

REPUBLIQUE ALGERINNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université de JIJEL – Faculté des sciences
Département de Biologie Cellulaire et Moléculaire



Mémoire



Pour obtenir le DES en Biologie
Option : Microbiologie

11B.12.107

LES DOMAINES D'APPLICATION DES MICROORGANISMES
TRANSGENIQUES

Présenté par les étudiantes :

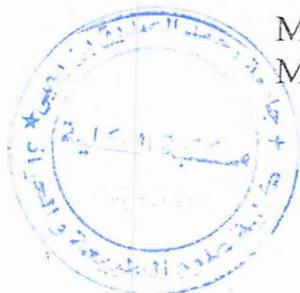
YNINEB Hakima

LAHMAR Saliha

Soutenu le : 19 / 06 / 2007



Devant le Jury :



M^{lle} CHERBAL Asma
M^{lle} LAGOUNE Souhaila

Encadreur
Examinatrice

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu, le Tout- Puissant, qui nous a aidé à réaliser ce travail.

Nous remercions très sincèrement M^{elle} CHERBAL Asma, assistante à l'Université de Jijel, d'avoir accepté de diriger ce travail. Nous sommes très reconnaissantes envers elle pour son aide, ses conseils, sa compétence et sa présence en tout moment.

Nous remercions vigoureusement M^{elle} LAGOUNE Souhaila, maître assistant à l'université de Jijel, d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Nous remercions vivement le personnel de la BU pour leur précieuse aide et toute personne ayant participé de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Enfin, nous remercions profondément nos précieuses familles et nos chères amies à la fois pour leur soutien infatigable, leur patience admirable et leur affection continuelle.

SOMMAIRE

Introduction	1
Etude bibliographique	2
I- Définitions	2
I.1- La transgénèse	2
I.2- Les organismes génétiquement modifiés (OGM).....	2
II- La technologie de l'ADN recombinant	2
II.1- La recombinaison génétique chez les microorganismes	2
II.1.1- La recombinaison génétique chez les bactéries	2
A- La conjugaison	3
B- La transformation	3
C- La transduction	4
II.1.2- La recombinaison génétique chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> et dans d'autres champignons	4
II.1.3- La recombinaison génétique chez les virus	5
III- Les outils de la biotechnologie	5
III.1- Les vecteurs de clonage	5
III.1.1- Les bactériophages	5
III.1.2- Le vecteur hybride	5
III.1.3- Les plasmides bactériens	5
III.2- Les enzymes de restriction et de modification	6
III.3- La mutagenèse	8
IV- Les étapes de la transgénèse	8
IV.1- L'insertion d'ADN étranger dans une cellule	8
IV.2- L'obtention d'ADN pour le clonage	9
IV.2.1- Les banques de gènes	9
IV.2.2- L'ADN synthétique	12
IV.3- La sélection d'un clone pourvu de gènes étrangers	12
IV.4- La fabrication d'un produit génique	13
V- Les applications de la transgénèse	14
V.1- Quelques applications des plantes transgéniques	14
V.1.1- La résistance aux insectes	14

V.1.2- La tolérance aux herbicides	14
V.1.3- La résistance aux virus	14
V.1.4- Autres résistances	15
V.2- Quelques applications des animaux transgéniques	15
V.2.1- La recherche fondamentale	15
V.2.2- Amélioration potentielle des productions animales par des animaux transgéniques	15
A- Production de viande	15
B- Production laitière	16
V.2.3- Augmentation de l'efficacité de la digestion de la ration alimentaire	16
V.2.4- Thérapie génique et ADN médicament	16
V.3- Les applications des microorganismes transgéniques	17
V.3.1- Application dans le domaine médicale (Les applications thérapeutiques)	17
A- Préparation de produits naturels ou synthétiques	17
B- Les vaccins recombinants	20
C- Le diagnostic médical	22
V.3.2- Les applications industrielles	22
A- Les principaux produits de la microbiologie industrielle	22
A.1- les antibiotiques	23
A.2- les acides aminés	23
V.3.3- Les microorganismes transgéniques dans l'alimentation	24
A- Intérêt des levures transgéniques	24
B- Intérêt des bactéries transgéniques	25
V.3.4- La biorestauration	26
VI- Diffusion des OGM	27
Discussion	28
Conclusion	29
Bibliographie	30

INTRODUCTION

Introduction :

La transgénèse est une technique de biologie moléculaire destinée à transformer le génome d'un organisme receveur en y insérant un gène (transgène) qu'il ne possède pas naturellement. Elle est devenue aujourd'hui une pratique courante de laboratoire car ses applications pratiques sont nombreuses et variées. Outre la production controversée d'organismes génétiquement modifiés (OGM) dans un but commercial, elle permet le clonage des gènes, leur expression dans un organisme, l'obtention des protéines correspondantes ou l'insertion d'un gène muté dans un organisme pour en examiner les conséquences. Aussi, pratiquement tous les domaines de la recherche en biologie font désormais appel à cette technique [1].

Historiquement, c'est en 1971 qu'un microorganisme comportant un gène étranger fut fabriqué pour la première fois lorsque Paul Berg parvint à introduire un fragment d'ADN du virus SV40 dans la bactérie *Escherichia coli* ouvrant la voie à ce qu'il est convenu d'appeler aujourd'hui techniques de l'ADN recombinant, génie génétique ou ingénierie génétique[1].

Les techniques de transgénèse ont pour origine les travaux d'un microbiologiste anglais, Fred Griffith, qui cherchait à mettre au point un vaccin contre la pneumonie à pneumocoque. En 1932, il montra que les bactéries responsables de cette maladie pouvaient transmettre certains de leurs caractères, notamment leur virulence, à des souches de pneumocoques non virulents. Alors même qu'ils avaient été tués par la chaleur, des pneumocoques pouvaient transmettre leur virulence et l'acquisition de cette caractéristique par la souche non virulente devenait héréditaire. Cette découverte était tellement incroyable à l'époque que Griffith hésita pendant quatre ans avant de publier ses résultats. Seul le transfert d'une substance chimique entre des bactéries mortes et des bactéries vivantes pouvait expliquer cette transformation et Oswald Avery réussit en 1944 à isoler la substance transformante qui se révéla être de l'acide désoxyribonucléique (ADN) suscitant une foule de travaux de recherche qui aboutirent notamment à l'élucidation de la structure de la molécule d'ADN et aux techniques actuelles de transgénèse. Les bactéries se prêtent particulièrement aux expériences de transgénèse car il est techniquement facile de leur faire intégrer des plasmides, petites molécules d'ADN circulaire que de nombreuses bactéries contiennent naturellement [1].

Les microorganismes transgéniques sont au centre de nombreuses recherches en génie génétique. La présente recherche explore les différents domaines d'application des microorganismes transgéniques (génétiquement modifiés) [2].

ETUDE

BIBLIOGRAPHIQUE

I- Définitions :

I.1- La transgénèse :

La transgénèse consiste à introduire un gène étranger appelé transgène, dans une cellule ou un organisme transgénique proviendra le plus souvent d'un œuf ou d'une cellule embryonnaire, dont l'ADN a été modifié par transgénèse [2].

Un organisme transgénique contient de l'ADN recombinant intégré et stable dans tous ses cellule [3].

La recombinaison est le processus par le quel un nouveau chromosome recombinant, ayant un génotype différent du chromosome de chacun des parents, est formé en combinant du matériel génétique de deux organismes.

Il en résulte un nouvel arrangement des gènes ou de partie de gène et habituellement une modification phénotypique [4].

La transgénèse peut être appliquée aux microorganismes, aux végétaux et aux animaux [5].

I.2- Les organismes génétiquement modifiés (OGM) :

Un organisme génétiquement modifié ou OGM est «un organisme vivant dont le patrimoine génétique a été modifié par génie génétique, soit pour accentuer certaines de ces caractéristiques ou lui en donner de nouvelles considérées comme désirables, soit au contraire pour atténuer, voire éliminer certaines caractéristiques considérées comme indésirables » [6].

Un OGM est un organisme, à l'exception des êtres humains, dont le matériel génétique a été modifié d'une manière qui ne peut s'effectuer naturellement par multiplication et/ou par recombinaison [7].

Les organismes génétiquement modifiés sont créés lorsqu'on introduit des gènes clonés dans les cellules germinales. Chez les eucaryotes, si les gènes introduits dérivent d'un autre organisme, les plantes ou les animaux transgéniques résultants peuvent être propagés par un élevage normal [8].

II- La technologie de l'ADN recombinant :

II.1- La recombinaison génétique chez les microorganismes :

La recombinaison génétique permet de rassembler dans une même souche deux caractères situés au départ dans des souches différentes. La nouvelle combinaison peut présenter un avantage économique ou technique [9].

La méthodologie utilisée est très différente selon que l'on considère moisissures, levures ou bactéries. Chez les eucaryotes, les croisements ne sont guère possibles, par les techniques habituelles, qu'entre cellules appartenant à la même espèce ou à des espèces très voisines. Chez les bactéries, il est parfois possible d'effectuer des transferts génétiques entre des cellules appartenant à des espèces différentes et, parfois même, à des genres différents. Cependant, il ne faut pas perdre de vue que la recombinaison génétique ne peut être obtenue dans la pratique que pour des espèces très bien étudiées au point de vue génétique. Ces espèces sont peu nombreuses et il est rare que les espèces les mieux connues soient celles qui ont le plus grand intérêt industriel [9].

II.1.1- La recombinaison génétique chez les bactéries :

La recombinaison génétique peut se produire chez les bactéries lors de la conjugaison, de la transformation ou de la transduction [2].

A- La conjugaison :

Dans la conjugaison, un élément cytoplasmique tel que le facteur sexuel F s'intègre dans le chromosome d'une cellule bactérienne, lors du contact cellule-cellule. Le facteur F intégré peut transférer tout ou partie de son chromosome dans une autre cellule dont le chromosome porte des allèles des gènes présents sur le chromosome transféré. Le segment transféré recombine avec un segment homologue du chromosome de la cellule receveuse. [10]

B- La transformation :

Dans la transformation, une bactérie absorbe un morceau d'ADN présent dans l'environnement. Un brin de cet ADN donneur est assimilé et peut transformer génétiquement la cellule réceptrice en se recombinant avec une région homologue du chromosome. La transformation est un phénomène naturel chez diverses bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Elle peut contribuer à la propagation de la résistance aux antibiotiques parmi les bactéries pathogènes. Dans cet exemple, l'allèle B remplace l'allèle b (figure 1) [11].

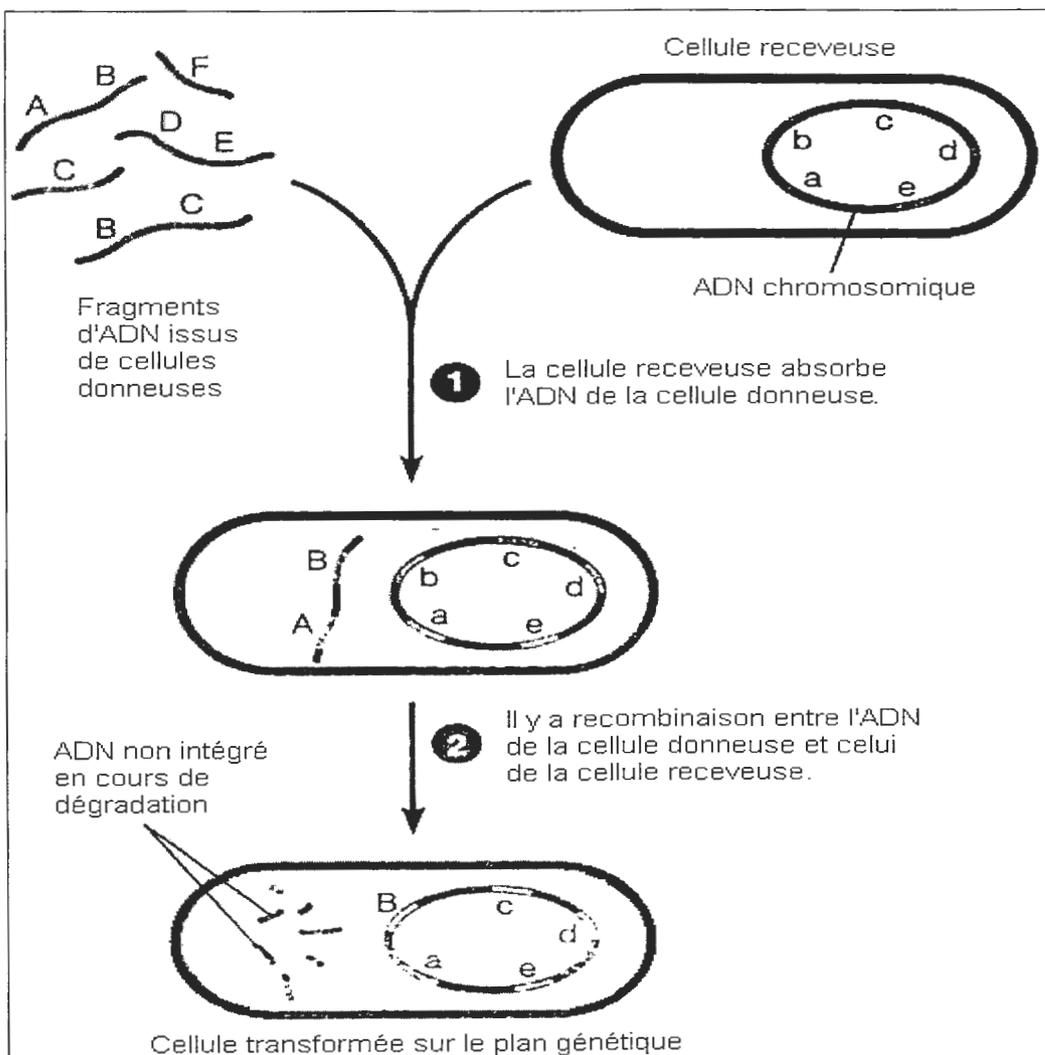


Figure 1 : Mécanisme de la transformation génétique chez les bactéries [27].

