Biologie et génie génétique *

par François Gros

(Membre de l'Institut, Directeur général de l'Institut Pasteur de Paris, Professeur au Collège de France.)

En 1973, S. Cohen et A. Chang, de l'Université de Stanford, en collaboration avec H. Boyer et R. Helling réussissent à faire se fusionner, dans un tube à essai, deux molécules d'ADN provenant de gènes bactériens différents pour constituer la première chimère génétique *in vitro*. Cette molécule recombinante peut être introduite dans l'une des deux bactéries parentales. Mieux encore : elle s'y multiplie et exprime l'information correspondant à celle des deux molécules envisagées séparément (1). En 1974, un chercheur américain du nom de Paul Berg (2) imagine de fabriquer lui aussi une chimère moléculaire de chromosomes provenant de virus séparés phylogénétiquement par quelques millions d'années. Il procède à la soudure, par voie enzymatique, d'un fragment du matériel génétique d'un petit virus oncogène simien, appelé SV_{40}, à l'ADN d'un autre chromosome miniature provenant d'une bactérie : *un plasmide*, dérivé du bactériophage lambda. Étant parvenu à recoller dans le tube à essai les deux chromosomes, il se prépare à transférer la molécule hybride ainsi créée dans une cellule bactérienne afin d'examiner si le chromosome porteur d'un gène carcinogène pour le Singe s'y reproduit et s'y exprime. Cette expérience va déchaîner une très longue série de controverses (qui sont d'ailleurs loin d'être éteintes). Elle aura pour conséquence immédiate l'établissement d'un moratoire international et la création de commissions d'éthique visant à permettre l'édification de règles de sécurité et la définition de laboratoires à confinement... Le génie génétique est né. Avec lui va s'ouvrir la voie à une démarche qui compte pour l'une des plus audacieuses des sciences de la vie tant dans ses aspirations fondamentales que pour ses perspectives d'application (3, 4, 5).

Aujourd'hui, les techniques du génie génétique nous apportent, en effet, un très puissant moyen d'analyse des gènes de cellules eucaryotes, cellules qui se prêtent assez difficilement, on le sait, aux expériences de la génétique classique. Elles constituent, à n'en pas douter, l'une des tentatives parmi les plus hardies pour rompre les barrières de l'espèce à des fins devant permettre l'obtention facilitée de produits biologiques rares. Il s'agit notamment d'améliorer les activités métaboliques de certaines espèces microbiennes ou végétales pouvant intéresser l'agronomie, l'industrie des fermentations ou l'industrie pharmaceutique.

Dans cet exposé introductif, nous tenterons de décrire les étapes principales qui sous-tendent les expériences de recombinaisons génétiques artificielles. Après quoi, nous en analyserons brièvement les résultats et évoquerons quelques-unes des conséquences attendues.

Les techniques de génie génétique sont fondées sur quatre opérations majeures :
1. Extraire l'ADN des cellules comportant le ou les gène(s) que l'on veut greffer.
2. Couper cet ADN, grâce à des enzymes douées d'une très haute spécificité afin d'obtenir des fragments de taille raisonnable se prêtant à la recombinaison.

* *Conférence plénière présentée, à Bordeaux, le mercredi 10 septembre 1980, à l'Assemblée générale annuelle de la Société Chimique de France, publiée dans un* « Supplément à la vie académique » *(tome 291, novembre 1980) des* Comptes Rendus des séances de l'Académie des Sciences.

3. Recombiner les fragments avec l'ADN provenant d'un chromosome dont l'habitat naturel est généralement une bactérie (il s'agit plus souvent du chromosome d'un plasmide ou d'un phage). Cette recombinaison *in vitro* (donc artificielle) entre chromosomes provenant de cellules ou de virus qui sont séparés dans l'échelle évolutive par des centaines de millions d'années est rendue possible par l'existence d'enzymes découvertes il y a plus d'une décennie, *les enzymes de restriction* et *les ligases*.
4. Réintroduire les molécules hybrides dans des cellules, le plus souvent de type bactérien.

La combinaison de ces opérations constitue en un sens une « véritable algèbre permettant d'ajouter de l'ADN à une cellule ou d'en retrancher » (P. Kourilsky).

Voyons à présent, d'un peu plus près, comment se déroulent en fait ces principales opérations.
Supposons que notre objectif soit d'introduire un gène d'origine animale dans une bactérie pour y analyser sa réplication et ses produits d'expression. A première vue, il pourrait s'avérer logique de greffer *in vitro* le gène étranger au chromosome *entier* d'une bactérie et d'introduire le chromosome porteur du greffon dans une autre cellule bactérienne. En pratique, on opère de façon légèrement différente.

En effet, le chromosome complet d'une bactérie ne peut être utilisé commodément en tant que véhicule ou vecteur du gène étranger. Il est constitué par une énorme molécule continue d'ADN, difficile à extraire sauf à y engendrer de nombreuses cassures. Les fragments cassés sont difficilement incorporables dans un cytoplasme et ne peuvent en tout cas s'y reproduire. C'est pourquoi, on aura recours de préférence à un chromosome miniature, encore appelé « plasmide », dont il existe une très grande variété chez les bactéries. Ces minichromosomes (qui peuvent être plusieurs centaines de fois plus petits que le chromosome principal) possèdent, comme l'ont démontré il y a quelques années Jacob, Brenner et Cuzin (1), la propriété d'être des « réplicons ». En d'autres termes ils ont l'aptitude de s'auto-dupliquer de façon parfaitement *autonome* à un rythme très grand. Une cellule bactérienne peut donc, dans certaines conditions, en recéler plusieurs centaines de copies. Ces plasmides sont circulaires, facilement isolables par des techniques de centrifugation à l'équilibre. Dans la nature, ils incluent eux-mêmes un certain nombre de gènes, tels ceux responsables de la résistance aux antibiotiques, de la formation de certaines toxines ou des enzymes assurant le processus de sporulation. De plus, ils peuvent être aisément transférés d'une bactérie à une autre.

