Document téléchargeable sur le site
https://www.svt-tanguy-jean.com/

EPLEFPA Dijon Quetigny Plombières-lès-Dijon
Site de Quetigny (21) • LEGTA Olivier de Serres
Classe préparatoire ATS (Adaptation Technicien Supérieur) Biologie
Préparation des Concours agronomiques et vétérinaires (voie C)

ENSEIGNEMENT DE BIOLOGIE • COURS
Partie A. L'unité et la diversité du monde vivant
Sous-partie A.3. L'unité et la diversité du monde vivant à l'échelle des organismes
[A.3.3. La modification du génome des organismes au moyen des biotechnologies]

Chapitre 9

Techniques de biologie moléculaire, génie génétique et biotechnologies

Objectifs : extraits du programme

3.3 La modification du génome des organismes au moyen des biotechnologies	
	- Les Organismes Génétiquement Modifiés (OGM) sont présentés. Cette étude permet de montrer les méthodes de transfert des gènes d'intérêt par génie génétique : transferts directs (électroporation, micro-injection, biolistique) et indirects (transformation via un vecteur plasmidique, transgénèse via un vecteur viral). - Les modalités d'intégration des gènes d'intérêt dans le génome bactérien sont décrites. - Les principes d'utilisation des molécules des génomes viraux (ADN de phage λ, ARN de rétrovirus) en transgénèse sont décrits. C'est l'occasion de développer l'organisation et le fonctionnement viral **Mots-clés** [Avantage sélectif, gène d'intérêt, enzyme de restriction, vecteurs, virus, recombinaison génétique, sélection des souches transformées, expression des transgènes] *Ne pas étudier le détail des techniques impliquant les vecteurs et se limiter au principe général. Limiter la présentation des techniques de biologie moléculaire (PCR et Blots) aux principes généraux.*

Introduction

Les **techniques de biologie moléculaire** regroupent, ***au sens le plus large, l'ensemble des techniques permettant l'étude et la manipulation des molécules biologiques***. Dans les faits, on entend surtout derrière ce terme les ***techniques modernes d'étude des macromolécules biologiques (protéines, acides nucléiques), notamment les acides nucléiques***. Dans une approche plus appliquée aux besoins humains, on peut parler de **biotechnologies** pour désigner ce que l'OCDE propose de définir comme ***« l'application des principes scientifiques et de l'ingénierie à la transformation de matériaux par des agents biologiques pour produire des biens et services »***. Les biotechnologies incluent notamment le **génie génétique** qui désigne ***l'ensemble des techniques permettant l'utilisation ou la modification du génome des organismes***. Parmi ces techniques, on peut citer la technique centrale que le programme invite à étudier : la **transgénèse** qui est la ***production d'organismes génétiquement modifiés (OGM) ou organismes transgéniques***, c'est-à-dire d'***organismes exprimant un gène extérieur (nommé gène d'intérêt) à leur espèce ajouté artificiellement par l'homme à leur génome*** (figure 1).

Comment les progrès de la biologie moléculaire permettent-ils l'étude des macromolécules aujourd'hui ? Comment le génie génétique permet-il la production d'organismes génétiquement modifiés (OGM) ?

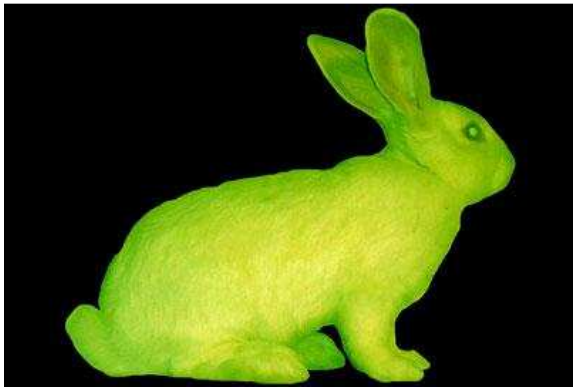


FIGURE 1. Un lapin transgénique (lapin GFP). La *Green Fluorescent Protein* (protéine de florescence verte) est une protéine initialement exprimée par des Méduses et dont le gène a été transféré à de nombreux organismes par transgénèse. http://sciences-et-cetera.fr/bio-arts/ (consultation décembre 2015).

I. Techniques de base d'étude des macromolécules

- À l'heure de la **génomique** et de la **protéomique**, la biologie moléculaire a bénéficié ces dernières années du **développement** et de la **baisse du coût de nombreuses techniques** devenues d'**emploi quotidien** dans les laboratoires.

A. Séparation, purification et isolement de macromolécules

- L'une des premières tâches possibles pour un biochimiste ou un biologiste moléculaire, c'est la **séparation des molécules d'un mélange** de manière à les **identifier** et/ou obtenir une **molécule « pure »**, libérée du mélange dont elle est extraite.

1. Séparation par migration dans un solvant (= éluant) : les chromatographies

a. Principe général

- Une **chromatographie** est basée sur la ***migration d'une phase mobile (mélange dont on veut séparer les constituants), généralement sous l'effet d'un solvant qu'on nomme éluant, sur une phase fixe (support de migration), la différence d'affinité entre les deux phases étant responsable de la migration différentielle des constituants de la phase mobile***.

Voir **TP B3** (Structures de collecte de l'énergie lumineuse) : **chromatographie** de **pigments photosynthétiques**

- Classiquement, l'**identification d'une molécule** se fait par calcul d'un **rapport frontal** (***rapport de la distance de migration de la molécule sur la distance de migration de l'éluant***) (page ci-contre).

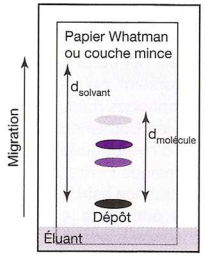
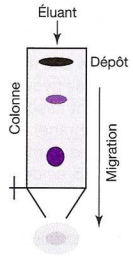
b. Aperçu de la diversité des techniques

- Un aperçu des techniques est proposé par le tableau I.
- On peut citer les techniques suivantes :
  - **Chromatographie sur papier WHATMAN** : ***migration ascendante de l'éluant par capillarité dans un papier spécifique*** (figure 2).
  - **Chromatographie sur couche mince** : ***migration ascendante de l'éluant sur une couche siliceuse qui retient* plus ou moins les constituants*** (figure 2).
  - **Chromatographie sur colonne** : ***migration descendante de l'éluant sur une couche de petites billes qui retiennent* plus ou moins les composés***. On peut ainsi **récupérer** les **différents composés** à des **temps différents d'élution**.
    - **Chromatographie sur colonne échangeuse d'ions** (figure 3) : les ***billes retiennent* les composés selon leur charge***.
    - **Chromatographie d'affinité** (figure 4) : sur les ***billes est fixé un ligand qui retient* seulement les protéines qui peuvent se fixer au ligand***.
    - **Chromatographie d'exclusion** (figure 5) : les ***billes laissent passer les composés en fonction de leur taille***.

* La ***fixation d'un composé à la surface d'un support fixe*** s'appelle **adsorption**.

TABLEAU I. Quelques techniques de chromatographies : un comparatif.
D'après DENŒUD *et al.* (2010).

	Papier Whatman	Adsorption		Exclusion
Partage	Liquide – liquide	Solide – liquide		Solide – liquide
Phase fixe	Eau emprisonnée dans le papier	Solide granuleux		Phase poreuse
Propriété utilisée	Partage entre les deux solvants	Affinité pour le solide		Taille des molécules
Exemple	Chromatographie ascendante	Couche mince	Colonne	Colonne

	Papier Whatman	Adsorption		Exclusion
Critère quantifiable	Rapport frontal	Rapport frontal	Temps d'élution	Temps d'élution des molécules : Petites > grosses
Schéma				

Les différents types de chromatographie.

Le rapport frontal R_f est défini comme le rapport entre la distance parcourue par la molécule étudiée ($d_{molécule}$) et la distance parcourue par le solvant ($d_{solvant}$), soit : $R_f = \frac{d_{molécule}}{d_{solvant}}$.

La résolution d'une chromatographie peut être améliorée en réalisant une chromatographie bidirectionnelle (deux migrations successives à 90°).

Conseils méthodologiques

Vous devez faire attention à ce que l'éluant ne dépasse pas la ligne de dépôt et à arrêter la migration à temps.

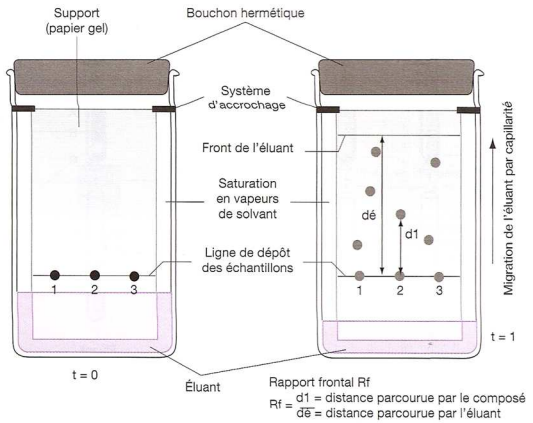
Veillez à toucher le moins possible le support avec vos doigts.

Attention, pour que la migration ait lieu, le bas du support doit tremper dans l'éluant !

Savoir réaliser une chromatographie.

Les étapes de la réalisation d'une chromatographie sont les suivantes.

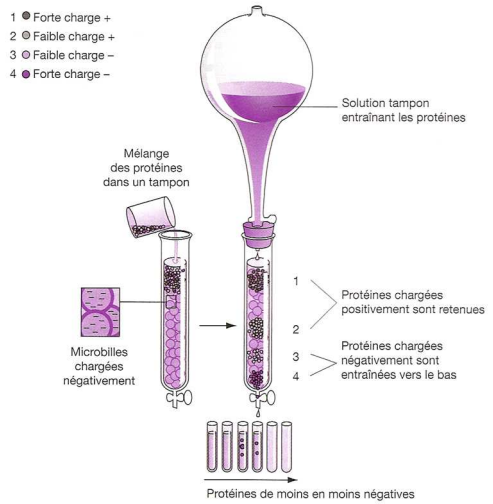
1. *Préparation de la solution à déposer* : elle dépend de ce que l'on cherche à étudier ; dans le cas de pigments photosynthétiques par exemple, on pourra au choix extraire les pigments en écrasant une feuille dans un petit volume de solvant, ou écraser un petit fragment de feuille directement sur la ligne de dépôt (en veillant à ne pas altérer le support).
2. *Dépôt* : il est important de marquer la ligne de dépôt (au crayon gris afin que la ligne de dépôt de migre pas avec l'éluant), cette ligne doit être au-dessus du niveau de l'éluant lors de la migration.
3. *Migration* : elle doit être suffisamment longue pour permettre une bonne séparation des produits, mais être arrêtée avant que le produit qui migre le plus n'atteigne le haut du support. Si les produits sont photosensibles (comme dans le cas de pigments), protégez votre chromatographie de la lumière.
4. *Analyse (après révélation si besoin)* : plusieurs données sont extraites de la chromatographie : nombre de molécules séparées, distance de migration (calcul des rapports frontaux), affinité pour l'éluant…
5. *Extraction des molécules isolées pour caractérisation* : le support peut être découpé autour de chaque « tache » correspondant aux différentes molécules qui peuvent ensuite être extraites par des solvants permettant leur caractérisation plus précise (par exemple pour des pigments photosynthétiques, réalisation d'un spectre d'absorption).



Chromatographie sur papier ou gel de silice

Cette technique sépare des mélanges de substances en utilisant leur solubilité différentielle dans un mélange de solvant (eau, butanol, acide acétique ou butanol, acétone, eau). Le papier ou le gel est au contact du mélange, l'eau imbibe la cellulose du papier ou le gel qui forme la phase stationnaire. Le solvant organique, constitue la phase mobile ; il migre par capillarité et entraîne avec lui les molécules du mélange. Les molécules se séparent selon leur polarité, les molécules hydrophobes se déplaçant plus loin que les hydrophiles. Après une première chromatographie, on améliore la séparation en réalisant une chromatographie bidimensionnelle en utilisant un solvant de composition différente du premier.

