet égard, la **transcription inverse suivie d'une amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR)** [RT pour *reverse transcriptase* en anglais]) est une méthode dont l'usage est très répandu.

La RT-PCR commence par transformer une série d'échantillons d'ARNm en ADN bicaténaire de séquences correspondantes. D'abord, on utilise la transcriptase inverse (une enzyme provenant d'un rétrovirus; voir la figure 19.9) pour synthétiser une copie d'ADN complémentaire de chaque ARNm contenu dans l'échantillon et obtenir ainsi une *transcrit inverse* (figure 20.10). Il faut se rappeler que l'extrémité 3' de l'ARNm porte un segment de nucléotides d'adénine (A) nommé queue poly-A. La présence de ce segment permet d'ajouter un court brin complémentaire de désoxythymidine (poly-dT) comme amorce pour la synthèse du brin d'ADN. Après la dégradation enzymatique de l'ARNm, l'ADN polymérase synthétise un second brin d'ADN, complémentaire au premier. L'ADN bicaténaire qui en résulte est nommé **ADN complémentaire (ADNc)**. Produit à partir de l'ARNm, l'ADNc correspond aux exons d'un gène (il ne possède pas d'introns) et on peut l'utiliser

▼ **Figure 20.10** La fabrication d'ADN complémentaire (ADNc) à partir de gènes eucaryotes. L'ADN complémentaire est l'ADN produit dans une éprouvette en utilisant l'ARNm comme matrice pour le premier brin. Puisque l'ARNm ne contient que des exons, l'ADNc bicaténaire contient alors la séquence de codage complète du gène, sans les introns. Bien qu'un seul ARNm soit illustré ici, l'ensemble final des ADNc correspond à tous les ARNm qui étaient présents dans la cellule à un moment donné.



pour exprimer une protéine dans une bactérie, comme on l'a mentionné précédemment. Pour évaluer à quel moment un gène d'intérêt de la drosophile est exprimé, il faudrait, par exemple, commencer par isoler tous les ARNm dans les échantillons recueillis à différents stades embryonnaires de la drosophile et produire des ADNc à partir des ARNm de chaque stade (figure 20.11).

L'étape suivante de la RT-PCR est la PCR (voir la figure 20.7). Comme on l'a mentionné précédemment, la PCR permet de produire rapidement plusieurs copies d'un segment spécifique d'ADN bicaténaire en utilisant des amorces s'hybridant aux extrémités opposées du segment visé. Dans notre exemple, il faudrait ajouter des amorces correspondant à un segment du gène d'intérêt de la drosophile en employant l'ADNc de chaque stade du développement embryonnaire comme matrice pour la PCR d'échantillons distincts.

Lorsqu'on analyse les produits obtenus par électrophorèse sur gel, on peut observer des copies de la région amplifiée sous forme de bandes seulement dans les échantillons qui contenaient à l'origine l'ARNm du gène d'intérêt. La méthode d'amplification connue sous le nom de RT-PCR quantitative (qRT-PCR) consiste à utiliser un colorant qui devient fluorescent uniquement lorsqu'il se lie à un produit d'amplification PCR bicaténaire. Les appareils de PCR quantitative les plus récents peuvent détecter la lumière et mesurer le produit de la PCR. Il est ainsi possible de générer des données quantitatives tout en évitant une électrophorèse, un avantage que n'offre aucune autre méthode. On peut également la RT-PCR et la qRT-PCR avec les ARNm obtenus simultanément à partir de différents tissus, ce qui permet de déterminer quel tissu produit un ARNm spécifique.

L'expression des groupes de gènes en interaction

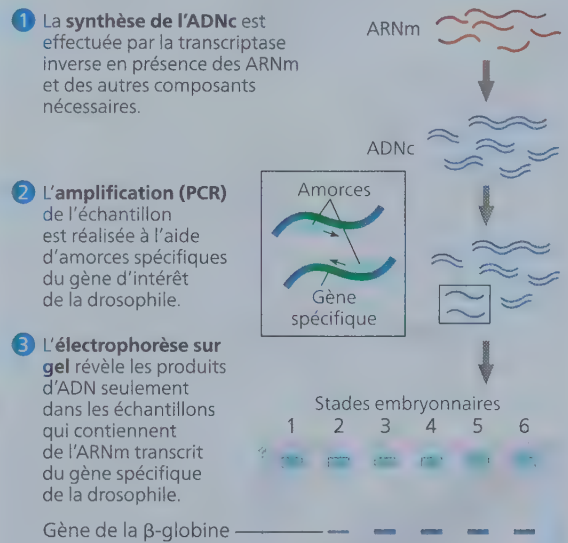
Les biologistes ont grand intérêt à comprendre comment les gènes interagissent afin de créer un organisme et d'assurer son fonctionnement. Maintenant que les séquences de génomes entiers de nombreux organismes sont presque complètement déterminées, on peut entreprendre l'étude de l'expression de grands groupes de gènes (une *approche systémique*). Des chercheurs utilisent les connaissances acquises sur des génomes entiers pour déterminer quels gènes sont transcrits dans différents tissus ou dans certaines circonstances, par exemple à divers stades de développement. L'un des objectifs de ces travaux consiste à déterminer les réseaux d'expression dans un génome entier.

La principale approche sur laquelle reposent les études sur l'expression de l'ensemble du génome fait appel à des **tests sur microréseaux à ADN**. Ce dispositif se compose d'infimes quantités d'un grand nombre de fragments d'ADN monocaténaire représentant différents gènes que l'on a fixés sur une plaque de verre sous forme de réseau, de grille ou de points denses. (Le microréseau est également nommé *puce à ADN*, par analogie avec les puces informatiques.) Idéalement, ces fragments représentent l'ensemble des gènes d'un organisme. Les ARNm des cellules à l'étude sont rétrotranscrits en ADNc (voir la figure 20.10), puis on ajoute un colorant fluorescent afin de pouvoir employer l'ADNc comme sonde sur le microréseau. Pour analyser plusieurs échantillons au cours d'une même expérience, on utilise différentes couleurs pour les divers échantillons cellulaires. La disposition des points colorés (présentée à la figure 20.12 sous forme de microréseau de taille réelle) montre les points auxquels chaque sonde était liée et, par conséquent, révèle quels sont les gènes exprimés dans les échantillons cellulaires analysés. C'est

L'analyse de l'expression de gènes uniques par la technique de RT-PCR

■ **APPLICATION** ■ La technique de RT-PCR utilise l'enzyme transcriptase inverse en association avec la PCR et l'électrophorèse sur gel. On peut utiliser la RT-PCR pour comparer l'expression génétique entre divers échantillons (par exemple, à différents stades embryonnaires, dans différents tissus ou dans le même type de cellules dans des conditions variées).

■ **TECHNIQUE** ■ Dans cet exemple, on a analysé les échantillons contenant des ARNm à six stades embryonnaires de la drosophile pour détecter un ARNm spécifique, tel qu'il est illustré ci-dessous. (On a représenté l'ARNm d'un seul stade.)



■ **RÉSULTATS** ■ L'ARNm pour ce gène est d'abord exprimé au stade 2 et continue de l'être jusqu'au stade 6. La taille du fragment amplifié (illustré par sa position sur le gel) dépend de la distance entre les amorces qui ont été utilisées (et non de la taille de l'ARNm).

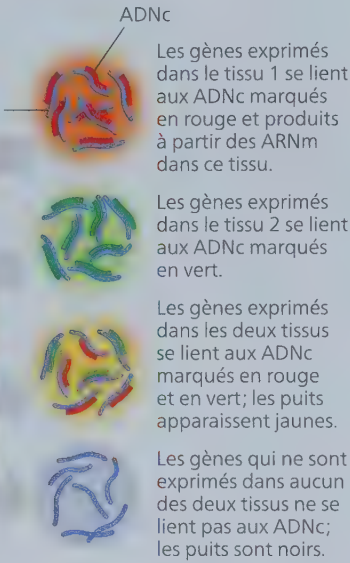
en 1995 que la technologie des microréseaux a connu un véritable essor, après la publication de nombreux articles à son sujet; depuis, des applications plus sophistiquées ont été mises au point et sont maintenant utilisées.

Étant donné la présence sur le marché de méthodes de séquençage rapides et peu coûteuses, les microréseaux sont de moins en moins utilisés. En effet, les chercheurs ont dorénavant les moyens de séquencer tout simplement les échantillons d'ADNc provenant de différents tissus ou à divers stades embryonnaires pour découvrir quels sont les gènes exprimés. Cette méthode

▼ **Figure 20.12** L'utilisation des microréseaux pour l'analyse de l'expression de nombreux gènes. Dans ce test sur microréseau à ADN, les chercheurs ont extrait l'ARNm de deux tissus humains distincts et ils ont synthétisé deux groupes d'ADNc marqués par un indicateur fluorescent rouge (tissu 1) ou vert (tissu 2). Les ADNc radiomarqués ont été hybridés sur des microréseaux, lesquels contenaient 5 760 gènes humains (environ 25 % des gènes humains), dont une partie est visible sur cet agrandissement. La couleur rouge indique que le gène situé dans ce puits est exprimé dans le tissu 1, la couleur verte, que le gène est exprimé dans le tissu 2, la couleur jaune, que le gène est exprimé dans les deux tissus, et la couleur noire, que le gène n'est exprimé dans aucun tissu. Pour chaque point, l'intensité de la fluorescence indique le niveau d'expression relatif du gène.

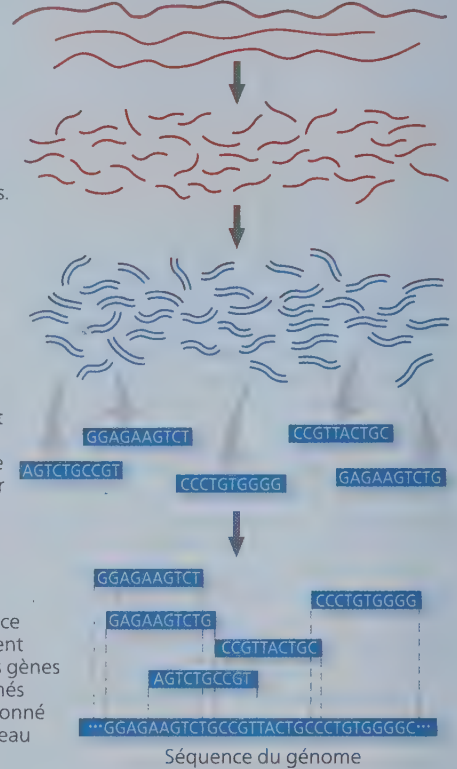
▼ **Microréseau à ADN**

(taille réelle). Chaque point correspond à un puits contenant les copies identiques de fragments d'ADN porteurs d'un gène spécifique.



▼ **Figure 20.13** L'utilisation du séquençage de l'ARN (ARN-seq) pour analyser l'expression de plusieurs gènes. Le séquençage de l'ARN fournit un vaste éventail de données sur l'expression des gènes, y compris leur niveau d'expression.

- 1 Les ARNm sont isolés à partir du tissu à l'étude.
- 2 Les ARNm sont découpés en petits fragments de tailles similaires.
- 3 Les ARNm sont rétrotranscrits en ADNc de la même taille.
- 4 Les ADNc sont séquencés.
- 5 Les courtes séquences sont cartographiées sur la séquence génomique par un ordinateur. Les données ainsi obtenues, notamment le nombre de fois qu'une séquence apparaît, mettent en évidence les gènes qui sont exprimés dans un tissu donné ainsi que le niveau d'expression.



directe est connue sous le nom de **séquençage de l'ARN**, ou *ARN-seq*, même si en réalité, c'est l'ADNc qui est séquencé. Dans cette méthode, on isole des échantillons d'ARNm (ou un autre type d'ARN), puis on les découpe en fragments plus courts de taille similaire. Ces fragments sont ensuite convertis en ADNc (figure 20.13). Les courts fragments d'ADNc sont d'abord séquencés, puis un programme informatique les rassemble et les cartographie sur le génome des espèces concernées (lorsque cela est possible), ou il les place tout simplement dans le bon ordre, à partir du début, en se fondant sur les séquences de plusieurs ARN se chevauchant. Le séquençage de l'ARN présente de nombreux avantages par rapport au test sur microréseaux. D'abord, cette méthode n'est pas fondée sur une hybridation avec une sonde radiomarquée et, par conséquent, une séquence génomique n'est pas essentielle (bien qu'il soit généralement possible d'en avoir une). Ensuite, cette méthode permet de mesurer les niveaux d'expression dans un très vaste intervalle; il est cependant difficile de mesurer avec précision les niveaux d'expression très bas ou très élevés lors d'un test sur microréseaux. Enfin, une analyse de séquences approfondie permet de recueillir une mine de renseignements au sujet de l'expression d'un gène donné, dont le taux relatif d'ARNm ayant fait l'objet d'un épissage alternatif. À mesure que diminue le coût du séquençage de l'ADN, le séquençage de l'ARN est de plus en plus utilisé pour de nombreuses applications. Toutefois, il est encore nécessaire de confirmer l'expression de gènes uniques par RT-PCR dans la plupart des cas.

Les scientifiques peuvent aujourd'hui mesurer simultanément l'expression de milliers de gènes. De telles analyses sont rendues possibles grâce aux biotechnologies, et l'automatisation permet de les réaliser à plus grande échelle. En plus de contribuer à la découverte des interactions entre les gènes et de mieux connaître leur fonctionnement, les tests sur microréseaux et le séquençage de l'ARN nous aident à mieux comprendre certaines maladies et pourraient mener à de nouvelles techniques de diagnostic ou à des thérapies innovatrices. Par exemple, la comparaison des modes d'expression génétique entre les tumeurs du cancer du sein et les tissus mammaires non cancéreux a déjà débouché sur des protocoles thérapeutiques plus détaillés et plus efficaces (voir la figure 18.27). Finalement, l'information obtenue grâce aux tests sur microréseaux nous permettra d'acquérir une meilleure vue d'ensemble et d'approfondir notre compréhension de la façon dont les gènes interagissent pour former un être vivant et maintenir ses systèmes vitaux en état de fonctionnement.