C- La transduction :

La transduction est le transfert d'ADN bactérien par l'intermédiaire de bactériophages (ou phages). Ceux-ci sont des virus de bactéries, qui existent sous la forme virulente ou tempérée. Les phages virulents se multiplient dans la bactérie (ou mieux sont répliqués par la bactérie) et la lysent. Les phages tempérés s'intègrent dans le chromosome bactérien sans induire la réplication et sont répliqués en même temps que lui. Le bactériophage est alors appelé prophage et la bactérie qui en est porteuse, une bactérie lysogène. Dans une population de bactéries lysogènes, un prophage se libère de temps à autre du chromosome bactérien, devient virulent, se multiplie, provoque la lyse de la bactérie et peut infecter de nouvelles bactéries. Si, au cours de sa libération, le prophage emporte avec lui plusieurs gènes bactériens, il peut y avoir transfert par le bactériophage de gènes bactériens d'une bactérie (lysogène) à une autre (lysogène). C'est la transduction [12].

Il existe deux types de transduction. Lorsque les gènes transférés (pas plus de 1 à 2 % du génome de la bactérie lysogène) s'intègrent dans le chromosome de la bactérie réceptrice et que celle-ci les transmet à sa descendance, on dit que la transduction est complète ou généralisée. Lorsque les gènes transférés ne sont pas intégrés dans le chromosome, ce qui est fréquent, on dit que la transduction est abortive. Dans ce cas, les gènes passent de la cellule mère à une seule cellule fille, etc. Il n'y a pas généralisation du caractère transféré à l'ensemble des descendants [12].

Le transfert d'ADN bactérien par transduction a été très utilisé par les généticiens en raison de sa faible fréquence (10^{-6}), de son caractère partiel (1-2 % du génome bactérien) et de sa relative non spécificité. On peut concevoir qu'elle a joué, plus que la transformation mais moins que la conjugaison, un rôle important dans l'évolution bactérienne [12]

II.1.2- La recombinaison génétique chez *Saccharomyces cerevisiae* et dans d'autres champignons :

Tout comme *Escherichia coli*, les champignons ne sont pas transformables naturellement. et il faut recourir à des moyens artificiels pour y introduire de l'ADN étranger. Une des méthodes utilise des sphéroplastes (des cellules sans paroi). A l'origine, elle fut mise au point pour *Saccharomyces cerevisiae* [13]. Dans cette méthode, la paroi cellulaire est digérée enzymatiquement et la fusion des sphéroplastes produits est induite par le polyéthylène glycol en présence d'ADN et de CaCl_2 . Les sphéroplastes régénèrent une paroi cellulaire dans un milieu stabilisateur contenant 3% d'agar. Cette dernière étape rend la récupération ultérieure des cellules peu aisée. L'électroporation représente une simplification méthodologique considérable par rapport aux sphéroplastes. Les cellules transformées par électroporation peuvent être sélectionnées à la surface de milieux solides ce qui facilite les manipulations ultérieures. La méthode des sphéroplastes et l'électroporation ont été appliquées à une gamme étendue de levures et de champignons à mycélium ("*filamentous fungi*") [14].

L'ADN peut aussi être introduit dans les levures et les champignons à mycélium par conjugaison : Heinemann et Sprague (1989) et Sikorski et al. (1990) ont découvert que des plasmides d'entérobactéries tels que R 751 (INCPB) et F (INCF) peuvent promouvoir le transfert de plasmides d'*E. coli* vers *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe*. Le pathogène de plantes *Agrobacterium tumefaciens* contient un grand plasmide Ti, et une partie de ce plasmide (l'ADN transféré (ADN-T)) peut être transférée par

conjugaison dans des protoplastes de *Saccharomyces cerevisiae* [14] et de champignons à mycélium [15].

L'ADN-T peut aussi être transféré dans des hyphes ou dans des conidies [16].

II.1.3- La recombinaison génétique chez les virus :

Elles sont produites lors d'une infection mixte. Le brassage génétique s'effectue à partir des deux génophores au sein de la cellule hôte, le plus souvent pendant le processus de réplication. Il peut y avoir de 4 à 5 opérations de recombinaison au cours d'un seul cycle lytique : le mécanisme est celui du *crossing-over* simple ou réciproque. Chez les bactériophages T pairs (T4), il existe un phénomène d'hétérozygotie correspondant à la présence de deux brins portant un allèle différent, ce qui entraîne la formation d'un hétéroduplex partiel. Au cours d'une infection mixte, il peut arriver que le génophore d'un virus soit encapsidé dans une capsidie hybride composée de protéines issues des deux "parents". Il n'y a pas, dans ce cas, de brassage génétique proprement dit et l'hybride obtenu n'est pas un recombinant. On appelle ce phénomène " mélange phénotypique ". Le cas le plus extrême est celui où le génophore d'un phage se retrouve dans la capsidie d'un autre : on l'appelle transcapsidation ou camouflage génotypique [17].

III- Les outils de la biotechnologie :

III.1- Les vecteurs de clonage :

Le transfert d'un fragment d'ADN dans une cellule est possible par un mécanisme de transformation naturelle, mais ce mécanisme est aléatoire. Il est préférable d'utiliser un vecteur qui tout en assurant une pénétration efficace du fragment dans la cellule (haut pouvoir de transformation), sera doté du pouvoir de se reproduire dans cette cellule et également de propriétés favorisant la sélection des cellule transformées. Il y a plusieurs choix pour les vecteurs de clonage : les plasmides des bactéries, bactériophages et les vecteurs hybrides [18].

III.1.1- Les bactériophages :

Deux phages sont très utilisés comme vecteurs, ce sont le phage λ (lambda) et le phage M₁₃, ou plus exactement des dérivés de ces deux phages qui doivent en effet subir divers types de modifications pour pouvoir être utilisés comme vecteurs de clonage [19].

III.1.2- Le vecteur hybride :

Les cosmides sont des plasmides dans lesquels ont été insérés les site Cos (sites d'extrémités cohésives) requis pour empaqueter l'ADN de λ dans sa capsidie. Les cosmides peuvent être perpétués en cellules bactériennes ou être purifiés en les empaquetant *in vitro* dans les bactériophages. Les avantages principaux des cosmides sont que des insertions beaucoup plus longues que 15 Kb peuvent être clonées et de ce fait, la facilité de trouver un plasmide recombinant et considérablement améliorée [18].

III.1.3- Les plasmides bactériens :

Les plasmides bactériens sont des petites molécules d'ADN circulaires extrachromosomiques que l'on rencontre à l'état naturel. Ils contiennent des gènes de résistance aux antibiotiques [20].

III.2- Les enzymes de restriction et de modification :

Une enzyme de restriction est une endonucléase à site de coupure très précis. Les séquences de nucléotides reconnues par les enzymes de restriction sont habituellement des séquences dites palindromiques. Les séquences palindromiques sont des séquences où la succession des nucléotides lue dans le sens 5'→3' (gauche-droite) pour le premier brin est identique à la séquence lue dans le sens droite-gauche pour le second brin (sens 5'→3'). Ces séquences palindromiques sont le plus souvent constituées de 4 ou 6 paires de bases [21].

Quand les sites de coupure sur les deux brins sont en vis-à-vis, les fragments générés sont à bords francs, quand il sont décalés, les fragments obtenus sont chevachants au débordants en 5' ou en 3' [19].

La coupure par une ou plusieurs enzymes de restriction fournit des fragments d'ADN de différentes tailles. Ces fragments peuvent être facilement analysés par électrophorèse sur gel. Les différents fragments obtenus sont utiles pour établir la carte de restriction d'un ADN [22].

La première enzyme de restriction à site de coupure spécifique fut découverte par HAMILTON Smith en 1970.

Elle a été extraite de la bactérie *Haemophilus influenzae* et nommée Hind III. C'est une enzyme qui reconnaît la séquence :



et coupe les liaisons phosphodiester de l'ADN aux sites indiqués par les flèches [22]. Depuis, plusieurs centaines d'enzymes de restriction ont été découvertes. Les séquences reconnues par ces enzymes comportent en général 4, 6 ou 8 bases [23].

Statistiquement, plus une séquence est petite (4 nucléotides) plus elle sera fréquente dans un ADN. Au contraire les longues séquences seront plus rares. Par conséquent, un ADN mis au contact d'une enzyme comme TaqI va être découpé en plusieurs petits fragments alors que NotI ne coupera l'ADN que rarement en de longs fragments [23].

Les extrémités d'ADN générées par un clivage enzymatique peuvent spontanément se réassocier. Ceci est d'autant plus facile que les extrémités sont débordantes car elles offrent des séquences monocaténaire complémentaires pouvant s'hybrider par des liaisons hydrogène (figure 2) [32].

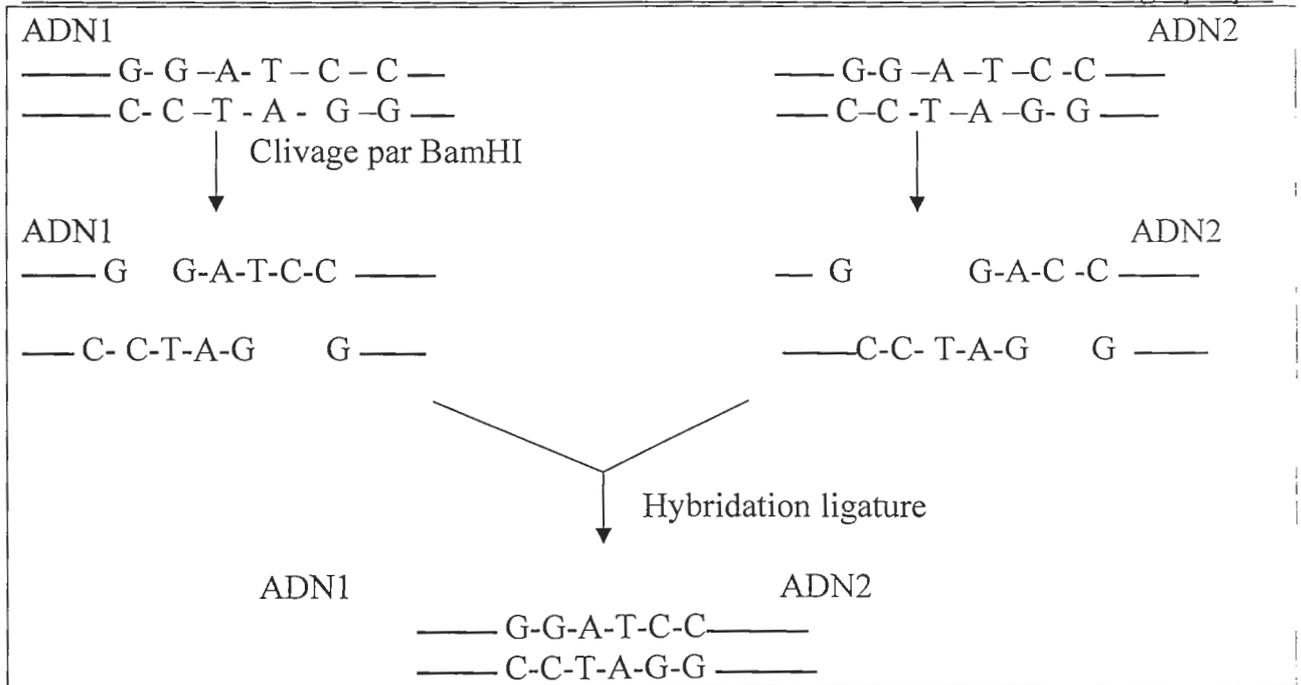


Figure 2 : Clivage d'un fragment d'ADN par une enzyme de restriction et ligation [23].

Les clivages par des enzymes différentes peuvent parfois fournir les mêmes extrémités débordantes (figure 3).

De même, toutes les extrémités franches peuvent être associées entre elles quelle que soit la séquence reconnue par l'enzyme [24].

L'association des fragments générés par les enzymes de restriction ne s'opère que par hybridation entre les bases complémentaires. Cette association instable peut être rendue permanente par une réaction de ligation à l'aide de l'ADN ligase, qui lie de manière covalente les fragments d'ADN [25].

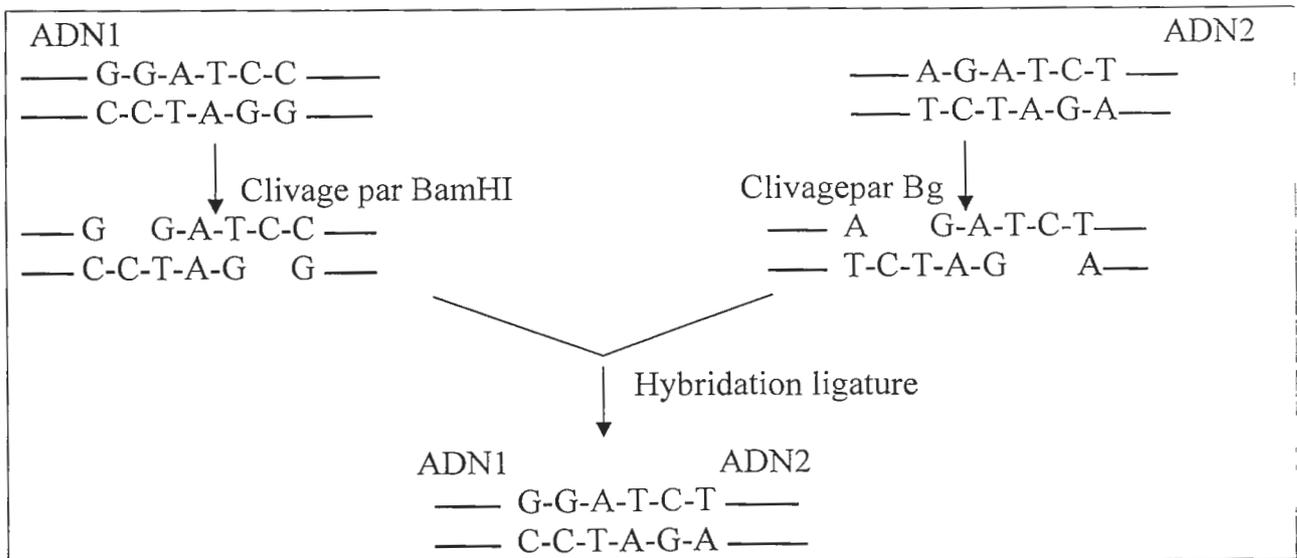


Figure 3 : Ligation de fragments d'ADN issus de clivage par des enzymes de Restriction [23].