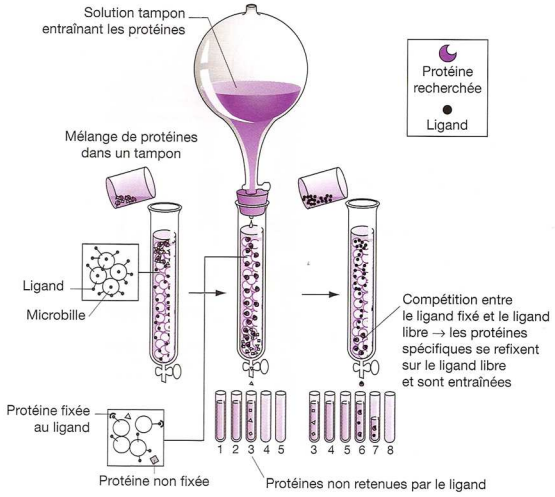
FIGURE 2. <u>Chromatographie sur papier ou gel de silice</u>. D'après BREUIL (2007).



Chromatographie sur résine échangeuse d'ions

Les billes de la résine sont soit chargées positivement soit négativement. Elles repoussent les protéines de même charge qu'elles et retiennent plus ou moins fortement celles de signe opposé. L'affinité d'une protéine pour le gel dépend du pH de l'éluant. Pour une résine anionique, les protéines chargées négativement sortent d'autant plus rapidement qu'elles sont négatives ; les protéines chargées positivement sortent d'autant plus lentement qu'elles possèdent une charge positive élevée.

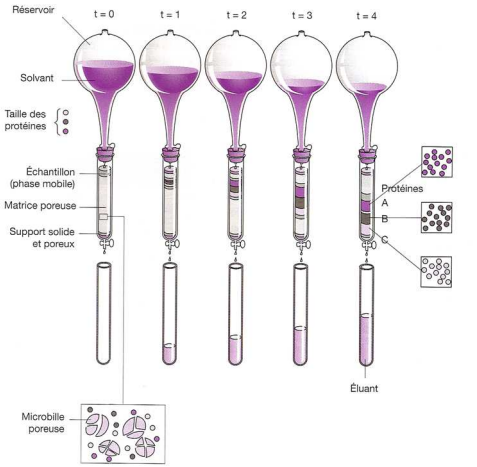
FIGURE 3. <u>Chromatographie sur colonne échangeuse d'ions</u>. D'après BREUIL (2007).



Chromatographie d'affinité

Cette chromatographie sépare les protéines selon leur affinité pour un ligand fixé de manière covalente sur les billes. Les protéines complémentaires du ligand s'y attachent et y restent accrochées alors que celles qui ne le sont pas traversent la colonne sans y être retenues. L'élution de la protéine est obtenue soit par une solution contenant le ligand, soit en faisant varier le pH de la solution ce qui diminue l'affinité de la protéine pour son ligand.

FIGURE 4. <u>Chromatographie d'affinité</u>. D'après BREUIL (2007).



Cette chromatographie dite de gel-filtration utilise des petites billes poreuses. Les petites molécules passent dans les pores de la bille en étant entraînées par le solvant alors que les molécules plus grosses ne le peuvent pas et circulent entre les billes, leur vitesse dépend de l'importance des interactions avec le gel. Les grosses molécules prennent donc moins de temps pour traverser la colonne. Ainsi, plus la colonne est longue, plus la séparation est efficace, mais la diffusion des protéines dans la colonne élargit les bandes, ce qui diminue le pouvoir de résolution de la méthode. Les diverses protéines de l'échantillon sont récoltées dans des tubes différents à mesure qu'ils arrivent au bas de la colonne.

FIGURE 5. <u>Chromatographie d'exclusion</u>. D'après BREUIL (2007).

2. Séparation par migration dans un champ électrique : les électrophorèses

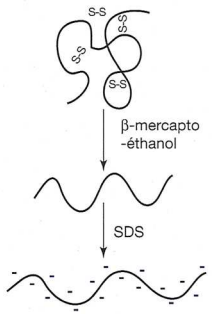
- Une **électrophorèse** est une ***séparation des constituants d'un mélange selon leur capacité à migrer dans un champ électrique*** (figures 6-7). Cette technique est fréquemment utilisée sur les **protéines** ou les **acides nucléiques**.
- Elle peut se faire sur du **papier** mais se fait généralement sur **gel d'agarose ou de polyacrilamide**. Des **puits** sont **creusés dans le gel** où sont **déposés** les mélanges à étudier (souvent **colorés**) ; un des puits contient généralement un **marqueur de taille/masse** qui servira de ***référence pour évaluer la taille/masse des substances migrant sur les autres pistes***.
- Les **protéines** sont généralement étudiées en **conditions dénaturantes** dites **SDS PAGE** (*Sodium Dodecyl-Sulfate PolyAcrilamide Gel Electrophoresis*), ce qui permet de s'assurer que ***la migration des protéines est simplement due à leur masse et non leur charge (neutralisée par le SDS)*** (figure 6).

En quoi consiste l'électrophorèse ?

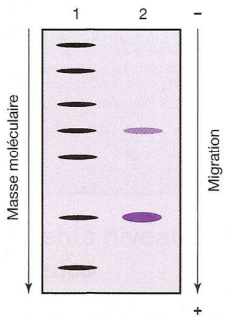
• **L'électrophorèse est une technique de séparation des protéines selon leur mobilité électrophorétique**, c'est-à-dire leur capacité à migrer sous l'influence d'un champ électrique. *La mobilité électrophorétique dépend de la taille et de la charge de la protéine.* Le gel d'électrophorèse (ex. agarose) est recouvert de tampon. Les protéines sont déposées dans un puits creusé dans le gel. Un champ électrique est appliqué au gel et provoque la migration des protéines.

• **L'électrophorèse en conditions dénaturantes permet de s'affranchir du facteur « charge électrique »**. *La mobilité électrophorétique ne dépend plus que de la taille de la protéine*. Cette technique est appelée *SDS-PAGE* (pour *Sodium Dodécyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*). Les protéines sont traitées (Fig.) par du β-mercaptoéthanol (puissant réducteur) qui déroule les protéines en réduisant les ponts disulfures et par du SDS (puissant détergent) qui se fixe aux protéines et les charge très négativement (masquant ainsi la charge initiale de la protéine). Les protéines dénaturées sont déposées dans un gel soumis à un champ électrique et migrent vers le pôle positif. Après révélation, chaque protéine apparait sous la forme d'une bande. *Cette technique permet de déterminer la taille des protéines présentes dans la solution.*

⇒ Les protéines sont des ampholytes. Leur charge dépend du pH. Le *point iso-ionique* (p_I) est le pH auquel la protéine est électriquement neutre. Cependant, les tampons d'électrophorèse contiennent des ions susceptibles de se fixer à la protéine et d'en modifier la charge. Le *pH isoélectrique* (pH_I) est la valeur expérimentale du pH à laquelle la protéine ne migre pas. Pour réaliser une électrophorèse, il faut donc se placer à un pH éloigné des pH_I des protéines de la solution.



Effet des conditions dénaturantes sur les protéines.



Exemple théorique de résultat de SDS-PAGE. Dans le puits 1 a été déposée une solution de marqueurs de masse moléculaires connus. Dans le puits 2 a été déposée la solution protéique étudiée.

⇒ Pour estimer la *masse moléculaire* d'une protéine, la position de sa bande est comparée à celles des marqueurs introduits. La largeur des bandes vous permet quant à elle d'estimer la quantité de protéine.

FIGURE 6. Principe de l'électrophorèse, notamment SDS PAGE. D'après DENŒUD *et al.* (2013).

- Dans le cas des acides nucléiques, le marqueur est un **marqueur de taille** : ***on évalue la longueur en pb des fragments d'ADN ou d'ARN présents initialement dans les puits***.
- Dans le cas des protéines, le marqueur est un **marqueur de masse** : ***on évalue la masse (en Da ou plutôt kDa) des protéines***.
- ***Les macromolécules de taille/masse importante migrent plus lentement que celles de taille/masse plus faible***.
- Une électrophorèse permet l'obtention d'un **électrophorégramme** ou **profil électrophorétique**.

Conseils méthodologiques

Savoir réaliser une électrophorèse.

En conditions dénaturantes, les protéines migrent vers le pôle positif, faites plutôt votre dépôt du côté du gel qui sera vers le pôle négatif. En conditions natives, les protéines peuvent migrer d'un côté comme de l'autre, faites plutôt votre dépôt au centre du gel.

Dans le cas d'une électrophorèse en conditions dénaturantes, on ajoute un traitement au β-mercaptoéthanol et SDS entre l'étape de lyse et l'ajout du colorant.

Le pourcentage d'agarose détermine la résolution du gel, plus le gel est concentré, plus les molécules seront séparées (en général, entre 0,3 et 2 % d'agarose).

Déposez les échantillons doucement au fond du puits pour éviter qu'il ne ressorte ou se mélange au puits voisin.

Avant d'allumer les électrodes, vérifier l'endroit du dépôt et le sens présumé de migration (vers les 2 pôles en conditions natives, vers le pôle positif en conditions dénaturantes).

Les étapes de la réalisation d'une électrophorèse sont les suivantes.

1. *Préparation de la solution à déposer* : les cellules sont lysées pour obtenir la solution de protéines. Un colorant est ajouté à la solution pour faciliter le dépôt.

2. *Préparation du gel d'électrophorèse* : le gel d'agarose est préparé en mélangeant de l'agarose (poudre) et du tampon (souvent Tris/Acétate/EDTA) chauffé au micro-onde, puis coulé dans le moule, en ajoutant le peigne qui permet de créer les puits nécessaires au dépôt. Une fois sec, le gel est placé dans la cuve et recouvert de tampon.

3. *Dépôt des échantillons* : les échantillons sont déposés un à un dans les puits, un puits étant réservé à l'échelle de taille (celui du milieu, ou un de chaque côté, pour faciliter la lecture).

4. *Migration* : fermer la cuve et brancher les électrodes. Surveillez la migration grâce à l'échelle de taille et le colorant (les molécules doivent être séparées mais ne doivent pas sortir du gel).

5. *Analyse* : l'électrophorèse de protéines peut être révélée directement par un colorant (rouge ponceau par exemple), ou suivie d'un western blot.

FIGURE 7. Déroulement d'une électrophorèse (pour information).
D'après DENŒUD *et al.* (2013).