L'opération consistera donc à ouvrir les cercles en des endroits précis grâce à des « endonucléases » connues sous le nom « d'enzymes de restriction », à y greffer un segment génétique étranger et à faire pénétrer la chimère moléculaire dans une bactérie (Figure 1*b*). On sélectionnera, après clonage, les cellules transformées par cette chimère en tirant parti de la perte de résistance à un antibiotique résultant de l'insertion du génome étranger à l'intérieur même de la séquence codant pour un phénotype de résistance donné. Supposons que l'on ait fragmenté par ailleurs le chromosome de la drosophile avec l'objectif de

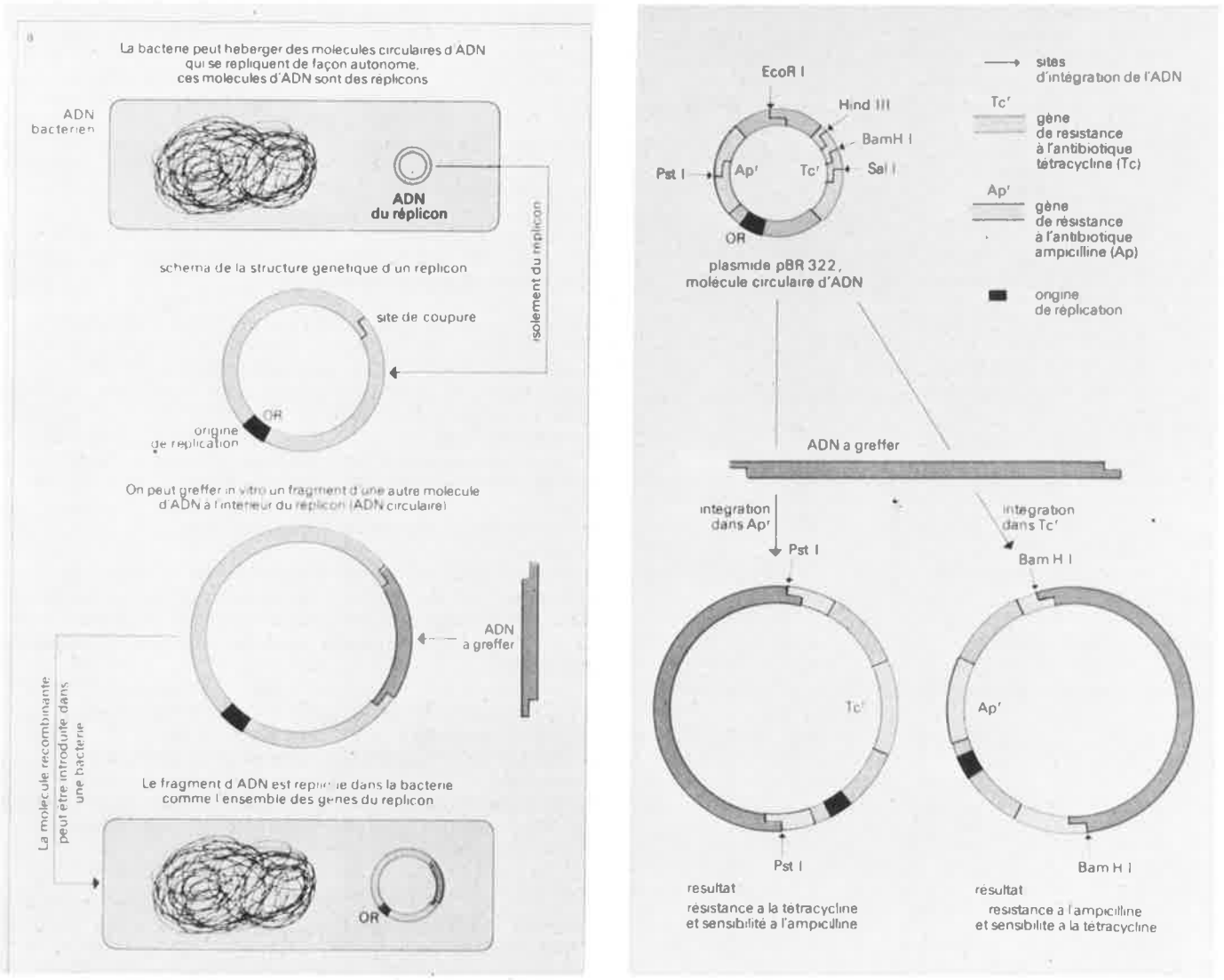

Figure 1. Extraite de l'article de F. Rougeon, F. Quétier et F. Vedel, *Encyclopeadia Universalis*. 1979, p. 141 (Figure 5).

transférer un ou plusieurs gènes de la mouche dans le cytoplasme de la bactérie. On mélange les fragments du matériel génétique total de la drosophile et ceux résultant du clivage des ADN de plasmide et on provoque par voie enzymatique la soudure au hasard de tous ces fragments. La collection des cercles plasmidiens, comportant chacun un fragment du chromosome de drosophile, va servir à réinfester une population de bactéries dépourvues de plasmides (généralement *E. coli*) dans des conditions telles que chaque cellule hôte n'absorbe qu'une seule molécule hybride. On étale enfin les cellules infestées sur une boîte renfermant un milieu gélifié solide. Chaque cellule étalée et isolée se divise un très grand nombre de fois, produisant un « clone » au sein duquel a eu lieu la réplication d'un seul type de molécule hybride. L'opération qui permet de faire se répliquer des fragments de chromosome issus d'un mélange complexe à l'intérieur de microcolonies bactériennes isolées est dénommée « clonage ». Pour utiliser un raccourci de langage, on se référera à cette expérience en disant que les chromosomes de la drosophile ont été « clonés » dans la bactérie *E. coli* grâce à un *« véhicule »* (ou *vecteur*) plasmidien. Le génie génétique permet donc de purifier des séquences chromosomiques particulières en provenance de pratiquement n'importe quelle cellule ou virus. Au lieu d'utiliser comme véhicule du gène étranger l'ADN circulaire d'un plasmide, on a parfois recours à celui d'un

