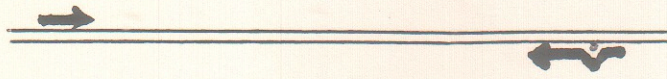


# MUTAGÈNESE DIRIGÉE (par amplification *in vitro* = technique PCR®)

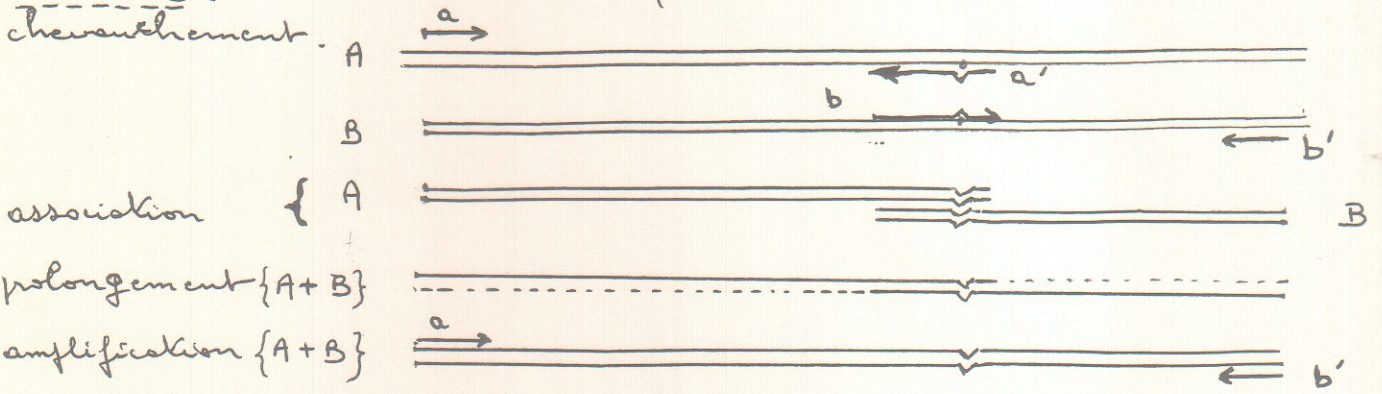
principe: pratiquement seul l'ADN inter-amorces (quelques kb) est amplifié, l'ADN matrice est négligeable.

## • SUBSTITUTION:

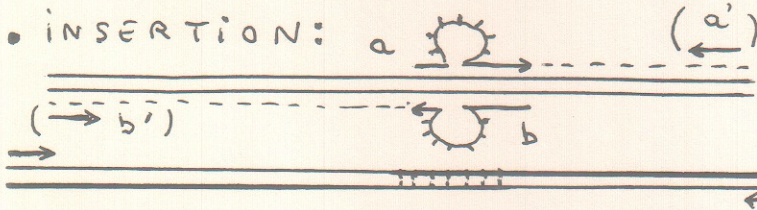
l'amorce "mutée" sur 1 base présente un mésappariement.



variante: mutation interne par 2 couples d'amorces avec chevauchement.

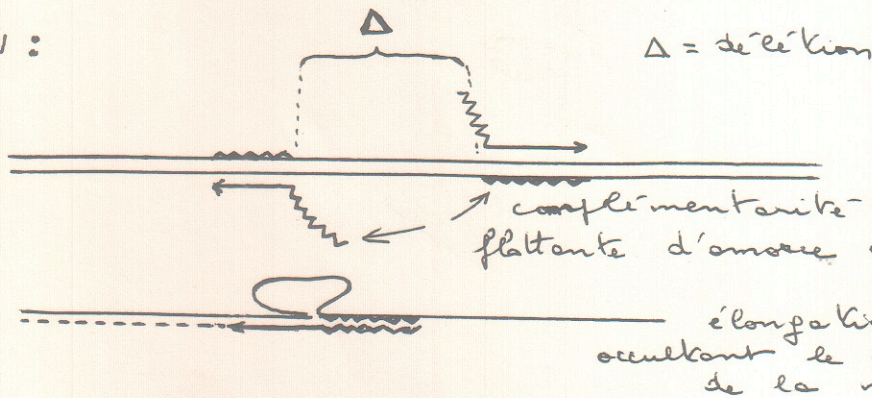


## • INSERTION:

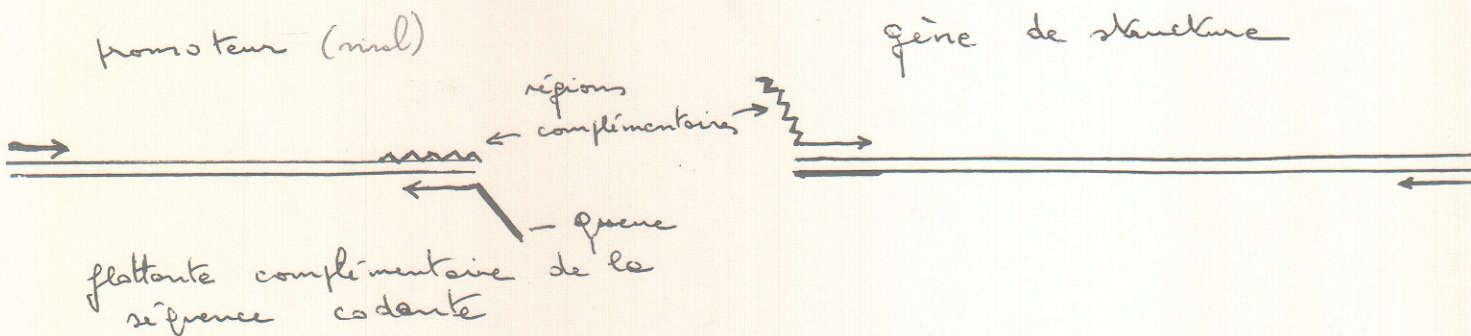


élongation des amorces (2 couples 2 "mutées" à boucle complémentaire et hybridation des produits.

## • DELETION:



# LIASON de 2 ADN (ADN recombinant) par PCR



variante: association de gènes co-transcrits  
 ex: gène DHFR - gène de structure d'une protéine à produire



## GÉNÉTIQUE DES BREBIS PHARMACIENNES

**S**urveillés par un berger au sourire édenté, ils brouettent tranquillement, dans un enclos, au milieu des collines verdoyantes des environs d'Edimbourg, en Ecosse. Ces moutons apparemment ordinaires sont en fait de véritables usines pharmaceutiques sur pattes : leur patrimoine héréditaire a été modifié pour que le lait des brebis produise des médicaments ! Les mamelles des braves ruminants sécrètent deux produits difficiles à obtenir par les méthodes classiques des biotechnologies : soit du facteur 9, une protéine utilisée pour le traitement de certaines formes d'hémophilie, soit de l'antitrypsine, une substance qui permet de combattre l'emphysème pulmonaire.

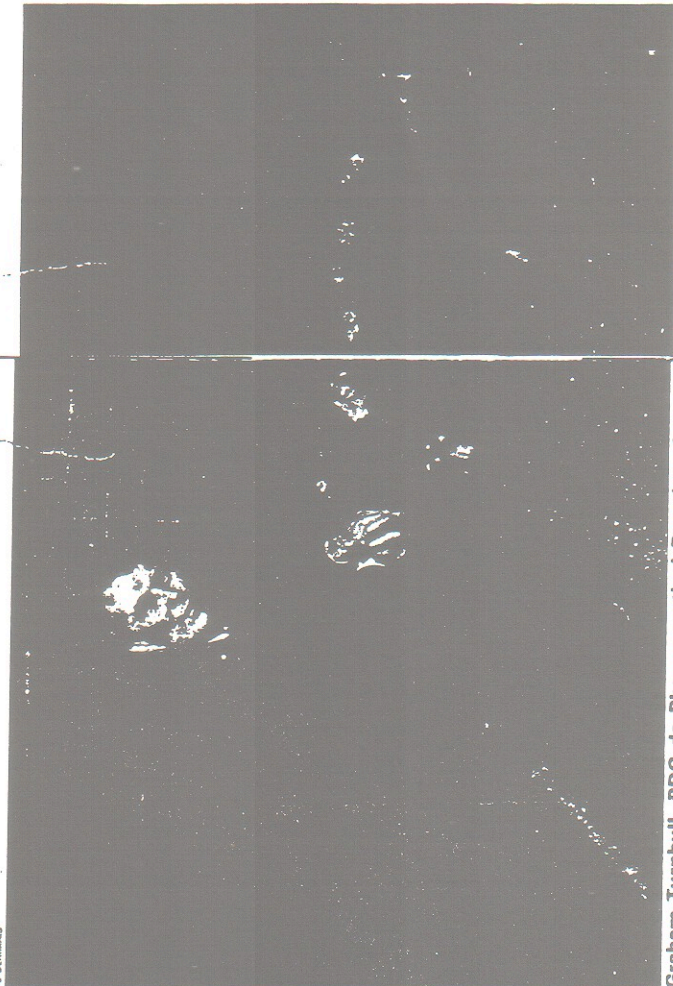
La ferme modèle où travaille le berger hilare appartient à l'AFRC (Agricultural and Food Research Council), un centre de recherche agromatique financé par le gouvernement britannique. Etrange télescope entre l'élevage millénaire et le nec plus ultra des biotechnologies : ces 52 moutons préfigurent une révolution imminente dans l'industrie pharmaceutique et alimentaire. Il s'agit tout simplement de fabriquer, par greffe génétique, de nouvelles races animales pour lesquelles on aura déterminé précisément, à l'avance, la composition de la viande, du lait ou du sang...

« L'entretien du bétail coûte moins cher que celui d'une usine biochimique », explique Graham Turnbull, PDG de la firme anglaise Pharmaceutical Proteins, qui s'apprete à commercialiser les médicaments issus des bestiaux « concoctés » par les chercheurs de l'AFRC. « Nous sommes les premiers en Europe à parier sur cette technique, mais nous serons sûrement suivis », ajoute fi-

gène de l'hormone de croissance. Les scientifiques n'ont cessé, depuis, de créer de nouvelles chimères. Dernière invention, les mammières pharmaceutiques, dont le premier, une souris produisant de l'interféron dans son lait, a été mis au point, l'année dernière, par la firme américaine Integrated Genetics.

« Le problème n'est pas tant de greffer le gène, il est de le faire fonctionner correctement », explique le Dr John Clark, le jeune biologiste qui dirige les recherches sur les moutons à l'AFRC. Beau-

L. DEHMAS



Graham Turnbull, PDG de Pharmaceutical Proteins, dans sa bergerie-laboratoire.

arthritique, dépressif et dépourvu de libido...

Les ovins écossais, eux, se portent apparemment à merveille, mais leur sécrétion de facteur 9 est encore très limitée : « Le gène greffé ne s'exprime pas suffisamment pour une production industrielle, reconnaît John Clark, mais nous espérons régler ce problème assez rapidement. »

Tâche délicate. Car le fameux gène du facteur 9 est présent dans toutes les cellules de l'animal, mais il ne doit fonctionner que dans les glandes mammaires. Voilà pourquoi

bergerie-laboratoire.

les chercheurs ne l'injectent pas seul dans l'embryon, mais couplé à un second gène (celui de la bêta-lactoglobuline), dont le rôle consiste à empêcher le premier de se déclencher ailleurs que dans les mamelles.

« Une technique à affiner, mais qui ouvre d'immenses possibilités, s'enthousiasme Graham Turnbull : c'est une clef qui permet d'introduire pratiquement n'importe quelle protéine dans le lait des moutons. » Pharmaceu-

tical Proteins envisage ainsi la production d'une dizaine de « médicaments à traire », dont le facteur 9 et l'antitrypsine ne sont que des modèles expérimentaux. Mais on peut aussi imaginer de modifier un jour la composition des laits de vache, en augmentant, par exemple, leur taux de caséine, pour faciliter la fabrication du fromage, ou en diminuant leur taux de lactose, ce sucre qui rend le lait indigeste aux deux tiers des habitants de la planète. En France, des procédés similaires ont été mis

au point pour des lapins, dans les laboratoires de l'Inra (Institut national de la recherche agronomique), à Jouy-en-Josas, où les chercheurs travaillent également dans une autre voie : la production de protéines non plus dans le lait, mais dans le sang d'animaux transgéniques. Seule différence : contrairement à la poule aux œufs d'or, ceux-ci doivent être tués pour l'extraction de leur précieuse substance... ■

Gilbert Charles



# Un système d'expression fidèle de protéines recombinantes: les cellules d'insectes infectées par baculovirus

Odile Filhol, Claude Cochet & Edmond M. Chambaz  
Unité INSERM 244, BRCE/LBIO/DRF, Centre d'Etudes  
Nucléaires, 85X, 38041 Grenoble Cedex, France.



Madame Odile Filhol

## INTRODUCTION

Les premières productions de protéines humaines d'intérêt biologique ou thérapeutique par génie génétique ont fait appel à des vecteurs d'expression dans lesquels le gène à exprimer est introduit. Cette construction est intégrée dans une cellule bactérienne hôte, dont on utilise la machinerie de synthèse de protéines [1]. Cependant, ce système d'expression procaryote possède plusieurs limitations : la protéine étrangère synthétisée peut être lysée ou être séquestrée dans des inclusions ce qui nécessite une extraction dénaturante et une renaturation laborieuse en vue de la restitution d'une structure tertiaire fonctionnelle [2]. Les cellules procaryotes ne réalisent pas les étapes de maturation des protéines fonctionnant chez les eucaryotes (coupures sélectives, hydroxylations, glycosylations, phosphorylations...). Les processus d'assemblage post-traductionnel des polypeptides synthétisés dans les cellules eucaryotes mettent en jeu une machinerie complexe impliquant des protéines spécifiques (chaperons) qui participent au transfert transmembranaire et au guidage des réactions nécessaires au repliement et au compactage corrects des chaînes peptidiques (pont disulfure, isomérisation des prolines...).

Pour toutes ces raisons, l'utilisation de cellules eucaryotes comme hôte d'expression génétique apparaît souhaitable et dans ce contexte, la produc-

tion de protéines recombinantes dans des cellules eucaryotes d'insectes, sous le contrôle d'un virus spécifique (baculovirus) constitue un nouveau système dont les avantages devraient entraîner une large utilisation [3-4]. Il permet la production abondante de protéines recombinantes, procaryotes ou eucaryotes, qui possèdent des propriétés antigéniques, immunologiques et fonctionnelles identiques à celles des protéines naturelles (Table I).

## LE CYCLE DU VIRUS

*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) (5) est le virus prototype de la famille des baculovirus qui peuvent infecter plus de 30 espèces d'insectes lépidoptères (Fig. 1). Au cours de l'infection, deux formes de virus sont produites par les cellules cibles : des particules virales extracellulaires (PVE) et des occlusions virales (OV) (Fig. 1). Ces dernières (polyhédres), sont constituées de la particule virale entourée d'une coque protéique formée en majorité de polyhédrine. Dans les cultures de SF9 infectées, la polyhédrine (PM 29 kDa) s'accumule jusqu'à des concentrations de l'ordre de 1 mg/ml pour  $10^6$  cellules infectées, ce qui représente alors plus de 50 % des protéines totales de la cellule.

## PRINCIPE ET METHODE DE CE SYSTEME D'EXPRESSION

Le gène de la polyhédrine n'est pas essentiel pour la replication ou la production de particules virales extracellulaires [6]. Il est dès lors possible de le modifier par l'insertion de gènes étrangers. Cette insertion est réalisée en aval du promoteur fort du gène de la polyhédrine après délétion de la région codante de celui-ci. Cette modification du vecteur conduit à la production de virus sans occlusion (OCC-) qui forment des plages de lyse visuellement très différentes de celles du type sauvage à occlusion (OCC+). Cette différence d'aspect des plages de lyse constitue un moyen visuel simple pour trier et isoler les virus recombinants [7].

Ces virus recombinants sont obtenus en trois étapes (Fig. 2) [8,9] :

1/ Insertion du gène à exprimer dans un vecteur de transfert bactérien (pUC8) modifié. L'insertion se fait au niveau d'un site de restriction entouré de séquences virales encadrant le promoteur de la polyhédrine.

2/ L'ADN du baculovirus et le vecteur de transfert sont co-transfectés dans les cellules d'insectes SF9 (cellules ovariennes provenant de *Spodoptera frugiperda*) par la technique de transfection au phosphate de calcium [10]. Au cours de cette étape, une recombinaison homologue permet la généra-



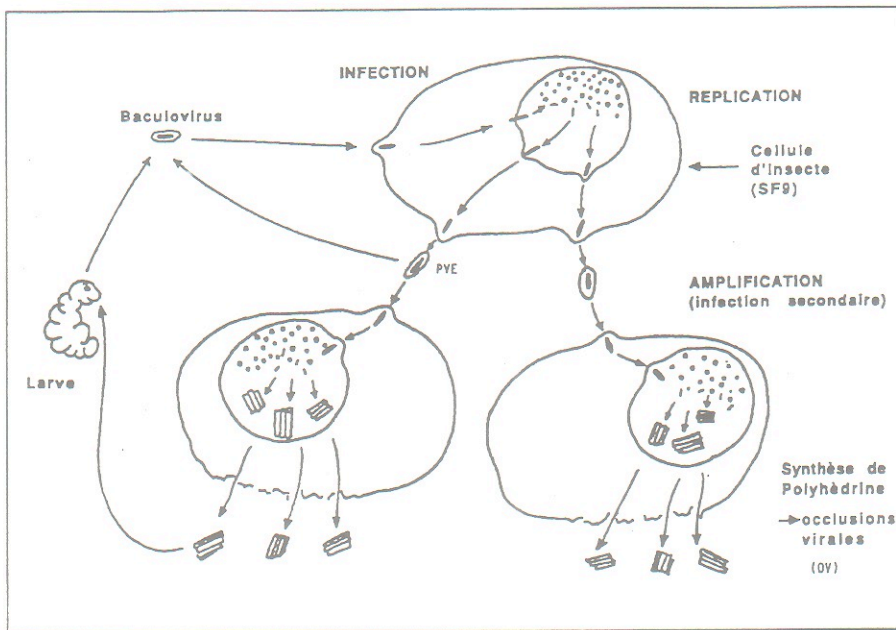


Figure 1 - Dans l'environnement naturel, une larve d'insecte sensible au baculovirus, est susceptible d'ingérer des occlusions virales contenues dans sa nourriture. Les cristaux de polyhédrine constituant ces occlusions se dissolvent dans l'intestin du lépidoptère, libérant les particules virales infectieuses qui envahissent alors les cellules intestinales. Une fois dans les noyaux cellulaires, l'ADN viral commence à se répliquer dès 6 heures après l'infection. Entre 10 et 12 h, les premières particules virales extracellulaires quittent la cellule pour infecter les cellules voisines. Plus tard, (18-24 h), la synthèse énorme de polyhédrine permet l'insertion des particules virales dans des occlusions protéiques. Ces occlusions en s'accumulant dans la cellule jusqu'à sa lyse (3-4 jours) jouent un rôle important dans le cycle naturel du virus : quand les larves infectées meurent, des millions de cristaux de polyhédrine sont libérés des tissus en décomposition. D'après Filhol et coll. (1990 *Medecine et Sciences*, 6, 297-300).

tion d'un ADN viral recombinant porteur du gène à exprimer.

3/ Cette recombinaison est un événement rare et il est nécessaire de purifier le virus recombinant. Ceci se fait par infections successives des cellules SF9 et identification visuelle des plages de lyses OCC<sup>-</sup>. Généralement, après 3 ou 4 cycles d'enrichissement, le virus sécrété est pur, prêt à être utilisé pour infecter en masse des cellules SF9.

## QUELQUES EXEMPLES D'UTILISATION DE CETTE TECHNIQUE

L'utilisation de ce système d'expression a déjà permis d'obtenir un certain nombre de protéines recombinantes eucaryotes (table I). Le facteur de croissance interleukine 2 et l'interféron  $\alpha$  et  $\beta$  [12, 13, 15] sont synthétisés et sécrétés sous une forme fonctionnellement active ; la production du domaine catalytique du récepteur du facteur de croissance EGF [16] et de la protéine kinase C [17] a permis l'ob-

tention de ces deux protéines kinases pleinement fonctionnelles. La production de l'enzyme Raf-1 kinase dans ce système a permis d'étudier sa régulation *in vitro*. En effet, l'enzyme synthétisée dans ces cellules SF9 ne possède qu'une très faible activité protéine-kinase. Par contre, la coproduction de cette enzyme avec le récepteur du PDGF dans les cellules d'insectes résulte en une remarquable stimulation de l'activité protéine-kinase de Raf-1. L'augmentation de l'activité enzymatique semble être due à la phosphorylation de Raf-1, ce qui confirme la pleine fonctionnalité des protéines exprimées dans ce système [20]. Une activation similaire de la protéine-kinase ribosomale S6 Kinase a été mise en évidence par coinfection des virus recombinants contenant le gène codant pour la protéine pp60<sup>v-src</sup> et celui de la S6 Kinase [21].

Un intérêt supplémentaire de cette technique est le relatif faible coût des milieux de culture récemment développés qui, sans adjonction de sérum, permettent la prolifération des cellules d'insectes, la réplication des virus et l'expression des protéines recombi-

nantes de façon satisfaisante [22]. Enfin, les cellules SF9 utilisées prolifèrent en suspension, permettant leur culture en fermenteur et une application à une échelle industrielle [9].

## PERSPECTIVES

Les recherches en cours visent à optimiser le lieu d'insertion du gène à exprimer dans le vecteur de transfert en vue d'augmenter le taux d'expression de la protéine (7, 23). Récemment, Sarvari et coll. ont montré que l'addition d'ecdystéroïdes entraîne une nette augmentation de la production de protéine recombinante (24). On peut imaginer qu'à terme, une manipulation directe de l'ADN du baculovirus ( $\approx 130$  kb) permettra d'éviter l'étape de recombinaison réciproque actuellement utilisée pour la construction du vecteur.

La méthode est appliquée dans notre laboratoire en vue d'obtenir une protéine kinase eucaryote oligomérique fonctionnelle : la caséine kinase II, formée de deux sous-unités différentes, de stoechiométrie  $\alpha_2\beta_2$  (25).



TABLE 1

GENE	PROTEINE (PM) (kDA)	PRODUCTION PAR LITRE DE CELLULES SF9	PROPRIETES BIOLOGIQUES	REFERENCE
AcNPV polyhedrine	29	1000 mg	phosphorylée localisation nucléaire	[5]
c myc humain	64/61	1 mg	antigénique, phosphorylée localisation nucléaire	[11]
interferon $\alpha$ humain	19,5	0,3 mg	activité interferon $\alpha$ antigénique, glycosylé, peptide signal clivé, sécrété	[12]
interferon $\beta$ humain	17/20,5	—	activité interferon $\beta$ antigénique, glycosylé, peptide signal clivé, sécrété	[13]
enveloppe du HIV	150/120	—	antigénique glycosylée, protéolysée	[14]
Interleukine 2 humaine	16/15,5	1 mg	activité interleukine 2 antigénique, peptide signal clivé, sécrétée	[15]
domaine kinase du récepteur de l'EGF	66	2 à 2,5 mg	activité tyrosine kinase, antogénique	[16]
isoforme $\gamma$ de la protéine kinase C	82-84	5 à 15 mg	activité kinase, antigénique, soluble	[17]
Ha-ras-p21	21	20 mg	activité antigénique, membranaire, palmitoylée	[18]
domaine cytoplasmique du récepteur de l'insuline humain	48	4 mg	activité kinase soluble, antigénique	[19]



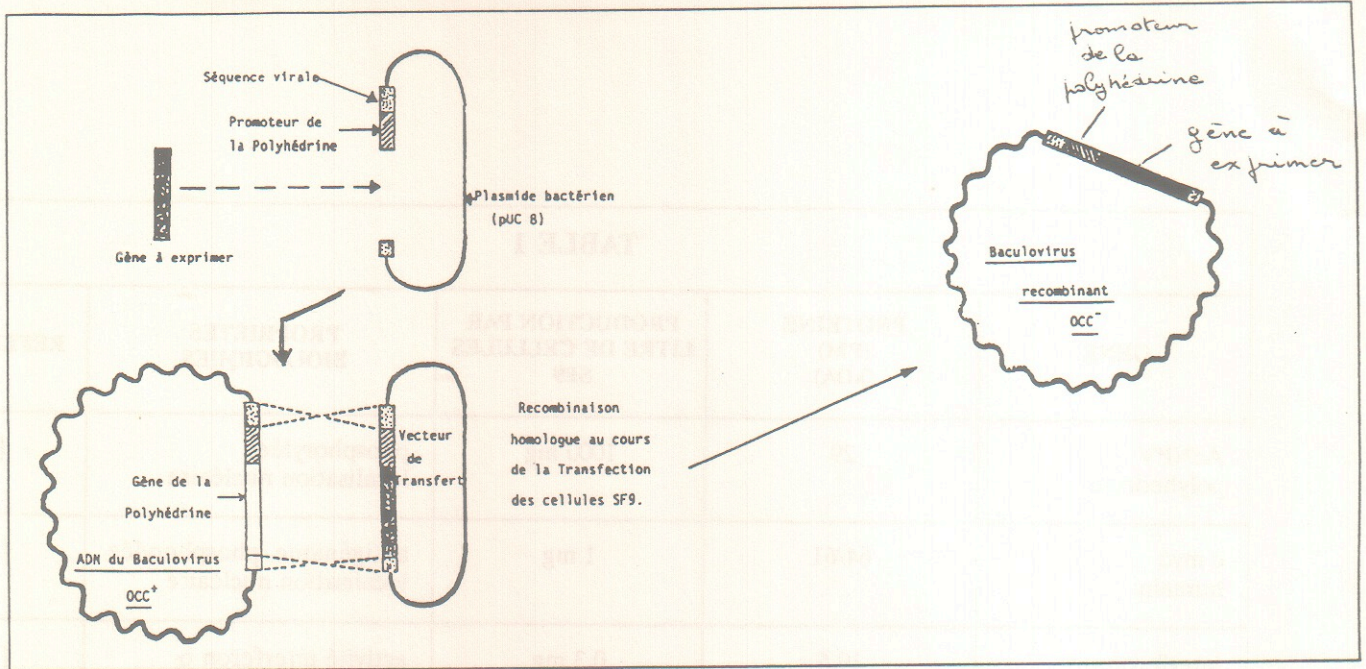


Figure 2 - Schéma représentant le processus de clonage d'un gène à exprimer dans l'ADN viral. Un fragment d'ADN approprié du gène est inséré dans un vecteur de transfert dans la bonne orientation en aval du promoteur de la polyhedrine. Des cellules d'insectes (SF9) en culture sont transfectées avec un mélange d'ADN viral et de vecteur de transfert. Au cours de cette transfection, une double recombinaison homologue se produit, entraînant la formation d'ADN viral dans lequel le gène de structure de la polyhedrine a été remplacé par le gène à exprimer. D'après Filhol et coll. (1990 *Medecine et Sciences*, 6, 297-300).

## REFERENCES

- Marston F.A.O. (1986) *Biochem. J.* 240, 1-12.
- Hoess A., Arthur A.K., Wanner G. and Fanning E. (1988) *Biotechnology* 6, 1214-1217.
- Summers M.D., Smith G.E. (1987) *A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures*. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin n° 1555.
- Filhol O., Cochet C. and Chambaz E.M. (1990) *Medecine et Sciences* 6 (3), 297-300.
- Maruniak J.E., Summers M.D. (1981) *Virology* 109, 25-34.
- Smith G.E., Fraser M.J., Summers M.D. (1983) *J. Virol.* 46, 584-593.
- Dulbecco R. and Vogt M. (1954) *J. Exp. Medicine* 99, 167-182.
- Miller D.W., Safer P., Miller L.K. (1986) In: J.K. Setlow and A. Hollander (eds). *Genetic engineering* vol. 8, pp 277-298. Principles and Methods. Plenum Publishing Corp. New York.
- Inlow D., Harano D., Maiorella B. (1987). Presented at symposium on strategies in cell-culture scale up. American Chemical Society National Meeting. New Orleans, Louisiana.
- Burand J.P., Summers M.D. and Smith G.E. (1980) *Virology* 101, 286-290.
- Miyamoto C., Smith G.E., Farrell-Towt J., Chizzonite R., Summers M.D., Ju G. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5, 2860-2865.
- Maeda S., Kawai T., Obinata M., Fujiwara H., Horiuchi T., Saeki Y., Furusawa M. (1985) *Nature (London)* 315, 592-594.
- Smith G.E., Summers M.D., Fraser M.J. (1983) *Mol. Cell. Biol.* 3, 2156-2165.
- Ilu S.I., Kosowski S.G., Schaaf K.F. (1987) *J. Virol.* 61, 820-832.
- Smith G.E., Ju G., Ericson B.L., Moschera J., Lahm H., Chizzonite R., Summers M.D. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 8404-8408.
- Wedegaertner P.B., Gill G.N. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 11346-11353.
- Patel G., Stabel S. (1989) *Cellular Signalling* 1, 227-240.
- Page M.J., Hall A., Rhodes S., Skinner R.H., Murphy V., Sydenham M., Lowe P.N. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 19147-19154.
- Herrera R., Lebwohl D., de Herreros A.G., Kallen R.G., Rosen O.M. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 5560-5568.
- Morrison D.K., Kaplan D.R., Escobedo J.A., Rapp U.R., Roberts T.M. and Williams L.T. (1989) *Cell* 58, 649-657.
- Vik T.A., Sweet L.J. and Erikson R.L. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2685-2689.
- Godwin G., Belisle B., DeGiovanni A., Gong T. and Vojchowski D. (1989) *In Vitro* 25 (3), 17-21.
- Luckow V.A., and Summers M.D. (1989) *Virology* 170, 31-39.
- Sarvari M., Csikos G., Sass M., Gal P., Shumaker V.N. and Zavodszky P. (1990) *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 167 (3), 1154-1161.
- Cochet C., Chambaz E.M. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 1403-1406.



## LES BIOTECHNOLOGIES VEGETALES POUR L'AMELIORATION ET LA PROTECTION DES CULTURES

G. FREYSSINET \*

\* RHONE-POULENC AGROCHIMIE LYON  
BP 9163 - 69263 LYON CEDEX 09

Au cours des quinze dernières années de nouvelles techniques liées à l'utilisation du gène génétique et à la totipotence du végétal ont vu le jour. Ces techniques vont-elles permettre de nouvelles approches pour la protection et l'amélioration des cultures ? Ce court résumé vise à répondre à cette question en prenant quelques exemples récents de la littérature.

### 1 - CARTES GENETIQUES :

La disponibilité de fragments d'ADN clonés a conduit de nombreux groupes à essayer de les localiser sur les chromosomes des plantes. En faisant ces études, on s'est aperçu que le diagramme d'hybridation est souvent différent pour différents cultivars d'une espèce donnée. Ces différences appelées polymorphisme des longueurs des fragments de restriction de l'ADN ont permis d'avancer rapidement dans la détermination de l'organisation du génome nucléaire de certaines plantes supérieures comme par exemple le maïs (1), ou la tomate (2). Cette technologie a de nombreuses applications, aussi bien dans le domaine végétal que dans le domaine animal, ou au niveau de l'espèce humaine. On retiendra en particulier : l'identification et la classification des cultivars, la liaison entre un diagramme de restriction et un caractère agronomiquement intéressant, l'aide au suivi de ce caractère dans le processus de sélection.

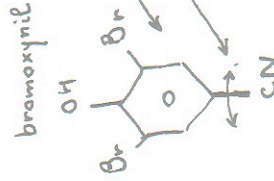
### 2 - UTILISATION DES TECHNIQUES DE BIOLOGIE CELLULAIRE :

Un végétal présente le caractère de totipotence, c'est-à-dire que l'on peut régénérer une plante fertile à partir d'un explant végétal, voire d'une seule cellule. Ces techniques sont développées depuis le début du siècle. Les premières applications ont été orientées vers la micropropagation des plantes comme les orchidées, les fraisiers, des arbres fruitiers. Depuis l'avènement du génie génétique et l'engouement pour les biotechnologies végétales, elles ont pris un second essor. Une des applications importantes est liée à l'utilisation de ces techniques couplées au transfert d'ADN étranger pour introduire de nouveaux caractères dans les cultures, voir ci-après pour quelques applications.

D'autres utilisations de cette totipotence sont par exemple liées à la culture *in vitro* des embryons immatures (sauvetage d'embryons) qui permet d'accélérer les cycles de sélection puisqu'on n'a plus besoin d'attendre la formation de la graine. Ainsi, chez le tournesol, on peut réaliser de trois à cinq régénérations par an. On peut aussi effectuer des sauvetages d'embryons après des croisements interspécifiques permettant ainsi d'obtenir de nouvelles combinaisons de gènes. Une autre application consiste à cultiver *in vitro* les gamètes mâles, on parle alors d'androgénèse, ou femelles, on parle alors de gynogénèse, pour obtenir des plantes haploïdes qui, lorsqu'elles doublent leur contenu chromosomique (dihaploïdes), donnent des lignées homozygotes en une génération (3). Enfin, d'autres groupes s'intéressent à l'utilisation de la phase *in vitro* pour sélectionner du matériel intéressant. En effet, dans certains cas, le tissu végétal cultivé *in vitro* subit des variations de son patrimoine génétique, on parle de variations somaclonales, qui peuvent être isolées, donnant des plantes régénérées différentes de la plante mère. Lorsque la variation "naturelle" est insuffisante, on peut appliquer un traitement mutagène. Cette approche a permis en particulier d'obtenir des plantes résistantes aux herbicides (4), ou ayant de nouvelles caractéristiques (5).

### 3 - LA RESISTANCE AUX HERBICIDES :

Jusqu'à présent, tous les herbicides ont été découverts par criblage différentiel des molécules sur les mauvaises herbes et les cultures, l'objectif étant de trouver une molécule qui détruit les mauvaises herbes sans affecter les cultures. Au cours de ce criblage, on trouve des molécules actives sur toutes les plantes et qui donc ne peuvent être utilisées que dans des conditions particulières, ce qui fait que dans de nombreux cas elles ne sont pas mises sur le marché. Dans ces cas-là, l'introduction de la résistance à la molécule dans une culture cible permettrait son développement. C'est ce à quoi de nombreuses sociétés d'agronomie consacrent une partie de leur activité depuis quelques années. Pour obtenir une résistance à un herbicide, on peut introduire soit une cible mutée résistante, soit un mécanisme de détoxification qui rendra la molécule inactive. C'est cette dernière stratégie que nous avons utilisée pour introduire la résistance au bromoxynil, un herbicide antimitotiques, dans le tabac industriel. En collaboration avec CALGENE, nous avons isolé un gène codant, pour une nitrilase qui permet la transformation du bromoxynil en acide 3,5-dibromo 4-hydroxybenzoïque. Ce gène a été transféré dans un tabac industriel en utilisant le système de transformation des disques foliaires avec *Agrobacterium*. Les tabacs transgéniques obtenus sont résistants à au moins 7 kg de bromoxynil/ha, soit plus de 20 fois la dose létale. CALGENE a transféré avec succès ce gène dans la tomate et le coton. Pour plus d'informations sur le sujet voir la référence 6.



### 4 - PLANTES RESISTANTES AUX INSECTES :

Une nouvelle voie pour protéger les plantes contre les insectes est d'introduire dans les plantes une molécule toxique pour les insectes qui attaquent cette plante. Deux types d'approches ont été utilisés à ce jour. Dans la première, les chercheurs ont introduit dans différentes cultures (tabac, tomate, pomme de terre, coton...) le gène codant pour la toxine de *Bacillus thuringiensis*. Lorsque l'insecte mange cette plante, il meurt rapidement. Dans la deuxième approche, les chercheurs ont introduit un gène codant pour un inhibiteur de protéases, si bien que lorsque l'insecte se nourrit sur cette plante il ne peut plus digérer et son développement



est fortement réduit. Pour rendre ces stratégies utilisables à grande échelle, il faudrait pouvoir élargir le spectre d'hôte, souvent ces protéines ne sont toxiques que pour une ou quelques espèces d'insectes. Il faudrait aussi augmenter l'efficacité et la rapidité d'action. Plus d'informations sur le sujet peuvent être obtenues dans les références 7 et 8.

#### 5 - PLANTES RÉSISTANTES AUX VIRUS :

Les plantes sont attaquées par des virus, ce qui entraîne souvent des baisses de rendement. La disponibilité des techniques de génie génétique et les connaissances sur les virus ont permis d'utiliser deux stratégies de protection. Dans la première le gène codant pour la protéine de la capsid est introduit dans le génome nucléaire de la culture. Dans la seconde, on introduit un gène codant pour un ARN messager antisens correspondant à une protéine indispensable au développement du virus. Dans les deux cas, les cultures sont résistantes à l'attaque du virus pour lequel la protection a été introduite. La référence 9 fournit des éléments complémentaires sur cet aspect.

#### 6 - INTRODUCTION D'AUTRES CARACTÈRES AGRONOMIQUES :

Les techniques disponibles et les succès obtenus dans les domaines décrits ci-dessus ont conduit les chercheurs à essayer d'introduire d'autres caractères agronomiques intéressants. Je retiendrai deux exemples de succès récents. Dans le premier, les chercheurs de Plant Genetic System ont introduit dans le tabac et le colza un gène codant pour une ribonucléase et contrôlé par un promoteur permettant une expression spécifique dans des cellules impliquées dans le développement des graines de pollen. Lorsque ce gène s'exprime, il entraîne la destruction de la cellule, donc du pollen, dans la plante, donnant ainsi une plante mâle stérile (10). Dans le second, les chercheurs ont remplacé une partie de la zone codant pour une protéine de réserve du colza, par la séquence nucléotidique codant pour la Leu-entképhaline. Le colza produit cette protéine dans ses graines. Il suffit après récolte de purifier la protéine (11). Cette stratégie permettrait-elle de développer une nouvelle voie de production de molécules peptidiques ayant, par exemple, un intérêt pharmacologique ? De nombreuses étapes restent encore à résoudre concernant en particulier le rendement et la pureté de la molécule.

Ces quelques exemples montrent l'intérêt des biotechnologies végétales appliquées à la protection et l'amélioration des cultures. De nombreux obstacles restent encore à franchir, en particulier dans le domaine des plantes transgéniques et dans l'application de ces techniques aux plantes de grandes cultures comme le maïs, le soja, les céréales... pour atteindre une exploitation industrielle et agricole de ces nouvelles approches.

#### REFERENCES

- 1 - HELENTJARIS T. 1987 - A genetic linkage map for maize based on RFLPs. *Trends in Genetics*, **3**, 217 - 221.
- 2 - TANSKLEY S.D., YOUNG N.D., PATERSON A.H. & BONIERBALE M.W. 1989 - RFLP mapping in plant breeding : New tools for an old science - *Bio/Technology*, **7**, 257 - 263.
- 3 - BECKERT M. 1986 - Quelques perspectives de production de plantes haploïdes chez le maïs. *Perspectives d'utilisation - Le Sélectionneur Français*, **36**, 29 - 46.
- 4 - CHALEFF R.S. & PARSONS M.F. 1978 - Direct selection in vitro for herbicide-resistant mutants of *Nicotiana tabacum* - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 5104 - 5107.
- 5 - EVANS D.A. 1989 - Somatic variation. Genetic basis and breeding applications - *Trends in Genetics*, **5**, 46 - 50.
- 6 - FREYSSINET G. 1990 - Résistance aux herbicides et transfert de gènes - 14ème Conf. du Colima. Journées Internationales d'Etudes sur la Lutte contre les Mauvaises Herbes. Versailles 1990, **9** - 23.
- 7 - VAECK M., REYNAERTS A. & HÖFTE H. 1989 - Protein engineering in plants : Expression of *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein gens - *Cell Culture and Somatic cell, Genetics of Plants*, **6**, 425 - 439.
- 8 - HILDER V.A., GATEHOUSE A.M.R., SHEERMAN S.E., BARKER R.F. & BOULTER D. 1987 - A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco - *Nature*, **300**, 160 - 163.
- 9 - ABEL P.P., NELSON R.S., DE B., HOFFMANN N., ROGERS S.G., FRALEY R.T. & BEACHY R.N. 1986 - Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene - *Science*, **232**, 738 - 743.
- 10 - MARIANI C., DE BEUCKELEER M., TRUETTNER J., LEMANS J. & GOLBERG R.B. 1990 - Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene - *Nature*, **347**, 737 - 741.
- 11 - KREBBERS E. & Van de KERCKOVE J. 1990 - Production of peptides in plant seeds - Insertion of a modified 2S albumin gene into *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* ; recovery of peptide from transformed seeds - *Trends Biotechnol.*, **8**, 1 - 3.



## V EXPRESSION DE GENES CLONES

traduit et commenté par B. CLAUSTRE M.E. DONNADILLE

### INTRODUCTION

depuis quelques années et la plupart des efforts scientifiques sont encore tournés vers la détermination de la structure des gènes. Cependant, si nous voulons utiliser le potentiel de ces technologies nous avons à apprendre le contrôle de l'expression de gènes spécifiques et sélectionnés.

les deux opérations qui constituent les événements de base du fonctionnement du gène sont d'une part la transcription de l'ADN en ARN messager (ARNm) et d'autre part la traduction de ce même ARNm en protéine.

Les procaryotes se différencient des eucaryotes par le fait que leurs gènes sont constitués de la juxtaposition de séquences nucléotidiques qui possèdent chacune leur propre rôle. Ces séquences entrent dans une structure que l'on appelle OPERON. Un exemple en est l'opéron lactose : en 5' des 3 gènes de structure  $\beta$ , Y et a on a 2 gènes à fonctions associées les gènes promoteur et opérateur. Pendant la transcription, l'ARN polymérase se lie au promoteur et provoque la transcription polycistronique de l'ensemble  $\beta$ , Y et a. Un contrôle peut être effectué à ce niveau si un répresseur se fixe sur le gène opérateur ; la polymérase ne pouvant pas se fixer la transcription est bloquée.

Un 2ème niveau de régulation fait intervenir une séquence nucléotidique d'ARN messager empêchant ce dernier de se fixer sur les ribosomes.

Le codon d'initiation AUG en ARNm (donc ATG en ADN) code pour le premier amino-acide de la protéine (qui est en fait une méthionine).

A la différence de ceux des procaryotes, les gènes eucaryotes sont constitués par une alternance de séquences nucléotidiques codantes dites EXONS et de séquences non codantes dites INTRONS.

Il a été montré que l'ADN était d'abord transcrit dans son intégralité en ARNm et que ce dernier subissait par la suite un épissage à savoir une excision enzymatique de tous les introns les uns après les autres et un réassemblage des exons entre eux pour donner un ARN monocaténaire codant pour une protéine unique. Or *Escherichia coli* ne possède pas les enzymes nécessaires à cette reconnaissance de sites d'excision pour effectuer cette épuration ou cette maturation et serait ainsi incapable de produire une molécule d'ARNm des eucaryotes qui puisse transcrire correctement le gène.

Le problème peut être résolu en clonant des gènes de synthèse obtenus biochimiquement par transcription inverse à partir d'ARNm. Mais le problème n'est que partiellement résolu puisqu'il nous reste l'obtention des signaux de transcription et de traduction qui doivent être reconnus. Mais cette reconnaissance dans des cellules bactériennes peut être obtenue en utilisant des vecteurs plasmidés désignés pour s'assurer que cet ADN complémentaire est bien transcrit et bien traduit dans la cellule hôte procaryote. Ces vecteurs sont appelés vecteurs d'expression (par opposition aux vecteurs de clonage).

ils peuvent être utilisés de 2 façons :

\* la première solution est d'utiliser une enzyme de restriction pour cloner un ADN (complémentaire) d'eucaryote dans un plasmide contenant tous les signaux nécessaires aux fonctions de transcription et de traduction.

En faisant cela, des précautions doivent être prises pour être sûr que la lecture des gènes eucaryotes reste correcte, sinon une mauvaise traduction du gène eucaryote pourrait arriver ; ici l'ouverture a été réalisée dans un triplet (ndt)

Les protéines eucaryotes désirées sont produites avec celles de l'hôte ; mais il faut se méfier d'interférences qui pourraient avoir lieu.

un exemple de l'utilisation de cette approche est la synthèse de l'insuline humaine.

Les gènes codant pour les chaînes A et B de l'insuline sont chimiquement synthétisés et sont insérés séparément dans un vecteur à la première partie de l'opéron lactose qui contient le promoteur et les gènes codant pour la  $\beta$  galactosidase. La production fusionnée conduit à l'obtention des chaînes A et B, chacune couplée à la  $\beta$  galactosidase.

On les clivera de cette dernière protéine par une enzyme spécifique épargnant un clivage des chaînes elles-mêmes ; les chaînes sont ensuite isolées et reliées entre elles par la réalisation de trois ponts disulfures aboutissant à l'insuline active.

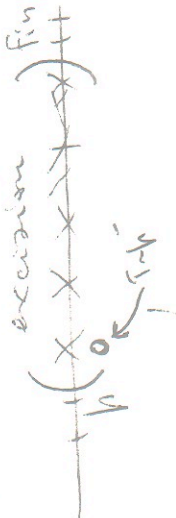
\* L'autre solution, consistant à passer par la non-fusion de deux protéines, est de cloner l'ADN dans un vecteur d'expression spécialement conçu. Il faut alors prendre un promoteur à fort pouvoir de contrôle tel que le promoteur tryptophane accolé d'une part à un codon d'initiation et d'autre part à une séquence de fin de transcription.

*Fusion*

$(A)(B)(\beta \text{ galactob})$  [A ins.] fin

$(A)(B)(\beta \text{ galactob})$  [B ins.] fin.





le vecteur subit l'excision d'une région située entre le promoteur et le site de terminaison ; le gène étranger est inséré ; en absence de tryptophane le gène est fortement exprimé ; la RNA polymérase transcrit donc la nouvelle portion insérée. ATG code pour la méthionine qu'il faudra ultérieurement éliminer. Cette approche de non-fusion a été utilisée pour produire l'enzyme chymosine, enzyme responsable du caillage du lait. L'ARNm codant pour la chymosine a été isolé puis introduit dans un promoteur tryptophane ayant un codon d'initiation.

**Commentaire de scènes filmées :**

voyons comment, en pratique, on peut vérifier qu'une cellule-hôte synthétise une nouvelle protéine :

Une souche d'E. coli décongelée est étalée sur une boîte de gélose.

Une colonie est prélevée et mise en suspension dans du milieu de culture, puis mise à multiplier dans une enceinte chauffée. Après centrifugation on obtient un culot bactérien ; par remise en suspension dans un tampon de lyse, on provoque la libération du contenu cellulaire ; les composants protéiques sont séparés par une électrophorèse verticale en gel de polyacrylamide ; un colorant bleu, ajouté au lysat avant le chargement des puits, sert de marqueur de position pour les peptides à migration rapide.

Après migration la cassette est sortie, le tampon vidé, les vitres séparées avec précaution. Le gel décollé est transféré dans un bac de colorant des protéines (bleu de coomassie).

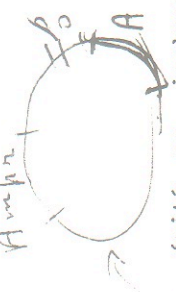
On remarque l'apparition dans le puits 12 (noté par l'opérateur "recombinant") d'une protéine nouvelle, habituellement non synthétisée par la bactérie, alors que le puits 10 par exemple correspond à des bactéries non recombinantes.

Les deux approches, l'une donnant des protéines fusionnées, l'autre non fusionnée ont chacune leur avantage ; l'utilisation d'une approche non-fusionnée n'est pas appropriée pour les protéines lourdes du fait de la difficulté de leur isolement.

En revanche, les petites protéines qui sont assez instables dans Escherichia coli semblent être plus adaptées à une synthèse fusionnée.

Ces méthodes de travail sont assez bien réglées au niveau du laboratoire, mais quand il s'agit de passer au niveau industriel on a d'avantage de problèmes. En plus des problèmes chimiques et d'application du génie génétique on se trouve confronté à des problèmes microbiologiques de perte de plasmide qui peuvent apparaître quand les cellules poussent sur un milieu de culture "high bio mass" c'est à dire à forte densité cellulaire. Les cellules bactériennes ne produisent plus les protéines désirées.

La perte de plasmide apparaît parce que la transcription de l'ADN exogène peut interférer avec la répllication du plasmide et entraîner des transformations métaboliques dans les cellules. Ainsi, les bactéries qui ne contiennent pas de plasmides, ont des avantages sélectifs qui leur permettent de proliférer.



Ceci peut être évité en incluant une séquence d'ADN extracellulaire spécifique dans le plasmide ou par sélection d'un gène sur le plasmide qui permettra aux seules cellules transformées de pousser, par exemple en présence d'un antibiotique.

Un autre problème se présente parce que les protéines eucaryotes ont tendance à être insolubles dans les cellules procaryotes. Ceci est sûrement dû au fait que la cellule d'Escherichia coli ne peut pas effectuer les réactions post-traductionnelles des cellules eucaryotes telles que la glycosylation ou la formation de ponts disulfures. En outre des protéines avec de forts pôles hydrophobes ne sont pas très bien tolérées. Les protéines eucaryotes s'accumulent souvent dans les cellules procaryotes comme des agents étrangers et réfractaires.

Cependant aucun de ces problèmes n'est insoluble. En effet la chymosine active, par exemple, a pu être produite à partir de la prochymosine. Celle-ci est utilisée dans la fabrication de certains fromages.

Des organismes autres qu'Escherichia coli peuvent être aussi utilisés pour exprimer des ADN clonés. C'est le cas de micro-organismes qui ont la propriété de sécréter plusieurs enzymes ; ils ont été adaptés. Ainsi des protéines ont été sécrétées et ceci a remédié au problème de leur solubilité. C'est le cas des Streptomyces pour lesquels il a été démontré que les voies enzymatiques de synthèse d'antibiotiques peuvent être transférées d'une souche à l'autre.

Dans cet ordre d'idée une voie enzymatique codant peut être transférée d'un organisme bactérien à faible vitesse de croissance et être incorporée dans un organisme à fort pouvoir de croissance. De nouveaux antibiotiques seront aussi synthétisés en utilisant des streptomyces recombinés.

Une solution évidente au problème de l'expression des gènes eucaryotes dans la cellule procaryote est de faire s'exprimer dans une cellule eucaryote les gènes considérés.

ceci a été fait avec succès pour des levures par exemple qui contiennent des plasmides naturels et qui ont été adaptées pour être utilisées en clonage.

Un vecteur -plasmide ou bactériophage- dans lequel on s'est arrangé pour qu'il y ait une origine de répllication et un gène de sélection distincts pour d'une part un hôte bactérien et d'autre part un hôte eucaryote est appelé vecteur "navette".

Un exemple de l'utilisation des levures recombinées est la synthèse de l'antigène de surface du virus de l'hépatite B. Cet antigène S correspond à la protéine qui confère l'immunité à l'infection provoquée par le virus.

Cette protéine s'accumule dans les vacuoles des levures de la même façon qu'elle est présente dans le sérum des patients infectés ; elle peut être purifiée et intégrée dans le vaccin potentiel contre l'infection.

Le principal problème que l'on peut rencontrer en utilisant des levures comme hôte pour l'expression des gènes est que notre connaissances des levures est encore rudimentaire.

Une autre alternative est l'utilisation de cellules de mammifères pour l'expression de gènes clonés. Elles peuvent être cultivées au laboratoire en appliquant des règles



strictes de stérilité.  
 Les cellules collectées sont réparties en 2 flacons pour une production en plus grande quantité ; puis une fois le milieu de culture enlevé les cellules sont lavées. On fait de leur adhérence aux parois par des protéines on fait une trypsinisation (noter les chocs contre la paillasse pour le décollement). La trypsinisation, qui doit être brève, est arrêtée, puis les cellules sont diluées et transférées dans 2 flacons de culture.  
 Remarque que le travail est effectué sous une hotte à flux laminaire.

Voyons en détail ce qu'est la transformation. Elle repose sur l'intégration d'un ADN exogène dans le chromosome d'un hôte. Mais le mécanisme d'intégration n'est pas toujours réalisé facilement. Si le gène qui doit être cloné code pour une production sélective, on voudra ensuite pouvoir reconnaître l'efficacité de cette transformation. Dans ce but la cellule hôte peut être transformée d'une part avec le gène que l'on veut cloner et d'autre part avec un gène marqueur : c'est donc une double incorporation dans le gène de l'hôte. Cette méthode de transformation simultanée avec deux ADN différents est appelé cotransformation.

Le gène marqueur fournit à la fois le recombinant sélectif et le contrôle d'expression du gène cloné. Le gène d'intérêt est présenté de telle façon que les signaux de transcription et de traduction soient intacts.

On va s'intéresser ici à la cotransformation entre le gène codant pour la dihydrofolate réductase (DHFR) et celui de l'activateur du plasmidogène. Cette dernière enzyme : la dihydrofolate réductase intervient dans le processus de mitose en permettant la transformation de l'acide folique en acide tetrahydrofolique qui est un matériel indispensable à la multiplication des cellules. Seules les cellules exprimant suffisamment cette dernière enzyme peuvent pousser en présence de méthotrexate. Une des caractéristiques de ce gène est dans certaines cellules d'être amplifié ; lorsque le milieu contient du méthotrexate plus de cellules comportent un nombre élevé de copies de ce gène plus elles résistent à des doses élevées de Méthotrexate. On l'a vu, le gène de l'activateur du plasmidogène est intégré dans le chromosome de l'hôte juste à côté du DHFR. Ce dernier, lorsqu'il est amplifié, l'est simultanément au gène tPA (Tissue Plasminogen Activator). On a donc un nombre croissant de transcripts de gènes codant pour l'activateur du plasmidogène en relation avec les concentrations croissantes de METHOTREXATE dans le milieu de culture.  
 On peut ainsi espérer des applications médicales. Un exemple de l'utilisation de cette protéine réside dans la résorption de caillots dans l'infarctus du myocarde.  
 Une autre méthode pour obtenir le contrôle de l'expression d'un gène cloné est d'utiliser, comme vecteur, un virus qui normalement infecte les cellules. L'ADN du virus possède généralement tous les signaux nécessaires à la transcription et à la traduction dans ces cellules.

DHFR tPA DHFR tPA Diffé (PA)  
 sélection en  
 présence de MTX

Un virus couramment utilisé dans cette optique est le virus du papillome bovin (BPV). L'ADN de ce virus est facilement manipulé et répliqué dans des cellules hôtes indépendamment de leur chromosome. Le gène désiré, le promoteur et le gène de sélection sont dans ce cas clonés dans BPV. Cet ensemble de gènes est ensuite cloné dans un plasmide d'Escherichia coli qui contient un gène de résistance aux antibiotiques (R). Ceci permet le clonage et la caractérisation des recombinants dans Escherichia coli avant l'infection des cellules eucaryotes pour l'expression des gènes cotransformés.  
 Une méthode de sélection dans les cellules eucaryotes est de conférer aux cellules un caractère d'insensibilité aux métaux lourds.

En permettant la production de cette nouvelle protéine ce gène confère aux cellules hôtes ainsi transformées une protection contre la toxicité du cadmium et du zinc. Ces cellules vont exprimer, simultanément à la résistance, le gène désiré. Ces méthodes ont été utilisées pour fabriquer l'hormone de croissance humaine. Comme avec les cellules procaryotes, des problèmes sont apparus et notamment en ce qui concerne le développement des millions de cellules eucaryotes quand elles poussent en suspension et qu'elles nécessitent une agitation et une bonne aération en continu.

CONCLUSION C'est <sup>2a</sup> ~~la~~ AAI méthode MSH

Des cellules transformées par des vecteurs ont été utilisées pour faire des protéines de toutes sortes. Elles ont été utilisées au laboratoire pour analyser l'expression des gènes et dans l'industrie pharmaceutique pour produire des protéines à visée thérapeutique.

Ces techniques sont encore assez récentes et changeront rapidement quand les incompréhensions de l'expression des gènes seront totalement levées avec les techniques de plus en plus sophistiquées dont nous disposons. Tandis que de plus en plus de gènes sont clonés, la production de leurs protéines correspondantes sont exprimées dans des vecteurs. Il devrait être possible d'exprimer aussi de l'ADN cloné qui aurait pu être modifié in vitro au préalable.

Ainsi de nouvelles protéines seront elles synthétisées. Un exemple de ces applications est la production de nouveaux interférons qui ne sont pas naturels. Deux gènes codant pour deux interférons différents mais similaires ont été clonés et recombinés pour faire un nouveau gène. Quand ce nouvel ADN sera exprimé, il donnera un nouvel interféron. La production de nouvelles protéines thérapeutiques et les systèmes de criblage indispensables commencent à se développer.

Les applications potentielles du génie génétique concernant l'expression des gènes clonés sont si récentes que ces techniques vont avoir un impact de plus en plus grand dans la vie de tous les jours.

par PCR mutations in situ  
 masquant un AA.



# MODIFICATIONS DU POTENTIEL GENETIQUE D'UN ORGANISME EN VUE D'UNE PRODUCTION

- Quelques exemples -

INSERT (structure type): régulateur - promoteur - op<sup>-</sup> - cotransformant / gène de structure ± inducteur

	A - par vecteurs	intérêt
transformation (plasmide)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• promoteur tryptophane - chymosine</li> </ul>	<p>en absence de Trp forte transcription.</p>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• p-O-CII de <math>\lambda</math> / <math>\alpha_1</math> anti trypine (*)</li> <li>+ élévation de t<sup>o</sup> (pBR322)</li> </ul>	<p>répenseur thermosensible; le peptide viral CII non inducible permet fixation de l'affinité ARN-ribosome.</p> <p>= protéine de "fusion"</p>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\beta</math> gal NH<sub>2</sub>-term. / viruline A</li> <li>+ IPTG</li> </ul>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DHFR * / tPA</li> <li>+ tétracycline (eucaryotes)</li> <li>+ triméthopime (bactéries)</li> </ul>	<p>Plutôt que d'une induction il s'agit d'une <u>sélection</u> cellulaire par résistance produite (amplification en tandem)</p>
transfection (virus: phages...)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DHFR * / antigène pré S<sub>2</sub> HBV (*)</li> <li>(Cellules Hamster Ovariennes)</li> </ul>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>(*) cotransformant supplémentaire: / peptide signal</li> </ul>	<p>production en continu par excision de la protéine</p>
transduction (cosmides)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• promoteur de la polyhédrine virale / interleukine (*)</li> </ul>	<p>cellules d'irradiées en culture infectées par (bactéris-) virus</p> <p>(vecteurs de dosage)</p>

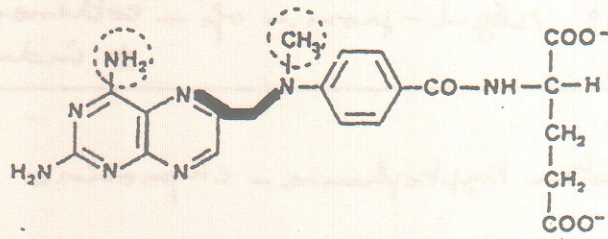
B - sans vecteur	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\beta</math> lactoglobuline / F IX (*)</li> </ul>	<p>focalisation tissulaire de l'expression chez organisme transgénique, et excrétion (lait).</p>
micro injection intra nucléaire d'ADN (eucaryotes sup.)		
micro injection intra cytoplasmique d'ARN		<p>limité à étude de fonctionnement</p>

(\*) : documentation disponible sur demande \* voir au dos

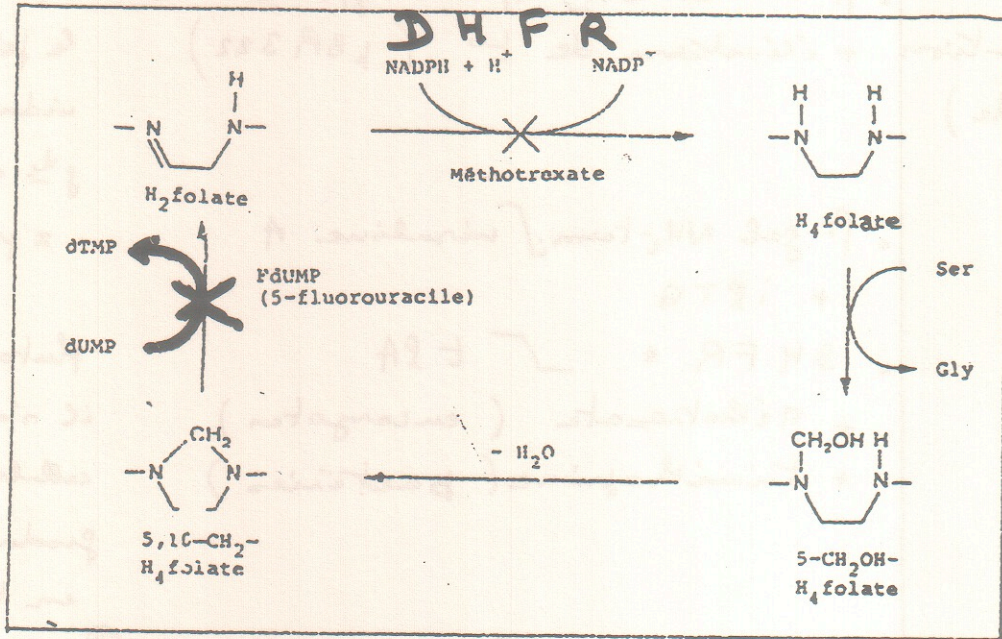


INHIBITION DE LA RÉGÉNÉRATION DU TÉTRAHYDROFOLATE

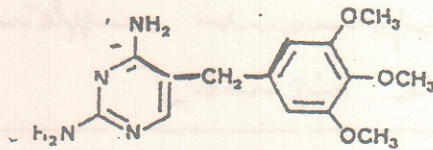
\* INHIBITION DE LA DIHYDROFOLATE REDUCTASE HUMAINE



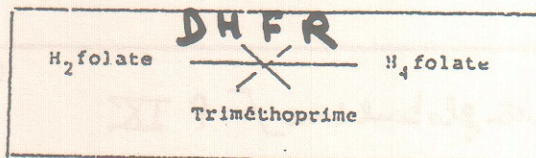
Méthotrexate  
(antinéoplasique, traitement du psoriasis)



\* INHIBITION DE LA DIHYDROFOLATE REDUCTASE BACTERIENNE



Triméthoprime (antibactérien)  
Utilisé en association avec le sulfaméthoxazole (effet synergique par double blocage)

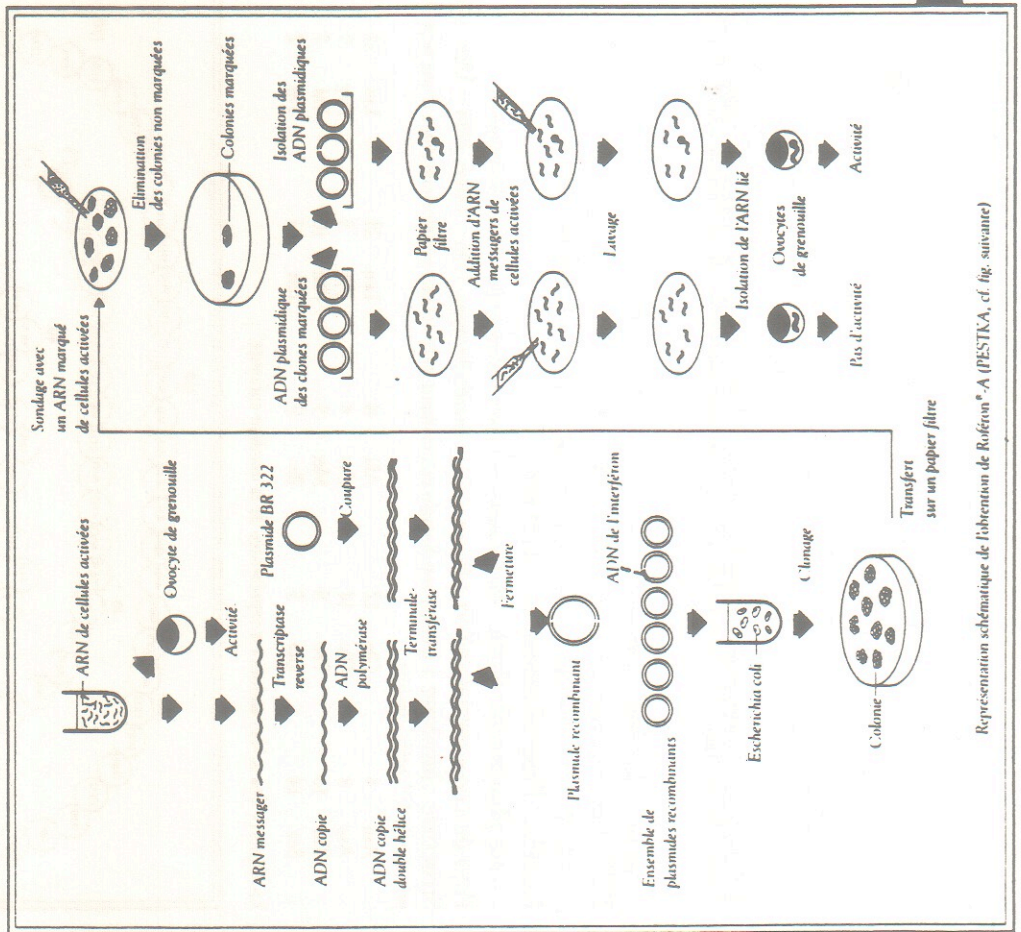




# Production

L'interféron humain recombinant  $\alpha$ -2a, principe actif de Roferon<sup>®</sup>-A, est produit par le génie génétique appliqué à la biotechnologie.

Il est synthétisé par Escherichia coli 294 M 2, qui contient le plasmide pLIF-A-trp 45 dans lequel on a introduit par recombinaison génétique le gène humain codant pour l'interféron  $\alpha$ .



Représentation schématique de l'obtention de Roferon<sup>®</sup>-A (PESTKA, cf. fig. suivante)

Le plasmide recombinant est introduit dans *E. coli* qui produit alors de grandes quantités d'interféron humain recombinant leucocyttaire que l'on a désigné d'abord par la lettre A (IFrA) puis par  $\alpha$ -2a : l'interféron  $\alpha$ -2a humain recombinant (dénomination commune internationale) est le principe actif de Roferon<sup>®</sup>-A qui agit comme un homologue à partir de cellules humaines.

La culture des bactéries produisant de l'interféron a lieu dans un fermentateur.

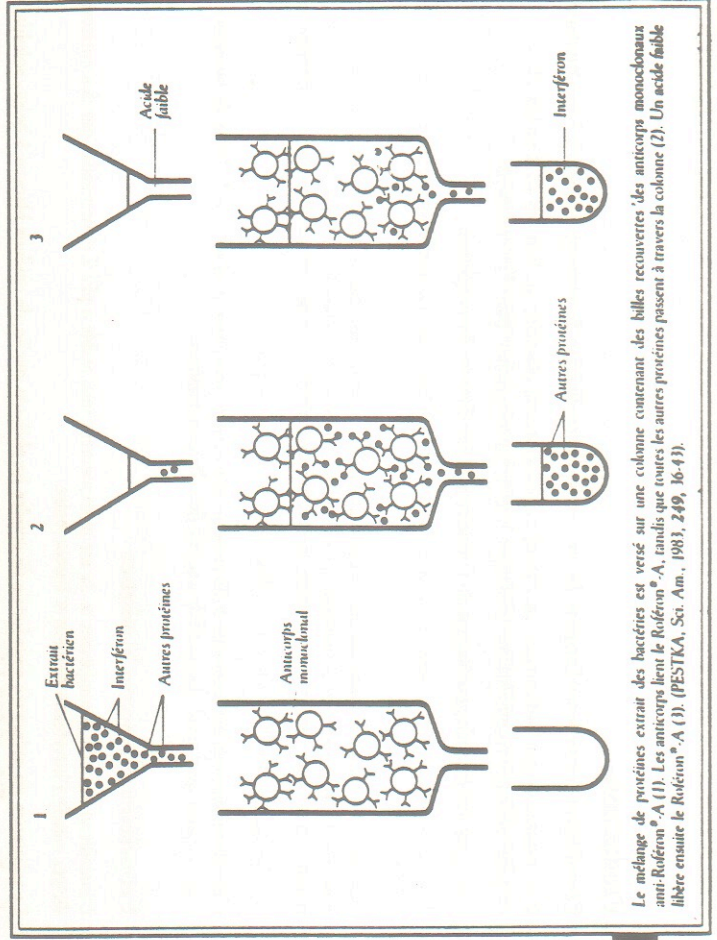
Après extraction de l'interféron à partir de la masse cellulaire bactérienne détruite, celui-ci est hautement purifié.

Des anticorps monoclonaux dirigés contre l'interféron  $\alpha$  ont été préparés et fixés sur des billes placées dans une colonne à chromatographie. Un extrait brut d'interféron recombinant est versé : seul l'interféron se lie aux anticorps tandis que les autres composants bactériens traversent la colonne sans être retenus.

Grâce à une solution acide faible l'interféron est ensuite détaché, la solution est neutralisée et concentrée, des techniques complémentaires de purification sont appliquées.

On obtient ainsi de l'interféron  $\alpha$  pratiquement pur.

Tout au long de la fabrication des contrôles rigoureux sont réalisés ; ils ont pour but de s'assurer de la stabilité des plasmides recombinants et de l'absence de modifications de la séquence d'acides aminés de Roferon<sup>®</sup>-A au fur et à mesure que les générations d'*E. coli* se renouvellent.



Le mélange de protéines extrait des bactéries est versé sur une colonne contenant des billes recouvertes des anticorps monoclonaux anti-Roferon<sup>®</sup>-A (1). Les anticorps lient le Roferon<sup>®</sup>-A, tandis que toutes les autres protéines passent à travers la colonne (2). Un acide faible libère ensuite le Roferon<sup>®</sup>-A (3). (PESTKA, Sci. Am., 1983, 249, 16-43)



# Renseignements généraux Roféron® -A

**Nom de spécialité :** Roféron®-A ( *lots. Roche* )

**DCI :** Interféron alfa-2a humain recombinant (IFN  $\alpha$ -2a)

**Autres dénominations :** Interféron recombinant  $\alpha$ -A, IFN  $\alpha$ -A, IFN $\alpha$ -A, IFLrA

**Numéro d'expérimentation :** Ro 22-8191

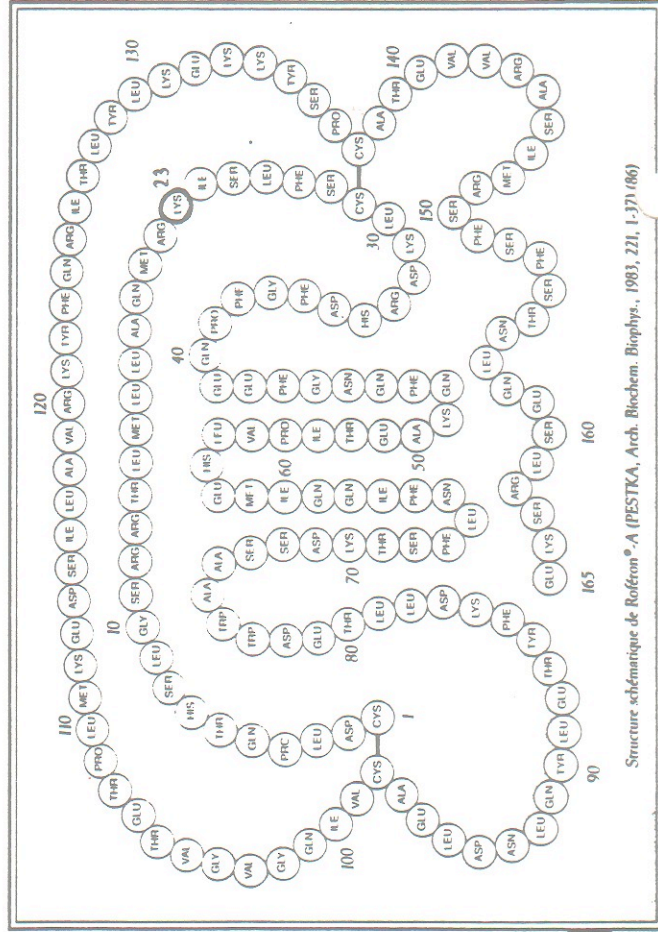
**Classe pharmacologique :** Modificateurs de réponse biologique (médiateurs biologiques).

**Pays de commercialisation :** France, 1987 - Grande-Bretagne, 1986 - Suisse, 1986 - USA, 1986

**Structure chimique :** L'interféron humain recombinant  $\alpha$ -2a est une protéine composée d'une séquence primaire de 165 acides aminés.

Asn	4	Gln	12	Ala	8	Leu	21	Lys	11
Asp	8	Glu	14	Cys	4	Tyr	5	Arg	9
Thr	10	Pro	5	Met	5	Phe	10	Val	7
Ser	14	Gly	5	Ile	8	His	3	Trp	2

La séquence des acides aminés est représentée de la manière suivante\* :



Structure schématique de Roféron®-A (PESTKA, Arch. Biochem. Biophys., 1983, 221, 1-37) (66)

\* Les interférons recombinants  $\alpha$  diffèrent par un acide aminé : interféron  $\alpha$ -2a : lysine en position 23, interféron  $\alpha$ -2b : arginine en position 23

## Production

L'interféron humain recombinant  $\alpha$ -2a est produit par application du génie génétique à la biotechnologie. Il est synthétisé par *Escherichia coli* 294 M 2 qui contient le plasmide pLIF-A-trp 45 dans lequel on a introduit par recombinaison génétique le gène humain codant pour l'interféron  $\alpha$ .

La culture des bactéries produisant de l'interféron a lieu dans un fermentateur.

Après extraction de l'interféron à partir de la masse cellulaire bactérienne détreuite, celui-ci est hautement purifié.

Des anticorps monoclonaux sont utilisés afin d'éliminer les protéines bactériennes contaminantes et d'obtenir un interféron quasiment pur. Grâce à une solution acide faible l'interféron est ensuite détaché, la solution est neutralisée et concentrée, des techniques complémentaires de purification sont appliquées.

On obtient ainsi de l'interféron recombinant  $\alpha$  pratiquement pur.

L'interféron humain recombinant  $\alpha$ -2a possède une activité spécifique de 4 à 8 x 10<sup>6</sup> UI/mg de protéines ; il agit comme un homologue produit à partir de cellules humaines.

## Propriétés physico-chimiques

L'interféron humain recombinant  $\alpha$ -2a est pratiquement pur, stable à pH 2 et neutralisé par des anticorps dirigés contre l'interféron humain  $\alpha$  leucocytaire.

La substance est présentée sous forme de poudre lyophilysée stérile, de couleur blanche à beige, soluble dans l'eau. - PM : 19 000 daltons.

- Solution aqueuse limpide à opalescente, incolore à jaune pâle.  
- pH de la solution 5 à 8.

## Composition

**Roféron®-A 3 millions d'unités/flacon**

interféron  $\alpha$ -2a humain recombinant (DCI)  
chlorure de sodium  
sérum albumine humaine

	par boîte de
1 MUI	10
3 MUI	30 MUI
9 mg	90 mg
5 mg	50 mg
	30
	90 MUI
	270 mg
	150 mg

**Roféron®-A 9 millions d'unités/flacon**

interféron  $\alpha$ -2a humain recombinant (DCI)  
chlorure de sodium  
sérum albumine humaine

	par boîte de
1 MUI	10
9 MUI	90 MUI
9 mg	90 mg
5 mg	50 mg
	30
	90 MUI
	270 mg
	150 mg

**Roféron®-A 18 millions d'unités/flacon**

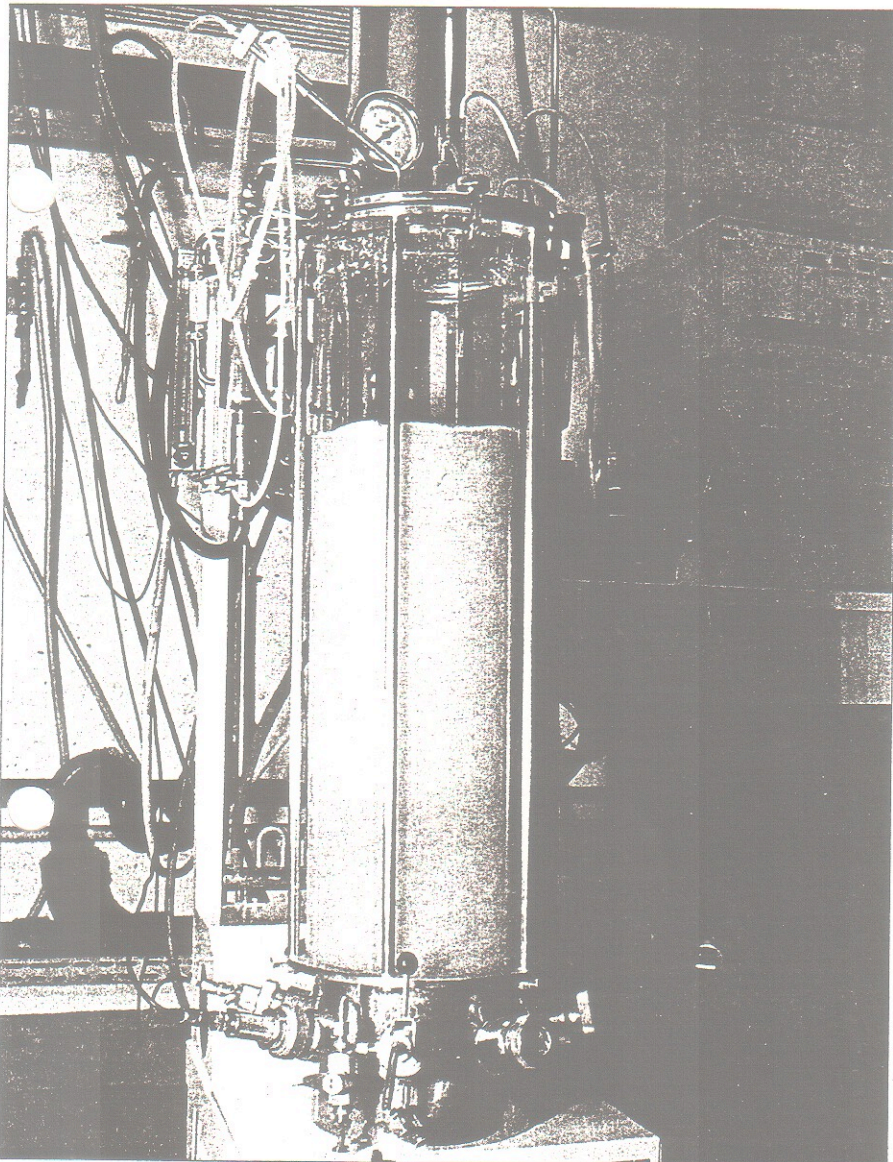
interféron  $\alpha$ -2a humain recombinant (DCI)  
chlorure de sodium  
sérum albumine humaine

	par boîte de
1 MUI	10
18 MUI	180 MUI
9 mg	90 mg
5 mg	50 mg
	30
	180 MUI
	540 MUI
	270 mg
	150 mg



# DE NOUVEAUX ANTICORPS POUR LES ANALYSES MÉDICALES

GRÂCE AU GÉNIE GÉNÉTIQUE, LES RÉACTIFS  
NÉCESSAIRES AUX DOSAGES BIOLOGIQUES PEUVENT  
AUJOURD'HUI ÊTRE DIRECTEMENT PRODUITS  
PAR DES BACTÉRIES.



Les hôpitaux et les laboratoires médicaux effectuent chaque jour des centaines de milliers d'analyses pour détecter des virus, des bactéries ou des parasites, déceler des cellules cancéreuses, ou encore doser des toxines ou des hormones. Ces examens apportent au médecin une source d'informations indispensable pour effectuer un diagnostic fin et mettre en place le traitement approprié. Généralement, les

réactifs utilisés pour ces dosages sont des anticorps couplés à des enzymes<sup>(1)</sup>. Leur champ d'utilisation s'étend d'ail-

Figure 1. Les dosages biologiques nécessitent de disposer d'anticorps dirigés contre la substance recherchée. Il est aujourd'hui possible de faire produire ces anticorps en grande quantité par des bactéries en culture (sur le cliché), ce qui évite d'avoir recours aux animaux de laboratoire. (Cliché G. Luneau/CEA Saclay)

leurs depuis quelques années à l'agriculture et à l'industrie alimentaire, où ils permettent de détecter la présence de toxines ou de composés interdits par la législation<sup>(2)</sup>.

Mais la fabrication des réactifs nécessaires est longue, coûteuse et nécessite le sacrifice de nombreux animaux de laboratoire pour obtenir les anticorps adéquats. Les industriels sont donc à l'affût de procédés plus avantageux. Au département d'ingénierie et d'études des protéines du CEA, à Saclay, nous avons mis au point une nouvelle génération d'anticorps de dosage, dont la production est assurée en totalité par des bactéries<sup>(3)</sup>. Ces travaux ont été couronnés en octobre 1992 par l'attribution du prix de biologie Alfred Kastler à l'un d'entre nous (F. Ducancel), ce qui souligne l'intérêt suscité par cette approche limitant l'utilisation d'animaux de laboratoire.

Les tests de dosage dits « immuno-enzymatiques » reposent sur l'utilisation d'anticorps, ou immunoglobulines, qui se fixent spécifiquement sur la substance recherchée. L'anticorps peut être visualisé parce qu'il a été préalablement lié chimiquement à une enzyme facilement détectable. On utilise pour cela des enzymes capables de scinder des molécules de synthèse particulières appelées chromogènes, qui donnent naissance à un produit coloré, alors que la molécule de départ est incolore. De tels substrats chromogènes ont été mis au point pour différentes enzymes : la  $\beta$ -galactosidase, la peroxydase, l'acétylcholinestérase, la phosphatase alcaline, pour ne citer que les plus connues. Lors du test, l'intensité de la coloration obtenue est proportionnelle à la quantité de substance présente. Il est ainsi possible de doser des quantités infimes, de l'ordre de  $10^{-15}$  g, d'une hormone par exemple.

La mise au point d'un système de dosage commercialisable nécessite donc à la fois de disposer de l'anticorps voulu en quantité suffisante, et de coupler ce dernier à l'enzyme qui permettra de le détecter. Classiquement, l'immunoglobuline est obtenue en injectant à des animaux de laboratoire, en général des souris, la substance à doser. La protéine étrangère déclenche une réaction immunitaire chez l'animal, qui sécrète des anticorps dirigés contre la substance injectée. Depuis la découverte de G. Kolher et C. Milstein, au Medical Research Center, à Cambridge, en 1975, on sait prélever les cellules immunitaires qui sécrètent les immunoglobulines puis les « immortaliser » en les fusionnant avec des globules blancs cancéreux : on obtient ainsi des cellules capables de se multiplier indéfiniment<sup>(4)</sup>. Après sélection des cellules hybrides synthétisant l'anticorps voulu,

- (1) T. Porstm et S.T. Kiessi *J. Immunol. Methods*, 150, 5, 1992.
- (2) J.H. Skerr *Agro-Industry HI-Tech*, 3, 29, 1991.
- (3) F. Ducancel *et al.*, *C.R. Acad. S. Paris*, 315, 221, 1992.
- (4) G. Kolher et C. Milstein *Nature*, 256, 52, 1975.
- (5) A. Skerra et A. Plückthum, *Science*, 240, 1038, 1992.
- (6) M. Better *et al.*, *Science*, 240, 1041, 1992.
- (7) Demande de Brevet français du CEA n° 8908444 du 26 juin 1992.
- (8) D. Gillet *et al.*, *Protein Engineering*, 5, 273, 1992.
- (9) W. Wels *et al.*, *Biotechnology*, 10, 1128, 1992.
- (10) C. Liqing *et al.*, *Protein Engineering*, 5, 605, 1992.



leur production en masse est assurée par des techniques de culture cellulaire ou, le plus souvent, par l'injection de ces cellules dans l'abdomen de souris où elles développent une tumeur. On peut ainsi produire à volonté des anticorps dits monoclonaux (parce qu'ils sont produits par un seul clone de cellules) dirigés contre des composés extrêmement divers. Mais l'utilisation des animaux de laboratoire est soumise à une réglementation de plus en plus contraignante et restrictive, particulièrement depuis la publication au *Journal Officiel* de la Communauté européenne, en 1986, des nouvelles directives relatives à l'expérimentation animale.

Qui plus est, le couplage de l'anticorps à l'enzyme reste une procédure fastidieuse. Celui-ci est réalisé par des procédés chimiques qui nécessitent plusieurs étapes de purification longues et coûteuses. En outre, la réaction chimique a généralement lieu au hasard à la surface des deux partenaires : il n'existe pas de site de couplage précis, ce qui aboutit à la formation de composés très hétérogènes.

Le développement récent du génie génétique a permis l'émergence de nouvelles techniques de production d'anticorps monoclonaux. Ainsi, en 1988, deux équipes, celle de A. Skerra et A. Plückthum, à l'institut Max Planck de Martinsried, en Allemagne, et celle de A.H. Horwitz de la firme Ingene, à Santa Monica, aux États-Unis, ont réussi à produire des fragments d'anticorps fonctionnels dans des bactéries en culture (fig. 1)<sup>(5,6)</sup>. Les chercheurs ont d'abord extrait, à partir des cellules animales immortalisées, le matériel génétique nécessaire à la production de l'immunoglobuline. Ils ont ensuite transféré dans des colibacilles les portions de gènes codant la région de l'immunoglobuline qui reconnaît la cible. Le fragment d'anticorps, sécrété à l'extérieur de la bactérie, peut ensuite être récupéré aisément.

Ces premiers travaux constituaient une avancée considérable, mais ils ne résolvaient pas le problème du couplage de l'anticorps avec l'enzyme. Or, depuis quelques années, notre équipe développe une technique de génie génétique qui conduit les bactéries à produire directement des protéines chimères. Nous avons d'abord cherché à fusionner une enzyme bactérienne, la phosphatase alcaline, avec une toxine de venin de serpent<sup>(8)</sup>. Nous avons inséré la portion d'ADN codant la toxine dans le gène de l'enzyme, puis nous avons introduit l'ensemble dans des colibacilles. Le gène chimère s'est révélé fonctionnel, et les bactéries modifiées sécrètent une molécule constituée de la toxine et de l'enzyme bout à bout dans

la même chaîne protéique. Ce type de construction, pour lequel nous avons déposé un brevet dès 1989<sup>(7)</sup>, a été étendu à d'autres protéines (hormones, toxines animales)<sup>(8)</sup>. Pouvaient-il s'appliquer aux immunoglobulines ? La principale difficulté réside dans le fait qu'une immunoglobuline est une molécule complexe, constituée de quatre chaînes protéiques, deux chaînes lourdes et deux chaînes légères (voir « La superfamille des immunoglobulines » dans *La Recherche* de juin 1991). Chacune de ces protéines contient une région variable ; ces régions, associées, sont responsables de la reconnaissance de la cible (fig. 2A). Dans un premier temps, notre procédé a été utilisé avec un fragment d'anticorps réduit à une seule chaîne protéique, constituée des régions variables accolées. En 1992, l'équipe suisse de

N.E. Hynes, à l'institut Friedrich Miescher, à Bâle, en association avec la société Ciba-Geigy<sup>(9)</sup> a construit une protéine chimère à partir du gène de la phosphatase alcaline, et des gènes codant pour un anticorps spécifique d'une protéine (erbB-2) présente en grande quantité à la surface de certaines cellules cancéreuses humaines. Ils ont ensuite utilisé ce réactif pour identifier des tumeurs du sein et des ovaires, avec un taux de succès comparable à celui des tests classiques. Cependant, les fragments d'immunoglobuline utilisés dans ces expériences, qui sont constitués d'une seule chaîne protéique, ont l'inconvénient de présenter une affinité pour leur cible jusqu'à dix fois plus faible que l'anticorps naturel.

Pour obtenir des produits de dosage encore plus performants, nous avons cherché à construire une protéine

chimère dont la structure serait plus proche de celle de l'anticorps naturel. Nous avons alors réalisé une construction génétique plus élaborée, qui permet la production simultanée par la bactérie de quatre chaînes protéiques : les deux chaînes légères de l'immunoglobuline, et deux chaînes lourdes tronquées fusionnées à l'enzyme (fig. 2B). Lorsqu'on introduit cette construction génétique dans la bactérie, les quatre chaînes synthétisées sont excrétées, et s'associent comme dans une immunoglobuline naturelle<sup>(2)</sup>. Cette molécule chimère est l'une des protéines les plus complexes qui ait été produite à ce jour par une bactérie. Elle possède une activité enzymatique performante et la même affinité pour sa cible que l'anticorps naturel. En outre, contrairement aux réactifs préparés par voie chimique, le composé obtenu est parfaitement identique d'une préparation à l'autre, puisqu'il est codé par une séquence génétique unique.

Le système génétique que nous avons mis au point permet de changer à volonté le fragment de gène codant l'anticorps, pour donner naissance à une infinité de réactifs détectant autant de substances différentes. Un autre atout déterminant est la facilité avec laquelle il est possible d'intervenir sur le fragment de gène introduit, pour modifier légèrement l'anticorps selon les exigences du dosage. Par exemple, les industriels se heurtent parfois au manque de spécificité des anticorps disponibles. De nombreuses équipes cherchent à obtenir des anticorps plus performants en effectuant *in vitro* des mutations dans la séquence génétique introduite, pour modifier la portion de la protéine qui reconnaît la cible.

Ces premiers résultats, prometteurs, doivent encore être confortés par l'amélioration des propriétés de l'enzyme bactérienne, la phosphatase alcaline, dont l'activité est inférieure à celle des enzymes de mammifères utilisées classiquement. Cette moindre efficacité diminue la rapidité des dosages, ce qui ne pose pas de problèmes majeurs pour les analyses effectuées en laboratoire de recherche ou à l'hôpital, mais constitue un obstacle à son utilisation dans des kits de diagnostic rapides comme les tests de grossesse. Toutefois, le problème n'apparaît pas insurmontable, puisque plusieurs équipes ont décrit récemment des mutants de l'enzyme bactérienne plus performants<sup>(10)</sup>. Il reste maintenant à produire et à tester ces réactifs à plus grande échelle, pour répondre à l'intérêt croissant que portent les grandes industries du diagnostic à ces nouvelles méthodes de production.

JEAN-CLAUDE BOULAIN, FRÉDÉRIC DUCANCEL, DANIEL GILLET ET ANDRÉ MENEZ

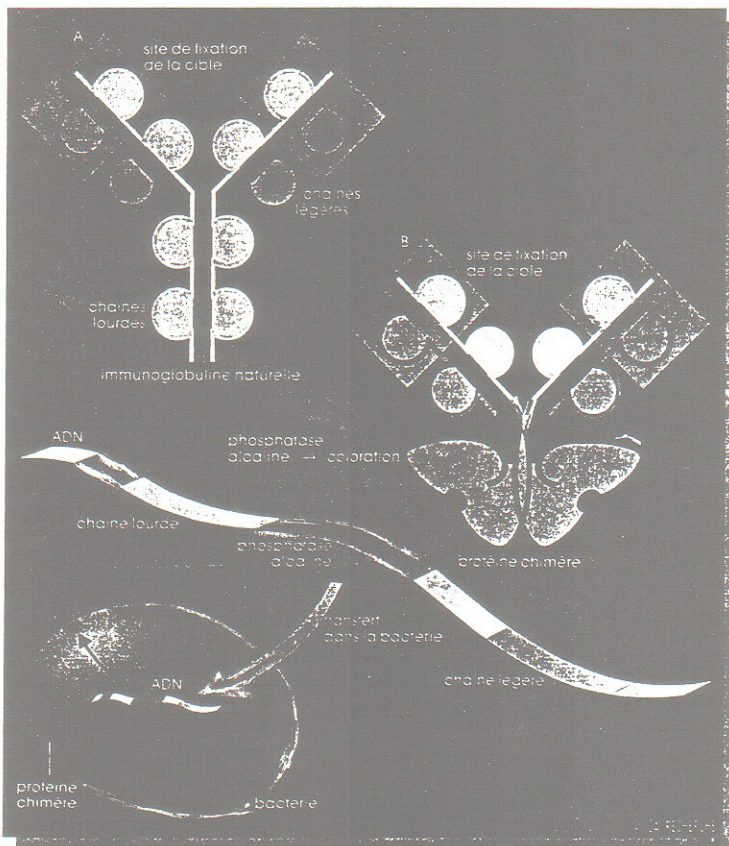
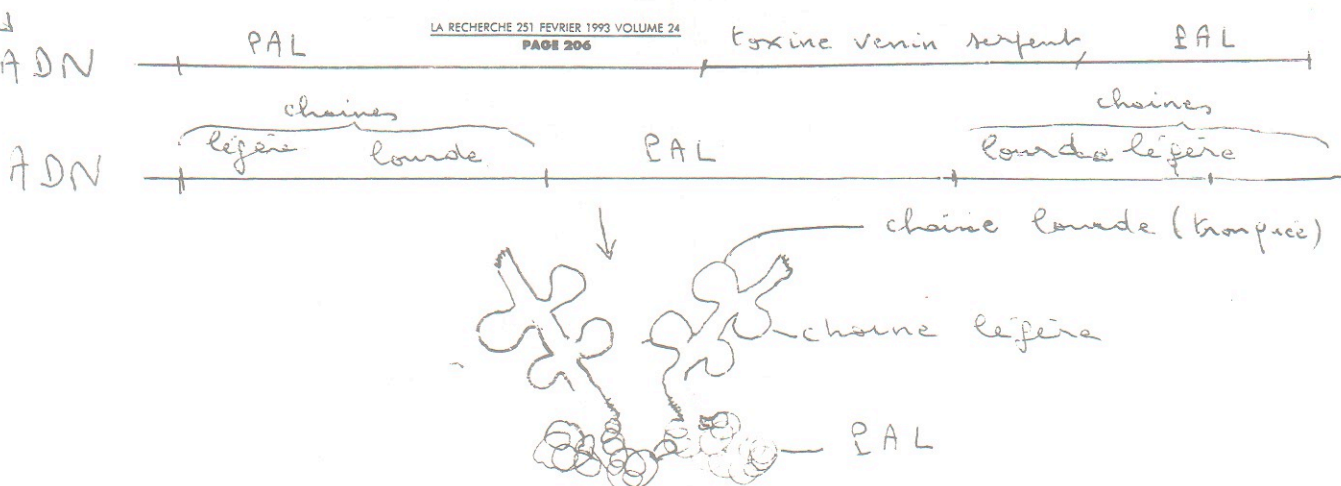


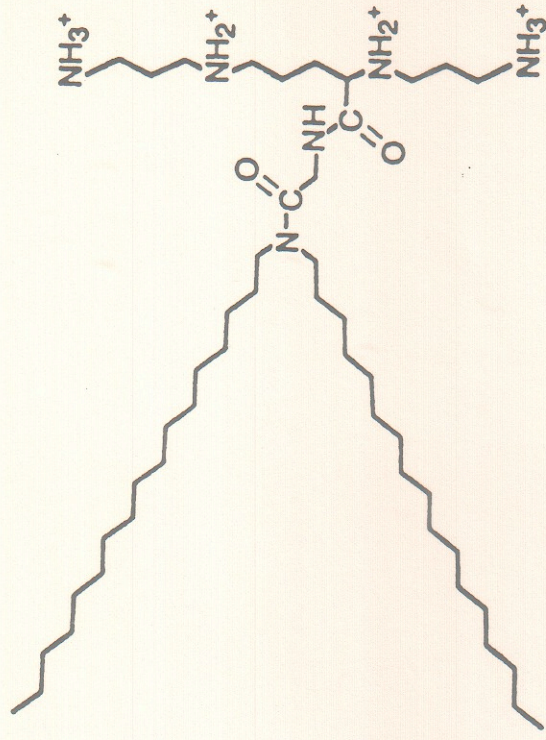
Figure 2. Un réactif de dosage fonctionnel, constitué de l'anticorps couplé à une enzyme qui catalyse une réaction colorée, a pu être produit directement par biotechnologie. Un anticorps naturel contient quatre chaînes protéiques, deux lourdes et deux légères ; elles forment une molécule en Y qui porte deux sites reconnaissant la cible (A). La partie inférieure de la molécule peut être remplacée par une enzyme bactérienne, la phosphatase alcaline (B). Pour cela, on introduit dans les bactéries une construction génétique qui contient les fragments de gènes nécessaires à la fabrication des chaînes lourdes tronquées, de l'enzyme, et des chaînes légères. Les protéines excrétées à l'extérieur de la bactérie s'assemblent alors comme dans l'anticorps naturel. Cette technique permet d'obtenir très facilement des réactifs de dosage performants.





The ability to introduce DNA into cells provides a powerful tool for studying the *in vivo* function and control of mammalian genes. Commonly used methods for gene transfection use calcium phosphate (1), DEAE-Dextran (2), electroporation (3) or liposomes (4) to facilitate the entry of DNA into cells. Transfectam reagent, a synthetic cationic lipopolyamine molecule, provides a new alternative to these transfection methods.

Transfectam reagent, developed at the University of Strasbourg in France (5), contains a spermine group with a strong affinity for DNA ( $K_d = 10^{-5}$ - $10^{-7}$  M) covalently attached through a peptide bond to a lipid moiety (Figure 1). It forms unilamellar vesicles of 800-1,000Å in size. The positively charged spermine headgroups bind to DNA, coating it with a lipid layer. In the presence of excess lipopolyamine, cationic lipid-coated plasmid DNA particles are formed. The lipid regions of these particles associate with the cell membrane and internalization of the DNA probably occurs by endocytosis.



Structure of Transfectam reagent.

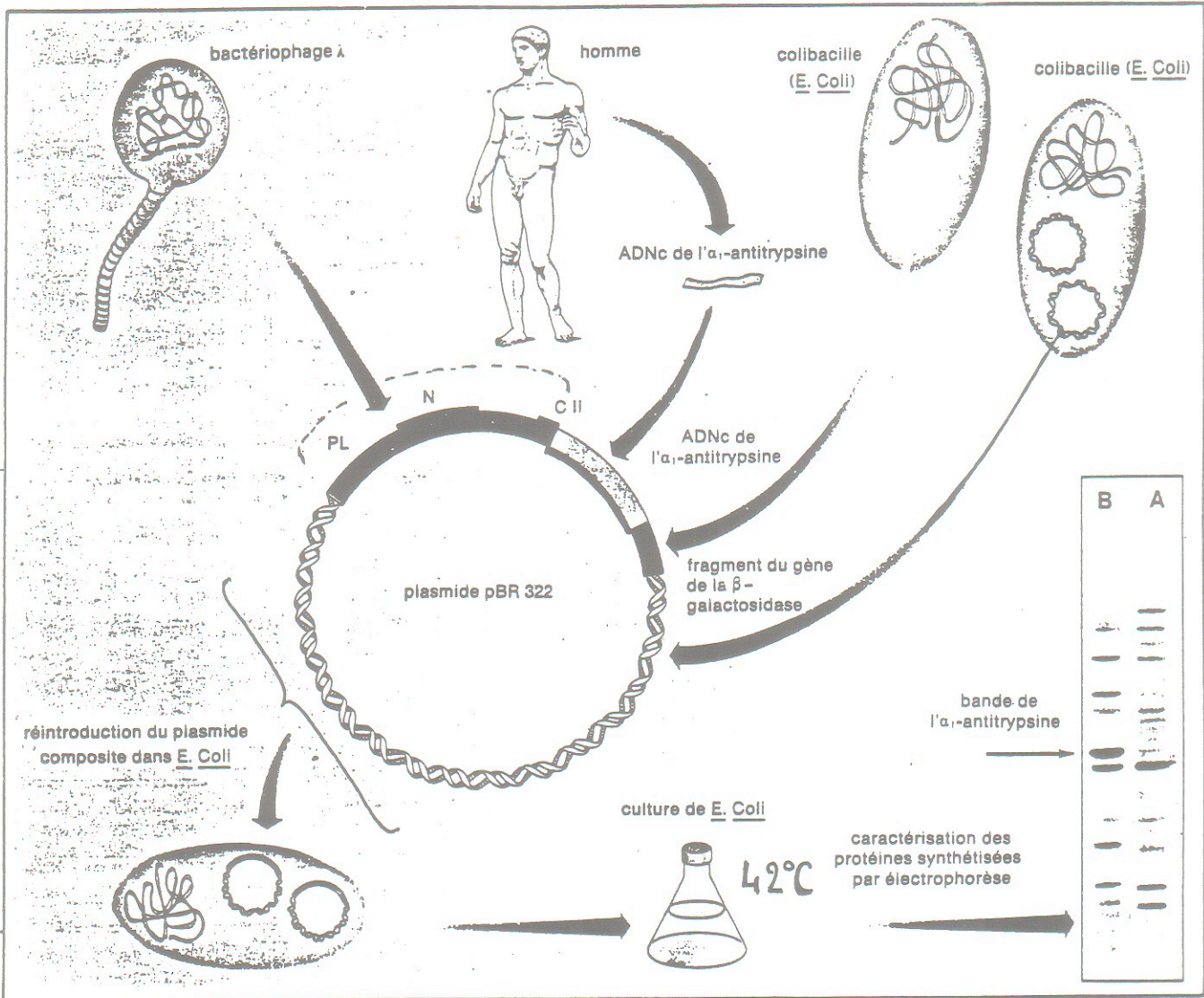


## COMMENT CONTRAINDRE UN COLIBACILLE À SURPRODUIRE UNE PROTÉINE HUMAINE

Comment produire l' $\alpha_1$ -antitrypsine humaine chez le colibacille ? Disposer de l'ADNc de cette protéine n'est pas suffisant pour garantir son expression par un colibacille : il faut lui adjoindre toute une batterie de signaux moléculaires qui, d'une part, le rendent « décodable » par la machinerie bactérienne et, d'autre part, permettent un très haut taux d'expression. Donc, l'ADNc codant pour l' $\alpha_1$ -antitrypsine humaine a été intégré dans un vecteur d'expression. L'ossature de ce vecteur est dérivée du plasmide pBR322 (en double hélice sur la figure) hôte du colibacille. On lui greffe une séquence « promoteur » (pL, couleur foncée) dérivée du génome d'un phage de bactérie (le phage  $\lambda$ ) et contrôlée négativement par la présence d'un répresseur thermosensible produit par le colibacille hôte. La production

d'ARNm est activée si l'on transfère les bactéries à 42 °C, température à laquelle le répresseur est inactivé. En aval du promoteur se trouve le gène codant pour la protéine N également du phage  $\lambda$  (couleur foncée), dont la fonction est d'éliminer les arrêts éventuels de transcription à l'intérieur de l'ADNc de l' $\alpha_1$ -antitrypsine. La région d'initiation de la traduction de l'ARNm est celle correspondant au gène cII du phage  $\lambda$  (couleur foncée). Le cDNA codant pour l' $\alpha_1$ -antitrypsine contient un site unique coupé par l'enzyme de restriction BamHI situé immédiatement après le premier acide aminé de la protéine mature. Ce site est utilisé pour intégrer l'ADNc dans le vecteur d'expression (en noir). Cet ADN très composite, cette construction, est réintroduit dans le colibacille. Il permet l'expression à 42 °C d'une

protéine fusionnée comprenant les 13 premiers acides aminés correspondant à la région N-terminale de la protéine cII du phage  $\lambda$ , 4 acides aminés de liaison dus à la construction génétique et 453 acides aminés de l' $\alpha_1$ -antitrypsine humaine. Le taux d'expression par la bactérie de cette protéine composite est de l'ordre de 10 à 15 % des protéines totales de la bactérie *E. coli*, ce qui se traduit par une bande majeure (flèche) lors d'une analyse électrophorétique de protéines synthétisées par cette bactérie (en bas à droite). Cette  $\alpha_1$ -antitrypsine hybride est reconnue par des anticorps dirigés contre l' $\alpha_1$ -antitrypsine humaine naturelle et présente une activité biologique similaire. Cet exemple démontre bien la faisabilité des techniques de génie génétique pour obtenir des quantités « industrielles » d'une protéine humaine.



Pour faire produire une protéine humaine par un colibacille, il ne suffit pas d'insérer le gène (ici l'ADNc) de cette protéine dans un plasmide de la bactérie. Il faut lui adjoindre une série de fragments d'ADN (dits de régulation) permettant à la bactérie de décoder le message de ce gène, et de produire la protéine en quantités notables. Le schéma représente les différentes étapes de la construction d'un plasmide capable de produire l' $\alpha_1$ -antitrypsine humaine. L'ADNc humain de l' $\alpha_1$ -antitrypsine est inséré (en couleur claire) dans le plasmide pBR322 du colibacille. Puis, on greffe en amont de l'ADNc une séquence « promoteur » (en couleur foncée) provenant du bactériophage  $\lambda$ , ainsi que le gène codant pour la protéine N du même bactériophage. Ce gène a pour fonction d'empêcher les arrêts éventuels de transcriptions. La traduction est rendue la plus efficace par l'utilisation du site d'attachement des ribosomes du gène cII provenant également du phage  $\lambda$ . Ce plasmide composite est réintroduit dans une bactérie. Dans certaines conditions de température, il exprime en abondance l' $\alpha_1$ -antitrypsine humaine, ce que l'on vérifie en faisant une analyse électrophorétique (en bas à droite du schéma) des protéines produites par le colibacille en absence d'ADNc (A) et en sa présence (B) : l' $\alpha_1$ -antitrypsine, indiquée par une flèche est devenue une protéine majoritaire de la bactérie. (Cliché Transgène).



marqueur

modalité d'apport

révélation/détection

$^{32}P$

substitution  
(kinase, nick translation)

autoradiographie

$SO_3^-$  + Ac-enzyme

greffage sur les cytosines

dU-biotine + avidine-enzyme

incorporation lors d'une  
réplication (amorçage aléatoire  
ou random priming,  
oligolabelling...) \*

dU-digoxigénine + Ac-enzyme

incubation  
de l'enzyme phosphatase  
alcaline ou peroxydase  
avec un substrat donnant  
un produit coloré ou  
chimiluminescent

linear denatured DNA

+ random hexanucleotides



+ dATP, dCTP, dGTP, dTTP + Dig-dUTP

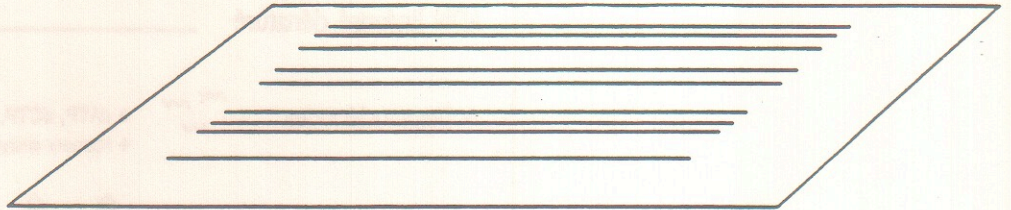


+ Klenow

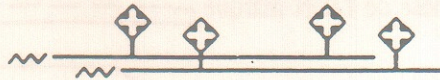
synthesis of labeled DNA



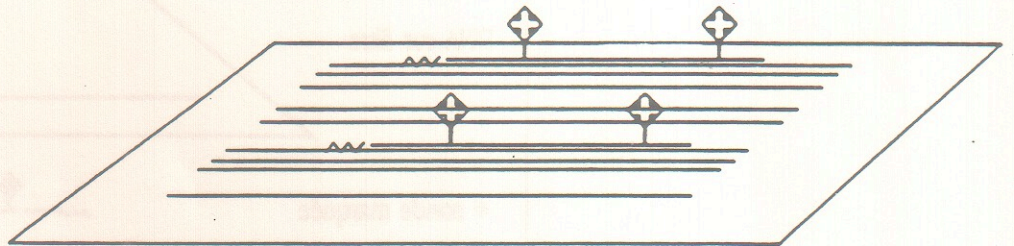
filter-bound DNA



+ labeled DNA



hybridization

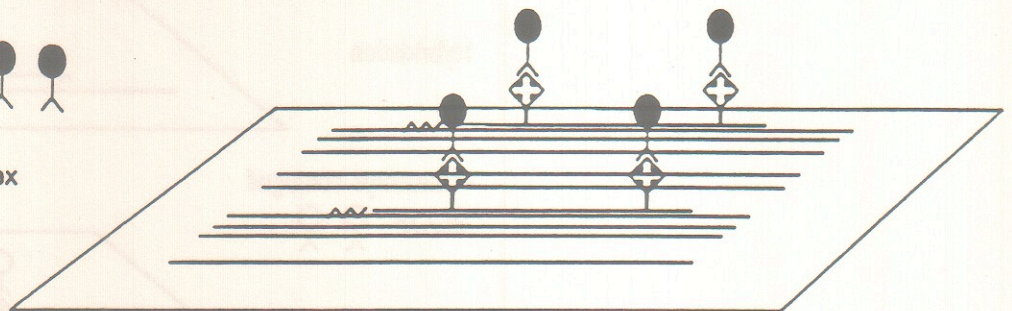


+ antibody conjugate

<Dig>AP



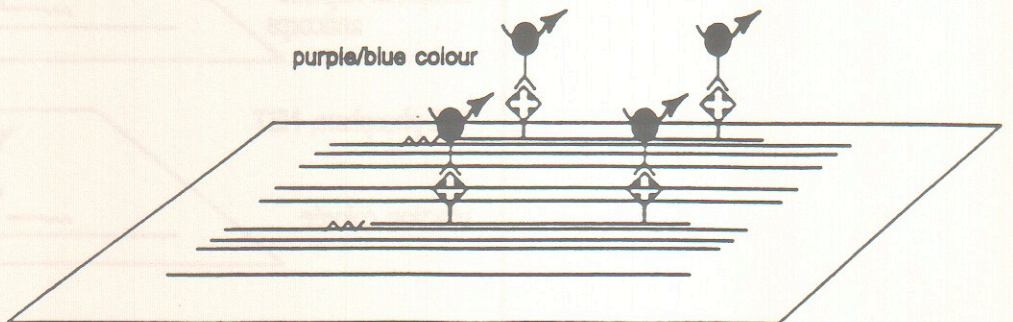
antibody hapten complex



+ X-phosphate, NBT

purple/blue colour

colour reaction



marquage

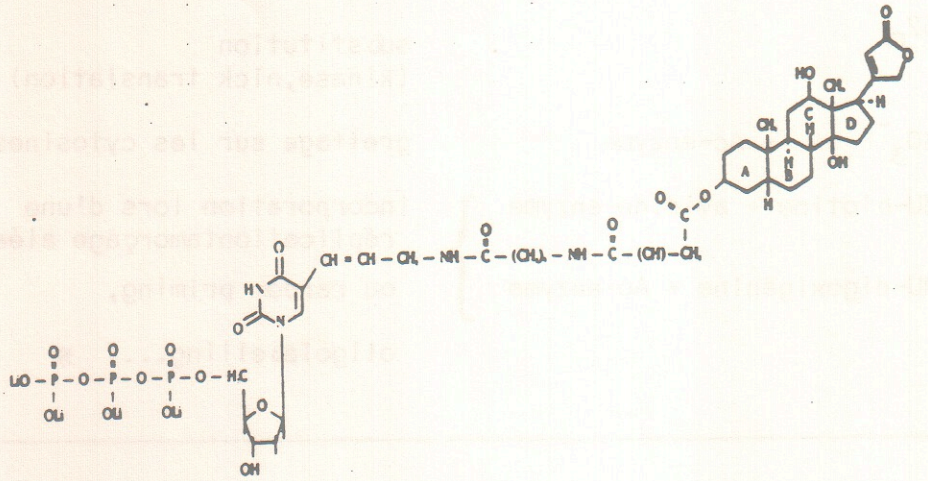
hybridation

révélation des duplex ou hybrides

\*



Nucléotide [digoxigénine - d UTP]



MARQUAGE PAR "RANDOM PRIMING" OU "OLIGO-LABELLING"

ADN linéarisé dénaturé

+ hexanucléotides

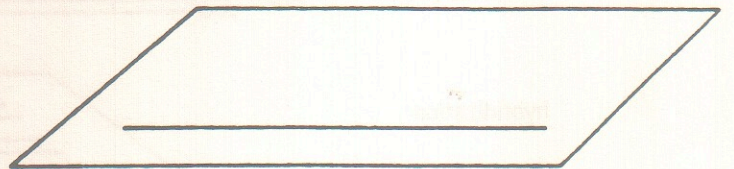


+ dATP, dCTP, dGTP, dTTP + Dig-dUTP  
+ Klenow enzyme

synthèse de l'ADN marqué



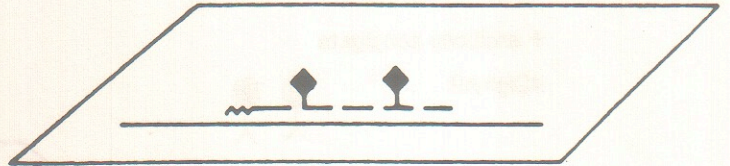
DNA sur filtre



+ sonde marquée



Hybridation

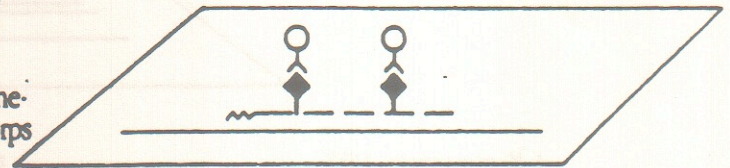


+ anticorps conjugué

<Dig>AP

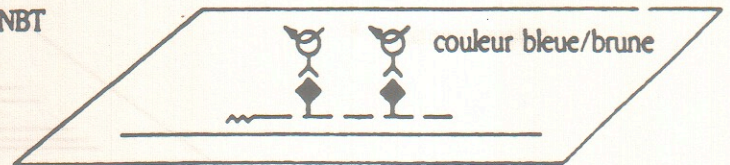


complexe haptène-anticorps



+ X-phosphate, NBT

réaction colorée



couleur bleue/brune



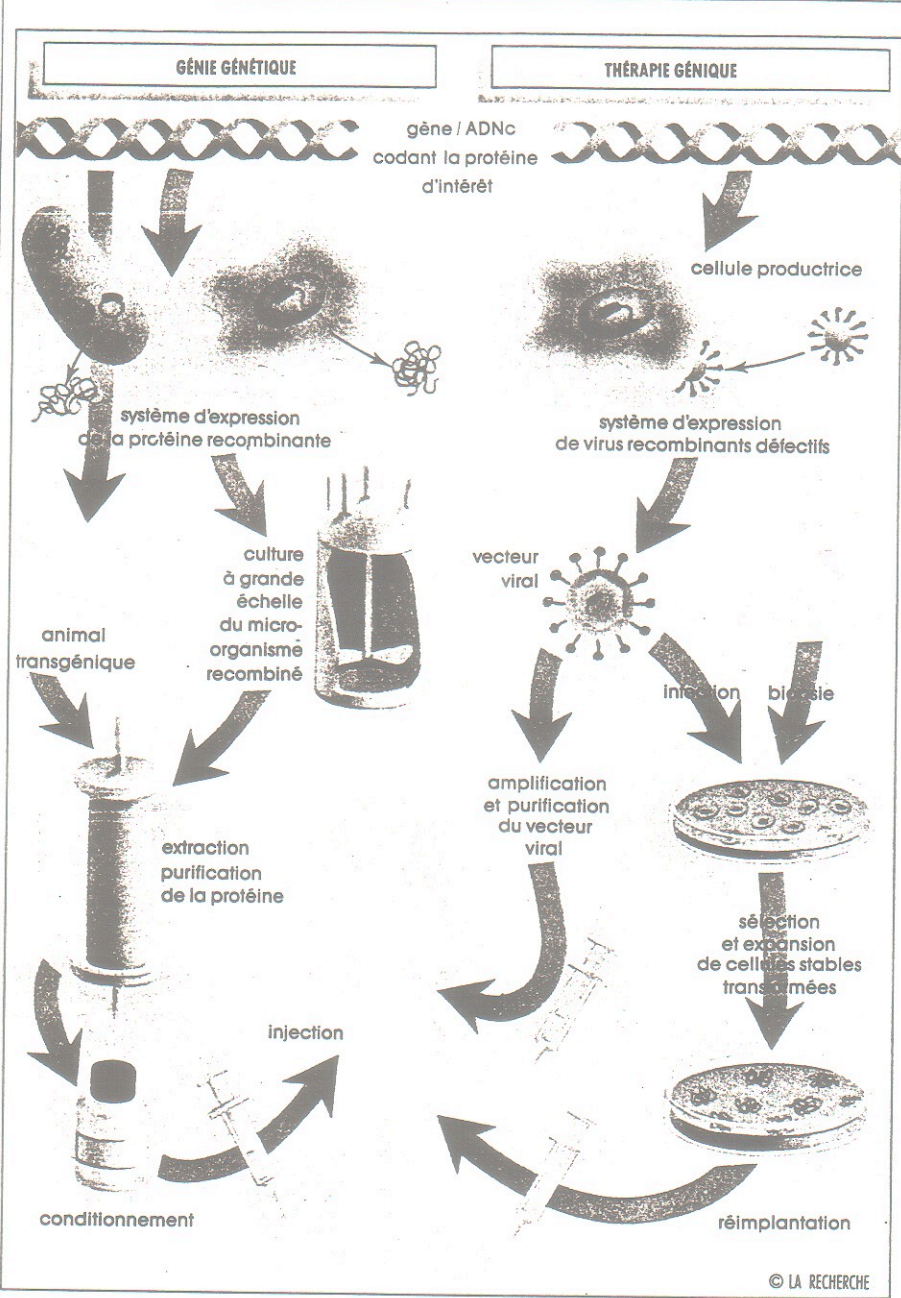
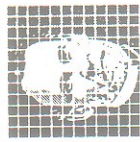


Figure 5. Ce schéma illustre les principales différences entre le génie génétique et la thérapie génétique : l'un fait produire par des micro-organismes la protéine d'intérêt thérapeutique ; l'autre vise à faire produire cette protéine par les propres cellules du patient. Dans le cas du génie génétique (A), la protéine est exprimée dans un système biologique (bactérie, levure, cellule de mammifère ou d'insecte) dit recombinant parce qu'on y a inséré le gène codant cette protéine par recombinaison génétique. Ce système doit être cultivé à l'échelle nécessaire aux objectifs de production. La protéine est ensuite extraite, purifiée puis conditionnée dans des conditions compatibles avec les exigences réglementaires. Depuis 1990, il est aussi possible de produire des protéines dans les fluides biologiques (sang et lait essentiellement) d'animaux transgéniques, dont le génome est porteur du gène codant la protéine. En règle générale, la protéine recombinante est injectée dans le sang (voie parentérale) selon une fréquence qui dépend des besoins thérapeutiques et de la durée de vie de la protéine chez le patient. Les nouvelles stratégies de thérapie génétique, encore en cours de mise au point, envisagent quant à elles d'utiliser directement l'ADN codant la protéine recherchée (B). Les résultats les plus prometteurs ont été obtenus avec des systèmes viraux rendus incapables de se répliquer chez l'hôte (virus défectifs) et porteurs du gène que l'on veut transférer chez le patient. Des lignées cellulaires adaptées sont donc nécessaires à la production du vecteur viral. Deux solutions sont alors possibles : avec certains vecteurs viraux et pour certains tissus cibles, il est possible d'administrer directement la particule virale recombinante. Dans d'autres cas, une étape cellulaire intermédiaire est indispensable, au cours de laquelle des cellules du patient sont prélevées, transfectées et multipliées avant réimplantation dans l'organisme. Quelle que soit la stratégie utilisée, la thérapie génétique devrait permettre de corriger le défaut d'expression d'une protéine sur des durées bien supérieures à celles qu'autorise aujourd'hui la simple injection de cette molécule.



# Introduction



**PASTEUR  
VACCINS**

les pays développés. Celles dues au virus B constituent la variété étiologique la plus sévère.

L'hépatite B est la maladie professionnelle numéro un des responsables de la santé, mais elle concerne également d'autres sujets exposés du fait de leur état de santé, de leur comportement, de leur environnement ou de leur activité.

La contamination se fait par le sang, par la salive et par les sécrétions sexuelles.

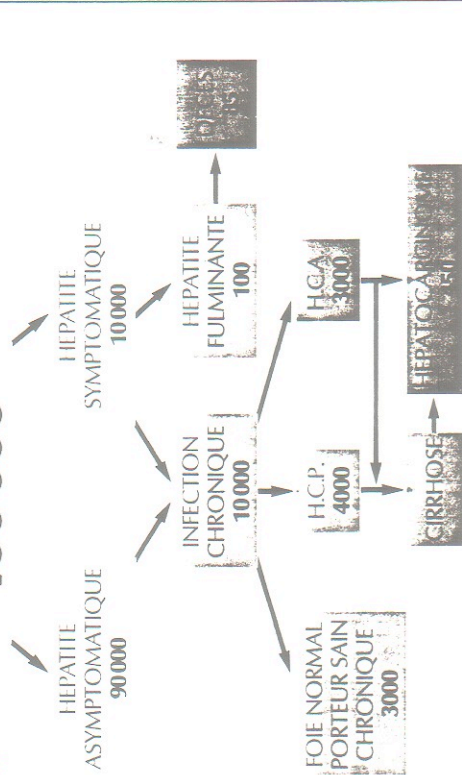
## Un nouveau vaccin : pourquoi ?

Les hépatites virales représentent la plus fréquente des maladies infectieuses de l'adulte dans

H.C.P., hépatite chronique persistante.  
H.C.A., hépatite chronique active.

L'histoire naturelle de l'hépatite B en France, 85 décès et 450 cancers pour 100 000 infections. JP Benhamou, Bichat 86.

**INFECTION AIGUE B 100 000**



Le virus est extrêmement résistant et sa conservation sur différents supports est excellente. La maladie peut être redoutable. Elle est caractérisée par sa durée d'incubation (6 semaines à 6 mois) et par le polymorphisme de son évolution.

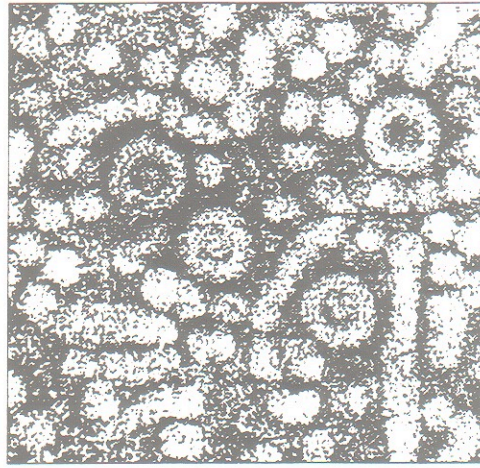
Le plus souvent, l'événement est transitoire et passe inaperçu: c'est l'hépatite asymptomatique. Les infections s'accompagnant d'ictère et d'élévation des transaminases représentent 10 à 20% des cas. Ce sont les hépatites aiguës. Une hépatite sur 20 entraîne une hospitalisation. Une hépatite sur 1000 est une forme fulminante souvent fatale. 10% des hépatites aiguës ou asymptomatiques passent à la chronicité (persistance de l'HBsAg plus de 6 mois).

Le lien entre le virus de l'hépatite B et le cancer primitif du foie (C.P.F.) est suspecté depuis plus de vingt ans et de nombreuses études épidémiologiques et virologiques apportent des arguments en faveur de cette hypothèse.

L'impact chronique sur 4 développe une hépatite chronique active pouvant conduire à la cirrhose ou au cancer primitif du foie (C.P.F.).

L'absence de traitement anti-viral (les antiviraux sont en cours d'étude sur des sujets atteints d'hépatite chronique active) justifie la prévention active par la vaccination. Elle est fortement recommandée pour les professions de santé par la circulaire n° 368 du 15/06/82 de la Direction Générale de la Santé; elle est également mentionnée dans le calendrier vaccinal.

**Le vaccin de 1<sup>re</sup> génération, le vaccin Hevac B Pasteur, dérivé du plasma, a largement prouvé son efficacité et son innocuité. Cependant, au fur et à mesure de l'augmentation du nombre des sujets vaccinés en France et en Europe, le nombre des donneurs potentiels (HBsAg positifs) est en diminution constante.**



Photographie en microscopie électronique des particules virales retrouvées dans le sang infecté.

**Pasteur Vaccins se devait donc de mettre au point un vaccin de nouvelle génération, issu des biotechnologies, qui pourrait remplacer à terme le vaccin Hevac B d'origine plasmatisque et se libérer ainsi de la contrainte de l'approvisionnement en matière première.**

**Ce nouveau vaccin est le GenHevac B Pasteur.** Sur le plan international, il constitue le seul vaccin dit de 3<sup>e</sup> génération, puisqu'il est obtenu par recombinaison génétique et qu'il renferme à la fois les antigènes HBs et HBeS2, ces données ayant une importance capitale: comme il sera vu dans l'étude clinique.

On réserve l'appellation "2<sup>e</sup> génération" aux vaccins préparés à partir d'une levure recombinée, contenant exclusivement l'antigène HBs et dépourvus d'antigène HBeS2.



# Rappel sur la structure du virus B et sur l'antigène Prés2

Au point de vue immunologique, l'antigène HBs peut porter plusieurs spécificités antigéniques (a, y, d, w, r) qui déterminent des sous-types. Le déterminant antigénique "a" étant commun à tous ces sous-types, c'est ce dernier qui est responsable de l'immunité croisée existant entre les divers sous-types de virus B. Un vaccin fait d'un seul sous-type de l'antigène HBs induit donc une immunité contre tous les sous-types de virus de l'hépatite B.

## Le génome

On a longtemps cru que l'enveloppe virale HBsAg était constituée d'une seule protéine reconnue globalement par les anticorps "anti-HBs". Or les techniques de pointe d'exploration moléculaire ont révélé une structure plus complexe de la particule HBsAg.

Celle-ci est en fait constituée de plusieurs protéines. L'organisation génétique de l'HBV permet de comprendre la structure de l'enveloppe. On sait aujourd'hui que celle-ci est codée par deux éléments différents: le gène S qui induit la production d'anticorps "anti-HBs" (ceux que l'on détecte avec les tests actuels) et la région "PréS" qui elle-même se subdivise en deux régions précises: "PréS1" et "PréS2".

## a protéine Prés2

On a longtemps cru que l'enveloppe virale HBsAg était constituée d'une seule protéine reconnue globalement par les anticorps "anti-HBs". Or les techniques de pointe d'exploration moléculaire ont révélé une structure plus complexe de la particule HBsAg.

C'est l'ensemble des gènes, c'est le patrimoine génétique du virus de l'hépatite B. Il est constitué d'ADN acide désoxyribonucléique.

C'est un génome de petite taille: 3200 nucléotides (phosphate + sucre + base). Les deux brins d'ADN sont enchaînés en double-hélice selon le schéma de Watson et Crick. Mais, ici, l'ADN est particulièrement double brin car les 2 brins ne sont pas associés sur toute leur longueur.

En effet, on distingue un brin long: L et un brin court: S, de longueur variable.



L'ADN est représenté avec sa structure partiellement double-brin ainsi que les 4 gènes.

précises, depuis la découverte initiale de l'antigène "Australia" en 1965 par Blumberg et de la particule de "Dane" en 1970.

Deux types de particules virales sont identifiées dans le sérum d'un sujet infecté par le virus B (HBV):  
- des particules complètes infectieuses ou particules de Dane,  
- des enveloppes virales vides, dépourvues de nucléocapsides et donc non infectieuses.

La particule complète a un diamètre de 42 nm. Elle est composée d'une enveloppe portant l'antigène majeur de surface (antigène HBs, anciennement antigène australien) et d'une nucléocapside centrale.

La nucléocapside ou "cœur" mesure 27 à 28 nm de diamètre et renferme le génome: ADN viral circulaire partiellement double brin et son enzyme de replication: l'ADN polymérase. Elle porte la spécificité antigénique HBe en surface et la spécificité HBe sous forme masquée.

L'antigène HBe est une protéine dont la présence dans le sérum traduit une réplication virale active. Il est de mauvais pronostic pour l'évolution d'une hépatite B, signant souvent la gravité et le passage à la chronicité.

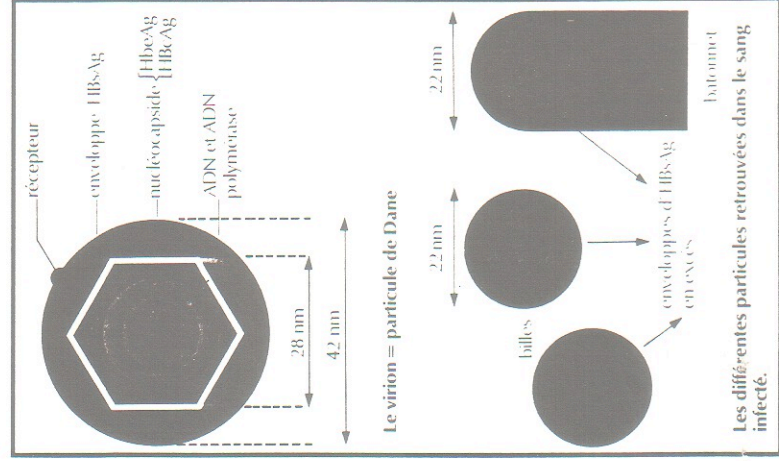
L'enveloppe virale est constituée par association de lipides, de protéines et d'hydrates de carbone. Les résidus d'hydrates de carbone sont liés aux protéines par covalence et celles-ci sont ancrées dans une double couche lipidique.

Les séquences hydrophobes des protéines sont intramembranaires et les séquences hydrophiles contenant les hydrates de carbone sont exposées à l'extérieur et portent les déterminants antigéniques.

L'enveloppe peut également intercepter des virus de l'homme humain polymérisée (HBSA).

## Structure Générale

La structure des antigènes du virus de l'hépatite B ainsi que celle de son génome ont été



Les différentes particules retrouvées dans le sang infecté.



# La génétique

## Principe général d'obtention d'un vaccin recombinant

Dans la production des vaccins recombinants, les techniques de clonage du gène sont utilisées pour exprimer un antigène capable d'induire une réponse immunitaire protectrice. Ce type de vaccin est proche des vaccins dits "sous-unités" constitués d'une molécule immunogène obtenue jusqu'ici, à partir du germe entier par purification biochimique.

Cependant, le clonage d'un gène et son transfert dans une cellule-hôte font que l'agent pathogène n'est plus nécessaire pour assurer la production du vaccin. Celui-ci ne comporte pas de produits viraux ou bactériens toxiques ou sensibilisants.

### Obtention d'un vaccin recombinant.

Le développement d'un vaccin obtenu par recombinaison génétique comporte plusieurs étapes. Dans un premier temps, les gènes codant pour les déterminants antigéniques, induisant une réponse immunitaire protectrice au cours d'une infection naturelle, sont clonés. Une fois cloné, le gène est intégré dans un vecteur d'expression, en général un plasmide. Ce plasmide est ensuite introduit dans une cellule-hôte. La cellule-hôte transférée reçoit une nouvelle information génétique qui doit conduire à l'expression d'une molécule recombinante ayant conservé ses propriétés d'antigénicité et d'immunogénicité. Une expres-

## Définition

La dernière décennie a vu la naissance d'une nouvelle technique: le génie génétique issu de la biologie moléculaire. On parle également de manipulation génétique ou de recombinaison génétique.

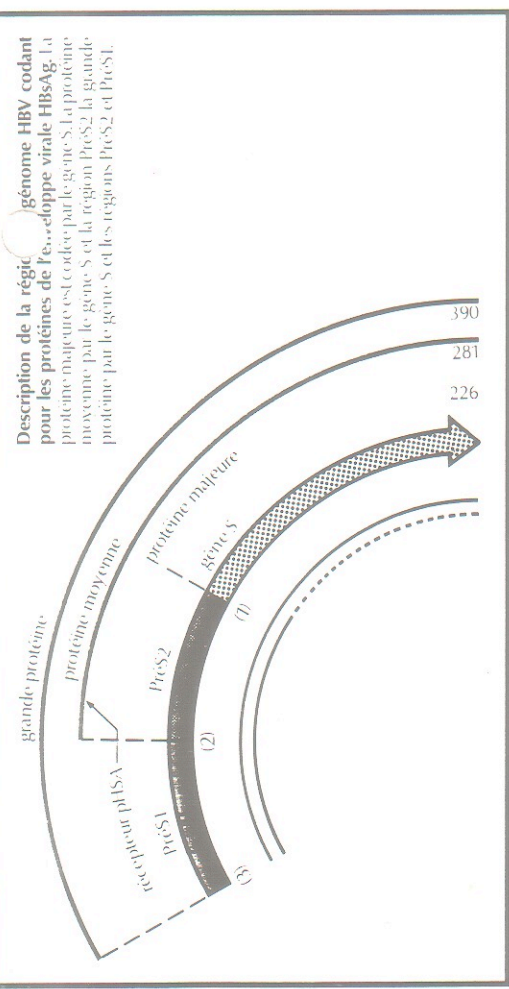
Les techniques de recombinaison génétique permettent de fusionner 2 génomes ou deux fragments de génome, ces génomes appartenant ou non à la même famille d'agents infectieux. On obtient ainsi un nouvel agent infectieux "chimère", création du laboratoire:

- la recombinaison homospécifique est la fusion de 2 génomes appartenant à différents types du même agent infectieux (ex.: virus de la poliomyélite).
- la recombinaison hétérospécifique permet d'introduire un gène étranger dans un génome d'une espèce différente qui lui sert de vecteur.

La première étape consiste à identifier le gène qui code pour la protéine vac cinante. Celui-ci est ensuite inséré dans un plasmide qui a son tour est introduit dans des cellules. On obtient ainsi une cellule porteuse d'une nouvelle information génétique capable de synthétiser l'antigène désiré. L'antigène est excréte puis purifié.

Ces techniques sont à l'origine de l'essentiel des progrès en biologie au cours des dix dernières années. Elles contribuent à la compréhension et au dépistage des maladies héréditaires, au développement des perspectives vaccinales anti-virales, anti-microbiennes ou anti-parasitaires.

Le vaccin Coelvac B est un des fruits de ces recherches.



liques qui présentent aussi un récepteur pour l'albumine. Les particules virales pourraient ainsi pénétrer dans l'hépatocyte.

La protéine majeure est présente sous deux formes, glycosylée (GP 275) et non glycosylée (P 245).

La protéine moyenne existe sous deux formes glycosylées: GP 335 et GP 365.



**Le virus B et ses 3 protéines d'enveloppe.**

La lecture du gène peut commencer à trois niveaux différents:

- Quand la lecture commence en (1) (voir schéma) il y a synthèse d'une protéine de 226 acides aminés. Cette protéine S est la plus petite des protéines d'enveloppe (S pour small). Elle est aussi appelée "majeure" car elle est quantitativement la plus représentée dans la particule d'HBsAg.
- Quand la lecture du gène commence en (2) il y a synthèse d'une protéine dite moyenne M constituée de la protéine S et de 55 acides aminés supplémentaires qui constituent la protéine antigénique PreS2.
- Quand la lecture du gène commence en (3) il y a synthèse de la protéine dite grande (G pour large) constituée de la protéine moyenne et de 109 acides aminés supplémentaires.

L'enveloppe virale HBsAg est donc constituée de trois protéines distinctes, dans l'ordre S, M, et L. Chacune des protéines induit la synthèse d'anticorps spécifiques.

La protéine moyenne aurait une fonction importante permettant au VHB de pénétrer dans les cellules du foie. Portant un récepteur pour l'albumine humaine polymérisée (pI<sub>h</sub>A), la protéine moyenne pourrait se lier à l'albumine sérique qui formerait un pont entre le virus et les cellules hépa-



sion correcte dépend des processus génétiques de transcription et de traduction (synthèse). Elle dépend aussi de la façon dont la molécule recombinée, une fois synthétisée, est modifiée par la cellule hôte. Les processus post-traductionnels sont fondamentaux pour conférer à la molécule recombinée ses propriétés antigéniques et immunogéniques. À l'état natif, l'antigénicité et l'immunogénicité d'une protéine peuvent dépendre de sa stabilité, de la glycosylation de certains résidus aminés ou de sa structure conformationnelle. Ces propriétés devront alors être retrouvées sur la protéine recombinée.

Ces modifications post-traductionnelles sont fonction de la cellule hôte dont le choix est fondamental. Trois hôtes d'expression peuvent

être utilisés, *Escherichia coli* (*E. coli*), une levure (espèce *Saccharomyces cerevisiae*) – et les cellules de mammifères. Chaque système a ses avantages. Toutefois, *E. coli* est peu utilisé en vaccinologie. Cette cellule procaryote n'excrète pas les protéines recombinées, et n'assure ni leur glycosylation ni leur assemblage. La levure ne glycosyle pas les protéines recombinées. Aussi, quand la glycosylation contribue à l'immunogénicité, le choix se portera sur les cellules de mammifères qui, de plus, assemblent correctement la protéine.

Le choix de la technique de génie génétique utilisée repose sur les connaissances de la particule virale, l'immunogénicité des épitopes de l'enveloppe virale et de la localisation de leurs séquences codantes sur le génome.

## Glossaire

### ARN Messenger:

Produit final de la maturation du transcrite d'un gène codant pour une protéine. Un ARN messenger est directement traduisible en protéine.

### Clone, cloner:

Un clone est un ensemble de cellules dérivées d'une même cellule mère. En cas de confection d'une banque d'ADN, contenant le même fragment d'ADN étranger, cloner consiste à développer un clone contenant le fragment d'ADN recherché.

### Code, code génétique:

Le "code génétique" est le système de correspondance entre les acides nucléiques et les protéines, un "triplet" de trois nucléotides correspondant potentiellement soit à un acide aminé, soit à un signal d'arrêt de traduction. "Coder" est une propriété des acides nucléiques, ADN ou ARN, auxquels correspondent une protéine dont l'enchaînement des acides aminés reflète celui des nucléotides.

### Eucaryotes:

Etres vivants dont le matériel génétique est contenu dans une membrane nucléaire (noyau). On donne souvent le nom d'eucaryotes supérieurs aux organismes pluricellulaires (animaux, plantes...) et d'eucaryotes inférieurs aux organismes unicellulaires (levures, protozoaires, etc...)

### Expression d'un gène:

Apparition de la fonction pour laquelle code le gène.

### Génome:

Ensemble des gènes constitués d'ADN d'une cellule vivante.

### Hybridation moléculaire:

Appariement entre deux molécules. S'applique plus particulièrement aux acides nucléiques dont les brins s'apparient selon la complémentarité des bases: guanine-cytosine, adénine-thymine (pour l'ADN) ou uracile (pour l'ARN).

### Nucléotide:

Molécule de base des acides nucléiques composée d'une base purique (adénine, guanine) ou pyrimidique (cytosine, thymine pour l'ADN ou uracile pour l'ARN), d'un sucre (ribose dans l'ARN et désoxyribose dans l'ADN) et d'au moins une molécule d'acide phosphorique.

### Procaryotes:

Etres vivants dont le matériel génétique n'est pas contenu dans une membrane nucléaire.

### Recombinants d'ADN (méthode des):

Recombinaison génétique in vitro entre des fragments d'ADN normalement non contigus. Cette méthodologie est à la base du génie génétique.

### Replication:

Synthèse semi-conservative de l'ADN double brin.

### Sonde:

Fragment d'ADN que l'on peut marquer, le plus souvent grâce à l'introduction de nucléotides radioactifs, et qui permettra de détecter spécifiquement une séquence homologue par hybridation moléculaire.

### Traduction:

Synthèse d'une protéine par "traduction" de l'ARN messenger.

### Transcription:

Synthèse d'ARN complémentaire d'une matrice d'ADN.

### Transcrit:

Produit de transcription.

### Transfection, transformation:

Transfert d'ADN libre exogène dans une cellule. La transfection d'une cellule par un ADN codant pour une fonction quelconque aboutit à sa "transformation". La transfection est l'une des techniques de base du génie génétique.

### Transgène, transgénique:

S'applique à des organismes vivants dans l'œuf ou l'embryon dans lesquels ont été transférés des gènes étrangers à leur patrimoine héréditaire propre. Le gène étranger, appelé "transgène" se transmet dans la descendance de l'animal transgénique, selon un mode mendélien. Il est possible de créer aussi bien des animaux que des plantes transgéniques.



# Fabrication et contrôle du vaccin recombinant contre l'hépatite B: GenHevac B Pasteur

## Fabrication

On a choisi, pour synthétiser les particules d'HBsAg, un système de cellules de mammifères: la cellule de lignée CHO (cellules d'ovaire de hamster chinois). Elle a été retenue car elle permet l'expression de protéines glycosylées, donc plus stables in vivo et directement excrétées sous forme particulaire dans le milieu de culture des cellules. Les particules excrétées ont une structure tridimensionnelle identique à celle des particules plasmatiques naturelles.

Le but recherché a été d'obtenir la synthèse de la protéine majeure portant tous les déterminants antigéniques de l'HBsAg et de la protéine moyenne portant l'antigène PréS2.

Le vecteur utilisé pour la transformation de ces cellules est un plasmide qui porte principalement deux unités de transcription:

- le gène HBsAg portant les séquences S et PréS2. La région PréS2 a été insérée dans le plasmide ce qui est un avantage pour le vaccin car l'on sait que les protéines PréS2 induisent la sécrétion par les lymphocytes B d'anticorps neutralisant le virus.
- le gène codant pour la dihydrofolate réductase (DHFR). Ce dernier permet d'obtenir des lignées cellulaires DHFR (+) qui synthétisent en permanence l'HBsAg et à un taux compatible avec une exploitation industrielle.

Le vecteur a été introduit dans des cellules CHODHR(-). Les cellules transformées par le plasmide deviennent ainsi CHODHR(+) et un clone a

pu être sélectionné grâce à sa propriété de résister à des concentrations élevées en méthotrexate (MTX). Le gène est amplifié en présence de méthotrexate (MTX).

Ce clone résistant au MTX constitue la banque de sémence primaire.

Une banque de sémence secondaire a ensuite été constituée.

Les cellules issues de la banque de sémence secondaire sont cultivées dans des fermenteurs de grande capacité (plusieurs centaines de litres).

Tous les 3 à 4 jours, le milieu de culture contenant les particules d'HBsAg synthétisées est récolté et du milieu frais est ajouté; la récolte est répétée plusieurs fois.

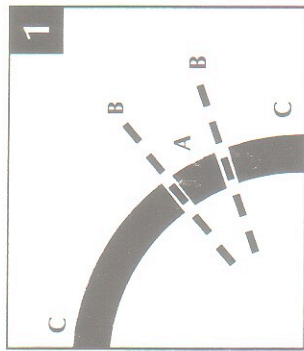
Le processus de fabrication a un double but, purifier les particules d'HBsAg et éliminer du milieu les protéines et les acides désoxyribonucléiques cellulaires. La 1<sup>ère</sup> phase est une concentration par précipitation au polyéthylène glycol. Les particules d'HBsAg sont ensuite purifiées par centrifugation zonale sur gradient de sucrose et par une chromatographie échangeuse d'ions. Les particules d'HBsAg purifiées sont ensuite inactivées par la chaleur et par un traitement au formol.

Des expériences ont été réalisées afin de déterminer la capacité de chaque étape de purification à éliminer l'ADN. La quantité d'ADN dans le produit fini est inférieure à 10<sup>3</sup> picogrammes par µg d'HBsAg ce qui est très nettement inférieur aux normes recommandées par l'O.M.S. (100 µg).

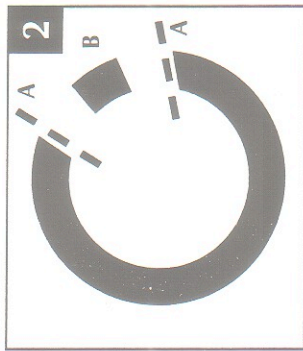
La dernière étape est la mise sous forme pharmaceutique: dilution et adsorption sur hydroxyde d'aluminium.

## La recombinaison génétique - principe

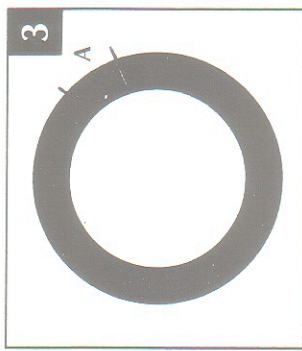
- A** Fragment d'ADN viral codant pour les protéines d'enveloppe.
- B** Enzymes de restriction.
- C** ADN viral.



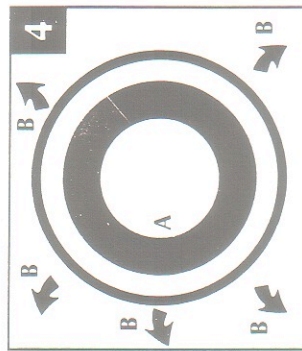
- A** Ouverture du plasmide avec des enzymes de restriction le plasmide est le vecteur, c'est un ADN extrachromosomique.
- B** On insère le fragment d'ADN viral en présence d'ADN ligase.



Le plasmide est retenu.



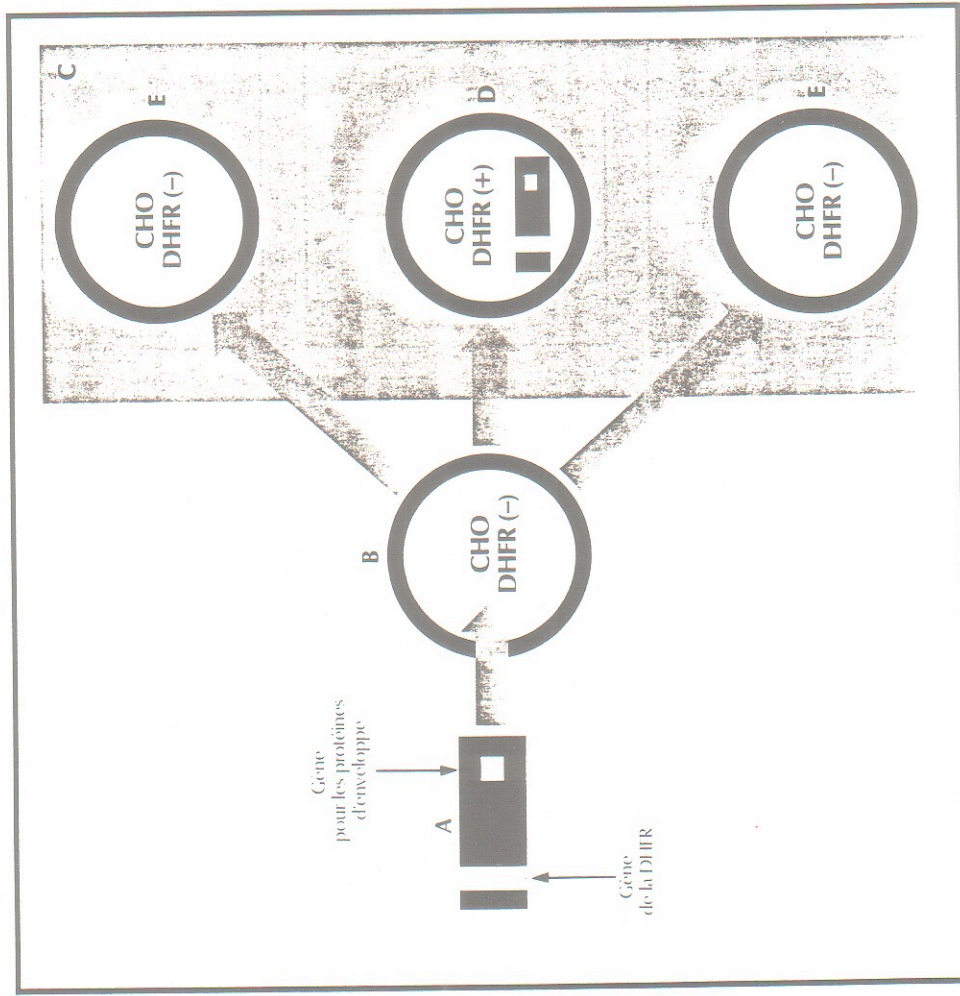
- A** Le plasmide est introduit dans les cellules CHODHR(-).
- B** Synthèse et excrétion de particules d'HBsAg.



Les enzymes de restriction permettent le découpage de l'ADN viral et l'ouverture du plasmide. L'ADN ligase est un enzyme permettant l'insertion du fragment d'ADN viral sur le vecteur.



# Recombinaison génétique : sélection des cellules transformées



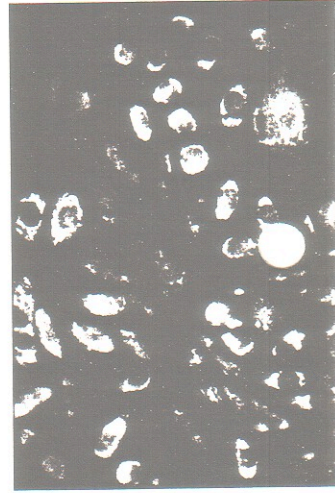
**A** Plasmide.

**B** Cellule de départ.

**C** Méthotrexate.

**D** Cellule transformée.

**E** Cellule non transformée et éliminée par le MTX (méthotrexate).



# Les étapes de la fabrication

## Banque de cellules CHO

contrôles de qualité

## Banque de cellules DHFR(+)

contrôles de qualité

## ● Démultiplication cellulaire et récoltes

- flacons de culture 50 à 65 jours
- bioreacteurs

contrôles divers

## ● récolte brute

### ● Purification

- ultrafiltration
- concentration par PEG
- centrifugation
- ultra-centrifugation de vélocité
- ultra-centrifugation isopycnique
- chromatographie par échanges d'ions.

contrôles divers

## ● antigène purifié

### ● Inactivation

- thermique
- chimique (formaldéhyde)

contrôles de qualité

## ● antigène purifié inactivé

### ● Mise sous forme pharmaceutique

- dilution
- adsorption sur Al(OH)<sub>3</sub>
- produit final vrac
- répartition

contrôles de qualité

contrôles de qualité  
contrôles divers

## ● produit fini

contrôles de qualité



# La programmation génétique des micro-organismes industriels

par David Hopwood

*L'élaboration des produits actifs fabriqués par les micro-organismes est programmée par des gènes : ces gènes spécifiques de la production d'un produit actif sont sélectionnés de façon intensive et le programme génétique est aujourd'hui modifié par des actions directes, telles que l'introduction de gènes provenant d'autres organismes.*

Un micro-organisme est un microcosme qui a évolué au cours des temps de façon à servir au mieux ses propres desseins : la survie et la reproduction. Par sélection naturelle, les bactéries ou les levures de type « sauvage » se sont étroitement adaptées à leur environnement et à la compétition avec les autres espèces ; elles ne sont donc *a priori* pas du tout adaptées à la fabrication de substances utiles à l'homme. La microbiologie industrielle moderne vise à sélectionner et à fabriquer des organismes aberrants du point de vue génétique ; cette programmation permet à ces organismes, soit de synthétiser un produit métabolique normal en des quantités qui épuiseraient de façon désastreuse les ressources énergétiques et nutritionnelles d'un organisme de type sauvage, soit même de fabriquer un produit qui n'appartient pas à leur répertoire habituel.

Les premiers essais pour contrôler et améliorer des procédés microbiologiques n'ont guère plus d'un siècle : c'est à cette époque rapprochée qu'on a isolé et cultivé pour la première fois à l'état pur des souches de bactéries et de champignons productrices de métabolites intéressants. On a pu alors sélectionner des souches particulièrement adaptées à une tâche donnée.

L'amélioration dirigée de souches industrielles spéciales ne devint possible que plus tard, lorsque l'on acquit quelques connaissances de génétique microbienne. D'abord vint la découverte de quelques mécanismes des mutations, c'est-à-dire le passage brutal d'une forme d'un gène (l'unité d'information héréditaire) à une forme nouvelle. Les mutations furent provoquées, en laboratoire, par des rayons X dès 1927 et la découverte, après 1945, d'un important arsenal d'autres radiations et agents chimiques fortement mutagènes donna aux microbiologistes un ensemble d'outils efficaces pour changer les caractéris-

tiques génétiques des organismes cultivés. Les progrès de la génétique permirent, en recombinant des gènes appartenant à deux organismes ou plus, la redistribution de l'information génétique : on découvrit que les bactéries se reproduisaient sexuellement par une forme particulière d'accouplement, la conjugaison, et échangeaient même de l'ADN « nu » ; parallèlement, de nouveaux systèmes génétiques furent découverts chez les champignons. Une meilleure compréhension de ces processus déclencha le développement explosif de la génétique microbienne et de la biologie moléculaire, encore loin d'être parachevé.

Dans les années qui suivirent la Seconde Guerre mondiale, l'industrie des fermentations, avec la production industrielle des antibiotiques, subit d'importantes transformations, à la fois dans ses potentialités et dans le volume de sa production. La pénicilline avait déjà été fabriquée pendant la guerre ; d'autres antibiotiques nouveaux furent fabriqués pour soigner d'innombrables affections bactériennes et fongiques. Puis, on mit au point de nouvelles fermentations dans lesquelles des micro-organismes fabriquaient d'autres produits chimiques purs tels que les acides aminés (qui entrent dans la composition des protéines) et les nucléotides (qui

entrent dans la composition de l'ADN). Il était impossible d'obtenir ces produits de façon économique à partir des souches sauvages ; leur production industrielle fut immédiatement liée à l'expérimentation génétique : une nouvelle industrie de la fermentation et une nouvelle approche scientifique de la génétique microbienne se développèrent parallèlement. Pendant une longue période, cependant (et à la plus grande frustration de certains généticiens académiques), la génétique classique ne contribua qu'exceptionnellement à la modification génétique des micro-organismes industriels.

Cette situation changea du tout au tout après la publication, en 1973, de travaux portant sur la recombinaison de l'ADN *in vitro* (« l'ADN recombinant ») et le clonage moléculaire. De nouvelles techniques permirent alors (en principe) le transfert d'un gène d'origine quelconque dans n'importe quel micro-organisme. Ces techniques du génie génétique sont de puissants instruments de laboratoire pour déterminer la structure et la fonction des gènes ; elles représentent un potentiel formidable pour l'élaboration de souches industrielles de micro-organismes capables de synthétiser de nouveaux produits de fermentation tels que l'insuline humaine ou l'hormone de croissance, ainsi d'ail-

1. CE PLASMIDE, isolé à partir d'une bactérie, est grossi 115 000 fois sur la photographie en microscopie électronique de la page ci-contre. Les plasmides sont de petites molécules circulaires de matériel génétique, formées d'ADN et qui se répliquent indépendamment du chromosome bactérien. Les plasmides jouent un rôle majeur dans la programmation génétique des micro-organismes parce qu'ils peuvent être transférés d'une souche à une autre (appartenant éventuellement à une espèce différente) et servir de vecteurs pour insérer, par le biais des techniques du génie génétique, une information génétique complètement nouvelle dans les bactéries. Ce plasmide a été isolé par Mervyn Bibb à partir de *Streptomyces coelicolor* dans le laboratoire de l'auteur, et a subi un ombrage au platine ; la double hélice d'ADN qui le constitue a environ dix micromètres de circonférence, soit à peu près 30 000 paires de bases, ce qui correspond à une trentaine de gènes.



leurs que pour la mise au point rationnelle de nouvelles souches mieux adaptées à des productions par fermentation déjà classiques. Si les possibilités du génie génétique ont fortement impressionné les industriels, il convient d'observer cependant que ce n'est que la clef de voûte d'un édifice de génétique microbienne qu'il a fallu 35 ans pour construire : le génie génétique n'est que l'une (mais certainement la plus excitante) des nombreuses techniques de programmation génétique des microorganismes industriels.

