

Ministère d'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Dr Moulay Tahar Saïda

Faculté des Sciences

Département de Biologie



**Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master en biologie**

Spécialité : **Biotechnologie et génomique végétale**

Par : *SOHBI Karima et RABAHI Cheimaa*

Intitulé

# *Revue sur les protéines à intérêt médical*

**Soutenu publiquement le 26/09/2021 devant les membres du jury :**

**Président Mr AMMAM Abdelkader    Maitre de conférences A    Université de Saïda**

**Examineur Mme HACHEM Yasmine    Maitre de conférences B    Université de Saïda**

**Promoteur Mme HASSANI Maya    Maitre de conférences B    Université de Saïda**

**Année Universitaire 2020/2021**

***LISTES DES FIGURES***  
***ET***  
***DES TABLEAUX***

## ***LISTES DES FIGURES et DES TABLEAUX***

**Figure01** :principe de clonage

**Figure02** :techniques de l'obtention du cDNA correspondant

**Figure03** :la production de protéine recombinante

**Figure 04** : Principales régions du plasmide Ti d'Agrobacterium tumefaciens.

**Figure 05** : Mécanismes et principaux gènes impliqués dans le transfert de l'ADN-T dans les cellules végétales : La plante blessée émet des composés phénoliques et des sucres qui sont perçus grâce au complexe virA/virG. Leur phosphorylation déclenche l'activation des gènes de virulence d'Agrobacterium tumefaciens. L'attachement de la bactérie à la surface de la cellule végétale se fait grâce à ses gènes chromosomiques. Une copie simple brin de l'ADN-T est synthétisée grâce au complexe virD1/virD2, puis, elle est conduite dans la cellule végétale grâce aux protéines virD2. Les protéines virB établissent un canal entre la cellule bactérienne et la cellule végétale. Le complexe T formé de l'ADN-T et des protéines virD2 (en 5' de l'ADN-T) et virE2 (le long de la séquence) entre dans la cellule végétale, où VIP1 facilite leur migration dans le cytoplasme. Puis, il se dirige vers le noyau de la cellule végétale et l'ADN-T s'intègre dans le génome (Zhu et al., 2000)

**Figure 06** : Représentation schématique du système de co-intégration. Le plasmide qui contient la région vir est maintenu dans Agrobacterium tumefaciens. Le plasmide qui comporte l'ADN-T (gène de sélection végétale et gène d'intérêt) est introduit dans Agrobacterium soit par électroporation, soit par conjugaison bactérienne via *E. Coli*. L'ADN-T s'intègre dans le plasmide Ti par recombinaison homologue : les régions vir et l'ADN-T sont sur le même plasmide. L'agrobactérie recombinante ainsi obtenue peut alors être utilisée pour transformer génétiquement des cellules végétales.

**Figure 07** : Représentation schématique du système binaire après conjugaison triparentale. Le plasmide de virulence est maintenu dans Agrobacterium tumefaciens. Le plasmide binaire, qui contient l'ADN-T, est introduit dans Agrobacterium tumefaciens par électroporation ou par conjugaison bactérienne (cas schématisé). En général, on utilise un plasmide «helper », pour améliorer le transfert du plasmide binaire d'*E. coli* vers A.

tumefaciens grâce a ses gènes tra et mob. C'est une conjugaison triparentale. Le plasmide « helper » ne possède pas d'origine de répliation d'A. tumefaciens, il est éliminé au cours des divisions successives. La présence des gènes vir va permettre le transfert de l'ADN-T (gène de résistance et gène de sélection) dans les cellules végétales.

**Figure 08** : Structure 3D de la protéine GFP (en coupe à droite enfin de bien visualiser le centre de la cage) : En jaune : les feuillets  $\beta$ , en violet : l'hélice  $\alpha$ , au centre : le chromophore.

**Figure 09** : MAT system vector system utilisé chez *le peuplier* (site Web Nippon Paper Group : ([http://www.np-g.com/e/about/research/topix\\_study/mat/matvector\\_01.html](http://www.np-g.com/e/about/research/topix_study/mat/matvector_01.html) ) : A : Les entre-nœuds sont cultivés en présence d'Agrobacterium, puis placés sur milieu nutritif ; seules les cellules ayant reçu le gène ipt peuvent se développer en l'absence d'hormones. Les cals sont cultivés jusqu'à l'obtention de bourgeons. En raison de l'expression du gène ipt, le phénotype de ces rameaux est anormal. Cependant, grâce à l'excision du gène ipt résultant du système de recombinaison R/RS, des rameaux normaux sont obtenus sur 13 à 40 % des cals. Seuls les gènes d'intérêt sont insérés dans ces plantes transformées. RS : site de recombinaison ; R : gène de recombinaison ; ipt : isopentényl transférase ; BD : bordure droite ; BG : bordure gauche. B : explant de peuplier ayant retrouvé un phénotype normal après excision du gène ipt, entouré de ESP : extreme shooty phenotype. C : enracinement possible de la plante marker free

**Figure 10** : Représentation schématique de l'embryogénèse somatique directe et indirecte. Les embryons résultant d'une cellule sont reliés aux cellules maternelles par une structure suspentrice, alors que ceux d'origine pluricellulaire sont fusionnés aux cellules maternelles par leur partie basale (Quiroz-Figueroa et al., 2006)

**Figure 11** : Les différents stades de l'embryon somatique chez la mangue (*Mangifera indica*). A : stade globulaire, B : stade cordiforme, C : stade torpédo, D : stade cotylédonaire. (<http://www.as-best.sinica.edu.tw/en/gr/wo/4?page=1> )

**Figure 12** : Les différentes étapes de la régénération de plantule par la voie de l'embryogénèse somatique indirecte, et les hormones végétales nécessaires aux différents stades (Zimmerman, 1993 ; Strosse et al.,2003)

**Tableau01** :différents vecteurs de clonage

# SOMMAIRE

<b>LISTES DES FIGURES ET DES TABLEAUX.....</b>	<b>01</b>
<b>SOMMAIRE.....</b>	<b>04</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>06</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>08</b>
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>10</b>
<b>1. BIOTECHNOLOGIE .....</b>	<b>11</b>
1.1. <b>Qu'est-ce que la biotechnologie ? .....</b>	<b>11</b>
1.2. <b>Principaux domaines biotechnologiques .....</b>	<b>14</b>
1.2.1. <b>L'ADN recombinant et le génie génétique .....</b>	<b>14</b>
1.2.2. <b>Plantes et culture des tissus végétaux .....</b>	<b>15</b>
1.2.3. <b>Culture des cellules de mammifère .....</b>	<b>16</b>
1.2.4. <b>Biocatalyseurs .....</b>	<b>16</b>
1.2.5. <b>Biorémédiation .....</b>	<b>17</b>
1.2.6. <b>Fermentation .....</b>	<b>18</b>
1.2.7. <b>Combustibles et produits organiques comme alternative au pétrole .....</b>	<b>18</b>
1.2.8. <b>Génie des procédés biotechnologiques.....</b>	<b>19</b>
<b>2. Les protéines recombinantes .....</b>	<b>20</b>
2.1. <b>La recombinaison génétique .....</b>	<b>20</b>
2.2. <b>Les protéines recombinantes.....</b>	<b>20</b>
2.2.1. <b>Produire une protéine recombinante, pourquoi.....</b>	<b>22</b>
2.2.2. <b>Les différents systèmes d'expression .....</b>	<b>23</b>
2.2.3. <b>Production de protéine recombinante .....</b>	<b>26</b>
2.2.3.1. <b>Étapes d'une production de protéine recombinant.....</b>	<b>26</b>
<b>TRAVAUX SUR LA SYNTHÈSE DE PROTÉINES À INTÉRÊT MÉDICAL PAR LES PLANTES.....</b>	<b>31</b>
<b>3. La transformation génétique chez les végétaux supérieurs .....</b>	<b>32</b>
3.1. <b>Les différentes techniques de transformation génétique des végétaux.....</b>	<b>32</b>
3.1.1. <b>Les méthodes de transferts directs .....</b>	<b>32</b>
3.1.2. <b>Les méthodes de transferts indirects.....</b>	<b>33</b>
3.2. <b>Mécanismes de l'infection des plantes dicotylédones par d'Agrobacterium tumefaciens .....</b>	<b>35</b>
3.2.1. <b>Le plasmide Ti et l'ADN-T .....</b>	<b>35</b>
3.2.2. <b>Induction du système de virulence de la bactérie .....</b>	<b>37</b>
3.2.3. <b>Le transfert de gènes d'Agrobacterium tumefaciens à la plante .....</b>	<b>39</b>
3.2.4. <b>L'intégration de l'ADN-T dans les cellules végétales .....</b>	<b>41</b>
3.3. <b>Utilisation de la souche Agrobacterium tumefaciens pour la transformation génétique des Plantes .....</b>	<b>42</b>

<b>3.3.1. Le système de co-intégration .....</b>	<b>43</b>
<b>3.3.2. Le système binaire .....</b>	<b>44</b>
<b>3.3.3. Les gènes de sélection .....</b>	<b>47</b>
<b>3.3.4. Les gènes rapporteurs .....</b>	<b>49</b>
<b>3.3.5. Les promoteurs .....</b>	<b>52</b>
<b>3.4. L'étape de régénération de la plante en vue de sa transformation génétique.....</b>	<b>53</b>
<b>3.4.1. Utilisation de cellules différenciées : l'organogénèse directe .....</b>	<b>54</b>
<b>3.4.2. Utilisation de cellules indifférenciées : la régénération indirecte .....</b>	<b>54</b>
<b>3.4.2.1. L'embryogénèse somatique .....</b>	<b>55</b>
<b>3.4.2.2. L'organogénèse indirecte à partir de cals.....</b>	<b>59</b>
<b>3.5. La transformation génétique in planta .....</b>	<b>59</b>
<b>3.5.1. Par inoculation de graines .....</b>	<b>60</b>
<b>3.5.2. Par inoculation de parties florales .....</b>	<b>60</b>
<b>3.5.3. Par inoculation de méristèmes.....</b>	<b>61</b>
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>62</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>64</b>

# ***REMERCIEMENTS***



**TOUTES LES LETTRES NE SAURONT TROUVER LES MOTS QU'IL FAUT .....**  
**TOUS LES MOTS NE SAURAIENT EXPRIMER LA GRATITUDE, L'AMOUR,**  
**LE RESPECT, LA RECONNAISSANCE.**  
**AUSSI, CEST TOUT SIMPLEMENT QUE :**



**JE DÉDIE CETTE MÉMOIRE À... ٤**

**À MON TRES CHER PERE.....**  
**À L'HOMME LE PLUS GÉNÉREUX DU MONDE.**  
**À MA TRES CHÈRE MÈRE .....**  
**À LA PLUS ATTACHANTE ET LA PLUS ADORABLE FEMME DU MONDE.**  
**À MES AMIS ET À TOUS CEUX QUE JE CONNAIS**  
**À NOTRE MAÎTRE ET JUGE DE MÉMOIRE .....**

**MME HASSANI.MAYA**

**MR AMMAM ABDELKADER**

**MME HACHEM YASMINE**

**JE VOUS REMERCIE DE M'AVOIR SI BIEN AIDÉ À MENER À BIEN CE**  
**TRAVAIL, VOUS N'AVEZ JAMAIS LÉSINÉ NI SUR VOTRE TEMPS NI SUR**  
**VOTRE**

**SAVOIR TOUT LE LONG DE CE TRAVAIL.**

# ***INTRODUCTION***

## ***GENERALE***

## ***Introduction Générale***

Grâce aux progrès accomplis dans les techniques du génie génétique, l'introduction dans une cellule procaryote ou eucaryote d'un gène provenant d'un autre organisme a permis d'utiliser la cellule hôte en tant qu'usine de production de protéines recombinantes. Ainsi, l'expansion des biotechnologies a pu offrir de nouvelles potentialités dans la conception, et la fabrication même, de médicaments innovants. Dans le domaine de la santé, le développement des biotechnologies a contribué à la mise au point de nombreuses molécules thérapeutiques : l'insuline recombinante dans le traitement du diabète se substitue depuis 1982 aux produits d'extraction, l'érythropoïétine recombinante stimule la production de globules rouges chez des patients dialysés ou atteints d'un cancer, ou encore le facteur VIII recombinant permet de traiter l'hémophilie. Des millions de patients ont déjà bénéficié de médicaments et de vaccins issus des biotechnologies, et certains rapports nous prédisent que dans le futur, beaucoup plus de personnes y auront accès (PhRMA, 2008). Actuellement, 633 médicaments issus des biotechnologies sont en développement pour le traitement de plus de 100 maladies. Ceci inclut 254 médicaments contre le cancer, 162 médicaments contre des maladies infectieuses, 59 contre des maladies auto-immunes, et 34 contre le virus de sida. Ces médicaments sont actuellement en essais cliniques ou en cours d'examen par la FDA (Food and Drug Administration) (PhRMA, 2008). Cet essor récent des biotechnologies appelle à l'émergence de nouveaux procédés de production de médicaments, et notamment de protéines recombinantes, toujours plus productifs et rentables. Certains systèmes d'expression sont désormais largement exploités comme les systèmes bactériens, les levures ou les CHO. D'autres systèmes d'expression, comme les systèmes végétaux ou les cellules d'insectes, moins développés, sont cependant très prometteurs. L'idée de créer une plateforme de production de protéines recombinantes à partir de plantes est née fin 2005 au sein de l'entreprise Plant Advanced Technologies SAS .

Dans ce contexte de recherche . Ce mémoire est structuré en 2 parties distinctes . La première est consacrée à la synthèse bibliographique sur les différents domaines de la

biotechnologie et les protéines à intérêt médical . La deuxième partie présente les travaux sur la synthèse de protéines à intérêt médical par les plantes .

## ***SYNTHESE***

## ***BIBLIOGRAPHIQUE***

# **1. BIOTECHNOLOGIE**

## **1.1. QU'EST-CE QUE LA BIOTECHNOLOGIE ?**

Donner une définition non équivoque de la biotechnologie s'avère difficile car le domaine englobe différentes activités scientifiques et de production. En outre, la biotechnologie couvre une vaste gamme de concepts, technologiques comme scientifiques. Cependant, l'absence d'une définition générale n'a pas freiné la progression du développement biotechnologique.

Voici quelques définitions issues de la bibliographie :

« La biotechnologie est un ensemble d'outils puissants utilisant des organismes vivants (ou une partie de ces organismes) pour obtenir ou modifier des produits, améliorer des espèces végétales et animales ou développer des microorganismes destinés à des usages spécifiques »

« La biotechnologie est la technique de manipulation des formes vivantes (organismes) visant l'obtention de produits utiles à l'humanité »

« La biotechnologie est l'application des principes de la science et de l'ingénierie au traitement des matières via des agents biologiques, dans le but d'obtenir des produits et des services »

« La biotechnologie est l'intégration des sciences naturelles et de l'ingénierie afin d'obtenir l'application d'organismes et de cellules (ou des parties de ces derniers) ainsi que d'analogues moléculaires dans la production de biens et de services »

« La biotechnologie est l'utilisation industrielle d'organismes vivants ou de techniques biologiques développées par la recherche fondamentale. Les produits biotechnologiques comprennent :

Les antibiotiques, l'insuline, l'interféron, l'ADN recombinant et les anticorps monoclonaux. Les techniques biotechnologiques comprennent : le génie génétique, les cultures cellulaires, les cultures de tissus, le biotraitement, l'ingénierie des protéines, les biocatalyses, les biosenseurs et la bioingénierie »

« La biotechnologie, ce n'est pas une seule technologie, elle rassemble diverses techniques qui ont en commun la manipulation des cellules vivantes et de leurs molécules et l'application pratique de ces procédés afin d'améliorer la vie ».

« En termes généraux, la biotechnologie est l'utilisation de procédés biologiques visant l'obtention de produits utiles, qui incluent des organismes modifiés, des substances et des appareils ».

« On appelle biotechnologie les procédés biologiques produisant des substances bénéfiques à l'agriculture, à l'industrie, à la médecine et à l'environnement ».

Conformément au Bureau de consultation en technologie du bureau de presse du gouvernement américain, il existe deux définitions de la biotechnologie. La première englobe l'ancienne biotechnologie et la nouvelle<sup>10</sup> :

« Toute technique utilisant des organismes vivants (ou une partie d'entre eux) pour créer ou développer des microorganismes destinés à des usages spécifiques ».

La seconde, plus spécifique, s'applique à la biotechnologie moderne :

« La biotechnologie est l'industrie qui utilise l'ADN recombinant, la fusion cellulaire et les nouvelles techniques de biotraitement ».

« La biotechnologie est l'application de la science et de l'ingénierie à l'utilisation directe ou indirecte d'organismes vivants, de parties d'organismes ou de produits d'organismes vivants, sous leur forme naturelle ou modifiée ».

Voici comment l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Économiques) décrit la biotechnologie :

« Application de la science et de la technologie aux organismes vivants comme à ses parties, produits et molécules, afin de modifier les matières vivantes ou non qui serviront à la production de connaissances, de biens et de services ».

D'autres définitions vont dans ce sens :

« La biotechnologie consiste tout simplement à utiliser des microorganismes, ainsi que des cellules végétales et animales afin de produire des matières, notamment des aliments, des médicaments et des produits chimiques utiles à l'humanité ».

« La biotechnologie est l'utilisation d'organismes vivants ou composés issus d'organismes vivants visant à obtenir des produits utiles à l'Homme ».

