

L'expression des gènes est un mécanisme hautement réglementé qui contrôle la fonction et l'adaptabilité de toutes les cellules vivantes, y compris les procaryotes et les eucaryotes (**Fig.09A**). Il existe plusieurs techniques pour étudier et quantifier l'expression des gènes et sa régulation. Certaines de ces techniques sont anciennes et bien établies tandis que d'autres sont des techniques de multiplexage relativement nouvelles. Le domaine de l'analyse de l'expression des gènes a connu des avancées majeures dans les différents domaines de recherche. Les méthodes traditionnelles se sont concentrées sur la mesure de l'expression d'un gène à la fois et non dans un contexte biologique particulier. Cependant, aujourd'hui, les techniques d'expression d'ARNm ont conduit à des améliorations dans l'identification des gènes.

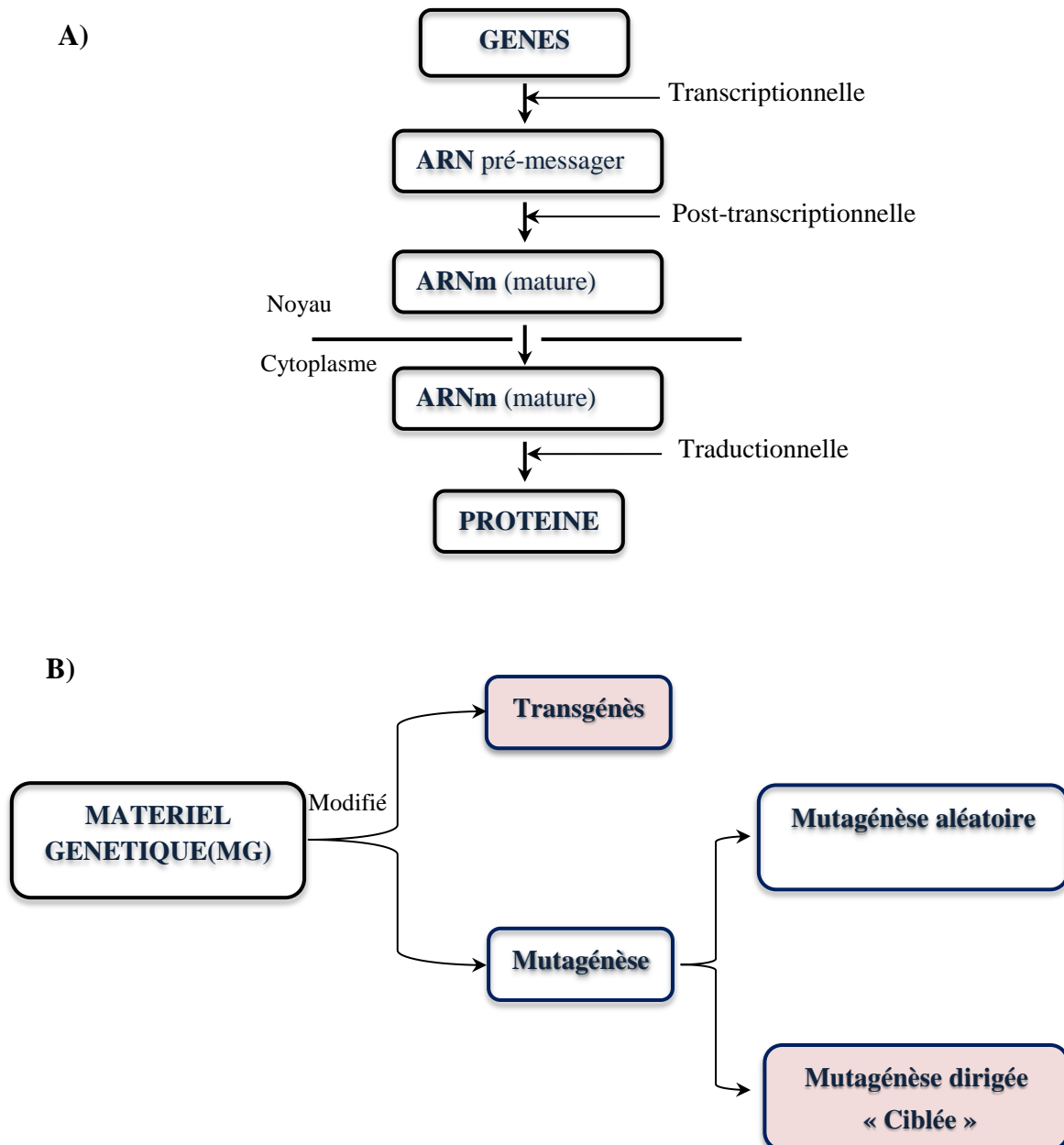


Fig.09: A : Différents niveaux de régulation de l'expression d'un gène. **B** : Méthodes de modification du matériel génétique

V.1. Méthodes d'étude de l'expression des gènes

V.1.1. Analyse qualitative et quantitative des transcrits

V.1.1.1. Northern blot

Deux techniques analytiques de biologie moléculaire dérivent du *Southern blot* par goût du jeu de mot, elles ont été nommées : *Northern blot* et *Western blot*. La technique de *Northern blot* développée par Alwin et ses collaborateurs en 1977, permet de visualiser un ARN spécifique au sein d'une population hétérogène d'ARN par l'utilisation d'une sonde reconnaissant au moins 20 bases de la partie codante du gène correspondant. La visualisation d'un ARN permet de :

- ✓ Apprécier sa distribution dans les tissus et d'étudier son abondance relative (analyse semi-quantitative), on peut alors déduire de ces observations l'expression plus ou moins importante de certains gènes (Fig.10A).
- ✓ Déterminer la taille de cet ARN.
- ✓ Détecter les intermédiaires de maturation et les différentes formes d'épissage d'ARN (analyse qualitative).

Le principe de cette technique est le même que celui de *Southern blot*, mais dans ce cas ce sont les ARN qui sont étudiés (molécule cible), avec quelques adaptations pratiques :

- ✓ Les ARN étant des entités isolables, contrairement aux gènes, il n'est pas nécessaire de faire appel aux enzymes de restriction.
- ✓ Les ARN totaux extraits sont soumis à une électrophorèse en gel d'agarose afin d'obtenir une séparation en fonction de leur taille. Leur riche structure secondaire doit être détruite afin qu'elle n'intervienne pas dans leur mobilité, pour cela l'électrophorèse est pratiquée en présence d'un agent dénaturant, ici le formaldéhyde (déstabilisent les appariements entre bases) à la place d'hydroxyde de sodium (la soude) utilisé en *Southern blot*. La soude est remplacée par le formaldéhyde puisque le groupe hydroxyle en position 2' du ribose chez l'ARN peut être facilement ionisé en milieu alcalin générant un O^- qui peut facilement briser le lien phosphodiester en attaquant le groupe phosphoryle adjacent (Fig.9B).
- ✓ L'extrême sensibilité des ARN vis-à-vis des ribonucléases, enzymes très répandues et très stables, nécessite de travailler avec un très grand soin, et dans les conditions les plus stériles possibles (port de gants indispensable, matériel et solution autoclavés).