Dans certains cas, les fragments d'ADN dont on dispose sont à bords francs et on souhaite leur donner les extrémités cohésives. Une enzyme, la transférase terminale, extraite du thymus de veau, ajoute des nucléotides aux extrémités 3' des brins d'ADN. En ajoutant ainsi un poly dA à un fragment d'ADN et un poly dT à un autre, il sera possible d'hybrider facilement les deux fragments d'ADN grâce à leurs extrémités devenues complémentaires parfois [25].

Cette manière de modifier une molécule d'ADN amène l'introduction de séquences supplémentaires, ce qui peut affecter la fonction de la molécule recombinante. C'est pour cela qu'on lui préfère, quand cela est possible, une introduction directe à l'aide d'extrémités franches ou cohésives générées par les enzymes de restriction [23].

III.3- La mutagenèse :

La mutagenèse dirigée sur une région précise du gène permet de modifier de manière fine la structure et la fonction de la protéine correspondante. Si, comme c'est généralement le cas, la connaissance de la séquence ne permet pas de prédiction précise sur la structure et la fonction de protéine codée, on peut créer une banque de mutants par la mutagenèse aléatoire du gène (ou d'une partie du gène) que l'on réintroduit dans la levure afin d'identifier ceux correspondant à un phénotype donné [26].

Dans une première méthode de détection, la banque de mutants, portée par un plasmide intégratif, est intégrée au chromosome par un *crossing-over* intégratif qui reconstitue le gène potentiellement mutagène et les transformations obtenues sont analysées pour le phénotype recherché [26].

IV- Les étapes de la transgénèse :

Le génie génétique met en œuvre des techniques de manipulation et de clonage de gènes dans le but de fabriquer des produits nouveaux, utiles et souvent très rentables.

La fabrication de ces produits passe par quatre grandes étapes : l'insertion d'ADN étranger dans les cellules, l'obtention d'ADN pour le clonage, la sélection d'un clone pourvu de gènes étrangers et, enfin, la fabrication d'un produit génétique [27].

IV.1- L'insertion d'ADN étranger dans une cellule :

Les techniques de l'ADN recombiné requièrent que des molécules d'ADN soient manipulées hors de la cellule (*in vitro*) pour y être réintroduites. Il existe plusieurs façons d'introduire de l'ADN dans les cellules. Le choix de la méthode est en général déterminé par le type de vecteur et la cellule hôte employés [27].

Dans la nature, les plasmides sont habituellement transférés entre les bactéries d'espèces apparentées par contact direct de cellule à cellule, comme dans la conjugaison [27].

En génie génétique en revanche, le plasmide est inséré dans une cellule par transformation, mécanisme par lequel les cellules peuvent incorporer l'ADN « nu » situé dans leur environnement immédiat [28].

De nombreux types de cellules, y compris *Escherichia coli*, les levures et les cellules de mammifères, n'intègrent pas spontanément l'ADN étranger. Toutefois, ces cellules peuvent être rendues compétentes, c'est-à-dire aptes à incorporer de l'ADN étranger, par de simples traitements chimiques. Dans le cas d'*Escherichia coli*, les cellules doivent être incubées dans une solution de chlorure de calcium pendant une période de temps [27].

Puis, l'ADN cloné est ajouté aux cellules compétentes, et on fait subir au mélange un léger choc thermique [27].

Certaines des cellules incorporent l'ADN par transformation, il existe d'autres modes d'insertion de l'ADN dans des cellules. L'électroporation en est un. Ce processus fait appel à un courant électrique qui forme des pores microscopiques dans la membrane cytoplasmique, par lesquels l'ADN peut pénétrer la cellule. Bien que l'on puisse appliquer cette méthode à tous les types de cellules, il faut souvent procéder au préalable à la transformation en protoplastes des cellules dotées d'une paroi cellulaire.

L'élimination de la paroi cellulaire à la suite d'une action enzymatique convertit une cellule en protoplaste et permet un accès direct à la membrane plasmique [28].

Le processus de la fusion de protoplastes met à profit une propriété de ces cellules. En effet, les protoplastes en solution fusionnent à une vitesse lente, mais néanmoins significative. Or, l'addition de polyéthylène glycol augmente la fréquence des fusions. C'est dans la nouvelle cellule hybride que l'ADN provenant des deux cellules « parentales » peut se recombiner. Cette méthode est particulièrement précieuse lors de la manipulation génétique des cellules végétales. Il existe une autre manière assez remarquable d'introduire de l'ADN étranger dans une cellule végétale ; il s'agit littéralement de bombarder sa paroi cellulaire à l'aide d'un canon à gènes.

Des particules microscopiques de tungstène ou d'or enrobées d'ADN sont expulsées du canon par un jet d'hélium en vue de cribler la paroi cellulaire.

Par la suite, certaines cellules végétales expriment l'ADN introduit de cette façon, comme s'il leur appartenait [28].

En fin, dans le cas de cellules animales, l'ADN peut être inséré par micro-injection. Cette technique fait appel à une micro pipette de verre dont le diamètre est bien plus petit que celui de la cellule. La micro pipette transperce la membrane plasmique, et on injecte l'ADN dans la cellule [19].

Il existe donc une panoplie d'enzymes de restriction, de vecteurs et de méthodes d'insertion de l'ADN dans les cellules. Cependant, il faut noter que l'ADN étranger ne survivra que s'il a été intégré à un vecteur se répliquant de manière autonome ou s'il a été incorporé dans l'un des chromosomes cellulaires par recombinaison [19].

IV.2- L'obtention d'ADN pour le clonage :

Nous avons vu comment les gènes peuvent être introduits dans les vecteurs par le biais d'enzymes de restriction, et transformés à l'intérieur de différents types de cellules. Mais comment les spécialistes du génie génétique obtiennent-ils les gènes qui les intéressent ? Il existe deux principales sources de gènes pour le clonage : les banques formées de copies de gènes ou de copies d'ADN_C dérivé de l'ARN_m de gènes et l'ADN synthétique. [27].

IV.2.1- Les banques de gènes :

Il n'est guère aisé d'isoler des gènes spécifiques sous la forme de fragments d'ADN individuels. C'est la raison pour laquelle les chercheurs intéressés par les gènes d'un organisme donné, qu'il s'agisse d'une plante, d'un animal ou d'un microorganisme,

commencent par extraire son ADN en lysant les cellules et en faisant précipiter l'ADN. Ce processus donne un agrégat d'ADN qui renferme tout le génome de l'organisme [18].

Après que l'ADN a été digéré par des enzymes de restriction, les fragments qui en résultent sont insérés dans un vecteur plasmidique ou dans un phage. Puis, ces vecteurs recombinés sont transférés dans des cellules bactériennes [18].

Le but visé est de fabriquer suffisamment de clones pour s'assurer qu'il existe au moins un clone pour chaque gène de l'organisme. Cet ensemble de clones contenant divers fragments de l'ADN constitue une banque de gènes, ou banque génomique, et chaque élément de l'ensemble est une bactérie ou un phage porteur d'un fragment du génome (figure 4). De telles banques sont essentielles pour conserver les clones d'ADN et pour en chercher un en particulier [18].

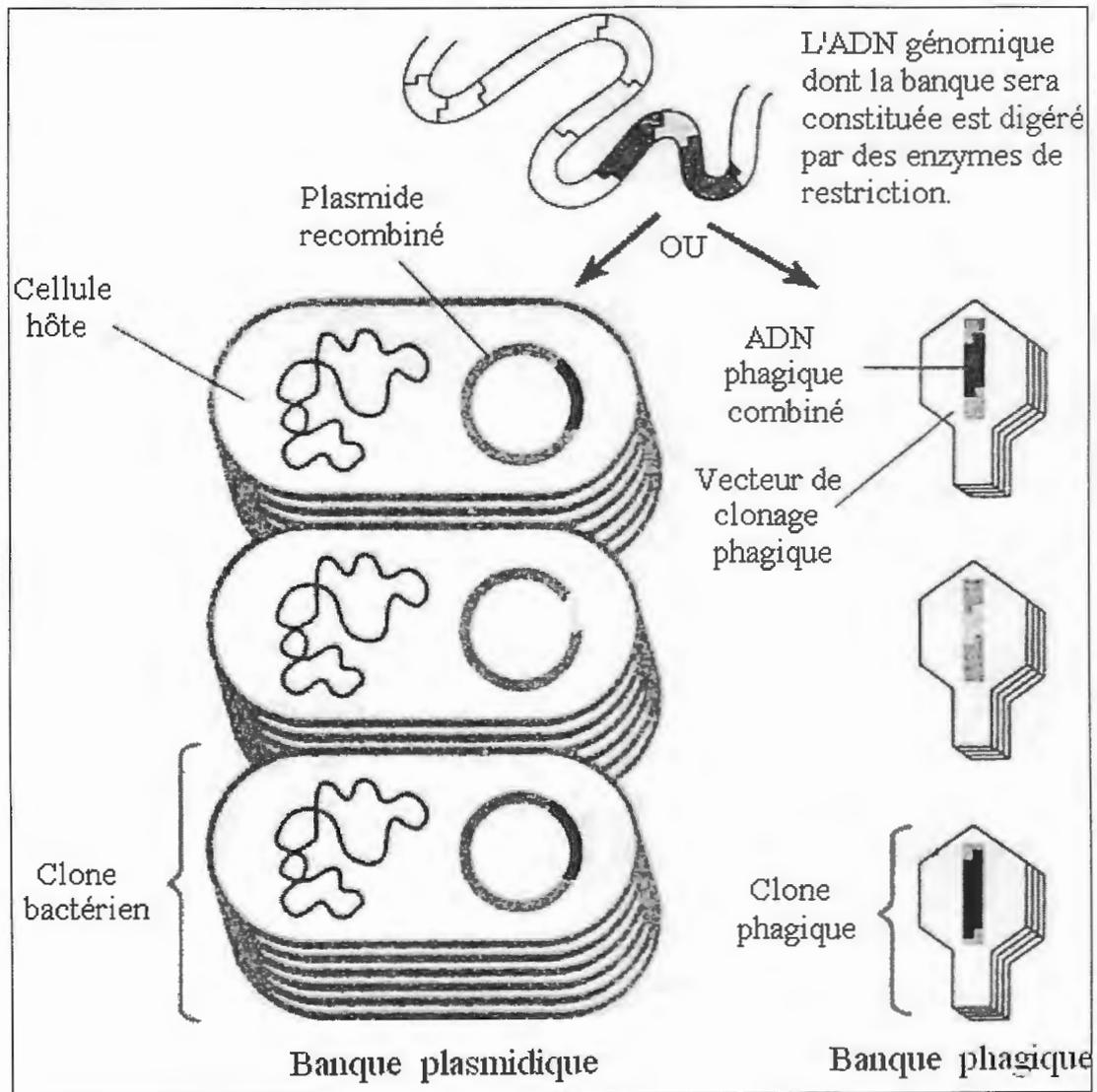


Figure 4 : Banque de gènes [27].

Le clonage de gènes extraits des cellules eucaryotes présente un problème particulier. En effet, ces gènes contiennent généralement des exons (segments d'ADN qui codent pour une protéine) et des introns (portions intercalées d'ADN qui ne codent pas une protéine). Lors du clonage d'un gène eucaryote, il est préférable d'employer une version du gène

sans introns, car un gène contenant des introns serait difficilement maniable en raison de sa taille [27].

Par ailleurs, si un tel gène introduit dans une cellule bactérienne, cette dernière n'est généralement pas apte à retirer les introns de l'ARN et, par conséquent, elle ne pourra pas fabriquer la protéine recherchée. On peut ce pendant synthétiser au laboratoire un gène qui ne renferme que des exons, et ce par le biais d'une technique de production d'ADN complémentaire (ADN_C). L'ADN complémentaire est considéré comme une sorte de gène artificiel sans introns. On le synthétise, à l'aide d'une enzyme nommée transcriptase inverse à partir d'un ARN_m qui sert de motrice [18].

La figure 5 illustre les étapes de la synthèse de l'ADN_C d'un gène eucaryote.

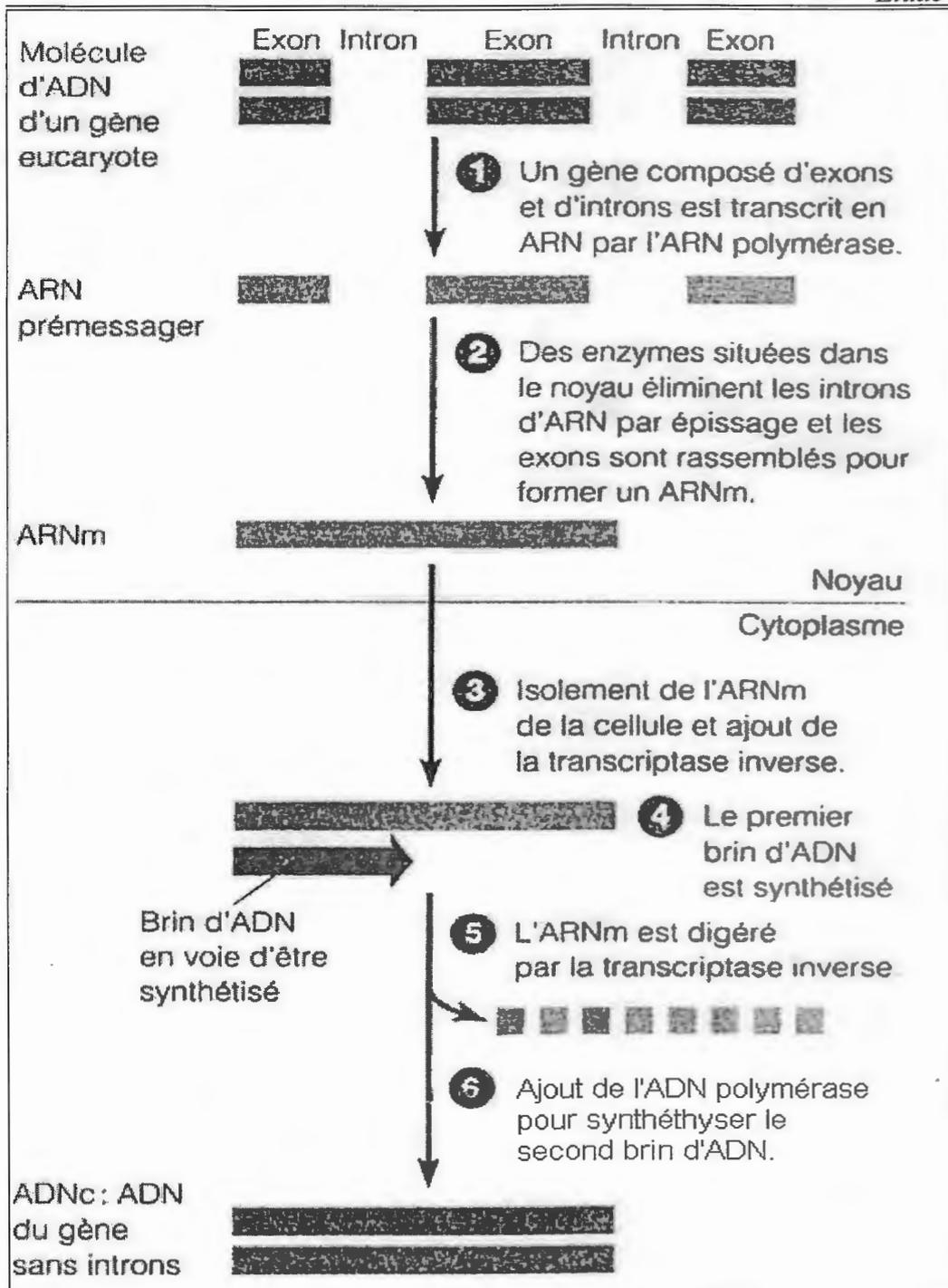


Figure 5 : Synthèse d'ADNc [27].

