

Techniques de manipulations génétiques

Le génie génétique correspond à l'ensemble des techniques qui permettent de manipuler le génome des être vivants et des virus en procédant *in vitro* ; c'est-à-dire que les manipulations génétiques sont réalisées non pas sur l'être vivant (comme la génétique et la mutagenèse classique) mais sur des parties de génomes isolées *in vitro*. Cela rend possible de modifier le génome d'un être vivant en y introduisant un ou plusieurs éléments génétiques provenant d'une autre unité biologique (cf. exemples)

Le clonage est la technique de base du génie génétique.

Définition du clonage : amplification naturelle d'une séquence d'acide nucléique (l'insert) provenant d'un organisme donneur dans un autre organisme hôte (receveur) par obtention d'un clone cellulaire de l'hôte. Le transfert du matériel génétique passe obligatoirement par une ou plusieurs étapes de manipulations *in vitro* (*ex vivo*).

Document : les grandes étapes du clonage

1) Préparation de l'ADN insert (à cloner).

4 origines possibles : A.D.N. complémentaire de l'ARNm eucaryote ou ADN amplifié par PCR ou d'origine naturelle (après purification) ou synthétique. Cet ADN à cloner est digéré par une ou deux enzymes de restriction.

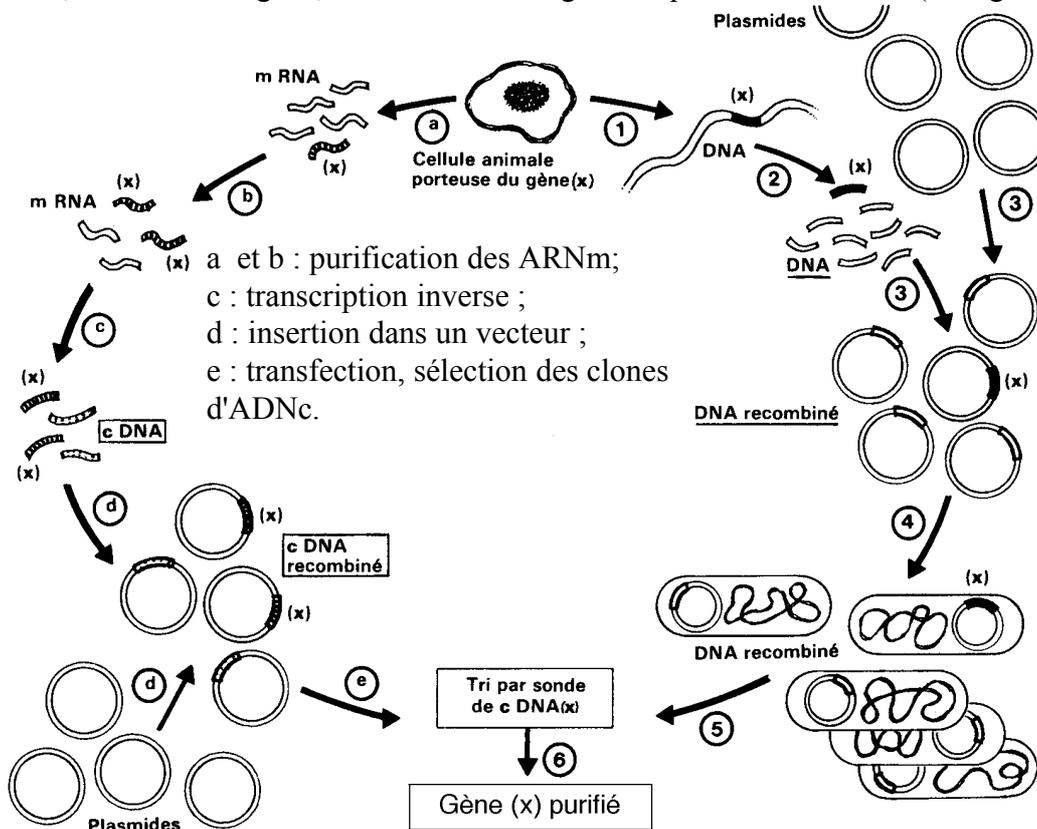
1') En parallèle choix et préparation du vecteur de clonage : plasmide, virus, phagémide ou chromosome artificiel. Ce vecteur est digéré par une ou deux enzymes de restriction compatibles avec celles utilisées sur l'insert.