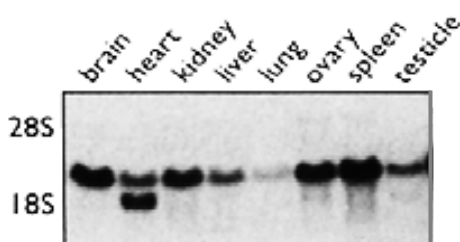


Fig.10A : Analyse de la transcription d'un gène dans différents tissus de souris par *Northern blot*

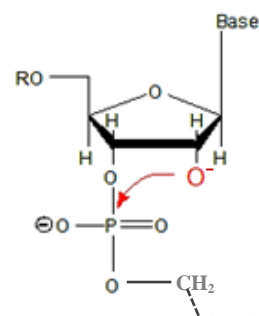


Fig.10B : Ionisation de la fonction OH dans l'ARN en milieu alcalin et l'attaque de la liaison phosphodiester adjacente.

V.1.1.2. RT-PCR (PCR sur ARNm ou *reverse transcriptase* PCR)

Les hybridations moléculaires dites classiques (*Southern* pour l'ADN et *Northern* pour l'ARN) ne sont pas parfois assez sensibles pour détecter des quantités infimes d'ADN ou d'ARN cible. C'est notamment le cas de nombreux ARNm qui ne sont présents dans les cellules qu'en très petit nombre. L'usage de la PCR permet de travailler de toutes **petites quantités** d'acides nucléiques. La polymérase thermostable utilisée par la PCR de base (classique) utilise un substrat d'ADN et, par là-même, est limitée à l'amplification d'échantillon d'ADN. Dans certains cas, il est plus indiqué d'amplifier de l'ARN. Par exemple, dans l'analyse de l'expression différentielle de gènes dans les tissus durant le développement, ou pour le clonage d'ADN dérivé d'un ARNm, c'est-à-dire l'ADNc, particulièrement s'il s'agit d'un ARNm peu abondant.

La RT-PCR se déroule en deux phases ; une première phase correspond à la copie d'ARNm en ADNc et une seconde phase correspond à une réaction PCR classique sur l'ADNc synthétisé :

- ✓ **1^{ère} Phase:** dans l'échantillon d'ARN totaux extraits à partir du tissu à examiner, l'ARNm est repéré en utilisant une sonde oligonucléotidique spécifique (**amorce 1** qui s'hybride uniquement à l'extrémité 3' d'ARNm auquel on s'intéresse), puis l'enzyme transcriptase inverse permet la synthèse du brin complémentaire sous une forme d'ADNc simple brin. Ce processus s'appelle transcription inverse (**Reverse Transcription**), d'où l'appellation de RT-PCR.
- ✓ **2^{ème} Phase :** L'ADN complémentaire synthétisé fournira le substrat d'ADN utilisable par la polymérase thermostable, qui servira ensuite de matrice pour une réaction de PCR classique (voir le cours d'amplification génique-chapitre IV).

Un exemple de résultats obtenus par RT-PCR pour l'étude de l'expression de cinq gènes de la plante *Arabidopsis thaliana* est présenté dans la figure ci-dessous.

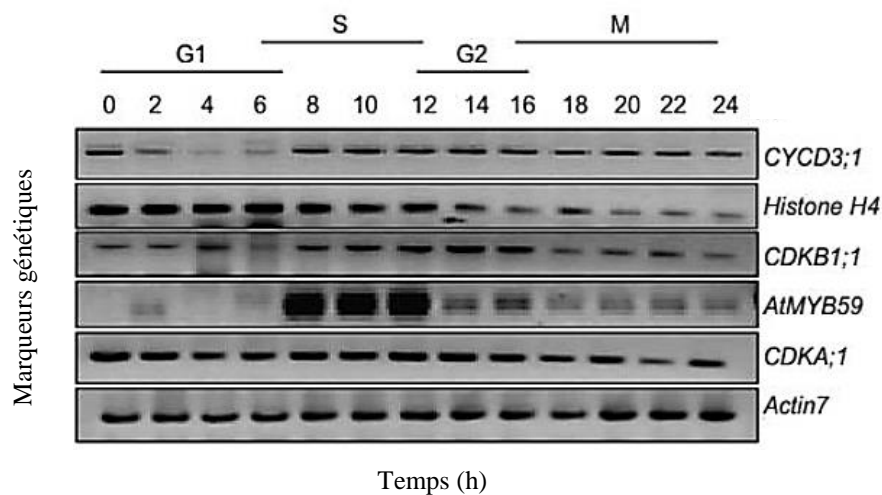


Fig.11 : Exemple de résultats obtenus par RT-PCR.

Une RT-PCR réalisée sur des ARN totaux extraits de cellules d'*A. thaliana* en culture pour le gène *AtMYB59* et quatre autres marqueurs. Le témoin de charge de la quantité initiale d'ARN est réalisé par RT-PCR de l'actine (Actin 7). G1, S, G2, M correspondent aux différentes phases du cycle cellulaire.

V.1.2. Analyse dynamique de la transcription (Par *Run on* : Elongation *in vitro* de transcrits initiés *in vivo*)

Le *Run on* est une technique permettant de **poursuivre** la transcription d'**ARN nucléaire** pour identifier les gènes qui sont transcrits à un certain **moment**, pour cette raison elle est considérée comme une méthode d'**analyse dynamique** des **transcrits**. Le principe de l'expérience de *Run on* est décrit dans les lignes suivantes:

- ✓ Purification des noyaux sur coussin de sucrose à 70%, cette forte concentration ne laisse passer que les particules denses comme les noyaux et empêche les petits facteurs de sortir des noyaux et sépare ces derniers du reste du lysat cellulaire.
- ✓ Incubation du culot de noyaux récupéré en présence d'UTP marqué au ^{32}P pendant 30 min. L'ARN polymérase II poursuit la transcription du brin d'ARN en présence de ces ribonucléotides marqués. A la fin du processus d'élongation, seules les transcrits, dont leur transcription est déjà initiée *in vivo* seront détectés (Fig.12), puisque les rares initiations qui auront lieu au cours de cette expérience donneront des ARN beaucoup trop courts et trop peu nombreux (indétectables).
- ✓ Une fois l'élongation terminée, les noyaux sont lysés et les ARNm marqués sont extraits, une **hybridation moléculaire** aura lieu. Les sondes utilisées sont généralement des ADNc correspondant aux gènes qu'on désire analyser leur transcription. Ces ADNc sont déposés sur une **membrane** en quantité identique (technique de *dot blot* : hybridation ARN-ADN, le même principe que les autres hybridations sur membrane étudiées dans les chapitres précédents).
- ✓ La membrane est ensuite incubée avec tous ARNm radioactifs, lavée et autoradiographiée.

