

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique

Université Frères MENTOURI - Constantine 1
Faculté des sciences de la nature et de la vie

Cours de Méthodologies de Biologie Moléculaire

L3
Biotechnologie
et Génomique
Végétale

Dr. KACEM Nadia Sandra

kacem.nadia@umc.edu.dz

Préambule

Par définition, la biologie moléculaire est l'étude de la biologie à l'échelon de la molécule. Sous cette dénomination sont regroupées les techniques et les découvertes qui ont permis l'analyse moléculaire des processus les plus intimes du vivant, de ceux qui en assurent la pérennité et la reproduction.

En termes de discipline, la biologie moléculaire est le fruit de la rencontre entre deux branches de la biologie développées au début du XX^e siècle, la génétique et la biochimie. La biologie moléculaire naît et se développe quand la question de la nature des gènes et de leur mécanisme d'action commence à se poser à certains généticiens et lorsque les biochimistes cherchent à comprendre comment les protéines et les enzymes sont fabriqués dans les cellules et quelle est l'intervention des gènes dans ce processus.

Les techniques de base de la biologie moléculaire consistent le plus souvent à tirer parti des caractéristiques propres du matériel biologique sur lequel on travaille (comme les propriétés physico-chimiques de l'ADN) et à exploiter des organismes, surtout des microorganismes, du monde vivant.

Ce polycopié, destiné aux étudiants L3 de Biotechnologie et Génomique Végétale, vise à leur faire acquérir les techniques de base en biologie moléculaire les plus couramment utilisées en biologie moléculaire ainsi que les méthodologies d'analyses, d'identification, d'évaluation et de recherche de gènes d'intérêt.

C'est dans cet esprit et avec cet objectif que ce polycopié est construit. Il est divisé en deux grandes parties : la première concerne les techniques moléculaires de base, permettant aux étudiants de mieux comprendre la structure, l'organisation et la fonction des gènes à travers différentes approches de génie génétique. Tandis que la seconde partie présente l'ensemble des techniques biochimiques de manipulation d'acides nucléiques et de protéine (transfert sur membrane et marquage, production d'anticorps, protéomique, transfert de gènes etc ...). L'accent est mis sur la diversité des techniques pouvant être mises en œuvre et sur la vitesse d'évolution de ces techniques.

Figure 1 : Mutagenèse par délétion, addition, ou par changement de cassette	2
Figure 2 : Mutagenèse dirigée en un site précis	4
Figure3 : Amorce oligonucléotidique mutée.	5
Figure 4 : Mutagenèse par PCR	7
Figure 5 : Vue d'ensemble du clonage d'un gène	11
Figure 6 : Principe de la technologie des puces à ADN.	26
Figure7 : Séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle (2D)	35
Figure 8 : Principaux éléments d'une spectrométrie de masse	38
Figure 9 : Structure d'un anticorps	41
Figure 10 : Principales étapes de la technique western blot	47
Figure 11 : ELISA indirecte	51
Figure 12 : ELISA directe	52
Figure 13 : Double Anticorps Sandwich ELISA direct	53
Figure 14 : ELISA compétitif direct, dosage d'antigènes	54
Figure 15 : ELISA compétitif direct, dosage d'anticorps	54
Figure 16 : Principe de la technique de transfert-hybridation de Southern	57
Figure 17 : La technique de Northern blot	59
Figure 18 : transfert de gènes par l'intermédiaire de liposomes	62
Figure 19 : Diagramme d'une cellule exposée à un champ électrique E	63
Figure 20 : Schéma du canon à particules par charge explosive	64
Figure 21 : Dispositif permettant la micro-injection d'ADN dans des protoplastes végétaux	66
Figure 22 : Carte génétique du plasmide Ti	68
Figure23 : Chronologie de l'infection de la cellule par <i>A. tumefaciens</i> et transfert de l'information génétique	72

Tableau 1 : Différents type de vecteurs de clonage et leurs inserts (kb)	9
Tableau 2: Récapitulatif des principaux avantages et inconvénients du système d'expression <i>E. coli</i>	13
Tableau 3 : Principaux avantages et inconvénients des levures comme système d'expression.	14
Tableau 4 : Principaux avantages et inconvénients du système d'expression Baculovirus / cellules d'insecte	16
Tableau 5 : Principaux avantages et inconvénients des cellules de mammifère	17
Tableau 6 : Principaux avantages et inconvénients des plantes transgéniques comme système d'expression	18
Tableau 7 : Principaux avantages et inconvénients des animaux transgéniques comme système d'expression.	19
Tableau 8 : Exemples des protéines recombinantes produites par différents hottes	20
Tableau 9 : Comparaison des principales caractéristiques des anticorps polyclonaux et des anticorps monoclonaux.	44

Première Partie : Techniques Moléculaires

I-LA MUTAGENESE DIRIGEE	1
1- Principe	1
2-La mutagenèse aléatoire	1
3-La mutagenèse dirigée	3
3-1 Mutagenèse par « cassette »	3
3-2 Méthode d'oligonucléotide synthétique	3
3-3 La mutagenèse par PCR	5
3-3-1 Notion d'amorce mutée	5
3-3-2 Mutations à l'intérieur d'un segment d'AND	5
II-PRODUCTION DE PROTEINES RECOMBINANTES	8
1-Principe	8
2-Intérêt de produire une protéine recombinante	8
3- Etapes de production d'une protéine recombinante.	8
3-1 Création d'une lignée de cellules productrice de la protéine désirée.	8
3.1.1 Préparation de l'ADN recombiné	9
3.1.2 Vecteur d'expression	9
3.1.3 Introduction du vecteur dans la cellule hôte	10
3.1.4 Sélection des cellules hôtes recombinantes	10
3.1.4.1 Première méthode de sélection	10
3.1.4.2 Deuxième méthode de sélection	11
3-2 Choix d'un système d'expression des protéines recombinantes	12
3-2-1 Critères de choix	12
3-2-2 Bactéries :	12
3-2-1-1 Espèces utilisées	12
3-2-2-2 Avantages et inconvénients de ce système	12
3-2-3 Levures et champignons filamenteux:	13
3-2-3-1 Espèces utilisées	13
3-2-3-2 Avantages et inconvénients de ces systèmes	13
3-2-4 Baculovirus en cellules d'insectes	13
3-2-4-1 Lignées utilisées	15
3-2-4-2 Avantages et inconvénients de ce système	15
3-2-5 Cellules de mammifères :	16
3-2-5-1 Lignées utilisées	16
3-2-5-2 Avantages et inconvénients de ce système	16
3-2-6 Plantes transgéniques :	17
3-2-6-1 Espèces utilisées	17
3-2-6-2 Avantages et inconvénients de ce système	17
3-2-7 Animaux transgéniques :	18
3-2-7-1 Espèces animales utilisées	18
3-2-7-2 Avantages et inconvénients de ce système	19
3-3 Optimisation du rendement	20
3-4 Purification de la protéine	20
3-5 Production	21
III-PUCES A AND	22
1-Principe des puces à ADN	22

2-Préparation d'une puce à ADN	22
2-1 Préparation des sondes :	22
2-2 L'hybridation	22
2-3 Lecture de la puce	23
3-Applications des puces à ADN	24
4- Différents types de puces à ADN haute densité	26

Deuxième partie : Techniques Biochimiques

I-PURIFICATION DES PROTEINES	28
1. Propriétés des protéines et applications	28
2. Origine du matériel	28
3. Etape préalable à la purification des protéines recombinantes : clarification	29
3.1. Lyse physique : sonication	29
3.2. Lyse mécanique : homogénéisateurs	29
3.3. Lyse enzymatique : lysozyme	29
3.4. Lyse thermique : cycles congélation-décongélation	30
4. Purification des protéines recombinantes	30
4.1 Chromatographie échange d'ions	30
4.2 Chromatographie d'affinité	30
4.3 Chromatographie d'exclusion stérique	31
4.4 Elimination des endotoxines	31
5. Caractérisation des protéines recombinantes	31
5.1. Méthodes qualitatives	31
5.2 Méthodes quantitatives	32
6. Conservation de la protéine recombinante	32
II-LA PROTEOMIQUE	33
1-Définition du protéome :	33
2-Principe de la protéomique :	33
3-Objectifs et applications de la protéomique	33
4-Approches de la protéomique	34
4-1 La protéomique descriptive:	34
4-2 La protéomique différentielle:	34
4-3 La protéomique fonctionnelle:	34
4-4 La protéomique structurale	34
5-Principales étapes de la protéomique :	34
5-1 Extraction protéique	34
5-2 Séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle (2D)	35
5-3 Visualisation des protéines	37
5-4 Analyse des gels	38
6. Identification des protéines :	38
6.1 Principe de la spectrométrie de masse	38
6.2 Spectrométrie de masse et recherche dans les banques de données	39
7. Analyse des données	40
III-PRODUCTION D'ANTICORPS	41
1-Définition d'un anticorps	41

2-Caractéristiques structurales des anticorps.	41
3-Production d'anticorps monoclonaux	41
3-1-Les applications des anticorps monoclonaux	43
4- Production d'anticorps polyclonaux	43
4-1-Exemples d'applications des anticorps polyclonaux	44
5- Différence entre anticorps monoclonaux et polyclonaux	44
IV-ANALYSES PROTEIQUES	45
1-La technique Western blot	45
1-1-Principe de la technique Western blot	45
1-2-Etapes de la technique	45
1-3- Avantage et inconvénient de la technique	45
2- Le test ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)	50
2-1-Principe générale de la technique ELISA	50
2-2-Avantages et inconvénients de la technique ELISA	50
2-3-Le test ELISA indirect	50
2-4-Le test ELISA direct	52
2-5-Le DAS ELISA direct ou <i>Double Antibody Sandwich</i> ELISA direct	52
2-6-ELISA compétitif direct	53
2-6-1 Dosage d'antigènes	53
2-6-2 Dosages d'anticorps	54
V-TECHNIQUES D'HYBRIDATION DES ACIDES NUCLEIQUES	55
1- La technique Southern blot	55
1-1- Principe du test Southern blot	55
1-2-Intérêt de la technique Southern blot	55
1-3-Etape de la technique Southern blot	55
2- Le test Northern blot	58
VI-METHODES D'INTRODUCTION DE L'AND DANS LES CELLULES (LA TRANSFECTIONS)	60
1. Définition	60
2. Méthodes de transfert directe de gène	60
2.1 Transfection par le PEG	60
2.2 Transfection par phosphate de calcium	60
2.3 Transfection par le DEAE-Dextran	61
2.4 Technique des liposomes	61
2.5 L'électroporation	63
2.6 Biolistique ou canon à ADN	63
2.7 Agrobiolistique	65
2.8 La micro-injection	65
3. Transfert indirect de gène par <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	66
3-1 La bactérie	66
3-2 Structure du génome d' <i>A. tumefaciens</i> C58	66
3-3 Le plasmid Ti	67
3-4 Processus d'infection d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	68
3-4-1 Reconnaissance bactérie/cellules végétales blessées	68
3-4-1-1 Fixation aux cellules hôtes	68
3-4-1-2 Activation des gènes vir	69
3-4-2 Transfert T-DNA	70

Table des matières

3-4-2-1 Production du brin T	70
3-4-2-2 Translocation du brin T dans la cellule végétale	70
3-4-2-3 Intégration dans le génome de l'hôte	71
a- Importation du complexe T dans le noyau	71
b- Intégration de l'ADN-T dans le génome végétal	72
Références bibliographiques	73

I- LA MUTAGENÈSE DIRIGÉE

1- Principe de la mutagenèse

C'est l'introduction volontaire d'un changement dans la séquence nucléotidique d'un gène, autrement dit d'une mutation. C'est une technique très puissante puisqu'elle offre la possibilité d'agir sur la relation entre la séquence d'un gène et la fonction de la protéine qu'il code. La mutagenèse peut être **aléatoire** ou **dirigée**. Le schéma général de l'opération comporte :

- une étape de modification de la séquence,
- une étape de transformation,
- une étape de sélection de cellules mutantes.

2-La mutagenèse aléatoire

Engendre des mutations en des mutations en des endroits non déterminés d'un gène. L'une des méthodes consiste à produire une petite délétion en éliminant le fragment libéré par coupure de l'ADN au niveau des deux sites de restriction (**Figure 1**). De même au niveau d'un site de restriction unique se situant dans la région du gène à muter, une petite délétion de quelques nucléotides s'avère possible à l'aide d'une nucléase (cas valable quand une enzyme de restriction génère des extrémités cohésives).

Une mutation par addition peut être également réalisée en provoquant la synthèse des séquences complémentaires des extrémités monobrins.

La mutagenèse aléatoire produit des mutants qui comptent plusieurs modifications comparativement à la séquence de départ. Il devient alors difficile d'associer le phénotype muté à telle ou telle mutation. Cette technique reste tout de même utile pour réaliser une première approche sur la relation entre la séquence d'une protéine, codée par le gène, et sa fonction biologique.

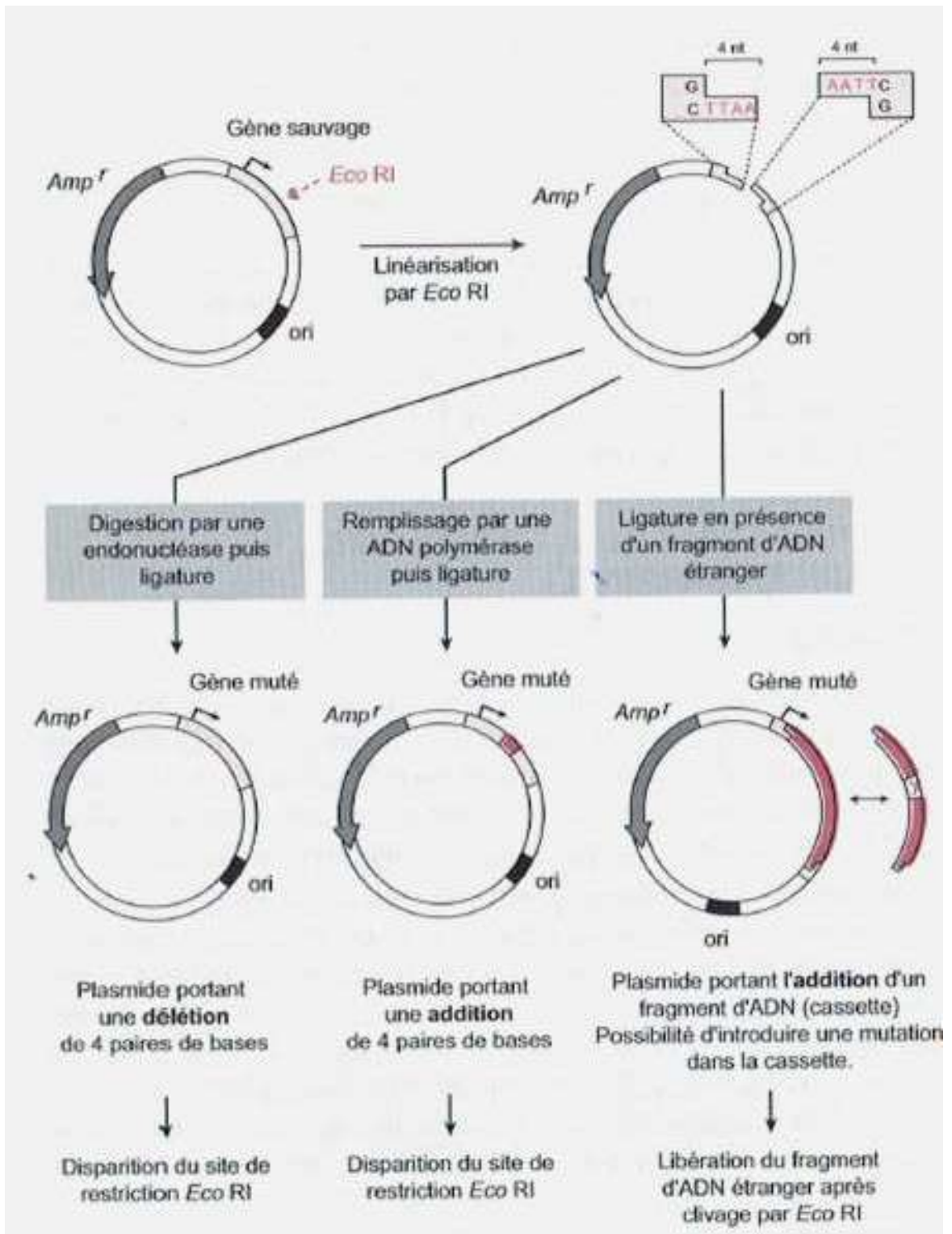


Figure 1 : Mutagenèse par délétion, addition, ou par changement de cassette (Maftah et al. 2007)

a- La mutagenèse chimique

Historiquement, la mutagenèse aléatoire était réalisée au moyen de procédés chimiques altérant la structure de l'ADN. Cette méthode implique l'utilisation d'agents chimiques tels que :

- **L'Ethylméthane sulfonate (EMS)** qui agit sur les bases guanines ce qui induit des erreurs lors de la réplication de l'ADN.
- **L'acide nitrique (HNO₂)** qui agit en désaminant les adénines et les cytosines causant une mutation ponctuelle par transversion (A/T en G/C).
- **Le bisulfite de sodium** qui agit spécifiquement sur la cytosine d'une région d'ADN simple brin. Il a été utilisé par l'équipe d'Ermakova-Gerdes pour muter aléatoirement et in vitro le gène psbDI.

3-La mutagenèse dirigée

Cette méthode porte sur un endroit très précis de l'ADN (un nucléotide par exemple). Elle permet de modifier d'une manière prédéterminée la séquence d'un gène.

3-1 Mutagenèse par « cassette »

Quand la région à muter porte des sites de restriction uniques, il est possible d'enlever un fragment d'ADN du gène sauvage et de le remplacer par un autre fragment constitué d'oligonucléotides mutés. Ce processus est appelé **mutagenèse par « cassette »** (Figure 1).

3-2 Méthode d'oligonucléotide synthétique

Le gène que l'on veut étudier est cloné dans un vecteur. On a déjà des indications sur sa fonction et on désire en acquérir de nouvelles sur une région particulière du gène.

On choisit le nucléotide que l'on veut changer, et on prépare un oligonucléotide qui contient la séquence environnante du gène autour de ce nucléotide. D'un autre côté on prépare le plasmide recombiné avec le gène et on le dénature par la chaleur. Les deux sont séparés par électrophorèse.

On met en présence l'oligonucléotide et le brin plasmidique qui contient la séquence complémentaire correspondante. On renature les deux ADN et on incube en présence d'ADN polymérase et de ligase. L'oligonucléotide va être allongé en recopiant le brin complet. Le plasmide obtenu est double brin avec un mésappariement à l'endroit de la mutation. On transforme une culture bactérienne qui va multiplier ce plasmide.

Deux types seront produits en quantité théoriquement égale par duplication de chaque brin. On obtiendra donc un plasmide contenant le gène sauvage et un plasmide contenant le gène muté (Figure 2).

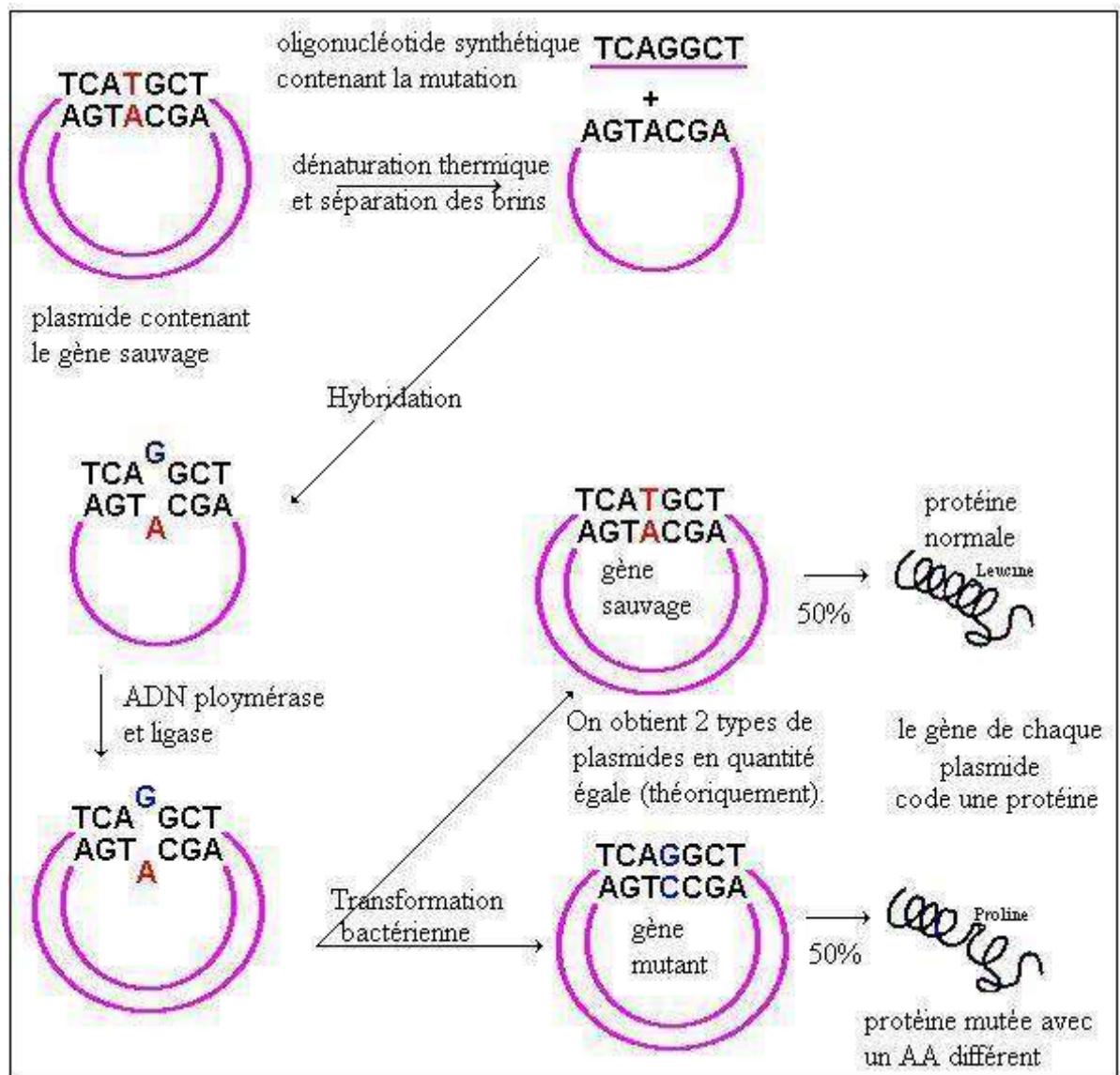


Figure 2. Mutagenèse dirigée en un site précis (Delarue 2007).

