

# CHAPITRE II

## LE GÉNIE GÉNÉTIQUE

Le génie génétique permet → de manipuler ADN et ARN  
→ de créer de nouvelles séquences  
→ d'étudier / modifier l'expression des gènes

### 1 Obtention d'un maïs transgénique pour le gène Bt

La bactérie Bt (*Bacillus thuringiensis*) est naturellement présente dans le sol.  
Le gène Bt qui nous intéresse code pour une protéine Bt (qui nous intéresse),  
toxique contre les chenilles.  
Cette protéine est depuis longtemps utilisée en insecticide.  
L'idée du génie génétique est d'introduire ce gène dans une plante qui  
produira elle-même cet insecticide dans ses tissus mangés par les chenilles.  
Le premier essai date de 1985 (sur les feuilles de tabac)

#### 1.1 Clonage du gène Bt

##### 1.1.1 Isolation du gène Bt

On doit d'abord récupérer le gène dans le génome bactérien, on utilise  
alors des enzymes de restriction. (Riche 1)  
On va utiliser une enzyme qui coupe de part et d'autre du gène pour le  
libérer du reste du génome.

##### 1.1.2 Construction du gène recombinant

On veut construire un gène nouveau avec la séquence codante du gène Bt et  
un promoteur spécifique.

Dans les promoteurs, il y a : - Les forts (constitutifs) qui permettent l'expression du  
gène en permanence  
- Les et d'autres qui s'expriment par exemple seulement  
dans les feuilles ou seulement à un stade de développement

On choisit un promoteur ayant un profil d'expression adéquate parmi tous les  
promoteurs connus dans le maïs.

On introduit ensuite le gène Bt et le promoteur dans un plasmide qui servira  
de vecteur pour introduire le plasmide dans une bactérie.

Les bactéries qui poussent en milieu hostile sont les résistantes. (les cellules qui poussent)  
Celles qui nous intéressent sont celles qui en plus ont intégré le insert.

#### a Linéarisation du plasmide

On choisit une enzyme dans le site de polyclonage compatible avec le gène  
utilisé pour le gène Bt.

#### b Ligation

Plasmide linéarisé + insert (soit le gène Bt) + ligase = gène recombinant ?

La ligase forme les liaisons phosphodiester

On peut avoir des ligations à bord franc ou à bord collant (dans laquelle  
les 2 extrémités s'apparient sur quelques bases, ce qui les maintient en place  
pour faciliter le collage)

À bord franc : pas d'appariement, la ligation marche moins bien

## b. Transformation par biolistique

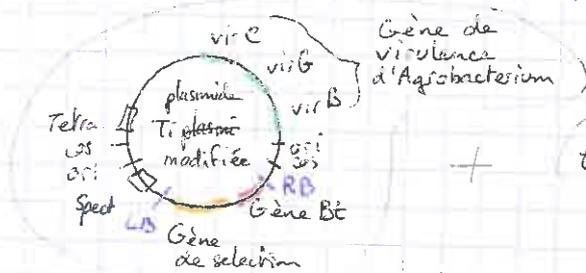
ADN mis à la surface de petites billes (en or ou tungstène) projetées très violemment contre les cellules : certaines pénètrent dans le cytoplasme et amènent l'ADN avec elles



## c. Transformation par Agrobacterium tumefaciens

→ on prépare la plasmide Ti recombinant

→ transformation et sélection des Agrobactéries transformées (sur tetracycline)



BIOLISTIQUE

↑ végétale

→ mise en contact d'une culture d'Agrobacterium et de cellules végétales ex-embryons de maïs

## 1.2 Sélection et régénération de cellules transformées.

- L'ADN introduit doit entrer dans le noyau et s'intégrer au génome pour pouvoir s'exprimer
- Les cellules ayant intégré le gène recombinant de manière stable sont sélectionnées sur milieu nutritif et agents sélectif (antibiotique)
- Sélection et régénération de plantes à partir d'une cellule transformée

## 1.3 Etude du maïs transformé (Fiche 19)

1.3.1. Vérification du profil d'expression du gène par Southern Blot

1.3.2. Vérification du profil d'expression du gène par Northern Blot



Dans l'exemple du gène Bt on réalise un Southern Blot avec une sonde spécifique. On vérifie ainsi la présence du transgène.

Il doit être entier et en un seul exemplaire. Seules les plantes correctes sont alors gardées.

On réalise ensuite un Northern Blot, tiré avec une sonde spécifique des gènes Bt et on vérifie l'expression du transgène dans toute la plante et durant tout le développement (stades : plantule, plante adulte...).

Re - Seules les plantes correctes sont gardées.

Objectif : sélection des transgènes les plus simples

- insertion du gène d'intérêt en entier.
- dans une zone permettant l'expression
- insertion d'une ou deux copies seulement

(sinon, on perturbe la plante ou bien la plante rejette les gènes)  
Gene silencing

Validation fonctionnelle sur plusieurs générations :

- essai au champ
- évaluation agronomique
- homologation - commercialisation

Mise sur le marché

### 3 Etude du gène pg (polygalacturonase) chez la tomate

Le gène pg a une fonction : il est impliqué dans le mûrissement de la tomate (par protéine).  
Il code pour une enzyme qui dégrade la pectine des parois du fruit.  
Cette dégradation entraîne un ramollissement du fruit donc d'abaissement de la durée de conservation, ce qui rend les fruits plus fragiles.

#### 3.1. Etude du promoteur pg par gène rapporteur. (fig 12)

Objectif : rechercher à quel moment du dvlp du fruit ce gène s'active ? Dans quel tissu ?

Déroulement :

- Construction : promoteur pg + séquence codante du gène GFP + signaux fin de transcription
- Transfo des  $\phi$  de tomate, régénération de plantes transgéniques
- Récolte analyse des fruits :
  - différents stades de mûrissement
  - réalisation de coupes fines dans les fruits, observation microscopique pour rechercher les zones de fluorescence.

Conclusion : ce gène s'active tôt dans le mûrissement, avant le stade organoleptique

#### 3.2. Stratégie anti-sens pour inactiver le gène

Objectif : bloquer l'action du gène pg pour que les tomates soient toutes molles.

Déroulement :

- Construction = promoteur pg + séq. <sup>anti</sup> ~~code~~ sens du gène pg + signaux fin de transcription
- Transfo des  $\phi$  de tomate (5 à 10% d'activité résiduelle)  
Pour la petite story : des tomates, commercialisées sous purée (15 years ago les lignes de tomates produites (pas spécialement délicieuses) ... bah c'est bien car puisque de toute façon c'est en purée...

##### 3.2.1. Vérification de la présence du gène anti-sens par PCR (fiche 11)

Certains gènes sont uniques à une personne. That's what's used by policemen.