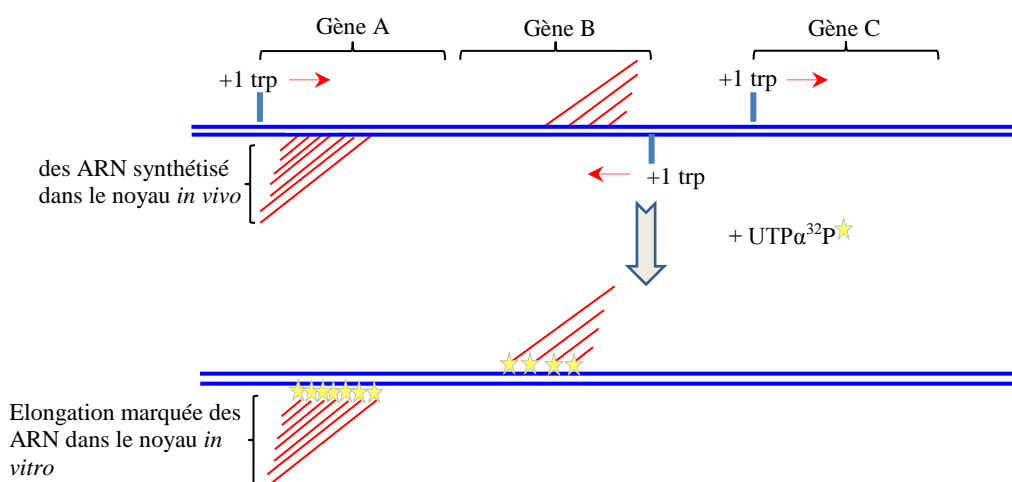


Fig.12: Transcription *in vitro* initiée *in vivo* (*Run on*). → : Sens de la transcription, +1 Le premier nucléotide dans le gène à transcrire.

V.1.3. Analyse des éléments de régulation de la transcription

V.1.3.1. Gel-retard (Etude des facteurs de la transcription)

L'expression d'un gène dépend de la fixation sur la région promotrice de protéines dites de régulation (facteurs de transcription). La technologie de gel-retard, appelée aussi gel-shift ou gel à retardement (EMSA : *electrophoretic mobility shift assay*) est la plus simple qui soit pour mettre en évidence une **interaction** entre un **acide nucléique** et une **protéine**. Elle repose sur le fait qu'un complexe ADN-protéine ou ARN-protéine migrera moins vite dans un gel non-dénaturant qu'un ADN ou un ARN libre (Fig.13). Ce retard de migration permet de juger au premier coup d'œil si une séquence particulière d'ADN ou d'ARN a été reconnue et liée par une protéine. Cette technique permet également de déterminer la constante d'association approximativement (on faisant varier la concentration d'ADN) et les conditions d'association (plusieurs partenaires, cofacteurs...). Cependant, elle ne permet pas de purifier ou de caractériser les protéines interagissant avec le promoteur. La technique de gel-retard consiste à :

- ✓ Extraire des protéines à partir des noyaux de différents tissus (généralement un tissu exprimant ce gène et un tissu de référence ne l'exprimant pas).
- ✓ Hybrider ces protéines nucléaires (qu'on pense parmi elles existe la protéine de régulation) avec le fragment d'ADN portant la **séquence promotrice** d'intérêt, et qu'il est marqué.
- ✓ Déposer sur un gel non dénaturant le mélange d'hybridation pour séparer les fragments d'ADN par électrophorèse. Si le fragment s'est hybridé avec une protéine nucléaire, un complexe se forme, et la bande correspondante aura migré moins loin sur le gel (elle est dite retardée) puisque sa migration est ralentie par rapport au fragment libre.
- ✓ Des oligonucléotides spécifiques non marqués sont rajoutés avec les protéines, ces oligonucléotides sont des compétiteurs spécifiques (ils ont la même séquence) du fragment d'ADN de départ, mais avec une concentration plus importante (~10 fois plus que le fragment d'ADN de départ). On remarque que la bande retardée est atténuée puisque les oligonucléotides non marqués spécifiques rentrent en compétition, car ils sont en excès, ce qui a éclairci la bande du complexe formé précédemment.
- ✓ On refait l'étape précédente mais cette fois avec des oligonucléotides non spécifiques, et qui sont aussi en excès. S'il la bande retardée est atténuée, cela signifie que l'interaction ADN marqué/protéine est non spécifique, car même l'oligonucléotide non spécifique a pu rompre cette interaction. S'il n'y a pas d'interaction entre cet oligonucléotide et la protéine, la bande retardée n'est plus atténuée. C'est dans ce cas qu'on peut confirmer qu'une spécificité existe entre notre fragment de départ et la protéine. On peut vérifier la spécificité de l'interaction ADN-protéine par l'incubation préalable du complexe avec un anticorps qui se fixe à la protéine. Le complexe ADN-protéine-anticorps a une migration encore plus retardée (qualifiée de supershift).

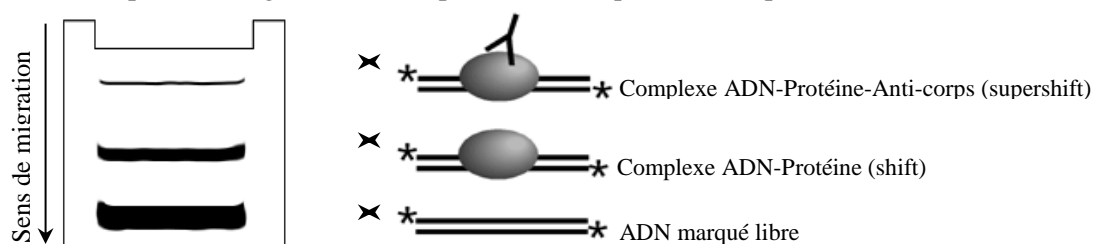


Fig.13: Gel-retard (Gel EMSA)

V.1.3.2. Empreinte à la DNase I (*Footprinting*)

Les expériences d'empreinte à la DNase I font généralement suite aux expériences de gel-retard. Elles permettent de définir avec précision les bases du promoteur (**identification du promoteur**) qui interagissent physiquement avec un facteur protéique nucléaire (facteurs transcriptionnels).

Expérience d'empreinte à la DNase I (Fig.14) : Le fragment contenant la séquence du promoteur - et marqué radioactivement à une de ses extrémités- est hybridé avec des extraits protéiques nucléaires comme précédemment. Puis le mélange est soumis à un traitement modéré (en condition douce) à la DNase I, qui est une endonucléase capable de couper les liaisons phosphodiester à l'intérieur des chaînes d'ADN sur un seul des deux brins. Il en résulte une collection de fragments de tailles différentes, dont certains sont marqués à l'une de leurs extrémités. La présence d'un complexe protéique cache un site éventuel de coupure par la DNase I et empêche l'action de cette enzyme. Les produits de digestion sont alors séparés par électrophorèse sur un gel d'acrylamide à grand pouvoir séparateur (de même type que le gel de séquence), puis détectés par autoradiographie. En comparant les bandes protéiques, on met en évidence une région sans bande correspondant au site de fixation du facteur protéique, qui par sa liaison à l'ADN a protégé celui-ci des coupures à la DNase I. En réalisant un séquençage du fragment étudié et en faisant migrer les produits de réactions parallèlement à ceux obtenus lors d'une expérience d'empreinte à la DNase I, il sera alors possible de déterminer la séquence du site de fixation du facteur protéique. Si les fragments utilisés sont reconnus par plusieurs facteurs on pourra mettre en évidence des empreintes (*footprint*) multiples.

