

---

# Transgénèse

---

Cours Master 1

---

Option : Génétique

---

SAHLA MAHLA

المصدر الاول للطلاب الجزائري



Réalisé par : Mme Belkhiter. S

2021/2022

# La transgénèse

La transgénèse, comme le transfert de gène isolé dans des cellules en culture, est une suite logique à l'isolement des fragments d'ADN portant une information génétique. En effet, seule une cellule ou mieux un organisme entier sont susceptibles de fournir certaines informations sur les mécanismes qui contrôlent l'expression des gènes. Ce fait a été révélé, sans qu'on le perçoive bien, dès les premières expériences de transgénèse. Le gène de globine utilisé s'est en effet avéré inactif à l'état de transgène. Cette observation incompréhensible à l'époque a conduit une décennie plus tard à définir la notion de LCR (locus control region). Tout ceci est encore plus vrai lorsque l'on cherche à définir le rôle des gènes dans l'expression des fonctions biologiques. La transgénèse est donc par essence le retour du gène isolé dans son contexte naturel complexe qu'est l'organisme. La transgénèse comprend deux opérations distinctes : l'**addition** et le **remplacement** de gène. La première est très largement pratiquée et chez plusieurs espèces. Pour des raisons d'ordre technique, la seconde commence seulement à être mise en œuvre chez des espèces autres que la souris.

L'**addition de gène**, réalisée pour la première fois en 1980-1982, a rapidement montré que le transfert de gène n'était pas fondamentalement très difficile, à condition toutefois de mettre en œuvre la technique de **microinjection** qui est un peu délicate. Le fait que les souris qui abritaient un gène d'hormone de croissance exogène avaient une croissance augmentée a fortement frappé les esprits, dans la mesure où la modification de caractères phénotypiques paraissait relativement simple à obtenir de cette manière. Très rapidement, toute une série d'applications potentielles ont été proposées qui deviennent petit à petit des réalités. Le remplacement de gène chez des animaux entiers n'est venu que dix ans plus tard et a été réservé à la souris jusqu'à 1999. La transgénèse expérimentale est désormais une des opérations incontournables dans l'étude des gènes (figure 1). Ceci ne va faire que s'accroître avec la possibilité désormais offerte d'identifier systématiquement l'ensemble des gènes d'un génome. Le succès de la transgénèse dépend encore pour une part de la maîtrise de certaines techniques. L'addition et le remplacement de gène sont des techniques laborieuses mais standardisées chez la souris. Il n'en est pas de même pour d'autres espèces, notamment pour les oiseaux et les gros mammifères. Chez les plantes, l'addition de gènes est largement utilisée mais est plutôt laborieuse lorsqu'elle met en œuvre la biolistique. Le remplacement de gène chez les végétaux n'est encore qu'une curiosité de laboratoire. Une des limites de la transgénèse par addition de gènes réside dans le fait que beaucoup de transgènes ne fonctionnent pas de manière satisfaisante. Il apparaît de plus en plus clairement que ceci est dû à l'incapacité des expérimentateurs à construire des gènes actifs, et à la méconnaissance qu'ils ont encore de ce que sont réellement les mécanismes de contrôle de l'expression génétique. La transgénèse apporte dans ce domaine une moisson d'informations essentielle dont elle est directement bénéficiaire. Malgré ses imperfections, la transgénèse a été largement adoptée par les expérimentateurs ainsi que par certains industriels. Environ 1 000 gènes ont été modifiés par **recombinaison homologue** chez la souris.

Les gènes peuvent être isolés par les méthodes classiques de clonage (1), par l'utilisation de marqueurs microsatellites (2) ou par la séquence systématique des ADNc et des génomes (3). Les gènes isolés peuvent être étudiés en tant que tels, utilisés pour réaliser des diagnostics et de la sélection ainsi que pour produire les protéines correspondantes et procéder à une thérapie génique ou à une transgénèse (figure 1).

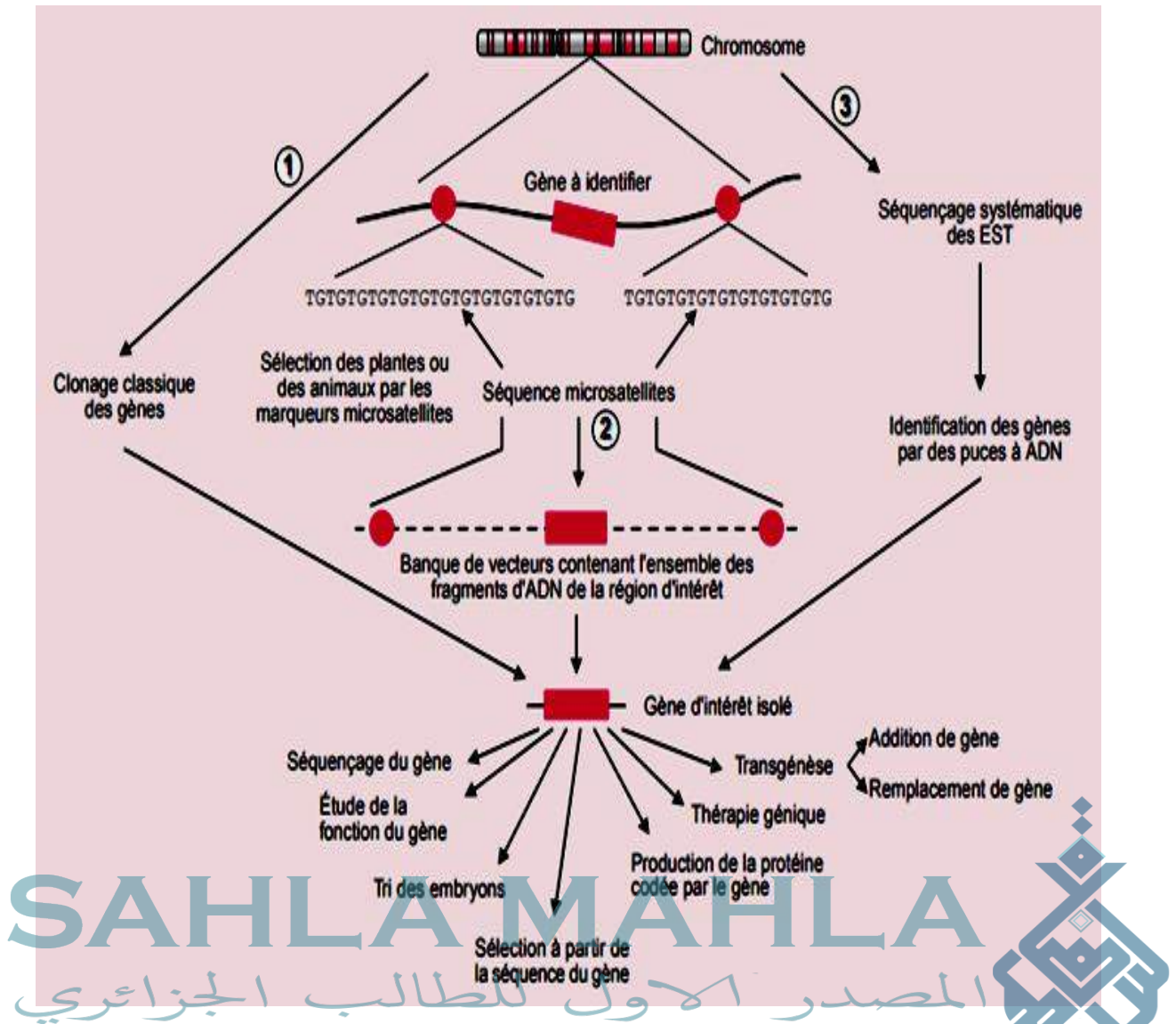


Figure 1. Principales utilisations des gènes isolés.

## 1. Méthodes physiques et vecteurs en transgénèse :

### 1.1. Les méthodes dites physiques,

- ❖ **La micro-injection** d'un transgène dans le noyau des cellules compte sans doute parmi les approches physiques les plus efficaces. Même si les rendements sont faibles et l'équipement nécessaire lourd, elle permet d'obtenir des clones cellulaires stables.

Elle permet également d'introduire des fragments de grande taille (GCV, YAC, BAC...). Elle reste jusqu'à maintenant la technique communément utilisée pour générer des modèles OGM (organismes génétiquement modifiés).

- ❖ **L'électroporation** consiste à introduire un fragment d'acides nucléiques dans le cytoplasme cellulaire à la faveur de pores transitoires générés au travers de la membrane plasmique par un champ électrique.

Cette technique permet elle aussi d'introduire des constructions de grande taille.

Elle s'applique à de très nombreux types cellulaires, les cultures primaires, les cellules ES (pour Embryonic Stem, ou cellules souches embryonnaires)...

Cette approche permet de réaliser des transfections de cellules pour lesquelles il n'existe pas de virus recombinants et où les conditions de culture cellulaire rendent les vecteurs synthétiques inopérants.

C'est notamment le cas des cellules issues des organismes marins ou des cellules végétales avec une paroi.

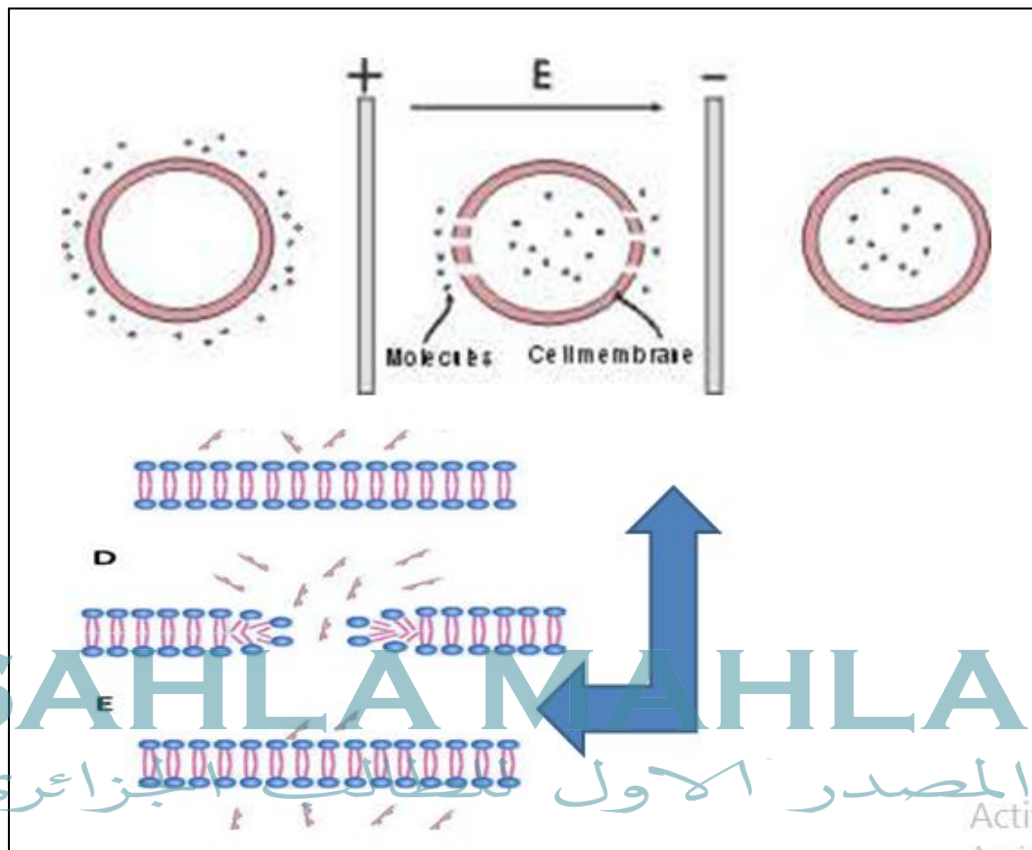


Figure 2 : Eléctroporation

- ❖ **La biolistique**, aussi appelée gene gun, consiste à propulser avec une très grande vitesse des microbilles de métal (or ou tungstène) recouvertes d'ADN.