##### 3.2.2. Etude de la quantité de polygalacturonase produite dans les plantes transgéniques par Western Blot.

### 4. Synthèse de la protéine médicamenteuse AT III in the goat's milk

AT III (Antithrombine) : protéine utilisée comme anticoagulant après crise cardiaque  
Elle est extraite du sang humain = coût élevé, faible production, risque de transmission d'agents pathogènes.

Objectif : faire produire cette protéine par des chèvres dans le lait  
→ production plus importante  
→ risque pathogènes limités

stade organoleptique : stade durant lequel la tomate "mûrit"

5 Exemple d'utilisation à des fins de recherche, les souris transgéniques →

51 Obtention de souris transgéniques ! fiche 15

52 Identification de la séquence activateuse qui agit sur la gène de la métallothionéine

53 Démonstration de la fonction d'une protéine par mutagenèse insertionnelle

6 Génie génétique et éthique

61 Etude de l'ADN dans le cas d'une maladie héréditaire

Voudriez-vous savoir si votre gène va vous faire mourir ?

Si vous étiez obligés de savoir, et que vous l'aviez, prendriez-vous une assurance vie ?

(+) Positifs de la génétique

→ comprendre les médicaments (aux USA, la 4<sup>e</sup> cause de mortalité est la réaction négative aux médicaments)

→ l'analyse d'ADN permet de savoir si un fœtus sera atteint d'une maladie héréditaire

→ dans le futur, on pourra "réparer" ces fœtus ?

62. Les plantes OGM peuvent-elles aider à nourrir le monde ?

Valeur des produits OGM ? Conséquences sur l'environnement ?

Exemple du riz transgénique meilleur sur le plan nutritionnel :

• élément de base dépourvu de nutriments vitaux

+ 800 millions d'enfants déficitaires en vitamine A (cécité, faiblesse immunitaire...)

↳ Endes ferme de riz modifié pour produire la provitamine A (bêta carotène)

• 6 gènes introduits : 3 gènes de naissance des préc + 1 gène de bactérie *Erwinia*

+ 24% de la pop. mond. déficitaires en fer

↳ riz modifié avec le gène de ferritine, qui fixe le fer  
riz corrige le déficit en fer sur animaux de labo

Ça donne :

souches enrichies en provitamine A et en fer

X

souches d'intérêt agronomique

↓  
Produit agricole résistant et de bonne qualité sur le plan nutritionnel.

# LE GENIE GENETIQUE



Eh! Remballez  
l'génie, c'est  
pas  
l'bon!

OBJECTIF = le maïs  
chenillo-destroyer self defence

L'ARTICLE = le gène d'intérêt à rober à *Bacillus Thuringiensis*

① Robe le gène : enzyme de restriction! GO!

② Adapter le gène : promoteur help me type fort → constitutifs, dans la constitution  
expression permanente!  
type autre → expression localisée dans  
l'espace-temps!

↳ in the pack (plasmide), you have gènes + promoteur!

Mode de fabrication du plasmide-pack :

1 → tu élis une enzyme

2 → tu embauches des ligases pour former des liaisons <sup>phospho</sup> dieste  
~~les liaisons~~ (les liaisons sont à bord collant, ou France).

③ Multiplier le gène adapté!

Thanks to the bacteria! genre *E. coli* qui double sa pop en 20 min



## Fiche 2: Les plasmides -2

Certains plasmides ont été modifiés pour servir de vecteur en génie génétique. Ils contiennent:

Exemple de **pBluescript**:

- Une origine de répllication bactérienne

- **MCS**: Site de clonage multiple; séquence contenant un grand nombre de sites de restriction différents, permettant d'ouvrir le plasmide et d'y ajouter l'insert

- Gène marqueur de la transformation: résistance à l'**ampicilline**

- Gène marqueur de ligation **lacZ** qui code pour la  $\beta$ galactosidase, pour sélectionner les bactéries ayant intégré un plasmide avec insert. \*1

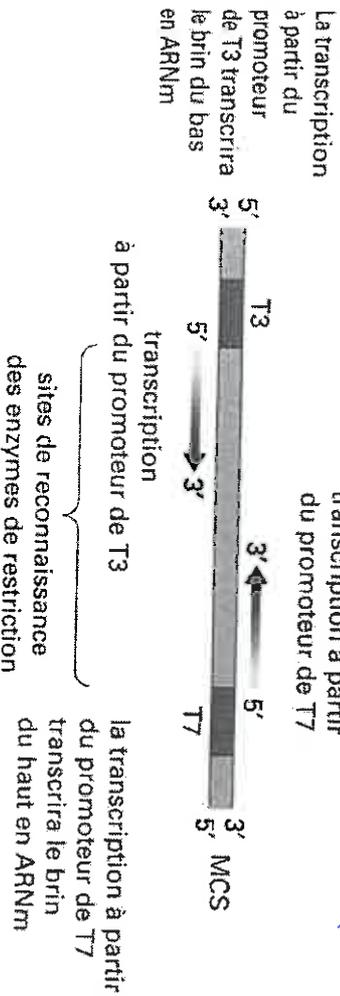
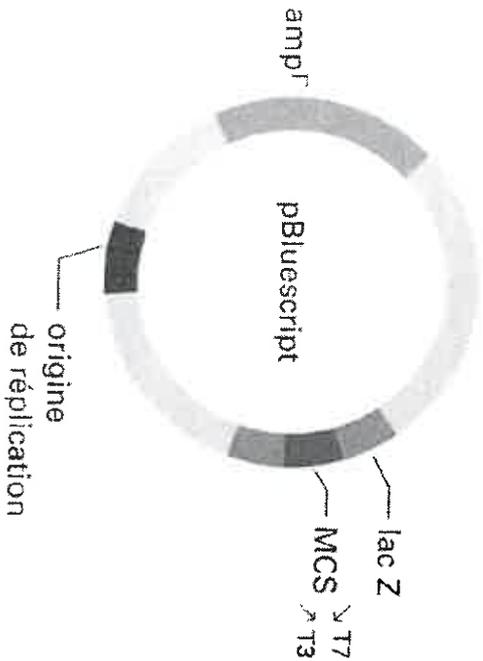
Test de dosage blanc/bleu:

La  $\beta$ galactosidase transforme le substrat **X-Gal** en un produit bleu brillant.

Cellule+ pBuescript sans insert dans MCS  $\Rightarrow$  colonie bleue si cultivée sur boîte avec X-Gal.

Cellule+ pBuescript avec insert dans MCS  $\Rightarrow$  colonie blanche: fonction du gène lacZ perdue: enzyme non produite  $\rightarrow$  ça c'est cool.

