

CHAPITRE III: OUTILS DE BIOLOGIE MOLECULAIRE ET DE GENIE GENETIQUE

1. Introduction

La biologie moléculaire est une discipline qui se trouve entre la Génétique, la Biochimie et la Physique, dont le but est de comprendre le fonctionnement de la cellule au niveau moléculaire.

Ce terme désigne également l'ensemble des techniques de manipulation d'acides nucléiques (ADN, ARN).

Le génie génétique (ou ingénierie génétique) est un ensemble de techniques situées au carrefour de la Biologie moléculaire, la Bactériologie, la Virologie, et la Génétique.

Les buts généraux du génie génétique sont:

- **Transfert de gènes**
 - entre différents organismes: ex. on peut placer le gène de l'insuline humaine dans le génome de bactéries pour qu'elles produisent la protéine en grande quantité.
 - Pour faire de la thérapie génique.
- Placer un gène dans un environnement biologique différent (pour comprendre le fonctionnement de certains gènes "silencieux").

2. Outils et méthodes DE BASE en biologie moléculaire

Les enzymes

* *Les enzymes de restriction*

- Les enzymes de restriction sont des enzymes d'origine bactérienne (les bactéries les utilisent pour se défendre contre les virus).

Ce sont des **endonucléases** ayant la particularité de couper les molécules d'ADN bicaténaires à des sites spécifiques de sa séquence appelés "**sites de restriction**".

Exemples: les enzymes EcoRI et HpaI

* **Les polymérases:** ADN polymérases (ADN → ADN), ARN polymérases (ADN → ARN), transcriptases inverses (ARN → ADN_c, c= complémentaire)

* **Autres enzymes:** nucléases, phosphatases alcalines,...

HpaI: Bouts francs

```
5'----GTT|AAC----3'
3'----CAA|TTG----5'
```

EcoRI: Bouts collants

```
5'----GAATTC----3'
3'----CTTAAG----5'
```

Extraction et purification des acides nucléiques

La nature de l'échantillon biologique est très variable, le plus souvent il s'agit de **sang**, mais d'autres milieux sont possibles: **urines, liquide céphalo-rachidien, salive, expectorations, tissus,...**

Il existe différents procédés d'extraction de l'ADN ou de l'ARN.

Détermination de la qualité et de la quantité de l'extrait

La quantité et la qualité de l'acide nucléique peuvent être estimées par **spectrophotométrie** en mesurant à 260 nm et 280 nm la densité optique (DO) d'une solution contenant l'acide nucléique.

Séparation des acides nucléiques par électrophorèse

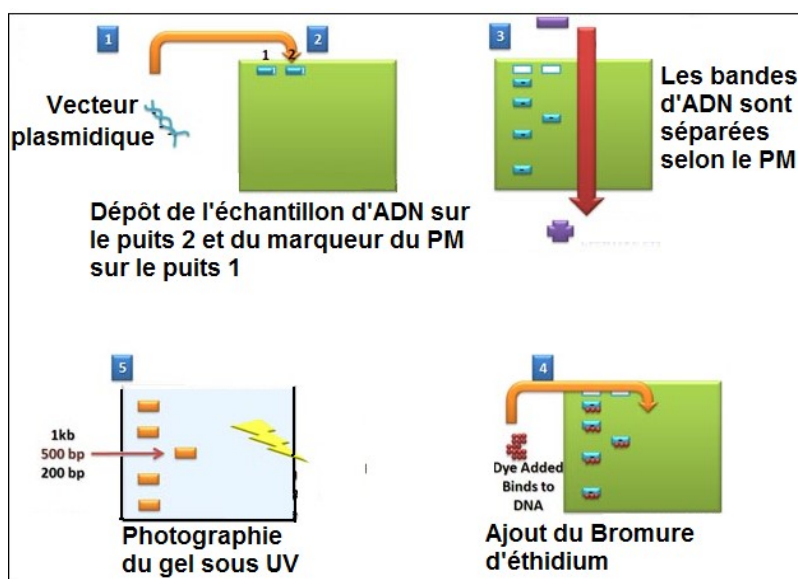
L'électrophorèse peut se faire sur gel d'agarose ou d'acrylamide.

Elle est nécessaire pour:

- l'**isolation** d'un fragment d'ADN pour des manipulations ultérieures
- mesure ou vérification de la **taille** d'un fragment d'ADN.

Exp: Des fragments d'ADN résultant de l'action d'une enzyme de restriction peuvent être séparés grâce à cette technique.

- Le mélange de fragments d'ADN est déposé sur un puits dans le gel.
- Après application d'un courant électrique, **l'ADN migre du pôle (-) vers le pôle (+) du gel. La vitesse de migration et la distance parcourue sont inversement proportionnelles à la taille de la taille de chaque fragment d'ADN.**
- La visualisation des acides nucléiques se fait par coloration du gel au **bromure d'éthidium (BET)** qui est un agent intercalant entre de l'ADN émettant une fluorescence orange lorsqu'il est éclairé par des UV. La comparaison visuelle de la fluorescence d'un échantillon avec celle d'une quantité d'ADN connue (**le marqueur de poids moléculaire PM**) permet d'estimer la quantité d'acides nucléiques déposée.



Principe d'hybridation moléculaire et sondes d'ADN

L'hybridation moléculaire est la capacité de **séquences simple-brin** (d'ADN ou d'ARN) **qui sont complémentaires** de s'unir spontanément en molécules **double-brin hybrides**.

Une sonde d'ADN est un fragment d'ADN simple brin marqué par un **marqueur isotopique** (sonde chaude: ^{32}P , ^{35}S ...) **ou non isotopique** (sonde froide: fluorochrome) qui peut s'hybrider avec **un fragment d'ADN recherché**, à condition qu'il contienne une **séquence complémentaire à la sonde**.

3. Techniques basées sur l'hybridation moléculaire

Lors de la manipulation des gènes et du génome, il est souvent nécessaire de **détecter des molécules spécifiques d'ADN (ou d'ARN) à partir d'un mélange complexe**. Des techniques du transfert permettent cette détection, **elles commencent par une électrophorèse de l'acide nucléique**.

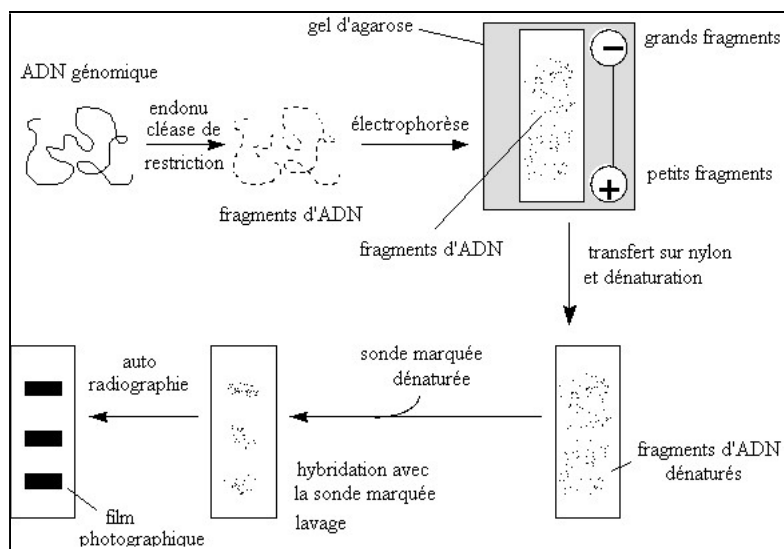
Southern blot

La digestion de l'ADN génomique par des enzymes de restriction produit un si grand nombre de fragments que le gel d'électrophorèse laisse apparaître une traînée continue de bandes d'ADN. Une sonde peut **identifier un fragment d'ADN spécifique** dans ce mélange par la technique du Southern blot dont les étapes sont les suivantes:

- 1.Extraction** de l'ADN à analyser
- 2.Digestion** de l'ADN par enzymes de restriction.
- 3.Séparation** de fragments de restriction selon leur taille par **électrophorèse**.
- 4.Transfert** de l'ADN sous forme dénaturée sur membrane de nylon.