L'ensemble sera progressivement freiné lors de la traversée des différentes membranes cellulaires.

L'ADN sera ensuite relargué dans le cytoplasme pour gagner le noyau où il sera exprimé pendant une durée plus ou moins longue.

Cette méthode de transfert de gènes direct est particulièrement appliquée aux cals végétaux mais aussi aux organites comme les chloroplastes et les mitochondries.



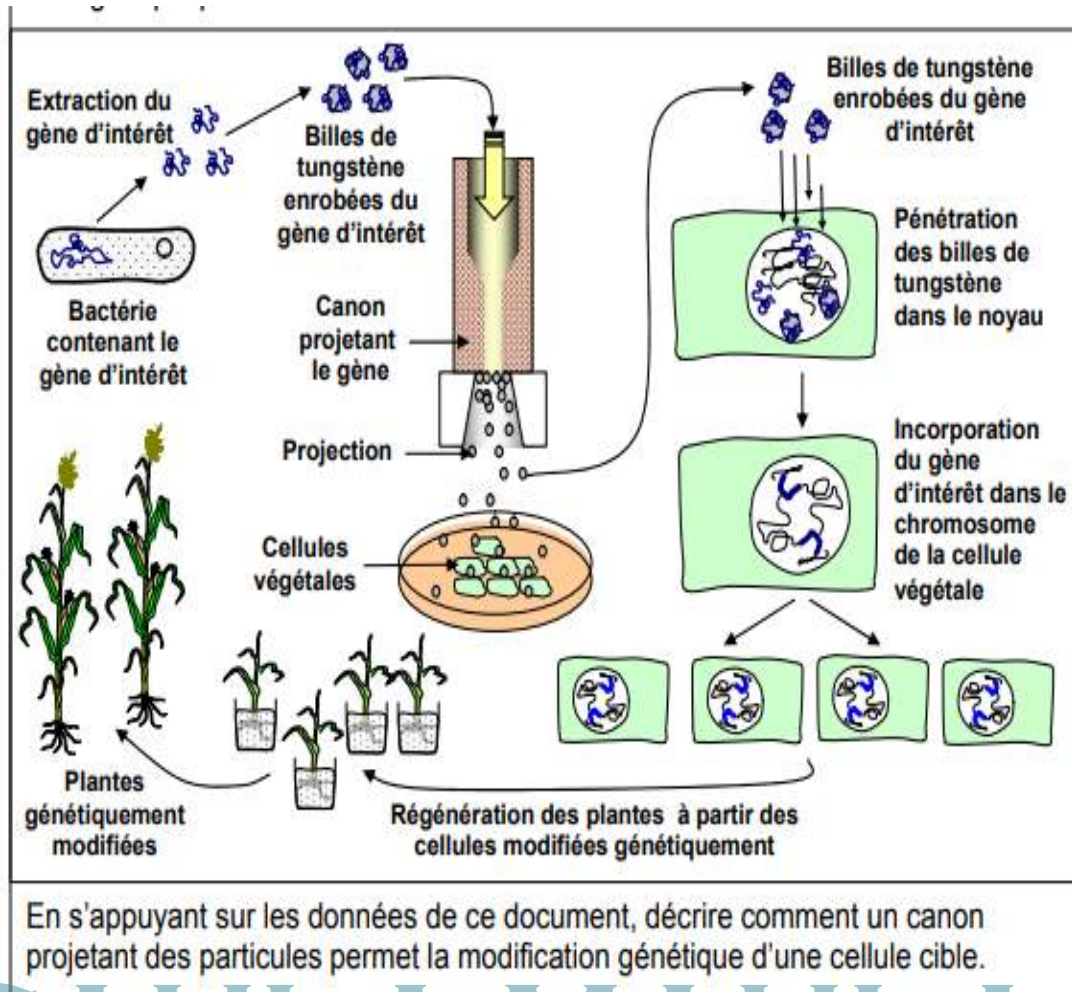


Figure 3 : Transgène par biolistique ou canon à ADN

❖ La **magnétofection** repose sur la combinaison de constructions d'acides nucléiques et de nanoparticules magnétiques. Cette approche permet, grâce à la focalisation générée par le champ magnétique, de concentrer rapidement la dose de vecteurs sur les cellules cibles pour promouvoir leur internalisation.

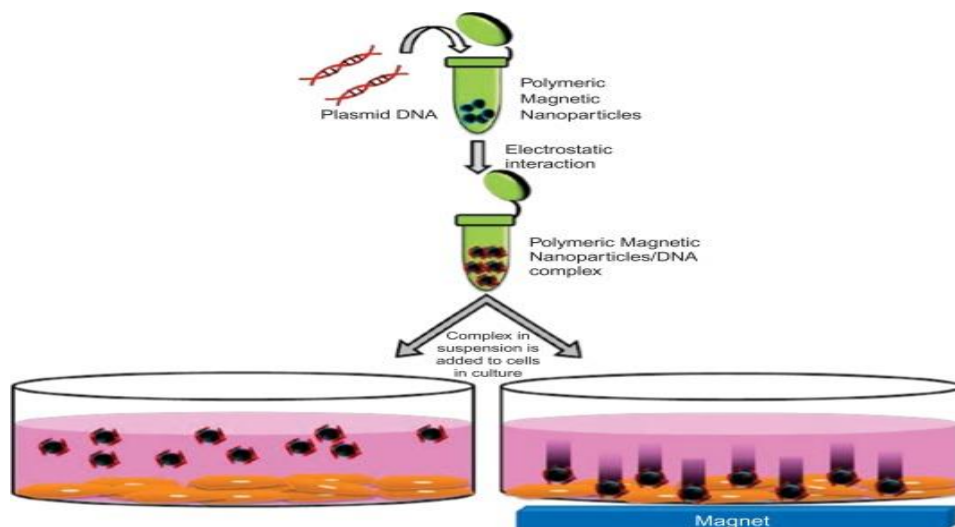


Figure 4 : Magnétofection

## 1.2. Vecteurs viraux recombinants

Ces types de vecteurs dérivent de virus recombinants dépourvus de gènes de virulence indispensables aux cycles infectieux,

Les gènes de virulence sont remplacés par la séquence du gène d'intérêt ce qui nécessite une production biologique à l'aide de cellules d'encapsidation.

Parmi les vecteurs à ADN, on retrouve notamment les adénovirus, les virus adéno associés ou AAV (Adeno Associated Virus) et les virus de l'herpès.

- ❖ **Les adénovirus** sont des virus à ADN double brin, non enveloppés et non intégratifs à la capacité d'encapsidation d'environ 30 kb.

Ils induisent ainsi une expression transitoire mais génèrent également une réaction inflammatoire importante qui peut perturber l'expression du transgène.

- ❖ **Les virus adéno-associés** sont, quant à eux, de petits virus à ADN simple brin. Ils sont dits associés car ils nécessitent l'aide d'un adénovirus pour se répliquer.

Contrairement aux adénovirus, ils induisent une très faible réaction inflammatoire.

Leur capacité d'encapsidation est en revanche relativement faible (environ 4 à 5 kb).

- ❖ **Virus de l'herpès**, ce sont des virus à ADN appartenant à la famille des virus responsables de la varicelle et du zona.

Ils ont un fort tropisme pour les cellules du système nerveux central et périphérique.

Ils sont cependant neurotoxiques.

Leur expression est transitoire et leur capacité d'encapsidation est d'environ 20 kb.

- ❖ **Les vecteurs à ARN** sont principalement dérivés de **retrovirus** ou de **lentivirus**.

Contrairement aux adénovirus et aux AAV, les rétro et lentivirus sont des virus intégratifs permettant une expression à long terme.

Les lentivirus transfectent aussi bien les cellules en division que les cellules quiescentes.

Leur capacité d'encapsidation est de 9 à 10 kb.

Toutefois, ces vecteurs viraux, bien que particulièrement efficaces sur le plan du transfert de gènes, peuvent induire une réponse inflammatoire ou immunitaire importante et/ou une insertion génomique pouvant conduire à une prolifération cellulaire incontrôlée.

## 1.3. Vecteurs synthétiques ou non viraux

Cette catégorie recouvre l'ensemble des approches chimiques utilisées dans le domaine du transfert de gènes. Les polymères et les lipides cationiques sont des molécules capables de s'assembler par interactions électrostatiques avec le polymère anionique qu'est l'ADN.

De ces auto-assemblages vecteur/acides nucléiques résultent des complexes nanométriques, appelés respectivement polyplexes (50 à 70 nm de diamètre) ou lipoplexes (80 à 120 nm), pouvant être internalisés dans les cellules par les voies d'endocytose.

Si un nombre très important de molécules ont été synthétisées et présentent une efficacité très acceptable in vitro variant en fonction du type cellulaire, un nombre extrêmement restreint de vecteurs chimiques ont fait la preuve de leur efficacité in vivo, notamment dans des conditions d'utilisation en essais cliniques.

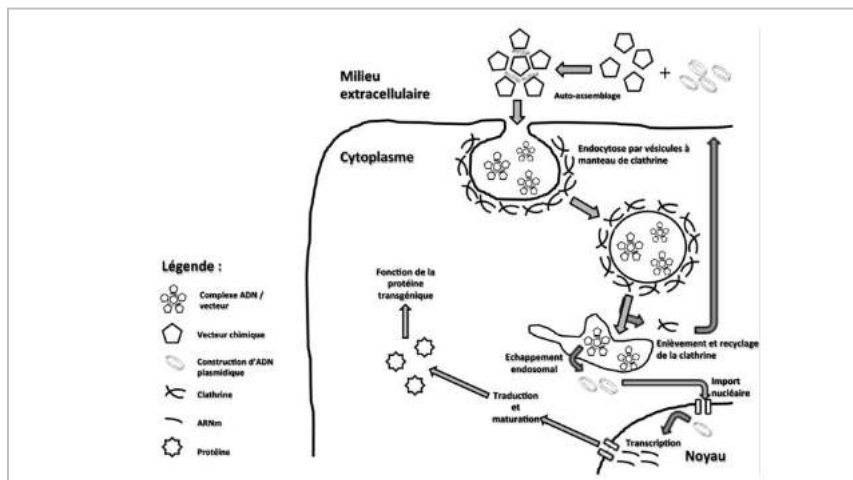


Figure 5 : Un exemple de vecteurs synthétique

## 2. Les types de transgénèse

### 2.1. La transgénèse « au hasard »

Une technique très répandue consiste à injecter le gène (plusieurs milliers de copies du transgène sont injectés dans le pronucleus mâle) dans l'oeuf au stade une cellule, directement dans le pronucleus mâle, le plus gros et le plus proche de la surface.

L'embryon commence sa segmentation et est introduit dans une mère porteuse où il termine son développement. En moyenne seulement 1 à 10% des animaux nés expriment le transgène.

### 2.2. La transgénèse ciblée

Il est possible de faire une transgénèse ciblée, par recombinaison homologue.

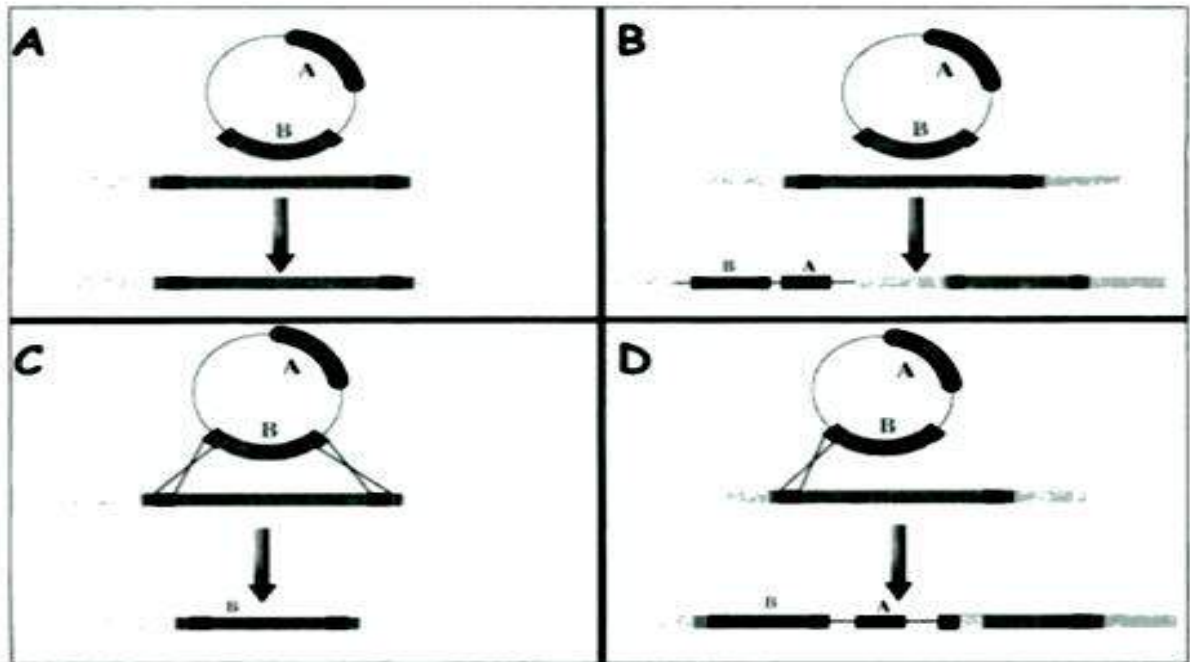
Ceci consiste à non pas ajouter un gène qui s'intègre n'importe où dans le génome, ce qui peut avoir des conséquences imprévisibles pour la cellule, mais à le faire placer au locus voulu dans l'ADN.

C'est une des méthodes qui permet l'inactivation spécifique d'un gène (gène-KO), afin d'en connaître le rôle précis.

## 3. Recombinaison homologue

Les recombinaisons au hasard sont infiniment plus fréquentes que les recombinaisons homologues, si bien que chez la plupart des animaux, comme chez les plantes, les transgènes s'intègrent n'importe où dans un chromosome quelconque du noyau lorsque l'on microinjecte de l'ADN dans l'œuf. Certaines cellules animales ont des mécanismes de réparation de l'ADN qui permettent à un fragment d'ADN étranger de prendre la place d'un gène endogène par processus de recombinaison homologue. Ceci n'est possible que si l'ADN exogène proposé présente de longues séquences homologues à celle du gène endogène cible. Ce phénomène est très fréquent chez les bactéries, les levures et rare chez certains animaux (0,1 %). La recombinaison homologue permet de remplacer très précisément une séquence d'ADN par une autre dont une partie seulement sera homologue à la première, ce mécanisme biologique

peut donc être utilisé pour remplacer un gène à un autre. Il est assez bien métriser au niveau des cellules souches embryonnaires chez la souris (figure 2).



**Figure n° 30:** Principe de la recombinaison homologue. **A.** Exemple d'un plasmide arrivant dans le noyau d'une cellule ou il n'est pas intégré à l'ADN génomique. **B.** Le plasmide est intégré en totalité dans un chromosome par recombinaison illégitime. **C.** La double recombinaison homologue entre les séquences homologues (en noir) portées à la fois par le plasmide et par l'ADN génomique conduit à l'échange de la région comprise entre ces deux zones d'homologie donc à l'intégration de la séquence B dans le chromosome. **D.** La recombinaison homologue n'a lieu qu'à partir d'une paire de séquences homologues conduisant à l'intégration de la totalité du plasmide dans le chromosome. A la différence du deuxième cas présenté, l'intégration est ciblée : elle se produit au niveau d'une séquence homologue.

#### 4. Les mutagenèses

##### 4.1. Mutagenèse par délétion

L'un des moyens pour évaluer le rôle d'une séquence d'ADN donnée est de la supprimer.

L'analyse des modifications physiologiques qui suivent cette excision permet alors de connaître le rôle de la séquence « délétee ».

##### Le principe :

- Une coupure par une enzyme de restriction suivie de l'action de la nucléase S1 permet de retirer de 3 à 8 paires de bases suivant le type d'enzyme de restriction (largeur du site de reconnaissance)
- Une coupure par une enzyme de restriction suivie de l'action de l'exonucléase III permet également de retirer plus de bases en fonction du temps d'incubation. La nucléase S1 est toujours utile pour raboter les extrémité 5'.
- Une coupure par une enzyme de restriction suivi de l'activité de la nucléase Bal 31 qui dégrade les deux extrémités de l'ADN à la fois. L'étendue du retrait dépend du temps d'incubation. La fermeture des deux extrémités restantes est toujours réalisée par la T4 ligase qui peut joindre deux molécules de DNA ayant des bouts francs.



## 4.2. Mutagenèse par insertion:

L'insertion d'une courte séquence dans un gène permet d'élucider l'effet de position soit d'une base soit d'une séquence de bases dans les phénomènes de régulation, ou pour connaître l'influence d'un acide aminé dans le fonctionnement d'une protéine.

Le principe utilise les mêmes méthodes que pour la délétion.

Le fragment que l'on veut insérer ou modifier est, soit une substitution de nucléotides, soit un fragment de restriction purifié, soit un oligonucléotide de synthèse.

Nous allons voir - La mutagenèse dirigée au moyen d'oligonucléotides:

## 4.3. Mutagenèse dirigée (Ciblée) au moyen d'oligonucléotides

Le remplacement ciblé de gène est un outil tout aussi valable pour disséquer la fonction d'un gène cloné. Un gène sauvage d'intérêt est substitué par un allèle contenant des mutations spécifiques au niveau d'un site précis à l'intérieur d'un gène cloné. La mutagenèse dirigée est utilisée pour déléter, insérer, ou changer un ou plusieurs nucléotides dans une séquence d'ADN.

La première méthode classique de mutagenèse dirigée est le clonage du gène d'intérêt et la détermination de sa séquence d'ADN. La séquence d'ADN est examinée et le site de la mutation ainsi que sa nature sont choisis. Le gène ou un fragment de gène est cloné dans le bactériophage M13. Le M13 existe sous deux formes : la forme ADN double brin appelée répllicative et la forme simple-brin qui est extrudée de la cellule bactérienne. Une fois que le gène d'intérêt est cloné dans M13, la forme simple-brin du génome M13 est récoltée *in-vitro* comme matrice pour créer une mutation dirigée.

La seconde étape de la mutagenèse dirigée est de concevoir et de synthétiser un oligonucléotide qui soit complémentaire d'une région du gène d'intérêt mais qui contienne la mutation souhaitée. L'oligonucléotide peut ne mesurer que 18 nucléotides. La mutation peut être un changement d'un ou plusieurs nucléotides, ou peut être une petite délétion ou insertion.

L'oligonucléotide synthétisé est ensuite hybridé à la molécule d'ADN simple brin M13 de façon à ce qu'il s'apparie à la région complémentaire sur le gène cloné dans M13. La région qui n'est pas complémentaire (c'est-à-dire la mutation) ne s'apparie pas avec le gène d'intérêt dans le clone simple-brin M13. Une polymérase d'ADN purifiée est ajoutée à la réaction ainsi qu'un mélange de nucléotides (d'ATP, dCTP, dTTP, dGTP). La polymérase d'ADN allonge l'extrémité 3' de l'oligonucléotide pour créer une molécule d'ADN M13 double-brin. Une ligase d'ADN est ajoutée pour ligaturer le brin d'ADN nouvellement synthétisé. La molécule d'ADN double-brin M13 ainsi formée est introduite dans des bactéries *E.coli*. Les bactéries répliquent la molécule d'ADN double-brin M13. Etant donné la réplication de l'ADN est semi-conservative, la moitié des molécules d'ADN répliquées va porter la mutation tandis que l'autre moitié va porter la version sauvage du gène cloné.

Les versions mutées de la molécule de M13 sont ensuite sélectionnées à l'aide de plusieurs procédures moléculaires de criblage.

Après synthèse de la version mutée du gène, celle-ci peut être isolée du vecteur M13 et sous-clonée dans de nombreux autres vecteurs différents, puis introduite dans des cellules en culture ou des organismes modèles pour tester la fonction du gène mutant.

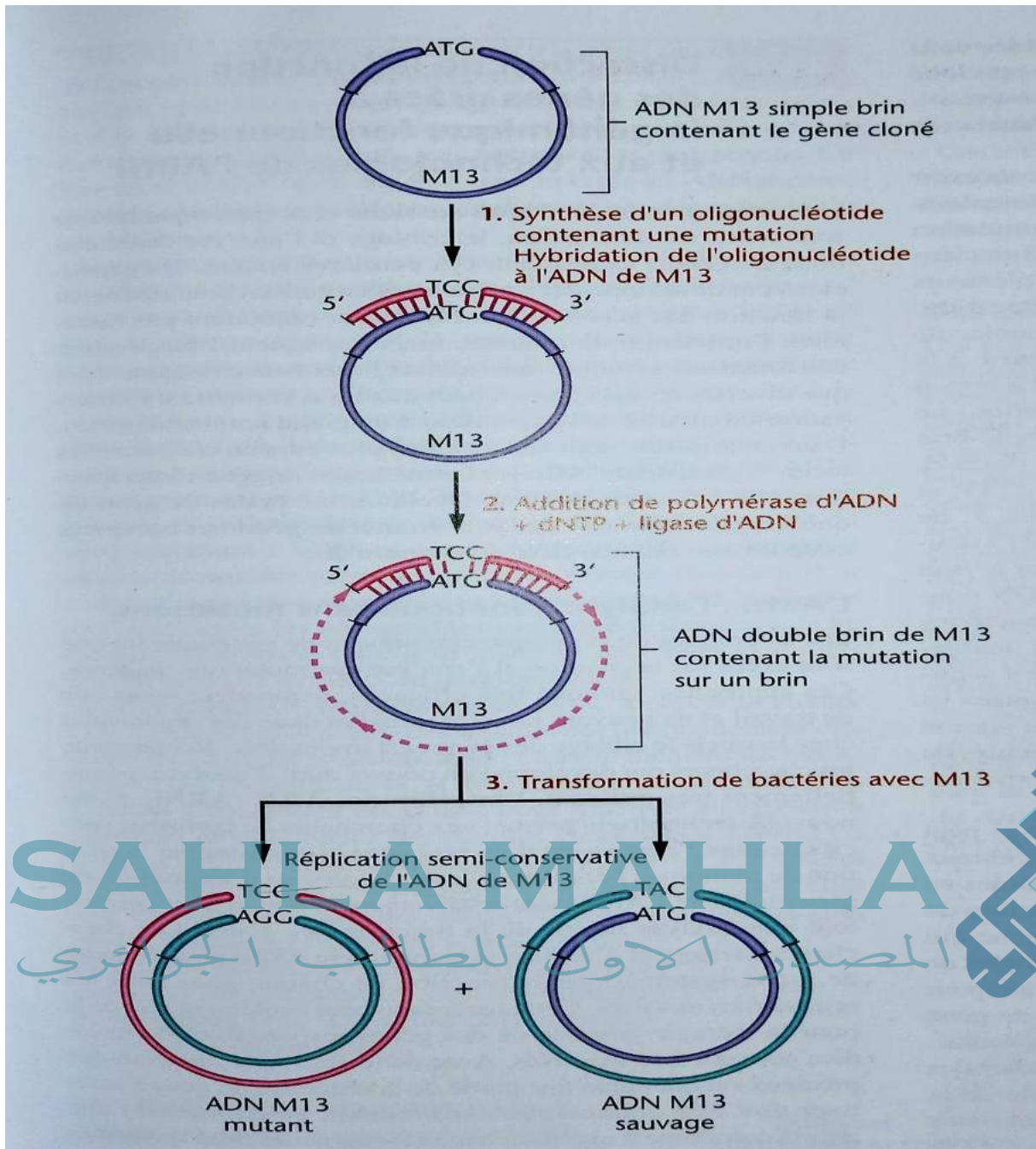


Figure 7 : Mutagenèse dirigée réalisée à l'aide d'oligonucléotides

#### 4.4 . La mutagenèse insertionnelle ciblée par recombinaison homologue

On peut cibler le site de la mutagenèse insertionnelle en introduisant une séquence homologue au gène que l'on veut léser.

Celle-ci reconnaît sélectivement le gène endogène et provoque une recombinaison homologue responsable soit **d'une insertion par addition**, soit **une insertion par remplacement**.

Dans le cas d'une insertion par remplacement, le gène cible est inactivé.

Dans le cas d'une insertion par addition, les deux gènes sont présents dans le génome.

#### 4.5. Mutagenèse par PCR

La création d'une mutation artificielle peut être obtenue dans un gène par le jeu des amplifications à partir d'amorces modifiées.

On prépare l'amplification du gène ou du cDNA grâce à deux amorces placées en amont et en aval de la séquence d'intérêt.

On prépare aussi par synthèse des oligonucléotides conformes aux séquences des deux brins du gène autour du codon qui doit être modifié mais dont les bases sont volontairement changées pour qu'elles permettent la synthèse d'un brin complémentaire comprenant la substitution (ou la délétion...) souhaitée.

On fait une première amplification entre chacune des amorces modifiées et les amorces des extrémités. En réunissant ces deux amplifications et en dénaturant l'ADN, on conduit à une renaturation entre les fragments au niveau des amorces centrales modifiées.

Cette hybridation fait apparaître des extrémités 3'OH d'où l'élongation (Taq polymérase) peut se poursuivre jusqu'aux extrémités de la séquence d'intérêt.

La poursuite des cycles en présence des amorces amont et aval conduit à l'amplification de cette séquence complète dans laquelle le codon muté a été inséré.

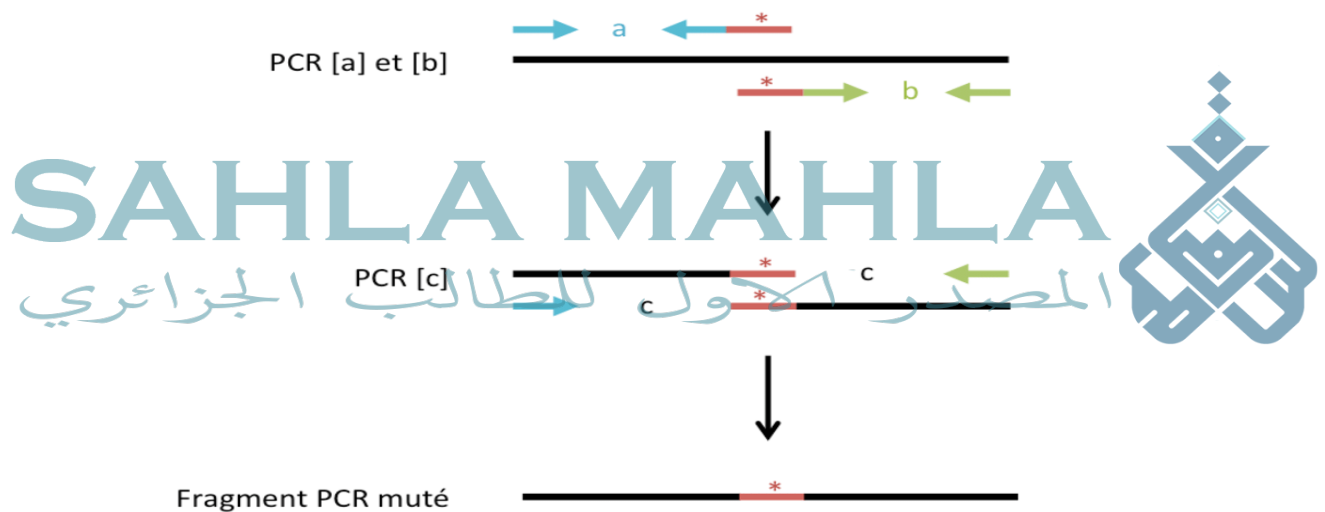


Figure 8 : Mutagenèse par PCR

#### 4.6. La mutagenèse dirigée par les nucléases ciblées (par le système CRISPR-Cas9)

Le système CRISPR-Cas9 basé sur une interaction de type ARN-ADN, découvert en 2012.

Ce système plus rapide à mettre en œuvre, moins coûteux et plus spécifique a ainsi pu être développé dans les années suivantes chez une grande variété d'organismes animaux et végétaux, modèles et non modèles.

Le système CRISPR-Cas9 a été initialement découvert chez certaines bactéries et correspond à un système immunitaire natif.

Leur génome contient en effet des loci CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats) constitués de différents éléments :

- (i) un opéron cas de gènes codant des protéines comprenant des domaines nucléase et hélicase et de fait capables de reconnaître et cliver l'ADN ;
- (ii) un locus composé d'une succession d'éléments répétés et de séquences d'ADN viral ou plasmidique (le CRISPR repeat-spacer array) ;
- (iii) un locus produisant un ARN non codant, le tacrRNA (trans-acting crRNA) voir explication sur la figure 9 et 10.

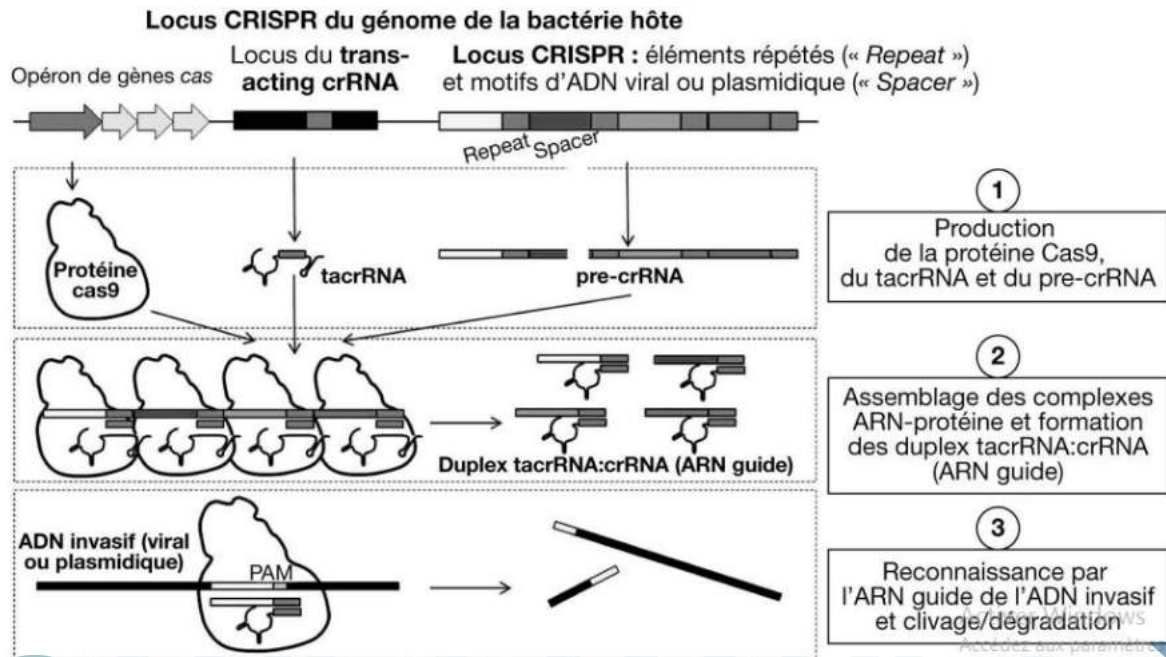


Figure 9 : La mutagenèse dirigée par les nucléases ciblées (par le système CRISPER-Cas9)

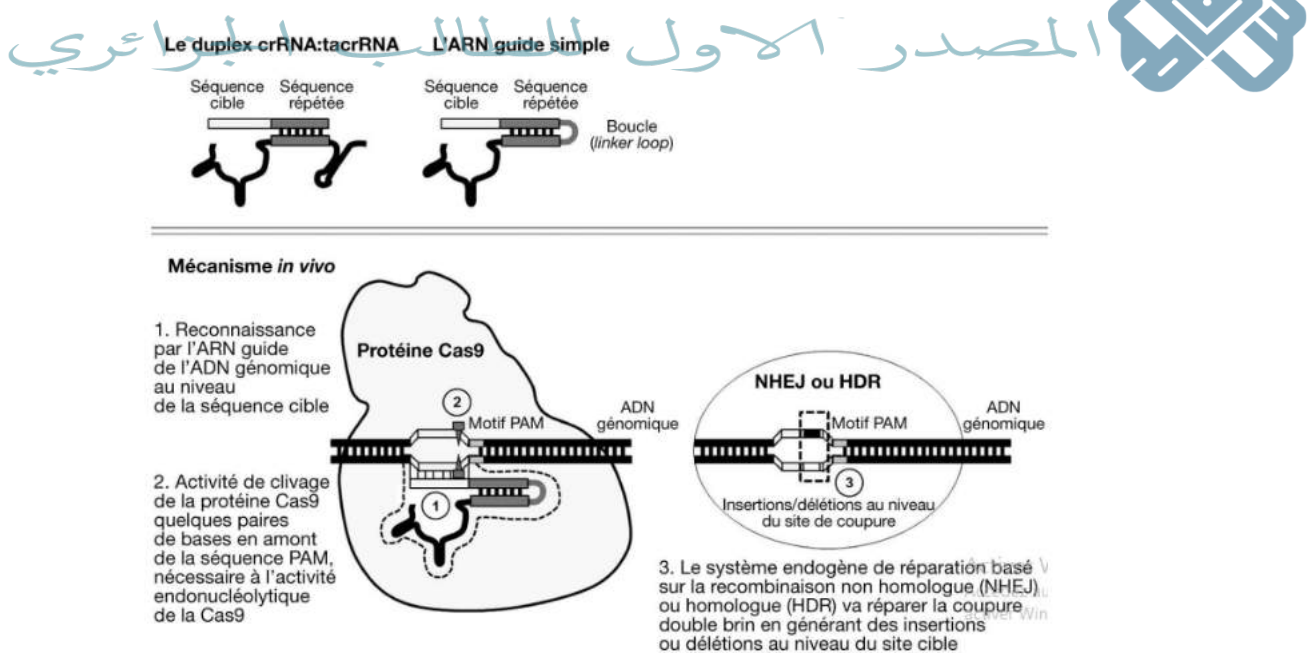


Figure 10 : Principe de la technologie CRISPR-Cas9.



## 5. Criblage de gènes

Les techniques puissantes que les généticiens utilisent pour comprendre la fonction des gènes sont l'invalidation de gènes le remplacement de gènes après mutagenèse dirigée, techniques connues sous le nom de criblages de gènes. Le criblage de gène peut être réalisé dans la plupart des organismes modèles incluant la levure, souris et la drosophile.

### a- Chez la levure

Le remplacement de gènes spécifiques (figure 11) est particulièrement efficace en raison d'un taux élevé de recombinaison mitotique. Le gène *KanMX* (qui confère la résistance à l'antibiotique G418) est inséré dans une copie clonée du gène à inactiver (gène *X*), celui-ci est interrompu par la cassette *KanMX* est introduit dans des cellules diploïdes de levure. Des événements de recombinaison homologue se produisent entre le gène cloné invalidé et un chromosome de la cellule diploïdes de levure, ce qui conduit à une souche de levure hétérozygote pour le gène invalidé. Après sporulation, les quatre spores haploïdes de l'asque sont disséquées et sont mises en culture sur un milieu contenant du G 418 (antibiotique). Toute spore capable de pousser sur ce milieu porte le gène *X* interrompu par le gène *KanMX*.

### b- Chez les souris

Les invalidations de gènes (figure 12) sont plus difficiles à réaliser. D'une part, il faut réaliser une culture de cellules souches embryonnaire (cellules ES). Les cellules sont prélevées sur des embryons de souris au stade blastocyste et mises en culture. Dans des conditions adéquates, ces cellules vont pousser et se diviser en culture sans se différencier. D'autre part, il faut également disposer d'une version invalidée du gène d'intérêt. Les chercheurs invalident le gène, préalablement cloné en introduisant un fragment d'ADN contenant un gène de résistance à un antibiotique tel que *neo<sup>r</sup>*. Ce fragment est alors intégré dans une molécule d'ADN recombinante plus grande qui contient notamment le gène *tk* du virus de l'herpès simplex. Ce vecteur, contenant le gène invalidé et les gènes *neo<sup>r</sup>* et *tk*, est appelé **vecteur de ciblage**. L'allèle *neo<sup>r</sup>* confère la résistance à l'antibiotique néomycine. Le gène viral *tk* code une enzyme la thymidine kinase, qui phosphoryle sélectivement des analogue de nucléosides tels que le ganciclovir. Si une cellule exprimant le gène *tk* est mise en culture en présence de ganciclovir, l'analogue de nucléoside phosphorilé devient un inhibiteur toxique de la réplication de l'ADN cellulaire.

Quand le vecteur de ciblage est introduit dans la cellule ES en culture, deux événements de recombinaison différents sont possible. Premièrement, le vecteur de ciblage peut s'intégrer dans le gène d'intérêt, présent dans les cellules ES, par recombinaison homologue, impliquant les régions de séquences identiques qui flanquent le gène *neo<sup>r</sup>*. Deuxièmement, le vecteur de ciblage complet peut s'intégrer au hasard dans le génome de la cellule ES. Pour sélectionner les cellules ES dans lesquelles a eu lieu une intégration par recombinaison homologue, les généticiens font pousser les cellules transformées dans un milieu contenant de la néomycine et du ganciclovir. Les cellules qui survivent en présence de néomycine sont celles dans lesquelles le vecteur de ciblage contenant l'allèle *neo<sup>r</sup>* s'est intégré. Les cellules résistantes à la néomycine qui survivent en présence de ganciclovir sont celles qui ont subi une recombinaison homologue avec le vecteur de ciblage et qui n'ont donc pas incorporé le gène *tk*. Après cette double sélection par les drogues, on teste l'ADN des cellules ES survivantes par Southern blot ou par PCR, pour vérifier que le gène d'intérêt a bien été invalidé, dans les cellules ES, par **l'ADN du vecteur de ciblage**.

Une fois que les cellules ES portant l'invalidation ciblée sont à disposition, elles sont utilisées pour créer des **souris knockout** (souris portant une invalidation ciblée). Les chercheurs collectent des blastocystes provenant d'une souris donatrice des cellules ES. Elles sont agrégées dans une blastula issue d'une fécondation *in-vitro* qui est implantée chez une femelle porteuse ; les descendants G<sub>0</sub> (ou F<sub>0</sub>) sont chimériques et peuvent contenir, dans leur tissu germinale, des cellules génétiquement modifiées (B<sup>+</sup>/B<sup>-</sup>) à

l'origine de gamètes génétiquement modifiées ( $B^-$ ) à partir desquels on peut, à la génération suivante, obtenir des descendants G1(ou F1) hétérozygotes ( $B^{+//B^-}$ ) pour la modification génétique, puis par croisement des G1, obtenir G2 ( ou F2) homozygotes ( $B^-//B^-$ ). A chaque étape, on vérifie le génotype des individus par la signature moléculaire de l'inactivation identifiée des la transformation des cellules ES.

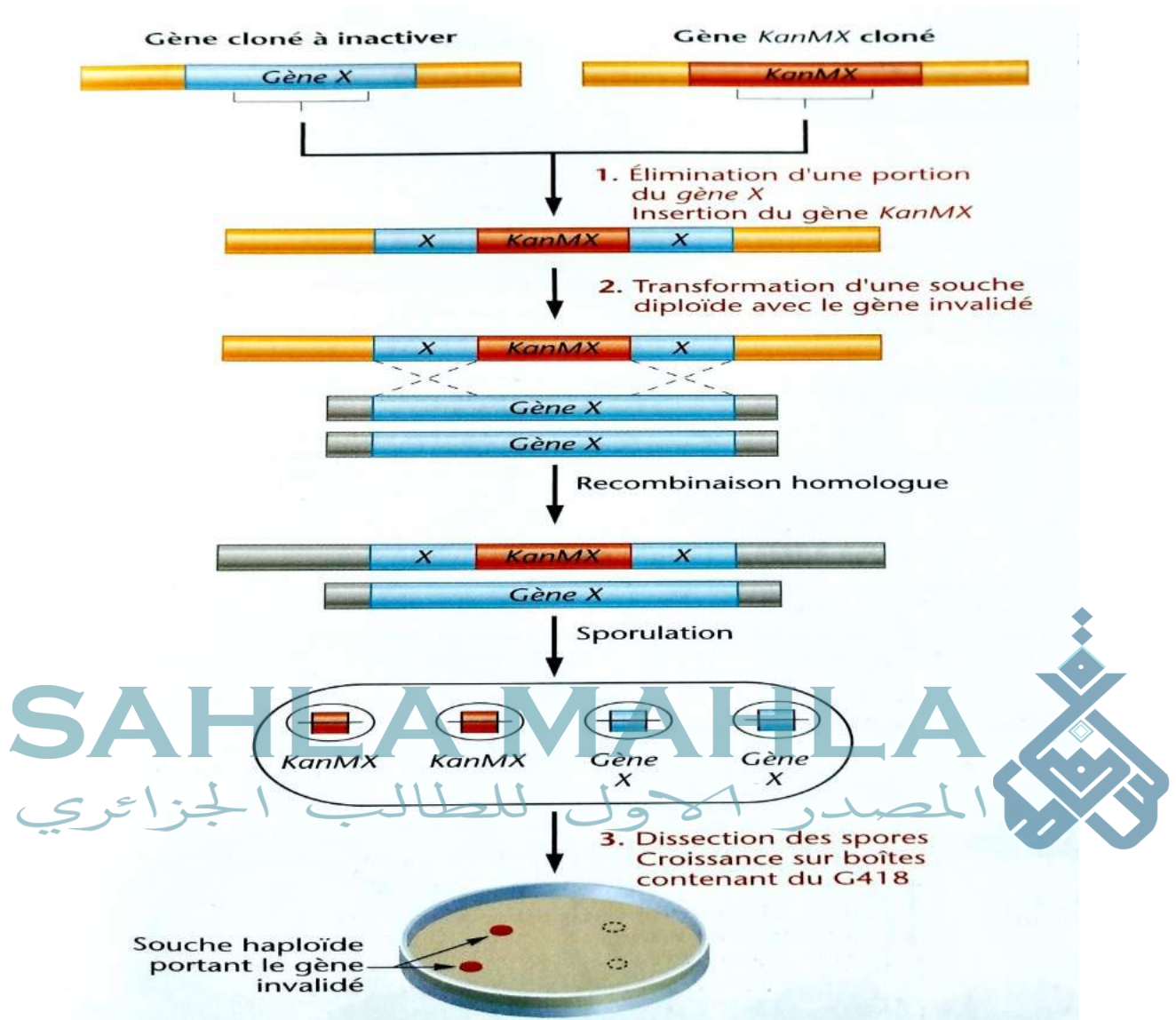


Figure 11 : Inactivation ciblée de gènes chez la levure

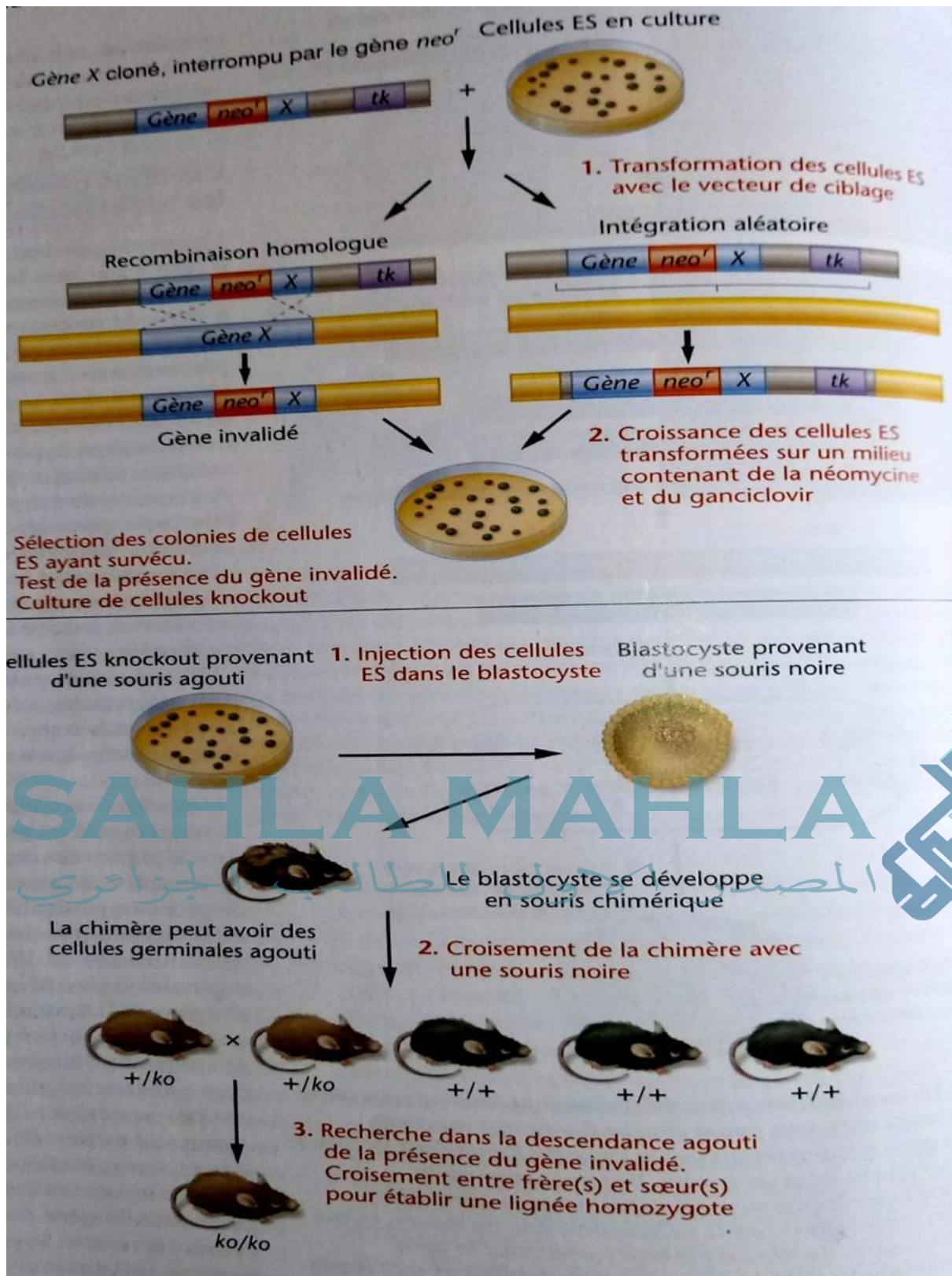


Figure 12 : Création d'une souris Knockout

## 6. Transferts de gènes *in vivo*.

### 6.1-Le transfert de gène dans les gamètes

#### a- Chez l'ovocyte

La microinjection de gène dans les ovocytes des animaux ne conduit pas fréquemment à l'intégration de l'ADN étranger. L'introduction d'une particule rétrovirale recombinante recouverte de l'enveloppe du VSV (vesicular stomatitis virus) entre la zone pellucide et la membrane de l'ovocyte conduit au transfert et à l'intégration des gènes du vecteur. L'enveloppe du virus VSV permet une haute efficacité d'infection, et l'intégration est facilitée par l'absence de membrane nucléaire de l'ovocyte au moment choisi pour réaliser l'infection. Les contraintes inhérentes aux vecteurs rétroviraux font que cette technique, actuellement appliquée à la vache seulement, est peut être plus intéressante que la microinjection dans les pronoyaux mais moins performante que le protocole mettant en œuvre le transfert de noyau.

#### b- Au niveau du spermatozoïde

La mise en contact direct des spermatozoïdes avec des solutions d'ADN, suivie d'une fécondation *in vitro* ou *in vivo*, n'a conduit qu'à l'obtention d'un très petit nombre d'animaux transgéniques. Plusieurs invertébrés marins, des poissons, des poulets, une vache et un porc transgéniques ont pu être obtenus de cette manière. Dans beaucoup de cas, les gènes intégrés étaient très profondément réarrangés et inexploitable. Il se pourrait qu'une activité DNAsique localisée en périphérie des spermatozoïdes les protège contre une invasion intempestive par des gènes étrangers. Une inhibition de cette enzyme permettrait peut-être à ce procédé d'être utilisable. Une méthode mise au point consiste à perméabiliser préalablement la membrane du spermatozoïde avant de l'incuber en présence d'ADN et de procéder à une fécondation par ICSI (intracytoplasmic sperm injection). L'efficacité du procédé dépend alors du rendement de l'ICSI.

### 6.2- Le transfert de gène dans les embryons au stade une cellule

La micro-injection consiste à injecter dans un des pronuclei d'un œuf fécondé (habituellement le pronucleus ou pronoyaux mâle car il est le plus accessible), quelques picolitres d'une solution tamponnée renfermant plusieurs centaines de copies du fragment d'ADN que l'on désire intégrer dans le génome de l'hôte. Afin de faciliter l'intégration de cet ADN, celui-ci doit se présenter sous forme linéaire. Après avoir été micro-injectés, les œufs sont introduits dans le tractus génital de souris pseudogestantes. Une faible proportion de ces œufs (10 à 20 % en moyenne) se développera pour donner naissance à des souriceaux. Le caractère transgénique de ces animaux sera révélé par la détection, dans leur ADN, du fragment micro-injecté (ou transgène). Environ 15 à 25 % des animaux analysés seront porteurs du transgène, ce pourcentage pouvant varier considérablement d'une expérience à l'autre. Cette technique perd très nettement de son efficacité chez les gros mammifères, du fait de la rareté relative des embryons et des femelles adoptives, mais aussi du faible taux d'intégration de l'ADN étranger.

Pour contourner ces difficultés, les embryons peuvent être obtenus après maturation des ovocytes et fécondation *in vitro*. Après micro-injection, les embryons sont cultivés jusqu'au stade blastocyste, ce qui permet une élimination spontanée des embryons non viables et un tri des transgéniques, si l'on a pris soin d'introduire un gène marqueur avec le gène d'intérêt. Ce protocole, qui a fait ses preuves chez la vache, a été presque aussitôt remplacé par la technique mettant en œuvre le transfert de noyau. La micro-injection de gènes dans l'embryon de poulet, qui ne peut avoir lieu que dans le cytoplasme car les pronucleus sont invisibles, impose que l'embryon achève son développement après avoir été transféré dans le jaune d'un œuf non fécondé.



### 6.3- Le transfert de gène par l'intermédiaire de cellules embryonnaires

#### a- La formation de chimères à partir de cellules multipotentes

Les cellules multipotentes ont par essence la capacité de pouvoir participer au développement d'un embryon. Elles peuvent être obtenues à partir de la masse cellulaire d'un blastocyste (cellules ES) ou des cellules primordiales germinales d'un fœtus (cellules EG). Certains marqueurs, comme la phosphatase alcaline, définissent en partie au moins le caractère multipotent. En pratique, des cellules sont considérées comme multipotentes si elles peuvent coloniser une morula ou un blastocyste après y avoir été introduites par microinjection, puis participer au développement de l'embryon et à la formation des gamètes. Des cellules fraîchement prélevées sur un embryon ont de telles propriétés. Pour pouvoir participer à une transgénèse, les cellules multipotentes doivent être cultivées pendant des temps suffisamment longs pour que soient sélectionnés les clones qui ont intégré un gène étranger ou dans lequel un gène a été remplacé par recombinaison homologue. Seules quelques lignées de cellules ES de souris permettent d'atteindre ces buts. Des lignées de cellules ES de poulet et plusieurs lignées de cellules EG, notamment de porc sont capables de participer au développement de l'embryon et de donner naissance à des animaux chimériques potentiellement transgéniques. Dans aucun cas toutefois, sauf chez la souris, les cellules multipotentes cultivées ne se sont avérées capables, de manière reproductible, de transmettre leur génotype en participant à la formation des gamètes. Ces échecs répétés viennent de notre méconnaissance de ce qu'est réellement une cellule multipotente, en tout cas une cellule capable de participer à la genèse de l'ensemble des tissus d'une chimère. Les études dans ce domaine sont poursuivies depuis une dizaine d'année. La possibilité de transférer des gènes par la technique de clonage des embryons a quelque peu réduit l'intérêt d'utiliser les cellules multipotentes et la génération de chimères.

#### b-L'obtention de clones à partir de cellules différenciées

Une approche a priori plus simple que la production de chimères à partir de cellules multipotentes consiste, en principe, à recréer un embryon et un organisme entier à partir d'une cellule plus ou moins différenciée. Cette méthode a été étendue aux ruminants domestiques, dans le but d'accélérer le progrès génétique. Le rendement de l'opération est resté trop faible pour lui permettre d'avoir un véritable impact dans les élevages. Le clonage ne paraissait par ailleurs possible qu'à partir de cellules embryonnaires fraîches. La méthode a été appliquée de manière plus extensive mais sans véritable modification, pour tenter de simplifier la transgénèse. Des clones de moutons ont été ainsi obtenus à partir de cellules pluripotentes issues de cellules embryonnaires cultivées, puis de cellules fœtales et somatiques différenciées. Cette méthode a été immédiatement mise à profit pour procéder à l'**addition** de gène. Le gène du facteur IX humain a ainsi pu être transféré à des moutons en utilisant 2,5 fois moins d'animaux que ce qu'exige la microinjection dans les pronoyaux. Cette méthode offre plus de souplesse à l'expérimentateur. Elle permet de choisir le sexe de l'animal donneur de noyaux, de sélectionner des clones cellulaires ne comportant que des gènes étrangers intacts et en nombre de copies limité. Elle permet enfin de faire naître plusieurs animaux génétiquement identiques, et non mosaïques, même à partir de cellules congelées. Des chèvres transgéniques ont été obtenues essentiellement de la même manière. La méthode est actuellement étendue à d'autres espèces et notamment à la vache.

**Le remplacement** de gène par recombinaison homologue a ensuite été rapidement envisagé, en utilisant également la technique de clonage des embryons par transfert de noyau. Les expérimentateurs devaient affronter pour cela deux difficultés prévisibles : le faible taux de recombinaison homologue dans les cellules somatiques par rapport aux cellules ES, et le nombre limité de cycles de division que peuvent subir les cellules primaires non immortalisées, même fœtales. En dépit de ces difficultés, plusieurs moutons ont pu être obtenus chez lesquels des gènes ont été remplacés. La méthode est actuellement étendue à la chèvre, à la vache, au porc, au lapin, et à la souris. Son efficacité dépend surtout de la maîtrise

du clonage que l'on a pu acquérir chez ces animaux. Des porcs transgéniques clonés, très attendus, ont été obtenus à partir de cellules différenciées. Le remplacement de gène est donc devenu possible chez toutes les espèces chez lesquelles le clonage est lui-même possible.

Le clonage des animaux peut découler de trois techniques : la dissociation, la section ou le transfert de noyaux.

- La dissociation : consiste à scinder un embryon au stade 2, 4 ou 8 cellules puis à réimplanter ces cellules dans la zone pellucide qui entoure l'œuf. Les embryons issus du développement de ces cellules peuvent ensuite être réimplantés dans une femelle porteuse.

- La section : d'un embryon se fait à un stade plus tardif (stade blastula), et doit aboutir à deux ensembles de cellules identiques qui en se développant vont donner de vrais jumeaux.

- Transfert de noyaux : consiste à implanter dans un ovocyte dépourvu de son information génétique, par aspiration une micropipette élimine les chromosomes et les éléments qui contiennent l'ADN cellulaire à ce stade les chromosomes ne sont pas enfermés dans un noyau. Puis on fusionne la cellule donneuse tout entière avec l'ovule receveuse.

Exemple (figure 13) :

- **Megan et Morag** : deux agneaux jumeaux identiques nés à partir d'une mère porteuse, leur matériel génétique provenait de cultures de cellules qui avaient été prélevées sur un embryon de neuf jours.

- **Dolly** : est le premier mammifère cloné à partir d'un adulte.

- **Polly** : cette brebis renferme le gène codant pour le facteur coagulant IX humain, protéine sanguine absente chez les hémophiles et utilisée dans le traitement de l'hémophilie B.

Ce gène du facteur IX est associé à un gène de résistance à un antibiotique (néomycine), en culture, seule les cellules transgéniques peuvent se développer à une forte dose de l'antibiotique ainsi on pourra cribler ou sélectionner les cellules ayant le gène.

SAHILAMAHILA  
المصدر الاول للطالب الجزائري



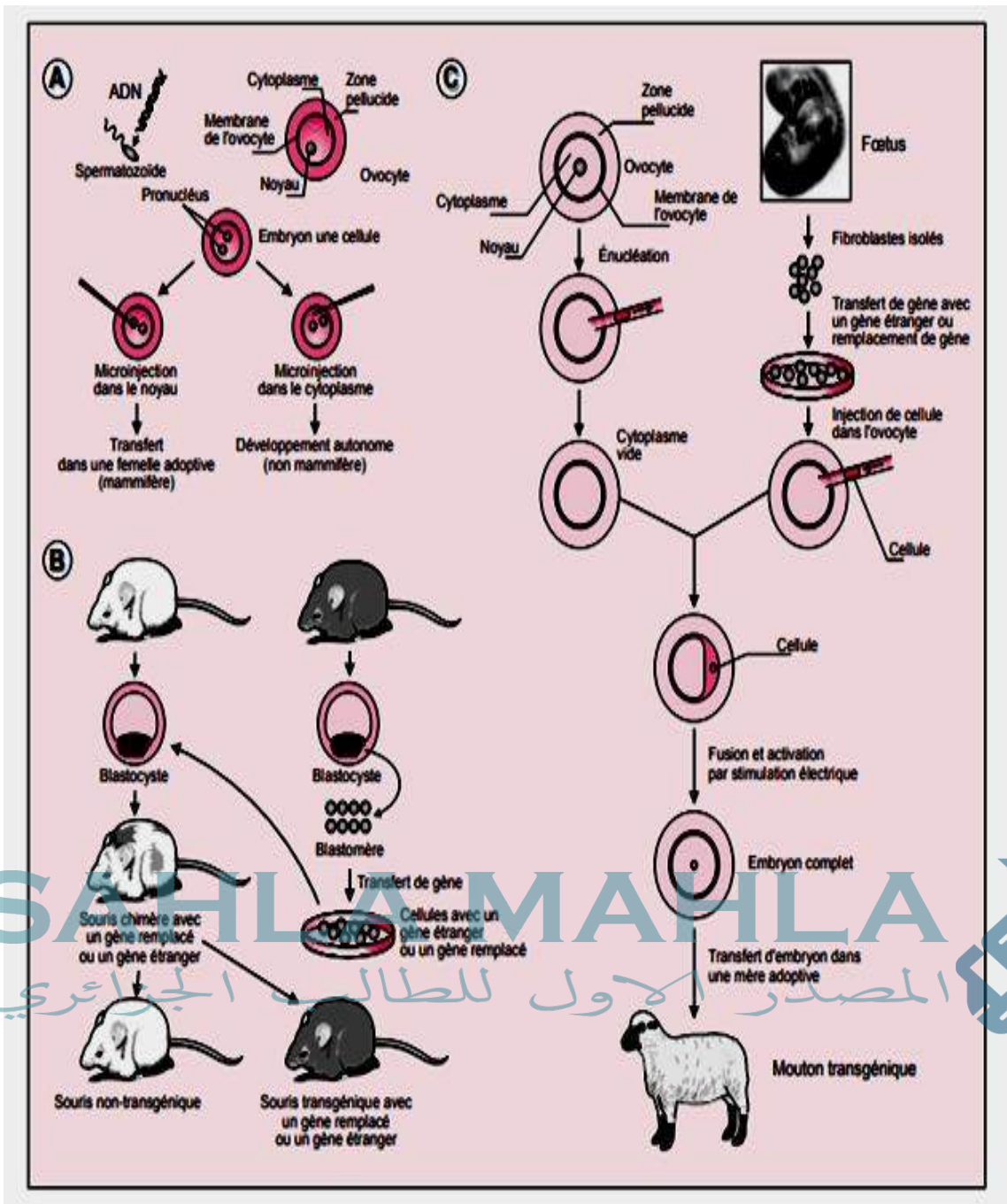


Figure 12 : Méthodes de transfert de gènes

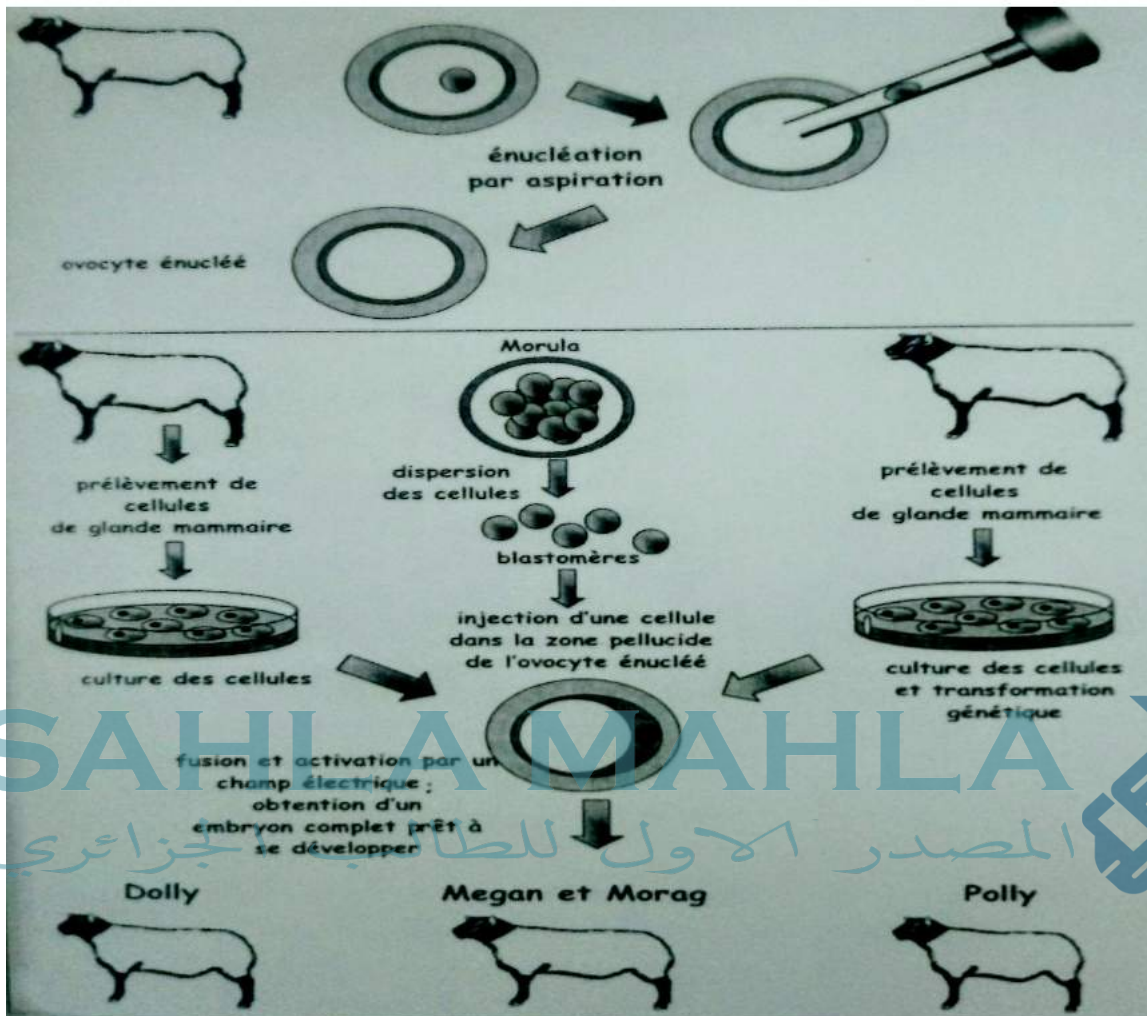


Figure 13 : Principe du clonage des animaux.



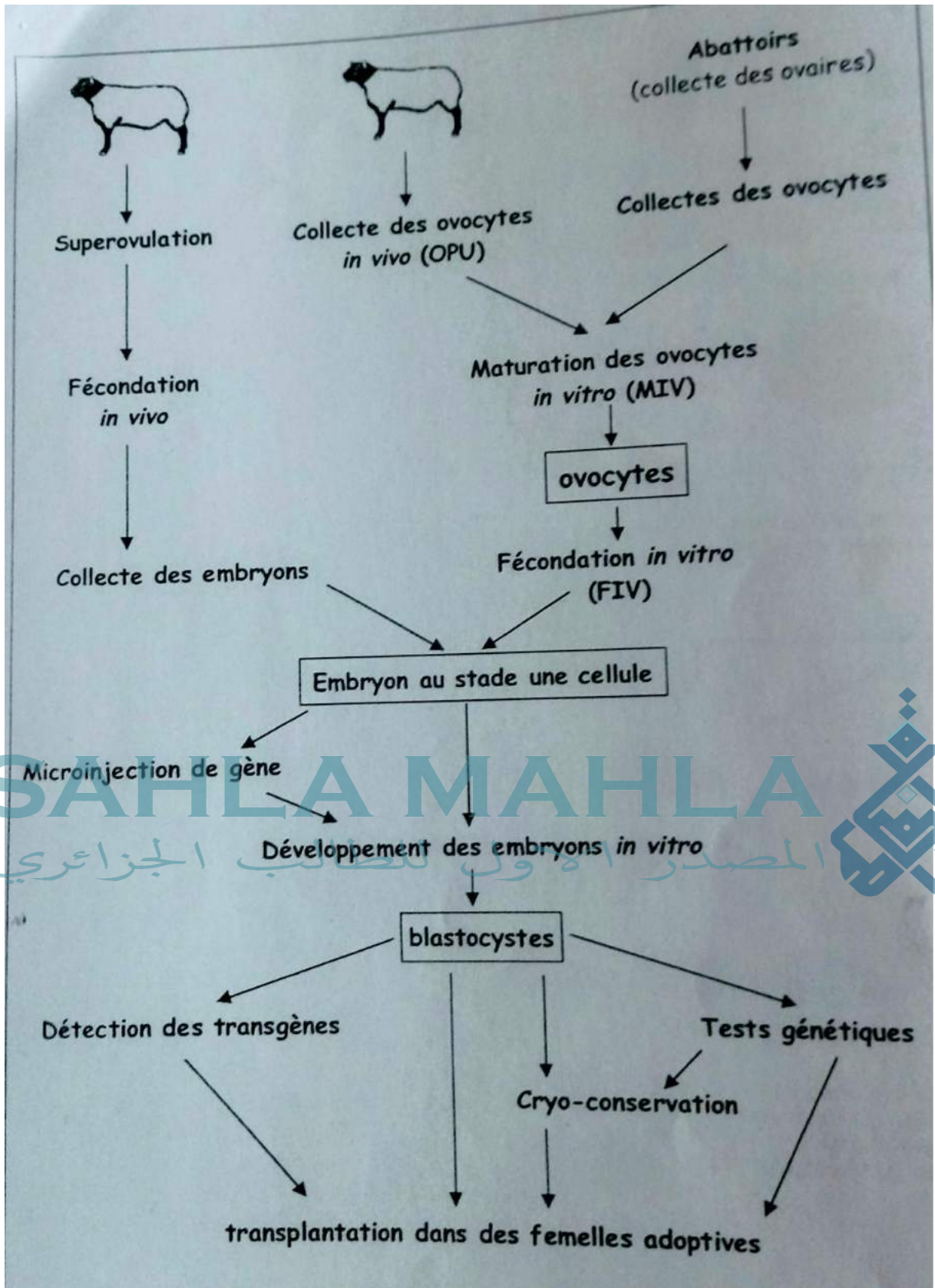


Figure 14 : Schéma récapitulatif des différentes techniques de préparations des embryons et des blastocystes pour l'élevage, la sélection et la transgénèse.

## 7. Apports et développement en physiologie et physiopathologie

### 7.1- La thérapie génique

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. Il est en effet théoriquement possible d'insérer un allèle normal dans les cellules somatiques des tissus atteints. Pour que la thérapie génique des cellules somatiques soit permanente, les cellules recevant 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 9 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 mettront à produire la protéine manquante, et le patient sera guéri.

La technique illustrée à la figure 15 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 thérapie génique. Cependant, trois des patients ont par la suite souffert de leucémie (cancer des cellules sanguines) et l'un d'eux est décédé. Deux facteurs peuvent avoir contribué à l'apparition de la leucémie: l'insertion du vecteur rétroviral près d'un gène intervenant dans la prolifération cellulaire et une fonction inconnue du gène de remplacement lui-même.

Deux autres maladies génétiques ont récemment été traitées par thérapie génique avec un certain succès : l'une causant une cécité progressive et l'autre provoquant une dégénérescence du système nerveux. Les expériences qui ont donné de bons résultats concernent très peu de patients, mais suscitent un optimisme prudent.