- Promoteur T3 et T7 flanquant le MCS: en ajoutant la polymérase correspondante à ces promoteurs, on peut synthétiser soit l'ARNm sens (normal) soit l'ARNm antisens



\* si une bactérie l'a intégré, elle résiste à l'ampicilline  
 \* si le plasmide porte le vecteur il transforme le X-Gal en bleu

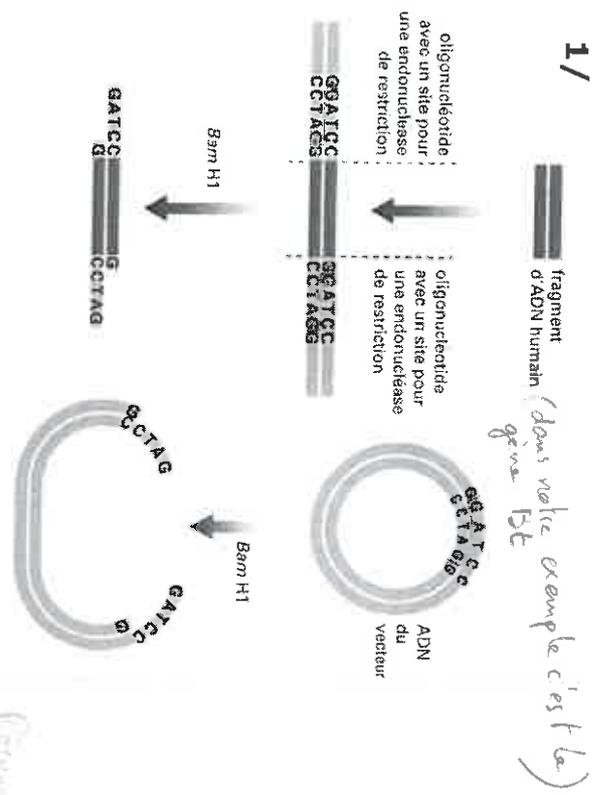
# Fiche 3: Le clonage -2

## Création d'un plasmide recombinant

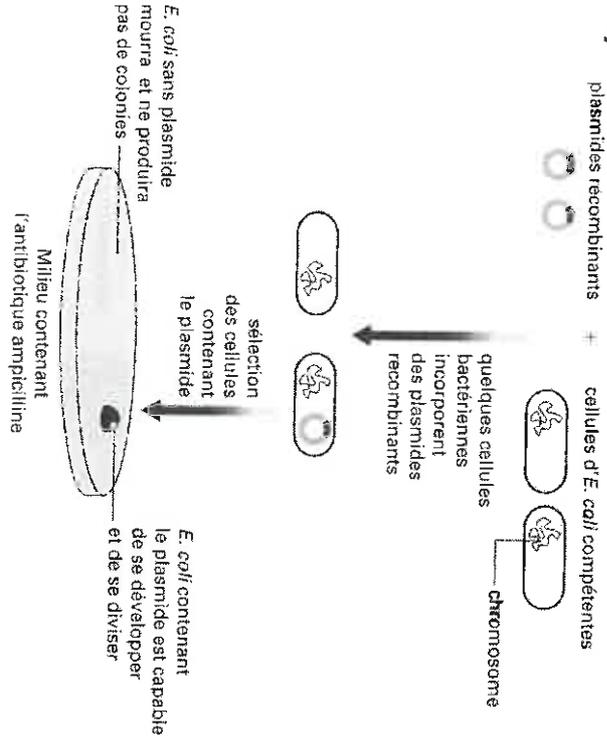
- Préparer l'insert en ajoutant un court fragment d'ADN synthétique comportant un site de restriction
- Le plasmide et l'insert sont coupés par une enzyme de restriction BamH1; les extrémités sont complémentaires et s'hybrident.
- Réaliser une ligation entre l'insert et le plasmide

*On recommence pour insérer le promoteur*

### 1/

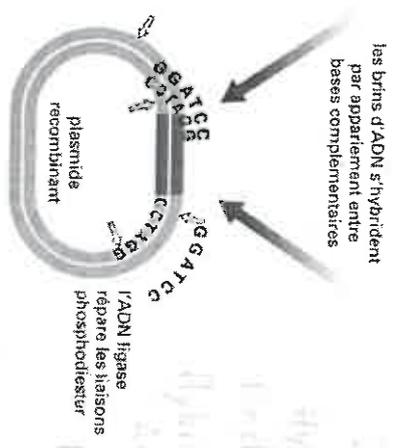


### 2/



## Introduction des plasmides recombinants dans des bactéries

- **Traitement des bactéries au chlorure de calcium** pour rendre la paroi plus perméable à l'ADN



## Fiche 5: Extraction et purification d'ADN et d'ARN

**Objectif :** obtenir de l'ADN ou de l'ARN purifié ( sans trace de protéines, lipides, ions etc...) à partir de cellules bactériennes, végétales ou animales.

**Protocole :**

### ➤ Extraction

- Broyer 1 tissu pour libérer des cellules isolées
- Lyser les cellules pour libérer le contenu du cytoplasme et du noyau
- Centrifuger pour éliminer les débris, membranes, mitochondries
- Conserver le surnageant ( qui contient les acides nucléiques)

*Handwritten notes:*  
ADN ?  
libérer, cyto, membrane, mitochondries  
Centrifuger, éliminer les débris  
Conserv

### ➤ Purification

- Faire passer le surnageant dans une colonne qui retient spécifiquement l'ADN génomique, ou l'ADN plasmidique ou les ARN. Les contaminants (protéines,...) ne sont pas retenus et sont donc éliminés.
- Éluer par un tampon approprié, qui décroche l'ADN ou l'ARN retenu dans la colonne : une solution très pure d'ADN ou d'ARN est ainsi obtenue.

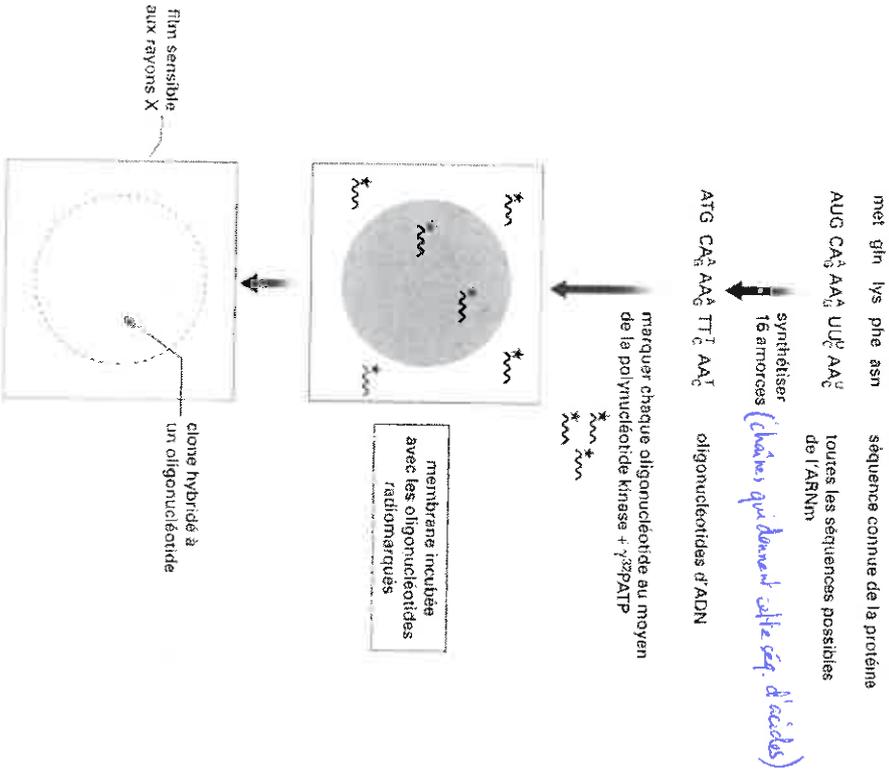
## Sélection de clones d'ADNc

après avoir construit une banque d'ADNc qui peut contenir plusieurs milliers de clones d'ADNc différents, il faut pouvoir identifier les clones qui contiennent l'ADNc qui nous intéresse:

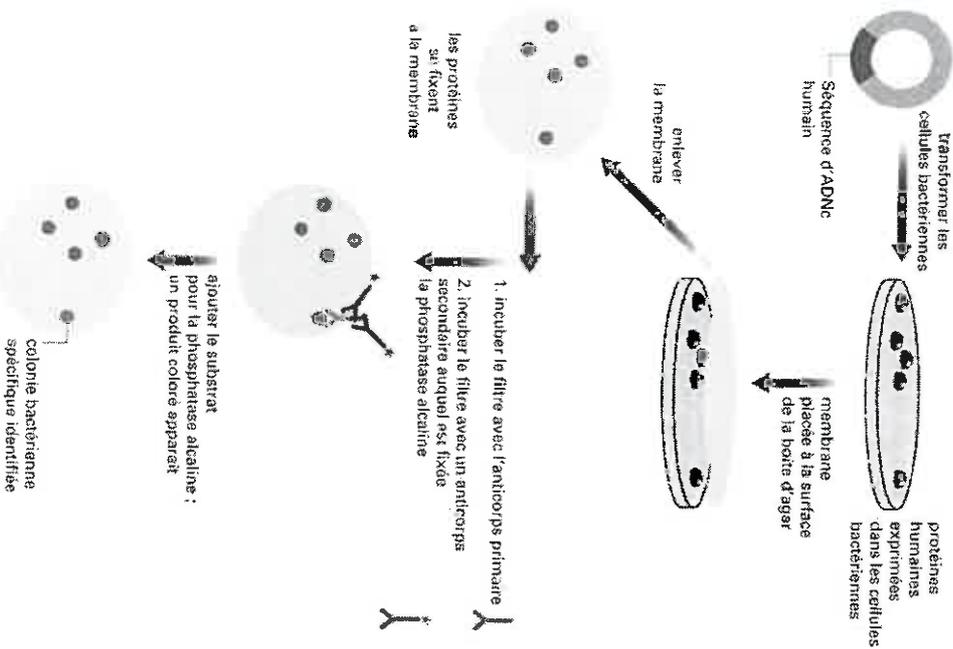
- bactéries ensemencées sur des boîtes d'agar
- les colonies sont ensuite répliquées sur une membrane de nylon
- traitement des membranes avec un détergent pour lyser les cellules fixées

Sélection avec une sonde oligonucléotidique radioactive

- traitement des membranes à l'hydroxyde de sodium pour rompre les liaisons H entre les brins de l'ADN fixé à la membrane de nylon et s'assurer que l'ADN est sous forme simple brin



Sélection par un anticorps utilisé comme sonde



# Fiche 9 : Le séquençage de l'ADN

Objectif: déterminer la succession des bases dans un fragment d'ADN donné

Protocole:

- mettre l'ADN à séquencer sous forme simple brin, de manière à pouvoir réaliser sa réplification *in vitro*

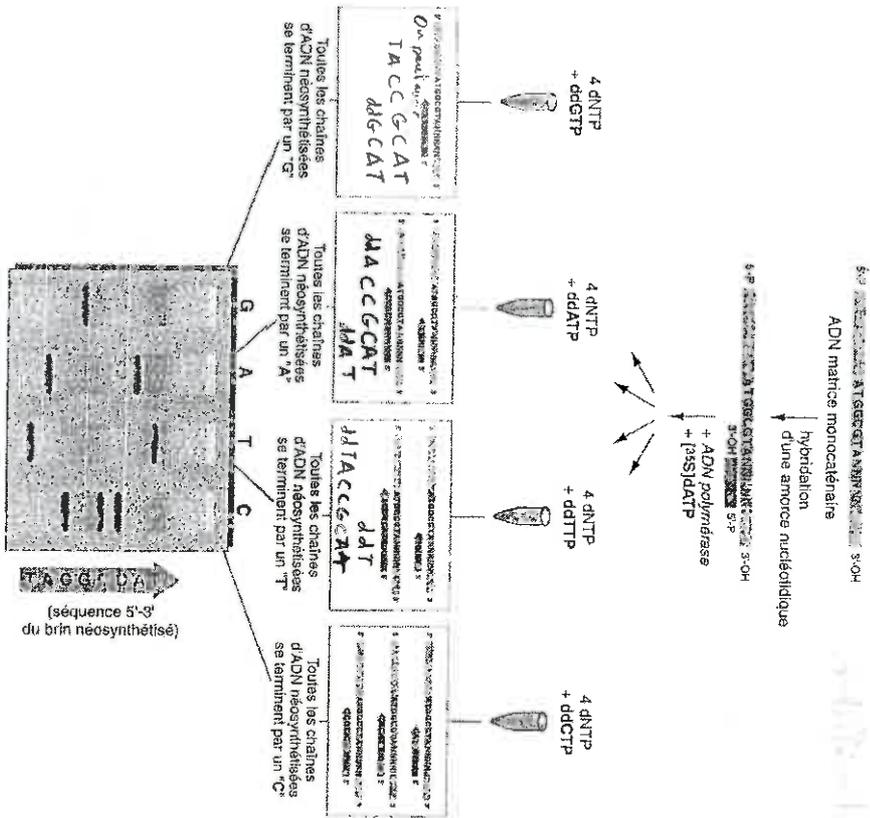
- synthétiser le brin complémentaire *in vitro* en fournissant: une ARN<sup>ADN</sup> polymérase, une amorce d'ADN (10-20 nucléotides complémentaires du début du fragment à séquencer) et des dNTPs.

- ajouter des ddNTPs (=didésoxynucléotides, cad qui n'ont pas de -OH en 3') dans le milieu réactionnel: ils sont ajoutés normalement par l'ADN polymérase à l'extrémité 3' du brin synthétisé, mais ils ne permettent pas l'accrochage du nucléotide suivant  $\Rightarrow$  arrêt de la synthèse de ce brin définitivement après le premier ddNTP incorporé par l'ADN polymérase.