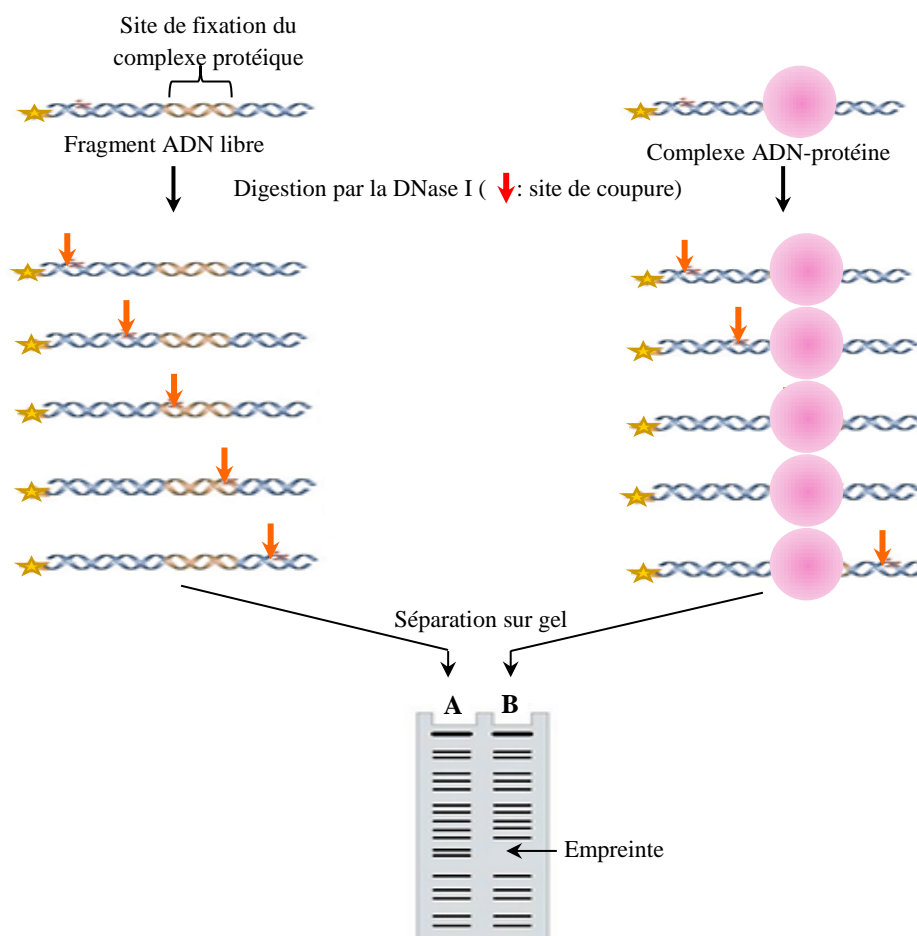


Fig.14: Empreinte à la DNase I (*Footprinting*). Piste A : Mélange des fragments d'ADN libres digérés, Piste B : mélange des produits de digestion des fragments d'ADN complexé avec le facteur protéique.

V.1.4. Analyse du transcriptome (par Puces à ADN)

Il y a quelques années, l'analyse de l'expression génique n'était possible que pour un seul gène ou un petit groupe de gènes à la fois (*Northern blot*, RT-PCR). Cependant avec la technique des réseaux d'ADN (puces ou filtres d'ADN), développée au milieu des années quatre-vingt, il est devenu possible de mesurer l'expression (transcrits) **simultanée** d'un **grand nombre** de gènes, voire d'un génome entier dans une cellule, un tissu, un organe, un organisme ou encore un mélange complexe, à un moment donnée, dans un état donnée par rapport à un échantillon de référence. La technologie des puces à ADN, aussi appelées biopuces, *DNA microarray* ou « DNA chips » repose sur une technologie multidisciplinaire intégrant la biologie, la biotechnologie, la chimie des acides nucléiques, l'analyse d'image et la bio-informatique.

Quelle que soit la technologie utilisée pour fabriquer les puces, le principe général est le même (Fig.15). Une puce à ADN est constituée de séquences d'ADN (oligonucléotides, ADNc ou produit PCR) immobilisés sur un petit support solide selon une **disposition ordonnée**. Les acides nucléiques cibles (à étudier) sont marqués par un radioélément ou une molécule fluorescente puis hybridés avec les sondes immobilisées sur la puce. Cette dernière comporte quelques centaines à plusieurs dizaines de milliers d'unités d'hybridation appelées « *spots* » (*spot* : en français tache). Chaque plot correspond à une séquence d'ADN. Après lavage, les régions où l'hybridation s'est produite sont repérées et quantifiées au moyen d'un système d'acquisition d'image ce qui permet de déterminer avec quelle(s) sonde(s) l'ADN cible s'est hybridé. Les résultats sont ensuite analysés et validés grâce à des logiciels informatiques dédiés à cette analyse et interprétés d'un point de vue biologique.