La FAO (Organisation des Nations-Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture) donne deux définitions complémentaires de la biotechnologie :

« L'utilisation de procédés biologiques ou d'organismes vivants pour la production de matières et de services bénéfiques à l'humanité. La biotechnologie implique l'utilisation de techniques qui augmentent la valeur économique des végétaux et des animaux et développent des microorganismes afin d'agir dans l'environnement ».

« La biotechnologie implique la manipulation, sur des bases scientifiques, d'organismes vivants, particulièrement à l'échelle génétique, afin de produire des nouveaux produits tels que les hormones, les vaccins, les anticorps monoclonaux, etc. ».

Certains biotechnologues définissent la biotechnologie comme « une technologie appliquant les potentiels des êtres vivants et leur possibilité de modification sélective et programmée à l'obtention de produits, de biens et de services ». Par conséquent, la biotechnologie regroupe les fondements d'un grand nombre de disciplines, de la biologie classique (taxonomie) à la bioingénierie ou le génie génétique, la microbiologie, la biochimie, la biologie cellulaire et moléculaire, l'immunologie, etc. (Muñoz, 1994). Pour J. D. Bu'lock (1991), la biotechnologie « est l'application contrôlée et délibérée d'agents biologiques simples (cellules vivantes ou mortes, composants cellulaires) dans les opérations techniques de fabrication de produits ou l'obtention de services ».

Le sens donné au terme « biotechnologie » est donc parfois trop limité (manipulation génétique et biologie moléculaire appliquée à l'obtention de biens et de services utiles). Au sens large, la biotechnologie englobe toutes les opérations de la biologie appliquée, de l'agriculture aux sciences culinaires.

## **1.2. PRINCIPAUX DOMAINES BIOTECHNOLOGIQUES**

La biotechnologie peut être examinée de deux façons différentes : d'un point de vue horizontal, qui distingue les techniques utilisées (domaines de la biotechnologie) ou d'un point de vue vertical, qui se concentre sur les secteurs d'application industrielle.

Les domaines de la biotechnologie, cités précédemment mais que nous examinerons à présent plus en détails, sont les suivants :

- l'ADN recombinant (génie génétique),
- la culture des tissus végétaux,
- la culture des cellules de mammifère,
- les biocatalyseurs,
- le traitement et la réutilisation des produits résiduels via des méthodes biotechnologiques (biorémédiation),
- les fermentations,
- l'obtention biotechnologique de combustible et de matière première organique comme alternative au pétrole,
- le génie des procédés biotechnologiques.

### **1.2.1. L'ADN recombinant et le génie génétique**

La biologie moléculaire a permis la découverte la plus importante de la biotechnologie : il est aujourd'hui possible de séparer le gène responsable de la codification de la production de certaines substances, de le transférer dans un autre organisme-hôte et de produire ainsi certaines protéines utiles de manière plus efficace. Grâce à ces progrès, la biotechnologie produit aujourd'hui à grande échelle des hormones, des vaccins, des facteurs de coagulation du sang et des enzymes. Par ailleurs, la production biotechnologique de

protéines permet d'éviter les inconvénients de la production à partir d'organismes supérieurs :

- À la différence de la culture de microorganismes, la culture de cellules d'organismes supérieurs à grande échelle n'est pas pratique car leur croissance est lente et leur contamination, fréquente.

- Le coût d'une culture de cellules est bien plus élevé que celui d'une culture microbienne.

- La source de cellules des organismes supérieurs est bien plus limitée que celle des organismes unicellulaires, qui, autre avantage, se reproduisent facilement et rapidement.

Ce domaine de la biotechnologie permet donc de produire de nouvelles protéines, par exemple des enzymes qui seront utilisées comme biocatalyseurs. La capacité spécifique des biocatalyseurs est gouvernée par la structure moléculaire ; au moyen de la technique de l'ADN recombinant, il est possible de modifier de façon sélective les gènes qui codifient la synthèse cellulaire des enzymes.

Par la suite, lors du transfert du nouvel ADN dans un microorganisme-hôte, on peut obtenir une nouvelle souche qui produira l'enzyme souhaitée.

### **1.2.2. Plantes et culture des tissus végétaux**

Les plantes, en plus de leur rôle-clé dans la production d'aliments, sont une source importante de matières premières et de médicaments. En effet, rappelons que 25 % des médicaments actuels sont d'origine végétale.

D'autre part, la culture d'organismes végétaux unicellulaires pour la production de biomasse ou l'extraction de produits de haute valeur ajoutée est une pratique qui augmente de jour en jour, à mesure que se développe la biologie moléculaire.

Enfin, la reproduction de plantes modifiées, via les techniques de réplique, a déjà été expérimentée avec succès. Cette technologie permet de remédier aux carences, d'améliorer les espèces et de mettre en place une résistance aux fléaux et aux maladies de nombreuses espèces végétales.

### **1.2.3. Culture des cellules de mammifère**

La première étude sur la fusion spontanée de deux cellules somatiques différentes pour former une Hétérocaryote (un minimum de deux noyaux et un unique cytoplasme) a été publiée en 1960 par Barsky et ses collaborateurs français. Cependant, on avait déjà observé à cette époque l'apparition de cellules polynucléaires dans les cultures de tissus de mammifères infectés par certains virus inactivés (Bull [et al.], 1984).

Les *Hétérocaryote* permettent d'obtenir l'expression des gènes des deux cellules parentales. En 1975, Kohler et Milstein ont appliqué cette propriété à leur célèbre synthèse d'anticorps monoclonaux, obtenus via la fusion de lymphocytes producteurs d'anticorps avec des cellules malignes de myélome, qui ont pour propriété une reproduction rapide. Ces cellules hybrides de myélome conservent cette propriété (la reproduction rapide) tout en exprimant des anticorps spécifiques.

Certaines protéines étant produites à partir des seules cultures de cellules de mammifère, cette culture des cellules à grande échelle est l'un des objectifs des biologistes moléculaires. Les anticorps monoclonaux et l'interféron sont deux exemples de ce type de protéines, qui sont très importantes pour la préparation des produits thérapeutiques et d'application analytique.

### **1.2.4. Biocatalyseurs**

Les enzymes sont des catalyseurs naturels ; comme c'est le cas pour tous les processus naturels, elles sont très spécifiques et font preuve d'une efficacité thermodynamique. Utilisées depuis des siècles, en particulier dans le secteur de la production d'aliments, elles sont l'une des formes les plus anciennes de la biotechnologie.

L'utilisation d'enzymes (isolées ou en cellules mortes ou mourantes) est d'une grande importance non seulement dans l'industrie alimentaire mais également dans la production de substances chimiques, dans les systèmes analytiques et de diagnostic, dans le traitement des maladies et enfin, dans l'industrie émergente des technologies plus propres.

L'utilisation des enzymes dans tous ces domaines a été rendue possible grâce aux meilleures connaissances de la fonction des enzymes dans les systèmes métaboliques des êtres vivants, de la structure des enzymes et par-dessus tout grâce à la possibilité d'obtenir des enzymes de synthèse via la manipulation génétique des microorganismes. Ces facteurs ont fait que de nombreuses entreprises sont spécialisées dans la production à grande échelle d'enzymes d'origine microbienne.

### **1.2.5. Biorémédiation**

Rappelons que la biorémédiation est l'application de la biotechnologie au traitement et à la réutilisation des produits résiduels. Examinons quelques applications de ce domaine.

Les épurateurs biologiques sont un bon exemple de biotechnologie appliquée simple. Il s'agit dans ce cas d'un lit fixe de microorganismes qui dégrade les produits organiques résiduels jusqu'à obtenir des niveaux acceptables dans les eaux qui doivent être rejetées directement. Les boues de ces épurateurs sont utilisées comme biomasse pour l'alimentation animale. Il existe également des procédés biotechnologiques de traitement des déchets solides urbains à l'aide de fermentations aérobie ou anaérobie permettant d'obtenir du biogaz.

Un autre exemple de cette technique, les tests de traitement des problèmes ponctuels à l'aide de la biotechnologie : citons la digestion, via des microorganismes, des nappes de pétrole flottant sur la mer après un accident de pétrolier ayant entraîné un rejet.

Toujours dans ce domaine, des études de dégradation microbienne des déchets de cellulose sont réalisées dans le but d'obtenir de la biomasse (protéines unicellulaires). On a

estimé que la quantité de protéines susceptibles d'être obtenue par ce biais à partir de déchets agricoles suffirait à alimenter l'ensemble de la population mondiale.

Enfin, signalons la présence d'autres études en cours : l'application de la biotechnologie pour la détoxification des sols pollués. Cette technique utilise des cultures de plantes supérieures qui fixent les métaux lourds et éliminent les polluants organiques.

### **1.2.6. Fermentation**

Avec la biocatalyse, les procédés de fermentation sont les formes les plus anciennes de la biotechnologie. La fermentation est l'application du métabolisme microbien pour transformer une matière en produits à valeur ajoutée. Ce procédé est en mesure de produire une incroyable variété de substances utiles, par exemple l'acide citrique, les antibiotiques, les biopolymères, les protéines unicellulaires, etc. Le potentiel est immense et très vaste, il suffit simplement de connaître le microorganisme adapté, de contrôler son métabolisme et sa croissance et d'être en mesure de l'utiliser à grande échelle.

### **1.2.7. Combustibles et produits organiques comme alternative au pétrole**

Le pétrole est une matière première non renouvelable, ce qui signifie que son usage incontrôlé ou croissant est limité. La biotechnologie utilisant quant à elle des matières renouvelables, son usage contrôlé peut s'étendre à l'infini. En cas d'épuisement du pétrole, la biotechnologie peut donc apporter deux solutions : d'une part, de nouveaux combustibles et d'autre part, une source alternative de produits organiques. L'utilisation des déchets de la fabrication du sucre de canne pour obtenir de l'alcool est un exemple de procédé entraînant des économies d'énergie.

Le méthane, issu de la fermentation des déchets agricoles (biogaz), est un autre combustible potentiel issu de la biotechnologie. Il s'agit là d'une biotechnologie facilement adaptable à des sociétés agricoles ne disposant pas de grandes ressources.

Le combustible biotechnologique le plus sophistiqué et peut-être le plus recherché est l'hydrogène dérivé de la biophotolyse de l'eau. Cette technologie est basée sur l'association de la capacité photosynthétique de la chlorophylle des cellules végétales et l'activité d'hydrogénase d'un enzyme d'origine bactérienne. Les grands avantages de ce combustible dérivé de l'eau est qu'il ne produit pas de pollution lorsqu'il brûle et que son réactif original se régénère. Malheureusement, cette technique est encore à l'étude.

### **1.2.8. Génie des procédés biotechnologiques**

L'application des techniques du génie chimique aux procédés biotechnologiques a entraîné l'apparition de la science des bioréacteurs, un secteur technique lié à la fois au génie chimique et à la biologie, à la microbiologie et à la biochimie et qui englobe l'étude et la conception de réacteurs à lit fixe, de sondes de contrôle de pH et de température, de pompes de dosage à réactifs et à aération, la conception d'agitateurs, l'étude des différentes méthodes d'immobilisation des enzymes et des microorganismes et la conception de divers filtres. L'ensemble de ces techniques possède aujourd'hui un nom, le génie des procédés. Toutes ces connaissances biotechnologiques doivent passer à un niveau de production qui les transformera en éléments rentables. Ceci demande la plupart du temps des procédés d'escalage et des technologies issues du secteur de l'ingénierie, qui doivent s'adapter aux propriétés spécifiques des organismes vivants de la biotechnologie. Voici quelques exemples de procédés : la collecte, le prétraitement et la filtration des matières premières, la conception du réacteur, la récupération et la réutilisation des biocatalyseurs, l'extraction et l'analyse des produits, le traitement des effluents et le recyclage des eaux.

## **2. Les protéines recombinantes**

### **2.1 La recombinaison génétique :**

La recombinaison génétique consiste à introduire un gène étranger et à le faire exprimer chez un micro-organisme (bactéries, levure, champignons) dans des cellules d'insecte, de mammifère... ou dans un organisme (plantes, animaux transgéniques). L'expression du gène permet d'obtenir des molécules dites recombinantes, ou r-molécules, qui sont utilisées, dans le domaine de la santé, comme vaccins ou comme médicaments. Pour la préparation de vaccins, le gène recombiné provient de l'agent pathogène et code l'antigène responsable de l'immunisation protectrice. Pour les médicaments, on utilise des gènes d'origine humaine codant des protéines normalement synthétisées par l'organisme, de façon physiologique ou en réponse à des situations particulières. Les médicaments recombinants s'adressent à deux types de pathologies :

Les déficits hormonaux ou bien enzymatiques innés ou acquis, dans le cas desquels les doses utilisées se rapprochent le plus possible des doses physiologiques, car leur emploi est parfaitement spécifique .

Les pathologies telles que le cancer, les maladies cardio-vasculaires ou les maladies infectieuses sont traitées par des r-molécules à doses relativement élevées.

### **2.2. Les protéines recombinantes**

Les protéines recombinantes sont ainsi qualifiées dans la mesure où elles sont produites par des cellules dont l'ADN a été modifié par recombinaison génétique. La protéine, synthétisée par une cellule différente de sa cellule d'origine, est ainsi dite hétérologue ou recombinante. Au sens large, un système de production adapté à la

fabrication d'une protéine recombinante donnée, est un procédé biotechnologique qui s'appuie principalement sur :

l'emploi d'un vecteur d'expression (un plasmide ou un virus), jouant le rôle de transporteur génétique du gène d'intérêt codant pour la protéine recherchée ;

l'utilisation d'une cellule hôte, chargée d'exécuter les instructions fournies par le gène d'intérêt qui lui est inséré, dans l'objectif de synthétiser la protéine recherchée ;

une phase de production proprement dite permettant de fabriquer les volumes de protéines souhaités ;

enfin, une séparation et extraction de la protéine du milieu de culture, suivie par une purification de celle-ci. Au sens restreint, un système de production de protéines recombinantes est caractérisé par un couple constitué d'un vecteur d'expression et d'un hôte (cellule ou organisme).

Actuellement, il existe divers systèmes d'expression voués à la production et la purification de protéines recombinantes : la bactérie *E. coli*, la levure *Saccharomyces cerevisiae* et les cellules *Chinese Hamster Ovary* (CHO) sont les plus avancées. Les autres systèmes d'expression font l'objet de nombreux travaux et sont de plus en plus présents dans le domaine des biotechnologies. Parmi ceux-ci, on trouve la levure *Pichia pastoris*, les cellules d'insectes, les animaux et les plantes transgéniques. Chacun de ces systèmes présentent des avantages et des inconvénients. Le choix de l'hôte d'expression sera en partie dicté par les impératifs économiques, mais la qualité des protéines recombinantes produites constituera également un paramètre déterminant, en particulier dans le cas de la production de protéines destinées à être injectées chez l'homme.

Pour être stables et actives *in vivo*, ces protéines doivent subir de multiples modifications post-traductionnelles. Les principales modifications sont le repliement, le clivage, l'association des sous-unités, la  $\gamma$ -carboxylation et la glycosylation. Elles se produisent après ou pendant la traduction de l'ARN messager en une chaîne d'acides aminés et sont spécifiques du type de cellule considérée. Parmi les modifications souvent requises pour assurer la fonction et la stabilité de la protéine, ainsi que son adressage vers le lieu où elle est active, la glycosylation est l'une des plus importantes. Les glycanes associés aux

protéines sont en effet extrêmement variables en fonction de l'hôte dans lequel la protéine d'intérêt est exprimée.

### **2.2.1. Produire une protéine recombinante, pourquoi ?**

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

1. L'identification des gènes.
2. L'isolement des gènes.
3. La modification des gènes.
4. La réexpression des gènes dans d'autres systèmes.

-Les autres buts de cette technologie sont :

5. La production d'une petite quantité de protéines d'intérêt scientifique comme les anticorps pour des applications expérimentales (*ELISA, Western Blot...*).

6. La production de protéines d'intérêt médical comme les anticorps, les vaccins ou les enzymes pour le traitement et parfois dans des cas d'un manque ou d'une déficience. Produire des anticorps pour le diagnostic.

7. La production d'une grande quantité de protéines d'intérêt économique et commercial

#### **➤ Quelques exemples :**

L'exemple connu des protéines recombinantes est l'insuline recombinante. L'insuline fut cristallisée en 1926. Elle fut la première protéine à être complètement séquencée en 1955, la première à être synthétisée chimiquement en 1958 et la première protéine humaine produite par biotechnologies en 1979 et commercialisée en 1982. L'insuline est sécrétée par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas. Elle exerce un effet

hypoglycémiant. L'insuline est administrée personnes touchées par le diabète qui est une maladie caractérisée par l'augmentation du taux du sucre dans le sang et les urines.

L'autre exemple de protéines recombinantes est l'hormone de croissance. L'hormone de croissance est une substance chimique naturelle que sécrète l'hypophyse. Elle règle la croissance et le développement normal chez les enfants. L'hormone de croissance recombinante humaine (rHGH) est produite à partir de cellules modifiées par génie génétique afin de produire cette hormone. Un déficit en hormones de croissance entraîne une maladie appelée le nanisme hypophysaire .

. Les autres exemples sont résumés ci-dessous.