La détermination de la fonction des gènes

Une fois qu'ils ont ciblé un gène d'intérêt, comment les scientifiques font-ils pour établir sa fonction? La séquence d'un gène peut être comparée à celles d'autres espèces. En connaissant la fonction d'un gène similaire dans une autre espèce, on peut présumer que celle du gène étudié est comparable. À cet égard,

les données sur l'emplacement et le moment de l'expression génétique peuvent aider à consolider cette hypothèse. Pour obtenir des preuves plus convaincantes, une des approches possibles consiste à désactiver le gène et à observer les conséquences de cette désactivation dans la cellule ou l'organisme.

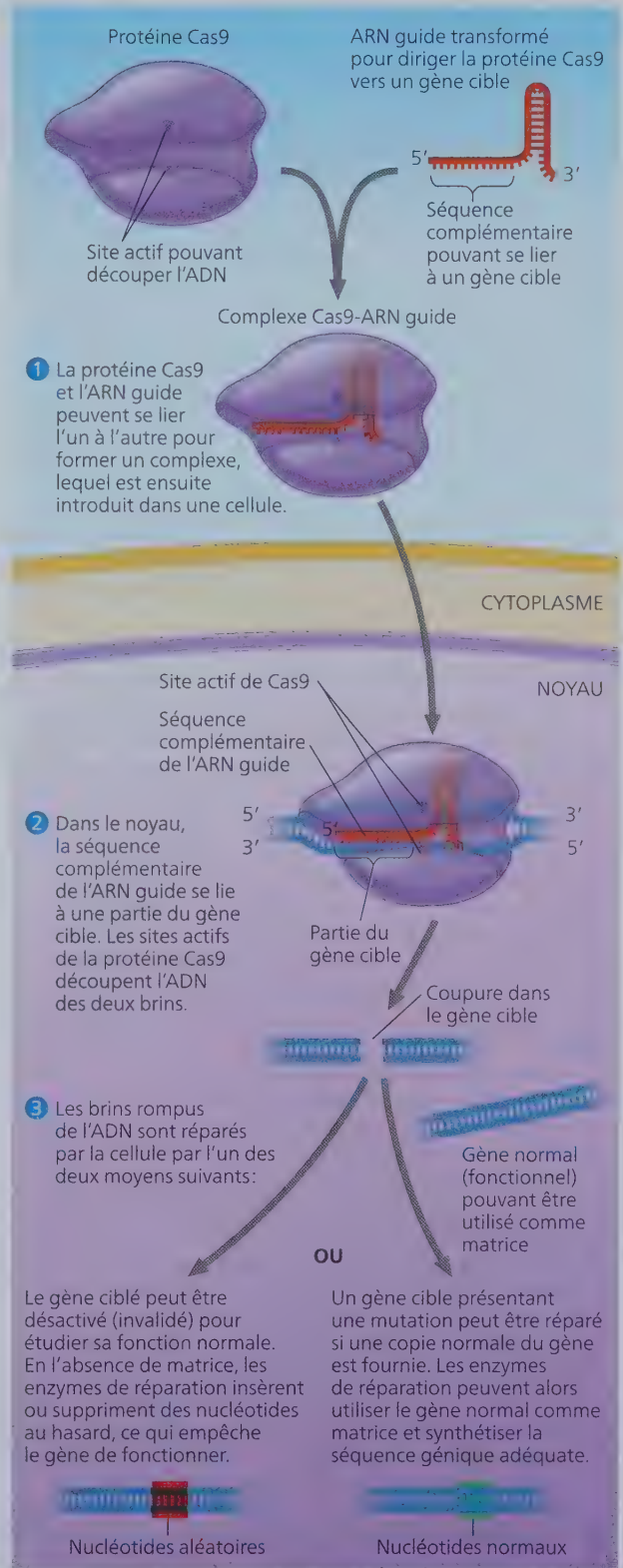
L'édition de gènes et de génomes

Les biologistes moléculaires ont longtemps cherché des techniques qui leur permettraient de modifier ou d'éditer le matériel génétique des cellules ou des organismes de façon prévisible. Pour une de ces techniques, appelée **mutagenèse *in vitro*** (ou *mutagenèse dirigée*), on effectue des mutations précises dans un gène cloné en substituant une base à une autre, en provoquant des délétions, etc. Après quoi, on réintroduit ce gène muté dans une cellule de façon à désactiver les copies cellulaires normales du même gène. Si les mutations provoquées altèrent ou neutralisent le fonctionnement de la protéine codée par le gène, le phénotype du mutant peut aider à déterminer la fonction de la protéine normale manquante. À l'aide de techniques moléculaires et génétiques, les chercheurs peuvent même produire des souris ayant un gène désactivé (gène invalidé, ou « *knockout* » en anglais) afin d'étudier le rôle du gène en question dans le développement et chez l'adulte. Mario Capecchi, Martin Evans et Oliver Smithies ont reçu un prix Nobel en 2007 pour la mise au point de cette technique.

Au cours des 10 dernières années, les biologistes ont mis au point une nouvelle technique d'une très grande efficacité pour l'édition de gènes dans les cellules et les organismes vivants. Il s'agit du **système CRISPR-Cas9**, qui révolutionne le domaine du génie génétique. Cas9 est une protéine bactérienne qui aide à défendre les bactéries contre l'infection des bactériophages. Elle fait partie d'un système dont le fonctionnement a été élucidé par Jennifer Doudna et Emmanuelle Charpentier. Dans les cellules bactériennes, Cas9 agit conjointement avec un ARN guide produit à partir de la région CRISPR du système bactérien (voir la figure 19.7).

Tout comme les enzymes de restriction décrites précédemment, Cas9 est une nucléase qui découpe les molécules d'ADN bicaténaire. Toutefois, alors qu'une enzyme de restriction ne reconnaît qu'une seule séquence d'ADN bien précise, la protéine Cas9 découpe toute séquence vers laquelle elle est orientée. Dirigée par un ARN guide auquel elle se lie et qu'elle utilise comme dispositif d'autoguidage, elle découpe les deux brins de toute séquence d'ADN, pourvu qu'ils soient parfaitement complémentaires à l'ARN guide. Les scientifiques ont pu exploiter la fonction de la protéine Cas9 en introduisant un complexe Cas9-ARN guide dans une cellule qu'ils souhaitaient modifier (**figure 20.14**). L'ARN guide du complexe est transformé pour qu'il devienne complémentaire au gène ciblé. Cas9 découpe les deux brins de l'ADN cible, et les extrémités de l'ADN ainsi rompues déclenchent un système de réparation de l'ADN (comparable à celui représenté à la figure 16.19). En l'absence d'ADN intact que les enzymes du système de réparation peuvent utiliser comme matrice, les enzymes de réparation se lient aux extrémités et, par conséquent, introduisent ou retirent parfois certains nucléotides au hasard, tel que l'illustre la partie inférieure gauche de la figure 20.14. Souvent, si la cassure touche une partie codante du gène, le processus de liaison modifie la séquence d'ADN, ce qui nuit au bon fonctionnement du gène.

▼ **Figure 20.14** L'édition d'un gène par l'intermédiaire du système CRISPR-Cas9.



Cette technique est très efficace pour inactiver un gène donné dans le but d'en étudier la fonction. Elle a déjà été utilisée avec de nombreux organismes, notamment des bactéries, des poissons, des souris, des insectes, des cellules humaines et diverses plantes cultivées. Des chercheurs ont également modifié la technique afin de pouvoir utiliser le complexe CRISPR-Cas9 pour réparer un gène muté (voir la partie inférieure droite de la figure 20.14). Ils introduisent ainsi un segment provenant du gène normal (fonctionnel) ainsi que le système CRISPR-Cas9. Une fois l'ADN cible découpé par la protéine Cas9, les enzymes de réparation peuvent utiliser un segment d'ADN normal comme matrice pour réparer l'ADN visé au point de cassure. La thérapie génique fait appel à cette approche, comme nous le verrons plus loin dans le présent chapitre.

Dans une autre application du complexe CRISPR-Cas9, les scientifiques s'attaquent au problème des maladies transmises par les insectes partout dans le monde. Ils se servent de ce complexe pour modifier certains gènes afin d'empêcher les insectes de transmettre la maladie, par exemple. Fait particulier, cette approche permet également de transformer le nouvel allèle afin qu'il soit transmis dans une beaucoup plus vaste mesure par rapport à l'allèle de type sauvage. Cette technique est connue sous le nom de « forçage génétique », car la transmission biaisée du gène modifié pendant la reproduction accentue rapidement la présence du nouvel allèle dans la population.

Les autres méthodes d'étude de la fonction des gènes

Il existe une autre méthode de blocage de l'expression de gènes sélectionnés qui ne modifie pas le génome, mais repose plutôt sur l'**ARN-interférence** (ARNi), un phénomène que nous avons décrit au concept 18.3. Dans cette approche expérimentale, on utilise des molécules d'ARN bicaténaire artificielles dont la séquence correspond à celle du gène visé pour amorcer la dégradation de l'ARN messager du gène, ou pour bloquer sa traduction. Chez certains types d'organismes, comme les nématodes et la drosophile, l'interférence par ARN avait déjà fait ses preuves dans l'analyse à grande échelle des fonctions des gènes. Cette méthode est plus rapide que la technique fondée sur le système CRISPR-Cas9, mais elle permet uniquement de réduire temporairement l'expression d'un gène plutôt que de l'inactiver ou de le modifier sur une base permanente.

Chez l'humain, des considérations éthiques empêchent l'inactivation des gènes pour déterminer leurs fonctions. Une autre stratégie consiste à analyser les génomes d'un grand nombre de personnes atteintes d'une anomalie ou d'une maladie phénotypique, comme une cardiopathie ou le diabète, pour essayer de repérer des particularités génétiques qu'elles ont en commun en comparant leur génome avec celui de personnes saines. On suppose que ces différences pourraient être associées à un ou à plusieurs gènes dysfonctionnels qui, d'une certaine façon, seraient inactivés de façon naturelle. Dans ces analyses à grande échelle, appelées **études d'association sur l'ensemble du génome**, on cherche les *marqueurs génétiques*, c'est-à-dire des séquences d'ADN qui varient dans la population. Dans un gène, une telle variation de séquence est à l'origine des différences entre les allèles, tel que nous l'avons vu dans le cas de l'anémie à hématies falciformes (voir la figure 17.26). Comme dans le cas des séquences codantes, l'ADN non codant

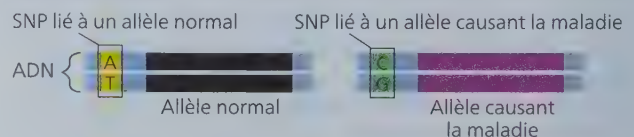
d'un locus spécifique sur un chromosome peut présenter de petites différences de nucléotides (polymorphisme) parmi les individus. Les variations observées dans les séquences d'ADN codantes ou non codantes au sein d'une population sont des polymorphismes (« plusieurs formes »).

Les variations du génome ne touchant qu'une seule paire de bases dans la population humaine constituent des marqueurs génétiques très utiles pour le dépistage des gènes causant des maladies et des troubles. Une variation présente chez au moins 1 % de la population au niveau d'une seule paire de bases se nomme **polymorphisme mononucléotidique** ou **SNP** (pour *single nucleotide polymorphism*, prononcé « snip »). Quelques millions de SNP se trouvent dans le génome humain, ce qui correspond environ à 1 paire de bases sur 100 à 300 séquences d'ADN (transcrit ou non transcrit). Il n'est pas nécessaire de séquencer l'ADN de nombreux individus pour déceler des polymorphismes mononucléotidiques; on peut les détecter par des analyses très sensibles sur microréseaux, par ARN-seq ou par PCR.

Après avoir identifié un SNP présent chez toutes les personnes atteintes d'une maladie, les chercheurs examinent plus en détail cette région et cherchent sa séquence. Dans la grande majorité des cas, le SNP lui-même ne contribue pas à la maladie en modifiant la protéine encodée; en fait, la plupart des SNP sont situés dans des régions non transcrites. Toutefois, si le SNP et un allèle responsable de la maladie sont suffisamment proches, les scientifiques peuvent tirer avantage de la très faible probabilité que l'enjambement entre le marqueur et le gène se produise au cours de la formation du gamète. Autrement dit, le marqueur et le gène seront presque toujours transmis ensemble, même si le marqueur ne fait pas partie du gène (figure 20.15). On a trouvé des SNP associés au diabète, à une cardiopathie et à plusieurs types de cancers. Des recherches se poursuivent afin d'identifier les gènes qui pourraient être en cause dans ces affections.

Les techniques et les stratégies expérimentales que vous avez étudiées jusqu'ici reposent sur l'utilisation de molécules biologiques, notamment l'ADN et les protéines. En parallèle, les biologistes ont aussi mis au point des techniques efficaces pour cloner des organismes multicellulaires entiers. Un objectif de ce travail consiste à obtenir des cellules d'un type particulier, les cellules souches, qui peuvent donner naissance à tous les types de tissus. L'utilisation des cellules souches combinée aux techniques de modifications géniques que nous avons abordées précédemment permettrait de traiter certaines maladies liées

▼ **Figure 20.15 Les polymorphismes mononucléotidiques (SNP) en tant que marqueurs génétiques pour des allèles responsables de maladies.** Ce schéma montre la même portion d'un génome provenant de deux groupes d'individus; dans celui des personnes atteintes d'une anomalie ou d'une maladie génétique, on observe la présence d'une paire C/G à un locus particulier, alors que les personnes en bonne santé présentent une paire A/T à ce même locus. Lorsqu'il est confirmé que l'allèle est associé à la maladie en question, on peut utiliser le SNP comme marqueur de l'allèle causant la maladie.



à des déficiences génétiques. Les méthodes qui font intervenir le clonage d'organismes et la production de cellules souches constituent le sujet de la prochaine section.

RETOUR SUR LE CONCEPT 20.2

1. Décrivez le rôle de l'appariement des bases complémentaires pendant la technique de RT-PCR, le test sur microréseaux, le séquençage de l'ADN et l'édition du système CRISPR-Cas9.
2. **HABILITÉ VISUELLES** ▶ Observez le microréseau de la figure 20.12. Si on marque un échantillon provenant d'un tissu normal avec un colorant fluorescent vert, et un échantillon d'un tissu cancéreux avec un colorant rouge, quelles couleurs représenteraient les gènes que vous souhaiteriez examiner en détail pour étudier le cancer ? Expliquez votre réponse.