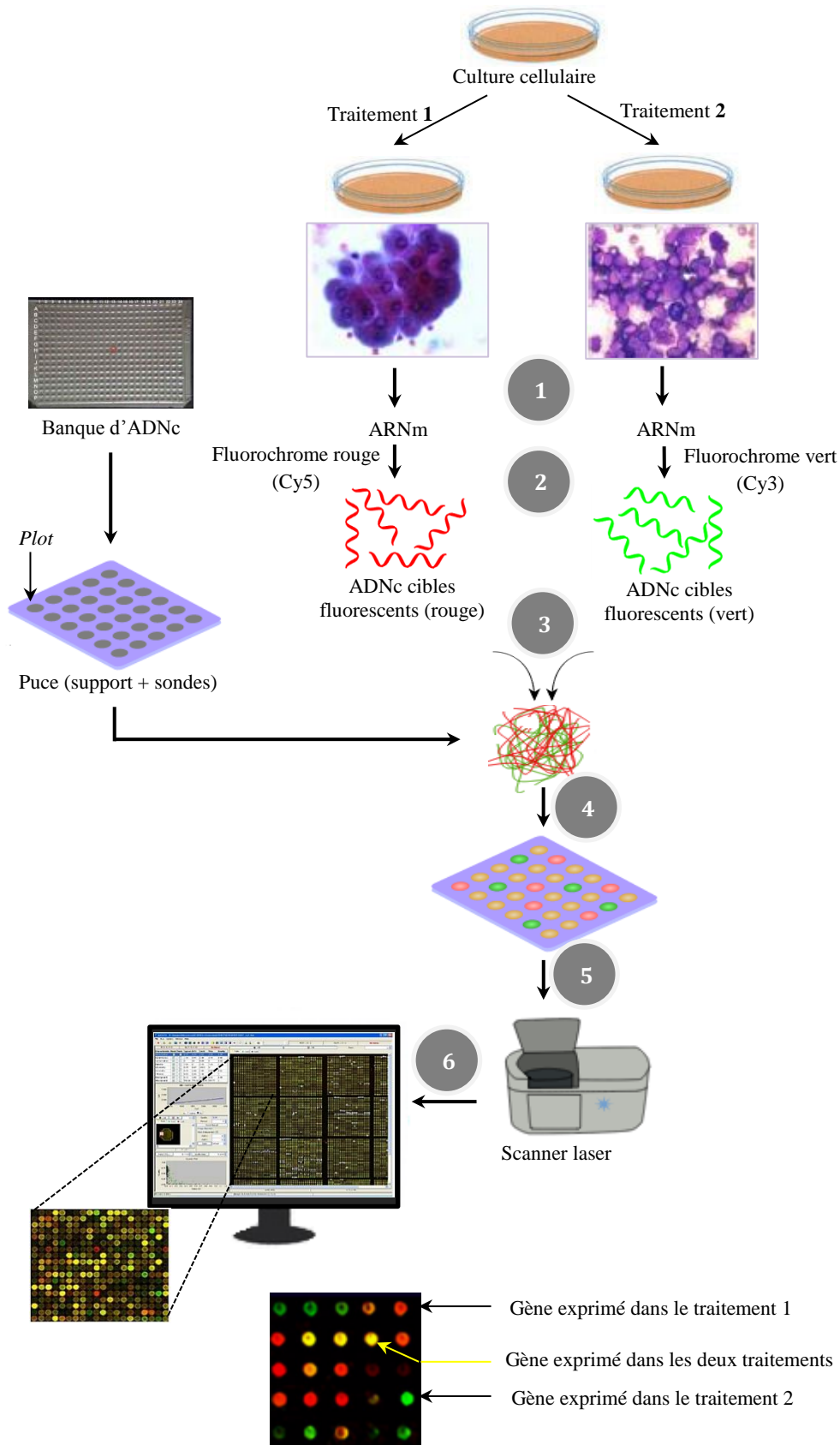


Fig.15: Puces à ADNc. **1** : Extraction des ARNm, **2** : RT-PCR & Marquage fluorescent, **3** : Mélange des ADN des deux conditions, **4**: Hybridation sur puce, **5** : Captage des signaux fluorescents par scanner laser, **6** : Analyse des données « *software* ».

V.1.5. Analyse des protéines (Par *Western blot*)

Comme cette méthode n'était qu'une extension de la méthode de *Southern* (Voir chapitre III : hybridation moléculaire), en jargon technique, le transfert des protéines sur membrane est appelé *Western blot*. Cette technique, appelée aussi immunoblot, permet la détection de protéines spécifiques parmi toutes celles qui sont présentes dans un extrait cellulaire. Elle permet également de déterminer la quantité relative d'une protéine, leur poids moléculaire et son état (résistance ou sensibilité aux protéases cellulaires, éventuellement son état de maturation...) et l'efficacité de la méthode d'extraction des protéines. Autrement, le *Western blot* est réalisé pour répondre au moins à l'une de ces questions :

- ✓ La protéine d'intérêt est-elle présente dans mon échantillon ?
- ✓ Est-ce que le traitement de mon échantillon par un agent « X » augmente ou réduit le **niveau d'expression** de ma protéine ?
- ✓ Le **niveau d'expression** de la protéine est-il différent selon le type de tissu ou le type de cellule ?
- ✓ Mon échantillon est-il sain ou pathologique ? le *Western blot* permet de détecter par exemple la maladie de Lyme, de la vache folle, HIV, etc.

Cette technique se déroule en plusieurs étapes, en gardant le même principe que le *Southern blot*, mais dans ce cas ce sont les protéines qui sont transférées (molécules cibles). Les différentes étapes pour la réalisation d'un *Western blot* sont citées ci-dessous et présentées dans la figure 16 :

1. Des échantillons protéiques sont déposés sur un gel d'électrophorèse et sont séparés en fonction de leur poids moléculaire.
2. Une fois que les protéines ont migré, une empreinte (*blot*) des protéines séparées est ensuite réalisée par **transfert en champ électrique** sur une **membrane**, généralement en nitrate de cellulose ou en polyfluorure de vinylidène. (PVDF). En effet, comme le gel n'est pas une bonne surface pour marquer les protéines (les anticorps ne sont pas maintenus sur un gel, les gels sont fragiles et difficiles à manipuler), il est donc nécessaire de les transférer sur une surface plus adéquate. Le transfert est réalisé en plaçant le gel et la membrane entre deux électrodes en plaque, le champ électrique étant perpendiculaire au plan du gel. La fixation des protéines à la membrane se fait grâce à des interactions hydrophobes et ioniques.
3. Blocage de la membrane : cette étape est indispensable pour limiter les interactions non spécifiques ultérieures entre les anticorps et la membrane. Le blocage est réalisé dans une solution de protéines concentrées.
4. Pour la détection de la protéine d'intérêt, les **anticorps primaires** sont généralement appliqués en premier, avant d'être reconnus par un **anticorps secondaire**. Ces derniers peuvent être marqués à l'enzyme (peroxydase, phosphatase alcaline), marqués par fluorescence (par ex., FITC, Alexa-Fluor, Qdot) ou conjugués à une biotine. La peroxydase est une enzyme économique, rapide et plus stable, tandis que la phosphatase alcaline est considérée comme plus sensible que la peroxydase en cas de détection colorimétrique. C'est avec ce marquage qu'on pourra par la suite observer leur position sur le gel.