5. Mise en contact de la membrane de nylon avec "**sonde**" qu'il est possible de repérer. **Hybridation** de la sonde avec les fragments d'ADN avec lesquels elle présente une complémentarité.

6. **Révélation**: mise en évidence des fragments d'ADN qui se sont liés aux sondes (Par autoradiographie si la sonde est marquée par un élément radioactif (sonde chaude) ou par méthodes biochimiques ou colorimétriques si la sonde n'est pas radioactive (sonde froide)).



Northern Blot

Cette technique permet la **détection du taux d'une population d'ARNm** (mise en évidence de l'expression d'un gène) dans un tissu donné.

Elle n'est pas très souvent utilisée en diagnostic mais en **recherche**.

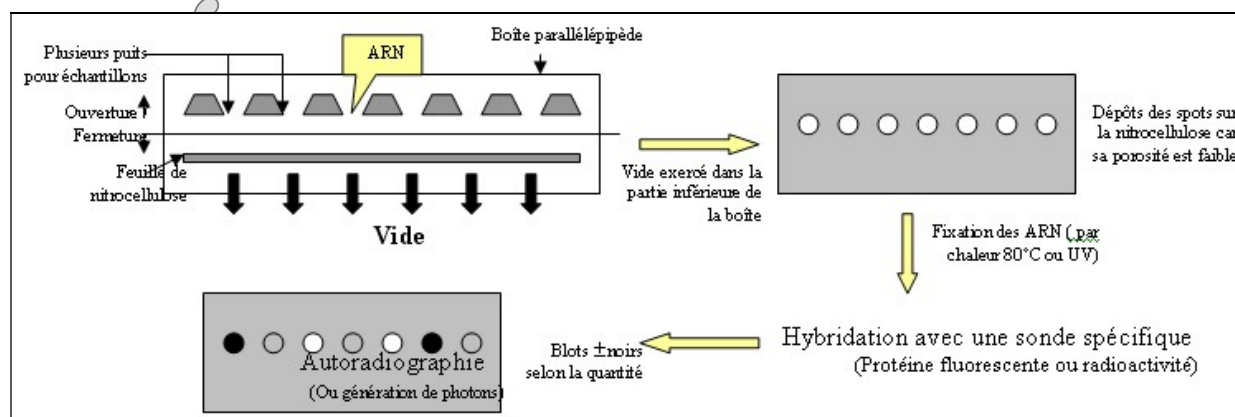
Dot/Slot-Blot

La sonde est un ADN alors que la cible peut être un fragment d'ADN ou un ARN donné **sans séparation préalable sur gel d'électrophorèse d'où la nécessité de vérifier que la sonde est très spécifique de la cible**.

Les cibles sont directement déposées sur une membrane d'hybridation à une concentration connue soit sous forme de point ("dot"), soit de trait ("slot")

Après hybridation entre la sonde et la cible, l'intensité de la tache obtenue (radioactivité ou fluorescence) reflète la concentration de l'acide nucléique recherché.

Cette technique permet d'apprécier la présence ou non d'un acide nucléique et sa quantité (appréciation semi-quantitative)



4. Amplification génique

Pour détecter une **séquence cible d'ADN**, il existe deux grands types de techniques qui permettent de l'amplifier (augmenter sa quantité):

- **La PCR**: réaction en chaîne de la polymérase ou (polymerase chain reaction), c'est une **amplification chimique** grâce à la machinerie de réplication extraite de bactéries spéciales (c'est une technique *in vitro*).
- **Les techniques de l'ADN recombinant ou le clonage moléculaire**: c'est l'utilisation la machinerie de réplication d'un **organisme vivant**: bactéries le plus souvent ou levures (c'est une technique *in vivo*)

A- La PCR

La PCR: est l'abréviation de l'expression anglaise Polymerase Chain Reaction ou Réaction en Chaîne par la Polymérase. Il s'agit de **réaliser *in vitro* une succession de réactions de réplication d'une matrice double brin d'ADN**. La PCR permet de:

- **Choisir** (ou de cibler) un segment d'ADN particulier dans le génome
- **Recopier** (amplifier) ce segment des millions de fois et de le rendre visible

Acteurs de la PCR:

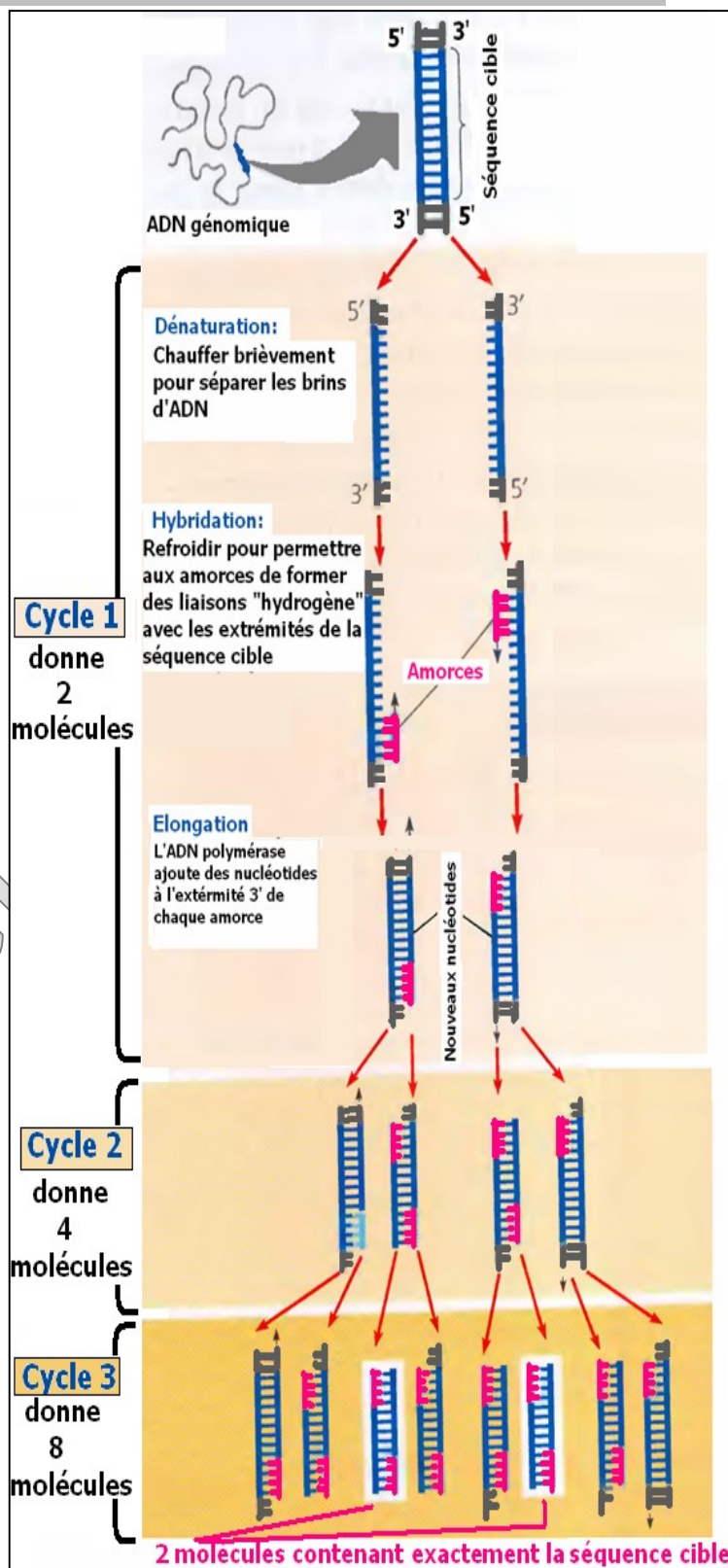
Les acteurs de la PCR sont :