Voir les réponses proposées à l'appendice A.

CONCEPT 20.3

Les organismes clonés et les cellules souches servent à la recherche fondamentale et à d'autres applications

Parallèlement aux progrès réalisés en biotechnologie, les scientifiques ont mis au point et amélioré les méthodes de clonage d'organismes multicellulaires entiers à partir de cellules uniques. Dans ce contexte, le clonage produit un ou plusieurs organismes génétiquement identiques au « parent » qui a fourni la cellule unique. On qualifie souvent cette méthode de *clonage d'organisme* afin de la distinguer clairement du clonage moléculaire et, ce qui est encore plus important, du clonage cellulaire, qui se définit comme la division d'une cellule se reproduisant de façon asexuée comme une bactérie dans un groupe de cellules génétiquement identiques. (Le thème commun pour tous les types de clonage est que le produit est génétiquement identique au parent. En fait, le mot *clone* vient du grec *klôn*, qui signifie « pousse ».) L'intérêt actuel à l'égard du clonage d'organismes vient principalement de son potentiel à générer des cellules souches. Une **cellule souche** est une cellule relativement peu spécialisée qui continue à se diviser et qui, dans des conditions appropriées, peut se différencier en cellules spécialisées d'un ou de plusieurs types. Les cellules souches offrent de très grandes possibilités en ce qui concerne la régénération des tissus endommagés.

Le clonage de végétaux et d'animaux a été tenté la première fois il y a plus de 50 ans au cours d'expériences destinées à répondre à des questions biologiques fondamentales. Par exemple, les chercheurs se sont demandé si toutes les cellules d'un organisme contenaient les mêmes gènes ou si les cellules perdent des gènes au cours du processus de la différenciation (voir le concept 18.4). Une façon de répondre à cette question consiste à vérifier si une cellule différenciée est en mesure de former un organisme entier ou, autrement dit, s'il est possible de cloner un organisme entier. Discutons de ces premières expériences avant d'examiner les progrès les plus récents dans le clonage d'organismes et les procédures pour produire des cellules souches.

Le clonage des végétaux : les cultures monocellulaires

Au cours des années 1950, F. C. Steward et ses étudiants de la Cornell University ont réussi à cloner des plantes entières à partir d'une cellule différenciée. En travaillant sur la carotte (*Daucus carota*), ils ont établi que des cellules différenciées extraites de la racine et incubées dans un milieu de culture peuvent donner des plantes adultes normales, génétiquement identiques à la plante « mère ». Ces résultats ont montré que la différenciation n'entraîne pas toujours des modifications irréversibles de l'ADN. Chez les végétaux, une cellule adulte peut donc se « dédifférencier » et donner naissance à tous les types de cellules spécialisées d'un organisme adulte complet. Les cellules qui possèdent cette capacité sont dites **totipotentes**.

Le clonage des végétaux est aujourd'hui abondamment utilisé en agriculture. Pour certains végétaux, comme les orchidées, le clonage est le seul moyen commercialement pratique de reproduire les plantes. Dans d'autres cas, on se sert du clonage pour reproduire une plante ayant des caractéristiques intéressantes, comme la résistance à un agent pathogène. En fait, vous avez probablement effectué vous-même du clonage de végétaux si vous avez déjà fait pousser une nouvelle plante à partir d'une bouture !

Le clonage des animaux : la transplantation de noyaux

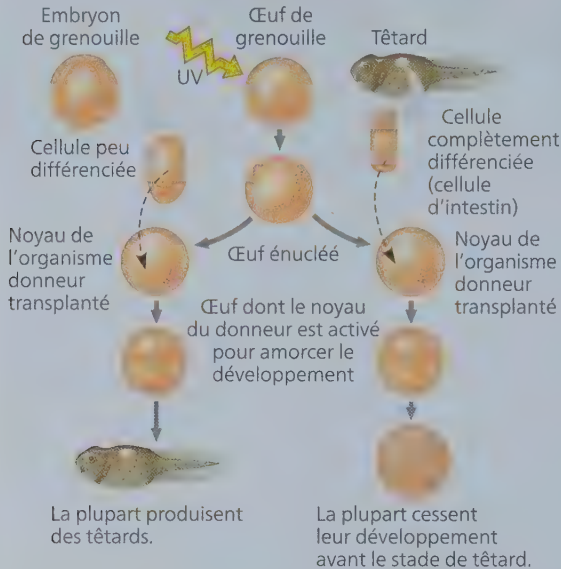
Généralement, les cellules animales différenciées mises en culture ne se divisent pas, et elles ne produisent pas les nombreux types de cellules d'un nouvel organisme. Par conséquent, les chercheurs dans ce domaine ont abordé différemment la question de savoir si les cellules animales différenciées sont totipotentes. Ils ont créé un *ovule énucléé* (en enlevant le noyau d'un ovule) pour y insérer le noyau d'une cellule différenciée, en faisant appel à une méthode nommée *transplantation de noyaux*, maintenant mieux connue sous le nom de *transfert de noyau d'une cellule somatique*. S'il conserve sa pleine capacité génétique, un noyau tiré d'une cellule donneuse différenciée peut alors commander le développement de tous les tissus et organes d'un organisme à partir de la cellule receveuse, encore au stade indifférencié. De telles expériences ont été effectuées sur des grenouilles (*Rana pipiens*) par Robert Briggs et Thomas King pendant les années 1950. Elles ont été poursuivies sur une autre espèce (*Xenopus laevis*) par John Gurdon dans les années 1970 (**figure 20.16**). Ces chercheurs transplantaient un noyau d'une cellule d'embryon de têtard dans l'œuf énucléé de la même espèce. Dans l'expérience de Gurdon, le noyau transplanté assurait le développement normal de l'œuf en têtard, mais avec certaines limites. Il est apparu en effet que le potentiel du noyau transplanté à régir un développement normal s'est avéré inversement lié à l'âge de l'organisme donneur : plus le noyau du donneur est vieux, plus le pourcentage de têtards qui se développent normalement est faible (voir la figure 20.16).

À partir de ces résultats, Gurdon a conclu que les noyaux *subissent effectivement* certains changements pendant la différenciation cellulaire. Chez les grenouilles et la plupart des autres animaux, le potentiel du noyau semble disparaître progressivement au cours du développement embryonnaire et de la différenciation cellulaire. C'est grâce à ces expériences fondamentales

Un noyau tiré d'une cellule animale différenciée peut-il commander le développement d'un organisme ?

■ **HYPOTHÈSE** ■ Si une cellule de grenouille différenciée peut commander le développement d'un organisme complet, alors son noyau devrait pouvoir orchestrer le développement normal d'une grenouille lorsqu'il est transplanté dans un œuf énucléé.

■ **EXPÉRIENCE** ■ John Gurdon et ses collègues de l'Oxford University, en Angleterre, ont détruit des noyaux d'œufs de grenouille (*Xenopus laevis*) en les exposant à un rayonnement ultraviolet. Ils ont ensuite transplanté dans des œufs énucléés des noyaux provenant de cellules d'embryons de grenouille et de têtard.



■ **RÉSULTATS** ■ La plupart des œufs ayant reçu des noyaux transplantés issus de jeunes embryons, dont les cellules sont relativement non différenciées, produisent des têtards. À l'opposé, moins de 2% de ceux qui ont reçu des noyaux de cellules d'intestin de grenouille complètement différenciées donnent des têtards normaux; de plus, dans ce dernier cas, la plupart des embryons cessent de se développer au cours des premières étapes.

■ **CONCLUSION** ■ Le noyau provenant d'une cellule de grenouille différenciée peut commander le développement d'un têtard. Cependant, la capacité de ce noyau à assurer un développement normal diminue à mesure que la cellule de l'organisme donneur se différencie, probablement en raison des changements subis dans les noyaux.

Source des données: J. B. Gurdon et coll., The developmental capacity of nuclei transplanted from keratinized cells of adult frogs, *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 34: 93-112 (1975).

ET SI ? ► Si chaque cellule dans un embryon à quatre cellules était déjà tellement spécialisée qu'elle aurait perdu sa totipotence, quels résultats prédiriez-vous pour l'expérience à la gauche de la figure ?

que la technologie des cellules souches a vu le jour⁶, et Gurdon a reçu le prix Nobel de médecine en 2012 pour ses travaux.

Le clonage reproductif de mammifères

En plus de cloner des grenouilles, les chercheurs ont réussi à cloner des mammifères en utilisant les noyaux provenant de jeunes cellules embryonnaires, même si, à l'époque, on ignorait s'il était possible de reprogrammer un noyau issu d'une cellule complètement différenciée pour qu'il réussisse à agir comme un noyau donneur. En 1997, cependant, des chercheurs écossais ont annoncé la naissance de Dolly, une agnelle qu'ils avaient clonée à partir d'une brebis adulte de six ans en transférant un noyau provenant d'une cellule différenciée d'une glande mammaire (figure 20.17). À l'aide d'une technique comparable à celle de la figure 20.16, les chercheurs ont implanté de jeunes embryons dans des mères porteuses. Sur plusieurs centaines d'embryons, un seul a connu un développement normal, et Dolly est née. Il s'agissait d'un clone génétique de la donneuse de noyau. Toutefois, Dolly a dû être euthanasiée à l'âge de six ans, car elle souffrait de certaines complications pulmonaires d'une maladie qui touche habituellement des brebis gardées à l'intérieur. On a également observé une maladie pulmonaire inhabituelle chez une autre brebis clonée dans le cadre de la même expérience. On a donc supposé que les cellules de cette brebis n'étaient pas aussi saines que celles d'une brebis normale, ce qui constituait l'expression probable d'une reprogrammation incomplète du noyau original transplanté. La reprogrammation se caractérise notamment par des changements épigénétiques qui modifient la structure de la chromatine (voir le concept 18.2), un sujet que nous aborderons sous peu.

Depuis, les chercheurs ont cloné de nombreuses espèces de mammifères, dont des souris, des chats, des vaches, des chevaux, des porcs, des chiens et des singes. Dans la plupart des cas, l'objectif était la production de nouveaux individus génétiquement identiques, ce qu'on nomme *clonage reproductif*. Ces expériences nous ont permis d'acquies de nombreuses connaissances. Par exemple, l'apparence ou le comportement d'animaux clonés de la même espèce *ne sont pas* toujours une copie conforme de l'original. Dans un troupeau de vaches clonées provenant de la même lignée de cellules cultivées, certaines ont un comportement dominant, alors que d'autres sont plus soumises. Le premier chat cloné (en 2001), appelé CC (pour

► **Figure 20.17**

Le clonage reproductif d'un mammifère par transplantation de noyau. Sur cette photo, on peut voir que Dolly, qui était alors une agnelle, n'a pas la même apparence que sa mère porteuse, debout près d'elle.



Carbon Copy, en anglais) (**figure 20.18**), constitue un autre exemple de non-identité chez les clones. Son pelage est calicot comme celui de sa mère, son unique parent, mais la couleur et les motifs sont différents en raison de l'inactivation aléatoire du chromosome X, ce qui est un événement normal pendant le développement embryonnaire (voir la figure 15.8). En outre, chez les humains, les vrais jumeaux, qui sont des « clones » naturels, sont toujours légèrement différents. Il est clair que certains effets relevant du milieu et des phénomènes aléatoires jouent un rôle important au cours du développement.

La régulation défectueuse des gènes chez les animaux clonés par suite de différences épigénétiques

Dans la plupart des études sur la transplantation de noyaux entrepris jusqu'ici, seul un petit pourcentage des embryons clonés se développe normalement jusqu'à la naissance. À l'instar de Dolly, de nombreux animaux clonés présentent des anomalies : par exemple, des souris souffrent d'obésité, de pneumonie ou d'insuffisance hépatique, ou encore meurent prématurément. Les scientifiques avancent que même les animaux clonés qui semblent normaux présentent probablement de légères anomalies.

Les chercheurs ont découvert quelques raisons qui expliquent la faible efficacité du clonage et la forte incidence des anomalies. Dans les noyaux des cellules complètement différenciées, un petit sous-groupe de gènes est activé et l'expression du reste des gènes est réprimée. Cette régulation est souvent attribuable à des changements épigénétiques de la chromatine tels que l'acétylation des histones ou la méthylation de l'ADN (voir la figure 18.7). Au cours de la procédure de transfert du noyau, un grand nombre de ces changements doivent être inversés alors que le noyau issu d'un animal donneur est à maturité. C'est ce qui permettra aux gènes d'être exprimés ou réprimés d'une façon qui convienne aux premiers stades du développement embryonnaire. Les chercheurs ont remarqué que l'ADN des cellules d'embryons clonés, tout comme celui des cellules différenciées de la même espèce, renferme souvent plus de groupements méthyle que l'ADN des cellules équivalentes d'embryons non clonés. Cette découverte porte à croire que la reprogrammation des noyaux de l'organisme donneur exige une restructuration de la chromatine plus précise et complète que celle observée au cours de la procédure de clonage. Étant donné que la méthylation de l'ADN intervient dans la régulation de l'expression génétique, des groupements méthyle additionnels ou mal situés dans l'ADN des noyaux de l'organisme donneur pourraient entraver le mécanisme de l'expression génétique essentielle à un développement embryonnaire normal. En fait, le succès d'une tentative de clonage pourrait dépendre dans une large mesure de la possibilité que la chromatine dans le noyau du donneur soit ou non artificiellement modifiée pour ressembler à celle de l'ovule nouvellement fécondé.

