

Les outils de génie génétique

Le génie génétique a été rendu possible dès le début des années soixante-dix grâce à deux découvertes fondamentales : celle des enzymes de restriction, véritables « ciseaux moléculaires » permettant de couper l'ADN à des endroits bien précis, et celle des ligases, enzymes capables de « coller » ensemble des morceaux d'ADN préalablement purifiés. Avec ces enzymes et d'autres, on dispose d'une panoplie d'outils moléculaires spécifiques de l'ADN, capables de cliver, souder, réparer ou allonger des morceaux de l'information génétique.

I- Les enzymes

I.1- Les polymérases d'acides nucléiques

a) La transcriptase reverse

La transcriptase reverse transcrit l'ARN en ADN complémentaire (cDNA). Comme toutes les polymérases, cette enzyme travaille dans le sens 5' → 3'.

b) La DNA polymérase I

La DNA polymérase I est une enzyme bactérienne jouant un rôle majeur dans la réplication de l'ADN.

c) La poly A polymérase

Cette enzyme catalyse la formation d'une séquence polyadénylée à l'extrémité 3'OH des ARN messagers eucaryotes.

d) La RNA polymérase

Cette enzyme est universellement distribuée. Elle permet la transcription de l'ADN simple brin en ARN.

I.2- Les ligases

a) La DNA ligase d'E. coli

Les ligases assurent la formation de liaisons phosphodiester entre une extrémité 3'OH et une extrémité 5' phosphate de deux nucléotides incorporés dans un acide nucléique. La T4 DNA ligase, enzyme extraite de bactéries infectées par le phage T4 assure la même fonction que la ligase de E. coli.

b) La RNA ligase

Cette enzyme extraite de bactéries infectées par le phage T4, réalise la ligation de deux ARN en créant entre eux une liaison phosphodiester entre l'extrémité 3'OH libre de l'un et l'extrémité 5' phosphate libre de l'autre.

I.3- Les nucléases

a) La DNase I

La désoxyribonucléase (DNase I) est une enzyme extraite du pancréas est une endonucléase coupant préférentiellement après une pyrimidine en libérant une extrémité 3'OH et une extrémité 5' phosphate libres. La coupure peut se faire aussi bien sur un ADN simple brin comme sur un ADN double-brin.

b) La RNase

La RNase A hydrolyse les liaisons phosphodiester qui unissent les ribonucléotides des ARN. La coupure se fait spécifiquement après des pyrimidines seulement si l'ARN est simple-brin.

I.4- Les enzymes de restriction

Ce sont des nucléases qui sont capables de reconnaître spécifiquement une courte séquence d'ADN (de 4 à 8 nucléotides) et de la cliver au site reconnu. Ces enzymes permettent de fragmenter l'ADN en segments de taille réduite ou de couper tel ou tel site désiré. Elles permettent aux bactéries de reconnaître certains ADN de bactériophages et de les dégrader. Les bactéries se protègent elles mêmes de l'action de ces enzymes en modifiant leur propre ADN

aux sites de reconnaissance (sites de restriction). La modification consiste souvent en une méthylation de certaines bases contenues dans le site de restriction ; un ADN exogène non méthylé sera reconnu et dégradé. Il existe deux catégories de nucléases selon leur mode d'action : les exonucléases qui dégradent par excision du nucléotide situé en extrémité de chaîne (souvent en 3') et les endonucléases qui coupent des liaisons phosphodiester dans la chaîne.

Les enzymes de restriction peuvent donner deux types de coupures :

a) Les coupures à bouts francs : l'enzyme coupe exactement au même niveau sur les deux brins de l'ADN. Il ne peut pas y avoir d'association entre les fragments résultant de la coupure. Une ligation ne pourra être effectuée que par la T4 ligase.

Les enzymes de restriction sont utilisées pour établir la carte de restriction de toute la molécule d'ADN que l'on souhaite caractériser. Cela consiste à déterminer l'ordre des sites de restriction le long de ce fragment, en déterminant par électrophorèse la taille des fragments libérés.

b) Les coupures à bouts cohésifs : Les coupures sont décalées l'une par rapport à l'autre sur les deux brins. Après coupure, les parties simple-brin peuvent s'apparier.