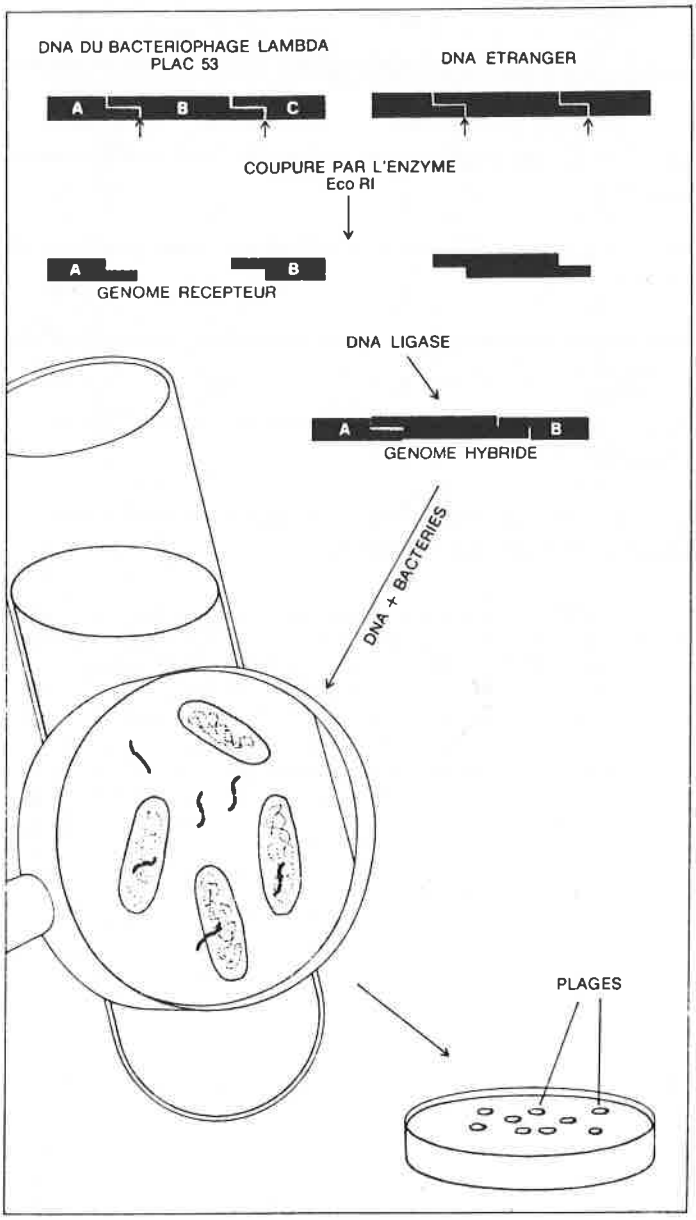

Figure 2. Extraite de l'article de P. Tiollais et A. Rambach, *La recherche*, 1977, 82, 827 (Figure 3).

bactériographe. On sait, en effet, qu'un bactériographe est un petit virus capable d'infester une cellule bactérienne. Tandis que le plasmide se reproduit dans la bactérie sans la tuer et demeure à l'état d'une molécule d'ADN non incluse dans une enveloppe protéique, l'ADN du bactériophage, une fois injecté dans la bactérie, altère le plus souvent les propriétés de réplication et d'expression de la machinerie cellulaire et dirige la synthèse de nouvelles protéines codées par le virus. Parmi ces protéines « virales » figurent des protéines d'enveloppe qui encapsident les molécules d'ADN répliquées et reconstituent des particules virales. Celles-ci sont libérées par la lyse cellulaire et tuent par conséquent la bactérie qui a servi à en assurer la perpétuation. Soit l'ADN d'un bactériographe communément propagé par la bactérie d'*E. coli* : le bactériographe lambda. On peut en exciser les séquences médianes non essentielles à la réplication du phage (Figure 2). Si les deux morceaux extérieurs à la partie incisée se recollent, le segment reconstitué sera néanmoins *trop court* pour être encapsidé et refaire une particule. En revanche, si on introduit un nouveau gène étranger, la molécule pourra recouvrer une longueur suffisante pour être encapsidée par les protéines virales. Transférée dans une cellule bactérienne, elle produira donc des particules infectieuses. Chaque cellule infestée, placée en milieu solide, donnera une plage de lyse à l'intérieur de laquelle figurent des particules incluant le gène étranger. Ici encore, on dira que le chromosome étranger a été « cloné grâce à un vecteur phagique et il est clair que la technique de « réinsertion-substitution », qui conduit à remplacer un fragment de génome de phage par un segment génétique étranger, tire parti de l'avantage sélectif que confère au virus le fait que son ADN retrouve sa longueur initiale.

Envisageons à présent les principales opérations biochimiques intervenant dans cette nouvelle chirurgie enzymatique qui sert de fondement aux techniques de recombinaisons artificielles et qui n'eût pas été possible sans l'énorme arsenal d'enzymes purifiées aptes à cliver, réparer, allonger ou souder les molécules d'ADN. Pendant longtemps, cette enzymologie si particulière du matériel génétique n'a pu en effet progresser de façon satisfaisante, car on ne disposait pas alors des systèmes capables de couper le ruban d'ADN en des sites spécifiques et délimités. En effet, la plupart des « endonucléases » connues attaquaient la molécule de façon aléatoire et engendraient, de ce fait, des fragments de tailles non définies, difficiles par conséquent à purifier. La découverte des enzymes de restrictions par W. Arber (7) a permis de lever cette hypothèse. Encore qu'il ait fallu attendre plusieurs années avant de réaliser le parti qui pouvait être tiré de ces protéines. Leur nom provient de ce que le rôle de ces nucléases fut mis en évidence pour la première fois dans un phénomène dit de « modification-restriction » qui permet aux bactéries d'éliminer des molécules d'ADN exogènes qui ont été perpétuées dans le cytoplasme d'espèces ou sous-espèces étrangères. Le nombre des enzymes de restriction aujourd'hui connues est voisin de la cinquantaine. Le biochimiste dispose donc ainsi d'une panoplie d'outils lui permettant de cliver la double hélice d'ADN de façon précise et reproductible.

Ces enzymes coupent généralement l'ADN en deux endroits qui ne se trouvent pas en vis-à-vis sur la structure hélicale, mais qui sont disposés cependant de façon symétrique par rapport à un axe perpendiculaire à l'hélice (Figure 3). Ceci tient à ce que les séquences de reconnaissance disposées sur chacun des brins de l'hélice sont identiques quoique de polarité inversée. Les deux morceaux d'ADN ainsi clivés ne sont pas alors terminés par des « bouts francs » mais comportent, on le voit, de courtes séquences monofilaires, complémentaires l'une de l'autre. Dans quelques cas cependant, le clivage s'effectue au niveau de liens phosphodiesters qui sont exactement en vis-à-vis : les 2 morceaux d'ADN ainsi produits sont alors dépourvus d'extrémités cohésives.