IV.2.2- L'ADN synthétique :

Dans certaine circonstance, il est possible de fabriquer des gènes *in vitro* en faisant appel à des machines qui synthétisent de l'ADN. Le clavier de l'appareil sert à entrer la séquence de nucléotides recherchée, tous comme si on tape des lettres avec un logiciel de traitement de texte pour former des phrases. Un microprocesseur régit la synthèse en puisant dans un stock de nucléotides et d'autres réactifs nécessaires.

On peut synthétiser une chaîne de 120 nucléotides à partir de cet appareil. A moins qu'il ne soit très court, on doit habituellement synthétiser plusieurs portions du gène séparément et les joindre pour former le gène en entier [27].

Cette approche comporte toutefois une difficulté ; il faut évidemment connaître la séquence du gène avant d'en effectuer la synthèse. Si le gène n'a pas encore été isolé, la seule manière de prédire la séquence de son ADN est de connaître la séquence des acides aminés de la protéine qu'il produit. En principe, si cette séquence est connue, on peut remonter à la séquence de l'ADN [27].

IV.3- La sélection d'un clone pourvu de gènes étrangers :

Comme nous l'avons mentionné, on peut avoir recours à plusieurs techniques pour insérer de l'ADN dans une cellule. Lors du clone, il est nécessaire d'identifier les cellules qui contiennent le gène recherché. Cette étapes et difficile, car un très petit nombre de cellules seulement -quelques unes sur des millions- sont susceptibles de renfermer ce gène. Nous étudierons ici une méthode de criblage typique, le criblage bleu-blanc, ainsi appelé en raison de la couleur des colonies bactériennes qui se forment à la fin de la procédure de détection [27].

Le plasmide d'ADN plasmidique utilisé dans cette technique comporte un gène (amp) conférant la résistance à l'ampicilline, un antibiotique. La bactéries hôte ne pourra donc pas se multiplier dans un milieu contenant de l'ampicilline, à moins qu'elle n'ait reçu le vecteur plasmidique. Ce dernier comporte également un deuxième gène (lacZ), celui de l'enzyme B-galactosidase. Á la figure 4, notez que le gène (lacZ) comprend plusieurs sites qui peuvent être coupés par des enzymes de restriction. On emploie aussi un fragment d'ADN étranger qui contient un gène que l'on veut cloner. Pour ce faire, on procédera à la sélection des bactéries recombinées qui l'auront incorporé [10].

Lors d'une telle expérience, des bactéries hôtes incorporent le plasmide d'origine, qui contient un gène (lac z) intact ; elles hydrolysent alors le gal. pour produire un composé bleu, responsable de l'apparition de colonies colorées en bleu. Par ailleurs, les bactéries hôtes n'incorporent pas toutes un plasmide, qu'il soit d'origine ou recombiné, et elles ne subissent donc pas de transformation. Mises en culture sur un milieu gal., elles ne croissent pas en raison de leur sensibilité à l'ampicilline. La détection des bactéries recombinées qui ont incorporé de l'ADN étranger a été rendue possible par l'isolement des colonies blanches [27].

La sélection du clone n'est pas pour autant terminée et les étapes suivantes présentent des difficultés. Les colonies blanches qui contiennent l'ADN étranger ont été localisées, mais on ne sait toujours pas si les bactéries renferment le gène recherché. Il faut donc procéder à une deuxième étape pour identifier le contenu génétique de ces bactéries. Deux méthodes permettent de vérifier la présence du gène. Si l'ADN étranger du plasmide code pour un produit (une protéine) détectable, la bactérie est isolée, mise en culture et testée afin de mettre en évidence la fabrication du produit génétique. Dans certains cas toutefois, il est nécessaire de localiser le gène lui-même directement dans la bactérie hôte [27].

L'hybridation sur colonie est une technique couramment employée pour déceler les cellules qui transportent un gène cloné spécifique. Cette technique fait appel à une sonde d'ADN, il s'agit d'une courte séquence d'ADN monocaténaire, complémentaire du gène recherché et synthétisée chimiquement à partir d'une portion connue de la séquence de nucléotides du gène recherché [18].

Pour révéler sa présence, on marque la sonde à l'aide d'un isotope radioactif ou d'une substance fluorescente. En principe, si elle trouve son brin correspondant, la sonde d'ADN radioactive s'apparie au gène recherché (hybridation) et la cellule apparaît alors

comme un clone porteur du gène recherché. Une fois que l'on a sélectionné un clone porteur du gène recherché et qu'on l'a isolé, on le cultive pour produire une grande quantité du gène lui-même ou pour fabriquer le produit génique dont le gène porte le code [18].

IV.4- La fabrication d'un produit génique :

Nous venons de voir que l'un des moyens de reconnaître les cellules porteuses d'un gène particulier est de vérifier la présence du produit génique.

Bien sûr, ces produits géniques sont souvent l'objet de recherche en génie génétique. Des protéines avec des applications industrielles, agricoles, ou pharmaceutiques peuvent être produites dans une variété de systèmes microbiens ou de culture de cellules. Plusieurs systèmes hôtes ont été développés : systèmes bactériens (*E. coli*, *Bacillus*), fongiques (levures, *Aspergillus*, *Fusarium*), de cellules en culture, de plantes, de mammifères, et d'insectes. Afin de produire un produit de gène désiré dans un de ces systèmes, le gène doit d'abord être cloné. Si c'est un gène eucaryote, un clone complet d'ADN (du début ATG au codon final d'arrêt) doit être obtenu, en particulier si l'expression a lieu dans un système bactérien. Les bactéries ne possèdent pas la machinerie pour épisser des introns. et d'autres systèmes peuvent ou ne peuvent pas correctement effectuer l'épissage d'introns des gènes de l'organisme sensiblement différent [18].

En outre, les bactéries ne peuvent pas effectuer des modifications post traductionnelles, telles que la glycosylation, qui peut être exigée pour la fonction de protéine. Le clone d'ADN est coupé derrière la commande d'un promoteur spécifique d'hôte dans un vecteur de plasmide pour guider la transcription dans le système hôte. Par exemple, un gène humain cloné serait épissé derrière le promoteur du gène de l'alcool oxydase de levure (AOx) pour l'expression dans un système de vecteur de levure. Le promoteur de gène AOx est un promoteur fort (produit beaucoup de molécules d'ARNm) et peut être régulé positivement par la présence du méthanol. Une fois que ce plasmide d'expression recombinant est créé, il est présenté dans les cellules du système hôte [18].

Des cellules recombinantes stables peuvent être développées dans le laboratoire et puis être employées pour produire le produit désiré de gène. L'expression d'un gène d'un organisme dans une cellule de la même espèce s'appelle l'expression homologue de gène, quand un gène est exprimé en système complètement différent du système cellulaire hôte, l'expression hétérologue du gène est employée. C'est la méthode utilisée pour produire une variété de protéines recombinantes utiles, telles que l'insuline humaine, le facteur de coagulation et l'hormone de croissance humaine. [18].

V- Les applications de la transgénèse :

V.1- Quelques applications des plantes transgéniques :

Le génie génétique n'est appliqué au monde végétal que depuis une dizaine d'années. En effet, les premières productions de plantes transgéniques fertiles des tabacs et des pétunias, résultat des travaux menés en parallèle par plusieurs équipes en Amérique du nord et en Europe furent obtenues en 1983. Depuis, les techniques ont fortement évoluées. Elles ont en particulier permis la transformation d'un plus grand nombre d'espèces végétales (on en recense une cinquantaine à l'heure actuelle) et l'introduction de nombreux caractères allant de la résistance aux herbicides (un des premiers caractères

agronomiques introduits) à la production d'anticorps ou de molécules d'intérêt pharmaceutique, en passant par la résistance aux pathogènes et aux ravageurs ou par l'amélioration du produit (lipides, maturité...) [29].

Dans le classement des surfaces cultivées par caractère génétique introduit, c'est la tolérance aux herbicides qui arrive en tête (74 % de toutes les plantes GM) suivie par la résistance aux insectes (19 %) et le double caractère résistance aux insectes et tolérance aux herbicides (17 %) [30].

V.1.1- La résistance aux insectes :

Les plantes transgéniques résistantes aux insectes sont fabriquées et expriment des toxines contre leurs ravageurs. Mais à la différence d'un insecticide classique que l'on utilise à des moments précis, la plante transgénique produit la toxine en continu, exposant ainsi les insectes de façon constante. Toutefois, le développement rapide de plantes transgéniques résistantes aux insectes est une recette sûre pour le développement de super insectes résistants aux toxines qu'elles produisent. De la même façon, le développement de plantes résistantes aux maladies ne fera vraisemblablement que provoquer de nouvelles maladies [31].

V.1.2- La tolérance aux herbicides :

Les herbicides sont des produits chimiques souvent efficaces mais dont la difficulté majeure est la spécificité : détruire les adventices et respecter les cultures installées. Ces herbicides sont souvent des produits dits systémiques, c'est-à-dire distribués dans tous les organes de la plante par les systèmes vasculaires de celle-ci. Deux stratégies complémentaires ont été développées : soit une augmentation de la sensibilité des plantes cibles, soit le renforcement de la résistance des plantes à épargner, en développant chez elles, par exemple un système de détoxification par dégradation du produit utilisé [32].

V.1.3- La résistance aux virus :

De nombreuses maladies des plantes sont dues à des infections par des virus. Des plantes ont été transformées (tabac, pomme de terre, tomate, betterave, concombre, piment, riz, etc.) à l'aide de ces ADNc et l'on a pu constater que ces plantes étaient devenues résistantes vis-à-vis du virus. Les mécanismes d'acquisition de cette résistance ne sont cependant pas encore complètement élucidés. Parmi les hypothèses formulées, la plus plausible viendrait d'une saturation des sites de décapsidation des cellules végétales hôtes, opération indispensable pour que le virus qui viendrait à nouveau envahir la cellule puisse se répliquer [31].

V.1.4- Autres résistances :

De nombreuses autres résistances acquises par voie biotechnologique ont été également recherchées. Parmi celles-ci la résistance des plantes à la sécheresse et la salinité. la tolérance au stress hydrique et leur adaptation à des conditions environnementales inhabituelles font l'objet de recherche dans un certain nombre de laboratoires des pays méditerranéens [8]. C'est ainsi qu'a été créée en 1999 une tomate qui, ayant reçu le gène de la PEP carboxylase du sorgho s'avère résistante à la salinité et très économe en eau [33].

V.2- Quelques applications des animaux transgéniques :

Un animal transgénique est un individu qui a reçu une information génétique nouvelle à la suite de l'introduction expérimentale d'ADN étranger dans son propre patrimoine génétique. Le transfert d'ADN dans les cellules sexuelles correspond à la transgénèse germinale. Ce type de transgénèse est fréquent dans de nombreuses espèces, mais surtout chez la souris. Pour des raisons d'éthique, cette transgénèse germinale ou thérapie génique germinale est totalement exclue dans l'espèce humaine [31].

En revanche, la thérapie génique somatique devrait se développer largement chez l'homme : c'est le transfert de gènes dans des cellules du corps (soma) autre que les cellules sexuelles (germen) ; on l'appelle aussi transgénèse somatique ou thérapie génique. Le gène introduit est un transgène [9].

V.2.1- La recherche fondamentale :

Des succès très importants de la transgénèse concernent actuellement la recherche fondamentale. Cette méthode permet d'aborder d'une manière nouvelle et particulièrement efficace l'étude des régions régulatrices des gènes, de leur rôle dans le développement embryonnaire, dans la différenciation cellulaire, dans la cancérogenèse. etc. un gène marqueur, le gène de β -galactosidase (lac z) est souvent utilisé comme gène rapporteur pour détecter le lieu et le moment de l'expression d'un gène particulier dans des embryons ou des tumeurs par exemple [34].

De nombreuses maladies d'origine génétique sont dues à un ou plusieurs défauts dans un seul gène. Afin d'envisager des traitements par thérapie génique (ou transgénèse somatique), un grand nombre de modèles de maladies expérimentales sont créés chez la souris transgénique : hypertension avec surexpression du gène de la rénine ou de l'angiotensine, diabète insulino-dépendant résultant d'une surexpression d'un gène de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité dans les cellules β du pancréas. hypercholestérolémie associée à la mutation du récepteur de la LDL, anémie associée à une mutation ponctuelle de la β -globine etc. certaines souris transgéniques permettent également d'étudier de multiples cancers : tumeurs mammaires, lymphome β Les modèles sont devenus innombrables, mais d'un intérêt certain pour la mise au point de nouvelles thérapeutiques [35].

V.2.2- Amélioration potentielle des productions animales par des animaux transgéniques :

A- Production de viande :

Afin d'augmenter la production de viande, on a d'abord exploré l'utilisation des gènes d'hormone de croissance et du facteur hypothalamique stimulant cette hormone. Le transfert nucléaire de ces gènes augmente le développement de la masse musculaire. Néanmoins, des taux chroniques élevés d'hormone de croissance ont pu conduire à de nombreux effets indésirables chez les animaux transgéniques : déformations osseuses chez les moutons, l'ostéochondrose chez le porc, maladies cardiaques, hyperglycémie et arthrite [36]. Excepté chez les poissons, l'administration des hormones de croissance n'est plus envisagée de manière chronique chez les animaux d'élevage [37].