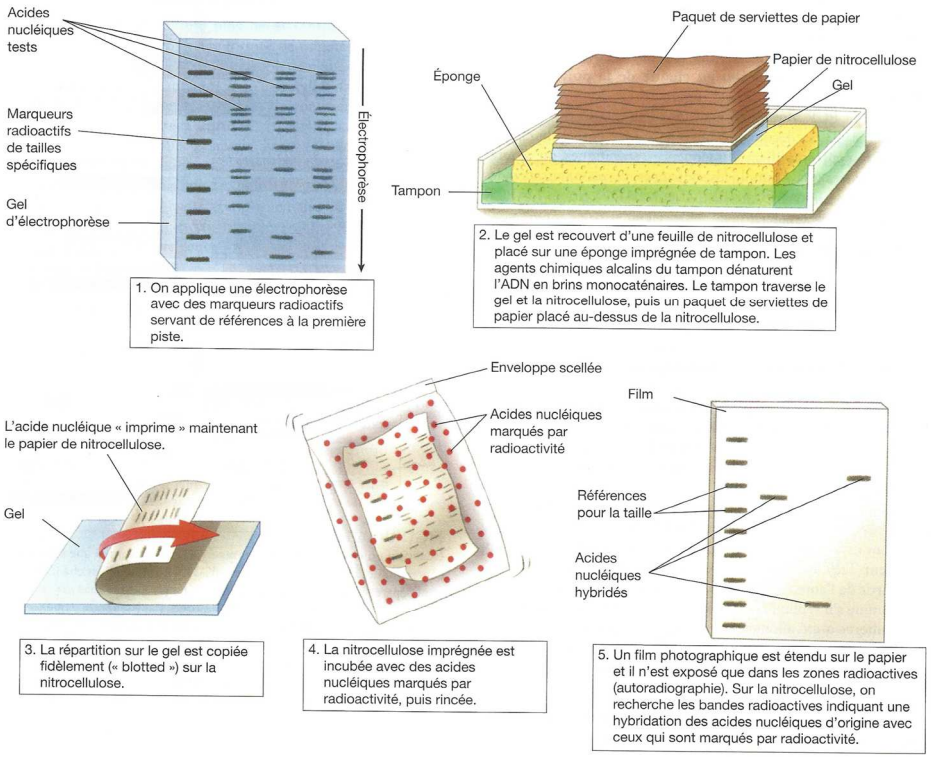
3. D'autres méthodes applicables

- Les **méthodes classiques de la chimie** (distillation, montage à reflux, **entraînement par la vapeur**…) ou de la **biologie** (**centrifugation**, **dialyse** au travers d'un sac à pores de taille connue…) peuvent aussi être appliquées à la **séparation** et la **récupération** de **macromolécules**. Les **ultracentrifugations** sont particulièrement utilisées avec les **acides nucléiques**.

B. Buvardages avec emploi de révélateurs : les *Blots*

1. Principe général

- Les ***Blots*** visent à ***identifier certaines protéines ou certaines séquences particulières d'acides nucléiques après migration électrophorétique au moyen d'anticorps complémentaires de protéines pour les protéines ou de sondes ADN ou ARN pour les acides nucléiques***.



La méthode « Southern blot ». E.M. Southern a mis au point cette méthode en 1975 pour mettre en évidence des fragments d'ADN d'intérêt dans un mélange complexe contenant de nombreux autres fragments de même taille. L'ADN est séparé sur un gel, puis transféré (« blotted ») sur un support solide comme du papier de nitrocellulose ou une membrane de nylon. Ce support est ensuite incubé avec une copie monocaténaire du gène d'intérêt qui s'hybride à la tache où se trouve un fragment possédant une séquence complémentaire. Les fragments d'intérêt sont identifiés sur le support par la position des bandes radioactives.

FIGURE 8. Le *Southern Blot* (étude des ADN). D'après RAVEN *et al.* (2007).

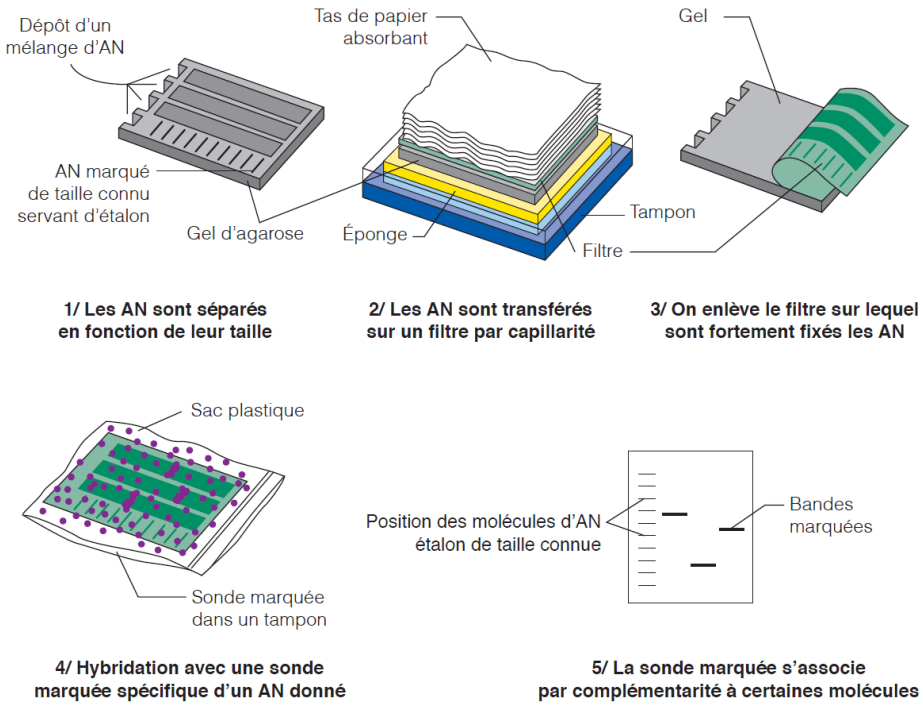


FIGURE 9. Le *Southern Blot* (étude des ADN) et le *Northern Blot* (étude des ARN) : une vision simplifiée. D'après SEGARRA *et al.* (2014).
AN = acide nucléique.

2. *Southern Blot*, *Northern Blot* et *Western Blot* : diversité des *Blots*

- On distingue trois types de « *Blots* » selon la nature chimique de la molécule étudiée :
  - ***Southern Blot*** (figures 8-9) : il permet ***l'étude des ADN***. Il comprend les étapes suivantes :
    - **Électrophorèse des fragments d'ADN à étudier (+ un marqueur de taille)**.
    - **Buvardage du profil électrophorétique** : une **réplique du profil** est réalisée sur une **feuille de nitrocellulose** par migration d'une solution tampon.
    - **Incubation de la nitrocellulose** avec des **sondes ADN monobrin (ou d'ARN) marquées (souvent radioactivement) complémentaires des séquences ADN recherchées** qui **s'hydrident** avec ces **séquences-cibles**.
    - **Révélation** (recherche de la radioactivité) sur la **nitrocellulose** pour localiser les **séquences cibles**.
  - ***Northern Blot*** (figure 9) : il permet ***l'étude des ARN***. Il présente le même **principe que le *Southern Blot*** sauf que les **séquences cibles** sont des **ARN** ; les sondes peuvent être des **ARN** ou des **ADN monobrins**.

- ***Western Blot*** (figure 10) : il permet ***l'étude des protéines qui sont révélées par immunodétection après buvardage***. On désigne parfois cette technique par le terme « **immunobuvardage** ».
  - Après **migration électrophorétique**, un **buvardage du profil obtenu** (*Blot*) est réalisé soit par un **champ électrique**, soit au moyen d'un **solvant tampon** comme pour les autres *Blots*.
  - Cette réplique est alors soumise à un **anticorps anti-protéine cible (anticorps primaire)** ; on utilise généralement ensuite un **anticorps secondaire** (anti-Ac primaire) le plus souvent couplé à un **fluorochrome**, une **enzyme**… *Il arrive toutefois qu'il n'y ait qu'un seul anticorps qui permette directement la révélation.*
  - La **révélation** des **protéines recherchées** se fera par **révélation de la fluorescence** (excitation du fluorochrome) ou **réaction enzymatique** (ajout du substrat de l'enzyme).

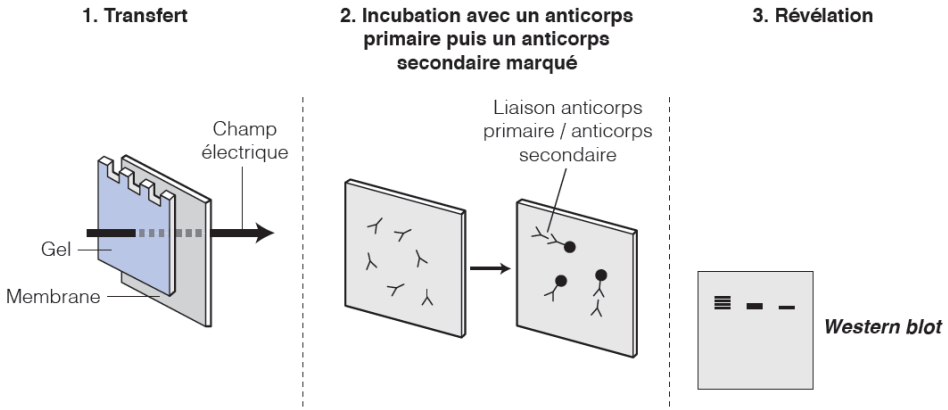


FIGURE 10. Étapes du Western Blot (étude des protéines). D'après SEGARRA *et al.* (2014).

> Le ***Southern Blot*** est le **premier test inventé** en 1975 par le Britannique Edwin M. SOUTHERN (né en 1938). Par la suite, les autres tests ont été **humoristiquement** baptisés avec d'autres **points cardinaux** en hommage à ce scientifique. L'***Eastern Blot*** n'existe pas !

C. Les puces à ADN (= biopuces), outils d'analyse génétique à grande échelle [*pour information*]

- Les **puces à ADN** ou **biopuces** (figure 11) sont des ***plaques rigides (en verre ou plastique) dont la surface est subdivisée en quelques milliers à quelques dizaines de milliers de zones de dépôt d'acides nucléiques (spots) répartis sur quelques cm²***.
- ***Chaque*** **zone de dépôt** comprend une **sonde à ADN monobrin (ADN dénaturé)**.
- On dépose ensuite, par un procédé assisté par ordinateur, des **ADN monobrins** généralement **construits à partir d'ARN rétrotranscrits** et **couplés à des fluorochromes**.
- La **révélation par fluorescence** permet de savoir si les **fragments d'ADN déposés** se sont ou non **hybridés avec les sondes de la puce**, et donc si telle ou telle séquence est exprimée par une population de cellules. *Notons qu'on peut étudier, en jouant sur diverses couleurs, plusieurs populations de cellules conjointement (souvent deux).*

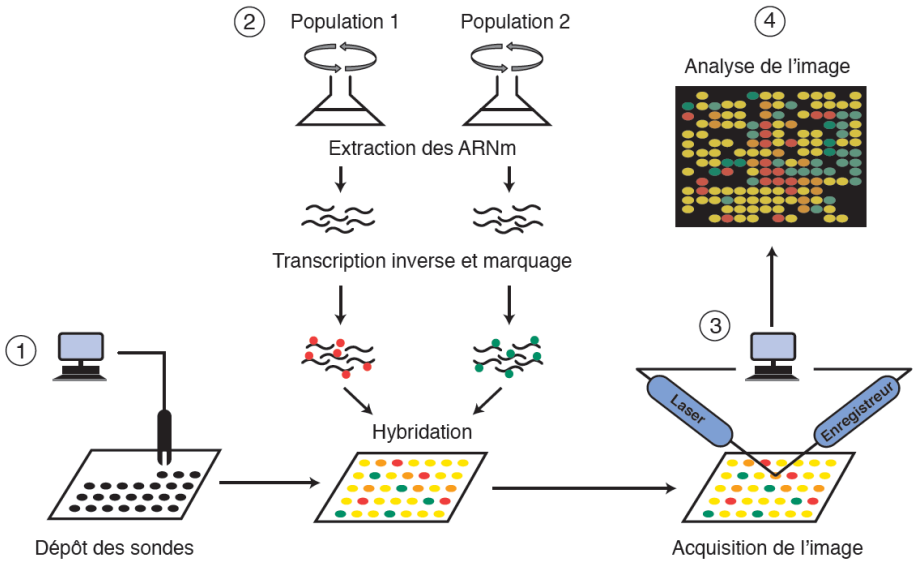
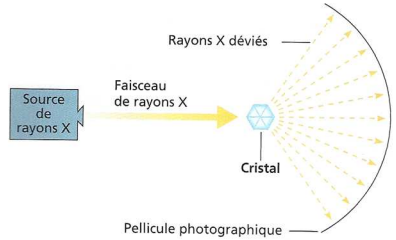


FIGURE 11. Principe des puces à ADN (pour information). D'après SEGARRA *et al.* (2014).