Exemple de sites de reconnaissance et de coupure pour deux endonucléases de restriction dans une même molécule d'ADN.

```

AAGCTTTAAAGG|CCGAATTCGTATTGCAACGGCCACGTAACC
TTCGAAATTTCCGGCTTAAGCATAACGTTGCCGGTGCAATTGG
AGGCCATCCCCATTAGCAGGTTTAGAGAGGGGAATTCTAGCCC
TCCGGTAGGGGTAATCGTCCAAATCACACCCTTAAGATCGGG
  
```

Quelques nucléases de restriction couramment utilisées sont présentées dans le tableau suivant

Nucléase	Source (rappelée dans le nom de l'enzyme)	Site reconnu	Nucléase	Source (rappelée dans le nom de l'enzyme)	Site reconnu
Hae III	Hæmophilus ægyptus	I m G G C C C C G G I m	Hpa II	Hæmophilus parainfluenzæ	I m C C G G G G C C I m
Mbo I	Moraxella bovis	I m G A T C C T A G I m	Taq I	Thermus aquaticus	I m T C G A A G C T m I
Bam HI	Bacillus amyloliquefaciens	I m G G A T C C C C T A G G m I	Bgl II	Bacillus globiggi	I m A G A T C T T C T A G A m I
Eco RI	Escherichia coli	I m G A A T T C C T T A A G m I	Hin dIII	Hæmophilus influenza	I m A A G C T T T T C G A A I m
Eco RII	Escherichia coli	I m G C C T G G C C G G A C C G m I	Pst I	Providentia stuartii	I m C T G C A G G A C G T C I m

(I représente le site de coupure pour chaque brin, m un site de méthylation lorsqu'il est connu).

II- Les sondes moléculaires et hybridation moléculaire

L'ADN est dénaturé lorsqu'on le chauffe. L'hélice devient instable et les deux brins de cette molécule se séparent. Si on réduit la température, une réassociation des brins est progressivement observée. Elle porte le nom d'hybridation.

Les techniques d'hybridation permettent de détecter une séquence donnée parmi une population d'autres séquences, à l'aide d'une sonde. Une sonde est un fragment d'ADN dont la séquence est complémentaire à celle recherchée. La sonde est marquée par incorporation d'atomes radioactifs ou de groupements fluorescents. La détection d'une séquence homologe à la sonde est possible par le biais de l'appariement des séquences complémentaires.

III- Les vecteurs

Les opérations du génie génétique rassemblent toutes les manipulations que l'on peut faire sur un fragment d'ADN, entre le moment où on le prélève dans une cellule et celui où il sera intégré dans une cellule receveuse. Elles débutent par l'isolement d'un ADN et son découpage par des enzymes de restriction. La recombinaison in vitro consiste à souder artificiellement le morceau d'ADN obtenu à un autre, le support ou vecteur qui peut être un plasmide ou un phage. Le fragment d'ADN choisi peut aussi être multiplié en de nombreux exemplaires, soit par réplication du vecteur, soit par la technique de la PCR (multiplication de l'ADN grâce à des enzymes spécifiques appelées ADN polymérases). Les dernières étapes comprennent l'insertion du fragment d'ADN dans une cellule ou un organisme receveur et l'expression de ce nouveau matériel (phénomène au cours duquel le gène cloné va générer son produit, une protéine).

IV- Quelques méthodes de génie génétique appliquées en médecine

IV.1- Amplification enzymatique (PCR)

Les techniques d'amplification de l'ADN (PCR, pour Polymerase Chain Reaction) utilisent une enzyme, la polymérase thermostable (la Taq polymérase), capable de répliquer rapidement, in vitro, un fragment d'ADN quelconque, pourvu qu'y soient fixées des amorces (petits brins d'ADN complémentaires permettant d'initialiser la réaction de polymérisation). Chaque cycle de PCR s'effectue en trois phases. La première consiste en la dénaturation par la chaleur de la double hélice d'ADN du fragment à amplifier (figure 1).

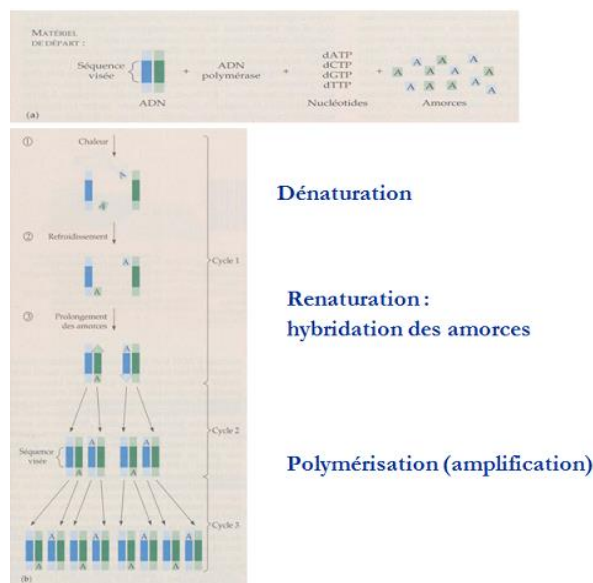


Figure 1. Schéma de l'amplification enzymatique de l'ADN

Les deux brins sont alors séparés. La température de la solution est ensuite abaissée, de façon que les amorces puissent s'associer aux brins séparés. La troisième phase est celle de la polymérisation proprement dite. La température est à nouveau augmentée, et l'ADN polymérase utilisé duplique les brins. À chaque nouveau cycle, l'enzyme duplique tous les brins d'ADN présents dans la solution, ce qui permet d'obtenir plus d'un million de copies du fragment de départ en seulement quelques heures.