### L'expression génétique

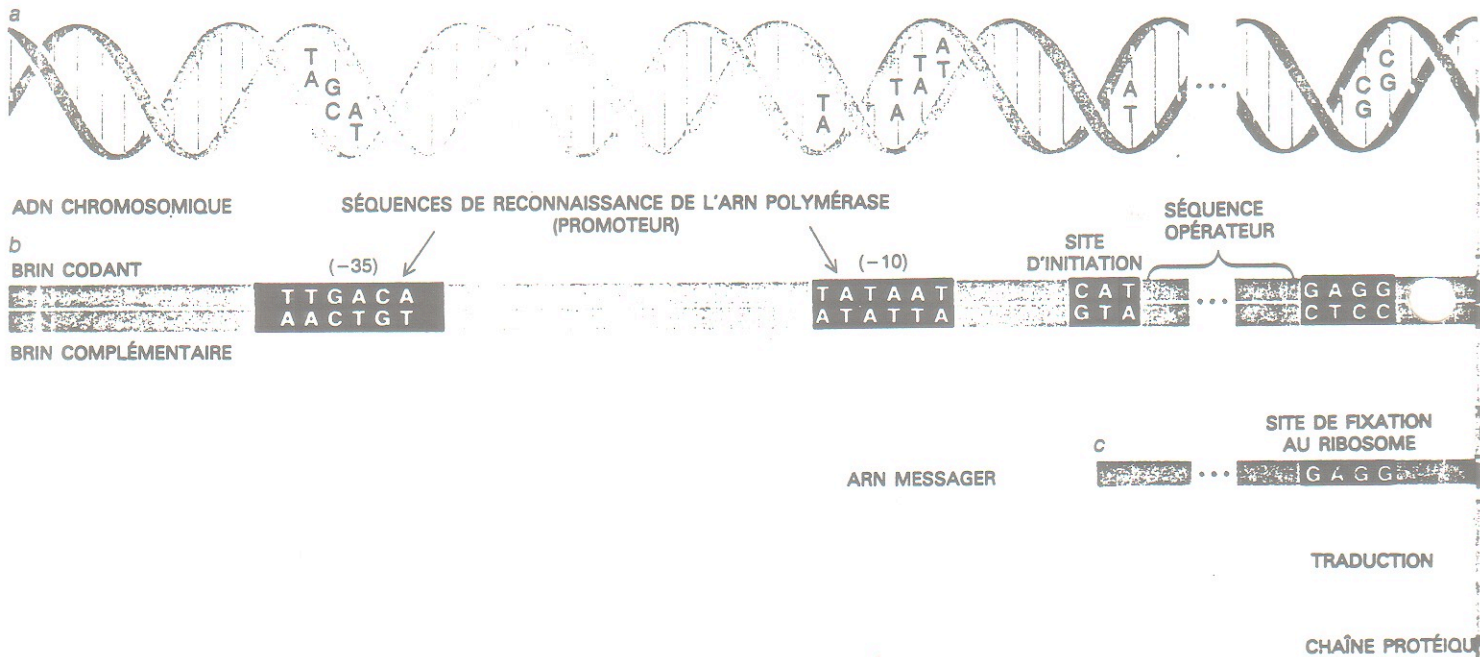
Dans la cellule vivante, l'information génétique est contenue dans la molécule d'ADN. L'information génétique d'une bactérie est stockée dans une seule molécule d'ADN longue et enchevêtrée : le chromosome bactérien. Cette molécule a une structure en double hélice, chaque brin (chaque hélice) étant formé d'une chaîne de nucléotides. Chaque nucléotide contient une des quatre bases suivantes : adénine (A), guanine (G), thymine (T) et cytosine (C). Ces bases sont complémentaires : une adénine sur un brin s'apparie avec une thymine sur l'autre brin et la guanine avec la cytosine. La double hélice est refermée sur elle-même et contient plusieurs milliards de paires de bases. Longue d'au moins un millimètre, elle est fortement repliée sur elle-même et tient facilement dans une bactérie

ayant un diamètre de l'ordre du millièbre de millimètre. L'information génétique totale contenue dans une bactérie est un ensemble de plusieurs milliers de gènes (chacun d'entre eux d'une longueur de l'ordre de mille paires de bases), chaque gène codant pour une protéine déterminée, généralement une enzyme. L'information est contenue dans la séquence des bases située sur l'un des brins de l'ADN, chaque codon de trois bases caractérisant l'un des 20 acides aminés. Sous la direction des gènes de structure, qui sont une sorte de moule à protéines, la machinerie cellulaire assemble quelques centaines d'acides aminés, selon une séquence linéaire déterminée, pour constituer une protéine.

Certaines parties de l'ADN ne codent pas pour la synthèse des protéines : les séquences adjacentes aux gènes de structure contrôlent à la fois l'expression de ces gènes, c'est-à-dire la transcription en ARN messager complémentaire de la matrice ADN, et la traduction de l'ARN messager en une protéine sur les organites cellulaires appelés ribosomes. Deux régions commandent la transcription : l'une est le promoteur, une courte séquence qui permet à une enzyme ARN polymérase, de se fixer sur l'ADN puis de se mouvoir le long de la chaîne et de déclencher la transcription en ARN du brin codant à partir d'un point situé avant le début du gène de structure ; l'autre région de contrôle est un signal de fin de transcription, situé à la fin du gène de structure. Les gènes dont

l'expression est déclenchée par une certaine concentration d'un métabolite particulier dans la cellule (ou le milieu de culture) sont munis, au niveau du promoteur et de la séquence terminale, de sites supplémentaires capables d'interagir avec des protéines de régulation ayant une certaine affinité pour l'ADN. Par exemple, une séquence « opérateur », entre le promoteur et le gène de structure, peut fixer une protéine (le répresseur) elle-même produite par un gène régulateur spécifique ; la fixation du répresseur, éventuellement liée à la présence d'un autre métabolite particulier, bloque la transcription du gène de structure. D'autres séquences de bases, après leur transcription en ARN messager, contrôlent la traduction. Un site de fixation du ribosome permet la formation du complexe ARN messenger-ribosome : la traduction est alors déclenchée par un signal spécifique au codon « start » du gène de structure et un signal d'arrêt en fin de gène commande la libération de la chaîne protéique réalisée.

Une excellente compréhension de ces processus de régulation ainsi que de leurs variations dans différents organismes est indispensable à une programmation génétique rationnelle ; on doit s'efforcer de savoir, par exemple, comment un changement à l'intérieur de la région codante modifie la séquence des acides aminés de l'enzyme affectant par là même son activité. De même, une légère altération d'un promoteur peut augmenter la probabilité de fixation de



2. L'INFORMATION GÉNÉTIQUE est stockée dans la double hélice d'ADN (a). Chaque brin de l'hélice est constitué par une chaîne de nucléotides. Le motif unitaire de chaque brin comprend un sucre, le désoxyribose, un groupement phosphate et une base parmi quatre : l'adénine (A), la guanine (G), la thymine (T) et la cytosine (C). L'information génétique est entièrement contenue dans la séquence des bases le long du brin. La complémentarité des bases (A s'associe avec T et G avec C) est la règle fondamentale de la réplication de

l'ADN, et une des règles de son expression en protéine (ici dans le cas de l'ADN bactérien). L'expression d'un gène débute par la transcription de la séquence de bases (b) en un brin d'ARN messager (c) qui correspond au brin codant d'ADN, à ceci près que l'uracile (U) remplace la thymine. La transcription en ARN et la traduction en protéines sont commandées par des séquences de bases (en noir), à la fois dans l'ADN et dans l'ARN. L'enzyme de la transcription, l'ARN polymérase, se fixe sur la région promoteur dont la séquence



l'ARN polymérase et, par conséquent, améliorer le taux de transcription ; des mutations au niveau des gènes « opérateurs » ou régulateurs peuvent aussi empêcher la fixation du répresseur et, ainsi, accroître considérablement (par dérépression) la transcription. De plus, des gènes transplantés d'un organisme à un autre non apparenté ne seront exprimés que si les promoteurs et les sites de fixation du ribosome sont reconnus par la machinerie cellulaire.

Le code génétique ainsi que la biochimie de la transcription et de la traduction sont approximativement les mêmes chez les procaryotes (bactéries) et chez les eucaryotes (tous les organismes supérieurs, des algues à l'homme), mais les signaux de contrôle sont différents. Examinons ainsi l'organisation et l'expression de l'ADN chez les eucaryotes : l'ADN s'entoure de protéines et se divise en un certain nombre de chromosomes définis, groupés à l'intérieur d'un noyau limité par une membrane. Les eucaryotes tels que les champignons ont environ dix fois plus d'ADN que les bactéries ; les plantes et les animaux supérieurs en ont des milliers de fois plus. L'augmentation du contenu en ADN des eucaryotes est bien supérieure à l'augmentation du nombre de gènes, en partie parce que de nombreux gènes y sont fragmentés : des parties non codantes, appelées introns, se trouvent à l'intérieur même du gène de structure. Les introns sont transcrits en même temps que les séquences codantes (les exons), mais ils

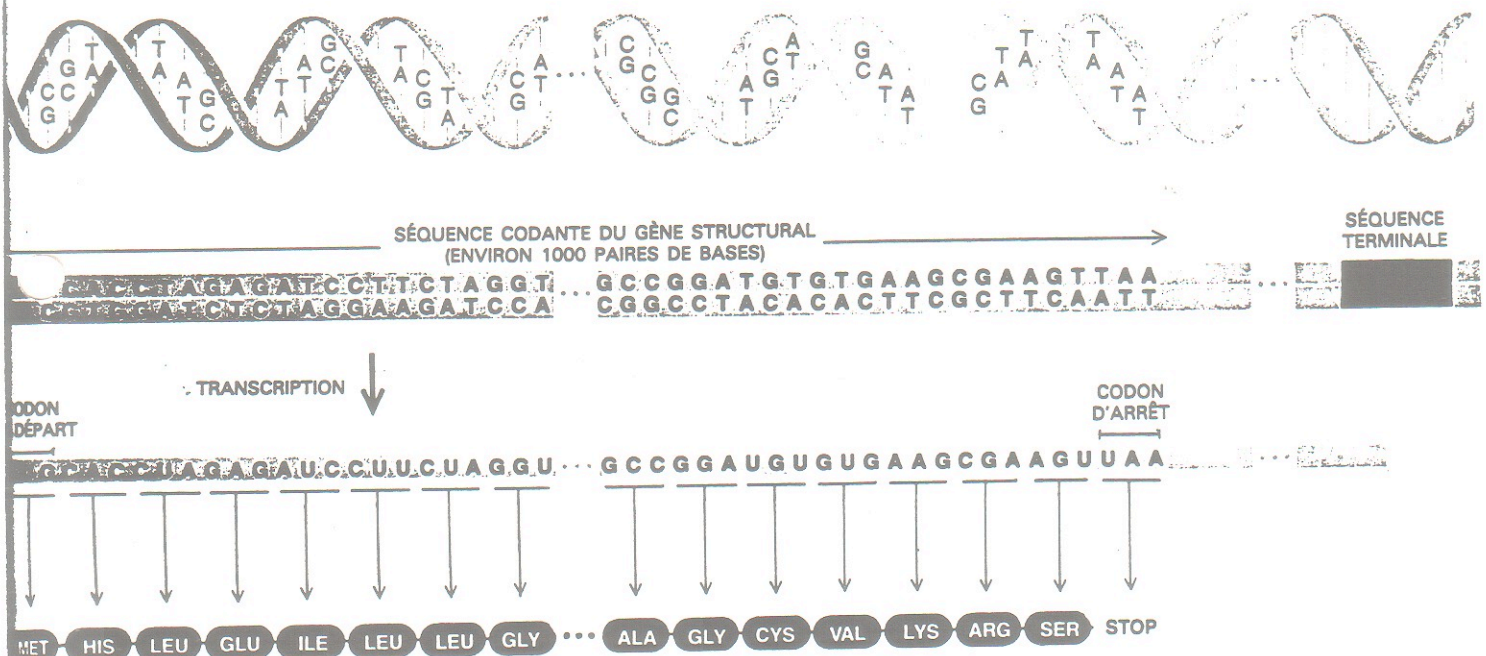
ne sont pas exprimés : ils sont éliminés par un processus d'excision lors d'une première étape et les exons d'un gène sont assemblés dans une seconde étape pour donner un ARN messager mature qui peut être traduit en protéine. Les introns, rares chez les champignons, sont présents dans la plupart des gènes chez les eucaryotes supérieurs ; leur présence complique les transformations génétiques car les bactéries ne possèdent pas les enzymes qui éliminent ces introns de l'ARN primaire traduit : dès lors, un gène eucaryote normal possédant des introns ne s'expriment pas naturellement dans les bactéries.

### Des micro-organismes sur mesure

Pour mettre au point un micro-organisme industriel sur mesure à partir d'une bactérie ou d'un champignon de « type sauvage », il faut modifier son information génétique, c'est-à-dire éliminer des propriétés indésirables, développer des propriétés intéressantes ou en introduire d'autres. Cela est réalisable de plusieurs façons : l'une d'entre elles consiste à tirer parti de mutations existantes ou d'en induire de nouvelles. La mutation la plus simple est une mutation ponctuelle : la transformation d'une paire de bases (par exemple adénine-thymine) en une autre (guanine-cytosine). Dans d'autres cas, une paire de bases ou un court fragment

d'ADN peut être excisé, c'est-à-dire éliminé d'une séquence (délétion), ou encore une paire de bases étrangère peut être insérée. De telles modifications se produisent à l'état naturel dans tout ADN, probablement à la suite d'erreurs dans sa réplication d'une génération à l'autre ; mais ces mutations spontanées sont rares : elles ne touchent une paire de bases donnée qu'environ une fois sur cent millions lors de la réplication. Cette fréquence des mutations peut être multipliée par plus de mille lorsqu'on expose les micro-organismes à des mutagènes tels que les rayonnements ultraviolets ou diverses radiations ionisantes (rayons X, rayonnement gamma ou faisceaux de neutrons). De nombreux composés chimiques, sans rapports apparents avec les acides nucléiques, peuvent également réagir avec les bases ou interférer avec la réplication de l'ADN et provoquer des mutations.

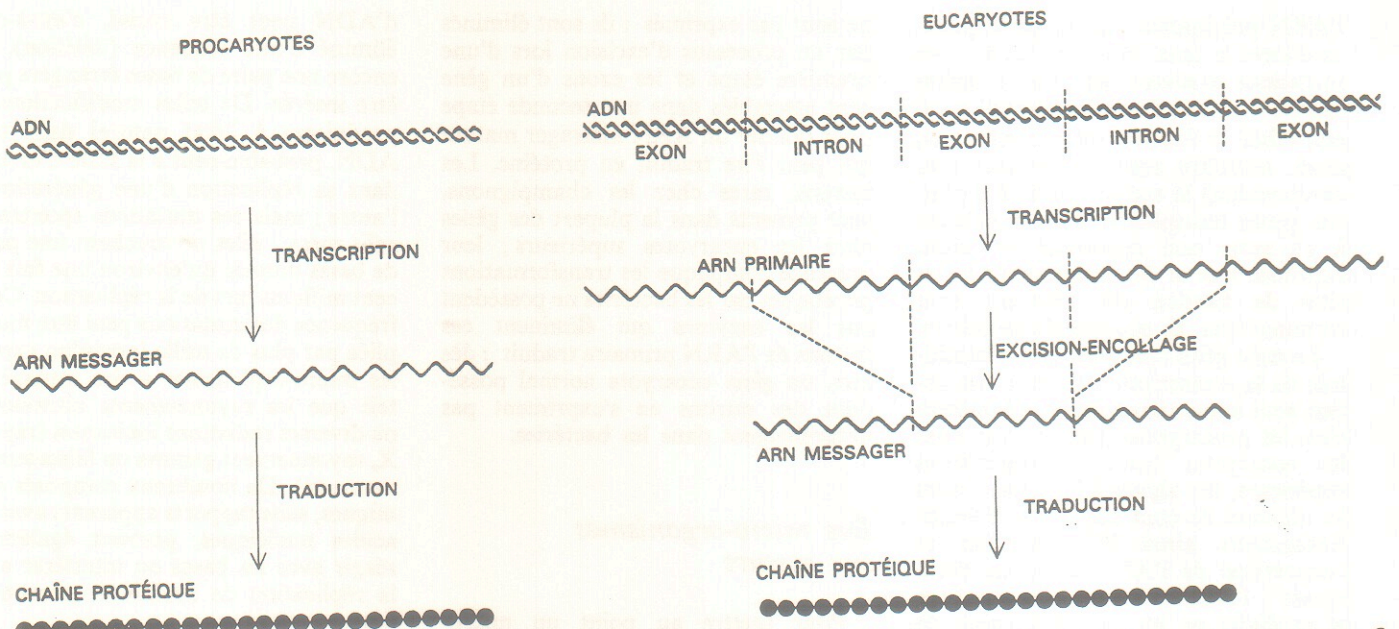
Malheureusement pour le microbiologiste, les agents mutagènes modifient les gènes au hasard. Chaque agent agit préférentiellement sur des bases ou des groupes de bases particuliers (les ultraviolets par exemple tendent à former des liaisons entre deux thymines adjacentes sur le même brin d'ADN) mais, comme tous les gènes sont constitués par les quatre mêmes bases, il est en général impossible de ne muter qu'un gène donné (encore que certains traitements spécifiques tendent à créer des mutations en certaines positions privilégiées d'un gène). Pour développer les caractéristiques utiles d'une souche, il faut



spécifique (pour *Escherichia coli*) est indiquée sur la figure. Cette région se trouve à une distance comprise entre 10 et 35 paires de bases du site d'initiation de la transcription. Au-delà de la fin du gène de structure, une région de terminaison indique l'arrêt de la transcription par l'ARN polymérase. Dans certains gènes, une séquence supplémentaire, l'opérateur, peut fixer une molécule spécifique, le répresseur, responsable d'un contrôle (négatif) supplémentaire. La traduction de l'ARN messager en protéine a lieu sur

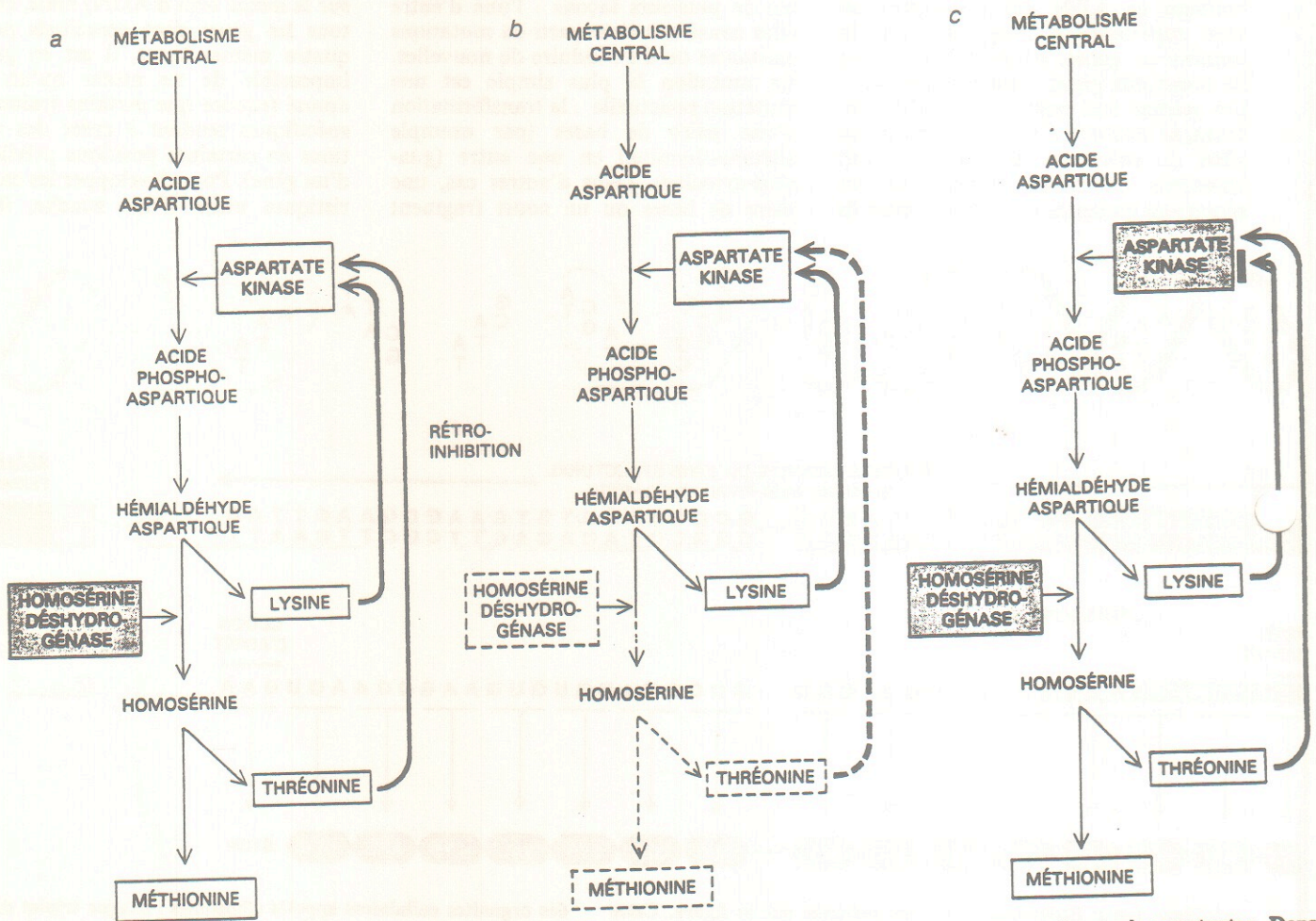
des organites cellulaires appelés ribosomes ; chaque triplet de bases (ou codon) code pour un acide aminé défini qui est ajouté à la chaîne protéique en formation. Sur l'ARN messager, une région de fixation du ribosome permet à la traduction de démarrer par un codon « initiateur » qui est toujours l'AUG codant pour l'acide aminé méthionine (*Met*). La traduction se poursuit jusqu'à un codon « stop » (le codon UAA est un des trois codons possibles). Celui-ci signale la fin de la traduction et sépare la chaîne protéique achevée du ribosome.





3. L'EXPRESSION DE L'ADN n'est pas la même chez les procaryotes (bactéries) et les eucaryotes (organismes supérieurs). Chez les procaryotes, à gauche sur la figure, l'information génétique, codée de façon continue sur la double hélice d'ADN en une séquence qui correspond à un gène structural, est transmise directement en ARN messenger, lequel est traduit en une protéine. Chez les

eucaryotes, à droite sur la figure, certains gènes structuraux (la plupart chez les eucaryotes supérieurs) sont fragmentés. Les régions codantes (exons) sont séparées par des séquences intercalées non codantes (introns). La totalité du gène est transcrite en un ARN messenger primaire. Les introns sont excisés et les exons réunis pour former l'ARN messenger mature.



4. GRÂCE À LA PROGRAMMATION MUTATIONNELLE, on obtient des souches bactériennes qui produisent de plus grandes quantités d'un acide aminé essentiel, la lysine. Dans les souches sauvages (a), la lysine est un produit, avec la thréonine et la méthionine, d'une voie métabolique ramifiée essentiellement contrôlée par rétro-inhibition : l'activité d'une enzyme, l'aspartate kinase, est inhibée par un excès de thréonine et de lysine (agissant ensemble).

Ce contrôle est aboli chez deux types de souches mutantes. Dans un cas (b), une mutation inactive une enzyme, l'homosérine déshydrogénase, ce qui empêche la thréonine de s'accumuler et d'inhiber l'aspartate kinase. Dans l'autre cas (c), le gène codant pour l'aspartate kinase est lui-même muté ; l'enzyme modifiée fonctionne mais n'est plus inhibée par la lysine, même lorsque cette dernière est présente en forte quantité.

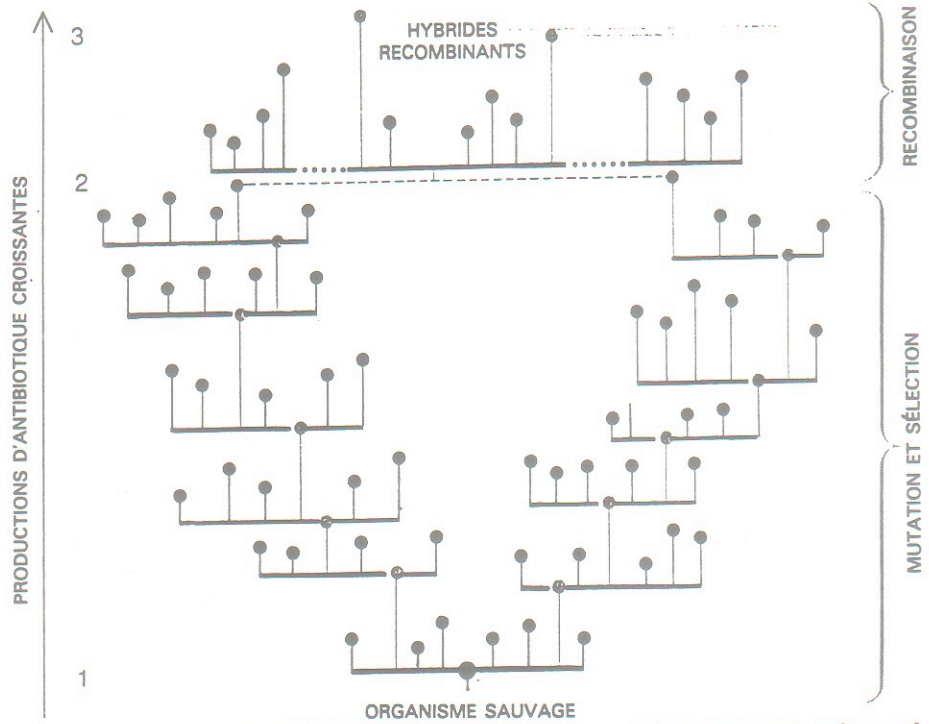


utiliser des tests très sensibles permettant de détecter les rares mutants possédant la propriété recherchée.

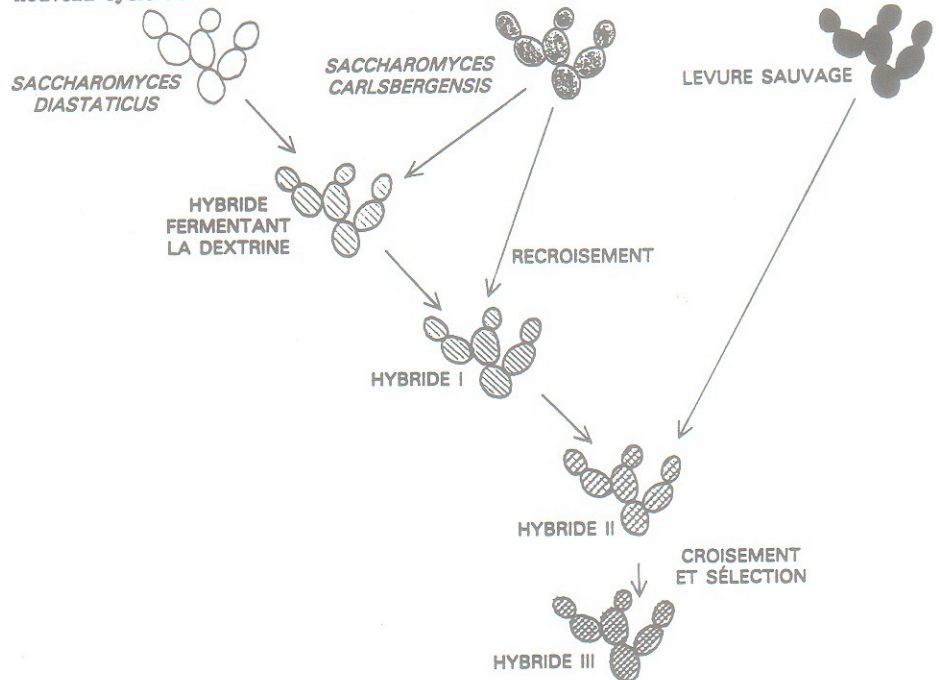
Certains de ces tests sont évidents : ainsi, pour sélectionner des mutants résistants à un inhibiteur empêchant la croissance de la souche sauvage, on étale plusieurs millions de cellules de la souche de départ sur une boîte contenant l'inhibiteur ; seules les cellules résistantes prolifèrent et forment des colonies. On ne peut cependant détecter d'autres types de mutants qu'en étudiant les caractéristiques (de production d'antibiotiques par exemple) des colonies prises au hasard dans des cultures de petit volume ou dans des fermenteurs industriels de faible capacité. Dans de tels cas, on peut espérer qu'en utilisant des mutagènes puissants, on trouvera un mutant favorable en testant non pas des millions, mais seulement des milliers de colonies. Nous examinerons ici deux stratégies très différentes pour améliorer des micro-organismes industriels par reprogrammation mutationnelle, avec des exemples de souches utilisées pour produire des acides aminés et des antibiotiques.

### La lysine

La lysine est un acide aminé essentiel dans l'alimentation animale (les cellules animales n'en fabriquent pas) et de nombreuses protéines végétales en sont dépourvues : on produit donc la lysine par fermentation pour l'utiliser comme additif à la nourriture animale. L'efficacité de cette fermentation dépend étroitement de nos connaissances fondamentales des voies métaboliques conduisant à la biosynthèse bactérienne de cet acide aminé et de la régulation génétique de cette synthèse. L'exploitation adroite de ce savoir a permis la sélection de souches mutantes de *Brevibacterium flavum* et de *Corynebacterium glutamicum* capables de convertir en lysine plus d'un tiers du sucre contenu dans un milieu de fermentation pour produire jusqu'à 75 grammes de lysine par litre de milieu de culture. Chez ces bactéries, la lysine est un produit final d'une voie métabolique ramifiée, c'est-à-dire non nécessaire à la croissance cellulaire, conduisant également à la synthèse de deux autres acides aminés, la méthionine et la thréonine. On connaît, dans ce cas, le mécanisme fondamental qui contrôle la synthèse de ces acides aminés de façon à satisfaire les besoins de la bactérie sans les dépasser : ce mécanisme est la rétro-inhibition de la première enzyme de la voie, l'aspartate kinase, résultant de la présence conjuguée de thréonine et de lysine ; toute accumulation excessive de ces deux acides aminés par rapport aux besoins de l'organisme tend à bloquer leur synthèse par inhibition de l'enzyme aspartate kinase ; inversement, une



5. LA PRODUCTION D'ANTIBIOTIQUE par un micro-organisme dépend d'un très grand nombre de gènes : elle peut être améliorée par mutation - sélections suivies de croisements qui recombinent les gènes provenant des deux organismes. On traite une première fois une souche sauvage par un mutagène (1) et les colonies filles sont sélectionnées ; quelques-unes révèlent une production améliorée. On choisit les meilleures souches (en couleur) qui sont à nouveau mutagénisées ; puis on répète ce processus. Les deux meilleurs mutants (2), qui, dans le cas présent, portent six mutations différentes et par conséquent diffèrent l'un de l'autre par douze gènes ou portions de gènes, sont croisés. La recombinaison peut engendrer  $2^{12}$  nouveaux génotypes. Parmi ceux-ci, beaucoup donnent des productions d'antibiotique plus importantes. On peut recombinaison les meilleurs producteurs (3) ou les soumettre à un nouveau cycle de mutation.