- **La Taq polymérase**: une ADN polymérase thermostable
- **Les amorces d'ADN (primers)**: des oligonuléotides complémentaires d'une séquence de l'ADN monocaténaire cible.
- **L'ADN génomique**
- **Les nucléotides triphosphate** représentant les quatre bases azotées : A, G, C et T.

Principe de la PCR:

Le principe de la PCR repose sur la répétition de 3 processus:

1. **Dénaturation** des deux brins d'ADN à une température élevée (environ 95°C) afin d'obtenir des molécules d'ADN monocaténares
2. **Hybridation** des amorces complémentaires d'une séquence de l'ADN monocaténaire cible (la température est ramenée à 40-65°C afin de permettre une bonne fixation des amorces).
3. **Elongation** par la Taq polymérase à partir des amorces, réalisée à la température de 72°C.



Les produits de ce premier cycle sont ensuite dénaturés par la chaleur.

Les amorces vont s'hybrider avec les brins d'ADN monocaténaire résultant de cette dénaturation et qui vont servir de matrice à leur tour.

Arrivant au 3^{ème} cycle, on commence à obtenir des deux **molécules contenant seulement la séquence cible**.

A chaque cycle, le nombre de copies de la séquence cible d'ADN est doublé: **2ⁿ molécules sont ainsi obtenues après n cycles**. (Ex. après 20 cycles on aura: 1 048 576 copies).

La détection et l'analyse des produits de PCR peuvent être très rapidement réalisées par électrophorèse sur gel.

B- Devenir des produits PCR:

Les produits de la PCR (amplicons) peuvent avoir différents devenirs, par exemple :

1. Séquençage du produit de PCR.

2. PCR-RFLP:

- Digestion enzymatique du produit de PCR par une enzyme de restriction choisie selon le besoin.
- Électrophorèse des produits de digestion.
- Aspects électrophorétiques variables selon la présence ou l'absence de sites de restriction des enzymes utilisées.

3. Clonage dans un vecteur: afin de pouvoir l'introduire par la suite dans un organisme vivant.

Variantes de la PCR:

1.PCR " Multiplex "

- Amplifications de **deux cibles ou plus en même temps**, avec des couples d'amorces différents:
- Elle permet de faire **l'étude de plusieurs cibles avec une petite quantité d'ADN**.

2.PCR en temps réel:

- C'est une PCR durant laquelle, **la présence et la quantité des amplicons sont analysés à chaque cycle grâce à l'émission d'un signal fluorescent par un fluorophore**.
- Ce **signal est proportionnel à la quantité des amplicons et est suivi le long de la réaction → cinétique (ou suivi en temps réel)**.
- Elle donne une possibilité d'analyse des produits amplifiés qui peut être:
 - **Quantitative → PCR quantitative en temps réel**. Elle peut déterminer, dans un échantillon biologique, le **taux**:
 - * **d'ADN**; ou
 - * **d'ARN spécifiques**, on parle alors de **RT-PCR**: car dans ce cas, on utilise d'abord une enzyme appelée **transcriptase inverse qui transforme l'ARN d'une cellule en ADN (nommé ADN complémentaire, ADNc)**, qui peut être quantifié par PCR en temps réel.
 - **Qualitative →** Génotypage par **détection des mutations ponctuelles** (génotypes homo/hétérozygotes)).

C- Le clonage moléculaire

Principes

Le clonage moléculaire est une technique qui consiste en l'insertion d'un fragment d'ADN dans un vecteur et sa multiplication. Son but est l'obtention de plusieurs copies

Le vecteur est tout véhicule de matériel génétique d'une cellule à une autre, c'est un **transporteur d'ADN**.

Intérêts du clonage moléculaire

- **Séquençage d'un génome:** La digestion enzymatique d'un génome puis le clonage des fragments obtenus, permet d'obtenir plusieurs copies de ces derniers qui seront séquencés par la suite (voir § séquençage).
- **Produire en grande quantité une protéine** codée par un gène d'intérêt dans une bactérie ou une levure.
Par la suite, la structure et/la fonction de celle-ci pourraient être étudiées.
- **Produire en grande quantité un gène donné** qui pourra être utilisé dans la **transgenèse** (voir § Applications du génie génétique) afin de créer un **organisme génétiquement modifié** qui va exprimer le gène.

5. Le séquençage

C'est une technique qui permet de détecter la séquence d'un ADN.

Séquençage par Méthode de Sanger

La méthode la plus utilisée est la **méthode enzymatique de Sanger: fabrication d'un ADN double brin à partir d'une matrice simple brin. Cette synthèse d'ADN double brin est interrompue au hasard par incorporation d'un nucléotide modifié (didésoxyribonucléotide).**

1. Le fragment d'ADN est le plus souvent un **produit de PCR purifié**
2. **Digestion** enzymatique de l'un des deux brins d'ADN → **ADN simple brin.**
3. Quatre réactions de **polymérisation** sont menées en parallèle dans quatre tubes distincts, contenant chacun
 - Un oligonucléotide complémentaire du début de la séquence d'ADN à déterminer. Il va servir d'**amorce de séquence**, pour la polymérisation.
 - Des nucléotides normaux (désoxyribonucléotide: **dNTP**)
 - Une ADN polymérase.
 - On choisit de marquer le dATP au P32, afin de rendre l'ADN synthétisé radioactif
 - Un nucléotide modifié (didésoxyribonucléotide : **ddTTP, ddATP, ddCTP et ddGTP**) qui interrompt la polymérisation lorsqu'il sera intégré. (la quantité est très faible par rapport aux dNTP).