2) Ligation de l'insert dans le vecteur de clonage : bouts francs, préparation de bouts collants, polarité de l'insert, déphosphorylation, tailing, ...

3) Transfection : utilisation de techniques physico chimiques (CaCl₂ + froid + choc thermique, HPO₄Ca, polycation), électroporation (schéma), lipofection sur cellules sans paroi, projection de particules métalliques chargées d'ADN vecteur (biolistique), injection directe dans l'ovocyte (animaux transgéniques), utilisation d'un virus modifié, etc. ...

4) Mise en culture pour sélection des clones transfectés et recombinants

5) Utilisation de la séquence clonée : séquençage, mutagenèse dirigée, production de protéine, détection d'exon, knock-out de gène, insertion dans un génome par recombinaison (transgénèse, thérapie génique), ...



Exemple de deux façons de cloner un gène de cellule eucaryote. Légende :

- 1 : purification de l'A.D.N. génomique ;
- 2 : fragmentation par une ou deux endonucléases de restriction;
- 3 : ouverture du vecteur par une ou deux enzymes de restriction et ligation de l'insert.
- 4 : transfection de la cellule hôte ;
- 5 : sélection des clones transfectés sur milieu sélectif
- 6 : hybridation sur colonie pour détecter le clone recombinant porteur du gène d'intérêt total :

1 Préparation de l'acide nucléique à cloner

1.1. purification d'acides nucléiques naturels

Le génome est :

- un chromosome eucaryote purifié par électrophorèse en champs pulsés ;
- un ensemble de fragments de chromosomes eucaryotes purifiés par une méthode non sélective ;
- un chromosome bactérien, un plasmide, qui sont des molécules circulaires ;
- un ADN (ou ARN) d'origine viral.

Après purification et éventuellement conversion en ADN (si c'est de l'ARN), le génome purifié est clivé par action d'une ou deux enzymes de restriction en une collection de fragments de taille compatible avec le type de clonage choisi. L'enzyme de restriction utilisée est choisie en fonction de la probabilité de rencontrer un de ses sites sur le génome. Plus cette probabilité est grande plus faible sera la taille moyenne des fragments obtenus. La première étape du clonage dans ce cas, consiste à créer une collection des différents fragments obtenus, dont chacun est multiplié dans un clone cellulaire. Cet ensemble de clones contenant chacun un vecteur recombiné portant un fragment est appelé une BANQUE GÉNOMIQUE.

La fragmentation utilise des enzymes de restrictions qui permettent de faciliter la ligation de chaque fragment dans le vecteur de clonage.

Longueur du site reconnu	Probabilité de coupure	Taille moyenne des fragments en paires de base (pb)
4	$1/4^4 = 1 / 2^8 = 1 / 256$	256
6	$1/4^6 = 1 / 2^{12} = 1 / 4096$	4096
8	$1/4^8 = 1 / 2^{16} = 1 / 6.10^4$	□ 60000

Remarques : la stratégie utilisant deux enzymes incompatibles permet d'orienter les inserts dans le site multiple de clonage (MCS) du vecteur approprié.

1.1.1. Purification d'ADN en général : outils usuels

Broyage de tissus : cf. cours de BTC et purification de protéines

Fragilisation enzymatique des parois de cellules bactériennes, végétales et fongiques

La paroi est un obstacle majeur à la lyse cellulaire. Pour rendre efficace la désorganisation de la membrane plasmique, des hydrolases spécifiques peuvent être employées.

Organisme	Bactérie	Champignon	Végétaux
Type de paroi	Peptidoglycane	Chitine	Cellulose, Hémicellulose
Enzyme	Lysozyme	Chitinase	Cellulase, Hémicellulase

Désorganisation des membranes par des détergents

Sodium Dodécyl Sulfate, triton X100, sarcosyl sont des détergents qui vont à la fois solubiliser les lipides membranaires sous forme de micelles, et suivant leur force (chargés ou pas) plus ou moins dénaturer les protéines membranaires. Cela permet de créer des pores membranaires suffisamment larges pour libérer le contenu du cytoplasme hors des cellules.