B- Production laitière :

L'administration d'hormone de croissance bovine à des vaches, des brebis ou des chèvres en lactation augmente en effet d'environ 20 % leur production laitière. A côté de l'approche récente d'administration d'hormone de croissance recombinante bovine (BST : somatotropine bovine) pour augmenter la productivité de lait par animal, afin de

faire produire la même quantité de lait par moins d'animaux, on pourrait favoriser la production endogène de GH ciblée dans le tissu mammaire à l'aide de promoteurs de lactoprotéines [38].

V.2.3- Augmentation de l'efficacité de la digestion de la ration alimentaire :

Deux approches principales ont été envisagées par génie génétique : les capacités enzymatiques de digestion de la microflore des ruminants notamment et a production d'animaux génétiques qui contiennent un gène de fusion comprenant une enzyme bactérienne liée à un promoteur spécifique de l'appareil digestif (estomac, intestin, pancréas). Par exemple, le gène de l'élastase du veau est exprimé à haut niveau dans le pancréas exocrine et à très faible taux dans les autres tissus. Le promoteur du gène de l'élastase permet donc de cibler l'expression d'un gène d'intérêt dans le pancréas. Il pourrait donc être fusionné à une enzyme bactérienne comme la cellulose [38].

V.2.4- Thérapie génique et ADN médicament :

Le terme de thérapie génique est employé pour désigner le traitement de maladies génétiques par le remplacement au sein de cellules appropriées du gène défectueux par son homologue normale et fonctionnel. L'une des difficultés majeures de la thérapie génique est le transfert efficace de gènes dans des tissus cibles. Les vecteurs aujourd'hui utilisés sont viraux pour la plupart et non viraux pour d'autres [23].

Les vecteurs viraux fréquemment employés sont les rétrovirus et les adénovirus [23].

La thérapie génique utilise deux stratégies pour délivrer des gènes dans des cellules cibles. La première dite *in vivo* consiste à modifier les cellules en place soit en livrant directement le transgène dans l'organe approprié soit en utilisant un vecteur capable de véhiculer spécifiquement le transgène au tissu choisi. Le transfert de gène s'effectue *in vivo* quand les cellules cibles sont soit totalement différenciées soit comprises dans un organe dont les contraintes architecturales conditionnent la fonction. C'est le cas des muscles striés et cardiaques, du système nerveux central ou du poumon. Dans ces différents cas, conserver l'anatomie correcte constitue un prérequis absolu [2].

La deuxième approche dite *ex vivo* nécessite le prélèvement des cellules, leur modification *in vitro* puis leur réimplantation dans l'organisme. Cette technique est pratiquée quand les cellules ou tissus cibles peuvent être renouvelés à partir d'un pool de cellules précurseurs comme c'est le cas pour le tissu hématopoïétique, lymphocytes, hépatocytes, cellules cancéreuses [2].

La thérapie génique est aujourd'hui envisagée pour le traitement des maladies infectieuses, des cancers, des maladies neurologiques et des désordres métaboliques. Pour le traitement des maladies infectieuses, comme le SIDA par exemple, deux stratégies sont aujourd'hui explorées. La première consiste à réaliser une immunisation intracellulaire et donc à rendre les cellules résistantes à la réplication virale. Cependant, l'efficacité de transfert de gènes dans ces cellules est encore faible et l'intégration de vecteurs rétroviraux nécessite que la cellule se divise, ce qui compromet le développement de la cellule et ses capacités fonctionnelles. La seconde stratégie consisterait à utiliser des cellules modifiées génétiquement, qui expriment des produits de gènes viraux et qui induisent ainsi des réponses immunitaires accentuées [23]. Nous voici pourtant arrivés à

l'ère de la thérapie génique, le premier protocole fut mis en route en 1990 pour traiter une enfant déficiente en adénosine désaminase (ADA). Ces patients souffrent d'une profonde immunodéficience et sont sujets aux infections qu'ils survivent peu d'années. On construisit un vecteur rétroviral porteur du gène ADA et on l'introduisit dans des lymphocytes au patient. Il fallait cependant répéter ce processus après quelques mois car la vie des cellules T est limitée. Le traitement améliora l'état général de la jeune enfant au point qu'elle résistera aux infections et reprit une vie sociale normale [39].

V.3- Les applications des microorganismes transgéniques :

Un organisme transgénique est un microorganisme qui possède de l'ADN recombinant qui contient généralement un gène intégré à toutes ses cellules. La plupart des organismes transgéniques sont des bactéries unicellulaire ou des levures (champignons unicellulaires). C'est pourquoi nous intéresserons principalement aux bactéries et aux levures transgéniques [40].

Les applications des microorganismes transgéniques sont nombreuses et variées :

V.3.1- Application dans le domaine médicale (Les applications thérapeutiques) :

A- Préparation de produits naturels ou synthétiques :

Elles sont importantes dans la fabrication des substances pharmaceutiques. La première substance fabriquée a été l'interféron, glycoprotéines de 20 kd, qui aident le corps à combattre les infections virales [41].

Comme nous l'avons indiqué, on crée des bactéries *E. coli* qui produisent de l'insuline humaine (figure 6). L'insuline est un produit pharmaceutique de très grande valeur. Cette petite protéine est sécrétée par le pancréas et régularise l'assimilation du glucose par les cellules à partir du sang. Pendant longtemps, les personnes souffrants de diabète insulinodépendant ont contrôlé leur maladie en s'injectant de l'insuline provenant du pancréas d'animaux d'abattoir [22].

La purification de cette insuline était un processus onéreux, sans compter que cette hormone n'était pas aussi efficace que celle d'origine humaine [22].

En raison de la valeur de l'insuline humaine et de la petite taille de cette protéine, l'industrie pharmaceutique a cherché très tôt à la produire par les techniques de l'ADN recombiné [27].

Pour fabriquer l'hormone, les gènes de chacune des deux courtes chaînes polypeptidiques formant sa molécule sont d'abord synthétisés chimiquement. En raison de la petite taille de ces chaînes (l'une est constitué de 21 acides aminés et l'autre de 30), il est possible d'employer des gènes synthétiques suivant la méthode décrite plus haut. Chacun des deux gènes synthétiques est inséré dans un vecteur plasmidique et joint à l'extrémité du gène codant pour la B-galactosidase si bien que le polypeptide est produit parallèlement à cette enzyme bactérienne. Deux cultures différentes d'*E. coli*, dans lesquelles on insère un des vecteurs plasmidiques, servent à produire l'insuline, et chacune secrète une chaîne polypeptidique différente. Les polypeptides sont récoltés, séparés de la B-galactosidase et chimiquement assemblés pour fabriquer l'insuline humaine. Cette réalisation a été l'un des premiers succès commerciaux du génie génétique [27].

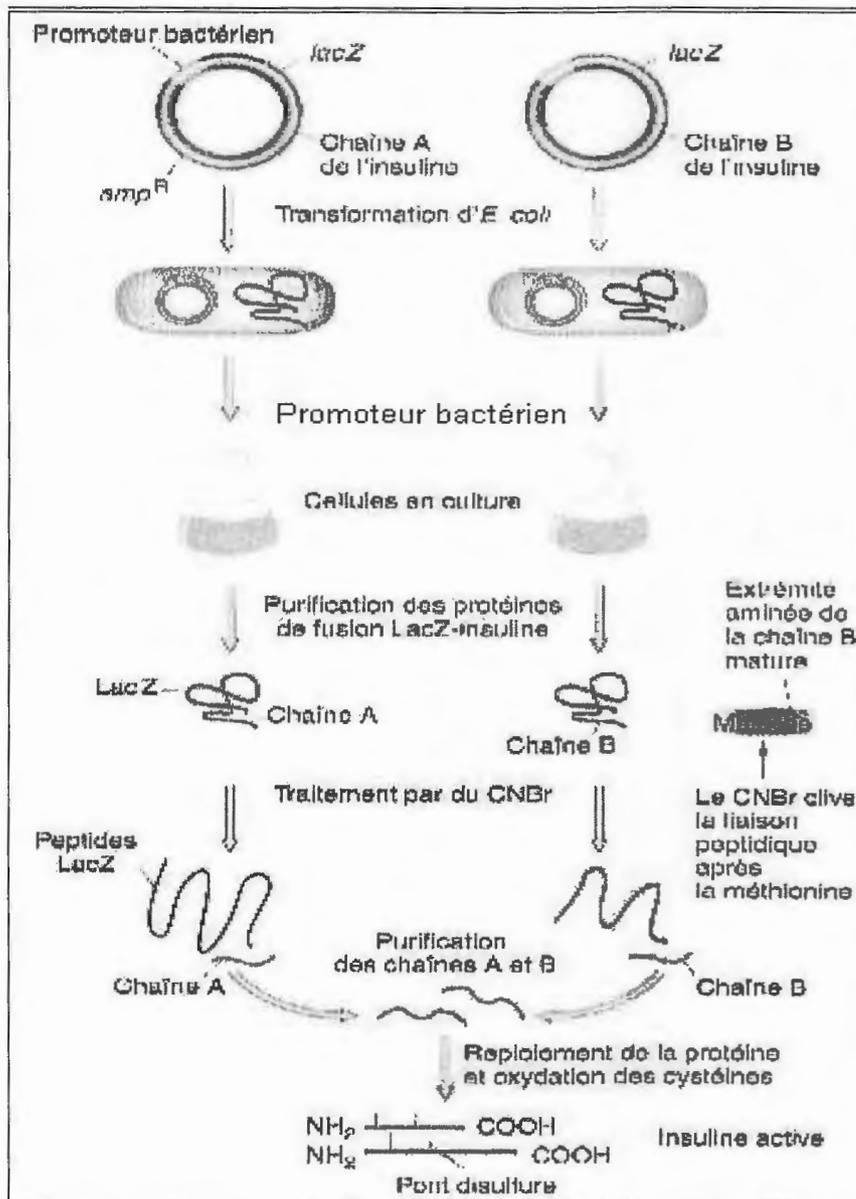


Figure 6 : L'expression de l'insuline humaine chez *E. coli* [22].

On a également fabriqué des bactéries transgéniques qui produisent l'hormone de croissance humaine (HCH). Celle-ci est normalement produite par l'hypophyse de l'individu (située à la base du cerveau) pour stimuler la croissance (figure 7).

Le nanisme, anomalie qui empêche l'enfant d'atteindre une taille normale, est provoqué par un déficit en HCH. On peut traiter les enfants qui en sont atteints en leur administrant des HCH produites par des bactéries génétiquement modifiées [42].

La somatostatine (ou hormone d'inhibition de l'hormone de croissance GHIH) est une autre hormone humaine que l'on produit maintenant commercialement en procédant à la modification génétique d'*E. coli*. Il fut un temps où la production de 5 mg de

somatostatine animale à des fins expérimentales nécessitait 500 000 cerveaux de moutons. En comparaison, on n'a besoin maintenant que de 8 L de culture de bactéries modifiées génétiquement pour obtenir une même quantité d'hormone humaine [42].

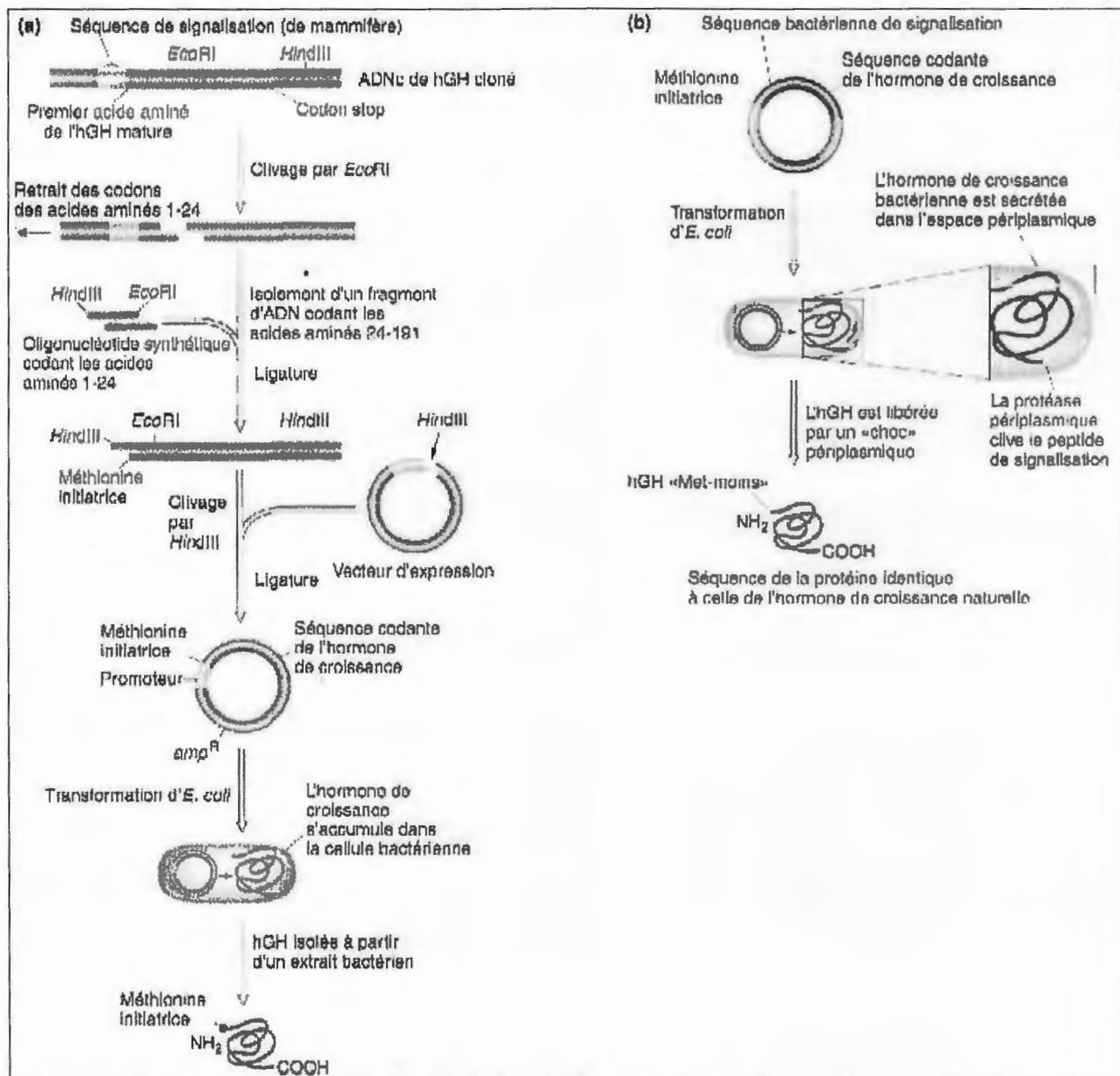


Figure 7 : Expression de l'hormone de croissance chez *E. coli* [22]

L'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) et la streptokinase dissolvent les caillots sanguins. Ils accélèrent donc la guérison des patients ayant subi une crise cardiaque et aident à prévenir les récives, en particulier lorsqu'ils sont administrés aussitôt après la crise. L'activateur tissulaire du plasminogène est produit par des cellules de mammifères génétiquement modifiées et mises en culture, alors que la streptokinase, produit connu de puis un certain temps, est fabriquée naturellement par les bactéries [43].