Tube 1: ADN + Amorce + DNA polymérase + dATP* + les 3 autres dNTP + ddATP
Tube 2: ADN + Amorce + DNA polymérase + dATP* + les 3 autres dNTP + ddTTP
Tube 3: ADN + Amorce + DNA polymérase + dATP* + les 3 autres dNTP + ddCTP
Tube 4: ADN + Amorce + DNA polymérase + dATP* + les 3 autres dNTP + ddGTP

4. **Dénaturation** des produits de polymérisation en ADN simple brin.
5. **Séparation par électrophorèse** (les produits de chaque tube dans un puits → 4 puits)
6. **Révélation** des fragments d'ADN par autoradiographie (rayon X),
7. **La séquence:** sachant que les fragments les plus courts sont les plus proches de l'amorce de séquence, la lecture du gel se fera du fragment le plus court (bas du gel) vers le fragment le plus long (haut du gel). La séquence lue est celle du brin sens.

Exemple de produits de polymérisation retrouvés dans un tube contenant le ddGTP

5' - TAAGTCCTAAAG
3' - ATTCAGGATTCAGGAGGCCTACCATGAAGATCAAG-5'

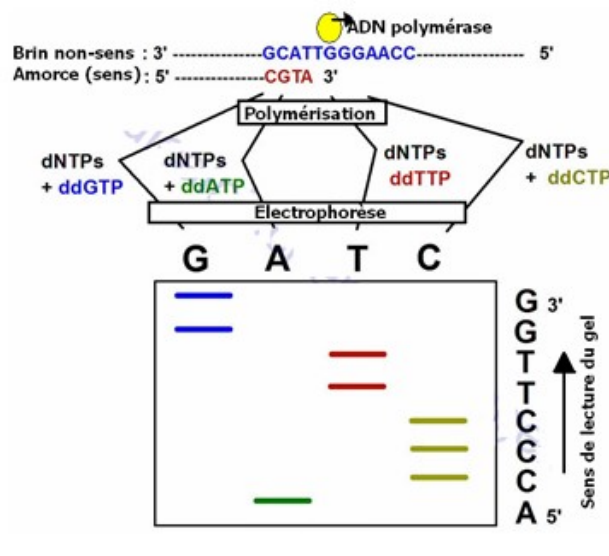
5' - TAAGTCCTAAAGTCTCCG
3' - ATTCAGGATTCAGGAGGCCTACCATGAAGATCAAG-5'

5' - TAAGTCCTAAAGTCTCCGG
3' - ATTCAGGATTCAGGAGGCCTACCATGAAGATCAAG-5'

5' - TAAGTCCTAAAGTCTCCGGATG
3' - ATTCAGGATTCAGGAGGCCTACCATGAAGATCAAG-5'

5' - TAAGTCCTAAAGTCTCCGGATGG
3' - ATTCAGGATTCAGGAGGCCTACCATGAAGATCAAG-5'

5' - TAAGTCCTAAAGTCTCCGGATGGTACTTCTAG
3' - ATTCAGGATTCAGGAGGCCTACCATGAAGATCAAG-5'



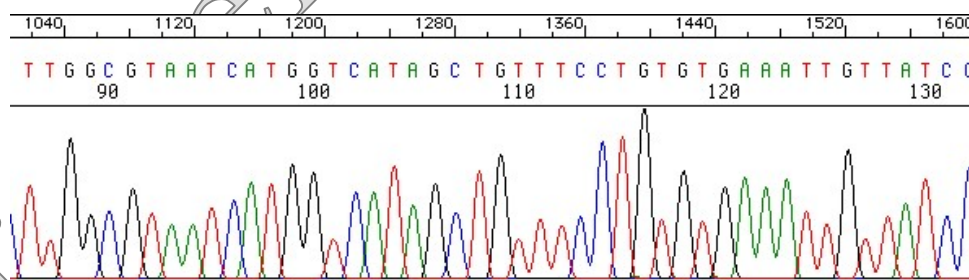
Cette technique "manuelle" est de moins en moins utilisée. Elle est remplacée par le **séquençage automatique**. Dans ce cas le marquage se fait soit:

- par marqueur fluorescent qui est fixé sur l'amorce → polymérisation → puis injection dans 4 tubes du séquenceur automatique
- par des marqueurs fluorescents différents fixés sur les ddNTP (vert pour le ddATP, bleu pour le ddCTP, jaune pour le ddGTP et rouge pour le ddTTP) → polymérisation → puis injection dans un seul tube du séquenceur automatique.

ADN + Amorce + DNA polymérase + les 4 autres dNTP
+ ddATP avec marqueur fluorescent vert
+ ddTTP avec marqueur fluorescent rouge
+ ddCTP avec marqueur fluorescent bleu
+ ddGTP avec marqueur fluorescent jaune

L'électrophorèse se fait de la même manière que la méthode manuelle.

Révélation par du gel par un faisceau laser qui le traverse et excite les fluorochromes → émission de fluorescences de longueur d'onde différentes → traitement par ordinateur → séquence affichée = **fluorogramme**.



Les technologies de séquençage à haut débit (Next Generation sequencing = NGS)

Ce sont des technologies qui permettent un **séquençage massif** de plusieurs millions de fragment d'ADN d'une même personne **et en même temps**.

Intérêts: rapidité + coût réduit.

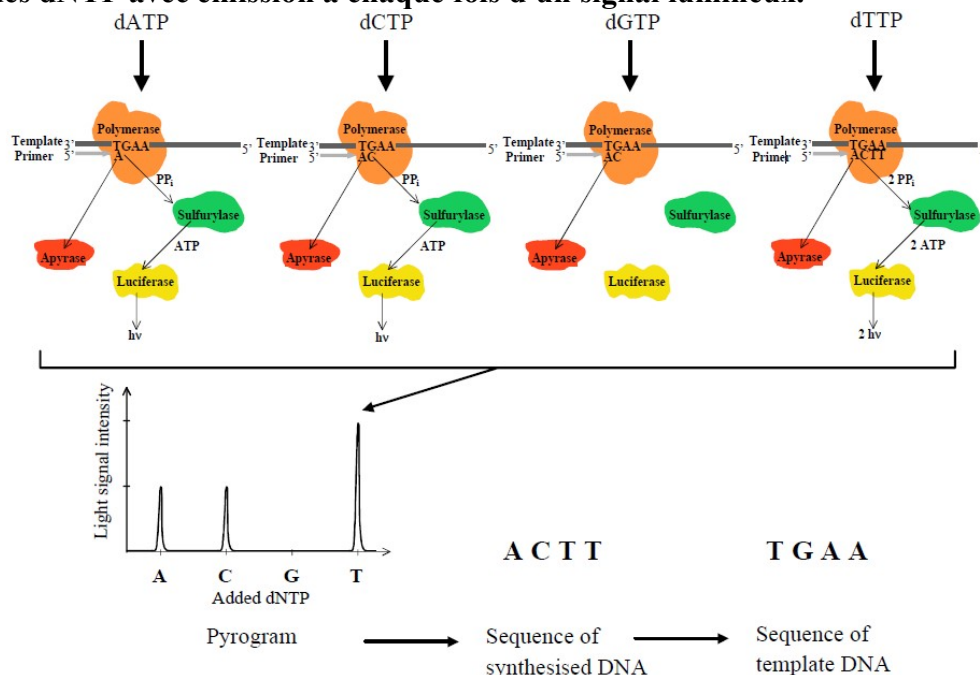
Plusieurs technologies existent et le déroulement général de ces méthodes est le suivant :

- 1- **fragmentation** de l'ADN en petits fragments dont la taille varie selon la technique de NGS et leur ligation à des fragments nucléotidiques dits « adaptateurs » sur un support.
- 2- **PCR**
- 3- **Séquençage et analyse bio-informatique des résultats.**

Les exemples suivants de techniques NGS ne sont pas à apprendre !