La figure 4 permet de comprendre comment, en clivant un cercle plasmidien, d'une part, et l'ADN provenant d'un chromosome étranger, d'autre part, à l'aide d'enzymes de restriction appropriées, on produit des molécules capables de s'emboîter les unes dans les autres. Par le jeu des hétéroappariements de type Watson-Crick (qui font qu'une adénine se place automatiquement face à une thymine et une cytosine en regard d'une guanine), les deux

Les enzymes de restriction : des bistouris pour DNA

origine	dénomination	site de reconnaissance	extrémité engendrée	Nombre de sites de coupures dans lambda (50 000 paires de bases)	adéno 2 (38 000 paires de bases)	SV40 (5 000 paires de bases)
Escherichia coli RY13 (porte le plasmide RTFI)	EcoRI	5'—GAATTC— —CTTAAG—3'	5'pAATTC— G—	5	5	1
Escherichia coli R245	EcoRII	—CCTGG— —GGACC—	pCCTGG— — ou pCCAGG— —	> 35	> 35	16
Haemophilus influenzae Rd	Hind II	—GTPyPuAC— —CAPuPyTG—	pPuAC PyTG	34	20	7
	Hind III	—AAGCTT— —TTCGAA—	pAGCTT— A—	6	11	6
Haemophilus parainfluenzae	Hpa I	—GTTAAC— —CAATTG—	pAAC— TTG—	11	6	4
	Hpa II	—CCGG— —GGCC—	pCGG— C—	> 50	> 50	1
Haemophilus aegyptius	Hae III	—GGCC— —CCGG—	pCC— GG—	> 50	> 50	18
Bacillus amyloliquefaciens H	Bam HI	—GGATCC— —CCTAGG—	pGATCC— G—	5	3	1
Bacillus globigii	Bgl II	—AGATCT— —TCTAGA—	pGATCT— A—	5	10	0
Serratia marcescens S	Sma I	—CCCGGG— —GGGCCC—	pGGG— CCC—	3	12	0
Xanthomonas malvacearum	Xma I	—CCCGGG— —GGGCCC—	pCCGGG— C—	3	12	0

Figure 3. Extraite de l'article de P. Tiollais et A. Rambach, *La recherche*, 1977, 82, 825 (tableau I).

morceaux d'ADN peuvent en effet se joindre et s'emboîter. Cette soudure n'est que partielle; il convient de reformer les liens phosphodiesters covalents clivés par l'enzyme (ici entre les bases A et G séparées par l'enzyme EcoR I) de chaque côté du segment reconstitué. Cette opération peut être aisément catalysée par des ADN ligases qui réparent en effet les liens phosphodiesters dans une structure bicaténaire.

Parfois, nous l'avons vu, le fragment de chromosome étranger n'est pas porteur d'extrémités cohésives et il en va de même pour le cercle plasmidien. Chacune des molécules d'ADN destinée à subir une recombinaison est alors « allongée » artificiellement par l'accolement de polymères répétitifs constitués par des molécules de désoxynucléotides dont les bases sont complémentaires. Cette opérations est catalysée par des enzymes appelées « terminales tranférases ».

Sous quel état peut se présenter l'ADN à greffer, porteur du gène étranger que l'on tente de cloner dans une bactérie ?
L'ADN, transporté dans une cellule réceptrice pour y être cloné, peut se présenter sous trois états : il peut s'agir d'un fragment de chromosome, d'une copie artificielle d'un ARN messager, appelée *c*-ADN, ou encore d'une molécule d'ADN synthétisée chimiquement et reproduisant tout ou partie de la séquence d'un gène. Les raisons qui militent pour cette pluralité apparaîtront plus clairement en fonction des considérations suivantes : supposons que nous ayons réussi à fragmenter les chromosomes d'une cellule de pancréas dans le but de cloner chez *E. coli* le fragment porteur de la séquence de codage pour l'insuline. Cette opération est parfaitement réalisable et, comme le schématise la figure 5, le fragment insuline transféré dans *E. coli* peut s'y répliquer. Toutefois (et ce point revêt une importance particulière), le gène inclu dans un tel fragment de chromosome d'organisme eucaryote *ne pourra jamais s'exprimer dans la bactérie.* Il sera donc incapable de diriger la synthèse d'une protéine nouvelle. La raison en est que, chez les organismes supérieurs, les séquences de codage sont *interrompues* par des séquences non codantes, dont les produits de transcription sont éliminés au sein des cellules eucaryotes par un processus naturel d'épissage (splicing) alors qu'elles ne subissent pas d'épissage au sein d'une cellule bactérienne. Ces séquences d'interruption (ou encore appelées « introns »), quoiqu'elles n'empêchent ni la réplication, ni la transcription du gène étranger, rendent donc impossible le décodage en protéines (8, 9).

Aussi, le plus souvent, la séquence clonée est-elle fabriquée artificiellement par voie enzymatique ou chimique. Dès lors, si l'on vise à obtenir la production d'insuline après transformation par un plasmide porteur de la séquence de codage correspondante, la première étape consiste à isoler, non pas le fragment incluant le gène naturel (lequel est porteur d'introns), mais « l'ARN messager » de l'insuline. La molécule du « messager » ne comporte pas de séquences d'interruption, celles-ci ayant été éliminées au cours de