Pour distinguer ces deux types on dispose de plusieurs moyens

- la mutation a pu modifier un site de restriction ce qui permet de discriminer les 2 types
- le séquençage de la région que l'on voulait muter donne dans tous les cas la réponse
- certaines protéines sont exprimées par les bactéries, dans ce cas on peut repérer la forme du gène par l'activité de la protéine qu'il code.
- L'oligonucléotide synthétique peut également être utilisé comme sonde marquée pour distinguer des phages de type sauvage des phages mutants.

3-3 La mutagenèse par PCR

L'introduction d'une mutation par PCR permet de créer 100 % de mutants. Le principe de toute mutation introduite par PCR repose sur le fait qu'une stricte complémentarité de l'amorce nucléotidique avec la séquence de l'ADN cible n'est pas absolument nécessaire sur toute la longueur considérée.

3-3-1 Notion d'amorce mutée

Schématiquement, une amorce mutée peut-être divisée en deux parties (**Figure 3**) :

- **L'extrémité 3'** qui doit rester complémentaire de la séquence de matrice à amplifier (initiation de la polymérisation)
- **L'extrémité 5'** qui peut porter des mutations ponctuelles, des sites de restriction, des séquences de recombinaison



Figure 3 : Amorce oligonucléotidique mutée.

3-3-2 Mutations à l'intérieur d'un segment d'AND

Les amorces **1** et **2** sont des amorces mutées. Elles ont, en plus, la particularité d'être complémentaires (le recouvrement des régions 5' mutées est particulièrement important pour la suite).

Les amorces **3** et **4** bornent le segment d'ADN à modifier. Elles déterminent sa longueur du produit final. (Il est assez classique d'effectuer la mutation sur un segment d'ADN intégré dans un plasmide. Dans ce cas, les amorces **3** et **4** peuvent être construites en fonction du plasmide choisi). Deux réactions de PCR sont d'abord réalisées en parallèle :

- Une PCR avec les amorces **2** et **3** donne un produit d'amplification correctement muté dans la région désirée mais de taille insuffisante.
- Une PCR avec les amorces **1** et **4** donne un produit, lui aussi

correctement muté, mais toujours de taille insuffisante.

Les deux produits de PCR ainsi obtenus sont alors purifiés (il s'agit surtout d'éliminer les amorces 1 et 2), et réunis dans un même tube.

L'hybridation des deux fragments par la partie commune est importante pour la dernière étape.

Une dernière PCR utilisant les amorces **3** et **4** est alors réalisée sur ce mélange et donne, en effet, un fragment de taille souhaitée (**Figure 4**).

A la fin de la réaction PCR, les mutations sont introduites dans les produits et peuvent être de trois types :

- 1) Des **substitutions** : un ou plusieurs nucléotides sont remplacés par un même nombre de nucléotides différents.
- 2) Des **insertions** : un ou plusieurs nucléotides sont ajoutés à la séquence cible.
- 3) Des **délétions** : un ou plusieurs nucléotides sont enlevés de la séquence.

L'un des inconvénients de la technique de mutagenèse par PCR, ce sont les erreurs de lecture de la *Taq* polymérase. Ce problème est aisément surmonté puisque l'on travaille en utilisant un nombre réduit de cycles (< 30) et que de nouvelles générations de polymérase thermorésistantes sont disponibles telles que la *Vent*, la *Pfu* et la *Pwo*, qui ont cette activité correctrice et donne des produits plus fidèles à la matrice

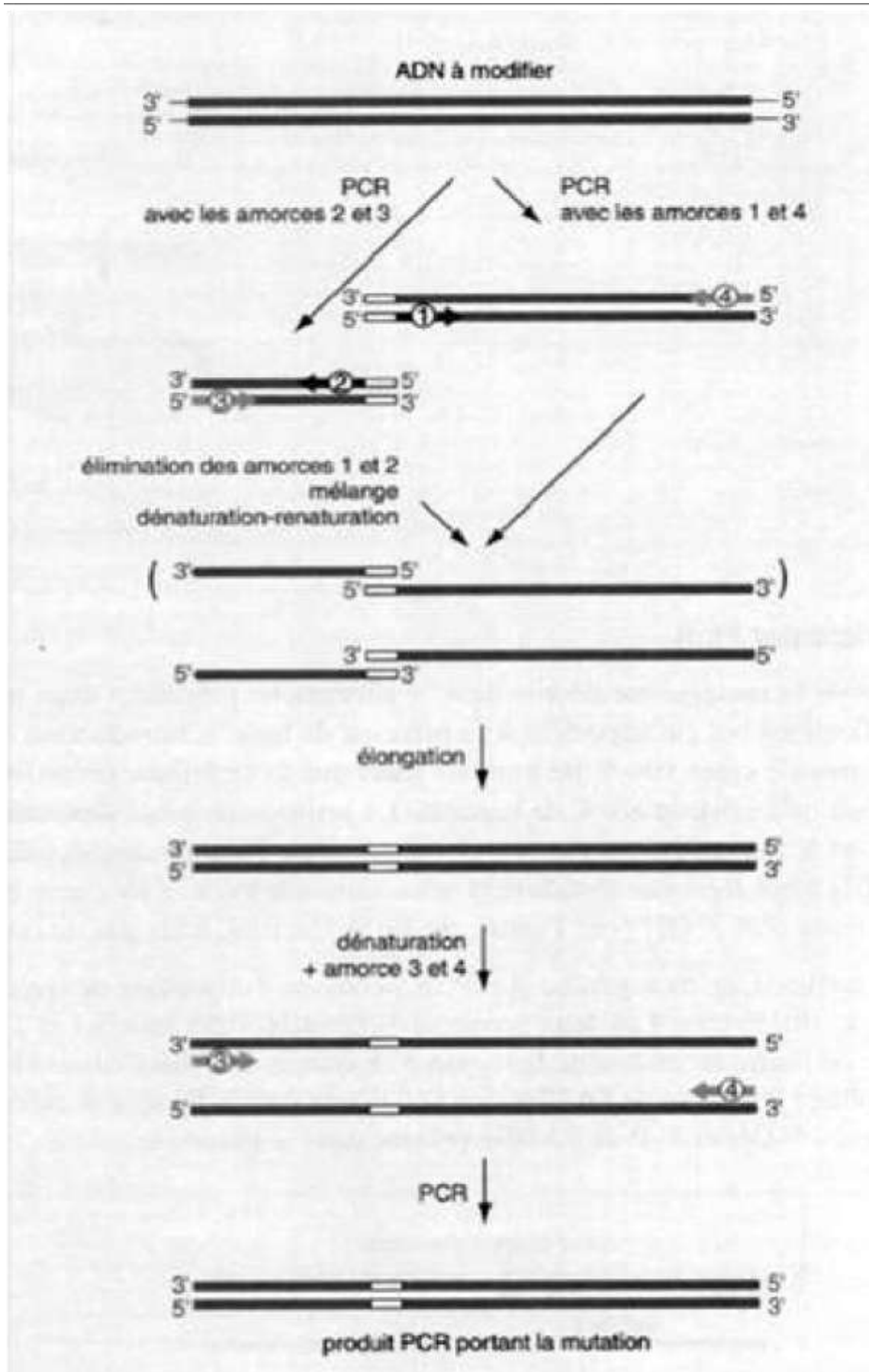


Figure 4 : Mutagenèse par PCR (Tagu et Moussar 2003)

II- PRODUCTION DE PROTEINES RECOMBINANTES

1-Principe

Avec les nouvelles biotechnologies (biotechnologies modernes), basées sur le DNA recombiné, de nouvelles méthodes de production de protéines sont nées. Il s'agit de protéines recombinantes élaborées par des cellules dont le DNA a subi des modifications par recombinaison génétique.

2-Intérêt de produire une protéine recombinante

La technologie de l'ADN recombinant est un outil pour comprendre la structure, la fonction et la régulation des gènes et leurs produits. Les objectifs de cette technologie sont:

1. L'identification des gènes.
2. L'isolement des gènes.
3. La modification des gènes.
4. La réexpression des gènes dans d'autres systèmes.
5. La production d'une petite quantité de protéines d'intérêt scientifique comme les anticorps pour des applications expérimentales (ELISA, Western Blot...).
6. La production de protéines d'intérêt médical comme les anticorps, les vaccins ou les enzymes pour le traitement et parfois dans des cas d'un manque ou d'une déficience. Produire des anticorps pour le diagnostic.
7. La production d'une grande quantité de protéines d'intérêt économique et commercial.

3- Etapes de production d'une protéine recombinante.

Les protéines recombinantes sont produites à partir d'un transgène introduit dans un organisme hétérologue par génie génétique. Ce procédé biotechnologique se déroule suivant cinq grandes étapes :

3.1 Création d'une lignée de cellules productrice de la protéine désirée.

❖ Principe du clonage moléculaire

Le clonage moléculaire consiste à obtenir des copies identiques et très nombreuses d'un même fragment d'ADN. Il nécessite différents outils pour pouvoir être mené à bien :

- De l'ADN que l'on désire cloner;
- Un vecteur dans lequel on insère l'ADN ce qui donne de l'ADN recombiné;
- Une cellule hôte qui va recevoir ce vecteur;
- Un moyen de multiplier les cellules hôtes;
- La sélection des cellules hôtes ayant réellement intégré le vecteur avec l'ADN recombiné;
- L'isolement et la purification de l'ADN recombiné multiplié.

3.1.1 Préparation de l'ADN recombiné

Il s'agit d'un hybride d'ADN provenant de deux espèces différentes, l'un des fragments d'ADN (l'insert) étant inséré dans un autre (vecteur). Cette production se fait *in vitro*, alors que la réplication se fera *in vivo*.

Ce sont les enzymes de restriction qui vont permettre l'insertion. Elles vont cliver le vecteur et l'ADN insert en produisant des extrémités compatibles entre elles, notamment par la production d'extrémités cohésives.

Une ligase permettra ensuite de lier les deux ADN, ce qui produira au final l'ADN recombiné.

3.1.2 Vecteur d'expression

Doit être stable et en grand nombre de copies dans la cellule hôte, posséder un promoteur fort et inductible. Pour exprimer une protéine recombinante, un vecteur doit avoir un promoteur, une origine de réplication, une séquence codante, un marqueur de sélection, un site de liaison aux ribosomes et un signal de recombinaison (**Tableau1**).

Tableau 1. Différents type de vecteurs de clonage et leurs inserts (kb) (Bajpai 2013)

Vector	Host	Insert size
Plasmid	<i>E.coli</i>	5–25 kb
λ phage	<i>E.coli</i>	35–45 kb
P1 phage	<i>E.coli</i>	70–100 kb
PAC _S	<i>E.coli</i>	100–300kb
BAC _S	<i>E.coli</i>	<300 kb
YAC _S	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	200–2000kb
Human Artificial Chromosomes (HACs)	<i>Cultured Human Cells</i>	>2000kb

3.1.3 Introduction du vecteur dans la cellule hôte

Pour cette étape que l'on appelle transformation, on met une suspension de bactéries en présence du vecteur recombinant. Ces bactéries sont rendues compétentes, c'est-à-dire capable d'accepter le vecteur recombinant, par un traitement chimique qui perméabilise leur membrane.

Il existe évidemment d'autres techniques en fonction du couple vecteur recombinant-cellule hôte choisi.

3.1.4 Sélection des cellules hôtes recombinantes

Dans le cas des bactéries, faut savoir que sur une population de cellules hôtes, toutes n'auront pas intégré un vecteur. A ce stade, trois populations de cellules hôtes existent : celles qui n'ont pas été infectées par le vecteur, celles qui ont été infectées par un vecteur ne possédant pas d'ADN recombiné, et enfin celles qui ont été infectées par un vecteur possédant l'ADN recombiné ; seule cette dernière catégorie est intéressante pour le clonage.

Il est fondamental de disposer d'un système de sélection double capable de discriminer à la fois :

- Les bactéries transformées des bactéries non transformées
- les bactéries transformées par un vecteur recombinant ou non recombinant

Deux méthodes de sélection des bactéries : résistances aux antibiotiques ou le gène Lac Z.

3.1.4.1 Première méthode de sélection

La transformation d'une bactérie sensible à un antibiotique par des plasmides portant un gène de résistance au même antibiotique aboutit à l'apparition d'une résistance uniquement pour les bactéries ayant incorporé les plasmides. Cette première étape permet de séparer les bactéries avec plasmides et les bactéries sans plasmides. Les bactéries sans plasmide sont tuées.

La deuxième étape consiste à distinguer les bactéries avec plasmides intacts des bactéries avec plasmides recombinants. On utilise pour cela une résistance à un second antibiotique. L'insertion du fragment d'ADN dans le plasmide doit inactiver le gène de résistance au deuxième antibiotique. Les bactéries transformées par les plasmides recombinants sont donc résistantes au premier antibiotique et sensible au deuxième antibiotique. Les bactéries transformées par les plasmides recombinants meurent.

3.1.4.2 Deuxième méthode de sélection

La première étape est identique à la méthode de sélection 1. La deuxième étape consiste à utiliser un système enzymatique appartenant à l'opéron lactose à la place du second antibiotique. L'insertion du fragment d'ADN dans le plasmide aboutit à l'inactivation du gène qui code pour la β -galactosidase. Pour vérifier la présence ou l'absence de l'activité enzymatique β -galactosidase, on utilise un galactoside X-gal dont la couleur passe de l'incolore au bleu quand il est clivé par la β -galactosidase. Pour pouvoir métaboliser le X-gal, la cellule doit être exposée à un inducteur le IPTG. En présence d'IPTG et de X-gal, les bactéries transformées par les plasmides recombinants se présentent sous forme de colonies blanchâtres. Par contre, les bactéries non transformées par les plasmides recombinants se présentent sous forme de colonies bleues. La sélection visuelle des bactéries transformées par les plasmides recombinants est donc possible (Figure 5).

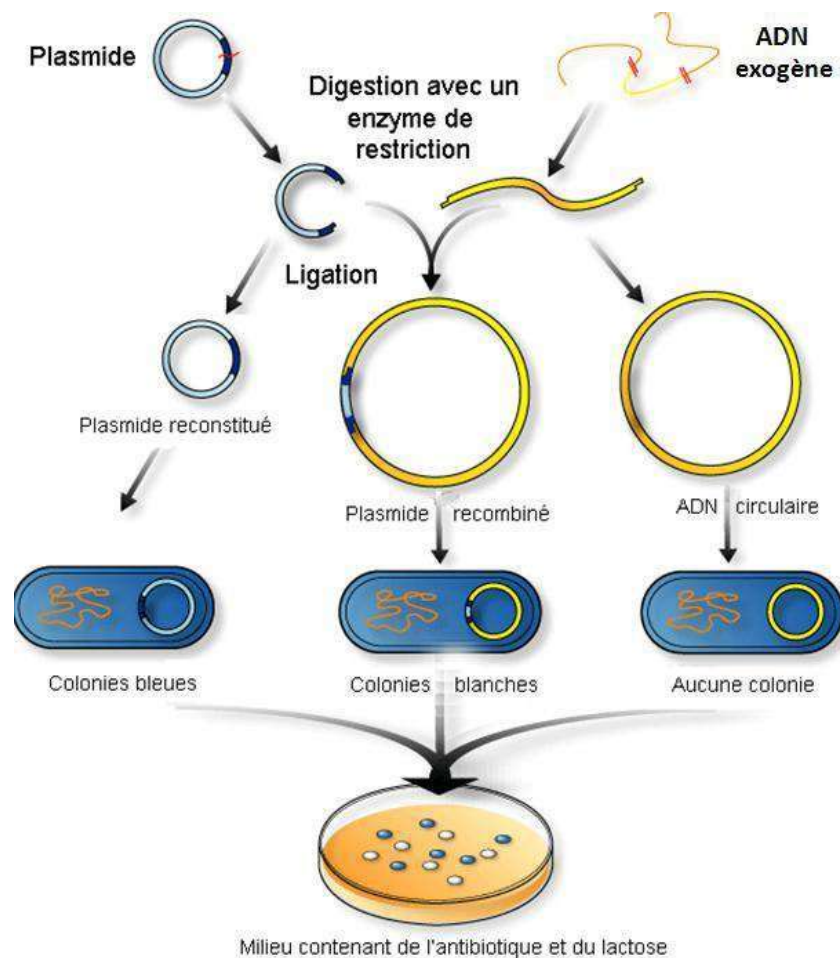


Figure 5. Vue d'ensemble du clonage d'un gène (Pronovost, 2013)

3.2. Choix d'un système d'expression des protéines recombinantes

3.2.1 Critères de choix

Les critères de choix d'une cellule ou d'un organisme hôte reposent notamment sur les propriétés de la protéine à produire, celles de l'hôte lui-même, sur le coût de production, sur la durée requise entre le clonage du gène et la caractérisation finale de la protéine d'intérêt, sur les contraintes réglementaires, etc.

3.2.2 Bactéries :

3.2.2.1 Espèces utilisées

Escherichia coli, bactérie Gram à négatif, est la principale bactérie utilisée en biotechnologie car sa génétique est bien connue et elle possède de nombreuses souches disponibles. D'autres bactéries (*Bacillus spp*, *Lactococcus lactis*, *Caulobacter crescentus* et *Streptomyces lividans*) sont utilisées mais de façon anecdotique

3.2.2.2. Avantages et inconvénients de ce système

Les bactéries sont faciles à cultiver à l'échelle industrielle : leur croissance est rapide et possible en fermenteurs. Elles permettent d'obtenir des rendements élevés de protéines d'intérêt : *E. coli* peut produire des protéines d'intérêts jusqu'à 80% de son poids sec. Par conséquent, les bactéries n'effectuent pas de modification post-traductionnelle propres aux mammifères (repliement optimal, glycosylations, association de sous-unités, γ -carboxylation, etc.), ce qui limite leur utilisation à la production de biomolécules simples.

De plus, du fait de leur faible potentiel de sécrétion, il est souvent nécessaire de lyser les bactéries pour récupérer la protéine d'intérêt, ce qui complexifie le procédé d'extraction-purification et nuit aux rendements de purification.

En outre, lors de ces étapes, il n'est pas rare que la préparation de protéine recombinante soit contaminée par des endotoxines (ou lipopolysaccharide : LPS). Si la protéine recombinante est destinée à traiter des cellules en culture ou à être injectée à des mammifères, le LPS devra être impérativement éliminé de la préparation, étape supplémentaire exposant à une diminution du rendement de production.

Contrairement à *E. coli*, les *Bacillus* utilisés ne possèdent pas d'endotoxines et sont donc intéressants pour l'expression de protéines thérapeutiques destinées à l'usage parentéral. Ils ne forment pas de corps d'inclusion (CI) (agrégats issus du mauvais

repliement et donc de l'insolubilité de la Protéine d'intérêt) mais au contraire, ils sont capables de sécréter la protéine d'intérêt directement dans le milieu de culture. Cela facilite la purification de la Protéine d'intérêt, qui néanmoins, est diluée, ce qui influence le rendement de production. De même, la protéolyse massive qui peut s'observer du fait de la présence de protéases bactériennes affecte ce rendement.

Tableau 2: Récapitulatif des principaux avantages et inconvénients du système d'expression *E. coli* (Demain and Vaishnav, 2009).

Avantages	Inconvénients
➤ Expression rapide	➤ Difficulté pour assurer les ponts disulfures corrects sauf dans le périplasma
➤ Concentrations élevées	➤ Protéines non glycosylées
➤ Caractéristiques génétiques bien établies	➤ Protéines produites avec des endotoxines
➤ Facilités pour la culture en masse et pour les modifications génétiques	➤ Formation d'acétate limitant la croissance cellulaire
➤ Coût peu élevé	➤ Corps d'inclusion inactifs

3.2.3 Levures et champignons filamenteux:

3.2.3.1 Espèces utilisées

Les levures utilisées pour la production de protéines recombinantes d'intérêt thérapeutique sont *Saccharomyces cerevisiae* (levure de bière) et *Pichia pastoris*. Quant aux champignons filamenteux, ce sont ceux du genre *Aspergillus* qui sont le plus souvent utilisés.

3.2.3.2 Avantages et inconvénients de ces systèmes

Les levures et champignons filamenteux offrent les mêmes facilités expérimentales et industrielles que les bactéries mais possèdent des avantages supplémentaires. Les *Aspergillus spp* sont par exemple capables d'intégrer le transgène dans leur génome et permettant ainsi une expression stable à long terme.

Par ailleurs, ils sont tous capables de sécréter la protéine recombinante dans le milieu de culture avec des rendements intéressants (25 g/L pour la glucoamylase produite par *Aspergillus niger*).

En outre, ils peuvent opérer plusieurs types de modifications post-traductionnelles comme le repliement, la formation de ponts disulfures et les glycosylations.

Malgré leurs avantages apparents, les levures et champignons filamenteux présentent des inconvénients qui limitent leur usage. Ils sont peu adaptés à la production de protéine recombinante nécessitant une glycosylation de type mammalien puisqu'ils privilégient l'incorporation de mannose, or ces résidus sont immunogènes pour les mammifères.

Ils sont également peu adaptés pour la production de protéines très complexes comme les anticorps monoclonaux. De plus, les champignons filamenteux expriment des protéases, ce qui peut diminuer le rendement de production de la protéine recombinante.

Tableau 3 : Principaux avantages et inconvénients des levures comme système d'expression (Demain and Vaishnav, 2009).

Avantages	inconvénients
➤ Taux de protéines élevé	➤ Glycosylation incomplète
➤ Souches productrices stables	➤ (de type <i>High-mannose</i>)
➤ Coût accessible	➤ Sécrétion difficile pour les
➤ Croissance cellulaire élevée	➤ protéines complexes
➤ Rendement élevé	➤ Niveau d'expression peu
➤ Croissance rapide en milieux chimiquement définis	➤ élevé
➤ Procédé de production similaire à celui des cellules animales	
➤ Formation des ponts disulfures possible	
➤ Repliement des protéines possible	
➤ Glycosylation possible	

3.2.4 Baculovirus en cellules d'insectes

3.2.4.1 Lignées utilisées

Les trois principales lignées cellulaires d'insectes utilisées sont les Sf9 et Sf21 (issues du papillon *Spodoptera frugiperda*) et la lignée Hi5 (issue du papillon *Trichoplusia ni*). Les cellules sont infectées par des baculovirus dans lesquels le transgène a été intégré. Ces virus sont naturellement pathogènes pour les insectes et les arthropodes mais pas pour les organismes vertébrés.

3.2.4.2 Avantages et inconvénients de ce système

Ce sont de virus capables d'infecter plus de 600 espèces d'insecte et non pathogènes pour les vertébrés et les plantes.

- La production de protéines recombinantes dans des cellules ou des larves d'insectes est facilement industrialisable puisque la culture en suspension dans des bioréacteurs est possible.
- Avec ce système d'expression, non seulement il n'y a pas de limite de taille du transgène intégré mais en plus, plusieurs gènes peuvent être exprimés simultanément.
- Le transgène intégré dans le génome viral étant sous la dépendance d'un promoteur fort (celui de la polyhédrine), Il est non essentiel pour la propagation de l'infection dans un individu ou en culture cellulaire, son niveau d'expression est important. En effet, la quantité de protéine recombinante produite peut représenter 30% des protéines cellulaires totales et le rendement peut atteindre 11 g/L de culture.
- la purification à partir du surnageant est par conséquent facile à effectuer.
- Par ailleurs, comparées aux bactéries ou aux levures, les cellules d'insectes sont capables d'opérer des modifications post-traductionnelles proches de celles effectuées par les cellules de mammifères. Néanmoins, il peut arriver que ces modifications soient imparfaites (mauvais repliement, hypo ou hyper-glycosylations...).

Tableau 4 : Principaux avantages et inconvénients du système d'expression Baculovirus / cellules d'insecte (Demain and Vaishnav, 2009).

Avantages	Inconvénients
➤ Modifications post-traductionnelles	➤ Glycosylation de type oligomannose ou paucimannose
➤ Repliement des protéines possible	➤ Nécessité de réinfection virale à chaque culture
➤ Titres élevés de protéine	➤ Augmentation de la mort cellulaire après infection virale
➤ Scale-up facile	➤ Production de la protéine dans un milieu de culture avec potentiellement des protéases et des glycosidases
➤ Sécurité (pas d'agents pathogènes)	➤ Titre en virus faible
➤ Protéines complexes	➤ Pas de lignée stable pour l'industrie
➤ Clivage efficace des peptides signaux	
➤ Expression de gènes multiples simultanément	

3.2.5 Cellules de mammifères :

3.2.5.1 Lignées utilisées

Plusieurs lignées cellulaires de mammifères sont habituellement utilisées pour la production de protéines recombinantes complexes (anticorps monoclonaux, facteurs de la coagulation, etc). Exemple : cellules de hamster (ovariennes : CHO, rénales : BHK), des cellules murines (myéломateuses : Sp2/0, plasmocytomateuses : NSO), des cellules humaines (embryonnaires rénales ou fibroblastiques).

3.2.5.2 Avantages et inconvénients de ce système

Actuellement, 60-70 % des protéines recombinantes pharmaceutiques sont produites dans des cellules de mammifère. En effet, malgré des rendements de production largement supérieurs et des contraintes de mise en oeuvre beaucoup moins importantes, les systèmes d'expression cités précédemment présentent l'inconvénient majeur de ne permettre aucune glycosylation ou une glycosylation incomplète. Ainsi, les cellules de mammifère, et plus particulièrement la cellule CHO, apparaissent comme un système

incontournable pour la production de glycoprotéines recombinantes d'intérêt thérapeutique.

Tableau 5 : Principaux avantages et inconvénients des cellules de mammifère (Demain and Vaishnav, 2009).

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Activité biologique de la protéine recombinante similaire à celle de la protéine native ➤ Modifications post-traductionnelles de mammifère ➤ Glycosylation proche de celle chez l'homme ➤ De nombreux vecteurs d'expression disponibles ➤ Excrétion aisée 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Coût élevé ➤ Croissance cellulaire lente ➤ Faibles concentrations comparées aux Procaryotes

3.2.6 Plantes transgéniques :

3.2.6.1 Espèces utilisées

Parmi les espèces végétales habituellement utilisées pour la transgénèse figurent le tabac, la luzerne, le colza, le maïs, le riz et la pomme de terre. Les protéines recombinantes produites sont généralement stockées dans les feuilles, les fleurs, les graines ou encore les racines.

3.2.6.2 Avantages et inconvénients de ce système

Différentes techniques sont employées afin de transférer un gène d'intérêt dans le patrimoine génétique d'une plante : vecteurs bactériens, injection de cellules embryonnaires totipotentes, biolistique, électroporation du protoplaste. La mise au point de plantes transgéniques à partir de végétaux comme le tabac, le colza ou encore la pomme de terre, permet de produire une variété de protéines recombinantes précieuses (**molecular farming**) : interféron, interleukine, facteur VIII de la coagulation. Dans ce domaine, restent principalement à résoudre les problèmes de niveau d'expression des protéines

(rendements faibles), ainsi que d'extraction et de purification. Les plantes transgéniques pourraient représenter un moyen de production peu coûteux.

Tableau 6 : Principaux avantages et inconvénients des plantes transgéniques comme système d'expression (Demain and Vaishnav, 2009).

Avantages	Inconvénients
➤ Coût peu élevé	➤ Glycosylation différente de
➤ Protéines complexes	➤ celle retrouvée chez l'homme
➤ Sécurité (faible risque de contamination par des agents pathogènes)	➤ Extraction et purification difficiles
➤ Scale-up facile et peu coûteux	➤ Pesticides et herbicides
➤ Repliement des protéines possible	➤ Opinion publique (Mouvements anti-OGM)
➤ Modifications post-traductionnelles	➤ Croissance lente et densité cellulaire faible

3.2.7. Animaux transgéniques :

3.2.7.1 Espèces animales utilisées

La plupart des animaux transgéniques utilisés pour produire des protéines recombinantes sont des mammifères : de la souris à la vache, en passant par le lapin, la brebis, la chèvre ou encore le cochon. Des animaux non mammifères sont aussi utilisés, notamment des espèces aviaires pour une production de protéine recombinante dans le blanc d'œuf.

Il existe différentes techniques de transgénèse applicable :

- microinjection de gène dans un des pronoyaux des embryons
- transfert de noyaux contenant l'ADN dans des ovocytes énucléés
- infection par des vecteurs lentiviraux
- fécondation des spermatozoïdes préalablement incubés avec l'ADN à transférer
- formation de chimères à l'aide de cellules souches embryonnaires portant le transgène

3.2.7.2 Avantages et inconvénients de ce système

Productions de grosses molécules, possibilité de consommer les protéines recombinantes dans l'alimentation, nécessite de grande structure pour l'élevage. Les

animaux transgéniques peuvent être utilisés afin de produire des protéines hétérologues : production de facteur IX de la coagulation dans le lait de brebis transgéniques, lactoferrine humaine obtenue dans le lait de vache transgénique, hormone de croissance humaine dans le lait de souris, hémoglobine humaine produite dans le sang du porc... L'intérêt d'une production de protéines recombinantes dans le lait ou le sang d'animaux transgéniques se heurte cependant à des niveaux d'investissements très lourds pour des marchés a priori très restreints.

Tableau 7 : Principaux avantages et inconvénients des animaux transgéniques comme système d'expression.

Avantages	inconvénients
➤ Titres élevés de protéines	➤ Coût encore élevé
➤ Scale-up facile	➤ Purification difficile
➤ Modifications post-traductionnelles de mammifères	➤ Ethique (santé des animaux)
➤ Glycosylation proche de celle retrouvée chez l'homme	➤ Lenteur du développement des animaux
	➤ Présence de NeuGc chez la plupart des
	➤ animaux

Le tableau ci-dessous résume quelques unes des protéines recombinantes, les plus fréquemment utilisées, produites dans différentes cellules hôtes (**Tableau8**).

Tableau 8 : Exemples des protéines recombinantes produites par différents hottes

	CHO	E.coli	Levure	Cellule humaine	Autre	Domaine thérapeutique
Hormone de croissance		+			Souris	Nanisme
Imiglucérase	+					Gaucher
Insuline		+	+			Diabète
Interféron α		+				Hépatite, cancer
Interféron $\beta 1 \alpha$	+					Sclérose en plaques
Interféron $\beta 1 b$		+				Sclérose en plaque
Interleukine 2		+				Cancer
Interleukine 11		+				thrombopénie
Agalsidase	+			+		Fabry
Dornas	+					Mucoviscidose
Erythropoïétine	+					Anémie
Facteur VIII	+				Rein de hamster	Hémophilie A
Facteur IX	+					Hémophilie B
FSH		+				Stérilité
G-CSF	+	+				Neutropénie

3.3. Optimisation du rendement: correspond à la quantité de protéines fabriquée par litre de fermenteur et par cycle de fabrication (un bioréacteur de 20000L peut réaliser 20 cycles/an). Rendement de l'ordre de 1,5 à 2 g/L/cycle; les meilleurs espoirs s'orientent vers 5 g/L.

3.4. Purification de la protéine, éliminant toute trace de cellules productrices, de virus, de produits de dégradation de la protéine, de milieu de culture.

3.5. Production : d'abord en lots pilotes, puis dans les conditions de bonnes pratiques de fabrication. La construction et la mise en état d'un bioréacteur pour une protéine médicamenteuse commercialisée prennent plusieurs années. La décision de mise en construction est prise vers le milieu de la phase III. Entre cette décision et la production de lots validés, 30 à 42 mois s'écoulent.

III- PUCES A ADN

1-Principe des puces à ADN

L'idée conceptuelle de la puce à ADN est très simple. Il s'agit de greffer sur une surface de quelques centimètres carrés des fragments synthétiques d'ADN (les sondes) espacés de quelques micromètres et représentatifs de chacun des gènes étudiés. Ce microdispositif est ensuite mis au contact des acides nucléiques à analyser, au cours de l'étape d'hybridation. Ces acides nucléiques, appelés cibles, correspondent aux ARNm ou aux ADNc qui ont été préalablement couplés à un marqueur fluorescent ou radioactif. Ce contact entre cibles et sondes conduit à la formation d'hybrides qualifiés par leurs coordonnées, et quantifiés grâce à la lecture des signaux radioactifs ou fluorescents.

2-Préparation d'une puce à ADN

2-1 Préparation des sondes :

La puce est constituée d'une surface solide, généralement du verre, recouverte de polylysines, molécules capables de fixer des fragments d'ADN (**sondes**). Chaque sonde correspond à une séquence d'ADN spécifique d'un gène donné et caractéristique d'une espèce recherchée.

Les copies d'une même sonde sont déposées sous forme de « spot » *via* des interactions électrostatiques à des emplacements précis sur la puce. Les sondes sont ensuite dénaturées afin que leurs fragments d'ADN se retrouvent sous forme simple brin et soient par la suite en mesure de capter un brin complémentaire (**cible**) présent dans l'échantillon à analyser (**Figure 6**).

Les molécules de polylysines en périphérie des spots, n'ayant pas reçu de sondes lors de cette étape de fabrication, sont bloquées lors de l'analyse de l'échantillon afin qu'elles ne captent pas de cible et qu'elles ne faussent pas la lecture du résultat.

Chaque emplacement de séquence nucléotidique est soigneusement annoté. Elles sont disposées à une densité de 1000 sondes/cm². Au total la puce peut contenir l'ensemble du génome de la cellule soit près de 30 000 gènes.

2-2 L'hybridation

On extrait ensuite l'ADN de deux groupes de cellules (sain et atteint), on prélève des brins d'ARN. Ces ARN sont également amplifiés par PCR puis transcrit en ADNc « la transcription inverse ». La quantité d'ARN prélevé doit être proportionnelle à la

quantité d'ADNc fixée sur la puce lors de la première étape.

Sur chacun des échantillons on intègre un marqueur fluorescent spécifique (par exemple : le vert pour le fragment d'ADN extrait du tissu sain et rouge pour le tissu tumoral.) Cette opération est répétée pour l'ensemble des gènes étudiés, appelés **cible**.

La puce est alors plongée dans un milieu liquide où chacune des cibles va se lier précisément à sa sonde complémentaire. Cette étape est appelée l'hybridation, elle peut durer quelques heures. Elle est ensuite « lavée », cela permet d'éliminer les brins non complémentaires, et ainsi enlever les nombreux signaux non spécifiques.

Cette hybridation est compétitive : plus la concentration de l'ADN cible est élevée, plus il s'hybridera sur la sonde. En conséquence, l'intensité de fluorescence verte ou rouge traduit l'hybridation préférentielle de l'ADNc témoin ou de l'ADNc de l'expérience. L'intensité de la fluorescence traduit donc la concentration relative des ARNm dans chaque condition. Ceux-ci sont soit surexprimé (induits), exprimé de la même manière ou sous exprimés (réprimés)

2-3 Lecture de la puce

Chaque spot de la puce est excité par un laser et on récupère la fluorescence émise via un photo-multiplicateur (PMT) couplé à un microscope confocal. On enregistre la fluorescence émise à une longueur d'onde (rouge, puis vert).

On obtient alors 2 images que l'on peut superposer artificiellement pour obtenir une image unique composée de spots allant du vert (ADN patient sain) au rouge (ADN patient atteint) en passant par différentes variations du jaune (ADN des deux conditions fixés en quantité plus ou moins identique).

Après normalisation des signaux, on calcule le rapport (ou ratio) fluorescence rouge/ fluorescence verte. Si ce ratio est supérieur à 1, le gène est surexprimé dans la condition expérimentale. Au contraire, si le ratio est inférieur à 1, le gène est sous exprimé. Pour être significatif, la modification d'expression d'un gène donné doit correspondre à un ratio de plus ou moins 2.

Les gènes identifiés peuvent ensuite être classés en fonction du niveau de leur sur ou sous expression de façon à être révéler des ensembles de gènes impliqués dans une fonction commune.

On peut visualiser les différences d'expression d'un gène donné ou bien comparer les niveaux d'expression de différents gènes grâce à des logiciels appropriés.

3-Applications des puces à ADN

Il existe de très nombreuses applications des puces à ADN. Les puces à ADN permettent de cribler des banques génomiques ou d'ADNc ou bien de caractériser leurs clones par empreintes d'oligonucléotides. Elles permettent de mesurer l'expression des gènes, mais aussi de caractériser la taille des ARN messagers en hybridant sur différentes puces les différentes fractions d'un gel d'électrophorèse.

Elles permettent aussi de détecter et de valider les gènes dans un génome ou une région génomique. Pour cela, une puce à ADN comportant des sondes régulièrement réparties sur la séquence à tester est hybridée avec des ARN provenant de différents tissus. Ces hybridations mettent en évidence les régions transcrites et la cohérence des signaux obtenus avec les différents tissus permet de déterminer si plusieurs régions voisines transcrites proviennent d'un seul ou de plusieurs gènes.

De manière générale les domaines d'application des puces à ADN sont aujourd'hui très nombreux : recherche pharmaceutique, génotypage, diagnostic, contrôle agroalimentaire et industriel, bioterrorisme, etc.

Des applications ont déjà vu le jour pour la détection d'agents infectieux ou la recherche de maladies génétiques. Une puce pour le virus de SIDA, commercialisée depuis 1996, comporte des oligonucléotides complémentaires des gènes viraux de la transcriptase inverse et de la protéase, cibles des traitements actuels. Elle porte aussi les oligonucléotides complémentaires des mutations qui rendent ces protéines et donc la multiplication virale résistantes aux médicaments. Elle permet en moins de cinq heures d'évaluer la charge virale et l'émergence de formes résistantes, orientant ainsi la décision thérapeutique.

De même, des puces existent pour la détection de bactéries pathogènes (en particulier le bacille de la tuberculose) et des gènes de résistance aux antibiotiques qu'elles peuvent porter. Elles comportent plus de 40 000 oligonucléotides différents greffés sur une surface de l'ordre de 10 mm².

D'autres applications commercialisées concernent la détection de formes mutées du gène *BRCA-1* (susceptibilité au cancer du sein), du gène *p53* (muté dans près de 50 % des cancers), des gènes qui confèrent une résistance aux anticancéreux, ou de divers gènes

associés à des maladies. De nombreuses autres applications de ces puces sont en développement : suivi des contaminations microbiennes dans l'eau ou les produits alimentaires, suivi de populations microbiennes complexes en dépollution ou fermentation, recherche d'OGM.

Les puces permettent aussi de suivre l'expression de l'ensemble des gènes d'un organisme, ce qui est connu sous l'épithète du « transcriptome » (par référence au mot « genome »). Des puces portant des séquences complémentaires de plusieurs milliers de gènes humains ont été développées.

Elles permettent, par hybridation d'ADNc, de déterminer quels gènes sont exprimés dans une condition, un tissu, ou une pathologie particulière. Une telle approche pourrait se révéler très performante pour l'étude des maladies multifactorielles qui sont dues au dérèglement simultané de plusieurs gènes et ont été jusqu'ici très difficiles à analyser au niveau génétique.

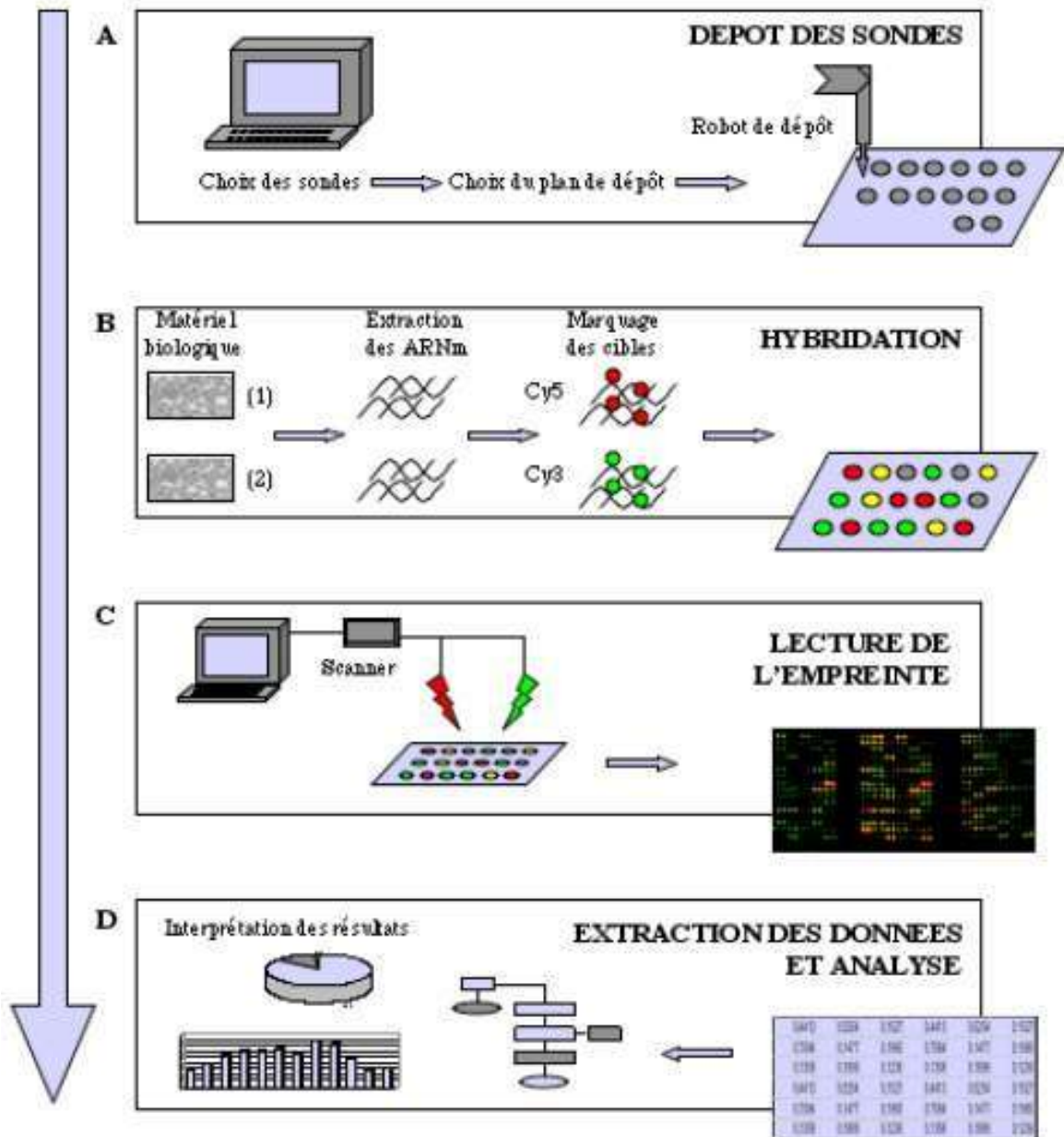


Figure 6 : Principe de la technologie des à puces à ADN (Reymond 2005). (A) Les séquences des sondes sont déterminées de façon à optimiser leur spécificité et leur sensibilité. Les sondes synthétisées sont déposées par un robot sur la surface de la lame selon un plan défini. (B) Les ARNm sont extraits des échantillons biologiques à comparer, marqués avec deux fluorochromes différents puis mélangés avant hybridation. (C) La lecture des lames est réalisée avec un scanner (microscope à fluorescence) couplé à un photomultiplicateur (PMT). (D) L'image est alors analysée de façon à quantifier le signal. Les données sont ensuite normalisées, analysées et interprétées.

4- Différents types de puces à ADN haute densité

Plusieurs types en fonction:

- du support utilisé (membrane de nylon, lame de verre)
- de la nature des sondes de capture (PCR, oligos)
- de la façon de fixer (spotter) les sondes au support (robot, photolithographie)
- du type de marquage des cibles (élément radioactif, dUTP biotinylé permettant une détection colorimétrique ou fluorescente, dUTP couplé au Cy3 ou Cy5 = carbocyanines fluorescente)

I- PURIFICATION DES PROTEINES

La purification de protéines est une série de processus destinés à isoler une ou des protéines à partir d'un mélange complexe (cellules ou autres particules ou matrices). Elle permet l'élimination de toute trace de cellules productrices, de virus, de produits de dégradation de la protéine, de milieux de culture.

1. Propriétés des protéines et applications

1.1 Propriétés électrostatiques

Composition en acides amines neutres ou charges différents selon la séquence: Electrophorèse, chromatographie par échange d'ions.

1.2 Propriétés hydrodynamiques

Taille, forme et structure quaternaire de la protéine: Gel filtration, diffusion de lumière, centrifugation.

1.3 Solubilité

Composition en acides amines hydrophobes. Exposition des résidus de surface: précipitation différentielle, chromatographie d'interaction hydrophobe, cristallisation.

1.4 Propriétés optiques

Absorbance de certains acides amines, de la liaison peptidique: Dosage spectrophotométrique, dichroïsme circulaire.

1.5 Propriétés fonctionnelles

Enzymes, interaction protéine-ligand. Dosage enzymatique, chromatographie d'affinité.

2. Origine du matériel

Selon l'origine de la protéine, les problèmes sont différents :

2.1. Protéine endogène naturellement présente dans un organisme.

- **Avantages:** protéine fonctionnelle, modifications post-traductionnelles correctes.
- **Inconvénients:** souvent faible quantité, problème d'homogénéité, nombreuses étapes de purification.

2.2 Protéine recombinante dont le gène a été introduit dans un organisme hôte

- **Avantages:** Protéine produite en grande quantité. Possibilité d'utiliser une fusion avec une étiquette (tag).
- **Inconvénients:** synthèse massive, parfois repliement incorrect, protéine insoluble, Modifications post-traductionnelles incorrectes ou absentes. Etapes de purification

3. Etape préalable à la purification des protéines recombinantes : clarification

L'étape préalable à la purification consiste à isoler les protéines solubles des constituants bactériens solides. Si la protéine recombinante est sécrétée dans le milieu de culture, une simple centrifugation ou une filtration est suffisante pour obtenir un échantillon clarifié prêt à être purifié. Cependant, dans la plupart des cas, la protéine recombinante doit être extraite de la bactérie après une lyse **physique, mécanique, enzymatique** ou **thermique**. Les conditions de lyse doivent permettre d'éviter l'oxydation et la protéolyse, mais aussi la contamination par l'ADN génomique. Le lysat bactérien obtenu est ensuite centrifugé et le surnageant est recueilli pour la purification.

3.1. Lyse physique : sonication

Cette méthode consiste à appliquer plusieurs impulsions courtes d'ultrasons de façon discontinue. Les phénomènes de cisaillement et de cavitation engendrés sont suffisants pour lyser de faibles quantités de bactéries. Néanmoins, la chaleur dégagée expose au risque de dégradation de la protéine recombinante.

3.2. Lyse mécanique : homogénéisateurs

Les homogénéisateurs permettent d'appliquer plusieurs fois une forte pression aux bactéries, puis à relâcher brutalement cette pression. Ces appareils sont adaptés pour lyser de très grandes quantités de bactéries (plusieurs dizaines de litres de bouillon). Ils présentent néanmoins l'inconvénient de dégager de la chaleur et de former de la mousse, ce qui expose au risque d'inactivation de la protéine recombinante.

3.3. Lyse enzymatique : lysozyme

La lyse enzymatique est basée sur la digestion de la couche de peptidoglycane de la paroi cellulaire bactérienne par l'utilisation de lysozyme. Cependant, dans le cas de bactéries à Gram négatif, une couche supplémentaire est présente sur la paroi cellulaire,

laquelle doit être perméable pour que le lysozyme puisse agir sur la composition en peptidoglycane de la paroi cellulaire.

3.4. Lyse thermique : cycles congélation-décongélation

La lyse thermique consiste à faire plusieurs cycles de congélation dans de l'azote liquide (puis à -20°C ou -80°C pendant plusieurs heures) et de décongélation des bactéries à température ambiante. Pour augmenter l'efficacité de la lyse thermique, il est possible de la combiner à la sonication et/ou à la lyse enzymatique.

4. Purification des protéines recombinantes

La purification d'une protéine recombinante permet non seulement d'isoler celle-ci du reste des protéines bactériennes, mais aussi de la concentrer.

La méthode la plus utilisée est la chromatographie d'affinité qui, en général, suffit pour obtenir un bon degré de pureté de la protéine recombinante. Néanmoins, si un plus grand degré de pureté est nécessaire, d'autres techniques peuvent être envisagées : **chromatographie liquide haute performance, chromatographie d'échange d'ions (CEI), chromatographie d'exclusion stérique (CES).**

Ces techniques qui permettent d'obtenir des rendements supérieurs à 90 % se décomposent en trois étapes : l'adsorption de la protéine recombinante sur un ligand spécifique greffé sur une matrice (agarose, sépharose...), l'élimination des autres protéines par des rinçages, et l'élution de la protéine recombinante.

4.1 Chromatographie échange d'ions: sépare les protéines en fonction de leurs charges de surface grâce à une résine greffée de groupements chargés + (échangeur d'anions) ou - (échangeur de cations). Les protéines sont éluées par un gradient de sel (NaCl, KCl...)

4.2 Chromatographie d'affinité: sépare les protéines en fonction d'une interaction réversible entre une protéine (ou un groupe de protéines) et un ligand spécifique fixé sur une matrice chromatographique. La chromatographie d'affinité est couramment utilisée pour les protéines surexprimées en fusion avec des étiquettes (Tag).

4.3 Chromatographie d'exclusion stérique

Cette technique permet la séparation des molécules en fonction de leur taille et de leur forme. On utilise pour cela des granules de gel poreux.

Les grosses molécules (dont le diamètre est supérieur à celui des pores) sont exclues et sont donc éluées les premières. Les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car incluses dans le gel, leur migration est freinée.

Les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse des masses moléculaires. Il existe une relation linéaire entre le volume d'éluion et le logarithme de la masse moléculaire.

4.4 Elimination des endotoxines

La production de protéine recombinante par *E. coli* expose à des risques de contamination des préparations par des endotoxines bactériennes (LPS). Or les préparations de protéine recombinante d'intérêt thérapeutique étant généralement destinées à l'usage parentéral, il est indispensable qu'elles soient apyrogènes. Plusieurs méthodes sont disponibles pour cela : la chromatographie d'affinité avec immobilisation de polymyxine B ou d'histidine, la séparation de phase en présence de Triton X-114 ou encore l'adsorption du LPS sur des cristaux de silicate de calcium hydratés.

5. Caractérisation des protéines recombinantes

5.1. Méthodes qualitatives

Dans le cadre d'une production de protéine recombinante pour des applications thérapeutiques, il est indispensable que cette protéine se trouve dans un état natif à la fin du processus. De nombreuses techniques permettent d'analyser l'intégrité, l'homogénéité et la qualité des structures protéiques comme l'électrophorèse, la spectrométrie de masse, la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire, la cristallographie aux rayons X, la diffusion dynamique de la lumière, ect...

Quant à l'activité biologique des protéines recombinantes produites, elle est validée par divers tests *in vitro* ou *in vivo* en fonction de la nature même de la protéine.

5.2 Méthodes quantitatives

La quantification directe ou indirecte de la protéine recombinante purifiée, est effectuée par spectrométrie d'absorption UV. Soit l'absorbance de la protéine recombinante à 280 nm est directement mesurée par un spectrophotomètre. Soit la protéine recombinante est dosée par des méthodes colorimétriques basées sur l'interaction de certains acides aminés avec un colorant (méthode de Bradford) ou avec des ions cuivreux \pm des réactifs aromatiques (méthode du Biuret, de Lowry...).

6. Conservation de la protéine recombinante

Les conditions de conservation dépendent fortement de la nature même de la protéine recombinante mais aussi de la durée de conservation voulue. En général, il faut éviter des conditions proches des limites de stabilité de la Pt (pH extrêmes, tampons peu adaptés...) ainsi que l'ajout de composés susceptibles d'interférer par la suite.

II- PROTEOMIQUES

1-Définition du protéome :

Le « protéome » terme défini par Wilkins et al. (1995) désigne l'ensemble des protéines exprimées dans un organisme, un tissu ou une cellule à un moment donné et dans un environnement donné. Le protéome possède la particularité de changer en permanence au cours de la vie d'une cellule et varie énormément en fonction des changements environnementaux ou des stress que subissent les organismes.

La taille du protéome est plus importante que celle du génome, car un gène peut coder pour plusieurs protéines en considérant les modifications introduites par la maturation des mRNA et les modifications post-traductionnelles (glycosylation, phosphorylation,...). Le protéome est dynamique, le génome est constant.

2-Principe de la protéomique :

Sur le plan méthodologique, l'approche consiste, après séparation par électrophorèse mono- ou bi-dimensionnelle (ou par chromatographie liquide) des différentes protéines contenues dans un échantillon, de les protéolyser par voie enzymatique ou chimique et d'analyser les peptides obtenus par spectrométrie de masse.

3-Objectifs et applications de la protéomique

- Dériver des informations fonctionnelles sur les protéines (localisation, sites de liaison de ligands....)
- Mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans les grandes fonctions cellulaires
- Étudier des voies de signalisation impliquées dans des processus biologiques ou dans le développement de maladies
 - Identifier de nouvelles espèces
 - Identifier des protéines constituant un complexe protéique (interactions protéines-protéines)
- Découvrir et valider l'utilisation de biomarqueurs protéiques utiles au dépistage de maladies, au suivi de leur évolution ou encore à l'évaluation de l'efficacité d'un traitement (biologie clinique)

4-Approches de la protéomique

4.1. La protéomique descriptive: le but est de fournir une image de l'ensemble des protéines exprimées par une cellule, un tissu ou un organisme donné (protéomique qualitative, quantitative, topologique (localisation subcellulaire de la production des protéines) et recherche de modifications post traductionnelles).

4.2. La protéomique différentielle: il s'agit d'étudier l'expression des protéines de tissus ou d'organismes entre deux conditions différentes et de déterminer les variations d'expression protéique de manière qualitative et quantitative.

4.3. La protéomique fonctionnelle: le but est de pouvoir élucider les interactions entre protéines, pour établir des réseaux d'interaction, de façon à mieux appréhender leurs fonctions et leurs régulations.

4.4. La protéomique structurale : le but est de déterminer la relation entre la structure et la fonction d'une protéine, en particulier par la résolution de sa structure tridimensionnelle.

5-Principales étapes de la protéomique :

5.1 Extraction protéique

La qualité de l'extraction protéique est un point majeur de toute analyse protéomique, elle doit être effectuée dans des conditions de travail strictement contrôlées de manière à minimiser les contaminations.

L'extraction a pour but de solubiliser le plus grand nombre possible de protéines, en éliminant les liaisons entre elles (liaisons ioniques, hydrogène, hydrophobes et ponts disulfure) ou avec d'autres molécules biologiques (lipides, acides nucléiques). Elle doit permettre aussi de limiter leur dégradation et/ou modification par des enzymes et des réactions chimiques.

Cependant, l'étape d'extraction se doit d'être la plus simple possible pour accroître la reproductibilité. Cette extraction se fait classiquement en présence de chaotropes (urée, thiourée), d'agent réducteur (DTT, β -mercaptoethanol) et de détergents (CHAPS, Triton X-100, SDS à faible concentration), et peut être complétée par des traitements mécaniques (cycles de congélation / décongélation, sonication, broyage).

5.2. Séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle (2D)

L'électrophorèse 2D est la méthode de choix pour séparer les protéines puisqu'elle permet de séparer simultanément plusieurs milliers de polypeptides d'un mélange

complexe en fonction de deux propriétés différentes : la charge électrique et le poids moléculaire (**Figure7**).

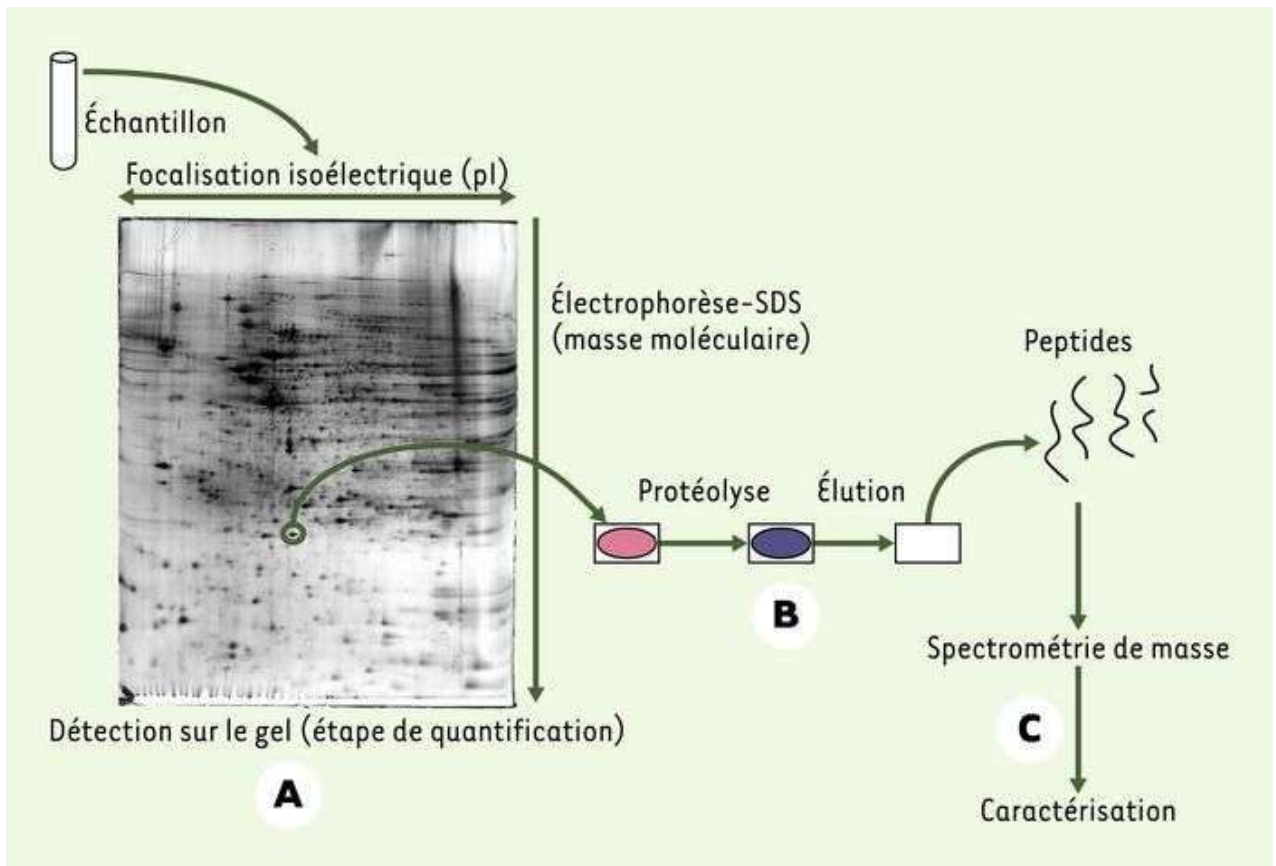


Figure7 : Séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle (2D) (Lescuyer, 2004). **A**. Le mélange de protéines est séparé par électrophorèse bidimensionnelle. **B**. Les taches d'intérêt, observées après coloration, sont digérées pour donner des peptides. **C**. Ces peptides sont extraits puis analysés par spectromètre de masse.

Dans la **première dimension**, les protéines sont soumises à une électrophorèse dans un gel présentant un gradient de pH continu. Au cours de cette étape, appelée **isoélectrofocalisation (IEF)**, elles migrent dans le gel jusqu'à une position où la valeur du pH est égale à celle de leur point isoélectrique (pI) où leur charge globale devient nulle.

- **pH** de la protéine > **pH** de la solution : la protéine est chargée **positivement**
- **pH** de la protéine < **pH** de la solution : la protéine est chargée **négativement**
- **pH** de la protéine = **pH** de la solution : la protéine n'a pas de charge = **charge nulle**

Cette première séparation est délicate et dépend beaucoup de la préparation des échantillons biologiques qui doit permettre une solubilisation maximale des protéines et empêcher leur agrégation et leur dégradation.

Dans la **deuxième dimension**, les protéines sont séparées par la technique **SDS-Page** (sodium-dodécyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis). La résolution s'effectue sur un gel réticulé constitué de polyacrylamide en présence d'un agent dénaturant, le sodium-dodécyl sulfate (SDS).

❖ **Electrophorèse monodimensionnel (1D ou SDS-PAGE) :**

Les protéines sont séparées en fonction de leur masse moléculaire dans un gel de polyacrylamide. Après extraction, les protéines sont reprises dans un tampon contenant du détergent SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) qui permet de conférer une charge négative aux protéines. Ainsi, sous l'effet d'un champ électrique, les protéines vont entrer dans le gel et avancer entre les mailles de polyacrylamide, ce qui permettra la séparation (les plus petites protéines migreront plus vite dans les mailles du gel). Les protéines sont ensuite colorées.

La séparation est basée sur deux paramètres importants :

- **un agent dénaturant: SDS:** est un détergent anionique qui dénature les protéines et leur confère une **charge négative**, proportionnelle à leur taille
- **un agent réducteur:** est aussi ajouté fréquemment (réduction des ponts s-s) comme le *β-mercaptoéthanol*(HS-CH₂-CH₂-OH)ou le DTT (dithiothréitol)

-Le polyacrylamide : polymère d'**acrylamide**et **bisacrylamide**

-La polymérisation est assistée par :

-Persulfate d'ammonium (APS): **catalyseur**

-TEMED: **accélérateur**

Après séparation en fonction du pI par focalisation isoélectrique, le strip d'IEF est placé sur un gel SDS-PAGE: les protéines seront alors séparées selon leur masse moléculaire (**figure7**);

Cette méthode très puissante permet d'obtenir une très grande résolution dans la séparation de protéines présentes dans un mélange complexe (carte protéiques: niveaux d'expression, isoformes, modification post traductionnelles.....)

5.3. visualisation des protéines

La dernière étape de l'électrophorèse 2D consiste à détecter les spots protéiques par coloration des gels. Plusieurs procédés de sensibilité différente existent et sont choisis en fonction de l'utilisation ultérieure des gels 2D.

Bleu de Coomassie, malgré sa faible sensibilité (100 à 500ng de protéines par bande), est totalement adapté aux études comparatives car il s'agit d'un colorant homogène, de sorte que la coloration est proportionnelle à la quantité de protéine présente. Protocole économique et sa limite de détection : environ de 60 à 100 ng. D'autre part, ce colorant est tout à fait adapté à la spectrométrie de masse.

La coloration au **nitrate** d'argent est, quant à elle, jusqu'à mille fois plus sensible et permet de détecter des spots contenant 0,1 ng de protéines. Elle présente néanmoins certains inconvénients : la stœchiométrie de la coloration n'est pas totalement linéaire, la reproductibilité est difficile à obtenir et certaines protéines sont peu ou pas colorées par cette méthode.

Plus récemment, la détection des spots par **fluorescence** (Sypro Orange, Sypro Red, Sypro Ruby) a été développée, avec une sensibilité et une linéarité d'intensité de coloration équivalente à celle de l'argent, mais avec une reproductibilité, une facilité et une rapidité meilleures que celles de la coloration au nitrate d'argent.

En dernier lieu, notons que l'**autoradiographie des gels 2D** après incorporation dans les protéines d'isotopes radioactifs comme le ^{35}S ou le $^{32}\text{P}/^{33}\text{P}$ est extrêmement sensible.

En effet, elle permet de visualiser des quantités très faibles de protéines (de l'ordre de 1 à 100 pg).

5.4 Analyse des gels

La première étape de l'analyse est la digitalisation ou numérisation des gels, c'est à-dire la transformation de l'image expérimentale en une information numérique utilisable par l'ordinateur (Acquisition de l'image). Plusieurs types d'appareils permettent de réaliser cette acquisition d'image: cameras CCD, densitomètres lasers, phospho- ou fluoro-imageurs et scanners. Ces outils découpent l'image en pixels et déterminent la différence de ton entre chacun d'entre eux. Ils reproduisent l'intensité, le périmètre, l'aire et l'orientation des taches protéiques. Traitement de l'image consiste à éliminer le bruit de fond, les artefacts de migration et de comparer les taches résolues.

Divers logiciels sont disponibles pour le traitement de l'image (Tycho, Gellab Quest, Bio-image, PD Quest, Phoretix 2D Melanie I). Le logiciel Progenesis, développé par NonLinear Dynamics Newcastle Mélanie 4 SIB à Genève, permet une visualisation 3D des spots sur le gel

6. Identification des protéines :

Après la séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle, les spots sont excisés, digérés (classiquement avec la trypsine mais d'autres endoprotéases peuvent être utilisées, AspN, chymotrypsine). Les étapes allant du prélèvement d'un spot protéique, de sa digestion par une protéase, de l'extraction des peptides de digestion, jusqu'au dépôt sur cible MALDI ou en microplaques pour analyse par spectrométrie de masse sont entièrement automatisables.

6.1 Principe de la spectrométrie de masse

Le spectromètre de masse est un instrument qui comprend différents constituants placés en série et qui permettent successivement, après introduction de l'échantillon par chromatographie ou injection directe par infusion, l'évaporation et l'ionisation des molécules de l'échantillon (source), l'accélération des ions formés, la séparation de ces ions en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z) (analyseur utilisant différents principes physiques) et enfin détection.

Les principales parties constituant un spectromètre de masse sont représenté dans le schéma ci-dessous (**figure 8**)

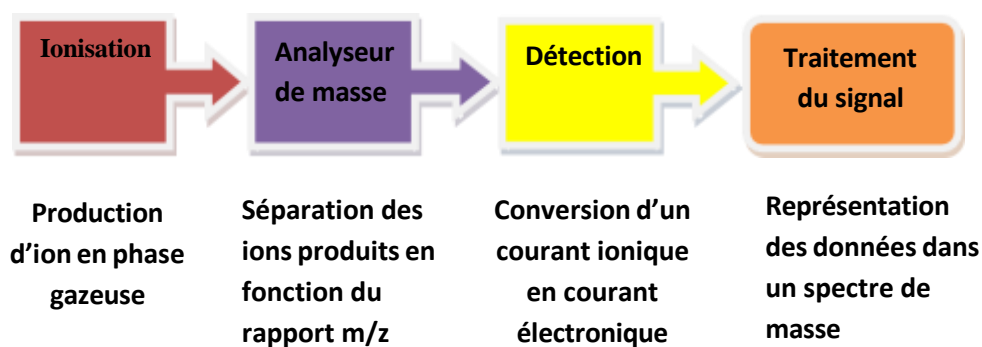


Figure 8: Principaux éléments d'une spectrométrie de masse

Après excision des spots d'intérêt, soit manuellement soit automatiquement, les principales étapes de la préparation des échantillons pour l'analyse par spectrométrie de masse.

- Etape de lavage
- Déshydratation et séchage
- Digestion avec la trypsine (50 ng trypsin, 37°C 16h)
- Extraction des peptides
- Désallage et concentration des peptides

L'objectif est de rendre disponible les protéines imbriquées dans le gel pour l'identification

6.2 Spectrométrie de masse et recherche dans les banques de données

L'avancée majeure en termes d'identification des protéines des gels 2D correspond à l'utilisation conjointe de la **spectrométrie de masse** et des **banques de données**. En s'adaptant à la biologie structurale, la spectrométrie de masse a permis de déterminer avec une sensibilité et une précision extrêmes la masse des molécules. Un spectromètre de masse se compose d'une source où s'effectuent l'**ionisation** et la désorption des ions, d'un analyseur où les ions sont séparés en fonction de leur **rapport masse sur charge (m/z)** et d'un détecteur permettant l'enregistrement et la quantification des ions.

Pour l'étude des composés peptidiques, deux modes d'ionisation sont principalement utilisés : - la désorption/ionisation laser assistée par matrice (**Maldi-Tof**) qui permet de réaliser une empreinte peptidique après digestion protéolytique (empreintes peptidiques)

Cette technique contrairement à l'ESI est tolérante à la présence de petite molécules, de sels et de détergeant. Elle nécessite au préalable la séparation des protéines par gel 2D. Les analytes seront cristallisés dans une matrice et ionisés à l'aide d'un laser UV ou IR. Cette technique permet d'engendrer des états de charge faible ce qui permet d'obtenir des spectres de complexité réduite. L'analyseur TOF est utilisé avec le MALDI.

- la spectrométrie de masse en tandem en mode nanospray (**MS-MS**) qui permet d'obtenir une microséquence en acides aminés.

C'est une technique de choix pour les expériences de haute sensibilité SM et SM/SM. Contrairement au MALDI, cette technique permet le couplage avec la

chromatographie liquide tel que la chromatographie d'exclusion et la chromatographie phase inverse.

7. Analyse des données

La liste de masses de la protéine est comparée aux listes de masses théoriques obtenues à partir des séquences protéiques dérivées du génome.

Le moteur de recherche d'empreinte peptidique : **ProFound** : Sans aucun doute le moteur le plus rapide actuellement.

III-PRODUCTION D'ANTICORPS

1-Définition d'un anticorps

Protéine synthétisée par les lymphocytes B (LB) et les plasmocytes, capable de reconnaître et de se lier spécifiquement à l'Antigène (Ag) ayant stimulé ce lymphocyte. Antigène (Ag): toute structure biologique reconnue par un Ac, peut-être de nature biochimique, protéique, glucidique, lipidique ou acide nucléique. Si l'Ag est trop petit il peut ne pas être reconnu par l'Ac. Très souvent les Ag peuvent être immunogènes c'est-à-dire capables de produire une réaction immunitaire. Il y a alors synthèse d'Ac spécifiques. A Ag étranger correspond un Ac plasmatique qui entraîne une liaison spécifique avec cet Ag.

2-Caractéristiques structurales des anticorps.

Un anticorps est une « glycoprotéine, c'est à dire que c'est une addition de glucides sur la chaîne de protéines. Un anticorps est formé de deux chaînes lourdes (H) et deux chaînes légères (L) = soit quatre chaînes peptidiques.

On note l'existence des « ponts disulfures » (S-S) dus à la Cystéine et la Méthionine qui possèdent des acides aminés soufrés ce qui peut entraîner la création de ponts dissulfures (ponts S-S intracaténaire = sur la même chaîne, ou ponts S-S intercaténaire = chaîne différentes) (**figure 9**)

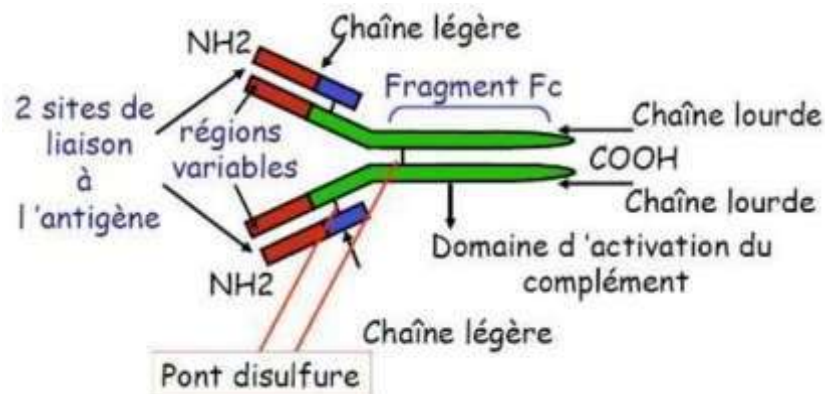


Figure 9: Structure d'un anticorps

3-Production d'anticorps monoclonaux

Principe de production des ACM C'est en 1975 que Kohler et Milstein (prix Nobel de médecine en 1984) ont été les premiers à obtenir in vitro des anticorps monoclonaux grâce au fait que les cellules de certains myélomes de souris (tumeurs malignes du

systèmes immunitaires) ont la propriété de sécréter, après fusion avec des lymphocytes, de grandes quantités d'immunoglobulines monoclonales et de se multiplier *in vivo* en donnant des clones immortels (contrairement aux lymphocytes B *in vivo*). Les étapes de la production sont les suivants :

A. Immunisation:

L'immunisation d'une souris est réalisée par injection intrapéritonéale d'une préparation d'antigène, avec un rappel trois jours avant la fusion afin d'augmenter considérablement la production d'anticorps dans la rate lors de la réponse secondaire.

B. Extraction des lymphocytes:

La rate est dilacérée pour récupérer les lymphocytes qui sont alors majoritaires.

C. Fusion :

Ainsi récupérés, les lymphocytes sont mis en culture avec des cellules myéломateuses, provenant d'une tumeur de souris Balb/c, en présence de polyéthylène glycol (PEG) qui facilite l'hybridation : on obtient des hybridomes.

D. Sélection des hybridomes:

Etant donné que toutes les cellules n'auront pas fusionné en hybridome, il faut séparer les hybridomes des myéômes et des lymphocytes restants. Les cellules sont diluées, lavées, centrifugées et remises en suspension dans un milieu sélectif HAT (Hypoxanthine, Aminoptérine, Thymidine).

E. Contrôle des hybridomes:

Le surnageant de culture est prélevé et testé par ELISA ou RIA (Radio ImmunoAnalyse) pour déterminer si il y a production d'anticorps spécifiques. F. ~~Clonage~~: Le clonage est fait grâce à la technique des dilutions limites qui consiste à réaliser des dilutions de manière à obtenir en théorie une seule cellule par puits de culture. On a ainsi une population homogène (clone) qui sécrète de façon permanente, quasi illimitée et continue des anticorps monoclonaux.

F. Le clonage :

Est fait grâce à la technique des dilutions limites qui consiste à réaliser des dilutions de manière à obtenir en théorie une seule cellule par puits de culture. On a ainsi une population homogène (clone) qui sécrète de façon permanente, quasi illimitée et continue des anticorps monoclonaux.

3-1 Exemples d'applications des anticorps monoclonaux

- **Test d'ovulation:** les anticorps monoclonaux anti-hormone lutéinisante qui révèlent l'augmentation du taux d'hormone LH (signe précurseur de l'ovulation).
- **Test de grossesse:** le principe repose sur la détection de l'hormone hGC (human Chorionic Gonadotropin) dans les urines par le biais d'une réaction colorée spécifique grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-hGC.
- Fabrication **des anticorps monoclonaux** contre des antigènes portés par des cellules tumorales afin de les détruire. L'intérêt de l'utilisation des anticorps monoclonaux pour **un traitement anti-cancéreux** réside dans la spécificité de ceux-ci à détruire des cellules cibles. On peut soit utiliser des anticorps seuls (anticorps nus) qui en s'attachant à la cellule entraînent sa mort ou associés à une autre molécule comme une toxine ou un produit radioactif. L'anticorps sert dans ce cas là, à amener vers la cellule tumorale l'élément qui va la détruire.
- **Test ELISA:** utilisation des anticorps monoclonaux comme anticorps traceurs dans le test ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Ce type de test est utilisé notamment dans le dépistage de la séropositivité au virus VIH, c'est à dire pour mettre en évidence la présence d'anticorps anti-VIH dans le sérum.

4- Production d'anticorps polyclonaux

Les anticorps polyclonaux doivent leur définition par le simple fait qu'ils constituent l'immunsérum polyclonal. L'immunsérum polyclonal contient plusieurs populations différentes d'anticorps qui reconnaissent chacune un épitope antigénique donné.

Le choix de l'espèce animale utilisée dépend de plusieurs facteurs, dont le volume de sérum requis (qui dépend lui-même de la quantité d'Ac polyclonaux à produire) et le type d'immuno essai. L'âge, le sexe et l'état de santé de l'animal sont également importants.

Les espèces animales les plus fréquemment utilisées pour la production d'Ac polyclonaux sont le lapin, la souris, le rat, le hamster, le cochon d'Inde, la chèvre, le mouton et le poulet.

Des espèces animales de grande taille (par exemple, des chevaux) peuvent aussi être utilisées afin d'obtenir des volumes plus importants d'antisérum, mais l'entretien de ces animaux est plus coûteux. Par ailleurs, il est possible d'extraire les immunoglobulines du lait des bovins, des brebis et des chèvres, ce qui représente une méthode non invasive pour la production de grands volumes d'Ac polyclonaux.

4-1-Exemples d'applications des anticorps polyclonaux

Pour des applications de western blot, d'ELISA, d'immunomarquage, d'immunoprécipitation, production de **sérum immun** « sérum polyclonal » et/ou **anticorps polyclonaux purifiés** (fraction IgG, fraction anti-idiotypic,...).

5- Différences entre anticorps monoclonaux et polyclonaux

La différence principale entre les anticorps monoclonaux et polyclonaux est que Les anticorps monoclonaux sont produits par le même clone de lymphocytes B plasmatisques et se lient à un épitope unique, tandis que les anticorps polyclonaux sont produits par différents clones de lymphocytes B plasmatisques et se lient aux différents épitopes du même antigène. Le tableau ci-dessous résume les autres différences entre les deux types d'anticorps.

Tableau 9 : Comparaison des principales caractéristiques des anticorps polyclonaux et des anticorps monoclonaux.

	Anticorps polyclonaux	Anticorps monoclonaux
Spécificité	Élevée	Variable
Fonctions biologiques	Toutes les fonctions	Variable selon la classe produite par l'hybridome
Espèces productrices	Vertébrés supérieurs	Souris, rat, lapin et mouton
Production	6 semaines <i>In vivo</i> Variable entre les lots	6 mois <i>In vitro</i> Homogène Conservation des clones en azote liquide
Utilisation	Le choix de l'un ou de l'autre méthode dépend de nombreux critères (quantité d'anticorps nécessaire, qualité d'anticorps, disponibilité de l'antigène...)	

IV-ANALYSES PROTEIQUES

1-La technique Western blot

1-1-Principe de la technique Western blot

La technique du Western Blot est l'une des techniques les plus utilisées pour la détection et la séparation des protéines. Elle repose sur le principe de l'immunochromatographie, un test au cours duquel les protéines sont séparées dans un gel de polyacrylamide en fonction de leur poids moléculaire. Une fois séparées, les protéines sont électro-transférées sur une membrane, puis détectées à l'aide d'anticorps.

1-2-Etapes de la technique

1-2-1-La préparation des échantillons

Cette étape comprend l'extraction de protéines à partir de cellules ou de tissus et l'estimation de la concentration en protéines. Divers tampons de lyse contenant des détergents et des inhibiteurs de protéase et de phosphatase peuvent être utilisés pour solubiliser les protéines de tissus entiers ou d'extraits de culture tissulaire. La protéine totale dans les échantillons peut être quantifiée par spectrophotométrie à 595 nm en utilisant le réactif de Bradford (**figure 10**)

1-2-2-Électrophorèse sur gel

Les protéines peuvent être séparées en fonction du point isoélectrique, du poids moléculaire, de la charge électrique ou d'une combinaison de tous ces éléments. La méthode la plus populaire est l'électrophorèse utilisant des gels de polyacrylamide chargés de SDS (SDS-PAGE). Les échantillons de protéines sont dénaturés avec un agent réducteur pour rompre les liaisons disulfure avant l'électrophorèse.

1-2-3-Transfert de protéines

Les protéines séparées sur gel par électrophorèse sont immobilisées par transfert sur un support solide.

La membrane utilisée pour adsorber les protéines doit évidemment avoir une bonne affinité pour les protéines et une bonne capacité d'adsorption. La nitrocellulose a été la première à être utilisée et l'est encore fréquemment. Elle est peu dispendieuse, facile à fabriquer. Du point de vue expérimental elle se manipule assez bien quoiqu'elle peut se déchirer facilement surtout lorsqu'elle est sèche.

D'autres ont été développées, à partir de dérivés de la cellulose ou de nylon, pour augmenter la capacité d'adsorption, diminuer le bruit de fond lors de la coloration, etc.

Les membranes de difluorure de polyvinyl (PVDF), la capacité d'absorption des protéines du PVDF est très supérieure à celle de la nitrocellulose. De plus il est beaucoup plus résistant et solide. Son principal inconvénient est qu'elle est hydrophobe et s'hydrate lentement et se déshydrate rapidement. Il faut donc inclure dans sa manipulation des étapes de réhydratation du PVDF en le faisant tremper tout d'abord dans un solvant polaire comme le méthanol avant de l'exposer à de l'eau.

Le transfert utilise un courant électrique pour tirer les protéines du gel sur la membrane (électroblotting).

1-2-4- Blocage avec un tampon de blocage

Pour la détection d'une protéine cible transférée sur la membrane, il est important de bloquer la détection de toute protéine non spécifique qui entraîne des résultats faussement positifs. Cela se fait généralement en utilisant des agents bloquants tels que la BSA, le lait écrémé ou un antiserum spécifique.

1-2-5- Incubation avec l'anticorps primaire

Les anticorps sont générés par inoculation à l'animal (généralement un lapin ou une chèvre) ou par exposition d'une culture de cellules immunitaires à la protéine d'intérêt dans son intégralité ou seulement sur l'une de ses fractions (épitope). Toutefois, les protéines ayant été dénaturées lors de l'électrophorèse sur gel. L'anticorps primaire se lie à la protéine cible.

1-2-6- Lavage avec un tampon de lavage

L'anticorps primaire non lié est éliminé par lavage.

1-2-7- Incubation avec l'anticorps secondaire

Un anticorps secondaire, qui reconnaît l'anticorps primaire et s'y lie, est ajouté. Le plus communément, un anticorps secondaire lié à la peroxydase de raifort (horseradish peroxidase) est utilisé en conjonction avec un agent luminescent, et le produit de la réaction émet une luminescence proportionnelle à la concentration en protéine.

1-2-8- Lavage avec du tampon de lavage

L'anticorps secondaire non lié est éliminé par lavage.

1-2-9-Détection et visualisation

La protéine cible peut être détectée par colorimétrie, fluorescence ou luminescence, selon l'anticorps secondaire utilisé.

Lorsque l'anticorps secondaire est lié à la peroxydase le produit de la réaction émet une luminescence proportionnelle à la concentration en protéine. Un film photographique sensible est placé contre la membrane et, sous l'exposition de la lumière due à la réaction, crée une image des anticorps liés à la membrane.

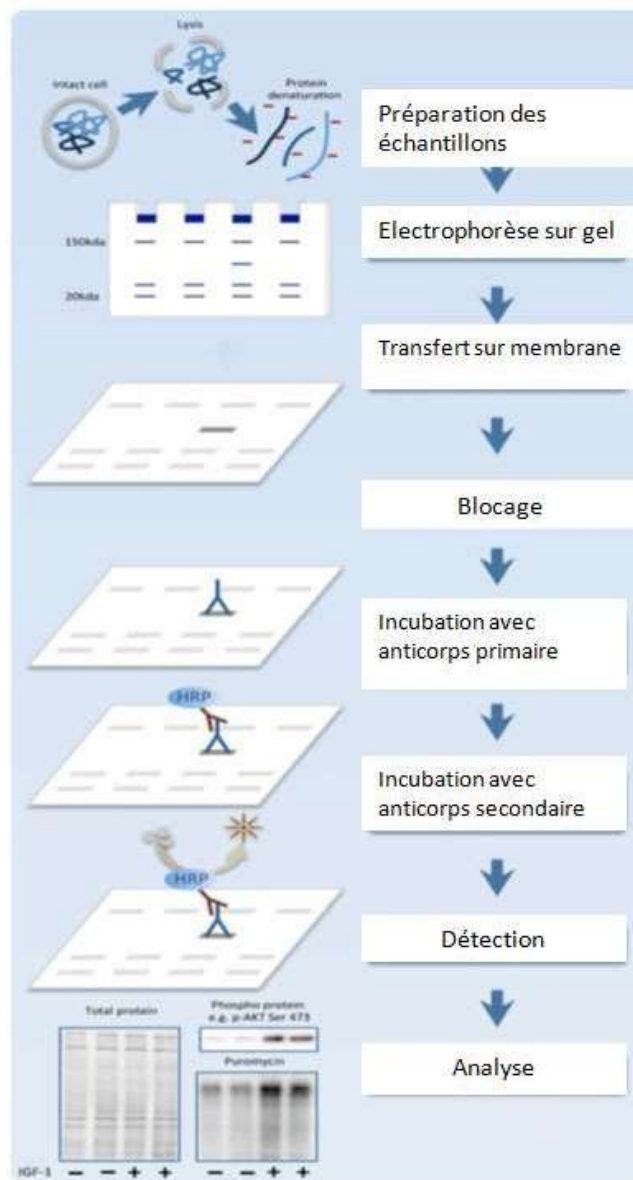


Figure 10: Principales étapes de la technique western blot (Bass et al. 2016).

1-3-Avantage et inconvénients de la technique Western blot

1-3-1-Avantages

➤ Sensibilité

Un des plus grands arguments en faveur de western blot est sa sensibilité. En raison de sa capacité à détecter aussi peu que 0,1 ng de protéine dans un échantillon, cette technique peut théoriquement servir d'outil diagnostique précoce et efficace, détecter la moindre réponse immunogène d'un virus ou d'une bactérie dans un échantillon de patient.

➤ Spécificité

La technique western blot doit sa spécificité à deux grands facteurs contributifs. Tout d'abord, l'électrophorèse sur gel trie un échantillon dans les protéines de taille différente, la charge et la conformation. Ce processus en lui-même est un grand pas vers la détection, sous forme de bandes formées dans le gel donnent déjà des indices sur la taille de la protéine ou d'un polypeptide d'intérêt.

La spécificité de l'interaction anticorps-antigène sert le deuxième facteur important. Étant donné que les anticorps spécifiques présentent une affinité pour des protéines spécifiques, le procédé est capable de détecter sélectivement une protéine cible, même dans un mélange de 300.000 protéines différentes.

1-3-2-Inconvénient:

➤ Enclin à des résultats faux ou subjectifs

En dépit de sa sensibilité et de spécificité, un western blot peut encore produire des résultats erronés. Un des résultats faussement positifs lorsqu'un anticorps réagit avec une protéine non-prévue, ce qui arrive souvent quand un patient testé pour le VIH arrive à avoir la tuberculose ou un certain nombre d'infections parasitaires.

Un faux-négatif, d'autre part, peut facilement entraîner des protéines plus grandes ne sont pas suffisamment de temps pour transférer correctement à la membrane.

➤ coût élevé et la demande technique

Le coût d'un western blot est un composite des grandes dépenses individuelles pour les anticorps marqués, les analystes qualifiés et de matériel de laboratoire. Un processus délicat, western blot exige de la précision dans toutes les étapes pour l'identification correcte des constituants d'un échantillon. Une erreur mineure dans la concentration de réactif ou la période d'incubation peut être désastreux pour l'ensemble du processus. Enfin,

l'équipement nécessaire pour la détection et l'imagerie - chimioluminescent, ou des systèmes fluorescents, radioactifs détection laser - peut être trop coûteux.

2- LE TEST ELISA

La technique d'ELISA a été conceptualisée et développée par deux scientifiques suédois, Peter Perlmann (investigateur principal) et Eva Engvall à l'Université de Stockholm en 1971.

2-1-Principe générale de la technique ELISA

La technique ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) est une technique immuno-enzymatique de détection qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps.

2-2 Avantages et Inconvénient de la technique ELISA

2-2-1 Avantages

Cette technique possède plusieurs avantages, parmi lesquels on trouve;

- L'utilisation d'anticorps monoclonaux rend la détection spécifique.
- Possibilité de quantifier grâce à la réalisation d'une gamme en parallèle.
- L'utilisation d'anticorps secondaires rend la technique sensible.
- Technique accessible à tous les biologistes.
- La détection du signal ne nécessite pas la présence d'appareillage spécialisé.

2-2-2 Inconvénient de la technique

la réaction enzymatique rend cette technique dépendante du pH , la température et de l'éclairement

2-3 Test ELISA indirect

Le test ELISA indirect consiste à détecter la présence d'un anticorps spécifique dans un échantillon de sérum. Pour cela il faut disposer :

- D'un échantillon de sérum à analyser
- D'un AG connu spécifique à l'AC recherché
- D'un anticorps traceur dirigé contre les anticorps humain et couplé à une enzyme (la peroxydase)
- Du substrat spécifique à l'enzyme, ici du TMB (3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine)

Le test comporte quatre étapes principales (**figure 11**):

- **Fixation de l'antigène** : L'antigène connu, spécifique à l'anticorps recherché, est fixé de manière électrostatique au fond de cupules de test (de puits). Les puits sont ensuite lavés pour enlever les antigènes non fixés.
- **Fixation de l'anticorps à détecter**: On verse le sérum à tester dans le puit. S'ils sont présents, les anticorps spécifiques vont se fixer aux antigènes au fond du puit. Un lavage des puits est effectué pour enlever les anticorps non fixés.
- **Fixation de l'anticorps traceur** : On verse dans le puits la solution contenant les anticorps traceurs. Ceux-ci ne peuvent se fixer qu'uniquement sur des anticorps humains. Ainsi si des anticorps humains dirigés contre l'antigène du puits ont été fixés à l'étape précédente, les anticorps traceurs pourront se fixer sur ceux-ci lors de cette étape. Dans le cas contraire ils seront éliminés lors du rinçage.
- **Révélation** : On verse dans le puits la solution contenant le substrat de l'enzyme fixée à l'anticorps traceur. Ce substrat ne pourra être transformé en produit que si le puits contient l'enzyme, c'est à dire si le puits contient des anticorps traceurs fixés aux anticorps humains eux même fixés aux antigènes situés au fond du puit. Le produit formé est de couleur bleue. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'enzyme présente et donc à la concentration d'anticorps recherchés. Un puits bleu indique une séropositivité et un puits incolore traduit une séronégativité.

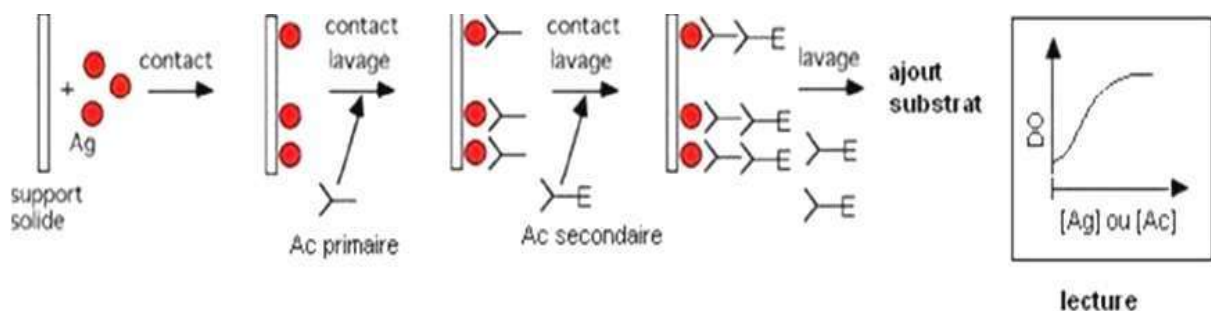


Figure 11 : ELISA indirect (Baco, 2011).

2-4 Test ELISA direct

Dans un premier temps, l'antigène à doser est déposé sur un support solide (généralement une plaque de microtitration). L'antigène est reconnu par un anticorps marqué par une enzyme. Les anticorps en excès, non liés à l'antigène, sont éliminés lors de l'étape de rinçage (**Figure 12**). L'ajout du substrat permet la réaction colorée dont la DO mesurée est proportionnelle à la quantité d'antigène fixée sur le support solide.

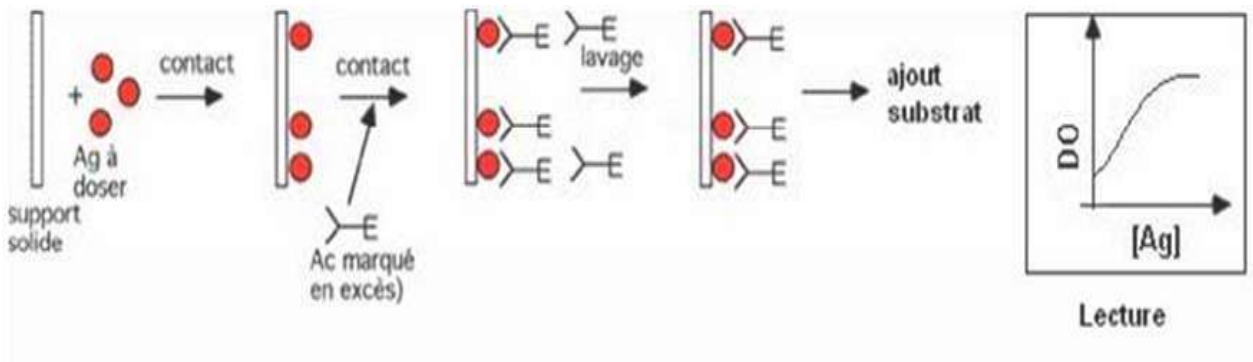


Figure 12 : ELISA direct (Baco, 2011).

2-5 Le DAS ELISA direct ou *Double Antibody Sandwich ELISA direct*

Dans ce cas de figure, l'antigène se trouve entre 2 anticorps spécifiques. L'utilisation de la DAS ELISA nécessite de posséder 2 anticorps monoclonaux reconnaissant des épitopes différents sur l'antigène (**figure 13**).

La **première** étape consiste à fixer sur le support, l'**anticorps de capture**. On incube la solution à 37°C pendant 2 heures puis lavage ou une nuit à 4°C puis lavage.

Lors de la **deuxième** étape, on dépose l'**échantillon possédant l'antigène** à identifier qu'on laisse incuber à 37°C pendant 2 heures puis lavage ou une nuit à 4°C puis lavage.

Dans une **troisième** étape, on fixe l'**anticorps de détection** marqué avec une enzyme sur l'antigène recherché. Pour cela, on dépose la solution d'anticorps dans les puits puis on incube l'ensemble à 37°C pendant 2 heures.

La **dernière** étape, on dépose une solution révélatrice contenant le substrat pour l'enzyme et on laisse incuber pendant 30 à 120 minutes. Le produit de réaction obtenu est soluble et coloré. L'intensité de cette coloration peut être mesurée à l'aide d'un photomètre.

NB: la différence entre le DAS ELISA direct et le **DAS ELISA indirect par le système biotine-streptavidine** réside au niveau de l'anticorps de détection. Pour le DAS ELISA indirect par le système biotine-streptavidine, l'anticorps de détection porte une molécule de biotine qui interagit avec la streptavidine couplé à une enzyme.

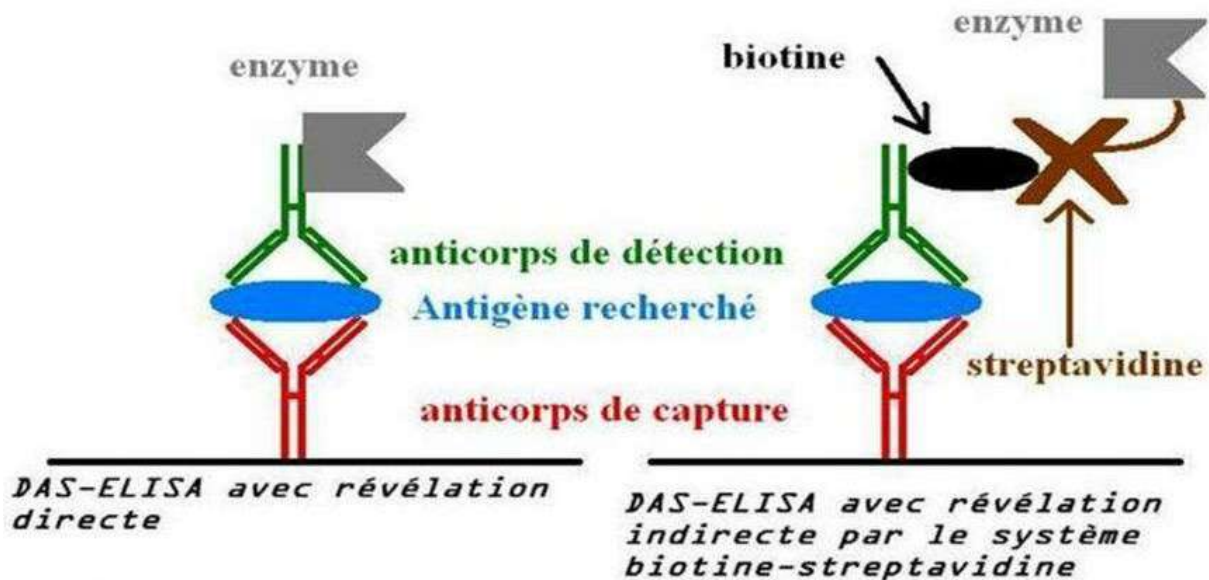


Figure 13. Double Anticorps Sandwich ELISA direct (Ling et Overby, 1972)

2-6 ELISA compétitif direct

2-6-1-Dosage d'antigènes

Les anticorps sont fixés sur le support solide. L'antigène à doser est mis en compétition avec des quantités connues d'antigène marqué. Plus la quantité d'antigène à doser sera forte, plus l'activité enzymatique sera faible et la DO mesurée sera faible. Elle sera donc inversement proportionnelle à la quantité d'antigène à doser (**Figure 14**).

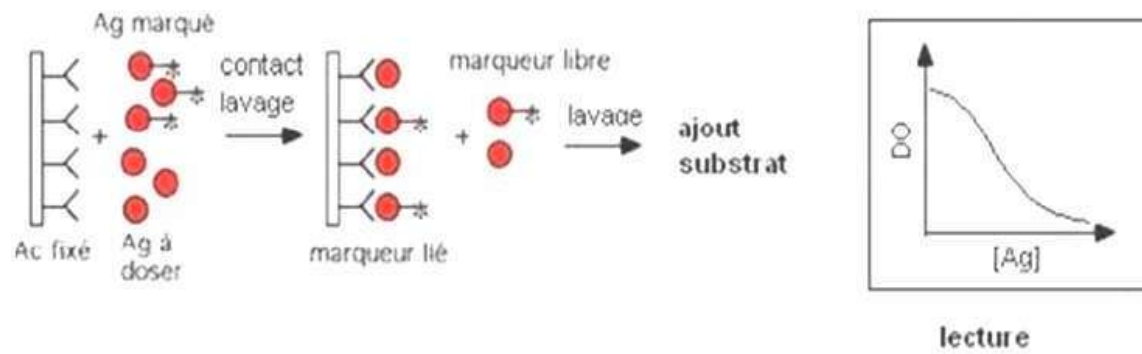


Figure 14 : ELISA compétitif direct, dosage d'antigènes (Baco, 2011).

2-6-2- dosage d'anticorps

L'ELISA direct compétitive permet aussi de mesurer une concentration inconnue d'anticorps (**Figure 15**). Pour cela, l'antigène est immobilisé sur le support. L'anticorps à doser est mis en compétition avec des quantités connues d'anticorps marqués. L'anticorps marqué se fixera d'autant plus que l'anticorps à doser sera présent en petite quantité. La DO mesurée sera donc inversement proportionnelle à la quantité d'anticorps à doser.

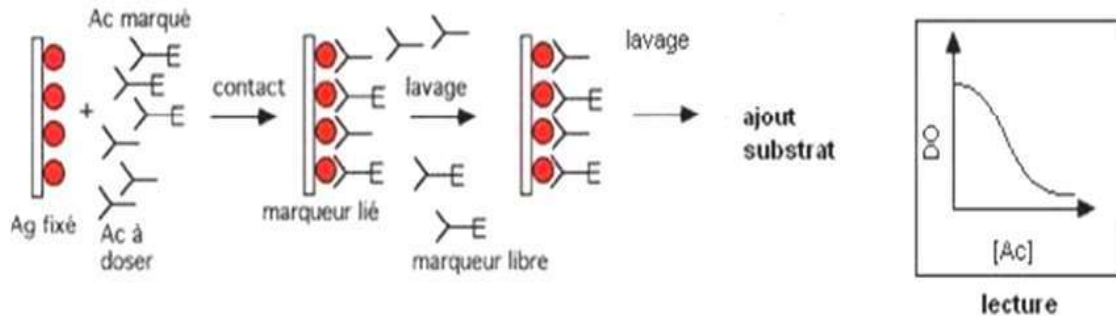


Figure 15 : ELISA compétitif direct, dosage d'anticorps (Baco, 2011).

V- TECHNIQUES D'HYBRIDATION DES ACIDES NUCLEIQUES

1- Le test Southern blot

1- 1- Principe du test Southern blot

Cette technique mise au point par M. Southern en 1975, consiste à traiter le fragment d'ADN que l'on désire étudier à l'aide d'une enzyme de restriction de manière à le réduire en petits segments. On réalise ensuite une électrophorèse de ces segments, puis le gel est dénaturé pour rendre l'ADN monobrin (indispensable à la fixation des sondes), et enfin on transfère (blot) tous sur une membrane de nylon.

On met ensuite à incuber dans les conditions physico-chimiques adéquates cette membrane en présence de la sonde, puis un lavage permet d'éliminer l'excès de sonde. La sonde ne va évidemment s'apparier qu'avec la séquence d'ADN dont on recherche la présence dans tout le fragment d'ADN de départ.

Il ne reste plus qu'à mettre en évidence la présence des sondes hybridées pour repérer la séquence d'ADN recherchée.

1-2-Intérêt de la technique Southern blot

Cette technique est intéressante pour mettre en évidence les remaniements génétiques (déletions par exemple), l'organisation des gènes les uns par rapport aux autres sur un chromosome et donc la disposition des groupes de gènes fonctionnellement apparentés. La technique de transfert –hybridation est également intéressante pour la recherche de séquences apparentées.

1-3-Etape de la technique Southern blot

Les étapes successives de cette technique sont les suivantes (**figure16**):

1-3-1-Extraction de l'ADN génomique

1-3-2-Digestion par des enzymes de restriction différentes du même ADN génomique :
L'ADN génomique est digéré par des enzymes de restriction différentes (dans le tube 1, on réalisera une digestion par l'enzyme 1 ; dans le tube 2, une digestion par l'enzyme 2 ; etc.). On peut bien entendu réaliser des digestions par deux enzymes dans un même tube. Dans ces conditions, on obtient un très grand nombre de fragments, mais seuls quelques fragments correspondent à une partie ou à la totalité du gène étudié.

1-3-3-Séparation électrophorétique des fragments d'ADN par électrophorèse dans un gel d'agarose.

Après séparation électrophorétique en gel d'agarose des fragments d'ADN bicaténaires obtenus par digestion enzymatique, on réalise une dénaturation des fragments par un traitement alcalin du gel d'électrophorèse. Ce traitement transforme les fragments d'ADN double brin (ou bicaténaires) en fragments d'ADN monobrin (ou monocaténaires).

1-3-4-Transfert des fragments monocaténaires du gel d'agarose à un support souple (feuille de nylon par exemple).

Le transfert des fragments monocaténaires du gel d'agarose à un support type nylon s'effectue par simple capillarité.

1-3-5-Fixation des fragments monocaténaires d'ADN sur le support souple et hybridation dans des conditions optimales de stringence avec une sonde complémentaire marquée à un radioisotope.

Les fragments monocaténaires d'ADN transférés sur un support solide souple (nylon) sont mis en présence d'une sonde qui va s'hybrider dans des conditions physico-chimiques bien définies. On parle de conditions optimales de stringence. La sonde s'apparie avec les fragments d'ADN monocaténaire selon les règles de complémentarité. De plus, elle est marquée avec un radioisotope (soit à son extrémité 5', soit à l'intérieur de la chaîne polynucléotidique).

1-3-6-Lavages et révélation

Après de nombreux lavages, le support solide est mis en contact avec un film photographique pendant plusieurs jours. Le film est ensuite révélé. Les bandes d'ADN monocaténaires hybridées avec la sonde radioactive sont visibles sous forme de bandes noires sur un fond blanc. La position de ces bandes par rapport à des témoins de poids moléculaire permet de déterminer la taille de ces fragments.

1-3-7-Résultat

La sonde va révéler la position sur la membrane des fragments d'ADN recherchés. Plusieurs situations peuvent se présenter :

- Les fragments d'ADN sont semblables au lieu d'hybridation de la sonde et à proximité de celui-ci et les fragments sont de même taille : il n'y a pas de polymorphisme.
- Un site de restriction au voisinage de la sonde n'est présent que chez l'un des deux individus; les fragments n'ont pas la même taille et ne sont donc pas à la même hauteur sur le gel: il y a polymorphisme de sites de restriction.
- Les sites de restriction sont identiques, mais une séquence supplémentaire est présente chez l'un des deux fragments. Les vitesses de migration des fragments et donc leur position sur le gel sont donc, ici aussi, différentes : il y a polymorphisme d'insertion/délétion.

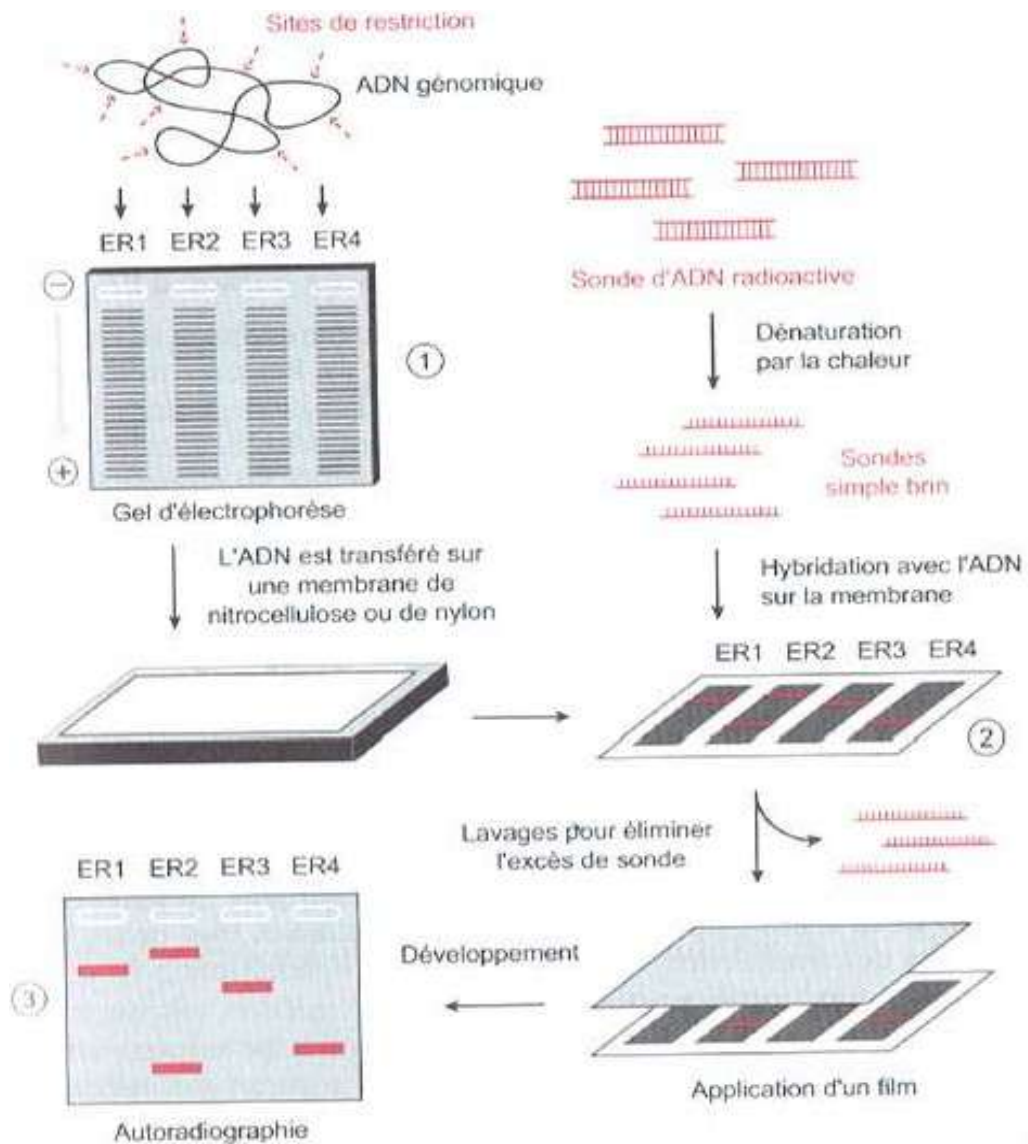


Figure 16 : Principe de la technique de transfert-hybridation de Southern (Maftah et al. 2011)

2- le test Northern blot

Northern blot est une technique d'ARN blot qui a été développée en par Alwine, Kemp, et Stark en 1977 à l'Université Stanford. Elle dérive du Southern blot.

Cette technique permet de déterminer la taille d'une ARNm et d'étudier son profil d'expression. Les ARNm sont extraits et dénaturés par chauffage, pour éliminer toutes les régions double brin, et soumis, côte à côte, à une électrophorèse en gel d'agarose dénaturant.

Les ARNm séparés sont ensuite transférés par capillarité à une membrane de nylon (ou de nitrocellulose). La membrane est alors incubée avec une sonde ADNc simple brin ou avec une sonde ARN antisens radioactive. L'hybridation se fait entre la sonde marquée et l'ARNm qui lui est complémentaire.

La sonde en excès est ensuite éliminée par des lavages successifs et la membrane de nylon est exposée à un film sensible aux rayons X. Comme l'ARNm est hybridé à la sonde radioactive, il peut être visualisé par autoradiographie (**figure 17**).

La visualisation d'un ARN par une sonde permet de :

- apprécier sa distribution dans les tissus et étudier son abondance relative
- déterminer sa taille
- détecter les intermédiaires de maturation et les différentes formes d'épissage de l'ARN

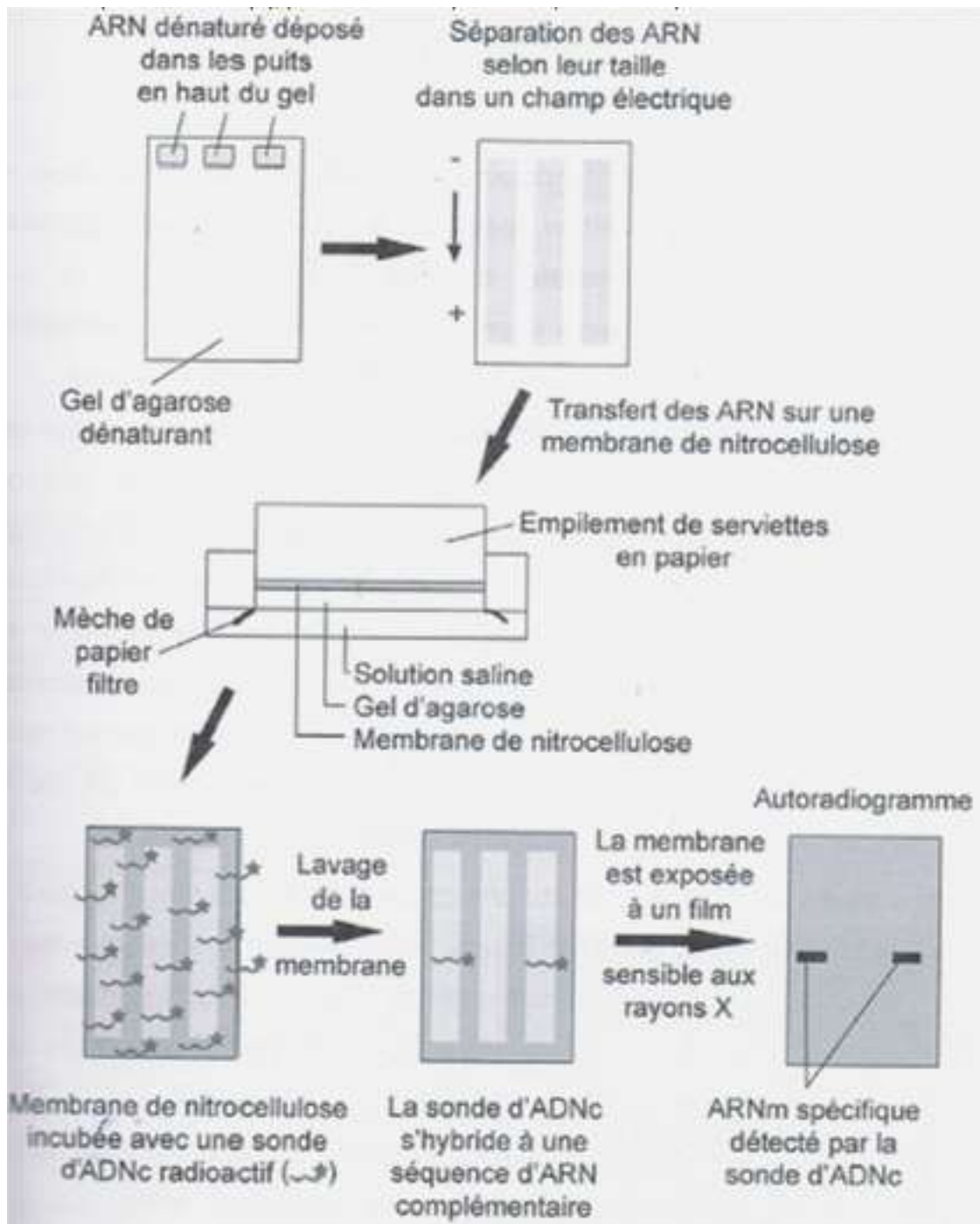


Figure 17: la technique de Northern blot (Chanoine 2007).

METHODES D'INTRODUCTION DE L'AND DANS LES CELLULES (LA TRANSFECTIONS)

1. Définition

La transfection décrit l'introduction du matériel étranger dans les cellules eucaryotiques utilisant un vecteur de virus ou des autres moyens de transfert.

- **L'infection** d'une cellule par un virus, est la voie naturelle par laquelle passent toutes les maladies à virus. Cette voie nécessite un site de reconnaissance sur les cellules.
- **La transfection** de gènes dans des cellules est une voie non naturelle d'infecter des cellules par un gène. Dans ce cas le gène est vectorisée par des polycations. Il n'a pas besoin de sites de reconnaissance membranaire.

2. Méthodes de transfert directe de gène

2.1 Transfection par le PEG

Le Polyéthylène Glycol est un polymère non toxique de haut poids moléculaire qui déstabilise de façon réversible les membranes plasmiques, permettant ainsi le transfert de l'ADN au travers de la membrane. Cette méthode chimique a permis l'obtention de maïs résistant à une matière active herbicide, le glufosinate. Elle est également utilisée sur la betterave.

2.2 Transfection par phosphate de calcium

L'une des plus classiques et des moins chères, mais aussi des moins fiables, est la transfection par phosphate de calcium, découverte par S. Bacchetti et F. L. Graham en 1977. Une solution saline tamponnée par HEPES (HEPES-buffered saline solution - HeBS) doublement concentrée et contenant des ions phosphate est combinée avec une solution de chlorure de calcium contenant l'ADN à transférer. Lorsque ces deux solutions sont combinées, il se forme un fin précipité de phosphate de calcium, liant l'ADN à transférer à sa surface.

La suspension contenant le précipité est alors ajoutée aux cellules à transférer (habituellement une culture cellulaire monocouche). Par un procédé non entièrement compris, les cellules incorporent le précipité contenant l'ADN (les ions Ca^{2+} masquent

la polarité négative de l'ADN lui permettant d'entrer dans la cellule).

2.3 Transfection par le DEAE-Dextran

Découverte par Vaheiri et Pagano en 1965, la captation des protons lysosomaux est assurée par un agent lysosomotropique (chloroquine). Par un processus encore mal connu, le complexe ADN-polycation quitte l'endosome, et est transloqué dans le noyau, où il est exprimé (transfection transitoire) ou intégré au génome puis exprimé (transfection stable).

La transfection de cellules de mammifères cultivées à l'aide de diéthylaminoéthyle (DEAE)-dextrane/ADN peut être une alternative intéressante aux autres méthodes de transfection dans de nombreuses circonstances.

Les principaux avantages de la technique sont sa simplicité et sa rapidité relatives. Les inconvénients comprennent l'inhibition de la croissance cellulaire et l'induction de changements morphologiques hétérogènes dans les cellules.

2.4 Technique des liposomes

On parle parfois de lipotransfection ou lipofection. Cette technique consiste à encapsuler les fragments d'ADN portant les gènes à transférer dans les structures sphériques appelées liposomes constituées de bicouches lipidiques ou phospholipidiques ressemblants à des membranes plasmiques.

Ces liposomes fusionnent, spontanément ou sous l'influence de la présence de PEG dans le milieu, avec la membrane plasmique de protoplastes préparés à partir d'une culture de cellules isolées et libèrent leur contenu dans le cytoplasme de la cellule végétale (**figure 18**).

Un certain nombre de ces molécules d'ADN peuvent être détruites sur place des nucléases. Une minorité d'entre elles parvient dans le noyau et peut s'intégrer au génome de la cellule pour être à l'origine d'un OGM.

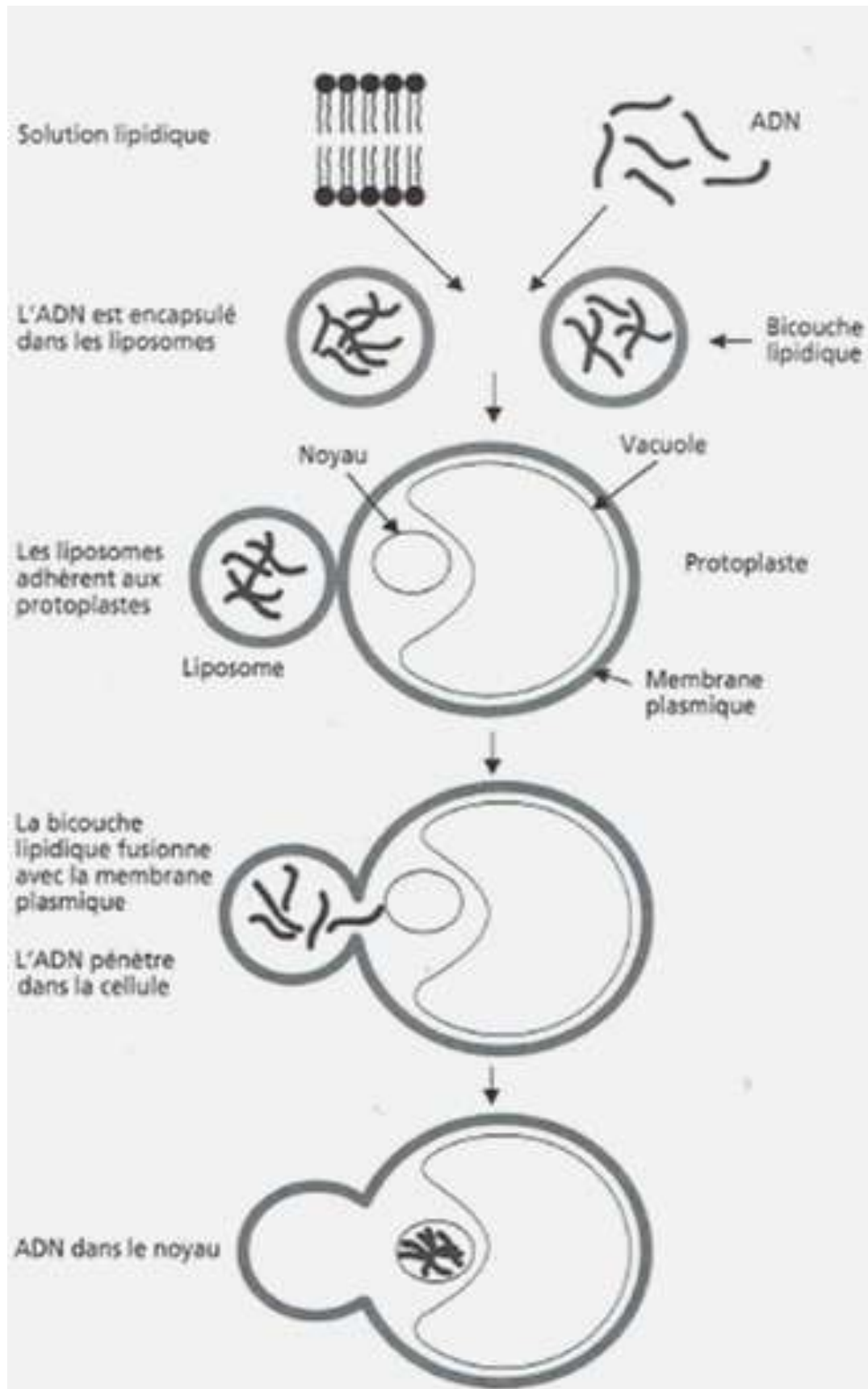


Figure 18 : transfert de gènes par l'intermédiaire de liposomes (Tourte, 2001)

2.5 L'électroporation

L'électroporation est une technique qui a été développée dans les années 80 et qui exploite les propriétés physiques des membranes cellulaires. La technique consiste en un transfert direct de l'ADN dans le cytoplasme de la cellule hôte. Des pores transitoires sont créés dans la membrane des cellules hôtes lorsqu'elles sont soumises à une brève impulsion électrique, permettant ainsi le passage de l'ADN (**figure19**)

Cette technique présente l'avantage de pouvoir- être utilisée sur tous les types de cellules. Elle nécessite cependant un appareillage particulier, mais son efficacité est nettement supérieure puisque, dans certains cas, près de 90 % des cellules intègrent l'ADN recombinant dans leur cytoplasme. L'électrolocation est requise pour certains types cellulaires comme les cellules ES (*Embryonic Stem*). Elle est également très souhaitable pour les gros fragments d'ADN (BAC, YAC...).

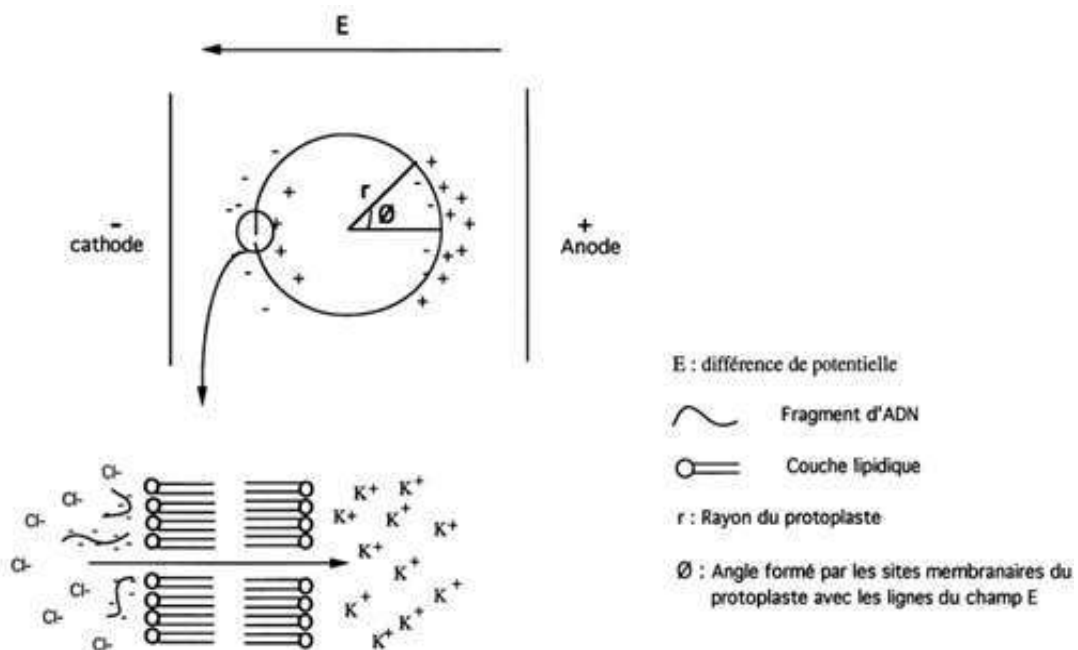


Figure 19 : Diagramme d'une cellule exposée à un champ électrique E (Jones et al. 1987).

2.6 Biolistique ou canon à ADN

Cette méthode a été développée dans le but d'introduire des gènes dans des cellules entières afin de s'affranchir des protoplastes et des difficultés de régénération rencontrées

pour certaines espèces végétales. Elle est également applicable aux cellules animales. Son principe consiste à délivrer en force de l'ADN sur des tissus par propulsion. La force de propulsion est obtenue soit par explosion d'une poudre dans une balle, soit par décompression d'un gaz (l'hélium le plus souvent).

La méthode consiste à introduire l'ADN nu tout d'abord précipité sur des billes de tungstène ou d'or d'environ 1 μm de diamètre. Ces micro-projectiles sont propulsés à l'aide d'un macro-projectile sur les cellules. Après arrêt du macro-projectile pour éviter qu'il ne détruise les cellules, certaines des micro-billes de tungstène vont pénétrer dans les cellules, transportant avec elles l'ADN. Cet ADN, comme dans le cas du transfert direct de gènes dans des protoplastes, doit atteindre le noyau, s'intégrer dans une partie du génome et s'y exprimer.

Les explants de la plante, après "bombardement", sont mis à cultiver sur un milieu sélectif afin de régénérer des plantes transgéniques. Cette approche a permis d'obtenir de nombreuses plantes transgéniques pour des espèces jusqu'alors réfractaires, notamment le maïs et le blé.

Plusieurs types d'appareils sont disponibles dans le commerce, soit à décharge de poudre, soit à décharge d'hélium. Des miniaturisations ont été réalisées afin de permettre notamment l'application de la biolistique à la transformation de tissus animaux *in vivo* sous anesthésie.

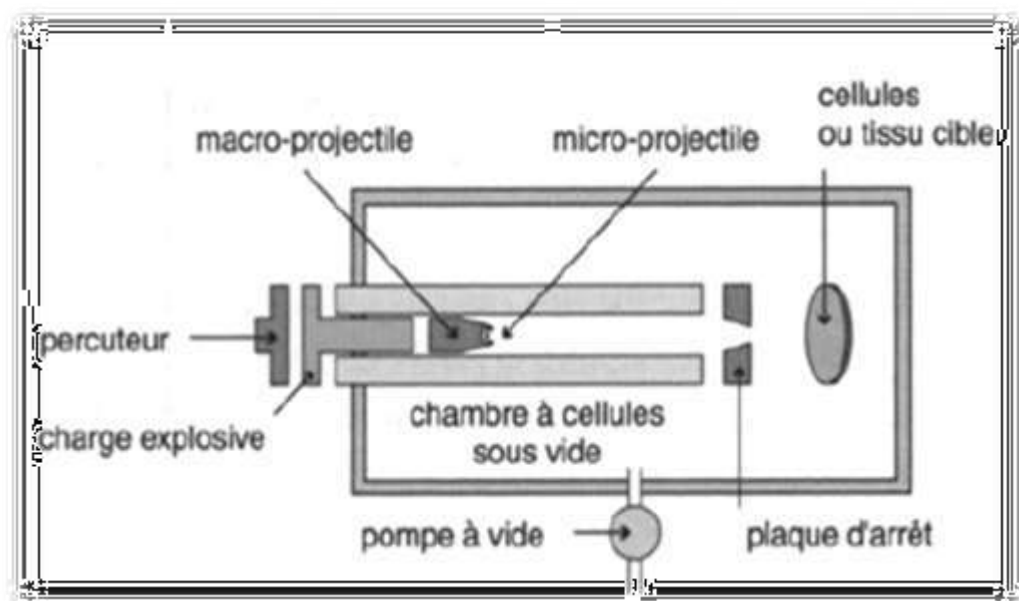


Figure 20 : Schéma du canon à particules par charge explosive (Klein et al. 1987)

2.7 Agrobiolistique

L'agrobiolistique est une combinaison de deux techniques de transfection qui associe la biolistique à la transformation indirecte par les agrobactéries. En effet, la technique de biolistique continue à évoluer et certains chercheurs ont cherché à associer plusieurs techniques pour obtenir la transformation génétique de quelques espèces peu accessibles aux transformations par l'une des techniques citées (**figure 21**)

C'est ainsi que l'on en est venu à utiliser le canon simplement pour provoquer des microblésures dans les cellules qui sont ensuite soumises à des agrobactéries porteuses du gène à transférer les microblésures favorisant l'envahissement du tissu par les agrobactéries et le rendement de la transformation se trouve ainsi fortement augmenté.

2.8 La micro-injection

Pour la technique de la micro-injection le matériel qui s'avère le plus favorable est le protoplaste. Il s'agit de cellules isolées dans on a retiré les parois en les faisant macérer dans une solution enzymatique.

Pour parvenir à ce résultat les cellules sont séparées les unes des autres par suite d'une digestion de la paroi pectique par une solution de pectinase.

Ces cellules sont ensuite, et parfois simultanément, traitées par un mélange de cellulase jusqu'à dissolution complète de la paroi.

La pression osmotique du milieu est ajustée par adjonction de sels variés ou de manitol afin d'éviter l'éclatement du protoplaste. La difficulté majeure alors rencontrées consiste dans un bon repérage du noyau car celui est souvent masqué par des chloroplastes et repoussé latéralement par la grande vacuole centrale.

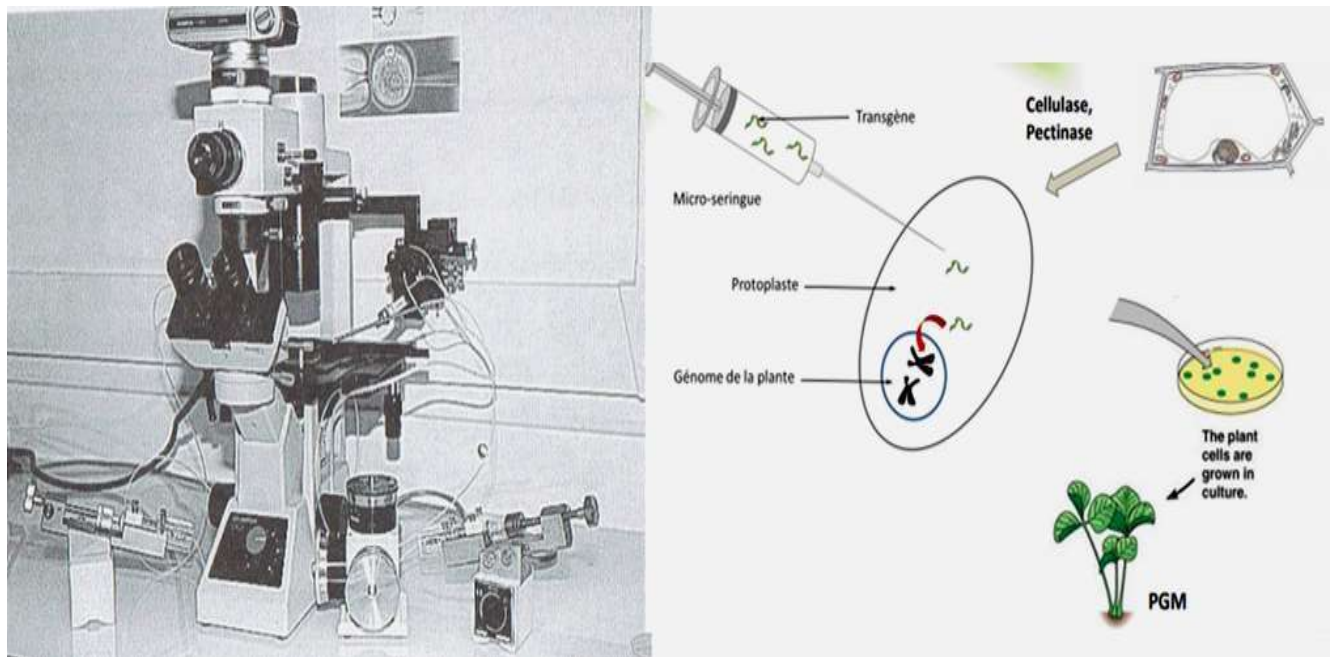


Figure 21 : Dispositif permettant la micro-injection d'ADN dans des protoplastes végétaux (Tourte, 2001)

3. Transfert indirect de gène par *Agrobacterium tumefaciens*

3.1 La bactérie

Agrobacterium tumefaciens est un bacille gram négatif. Cette bactérie appartient à la famille Rhizobiaceae, tout comme *Agrobacterium rhizogenes*. Il s'agit de bactéries présentes dans le sol, qui sont pathogènes des plantes. La première est responsable de la galle du collet, la seconde de la maladie « hairy root », qui est une maladie sur racine

3.2. Structure du génome d'*A. tumefaciens* C58

La souche modèle du biovar 1, *Agrobacterium tumefaciens* C58 a été complètement séquencée deux fois. Elle possède quatre réplicons : un chromosome circulaire (CcC58, 2,8Mb) comportant la plupart des gènes impliqués dans les processus biologiques essentiels à la survie de la bactérie (synthèse d'acides nucléiques, traduction, métabolisme des acides aminés ...), un chromosome linéaire (LcC58, 2Mb), un plasmide cryptique At (pAtC58, 0,55Mb) et un plasmide Ti (« Tumour-inducing », pTiC58, 0,2Mb). Ce dernier plasmide porte le fragment d'ADN qui est transféré dans la cellule végétale, appelé ADN-T « Transferred-DNA » et les gènes de virulence *vir* qui régissent l'intégration de l'ADN-T dans la cellule hôte.

Le génome d'*A. tumefaciens* C58 contient 5419 gènes codant pour des protéines dont plus de 60% possèdent une fonction putative attribuée par homologie de séquences. Les familles les plus représentatives sont les adénosines triphosphates (ATPases) et les transporteurs de type ABC (ATP binding cassette).

3.3. Le plasmid Ti

Plasmide Ti = pTi (= plasmid tumor inducing) de la bactérie *Agrobacterium*, d'une taille de 250 kb environ, il comprend quatre grandes régions: la région T ou ADN-T (qui correspond à l'ADN transféré à la plante) définie par les bordures droite (RB, Right Border) et gauche (LB, Left Border); la région de virulence Vir nécessaire au transfert de l'ADN-T; la région qui code les enzymes du catabolisme des opines; la région Tra impliquée dans le transfert du plasmide Ti entre agrobactéries (**figure 22**).

Ce plasmide est utilisé comme vecteur de la construction génétique désirée ; les gènes oncogènes sont remplacés par le gène d'intérêt agronomique + un ou plusieurs gènes de sélection, une construction génétique introduite dans la bactérie avirulente, sera transférée dans la plante et intégrée à son génome. Cependant, Il existe quelques plantes telle que les céréales, qui sont insensibles aux bactéries de la galle du collet et ne peuvent donc pas être ainsi modifiées. D'où l'utilisation d'autres techniques de transfert de gènes d'intérêt : Biolistique (canon à particules), Electroporation (electrotransfert) et Microinjection.

La carte génétique du plasmide Ti est constituée de quatre régions importantes (**Figure 22**) :

➤ **ADN-T/ Région transférée de la bactérie à la cellule végétale.**

Cette région est flanquée de deux zones de bordures (FD à droite et FG à gauche), importantes pour la réalisation du transfert. L'ADN-T comporte une région permettant le développement de la tumeur (galle) chez la plante infectée.

L'ADN-T comporte aussi les gènes permettant la synthèse et la libération des opines par les cellules végétales.

➤ **VIR/ Région de virulence.**

Cette région comporte une série de gènes, qui permettent la fixation de la bactérie aux cellules végétales et le transfert de l'ADN-T.

➤ **OCC/ Région de catabolisme des opines.**

Cette région permet à la bactérie d'utiliser les opines libérées par le végétal suite à son infection par l'ADN-T.

➤ **ORI Région de réplication.**

Cette région permet au plasmide de se multiplier dans la bactérie

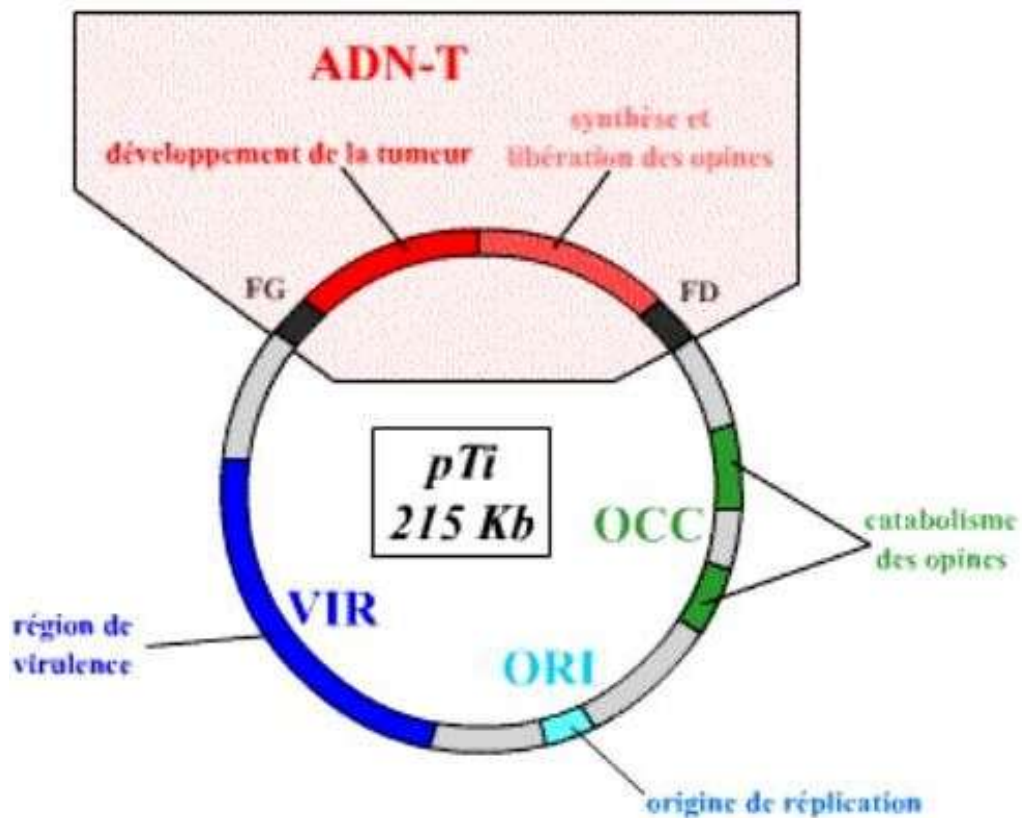


Figure 22 : Carte génétique du plasmide Ti (Beijersbergen et Hooykaas, 1993).

3.4. Processus d'infection d'*Agrobacterium tumefaciens*

Le pouvoir pathogène d'*Agrobacterium tumefaciens* est conféré à la présence d'un plasmide appelé pTi. Ce plasmide possède toutes les fonctions requises pour l'infection

d'une cellule végétale. Néanmoins, certains gènes chromosomaux d'*Agrobacterium tumefaciens* sont également impliqués dans le processus d'infection de la plante.

Plus schématiquement, le cycle d'infection d'*A. tumefaciens* se décompose en trois étapes :

- la reconnaissance bactérie / hôte,
- le transfert de l'ADN-T,
- l'expression des gènes de l'ADN-T qui induisent le développement de la tumeur.

3.4.1 Reconnaissance bactérie/cellules végétales blessées

3.4.1.1 Fixation aux cellules hôtes

Lors d'une blessure, la plante libère des molécules chimio-attractantes telles que des sucres et des composés phénoliques attirant ainsi la bactérie qui se déplace vers la blessure à l'aide de ses flagelles en suivant le gradient de concentration. Pour établir un contact physique avec son hôte, *A. tumefaciens* reconnaît des protéines localisées sur la paroi végétale et apparentées à la vitronectine, protéine impliquée dans le maintien de la structure et dans la cohésion des cellules végétales. Ces protéines sont reconnues par des polysaccharides acylés de type 1-2 glucane, synthétisés et excrétés par les gènes du chromosome bactérien tels que *exoC*, *chvA* et *chvB*. L'interaction du polysaccharide avec la protéine de type vitronectine entraîne la synthèse de filaments de type cellulose stabilisant et renforçant ainsi l'attachement de la bactérie sur la cellule hôte.

3.4.1.2 Activation des gènes vir

L'activation des gènes de virulence *vir* est une étape indispensable pour le processus de transgénése. Les gènes *vir* sont activés par trois types de signaux chimiques que la plante relâche en cas de blessure :

- les composés phénoliques dérivés du syringol (le plus actif étant l'acétosyringone) ;
- les monosaccharides tels que le glucose et l'acide glucorinique ;
- et un pH acide.

Les gènes *vir* présents sur la partie non transférable du plasmide Ti ont besoin d'être induits par l'exsudat des cellules blessées pour être exprimés. Les composés phénoliques synthétisés par la plante sont reconnus par la protéine *VirA* (récepteur présent dans la membrane interne de la bactérie). Après fixation des composés, la protéine *VirA* s'auto-

phosphoryle puis phosphoryle la protéine régulatrice cytoplasmique VirG qui se fixe sur la boîte vir qui active la transcription des promoteurs des gènes vir. Cette dernière étape permet de stabiliser le contact avec l'hôte et permet d'engager le processus de transfert du T-DNA.

L'acidité du milieu externe est le troisième élément intervenant dans l'activation des gènes vir. Elle active l'expression de virG via une protéine chromosomale ChvI qui interagirait sur l'un des deux promoteurs de virG.

3.4.2. Transfert T-DNA

3.4.2.1. Production du brin T

L'expression des gènes vir conduit à la production d'un brin d'ADN-T. Pour cela, les endonucléases VirD1 et VirD2 vont agir spécifiquement pour couper un fragment de plasmide Ti. Grâce à son activité hélicase, la protéine VirD1 sépare les deux brins d'ADN-T. La protéine VirD2 quand à elle clive l'ADN-T au niveau des séquences répétées de 25 nucléotides, spécifiques des régions flanquantes de ce fragment. VirD2 se fixe covalamment à l'extrémité 5' du brin d'ADN-T.

Le complexe VirD2/ADN-T se sépare du reste du plasmide, et ainsi le brin T est formé et il va pouvoir s'orienter afin d'être transféré dans la cellule hôte pendant que le plasmide Ti est régénéré à l'aide de la machinerie de réparation de l'ADN de la bactérie.

3.4.2.2. Translocation du brin T dans la cellule végétale

Le complexe brin T/ VirD2 ainsi que quatre autres protéines effectrices bactériennes (VirE2, VirE3, VirF et VirD5) sont transférés dans la cellule végétale. Ce transfert requiert une machinerie protéique particulière qui forme un canal entre la bactérie et la cellule hôte.

Cette structure est un système de sécrétion de type IV composé d'un assemblage de 12 protéines : 11 protéines VirB et de la protéine VirD4.

La protéine VirB1 hydrolyse localement le peptidoglycane de la membrane bactérienne, puis les autres protéines s'assemblent autour de VirD4 pour former le transporteur T. Le complexe multiprotéique formé est composé en trois sous groupe. Le pilus T composé principalement de VirB2 et des ATPases VirB4, VirB11 et VirD4 fournissent l'énergie nécessaire à l'assemblage du transporteur T et au transfert du brin T. Les protéines VirB6 à VirB10 constituent le canal de translocation traversant les

membranes bactériennes. Enfin les protéines VirB2, VirB5 et VirB7 sont impliquées dans le contact bactérie/ cellule végétale.

3.4.2.3. Intégration dans le génome de l'hôte

A son entrée dans cellule végétale, le brin T est recouvert de protéines VirE2 afin de le protéger des nucléases végétales et de lui conférer la structure nécessaire pour son transport jusqu'au noyau de la cellule hôte. On le nomme complexe T. Pour le moment, les données expérimentales présents dans la littérature ne permettent pas de déterminer précisément où se forme le complexe T mais la possibilité que le complexe se forme avant ou lors du passage dans le canal de translocation est l'hypothèse la plus récente.

a- Importation du complexe T dans le noyau

Dans le cytoplasme de la cellule végétale, le complexe T est dirigé vers le noyau de la cellule à l'aide de protéines cargos telles que la dynéine. De plus, il a été démontré que des protéines de la cellule hôte de la famille des importines se fixent sur les séquences NLS (Nuclear Localisation Signal) de VirD2 et VirE2, facilitant ainsi l'entrée du complexe T dans le noyau. La protéine VirE2 interagit avec la protéine de plante VIP1 (VirE2-Interacting Protein 1). En réponse au stress induit par l'entrée de protéines dans la cellule de plante, VIP1 est activé par phosphorylation par la protéine MPK3. Dans de telles conditions, VIP1 est recrutée dans le noyau où elle y co-transporte VirE2 et donc l'ADN-T.

b. Intégration de l'ADN-T dans le génome végétal

L'intégration de l'ADN-T dans le génome de la plante se fait de façon aléatoire, avec une préférence pour les régions transcriptionnellement actives de la chromatine. Actuellement, deux modèles sont proposés. Le premier se base sur le principe d'une recombinaison entre l'ADN-T simple brin T et la séquence d'ADN de la plante dans des régions où il y aurait une « micro-homologie ». La présence de VirD2 sur la partie 5' du brin T permettrait la coupure de l'ADN végétal et ainsi l'intégration du brin d'ADN-T.

Au moment de l'intégration du brin d'ADN-T, VirD2 et VirE2 sont décrochés permettant ainsi la synthèse du brin complémentaire de l'ADN-T et l'incorporation d'une copie double brin dans le génome de la plante.

Le deuxième modèle se base sur une recombinaison non homologe suite à des cassures de l'ADN végétal. Ceci suppose que le brin d'ADN-T est répliqué pour former un double brin T qui s'intègre au niveau d'une cassure dans le génome de la cellule végétale. Cette réplication non homologe explique plus facilement la présence de copies répétées d'ADN-T et la présence fréquente de plusieurs ADN-T d'*Agrobacterium* de souches différentes dans un même génome de cellule végétale (**Figure 23**).

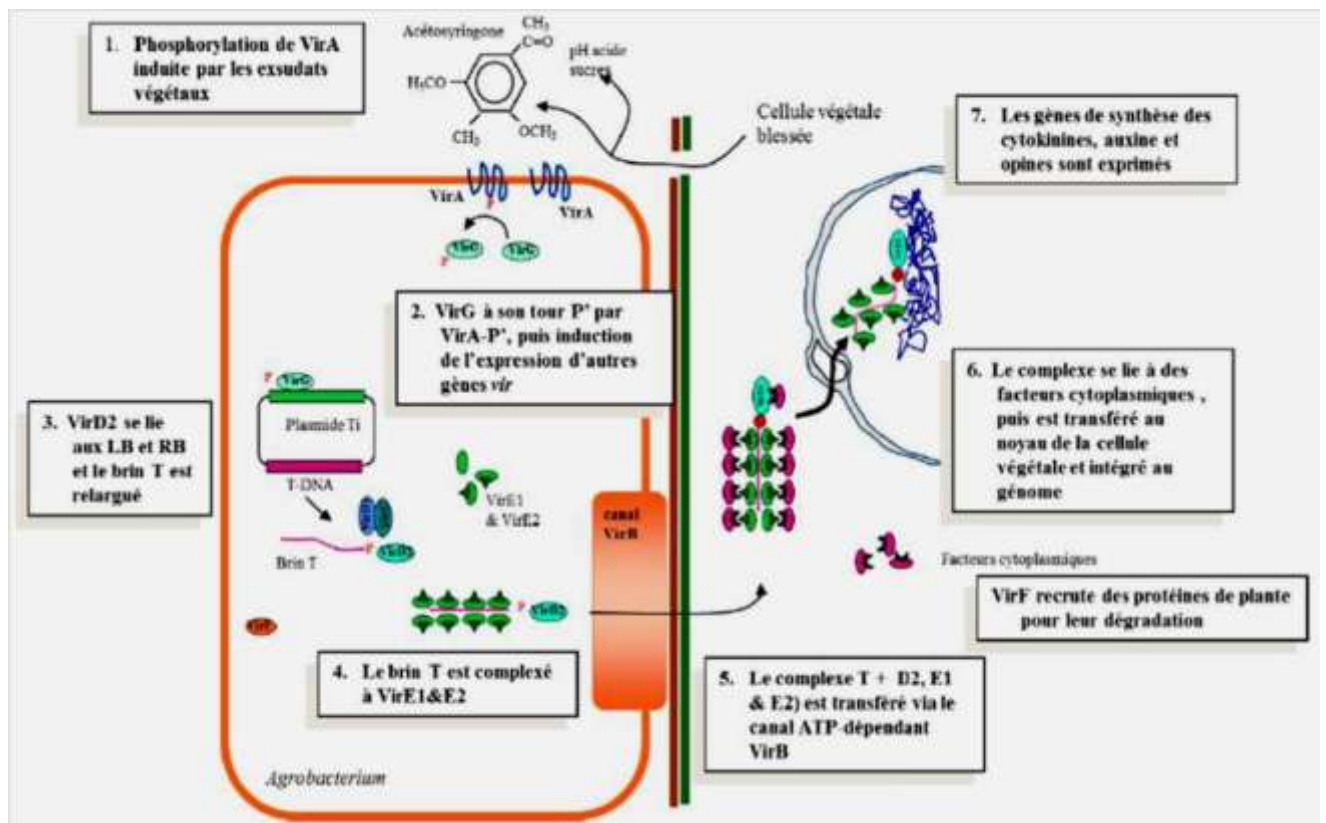


Figure 23: Chronologie de l'infection de la cellule par *A. tumefaciens* et transfert de l'information génétique (Marty, 2018).

Références bibliographiques

- Baco E (2011) Synthèse d'haptènes de phycotoxines pour l'élaboration d'un immunocapteur. Thèse de doctorat. Univ. Catholique bordeaux I. 155p
- Bajpai B (2013) High Capacity Vectors. *Advances in Biotechnology* 22: 1-10
- Bass JJ, Wilkinson DJ, Rankin D, Phillips BE, Szewczyk NJ, Smith K, Atherton P J (2017) An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research *Scand J Med Sci Sports* 27: 4-25
- Beaumont S (2007) *Biologie moléculaire PCEM*, Dunod, Paris 305p
- Beijersbergen A, Hooykaas PJJ (1993) The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. in: Nester, E.W., & Verma, D.P.S. (Ed.). *Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp: 37-49
- Chanoine C (2008) *Bases cellulaires et moléculaires du développement méthodes et exercices*. Paris, Edition Ellipses 260p
- Delarue M (2007) CHAPITRE VI : créer et utiliser le polymorphisme pour étudier un processus biologique. Université pierre et marie curie Pris 6. [En ligne]. http://genetique.snv.jussieu.fr/OLD%20SITE/licenceLV203_details.htm
- Demain AL, Vaishnav P (2009) Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv* 27 : 297–306
- Kacem NS (2017) Sélection in vitro pour la tolérance au stress hydrique chez le blé dur (*Triticum durum* Desf): approche protéomique, transcriptomique et génétique. Thèse de doctorat. Univ. Frères Mentouri. Constantine. 181p
- Klein RM, Wolf ED, WU R, Sanford JC (1987) High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. Reproduit avec l'autorisation de Nature. *Macmillan Magazines Ltd.* 327 : 70-73
- Lescuyer P, Chevallet M, Rabilloud T (2004) L'analyse protéomique : concepts, réalités et perspectives en thérapeutique M/S. *médecine sciences* 20 : 587–592
- Ling CM, Overby LR (1972) Prevalence of hepatitis B virus antigen as revealed by direct radioimmunoassay with ¹²⁵I-antibody. *J. Immunol* 109: 834-841
- Maftah A, Petit JM, Julien R (2018) *Mini manuel de biologie moléculaire*. Paris, Edition DUNOD 221p
- Marty L (2018) Structures et spécificités de Protéines Périplasmiques de Fixation pour les mannityl-opines chez *Agrobacterium tumefaciens*. Thèse de doctorat. Univ. Université Paris-Saclay. 149p

Références bibliographiques

- Pronovost M., (2013) Chapitre 4 – La génétique – Biotechnologies [En ligne]. http://mpronovost.ep.profweb.qc.ca/BIONP1/bionp1_biotechnologie.html.
- Reymond N (2005) Bioinformatique des puces à ADN et application à l'analyse du transcriptome de *Buchnera aphidicola*. Thèse de doctorat. Univ. Institut national des sciences appliquées de Lyon. 326p
- Singh A, Kumar V, Poonam, Gupta H R (2014) Genetically modified food: a review on mechanism of production and labeling concern. *Adv Plants Agric Res* 1 :121–127
- Smith EF et Townsend CO (1907) A plant-tumor of bacterial origin. *Science*. 25 : 671-673
- Tagu D, Moussard C (2003) Principes des techniques de biologie moléculaire. Paris : INRA 176p
- Tourte Y (2001) Les OGM : la transgénèse chez les plantes. Paris, Editions Dunod 144 p