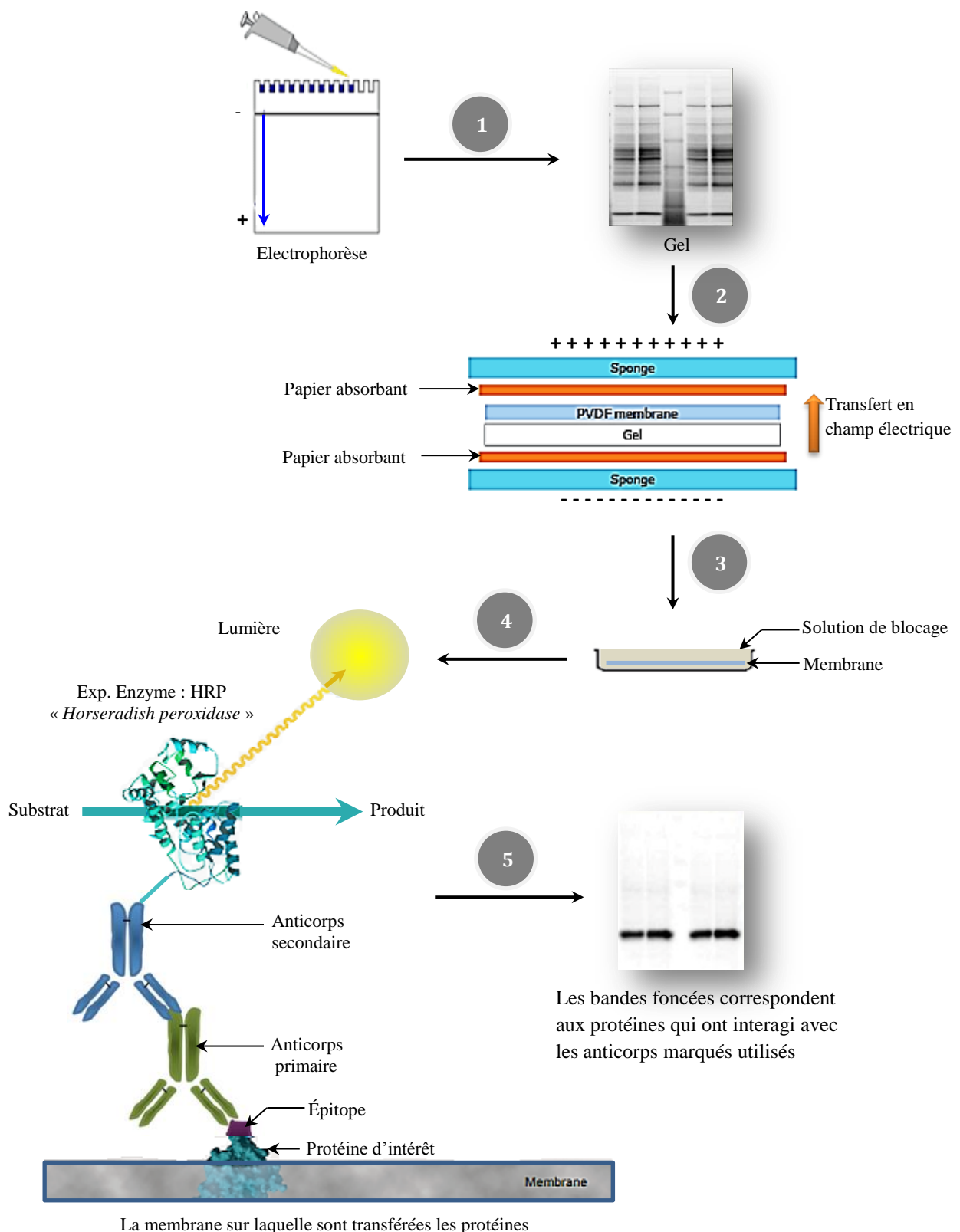


Fig.16: Détection d'une protéine spécifique par la technique de *Western blot*. **1** : Séparation, **2** : Transfert sur membrane, **3** : Blocage de la membrane, **4** : Détection, **5** : Visualisation.

V.2. Modification du matériel génétique (MG)

V.2.1. Transgénèse

V.2.1.1. Transfert des gènes

Le transfert de gène consiste à introduire un matériel génétique (sous forme d'ADN ou d'ARN) dans une cellule cible pour conduire à un effet physiologique souhaité. Le concept initial associé à la notion de transfert de gène était celui de la thérapie génique, c'est à dire la compensation de gènes dont l'altération est responsable de maladies. Puis cette notion a été étendue à l'utilisation du gène de manière intensive dans la sélection végétale et animale. La transformation génétique, n'est possible que lorsque les cellules sont rendues compétentes, c'est-à-dire aptes et capables d'introduire l'ADN étranger. Elle peut s'opérer de plusieurs manières différentes.

- ✓ **Choc thermique** : c'est la technique la plus commune pour les **procaryotes**. Le vecteur est pour cela adsorbé sur la bactérie à la température de 4°C puis capturé par la cellule grâce à un choc thermique de courte durée (42°C pendant 90 secondes).
- ✓ **Électrolocation** : Il s'agit de soumettre les cellules à un champ électrique. Les impulsions électriques produisent un potentiel transmembranaire provoquant une rupture réversible de la membrane cellulaire, ce qui forme des pores permettant à l'ADN de pénétrer dans la cellule.

Lorsque la transgénèse concerne des cellules d'un organisme **eucaryote** pluricellulaire, on parle de **transfection**. Différentes méthodes sont suivies pour l'introduction d'ADN dans les cellules eucaryotes:

- ✓ **Microinjection** : est l'une des techniques de choix de la transformation, elle consiste à injecter l'ADN dans le noyau de la cellule à l'aide de très fines aiguilles. C'est une technique efficace mais qui a l'inconvénient d'être individuelle, limitée à un petit nombre de cellules.
- ✓ **Co-précipitation d'ADN avec le phosphate de calcium**: Il s'agit d'une technique relativement simple à réaliser, bien qu'elle puisse être toxique (elle acidifie le milieu de culture à long terme). Elle consiste à l'internalisation de l'ADN est sa présentation sous la forme d'un co-précipité avec les cristaux tricalciques du phosphate de calcium (l'ADN est protégé des nucléases) et son injection par endocytose.
- ✓ **Encapsulation de l'ADN dans des liposomes** : ces derniers sont des vésicules artificielles qui fusionnent avec la membrane cellulaire en libérant leur contenu dans le cytoplasme.
- ✓ **Association de l'ADN et d'une colonne DEAE** (diéthylaminoéthyl) : Il s'agit de l'adsorption de l'ADN (chargé négativement) sur le couple DEAE-dextrose (chargé positivement) et son internalisation par endocytose.

La transfection peut soit être stable ou transitoire :

- **Expression stable** : reste plus productrice mais nécessite que l'ADN introduit soit intégré dans le génome de la cellule hôte. Une des limitations du transfert des gènes dans les cellules de mammifères reste que les sites d'intégration dans le génome sont aléatoires (intégration par **recombinaisons hétérologue**). Cependant il est possible de réaliser une **recombinaison**

homologue entre l'ADN modifié expérimentalement et des séquences identiques du génome de l'hôte.

- **Expression transitoire** : elle est de courte durée (24 à 72 heures), due à l'instabilité de l'ADN non intégré dans le génome de l'hôte. Cette forme d'expression ne permet pas une production importante mais elle est très utile pour contrôler qu'un gène s'exprime conformément à ce qui est attendu. Elle permet l'analyse rapide de l'expression d'un gène sans sélection des cellules transformées, généralement par l'utilisation des gènes appelés gènes rapporteurs.

V.2.1.1. Définition d'un **gène rapporteur** (*gène reporter*) et exemples

Lorsque l'on s'intéresse aux modalités d'expression d'un gène, on étudie davantage les régions régulatrices. Dans ce cas le fragment d'ADN cloné n'est pas le gène d'intérêt mais sa région promotrice. Ce promoteur est alors cloné en aval d'un **gène rapporteur** (*gene reporter*), qui sert d'indicateur de l'activité des séquences régulatrices qui le contrôlent. Les gènes rapporteurs présentent l'avantage de coder des protéines dont la présence (l'expression) est facilement mise en évidence par simple coloration ou mesurable par un test d'activité enzymatique. D'origine différente de celle de l'organisme dans lequel il est testé, c'est pour cette raison qu'en ce qui concerne les cellules eucaryotes, les gènes rapporteurs sont la plupart du temps d'origine bactérienne. L'utilisation de gènes rapporteurs permet *in situ* de repérer au cours du temps ou selon les facteurs environnementaux les lieux et les conditions d'expression des gènes. L'utilisation de gènes rapporteurs avec des promoteurs mutés (souvent par délétion) permet d'identifier précisément les éléments de réponse à certains facteurs de transcription (séquence nucléotidique responsable de la réponse observée).