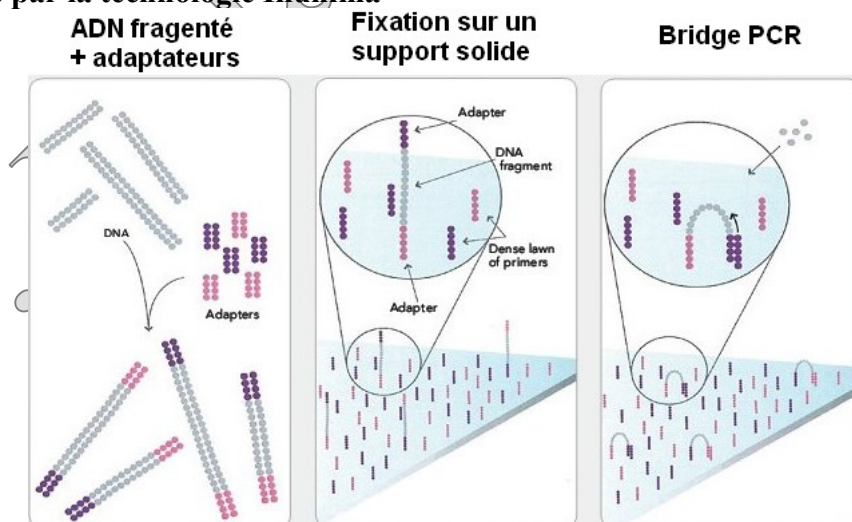
A- Le Pyroséquençage

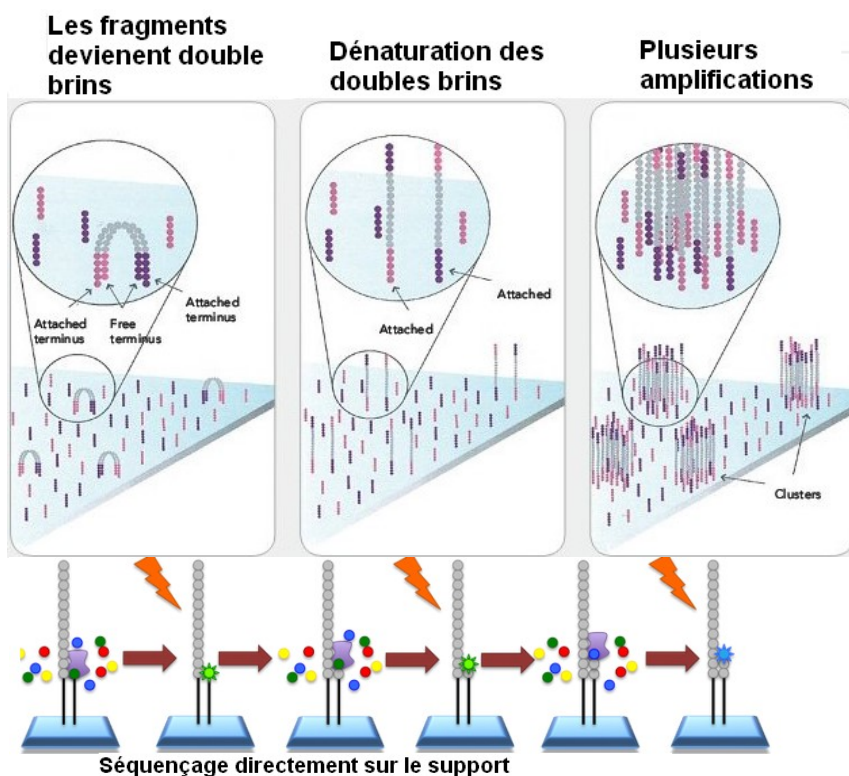
C'est la première technique de NGS développée. La réaction est basée sur l'incorporation séquentielle des dNTP avec émission à chaque fois d'un signal lumineux.



Les nucléotides sont ajoutés l'un après l'autre. Si le nucléotide ajouté dans le milieu réactionnel correspond à celui attendu par la Polymérase, il est incorporé dans le brin en cours de synthèse en libérant un PyroPhosphate (PP_i). Grâce à une ATP Sulfurylase, ce PP_i est transformé en ATP qui est utilisé par une luciférase pour émettre un signal lumineux. C'est ce signal qui est capté par le séquenceur qui le reproduit sous la forme d'un pic sur le Pyrogramme. **La hauteur de ce pic est fonction de l'intensité du signal lumineux**, elle-même proportionnelle au nombre de nucléotides incorporés en même temps. On peut donc déduire la séquence de la taille des pics obtenus.

B- Le séquençage par la technologie Illumina





- * Position après position
- * Mélange contenant toutes les bases associées chacune à un fluorophore différent.
- * L'extrémité de ces bases est protégée pour empêcher l'addition de bases supplémentaires à chaque cycle d'incorporation.
- * Lecture laser
- * Le clivage des fluorophores permet ensuite l'incorporation de la base suivante.
- * La lecture est effectuée ainsi cycle après cycle.

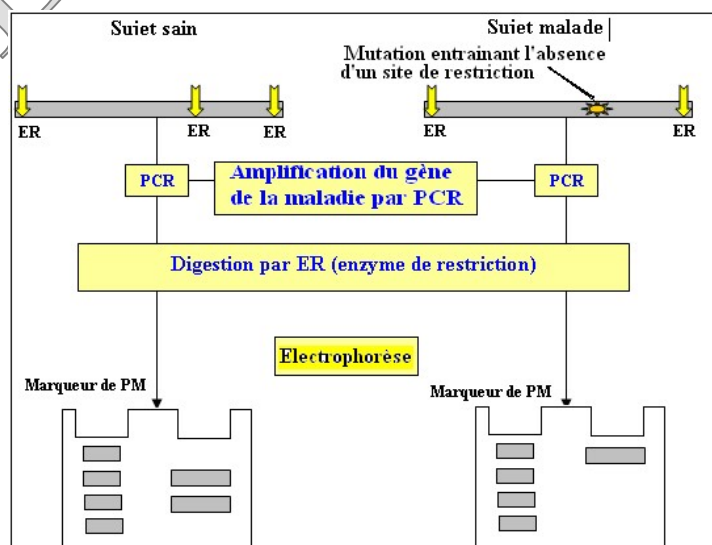
6. Quelques applications des techniques de biologie moléculaire

A- Diagnostic des maladies humaines

Diagnostic de maladies génétiques dues à des mutations

Si la mutation est connue pour donner une modification des sites de restrictions

Certaines mutations entraînent l'absence ou l'apparition d'un site de restriction d'une enzyme de restriction donnée (ER) par rapport aux sujets normaux. Ceci peut être utilisé pour détecter ces sujets malades.