N.B. : le tampon utilisé lors de cette phase contient souvent une substance chélatrice telle que l'EDTA ou le citrate qui séquestre par complexation les ions divalents et notamment le magnésium cofacteur des DNases et RNases.

Déprotéinisation par défécation

Les protéines soumises à un **agent chaotropique** (compétiteur de l'eau) tel que le perchlorate sont complexées par ce sel et précipitent (défécation). Après centrifugation il reste peu de protéines dans le surnageant et tous les acides nucléiques.

Déprotéinisation par hydrolyse enzymatique

Les protéines peuvent être hydrolysées par une **endoprotéase non spécifique** telle que la **protéinase K**.

Destruction par hydrolyse des ARN

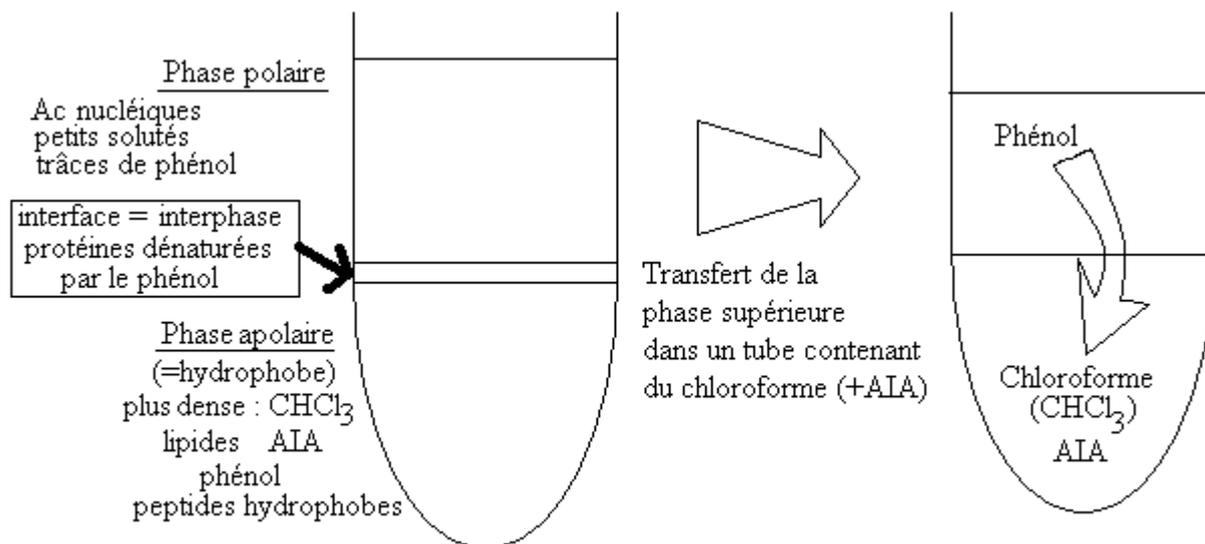
L'hydrolyse peut se dérouler de manière chimique NaOH ou mieux enzymatique : **RNase A** (DNase free).

Extraction biphasique des lipides et protéines en 2 étapes :

Le procédé d'extraction consiste à jouer sur la différence de solubilité des composés chimique entre deux phases de solvants non miscibles, c'est le principe du partage en chromatographie.

Pour faciliter la récupération de la phase aqueuse contenant les acides nucléiques, on utilise un solvant apolaire plus dense que l'eau : le **chloroforme** CHCl_3 (nocif et volatil).
 Lors de la phase d'extraction, plus l'émulsion est fine plus la surface d'échange augmentera. Afin d'améliorer la séparation des deux phases après centrifugation, de l'**alcool isoamylique** est ajouté.
 Les protéines sont extraites après dénaturation par le phénol (nocif) et forment une peau blanche à l'**interphase** ou **interface** entre les deux **phases**.