Les gènes rapporteurs les plus utilisés sont :

- ✓ Le gène de la chloramphénicol acétyl transférase (CAT). L'activité de la CAT, catalysant le transfert d'un groupement acétyl sur le chloramphénicol, est simple à mesurer en présence de chloramphénicol ou d'acétyl coenzyme A marqué au ^{14}C .
- ✓ Le gène *LacZ* de la β -galactosidase et le gène *gus* de la β -glucuronidase (très employé chez les végétaux). L'expression de la β -galactosidase et de la β -glucuronidase est détectable par coloration bleue des cellules en présence respectivement de X-Gal ou de X-Gluc.
- ✓ Le gène de la luciférase. En présence de luciférase et d'ATP, la luciférase exprimée dans les cellules est capable d'induire l'émission de lumière facilement repérable et mesurable.
- ✓ Le gène de la protéine fluorescente verte (GFP). La protéine GFP exprimée émet une lumière verte (à 509 nm) visualisable par fluorescence sous UV. La fluorescence est intrinsèque à la protéine et sa détection ne nécessite aucune infiltration des tissus par un substrat puisqu'il ne s'agit pas d'une enzyme. Ce gène rapporteur peut donc être utilisé pour des expériences *in vivo*.

Le choix du gène dépend du type de tissu étudié et de l'usage. Par exemple, le gène *gus* et *gfp* sont appropriés pour la localisation *in situ* des activités des promoteurs étudiés. Le gène *cat* est plus adapté aux mesures quantitatives d'expression à partir des extraits cellulaires bruts.

V.2.2. Mutagénèse

C'est l'introduction volontaire d'un changement dans la séquence nucléotidique d'un gène, autrement dit d'une mutation. C'est une technique très puissante puisque elle offre la possibilité d'agir sur la relation entre la séquence d'un gène et la fonction de la protéine qu'il code. La mutagénèse *in vitro* est utilisée aujourd'hui de manière courante. Elle peut être aléatoire ou dirigée. Le schéma général de l'opération (Fig.17), comporte :

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

La stratégie générale de mutagénèse illustrée dans la figure 17 consiste à traiter un plasmide contenant le gène d'intérêt par l'une des techniques de mutagénèse de telle manière à modifier la séquence de l'ADN. S'il s'agit d'une mutagénèse aléatoire, on obtient un mélange de plasmides dont certains sont mutés à différents sites et d'autres non mutés. Le mélange plasmidique est utilisé pour la transformation d'une souche hôte. Les bactéries ayant intégré un des plasmides sont sélectionnées sur un milieu contenant l'ampicilline « le plasmide est porteur du gène de résistance à cet antibiotique ». L'étape suivante consiste à rechercher parmi les colonies obtenues, celles qui portent la mutation souhaitée dans le plasmide.

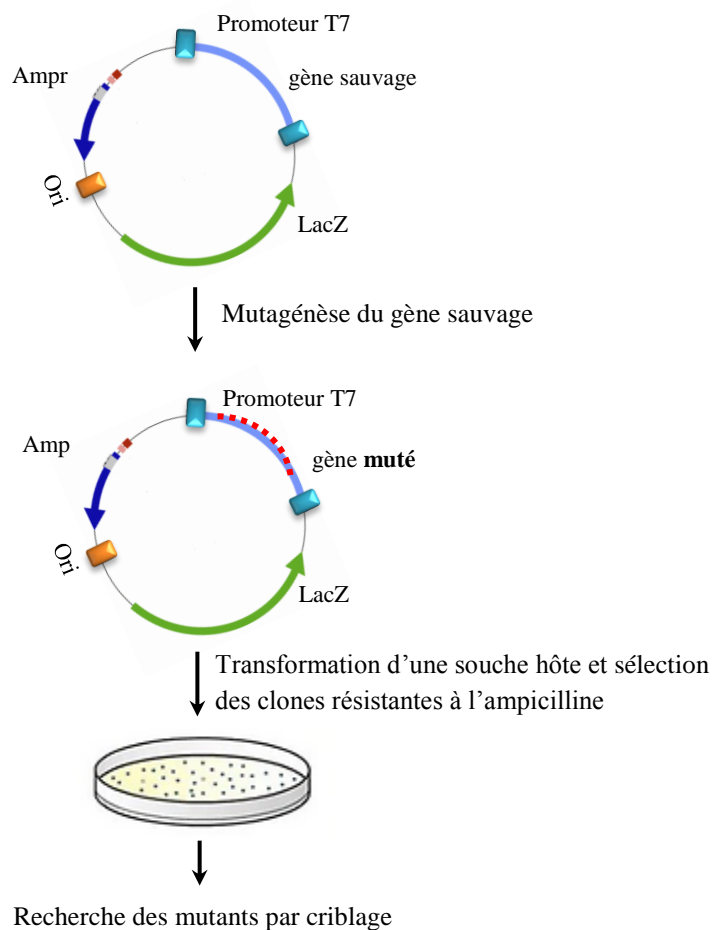


Fig.17 : Principe générale de la mutagénèse.

V.2.2.1. Mutagenèse aléatoire

La mutagenèse aléatoire consiste à induire des mutations n'importe où dans l'ADN, afin d'obtenir un grand nombre de mutants, pouvant être par la suite sélectionnés. Ces mutations peuvent être obtenues en modifiant les propriétés du milieu (concentration en ions, enzymes...), par l'action de composés mutagènes chimiques ou physique. La mutagenèse aléatoire sert principalement à localiser des gènes codant un phénotype particulier. En effet, après avoir obtenu des mutations dans diverses régions du génome, les mutants sont triés à l'aide d'un crible et seuls seront gardés ceux qui présenteront le caractère que l'on veut observer. Une fois le(s) gène(s) identifié(s), on pourra utiliser la mutagenèse dirigée pour créer des mutations plus ciblées et étudier leurs impacts sur le phénotype. L'une des méthodes consiste à linéariser le vecteur au niveau d'un site de restriction unique se situant dans la séquence du gène à muter (Fig.18). Une délétion de quelques nucléotides est possible à l'aide d'une nucléase qui élimine les extrémités monocaténaire des bords cohésifs (cas A). Une mutation par addition peut être également réalisée en provoquant la synthèse des séquences complémentaires des extrémités monobrin (cas B) ou en insérant un fragment d'ADN étranger (cas C).