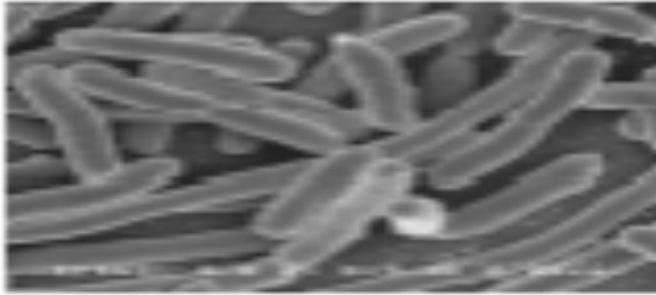
---

Anticoagulants	
Erythropoïétine	CHO
Interférons $\alpha$ , $\beta$ et $\gamma$	
Facteurs VIII et IX de la coagulation	
Antithrombine	
$\alpha$ 1-antitrypsine	
TNF (tumor necrosis factor)	
Insuline	<i>E. coli</i>
EGF (epidermal growth factor)	
G-CSF (granulocyte colony stimulating factor)	
Anticorps	
Interleukine 2	<i>E. coli</i>
Vaccin contre l'hépatite B	
Lipocortine	

---

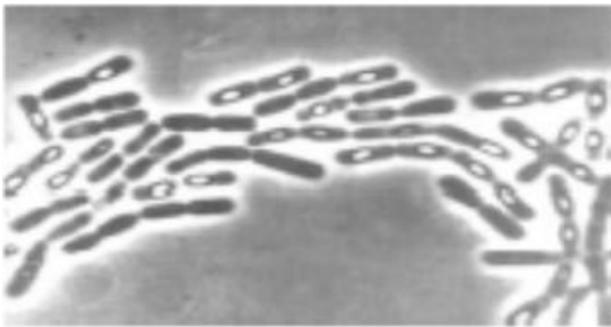
### 2.2.2. Les différents systèmes d'expression :

1) *Escherichia coli* : elle fut et reste encore le premier hôte utilisé pour la fabrication de protéines recombinantes. Exemples de protéines recombinantes produites : hormone de croissance humaine, insuline, interféron  $\alpha$  et interleukine-2..

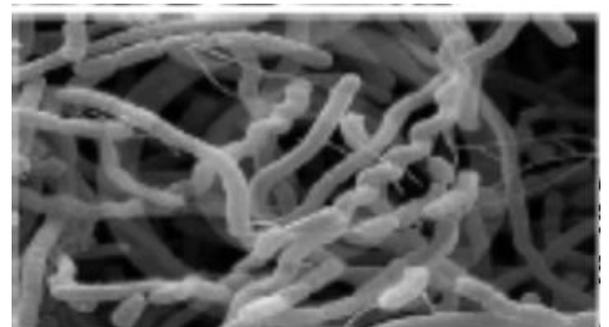


*Escherichia coli*

D'autres bactéries : *Bacillus subtilis*, *Streptomyces*... A leur actif, celles-ci possèdent des capacités de sécrétion supérieures à *E. coli*. Cependant leur génétique est moins connue, et le niveau de production de protéines est inférieur à celui obtenu avec *E. coli*.

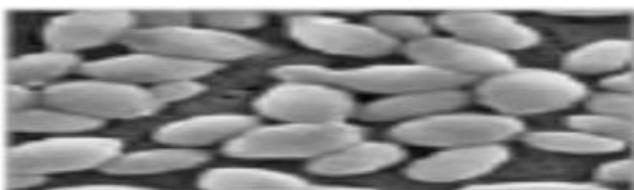


*Bacillus*



*Streptomyces*

2) *Saccharomyces cerevisiae* : il s'agit de la levure de boulanger, utilisée depuis des millénaires dans l'alimentation humaine. Exemples de protéines recombinantes produites : antigène de surface du virus de l'hépatite B, insuline

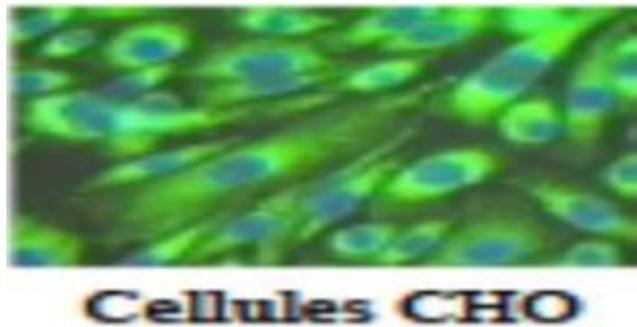


*Saccharomyces cerevisiae*

D'autres levures et champignons filamenteux : *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Hanseluna polymorpha*, *Yarrowia lipolytica*, *Aspergillus niger*.

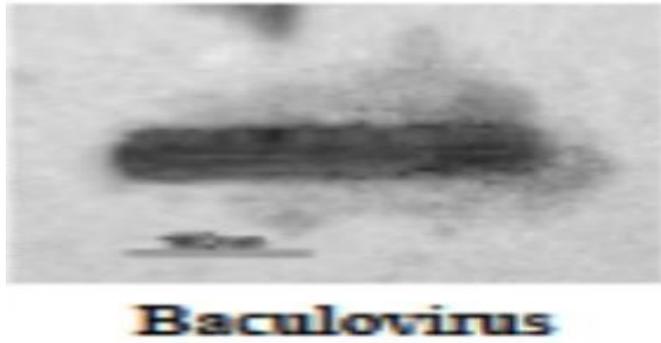


3) Cellules *CHO* (Chinese Hamster Ovary) : exemples de protéines recombinantes produites : antigène du virus de l'hépatite B, hormone de croissance humaine, cytokines,

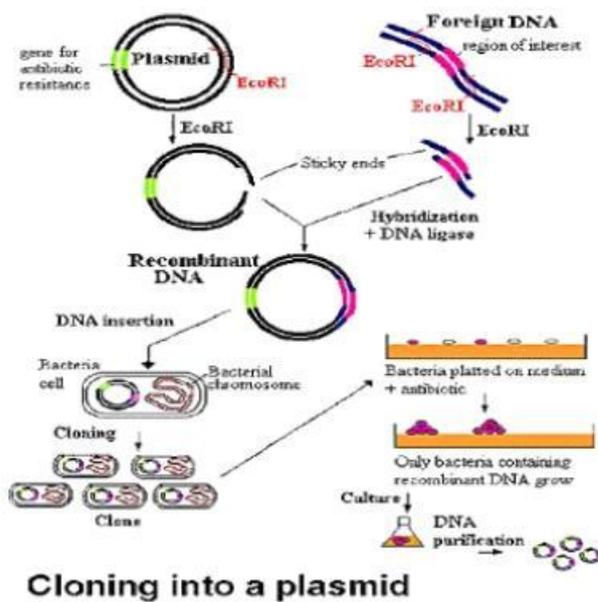


facteurs de coagulation

Des cellules d'insectes (*Spodoptera frugiperda*), utilisant des vecteurs d'expression développés à partir du Baculovirus. Ces cellules sont capables de sécréter la protéine recombinante et d'effectuer les opérations post-traductionnelles. Par ailleurs il est possible également d'utiliser des larves de vers à soie vivants.

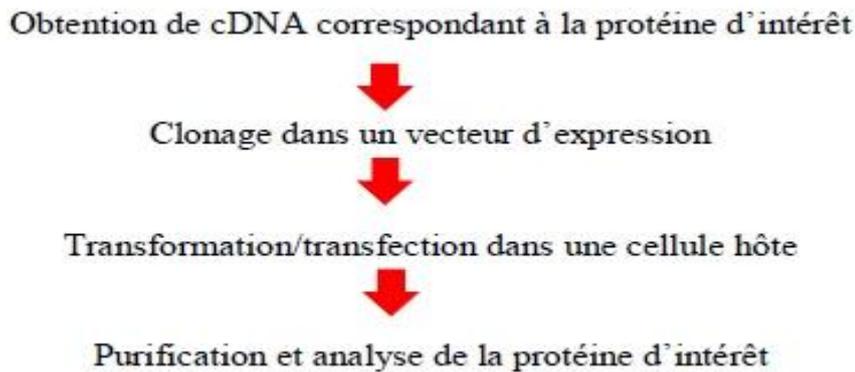


### 2.2.3. Production de protéine recombinante :



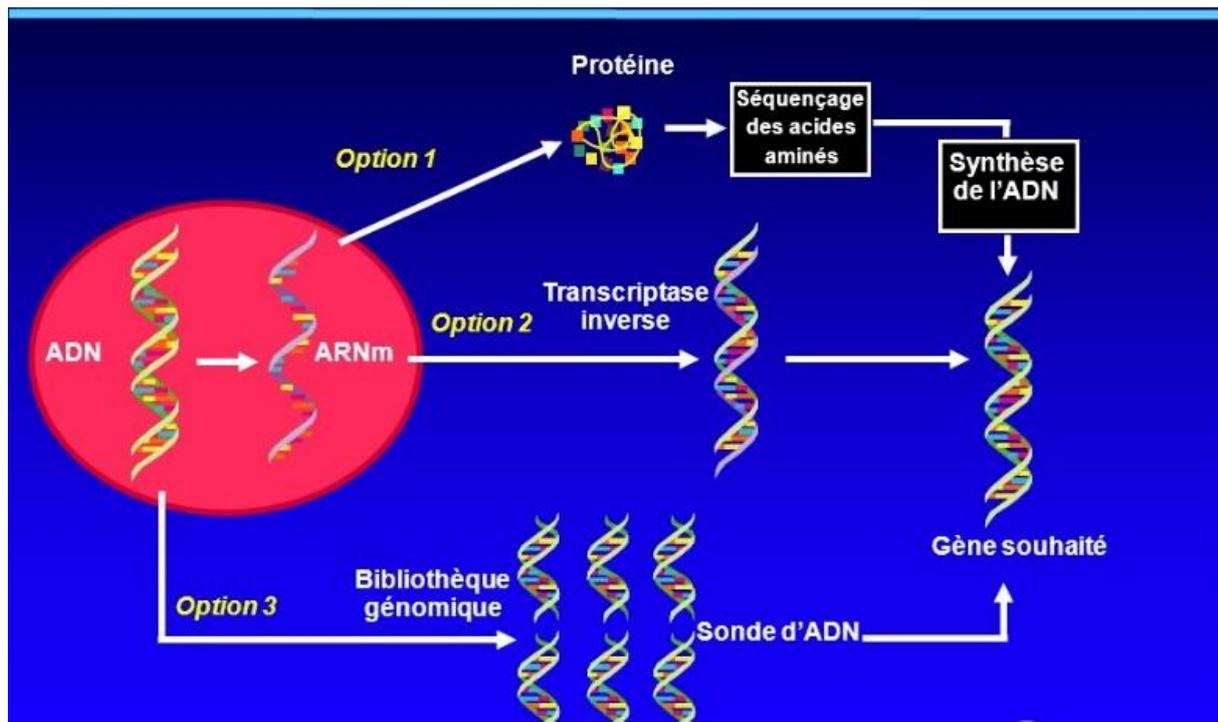
**Figure01 :principe de clonage**

### **2.2.3.1. Étapes d'une production de protéine recombinante :**



#### **A) Obtention du cDNA correspondant à la protéine d'intérêt**

Pour le clonage en vue de l'obtention d'une protéine recombinante on doit utiliser soit l'ADN génomique (l'ADN génomique est obtenu à partir de lignées cellulaires, de tissus ou d'organismes entiers en fonction de la taille de l'organisme. Pour un organisme donné on part de n'importe quel lot de cellules, l'ADN génomique sera le même) et l'amplifier par la PCR ou l'ARNm (si la protéine n'est exprimée que dans certains tissus : on doit récupérer l'ARNm à partir de ces cellules puis la conversion de ARNm en ADN par l'utilisation de la technique de RT-PCR). Comme pour l'ADN génomique, l'ARN est obtenu à partir de lignées cellulaires, de tissus ou d'organismes entiers. Mais chaque type cellulaire exprime un lot donné de gènes donc pour un organisme donné on part d'un lot de cellules ; l'ARN est différent pour chaque type cellulaire.



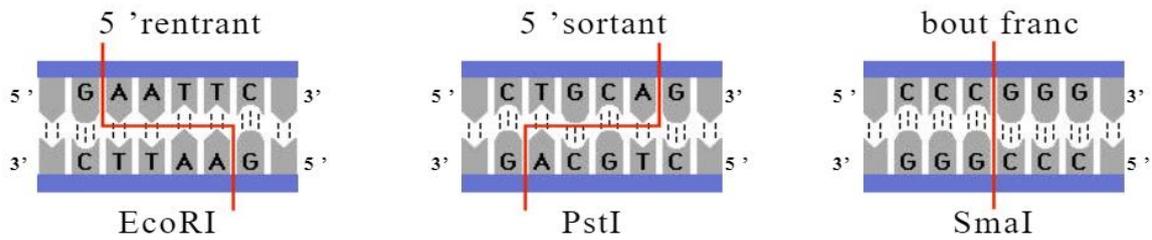
**Figure02** : techniques de l'obtention du cDNA correspondant

### **B) Clonage dans un vecteur d'expression :**

Le cDNA et le vecteur doivent couper par l'utilisation des enzymes de restrictions qui sont des enzymes bactériennes qui reconnaissent des séquences spécifiques sur l'ADN le (cDNA ou le vecteur) de 4 à 8 paires de bases, et qui clivent l'ADN sur les deux brins au niveau de ces sites. Elles coupent l'ADN au niveau des ponts phosphodiester

#### ➤ **Caractéristiques :**

- La plupart des sites sont des séquences inversées répétées (palindromes) cas de *EcoRI* : **5'GAATTC 3' ; 3'CTTAAG 5'**.
- Coupure avec formation de bouts collants ou à bouts francs .



### ➤ *Propriétés des vecteurs de clonage*

- Capables de répllication autonome dans une cellule hôte donnée (origine de répllication de type procaryotique et/ ou eucaryotique).
- Possèdent un polylinker ou site multiple de clonage.
- Supportent l'insertion d'un fragment d'ADN plus ou moins grand.

Type de vecteur	ADN cloné en kb
Plasmide	20
Phage lambda	25
Cosmide	45
Phage P1	100
BAC (bacterial artificial chromosome)	300
YAC (yeast artificial chromosome)	1000

**Tableau01** :différents vecteurs de clonage

- **Ligation (ligature...)** :Une enzyme, la ligase, est capable de lier de façon covalente deux molécules d'ADN en une.

### **C) Transformation/transfection dans une cellule hôte :**

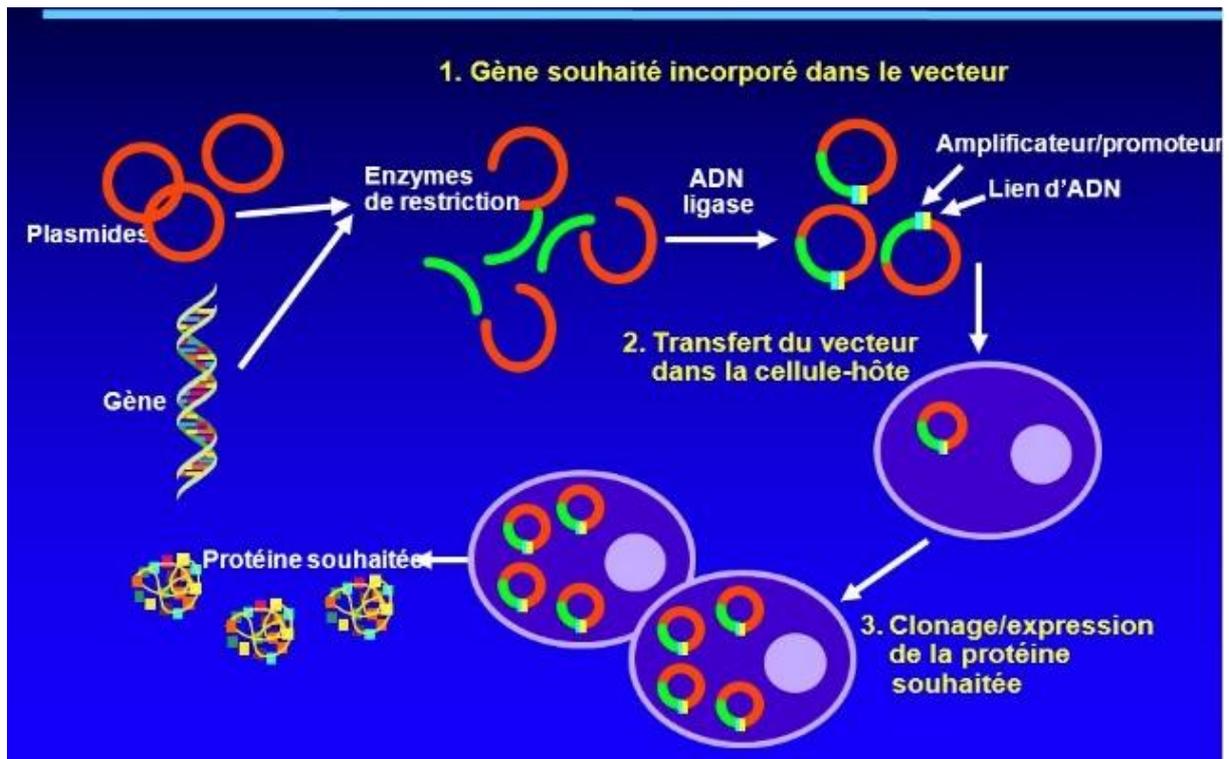
Il existe plusieurs méthodes de transformation/transfection de l'ADN recombinant dans les cellules hôtes :

- Chlorure de calcium et choc thermique
- Électroporation
- Lipofection
- Biolistique
- Infection virale

### **D) Purification de protéine d'intérêt**

Protéine est-elle excrétée par la cellule productrice ?