Schéma :



Précipitation par un solvant peu polaire (éthanol à 70 %) en présence de cations (deux étapes) :

L'ADN est soluble grâce à la présence de groupements phosphates chargés, ainsi que (dans une moindre mesure) des groupements hydroxyle des pentoses. Pour faire précipiter l'ADN il est nécessaire de neutraliser les charges négatives en ajoutant (s'il n'est pas déjà là : cf. lyse alcaline) un **cation** en concentration élevée (0,5 à 1 mol/L final), puis à baissier la polarité du milieu en ajoutant un solvant moins polaire que l'eau, tel que l'**éthanol** froid (-20°C) (deux volumes au moins), ou l'**isopropanol** (propanol-2) (au moins un volume).

La mise en œuvre se déroule en deux étapes :

La première permet d'obtenir la précipitation de l'ADN : il faut veiller à d'abord homogénéiser l'ADN et la solution apportant le cation, puis ajouter le solvant choisi (éthanol ou isopropanol).

La deuxième en remplaçant le premier surnageant par de l'éthanol à 70° , permet de solubiliser une partie des solutés dans les 30 % d'eau pure ; c'est une étape de **lavage** du culot, pour en extraire les petits solutés.

1.1.2 Purification de plasmide en particulier

Critères déterminant le choix d'une méthode de purification :

- la taille (quelques kilo paires de bases pour les petits);
- le nombre de copies pas cellules (de 20 à 400) ;
- le besoin ou pas d'éliminer les protéines de manière poussée.

Dans tous les cas on évitera d'homogénéiser de manière brutale, car le vortex casse les plasmides en fragments linéaires ou circulaires relaché (**Open circular**) inutilisables.

Trois protocoles sont appliqués :

1.1.2.1. Méthodes de lyse douce pour la purification de gros plasmides ($T > 15$ kpb)

Les gros plasmides dont la taille est supérieure à environ 15 kpb sont tout aussi fragile que l'ADN chromosomique et peuvent être cassés mécaniquement si les manipulations sont trop violentes ; c'est pourquoi on effectuera dans ce cas des homogénéisations très douces, **on ne vortexe jamais !**

On privilégiera l'utilisation d'enzymes [lysozyme, protéinase K] et de détergents pour éliminer protéines et lipides, et ou une technique de chromatographie.

1.1.2.2 . La méthode de lyse alcaline (pour les plasmides de taille usuelle T < 15 kpb)

Principe

C'est la méthode de loin la plus employée, elle précède souvent l'utilisation des colonnes de chromatographies dans les kits de purification.

La petite taille et la conformation superenroulée des plasmides couramment utilisés leur confère une plus grande résistance aux dénaturations dans des conditions alcaline particulières (pH 12) que l'ADN chromosomique. A ce pH alcalin alors que l'ADN chromosomique est totalement dénaturé et souvent fragmenté mécaniquement, le **superenroulement** des plasmides leur évite une dénaturation complète. Après neutralisation de la solution de lyse alcaline, seuls les plasmides peuvent se renaturer rapidement. La grande majorité des protéines, des molécules pariétales et l'ADN chromosomique ne se renaturent pas et forment un complexe gélatineux de type colloïdale duquel les plasmides sont exclus.

Mise en oeuvre

La lyse alcaline employée dans la, plupart des kits commerciaux de purification comporte **trois étapes** : Après centrifugation et élimination du milieu de culture surnageant, le culot cellulaire est remis en suspension dans un tampon contenant de l'**EDTA (chélateur)** des ions magnésium qui sont les cofacteurs obligatoires des DNases), ainsi que de RNases (action prolongée tout le long de la purification grâce à sa grande résistance aux conditions dénaturantes) et parfois du **lysozyme** (pour hydrolyser le **peptidoglycane**). Ce tampon est souvent additionné d'un glucide qui permet d'ajuster la molarité du solvant pour le rendre **isotonique** au cytoplasme pour éviter un éclatement prématuré des cellules ;

A la suspension cellulaire isotonique est ajouté un volume de **soude** (NaOH) additionné de **SDS** (sodium dodecyl sulfate). Les conditions alcalines conduisent à la dénaturation complète de l'ADN chromosomique, de la plupart des protéines solubles ou incorporés dans les membranes. Le SDS complète l'action dénaturante du pH alcalin sur les protéines. Les plasmides sortent des cellules dont les parois et membranes se destructurent ; une solution d'un tampon concentré (Acétate de potassium 4 mol/L par exemple) permet de ramener le pH à la neutralité ce qui entraîne une contraction des molécules dénaturées qui forment un amas colloïdale plus resserré. Une centrifugation permet de séparer cet amas d'un surnageant qui contient les plasmides et toutes les petites molécules cytoplasmiques non dénaturables. Le surnageant est appelé **lysat clair (clear lysate)**.