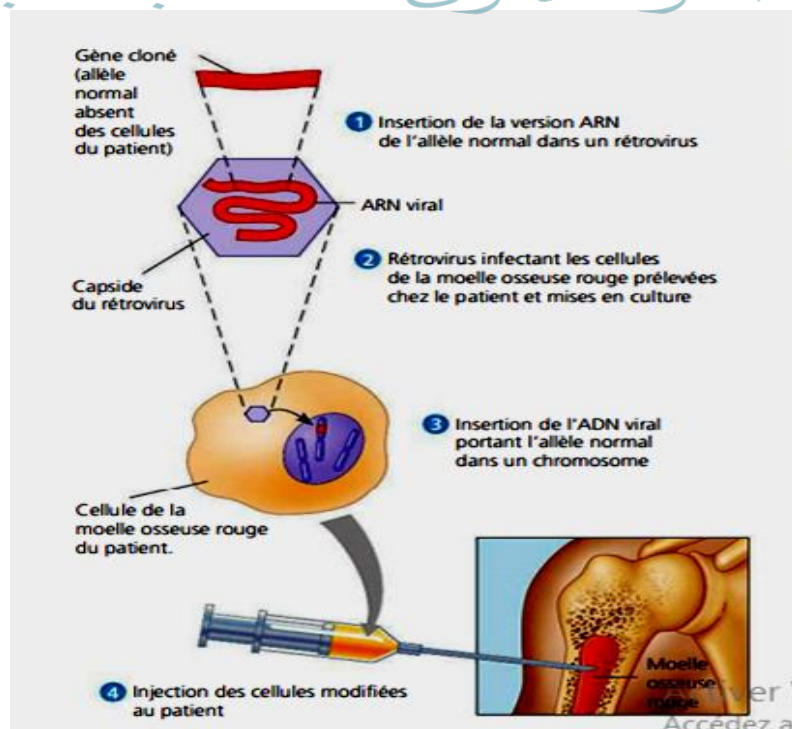


Figure 15: Une thérapie génique utilisant un vecteur retro-viral

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. La surexpression de ce récepteur causée par une translocation chromosomique est déterminante dans la manifestation de la leucémie myéloïde chronique (LMC) . 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.

Les produits pharmaceutiques à base de protéines peuvent être synthétisés industriellement, à l'aide de cellules ou d'organismes entiers. À l'heure actuelle, on fait surtout appel aux cultures cellulaires.

### **7.2- La production de protéines dans des cultures cellulaires**

Le clonage d'ADN et les systèmes d'expression génique permettent la production à grande échelle d'une protéine qui n'est 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 au fur et à mesure qu'elle est produite. Cela simplifie l'étape de la purification par les méthodes biochimiques traditionnelles.

L'insuline (figure 16 ) et l'hormone de croissance humaine (HGH) ont été parmi les premières substances pharmaceutiques «fabriquées» par cette méthode. L'insuline ainsi produite 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.

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.

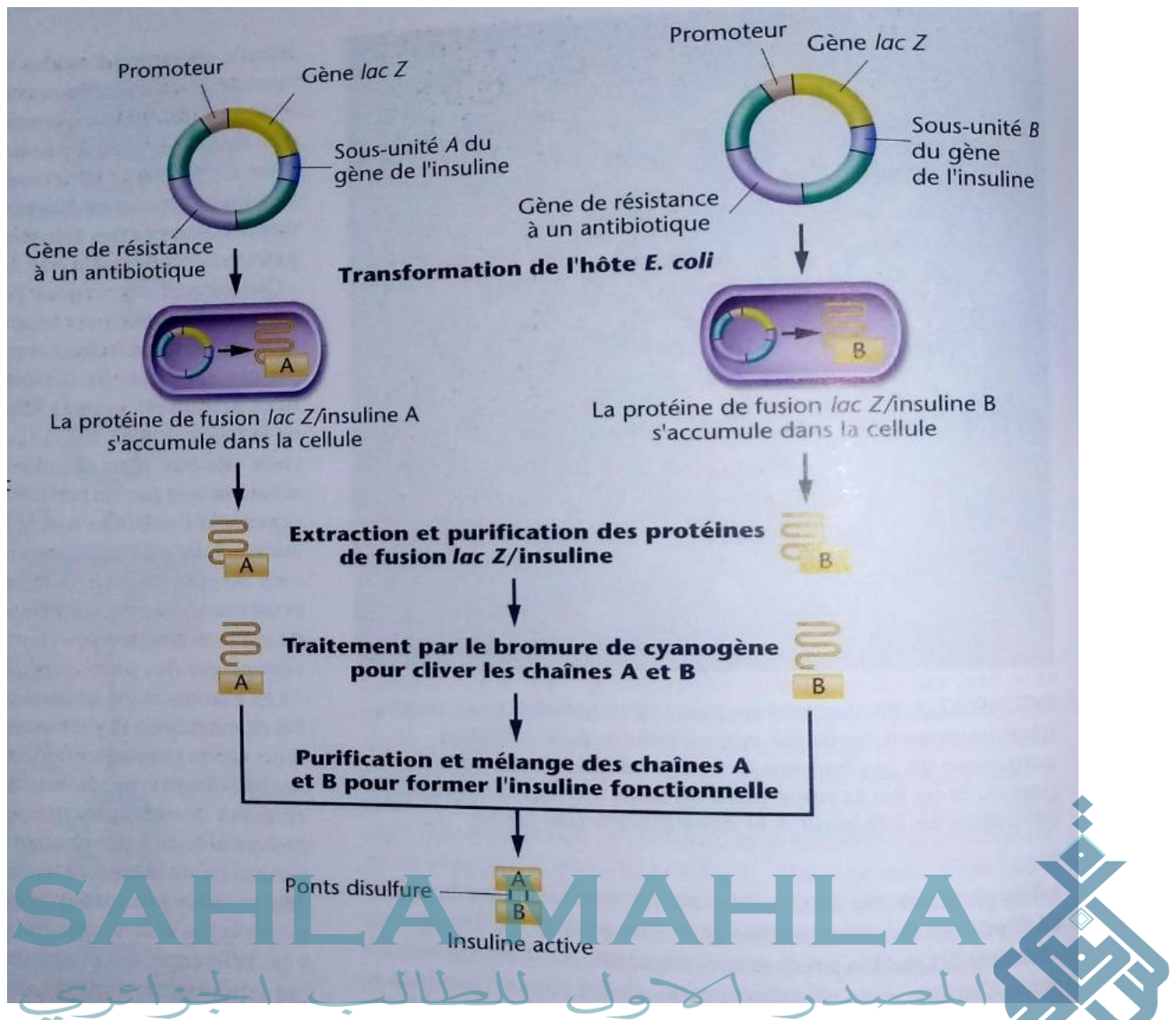


Figure 16 : Synthèse de l'insuline. Pour synthétiser de l'insuline humaine recombinante.

Bien que l'insuline humaine soit maintenant produite par d'autres procédés, l'étude de la méthode d'origine est instructive, car elle montre à la fois les difficultés de la mise en application des techniques de l'ADN recombinant.

Des oligonucléotides synthétiques codant les chaînes A et B de l'insuline sont insérés à la fin de la séquence codante du gène *lacZ* cloné d'*E. coli*. Les plasmides recombinants sont transférés dans les hôtes *E. coli*, dans lesquels la protéine de fusion  $\beta$ -galactosidase/insuline est synthétisée et accumulée. La protéine de fusion est ensuite extraite de la cellule hôte et purifiée. Les chaînes d'insuline sont détachées de la  $\beta$ -galactosidase par un traitement au bromure de cyanogène. Les sous-unités de l'insuline sont purifiées et mélangées pour produire la molécule d'insuline fonctionnelle.



## 8- Transgénèse animale additive, substitutive et applications

Des hôtes bactériens ont été utilisés pour produire la première génération de protéines médicaments, bien qu'utiliser des hôtes procaryotes (bactéries) pour synthétiser des protéines eucaryotes présente beaucoup de désavantages. L'un des problèmes est que les bactéries ne peuvent pas assurer une synthèse correcte des protéines eucaryotes ni leurs modifications post-traductionnelles. Souvent les protéines eucaryotes synthétisées dans des cellules procaryotes n'acquièrent pas la configuration tridimensionnelle indispensable à leur fonction biologique et sont donc inactives. Pour surmonter ces difficultés et augmenter les rendements, des méthodes de seconde génération utilisent des hôtes eucaryotes. Au lieu d'être synthétisées par des cellules hôtes se développant dans des tissus en culture, des protéines humaines telles que l' $\alpha_1$ -antitrypsine sont produites dans le lait du bétail.

Un déficit en  $\alpha_1$ -antitrypsine est associé à une forme héréditaire d'emphysème, maladie respiratoire progressive et fatale, fréquente dans les populations européennes. Pour produire l' $\alpha_1$ -antitrypsine utilisée dans le traitement de cette maladie, le gène humain a été cloné dans un vecteur, près d'une séquence promotrice de mouton active dans les cellules productrices de lait. Les gènes situés à côtés de ce promoteur sont exprimés uniquement dans le tissu mammaire. Ce gène de fusion a été micro-injecté dans des œufs fécondés de mouton *in-vitro*. Les œufs fécondés ont été transférés chez des mères porteuses. La brebis transgénique en résultant s'est développée normalement et après accouplement, a produit du lait contenant de fortes concentrations d' $\alpha_1$ -antitrypsine fonctionnelle. Cette protéine humaine est présente à des concentrations supérieures à 35 grammes par litre de lait, et peut être facilement extraite et purifiée. Un petit troupeau de brebis transgéniques allaitantes peut facilement fournir une quantité suffisante de cette protéine. La célèbre brebis, **Dolly** a été clonée afin de faciliter la création de troupeaux de brebis produisant régulièrement des taux élevés de protéines humaines.

Les protéines humaines synthétisées dans des animaux transgéniques subissent des essais cliniques préalables à leur utilisation thérapeutique. Une enzyme humaine recombinante, l' $\alpha_1$ -glucosidase, produite dans le lait de lapine, subit actuellement les tests cliniques pour le traitement des enfants atteints de la maladie de pompe. Cette maladie métabolique progressive et fatale est due à l'absence de l'enzyme  $\alpha_1$ -glucosidase ; elle est transmise sur le mode autosomique récessif. Dans les cas de survenue précoce de la maladie, les enfants présentent une hypotonie musculaire et ne peuvent jamais s'asseoir ni se tenir debout. La plupart meurent avant l'âge de deux ans de complications respiratoires et cardiaques. Dans l'un des premiers essais, l'enzyme recombinante était administrée aux enfants une fois par semaine, sans effet secondaire significatif. Chez tous les enfants, une activité enzymatique normale dans les tissus analysés et une amélioration des symptômes ont été observés. Si des essais à grande échelle sont couronnés de succès, l' $\alpha_1$ -glucosidase recombinante provenant d'animaux transgéniques deviendra le traitement de choix pour cette maladie.

## Bibliographie :

Breitler., J-C, Casse., F. 2001. OGM : Description, méthodes d'obtention, domaines d'application. Editions France Agricole. 166 p.

Serre.,J-L, Gaumer., M, Netter., M. 2018. Génétique : Théorie, analyse et ingénierie. 5<sup>ème</sup> Edition. Dunod. France.414 p.

Houdebine., L-M. 2000. Modifications génétiques animales et végétales : méthodes de transgénèse et expression des transgènes. médecine/sciences n°10 vol 16. 1017-1029 pp.

Klug.,W, Cummings., M, Spencer.,M .2010. Génétique. 8<sup>ème</sup> Edition.Pearson education. Paris. 704 p.

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطلاب الجزائري