IV.2- RFLP

Les enzymes de restriction coupent les deux brins de l'ADN de manière définie en fragments dont la taille dépend de la présence des sites de restriction. Ainsi, les fragments obtenus après digestion d'une séquence d'ADN par une enzyme de restriction, peuvent être caractérisés par la position relative des sites de coupure. La distance entre chaque site de restriction peut être définie par la taille des fragments obtenus.

Une carte de restriction est définie par l'ordonnancement et la position relative des sites de restriction présents sur un segment déterminé d'ADN.

IV.3- Séquençage d'ADN

Le séquençage d'ADN est le plus couramment pratiqué en raison de sa relative facilité de mise en œuvre suivant le protocole enzymatique de Sanger. Il est possible de déduire d'une séquence nucléotidique, la séquence de la protéine codée par la région analysée.

Le fragment d'ADN à séquencer doit être inséré dans l'ADN plasmidique. La synthèse est débutée grâce à une amorce marquée avec un groupement fluorescent de couleur différente, et dont la séquence est complémentaire d'une séquence d'ADN plasmidique (figure 2). Le fragment d'ADN inséré est répliqué avec l'ADN du plasmide. L'insertion d'un didésoxyribonucléotide arrête la synthèse de l'ADN en cette position. Ainsi, une série de fragments d'ADN néo-synthétisé se termine chacun par un didésoxynucléotide. Ces fragments sont séparés par électrophorèse et les molécules seront détectées en fonction de leur taille et leur type de fluorescence, permettant alors de reconstituer l'ensemble de la séquence du fragment.

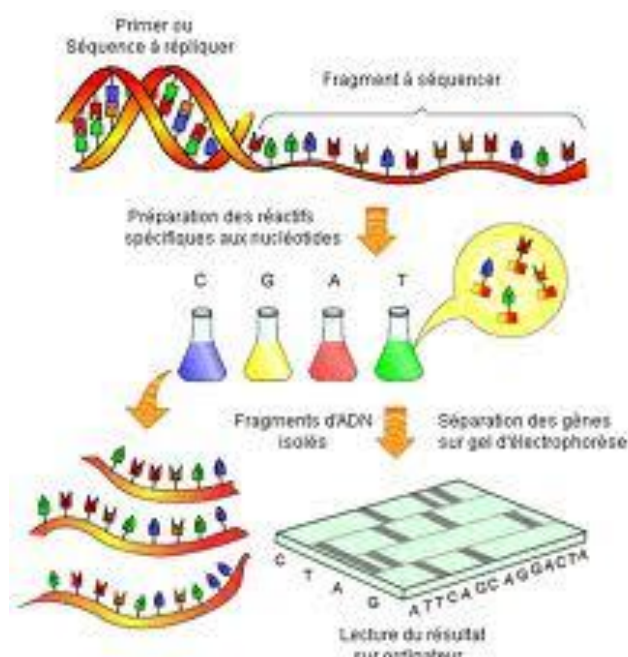


Figure 2. Schéma du séquençage de l'ADN

V- Génie génétique et industrie

Les principales applications du génie génétique concernent l'industrie pharmaceutique (production de substances médicamenteuses fabriquées par des cellules modifiées, qui deviennent de véritables micro-usines de production), la médecine, avec la thérapie génique.

- **Etude du fonctionnement d'un gène :** Grâce à la transgénèse, on peut créer des modèles animaux porteurs de gènes défectueux, et reproduire des maladies humaines pour mieux les étudier. L'animal de choix pour ces modèles reste la Souris. L'étude des gènes peut s'effectuer aussi dans d'autres systèmes dits "in vitro" : les cellules en cultures par exemple.

- **Produire des protéines recombinantes d'intérêts thérapeutiques ou alimentaires :** Le gène d'intérêt est isolé d'un mélange d'ADN, grâce aux enzymes de restrictions. Puis, il est séparé par les techniques d'électrophorèse. Recollé, grâce aux ligases, dans un plasmide appelé vecteur ; on obtient un ADN recombinant. Le vecteur est transféré dans un organisme. La production de protéine est induite de façon contrôlée ; et peut être purifiée et utilisée. Cette technique s'applique à des organismes simples tels que les bactéries ou les levures. Parmi les médicaments produits par génie génétique, citons l'insuline et le facteur de coagulation VIII.

- **Inventer de nouvelles approches thérapeutiques :** la thérapie génique est une technique prometteuse qui utilise le gène comme médicament pour traiter une maladie due au déficit ou au dysfonctionnement d'un gène essentiel. Cette forme de médecine, encore expérimentale, se concentre sur l'origine moléculaire des maladies. Elle met en œuvre les dernières techniques de manipulation de l'ADN. Le spectre d'action de la thérapie génique ne cesse de s'étendre et vise aujourd'hui des affections telles que le cancer, le sida, la mucoviscidose et même certaines affections neurologiques telles que la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer.