

Mise au point sur le clonage des gènes, la préparation et l'utilisation des sondes d'ADN

Nicole MONTENY ⁽¹⁾

Résumé

La transformation bactérienne observée par Griffith en 1928 n'a conduit à la naissance du génie génétique qu'une quarantaine d'années plus tard, lorsque le facteur transformant a pu être identifié comme étant une molécule d'acide désoxyribonucléique (ADN), le plasmide.

D'autres méthodes se sont développées qui permirent l'essor des nouvelles techniques :

1. Les enzymes de restriction, endonucléases spécifiques, reconnaissent une séquence déterminée de paires de base dans un ADN et clivent les deux brins en générant des extrémités « cohésives » ou des « bouts francs » ; chaque génome soumis à une enzyme de restriction sera découpé en un nombre de fragments déterminé par l'existence des sites de reconnaissance (ou sites de restriction) qu'il renferme.

2. Le fragment que l'on souhaite cloner est séparé par électrophorèse ; lié à un vecteur, il forme la molécule d'ADN recombinant.

3. Le vecteur est généralement un plasmide, molécule d'ADN bactérien, extrachromosomique, circulaire et bicaténaire. Les quelques gènes qu'il porte concernent généralement des résistances à des antibiotiques.

4. La sélection des cellules transformées se fait sur la base des caractères de résistance que le plasmide recombinant confère à la cellule dans laquelle il est introduit.

5. Le clonage du fragment choisi est obtenu en faisant proliférer la cellule transformée suivant les techniques habituelles en culture cellulaire. Le fragment d'ADN, extrait de cette population monoclonale, dénaturé pour l'amener au stade simple brin, marqué par des éléments radioactifs ou fluorescents, constituera la sonde capable de s'hybrider sur un ADN préparé par ailleurs.

Plusieurs exemples d'utilisation de sondes d'ADN sont cités dans cet article.

Mots-clés : Enzymes de restriction - ADN recombinant - Plasmide - Sélection des cellules transformées - Clonage - Sonde.

Summary

GENE CLONING AND DNA PROBE PREPARATION AND USE. Bacterial transformation was first observed by Griffith in 1928 and led to the birth of genetic engineering in the seventies when the transforming factor was identified as a DNA molecule, the plasmid.

Several other methods were developed which helped to spread the new techniques :

1. DNA is cut using restriction enzymes and bound to another DNA fragment, from a different origin.

2. Transfer of the chimaeric DNA to a replication system by means of a vector.

3. Selection of the transformed cells constituting a clone which bears the requested characteristic.

The techniques are based essentially on the properties of restriction enzymes and plasmids.

Restriction enzymes : specific endonucleases, being able to cut any DNA at different sequences of bases. They may

(1) Biologiste ORSTOM, Laboratoire d'Entomologie médicale, 70-74, route d'Aulnay, 93140 Bondy.

generate blunt or sticky ends, for example : *Eco RI* (extracted from *Escherichia coli*) identifies the sequence $5'G^*AATT C 3'$ and cleaves (=*) both strands of DNA between G and A giving sticky ends while the enzyme *Hae III* (extracted from *Haemophilus aegyptus*) identifies the sequence $5'GG^*CC 3'$ and generates blunt ended fragments.

Each genome, when submitted to a given restriction enzyme, is cut into a precise number of fragments depending upon the number of restriction sites it bears.

The fragments are separated by gel electrophoresis which enables to select the right one to be joined to the vector, thus creating a recombinant DNA molecule by the enzymatic ligation process.

Plasmids

Cells (most of the time bacteria, in particular *E. coli*) are treated to accept and incorporate an exogenous DNA carried by a recombinant vector. Plasmids are generally used.

Plasmids are self replicating extrachromosomal DNA found in bacteria. These circular double stranded molecules usually carry a few genes, including resistance to some antibiotics.

Selection of transformed cells

The most useful plasmids are those which have a restriction site in one (A) out of two resistance genes (A and B) so that transformed cells may be selected on the basis of resistance for one substance (B : the plasmid has been incorporated) and lack of resistance for a second drug (A : the plasmid is the recombinant form and bears the exogenous DNA inserted in the resistance gene A).

Multiplication of the transformed cells is then processed following common cell culture methods and yields a clone in which DNA bears an exogenous gene. This gene, after extraction, purification by gel electrophoresis, denaturation to obtain single stranded molecules, labelling by radio- or fluorescent elements, will constitute a probe used to visualise the presence of the original gene in a complex DNA pool by hybridization.

Several applications of this technique are mentioned in this paper.

Key words : Restriction enzymes - Recombinant DNA - Plasmids - Selection of transformed cells - Cloning - Probe.

Introduction

Les espèces sont déterminées et définies par leurs gènes. Ces derniers sont situés sur les chromosomes qui portent, dans la majorité des cas, la plus grande part de l'information génétique. Il y a cependant des exceptions : dans certaines bactéries, il existe des fragments d'ADN, appelés plasmides, qui se situent en dehors de ces structures.

L'observation du *prélèvement*, par un plasmide, d'un petit fragment d'ADN chromosomique de sa propre cellule et son *transfert* à une bactérie d'une autre souche, *avec ou sans incorporation* du plasmide dans l'ADN chromosomique de la cellule réceptrice est à l'origine du développement des techniques de manipulation génétique.

La naissance du génie génétique et l'engouement des biologistes pour les nouvelles techniques qu'il a développées sont consécutifs à l'apparition de divers « outils » vers les années 1970 (tabl. I).

Le procédé de clonage de gènes s'appuie sur quatre étapes biochimiques et biologiques distinctes :

- 1 - isolement d'une séquence d'ADN par découpage enzymatique et soudure de ce fragment à un ADN d'origine différente ;
- 2 - transfert du fragment d'ADN sélectionné par un système vecteur capable de se répliquer et de répliquer le segment d'ADN étranger qui lui est lié ;
- 3 - incorporation du vecteur composite dans une cellule (bactérienne) fonctionnelle ;
- 4 - sélection dans une grande population de cellules réceptrices d'un clone de cellules contenant le fragment d'ADN sélectionné ; amplification de ce dernier.

Actuellement le clonage des gènes est réalisé dans de très nombreux laboratoires qui en augmentent continuellement le champ d'utilisation. Nous nous proposons d'en expliquer la méthodologie et de donner un aperçu sur les applications réalisées ou envisagées dans un proche avenir.

Pour plus de clarté, nous ne choisirons pas la chronologie des découvertes. Elles ont permis de constituer progressivement un outil d'une extrême précision à l'échelle de la « molécule biologique ».

TABLEAU I

Principales découvertes ayant permis la mise au point des techniques utilisées en génie génétique (d'après Leclerc et al., 1983).
Main discoveries leading to genetic technologies improvement (in Leclerc et al., 1983).

ANNEE	TRAVAUX SCIENTIFIQUES
1970	BALTIMORE, MIZUTANI et TEMIN : découverte de la transcriptase réverse KHORANA : propriétés de la ligase du phage T 4 SMITH : purification de la première enzyme de restriction MANDEL et HIGA : les sels de calcium facilitent la pénétration de l'ADN chez <i>E. coli</i>
1971	NATHANS : première utilisation des enzymes de restriction pour l'analyse d'un ADN viral
1972	JACKSON, SYMONS et BERG : première fusion d'ADN. Liaison de l'ADN d'un virus SV-40 avec de l'ADN de bactériophage λ (utilisation de la terminale transférase) MERTZ, DAVIS et SGARAMELLA : réalisation de "bouts collants" avec l'enzyme Eco RI sur des ADN viraux
1973	COHEN, CHANG, BOYER et HELING : mise au point du premier plasmide vecteur (pSC 101)
1974	COHEN : clonage des gènes ribosomiques du crapaud <i>Xenopus laevis</i> chez <i>E. coli</i>
1975	ROUGEON et MANIATIS : conversion d'un ARNm en ADNc puis clonage
1977	BOYER et ITAKURA : production de somatostatine chez <i>E. coli</i>

1. Isolement d'une séquence d'acide nucléique

L'ADN double brin, après son extraction des cellules, peut être découpé en un nombre variable de fragments, soit mécaniquement, soit enzymatiquement.

On dispose de deux types d'enzymes (nucléases) capables de réaliser cette digestion : les *exonucléases* altèrent les extrémités des doubles brins, les *endonucléases* agissent en des points divers à l'intérieur des chaînes d'ADN.

1. 1. Certaines ENDONUCLÉASES NON SPÉCIFIQUES, dégradent la molécule d'ADN en fragments dont le nombre est d'autant plus élevé et la taille d'autant plus réduite que la digestion est poursuivie plus longtemps. La limite ultime est le nucléotide, élément de base de l'acide nucléique (fig. 1) constitué d'un sucre à cinq carbones (désoxyribose) lié d'une part à un phosphate sur son carbone n° 5 et à une base purique (adénine A ou guanine G) ou pyrimidique (cytosine C ou thymine T) sur son carbone n° 1. Le carbone n° 3 porte une fonction alcool susceptible de se lier de façon covalente avec le groupement phosphate d'un nucléotide voisin.

Cette configuration donne une orientation à l'enchaînement des nucléotides et par là à l'ADN qui présente des extrémités 5' phosphate et 3'-OH. Le brin associé est orienté inversement. La longueur du double brin s'exprime en paires de bases (pdb) ou en millier de paires de bases (kb).

1. 2. ENDONUCLÉASES DE RESTRICTION : La dénomination « restriction » attribuée à ces enzymes provient de l'observation suivante : parmi les bactériophages λ qui se sont multipliés dans une souche « C » d'*Escherichia coli* (= « λ C »), environ 1 sur 1 000 seulement sont à même d'infecter une souche « K » de cette bactérie. On dit que la souche « K » restreint la croissance du phage « λ C ». En réalité, lorsque le phage se fixe sur la bactérie, il y injecte son ADN. Cet acide nucléique viral est porteur de sites particuliers (= sites de restriction) reconnus par les endonucléases de la bactérie qui entrent en action et le dégradent. Pour protéger son propre ADN, la cellule bactérienne fabrique des enzymes de modification, les méthylases, qui ajoutent un groupement méthyle aux nucléotides reconnus par ses propres endonucléases de restriction. Seules les souches de phages qui ne possèdent pas les sites

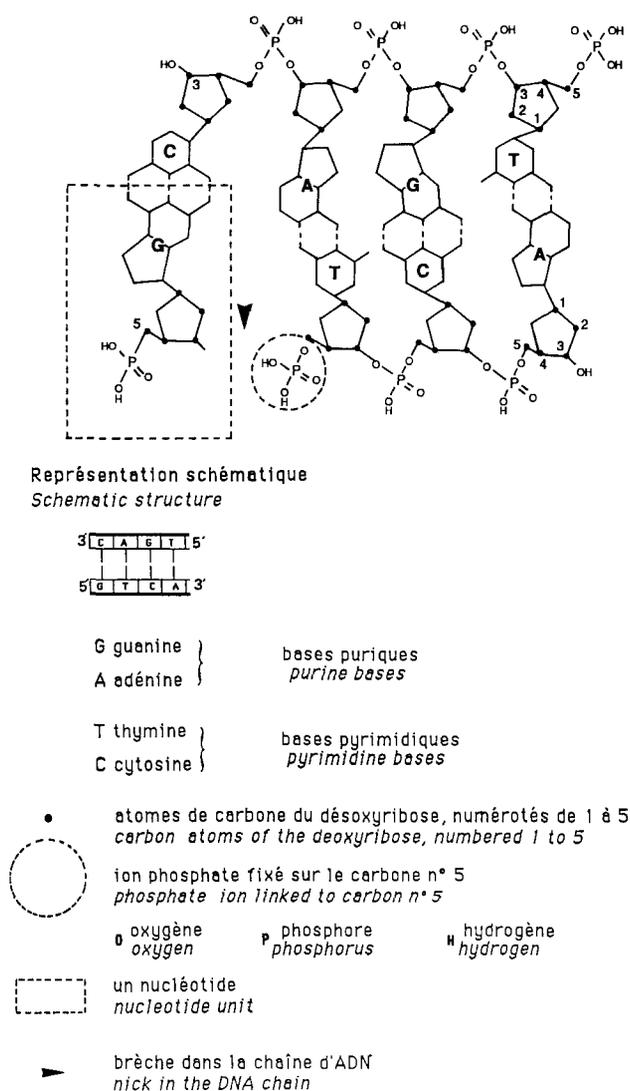


FIG. 1. — Portion d'acide désoxyribonucléique (ADN) constituée de quatre paires de bases.
Part of desoxyribonucleic acid (ADN) constituted by four base pairs.

de restriction correspondants pourront se développer sur la souche bactérienne.

Les endonucléases de restriction abondent dans les micro-organismes. Elles se différencient par leur site de restriction : elles reconnaissent des séquences déterminées de nucléotides et coupent l'ADN double brin à ce niveau (Berman, 1986). On remarque que la séquence est palindromique, c'est-à-dire possède un axe de symétrie (exem-

ple de palindrome : « Esape reste ici et se repose » – peut être lu également de droite à gauche). Les coupures produisent des brins d'ADN à « bords francs » si les deux brins d'ADN sont coupés au même niveau, ou à « extrémités cohésives » si les points de coupe de chaque brin sont séparés par plusieurs nucléotides (Berman, 1986) (tabl. II).

TABLEAU II

Origine et site de coupe de quelques enzymes de restriction.
Origin and acting site of some restriction enzymes.

ORIGINE	ENZYME	SITE = "	
<i>Escherichia coli</i> KY 13	Eco RI	G ¹ A A T T C A A G C T ² T	} Extrémités cohésives ou "bords collants"
<i>Hemophilus influenzae</i>	Hind III	A ¹ A G C T T T T C G A ² A	
<i>H. parainfluenzae</i>	Hpa II	C ¹ C G G G G C ² C	} Coupure franche
<i>H. aegyptius</i>	Hae III	G G ¹ C C C C ² G G	

Le nombre de fragments de restriction obtenus en traitant un génome par une enzyme de restriction est fonction de la fréquence des sites de reconnaissance présents. Cette fréquence est statistiquement plus élevée si la séquence est plus courte. Les fréquences théoriques de coupe d'un génome complexe d'eucaryote dont la disposition des nucléotides (bases A T C G) est au hasard (C + G = 50 %), par des enzymes de restriction dont le site de reconnaissance est à 4, 6, ... n paires de bases sont données comme exemple :

une séquence tétranucléotidique quelconque surviendra toutes les 4ⁿ soit 256 paires de bases (pdb), une séquence hexanucléotidique quelconque surviendra toutes les 4⁶ soit 4096 pdb, et 4ⁿ pour une séquence à n nucléotides.

Chaque enzyme de restriction coupe les chaînes d'acides nucléiques en un nombre caractéristique de segments, reconnaissables par leur taille après électrophorèse sur gel de polyacrylamide ou d'agarose et coloration au bromure d'éthidium (**). Les génomes viraux, de petite taille, ont été étudiés en premier lieu (tabl. III).

2. Les vecteurs

Il est techniquement impossible d'introduire directement, puis d'amplifier un fragment d'ADN dans une bactérie sans un système intermédiaire appelé vecteur et qui consiste en une molécule d'ADN de petite taille d'origine bactérienne ou virale, plasmide ou bactériophage.

(**) S'intercale entre les doubles brins d'ADN et les rend fluorescents sous lumière ultra-violette.

TABLEAU III

Nombre de sites de reconnaissance par des enzymes de restriction dans un génome viral.

Number of recognition site of restriction enzymes in some viral genomes.

Enzyme	SV-40	Phage λ	Adenovirus 2
Eco RI	1	5	5
Hind III	6	6	11
Hpa II	1	> 50	> 50
Hae III	18	> 50	> 50
Taille (kb)	5	50	38

2. 1. LES PLASMIDES

La taille des plasmides bactériens est d'environ 1/100 de celle du chromosome. Dans la bactérie, le nombre de copies du plasmide est très variable, de quelques unités à plusieurs milliers. Chacun de ces plasmides possède son propre système de réplication et porte quelques gènes. Ce sont par exemple les facteurs sexuels ou les gènes de résistance aux antibiotiques. Ces plasmides peuvent être extraits des cellules bactériennes par lyse cellulaire suivie d'une ultracentrifugation en gradient de densité (sur chlorure de césium en présence de bromure d'éthidium qui se lie différenciellement aux ADN conférant une plus forte densité aux ADN plasmidiques).

On choisit de préférence des plasmides de petite taille (3 à 20 kb) qui portent un nombre limité de sites de coupure par les enzymes de restriction usuelles. Si le site de coupure (de préférence unique pour l'« ouverture » du plasmide) est situé à l'intérieur du gène de résistance à un antibiotique, les plasmides qui auront réalisé l'intégration de l'ADN à amplifier (insert, ADN recombinant ou exogène) ne seront plus capables de transmettre le caractère de résistance à cet antibiotique.

2. 2. LES COSMIDES

Des molécules entièrement artificielles ont été construites sur la base des observations ci-dessus. Elles ne comportent que les gènes indispensables à la fonction à laquelle elles sont destinées : origine de réplication plasmidique, résistance à une ou plusieurs drogues, séquences portant des sites de restriction correspondant aux enzymes usuelles, extrémités cohésives (cos) du phage λ . La dimension de l'ADN qui peut être incorporé dans les cosmides est très largement supérieure à celle des plasmides. On peut obtenir l'encapsidation de l'ADN recombinant en complétant l'ensemble par les gènes qui codent pour cette

fonction chez le phage ayant servi de base. Les cosmides permettent de cloner jusqu'à 45 kb d'ADN étranger.

2. 3. LES PHAGES

On peut aussi utiliser comme vecteur l'ADN de certains bactériophages susceptibles d'infecter *Escherichia coli*, comme par exemple le phage λ . L'ADN du phage λ , double brin de 50 kb est linéaire et comporte des extrémités cohésives (cos) de 12 nucléotides. Après la pénétration dans une bactérie, l'ADN se circularise par ses extrémités cohésives et se comporte comme un plasmide. La partie centrale de la molécule contient des gènes non essentiels à sa multiplication, cette région peut donc être excisée et remplacée par l'ADN recombinant. Pour réussir ce cas de figure, il faut sélectionner un mutant qui ne possède aucun site de restriction de l'enzyme utilisée pour le découpage dans la région qui porte les gènes essentiels. Le phage λ ainsi constitué peut infecter un tapis bactérien, s'y multiplier en provoquant des plages de lyse à condition d'avoir intégré l'ADN étranger car l'encapsidation des particules virales ne se fera que si l'acide nucléique représente de 76 à 108 % de la longueur normale de celle du phage. La taille maximale du fragment d'ADN que l'on peut intégrer dans le génome du phage λ correspond à environ 20 gènes (soit 20 kb).

2. 4. PROCÉDÉS DE LIGATION

La jonction entre le vecteur et l'ADN sélectionné peut être réalisée selon trois modalités.

2. 4. 1. Extrémités cohésives (fig. 2)

A condition d'utiliser la même enzyme de restriction qui génère des extrémités cohésives pour « ouvrir » le plasmide et pour sélectionner le fragment d'ADN à cloner, le fait de mélanger les deux préparations aboutira à la réunion des extrémités complémentaires. Une précaution s'impose : si les fragments d'ADN à cloner sont généralement trop courts pour se cycliser spontanément, il n'en est pas de même pour le plasmide « ouvert » ; celui-ci doit donc être soumis à un traitement à la phosphatase alcaline qui, en supprimant le groupement phosphate resté libre sur les deux extrémités 5' obtenues lors de la linéarisation du plasmide, empêche sa recyclisation ou même la polymérisation de plusieurs plasmides. La répartition de la matrice (chaîne désoxyribose-phosphate) au niveau des deux points de jonction sera la dernière étape. Elle peut être réalisée *in vitro*, par une ligase, mais généralement la machinerie enzymatique de la cellule réceptrice l'effectuera, comme c'est le cas pour bien des brèches apparues spontanément dans un ADN cellulaire.

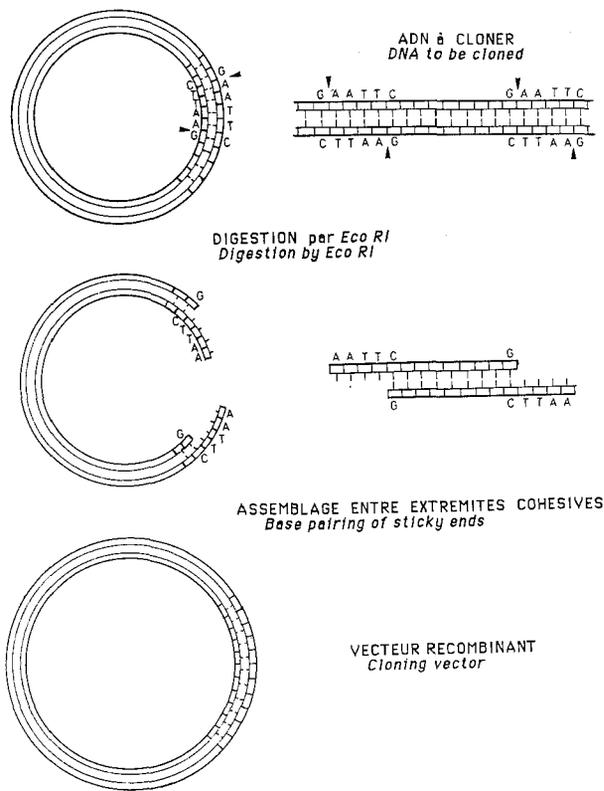


FIG. 2. — Procédé de ligation faisant intervenir les extrémités cohésives.

Ligation process by means of sticky ends.

2. 4. 2. Molécules synthétiques de jonction (fig. 3)

Ce procédé fait appel à une ADN-ligase (extraite du phage T4) capable de relier entre elles des extrémités franches d'ADN double brin. L'ADN à cloner, traité par une enzyme de restriction qui découpe les deux brins d'ADN au niveau de la même paire de base (= bouts francs), est soumis à une forte concentration de ligase (en présence d'adénosine triphosphate, ATP, car cette réaction nécessite une énergie élevée) et à un excès d'une molécule d'ADN synthétisée artificiellement appelée adaptateur. Cet adaptateur, de la taille d'une dizaine de paires de bases, doit contenir un site pour l'enzyme de restriction avec lequel est préparé le plasmide. Les extrémités cohésives produites sont traitées comme décrit au paragraphe précédent.

2. 4. 3. Addition de séquences homopolymériques complémentaires (fig. 4)

Le vecteur sous sa forme linéaire (après un premier

traitement enzymatique d'« ouverture ») et le fragment d'ADN à cloner découpé en bouts francs, sont soumis séparément à une exonucléase qui enlève de façon successive des nucléotides à partir de l'extrémité 5' de chaque brin. Cette digestion est conduite de façon modérée et limitée dans le temps pour que les extrémités 3' ainsi dégagées puissent servir d'amorce (d'ancrage) à la transférase terminale dont le rôle est d'ajouter, aux extrémités 3' sur laquelle elle est fixée, des nucléotides que l'on choisira complémentaires pour les deux ADN à préparer : par exemple désoxyriboadénine triphosphate (A) sur le plasmide et désoxyribothymine triphosphate (T) sur l'ADN à insérer. L'assemblage aura lieu sur le principe des extrémités cohésives vu plus haut avec ceci de particulier que les points de jonction sont moins assurés car les bases complémentaires ne s'apparient pas forcément au maximum des unités disponibles. Il convient de rajouter une étape où une ADN polymérase complètera la matrice avec les désoxyribo-nucléotides choisis (ici A et T).

2. 5. SYNTHÈSE D'ADNc (fig. 5)

Il est parfois plus facile de cloner la copie de l'ARN messager d'un gène que le gène chromosomique lui-même. L'avantage en est évident : on est certain que le gène sur lequel porte le clonage est entier et on évite le travail fastidieux de la sélection du fragment recherché dans une banque génomique exhaustive.

Une enzyme, la *transcriptase réverse* a été découverte (Temin et Mizutani, 1970 ; Baltimore, 1970) dans les rétrovirus dont l'acide nucléique est un ARN. Dans la cellule hôte infectée par le virus, sous l'action de la transcriptase réverse, l'ARN viral est transcrit en ADN qui peut dès lors s'intégrer dans l'ADN de l'hôte.

Les étapes de la synthèse et du clonage de l'ADN complémentaire d'ARN (ADNc) sont les suivantes :

- copie de l'ARNm en ADN simple brin par la transcriptase réverse ;
- synthèse de l'ADN double brin par l'ADN-polymérase ;
- addition aux extrémités 3' des ADN du gène et du vecteur linéarisé de séquences homopolymériques complémentaires par la terminale transférase ;
- liaison du fragment au vecteur.

3. Cellules réceptrices et amplification

Les molécules d'ADN recombinantes construites *in vitro* doivent être introduites dans une cellule susceptible de les accepter et de proliférer en culture continue. Les premiers résultats positifs ont été obtenus en réinsérant des plasmides d'*E. coli* dans cette même bactérie. Par la

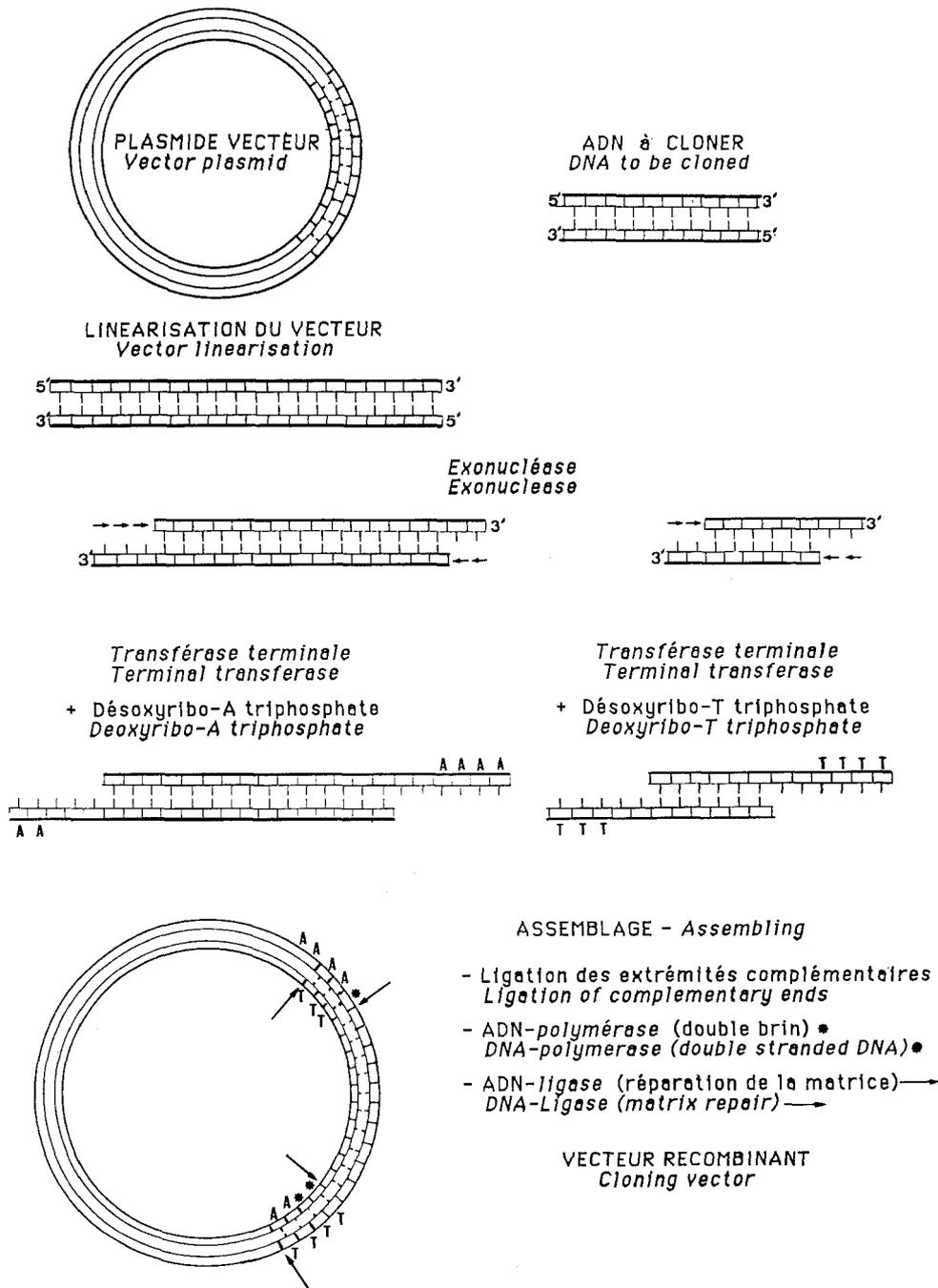


FIG. 4. — Procédé de ligation par addition de séquences homopolymériques complémentaires.
Ligation process by means of addition of complementary homopolymeric sequences.

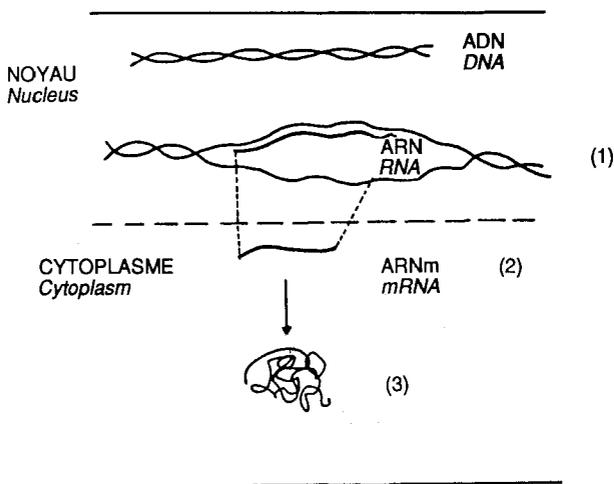


FIG. 5. — Étapes de la synthèse protéique :

- (1) Transcription d'un gène de l'ADN
 - (2) Maturation du transcrit en un ADN messenger (ARNm) par épissage des introns = élimination au niveau de l'ARN de certaines séquences non codantes de l'ADN
 - (3) Traduction de cet ARNm en une protéine, dans les ribosomes.
- Protein synthesis steps :*
- (1) Transcription of a gene from the DNA molecule
 - (2) Maturation of the transcript in a messenger RNA (mRNA) by cutting out several non coding sequences of DNA
 - (3) Traduction from the mRNA in a protein, in the ribosomes.

cédente. On peut espérer 20 à 30 clones pour 100 cellules injectées.

Le système de répllication du vecteur étant fonctionnel puisque les gènes impliqués ont été conservés dans le plasmide, la prolifération de la bactérie réceptrice aboutit à une amplification de la molécule d'ADN recombinant dans le clone issu de cette cellule unique.

D'autres systèmes bactériens récepteurs, en particulier *Bacillus subtilis*, ont été utilisés en suivant pratiquement la même méthodologie.

Si l'ADN à cloner est inséré dans un virus, la pénétration dans la cellule réceptrice est facilitée. En effet, si le vecteur transformé est un bactériophage susceptible d'infecter une souche bactérienne, rien ne s'oppose à la pénétration de l'ADN recombinant par le processus naturel d'infection virale. Cette observation est à la base du clonage dans des cellules eucaryotes (même des cellules de mammifères) par des virus qui s'y développent normalement. Le virus SV-40, virus transformant isolé chez le singe, dont le génome est très petit (5 000 pdb) comporte une zone non essentielle d'environ 1 500 pdb qui peut être remplacée par un ADN exogène. Le virus recombinant a été multiplié dans des cellules humaines cultivées en lignée continue (Tiollais et Rambach, 1977) mais cet exemple

reste encore peu suivi. Par contre, d'autres cellules eucaryotes comme certaines algues ou des levures sont actuellement plus largement utilisées en raison notamment de leur pouvoir de prolifération.

4. Sélection des cellules transformées

Il est essentiel de disposer d'un système sans faille pour séparer les cellules réceptrices qui auront intégré un vecteur recombinant de celles qui ne possèdent pas l'insert. Plusieurs systèmes de sélection sont possibles. L'un des plus simples dans le principe consiste à utiliser une souche d'*E. coli* sensible à deux antibiotiques A et B, un plasmide portant les gènes de résistance à ces deux produits et un site de restriction unique situé dans l'un des deux (supposons le gène conférant le caractère A-résistant) (fig. 6). Après insertion de l'ADN exogène au niveau du site de restriction, le gène A ne sera plus fonctionnel et le caractère A-résistant ne sera plus porté par le plasmide qui conférera, à la cellule réceptrice qui l'aura intégré, uniquement le caractère B-résistant. Ainsi, les

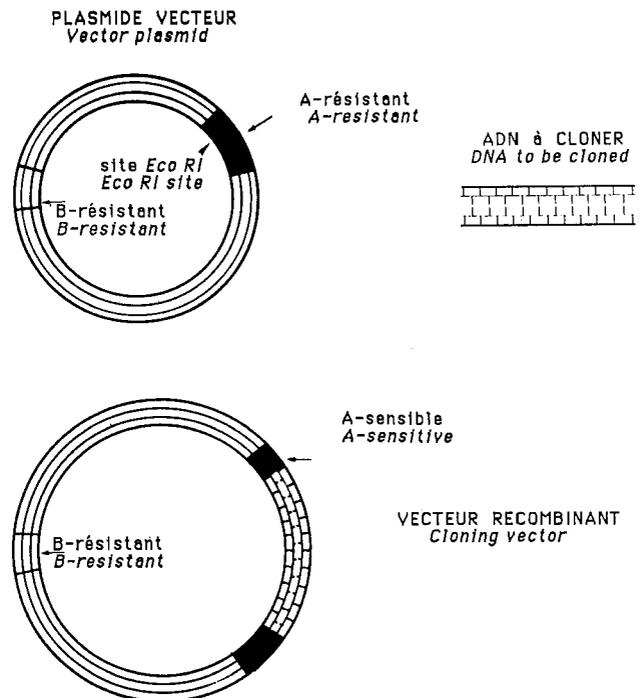
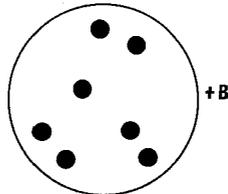


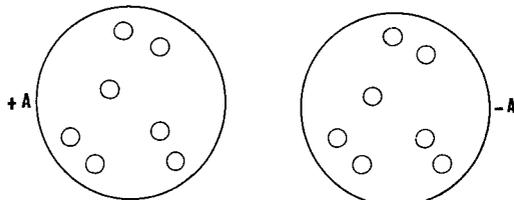
FIG. 6. — Inactivation du gène "A-résistant" par insertion de l'ADN à cloner.
Inactivation of the gene "A-resistant" by insertion of exogenous DNA.

clones qui se développeront sur milieu contenant l'antibiotique B auront effectivement intégré le plasmide et parmi eux, seuls ceux inhibés par l'antibiotique A posséderont le plasmide portant l'insert d'ADN dont on veut réaliser l'amplification (fig. 7).

COLONIES DE BACTERIES TRANSFORMEES CROISSANT EN PRESENCE DE B
Transformed bacteria colonies growing on B+ medium



TRANSFERT A L'AIDE D'UN TAMPON STERILE DES COLONIES SUR DES MILIEUX DE CULTURE CONTENANT (+A) OU EXEMPTS (-A) DE A
Transfer of colonies by sterile stamp on culture media containing (+A) or exempt (-A) of A



INCUBATION UNE NUIT A 37°C
Overnight incubation at 37°C

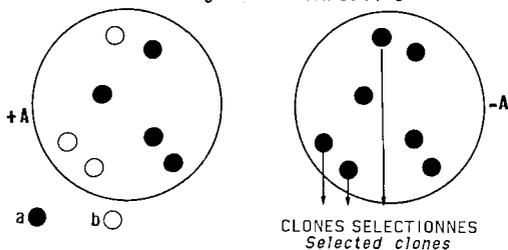


FIG. 7. — Sélection des cellules transformées ayant
a : intégré un plasmide non recombinant
b : intégré un plasmide recombinant.

Sélection of cells

a : transformed by a non recombinant plasmid
b : transformed by a recombinant plasmid.

5. Expression de l'ADN exogène – Réalisation de sondes

Le clone recombinant constitue un matériel de base et peut conduire à deux utilisations bien distinctes :

- l'expression d'un gène cloné pour aboutir à la production de la protéine pour laquelle il code,
- préparation d'une sonde qui servira de marqueur pour la détection de séquences d'ADN.

5. 1. EXPRESSION DU GÈNE CLONÉ

L'expression d'un gène étranger dans une cellule bactérienne (= procaryote) ou même dans une cellule d'eucaryote implique, comme nous venons de le voir, que la machinerie métabolique de la cellule réceptrice « comprenne » les informations contenues dans le fragment d'ADN introduit artificiellement. Une autre contrainte est la qualité de la protéine ainsi synthétisée. En effet, certains processus de « maturation » des protéines (la glycosylation) sont absents dans les procaryotes. Dans le tableau IV sont cités les premiers exemples d'expression réussie.

TABLEAU IV

Les premiers succès du génie génétique (d'après J. de Rosnay, Annales des mines, 1981, in Leclerc *et al.*, 1983).
The first successes in genetic engineering (after J. de Rosnay, Annales des mines, 1981, in Leclerc et al., 1983).

PRODUIT FABRIQUE OU PROCEDE	ESPECE CHIMIQUE	DATE	CELLULE	AUTEUR
Somatostatine	Hormone du cerveau	Nov. 77	<i>E. coli</i>	BOYER
Insuline	Hormone du pancréas	Sept. 78	<i>E. coli</i>	BOYER
Ovalbumine	Protéine oeuf de poule	Oct. 78		KOURILSKY CHAMBON
Dihydrofolate réductase	Protéine de souris	Oct. 78	<i>E. coli</i>	COHEN
Globine de souris	Protéine	Sept. 79	Cellules de singe	LEDER
Antigène Hbs (vaccinal : hépatite B)	Protéine	Mars 79 Avril 80	<i>E. coli</i> Cellules de souris	MURRAY TIOLLAIS CHANY
		août 80	<i>E. coli</i>	TIOLLAIS
Interféron	Protéine	Janv. 80	<i>E. coli</i>	WEISSMANN

5. 2. LES SONDÉS D'ADN

Elle va servir à détecter dans un ADN complexe, la ou les parties (gènes ou portions de gène) sur le modèle desquels elle a été construite : elle possède la structure complémentaire et pourra s'hybrider. Une sonde peut être constituée par le plasmide porteur de son insert ou par l'insert seul, obtenu en traitant le plasmide recombinant amplifié, à l'aide de l'enzyme de restriction utilisée pour sa construction. Le marquage radioactif est le plus largement utilisé bien qu'actuellement les sondes dites « froides » soient appelées à se développer pour l'avantage qu'elles présentent de ne pas faire appel à des radioéléments : elles sont couplées à des produits fluorescents ou à de la biotine. La révélation de l'hybridation de telles sondes est faite par luminescence sous lumière ultra-violette ou par réaction enzymatique colorée.

5. 2. 1. Marquage des sondes radioactives

L'étape du marquage peut se situer *in vivo*, en incluant dans le milieu de culture des bactéries des produits radioactifs qui entrent dans le métabolisme cellulaire au niveau des acides nucléiques. Cette technique est grande consommatrice de radioéléments. Plus généralement, *in vitro*, des nucléotides radioactifs (phosphore 32) sont incorporés enzymatiquement à l'ADN (fig. 8) ;

— une endonucléase crée de façon aléatoire des brèches (« nicks ») dans l'ADN, dégageant des régions simple brin (*excision*) ;

— une ADN polymérase présentant une double activité agrandit la brèche en amont, dans le sens 5' → 3' et, en aval, synthétise un nouveau brin (*réparation*) en incorporant les nucléotides radioactifs fournis, en prenant comme matrice la séquence nucléotidique du brin intact.

5. 2. 2. Dénaturation de la sonde

La sonde purifiée (par chromato-centrifugation) sous sa forme double brin doit être dénaturée, c'est-à-dire présentée en simple brin pour l'hybridation. L'ouverture du double brin peut s'obtenir par choc thermique, ionique ou chimique (formamide, etc.). L'ADN monocaténaire est alors susceptible de s'hybrider avec sa séquence complémentaire au niveau d'un acide nucléique complexe lui aussi dénaturé pour cette circonstance.

5. 2. 3. Hybridation (fig. 8)

L'hybridation entre l'ADN à étudier et la sonde peut avoir lieu en milieu liquide, solide ou sur coupe histologique. Si l'ADN à étudier est immobilisé sur un filtre de nitrocellulose (soit directement, soit après électrophorèse en gel d'agarose ou de polyacrylamide) des indications de poids moléculaires permettent de caractériser les fragments hybridés. L'information recherchée orientera le choix du procédé.

La révélation des fragments d'ADN sur lesquels la sonde s'est hybridée est obtenue par autoradiographie du filtre de nitrocellulose ou de la préparation histologique.

5. 2. 4. Applications

Les applications sont innombrables et il s'en développe de nouvelles constamment. Nous citerons quelques exemples choisis dans des domaines aussi différents que la médecine, la biologie humaine, l'entomologie, la virologie, la parasitologie.

— Détermination des degrés d'homologie entre séquences d'acides nucléiques afin d'établir la filiation des espèces au cours de l'évolution ; c'est ainsi que l'on a pu établir par

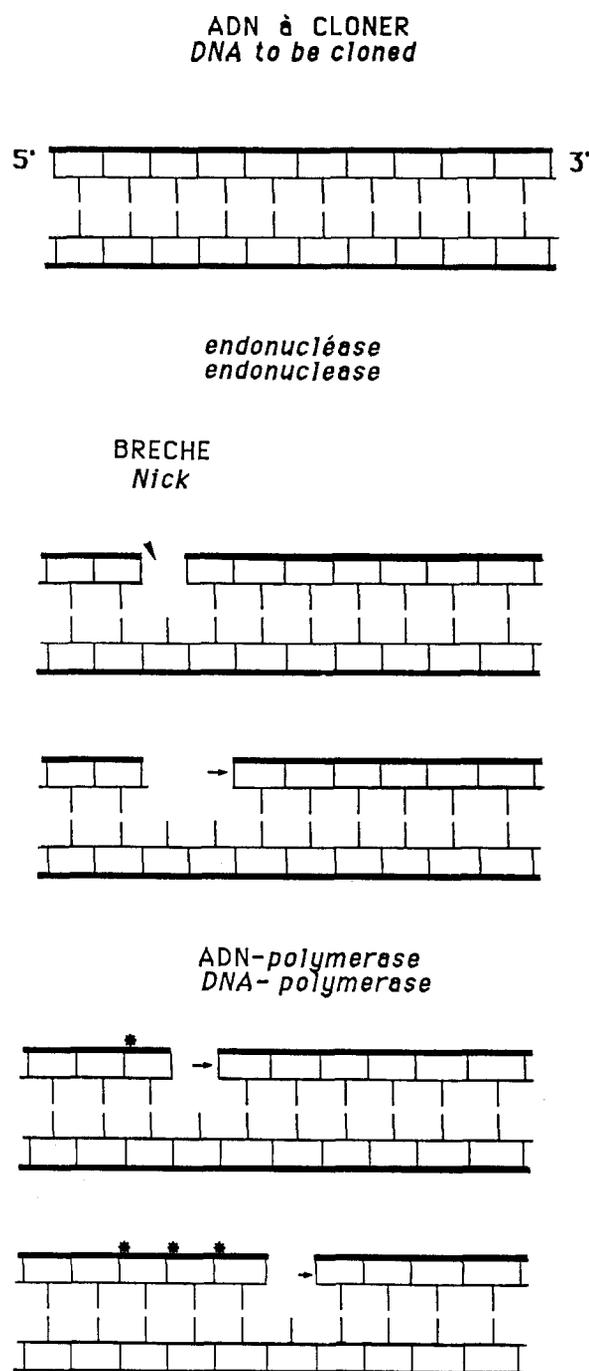


FIG. 8. — Le principe de la translation de brèches : excision enzymatique, puis réparation avec des nucléotides marqués
* = p^{32} phosphore radioactif.
Nick translation : excising and repairing with labelled nucleotides
* = p^{32} radioactive phosphorus.

exemple que les rétrovirus qui provoquent l'immunodépression chez le singe et chez l'homme (SIDA) ne présentent que 70 % d'homologie...

— Caractérisation de certains gènes oncogènes (à l'origine d'une transformation qui conduit à une prolifération anormale de la cellule) intégrés dans le génome cellulaire : les cellules ainsi transformées sont le siège du développement d'un cancer ; étude de l'apparition et de l'évolution de certains cancers (Westaway *et al.*, 1986).

— Recherche de l'existence d'un gène conférant un caractère :

= chez un insecte : résistance à un insecticide (Magnin, 1986)

= chez l'homme : diagnostic anté-natal, sur biopsie placentaire, d'une maladie congénitale (myopathie de Duchenne - Chambaz, *com. pers.*).

— Caractérisation génétique :

= chez *Onchocerca volvulus* : distinction entre les souches de forêt ou de savane (Bradley, 1987)

= chez *Leishmania* : critères d'identification de souches en relation avec leur pathogénicité (Lawrie *et al.*, 1985)

= chez *Plasmodium falciparum* : caractérisation de souche dans un but de diagnostic clinique (Mac Laughlin *et al.*, 1987)

— Étude de maladies virales :

= présence de virus de l'herpès ou de la rougeole dans les cellules cérébrales de patients atteints de sclérose en plaques (Schuller, 1987)

= détection du virus de l'hépatite B dans les cellules du foie (Tiollais et Rambach, 1977).

Conclusion

Les possibilités ouvertes à la recherche par le clonage de l'ADN ont été intensivement exploitées dès les premiers mois qui ont suivi les expériences initiales.

Grâce à la technique du clonage, on peut détecter l'existence d'un gène dans un chromosome, en évaluer et même mesurer plus précisément le nombre d'exemplaires présents. Les séquences répétitives peuvent être à l'origine de l'amplification d'un caractère ou d'un système de régulation enzymatique. C'est à cette particularité qu'a été rattachée par exemple la propriété de résistance à un insecticide. Un caractère qui présente un avantage vital peut être sélectionné sous la pression du milieu et la détection par clonage de son niveau d'expression mise en rapport avec l'existence du caractère étudié.

On pourra aussi suivre l'expression de divers gènes au cours du développement d'un organisme et en déterminer la chronologie. Cette approche est actuellement utilisée dans l'étude de la cancérisation des cellules pour tenter de comprendre le mécanisme d'action des séquences oncogènes

cellulaires ou introduites par des virus.

D'une façon générale, c'est la régulation de l'expression génétique chez les eucaryotes qui est la cible des généticiens moléculaires.

L'idée de synthétiser un vaccin en insérant un gène codant pour une protéine virale antigénique (impliquée dans la réponse immunitaire productrice d'anticorps vaccinaux) a conduit à l'utilisation du virus de la vaccine, remanié, par des gènes de l'hépatite B notamment. Les vaccins synthétiques sont effectivement une voie d'avenir (Godson, 1985). On envisage même de combiner plusieurs gènes pour réaliser des vaccins polyvalents.

La synthèse de protéines animales (et humaines) dans une bactérie confère ses lettres de noblesse à cette technique. Les échecs sont encore nombreux car les signaux d'initiation de transcription et de traduction, ainsi que le processus de maturation des ARNm et de glycosylation finale des protéines, sont très différents chez les animaux et chez les bactéries. Il n'empêche qu'un nombre croissant de protéines « artificielles » voient le jour dans les fermenteurs industriels.

Une autre voie d'avenir se situe dans la « chirurgie génétique ». Tous les organismes peuvent être considérés comme « transgéniques » étant donné qu'au cours de l'évolution ils ont intégré de manière durable de l'ADN étranger, essentiellement d'origine virale. Plus généralement on restreint le terme de transgénique aux animaux chez lesquels de l'ADN étranger a été incorporé expérimentalement à la lignée germinale.

Des souris transgéniques ont été produites par microinjection de jeunes embryons par de l'ADN remanié de virus SV40. Plus tard, des rétrovirus ou des cellules cancéreuses ont servi de vecteur. Chez ces animaux, l'expression des gènes introduits a conduit à la manifestation de caractères appartenant à l'espèce donneuse (Palmiter et Brinster, 1985).

Très rapidement, les milieux scientifiques les premiers, l'opinion publique et la presse également s'émurent des risques que représentaient les techniques de clonage moléculaire.

En juillet 1974, un comité scientifique réuni par Paul Berg publia un rapport et une lettre diffusée par plusieurs journaux spécialisés exprimant sa « préoccupation au sujet des conséquences fâcheuses que pourrait avoir une application aveugle » de ces techniques. Il propose aux chercheurs de s'interdire la fabrication d'organismes nouveaux producteurs de toxines ou résistant aux antibiotiques et de se refuser à cloner dans des bactéries des gènes issus de virus tumoraux. En effet, à ce stade de l'expérimentation personne n'était capable d'évaluer avec précision les dangers de certaines expériences avant de les entreprendre et de toute manière les règles de sécurité appropriées

n'étaient pas mises en place. Un congrès s'est tenu en 1975 à Asilomar dont les débats ouverts à la presse furent largement commentés. Les conclusions, complexes et controversées par certains, fixèrent cependant les limites scientifiques en admettant le bien fondé de la production de certains groupes de protéines tout en instaurant des règles de sécurité contre la dissémination accidentelle de nouvelles combinaisons biologiques. Certaines expériences furent reconnues potentiellement trop dangereuses pour être entreprises en l'état actuel des évaluations et des systèmes de protection.

Le congrès d'Asilomar fut une première étape dans la

prise de conscience du monde scientifique devant ce nouvel outil qu'est le clonage génétique. Depuis, certaines équipes de chercheurs ont délibérément changé l'orientation de leurs programmes s'appliquant une autocensure dictée par leur éthique.

Espérons que cette démarche soit un exemple pour la recherche et incite à une plus grande rigueur dans les domaines qui touchent notamment la qualité de la vie et la sauvegarde de l'environnement.

Manuscrit accepté par le Comité de Rédaction le 19 avril 1988.

BIBLIOGRAPHIE

- BALTIMORE (D.), 1970. — Viral RNA-dependent DNA polymerase. *Nature*, 226 : 1209-1211.
- BERMAN (H.M.), 1986. — How Eco RI recognizes and cuts DNA. *Science*, 234 : 1482-1483.
- BRADLEY (D.), 1987. — DNA probe for river blindness. *Nature*, 327 : 365-366.
- COHEN (S.), 1975. — La manipulation des gènes. *Scientific american* (July 1975) : 186-196, in *Hérédité et manipulations génétiques*. Bibliothèque Pour la Science. Belin, Paris, 204 p.
- GODSON (N.), 1985. — A la recherche d'un vaccin antipaludique. *Pour la Science* (Juillet 1985) : 24-31.
- LAWRIE (J.M.), JACKSON (P.R.), STITELER (J.M.) et HOCKMEYER (W.T.), 1985. — Identification of pathogenic *Leishmania* promastigotes by DNA:DNA hybridization with kinetoplast DNA cloned into *E. coli* plasmids. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 34, 2 : 257-265.
- LECLERC (H.), IZARD (D.), HUSSON (M.O.), WATTRE (P.) et JAKUBCZAK (E.), 1983. — *Microbiologie générale*. Doin, Paris, 369 p.
- MAC LAUGHLIN (G.L.), COLLINS (W.E.) et CAMPBELL (G.H.), 1987. — Comparison of genomic, plasmid, synthetic and combined DNA probes for detecting *Plasmodium falciparum* DNA. *J. of Clin. Microbiol.*, 25, 5 : 791-795.
- MAGNIN (M.), 1986. — Résistance aux insecticides organophosphorés : détection, caractérisation, génétique et dynamique dans les populations naturelles. Thèse de doctorat d'Université. Paris VI.
- PALMITER (R.D.) et BRINSTER (R.), 1985. — Transgenic mice. *Cell*, 41 : 343-345.
- SCHULLER (E.), 1987. — La sclérose en plaques. *La Recherche*, 191 : 1028-1037.
- TEMIN (H.), 1972. — La synthèse de l'ADN dirigée par l'ARN. *Scientific american* (January 1972) : 176-185, in *Hérédité et manipulations génétiques*. Bibliothèque Pour la Science. Belin, Paris, 204 p.
- TEMIN (H.) et MIZUTANI (S.), 1970. — RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*, 22 : 1211-1213.
- TIOLLAIS (P.) et RAMBACH (A.), 1977. — Génie génétique ou manipulations génétiques. *La Recherche*, 8, 82 : 822-832.
- WESTAWAY (D.), PAPKOFF (J.), MOSCOVICI (C.) et VARMUS (H.E.), 1986. — Identification of a provirally activated c-Ha-ras oncogene in an avian nephroblastoma via a novel procedure : cDNA cloning of a chimaeric viral-host transcript. *EMBO J.*, 5, 2 : 301-309.