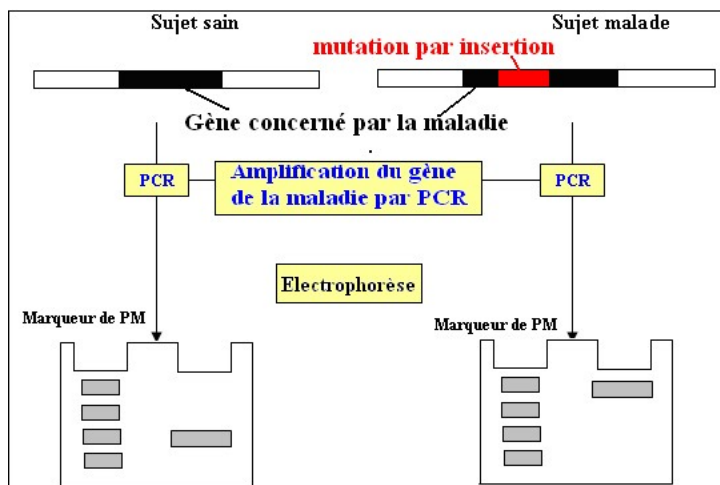


Si la mutation est une insertion ou une délétion

Dans ces cas, la mutation se manifeste par la modification de la taille du gène. Il suffit donc d'amplifier tout ou une partie du gène.

En cas d'une insertion, le produit PCR issu de l'ADN d'un malade est plus long que celui qui est issu d'une personne saine. Une délétion présente un résultat contraire.

L'évaluation de la taille des produits PCR par électrophorèse conduit directement au diagnostic.

**Diagnostic de maladies infectieuses**

Qui peuvent être **bactériennes, parasitaires ou virales** (exp : virus du SIDA ou de l'hépatite C)

La PCR utilise, dans ce cas, des amorces qui permettent d'**amplifier de façon très sélective des séquences de l'ADN du pathogène**.

Biologie moléculaire en cancérologie

Elle peut être dans un but de

- **dépistage** (exp: recherche de mutations des gènes BRCA1 et BRCA2 qui prédisposent au cancer du sein dans une famille).
- **diagnostic** (exp: présence du gène de fusion bcr-abl en RT-PCR (transcrit de fusion BCR-ABL) dans la leucémie myéloïde chronique).
- **ou d'évaluation du pronostic**: La RT-PCR quantitative permet de suivre l'efficacité d'un traitement.

B- Intérêt dans l'identification des individus (Médecine légale)

Il est possible d'identifier des individus grâce à des variations de séquences de leur ADN qu'on appelle les marqueurs polymorphes

Les marqueurs polymorphes

Ce sont des **séquences d'ADN variables entre les individus** et situées sur des sites spécifiques du génome humain. Elles ne sont **généralement** pas associées à aucune variation phénotypique mesurable : elles sont **silencieuses**.

Elles sont **polymorphes** c à d que leur locus peut contenir un allèle parmi un grand choix de **plusieurs allèles différents**.

Les types de marqueurs polymorphes

On peut les classer en trois classes majeures :

- **Les SNP (Single Nucleotide Polymorphism)** (prononcé SNIPS) : C'est un type de polymorphisme de l'ADN dans lequel **deux chromosomes diffèrent sur un segment donné par une seule paire de bases**. Les SNP constituent la forme **la plus abondante de variations génétiques** dans le génome humain (plus de 90% de toutes les différences entre individus).
- **Les microsatellites ou STR (simple tandem repeats)** : séquences de 2-5 pb qui peuvent se répéter 12-40 fois. La variation du nombre de répétitions forme des allèles différents.
- **Les minisatellites ou VNTR (variable number of tandem repeats)** : séquences de 10-40 pb qui peuvent se répéter jusqu'à plus de 1000 fois. La variation du nombre de répétitions forme des allèles différents.

Détection du polymorphisme de l'ADN

Il existe plusieurs techniques permettant de détecter ce polymorphisme, les plus couramment utilisées sont le **Southern Blot**, La **PCR-RFLP** ou la **PCR-multiplexe** qui donnent une image constituant une **empreinte génétique individuelle**.

1-L'utilisation du Southern Blot dans ce cas est possible car :

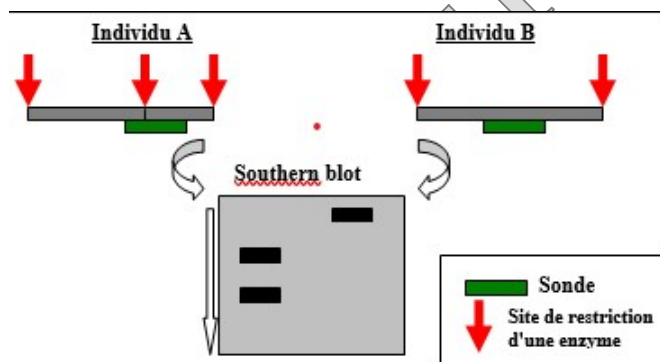
- Les **SNP** peuvent se manifester par des **apparitions ou disparitions des sites de restriction** d'une enzyme de restriction sur un segment donné de l'ADN.
- Les **ADN satellites (micro ou minisatellites)** peuvent aussi se manifester par des **variations de la taille des fragments** de restriction obtenus après la digestion enzymatique d'un segment donné de l'ADN.

Dans les deux cas, on peut assister à des variations de la taille des fragments de restriction obtenus après la digestion de l'ADN de différents individus, on les appelle **les RFLP : variations entre tous les individus humains révélées par des modifications de la succession des sites de restriction d'une enzyme donnée sur le génome, ce qui entraîne la formation de fragments de restriction de tailles variables (polymorphes) d'où le nom de RFLP "Restriction Fragment Length Polymorphism"** signifiant polymorphisme de la longueur des fragments de restriction.

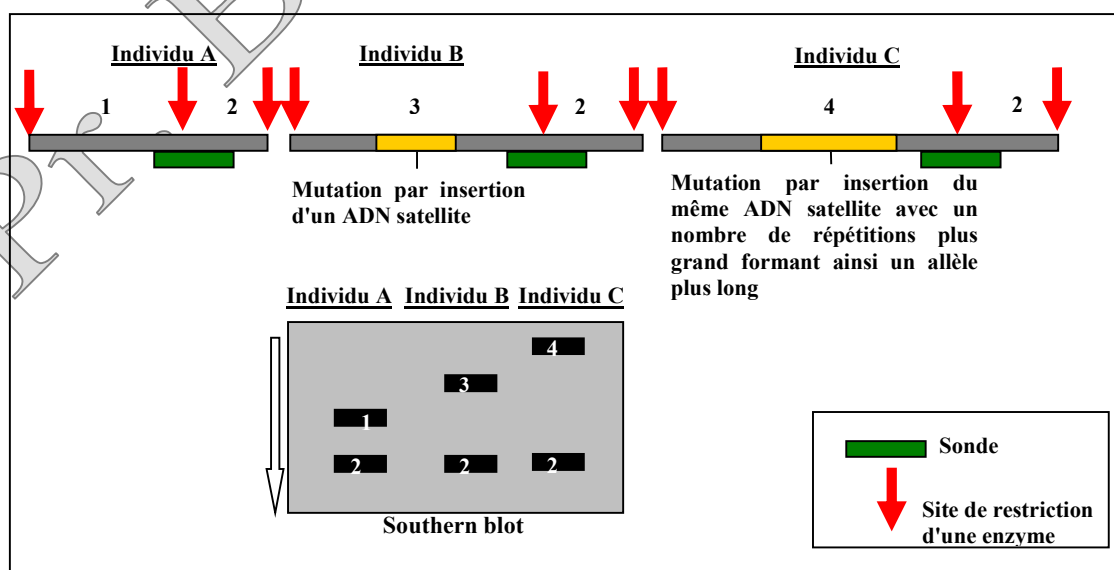
La **probabilité** d'avoir deux individus non apparentés avec le **même RFLP** est presque nulle (**inférieure à 10^{-20}**). Le nom RFLP peut être donné aussi à la technique du Southern Blot dans ce cas.