Les cellules souches animales

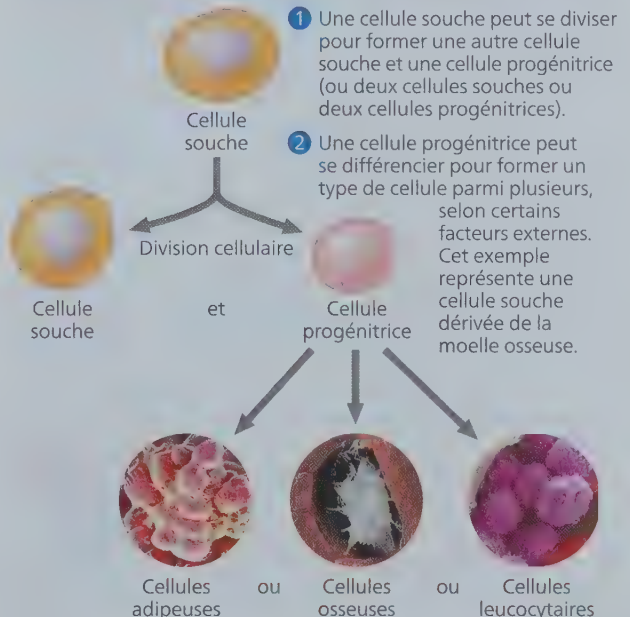
Les avancées réalisées dans le clonage des embryons de mammifères, dont les primates, ont relancé les spéculations concernant le clonage d'êtres humains, qui n'a pas dépassé les stades très précoces du développement embryonnaire. La principale raison pour laquelle les chercheurs ont tenté de cloner des embryons humains n'est pas la reproduction, mais la production

de cellules souches à des fins thérapeutiques. Rappelez-vous qu'une cellule souche est une cellule relativement peu spécialisée qui continue de se diviser et qui, dans des conditions appropriées, peut se différencier en cellules spécialisées d'un ou de plusieurs types (**figure 20.19**). Par conséquent, les cellules souches ont la capacité à la fois de reconstituer leur propre population et de produire des cellules qui empruntent des voies de différenciation spécifiques.

▼ **Figure 20.18** CC («Carbon Copy»), le premier chat cloné, et son unique parent. Rainbow (à gauche) a fourni le noyau dans une procédure de clonage qui a donné CC. Cependant, les deux chats ne sont pas identiques : Rainbow est une chatte calicot classique dont le pelage porte des taches orangées et elle manifeste une « personnalité réservée », alors que CC a un pelage gris et blanc et est plus enjouée.



▼ **Figure 20.19** Les cellules souches maintiennent leur propre population tout en générant des cellules différenciées.



Les cellules souches embryonnaires et adultes

De nombreux jeunes embryons d'animaux contiennent des cellules souches capables de donner naissance à des cellules embryonnaires différenciées de n'importe quel type. On peut isoler les cellules souches durant le stade de la blastula chez les animaux, et durant celui du blastocyste, qui est son équivalent chez les humains. En culture, ces *cellules souches embryonnaires* (*cellules SE*) se reproduisent indéfiniment; de plus, selon les conditions de culture, on peut les faire se différencier en une grande variété de cellules spécialisées (**figure 20.20**), notamment des ovules et des spermatozoïdes.

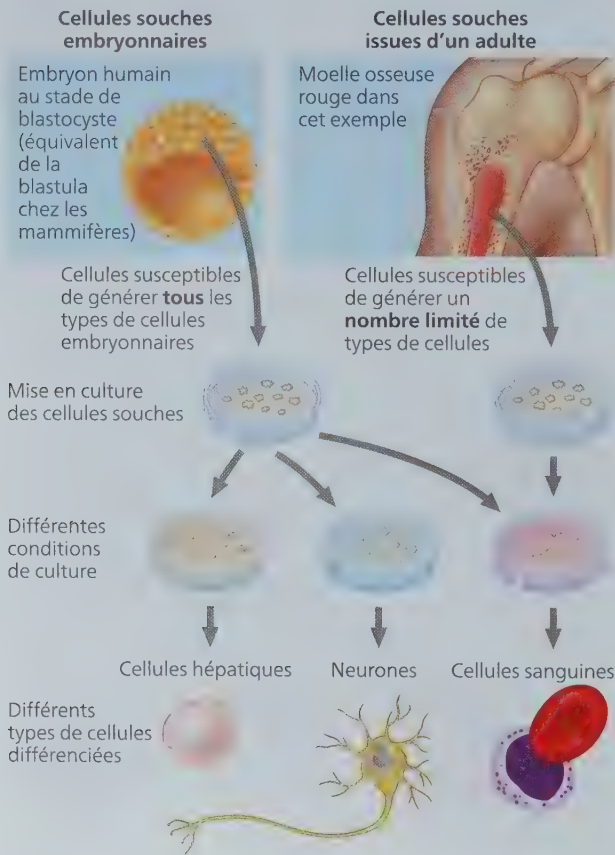
L'organisme adulte contient plusieurs variétés de cellules souches qui remplacent au besoin les cellules spécialisées autres que celles de la lignée germinale. Contrairement aux cellules SE, les *cellules souches adultes* sont incapables de donner naissance à tous les types cellulaires dans les organismes, bien qu'elles puissent en générer plusieurs. Par exemple, un des types de cellules souches de la moelle osseuse rouge peut produire tous les

différents types de globules sanguins (voir la figure 20.20), alors qu'un autre peut se différencier en os, en cartilage, en tissu adipeux, en muscle et en endothélium (paroi des vaisseaux sanguins). Une autre découverte qui a récemment surpris le monde scientifique concerne l'existence, dans l'encéphale adulte, de cellules souches continuant de produire certains types de neurones. De plus, des chercheurs ont fait état dernièrement de la découverte de cellules souches dans la peau, les cheveux, les yeux et la pulpe dentaire. Bien que les cellules souches se trouvent en très petit nombre chez les animaux adultes, les scientifiques apprennent à les reconnaître, à les isoler à partir de divers tissus et, dans certains cas, à les mettre en culture. Quand les cellules souches provenant d'animaux adultes sont placées dans des conditions de culture adéquates (par exemple, l'ajout de facteurs de croissance précis), elles peuvent être amenées à se différencier en plusieurs types définis de cellules spécialisées, bien qu'aucune ne soit aussi polyvalente que les cellules SE.

En plus de constituer une extraordinaire source de données sur la différenciation, la recherche sur les cellules souches embryonnaires ou les cellules souches adultes a un énorme potentiel dans le domaine médical. L'objectif majeur est d'obtenir des cellules dans le but de soigner des organes endommagés ou malades. Parmi les applications possibles, on peut penser aux cellules pancréatiques productrices d'insuline pour les diabétiques de type 1 ou à certains types de neurones pour les patients souffrant de la maladie de Parkinson ou de la chorée de Huntington. On utilise depuis longtemps les cellules souches adultes issues de la moelle osseuse comme source de cellules du système immunitaire chez les patients dont le propre système immunitaire n'est pas fonctionnel à cause d'anomalies génétiques ou d'une radiothérapie contre le cancer.

Le potentiel de développement des cellules souches adultes est limité à certains tissus. Pour la plupart des applications médicales, les cellules souches embryonnaires sont plus prometteuses que les cellules souches adultes parce qu'elles sont **pluripotentes**, c'est-à-dire capables de se différencier en de nombreux types de cellules. En 2013, un groupe de recherche a rapporté qu'il avait établi des lignées de cellules SE à partir de blastocystes humains. Pour y arriver, les chercheurs ont transféré le noyau d'une cellule différenciée dans un ovule énucléé. Auparavant, les cellules SE provenaient uniquement d'embryons donnés par des patientes suivant des traitements contre la stérilité ou de cultures cellulaires continues établies au départ avec des cellules isolées d'embryons donnés, ce qui soulevait des questions éthiques et politiques. Même si les scientifiques continuent de perfectionner les techniques pour le clonage de jeunes embryons humains, il s'agit sans aucun doute d'une nouvelle source potentielle de cellules SE qui pourrait s'avérer moins controversée. De plus, avec un noyau donneur provenant d'un individu atteint d'une maladie particulière, les chercheurs devraient pouvoir produire des cellules SE qui sont adaptées au patient et qui ne seraient pas rejetées par son système immunitaire lors d'utilisations thérapeutiques. Lorsque le but principal du clonage est de produire des cellules SE pour traiter des maladies, le processus porte le nom de *clonage thérapeutique*. Bien que la plupart des gens croient que le clonage reproductif d'humains est contraire à l'éthique, les opinions sont plus nuancées au sujet de la moralité du clonage thérapeutique.

▼ **Figure 20.20** L'utilisation des cellules souches. Les cellules souches animales qui peuvent être isolées à partir de jeunes embryons ou de tissus provenant d'un adulte, puis mises en culture, sont des cellules relativement non différenciées, qui se reproduisent naturellement. Les cellules souches embryonnaires sont plus faciles à mettre en culture que les cellules souches adultes et peuvent théoriquement donner tous les types de cellules d'un organisme. On ne comprend pas encore très bien quels assortiments de cellules peuvent donner les cellules souches adultes.



Les cellules souches pluripotentes induites (SPi)

Faire progresser le débat semble maintenant moins impératif puisque les chercheurs ont réussi à reprogrammer des cellules complètement différenciées pour qu'elles se comportent comme des cellules SE. La réalisation de cette percée, qui s'est heurtée à d'énormes obstacles, a été annoncée en 2007, d'abord par des laboratoires qui utilisaient des cellules de peau de souris, puis par d'autres groupes qui travaillaient sur des cellules de peau humaine et d'autres organes ou tissus. Dans tous les cas, les chercheurs ont transformé les cellules différenciées en un type particulier de cellules SE en utilisant des rétrovirus pour introduire des copies clonées supplémentaires de quatre gènes maîtres régulateurs de «cellules souches». Les cellules «déprogrammées» sont appelées *cellules souches pluripotentes induites (SPi)* parce qu'on a rétabli leur pluripotence à l'aide d'une technique de laboratoire plutôt simple qui permet de les ramener à un état indifférencié. La **figure 20.21** décrit les expériences qui ont transformé pour la première fois des cellules indifférenciées en cellules SPi. En 2012, Shinya Yamanaka a reçu le prix Nobel de médecine pour cette réalisation, un honneur qu'il a partagé avec John Gurdon, dont les travaux sont présentés à la figure 20.16.

À de nombreux égards, les cellules SPi peuvent accomplir la plupart des fonctions des cellules SE. Toutefois, on relève quelques différences dans l'expression génétique et d'autres fonctions, dont la division cellulaire. Au moins jusqu'à ce que ces différences soient complètement comprises, l'étude des cellules SE continuera de contribuer largement au développement des thérapies par les cellules souches. (En fait, les cellules SE seront probablement toujours d'un grand intérêt pour la recherche fondamentale également.) Entre-temps, les expérimentations se poursuivent avec les cellules SPi déjà produites.

On peut utiliser les cellules SPi humaines principalement de deux façons. Premièrement, il est possible de reprogrammer en cellules SPi les cellules provenant de personnes malades ; de telles cellules servent de modèles pour étudier la maladie et mettre au point de futurs traitements. On a déjà créé des lignées de cellules SPi humaines à partir d'individus atteints de diabète de type 1, de la maladie de Parkinson, de la maladie de Huntington, du syndrome de Down et de plusieurs autres maladies. Deuxièmement, dans le domaine de la médecine régénérative, on envisage de reprogrammer les propres cellules du patient en cellules SPi, puis de les utiliser pour remplacer des tissus non fonctionnels. Les cellules productrices d'insuline du pancréas en sont un bon exemple. En 2014, deux groupes de recherche ont décrit des méthodes efficaces pour cultiver des cellules productrices d'insuline à partir de cellules SPi et SE. Avant de pouvoir utiliser ces cellules chez les patients, les chercheurs devront toutefois trouver le moyen de s'assurer qu'elles ne soient pas détruites par le système immunitaire (principale cause du diabète de type 1, qui se caractérise par un dysfonctionnement du système immunitaire).

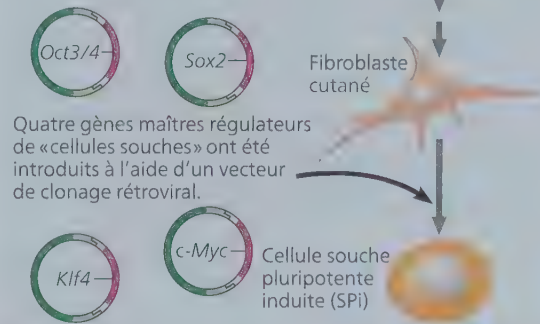
Autre découverte surprenante, les chercheurs ont pu cibler les gènes capables de reprogrammer directement une cellule différenciée en un autre type de cellule différenciée sans qu'elle passe par un état pluripotent. Le premier exemple documenté est la transformation de cellules pancréatiques d'un type à un autre. Il n'est toutefois pas nécessaire que les deux types de cellules soient étroitement apparentés. En effet, un autre groupe de recherche a réussi à reprogrammer directement un fibroblaste

DÉMARCHE SCIENTIFIQUE INVESTIGATION

Une cellule humaine complètement différenciée peut-elle être «déprogrammée» pour devenir une cellule souche pluripotente ?

■ **HYPOTHÈSE** ■ S'il est possible de renverser la différenciation cellulaire, on devrait pouvoir transformer des cellules différenciées en cellules souches pluripotentes en activant les gènes appropriés.

■ **EXPÉRIENCE** ■ Shinya Yamanaka et ses collègues de l'Université de Kyoto, au Japon, ont utilisé un vecteur rétroviral pour introduire quatre gènes dans des fibroblastes cutanés humains complètement différenciés. Ils ont ensuite mis en culture les cellules dans un milieu favorisant la croissance des cellules souches.



■ **RÉSULTATS** ■ Deux semaines plus tard, les cellules avaient pris l'aspect de cellules souches et se divisaient activement. Les profils d'expression et de méthylation géniques ainsi que d'autres caractéristiques correspondaient également à ceux des cellules souches embryonnaires. Les cellules SPi pouvaient se différencier en cellules cardiaques ainsi qu'en d'autres types de cellules.

■ **CONCLUSION** ■ Les quatre gènes ont transformé des cellules cutanées différenciées en cellules souches pluripotentes dont les caractéristiques étaient comparables à celles des cellules souches embryonnaires.

Source des données: K. Takahashi et coll., Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, *Cell* 131: 861-872 (2007).