1.1.3. outils de raffinement : Chromatographies et Ultracentrifugation :

1.1.3.1 . Ultracentrifugation sur gradient de chlorure de césium autoformé :

La solution à purifier est mélangée à une solution concentrée de chlorure de césium et de bromure d'éthidium de manière à obtenir une concentration définie en chlorure de césium. Dans ces conditions la densité du solvant est très proches de celle de l'ADN.

L'emploi du **bromure d'éthidium** a deux finalités :

- en s'intercallant entre les bases de l'ADN double brin il permet de visualiser en fin de centrifugation l'anneau correspondant à l'ADN ; par insolation aux UV l'ADN fluoresce dans le bleu, sinon la forte concentration de BET permet de voir l'anneau par sa couleur rouge violacée ;
- dans le cas particulier où l'on veut séparer l'ADN chromosomique de l'ADN plasmidique le taux d'incorporation différent du BET dans ces molécules en fonction de leur conformation (respectivement relâchée et superenroulé négativement) permet de les différencier par leur densité. Ainsi on obtiendra deux anneaux séparés, celui du plasmide étant le plus dense.

Les autres molécules présentes dans le mélange sont soit beaucoup moins denses et surnagent (les protéines), soit plus denses et précipitent (ARNs).

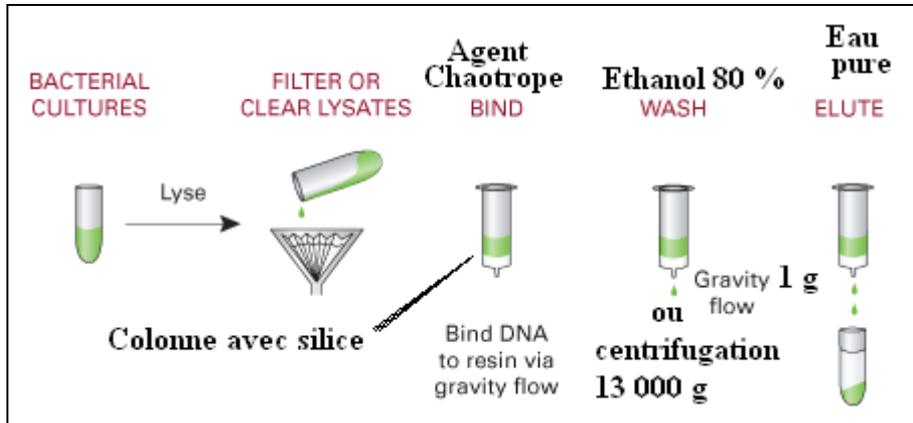
L'anneau d'intérêt est récupéré par ponction directe à l'aide d'une seringue, puis soumis à deux étapes de nettoyage pour éliminer les deux produits ajoutés :

- le BET est éliminé par extraction biphasique à l'aide d'un solvant très peu miscible à l'eau (chloroforme ou **butanol**) ;

- le chlorure de césium est éliminé par **dialyse** dans un grand volume d'eau ou par **diafiltration** (changement de solvant à l'aide d'un dispositif d'ultrafiltration tangentielle)

Remarques technologique : du fait de la très faible différence de densité entre le solvant et l'ADN, la vitesse de sédimentation de l'ADN est extrêmement faible, par conséquent la centrifugation doit se faire sur une longue durée (48 heures) et une accélération colossale (100 000 g), ce qui nécessite une machine spécifique très honoreuse. Ce procédé n'est donc utilisé que par un très petit nombre de laboratoires.