- Si oui : récupération dans le milieu de culture + purification.
- Si non : il faut casser les cellules.



**Figure03** : la production de protéine recombinante

***TRAVAUX SUR LA SYNTHÈSE DE  
PROTÉINES À INTÉRÊT MÉDICAL PAR  
LES PLANTES***

### **3. La transformation génétique chez les végétaux supérieurs**

#### **3.1. Les différentes techniques de transformation génétique des végétaux**

La transformation génétique chez les végétaux a pour but l'introduction, l'insertion et l'expression de nouveaux caractères (ou la suppression de caractères) dans le génome des cellules végétales par des techniques de recombinaison de l'ADN exogène (Birch, 1997), suivie de la régénération et de la sélection des plantes transformées. Il existe différents types de transfert de gènes : les méthodes dites directes et les indirectes.

##### **3.1.1. Les méthodes de transferts directs**

Les principales techniques de transformation directe sont la biolistique, la microinjection, l'électroporation, et le transfert utilisant le Poly Ethylène Glycol.

La biolistique a été mise au point au départ, pour permettre la transformation génétique de plantes *monocotylédones*, résistantes à l'infection par *Agrobacterium tumefaciens* avant la construction de souches adaptées. Cette technique peut s'appliquer à toutes les espèces végétales.

En biolistique ou bombardement de particules (Sanford, 1988 ; Klein et al., 1992 ; Sanford, 2006), les cellules végétales sont bombardées par des particules de tungstène ou d'or de l'ordre du micromètre de diamètre sur lesquelles l'ADN à transférer est adsorbé. Ces billes seront progressivement ralenties en traversant les différentes couches cellulaires végétales. Quand une de ces billes atteint le noyau, l'ADN porté peut y être introduit, et peut s'intégrer dans le génome de façon aléatoire. Cette technique nécessite l'utilisation d'un appareil capable d'accélérer les particules métalliques ou canon à particules. Suivant les espèces, la période avant d'obtenir une lignée transgénique stable peut varier de quelques jours à plusieurs mois. Cette méthode peut être appliquée à des méristèmes ou des embryons immatures, ce qui évite les problèmes de régénération à partir de cellules ou de tissus. Mais la plante développée étant chimérique, il faut souvent attendre la génération suivante pour sélectionner les descendants transformés. Cette technique est également

utilisée pour effectuer la transformation des génomes des organites, chloroplastes ou mitochondries (Maliga, 2002).

Il est également possible de transférer des organites subcellulaires et de l'ADN grâce à la micro-injection. Le transfert d'ADN dans des protoplastes issus de cellules de mésophylle de *tabac* a permis d'obtenir 14 % de transformant sans avoir recours à la sélection (Crossway et al., 1986).

L'électroporation de protoplastes et de cellules intègres (Fromm et al., 1985) est basée sur la capacité des macromolécules présentes dans le milieu extracellulaire d'être acceptées à l'intérieur de cellules vivantes après un cours choc électrique. Le champ électrique provoque la déstabilisation de la membrane plasmique de la cellule et conduit à l'ouverture des pores membranaires, facilitant ainsi le passage de l'ADN dans le noyau.

La technique de la lipotransfection est également une méthode dite directe. Le but de cette méthode est d'«emprisonner» le gène d'intérêt dans un liposome, c'est-à-dire une structure sphérique constituée de lipides. Ceux-ci ont la capacité de fusionner avec la membrane de protoplastes, ils libèrent ainsi leur contenu (ici le gène d'intérêt) dans le cytoplasme du protoplaste. Cependant, seule une minorité de ces gènes pourront parvenir jusqu'au noyau et s'intégrer par la suite au génome de la cellule, c'est pourquoi cette méthode est peu utilisée (Felgner and Lingold, 1989 ; Zhen et al., 1994 ; Patrick et al., 1999)..

Enfin, la transformation de protoplastes est aussi possible par des méthodes chimiques en présence de *PolyEthylène Glycol* (PEG), qui déstabilise la membrane plasmique des cellules. Elle a été utilisée pour la première fois par Uchimiya et ses collaborateurs pour la transformation de protoplastes de riz (Uchimiya et al., 1986).

### **3.1.2. Les méthodes de transferts indirects**

Les méthodes indirectes utilisent des agents pathogènes tels que les virus (Porta and Lomonosoff, 2002 ; Gleba et al., 2007) ou les bactéries.

Les vecteurs les plus souvent utilisés sont les agrobactéries : *Agrobacterium tumefaciens* (responsable de la galle du collet ou crown gall), et *A. rhizogenes* (responsable

de la prolifération anarchique du chevelu racinaire ou hairy roots). L'utilisation d'*Agrobacterium tumefaciens* présente certains avantages sur les méthodes directes. En effet, le nombre de copies du transgène transféré à la plante est réduit, ce qui diminue le risque potentiel de *co*-suppression (cf 1.2.6.2.6) et d'instabilité du transgène (Hansen et al., 1997). De plus, c'est un système où une cellule unique est transformée, ce qui évite l'obtention de plantes *chimères* comme c'est très souvent le cas en transformation directe (Enriquez-Obregon et al., 1997 ; Enriquez-Obregon et al., 1998). Et enfin, le transgène est souvent inséré dans des régions du génome transcriptionnellement actives.

Seul le système de transformation génétique utilisant *Agrobacterium tumefaciens* sera présenté en détail dans la suite de la synthèse bibliographique.

Les virus phytopathogènes présentent plusieurs avantages. Ils sont capables d'infecter des cellules intactes de plantes et d'y introduire leur acide nucléique. Ensuite, les cellules infectées produisent de grandes quantités de virus, engendrant un niveau d'expression du transgène très élevé. Les infections virales sont souvent systémiques, permettant l'expression rapide du transgène dans toutes les cellules. Finalement, tous les virus de plantes connus ont une répllication épisomique, c'est pourquoi le transgène qu'ils portent n'est pas soumis aux effets de position qui influencent souvent l'expression des transgènes intégrés. Par contre, une transformation stable par infection virale n'est pas possible, ni l'obtention d'une lignée transgénique (Primrose et al., 2004).

Il est cependant possible d'introduire une copie complète de génome viral dans des cellules de plantes isolées ou dans des plantes entières via *Agrobacterium* ou par transfert direct d'ADN. De cette façon, il est possible de générer des lignées de cellules transformées de façon transitoire ou des plantes transgéniques portant un génome viral recombinant intégré. Dans le cas de virus à ARN, la transcription d'une copie d'ADNc intégré dans le génome fournit des ARN viraux compétents pour la répllication, qui seront amplifiés de façon épisomique, et faciliteront un haut niveau d'expression du transgène. Les plantes transgéniques sont infectées de façon persistante par le virus et peuvent produire de grandes quantités de protéines recombinantes. Dans le cas des virus à ADN, la

transformation transitoire ou stable à l'aide d'*Agrobacterium* avec un ADN-T contenant un génome viral partiellement dupliqué peut conduire à la répllication épisomique de génomes intacts (escape répllication). Ce dernier procédé, est mieux connu sous le nom « d'agro-infection » ou « d'agro-inoculation » (Primrose et al., 2004).

### **3.2. Mécanismes de l'infection des plantes dicotylédones par**

#### ***d'Agrobacterium Tumefaciens***

Il s'agit d'un processus naturel réalisé par une bactérie gram négatif du sol de la famille des *rhizobiaceae Agrobacterium tumefaciens*, entraînant la galle du collet (Smith and Townsend, 1907). Cette bactérie a la propriété remarquable de transférer une partie de son ADN dit ADN-T (Matthysse and Stump, 1976 ; Chilton et al., 1977a ; Zupan et al., 2000) dans le génome de cellules végétales. Elle les asservit à ses besoins en leur faisant produire des opines (substrat aminocarboné que seule la bactérie peut cataboliser) en réponse à l'émission de signaux chimiques de la plante hôte blessée (Gelvin, 2006).

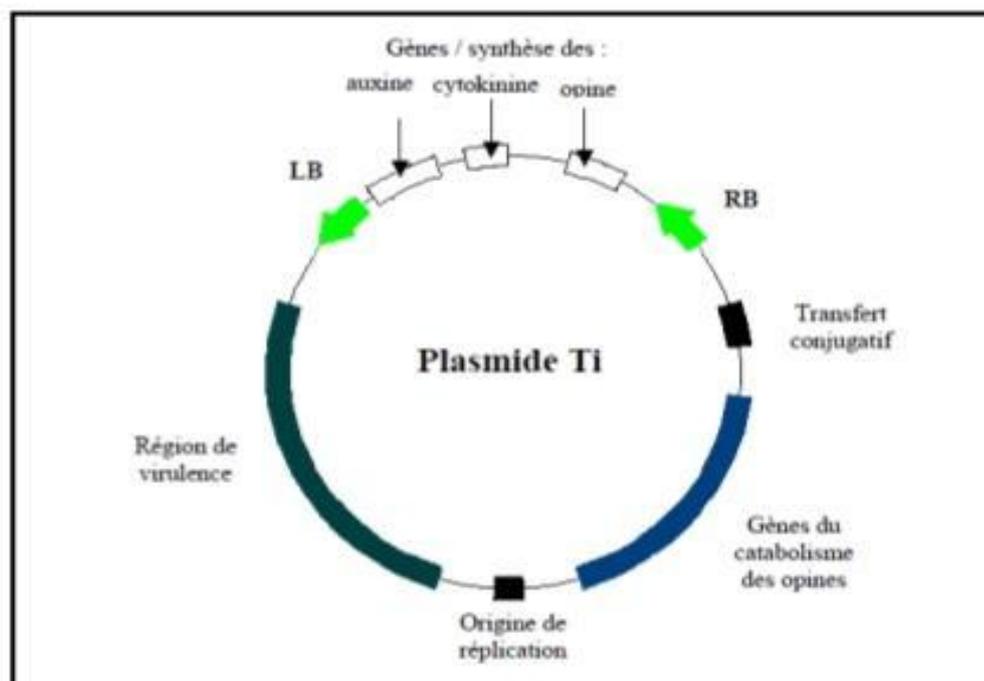
#### **3.2.1. Le plasmide Ti et l'ADN-T**

Les agrobactéries capables d'infecter des cellules végétales possèdent en plus de leur génome chromosomique un plasmide Ti de 200 kb responsable de leur virulence. Si ce plasmide est transféré dans une souche non virulente d'agrobactéries ou de bactéries génétiquement proches telles *Rhizobium trifolii* (qui induit la formation de nodules racinaires), celle-ci devient à son tour capable d'infecter les cellules végétales (Hooykaas et al., 1977). Néanmoins, la seule présence de ce plasmide n'est pas suffisante pour rendre virulente une souche bactérienne comme *Escherichia coli*. Il y a donc des particularités au

sein même du génome d'Agrobacterium tumefaciens qui la rendent capable d'infecter des cellules végétales.

Le plasmide Ti d'Agrobacterium est composé de différents éléments (Figure 04) :

- Un ADN-T (ADN de transfert) flanqué de bordures droite et gauche de 25 pnb en orientation directe. Elles sont appelées RB et LB pour Right et Left Borders.
- Une région de virulence comprenant des gènes vir organisés en 8 opérons permettant le transfert de l'ADN-T à la cellule végétale.
- De gènes servant au transfert de plasmides entre bactéries par conjugaison.
- D'une séquence servant à sa réplication.



- De gènes impliqués dans le catabolisme des opines.

**Figure 04:** Principales régions du plasmide Ti d'Agrobacterium tumefaciens.

L'ADN-T est une séquence d'ADN encadrée par des bordures droite et gauche et constituée de plusieurs types de gènes. Certains d'entre eux sont des oncogènes (onc) codant pour des enzymes impliquées dans la synthèse de phytohormones telles que les auxines (iaaM et iaaH) et les cytokinines (ipt). Ils sont responsables de la formation de

tumeurs chez la plante infectée (Hooykaas and Schilperoort, 1992). D'autres gènes codent pour la synthèse d'opines. Ces composés, produits par la condensation d'acides aminés et de sucres, sont synthétisés et excrétés par les cellules tumorales végétales et sont des sources de carbone et d'azote pour *Agrobacterium tumefaciens*. Le type d'opines présent dans la tumeur dépend de la souche d'agrobactérie infectante (Dessaux et al., 1993) (La nature des opines produites a d'ailleurs permis une classification des bactéries (souches à nopaline, octopine, agropine succinamopine...)).

La région vir du plasmide Ti est un régulon de 30 kb composé de 8 opérons. Certains sont essentiels au transfert de l'ADN-T (*virA*, *virB*, *virD*, *virG*, *virF*), d'autres augmentent l'efficacité du transfert (*virC* et *virE*) (Hooykaas and Schilperoort, 1992 ; Zupan and Zambryski, 1995), et enfin, le dernier est de moindre importance (*vir H*) (De La Riva et al., 1998). Chacun de ces opérons est constitué de un ou plusieurs gènes : 1 gène pour *virA* et *virG*, 2 pour *virC* et *virE*, 5 pour *virD* et 11 gènes pour *virB*.

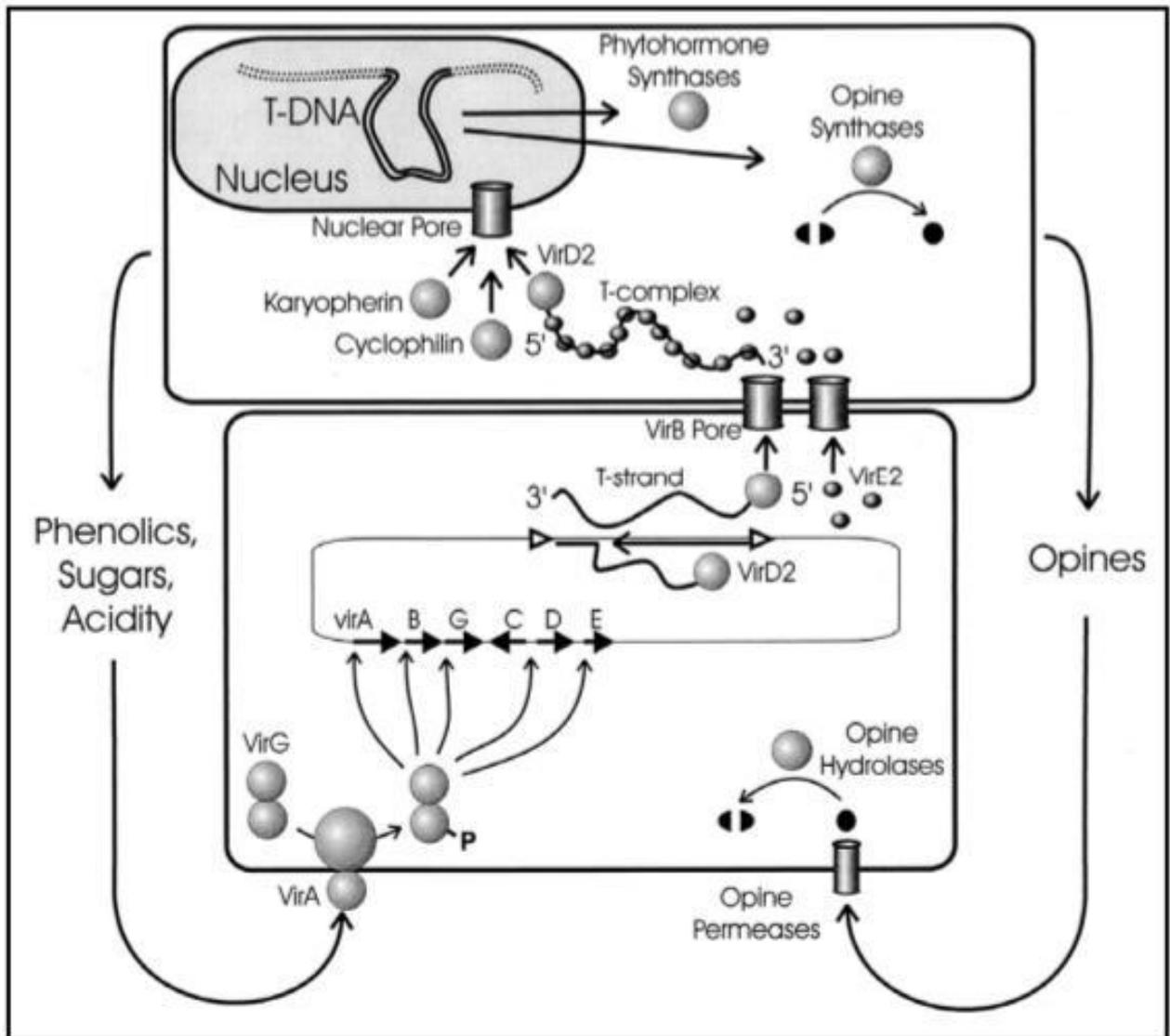
### **3.2.2. Induction du système de virulence de la bactérie**

#### ***Principe général :***

Le transfert de gènes d'*Agrobacterium tumefaciens* à la plante nécessite un grand nombre d'étapes distinctes et essentielles. Tout d'abord, la plante doit être blessée pour induire la reconnaissance plante-bactérie. Les composés que synthétise la plante blessée activent le système de virulence de la bactérie et induisent son attachement à la cellule végétale (Stachel et al., 1985). L'ADN-T est ensuite transféré puis transcrit dans les cellules de la plante avant même d'être intégré dans le génome. On parle d'expression transitoire. Après son intégration, le niveau d'expression de l'ADN-T est en partie déterminé par son site d'insertion dans le génome végétal. Les cellules de la plante se multiplient et forment des tumeurs grâce à la synthèse continue d'auxines et de *cytokinines*. Les cellules végétales transformées continuent à synthétiser des opines qui sont des sources de carbone et d'azote métabolisables par *Agrobacterium tumefaciens* (Klapwijk et al., 1978). Elles favorisent, de ce fait, la multiplication des agrobactéries.