On peut comprendre que les RFLP naissent par deux mécanismes possibles:

- La **perte ou le gain d'un site de restriction** expliquée par les **SNP** et donnant des « **RFLP bi-alléliques** »

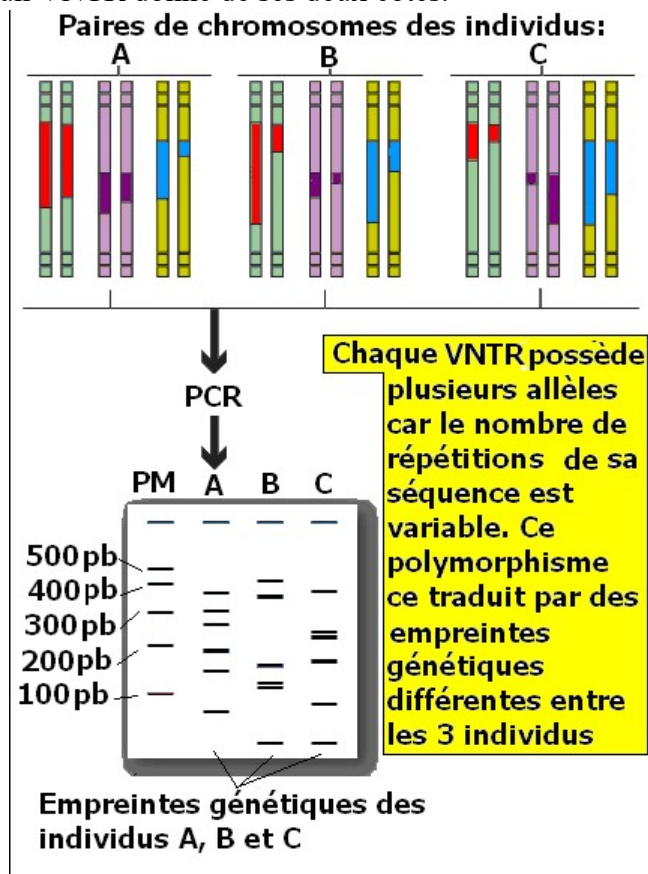


- Une **insertion ou une délétion** qui change la taille des fragments sans changement du nombre de sites de restriction, ceci s'explique par la présence des **ADN satellites** et donne naissance aux « **RFLP multi-alléliques** »



2-La PCR-RFLP : est une PCR suivie d'une digestion enzymatique puis d'une électrophorèse des fragments obtenus. Ses résultats sont comme le Southern Blot mais elle est plus rapide et moins dangereuse (radioactivité).

3-La PCR-multiplexe permet de montrer plus rapidement le polymorphisme d'un ADN satellite donné entre des individus, et ceci en l'amplifiant, sans avoir besoin d'utiliser des enzymes de restriction : dans l'exemple suivant, la PCR utilise 3 couples d'amorces. Chaque couple reconnaît les séquences non polymorphes qui cernent un VNTR donné de ses deux côtés.



Utilisation des marqueurs polymorphes pour l'identification des individus

Comme ces marqueurs sont très variables d'un sujet à un autre, on peut les utiliser pour l'**identification en médecine légale** :

1. **Criminalistique:** Recherche de criminels,
2. **Tests de paternité** (recherche du père biologique d'un enfant).

Remarque : Les marqueurs polymorphes ont d'autres utilisations : Diagnostic de certaines maladies et Cartographie du génome.

C- Applications du génie génétique

Un gène cloné et amplifié peut être introduit dans un organisme vivant "étranger" → **c'est la Transgénèse** qui a plusieurs applications:

DANS LE DOMAINE DE L'AGRONOMIE

La transgénèse a permis d'obtenir des **organismes génétiquement modifiés (OGM)** qui peuvent être:

- **animaux** (exp: transfert du gène de l'hormone de croissance pour obtenir des lignées de poissons à croissance accélérée)
- **plantes** (exp: maïs transgénique ayant un gène de résistance à un insecte (la pyrale)).

DANS L'INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE

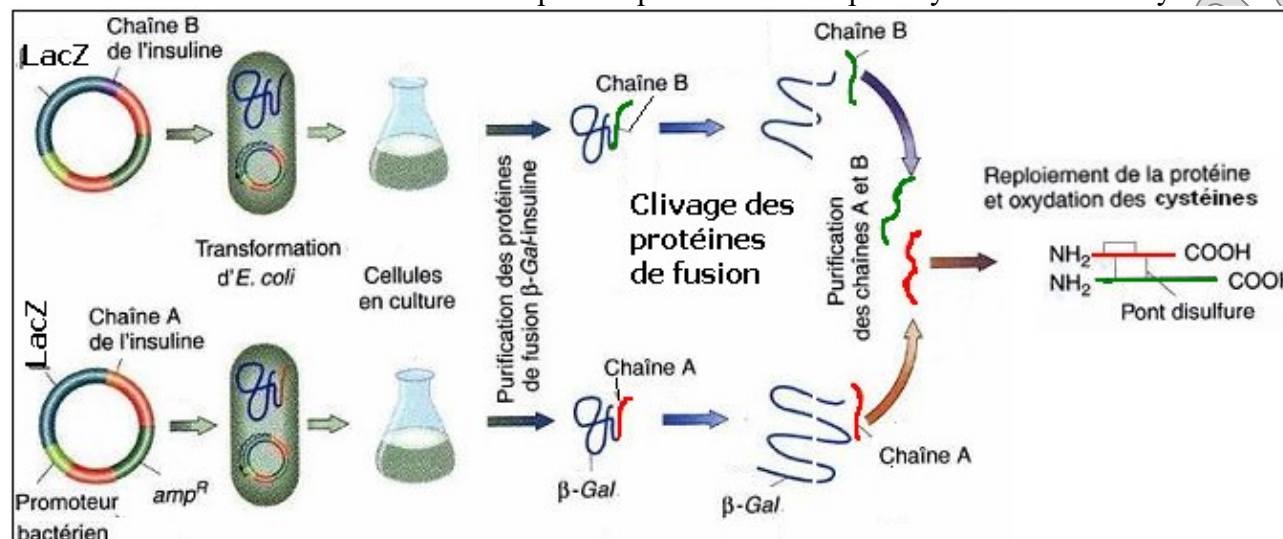
La technologie de l'ADN recombinant (clonage moléculaire) permet la synthèse de protéines recombinantes chez des organismes receveurs. Certaines protéines d'intérêt médical actuellement sur le marché sont produites par trois types de cellules recombinées :

- **une cellule procaryote: la bactérie *Escherichia coli***: par exemple:

Chacune des deux chaînes polypeptidique A et B de l'**insuline** est synthétisée chez la bactérie qui a été transformée avec un vecteur plasmidique portant l'ADN qui code pour chacune d'entre elle.

Chaque chaîne est liée à une protéine bactérienne (β -Gal codée par le gène LacZ) formant ainsi une **protéine recombinante**.