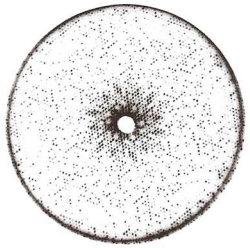
D. Élucidation de la structure tridimensionnelle d'une protéine : diffraction aux rayons X et informatique [*pour information*]

- L'**élucidation de la structure tridimensionnelle des protéines** repose sur :
  - Le **séquençage de la protéine** (ou la déduction de cette **séquence peptidique** à partir de la **séquence nucléotidique de l'ARNm** correspondant)
  - L'**usage de la diffraction aux rayons X**
  - L'emploi du l'**outil informatique**.
- La figure 12 résume le principe de cette étude.

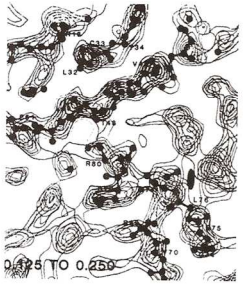
> Deux remarques :
> - *Avant l'avènement de l'informatique, l'interprétation d'un cliché de diffraction était un travail long et fastidieux nécessitant un haut niveau de spécialisation.*
> - *C'est avec un cliché utilisant cette technique, produit par Rosalind FRANKLIN, que CRICK & WATSON ont déterminé la structure de l'ADN en 1953.*



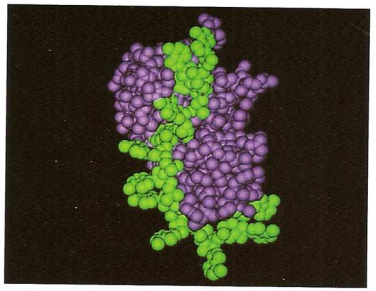
❶ **Cristallographie par diffraction de rayons X.** Un instrument émet un faisceau de rayons X vers la protéine cristallisée. Les atomes régulièrement espacés du cristal diffractent (dévient) les rayons X selon une disposition ordonnée.



❷ **Figure de diffraction des rayons X provenant d'une protéine cristallisée.** Les rayons X déviés impressionnent une pellicule photographique, produisant un ensemble de points.



❸ **Carte de densité électronique.** À partir de ces figures de diffraction, des ordinateurs dressent les cartes de densité électronique de coupes transversales successives de la protéine. En combinant l'information qui est fournie par les cartes de densité électronique et celle qui porte sur la structure primaire de la protéine (telle que déterminée par des méthodes chimiques), il est possible de tracer le graphique des coordonnées spatiales (*x, y, z*) de chaque atome.



❹ **Modèle par infographie de la ribonucléase (violet) liée à un court brin d'acide nucléique (vert).** Finalement, les logiciels graphiques produisent une image qui montre la position de chaque atome dans la molécule. On peut faire tourner l'image sur l'écran afin de voir la molécule sous divers angles.

Cristallographie par diffraction de rayons X. Ces illustrations (une gracieuseté du Département de biochimie de l'Université de Californie à Riverside) montrent comment, à l'aide de la cristallographie par diffraction de rayons X, les scientifiques déterminent la structure tridimensionnelle d'une protéine. La protéine illustrée ici est une enzyme appelée ribonucléase liée à une molécule d'acide nucléique. La première étape consiste à cristalliser la protéine. L'analyse informatique des résultats de la cristallographie fixe sur une image la position de chaque atome dans l'espace tridimensionnel de la molécule. Finalement, les scientifiques font appel à un autre logiciel pour générer un modèle tridimensionnel de l'enzyme.

FIGURE 12. Élucidation de la structure tridimensionnelle des protéines.
D'après CAMPBELL & REECE (2004).

E. Amplification de séquences d'ADN : la réaction en chaîne de la polymérase (PCR)

- Dès qu'un **gène** est **identifié** et **isolé**, il convient d'en **produire une grande quantité de copies**, ce qui est permis par la **réaction en chaîne de la polymérase** ou **PCR** (*Polymerase Chain Reaction*). ***Cette réaction repose sur des cycles (répétés de nombreuses fois) de dénaturation de l'ADN, fixation d'amorces sur les brins séparés et polymérisation d'ADN par une polymérase agissant à chaud (72 °C), la Taq polymérase*** (provenant d'une Eubactérie thermophile *Thermophilus aquaticus*) (figure 13).

Il existe aussi la **RT PCR** (*reverse transcription PCR*) qui ***permet d'amplifier une séquence d'ARN en ADN*** : avant le premier cycle, ***l'ARN est rétrotranscrit*** par une **transcriptase inverse** en **ADNc (ADN complémentaire)** puis la **PCR** a lieu sur cet ADNc.

Encadré A Quelques détails techniques sur la PCR

(Au-delà du programme : pour information – d'après HARRY, 2008)

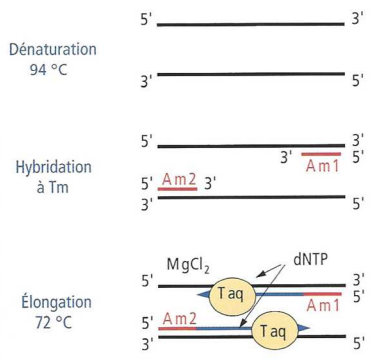
• LA RÉACTION DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE (PCR)

Le principe de la **PCR** (pour « Polymerase Chain Reaction » ou Réaction de Polymérisation en Chaîne a été décrit par Saiki et collaborateurs en 1985 et sa mise au point a récompensé du prix Nobel de Chimie K. Mullis en 1993. La PCR a depuis été développée pour un certain nombre d'applications.

Cette technique permet l'obtention d'un très grand nombre de copies d'un segment particulier d'ADN, nommé ADN cible. Le principe de cette technique consiste à utiliser deux amorces, courtes séquences d'ADN de 18 à 24 nucléotides, qui s'hybrident à des sites complémentaires situés en orientation inversée sur les deux brins de l'ADN et qui encadrent la région que l'on veut amplifier. L'élongation des brins complémentaires à partir des amorces est assurée par une enzyme, l'ADN polymérase. Alors que le principe de la PCR a été décrit en 1985, en 1988 la PCR devient encore plus performante avec l'emploi de la **Taq polymérase** dérivée d'une bactérie thermophile, *Thermus aquaticus*, isolée des sources chaudes du parc de Yellowstone et qui présente la propriété d'être stable à la chaleur.

La réaction de PCR repose sur trois étapes (figure) :

- la **dénaturation** de l'ADN réalisée à haute température (30 sec à 1 min à 94 °C) conduit à la séparation des brins d'ADN ;
- l'**hybridation** des amorces spécifiques se réalise à une température déterminée par rapport à la température de fusion des amorces notée **Tm** (30 sec à 2 min à 50-60 °C) ;
- l'**élongation** des brins d'ADN est effectuée à 72 °C (30 sec à 1 min).



La PCR comporte trois étapes : dénaturation, hybridation et élongation.

La durée de ces étapes dépend de plusieurs facteurs, comme la performance de l'appareil utilisé et la longueur des fragments à amplifier. Les produits de PCR obtenus sont désignés sous le terme d'**amplicons**.

Pour effectuer une PCR, on utilise un thermocycleur qui peut contenir plusieurs blocs. Chaque bloc peut contenir de 25 à 96 microtubes ou une microplaque selon les modèles.

Chaque microtube contient, outre du tampon :
– l'ADN de l'organisme à partir duquel on veut amplifier une région cible, cet ADN servant de matrice ;
– les deux amorces encadrant la région à amplifier ;
– des dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) à partir desquels les brins complémentaires seront synthétisés ;
– du $MgCl_2$, cofacteur de la réaction ;
– de la Taq polymérase qui polymérise la réaction.

Notons que la détermination de la concentration en $MgCl_2$ est importante et se situe entre 1,0 et 3,0 mM. En effet, un excès de $MgCl_2$ provoque des hybridations non spécifiques et un manque de $MgCl_2$ induit une diminution de l'activité de la polymérase.

Pour chaque PCR, on établit pour un bloc un programme comprenant un cycle de trois températures (dénaturation, hybridation, élongation) répété de 20 à 40 fois. À chaque cycle, la quantité d'ADN est amplifiée par un facteur de 2, puisque chacun des deux brins d'ADN nouvellement synthétisés sert de matrice à la fabrication d'un nouveau brin complémentaire. À l'issue de la PCR, n cycles produisent en théorie 2^n – (2n) amplicons.

Une séquence peut être amplifiée par un facteur de 10 millions avec une haute spécificité.

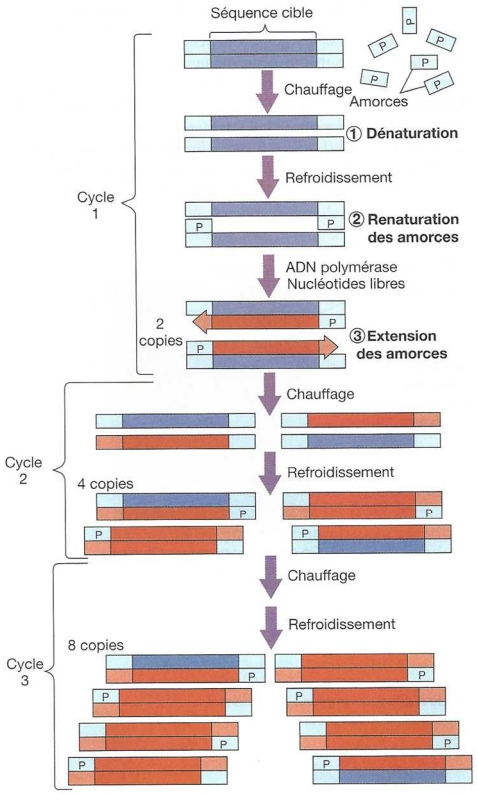
Les amplifiats obtenus après PCR sont vérifiés sur gel d'agarose. Leur taille doit correspondre à la taille attendue pour la région ciblée (figure 4.3).

La **RT-PCR** (pour « Reverse Transcriptase PCR ») permet l'amplification d'une région donnée à partir d'ARNm. Cette réaction a comme première étape, étape de rétro-transcription (RT) la conversion des ARNm en ADN simple brin (ADNc pour ADN complémentaire) en utilisant une enzyme d'origine virale, la **transcriptase inverse**. Cet ADN sert ensuite de matrice pour la réaction de PCR classique.

Étape 1 : dénaturation. On part d'un mélange contenant l'amorce présente en excès (généralement une séquence synthétique de 20 à 30 nucléotides) et du fragment d'ADN à amplifier. Ce mélange d'amorces et de fragments est chauffé à environ 98°C. À cette température, le fragment d'ADN bicaténaire se dissocie en brins monocaténaires.

Étape 2 : renaturation (*annealing*) des amorces. La solution est ensuite refroidie à 60°C environ. En refroidissant, les brins isolés d'ADN se réassocient en brins bicaténaires. Cependant, en raison de l'important excès d'amorce, chaque brin du fragment forme des paires de bases avec une amorce complémentaire voisine de la région à amplifier, le reste du fragment restant simple.

Étape 3 : extension de l'amorce. On ajoute maintenant une ADN polymérase très thermostable, la polymérase Taq (du nom de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus*, d'où provient Taq), ainsi qu'une provision des quatre nucléotides. À partir de l'amorce, la polymérase recopie le reste du fragment comme s'il répliquait l'ADN. Quand la synthèse est terminée, l'amorce a été allongée d'une copie complémentaire de tout le fragment monocaténaire. Les *deux* brins d'ADN ayant été répliqués, on a maintenant deux exemplaires du fragment d'origine.

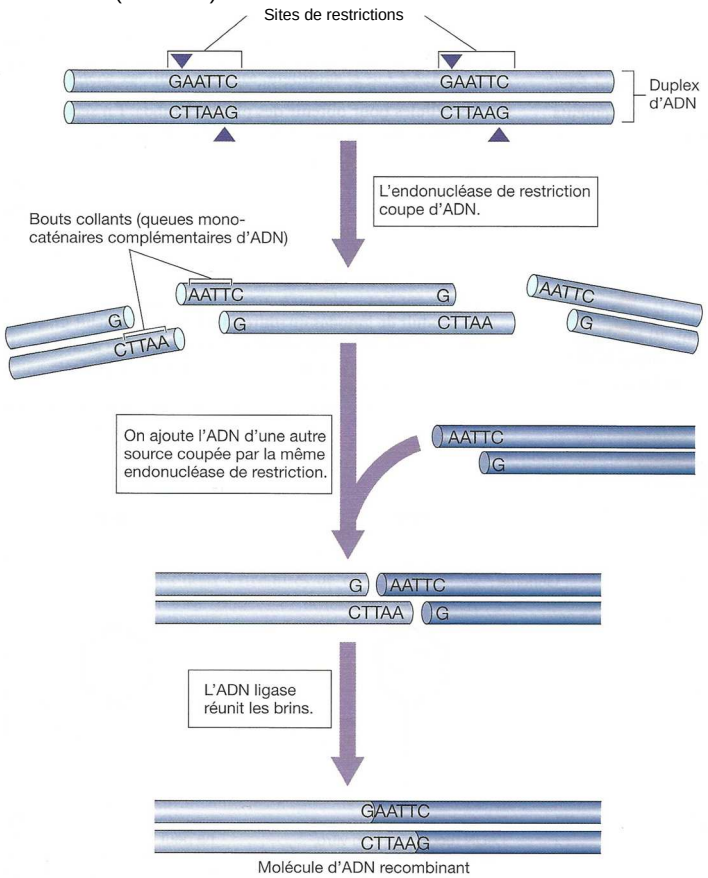


Réaction en chaîne de la polymérase. (*1*) *Dénaturation* : une solution contenant des amorces et le fragment d'ADN à amplifier est chauffée pour séparer l'ADN en brins monocaténaires. (*2*) *Renaturation des amorces* : la solution est refroidie et les amorces s'unissent aux séquences complémentaires de l'ADN bordant la séquence à amplifier. (*3*) *Extension des amorces* : l'ADN polymérase copie ensuite le reste des différents brins en commençant par l'amorce. Les étapes 1-3 sont répétées avec les brins répliqués. Ce processus se répète de nombreuses fois, doublant chaque fois le nombre de copies jusqu'à ce que le nombre de copies du fragment d'ADN soit suffisant pour l'analyse.

FIGURE 13. Étapes et schématisation de la PCR : une vision très simplifiée.
D'après RAVEN *et al.* (2007).

F. Découpage d'acides nucléiques : l'emploi des enzymes de restriction

- Les **enzymes de restriction** sont des ***protéines qui coupent l'ADN au niveau d'une courte séquence de nucléotides caractéristique appelée site de restriction***. Chaque enzyme de restriction reconnaît ainsi un **site spécifique**. **Plusieurs centaines d'enzymes de restriction** sont actuellement connues ; on les retrouve naturellement dans un **grand nombre d'espèces de Bactéries**.
- Les **sites de restriction** sont de ***petites séquences souvent coupées en « zigzag » (dites en baïonnette)***, ce qui produit de courtes ***queues monocaténaires pouvant se lier entre elles au niveau d'un même site de restriction***. On dit ainsi qu'une enzyme de restriction alors produit des **bouts collants** (= **extrémités cohésive**) (figure 14, tableau II). Cette caractéristique est particulièrement utilisée en **génie génétique** pour **ajouter un gène d'intérêt à un ADN cible** ; on utilise généralement une **ADN ligase** ***pour suturer les bouts collants*** lors du processus.
- Notons toutefois que **certains enzymes de restrictions** produisent des **coupures franches** (tableau II).



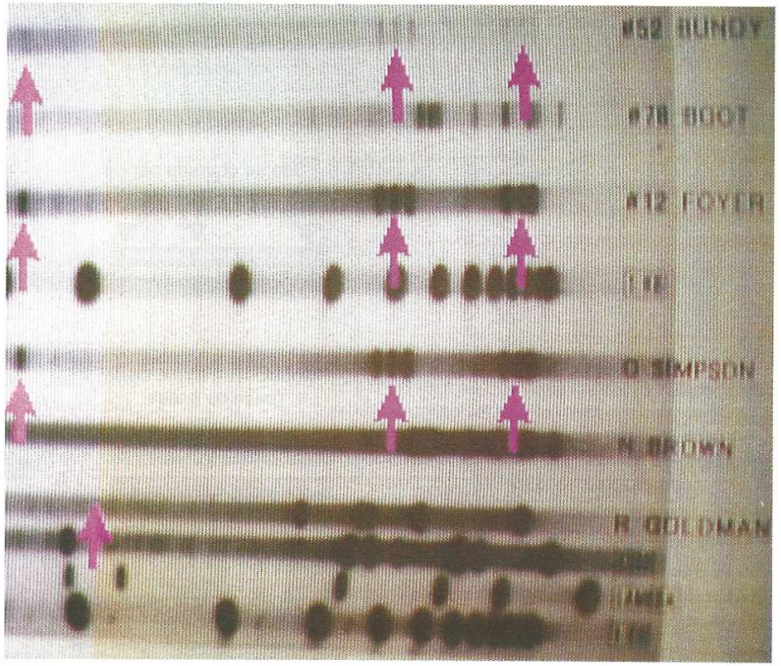
Beaucoup d'endonucléases de restriction produisent des fragments d'ADN avec des « bouts collants ». L'endonucléase de restriction *Eco*RI coupe toujours la séquence GAATTC entre G et A. La même séquence se retrouvant sur les deux brins, tous deux sont coupés. Cependant, les deux séquences produites sont orientées différemment dans les deux brins. En conséquence, les queues monocaténaires sont complémentaires, elles sont « collantes ».

FIGURE 14. Action des enzymes de restriction et production de bouts collants.
D'après RAVEN *et al.* (2007).

⮟ **TABLEAU II. <u>Quelques enzymes de restriction</u>.** D'après PEYCRU *et al.* (2013).

Enzyme	Micro-organisme producteur	Type de coupure	Séquence cible (généralement de type palindrome)
Hpa1	*Haemophilus parainfluenzae*	Coupure franche	5' ← G T T A A C / C A A T T G → 5'
EcoR1	*Escherichia coli*	Extrémités cohésives (coupure en baïonnette)	5' ← G A A T T C / C T T A A G → 5'
Hind 3	*Haemophilus influenzae*		5' ← A A G C T T / T T C G A A → 5'
Pst1	*Providencia stuarti*		5' ← C T G C A G / G A C G T C → 5'

L'emploi d'**enzymes de restriction** permet également de réaliser des **empreintes génétiques**, ***profils électrophorétiques de génome préalablement soumis à une ou plusieurs enzymes de restriction*** permettant d'étudier le **polymorphisme d'une population** ou encore de **comparer des génomes** (par exemple dans les enquêtes policières) : ***<u>des génomes identiques présentent la même fragmentation et donc les mêmes bandes sur le profil électrophorétique alors que l'existence de mutations induit l'apparition ou la disparition de sites de restriction</u>*** (figure 15).



Profils d'ADN de O.J. Simpson et des échantillons de sang provenant de la scène du meurtre de son ancienne épouse. On s'est servi de ces profils comme preuve lors du procès pour meurtre très médiatisé et controversé de 1995.

⮝ **FIGURE 15. <u>Rôle des empreintes génétiques dans les enquêtes policières</u>.** D'après RAVEN *et al.* (2007).

II. La transgénèse : production d'organismes génétiquement modifiés (OGM) présentant un gène d'origine exogène leur conférant un avantage sélectif

A. Principes généraux et étapes de la transgénèse

1. Notion de transgénèse, gène d'intérêt et avantage sélectif

- La **transgénèse** est le ***transfert, opéré en laboratoire, d'un gène d'intérêt depuis un organisme donneur vers un organisme receveur appartenant généralement à une espèce différente***. Le **gène d'intérêt** exprimé ***permet alors à l'organisme receveur de bénéficier d'une nouvelle caractéristique génétique sur laquelle il est sélectionné et qui présente un intérêt pour l'être humain*** : on dit que la transgénèse confère un **avantage sélectif** *au profit de l'espèce humaine* (à ne pas confondre avec un ~~**avantage sélectif au sens évolutif**~~).

2. Principales étapes du processus

- La **transgénèse** au sens le plus large comprend les étapes suivantes :
  - **Isolement du gène d'intérêt** à l'aide d'une **enzyme de restriction** et son **identification** grâce à une **sonde moléculaire**.
  - **Amplification par PCR** de ce gène.
  - [**Construction de l'ADN recombinant (= *ADN artificiel obtenu en laboratoire par réunion de matériel génétique issu d'origines différentes*)** en ***insérant le gène d'intérêt dans un vecteur de clonage*** comme un **plasmide** // parfois **intégration directe** dans le génome cible]
  - **Insertion du gène d'intérêt** dans le **génome de l'organisme cible**
  - **Criblage** : ***sélection des cellules ou organismes exprimant l'ADN recombinant (souches transformées)***.

Une partie des techniques citées ci-dessus a été abordée plus haut. Voir I.

3. Intérêts et risques de la transgénèse

- La transgénèse est un **outil important** en **recherche scientifique** où elle a permis d'immenses **progrès**. C'est aussi un outil utilisé par l'**industrie pharmaceutique** (production par des bactéries d'hormones, de vitamines…), le **monde agronomique et agro-alimentaire** (production de variétés végétales résistantes aux ravageurs ou aux herbicides, production de variétés à croissance plus rapide et/ou plus importante…).
- Toutefois, des **risques** (**environnementaux**, **sanitaires** voire **économiques** à cause de certains monopoles notamment dans les semences) existent et leur **évaluation** n'est pas forcément satisfaisante aujourd'hui (encadré B : exemple des plantes transgéniques).

B. Isolement du gène d'intérêt

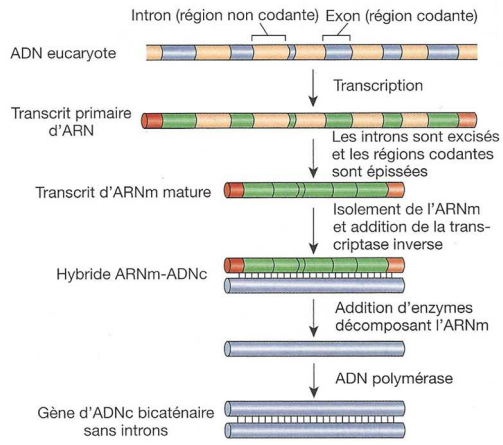
- Le **gène d'intérêt** est généralement obtenu par **fragmentation du génome** par des **enzymes de restriction** et ***Southern Blot*** **sur les fragments obtenus**.
- *Notons que, si l'on souhaite exprimer un **gène morcelé eucaryote** chez des **Eubactéries**, on produit un **gène artificiel sans introns** généralement au moyen de l'**ARNm mature** du gène **rétroconverti (par la transcriptase inverse) en ADNc** (**ADN complémentaire monobrin immédiatement obtenu**) puis (après action d'une **polymérase**) en **ADN double brin*** (figure 16).

Encadré B — Les OGM en agriculture : entre bénéfices et risques

(Au-delà du programme : pour information)

	Bénéfices	Risques
Agriculture	• Augmentation du rendement • Diminution de la charge de travail : moins de traitements chimiques et mécaniques • Plus de sécurité : moins d'utilisation de pesticides toxiques • Diversification des débouchés (ex : pharmacie)	• Dépendance de l'agriculteur à des firmes agro-chimiques • Contraintes pour les agriculteurs pour la coexistence de filières OGM et non OGM • Contamination de champs non transgéniques
Société	• Produits avec de nouvelles qualités organoleptiques et nutritionnelles • Production de nombreuses molécules (plante-usine)	• Problèmes éthiques : brevetabilité du vivant • Risques sanitaires encore peu cernés
Environnement	• Diminution des intrants (pesticides) : baisse de la pollution agricole des sols et des nappes phréatiques • Meilleur respect de la faune • Phytoremédiation	• Flux des transgènes hors culture • Risques de perturbation des équilibres biologiques

D'après MEYER *et al.* (2008)



Production d'ADNc. On isole un transcrit mature d'ARN du cytoplasme d'une cellule. On utilise une enzyme, la transcriptase inverse, pour fabriquer un brin d'ADN complémentaire de l'ARNm mature. Cet ADN sert de modèle pour l'ADN polymérase, enzyme qui assemble en face de lui un brin complémentaire d'ADN et donne l'ADNc, ADN bicaténaire représentant l'ARNm sans introns.

FIGURE 16. Technique de l'ADNc (ADN complémentaire). D'après RAVEN *et al.* (2007).

C. Insertion directe ou indirecte du gène d'intérêt (transgène) dans le génome cible

- **Deux solutions** se présentent, avec souvent l'**inconvénient** que l'**on maîtrise mal à quel endroit le gène d'intérêt (= transgène) va s'insérer** :
  - Soit le gène est **inséré directement dans le génome cible**.
  - Soit le gène est **inséré dans un vecteur qui permettra l'insertion du gène d'intérêt dans la cellule cible et son expression**.

1. Quelques modalités d'insertion directe : électroporation, micro-injection et biolistique

- On peut citer :
  - L'**électroporation** : sur des **cellules eubactériennes**, des ***cellules végétales sans paroi*** (**protoplastes**) ou des **cellules embryonnaires (ou zygotes) d'Animaux**, ***on applique un champ électrique qui déstabilise les membranes***, ce qui permet ***l'entrée d'ADN extracellulaire dans la cellule puis le noyau***.
  - La **micro-injection** (figure 17) : utilisée chez les Animaux mais aussi sur des **protoplastes végétaux**, ***il s'agit d'injecter une solution contenant l'ADN d'intérêt directement dans le noyau des cellules à modifier***.
  - La **biolistique** (contraction de « bio- » et « balistique ») (figure 18) : utilisée sur les **organes végétaux** (**feuilles** notamment, ou bien ***ensembles de cellules méristématiques obtenus artificiellement*** qu'on nomme **cals**), il s'agit de ***faire pénétrer les ARN d'intérêts par le biais de billes d'or ou de tungstène propulsés sous pression au moyen d'un canon à particules***. On **régénère** ensuite une **plante entière** par **multiplication végétative artificielle** des cellules **exprimant le gène d'intérêt** et ne semblant **pas déstabilisées** (car hélas le gène peut **s'insérer n'importe où**, y compris au milieu de **séquences codantes** qui sont alors **endommagées**).

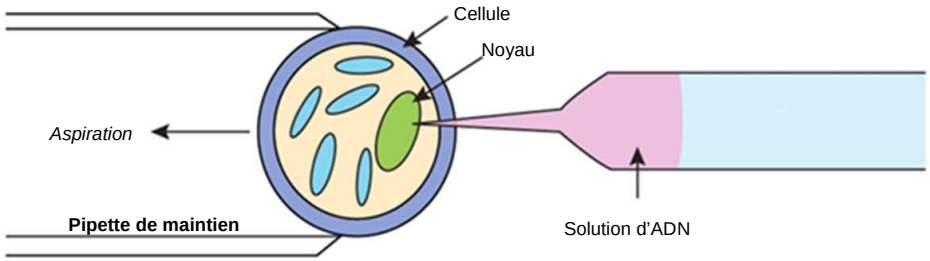


FIGURE 17. Micro-injection d'ADN.
http://nptel.ac.in/courses/102103016/module3/lec24/3.html (consultation décembre 2015).

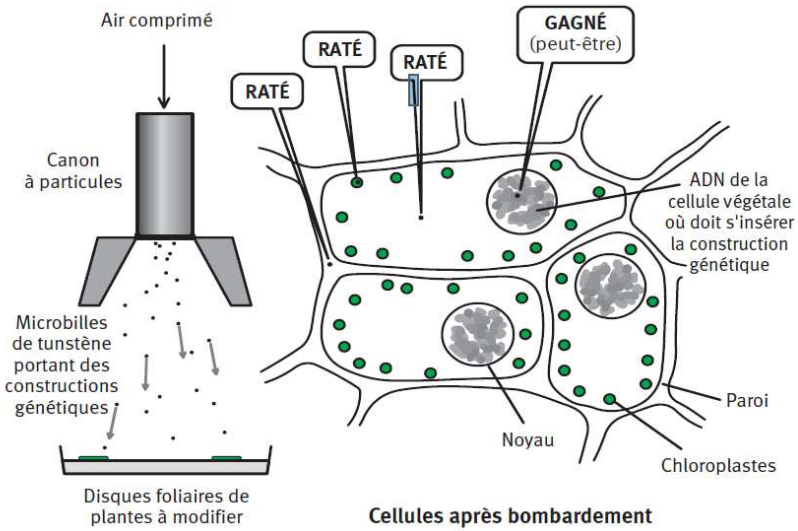


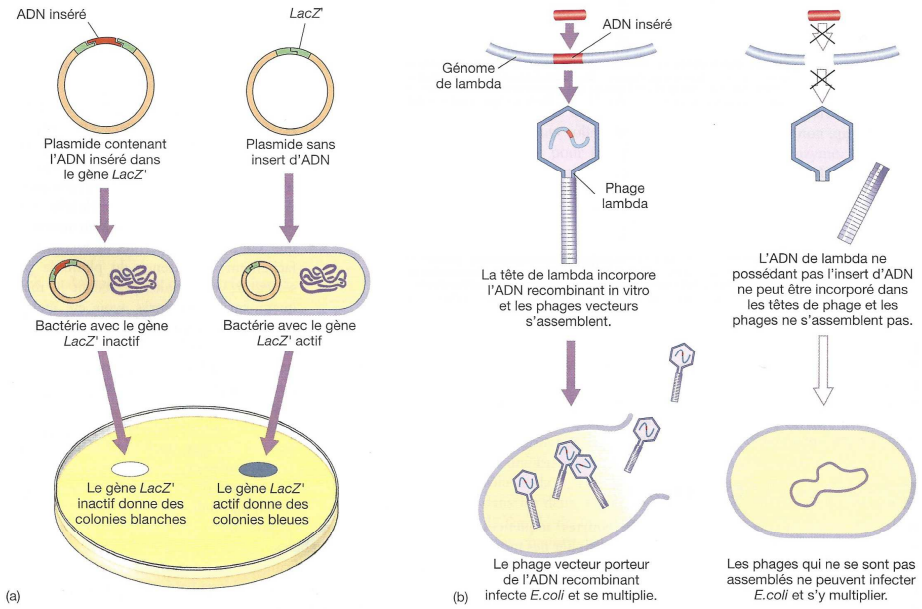
FIGURE 18. Biolistique. © *Académie en ligne* (consultation décembre 2015).

2. Transformation de la cellule cible *via* un vecteur plasmidique ou viral

- On peut également **transformer génétiquement** des cellules en produisant un **vecteur (plasmide recombiné, génome viral recombiné)** (figure 19).

a. Utilisation de plasmides

- Les **plasmides recombinants** sont ***produits au moyen d'enzymes de restriction en ajoutant le gène d'intérêt et également, très souvent, un gène rapporteur***. Ce dernier est un ***gène dont l'activité est facile à observer ou tester (gène d'une enzyme comme la luciférase, gène GFP, gène de résistance aux antibiotiques…) qui permettra de savoir si la transformation a réussi ou échoué***.
- Cette technique est **très utilisée chez les Bactéries**.
- Cette technique peut aussi être utilisée sur **certaines plantes** sensibles à la **Bactérie *Agrobacterium tumefaciens*** responsable de tumeurs. Cette Bactérie possède un **plasmide Ti** (*Tumor inducing Plasmid*) qui est ***capable de s'insérer dans la 'plante' et de se transmettre ensuite aux cellules végétales produites par divisions cellulaires tout en provoquant des tumeurs végétales***. On utilise alors des *Agrobacterium* dont le **plasmide** a été **modifié** : suppression ou **inactivation des gènes de virulence**, ajout du **gène d'intérêt** et d'un **gène rapporteur**… (figure 20).



Utilisation des plasmides et des phages somme vecteurs. (*a*) On peut cribler les bactéries hôtes pour la présence des plasmides recombinants en observant la présence d'un phénotype chez l'hôte, comme l'absence de coloration bleue si la bactérie est étalée sur un milieu contenant X-gal. (*b*) On peut sélectionner les phages vecteurs possédant l'ADN recombinant parce qu'ils sont capables de s'assembler in vitro, d'infecter un hôte et de s'y multiplier.

FIGURE 19. Plasmides et phages, des vecteurs. D'après RAVEN *et al.* (2007). Notons que la production d'un OGM stable par bactériophages suppose une induction du cycle lysogénique.

b. Utilisation de virus

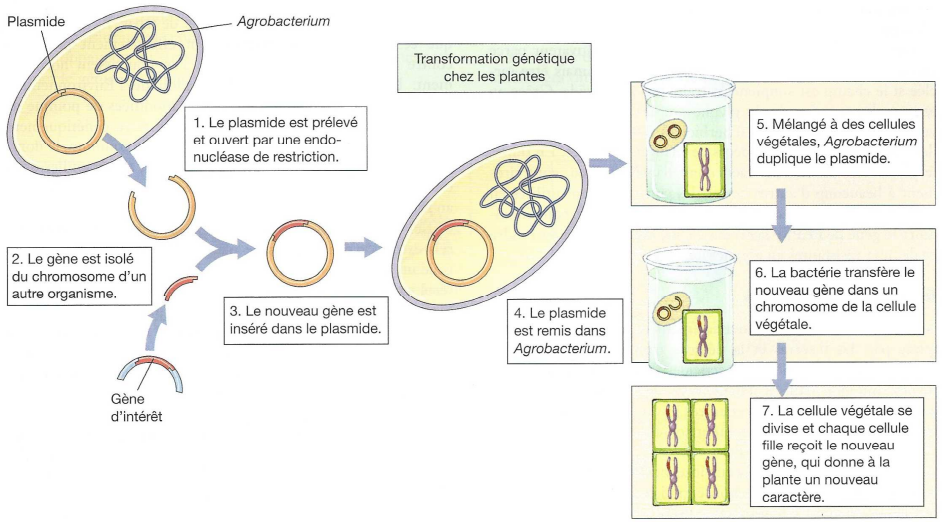
- Chez les **Bactéries**, on utilise un **Bactériophage** (figure 19) dont le **génome** est **modifié** : insertion du **gène d'intérêt** et du **gène rapporteur**, **favorisation du cycle lysogénique**… Il y a ainsi **modification durable du génome cible**. On peut aussi utiliser le **cycle lytique** (figure 19) simplement pour **multiplier les vecteurs**.
- Chez les **Eucaryotes**, on peut utiliser un **rétrovirus modifié** : insertion du **gène d'intérêt** et du **gène rapporteur**, **suppression** ou **inhibition** des **gènes de virulence**… Il y a là encore **modification durable** du génome cible. *Notons qu'il s'agit là d'une technique également employée en thérapie génique.*
- **Inconvénient** de ces techniques : l'insertion du **provirus** est **aléatoire** et fait courir le **risque** d'une **altération de séquence codante**.