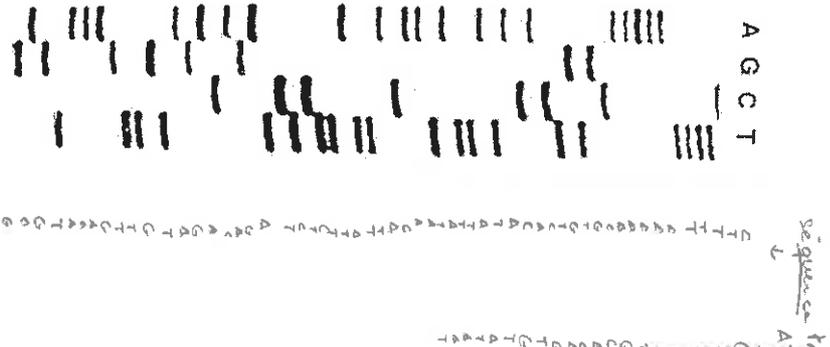
- réaliser 4 tubes en parallèle pour séquencer un fragment avec chacun des ddNTPs.

- Dans chacun des 4 tubes, une famille de brins complémentaires est obtenue. Ces brins sont de longueur variable mais ils se terminent tous par le ddNTP ajouté dans le tube

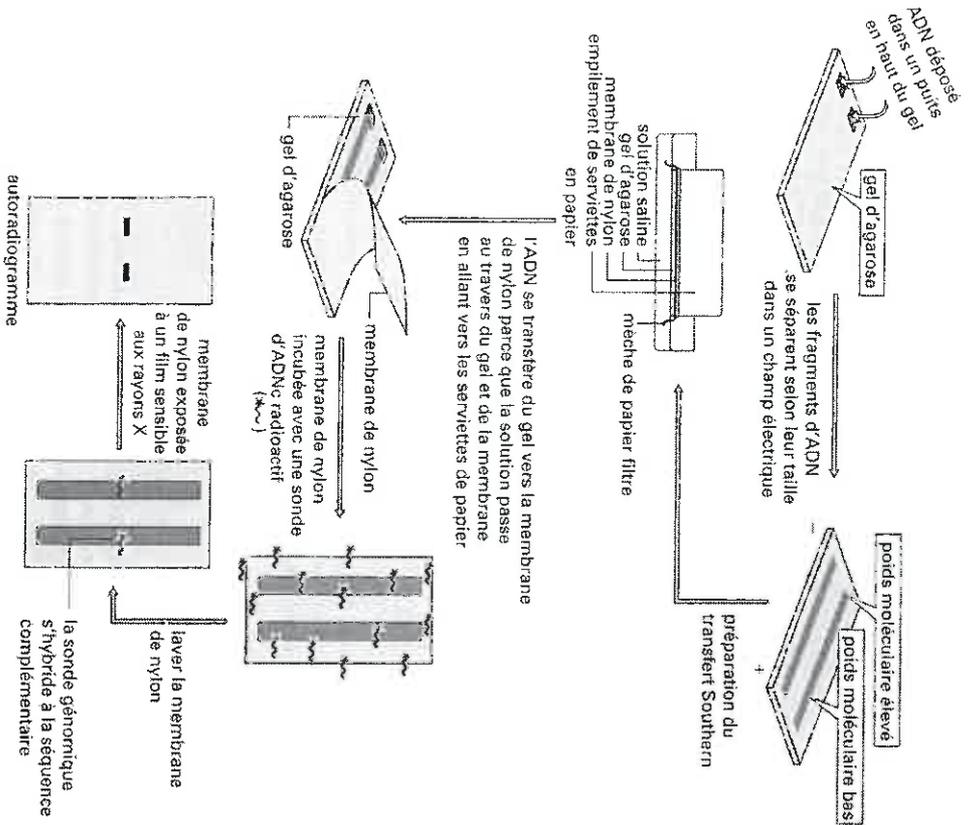
- Séparer les fragments sur gel d'électrophorèse d'acrylamide, ce qui permet de connaître l'espacement à un nucléotide près entre tous les A dans la séquence (tube avec ddATP), tous les T, les G et les C.
- Déterminer la séquence du fragment par comparaison des 4 pistes sur le gel du bas vers le haut, des plus petits fragments vers les plus grands.



Chaque trait désigne une fin de liste  
On en déduit le position des bases



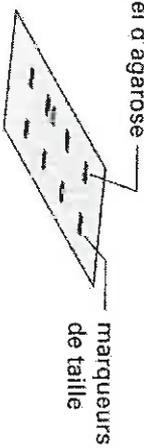
# Fiche 10: Technique d'hybridation moléculaire : Southern et Northern Blot-2