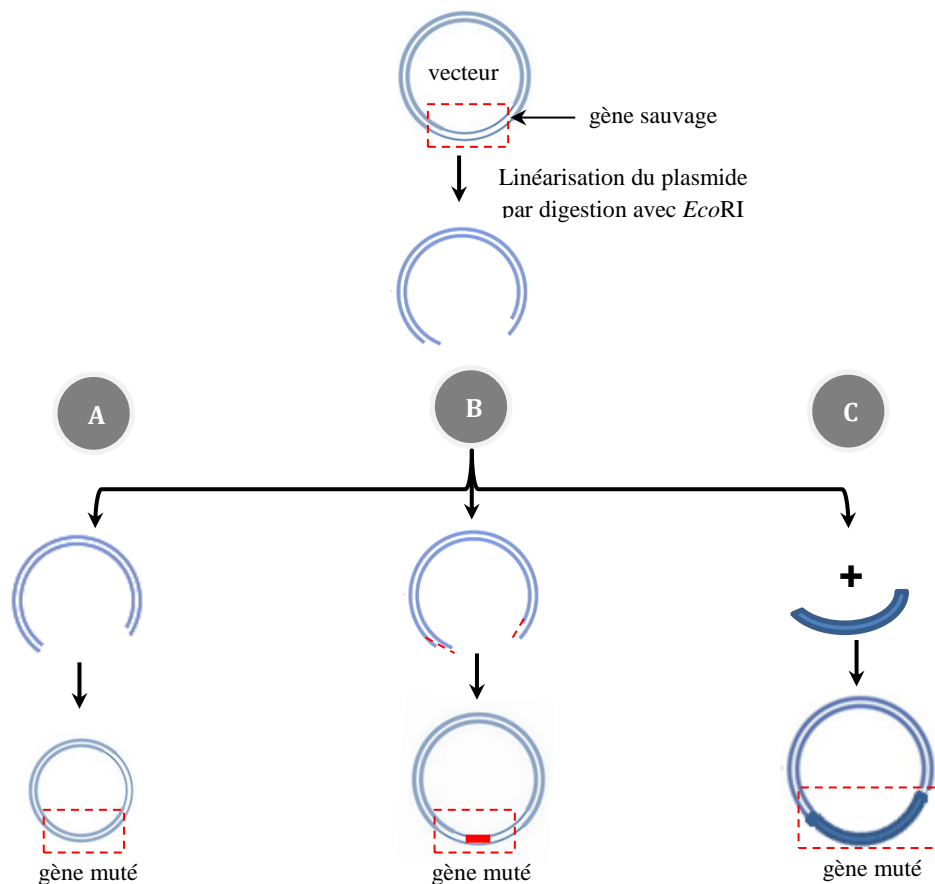


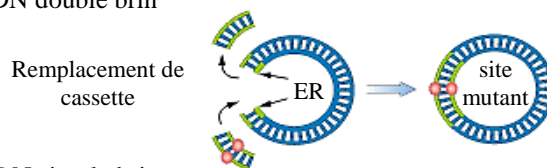
Fig.18: Mutagenèse aléatoire. **A :** Digestion par une nucléase et ligature. **B :** Remplissage par une ADN polymérase et ligature. **C :** Ligature en présence d'un fragment d'ADN étranger.

V.2.2.2. Mutagenèse dirigée (ciblée)

Elle porte sur un endroit très précis de l'ADN (un nucléotide par exemple). Elle permet de modifier d'une manière prédéterminée la séquence d'un gène. Les techniques de mutagenèse dirigée sont devenues simples et rapides depuis que des oligonucléotides de synthèse sont disponibles. Quand la région à muter porte des sites de restriction uniques, il est possible d'enlever un fragment d'ADN d'un gène sauvage et de le remplacer par un autre fragment constitué d'oligonucléotides mutés. Ce processus est appelé mutagenèse par cassette (Fig.19i). Une autre méthode de mutagenèse dirigée peut être employée quand le gène à muter ne porte pas de sites de restriction (Fig. 19ii). Elle consiste à :

- ✓ Préparer de l'ADN monocaténaire à partir de cellule transfectées par un phage ou un phagemide (hybride d'un phage et de plasmide).
- ✓ Hybrider un oligonucléotide portant une mutation sur une base (substitution, insertion, délétion) ; pour une bonne efficacité de l'hybridation la mutation est placée au milieu de la séquence de l'oligonucléotide.
- ✓ Produire le brin complémentaire en utilisant l'oligonucléotide muté comme amorce.
- ✓ Liger l'hétéroduplex (un brin muté et un brin sauvage).
- ✓ Transformer une souche bactérienne.
- ✓ Sélectionner les bactéries portant la mutation, la cellule ne contient généralement qu'un seul type de plasmide ; lors de la réplication l'un ou l'autre des deux plasmides issu de la réplication (plasmide sauvage et muté) sera conservé par la cellule, l'autre sera détruit.

(i) Cas d'ADN double brin



(ii) Cas d'ADN simple brin

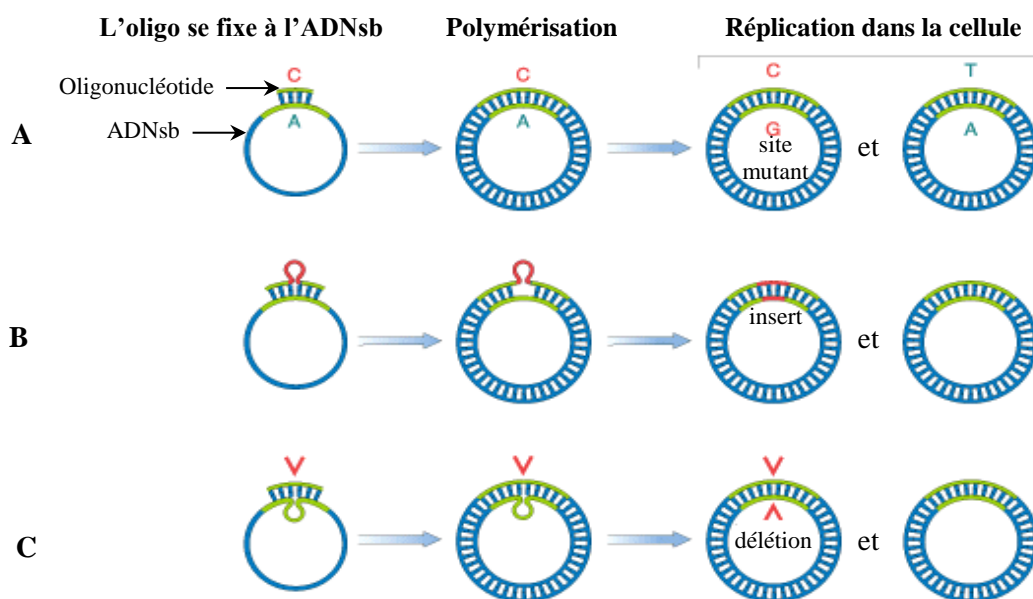


Fig.19 : Mutagenèse dirigée. **(i)** : Mutagenèse par remplacement de cassette. **(ii)** : Mutagenèse par l'utilisation d'un oligonucléotide. **A** : Substitution de paire de bases. **B** : Insertion. **C** : Délétion. ADNsb : ADN simple brin. ER : Enzyme de restriction.