ET SI ? ► On pourrait envisager de reprogrammer les cellules cutanées des patients atteints de maladies comme une cardiopathie ou la maladie d'Alzheimer afin de les transformer en cellules SPi. En effet, avec la mise au point de techniques permettant de transformer les cellules SPi en cellules cardiaques ou nerveuses, il deviendra possible d'utiliser les cellules SPi des patients pour traiter leur maladie. Lorsque les organes d'un donneur sont greffés, le système immunitaire du receveur peut rejeter la greffe. Cette réaction de l'organisme est extrêmement dangereuse pour le patient. Selon vous, un tel risque existe-t-il avec l'utilisation des cellules SPi ? Justifiez votre réponse. Comme il s'agit de cellules indifférenciées se divisant activement, quels sont les risques qui pourraient être associés à cette intervention ?

cutané en cellule nerveuse. D'intenses recherches sont en cours afin de concevoir des techniques permettant de forcer les cellules SPI, ou même les cellules complètement différenciées, à se transformer en divers types de cellules spécifiques au bénéfice de la médecine régénérative. Ces recherches ont déjà connu certains succès. Les cellules SPI créées de cette façon fournissent au bout d'un certain temps des cellules de « remplacement » sur mesure pour des patients sans qu'il soit nécessaire d'utiliser des ovules ou des embryons humains, éladant ainsi la plupart des objections d'ordre éthique.

RETOUR SUR LE CONCEPT 20.3

1. En vous appuyant sur les connaissances actuelles, comment expliqueriez-vous la différence dans le pourcentage de têtards obtenus à partir des deux sortes de noyaux donneurs de la figure 20.16 ?
2. Quelques entreprises de la Chine et de la Corée du Sud offrent un service de clonage de chiens. À cette fin, ils utilisent les cellules des chiens de leurs clients pour obtenir le noyau nécessaire à l'intervention, telle qu'elle est décrite à la figure 20.17. Les clients de ces entreprises doivent-ils s'attendre à obtenir un clone identique à l'animal d'origine ? Justifiez votre réponse. Quelles questions éthiques un tel service soulève-t-il ?
3. **FAITES DES LIENS** ► D'après ce que vous savez de la différenciation musculaire (voir la figure 18.18) et le génie génétique, quelle expérience réaliseriez-vous d'abord si vous souhaitiez transformer directement une cellule souche embryonnaire ou une cellule SPI en cellule musculaire ?

Voir les réponses proposées à l'appendice A.

CONCEPT 20.4

Les applications de la biotechnologie influent sur nos vies de diverses façons

Il se passe rarement une journée sans qu'il soit question de biotechnologie dans l'actualité, en particulier de percées prometteuses dans le domaine de la médecine. Mais il ne s'agit que d'un exemple parmi les nombreux domaines qui profitent des contributions apportées par les techniques d'analyse de l'ADN et le génie génétique.

Les applications en médecine

À ce jour, l'identification de gènes humains dont les mutations sont à l'origine d'anomalies génétiques est une des applications importantes de la biotechnologie. En effet, de telles recherches pourraient mener à la mise au point de nouveaux modes de diagnostic, de traitements originaux, voire de nouvelles méthodes de prévention. La biotechnologie contribue également à améliorer notre connaissance des maladies « non génétiques », telles que l'arthrite ou le sida, puisque les gènes influent sur la susceptibilité d'un individu à contracter ces maladies. De plus, toutes sortes de maladies entraînent des modifications de l'expression génétique dans les cellules affectées et,

souvent, perturbent le fonctionnement du système immunitaire des personnes malades. Les chercheurs identifient les gènes activés ou inactivés par une maladie donnée ; pour ce faire, ils peuvent recourir à l'ARN-seq et aux tests sur micro-réseaux à ADN ou se tourner vers d'autres techniques permettant de comparer l'expression génétique dans des tissus sains et malades. Ces gènes et leurs produits sont des cibles potentielles pour la prévention ou le traitement.

Le diagnostic et le traitement des maladies

La biotechnologie et, notamment, la recherche d'agents pathogènes à l'aide de la PCR et de sondes nucléiques ont ouvert de nouvelles perspectives dans le domaine du diagnostic des maladies infectieuses. Par exemple, comme la séquence du génome de l'ARN du VIH est connue, la RT-PCR permet d'amplifier et donc de déceler cet ARN dans des échantillons de sang ou de tissu (voir la figure 20.11). La technique de RT-PCR est souvent la meilleure façon de détecter un agent infectieux très discret.

Les spécialistes de la médecine peuvent aujourd'hui diagnostiquer des centaines d'anomalies génétiques chez l'humain grâce à la PCR et aux amorces qui ciblent les gènes associés à de telles anomalies. Le produit de l'ADN amplifié est alors séquencé pour révéler la présence ou l'absence de mutations responsables de la maladie. Parmi les gènes de maladies humaines déjà identifiés, on trouve ceux de l'anémie à hématies falciformes, de l'hémophilie, de la mucoviscidose (fibrose kystique), de la chorée de Huntington et de la myopathie de Duchenne. Il est possible de savoir quelles personnes seront atteintes de telles maladies avant l'apparition des symptômes, et ce, même avant leur naissance (voir la figure 14.19). La PCR sert également à repérer des porteurs asymptomatiques d'allèles récessifs risquant d'avoir des effets nocifs.

Comme vous l'avez appris précédemment, les études d'association sur l'ensemble du génome ont permis de déceler les polymorphismes mononucléotidiques (SNP) qui sont liés aux allèles responsables de maladies (voir la figure 20.15). Il est possible d'effectuer une PCR ou le séquençage de l'ADN à la recherche de SNP liés à l'allèle anormal. De tels SNP indiquent un risque accru de maladies comme les cardiopathies, la maladie d'Alzheimer et certains types de cancers. Les firmes qui proposent des tests génétiques pour les facteurs de risque de ce genre recherchent la présence de SNP déjà identifiés comme étant liés à une pathologie. Il peut être utile pour un individu de connaître les risques pour sa santé, mais il faut comprendre que de tels tests génétiques ne reflètent que des corrélations et ne permettent pas de faire des prédictions.

Les techniques décrites dans le présent chapitre ont également entraîné des améliorations dans le traitement des maladies. En entreprenant l'analyse de l'expression de nombreux gènes chez des femmes souffrant du cancer du sein, les chercheurs comprennent mieux les différents sous-types de cancers du sein (voir la figure 18.27). En connaissant les niveaux d'expression de certains gènes, il est possible de déterminer la probabilité d'une récurrence et d'instaurer le traitement approprié. Étant donné que certaines femmes à faible risque ont un taux de survie de 96 % sur une période de 10 ans sans traitement, l'analyse de l'expression génétique permet aux médecins et aux patientes de compter sur des informations valables quand vient le moment d'examiner les choix de traitements.

Beaucoup de personnes pensent que, dans le futur, une «médecine personnalisée» les renseignera sur leur profil génétique et leur permettra de connaître les maladies dont ils pourraient souffrir et de choisir les traitements appropriés. Comme nous le verrons plus loin dans le présent chapitre, le *profil génétique* se limite actuellement à l'identification d'un ensemble de marqueurs génétiques comme les SNP. Ultimement, on sera toutefois en mesure d'établir la séquence complète de l'ADN de chaque individu lorsque le séquençage sera moins coûteux. Notre capacité à séquencer le génome humain rapidement, et à moindres frais, évolue plus rapidement que la mise au point de traitements appropriés contre les maladies identifiées par analyse génétique. Malgré tout, l'identification des gènes responsables de ces maladies offre d'excellentes cibles pour les interventions thérapeutiques.

La thérapie génique humaine et l'édition de gènes

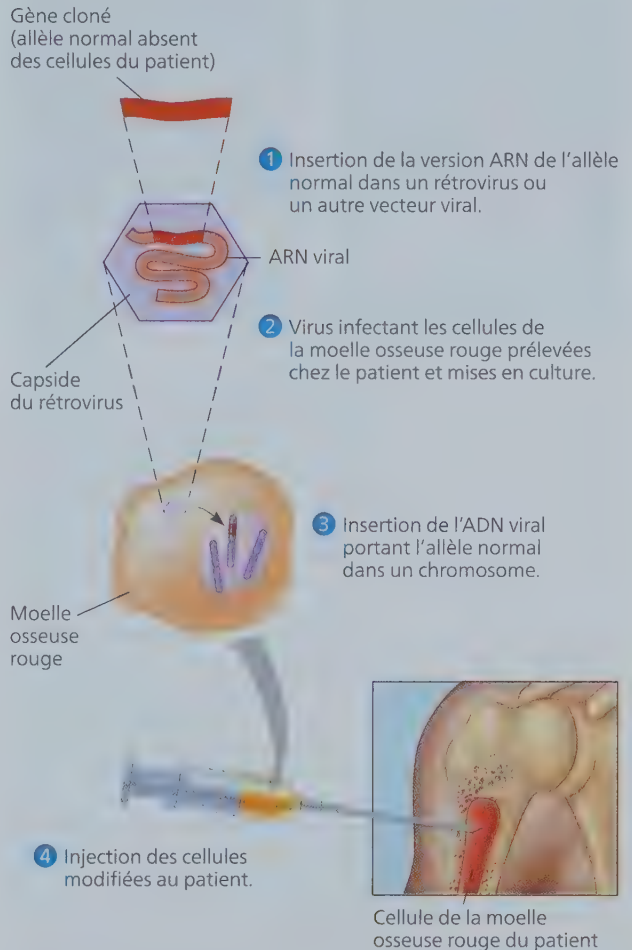
La **thérapie génique** consiste à traiter une personne malade en introduisant des gènes dans ses cellules. Cette approche semble très prometteuse dans le cas de maladies, en fait peu nombreuses, causées par un seul gène défectueux. Elle a pour objectif d'insérer un allèle normal dans les cellules somatiques des tissus atteints.

Pour que la thérapie génique des cellules somatiques soit permanente, les cellules qui possèdent l'allèle normal doivent se multiplier pendant toute la vie du patient. C'est le cas des cellules de la moelle osseuse rouge, parmi lesquelles se trouvent les cellules souches donnant naissance à l'ensemble des cellules sanguines et à celles du système immunitaire. Ce sont donc des cibles de choix à cet égard. La **figure 20.22** décrit une procédure possible dans le cas d'une personne dont les cellules de la moelle osseuse rouge sont incapables de produire une enzyme vitale par suite de la présence d'un gène défectueux. Le traitement consiste à prélever quelques cellules de moelle osseuse rouge, à y insérer l'allèle normal au moyen d'un vecteur viral puis à injecter dans l'organisme les cellules modifiées. Le déficit immunitaire combiné sévère (DICS) est causé par cette sorte de défaut d'origine génétique. Si le traitement réussit, les cellules de la moelle osseuse rouge se mettent à produire la protéine manquante, et le patient pourrait être guéri.

La technique illustrée à la figure 20.22 a été utilisée au cours d'une thérapie génique expérimentale du DICS. Dans une étude réalisée en France en 2000, 10 jeunes enfants atteints de DICS ont été traités selon cette procédure. Après deux ans, neuf d'entre eux présentaient une amélioration importante et définitive de leur état; c'est le premier succès incontestable de la thérapie génique. Cependant, trois des patients ont par la suite souffert de leucémie (cancer des cellules sanguines) et l'un d'eux est décédé. Les chercheurs en sont venus à la conclusion que le vecteur a vraisemblablement été inséré près d'un gène intervenant dans la prolifération des cellules sanguines. En utilisant un vecteur viral ne provenant pas d'un rétrovirus, les chercheurs sont parvenus à traiter avec un certain succès au moins trois autres maladies génétiques à l'aide de la thérapie génique: un type de cécité progressive (voir le concept 50.3), une maladie dégénérative du système nerveux et un trouble sanguin dans lequel intervient le gène de la β -globine.

La thérapie génique soulève de nombreuses questions d'ordre technique. Par exemple, comment peut-on ajuster l'activité du

▼ Figure 20.22 Une thérapie génique utilisant un vecteur rétroviral. Un rétrovirus rendu inoffensif sert de vecteur dans cette procédure qui repose sur le fait que le rétrovirus produit un transcrite d'ADN à partir de son génome d'ARN et qu'il l'insère dans l'ADN chromosomique de la cellule hôte (voir la figure 19.9). Si le gène étranger porté par le vecteur rétroviral est exprimé, la cellule et ses descendantes sécréteront le produit correspondant. Les cellules qui se reproduisent pendant toute la vie de la personne, comme celles de la moelle osseuse rouge, sont des cibles idéales pour ce type de traitement.



gène transféré pour que les cellules synthétisent le produit correspondant en quantité adéquate, au bon moment et au bon endroit? Comment peut-on être sûr que l'insertion du gène n'entrave pas d'autres fonctions cellulaires essentielles? De nouvelles connaissances sur les éléments de contrôle et les interactions entre les gènes permettront peut-être aux chercheurs de répondre à ces questions.

L'édition de gènes est une approche plus directe qui évite les complications associées à l'utilisation d'un vecteur viral dans le cadre d'une thérapie génique, surtout depuis la découverte du système CRISPR-Cas9 décrit précédemment. Cette approche consiste à corriger une mutation en éditant le gène défectueux. Comme l'illustre la figure 20.14, le système CRISPR-Cas9 peut effectuer une telle correction.

En 2014, un groupe de chercheurs a corrigé une anomalie génétique chez une souris à l'aide d'une technologie fondée sur le système CRISPR-Cas9. Pour ce faire, les chercheurs ont modifié génétiquement une souris de laboratoire pour qu'elle présente une mutation dans le gène encodant une enzyme hépatique métabolisant la tyrosine, un acide aminé. Ils ont ainsi imité la tyrosinémie, un trouble génétique fatal chez l'être humain. Une molécule d'ARN guide complémentaire à la région du gène présentant la mutation a été introduite dans la souris conjointement avec la protéine Cas9 et, à titre de matrice, un segment d'ADN de la même région du gène normal. Une analyse ultérieure a démontré que le gène anormal avait été corrigé dans un assez grand nombre de cellules hépatiques, ce qui a permis la production d'une quantité suffisante d'enzymes fonctionnelles pour atténuer les symptômes de la maladie. Bien qu'il reste certains obstacles à surmonter avant de pouvoir utiliser cette approche dans des études cliniques chez l'être humain, la technologie CRISPR suscite un vif intérêt, tant chez les chercheurs que chez les médecins.