D. Clonage des cellules après insertion du transgène

1. Principe général

- Très souvent, les **cellules** ou **organismes ayant subi la transgénèse** sont **clonés**, c'est-à-dire qu'***on produit des cellules ou organismes génétiquement identiques***, ce qui permet au passage de **multiplier les séquences d'intérêt**.

Un **clone** est, au sens premier, un ***ensemble de cellules génétiquement identiques***. Chez les **organismes pluricellulaires**, on peut parler de **clones** pour désigner des ***individus porteurs du même patrimoine génétique***.



Le plasmide Ti. Ce plasmide d'*Agrobacterium tumefaciens* est utilisé pour les manipulations génétiques chez les plantes.

FIGURE 20. Transformation génétique végétale par plasmide Ti modifié d'*Agrobacterium*. D'après RAVEN *et al.* (2007).

- Dans tous les cas, les **cellules** ou **organismes** qu'on a essayé de **modifier génétiquement** seront (le plus souvent **après clonage**) ***testés de manière à vérifier que la transgénèse a réussi*** : c'est le **criblage** (voir E).

2. Cas des Bactéries

- Dans le cas des **Bactéries**, on laisse simplement les cellules **se reproduire naturellement** (figure 21).

3. Cas des 'plantes'

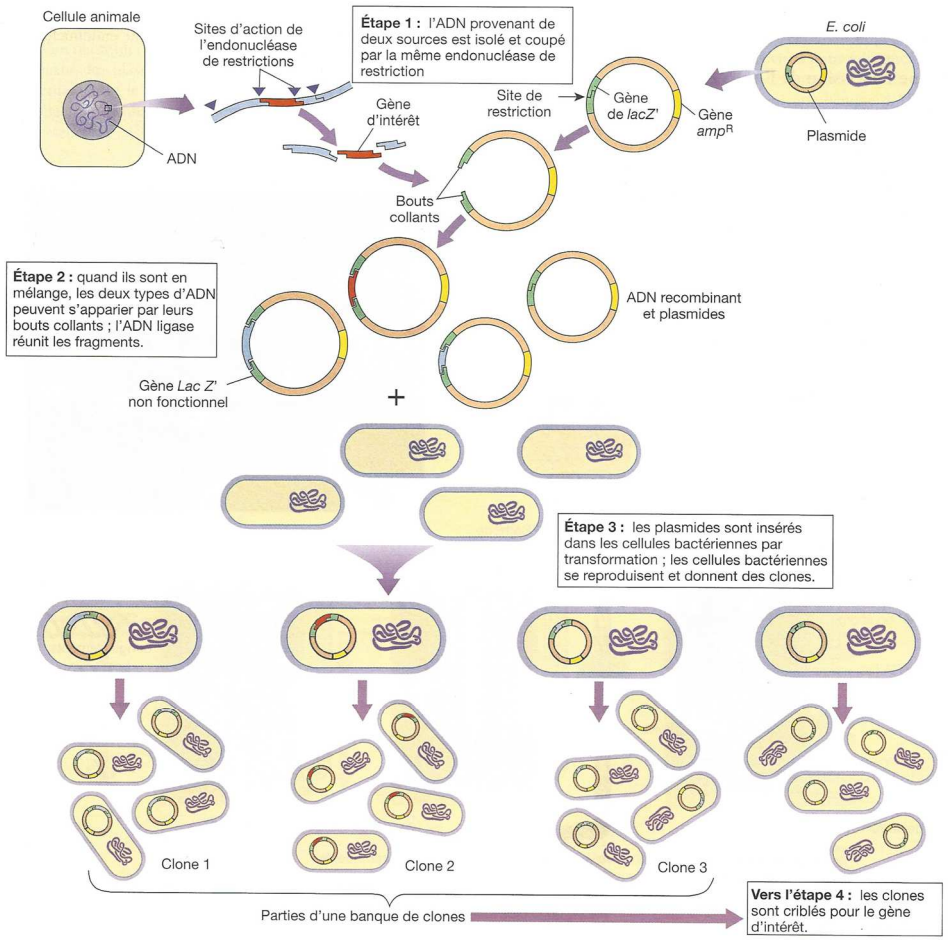
- Dans le cas des **'plantes'**, on **cultive artificiellement les cellules** qu'on suppose **transformées** sur un **gel** en jouant sur **différentes hormones végétales**. Les cellules sont d'abord poussées à se **dédifférencier** en **cellules méristématiques** (*il arrive que ce soit à ce stade qu'on pratique la transgénèse*) puis à se **multiplier** ; enfin, on sépare les **ensembles artificiels de cellules méristématiques** et l'on pousse artificiellement (pas des hormones végétales) ces ensembles de cellules à se **différencier en plantes entières** (figure 22).

4. Cas des Animaux

- Chez les **Animaux**, la **transgénèse** a souvent lieu sur des **zygotes** ou de **très jeunes cellules embryonnaires**. On laisse ensuite généralement **se développer**

des **embryons transformés** mais sur **seulement quelques divisions** : en effet, alors que les **cellules** sont encore **totipotentes**, on les sépare artificiellement et **chaque cellule** donnera individuellement un **nouvel embryon**.

Après **criblage**, lorsque des **individus transgéniques et viables** ont été obtenus, les **nouveaux animaux transgéniques** sont produits en **croisant les animaux transgéniques** existants entre eux par **reproduction sexuée classique**.



Étapes d'une expérience de génie génétique. À l'étape 1, l'ADN contenant le gène d'intérêt (dans ce cas, provenant d'une cellule animale) et l'ADN d'un plasmide sont coupés par la même endonucléase de restriction. Les gènes *amp*R et *lacZ'* se trouvent dans le plasmide et servent à cribler un clone (étape 4). À l'étape 2, les deux types d'ADN sont mélangés et s'apparient par leurs bouts collants. À l'étape 3, l'ADN recombinant est introduit dans une cellule bactérienne qui se reproduit et donne des clones. À l'étape 4, les clones bactériens seront criblés en fonction du gène d'intérêt.

FIGURE 21. Étapes d'une expérience de génie génétique incluant l'étape de clonage. D'après RAVEN *et al.* (2007).

Développement d'une plante transgénique. L'ADN contenant un gène de résistance à l'herbicide a été introduit chez le blé (*Triticum aestivum*). L'ADN contient aussi le gène *GUS*, qui sert de marqueur. Le gène *GUS* produit une enzyme qui catalyse la transformation d'une solution limpide en un colorant bleu. (*a*) Tissu embryonnaire immédiatement avant l'insertion de l'ADN étranger. (*b*) après le transfert, les cellules du cal contenant l'ADN étranger se reconnaissent à la couleur produite par le gène *GUS* (taches bleues). (*c*) Formation de tiges feuillées sur des cals transgéniques cultivés sur un milieu sélectif. Ici, le gène de résistance à l'herbicide permet le développement des cellules résistantes sur le milieu sélectif contenant l'herbicide. (*d*) Croissance comparée, sur le milieu sélectif, de plantes transgéniques possédant le gène de résistance (*à gauche*) et d'une plante non transformée (*à droite*).

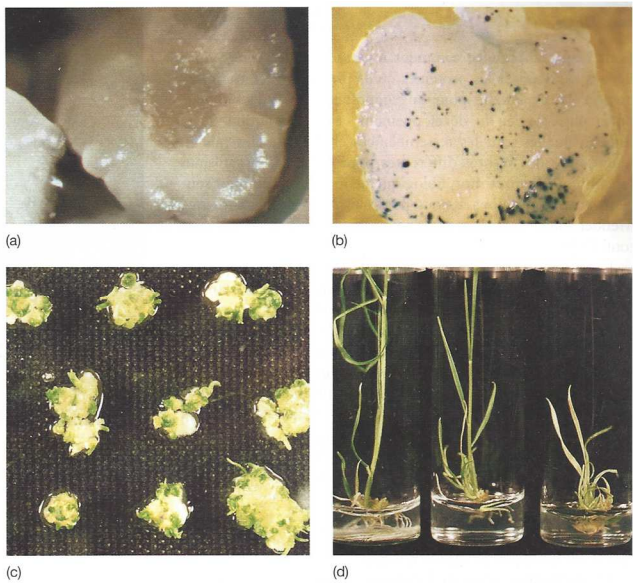


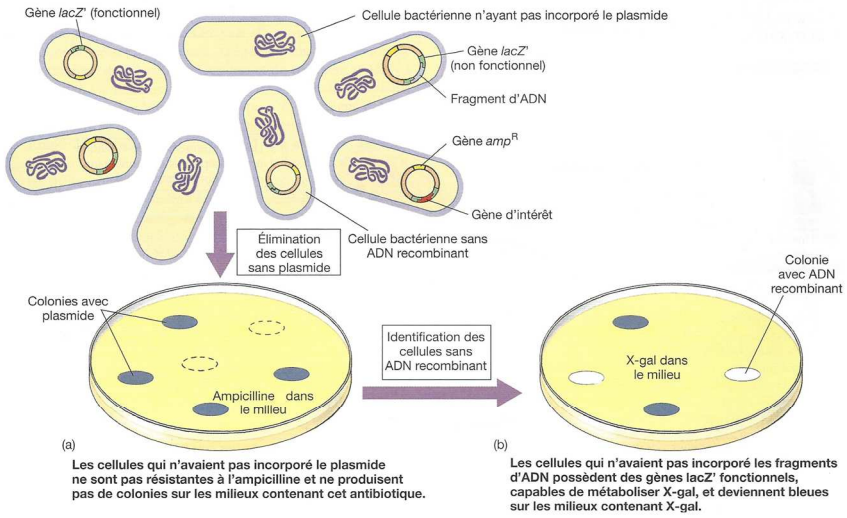
FIGURE 22. Implication de la multiplication végétative artificielle dans la mise au point d'une plante transgénique (+ criblage en d). D'après RAVEN *et al.* (2007).

E. Criblage génétique : sélection des souches transformées par vérification de l'insertion et de l'expression des transgènes

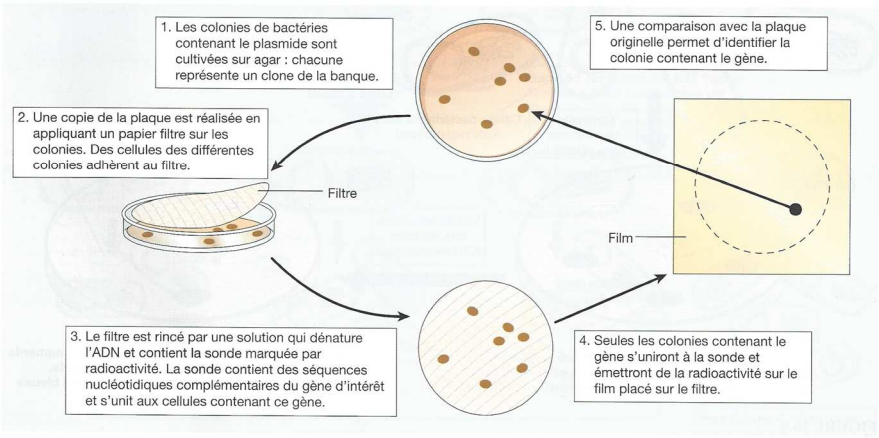
- Le **criblage** consiste à ***tester les cellules ou individus obtenus après transgénèse afin de vérifier le succès (ou l'échec) du processus***. Il s'agit ***soit de vérifier directement si les souches d'organismes modifiés expriment bien le gène d'intérêt***, ***soit de vérifier si elles expriment le gène rapporteur dont on déduit le succès de la transgénèse*** (figures 22-23).