Le transfert de l'ADN-T fait intervenir à la fois des gènes portés par la région vir du plasmide Ti et des gènes chromosomiques de la bactérie (Doty et al., 1993).

Les rôles des gènes d'origine chromosomique sont très divers : certains interviennent dans l'attachement d'*Agrobacterium* aux parois des cellules végétales. C'est le cas des loci *chvA* et *chvB*, qui sont impliqués dans la synthèse et l'excrétion de  $\beta$ -1,2 glucane (Cangelosi et al., 1989). Les loci *cel*, *pscA* (*exoC* chez *Rhizobium*), *att*, servent à l'adhésion de la bactérie aux cellules végétales. En effet, *Cel* permet la synthèse des fibrilles de cellulose (Matthysse, 1983), *pscA* intervient dans la synthèse de glucanes cycliques et d'acides succinoglycane (Cangelosi et al., 1987), et enfin *att* code pour une protéine de la surface cellulaire (Matthysse, 1987 ; Matthysse et al., 2000). Le locus *chvE* intervient comme régulateur (en association avec *VirA*) des gènes de la région de virulence du plasmide (De La Riva et al., 1998). La reconnaissance des composés phénoliques (Bolton et al., 1986 ; Kumar and Rajam, 2005) (telle que l'acétosyringone) par le complexe protéique transmembranaire formé de *chvE* et *virA* (la seule protéine vir exprimée constitutivement) et l'acidité du milieu extérieur (pH 5,0 à 5,5) entraînent une autophosphorylation de la protéine *virA* (Johnson and Das, 1998). *VirA* est capable de phosphoryler à son tour la protéine cytoplasmique *virG* (Jin et al., 1990), qui active et régule la transcription de l'ensemble des gènes vir (Stachel and Zambryski, 1986) dont les 11 gènes de l'opéron *virB* impliqués dans la synthèse et l'assemblage du T-pilus (Fullner et al., 1996 ; Lai and Kado, 1998 ; Lai and Kado, 2002)



**Figure 05 : Mécanismes et principaux gènes impliqués dans le transfert de l'ADN-T dans les cellules végétales :** La plante blessée émet des composés phénoliques et des sucres qui sont perçus grâce au complexe virA/virG. Leur phosphorylation déclenche l'activation des gènes de virulence d'*Agrobacterium tumefaciens*. L'attachement de la bactérie à la surface de la cellule végétale se fait grâce à ses gènes chromosomiques. Une copie simple brin de l'ADN-T est synthétisée grâce au complexe virD1/virD2, puis, elle est conduite dans la cellule végétale grâce aux protéines virD2. Les protéines virB établissent un canal entre la cellule bactérienne et la cellule végétale. Le complexe T formé de l'ADN-T et des protéines virD2 (en 5' de l'ADN-T) et virE2 (le long de la séquence) entre dans la cellule végétale, où VIP1 facilite leur migration dans le cytoplasme. Puis, il se dirige vers le noyau de la cellule végétale et l'ADN-T s'intègre dans le génome (Zhu et al., 2000).

### 3.2.3. Le transfert de gènes d'*Agrobacterium tumefaciens* à la plante

Il s'ensuit une cascade d'événements qui aboutit au transfert de l'ADN-T bactérien dans le génome de la plante.

La seule condition sine qua non au transfert des gènes de l'ADN-T d'Agrobacterium aux cellules végétales est l'intégralité de la séquence des bordures et en particulier de la bordure droite. Elle est essentielle au transfert de l'ADN dans la plante, suggérant qu'il s'initie au niveau de la bordure droite RB et se poursuit vers la bordure gauche LB (Miranda et al., 1992) (Figure 05).

L'initiation du transfert commence quand le complexe virD1/virD2 reconnaît les séquences des bordures droite et gauche de l'ADN-T, les clivent à une distance de 4 nucléotides de leur extrémité gauche et déclenche la synthèse d'un ADN-T simple brin (Scheiffele et al., 1995). L'initiation de cette copie est possible à partir des 2 bordures. Cependant, la fixation de virC1 sur la séquence over-drive, à proximité de RB, stimule la synthèse du simple brin d'ADN-T à partir de RB vers LB. VirD2 permet le clivage de l'ADN-T au niveau des 2 bords et détermine donc la séquence d'ADN-T qui sera intégrée (Yanofsky et al., 1986). La protéine virD2 y reste alors fixée de manière covalente en 5' le protégeant des exonucléases (Durrenberger et al., 1989) et le guidant vers le noyau de la cellule végétale (Durrenberger et al., 1989 ; Pansegrau et al., 1993).

Le transfert de l'ADN simple brin (Yusibov et al., 1994) nu est guidé par la protéine virD2 vers la cellule végétale. Les protéines VirE2 migrent séparément vers la cellule végétale puis elles se fixent au complexe ADN-virD2 (Sundberg et al., 1996) pour former le complexe T (Howard and Citovsky, 1990) dans le cytoplasme de la cellule végétale (Zhu et al., 2000). Elles protègent le simple brin d'ADN de la dégradation des nucléases dans la cellule végétale (Christie et al., 1988 ; Gelvin, 1998).

Le transfert de l'ADN-T vers la cellule végétale se fait au travers d'un canal composé de sous-unités virB. Le canal ressemble à un pilus observé lors d'une conjugaison bactérienne (Fullner et al., 1996). Une fois dans la cellule végétale, les récepteurs cytoplasmiques de la plante se fixent aux signaux de localisation nucléaires (NLS) présents sur les protéines virD2 et virE2, et permettent le transfert de l'ADN-T vers le noyau végétal (Citovsky et al., 1992 ; Citovsky et al., 1997).

Peu de gènes végétaux ont été identifiés comme ayant un rôle dans le transfert de l'ADN-T. Le plus étudié est le gène vip1. La protéine VIP1 intervient dans le transport du

complexe-T du cytoplasme de la cellule végétale vers le noyau, en se fixant à virE2 (Tzfira et al., 2001 ; Ward et al., 2002 ; Dafny-Yelin et al., 2008).

### **3.2.4. L'intégration de l'ADN-T dans les cellules végétales**

L'insertion de l'ADN-T se fait au hasard et sous forme de recombinaison illégitime (Mayerhofer et al., 1991) dans le génome végétal. Stabilisé, il est ensuite transmis classiquement par division cellulaire aux cellules filles (Zhu et al., 2000). Les gènes de l'ADN-T seront exprimés et permettront la synthèse d'auxines, de cytokinines (responsables de la tumeur végétale), et d'opines. La bactérie détourne ainsi la machinerie biosynthétique de la plante à son profit.

L'intégration de l'ADN-T se fait aléatoirement mais de préférence dans les régions transcriptionnellement actives du génome de la plante (Feldmann and Marks, 1987). Plusieurs ADN-T peuvent être transférés dans la même cellule par des bactéries différentes et il arrive souvent que les ADN-T co-transférés s'intègrent au même endroit dans le génome cellulaire. Ceci suggère l'existence de « points chauds » favorables à l'intégration de l'ADN-T (De Block and Debrouwer, 1991). Ces hot spots pourraient être des endroits où l'ADN génomique est endommagé et où seraient présentes les enzymes nécessaires à sa réparation.

L'insertion de l'ADN-T dans le génome végétal se fait par recombinaison illégitime. En effet, la comparaison de séquence d'ADN génomique avant et après insertion de l'ADN-T montre que les homologies de séquences ne sont pas nécessairement très grandes (Hooykaas and Schilperoort, 1992 ; Tinland, 1996).

Le modèle proposé par Tinland (1996) tient compte de ces éléments. L'association de l'ADN-T et de l'ADN de la cellule hôte se ferait en 3' de l'ADN-T au niveau d'une courte séquence homologue. L'ADN végétal simple brin déplacé serait alors la cible d'activités endonucléasiques expliquant la délétion de quelques nucléotides dans la séquence finale autour du site d'insertion (13-73 pb) de l'ADN-T (Hooykaas and Schilperoort, 1992). Il s'avère que le côté gauche de l'ADN-T (en 3' du simple brin) est peu conservé et a une courte région

homologue avec le site de pré-insertion (au moins 5 nucléotides consécutifs). Une partie de cette extrémité de l'ADN-T serait digérée afin qu'il y ait un meilleur appariement avec l'ADN végétal. La partie 5' de l'ADN-T liée à virD2 se fixerait au brin d'ADN végétal complémentaire au niveau d'une « micro-homologie » (souvent, seulement un nucléotide).

Les extrémités de l'ADN-T sont ainsi liées à l'ADN. Une digestion du brin supérieur de l'ADN, suivie d'une réparation et d'une réplication de l'ADN-T permet d'obtenir un double brin d'ADN comprenant la séquence d'ADN-T. Ce modèle indique donc que l'intégration de l'ADN-T se fait à l'état de simple brin (Tinland et al., 1994).

Il a été montré que l'ADN-T est parfois rejeté du génome-hôte, en y laissant quelques empreintes de son intégration passée (Marton et al., 1994). Cette instabilité semble cependant être limitée au processus d'intégration, puisqu'une fois intégrée dans le génome des plantes, l'ADN-T réagit comme l'ADN hôte et est transféré dans la descendance (Tinland, 1996).

### ***3.3. Utilisation de la souche *Agrobacterium tumefaciens* pour la transformation génétique des plantes***

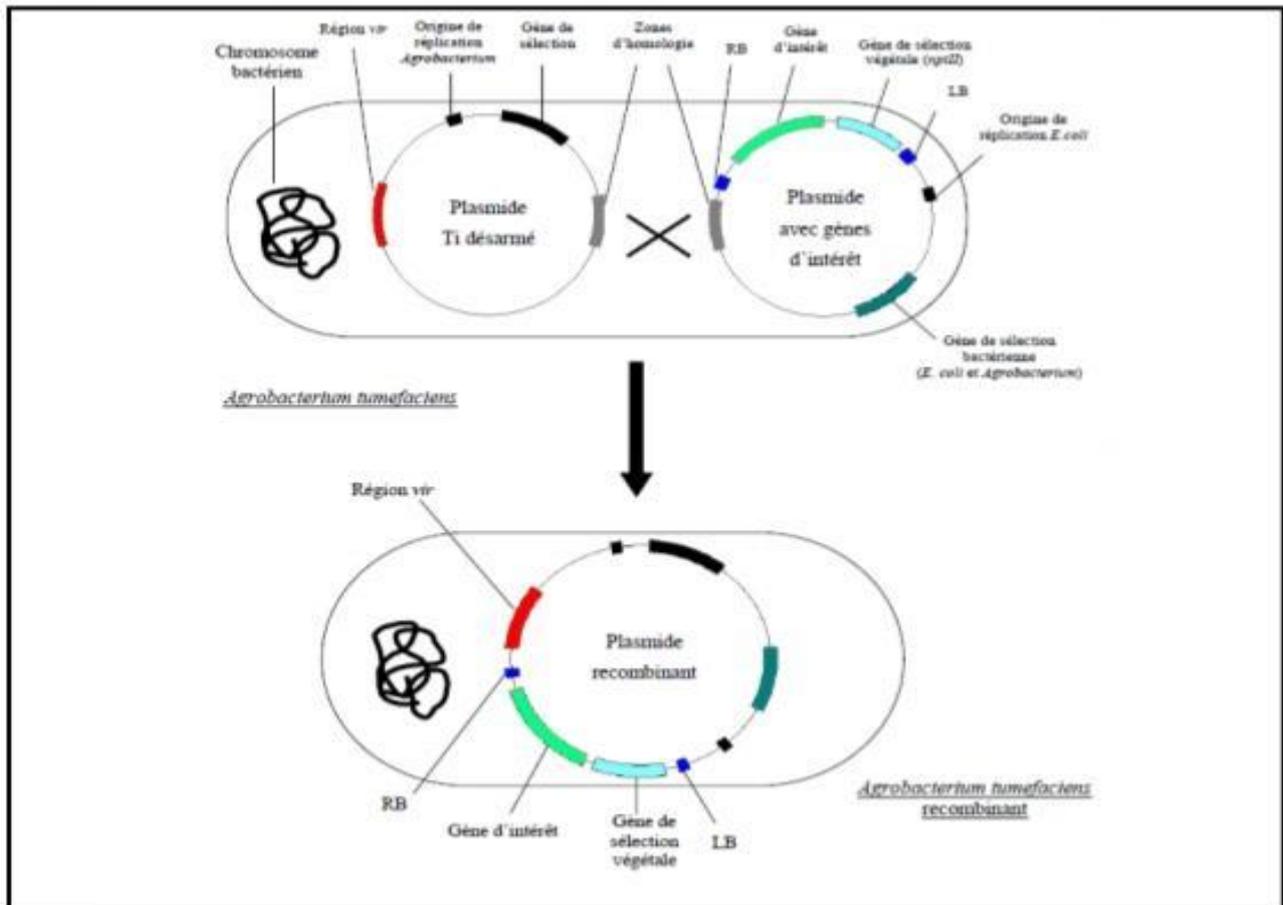
*Agrobacterium tumefaciens* est devenu un outil permettant la transformation génétique de végétaux avant même que les mécanismes moléculaires permettant ce transfert d'information génétique ne soient totalement connus (Chilton et al., 1977b ; Hernalsteens et al., 1980).

Le fait qu'aucun des gènes de l'ADN-T ne soit nécessaire à son transfert dans les cellules végétales a ouvert de grandes perspectives. Il est possible de remplacer ces gènes par des gènes d'intérêt sous contrôle de promoteurs (constitutifs ou non) et de maintenir le processus de transformation génétique, tout en enlevant les effets tumorigènes indésirables. Un plasmide Ti dont la partie oncogène a été éliminée est un plasmide Ti désarmé.

Afin d'utiliser *Agrobacterium tumefaciens* comme vecteur pour la transformation génétique des végétaux, différents systèmes ont été mis en place pour modifier l'ADN-T et y insérer des gènes d'intérêt. La taille des séquences d'ADN transférables sans modification peut atteindre 150 Kb grâce au vecteur binary-BAC (Hamilton et al., 1996). La construction de plasmides Ti synthétiques dans *E. coli*, beaucoup plus petits (environ 10 Kb) que le plasmide d'origine tel qu'il était lors de sa découverte (150 Kb) est un des grands avantages de cette technique. Deux systèmes de transformation ont été développés : le système de *co*-intégration et le système binaire.

### **3.3.1. Le système de *co*-intégration**

Le système de *co*-intégration est basé sur la recombinaison de deux plasmides, et le but est d'obtenir un plasmide comportant à la fois la région vir et l'ADN-T. La première construction (transgène + marqueur de sélection) est clonée dans un petit plasmide chez *Escherichia coli*. Ce plasmide est introduit par conjugaison ou électroporation dans *Agrobacterium tumefaciens* qui renferme le plasmide contenant les gènes vir. Les deux Plasmides se recombinent grâce à une région homologue pour former le plasmide final (Zambryski et al., 1983 ; Deblaere et al., 1985). C'est pourquoi pour cette méthode, on parle de vecteur *co*-intégré. Diverses constructions sont possibles. Une d'entre elles est décrite (Figure 06). Elle correspond au cas où le gène d'intérêt lié au marqueur de sélection végétale est cloné dans un petit plasmide entre les deux bordures LB et RB, le marqueur de clonage et la séquence homologue étant en dehors de cette zone. Il y a alors insertion du gène d'intérêt et des marqueurs de sélection.



**Figure 06 : Représentation schématique du système de co-intégration.** Le plasmide qui contient la région vir est maintenu dans *Agrobacterium tumefaciens*. Le plasmide qui comporte l'ADN-T (gène de sélection végétale et gène d'intérêt) est introduit dans *Agrobacterium* soit par électroporation, soit par conjugaison bactérienne via *E. Coli*. L'ADN-T s'intègre dans le plasmide Ti par recombinaison homologue : les régions vir et l'ADN-T sont sur le même plasmide. L'agrobactérie recombinante ainsi obtenue peut alors être utilisée pour transformer génétiquement des cellules végétales.