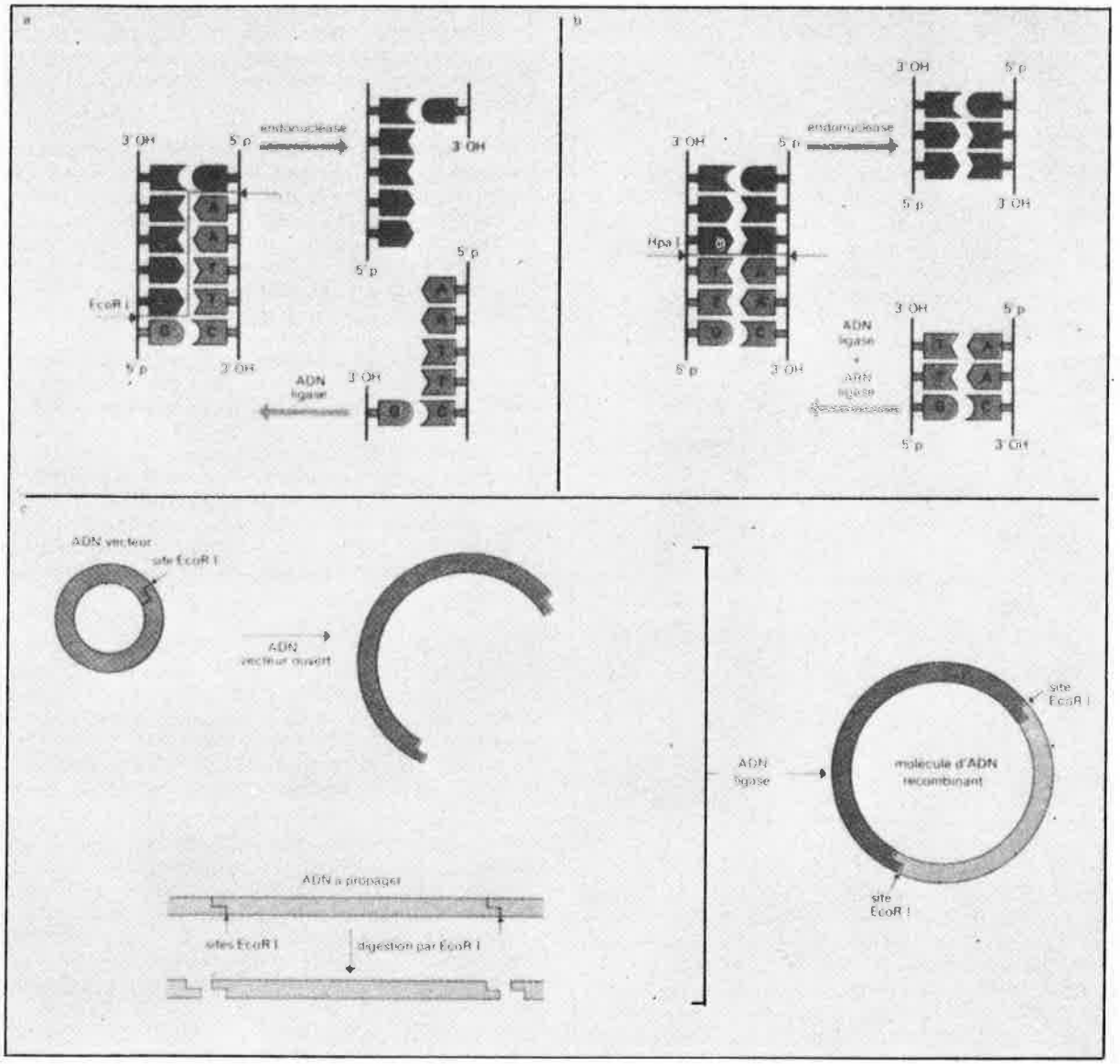

Figure 4. **Extraite de l'article de F. Rougeon et coll., *Encyclopaedia Universalis*, 1979, p. 144 (Figure 7).**

sa biosynthèse. L'ARN messager purifié est copié par une « transcriptase inverse » en un produit que l'on dénomme ADN complémentaire ou *c*-ADN. C'est cette « copie » colinéaire et strictement conforme qui est en pratique soudée à l'ADN du plasmide ou à celui d'un bactériographe. La molécule hybride peut alors être introduite dans une bactérie. Elle aura la capacité de s'y exprimer pour former une nouvelle protéine.

Les progrès de la chimie organique appliquée aux acides nucléiques ont permis, notamment sous l'impulsion de Khorana, Itakura et coll., de fabriquer également des gènes *entièrement synthétiques* dépourvus d'introns. Cela implique de connaître la séquence chimique de la protéine ou du polypeptide dont on envisage de provoquer la synthèse par clonage, et d'assembler par voie chimique les nucléotides de codage, ou « codons » correspondants. Ainsi a pu être réalisée la synthèse chimique du « gène » d'une hormone hypophysaire, la *somatostatine* et des gènes de l'insuline humaine (10, 11). Ces gènes « synthétiques » peuvent ensuite être clonés comme des *c*-ADN ou des gènes naturels.
Il est illusoire d'espérer pouvoir décrire en si peu d'espace les principaux résultats déjà fournis par des techniques du génie génétique (texte encadré).
Puisque cette technique permet de cloner (c'est-à-dire à la fois de purifier et d'amplifier une séquence génétique ou un fragment de chromosome défini), elle donne, par conséquent, accès à des quantités importantes de matériel génétique en provenance des organismes supérieurs, grâce à quoi plusieurs types d'opérations peuvent être envisagés.

Résultats ou conséquences probables découlant des expériences de génie génétique

- **Étude du génome des organismes supérieurs (mosaïsme – « introns » – « épissage »).**
- **Cas particulier des gènes codant pour les immunoglobulines.**
- **Établissement rapide des séquences de protéines.**
- **Diagnostic précoce de certaines maladies héréditaires.**
- **Fabrication artificielle de protéines douées d'activités intéressantes pour les secteurs de la santé de l'industrie ou de l'agronomie (pharmaco-endocrinologie, sérothérapie).**
- **Génie génétique chez les plantes ou leurs bactéries symbiotiques (fixation de l'azote – changements de propriétés génomiques des végétaux).**

• *a*) **L'établissement rapide de la séquence chimique du gène isolé et cloné.** Les données qui en émanent sont très précieuses surtout lorsqu'il s'agit du gène codant pour une grande protéine. En effet, l'établissement direct de la séquence d'une protéine par les techniques conventionnelles de la biochimie, bien qu'elle demeure