Les protéines recombinantes sont purifiées, puis les 2 chaînes de l'insuline sont libérées des protéines bactériennes et reliées ensuite entre elles par des ponts disulfures par oxydation de leurs cystéines.



- **deux types de cellules eucaryotes :**

▪ **la levure *Saccharomyces cerevisiae***

Des **vaccins anti-hépatite B** préparés à partir de cette levure qui a été transformée par un plasmide pour synthétiser l'Ag HBs du virus de l'hépatite B.

▪ **les cellules de mammifères (essentiellement les cellules CHO).**

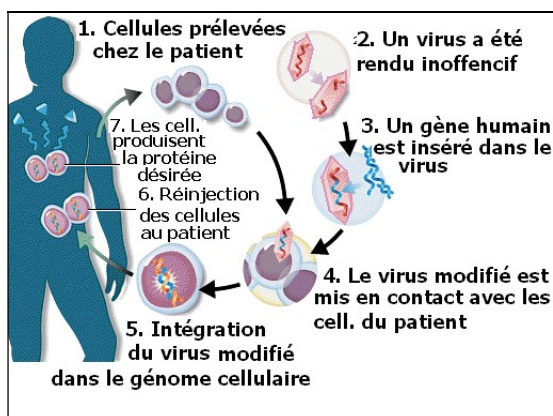
Ces cellules ont été utilisées pour la synthèse de beaucoup de protéines: **hormone de croissance humaine, facteurs de coagulation...**

DANS LE DOMAINE MEDICALE

1- THERAPIE GENIQUE par transfert de gène à des cellules cibles

La thérapie génique est la correction à des fins thérapeutiques d'un défaut génétique par intervention sur l'ADN. Elle introduit, dans des cellules humaines, des vecteurs recombinants portant le gène qui peut corriger la maladie.

Ces vecteurs sont le plus souvent des virus inactivés. L'ADN des virus a la capacité d'intégrer le génome humain et donc d'être transmis d'une génération cellulaire à une autre.



Enfant atteint d'un X-SCID (Enfant-bulle)

Certaines maladies génétiques humaines ont bénéficié d'essais thérapeutiques de ce genre dont quelques uns se sont montrés de résultats très prometteurs, la thérapie génique n'est plus qualifiée de futuriste:

(Tableau à consulter pour avoir des exemples et être à jour de ce qui se passe, **ne pas apprendre**).

Année	Maladie traitée	Gène	Vecteur	Cellules cibles
2000	X-SCID ("enfants bulles"): profond déficit immunitaire lié à l'X	γc	Rétrovirus	Cellules souches hématopoïétiques
Fin 2009	Amaurose de Leber: Cécité congénitale	RPE65	Adénovirus	Injection directe dans la rétine #
Fin 2009	Adrénoleucodystrophie liée à l'X ¹ :	ABCD1	Lentivirus	Cellules souches hématopoïétiques (sont capables aussi de donner des cellules gliales)
Fin 2011	Hémophilie B: déficit du facteur IX de la coagulation	Gène du facteur IX	Adénovirus	Cellules hépatiques
Juin 2012	Déficit en décarboxylase des acides aminés aromatiques (AADC) ² ,	AADC	Adénovirus	Injection dans le <i>putamen</i> , région principale de l'activité AADC cérébrale.
Fin 2012	Déficit en en lipoprotéine lipase (LPLD) ou hypercholestérolémie héréditaire ³	LPL.	Adénovirus → Glybera ®*	Injection intramusculaire.

¹ Adrénoleucodystrophie liée à l'X¹: maladie neurologique grave touchant les garçons : associe une démyélinisation progressive du système nerveux central et périphérique, une insuffisance surrénale (maladie d'Addison) et une accumulation d'acides gras à très longue chaîne (AGTLC) dans le plasma, les fibroblastes et les tissus.

² Déficit en décarboxylase des acides aminés aromatiques (AADC): La décarboxylase des acides aminés aromatiques (AADC), responsable de la décarboxylation de la L-Dopa et du 5-hydroxytryptophane, est essentielle à la synthèse de la dopamine et de la sérotonine. Un déficit génétique en cette enzyme se traduit par de graves retards de développement, une hypotonie, des difficultés à se déplacer, des mouvements anormaux des membres ou des yeux et autres symptômes

³ Déficit en en lipoprotéine lipase (LPLD): Cette anomalie entraîne une activité fortement réduite des enzymes LPL nécessaires pour briser les volumineuses particules transportant la graisse qui circule dans le sang après chaque repas (chylomicrons), qui s'accumulent alors dans le sang, elles peuvent obstruer les petits vaisseaux sanguins. L'excès de chylomicrons entraîne une inflammation aiguë et répétée du pancréas, appelée pancréatite, un trouble très grave et douloureux, potentiellement mortel. Elle favorise la survenue de diabète et de complications cardiovasculaires.

Début 2014	Maladie de Parkinson (phase 1/2, un espoir!)	3 gènes: <i>synthèse de la dopamine: (AADC, TH et CH1)</i>	Lentivirus	Injection dans le striatum pour convertir ses cellules en «usines à dopamine»,
Depuis 2010 jusqu'à aujourd'hui	LAL (leucémie aigüe lymphoïde) ** Lymphome Non Hodgkinien ##	<i>Immunothérapie génique</i>	<i>T-CAR : Cellules T modifiées génétiquement ex vivo afin d'exprimer un TCR chimérique c.à.d. formé de plusieurs segments dont le segment extracellulaire reconnaît un antigène spécifique.</i>	Ces cellules ainsi modifiées ciblent alors les cellules tumorales portant l'antigène spécifique et les tuent.

* Glybera ®: 1^{ière} thérapie génique autorisée à la commercialisation par la Commission européenne en 2012.

Luxturna ® : approuvé par la FDA pour sa mise sur le marché en 2017

** Kymriah (tisagenlecleucel approuvé par la FDA pour sa mise sur le marché en 2017

Yescarta approuvé par la FDA pour sa mise sur le marché en 2017

2- Thérapie de l'avenir: LA REPROGRAMMATION CELLULAIRE vers le stade de cellule souche embryonnaire

Il s'agit de la transformation des **cellules adultes (différenciées) somatiques en cellules souches** susceptibles de **régénérer les tissus de l'organisme**. L'ADN d'une **cellule différenciée** est **reprogrammé** pour ressembler à celui d'une **cellule souche embryonnaire**. Les cellules souches obtenues peuvent être alors différenciées en **différents tissus**.

Procédés : Deux principaux procédés peuvent être utilisés.

1- Transfert de noyaux : c'est le principe du clonage « Brebis Dolly »

2- Transduction de facteurs de transcription : formation de cellules souches pluripotentes induites = iPS (induced pluripotent stem cells)

Ce dernier procédé **semble** être le meilleur car:

- Il ne nécessite pas le recours à des cellules souches embryonnaires (**pas de problème éthique**),
- Il peut utiliser les cellules de la personne même (**pas de problème de rejet par la suite**);

Intérêts:

1- **Thérapie de régénéscence** pour **différentes maladies** : **cancer, infarctus du myocarde, diabète, maladie de Parkinson, dégénéscence maculaire liée à l'âge (DMLA)...**

2- **Fabrication des lignées cellulaires à partir de donneurs atteints de maladies génétiques** pour obtenir des cultures cellulaires permettant l'**essai de molécules potentiellement thérapeutiques**.