En plus des défis techniques qu'elles posent, la thérapie génique et l'édition de gènes soulèvent également des questions d'ordre éthique. Certains opposants estiment qu'il est immoral et même contraire à l'éthique d'altérer des gènes humains de quelque façon que ce soit. D'autres ne voient aucune différence fondamentale entre la transplantation de gènes dans des cellules somatiques et la transplantation d'organes. Les scientifiques iront-ils jusqu'à tenter de modifier des cellules de la lignée reproductrice dans l'espoir de corriger une anomalie dans les générations à venir ? Dans les faits, on pratique couramment ce genre d'expériences de génie génétique sur des souris de laboratoire et les conditions permettant de modifier génétiquement les embryons humains ont été discutées et définies.

La découverte du système CRISPR-Cas9 a suscité un vif débat entourant l'éthique de l'édition des gènes, et plus particulièrement les applications potentielles ou réelles de ce système. En mars 2015, des scientifiques réputés qui travaillaient sur le système CRISPR-Cas9 ont publié un article s'adressant à la communauté des chercheurs et dans lequel ils déconseillaient fortement d'entreprendre des travaux expérimentaux réalisés sur des ovules ou des embryons humains. Un mois plus tard, des scientifiques chinois rapportaient toutefois avoir utilisé le système CRISPR-Cas9 pour éditer un gène dans des embryons humains. (Ils ont utilisé des ovules fécondés non viables – des zygotes qui ne pouvaient se développer complètement –, mais capables de former des blastocystes.) Les chercheurs tentaient alors d'éditer le gène de la β -thalassémie, dont les mutations causent une maladie sanguine du même nom. Ils ont injecté des cellules modifiées au moyen de la technologie CRISPR-Cas9 dans 86 zygotes ; le gène était édité correctement dans seulement 4 de ces zygotes. Chez plusieurs autres embryons, ils ont observé des effets sur des gènes différents de celui de la β -thalassémie, et ce, dans une proportion nettement plus élevée que celle obtenue chez les embryons murins ou dans les lignées de cellules humaines. Cette étude met en évidence les problèmes associés à cette technique, du moins chez les embryons humains, en plus d'alimenter les inquiétudes entourant la question éthique. Dans quelles circonstances, s'il en est, est-il souhaitable de modifier le génome de lignées reproductrices humaines ? Cela mènera-t-il inévitablement à l'eugénisme, une doctrine qui vise délibérément à influencer la constitution génétique des populations humaines ?

Bien qu'il ne soit peut-être pas nécessaire de résoudre ces questions dans l'immédiat, il est essentiel de les prendre en considération parce qu'elles finiront vraisemblablement par devenir primordiales dans un avenir rapproché.

Les produits pharmaceutiques

L'industrie pharmaceutique tire d'importants bénéfices des progrès de la biotechnologie et de la recherche en génétique ; elle s'en sert pour mettre au point des médicaments utiles pour traiter les maladies. Les produits pharmaceutiques sont synthétisés à l'aide de méthodes issues de la chimie organique ou de la biotechnologie, selon la nature du produit.

La synthèse de petites molécules utilisées comme médicaments La détermination de la séquence et de la structure des protéines essentielles à la survie des cellules tumorales a débouché sur l'identification de petites molécules permettant de combattre certains cancers en bloquant la fonction de ces protéines. Un de ces médicaments, l'imatinib, est une petite molécule qui inhibe un récepteur spécifique d'une tyrosine kinase (voir la figure 11.8). La surexpression de cette kinase causée par une translocation chromosomique est déterminante dans la manifestation de la leucémie myéloïde chronique (LMC ; voir la figure 15.16). Les patients traités avec l'imatinib durant les premiers stades de la LMC ont présenté une rémission presque complète et durable du cancer. Les médicaments qui agissent de cette façon ont également été utilisés avec succès pour traiter quelques types de cancers du poumon et du sein. Cette stratégie n'est malheureusement valable que pour les cancers dont la base moléculaire est assez bien comprise.

Par ailleurs, dans le cas de tumeurs traitées à l'aide de médicaments, il n'est pas rare de voir apparaître des cellules présentant une résistance au traitement. Dans une étude, on a séquencé le génome entier de cellules tumorales avant et après l'apparition d'une résistance aux médicaments. La comparaison des séquences géniques a révélé la présence de modifications génétiques permettant aux cellules tumorales de contourner la protéine inhibée par le médicament. Aussi, force est de constater que les cellules tumorales illustrent quelques principes de l'évolution : certaines cellules tumorales présentent une mutation aléatoire qui leur permet de survivre en présence d'un médicament particulier. En conséquence de la sélection naturelle, il est donc possible pour ces cellules de survivre et de se répliquer en présence du médicament.

La production de protéines dans des cultures cellulaires

Les produits pharmaceutiques à base de protéines sont couramment synthétisés à grande échelle à l'aide de cultures cellulaires. Dans ce chapitre, nous avons vu que le clonage d'ADN et les systèmes d'expression génétique permettent la production à grande échelle d'une protéine sélectionnée qui ne serait présente naturellement qu'en très petite quantité. Il est même possible de modifier les cellules hôtes utilisées dans ces systèmes d'expression de manière à ce qu'elles sécrètent la protéine en question dans le milieu au fur et à mesure de sa production intracellulaire. Cela simplifie l'étape de la purification par les méthodes biochimiques traditionnelles.

L'insuline et l'hormone de croissance humaine (GH) ont été parmi les premières substances pharmaceutiques produites par cette méthode. L'insuline ainsi synthétisée pourra servir à traiter les 200 millions de diabétiques dans le monde ; diverses formes

d'insuline, différant par leur rapidité ou leur durée d'action, sont maintenant offertes ou en voie de l'être. Quant à la synthèse de l'hormone de croissance humaine, c'est une bénédiction pour les enfants atteints à leur naissance d'une forme de nanisme causée par une production insuffisante de cette hormone ainsi que pour les personnes atteintes du sida qui doivent prendre du poids. L'activateur tissulaire du plasminogène (tPA, ou *tissue plasminogen activator*) est une autre substance pharmaceutique importante issue du génie génétique. Cette substance remplace la streptokinase, une enzyme bactérienne, qui pouvait causer des réactions immunitaires dangereuses et entraîner d'autres problèmes. S'il est administré très peu de temps après une première crise cardiaque, le tPA permet de dissoudre les caillots sanguins et réduit le risque d'une rechute.

La production de protéines par les animaux à vocation pharmaceutique Dans certains cas, au lieu d'utiliser des systèmes cellulaires pour produire de grandes quantités de produits protéiques, les spécialistes en sciences pharmaceutiques ont recours aux animaux. Ils peuvent insérer un gène (ou une autre molécule d'ADN) provenant d'un animal dans le génome d'un autre, souvent d'une espèce différente; celui-ci devient alors un animal **transgénique**. Pour créer de tels animaux, on prélève les ovules d'une femelle de l'espèce réceptrice que l'on féconde *in vitro*. On a préalablement cloné le gène recherché à partir d'un autre organisme. On injecte ensuite l'ADN cloné directement dans le noyau des ovules fécondés (zygotes). Certaines cellules insèrent l'ADN étranger, le *transgène*, dans leur génome et sont en mesure de l'exprimer. Une fois que les zygotes modifiés sont devenus des embryons, on les implante chirurgicalement dans une mère porteuse. Si l'embryon se développe comme prévu, il devient un animal transgénique qui exprime son nouveau gène «étranger».

Si le gène inséré code pour une protéine que l'on cherche à produire en grandes quantités, ces animaux transgéniques peuvent agir comme de véritables «usines» pharmaceutiques. Par exemple, on a ajouté au génome d'une chèvre le transgène d'une protéine du sang humain, l'antithrombine, qui prévient la formation de caillots, de sorte que l'animal sécrète la substance en question dans son lait (**figure 20.23**). La protéine est alors purifiée, selon un procédé généralement plus facile à réaliser que si elle provenait d'une culture cellulaire. On doit tester soigneusement les protéines pour s'assurer que les patients ne souffriront pas de réactions allergiques ou ne subiront pas d'effets néfastes par suite de l'administration de ces substances ou de la présence de contaminants provenant des animaux d'élevage.

Les preuves médico-légales et les profils génétiques

Lorsqu'un crime violent est commis, des liquides de l'organisme ou de petits échantillons de tissus humains peuvent rester sur les lieux du délit, sur les vêtements de la victime ou sur n'importe quel autre objet lui appartenant ou appartenant à son assaillant. Quand les quantités de sang, de tissu ou de sperme sont suffisantes, les laboratoires d'enquête peuvent déterminer le groupe sanguin ou le type tissulaire de l'individu concerné. Ils se servent d'anticorps pour détecter des protéines spécifiques qui peuvent être présentes à la surface des cellules. Cependant, ces tests nécessitent une quantité relativement importante d'échantillons frais. De plus, comme de nombreux individus

▼ **Figure 20.23** Des chèvres servant d'animaux à vocation pharmaceutique. Cette chèvre transgénique porte le gène d'une protéine du sang humain, l'antithrombine, qu'elle sécrète dans son lait. Les patients incapables de produire cette protéine sont atteints d'un trouble héréditaire qui se manifeste par la formation de caillots dans leurs vaisseaux sanguins. La protéine, qui est facilement purifiée à partir du lait de chèvre, est utilisée pour la prévention des caillots sanguins chez les patients pendant une intervention chirurgicale ou durant l'accouchement.



ont le même groupe sanguin ou le même type tissulaire, cette méthode permet seulement d'innocenter un suspect, pas de prouver sa culpabilité.

Les tests d'ADN, eux, permettent d'identifier un coupable avec beaucoup plus de certitude, parce que chaque personne possède une séquence d'ADN qui lui est propre (sauf dans le cas de vrais jumeaux). L'analyse des marqueurs génétiques qui varient dans la population permet de déterminer l'ensemble des marqueurs génétiques propres à un individu, c'est-à-dire son **profil génétique**. (Ce terme est préféré à celui d'«empreinte génétique» par les experts en criminalistique, qui veulent mettre l'accent sur l'héritabilité de ces marqueurs plutôt que sur le fait qu'ils produisent un motif sur gel, qui est, comme une empreinte digitale, visuellement reconnaissable.) Le FBI applique les techniques d'analyse de l'ADN en médecine légale depuis 1988. L'agence fédérale américaine a d'abord eu recours à l'électrophorèse sur gel et à l'hybridation d'acides nucléiques pour détecter des ressemblances et des différences entre des échantillons d'ADN. Cette méthode nécessitait des échantillons de sang ou de tissu beaucoup plus petits que les anciennes méthodes (seulement 1 000 cellules environ).

Aujourd'hui, les experts en criminalistique utilisent une méthode encore plus sensible qui tire avantage des variations de longueur des marqueurs génétiques nommées **répétitions courtes en tandem** ou **STR** (pour *short tandem repeats*). Ce sont des unités de séquences de deux à cinq nucléotides répétées en tandem dans des régions spécifiques du génome. Le nombre de répétitions présentes dans ces régions est très variable d'une personne à l'autre (polymorphe) et, même chez une seule personne, les deux allèles d'une STR peuvent différer l'un de l'autre. Par exemple, chez un individu donné, la séquence ACAT peut être répétée 30 fois à un locus du génome et 15 fois au même locus du chromosome homologue, alors que chez une autre personne le nombre de répétitions pourrait être de 18 à ce locus sur chaque chromosome homologue. (On peut exprimer ces deux génotypes par les deux nombres de répétitions: 30,15 et 18,18.) On se sert souvent de la PCR pour multiplier sélectivement certaines STR

en utilisant des ensembles d'amorces portant des marqueurs fluorescents de couleurs différentes. Il est alors possible de déterminer par électrophorèse la longueur de la région, et par conséquent le nombre de répétitions. L'étape de la PCR permet d'utiliser cette méthode même lorsque l'ADN est en mauvais état ou qu'on n'en possède que de petites quantités. Elle peut porter sur un échantillon de tissu ne contenant que 20 cellules.

En cas de meurtre, par exemple, elle permet de comparer de petits échantillons de sang, prélevés sur les lieux du crime, avec l'ADN du suspect et celui de la victime. L'expert en criminalistique effectue des tests sur quelques portions sélectionnées de l'ADN (généralement 13 marqueurs de STR). Même un ensemble aussi réduit de marqueurs suffit pour obtenir un profil génétique utile comme preuve médico-légale parce que la probabilité est infime que deux personnes (autres que de vrais jumeaux) aient exactement le même jeu de marqueurs de STR. The Innocence Project, un organisme sans but lucratif dont l'objectif est de faire invalider des condamnations injustifiées, utilise l'analyse des répétitions courtes en tandem des échantillons archivés des scènes de crimes pour rouvrir d'anciens dossiers. En 2016, plus de 340 personnes innocentes avaient déjà été libérées de prison à la suite d'un travail médico-légal et légal effectué par ce groupe (figure 20.24).

▼ **Figure 20.24** L'analyse des répétitions courtes en tandem (STR) en vue de libérer de prison un homme innocent.

(a) En 1984, Earl Washington a été déclaré coupable et condamné à mort pour le viol et le meurtre de Rebecca Williams survenu en 1982. En 1993, sa peine a été commuée en prison à vie en raison de nouvelles doutes concernant la preuve. En 2000, l'analyse des STR par des experts en criminalistique associés à The Innocence Project a démontré de façon irréfutable son innocence. Cette photo montre Washington peu de temps avant sa libération en 2001, après 17 ans de prison.