⇒ hybridation révéla l'existence d'un gène

## 1/ Technique de transfert Southern

1. Dénaturer l'ARN
2. Séparer les ARN sur un gel d'agarose dénaturant

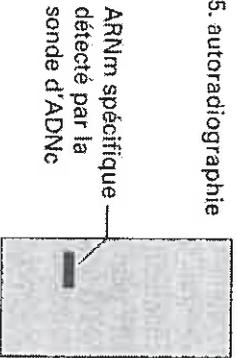


3. transférer l'ARN sur une membrane



4. incuber la membrane avec la sonde d'ADNc

5. autoradiographie



## 2/ Technique de transfert Northern

Extrait d'un animal traité par le phénobarbital

Extrait d'un animal non traité



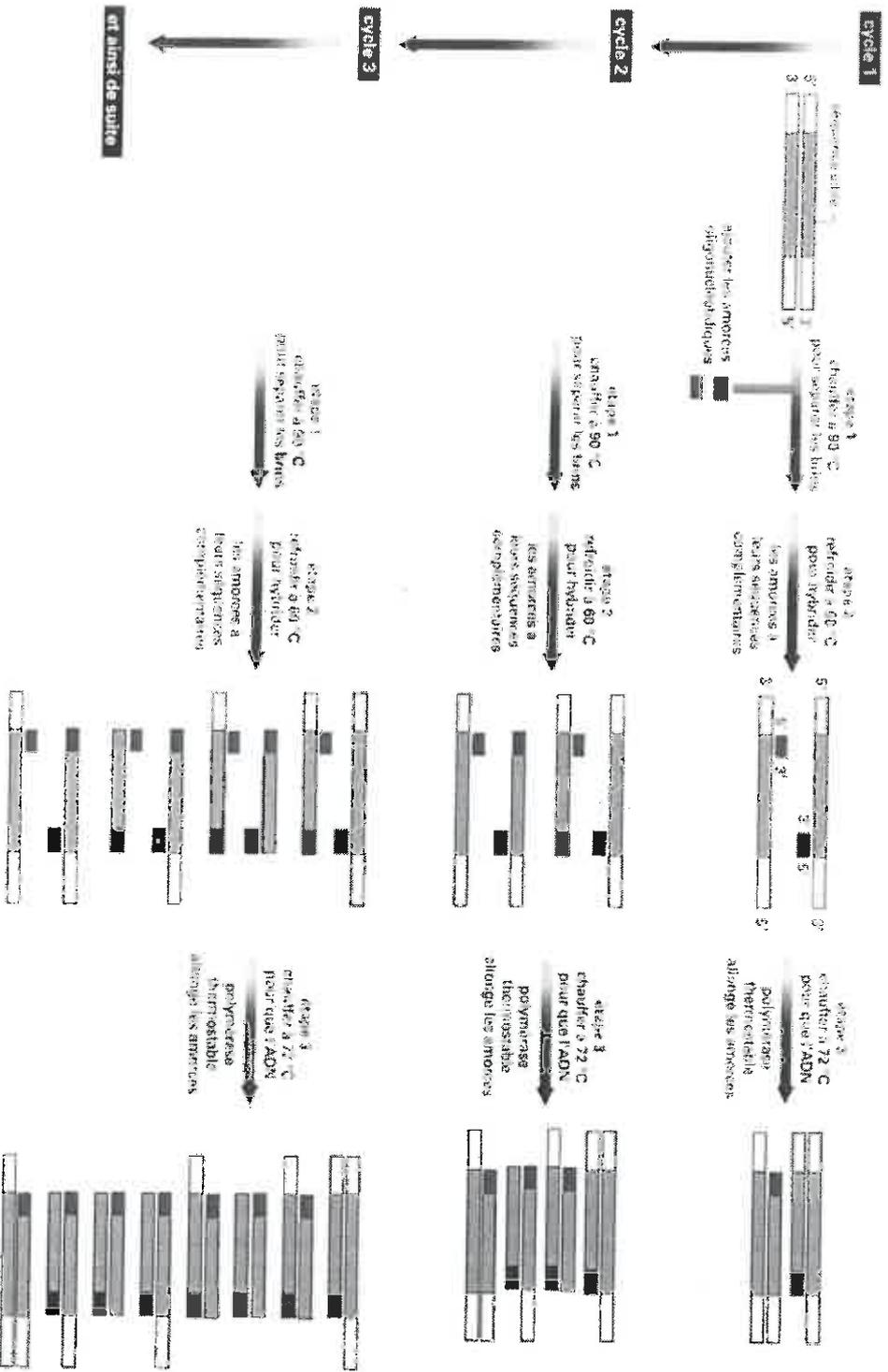
3/ Un transfert northern révèle que le gène CYP2B1 est surexprimé chez les animaux auxquels on donne du phénobarbital

## PCR: Polymérase Chain Reaction

Objectif: réaliser l'amplification d'un fragment d'ADN par répllication *in vitro* ( et non pas *in vivo* dans une bactérie)

### Principe:

- l'ADN double brin à amplifier est dénaturé par chauffage (pour avoir 2 simples brins)
- 2 amorces sont utilisées en même temps, elles encadrent la séquence à amplifier et s'hybrident chacune sur un brin différent, en se faisant face.
- une ADN polymérase purifiée est ajoutée dans le tube, elle réplique les 2 brins modèles en parallèle, à partir des amorces
- 2 molécules filles sont alors obtenues dans la région à amplifier
- les 4 brins d'ADN vont maintenant pouvoir servir de brin modèle pour un deuxième cycle de répllication.



## Fiche 12 : Étude d'un promoteur par gène rapporteur-1

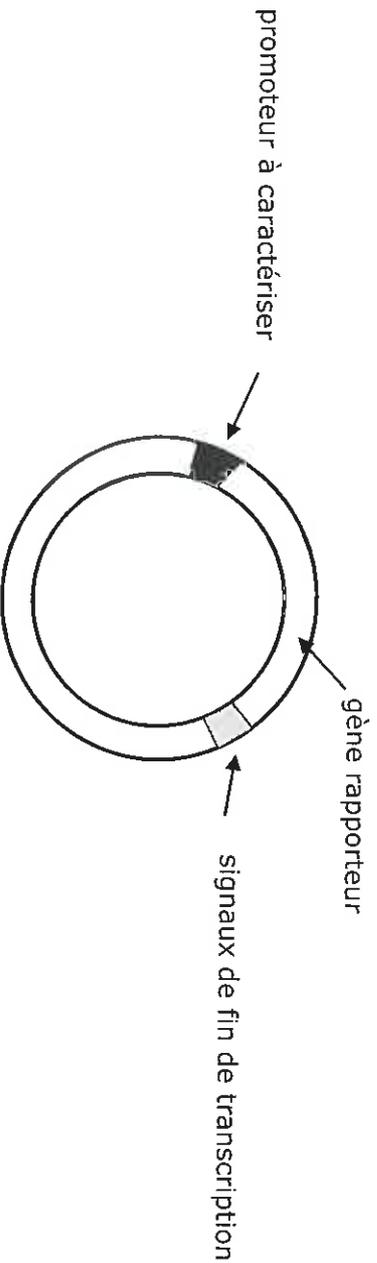
Objectif: Identifier les facteurs de transcription spécifiques et les zones du promoteur qui jouent un rôle dans le taux de transcription du gène étudié.

Principe :

- Le profil d'expression d'une protéine donnée dépend principalement de son promoteur et des facteurs de transcription spécifique présents à un moment donné dans la cellule.
- comme les protéines étudiées sont le plus souvent difficiles à détecter ou doser (protéine mal connue, pas de protocole facile,...), la séquence codante du gène à étudier est remplacée par la séquence codante d'une protéine facile à détecter ou doser (=protéine rapporteur):
  - protéine CAT (chloramphénicol acétyl transférase): enzyme facilement dosable *in vitro*
  - protéine  $\beta$  gal ( $\beta$  galactosidase): enzyme facilement dosable *in vitro* et facilement détectable *in situ* (produit formé bleu )
  - protéine GFP (green fluorescent protein) : protéine naturellement fluorescente, donc facilement détectable *in situ*
- si le promoteur est inchangé, cette protéine rapporteur sera produite dans les mêmes conditions que la protéine à étudier : dans les mêmes tissus, avec le même profil d'expression en réponse à certains signaux ou durant le développement.

Protocole

- Construire un gène recombinant : promoteur du gène à étudier + séquence codante du gène rapporteur + signaux de fin de transcription



- Introduire ce gène dans un plasmide
- Transformer des cellules en culture ou des organismes avec ce plasmide

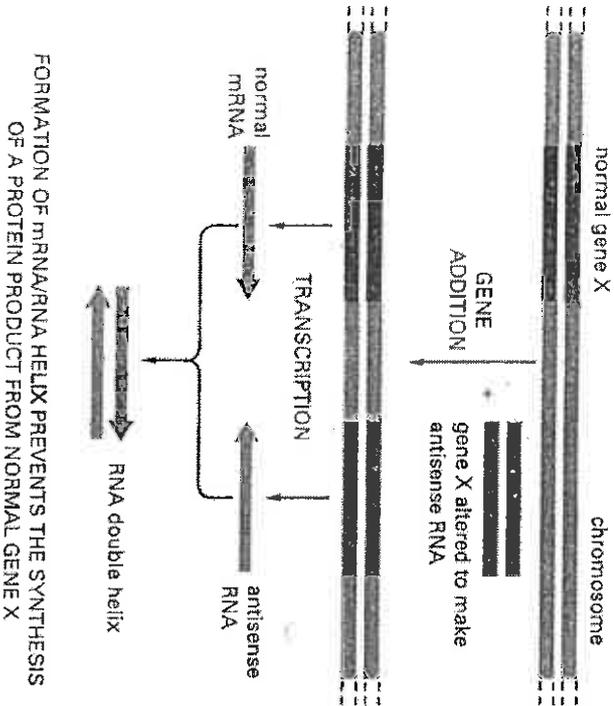
# Fiche 13 : L'inactivation de gène par ARN antisens

## Objectif :

supprimer l'expression d'un gène particulier dans un organisme, dans un but soit d'amélioration agronomique (gène néfaste pour l'utilisation par l'homme de cet organisme) soit de recherche (découvrir à quoi sert ce gène en analysant les problèmes entraînés par son absence).

## Principe :

- un ARN anti-sens est un ARN complémentaire de l'ARN messenger du gène à inactiver
- dans la cellule, il s'apparie de manière stable avec cet ARNm cible, ce qui empêche toute traduction au niveau du ribosome, donc plus de synthèse de la protéine codée par l'ARNm cible.
- l'expression du gène cible est ainsi très fortement voire complètement inhibée.



## The antisense RNA

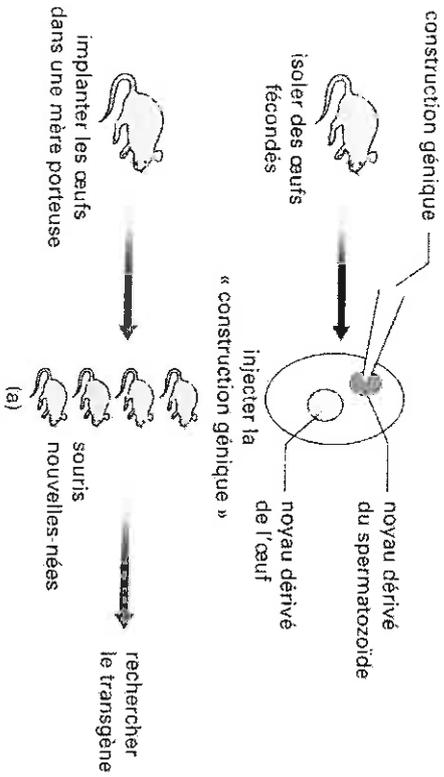
strategy for generating dominant negative mutations. Mutant genes that have been engineered to produce antisense RNA, which is complementary in sequence to the RNA made by the normal gene X, can cause double-stranded RNA to form inside cells. If a large excess of the antisense RNA is produced, it can hybridize with—and thereby inactivate—most of the normal RNA produced by gene X. Although in the future it may become possible to inactivate any gene in this way, at present the technique seems to work for some genes but not others.

## Protocole

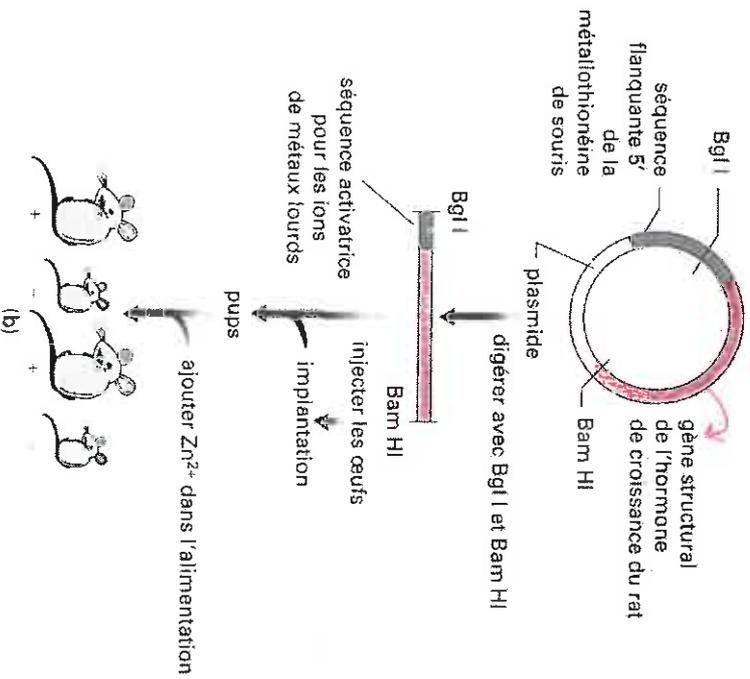
- Construire un gène recombinant : promoteur du gène cible + séquence du brin anti-sens (au lieu du brin sens) + signaux de fin de transcription.
- Transformer les cellules avec ce gène recombinant
- Régénérer des individus transgéniques, mesurer le niveau d'expression du gène cible dans chaque individu , sélectionner les individus présentant une inhibition totale ou très marquée.

# Fiche 15 : Transgénèse animale

**Principe:** Un animal transgénétique est produit par introduction d'un gène étranger dans le noyau d'un œuf fécondé. L'œuf est implanté dans une mère porteuse et la progéniture testée pour déterminer si elle porte le gène étranger.



- Ex: le gène de la métallothionéine contient une séquence activatrice pour les ions de métaux lourds
- Les souris + portent le transgène
  - Les souris - n'ont pas le transgène