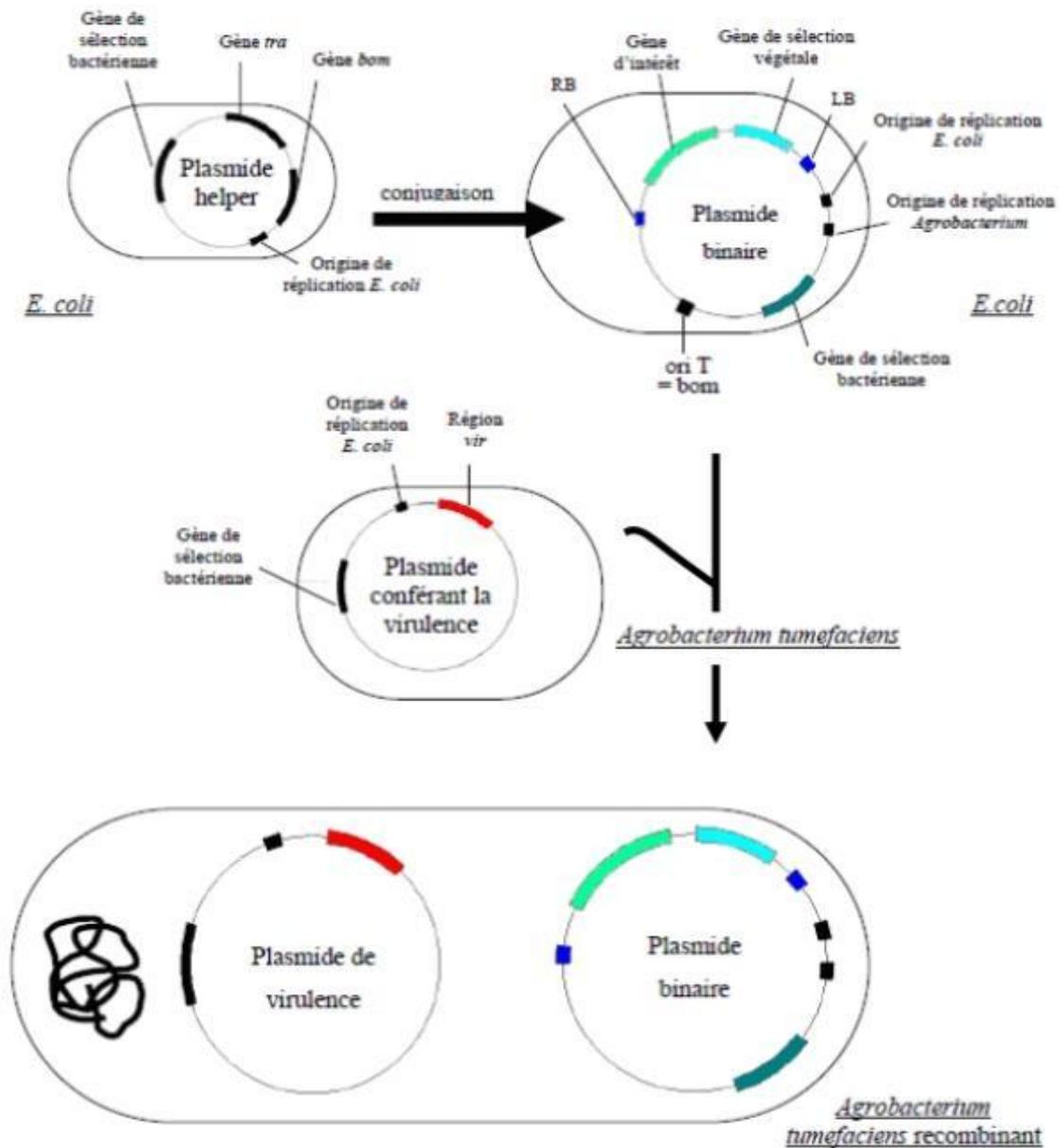
### 3.3.2. Le système binaire

Une autre étape a été franchie lors de la séparation des gènes vir et de l'ADN-T sur deux plasmides différents. En effet, à l'état naturel, les gènes vir et l'ADN-T sont situés sur le même plasmide, mais leur action est aussi possible en Trans (non lié aux autres éléments) c'est-à-dire quand ils sont sur deux plasmides différents (Bevan, 1984). Le plasmide de petite taille portant le gène d'intérêt et le marqueur de sélection entre les bordures droites et gauche, une origine de répllication fonctionnelle dans *Agrobacterium* et le gène de sélection bactérienne en dehors des bordures, est tout d'abord construit dans *E. coli* (figure 07). Ce

Plasmide dit « binaire » par référence à la méthode utilisée est donc capable de se répliquer à la fois dans *E. coli* et dans *Agrobacterium* (Hoekema et al., 1983).

Il est ensuite introduit par conjugaison bactérienne dans *Agrobacterium tumefaciens* qui renferme déjà un plasmide (dit « assistant ») avec une région vir et l'origine de répllication du plasmide Ti. Il n'y a cette fois pas de recombinaison entre eux. Un troisième plasmide dit « helper » qui ne peut pas se répliquer chez *Agrobacterium* est également utilisé pour augmenter le taux de transfert par l'action de ses protéines tra et mob (pour Transfer et Mobilisation), codées respectivement par les gènes tra et mob, dans le cadre d'une conjugaison triparentale.

Depuis le développement de cette technique, de nombreux vecteurs binaires ont été construits (Hellens et al., 2000b) et ont été améliorés du point de vue de leur flexibilité, (permettant leur utilisation sur un grand nombre d'espèce végétale), et de leur format facilitant la manipulation de gène in vitro (exemples : pGreen0029 (Hellens et al., 2000a), pBin20 (Hennegan and Danna, 1998), pZP111(Hajdukiewicz et al., 1994), pJJ1881 (Jones et al., 1992), pCGN1547 (McBride and Summerfelt, 1990), pBIN19 (Bevan, 1984)...).



**Figure 07 : Représentation schématique du système binaire après conjugaison triparentale.** Le plasmide de virulence est maintenu dans *Agrobacterium tumefaciens*. Le plasmide binaire, qui contient l'ADN-T, est introduit dans *Agrobacterium tumefaciens* par électroporation ou par conjugaison bactérienne (cas schématisé). En général, on utilise un plasmide « helper », pour améliorer le transfert du plasmide binaire d'*E. coli* vers *A. tumefaciens* grâce à ses gènes *tra* et *mob*. C'est une conjugaison triparentale. Le plasmide « helper » ne possède pas d'origine de répllication d'*A. tumefaciens*, il est éliminé au cours des divisions successives. La présence des gènes *vir* va permettre le transfert de l'ADN-T (gène de résistance et gène de sélection) dans les cellules végétales.

### 3.3.3. Les gènes de sélection

Le taux de transformation génétique des plantes est en général très faible, c'est pourquoi des marqueurs de sélection sont utilisés. Les gènes de sélection couramment utilisés dans le cadre de la transformation génétique de plantes codent pour des protéines qui métabolisent l'agent sélectif et le rendent ainsi moins cytotoxique. On parle de sélection négative, car seuls les transformants vont survivre (Bevan et al., 1983 ; Herrera-Estrella et al., 1983). Toutefois, certaines cellules non transformées présentent une résistance intrinsèque à l'agent sélectif et se multiplient comme les cellules véritablement transformées : c'est le phénomène d'échappement.

Le type de sélection utilisé lors d'une transformation génétique doit être choisi en fonction de la plante pour laquelle on veut obtenir des transformants et du matériel végétal utilisé. En effet, certaines plantes peuvent s'avérer extrêmement résistantes à certains composés habituellement utilisés comme agent de sélection (McLaughlin and Ahmad, 1984).

Les gènes de sélection négative couramment utilisés en transformation génétique confèrent une résistance soit aux antibiotiques, soit aux herbicides. Par exemple :

- Le gène *nptII* isolé du transposon Tn5 d'*E. coli*, code pour la néomycine phosphotransférase II et confère la résistance à la *kanamycine* ou à la néomycine (aminosides) (Fraley et al., 1983).
- Le gène *hpt* isolé d'*E. coli* code pour l'hygromycine B phosphotransférase et confère la résistance à l'hygromycine et la généticine G418 (aminosides) (Waldron et al., 1985 ; Wagner et al., 1997).
- Le gène *bar* isolé de *Streptomyces hygroscopicus*, code pour la phosphinotricine acétyltransférase ou PAT et confère la résistance à des herbicides appelés phosphinotricine glycosinate ou PPT (principe actif de l'herbicide BASTA®) qui est un inhibiteur de la glutamine synthétase (De Block et al., 1987 ; Thompson et al., 1987).

Il existe d'autres gènes de sélection, peu utilisés dans les techniques de transformation génétique de plantes, mais dont l'utilisation semble prometteuse. Ils

permettent de sélectionner les plantes transformées sans tuer celles qui ne le sont pas. La sélection positive est basée sur l'état auxotrophique de la plupart des espèces végétales cultivées *in vitro*. En effet, il leur est impossible de se développer sans l'ajout de plusieurs substances (hormones, sucres). Cet aspect a été exploité pour mettre au point de nouveaux systèmes de sélection basés sur la complémentarité. L'insertion d'un gène dans les cellules leur permet de produire une substance essentielle à leur croissance, elles peuvent alors se développer sur un milieu non supplémenté contrairement à celles n'ayant pas reçu ce gène (Wenck and Hansen, 2005).

Ces gènes de sélection positive codent pour des enzymes de conversion d'un sucre non-métabolisable (mannose, xylose) présent dans le milieu en une source carbonée utilisable.

A titre d'exemple :

- Le gène *pmi* isolé d'*E. coli* code la phosphomannose isomérase qui permet la conversion du mannose-6-phosphate en fructose-6-phosphate qui est un sucre métabolisable (Joersbo et al., 1998 ; Lucca et al., 2001 ; Zhengquan et al., 2004).
- Le gène *xylA* isolé de *Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes* code pour la xylose isomérase qui permet la conversion du xylose en xylulose qui est alors métabolisé dans la voie des pentoses phosphate (Haldrup et al., 1998 ; Haldrup et al., 2001).
- Le gène *dogR1* code pour la 2-déoxyglucose-6-phosphate phosphatase (2-DOG-6-P), et est utilisé pour la sélection positive de plants de *tabac* et de pomme de terre (Kunze et al., 2001). C'est un gène isolé à partir de la levure, conférant une résistance au 2-déoxyglucose (2-DOG) lorsqu'il est exprimé dans les plantes transgéniques.

Comparée à la sélection négative, de meilleurs taux de transformation sont obtenus. Cette technique provoque moins de nécrose des explants et facilite l'apparition de tiges feuillées transgéniques. En effet, dans la sélection négative, certaines des cellules transformées, étant entourées de cellules nécrosées, ne peuvent pas se multiplier. Les gènes de sélection positive offrent également l'avantage d'éviter la dissémination potentielle de

gènes de résistance à des antibiotiques ou d'herbicides (Aragalfo and Brasileiro, 2002 ; Wenck and Hansen, 2005 ; Darbani et al., 2007).

### **3.3.4. Les gènes rapporteurs**

Un gène rapporteur est un gène-témoin codant pour une protéine d'activité connue et détectable, utilisée souvent pour localiser l'expression d'un gène.

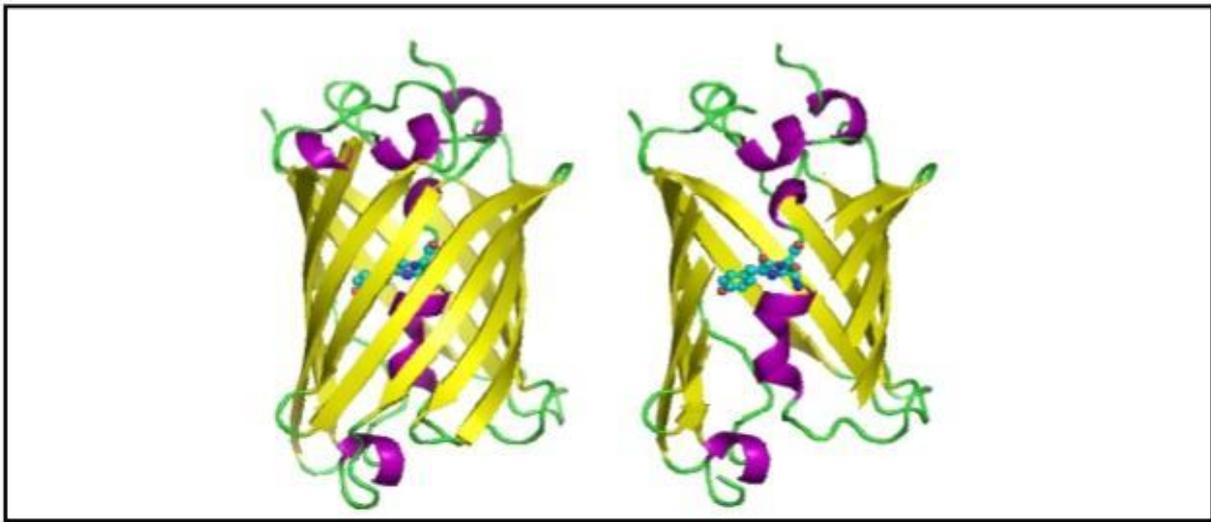
Son activité se traduit par une modification d'un caractère visible de la plante dans des conditions particulières (présence d'un substrat, pH, UV). Cela permet notamment l'étude de promoteurs.

Tout comme le gène de sélection, le choix du gène rapporteur doit se faire en fonction de la nature du matériel végétal. En effet, certaines plantes ont des activités endogènes qui sont capables de masquer l'expression d'un gène rapporteur. Citons quelques exemples :

Le gène lacZ code pour une enzyme ayant une activité  $\beta$ -galactosidase. L'expression de ce gène est facilement mise en évidence par l'apparition de composés colorés après ajout de substrats tels que l'ONPG (O-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) ou le X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside). Néanmoins, l'existence d'activité  $\beta$ -galactosidase endogène chez bon nombre de plantes rend le gène rapporteur peu utilisé (Matsumoto et al., 1988).

Le gène GUS ou uid A, isolé à partir d'*Escherichia coli*, code pour l'enzyme ayant une activité  $\beta$ -glucuronidase capable d'hydrolyser certains composés glucuroniques. Cette enzyme, en présence du substrat X-Gluc (acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronide) conduit à l'apparition d'un produit de couleur bleue (Jefferson, 1987). La  $\beta$ -glucuronidase libère de l'umbelliférone à partir de dérivés umbelliferyl comme le MUG (4-méthylumbelliféryl  $\beta$ -D-Glucuronide) et permet la mesure de l'activité enzymatique par fluorimétrie (Jefferson et al., 1987).

Le gène GFP code pour la Green Fluorescent Protein (protéine verte fluorescente). Cette protéine de 27 kDa a été isolée de la méduse *Aequora victoria*. Elle devient verte fluorescente quand elle est excitée par des ultraviolets ou de la lumière bleue (Haseloff and Amos, 1995 ; Hu and Cheng, 1995 ; Baulcombe et al., 1998). La protéine est constituée de 11 feuillets  $\beta$  disposés en parallèle, d'une hélice  $\alpha$  qui contient le chromophore (Figure 8). Les 11 feuillets  $\beta$  forment une cage dans laquelle est emprisonné le chromophore. Cette forme surprenante de la GFP est appelée forme «  $\beta$ -can».



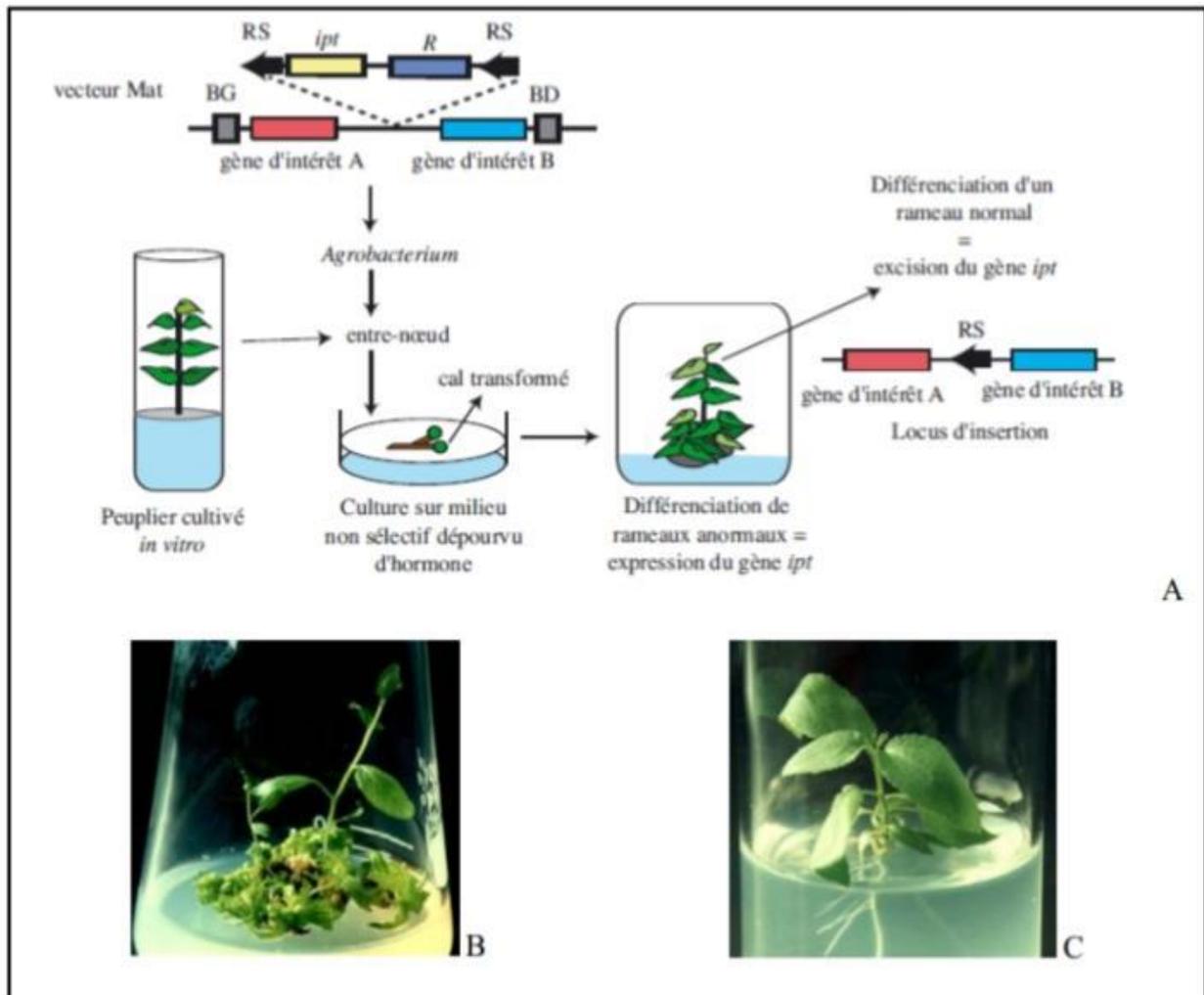
**Figure 08 : Structure 3D de la protéine GFP** (en coupe à droite enfin de bien visualiser le centre de la cage) : En jaune : les feuillets  $\beta$ , en violet : l'hélice  $\alpha$ , au centre : le chromophore.