B- Les vaccins recombinants :

Les vaccins sont classiquement fabriqués à partir de microorganismes inactivés ou à partir de leurs fractions antigéniques isolées. Dans les deux cas, une réponse immunitaire

spécifique est induite chez l'hôte. Les fractions antigéniques des sous unités immunogènes spécifiques peuvent être produites chez d'autres microorganismes, grâce au clonage d'ADN recombinant. Par ce processus, on peut fabriquer des vaccins de conformité parfaite, en quantités voulues et sans le moindre risque de maladies.

Le premier vaccin obtenu par un tel procédé a été le vaccin de l'hépatite B qui est une infection virale du foie pouvant dégénérer en cirrhose et en cancer (figure 8). Un vaccin très efficace contre le virus de l'hépatite B a d'abord été développé en 1982 à partir d'antigènes viraux isolés de plasma humain. Mais sa production à grande échelle s'est révélée problématique, principalement en raison de la disponibilité limitée de plasma adéquat [43].

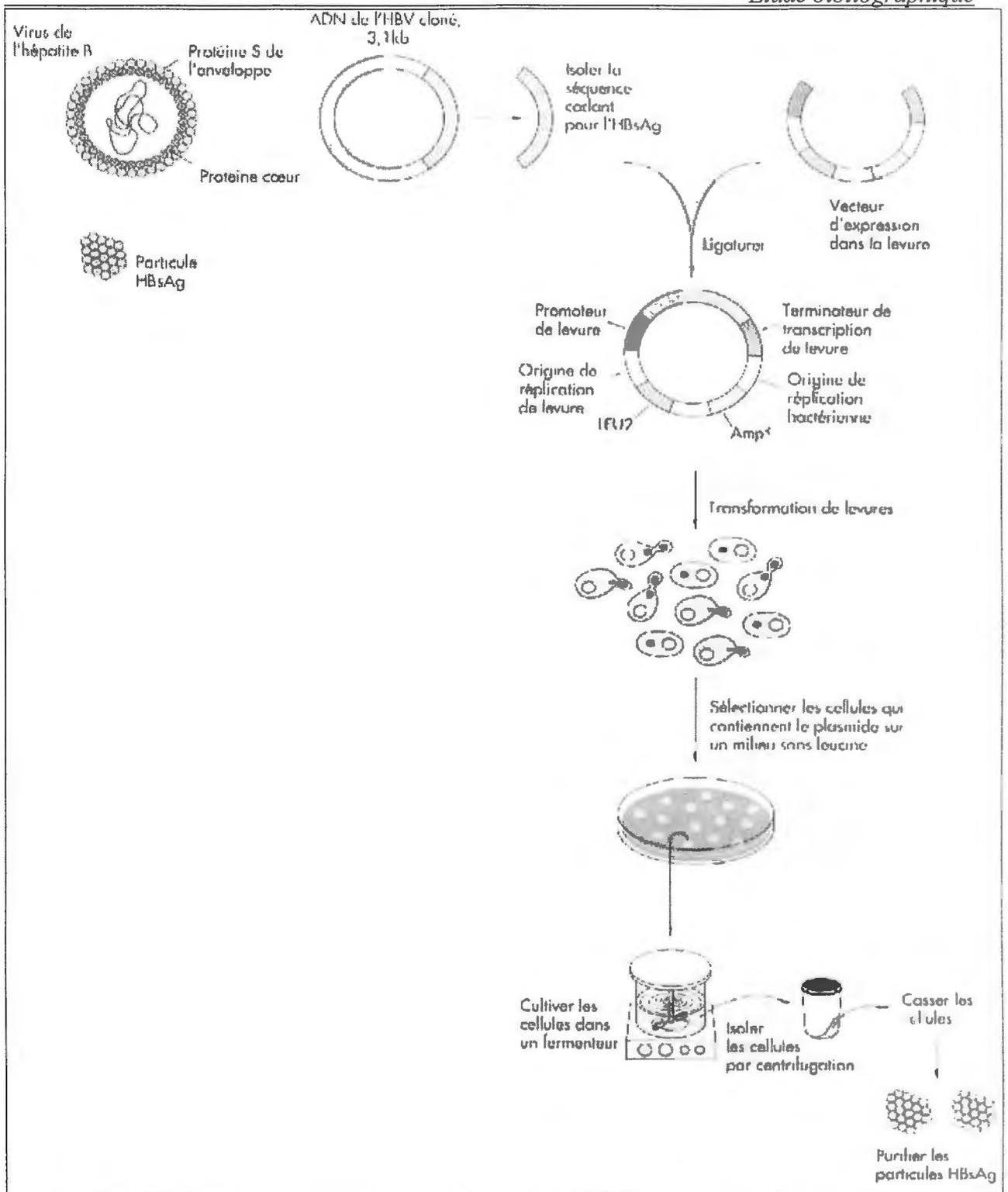


Figure 8 : Production du vaccin de l'hépatite B par les levures [22].

Le clonage des gènes codant pour les antigènes viraux chez *E. coli* et d'autres bactéries a permis la production de composés inactifs car non glycosylés, cette fonction semblant essentielle à l'expression de leur antigénicité. La réalisation des mêmes procédés chez des cellules eucaryotes, dont essentiellement la levure *Saccharomyces cerevisiae*, a débouché sur la biosynthèse de composés glycosylés et antigéniques. D'autres vaccins viraux sont également produits de cette manière, c'est en particulier le cas du vaccin contre la fièvre aphteuse (maladie ovine) [43].

D'ores et déjà, on envisage que le vaccin contre le virus du SIDA sera un vaccin synthétique obtenu grâce aux techniques de génie génétique [44].

C- Le diagnostic médical :

Une grande variété de conditions médicales nous provient de la mutation. Dans les troubles génétiques tels que la dystrophie musculaire ou la fibrose kystique, les individus sont nés avec des gènes défectueux qui causent les symptômes de ces troubles [8].

Plusieurs cancers qui surviennent sont dus à des mutations spontanées dans les cellules somatiques de gènes dont le rôle normal est d'assurer la régulation de la croissance cellulaire [8].

Le clonage des gènes impliqués dans les troubles génétiques et les cancers a montré que certaines mutations sont plus fréquentes et plus corrélées avec des troubles plus agressifs. En utilisant des informations d'une séquence pour élaborer des amorces et des sondes de la PCR, plusieurs tests ont été développés pour dépister les patients qui ont ces mutations cliniquement importantes [8].

En utilisant ces tests, les parents qui sont hétérozygotes pour la mutation peuvent être informés si leur fœtus sera porteur d'un trouble génétique tel que la dystrophie musculaire ou la fibrose kystique (en héritant un gène défectueux de chacun des parents) et donc prendre en considération un avortement. La vérification de la présence de mutations dans un gène peut confirmer un diagnostic basé sur d'autres présentations cliniques. Dans les cas de cancers, la connaissance de l'oncogène muté, et la manière dont il a été muté, peut aider à décider de la meilleure voie de traitement ainsi que l'apport d'informations pour le développement de nouvelles thérapies [8].

V.3.2- Les applications industrielles :

Les applications industrielles de la technologie de l'ADN recombinant concernent la production de dérivés protéiques par des bactéries, mycètes et cellules de mammifères utilisés comme des usines, l'amélioration des souches pour des procédés biologiques existants et le développement de nouvelles souches pour des procédés biologiques nouveaux. L'industrie pharmaceutique produit déjà actuellement plusieurs polypeptides d'importance médicale par cette technologie. En plus, on a intérêt à faire fabriquer par des bactéries recombinantes des enzymes coûteuses d'importance industrielle. Des bactéries qui métabolisent le pétrole et d'autres matériaux toxiques sont déjà développées. Pour construire ces bactéries, on transfère dans les microorganismes appropriés, un plasmide unique où sont rassemblés les gènes cataboliques nécessaires. De nombreuses applications potentielles existent dans les industries chimiques et alimentaires [4].

A- Les principaux produits de la microbiologie industrielle :

La microbiologie industrielle a donné des produits qui ont influencé directement notre vie de multiples façons. Souvent mal appréciées, ces produits ont profondément changé notre vie et notre espérance de vie. Il y a les produits industriels et agricoles, les additifs alimentaires, les produits pharmaceutiques pour la santé humaine ou animale et les biocombustibles [4].

En particulier, au cours des quelques dernières années, des composés autres que les antibiotiques ont été utilisés en médecine et ont contribué de façon importante à l'amélioration du bien-être des populations humaines et animales [4].

A.1- les antibiotiques :

De nombreux antibiotiques sont produits par les microorganismes, surtout par les actinomycètes du genre *Streptomyces*, et par les mycètes filamenteux. De plus, les techniques du génie génétique ont permis d'améliorer les rendements de beaucoup de procédés de fabrication. Ainsi, la souche de moisissure qui est utilisée aujourd'hui pour la production industrielle de la pénicilline, en synthétise plus de 20 grammes par litre de culture, alors que la souche nom remaniée n'en produisait que 60 milligrammes par litre [4].

La pénicilline produite par *Penicillium chrysogenum* est un excellent exemple d'une fermentation pour laquelle on ajuste soigneusement la composition du milieu pour atteindre des rendements maximums (figure 9) [4].

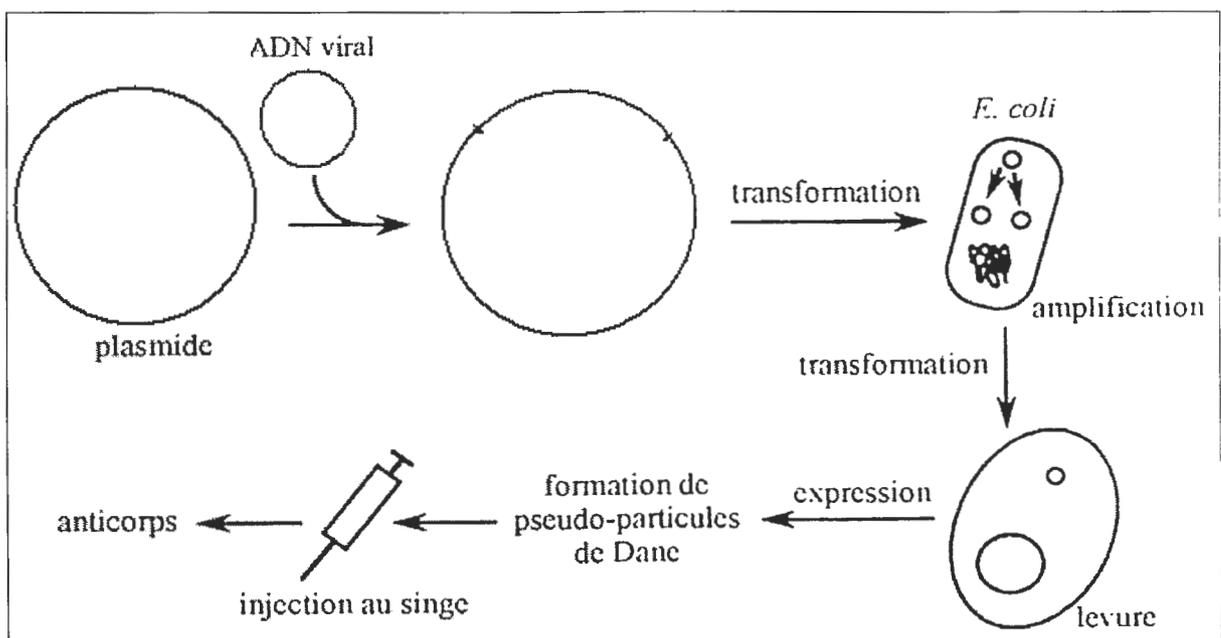


Figure 9 : Production d'anticorps par les levures [9].

A.2- les acides aminés :

On utilise des acides aminés tels que la lysine et l'acide glutamique dans l'industrie alimentaire, comme additifs nutritifs dans les pains et comme rehausseurs de goût dans le cas du glutamate mono sodique [9].

Les acides aminés sont typiquement produits par des mutants de régulation dont la capacité de limiter la synthèse d'un produit final est réduite. Le microorganisme normal évite la surproduction d'intermédiaires biochimiques par la régulation précise de son métabolisme. Actuellement, de grandes quantités d'acide glutamique de plusieurs autres *Corynebacterium glutamicum* qui ne savent plus, ou n'ont plus qu'une capacité limitée de transformer l'alphacétoglutarate (un intermédiaire du cycle des acides tricarboxyliques) en succinyl-CoA. Bien que ce soit peu répandu, on a employé des microorganismes, avec des mutations de régulation apparentées, pour produire une série de nucléotides puriques servant à rehausser le goût de potages et de produits carnés [9].

V.3.3- Les microorganismes transgéniques dans l'alimentation :

La transgénèse permet de conférer à des microorganismes (levures, bactéries) utilisés en alimentation des propriétés nouvelles ou de renforcer leurs propriétés initiales. Une levure génétiquement modifiée à partir de constituants de la même souche est utilisée en Grande Bretagne pour la panification [45].

Plusieurs enzymes purifiées issues de bactéries transgéniques sont aussi déjà utilisées : diverses autres applications sont envisagées [45].