F. L'existence de modifications génétiques conduisant à l'inactivation (extinction) de gènes : le *knock-out*

- Il est ***possible d'insérer par transgénèse une copie antisens d'un gène (séquence complémentaire de la séquence génique visée)***. Il s'ensuit, si les **deux séquences** sont **exprimées**, la ***synthèse de deux ARNm complémentaires qui s'hybrident, ce qui conduit à leur dégradation et donc à l'inactivation du gène correspondant***. C'est ce qu'on appelle le **knock-out**.



identification des clones recombinants. Les bactéries sont transformées par des plasmides recombinants porteurs du gène de résistance à l'ampicilline (*amp*R). Une sélection est ainsi possible sur un milieu contenant de l'ampicilline. Le plasmide possède également le gène *lacZ'* qui code la β-galactosidase, enzyme intervenant dans le métabolisme d'un sucre, le lactose. Le substrat artificiel X-gal peut être décomposé par l'enzyme et donner une coloration bleue. (*a*) Sélection d'*amp*R : seules les bactéries transformées et possédant un plasmide seront capables de croître sur l'ampicilline. (*b*) Criblage pour l'activité de β-galactosidase : le plasmide a été conçu de manière à ce que l'ADN inséré interrompe le gène *lacZ'* pour inactiver la β-galactosidase. Après étalement sur un milieu contenant X-gal, les bactéries hébergeant les plasmides dépourvus d'insert seront bleues, alors que celles qui possèdent des inserts ne seront pas colorées (elles seront blanches).



identification du gène d'intérêt par hybridation. (*1*) Dans cette culture bactérienne, chaque colonie représente des millions de clones dérivés d'une seule cellule. Pour vérifier si un certain gène se trouve dans un clone particulier, il est nécessaire d'identifier les colonies dont les cellules contiennent un ADN qui s'hybride avec une sonde contenant des séquences d'ADN complémentaires du gène. (*2*) Après l'application d'un papier filtre sur la plaque d'origine, des cellules des différentes colonies adhèrent au filtre. (*3*) Le filtre est ensuite rincé par une solution qui dénature l'ADN et contient la sonde marquée par radioactivité. (*4*) Seules les colonies contenant l'ADN qui s'hybride à la sonde, et contient donc le gène d'intérêt, marqueront le film d'autoradiographie. (*5*) Le film est ensuite comparé à la plaque d'origine pour identifier la colonie contenant le gène.

FIGURE 23. <u>Criblage génétique : exemple chez Bactéries transgéniques</u>.
D'après RAVEN *et al.* (2007).

Références

ALBERTS, B., A. JOHNSON, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS & P. WALTER (2004). *Biologie moléculaire de la cellule. Quatrième édition.* Traduction de la quatrième édition américaine (2002) par F. LE SUEUR-ALMOSNI. Flammarion, Paris. Première édition américaine 1983 (1986 1e édition française).

BERTHET, J. (2006). *Dictionnaire de Biologie.* De Boeck Université, Bruxelles (Belgique).

BOUJARD, D. (dir). B. ANSELME, C. CULLIN & CÉLINE RAGUÉNÈS-NICOL (2015). *Biologie cellulaire et moléculaire. Tout le cours en fiches. Licence. PACES. CAPES.* 2e édition (1e édition 2012), Dunod, Paris.

BREUIL, M. (2007). *Biologie 1re année BCPST-véto*. Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

BREUIL, M. (2009). *Biologie 2e année BCPST-véto.* Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

CAMPBELL, N. A. & J. B. REECE (2004). *Biologie*. De Boeck Université, Bruxelles, 2e édition (1e édition 1995).

[CAMPBELL, N. A.], J. B. REECE, L. A. URY, M. L. CAIN, S. A. WASSERAMN, P. V. MINORSKY, R. B. JACKSON (2012). *Campbell Biologie.* Adaptation française J. FAUCHER & R. LACHAÎNE. Pearson, Paris (4e edition).

DENŒUD, J., T. FERROIR, O. GUIPPONI, H. MOREAU, M. PAULHIAC-PISON, M.-L. PONS & F. TEJEDOR (2011). *Biologie-Géologie BCPST-véto 2e année.* Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

DENŒUD, J., C. GODINOT, O. GUIPPONI, H. MOREAU, M. PAULHIAC-PISON & F. TEJEDOR (2013). *Biologie-Géologie BCPST-véto 1e année.* Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

DENŒUD, J., C. GODINOT, O. GUIPPONI, H. MOREAU, M. PAULHIAC-PISON, M.-L. PONS & F. TEJEDOR (2014). *Biologie-Géologie BCPST-véto 2e année.* Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

GODINOT, C., H. MOREAU, M. PAULHIAC-PISON & F. TEJEDOR (2010). *Biologie-Géologie 1re année BCPST-véto*. Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

HARRY, M. (2008). *Génétique moléculaire et évolutive.* Maloine, Paris, 2e édition (1e édition 2001).

LAFON, C. (2003). *La biologie autrement. 100 questions de synthèse.* Ellipses, Paris.

LATRUFFE, N. (dir.), F. BLEICHER-BARDETTI & J. VAMECQ (2014). *Biochimie. Tout le cours en fiches. Licence. PACES-UE1. CAPES.* Dunod, Paris.

LIZEAUX, C, D. BAUDE et collaborateurs (2012). *Sciences de la Vie et de la Terre Terminale S enseignement obligatoire.* Bordas, Paris.

MEYER, S., C. REEB & R. BOSDEVEIX (2008). *Botanique. Biologie et physiologie végétales.* Maloine, Paris, 2e édition (1e édition 2004).

MORÈRE, J.-L., R. PUJOL (coord.), J.-C. CALLEN, L. CHESNOY, J.-P. DUPONT, A.-M. GIBERT-TANGAPREGASSOM, G. RICOU, N. TOUZET (dir.) et colloborateurs (2003). *Dictionnaire raisonné de Biologie.* Frison-Roche, Paris.

PEYCRU, P. (dir.), J.-F. FOGELGESANG, D. GRANDPERRIN, B. AUGÈRE, J.-C. BAEHR, C. PERRIER, J.-M. DUPIN & C. VAN DER REST (2010*a*). *Biologie tout-en-un BCPST 1re année.* Dunod, Paris, 2e édition (2009), réimpression corrigée (2010) (1e édition 2006).

PEYCRU, P. (dir.), J.-C. BAEHR, F. CARIOU, D. GRANDPERRIN, C. PERRIER, J.-F. FOGELGESANG & J.-M. DUPIN (2010*b*). *Biologie tout-en-un BCPST 2e année.* Dunod, Paris, 2e édition (1e édition 2007).

PEYCRU, P., D. GRANDPERRIN, C. PERRIER (dir.), B. AUGÈRE, T. DARRIBÈRE, J.-M. DUPIN, C. ESCUYER J.-F. FOGELGESANG, & C. VAN DER REST (2013). *Biologie tout-en-un BCPST 1re année.* Dunod, Paris, 3e édition (1e édition 2006).

PEYCRU, P., D. GRANDPERRIN, C. PERRIER (dir.), B. AUGÈRE, J.-F. BEAUX, F. CARIOU, P. CARRÈRE, T. DARRIBÈRE, J.-M. DUPIN, C. ESCUYER, J.-F. FOGELGESANG, S. MAURY, É. QUÉINNEC, E. SALGUEIRO & C. VAN DER REST (2014). *Biologie tout-en-un BCPST 2e année.* Dunod, Paris, 3e édition (1e édition 2007).

RAVEN, P. H., G. B. JOHNSON, J. B. LOSOS, S. S. SINGER (2007). *Biologie*. De Boeck, Bruxelles.

RICHARD, D. (dir.), P. CHEVALET, S. FOURNEL, N. GIRAUD, F. GROS, P. LAURENTI, F. PRADÈRE & T. SOUBAYA (2012). *Biologie. Tout le cours en fiches. Licence. CAPES. Prépas*. Dunod, Paris, 2e édition (1e édition 2010).

RICHARD, D. (dir.), P. CHEVALET, S. FOURNEL, N. GIRAUD, F. GROS, P. LAURENTI, F. PRADÈRE & T. SOUBAYA (2015). *Biologie. Tout le cours en fiches. Licence. CAPES. Prépas*. Dunod, Paris, 3e édition (1e édition 2010).

SEGARRA, J. (dir.), É. CHAUVET, C. COLSON-PROCH, M. HUILLE, M. LABROUSSE, F. LOUET, F. METZ & E. PIÈTRE (2014). *Biologie BCPST 1re année.* Ellipses, Paris.

SEGARRA, J., E. PIÈTRE (dir.), G. BAILLY, O. CHASSAING, D. FAVRE, T. JEAN, F. METZ & C. MEUNIER (2015). *Biologie BCPST 2e année.* Ellipses, Paris.

Plan du chapitre

Objectifs : extraits du programme **1**
Introduction **1**

I. Techniques de base d'étude des macromolécules **2**
A. Séparation, purification et isolement de macromolécules **2**
1. Séparation par migration dans un solvant (= éluant) : les chromatographies 2
a. Principe général 2
b. Aperçu de la diversité des techniques 2
2. Séparation par migration dans un champ électrique : les électrophorèses 4
3. D'autres méthodes applicables 4
B. Buvardages avec emploi de révélateurs : les Blots **5**
1. Principe général 5
2. Southern Blot, Northern Blot et Western Blot : diversité des Blots 5
C. Les puces à ADN (= biopuces), outils d'analyse génétique à grande échelle [pour information] **6**
D. Élucidation de la structure tridimensionnelle d'une protéine : diffraction aux rayons X et informatique [pour information] **6**
E. Amplification de séquences d'ADN : la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) **7**
F. Découpage d'acides nucléiques : l'emploi des enzymes de restriction **8**

II. La transgénèse : production d'organismes génétiquement modifiés (OGM) présentant un gène d'origine exogène leur conférant un avantage sélectif **10**
A. Principes généraux et étapes de la transgénèse **10**
1. Notion de transgénèse, gène d'intérêt et avantage sélectif 10
2. Principales étapes du processus 10
3. Intérêts et risques de la transgénèse 10
B. Isolement du gène d'intérêt **10**
C. Insertion directe ou indirecte du gène d'intérêt (transgène) dans le génome cible **11**
1. Quelques modalités d'insertion directe : électroporation, micro-injection et biolistique 11
2. Transformation de la cellule cible via un vecteur plasmidique ou viral 11
a. Utilisation de plasmides 11
b. Utilisation de virus 12
D. Clonage des cellules après insertion du transgène **12**
1. Principe général 12
2. Cas des Bactéries 12
3. Cas des 'plantes' 12
4. Cas des Animaux 12
E. Criblage génétique : sélection des souches transformées par vérification de l'insertion et de l'expression des transgènes **13**
F. L'existence de modifications génétiques conduisant à l'inactivation (extinction) de gènes : le knock-out **13**

Références **14**
Plan du chapitre **15**

© Tanguy JEAN. Les textes et les figures originales sont la propriété de l'auteur. Les figures extraites d'autres sources restent évidemment la propriété des auteurs ou éditeurs originaux.
Document produit en décembre 2015 • Dernière actualisation : août 2017.
Contact : Tanguy.Jean4@gmail.com
Adresse de téléchargement : http://tanguyjean.businesscatalyst.com/

Ces données sont placées sous licence *Creative Commons Attribution – Pas d'Utilisation commerciale 4.0 CC BY NC* qui autorise la reproduction et la diffusion du document, à condition d'en citer explicitement la source et de ne pas en faire d'utilisation commerciale.