Son utilisation comporte de nombreux avantages parce qu'elle ne nécessite pas l'addition de substrat, ni de co-facteur, et surtout parce qu'elle ne nécessite pas la destruction de l'échantillon étudié. Ceci permet notamment un suivi des variations de son expression au sein des mêmes tissus au cours du temps (Sheen et al., 1995). Des protéines GFPs modifiées ont été créées avec un coefficient de fluorescence plus grand, de meilleures expressions chez les *eucaryotes* ou des propriétés d'absorption altérées (Heim and Tsien, 1996 ; Reichel et al., 1996). La forme m-GFP5-ER ( $\lambda$  d'absorption 395 et 473,  $\lambda$  d'émission de 507 nm) a subi plusieurs modifications pour améliorer son expression dans les plantes transgéniques (Siemering et al., 1996 ; Harper and Neal Stewart, 2000). Un intron empêchant son expression chez *Arabidopsis* (Haseloff et al., 1997) et chez le *tabac* (Reichel et al., 1996) a été éliminé de la séquence de m-GFP-5ER. Elle est adressée dans le réticulum endoplasmique par la fusion d'une séquence *chitinase d'Arabidopsis* à l'extrémité N terminal et par la fusion d'une séquence polypeptidique His-Asp-Glu-Leu à l'extrémité C terminal

(Haseloff et al., 1997). Elle comporte 3 mutations donnant à cette GFP de nouvelles propriétés : le suivi possible de la protéine à haute température, et des maxima d'excitation identiques atteints dans le bleu ou dans l'ultraviolet (Siemering et al., 1996).

De nombreuses autres protéines fluorescentes semblables à la GFP mais n'émettant pas aux mêmes longueurs d'ondes, sont utilisées comme gène rapporteur, par exemple : la YFP Yellow Fluorescent Protein et la dsRed (Jach et al., 2006 ; Berg et al., 2008).

D'autres gènes engendrent une modification morphologique des plantes transformées par l'expression d'enzymes liées à la synthèse d'hormones. Par exemple, le gène *ipt* codant pour l'isopentenyl transférase, isolé de l'ADN-T du plasmide Ti d'*Agrobacterium Tumefaciens*, catalyse la condensation de l'isopentenyl pyrophosphate avec l'AMP pour produire l'isopentenyl AMP, un précurseur de plusieurs cytokinines (notamment la zéatine). Les cytokinines sont des phytohormones stimulant l'organogénèse de tissus végétaux cultivés *in vitro*. Les plantes obtenues présentent une morphologie différente des plantes non transformées : elles perdent leur dominance apicale, forment des bourgeons de morphologie anormale (ESP : extreme shooty phenotype) et sont incapables de former des racines à cause de la surproduction de cytokinines. Ce gène permet à des plantes transformées de se développer sur un milieu sans hormones, faisant office de gène de sélection. Le gène *ipt* peut être utilisé visuellement comme gène rapporteur de transformation génétique (Ebinuma et al., 1997). L'excision du gène *ipt* grâce à la présence d'une cassette « hit-and-run » permet ensuite aux plantes sélectionnées de retrouver leur phénotype normal (Figure 15). Les plantes transformées obtenues sont donc dénuées de gène marqueur (marker-free) (Ebinuma et al., 1997 ; Ebinuma and Komamine, 2001). Cette technique, brevetée par l'entreprise anglaise Zeneca mais exploitée par Nippon Paper Industries Co., est appelée Multi-Auto-Transformation (MAT) vector system (Ebinuma and Komamine, 2001). Elle peut notamment aider à la transformation génétique de plantes récalcitrantes à la régénération (Zuo et al., 2002) et donc permettre de régénérer et de transformer la plante en une seule étape. Cependant, ce système ne fonctionne pas forcément sur toutes les espèces végétales (Khan et Al., 2006b).



**Figure 09 : MAT system vector system utilisé chez le peuplier** (site Web Nippon Paper Group : [http://www.np-g.com/e/about/research/topix\\_study/mat/matvector\\_01.html](http://www.np-g.com/e/about/research/topix_study/mat/matvector_01.html)): **A** : Les entre-nœuds sont cultivés en présence d'Agrobacterium, puis placés sur milieu nutritif ; seules les cellules ayant reçu le gène *ipt* peuvent se développer en l'absence d'hormones. Les cals sont cultivés jusqu'à l'obtention de bourgeons. En raison de l'expression du gène *ipt*, le phénotype de ces rameaux est anormal. Cependant, grâce à l'excision du gène *ipt* résultant du système de recombinaison R/RS, des rameaux normaux sont obtenus sur 13 à 40 % des cals. Seuls les gènes d'intérêt sont insérés dans ces plantes transformées. RS : site de recombinaison ; R : gène de recombinaison ; *ipt* : isopentényl transférase ; BD : bordure droite ; BG : bordure gauche. **B** : explant de peuplier ayant retrouvé un phénotype normal après excision du gène *ipt*, entouré de ESP : extreme shooty phenotype. **C** : enracinement possible de la plante marker free.

### 3.3.5. Les promoteurs

Un promoteur très actif est nécessaire pour obtenir une expression du transgène permanente et à haut niveau chez la plante. Chez les *dicotylédones*, les promoteurs d'Agrobacterium de la nopaline synthétase (*nos*), de l'octopine synthétase (*ocs*) et de la Mannopine synthétase (*mas*) ont été largement utilisés. Le promoteur le plus populaire pour l'expression de transgènes chez les dicotylédones est celui de l'ARN 35S du virus de la

mosaïque du *chou-fleur* (CaMV 35S). Il est très actif et peut encore être amélioré par une duplication de la région amplificatrice (Rathus et al., 1993). A noter que ces promoteurs sont bien moins actifs chez les *monocotylédones*. D'autres promoteurs comme l'ubiquitine-1 du *maïs* ou l'actine-1 du *riz* ont été très largement utilisés (McElroy and Brettell, 1994).

En même temps que les promoteurs à expression permanente, un grand nombre de promoteurs ont été utilisés pour diriger l'expression de transgènes dans des tissus particuliers (comme par exemple le promoteur Gsn9) (Huang et al., 2001 ; Dezar et al., 2005).

Les promoteurs endogènes inductibles par un stimulus externe (éthanol-inductibles, tétracycline-inductibles ou encore inductibles au froid...) présentent également l'avantage de pouvoir choisir le moment de l'expression du transgène (Gatz and Lenk, 1998 ; Dezar et al., 2005 ; Kálai et al., 2008).

### **3.4. L'étape de régénération de la plante en vue de sa transformation génétique.**

Les différentes étapes de la transformation génétique, allant de l'introduction d'ADN étranger dans une cellule jusqu'à son expression par la plante, sont d'abord dépendantes du degré d'aptitude d'une espèce végétale donnée à la régénération *in vitro*, c'est-à-dire de sa capacité à produire des plantes entières à partir de différents tissus ou organes par caulogénèse adventive ou par embryogénèse somatique.

Dans la plupart de ces systèmes, la première étape d'un protocole de transformation consiste à déterminer des conditions de régénération de la plante. Différents matériels végétaux de départ peuvent être utilisés et chacun a ses caractéristiques propres avec ses avantages et ses inconvénients. Il est possible de les distinguer selon leur nature : les cellules différenciées (explants : hypocotyles, feuilles...) et les cellules indifférenciées (cals, suspensions cellulaires) qui nécessitent toutes deux des phases de culture *in vitro* longues à la différence de la transformation *in planta*.

Le choix du matériel de départ est orienté par les possibilités qu'offre l'espèce végétale en question, et par le type de matériel transformé désiré. En effet, la transformation in *planta*, par exemple, ne pourra s'effectuer que sur des espèces dont on pourra obtenir facilement des fleurs, et plus particulièrement des organes reproductifs (Trieu et al., 2000).

#### **3.4.1. Utilisation de cellules différenciées : l'organogénèse directe**

Cette méthode correspond à la formation spontanée d'organes (bourgeons, racines) directement sur la surface d'explants intacts cultivés, comme par exemple les feuilles, les tiges, les entre-nœuds, les racines, les hypocotyles, sous l'action d'une balance hormonale adéquate établie dans le milieu de culture (Singh et al., 2002 ; Chitra and Padmaja, 2005 ; Kumar et al., 2005). Le processus d'organogénèse directe ne comporte pas la formation de cal, ce qui permet d'obtenir généralement des plantes transformées rapidement, et de limiter les risques de variation somaclonale. Il nécessite la formation de zones de division cellulaire au niveau du tissu qui permettent l'organisation de centres méristématiques appelés méristémoïdes, capable de générer un organe entier. Cette méthode est surtout applicable aux espèces végétales non récalcitrantes à la régénération.

#### **3.4.2. Utilisation de cellules indifférenciées : la régénération indirecte**

Les plantes considérées comme récalcitrantes à la régénération, sont la plupart du temps régénérées par embryogenèse somatique indirecte et/ou par organogénèse indirecte. Par régénération indirecte, on entend la formation de tiges feuillées ou la formation d'embryons somatiques, à partir d'une ou plusieurs cellules de l'explant ayant subi :

- Un processus de dédifférenciation cellulaire sous l'action de balance hormonale

- Une déviation du programme interne de différenciation cellulaire vers un programme de prolifération.

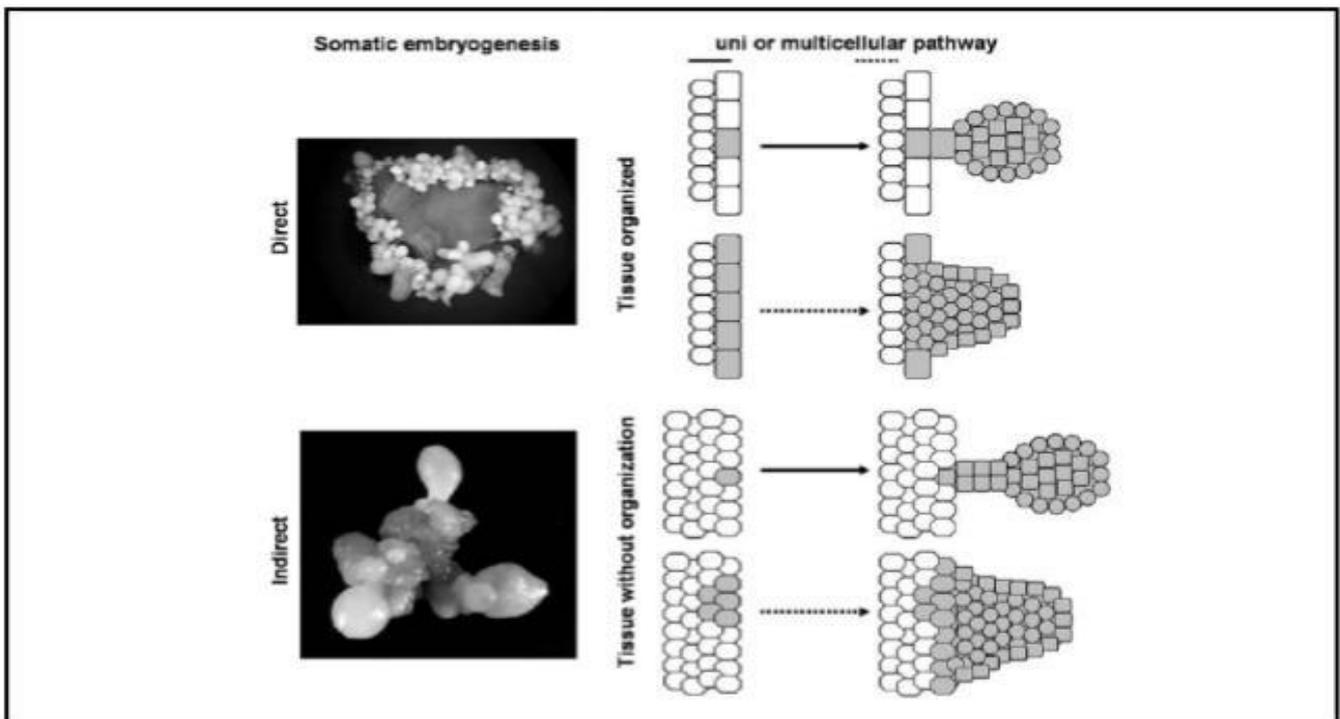
Ceci permet l'apparition d'amas non structuré de cellules végétales indifférenciées théoriquement totipotentes appelés cal (processus de callogénèse).

### **3.4.2.1. L'embryogénèse somatique**

L'utilisation de l'embryogénèse somatique comme méthode de multiplication, de conservation ou de régénération dans un protocole de transformation génétique est courante chez des plantes récalcitrantes, comme le *coton* (Shoemaker et al., 1986), *l'abetterave* sucrière (Zhang et al., 2001), *la vigne* (Marsoni et al., 2008), *le tournesol* (Saji and Sujatha, 1998) ou *la rose* (Li et al., 2002).

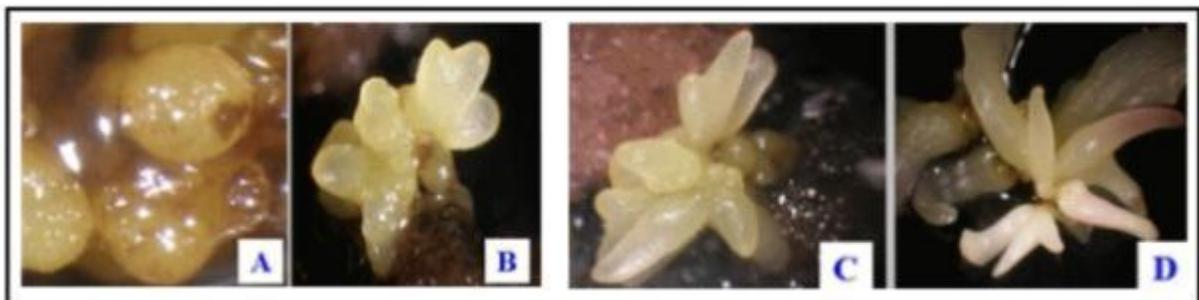
En fait, il existe deux types d'embryogénèse somatique (Figure 10) :

- le terme d'embryogénèse somatique directe est appliqué à la formation d'un embryon à partir d'un explant différencié (feuilles, tiges...). Son origine est unicellulaire ou pluricellulaire et requiert des conditions favorables pour le développement de l'embryon.
- Le terme d'embryogénèse somatique indirecte réfère à la formation d'un embryon après une intense prolifération cellulaire (formation d'un cal). Son origine peut être unicellulaire ou pluricellulaire. C'est à cette voie que l'on s'intéresse dans cette partie.



**Figure 10 :** Représentation schématique de l'embryogénèse somatique directe et indirecte. Les embryons résultant d'une cellule sont reliés aux cellules maternelles par une structure suspentrice, alors que ceux d'origine pluricellulaire sont fusionnés aux cellules maternelles par leur partie basale (Quiroz-Figueroa et al., 2006).