Pour plusieurs produits alimentaires fermentés, les microorganismes transgéniques pourraient être à la base de différentes innovations. On pourrait disposer des souches aux propriétés améliorées dans des domaines très variés : enzymes mieux adaptées aux transformations, nouveaux composés d'arômes naturels ou agents texturants, meilleure résistance aux bactériophages, molécules inhibitrices des germes indésirable, ou molécules probiotiques bénéfiques pour la santé de consommateur [45].

A- Intérêt des levures transgéniques :

Les levures jouent un rôle essentiel dans la panification, l'œnologie et la transformation de l'amidon en sucres[46].

La génétique moléculaire a été développée chez plusieurs levures, dont *Saccharomyces cerevisiae*. Pour les levures de boulangerie, plusieurs améliorations pourraient être envisagées : vitesse de croissance et rendement de production, résistance au séchage pour les levures qui doivent être produites sous forme de ferments secs actifs, résistance au froid pour des préparations des pâtes destinées à être congelées et conservations (car l'activité fermentaire des levures diminue au cours des stockages) [46].

De plus, le pouvoir fermentaire de la pâte et le développement de la saveur du pain résultent d'un ensemble d'activités enzymatiques liées au catabolisme du sucre. En remplaçant les promoteurs naturels des gènes des enzymes responsables de la fermentation du maltose (maltase et maltose perméase) par des promoteurs constitutifs forts, provenant de la même souche. On a obtenue une sécrétion accrue de ces enzymes. La levure ainsi modifiée métabolise mieux le maltose et libère des quantités de CO₂ plus importantes à un stade précoce, ce qui diminue le temps de levure de la pâte.

Dans ce cas, il faut remarquer qu'il y a cuisson du pain et que les consommateurs n'absorberont pas de levures vivantes [46].

De même, la fermentation d'un mout de brasserie fait intervenir le métabolisme des sucres, des acides aminés, des peptides et des lipides, pour aboutir à la formation d'éthanol, de CO₂ et de composés aromatiques [45].

Par transgénèse, un certain nombre d'équipes internationales envisagent l'obtention de souches présentant des propriétés plus intéressantes : métabolisme plus stable, fermentation plus rapide, meilleure conversion du maltose et du maltotriose en éthanol, profils aromatiques équilibrés et reproductibles, caractère plus ou moins floculant [46].

Quand aux vins, la fermentation alcoolique constitue l'étape fondamentale de leur élaboration alcoolique. La fermentation alcoolique de levures pose deux problèmes : celui de la stabilité des souches, et celui de leur développement dans les milieux déjà riches en microorganismes que sont les moûts de raisin. Les principales propriétés à améliorer et à stabiliser pourraient être le rendement en éthanol et la tolérance à cet

éthanol, la production d'ester et de glycérol, l'adaptation à des températures extrêmes. des exigences faibles en éléments nutritionnels. D'autres propriétés pourraient être recherchées comme la tolérance au SO₂, la fermentation malo-lactique, ou le caractère floculant qui intéresse notamment l'élaboration de vins mousseux par la méthode champenoise [45].

Des levures alimentaires transgéniques sont aussi utilisées pour produire des protéines hétérologues comme la chymosine A, enzyme de la présure utilisée pour la coagulation du lait en fromagerie. En effet, à la suite d'une pénurie croissante de présure de veau, on recherche de puis une vingtaine d'années des succédanés de présure utilisables industriellement. Le gène de la chymosine a été cloné dans la levure laitière *Kluyveromyces lactis*, qui l'exprime, puis cette chymosine a été utilisée dans plusieurs pays (Etats-Unis, Grande Bretagne, Japon ...), mais pas en France, pour fabriquer différents fromages. Les résultats obtenus avec de la chymosine produite par la levure transgénique sont identiques à ceux observés avec la présure de veau [46].

Les techniques de purification de l'enzyme sont telles que les préparations commerciales de celle qui ne renferment pas de levures transgéniques, qui ne seront donc pas retrouvées dans le fromage [46].

B- Intérêt des bactéries transgéniques :

L'évolution inéluctable de la fabrication des produits laitiers fermentés (laits fermentés. yaourts et fromages) dans de grandes unités mécanisées, la généralisation de la conservation du lait au froid, ainsi que l'amélioration de la régularité des qualités organoleptiques des produits artisanaux ou traditionnels, impliquent une maîtrise de plus en plus grande de la fermentation lactique et une bonne connaissance des levains. En effet, il est désormais bien démontré qu'en plus de leur importance dans l'acidification du lait, les bactéries lactiques jouent un rôle primordial dans l'apparition de l'arôme ou de précurseurs d'arôme, ainsi que dans la texture finale de produits [47].

L'étude des polysaccharides exocellulaires secrétés par certaines bactéries lactiques montre qu'ils jouent un rôle fondamental dans la texture des laits fermentés, et notamment des yaourts brassés [47].

Or, la biosynthèse de ces composés est très peu connue. Elle implique de très nombreux gènes, d'où le caractère particulièrement instable de leur production. A terme, on devrait pouvoir obtenir des souches aux caractères stabilisés, produisant plus de polysaccharides aux caractéristiques rhéologiques adaptées aux produits souhaités [47].

Des virus spécifiques peuvent infecter des bactéries, s'y multiplier et entraîner la mort des cellules qui les contiennent, d'où des retards d'acidification. Ces phases lytiques se répandent dans les ateliers de fabrication ou de préparation des levains. Réinfectant de nouvelles souches, ils pénètrent dans la cellule bactérienne, s'intègrent à son chromosome, supportent plusieurs divisions cellulaires sans devenir lytiques, mais peuvent le redevenir de façon inattendue [48].

Les techniques de génie génétique permettent actuellement d'augmenter la résistance des bactéries lactiques aux bactériophages. Les bactéries lactiques produisent une grande variété de peptides ou de protéines ayant une activité antibactérienne. Ces molécules appelées bactériocines, (produites par des souches de lactocoques) pourraient être mieux exploitées dans diverses transformations laitières, notamment pour assurer la sécurité hygiénique de certains fromages. Au jour d'hui, la nisine, bactériocine utilisée par des industriels permet par exemple de lutter contre le gonflement butyrique des fromages

fondus. Par ailleurs, ces molécules ou les souches les sécrétant pourraient être utilisées pour contrôler le niveau de germes pathogènes comme *Listeria monocytogenes* ou

Staphylococcus aureus de certains fromages. Leur efficacité est d'autant plus grande que la contamination du lait est faible, ce qui exige d'améliorer la qualité bactériologique du lait cru. Les souches transgéniques seraient plus efficaces car après mutagenèse dirigée, on pourrait les rendre plus spécifiques vis-à-vis des bactéries cibles [48].

En effet, on constate que les bactériocines des souches sauvages sont souvent inefficaces dans le fromage, alors que les bactériocines modifiées pourraient être plus stables [49].

Si à ce jour, il n'y a pas encore de bactéries lactiques transgéniques autorisées dans les aliments, en revanche, quatre enzymes issues d'autres bactéries génétiquement modifiées le sont. Deux peuvent être utilisées pour l'hydrolyse de l'amidon ou la production de bière ou d'alcool (une amylase de *Bacillus licheniformis* modifiées par recombinaison homologue, et une alpha-amylase de *Bacillus licheniformis* contenant les gènes de *Bacillus stearothermophilus*). La troisième joue un rôle dans la panification et la production des sirops de maltose (une exoamylase maltogène de *Bacillus subtilis* contenant le gène de *Bacillus stearothermophilus*) [49].

Enfin, la quatrième intervient dans la fabrication de bière et d'alcool (une acétolactate décarboxylase de *Bacillus subtilis* contenant le gène de *Bacillus brevis*) [49].

Des bactéries lactiques et des levures sont adaptées à la production de légumes fermentés (olives, choucroute) [50].

Dans le domaine de l'élevage, on peut noter qu'en alimentation animale, un certain nombre d'additifs à usage alimentaire pour les animaux, thréonine, tryptophane et lysine produites par des bactéries recombinantes sont également utilisées [50].

La phytase, par exemple, enzyme présente à l'état naturel chez certains végétaux, peut être obtenue par ce moyen et contribue à accroître la digestibilité du phosphore d'origine végétale, contribuant ainsi à réduire la pollution phosphatée causée par les rejets animaux [50].

V.3.4- La biorestauration :

Les divers constituants de notre environnement sont de plus en plus contaminés par des agents physiques et, surtout, chimiques susceptibles de porter préjudice à notre santé [51].

Chaque organisme vivant, depuis les animaux jusqu'aux plantes en passant par les bactéries, ingère des nutriments pour vivre et produit par la suite des déchets. Différents organismes ont besoin de types différents de nutriments, que les processus métaboliques vitaux décomposent de manière particulière, à près quoi les organismes excrètent [52].

Les déchets dangereux comportent les déchets ménagers spéciaux ou déchets toxiques en quantités, et les déchets industriels spéciaux au contenu polluant ou aux propriétés explosives, ou inflammables [53].

Certaines bactéries se développent grâce à la décomposition chimique de déchets, et leur métabolisme convertit ces matières dangereuses ou toxiques en produits inoffensifs. Par exemple, certains microorganismes se nourrissent de matières toxiques ou dangereuses comme les hydrocarbures (pétrole), le chlorure de méthylène, une variété de détergents, la créosote, le pentachlorophénol, le soufre et le biphenyle polychloré (PBC). On appelle biorestauration l'utilisation d'organismes vivants pour dégrader les déchets. Le terme

biorestauration regroupe deux mots : bio, diminutif de biologie et restauration, qui signifie la grande majorité des applications de la biotechnologie environnementale qui

utilisent des microorganismes d'origine naturelle pour décomposer et filtrer les déchets avant qu'ils ne s'introduisent dans l'environnement. Toutefois, on étudie et met à l'essai

Certains systèmes plus perfectionnés utilisant des microorganismes transgéniques pour traiter les déchets et prévenir la pollution afin d'enlever des matières difficiles à décomposer [54].

Par exemple, on a mis au point des bactéries transgéniques *Pseudomonas* capables de décomposer des composés polyhalogénés, qui constituent une grande catégorie de polluants, en des produits inoffensifs [55].

On a également mis au point des bactéries capables de convertir des ions de métaux lourds toxiques en des formes d'éléments moins toxiques plus faciles à isoler et à enlever de l'environnement [55].

Par exemple, les chercheurs ont signalé la mise au point de *E. coli* transgénique capable de nettoyer les milieux pollués par le mercure (Hg^{2+}) [55].

On a créé des microorganismes transgéniques qui possèdent des gènes pour la bioluminescence (éclairage) ainsi que des gènes présents à l'état naturel qui leur permettent de décomposer les contaminants. Le résultat de cette relation génétique est que les bactéries s'allument lorsqu'elles travaillent à la décontamination [54].

Par exemple, les gènes pour la production de lumière (lux-gènes) ont été liés aux gènes d'un microorganisme pour la décomposition de la naphthaline [55].

On mesure l'activité du microorganisme sur place en fonction des changements dans les niveaux de lumière relevés par les détecteurs à fibres optiques. Ce système de repérage permet aux scientifiques de déterminer, en fonction de l'intensité de la lumière émise, si les bactéries font leur travail. Par ailleurs, les scientifiques peuvent analyser rapidement l'efficacité de l'organisme et optimiser les conditions (comme les niveaux nutritifs) pour une émission maximale de lumière (et donc d'activité de biodégradation) [56].

VI- Diffusion des OGM :

En 2000, trois pays recelaient la quasi-totalité des OGM dans le monde : Etats-Unis (69 %), Argentine (23 %) et Canada (7 %). Cependant, le nombre de pays qui adoptent progressivement les cultures transgéniques est passé de six en 1996 à 13 en 2000 (Etats-Unis, Argentine, Canada, Chine, Mexique, Ukraine, Bulgarie, Roumaine, Russie, Australie, Afrique du sud, Espagne et France). En Algérie, bien qu'un arrêté ministériel interdise l'introduction de plantes et de semences génétiquement modifiées, aucune réglementation ni contrôle ne sont faits pour les denrées importées à l'alimentation (oléagineux servent à la fabrication des huiles, tourteaux, céréales destinées aux minoteries ...) [30].

DISCUSSION

Discussion :

Le génie génétique n'est pas une science ; c'est un recueil de techniques pour isoler et modifier des gènes. Cet ensemble d'interventions sur l'ADN ressortit essentiellement au domaine de la biologie moléculaire, par lequel des fragments d'information génétique peuvent être transférés d'un organisme à un autre, de même espèce ou d'une espèce différente. Dans l'organisme hôte, l'information génétique introduite remplace ou supplée à une information génétique existante, ou bien encore elle constitue pour l'organisme hôte un nouveau type d'information [57].

Les OGM font déjà l'objet de nombreuses applications. La modification génétique des microorganismes offre des possibilités nouvelles en recherche : par exemple, modifier des levures pour la production de protéines à usage industriel ou thérapeutique, de métabolites ou de précurseurs pour la chimie fine. S'appuyant sur une technologie plus économique et plus sûre, elle offre la possibilité de produire des médicaments (insuline, hormones de croissance, vaccins) à moindre coût. Enfin, on note une contribution possible à la protection de l'environnement. Ainsi, dans l'industrie, des enzymes produites par des microorganismes transgéniques entrent dans la fabrication de produits de lessive ; des bactéries transgéniques servent à produire un polymère biodégradable qui entre dans la fabrication de tissus ; d'autres doivent servir à la dépollution des sols. La modification génétique des microorganismes est sans doute celle qui soulève le moins de questions quant aux risques, notamment en raison des contrôles sévères dans le domaine des médicaments. Peu de risques d'allergie ou de toxicité seraient associés à ces organismes et les risques de propagation dans l'environnement semblent minimes. En ce qui concerne les OGM relâchés dans l'environnement, cependant, il apparaît impossible d'affirmer que les risques sont inexistantes [57].

CONCLUSION

Conclusion :

Plusieurs microorganismes sont déjà utilisés couramment pour leur effet favorable sur la santé. L'utilisation de la transgénèse permet de mieux connaître leur action et d'envisager de renforcer leurs propriétés bénéfiques. Il est aussi possible par ce moyen de faire produire des molécules ayant des effets thérapeutiques. Trois types de molécules pouvant être utiles dans certaines affections liées à l'immunité, à la digestion ou au fonctionnement hormonal ont déjà été produits avec succès.