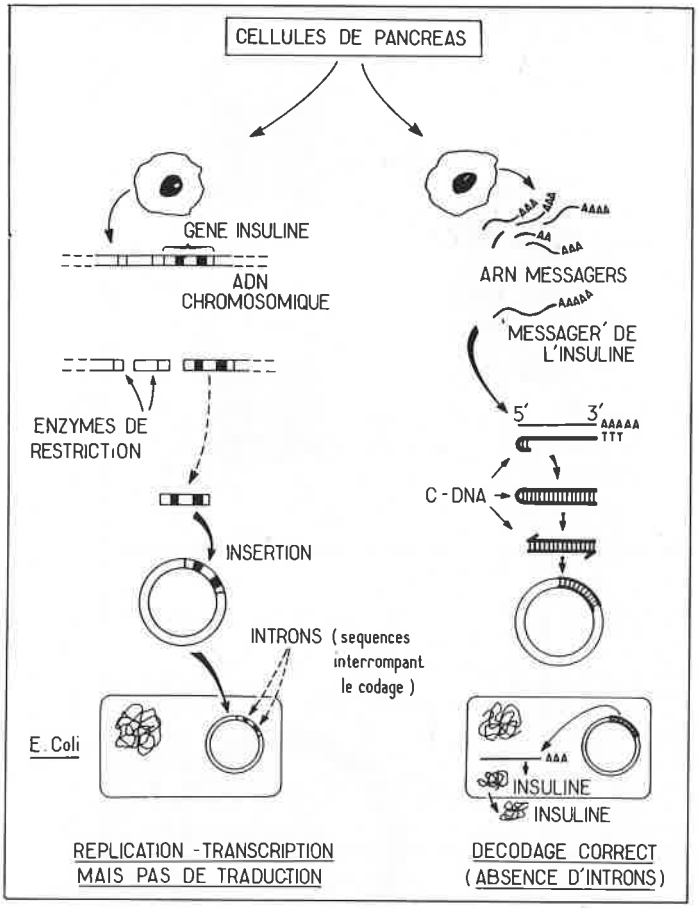

Figure 5.

la seule technique irréprochable pour atteindre à la structure primaire de cette protéine, représente néanmoins un exercice long et fastidieux. En déterminant la séquence du *gène* correspondant on peut assez facilement déduire celle de la protéine de façon beaucoup plus rapide. Ceci implique la connaissance du code génétique et l'application de quelques correctifs mineurs (liés à la nature des ARN de transfert utilisés dans l'espèce considérée pour la traduction de certains codons dits « dégénérés «). A l'heure actuelle l'établissement de la séquence chimique d'un gène permet donc d'en déduire assez rapidement celle de la protéine codée par ce gène.

• *b*) **On peut procéder à la cartographie hyperfine des régions du chromosome** présentant un intérêt particulier, soit pour la biologie du développement, soit pour l'étude du déterminisme des maladies héréditaires. Cette cartographie hyperfine revient à une « cartographie physique » : on repère en effet l'emplacement des séquences de codage (en s'aidant de sondes moléculaires radioactives susceptibles de former des hybrides avec ces séquences) par rapport à des sites de coupures produites par des enzymes de restriction bien connues.

La cartographie des gènes humains codant pour les principales hémoglobines adultes a pu ainsi être précisée. Ce résultat revêt une assez grande importance pour comprendre la chronologie d'expression des gènes ou les altérations dont ils peuvent être le siège au cours de maladies héréditaires.

c) **Une conséquence directe issue de telles études est de pouvoir appliquer un microdiagnostic prénatal** de maladies héréditaires sur des quantités infimes de cellules prélevées dans le liquide amniotique. A l'aide de sondes radioactives du gène « globine », obtenues par clonage, et en recherchant les sites de coupure par des enzymes de restriction sur des chromosomes de cellules amniotiques prélevées à partir d'individus sains ou d'individus hétérozygotes porteurs du gène de la drépanocytose (nom donné à certaines formes d'anémies graves qui sévissent en Amérique, en Afrique et dans le bassin méditerranéen et qui se traduisent par des altérations morphologiques profondes des hématies), Kahn et Dozy ont pu établir la cartographie prénatale des génomes altérés. Ces techniques de diagnose génétique précoce semblent appelées à un grand avenir. Elles pourraient être étendues à d'autres maladies héréditaires.

• *d*) **D'autres conséquences directes de la cartographie « hyperfine » des gènes ont été, d'une part, la découverte du mosaïsme génétique** (Figure 6) (phénomène d'une extrême importance dans le contexte du fonctionnement des gènes de cellules eucaryotes inférieures et supérieures) et, d'autre part, celle des phénomènes de translocation dont sont l'objet les gènes codant pour les immunoglobulines (13, 14). Certains de ces points seront évoqués par mes collègues P. Chambon et P. Kourilsky dans leurs exposés.

• *e*) Pour en venir à présent à des considérants plus pratiques, nous évoquerons en dernier lieu **les résultats de synthèse artificiellement dirigée de protéines d'origine animale par des bactéries.**

Ici l'objectif revient à « domestiquer » les bactéries, les levures (voire des cellules animales facilement cultivables en lignées continues), de sorte qu'une fois programmées artificiellement par génie génétique, elles acquièrent la capacité de synthétiser des protéines douées d'activités biologiques intéressant la *pharmacologie*, l'*endocrinologie* ainsi que les secteurs *agronomique* et *agro-alimentaire*.

A titre d'illustration, on notera sur le tableau I quelques exemples de protéines présentant un intérêt médical ou pharmacologique évident et dont on a pu forcer la synthèse en transformant, soit des cellules animales (on a alors recours à des vecteurs viraux non dangereux pour l'homme), soit des cellules bactériennes transformées par des plasmides véhiculant des séquences de codage provenant d'ARN messagers étrangers (*c*-ADN).

Les rendements sont assez variables, en général assez faibles. Néanmoins, ils peuvent être considérablement accrus (optimisation) en ayant recours à d'autres vecteurs ou en plaçant les gènes clonés sous contrôle de promoteurs bactériens à haute efficacité. L'intérêt qui s'attache à la production d'insuline humaine, à celle, très proche, semble-t-il, d'antigènes vaccinants en provenance du virus de l'hépatite B ou encore à la production d'interféron humain est évident.

Déjà certaines firmes ont envisagé de produire de l'hormone de croissance humaine par génie génétique. Une telle opération, si elle était couronnée de succès, ferait réaliser des économies considérables dans les coûts de revient. Le potentiel de fabrication serait illimité puisqu'il ne dépendrait plus de la collecte d'organes humaines avec les risques inhérents à ce genre d'entreprise.