6. LA LEVURE DE BIÈRE *Saccharomyces carlsbergensis* convertit le sucre en alcool et en dioxyde de carbone mais elle ne fermente que 81 pour cent des sucres du liquide de fermentation (le moût). Une souche de levure capable de fermenter tous les sucres pour fabriquer une bière « légère » est obtenue par croisement de plusieurs espèces de levures et par recombinaison des gènes codant pour les enzymes qui dégradent les différents sucres. *Saccharomyces diastolicus* fermente les dextrines. Son croisement avec *Saccharomyces carlsbergensis* produit un hybride capable de fermenter les dextrines mais donnant une bière peu agréable au goût. Plusieurs croisements successifs de l'hybride avec *Saccharomyces carlsbergensis* produisent l'hybride I qui convertit 90 pour cent de sucres et donne une bière agréable. Le croisement de l'hybride avec la souche sauvage qui fermente les isomaltoses donne l'hybride II qui transforme 100 pour cent des sucres. Le croisement des souches de l'hybride II entre elles donne une souche encore améliorée (l'hybride III).



concentration insuffisante en thréonine et en lysine augmente le taux de synthèse.

On a isolé deux mutants bactériens qui synthétisent la lysine bien au-delà de leurs besoins. Pour la première de ces souches surproductrices, une mutation du gène codant pour une enzyme, l'homosérine déshydrogénase, abolit son activité et empêche la bactérie de synthétiser la thréonine (un des produits inhibiteurs) et la méthionine. Lorsque ce mutant auxotrophe, c'est-à-dire nutritionnellement déficient, est cultivé dans un milieu contenant juste assez de thréonine et de méthionine pour permettre sa croissance mais pas assez de thréonine pour bloquer, en interaction avec la lysine, l'activité de l'aspartate kinase, la bactérie produit beaucoup de lysine. On sélectionne les mutants auxotrophes en testant des milliers de colonies préalablement mutagénisées ; ils ne croissent que si certains produits (en l'occurrence, la méthionine et la thréonine) sont ajoutés au milieu de culture. Ces mutants sont isolés très facilement : pour ce faire, on place la culture mutagénisée dans un milieu, déficient en facteurs de croissance appropriés, mais contenant de la pénicilline ; cet antibiotique agit sur la paroi cellulaire des bactéries en croissance et les tue : les auxotrophes qui ne peuvent croître

survivent, tandis que les bactéries mutées meurent.

La seconde variété de mutants possède une aspartate kinase modifiée qui a conservé son activité enzymatique mais qui ne réagit plus avec la lysine et perd par là même sa sensibilité à la rétro-inhibition : la lysine s'accumule à de fortes concentrations dans le fermenteur. De tels mutants ont pu être isolés parce qu'ils sont résistants à un composé appelé AEC, lequel ressemble tellement à la lysine qu'il reproduit son action régulatrice en inhibant l'aspartate kinase, même en l'absence de lysine : aussi, en présence d'AEC, les souches sauvages meurent par privation de lysine, alors que les mutants prolifèrent et forment des colonies. La production de lysine n'est qu'un exemple de procédé industriel dépendant de la sélection classique de mutants où l'on a éliminé les régulateurs de la production d'acides aminés.

### La fabrication des antibiotiques

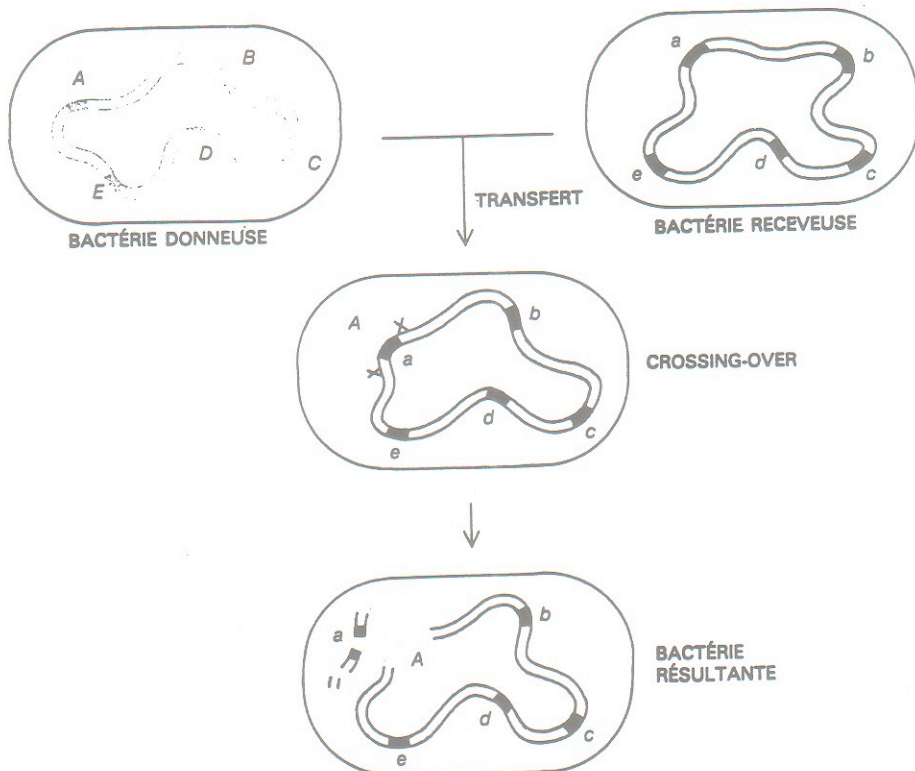
Le cas des antibiotiques est très différent. Ils ne sont synthétisés qu'à certaines étapes particulières du cycle vital de certaines moisissures, les actino-

mycètes (bactéries filamenteuses), et de certaines bactéries sporulantes. Leur régulation génétique est encore mal connue et leur synthèse dépend certainement de nombreux facteurs. Les mécanismes de contrôle répondent aux variations du métabolisme cellulaire (la disponibilité en carbone, en azote et en phosphate minéral par exemple) ; la production dépend aussi de la synthèse de groupements chimiques entrant dans la composition de l'antibiotique et de la résistance de l'organisme producteur à la toxicité de ce dernier. Dans la mesure où la production d'un antibiotique dépend de plusieurs centaines de gènes, il est impossible de trouver des mutations uniques capables de faire passer la production de quelques milligrammes par litre pour une souche sauvage, aux 20 grammes par litre ou plus de pénicilline ou de tétracycline qu'on obtient aujourd'hui avec les souches industrielles hautement élaborées, *Penicillium chrysogenum* et *Streptomyces aureofaciens*.

Ces souches vraiment remarquables ont été obtenues après de nombreux cycles de mutation-sélection. A chaque cycle, la culture est mutagénisée et des milliers de colonies sont examinées. Lorsqu'un mutant révèle une augmentation de production significative, il sert de point de départ à un nouveau cycle de mutation-sélection. De cette façon, l'évolution de l'organisme est dirigée jusqu'à l'obtention d'une souche produisant l'antibiotique en quantités économiquement intéressantes.

Un travail de ce genre est lent et laborieux et les résultats sont imprévisibles, dans la mesure où les taux de production dépendent non seulement du patrimoine génétique de la souche, mais aussi des conditions de culture. Dans les premières étapes d'un programme d'amélioration, on peut trouver des mutants avantageux en testant directement des colonies poussant dans des boîtes de Pétri, mais les qualités de ces souches doivent être réévaluées dans des conditions reproduisant (autant que possible) celles de la production commerciale caractérisée par des fermenteurs géants de 100 000 litres ou plus. En dépit de ces obstacles, plusieurs procédés de fermentation d'antibiotiques utilisent aujourd'hui des souches améliorées, après 20 ans de recherches ou plus, par 20 ou 30 étapes de sélection.

Une mutation altère le patrimoine génétique d'un micro-organisme. La recombinaison, l'autre procédé de reprogrammation génétique, consiste à réarranger les gènes ou portions de gènes et à rassembler dans un seul organisme l'information génétique provenant de deux gènes ou plus. La recombinaison résulte de tout un ensemble de processus naturels et de techniques de laboratoire. Dans la recombinaison dite homologue, des chromosomes bactériens ou eucaryotes ayant des



7. LA RECOMBINAISON HOMOLOGUE correspond à un des processus naturels ou artificiels par lequel un morceau de chromosome d'une cellule donneuse pénètre dans une cellule receveuse. L'ADN donneur peut s'apparier avec une région homologue correspondante de l'ADN du chromosome receveur, se casser et échanger des portions dans un processus appelé « crossing over » (symbole X) qui produit une nouvelle combinaison des gènes du donneur et du receveur. Dans le cas du chromosome à cinq gènes représenté ici, une combinaison d'un gène sur 2<sup>5</sup> (soit 32) apparaît : le gène donneur A remplace le gène a du chromosome ; le gène a, exclu du chromosome, est éliminé.



séquences d'ADN similaires sont réunis au cours d'un processus d'accouplement et échangent des portions de gènes correspondantes par coupure et recollage de l'ADN. Dans le cas des eucaryotes, la reproduction sexuée est à l'origine d'un autre procédé de brassage des gènes au cours duquel les panoplies chromosomiques provenant de deux individus sont mélangées et réassorties.

La recombinaison homologe est d'une stupéfiante efficacité pour fabriquer de nouveaux génotypes (le génotype est l'ensemble des gènes d'un organisme). Si deux individus diffèrent par  $n$  gènes ou portions de gènes, la recombinaison de leurs deux patrimoines génétiques peut engendrer  $2^n$  génotypes différents. Le croisement entre deux micro-organismes dont l'ADN diffère seulement d'une douzaine de bases dispersées au milieu de milliards d'autres paires de bases peut constituer  $2^{12}$ , c'est-à-dire presque 5000 génotypes nouveaux ! Comme dans la plupart des cas il y a encore plus de gènes différents

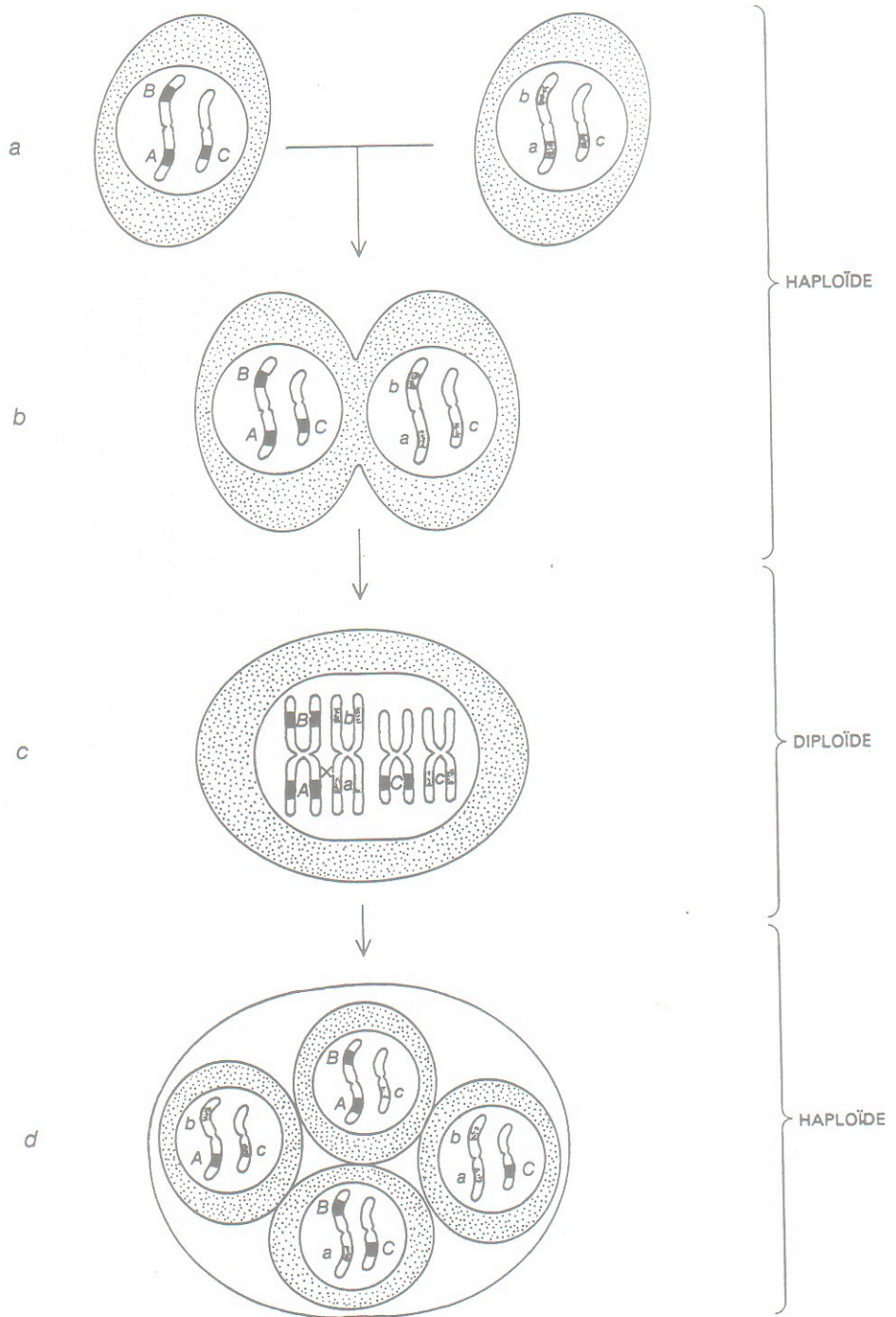
que les cellules parentales, un nombre astronomique de nouvelles combinaisons résulte des croisements. Bien que quasiment tous les micro-organismes puissent échanger des gènes avec des souches apparentées, on n'a jamais, à de très rares exceptions près, utilisé les potentialités naturelles de recombinaison génétique entre souches apparentées pour obtenir des souches industrielles intéressantes. Examinons, à titre d'exemple, les levures industrielles.

La reproduction des levures est plus haploïde que diploïde : le génotype des souches haploïdes ne comporte qu'un seul jeu de chromosomes incluant un seul jeu complet de gènes, alors que les génotypes diploïdes (comme ceux de la plupart des animaux et des plantes) ont deux jeux de chromosomes comportant deux copies de chaque gène. En général, une levure haploïde ne peut se reproduire de façon sexuée et assurer du coup la recombinaison génétique que si elle rencontre une cellule de la même espèce mais de type « sexuel » opposé. Les deux cellules fusionnent alors pour donner naissance à une cellule momentanément diploïde, à l'intérieur de laquelle se forment des spores sexuées haploïdes comportant différentes combinaisons des gènes parentaux. Pour les levures industrielles, il existe certaines variations autour de ce thème de reproduction majeur : certaines levures ont plusieurs jeux de chromosomes ou, ne se croisent que de façon intermittente. L'hybridation de différentes souches, souvent d'espèces différentes, a néanmoins joué un rôle important dans la mise au point de levures industrielles qui augmentent la vitesse de fermentation de la pâte à pain, la teneur en alcool des liqueurs à distiller, et qui facilitent le brassage de bières spéciales dont pres-

que tous les sucres solubles ont été éliminés.

En principe, seuls les membres d'espèces très proches se croisent avec succès. Quelquefois cependant, on peut lever les barrières naturelles empêchant la recombinaison d'organismes diffé-

rents en préparant des protoplastes, c'est-à-dire des cellules bactériennes ou fongiques dont la résistante paroi cellulaire externe a été détruite et où ne subsiste que la mince membrane cellulaire. Puisque la composition des membranes cellulaires est à peu près la même



8. LA RECOMBINAISON CHEZ LES EUCARYOTES implique un *crossing over* entre fractions de chromosomes et la redistribution de ces dernières pour former les nouveaux chromosomes. Une levure typique est haploïde durant la plus grande partie de son cycle vital, avec un seul ensemble de 15 chromosomes ou plus ; on n'en a représenté ici que deux. Deux cellules de sexes opposés (a) peuvent fusionner (b) ; les noyaux fusionnent à leur tour pour former un noyau diploïde avec deux jeux complets de chromosomes. Au cours de la méiose (une phase de la reproduction sexuée), les chromosomes donnent des structures doubles comprenant deux chromatides (c). Les chromosomes homologues s'apparient et échangent des portions de chromatides par *crossing over* ; puis quatre spores haploïdes sexuées se forment (d). Chaque spore peut avoir une nouvelle combinaison de gènes différente (*noir et couleur*) de celle des cellules parentales : les gènes portés par le même chromosome (A, a ; B, b) se recombinent par *crossing over* et les gènes portés par différents chromosomes sont mélangés au cours du réarrangement des paires de chromosomes.



dans la plupart des espèces, on peut provoquer la fusion et obtenir une cellule hybride dans laquelle tous les gènes peuvent se recombiner.

La fusion des protoplastes est une technique efficace pour augmenter la fréquence des recombinaisons chez les organismes qui se croisent rarement à l'état naturel, comme par exemple de nombreuses espèces de l'actinomycète *Streptomyces*. On prépare les proto-

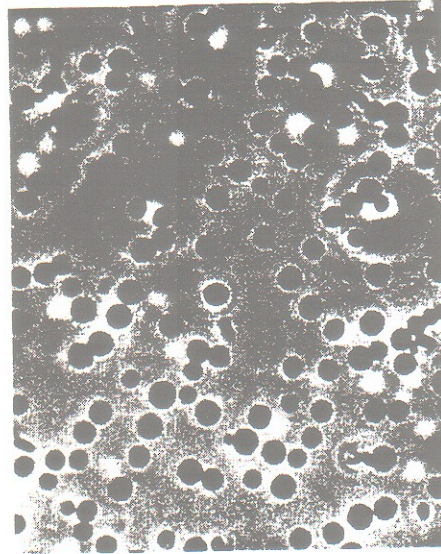
plastes par digestion de la paroi bactérienne au moyen d'une enzyme, le lysozyme. L'opération est réalisée dans une solution sucrée dont la pression osmotique équilibre la pression interne des cellules, faute de quoi cette dernière ferait éclater la fragile membrane cellulaire. La fusion des protoplastes de deux souches est induite par traitement par un agent tel que le polyéthylène glycol et les ADN parentaux se recombinent

dans l'hybride résultant. Les protoplastes hybrides donnent ensuite naissance à une culture normale après régénération de la paroi cellulaire. La fusion est si efficace que deux souches de *Streptomyces* peuvent, après hybridation, engendrer une population dans laquelle une cellule sur cinq au moins possède une nouvelle combinaison de gènes. Il serait en principe possible de créer ainsi, en une seule étape, des combinaisons de gènes mutés (aptes par exemple à augmenter la production d'antibiotiques) que des chercheurs ont jusqu'ici laborieusement préparés par des cycles successifs de mutation-sélection sur des lignées séparées.

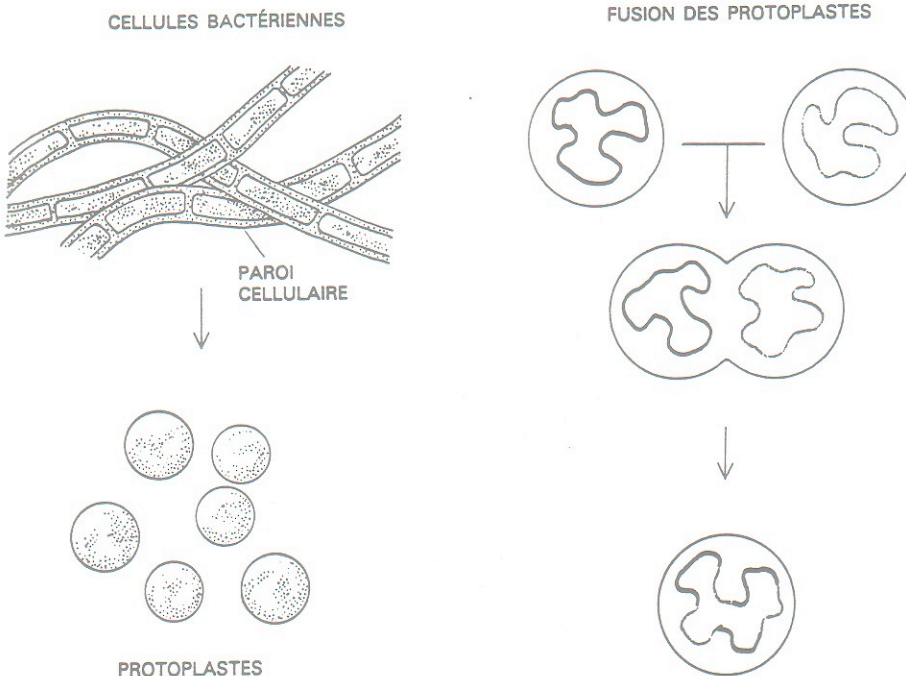
### Les méthodes du génie génétique

Alors que par la recombinaison homologue deux cellules échangent des séquences correspondantes d'ADN, d'autres formes de recombinaisons, tel que le transfert de plasmide, visent à ajouter une nouvelle portion d'ADN à celui d'un micro-organisme. Les plasmides sont de petites molécules circulaires d'ADN extrachromosomique que l'on trouve chez les bactéries et chez quelques levures. Ils se répliquent de façon autonome et se transmettent aux cellules filles. Les plasmides portent souvent des gènes responsables de propriétés spécifiques des bactéries; ils peuvent être transférés d'une souche bactérienne à une autre souche non apparentée, et parfois même à une autre espèce, pour y introduire des propriétés génétiques totalement nouvelles. Certains plasmides codent pour des structures déclenchant la conjugaison des bactéries et sont ainsi les promoteurs de leur propre transfert de cellule à cellule; les plasmides peuvent aussi passer d'une bactérie à une autre par l'intermédiaire d'un bactériophage ou virus bactérien. Enfin, l'ADN plasmidique pur, après libération par éclatement (naturel ou induit) de sa cellule hôte, peut pénétrer dans une autre cellule par un processus appelé transformation, lequel peut être grandement facilité par diverses techniques de laboratoire.

Donnons un exemple de culture microbienne résultant d'un transfert de plasmides naturels: la construction d'une bactérie capable de métaboliser, donc de dégrader, les principaux hydrocarbures du pétrole. De nombreuses souches de *Pseudomonas putida* hébergent un plasmide codant pour des enzymes qui ne digèrent qu'une seule classe d'hydrocarbures; parmi ces plasmides, citons le plasmide OCT qui permet la digestion de l'octane, de l'hexane et du décane; le plasmide XYL la digestion du xylène et du toluène; le plasmide CAM la digestion du camphre et le plasmide NAH celle du naphthalène.

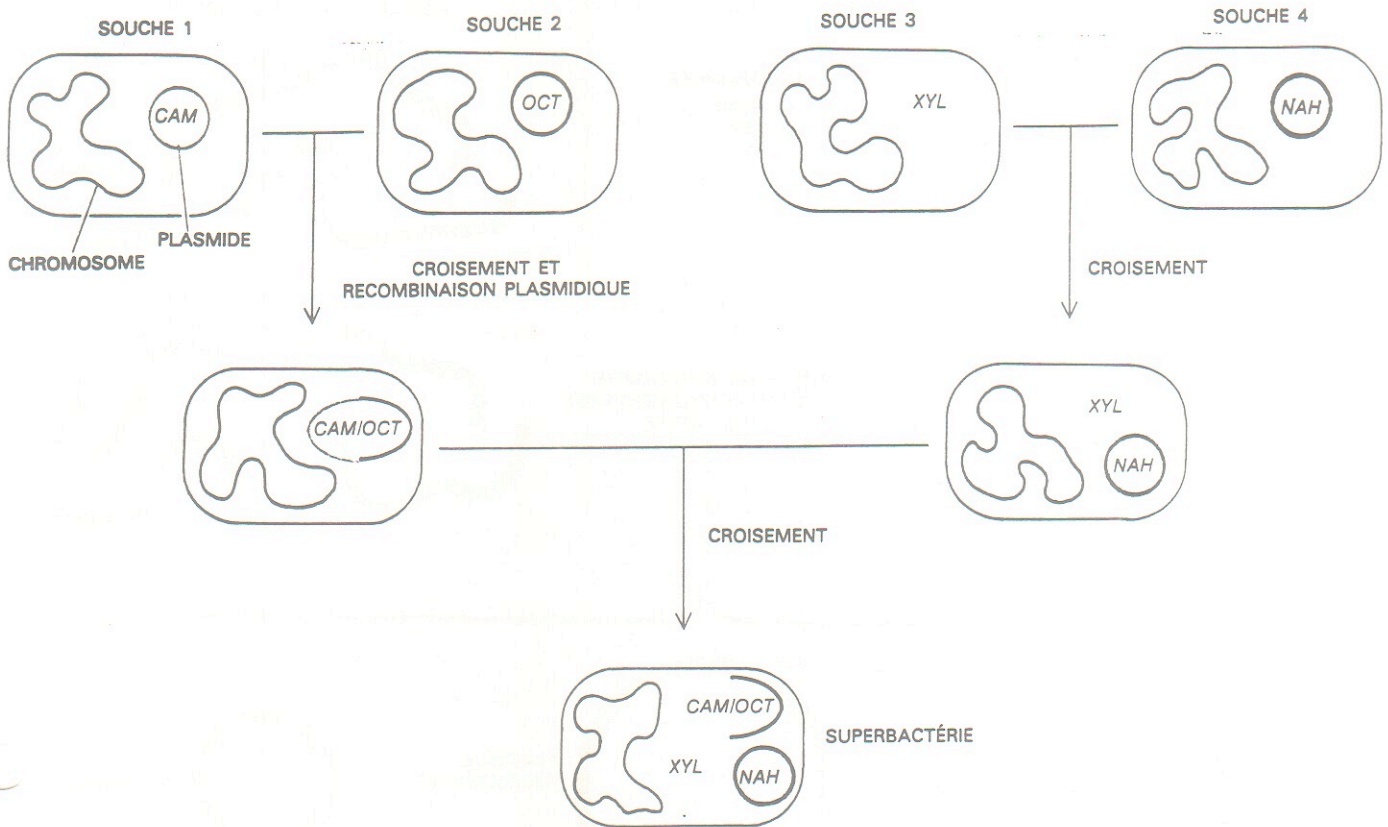


9. LES PROTOPLASTES SPHÉRIQUES ET LES CELLULES BACTÉRIENNES dont ils proviennent sont agrandis environ 2500 fois sur cette photographie réalisée par Keith Chater et l'auteur. Une paroi cellulaire épaisse et résistante limite les cellules filamenteuses de l'actinomycète *Streptomyces coelicolor* (à gauche). La paroi est digérée par une enzyme, le lysozyme, et chaque cellule n'est alors plus entourée que de sa mince membrane cellulaire; les protoplastes (à droite) prennent une forme sphérique dans une solution sucrée concentrée dont la pression osmotique contrebalance la pression intracellulaire. On peut alors induire la fusion des protoplastes.



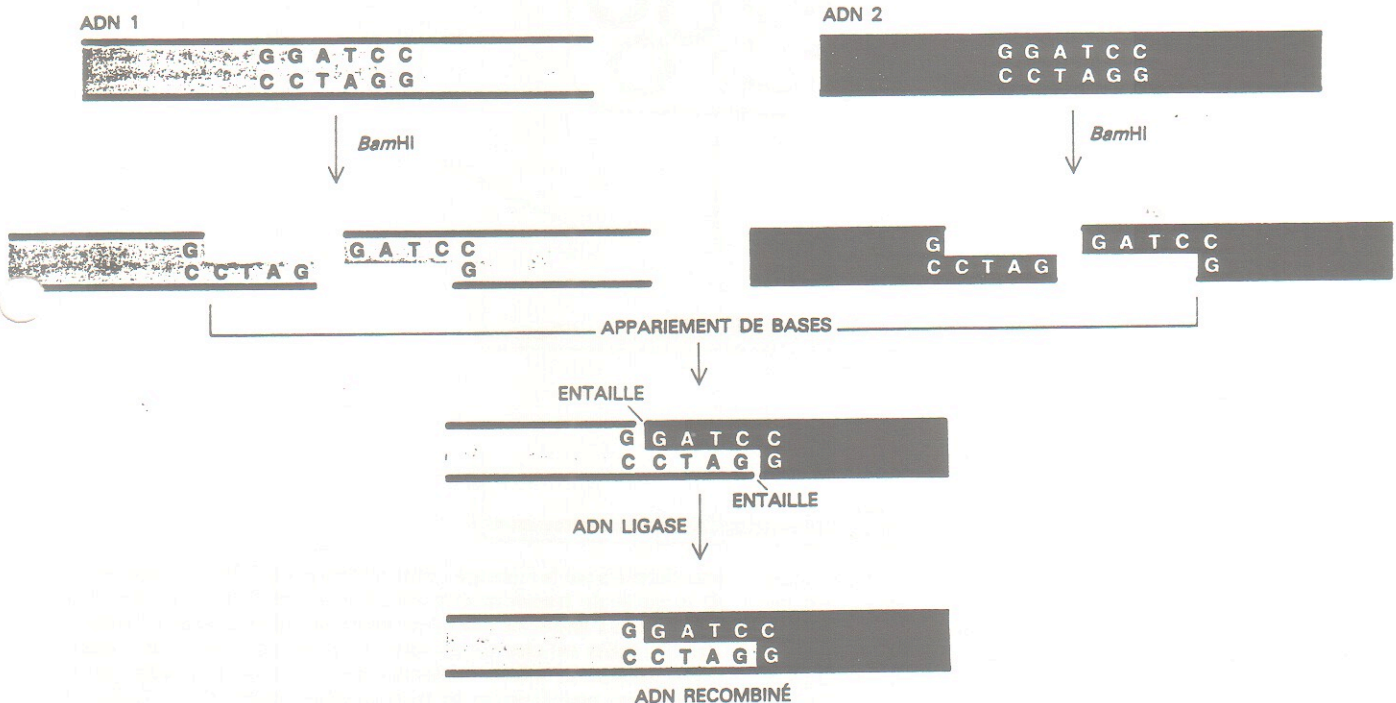
10. LA FUSION DES PROTOPLASTES permet la recombinaison des gènes entre deux espèces qui ne se croisent pas, ou l'augmentation de la recombinaison entre souches d'un organisme comme *Streptomyces* qui ne s'apparient que rarement. Les protoplastes proviennent des cellules de *Streptomyces* (à gauche). Les protoplastes de deux souches sont traités au polyéthylène glycol (à droite); ils fusionnent pour donner un nouvel hybride abritant deux chromosomes dont des parties se recombinent pour donner un nouveau génotype.