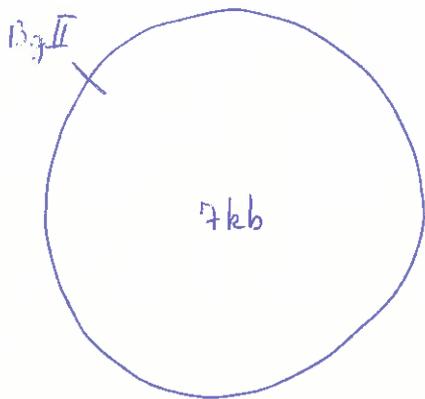
ADN c

South	ADN	ADN
North	ARN	ARN
West	protéine	anticorps

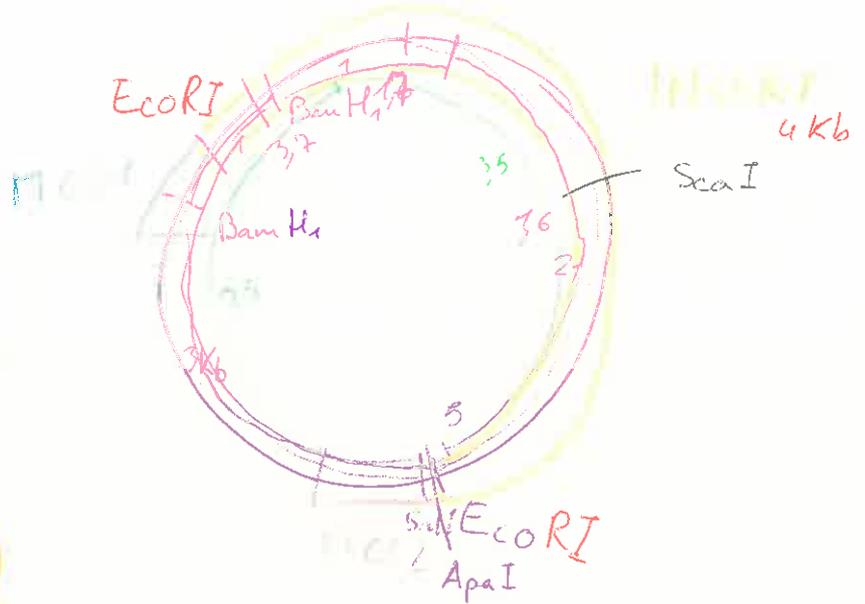
↳  $K_{12}$  type : colonies résistance à l'ampicilline → elles ont le vecteur  
 certaines colorent le X-gal → pas d'insert  
 d'autres non → LacZ "détruit" → insert

↓ si il y a insert, inhibition du gène X

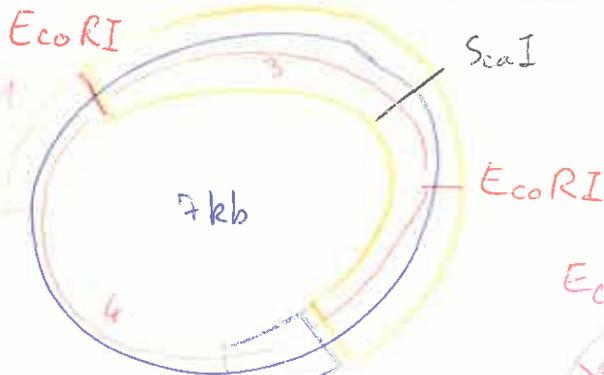
pKSXA  
1 fragment →



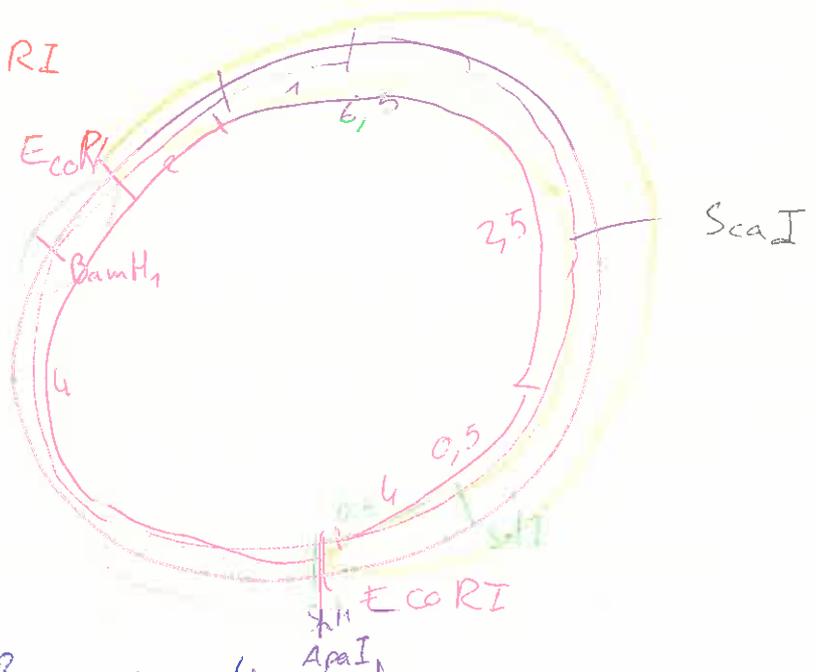
pKSXA



insert (4Kb)



pKSXB

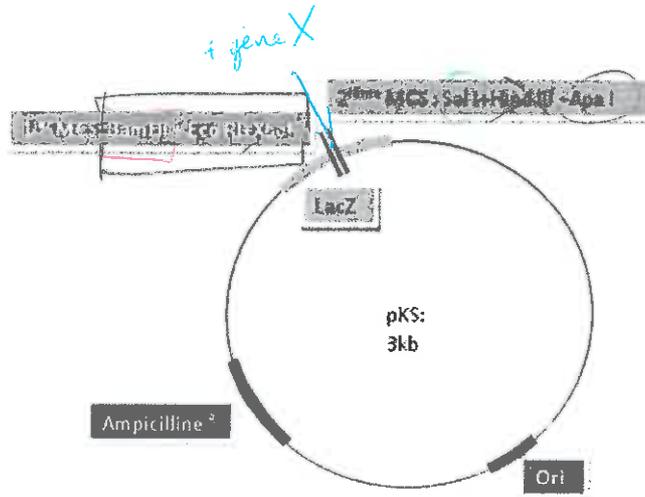


→ L'insert avait 2 façon de s'orienter

Question de génie génétique (temps conseillé 1h00) :

Un ADNc codant pour le gène X de souris a été cloné dans le site EcoRI du vecteur pKS (figure 1). Après ligation, on transforme des bactéries (préparées à partir d'une souche sensible à l'ampicilline) par le produit de cette ligation, puis on étale les transformants sur un milieu en présence d'ampicilline et de X-gal.

Figure 1 :



Rappels : Ori : origine de réplication, MCS : site multiple de clonage.

1) Quel type de colonies contient les plasmides recombinants et pourquoi ?

On prépare l'ADN plasmidique à partir de deux colonies A et B. Les plasmides recombinants pKSXA et pKSXB ainsi obtenus sont digérés par des enzymes de restriction. La taille des fragments d'ADN obtenus est mesurée après migration électrophorétique sur gel d'agarose.

2) A partir des résultats, établir les cartes de restriction de pKSXA et pKSXB.

Enzymes	Tailles des fragments obtenus (en kb)	
	pKSXA	pKSXB
Eco RI	4+3	4+3
Sca I	7	7
Bgl II	①	①
Bam HI	5+1	4+2+1
Sal I	3.5	6.5+0.5
Apa I	3.7+1.7+1.6	4.7+1.6+0.7
BglII + SalI	3.5+2.5+1	4+2.5+0.5

Dans l'insert

les 2 ont le vecteur normal, sinon elles seraient couvrées par l'ampicilline

1 Bgl + 1 Sal I