Nombre de répétition de trois marqueurs différents selon la source de l'échantillon d'ADN

Source de l'échantillon	Marqueur 1 des STR	Marqueur 2 des STR	Marqueur 3 des STR
Sperme sur la victime	17,19	13,16	12,12
Earl Washington	16,18	14,15	11,12
Kenneth Tinsley	17,19	13,16	12,12

(b) Dans l'analyse des STR, on a amplifié par PCR des marqueurs STR sélectionnés dans un échantillon d'ADN; les produits des PCR sont séparés par électrophorèse. La procédure permet de déterminer le nombre de répétitions présentes pour chaque locus de STR dans l'échantillon. Un individu a deux allèles par locus de STR, chacun contenant un certain nombre de répétitions. Ce tableau montre le nombre de répétitions pour trois marqueurs STR dans trois sources d'échantillons: le sperme trouvé sur la victime, Washington et un autre homme appelé Kenneth Tinsley, emprisonné après une condamnation sans rapport avec le meurtre de Rebecca Williams. Les résultats des STR et d'autres données (non illustrées) ont exonéré Washington et incriminé Tinsley.

L'emploi des profils génétiques peut également servir à d'autres buts. La comparaison de l'ADN d'une mère, de son enfant et du père putatif peut apporter une solution définitive à une affaire de paternité. Il arrive aussi parfois que la paternité revête un intérêt d'ordre historique: des profils génétiques ont permis de montrer de façon probante que le troisième président des États-Unis, Thomas Jefferson (1743-1826), ou l'un de ses proches parents était le père d'au moins un des enfants de son esclave Sally Hemings. Les profils génétiques peuvent également identifier les nombreuses victimes d'une catastrophe. Les plus gros travaux de ce genre ont eu lieu après la destruction du World Trade Center en 2001; plus de 10 000 échantillons de restes humains ont été comparés avec des échantillons d'ADN provenant d'objets personnels, comme des brosses à dents, fournis par les familles. En fin de compte, les experts en criminalistique ont réussi à identifier près de 3 000 victimes à l'aide de ces méthodes.*

À quel point le profil génétique est-il fiable? Plus le nombre de marqueurs examinés dans un échantillon d'ADN est grand, plus il est probable que le profil soit propre à un individu. Dans les affaires criminelles où on utilise l'analyse des STR avec 13 marqueurs, la probabilité que deux personnes aient des profils génétiques identiques se situe entre 1 sur 10 milliards et 1 sur plusieurs billions (millions de millions, soit 10^{12}). En guise de comparaison, la population mondiale compte entre 7 et 8 milliards d'individus. La probabilité exacte dépend de la fréquence de ces marqueurs dans la population en général. Il est essentiel de disposer de données sur la fréquence, selon les groupes ethniques qui composent une population, parce que les fréquences de ces marqueurs peuvent varier considérablement entre les groupes ethniques de même qu'entre un groupe ethnique particulier et la population dans son ensemble. La disponibilité croissante de ces données permet aux experts en criminalistique d'effectuer des calculs statistiques extrêmement précis. Par conséquent, malgré les problèmes pouvant résulter de l'insuffisance des données statistiques, de l'erreur humaine ou de témoignages faussés, les experts juristes et les scientifiques considèrent désormais que le profil génétique constitue une preuve concluante.

La dépollution de l'environnement

On exploite de plus en plus souvent les aptitudes diverses des microorganismes à transformer les substances chimiques dans des opérations de dépollution de l'environnement. Si les besoins nutritifs de tels microorganismes ne permettent pas de les utiliser directement, les scientifiques sont actuellement capables de transférer chez d'autres microorganismes les gènes de capacités métaboliques intéressantes qui les transformeront en outils de protection de l'environnement. Par exemple, de nombreuses bactéries peuvent extraire des métaux lourds de leur milieu (cuivre, plomb, nickel) et les transformer en des composés comme le sulfate de cuivre ou le sulfate de plomb, dont l'extraction est facile. Les microorganismes génétiquement modifiés pourraient jouer un rôle important dans le domaine minier (particulièrement dans le cas où les réserves de minerai sont épuisées) et dans le traitement des déchets miniers hautement toxiques. Les biotechnologues tentent de modifier des microorganismes de façon à leur permettre de dégrader les hydrocarbures chlorés et d'autres composés toxiques. Ces

microorganismes seraient employés dans les stations de traitement des eaux usées ou par les industries avant de déverser leurs effluents dans l'environnement.

Les applications en agriculture

Le génome des végétaux et des animaux les plus utilisés en agriculture fait également l'objet de recherches. Il y a des années que l'on se sert de la biotechnologie pour tenter d'améliorer la productivité agricole. La reproduction sélective des animaux d'élevage et des plantes cultivées a exploité les mutations et la recombinaison génétique d'origine naturelle pendant des milliers d'années.

Comme nous l'avons décrit plus tôt, grâce à la biotechnologie, les scientifiques ont produit des animaux transgéniques, ce qui accélère le processus de la reproduction sélective. La création d'animaux transgéniques poursuit souvent les mêmes objectifs que la sélection classique : elle vise, notamment, à produire un mouton donnant une laine de meilleure qualité, un porc dont la viande est plus maigre ou une vache qui atteindra l'âge adulte plus rapidement. Par exemple, les scientifiques peuvent isoler et cloner un gène qui améliore le développement musculaire (les muscles représentent la plus grande partie de la viande que nous consommons) dans une race de bovins et le transférer à d'autres bovins, voire à des moutons. Cependant, les problèmes de santé ne sont pas rares chez les animaux d'élevage qui portent des gènes provenant d'autres espèces et, par conséquent, la modification des gènes d'un animal à l'aide du système CRISPR-Cas9 sera vraisemblablement plus utile au cours des années à venir. Néanmoins, il importe de prendre en compte la santé et le bien-être des animaux au moment de les modifier génétiquement.

Les spécialistes en agriculture ont déjà introduit chez de nombreuses plantes des gènes conférant des caractères recherchés comme la maturation plus tardive, la résistance à la détérioration, à la maladie ou à la sécheresse, etc. Les modifications peuvent également ajouter de la valeur aux cultures destinées à l'alimentation en augmentant leur durée de conservation ou en améliorant leur saveur ou leur valeur nutritionnelle. Chez de nombreuses espèces végétales, une seule cellule de tissu mise en culture peut donner une plante adulte complète. Par conséquent, il est possible d'effectuer des manipulations génétiques sur une cellule somatique ordinaire pour obtenir un organisme doté de nouveaux caractères.

Le génie génétique remplace rapidement les programmes classiques de sélection des plantes, surtout dans les cas où un petit nombre de gènes détermine les caractères recherchés, comme la résistance aux ravageurs ou aux herbicides. Les cultures modifiées à l'aide d'un gène bactérien qui rend les plantes résistantes aux herbicides peuvent croître, alors que les mauvaises herbes sont détruites. On peut également modifier génétiquement certaines espèces cultivées afin de les rendre résistantes aux insectes destructeurs, ce qui permet du même coup de réduire l'emploi des insecticides chimiques. En Inde, l'insertion dans les génomes de plusieurs variétés de riz d'un gène de la résistance à la salinité issu d'une plante de la mangrove côtière a produit des plants de riz capables de croître dans de l'eau trois fois plus salée que l'eau de mer. Le centre de recherche qui a accompli cet exploit de génie génétique estime qu'un tiers de toutes les terres irriguées a une salinité élevée en raison d'une irrigation excessive et d'un usage intensif d'engrais chimiques,

ce qui menace sérieusement l'approvisionnement alimentaire. Par conséquent, les plantes cultivées résistantes à la salinité pourraient être d'un immense intérêt dans le monde entier.

Les questions sur la sécurité et l'éthique soulevées par les biotechnologies

À propos des dangers potentiels associés à la technologie de recombinaison de l'ADN, on s'est d'abord préoccupé du risque de création d'agents pathogènes dangereux. Par exemple, que se passerait-il si, dans une étude de recherche, les gènes de cellules cancéreuses étaient introduits dans des bactéries ou des virus ? Par mesure de précaution contre des microorganismes indésirables, les scientifiques ont adopté un ensemble de lignes directrices, devenues des règlements officiels dans plusieurs pays. Les mesures de sécurité comprennent notamment des procédures strictes de travail en laboratoire destinées à protéger les chercheurs contre l'infection par des microorganismes modifiés et aussi à empêcher que ceux-ci s'échappent accidentellement du laboratoire. De plus, les souches de microorganismes employées dans les expériences portant sur l'ADN recombiné sont modifiées génétiquement, de sorte qu'elles ne peuvent survivre hors du laboratoire. Enfin, on a interdit certains types d'expériences présentant un risque évident.

Aujourd'hui, le public s'inquiète surtout des risques liés non pas aux microorganismes recombinés, mais plutôt aux **organismes génétiquement modifiés (OGM)** dont on se sert à des fins alimentaires. Un OGM est un organisme transgénique auquel on a ajouté un ou plusieurs gènes par des moyens artificiels. Les gènes en question proviennent d'une autre espèce ou encore d'une autre variété de la même espèce. Certains saumons, par exemple, ont été génétiquement modifiés par l'ajout d'un gène de l'hormone de croissance plus actif. Cependant, la majorité des OGM qui assurent notre approvisionnement alimentaire ne sont pas des animaux, mais des plantes.

Les cultures génétiquement modifiées sont très répandues aux États-Unis, en Argentine et au Brésil ; ensemble, ces pays comptent pour plus de 80 % de la superficie mondiale consacrée à de telles cultures. Aux États-Unis, la majorité des cultures de maïs, de soja et de canola sont génétiquement modifiées et, en vertu d'une loi adoptée récemment, il est maintenant obligatoire de mentionner la présence d'OGM dans tout produit alimentaire. Cependant, les mêmes aliments font l'objet d'une controverse continue en Europe, où la révolution génétique a fait face à une forte opposition. Les inquiétudes de nombreux Européens portent sur la sécurité des aliments génétiquement modifiés et les conséquences environnementales possibles de la culture des plantes transgéniques. Bien qu'un petit nombre de cultures génétiquement modifiées aient été pratiquées en sol européen, l'Union européenne a défini en 2015 un cadre juridique exhaustif concernant les OGM. Aussi, chaque État membre peut notamment interdire la culture ou l'importation d'OGM, qui doivent être clairement étiquetés. En Europe, les OGM suscitent une grande méfiance, ce qui compromet leur avenir.

Ceux qui préconisent une approche prudente à l'égard des cultures génétiquement modifiées craignent que les plantes transgéniques puissent transmettre leurs nouveaux gènes à des espèces apparentées situées dans des zones voisines restées à l'état naturel. On sait que les graminées des pelouses ou des cultures, par exemple, échangent souvent des gènes avec leurs

parentes sauvages par l'intermédiaire du pollen. Si le pollen des plantes cultivées portant des gènes de résistance aux herbicides, aux maladies ou aux insectes ravageurs féconde des espèces sauvages, celles-ci pourraient devenir de « super-mauvaises herbes » très difficiles à éliminer. Quant aux risques pour la santé humaine que posent les aliments génétiquement modifiés, certaines personnes craignent que les protéines produites par les transgènes créent des réactions allergiques. Bien que certains faits indiquent que de telles allergies peuvent survenir, les partisans des cultures génétiquement modifiées affirment qu'il est possible de tester ces protéines à l'avance pour éviter de produire celles susceptibles de causer des réactions allergiques. (Pour de plus amples renseignements concernant la biotechnologie végétale et les cultures GM, voir le concept 38.3.)

Les gouvernements et les agences de réglementation du monde entier s'efforcent de favoriser l'emploi des biotechnologies dans l'agriculture, l'industrie et la médecine, tout en veillant à ce que les nouveaux produits et procédés ne posent aucun danger. Au Canada, la Direction générale de la protection de la santé (DGPS, Santé Canada), Agriculture Canada, l'Agence canadienne d'inspection des aliments et le Comité consultatif national sur la biotechnologie travaillent conjointement à l'établissement des principes directeurs et de la réglementation encadrant les nouvelles réalisations en biotechnologie. En France, le contrôle est exercé par la Commission du génie génétique et la Commission du génie biomoléculaire. Ces organismes subissent des pressions croissantes de la part de certains groupes de consommateurs. Ces mêmes organismes et le public doivent également examiner des questions éthiques en fonction des nouvelles biotechnologies.

Les progrès de la biotechnologie nous ont permis d'obtenir les séquences complètes des génomes humains et de ceux de nombreuses autres espèces, nous fournissant un vaste trésor d'informations sur les gènes. On peut se demander dans quelle mesure certains gènes diffèrent d'une espèce à l'autre, et comment les gènes, voire les génomes entiers, ont évolué. (Ces sujets sont abordés au chapitre 21.) En même temps, l'accélération du processus de séquençage des génomes d'individus et la réduction des coûts de cette opération nous forcent à aborder des questions

éthiques importantes. Qui devrait avoir un droit de regard sur les informations génétiques d'une autre personne? Comment cette information devrait-elle être utilisée? Devrait-on prendre en compte le génome d'un individu pour déterminer s'il peut obtenir un emploi ou contracter une assurance? Il est probable que les considérations éthiques ainsi que les inquiétudes suscitées par les dangers pour la santé et l'environnement ralentiront la mise en œuvre de certaines applications de la biotechnologie. En même temps, une réglementation trop contraignante risque de nuire à la recherche fondamentale et à ses retombées bénéfiques. Par ailleurs, le génie génétique, et plus particulièrement l'édition de gènes avec le système CRISPR-Cas9, nous permet de modifier substantiellement et rapidement des espèces qui évoluent depuis des millénaires. Un bon exemple serait l'usage potentiel du forçage génétique, qui éliminerait la capacité d'un moustique à porter une maladie ou qui éradiquerait certaines populations de moustiques. Malgré les effets bénéfiques potentiels sur la santé, du moins au départ, une telle approche pourrait aisément causer certains problèmes imprévus. Aussi, le pouvoir phénoménal de la biotechnologie nous impose d'agir avec humilité et prudence.

RETOUR SUR LE CONCEPT 20.4

1. Quel avantage présenterait l'emploi de cellules souches dans la thérapie génique?
2. Énumérez au moins trois caractéristiques qui ont été transmises à des plantes cultivées grâce à la biotechnologie.
3. **ET SI ?** ► Imaginez que vous êtes médecin et qu'un de vos patients présente des symptômes laissant croire qu'il est atteint d'une hépatite A. Toutefois, les analyses n'ont pas réussi à démontrer la présence de protéines virales dans le sang. Sachant que l'hépatite A est causée par un virus à ARN, quels tests de laboratoire pourriez-vous effectuer pour confirmer votre diagnostic? Quels sont les résultats qui appuieraient votre hypothèse?