Des espoirs sont également placés dans la fabrication industrielle d'antigènes vaccinants par des bactéries domestiquées. Les expériences visent en particulier la production d'antigène Hbs. Il s'agit d'une protéine d'enveloppe codée par le virus de l'hépatite B, maladie sérieuse, voire grave, qui sévit dans le monde entier (le nombre de « porteurs » sains est d'ailleurs très élevé). L'obtention de l'antigène à grande échelle est un objectif recherché dans de nombreuses entreprises. Elle permettrait de pratiquer des campagnes de vaccination fort utiles. Au stade actuel, l'antigène Hbs peut être purifié à partir du sang des malades (USA) ou des porteurs sains (France). Il est impossible d'obtenir la propagation du virus en culture. Après que l'équipe de K. Murray, en Grande-Bretagne, ait réussi à cloner l'antigène Hbe (autre antigène responsable de la réplication), celle de P. Tiollais (Institut Pasteur et INSERM) est parvenue à cloner le génome entier du virus, qui se présente comme une molécule d'ADN circulaire. Outre que la séquence chimique du gène Hbs a pu être établie, des expériences ont été entreprises pour « provoquer » la synthèse de la protéine vaccinante dans des cellules animales en culture.

Le génie génétique pourrait être appelé à rendre d'inestimables services en bioagronomie, notamment pour améliorer les potentialités des bactéries responsables de la fixation de l'azote, tels

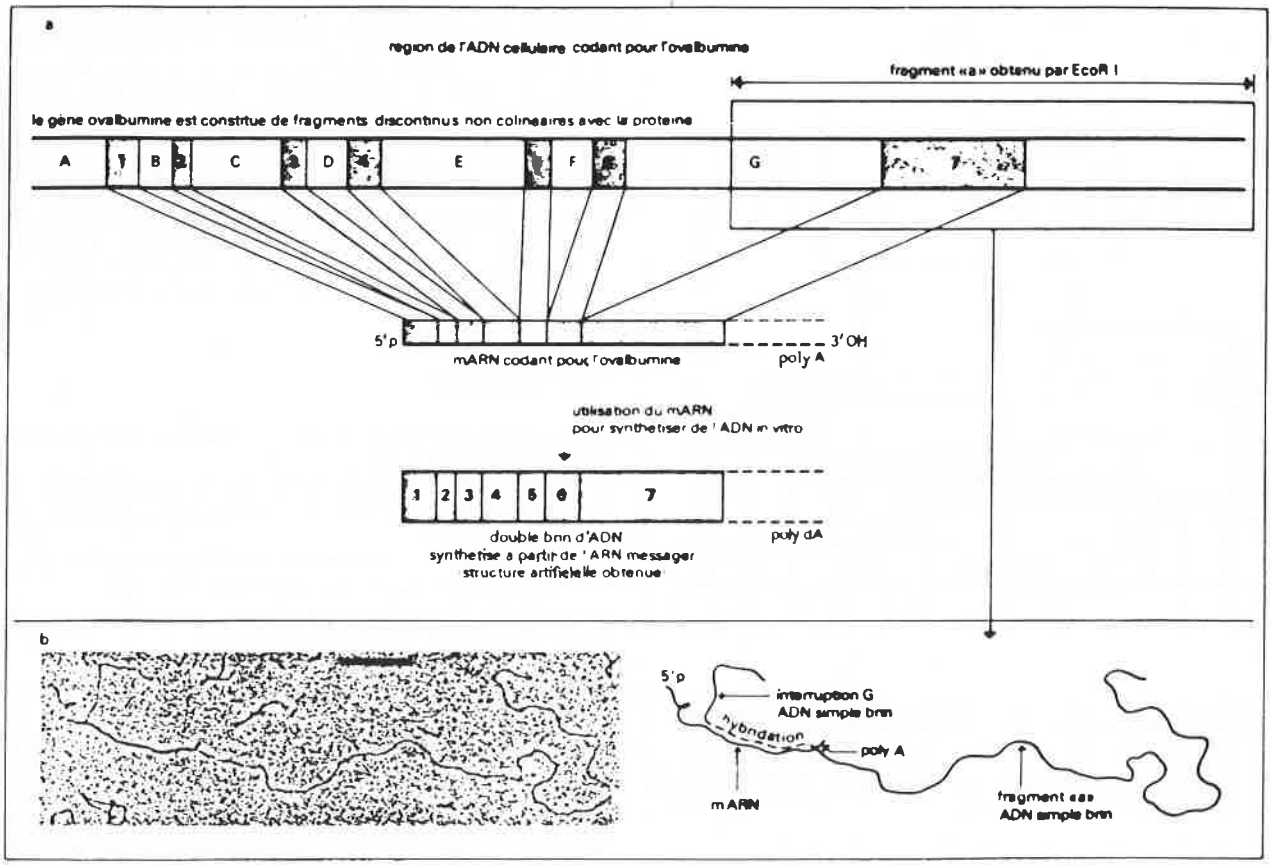

Figure 6. Extraite de l'article de F. Rougeon et coll., *Encyclopeadia Universalis*, 1979, p. 147 (Figure 11).

Tableau I. Principaux types de gènes exprimés après transformation par génie génétique

Protéines	Vecteur	Cellule hôte	Rendement
Globine (lapin-chaîne B)	SV 40	Rein de singe	10^5 molécules par cellule
Ovalbumine (poule)	Plasmide P BR 322	E. Coli	10^5 molécules par cellule
Somatostatine (homme)	Plasmide P BR 322-LAC	E. Coli	10^4 molécules par cellule
Insuline (rat, homme)	P BR 322-LAC	E. Coli	10^2-10^3 molécules par cellule 10^5 mol mais faible comp. AB
Hormone de croissance (homme)	P BR 322-adapteur synthétique	E. Coli	1-2 × 10^5 molécules par cellule
Interferon (homme)	P BR 322	E. Coli	Quelques molécules par cellule
Antigène-HBC (hépatite B)	P BR 322	E. Coli	10^4 molécules par cellule Activité immunogénique
Hémagglutinine (grippe)	P WT 111-Operon TRP	E. Coli	1-2 × 10^5 molécules par cellule
Enzymes Ex. : dihydrofolate réductase, etc.	P BR 322	E. Coli	10^4 molécules par cellule

les *Rhizobiums* qui sont indispensables à la croissance des légumineuses, ou même pour modifier les conditions de dépendances métaboliques des cellules végétales hétérotrophes elles-mêmes. En effet, la plupart des plantes qui font la base de notre alimentation requièrent pour leur croissance de l'azote organique à l'état de nitrates inclus dans les engrais chimiques coûteux. Grâce au travail des généticiens, notamment sur des bactéries modèles du genre *Klebsiella*, on a pu dresser la carte génétique complète des principaux enzymes transporteurs et régulateurs responsables de la conversion de l'azote atmosphérique en NH_3 (Figure 7) (15). Si l'on peut transférer tout ou partie de ces segments génétiques provenant d'une bactérie fixatrice à l'intérieur du cytoplasme d'une cellule végétale hétérotrophe, il n'est pas interdit de penser que l'on pourra supprimer ou réduire la dépendance des plantes vis-à-vis des engrais préformés.