C'est un processus permettant de générer des unités bipolaires appelées embryons somatiques à partir de cellules somatiques. Leur organisation est quasi similaire à celle d'un embryon zygotique, exceptions faites de l'absence ou du retard dans le développement du duspenseur, de période de dormance et d'enveloppe protectrice présente dans une graine. Leur développement suit quatre étapes principales (Figure 11) : globulaire (A), ovale, cordiforme (B), allongé, torpédo (C) et cotylédonaire (D) (par ordre d'apparition) (Zimmerman, 1993 ; Dodeman et al., 1997 ; Quiroz-Figueroa



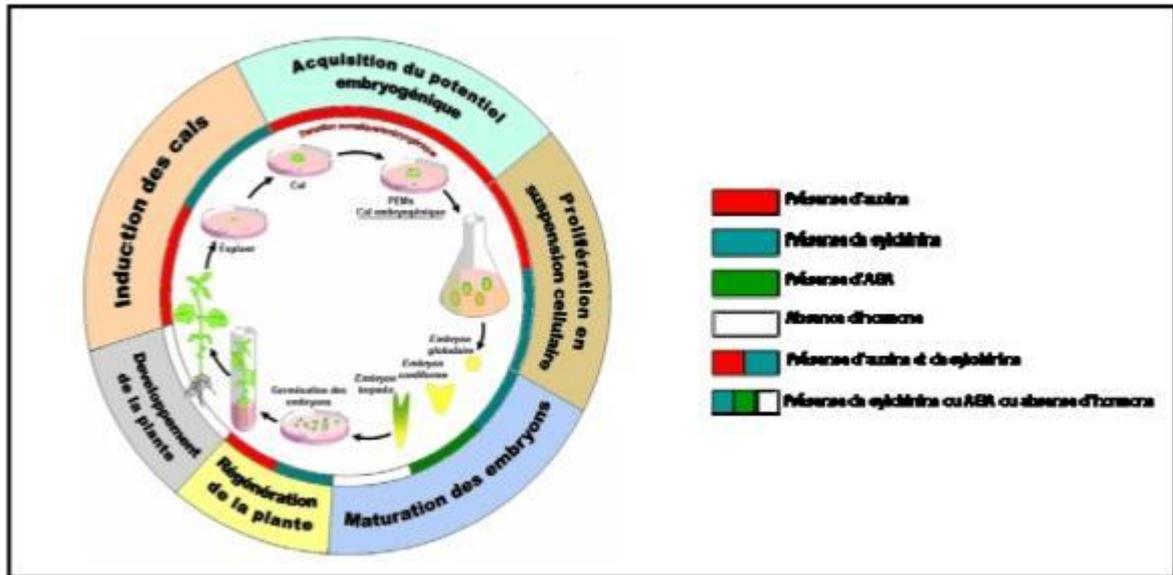
et al., 2006).

**Figure 11** : Les différents stades de l'embryon somatique chez *la mangue (Mangifera indica)*. A : stade globulaire, B : stade cordiforme, C : stade torpédo, D : stade cotylédonaire. (<http://www.asbest.sinica.edu.tw/en/gr/wo/4?page=1>)

La technique de la régénération par l'embryogénèse somatique indirecte repose sur l'utilisation de régulateurs de croissance naturels ou synthétiques pour induire tout d'abord la dédifférenciation des tissus et la formation de tissus (cals) embryogènes. L'acquisition du potentiel embryogénique dans des cellules somatiques nécessite une reprogrammation du profil d'expression des gènes qui s'accompagne de changements morphologiques, physiologiques et métaboliques au sein des cellules (Namasivayam, 2007).

Ce cal embryogénique est le lieu même de la formation et de la maturation de masses pro-embryogéniques (MPEs) définies suivant 3 stades caractérisés par des agrégats cellulaires distincts. Ce sont des amas cellulaires ayant acquis un potentiel embryogénique pouvant donner des embryons sans stimuli exogènes (Namasivayam, 2007). C'est à partir de ces masses cellulaires que le développement des embryons puis la régénération de plantules sont réalisées. La régénération par embryogénèse somatique indirecte comporte plusieurs étapes théoriques (Figure 12) (Kallerhoff et al., 2003) :

- L'induction de la callogenèse, à partir d'un explant (à déterminer selon les plantes) sous l'action d'une combinaison hormonale à déterminer (nature, et concentrations).
- L'acquisition du potentiel embryogénique du cal, la formation et la maturation des MPEs, en présence d'auxines.
- La prolifération en suspension cellulaire ou en milieu solide,
- La formation (passage d'un stade MPEs III à l'embryon globulaire) et la maturation des embryons (notamment l'acquisition de la tolérance à la dessiccation et l'accumulation des réserves),
- La régénération et le développement d'une plante entière.



**Figure 12 :** Les différentes étapes de la régénération de plantule par la voie de l'embryogénèse somatique indirecte, et les hormones végétales nécessaires aux différents stades (Zimmerman, 1993 ; Strosse et al.,2003).

L'élaboration d'un protocole de régénération par embryogénèse somatique pour une plante donnée peut s'avérer très fastidieux et très long. En effet, le schéma ci-dessus en une représentation théorique des différentes étapes. Un protocole de régénération peut être très différent d'une plante à l'autre, de par les explants de départ utilisés, les combinaisons, les doses et les temps d'exposition aux hormones végétales pour chaque étape, la composition des différents milieux de cultures (composition en micro-éléments, macroéléments, sucres, acides aminés...), et les conditions de cultures (lumière, température...). Cette technique offre cependant de nombreux avantages en culture in vitro (Kallerhoff et al., 2003) :

- la capacité d'obtenir des structures ayant à la fois un méristème apical et un méristème racinaire, permettant ainsi aux racines de se développer sans l'apport d'auxines exogènes,
- la capacité de produire un grand nombre de plantules régénérées de bonne qualité,
- la capacité d'induire la dormance et d'encapsuler les embryons somatiques dans des billes de matrice gélatineuse, pour produire des semences artificielles, et

- la capacité de transformer génétiquement une plante sans aucun risque de chimère dans le cas d'une origine unicellulaire de l'embryon (transformation via *Agrobacterium tumefaciens*, micro-injection, électroporation, ou biolistique).

#### **3.4.2.2. L'organogénèse indirecte à partir de cals**

La régénération par organogénèse indirecte à partir de cals correspond à la formation d'une tige feuillée à partir de cellules indifférenciées (Ewa Sroga, 1987 ; Coulombe et al., 1990 ; Das et al., 1996 ; Ramanayake and Wanniarachchi, 2003). Pour cela, il est nécessaire d'avoir un taux de cytokinines endogènes élevé, qui va permettre de générer les tiges feuillées. Malgré un risque élevé d'obtention de chimères au cours d'une transformation génétique (due à l'origine pluricellulaire des bourgeons), ce procédé constitue un excellent moyen d'obtenir en peu de temps un grand nombre de plantules.

Néanmoins, l'utilisation de ce type de matériel végétal n'est pas sans inconvénient. En effet, il faut conserver les cals en bon état, ce qui implique des repiquages réguliers. D'autre part, la culture à long terme de cellules indifférenciées est à l'origine de variations somaclonales, mais aussi de perte des fonctions menant à la régénération de plantes entières anormales (Sala et al., 2003a ; Bordallo et al., 2004).

L'organogénèse indirecte est une méthode utilisée dans la multiplication, la conservation ou la transformation génétique de plantes récalcitrantes, comme *la betterave sucrière* (Zhang et al., 2004) ou *l'orge* (Chauhan and Kothari, 2004).

### **3.5. La transformation génétique *in planta***

Plusieurs protocoles de transformation *in planta* ont été décrits. Cette approche permet de transformer des plantes pour lesquelles la culture *in vitro* et la régénération sont difficiles. Le principe en est le suivant : l'inoculation de la plante va permettre la transformation de certaines zones qui seront à l'origine de lignées germinales. Certains

des descendants seront donc transformés avec le gène d'intérêt. L'inoculation avec *Agrobacterium* se fait soit sur les organes reproducteurs, soit sur les graines.

### **3.5.1. Par inoculation de graines**

Le premier protocole de transformation *in planta* a été mis au point sur *Arabidopsis Thaliana* (Feldmann and Marks, 1987). Il consiste à incuber des graines d'*Arabidopsis* une nuit dans une culture d'*Agrobacterium*, puis à les faire germer. A maturité, ces plantes produisent des graines dont seules les transformées germent sur un milieu de sélection. Un grand nombre de plantes transgéniques contenant l'ADN-T a pu être obtenu, mais cette technique est en général peu reproductible. D'autres méthodes plus efficaces de transformation *in planta* d'*Arabidopsis* ont depuis été mises au point. Elles font intervenir l'inoculation des parties florales comme décrit dans la partie suivante.

### **3.5.2. Par inoculation de parties florales**

Bechtold et ses collaborateurs (Bechtold et al., 1993) ont décrit une méthode plus fiable, dans laquelle les bactéries sont infiltrées, par dépression sous vide, dans des fleurs d'*Arabidopsis*. Une technique encore plus simple, appelée « trempage des fleurs » a été largement utilisée (Clough and Bent, 1998). Elle consiste à simplement tremper les fleurs d'*Arabidopsis* dans une suspension de bactéries au moment de la fertilisation. Dans ces deux méthodes, les plantes transformées sont chimériques, mais donnent naissance à un petit nombre de descendants transgéniques (en général un 1% des graines obtenues (Bent, 2006 ;Zhang et al., 2006)).

Ces méthodes de transformation *in planta*, sont généralement assez peu efficaces. C'est pourquoi la petite taille d'*Arabidopsis* et sa capacité à produire plus de 10 000 graines par plants sont avantageuses. Cette limitation a jusqu'à présent été un

obstacle à l'adoption généralisée des techniques in *planta* pour d'autres espèces végétales. Une technique similaire a été adaptée à *Medicago truncatula* (Trieu et al., 2000), et s'est montrée très efficace. Le Taux de transformation moyen est de 36 % (4,7 à 76 %) des graines testées, ce qui est de loin supérieur aux valeurs observées lors de la transformation génétique d'*Arabidopsis*.

Des approches similaires utilisant le transfert direct d'ADN ont été tentées chez d'autres espèces, mais la transformation de la lignée germinale n'était pas reproductible. De l'ADN nu a, par exemple, été injecté dans les pièces florales de plants de *seigle* (De la Pena et al., 1987) après leur fertilisation, cela a permis d'obtenir quelques plantes transgéniques.

### **3.5.3. Par inoculation de méristèmes**

Une alternative à la transformation des tissus de la lignée germinale consiste à introduire l'ADN dans les méristèmes apicaux in *planta*, puis à faire croître les pousses transgéniques. Chez *Arabidopsis*, ceci a été réalisé en coupant simplement des pousses apicales à leur base, et en inoculant le tissu coupé dans une suspension d'*Agrobacterium* (Chang et al., 2003). Par cette méthode, on obtient des plantes transgéniques à partir des tiges transformées avec une fréquence d'environ 5%. Une technique de transformation génétique de méristèmes apicaux d'embryons de graines de *riz* par *Agrobacterium* a récemment été décrite (inoculation avec une aiguille). Elle a donné un taux de transformation d'environ 40% pour la génération de plantes T1 (Supartana et al., 2005).

# ***CONCLUSION GENERALE***

## ***Conclusion générale***

Les biotechnologies participent pour une part importante à l'actuelle révolution technologique. Le développement des biotechnologies commence tout juste à opérer des mutations majeures dans l'industrie du médicament, sans mentionner celle de l'alimentation, de l'agriculture et de l'environnement.

Les médicaments issus de la biotechnologie sont des agents thérapeutiques produits à l'aide d'organismes vivants et de la technologie de transgénèse (couramment appelée le génie génétique). Ils ont permis de faire des progrès significatifs dans le traitement de maladies restées incurables jusqu'à présent.

Ils représentent encore un grand espoir dans de nombreux domaines de thérapeutique. Cette classe de produits comprend les protéines recombinantes tels que l'insuline, les cytokines et les facteurs de croissance, les vaccins recombinants et les anticorps monoclonaux.

Le recours à ces molécules recombinantes d'intérêt thérapeutique doit toutefois prendre en considération certains effets secondaires, tels que l'absence de sécurité maximale vis-à-vis des risques infectieux contaminations virale ou bactérienne possible, transmission éventuelle d'agents pathogènes, prions..., Néo-antigénicité, apparition des anticorps neutralisants.

Des exigences particulièrement sévères sont prises sous forme de directives et de normes par divers organismes, à l'encontre de la production des médicaments par des procédés biotechnologiques. Ces normes et directives permettent d'assurer la qualité du produit biotechnologique et de garantir son innocuité et son efficacité.

# ***REFERENCES***

# ***BIBLIOGRAPHIQUES***

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Abu-Qarn, Mehtap, Eichler, Jerry and Sharon, Nathan (2008). « Not just for Eukarya anymore : Protein glycosylation in Bacteria and Archaea. » *Current Opinion in Structural Biology* 18(5) : 544-550.
- Akbudak, M. A. and Babaoglu, M. (2005). « Callus induction in small flowered willow herb (*Epilobium parviflorum* Schreb). » *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 14(2) : 189-191.
- Allen, M. J., Boyce, J. P., Trentalange, M. T., Treiber, D. L., Rasmussen, B., Tillotson, B., Davis, R. and Reddy, P. (2008). « Identification of novel small molecule enhancers of protein production by cultured mammalian cells. » *Biotechnology and Bioengineering* 100(6) : 1193-1204.
- Altmann, F., Staudacher, E., Wilson, I. B. and Marz, L. (1999). « Insect cells as hosts for the Expression of recombinant glycoproteins. » *Glycoconj J* 16(2) : 109-23.
- Anandalakshmi, R., Marathe, R., Ge, X., Herr J.M, Jr., Mau, C., Mallory, A., Pruss, G., Bowman, L. and Vance, V. B. (2000). « A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. » *Science* 290(5489) : 142-144.
- Arakawa, T., Chong, D. K. X., Lawrence Merritt, J. and Langridge, W. H. R. (1997). « Expression of cholera toxin B subunit oligomers in transgenic potato plants. » *Transgenic research* 6(6) : 403-413.
- Arcalis, E., Marcel, S., Altmann, F., Kolarich, D., Drakakaki, G., Fischer, R., Christou, P. and Stoger, E. (2004). « Unexpected deposition patterns of recombinant proteins in postendoplasmic reticulum compartments of wheat endosperm. » *Plant Physiol* 136(3) : 3457-66.
- Assemblée générale FEB, 1989 ( <http://www.eurodoctor.it/biotech.html> ).
- Bakker, H., Bardor, M., Molthoff, J.W., Gomord, V. , Elbers, I. , Stevens, L.H., Jordi, W., Lommen, A., Faye, L. , Lerouge, P. and Bosch, D. (2001). « Galactose-extended glycans of Antibodies produced by transgenic plants » *Proceedings of the National Academy of Science*.98(5) : 2899-2904.

- Baur, A., Reski, R. and Gorr, G. (2005). « Enhanced recovery of a secreted recombinant Human growth factor using stabilizing additives and by co-expression of human serum Albumin in the moss *Physcomitrella patens*. » *Plant Biotechnology Journal* 3(3) : 331-340.
- Bioindustry Association (<http://www.bioindustry.org> ).
- Cadoret, J. P., Bardor, M., Lerouge, P., Cabiglieri, M., Henriquez, V. and Carlier, A. (2008).« Microalgae as cell factories producing recombinant commercial proteins. » *Les microalgues : Usines cellulaires productrices de molecules commerciales recombinantes* 24(4) : 375-382.
- Canadian Food Inspection Agency ( [www.cfia-acia.agr.ca](http://www.cfia-acia.agr.ca) ).
- Cours de production de protéines recombinantes master1 Immunologie dr.Bouzahar Deffar Khalissa
- De Zoeten, G. A., Penswick, J. R., Horisberger, M. A., Ahl, P., Schultze, M. and Hohn, T. (1989). « The expression, localization, and effect of a human interferon in plants. » *Virology*172(1) : 213-222
- Decker, Eva L. and Reski, Ralf (2007). « Moss bioreactors producing improved Biopharmaceuticals. » *Current Opinion in Biotechnology* 18(5) : 393-398.
- Farges-Haddani, B., Tessier, B., Chenu, S., Chevalot, I., Harscoat, C., Marc, I., Goergen, J. L.
- And Marc, A. (2006). « Peptide fractions of rapeseed hydrolysates as an alternative to animal Proteins in CHO cell culture media. » *Process Biochemistry* 41(11) : 2297-2304.
- Infoagro ([http://www.infoagro.com/semillas\\_viveros/semillas/biotecnologia.asp](http://www.infoagro.com/semillas_viveros/semillas/biotecnologia.asp) ).
- Le Centre Bioinfo ( <http://www.porquebiotecnologia.com.ar/doc/biotecnologia/biotec.asp> ).
- Matthew Herwig ( <http://www.engr.umbc.edu/~mherwi1/proj1.html> ).
- North Carolina Biotechnology Center (<http://www.ncbiotech.org/>).
- Office of Technology Assessment Publications (OTA Publications). *Biotechnology in Global Economy*. Congress Of the United States, 1991.
- Organisation des Nations-Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO) (<http://www.fao.org/DOCREP/003/X3910E/X3910E00.htm>).

- R-Molécules ou protéine recombinantes (<https://www.universalis.fr/encyclopedie/r-molecules-proteines-recombinantes/>)
- Ruggiero, F., Exposito, J. Y., Bournat, P., Gruber, V., Perret, S., Comte, J., Olganier, B., Garrone, R. and Theisen, M. (2000). « Triple helix assembly and processing of human Collagen produced in transgenic tobacco plants. » FEBS Letters 469(1) : 132-136.
- Sala, F., Rigano, M., Barbante, A., Basso, B., Walmsley, A.M. and Castiglione, S. (2003b). « Vaccine antigen production in transgenic plants : strategies, gene constructs and Perspectives. » Vaccine 21(7-8) : 803-808.
- The Biotech Life Sciences Dictionary ( <http://www.eurodoctor.it/biotech.html> ).
- Washington Biotechnology and Medical Technology Matthew Herwig(<http://www.engr.umbc.edu/~mherwi1/proj1.html> ).
- The Biotechnology Gateway. Canada Industry (<http://strategis.ic.gc.ca/SSG/bo01074e.html> ).