Voir les réponses proposées à l'appendice A.

RÉVISION DU CHAPITRE 20



Consultez votre MANUEL NUMÉRIQUE, qui vous donne accès aux **animations**, aux **exercices** et à la plateforme d'**anatomie interactive**.

Résumé des concepts clés

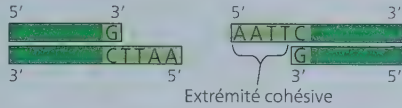
CONCEPT 20.1

Le séquençage et le clonage de l'ADN sont des procédés fort utiles au génie génétique et à la recherche en biologie (p. 456 à 463)

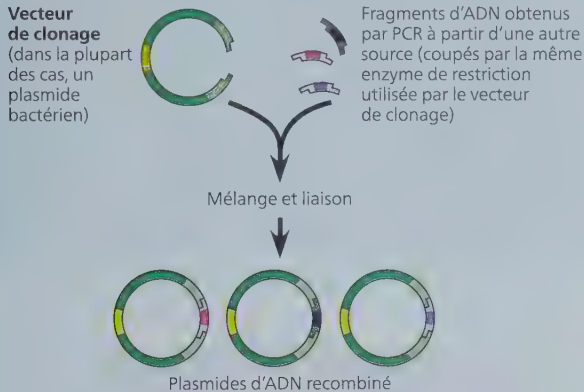
- L'**hybridation des acides nucléiques**, soit l'appariement des bases d'un brin d'acide nucléique et de celles d'une séquence complémentaire située sur un autre acide nucléique, est une technique dont l'usage est très répandu dans le domaine de la **biotechnologie**.

- On peut réaliser le **séquençage de l'ADN** en utilisant la méthode de terminaison de chaîne par un didésoxyribonucléotide dans des appareils de séquençage automatisé.
- Les techniques de nouvelle génération (rendement élevé) pour le séquençage de l'ADN reposent sur le séquençage par synthèse: on utilise une ADN polymérase pour synthétiser un segment d'ADN à partir d'une matrice monocaténaire, et l'ordre dans lequel les nucléotides s'ajoutent met en évidence la séquence de l'ADN. Avec les méthodes de séquençage de troisième génération, comme la technologie par les nanopores, de longues molécules d'ADN sont séquençées, une à la fois, à l'aide d'un procédé permettant de distinguer les différentes bases nucléotidiques pendant leur passage dans le pore d'une membrane.

- Le **clonage** des gènes (ou le clonage de l'ADN) produit plusieurs copies d'un gène (ou d'un segment d'ADN) qui peuvent ensuite être utilisées pour manipuler et analyser l'ADN et pour produire de nouveaux produits ou des microorganismes utiles dotés de caractères avantageux.
- En **génie génétique**, des **enzymes de restriction** bactériennes coupent les molécules d'ADN en de courtes séquences nucléotidiques spécifiques (**sites de restriction**). Elles créent ainsi un ensemble de fragments d'ADN bicaténaire pourvus d'**extrémités cohésives** monocaténares.



- Les bases des extrémités cohésives sur les fragments de restriction s'apparient facilement avec les segments monocaténares complémentaires situés sur les autres molécules d'ADN. L'ADN ligase, une enzyme, peut lier ces fragments en produisant des molécules d'**ADN recombiné**.
- L'**électrophorèse sur gel** permet de séparer les fragments de restriction d'ADN selon leur longueur.
- L'**amplification en chaîne par polymérase (PCR)** permet d'obtenir rapidement *in vitro* de nombreuses copies d'un certain segment cible d'ADN, parce qu'elle fait intervenir une ADN polymérase résistante à la chaleur et des amorces qui encadrent la séquence recherchée.
- Voici la procédure de clonage d'un gène eucaryote :



- Les plasmides recombinés sont réinsérés dans les cellules hôtes ; chacune d'entre elles se divise pour former un clone cellulaire.
- Plusieurs difficultés techniques empêchent l'expression de gènes eucaryotes clonés dans les cellules hôtes bactériennes. L'utilisation de cellules eucaryotes provenant de cultures comme cellules hôtes associées aux **vecteurs d'expression** appropriés permet de contourner ces problèmes.

? Décrivez comment le processus de clonage de gènes donne un clone cellulaire contenant un plasmide recombiné.

CONCEPT 20.2

Les biotechnologies permettent d'étudier l'expression et la fonction d'un gène (p. 463 à 469)

- Différentes techniques utilisent l'hybridation d'une **sonde nucléique** pour déceler la présence d'ARNm spécifiques.
- L'**hybridation *in situ*** et la **RT-PCR** permettent de déceler la présence d'un ARNm spécifique dans un tissu ou dans un échantillon d'ARN, respectivement.
- On utilise des microréseaux à ADN pour identifier des ensembles de gènes exprimés conjointement par un groupe de cellules. Toutefois, on a de plus en plus souvent recours au **séquençage de l'ARN** (ARN-seq) pour séquencer l'**ADNc** correspondant à l'ARN des cellules.

- Quand la fonction d'un gène est inconnue, son inactivation expérimentale et l'observation des effets phénotypiques qui en résultent fournissent des indices sur son rôle. Le **système CRISPR-Cas9** permet aux chercheurs d'éditer, de manière précise et comme ils le souhaitent, les gènes de cellules vivantes. Les nouveaux allèles peuvent être modifiés de sorte qu'ils soient transmis, de façon biaisée, dans une population donnée (forçage génétique). Chez l'humain, les **études d'association sur l'ensemble du génome** ciblent et utilisent les **polymorphismes mononucléotidiques (SNP)** comme marqueurs génétiques pour les allèles qui sont associés à des maladies particulières.

? Quels renseignements utiles obtient-on en décelant l'expression de gènes spécifiques ?

CONCEPT 20.3

Les organismes clonés et les cellules souches servent à la recherche et à d'autres applications (p. 469 à 474)

- Les premières tentatives de clonage d'un organisme visaient à établir l'équivalence génomique de l'ensemble des cellules d'un organisme.
- Les cellules différenciées de plantes parvenues à maturité sont souvent **totipotentes**, c'est-à-dire qu'elles peuvent donner naissance à tous les tissus d'un nouvel individu complet.
- Le noyau d'une cellule animale différenciée peut parfois donner naissance à un nouvel individu s'il est transplanté dans un ovule enucléé.
- Certaines **cellules souches** embryonnaires (SE) provenant d'embryons d'animaux ainsi que certaines cellules souches adultes provenant de tissus d'adultes ont la capacité de se reproduire et de se différencier en laboratoire (*in vitro*) et dans l'organisme (*in vivo*), ce qui permet d'entrevoir des applications médicales. Les cellules SE sont **pluripotentes**, mais difficiles à obtenir. Les cellules souches pluripotentes induites (SPi) ressemblent aux cellules SE pour ce qui est de leur capacité à se différencier ; on peut les produire en reprogrammant des cellules différenciées. Les cellules SPi sont un moyen prometteur pour la recherche médicale et la médecine régénérative.

? Décrivez comment, à l'aide d'une souris, un chercheur pourrait réaliser (1) un clonage d'organisme, (2) la production de cellules SE et (3) une génération de cellules SPi, en insistant sur la façon dont les cellules sont reprogrammées. (Les procédures sont fondamentalement les mêmes chez l'humain et chez la souris.)

CONCEPT 20.4

Les applications de la biotechnologie influent sur nos vies de diverses façons (p. 474 à 480)

- La biotechnologie, notamment l'analyse des marqueurs génétiques comme les SNP, est de plus en plus utilisée pour diagnostiquer des maladies génétiques ou autres ; elle offre la possibilité de meilleurs traitements de certains troubles génétiques, ou même de guérisons, au moyen de la **thérapie génique** ou de l'édition de gènes avec le système CRISPR-Cas9. Elle permet également de mettre au point des traitements mieux ciblés contre le cancer. La biotechnologie est utilisée conjointement avec des cultures cellulaires pour la production à grande échelle d'hormones protéiques et autres protéines à usage thérapeutique. Certaines protéines thérapeutiques sont produites par des animaux **transgéniques** à vocation pharmaceutique.
- L'analyse des marqueurs génétiques tels que les **répétitions courtes en tandem (STR)** dans l'ADN obtenu des tissus ou des liquides de l'organisme trouvés sur les lieux de crimes permet d'obtenir un **profil génétique**. Ce profil génétique peut constituer une preuve irréfutable qu'un suspect est innocent, ou une forte présomption qu'il soit coupable. On s'en sert également pour régler des litiges sur la paternité et pour identifier des restes humains lors de crimes ou d'accidents.
- Le génie génétique permet de modifier le métabolisme des micro-organismes de manière à pouvoir les utiliser pour extraire des minéraux de l'environnement ou pour dégrader divers types de déchets toxiques.

- La création de végétaux et d'animaux transgéniques a pour objectif d'améliorer la productivité agricole et la qualité des aliments.
- Les avantages potentiels des biotechnologies doivent être soigneusement évalués à la lumière des dangers susceptibles de nuire aux humains ou à l'environnement.

? Quels facteurs vous aideraient à déterminer si une maladie génétique constitue une bonne cible pour entreprendre et réussir une thérapie génique ?

Évaluation

NIVEAU 1 : CONNAISSANCES ET COMPRÉHENSION

- En biotechnologie, le terme *vecteur* peut désigner :
 - l'enzyme qui découpe l'ADN en fragments de restriction.
 - l'extrémité cohésive d'un fragment d'ADN.
 - un marqueur SNP.
 - un plasmide employé pour introduire de l'ADN dans une cellule vivante.
- Parmi les outils biotechnologiques suivants, lequel n'est pas associé au bon usage ?
 - électrophorèse – séparation des fragments d'ADN.
 - ADN ligase – découpage de l'ADN et création d'extrémités cohésives au niveau des fragments de restriction.
 - ADN polymérase – PCR pour amplifier des sections de l'ADN.
 - transcriptase inverse – production d'ADNc à partir d'ARNm.
- Il est plus facile de manipuler par biotechnologie des végétaux que des animaux, car :
 - les gènes des cellules végétales ne contiennent pas d'introns.
 - il existe un plus grand nombre de vecteurs pour transférer l'ADN recombiné dans les cellules végétales.
 - une cellule somatique végétale peut souvent donner une plante complète.
 - les cellules végétales ont de plus gros noyaux.
- Un paléontologue a prélevé un morceau de la peau préservée d'un dodo (oiseau disparu) vieux de 400 ans en vue de comparer une région spécifique de l'ADN de cet échantillon avec celui d'oiseaux vivants. Parmi les techniques suivantes, laquelle permettrait le mieux d'accroître la quantité d'ADN de dodo disponible pour ces tests ?
 - L'analyse des SNP.
 - L'amplification en chaîne par polymérase (PCR).
 - L'électroporation.
 - L'électrophorèse sur gel.
- Les biotechnologies donnent lieu à de nombreuses applications dans le domaine médical. Parmi les opérations suivantes, laquelle *n'est pas encore* effectuée de façon régulière ?
 - La production d'hormones pour le traitement du diabète et du nanisme.
 - L'analyse de l'expression génétique pour la mise au point de traitements ciblés.
 - L'édition de gènes à l'aide du système CRISPR-Cas9 dans des embryons humains viables pour corriger des maladies génétiques.
 - La détection prénatale d'allèles de maladies génétiques.

NIVEAU 2 : APPLICATION ET ANALYSE

- Parmi les affirmations suivantes, laquelle *ne s'appliquerait pas* à un ADNc produit à partir d'un échantillon de tissu de cerveau humain ?
 - Il peut être amplifié par PCR.
 - Il est produit à partir d'ARN pré-messager et à l'aide de la transcriptase inverse.
 - Il peut être marqué et servir de sonde *in vivo* pour repérer des gènes exprimés dans le cerveau.
 - Il ne contient pas les introns de l'ARN pré-messager.

- L'expression d'un gène eucaryote cloné par une cellule bactérienne soulève de nombreux défis. Parmi les problèmes suivants, lequel peut être résolu en ayant recours à de l'ARNm et de la transcriptase inverse ?
 - La maturation après la transcription.
 - La maturation après la traduction.
 - L'hybridation des acides nucléiques.
 - La liaison des fragments de restriction.
- Parmi les séquences suivantes d'ADN bicaténaire, laquelle a le plus de chances d'être reconnue et coupée par une enzyme de restriction ?
 - AAGG
TTCC
 - GGCC
CCGG
 - ACCA
TGTT
 - AAAA
TTTT

NIVEAU 3 : SYNTHÈSE ET ÉVALUATION

- FAITES DES LIENS** ► Imaginez que vous voulez étudier la cristalline humaine, la protéine présente dans le cristallin de l'œil (voir la figure 1.8). Afin d'obtenir une quantité suffisante de la protéine recherchée, vous décidez de cloner le gène qui code pour celle-ci. En admettant que vous connaissiez la séquence de ce gène, comment procéderiez-vous ?
- FAITES DES LIENS** ► En vous reportant à la figure 20.15, expliquez ce que signifie une corrélation entre un SNP et un allèle causant une maladie ? Pourquoi une telle corrélation permet-elle d'utiliser le SNP comme marqueur génétique ? (Voir le concept 15.3.)
- FAITES UN DESSIN** ► Vous clonez un gène d'oryctérope (*Oryzctopus afer*) en utilisant un plasmide bactérien comme vecteur. Le schéma en vert ci-dessous illustre le plasmide qui contient le site de restriction pour l'enzyme utilisée dans la figure 20.5. Au-dessus du plasmide, il y a un segment d'ADN linéaire d'oryctérope synthétisé par PCR (en rose). Illustrez votre procédure de clonage par un schéma qui montre ce que deviennent ces deux molécules au cours de chaque étape. Utilisez une couleur pour l'ADN de l'oryctérope et ses bases, et une autre pour ceux du plasmide. Annotez chaque étape et toutes les extrémités 5' et 3'.

5' GAATTCTAAAGCGCTTATGAATTC 3'
3' CTTAAGATTTTCGCGAATACTTAAG 5'

ADN de l'oryctérope



Plasmide

Voir les réponses proposées à l'appendice A.