11. ON PEUT CONSTRUIRE UNE « SUPERBACTÉRIE » capable de métaboliser les principaux hydrocarbures du pétrole par transformation de plasmides. Les propriétés de quatre souches différentes de *Pseudomonas putida* de métaboliser les hydrocarbures de la famille du camphre (*CAM*), de l'octane (*OCT*), du xylène (*XYL*) ou du naphthalène (*NAH*) dépendent d'enzymes qui ne sont pas portées par des chromosomes mais par différents plasmides. On

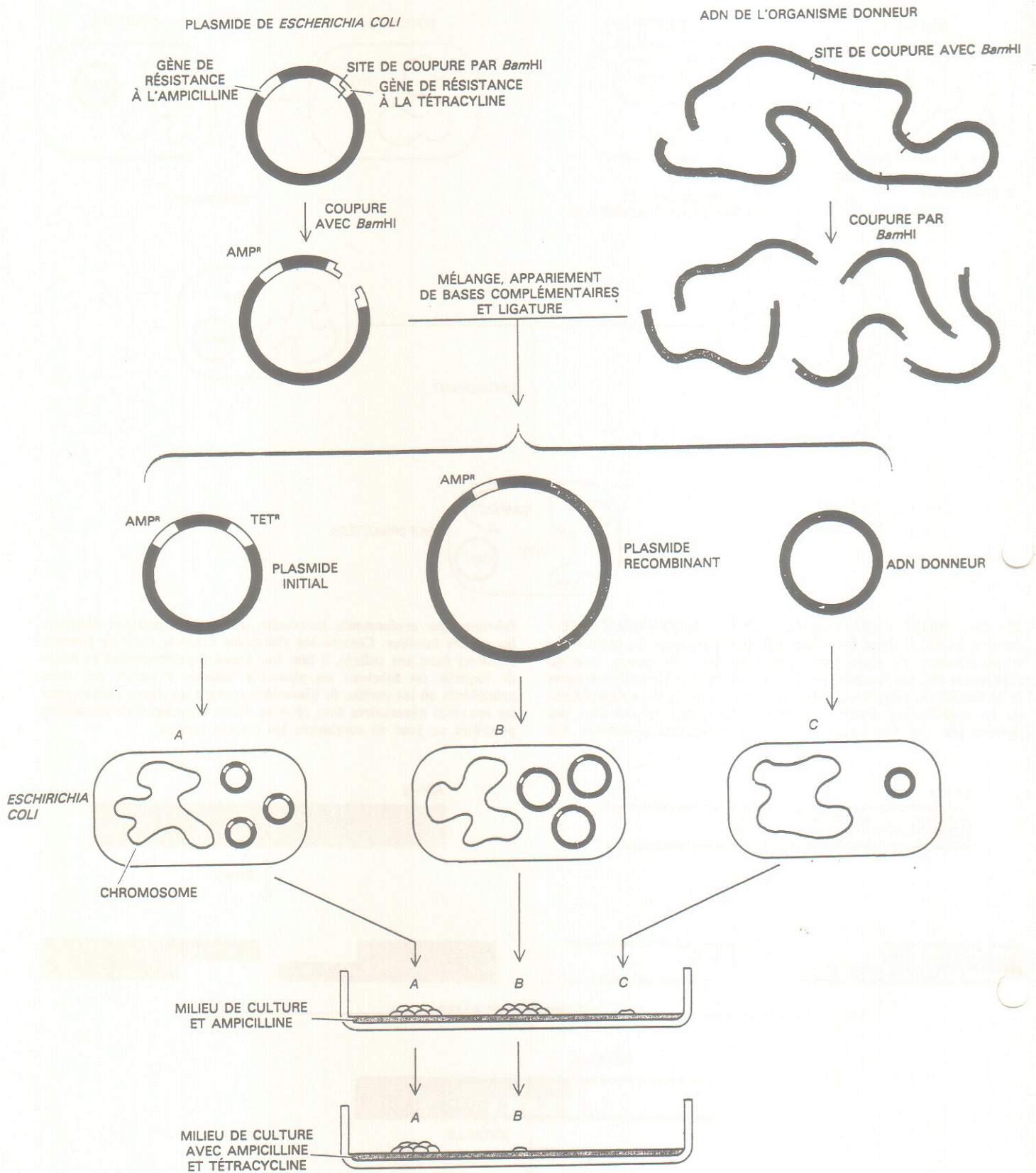
fabrique, par croisements successifs, une souche pouvant dégrader les quatre familles. Comme les plasmides *CAM* et *OCT* ne peuvent coexister dans une cellule, il faut une étape supplémentaire au cours de laquelle on fabrique un plasmide hybride à partir des deux précédents où les parties de plasmides portant les gènes codant pour les enzymes nécessaires sont réunies. Cette superbactérie permettra peut-être un jour de combattre les marées noires.



12. LES ENDONUCLÉASES DE RESTRICTION, outils de base du génie génétique, sont des enzymes bactériennes capables de reconnaître de courtes séquences palindromiques (qui se lisent de la même façon dans les deux sens, de droite à gauche et de gauche à droite) déterminées de l'ADN et de couper la chaîne à un site spécifique de cette séquence. L'enzyme *BamHI* (baptisée en fonction de sa source, *Bacillus liquefaciens*) et de nombreuses autres enzymes

appelées endonucléases de restriction coupent l'ADN de telle façon qu'elles font apparaître des extrémités simple brin appelées « extrémités collantes » parce que leurs bases sont complémentaires. Deux ADN d'origine différente (couleur et gris), tous deux coupés par *BamHI*, peuvent être réassociés par appariement de base. Des interruptions dans la chaîne de l'ADN réassocié peuvent être scellées par l'ADN ligase.





13. APRÈS INTRODUCTION DANS LA BACTÉRIE *Escherichia coli* d'un plasmide vecteur portant un gène étranger, on obtient un clone de bactéries portant ce gène. Ici le plasmide porte les gènes de résistance aux antibiotiques ampicilline et tétracycline. Un plasmide traité par *Bam*HI est coupé en un site, à l'intérieur du gène codant pour la résistance à la tétracycline. Des extrémités collantes sont créées. L'ADN d'un organisme donneur est coupé par *Bam*HI en un certain nombre de fragments ayant les mêmes extrémités collantes. Le vecteur coupé et l'ADN du donneur sont mélangés, hybridés et ligaturés. Il en résulte un mélange de molécules : des plasmides recircularisés (à gauche), des plasmides recombinants portant un segment de l'ADN du donneur (au centre) et de l'ADN du donneur circularisé (à droite). Des bactéries *Escherichia coli* sont

transformées par le mélange : elles intègrent les différentes molécules. Si la molécule transformante est un plasmide, il se reproduit et se transmet aux bactéries filles, leur conférant la résistance à l'ampicilline. De telles cellules (A, B) sont reconnaissables par leur capacité à croître sur un milieu contenant de l'ampicilline, tandis que les cellules non transformées ou transformées seulement par l'ADN du donneur (c) sont tuées. Une « réplique » de colonies résistant à l'ampicilline est effectuée sur un disque de velours et transférée sur un milieu contenant tétracycline et ampicilline. Dès lors, toutes les cellules hébergeant des plasmides recombinants (B) sont tuées parce que le gène plasmidique conférant la résistance à la tétracycline a été détruit. La culture qui a donné naissance à la colonie B est testée pour identifier les clones portant les différents gènes du donneur.



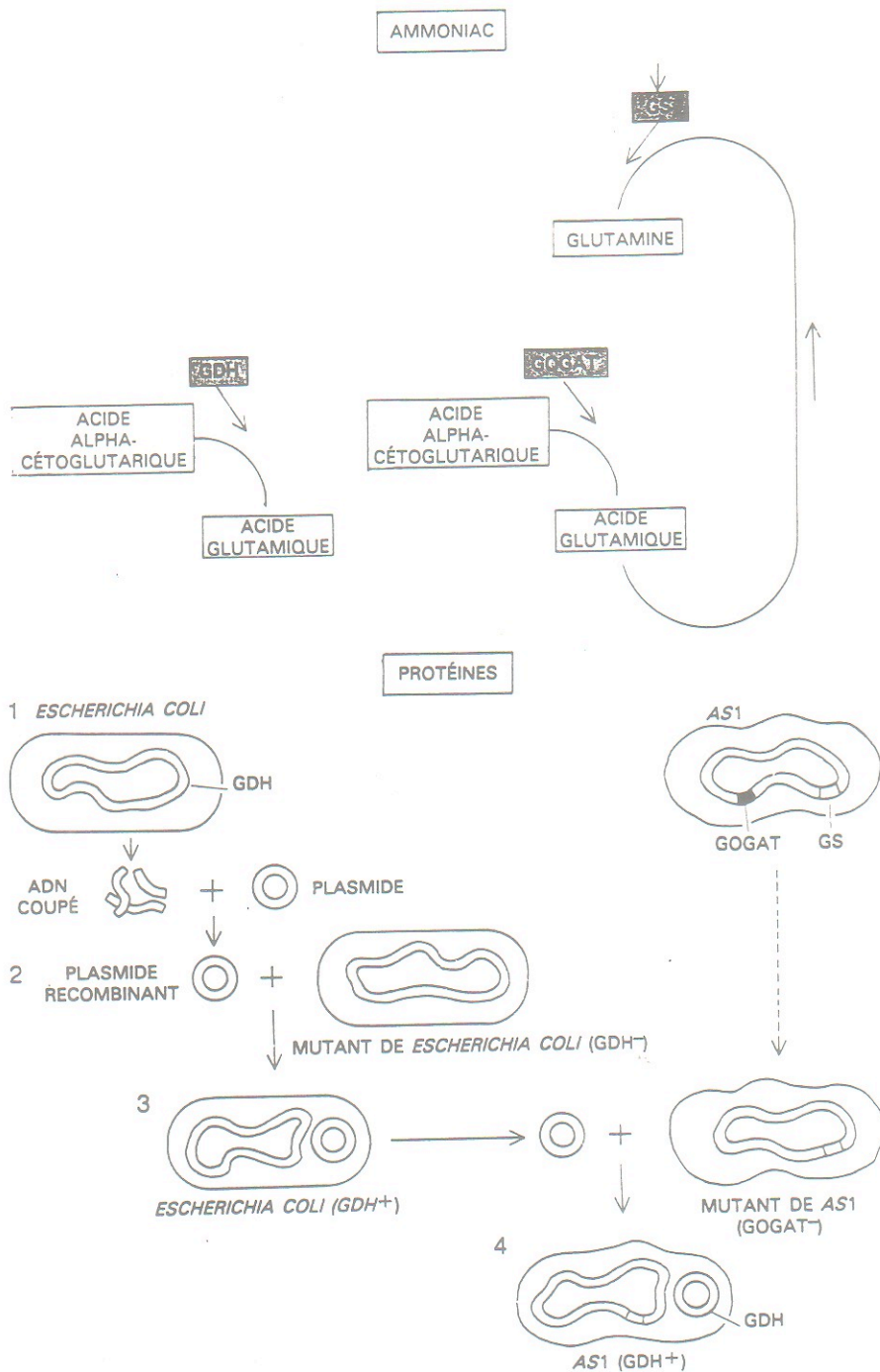
Deux des plasmides (*CAM* et *NAH*) engendrent leur propre transfert en induisant les croisements entre bactéries. Cela n'est pas le cas des autres, qui ne peuvent être transférés que si d'autres plasmides inducteurs sont introduits dans le système. Au moyen de croisements successifs, on a créé une « superbactérie » qui héberge les plasmides *XYL* et *NAM* ainsi qu'un plasmide hybride dérivé, par recombinaison, de *CAM* et *OCT* (qui sont incompatibles et ne peuvent coexister séparément dans la même bactérie). La bactérie multipiasmique croît très rapidement sur du pétrole lourd car elle digère beaucoup plus d'hydrocarbures que n'importe quelle souche qui ne contient qu'un seul des plasmides. Il reste à démontrer qu'une telle bactérie peut éliminer les nappes de pétrole répandues par les navires pétroliers ou nettoyer les tankers! Cette bactérie a déjà une histoire juridique : la validité du brevet qui la concerne, le premier brevet jamais attribué à un micro-organisme transformé génétiquement, a été confirmée par la Cour Suprême des Etats-Unis.

D'autres plasmides naturels hébergent des gènes codant pour des propriétés industrielles potentiellement intéressantes. Dans mon laboratoire, à l'Institut John Innes en Grande Bretagne, nous avons découvert que la synthèse de certains antibiotiques par des espèces variées de *Streptomyces* est sous contrôle plasmidique et non chromosomique. La diversité de ces antibiotiques est telle que l'éventail de leurs applications est important, non seulement en médecine humaine et vétérinaire, mais aussi comme additifs à la nourriture animale et dans le traitement de certaines maladies végétales. Le transfert, dans un seul *Streptomyces* hôte, de plasmides variés codant pour différents antibiotiques devrait permettre aux enzymes de la nouvelle souche de coopérer à la synthèse d'antibiotiques aux propriétés nouvelles.

La possibilité d'isoler un plasmide à partir d'une culture et de l'introduire dans une autre est à la base des expériences de recombinaison génétique *in vitro*. On peut insérer des gènes étrangers naturels ou synthétiques dans un plasmide et introduire ensuite ce dernier dans un nouvel hôte microbien. Le plasmide peut alors être utilisé comme vecteur pour des gènes qui n'ont pas d'équivalents dans l'organisme receveur, lequel ne peut par conséquent pas en hériter de façon stable au travers de la recombinaison homologe; une fois introduits, de tels gènes peuvent être transmis indéfiniment, de génération en génération, au rythme des répliquations du plasmide. Les ADN de certains virus peuvent également servir de vecteurs, pourvu qu'ils infectent les micro-organismes sans entraîner leur mort. De nombreux virus bactériens (les bactériophages dits « tempérés ») respectent

cette double condition, ainsi que certains virus qui infectent les plantes et les animaux. Ces derniers virus peuvent, comme chez les micro-organismes, ouvrir la voie aux applications industrielles des transformations génétiques de cellules végétales et animales.

Les techniques d'ADN recombinant sont utilisables de différentes façons dans de nombreuses fabrications industrielles. L'objectif le plus courant est de faire produire à un micro-organisme une protéine enzymatique ou hormonale qu'il ne synthétise pas naturellement :



14. ON PEUT REMPLACER UN MÉTABOLISME DE L'AZOTE dans une souche de *Methylophilus methylotrophus* appelée *AS1*, gros consommateur d'énergie (couleur sombre) par un métabolisme énergétiquement plus économe (couleur claire). Les deux voies métaboliques partent de l'ion ammonium (la source d'azote) et l'incorporent dans les acides aminés puis dans les protéines. Au cours de cette incorporation, l'étape de formation de l'acide glutamique catalysée par la GDH (chez *Escherichia coli* et quelques autres espèces) ne requiert pas l'énergie contenue dans l'ATP, alors qu'elle est consommée dans l'une des deux étapes catalysées par la GS et la GOGAT (chez *AS1*). Par des méthodes de génie génétique, le gène de la GDH a été isolé chez *Escherichia coli* et introduit dans un plasmide. Un mutant de *Escherichia coli*, déficient en GDH, est transformé avec le plasmide recombinant. Les cellules transformées sont reconnaissables à leur capacité d'utiliser les ions ammonium comme source d'azote. Les plasmides recombinants sont réisolés et introduits dans un mutant de l'*AS1* déficient en GOGAT. Les cellules *AS1* transformées synthétisent la GDH et ont ainsi une croissance plus efficace.



pour cela, on transfère généralement un gène codant pour le produit recherché dans un micro-organisme hôte et on cultive ensuite de grandes quantités du micro-organisme pour obtenir le produit. (Jusqu'à présent, l'hôte a été presque exclusivement la bactérie *Escherichia coli*, le cheval de bataille de la biologie moléculaire, pour lequel on possède de nombreux vecteurs plasmidi-

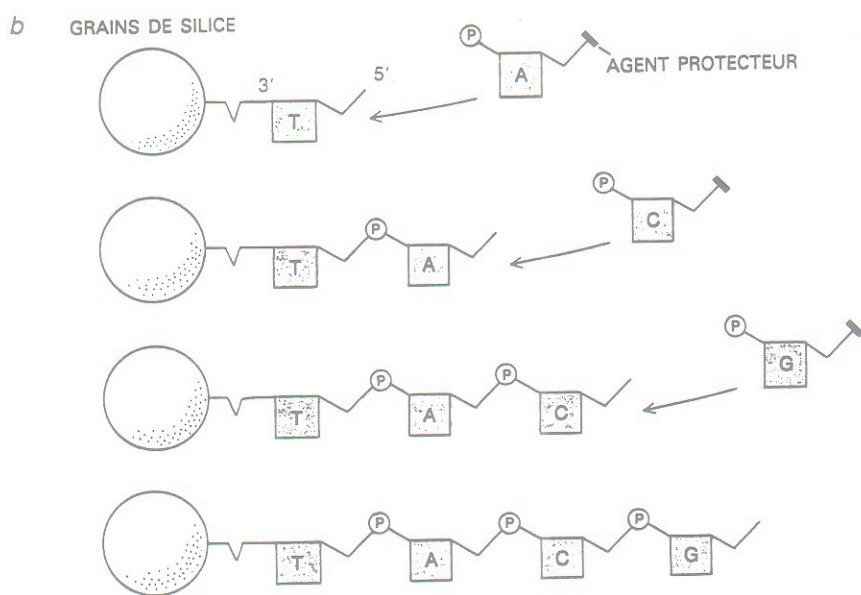
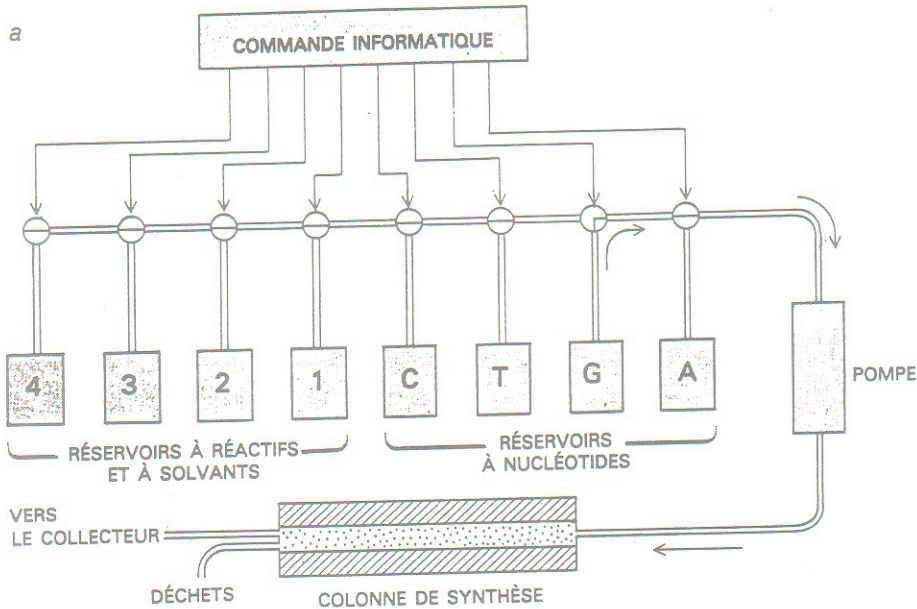
ques efficaces et bien caractérisés. Il pourra cependant se révéler un jour plus avantageux d'utiliser d'autres hôtes mieux adaptés à la culture en gros fermenteurs de type industriel.) Un objectif relativement différent, mais utilisant néanmoins les plasmides, est d'améliorer une souche industrielle existante. Plutôt que d'introduire un caractère génétique entièrement nouveau, on

peut augmenter l'efficacité d'une souche connue en modifiant son patrimoine génétique. En définitive, les techniques de recombinaison génétique permettront peut-être d'améliorer les procédés classiques en créant des mutations sur des sites spécifiques de gènes déterminés, ce qui éliminerait le caractère aléatoire de la mutagenèse habituelle.

### Le clonage sélectif et l'élaboration des souches

Nous décrivons les méthodes utilisées en génie génétique en donnant un exemple de leur application à la production d'une protéine donnée. Le travail réalisé ces dernières années dans les laboratoires du monde entier a rendu relativement facile le découpage de molécules géantes d'ADN, comme celles des chromosomes, en un certain nombre de fragments plus courts, et ceci à l'aide d'enzymes particulières, les endonucléases de restriction. Ces enzymes de restriction coupent l'ADN en des sites déterminés correspondant à des séquences de base spécifiques. Certaines de ces enzymes engendrent des fragments d'ADN à extrémités complémentaires « collantes ». Les fragments qui contiennent le gène à transférer sont insérés dans un vecteur plasmidique (ou un bactériophage) préalablement ouvert par la même enzyme et ayant donc des extrémités correspondant à celles des fragments de l'ADN découpé. Les plasmides recombinants sont introduits dans *Escherichia coli* par le processus de transformation précédemment décrit. Les clones bactériens (colonies provenant de la multiplication végétative d'une seule cellule), qui hébergent le plasmide, sont sélectionnés en fonction de leur capacité à croître en présence d'un antibiotique, cette résistance leur étant conférée par un gène du plasmide. La présence, dans les recombinants, du fragment étranger recherché est généralement vérifiée par des tests indirects de dosage de la protéine intéressante pour laquelle il code. Des clones de milliards de bactéries sélectionnées sont ainsi obtenus, chaque bactérie abritant une copie du gène étranger.

Il est en principe possible, encore que laborieux en pratique, de cloner pratiquement n'importe quel gène, par exemple le gène naturel humain codant pour l'insuline : pour ce faire, on clone de l'ADN humain au hasard, c'est-à-dire qu'on insère un mélange de fragments de toutes tailles d'un échantillon complet d'ADN humain dans des plasmides ; vient ensuite la recherche (laborieuse) de la bactérie correctement transformée parmi un million de clones environ ! Les cellules ne se comporteront toutefois pas comme des usines d'insuline, parce que les bactéries ne peuvent pas exprimer des gènes euca-



15. LES « MACHINES À SYNTHÉTISER LES GÈNES » dont il existe plusieurs types, synthétisent de courtes séquences d'un brin d'ADN automatiquement et rapidement. Elles sont commandées par un microprocesseur. La version construite par *Bio Logical's*, une société canadienne, est représentée en a. On commande la séquence de bases désirée en appuyant sur les touches d'un clavier. Le microprocesseur commande l'ouverture de soupapes qui permettent chacune l'envoi des nucléotides, des réactifs et des solvants nécessaires à la synthèse dans la colonne de synthèse. Cette colonne est pleine de grains de silice (d'une granulométrie à peu près identique à celle du sable). Chaque grain constitue le substrat où les molécules d'ADN sont assemblées. Pour constituer une séquence donnée (ici au T ou thymine), on fixe d'abord plusieurs milliers d'exemplaires du nucléoside (base plus sucre) sur chaque grain, le nucléoside étant à la terminaison 3' de la séquence (ici au T ou thymine). Le microprocesseur commande l'envoi de millions d'exemplaires du nouveau nucléotide (A ou adénosine) dont l'extrémité 5' est protégée contre les réactions parasites : A se fixe sur T. On enlève ensuite l'agent protecteur et on fixe C, puis G, etc. ; on a ainsi synthétisé des chaînes de 40 nucléotides, un nucléotide toutes les demi-heures. Les chaînes terminées sont séparées des grains de silice et envoyées dans un collecteur.



ryotes contenant des introns : ceux-ci doivent être éliminés pour donner un gène artificiel non fragmenté qui, seul, peut s'exprimer.

Une autre approche consiste à extraire l'ARN messager des cellules du pancréas qui fabriquent l'insuline. Ces cellules sont riches en ARN messager mature de l'insuline, où les introns ont déjà été excisés. A l'aide d'une enzyme, la transcriptase inverse, on fabrique une copie d'ADN artificielle portant, de façon ininterrompue (c'est-à-dire sans introns), l'information génétique de l'insuline; cette copie peut alors être clonée. Une autre approche possible (à condition que la séquence en acides aminés de la protéine soit connue, comme c'est le cas pour l'insuline humaine) consiste à synthétiser un gène artificiel, en respectant les règles du code génétique, à partir des nucléotides appropriés; ceci a été réalisé pour quelques petites protéines. L'apparition des « machines à synthétiser les gènes », c'est-à-dire des machines capables de synthétiser automatiquement des nucléotides déterminés devrait rendre cette méthode plus accessible dans l'avenir.

Un gène sous forme de copie d'ADN ou résultant d'une synthèse artificielle ne contient ni le promoteur ni les signaux de régulation nécessaires à son expression dans une bactérie. Il est donc nécessaire d'introduire ce gène dans le vecteur en un point où l'insertion des signaux de régulation bactériens est de nature à entraîner son expression. Le problème n'est pas totalement résolu pour autant. Les bactéries dégradent fréquemment les protéines étrangères et il faut modifier la cellule hôte pour l'empêcher de détruire la nouvelle production; une possibilité consiste à sélectionner un hôte muté ayant perdu les enzymes responsables de la dégradation des protéines. L'hôte doit aussi être sélectionné ou modifié pour avoir une bonne croissance, en dépit de l'accumulation ou de la sécrétion de quantités importantes d'une protéine dont il n'a que faire. La production industrielle de protéines d'intérêt thérapeutique comme l'insuline humaine, l'hormone de croissance ou d'agents antiviraux comme les interférons, a un tel intérêt commercial que ces divers obstacles seront vraisemblablement surmontés dans un avenir très proche.

Il se pourrait même qu'on puisse un jour programmer des micro-organismes pour fabriquer des protéines qui n'existent pas dans la nature. La réussite récente du clonage sous forme de copie d'ADN (cADN) des gènes codant pour les interférons humains nous a révélé, à la surprise générale, qu'il existe un grand nombre d'interférons, différant non seulement par leurs séquences en acides aminés mais aussi par leurs propriétés. On pourrait ajouter à la famille des interférons des membres tout

à fait nouveaux par un équivalent artificiel de la recombinaison homologue : la réunion des parties provenant de deux gènes isolés à partir de deux clones de *Escherichia coli* codant pour deux interférons naturels différents. Le gène hybride pourrait ensuite être ré-inséré dans la bactérie hôte. On pourra peut-être par cette voie, synthétiser une profusion de nouvelles molécules dont il restera à tester la valeur thérapeutique. Plus tard, lorsqu'on en saura plus sur les rapports entre structure et fonction chez les protéines, on réussira probablement à créer des protéines totalement nouvelles et à les fabriquer en synthétisant et en clonant des gènes artificiels.

L'amélioration génétique d'une souche existante est tout à fait appropriée au cas de substances, comme les antibiotiques et les alcaloïdes, qui ne sont pas directement codées par des gènes mais synthétisées par des voies métaboliques contrôlées par des protéines, elles-mêmes codées par des gènes. Plutôt que de poursuivre la tâche rebutante qui consiste à transplanter l'ensemble des gènes nécessaires à une synthèse de ce type dans un hôte totalement étranger et *a priori* inapte à les exprimer, on peut se contenter de modifier l'information génétique d'une souche préexistante. On peut par exemple éliminer une étape limitante (un « goulot d'étranglement ») du métabolisme par duplication d'un gène ou encore fournir à un micro-organisme une nouvelle enzyme capable de transformer un métabolite naturel en un produit intéressant. On met au point actuellement des systèmes de clonage dans ce but.

Une souche de la bactérie *Methylophilus methylotrophus* appelée AS1 constitue un excellent exemple d'une reprogrammation par le génie génétique pour améliorer un micro-organisme industriel préalablement assez bon. Les cellules sont cultivées dans des fermenteurs géants, centrifugées et séchées pour être utilisées comme complément protéique dans l'alimentation animale. AS1 utilise le méthanol (CH<sub>3</sub>OH) comme source de carbone et les ions ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) comme source d'azote. L'introduction des acides aminés dans les protéines par l'intermédiaire de l'acide glutamique, débute par deux réactions catalysées par la glutamine synthétase (GS) et la glutamate synthétase (GOGAT). Cette voie gaspille de l'énergie, dans la mesure où l'étape catalysée par la GS dépend du transporteur cellulaire d'énergie qu'est l'adénosine triphosphate (ATP). Dans d'autres bactéries, dont *Escherichia coli*, il existe une autre voie contrôlée par une enzyme différente, la glutamate déshydrogénase (GDH), laquelle conduit aussi à l'acide glutamique mais requiert moins d'énergie.

On a élaboré un dérivé d'AS1 moins gourmand en énergie. Pour cela, on isole d'abord un mutant auxotrophe d'AS1 dépourvu de GOGAT et qui ne

peut incorporer les groupements aminés dans les protéines. Dans un deuxième temps, le gène de *Escherichia coli* codant pour la GDH a été cloné par intégration, après coupure du fragment correspondant d'ADN chromosomal de *Escherichia coli*, dans un plasmide et introduction de ce dernier dans une souche de *Escherichia coli* manquant de GDH. Le clone correspondant est identifié par une propriété fondamentale que lui confère le plasmide : il peut utiliser les ions ammonium. Ce plasmide a été choisi parce qu'il est transférable (par conjugaison ou par transformation) à des bactéries appartenant à de nombreuses espèces dont AS1. Ainsi, dans un dernier temps, la GDH clonée a été introduite dans la AS1 auxotrophe déficiente en GOGAT. La souche résultante, chez laquelle la GOGAT est remplacée par la GDH, croît en utilisant moins d'énergie. Lorsqu'on produit des milliers de tonnes d'une denrée, une augmentation même minime du rendement énergétique est bienvenu.

La mutagenèse dirigée est une application particulièrement excitante du génie génétique. Le caractère aléatoire de la mutagenèse spontanée ou induite complique la sélection de mutants. Le problème n'est pas critique lorsque l'on recherche un mutant auxotrophe dépourvu d'une enzyme spécifique, dans la mesure où la cible de la mutagenèse est assez étendue. Un changement de n'importe laquelle des centaines de paires de bases d'un gène est de nature à l'inactiver. Il est cependant beaucoup plus difficile de modifier une partie déterminée d'un gène dans l'espoir de le rendre plus performant, par exemple en changeant une paire de bases définie dans le promoteur pour augmenter le taux de transcription. Maintenant que l'on sait isoler un gène à partir d'un clone, sa séquence en ADN peut être modifiée par un traitement chimique sélectif, et cela hors de la cellule; puis on peut réintroduire le gène dans l'hôte et s'en remettre à la recombinaison homologue pour remplacer le gène normal par le nouveau.

La génétique microbienne industrielle est aujourd'hui une technique parvenue à maturité. De nombreuses techniques de programmation génétique n'auraient pu être envisagées il y a seulement quelques années. Au nombre de celles-ci, la mutagenèse dirigée aide à éliminer le hasard intrinsèquement lié aux procédures fondées sur l'isolement de mutants, la fusion des protoplastes accroît le pouvoir de la recombinaison naturelle et un assortiment de techniques du génie génétique permet la transplantation de gènes naturels ou même la fabrication de nouveaux gènes. L'application judicieuse de ces techniques, indépendamment ou en combinaison, devrait nous permettre de comprendre l'extraordinaire faculté d'adaptation biochimique des micro-organismes, de l'augmenter et de la canaliser.



---

Professeur J. VILLARD

**U. V. OPTIONNELLE : BIOTECHNOLOGIES**

3 ème et 4 ème Années

Examen du 20 Juin 1994

Durée 1h  
noté sur 20

**Sujet: traiter obligatoirement les deux questions suivantes:**

1) **Biotechnologies:** (14 points)

- Définition (s)
- Différentes catégories de cellules et/ou fractions cellulaires mises en œuvre
- Donner un exemple concis d'application pour chaque catégorie de cellules

2) **Citer 5 molécules d'origine fongique, issues des biotechnologies, et possédant une activité pharmacologique.** (6 points)

- Utilisation(s)
- Noms des espèces impliquées