Les microbes sont souvent, bien à tort, mal considérés à travers l'impact médical, social et psychologique de leurs représentants pathogènes. Cependant de nombreux microorganismes cohabitent depuis toujours avec l'homme, et celui-ci les utilise depuis longtemps, parfois sans le savoir. Les plus connus sont les levures et les bactéries lactiques, utilisées depuis des millénaires dans la fabrication de produits fermentés (pain, bière, dérivés laitiers et carnés...). Depuis leur découverte "scientifique" par Pasteur, l'homme a appris à mieux contrôler les microorganismes pathogènes, et à utiliser plus rationnellement ceux qui pouvaient lui être utiles. Aujourd'hui, les techniques de la biologie moléculaire lui permettent de manière spectaculaire d'utiliser à son profit les capacités de ces organismes. Par exemple, certaines bactéries comme *Escherichia coli* sont déjà utilisées pour produire un vaccin anti-hépatite B ou l'hormone de croissance. Malheureusement, cette bactérie contient des facteurs pyrogènes (induisant la fièvre), ce qui nécessite de purifier les substances bénéfiques et augmente considérablement le coût de production.

Parmi les microorganismes, certains peuvent être utilisés comme médicament. Par exemple, *Saccharomyces boulardii* est couramment prescrit dans les cas de diarrhées associées aux antibiotiques. Mais ce n'est pas toujours vrai. Par exemple, les effets bénéfiques à long terme des bactéries lactiques sur la santé n'ont pas été démontrés avec la même rigueur que pour un médicament. Il est donc tentant de vouloir mieux utiliser ces microorganismes dans le domaine de la santé.

Les bactéries lactiques pourraient, à terme, être utilisées comme vecteur de molécules thérapeutiques. Il serait alors hors de question de commercialiser ces souches sous la forme de produits alimentaires. Les formules sous lesquelles ces bactéries pourraient être administrées sont diverses, comme par exemple des comprimés ou des gélules contenant les bactéries lyophilisées. Le faible coût de production de tels médicaments devrait permettre de réduire certaines dépenses de santé.

Les bactéries lactiques génétiquement modifiées permettront à plus ou moins long terme de nous protéger contre certaines pathologies digestives aussi variées que les déficiences enzymatiques ou les infections bactérienne ou virale, ou même les allergies alimentaires.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie :

- [1] TEPFER, M et BALAZS(Ed).Virus resistant transgenic plants. Potential ecological impact. Inra, springer, OCDE, 1997, p126.
- [2] OULMOUDEN, A et al. Génétique. Paris, dunod, 1999, pp 169, 185.
- [3] MORAN, L-A et al. Biochemistry. 2^{ème} édition, (New Jersey : Neil Paterson publishers/ prentice hall, 1994), 3329.
- [4] PRESCOTT et al.Microbiologie. Bruxelles, deboeck université, 1995, p 256, 303, 304.
- [5] GOUVERNEMENT DU QUÉBEC. Commission de l'éthique de la science et de la technologie. Mémoire sur « les nouveaux enjeux de la sécurité alimentaire au québec » (2004).
- [6] ETIENNE, J. Biochimie génétique biologie moléculaire. 4^{ème} édition. Paris, masson, 1998, p220.
- [7] RONALD, P. Le riz génétiquement modifié. Pour la science, 1998, PP 243, 68-73.
- [8] TURNER, P-C et al. L'essentiel en biologie moléculaire. Paris, port royal livres, 2000, pp 188, 189.
- [9] SCRIBAN, R et professeur ALAIN, P. Biotechnologie. Paris, TEC ET DOC, 1999, pp 427, 524, 732.
- [10] GRIFFITHS, F- J et al. Introduction a l'analyse génétique . 3^{ème} édition. Paris, de boek, 2002, p 283.
- [11] SINGLETON, P et DUSART, j. Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies. 6^{ème} édition. Paris, dunod, 2005, p 202.
- [12] BOUSSEBOUA, H. Elémentes de microbiologie. 2^{ème} édition, constantine (Algérie), éditions campus – club, 2005, pp 149, 150.
- [13] HINNEN et al. transformation of yeast. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75, 1929-33. (1978).
- [14] Bundock, P et al. Integration of agrobacterium- tumefaciens T-DNA in the *saccharomyces cerevisiae* genome by illegitimate recombination. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 93, 15272. 5 (1996).
- [15] De Groot M. J-A et al. Agrobacterium tumefaciens- mediated transformation of filamentous fungi- nature biotechnol , 1998, pp 16, 839-842.

- [16] PRIMROSE, S et al. Principes de génie génétique. 6^{ème} éditions. Paris, pp 156 .157.
- [17] SUIRAUD, J-P. Génétique microbienne bases théoriques et introduction au application pratiques. Paris, TEC ET DOC, 1993, p 308.
- [18] ELROD, S et al. Génétique. 4^{ème} édition. Paris, dunod, 2003, p p 418-432.
- [19] ETIENNE, J. Biochimie génétique biologie moléculaire. 5^{ème} édition. Paris, masson, 1999, pp 44, 321, 415.
- [20] كلودين غيران-مارشان وترجمة الدكتور فؤاد شاهين اختبارات علم الوراثة. بيروت-لبنان، عويدات للنشر والطباعة، 2002، الصفحة 55.
- [21] HERBERT, E. Génétique cours exercices corriges annales corrigées. Paris, éditions Robert Atlani, 1997, p 281.
- [22] WATSON et al. ADN recombinant. 2^{ème} édition. Bruxelles de boek université, 1994, pp 64,455, 457, 459.
- [23] MAFTAH, A et JULIEN, R. Biologie moléculaire. 2^{ème} édition. Paris, dunod, 1999, p 96, 97, 100, 153, 154, 298.
- [24] Dr. MOULESSEHOULS. Biologie moléculaire. Ben aknoun (Alger), l'office des publication universitaires, 2004, p 20.
- [25] GENEVÉS, L. Aide-mémoire de biologie moléculaire. 2^{ème} édition. Revue et augmentée. Paris, 1996, pp 110 , 111.
- [26] LARPENT, J- P. Biotechnologie des levures. Paris, Masson, 1991, p 88.
- [27] TORTORA, G et al. Introduction à la microbiologie. 2^{ème} édition. Canada, 2003, pp 278.280-287.
- [28] LANSING, M-P et al. Microbiologie. 2^{ème} édition. Paris. De boek, 2003, p 335.
- [29] Académie des sciences -CADAS Rapport commun n° 2. Les techniques de transgénèse en agriculture. Paris, TEC ET DOC, 1993, p40.
- [30] Compilation par Frédéric Prat de différentes sources, dont principalement l'international service for the acquisition of agribiotech application (ISAAA), 1997, 1998, 1999, 2000.
- [31] ALI BRAC, R-P, FRANCK, S. Graines suspectes plantes transgénique : une menace pour les moins nantis. pp 73, 83.
- [32] TOURTE, Y et TOURTE, C. Génie génétique et biotechnologie : concepts et méthodes, Application à l'agronomie et aux bio-industrie. Paris, dunod, 1998, p145.
- [33] TOURTE, y et al. Génie génétique et biotechnologies concepts, méthodes et applications agronomiques. 2^{ème} édition . Paris, dunod, 2002, pp 171, 174, 175.

- [34] THIBAULT, C et al. Reproduction in mammals and man. Paris, ellipses, 1993. p800.
- [35] BELAISCH, J et al. Contraception -fertilité- sexualité. 3^{ème} édition. Réunion de la SFEF. Paris ,1992 .
- [36] EBERT, K-M , SCHINDLER, J-E-S. Transgenic farm animals : progress report-theriogenology ,1993, P 39,121,135.
- [37] PALMITER, R-D et al. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjection with metallothionein – growth hormone fusion genes. London, 1982, pp 300, 611, 615, 800.
- [38] BABIUK, L-A. PHILLIPS J-P. Animal biotechnology, comprehend-save biotechnology. 1st supplement , pergamon press, oxford , 1989 , P : 260
- [39] LODISH et al. Biologie moléculaire de la cellule. 3^{ème} édition, américaine, de boek université, 1997, pp 299.
- [40] MORAN, L-A et al. Biochemistry, (New Technology 14 (5-8), 264- 276.
- [41] DUPUY, y et al. Les microorganismes du gène à la biosphère. Paris, ellipses édition marketing S-A, 2005, pp166, 167.
- [42] KATtZ, J and SATELLE, D-B. Biotechnology for ALL, (cambridge :Hobsons,1991), pp 28, 92.
- [43] BOUSSEBOUA, H. Microbiologie générale .Constantine, édition de l'université mentouri, 2002 , p 150.
- [44] CREPIN, M. Expression des gènes et génie génétique. Paris, collection méthodes HERMANN, EDITEURS DES SCIENCES ET DES ARTS, 1987, p 298.
- [45] Von WRIGHT. A, BRUCEA. Genetically modified microorganismes and their potential effects on human health and nutrition (2003) trends in foods science and jersey : Neil patterson , 1994) pp 33, 35 .
- [46] BOURGOIS, C-M et LA PRENt, J- P, Microbiologie alimentaire.Tome 2. Aliments fermentés et fermentation alimentaires. 2^{ème} édition. Paris, technique et documentation lavoisier, 1996 .
- [47] DESMAZEAUDM, H. Levains lactiques et levains non lactiques. Utilisation et perspectives. Paris, 1993.
- [48] DESMAZEAUDM. Les bactéries lactiques dans l'alimentation humaine : Utilisation et innocuité, chiers agriculture. 5^{ème} edition, 1996, pp 331, 343.
- [49] Association of manufacturers of fermentation enzyme products, cité par : « les biotechnologie dans l'alimentation », EFIC, 1995.

- [50] SZCZEBARA F, M et coll. Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast. *Nature biotechnology*, 21 février 2003, pp 143-149 .
- [51] ALAIN, L. Les mutagènes de l'environnement et leurs effets biologiques. Paris , masson , 1990 , p 5.
- [52] Biotechnologie au canada. Bulletin science et environnement. Environnement canada. Numéro 11,1999.
- [53]CHRISTIAN, NGÔ et al. Déchets et pollution impact sur l'environnement et la santé. Paris, dunod, 2004, p 108.
- [54] La stratégie canadienne et biotechnologie : un processus de renouvellement continu. Secrétariat canadien de la stratégie pour la biotechnologie. Ottawa : industrie canada catalogue N^o- C21-22\5 -1998.
- [55] Bacteria biotech : developing environmental alternatives in the oil industry. The Ag biotech infosource, Issue 42, 1999.
- [56]GRACE, E-S. Biotechnologie unzipped :Promises and readities, (toronto :Trifolium Books INC , 1997), p 140.
- [57] LINTS, F .Genétique3. 3^{ème} édition. Paris, office international de librairie, 1991, p 281.

GLOSSAIRE:

clonage: dans la technologie de l'ADN recombinant, consiste à insérer et perpétuer un fragment d'ADN dans un vecteur, dite le clonage.

Ex vivo: se dit des expérimentations effectuées sur des cellules en culture.

Insertion : addition d'une ou plusieurs paires de bases dans un ADN chromosomique.

In vivo: réaction ou processus qui se produit dans un organisme vivant.

Sphéroplastes : les cellules sans paroi.

Présenté par : YNINEB Hakima
LAHMAR Saliha

Dirigé par : M^{elle} CHERBAL Asma

Date de soutenance : 19 Juin 2007

LES DOMAINES D'APPLICATION DES MICROORGANISMES TRANSGENIQUES

Nature du diplôme : Diplôme d'études supérieures en Biologie option Microbiologie

Résumé :

La transgénèse est une technique de biologie moléculaire destinée à transformer le génome d'un organisme receveur en y insérant un gène qu'il ne possède pas naturellement. Elle est devenue aujourd'hui une pratique courante de laboratoire car ses applications pratiques sont nombreuses et variées.

Les microorganismes transgéniques sont au centre de nombreuses recherches en génie génétique. La présente recherche explore les différents domaines d'application des microorganismes transgéniques. En effet, La modification génétique des microorganismes offre des possibilités nouvelles en recherche telle que la modification des levures et des bactéries pour la production de protéines à usage industriel ou thérapeutique, de métabolites ou de précurseurs pour la chimie fine. S'appuyant sur une technologie plus économique et plus sûre, elle offre la possibilité de produire des médicaments (insuline, hormones de croissance, vaccins) à moindre coût. Enfin, on note une contribution possible à la protection de l'environnement.

Mots-clés : transgénèse, gène, génie génétique, modification génétique, microorganismes transgéniques.

Abstract:

Transgenesis is a molecular technique of biology intended to transform the genome of a receiver organism while inserting there a new gene. It became today a current practice of laboratory because its practical applications are numerous and varied.

The transgenic microorganisms are in the center of many researches in genetic engineering. The present survey explores the various applications of transgenic microorganisms. Indeed, the genetic modification of microorganisms offers new possibilities such as the modification of yeasts and bacteria for the production of proteins of industrial or therapeutic use, and for the production of metabolites or precursors for fine chemistry. Being based on a more economic and surer technology, it makes it possible to produce drugs (insulin, growth hormone, and vaccines) at lower cost. Finally, we notice a possible contribution to the environmental protection.

Keywords: transgenesis, gene, genetic engineering, genetic modification, transgenic microorganisms.

الملخص :

إن التعديل الوراثي وسيلة من الوسائل البيولوجية التي تهدف إلى تغيير المادة الوراثية لكانن مستقبل و ذلك بإدخال مورثة له لم يكن يملكها من قبل. وقد أصبحت هذه الوسيلة في يومنا هذا ممارسة سارية في المخابر لأن تطبيقاتها العملية عديدة و متنوعة. و تعد الكائنات الدقيقة المعدلة وراثيا محور أبحاث عديدة في الهندسة الوراثية. في الواقع، فإن التعديل الوراثي للكائنات الدقيقة يوفر إمكانيات جديدة في البحث، مثل التعديل الوراثي للبكتيريا و الفطريات للحصول على بروتينات ذات استعمالات صناعية أو دوائية، و كذا الحصول على مواد أيضا من أجل الاستعمالات الكيميائية. بارتكازه على تكنولوجيا أقل كلفة و أكثر ضمانا، يمنح التعديل الوراثي إمكانية صناعة أدوية كالأستولين، هرمون النمو و مختلف اللقاحات بأقل تكلفة كما أنه يساهم في حماية البيئة.

الكلمات المفتاحية : التعديل الوراثي، مورثة، الكائنات الدقيقة المعدلة وراثيا، الهندسة الوراثية.