A l'heure actuelle, il subsiste encore d'assez nombreuses difficultés dans la domestication des cellules bactériennes ou fongiques à des fins économiques ou médicales. Les rendements en protéines synthétisées par génie génétique demeurent généralement faibles ; certaines protéines demandent pour devenir actives des transformations (glycosylation, hydroxylation ou clivages

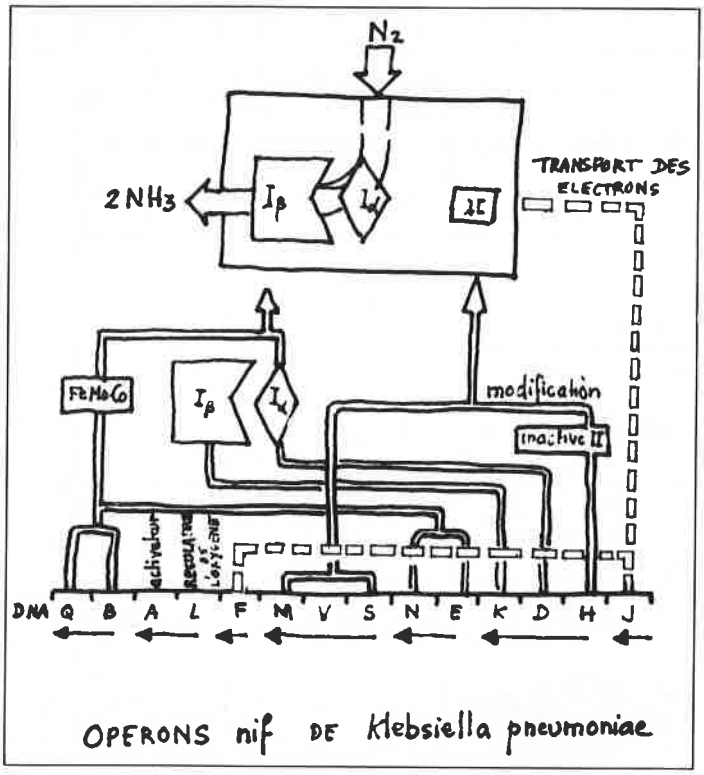

Figure 7. Extraite de l'article de Winston J. Brill, *Americain Scientist*, 1979, 67, 461 (Figure 4).

protéolytiques partiels) que les cellules bactériennes effectuent mal ou pas du tout. Parfois, la protéine étrangère formée dans la bactérie y est instable ou mal sécrétée. Enfin, il arrive que dans les cultures en masses de bactéries transformées, les gènes étrangers segrègent, c'est-à-dire qu'ils soient peu à peu éliminés.

Il fait cependant peu de doute qu'en dépit de ces limitations qui ne sont certainement que passagères, les techniques de recombinaison génétique *in vitro* iront en s'affinant tant en ce qui concerne le choix des vecteurs que celui des cellules hôtes ou des méthodes de détection du produit fabriqué dans ces « usines miniatures » qui sont les bactéries transformées. Ainsi que mes collègues, les professeurs F. Jacob, P. Royer, et moi-même l'avons cependant écrit dans un rapport remis au Président de la République : la biologie (et avec elle le génie génétique) n'engendrera ni miracles ni monstres ; elle ne mérite donc ni excès d'honneur ni indignité. Il en va de la biologie comme des autres sciences, c'est à partir d'une certaine idée de l'Homme que l'on pourra l'utiliser au mieux et il y a fort à parier que les techniques de recombinaisons génétiques *in vitro* pourront apporter à ce sujet des contributions vraiment capitales.

Bibliographie

(1) S. Cohen, A. Chang, H. Boyer et Helling, *Proc. Natl, Acad. Sc., U.S.A.*, 1973, **70,** 3240.
(2) P. Berg, D. Baltimore et H. Boyer, *Science*, 1974, **195,** 303.
(3) F. Rougeon, F. Quétier et F. Vedel, *Encyclopaedia Universalis*, 1979, p. 135.
(4) P. Tiollais et A. Rambach, *La Recherche*, 1977, **82,** 821.
(5) P. Kourilsky, *La Recherche*, 1980, **110,** 390.
(6) F. Jacob, S. Brenner et F. Cuzin, *Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol.*, 1963, **28,** 329.
(7) R. J. Roberts, *Nucl. Acids Res.*, 1980, **8,** 263.
(8) P. Kourilsky et P. Chambon, *Trends in Biochemical Sciences*, 978, **3,** 244.
(9) O. Mercereau-Puijalon et P. Kourilsky, *Nature*, 1979, **279,** 647.
(10) K. Itakura, T. Hirose, R. Crea, A. D. Riggs, H. L. Heyneker, F. Bolivar et H. W. Boyer, *Science*, **198,** p. 1056.
(11) D. V. Goeddel, D. G. Kleid, F. Bolivar, H. L. Heyneker, D. G. Yansura, R. Crea, T. Hirose, A. Kraszewski, K. Itakura et A. Riggs, *Proc. Natl. Acad. Sc., U.S.A.*, 1979, **76,** 106.
(12) Y. M. Kan et A. M. Dozy, *Proc. Natl. Acad. Sc.*, 1978, **75,** 5631.
(13) H. Sakano, J. H. Rogers, K. Hüppi, C. Brack, A. Traunecker, R. Maki, R. Wall et S. Tonegawa, *Nature*, 1979, **277,** 627.
(14) R. Lenhard-Schuller, B. Hohn, C. Brack, M. Hirama et S. Tonegawa, *Proc. Natl. Acad Sc., U.S.A.*, 1978, **75,** 4709.
(15) C. Elmerich, *Physiol. Vég.*, 1979, **17,** 883.