1.1.3.2. Chromatographie sur gel de silice en présence d'agent chaotrope :



La silice SiOH_4 a la propriété d'adsorber spécifiquement les acides nucléiques lorsque la polarité du solvant diminue en dessous d'un certain seuil. La première étape de la purification consiste à mélanger à la solution d'ADN contaminée par des protéines à une solution concentrée d'un **agent chaotrope** (NaCl concentré ou Chlorure de Guanidium). Le produit ajouté a la propriété d'empêcher l'eau de solvater

suffisamment l'ADN pour le solubiliser, mis en présence de silice l'ADN devient insoluble et s'adsorbe à sa surface. Les protéines restent solubles dans les mêmes conditions.

La deuxième étape consiste à laver la phase fixe des protéines présentes dans le volume de solvant libre, en utilisant un solvant peu polaire. La plupart du temps ce solvant est constitué d'éthanol à 80 %, ce qui permet d'éliminer une grande partie des sels chaotropiques sans décrocher l'ADN.

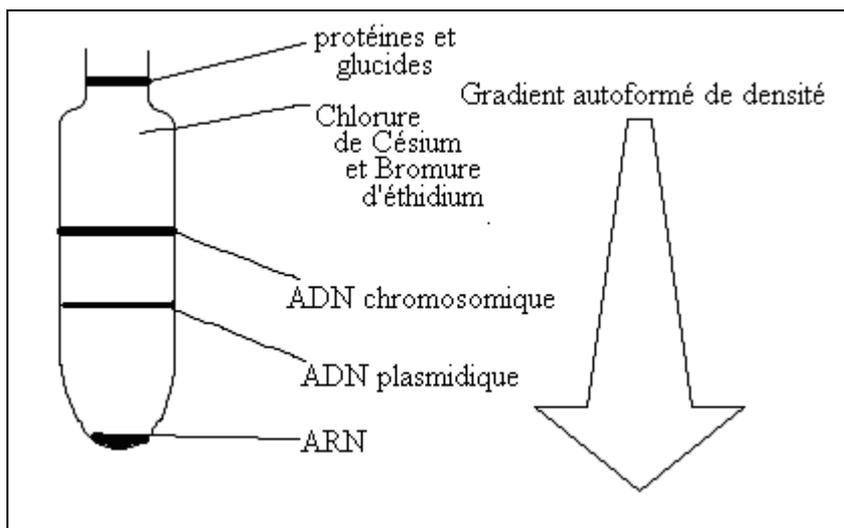
La dernière étape est la phase d'éluion, qui se fait en utilisant un faible volume de tampon très peu ionisé ou de l'eau pure.

1.1.3 Chromatographie sur résine échangeuse d'anions :

Dans cette technique une résine fortement chargée par des résidus cationiques (ammonium quaternaire) adsorbe les acides nucléiques (l'ADN et l'ARN étant des polyanions phosphates) à base forte ionique. Après une phase obligatoire de lavage à faible force ionique, l'éluion se fait à forte force ionique (compétition des anions). La solution d'acides nucléiques peut directement être précipitée par l'éthanol sans rajouter de sels.

En résumé : deux techniques de chromatographie sont les plus utilisées :

- Sur silice en présence d'un agent chaotrope ; la solution à purifier est mélangée à un agent chaotrope qui diminue la solubilité de l'ADN (1 volume de Guanidine 6 mol.L^{-1}) ; l'ADN s'adsorbe sur la silice ; un lavage à l'éthanol 80 % permet d'éliminer toutes les protéines ; puis l'ADN est élué dans un tampon de faible force ionique (TE ou eau) ;
- Sur résine anionique (échangeuse d'anions comme R-NH_3^+ , $\text{R}_1\text{R}_2\text{R}_3\text{R}_4\text{N}^+$, Q pour quaternaire), l'ADN se fixe à faible force ionique et est élué par compétition à force ionique élevée. Ce procédé peut nécessiter un dessalage par précipitation à froid en présence d'éthanol, suivie d'un lavage à froid par l'éthanol 70 % pour le dessalage proprement dit, ou bien par l'utilisation d'une chromatographie d'exclusion.



Remarque : dans ces deux procédés l'éluion dépend de la force ionique mais de manière inversée.

1.1.4. Ultracentrifugation sur gradient autoformé de chlorure de césium : centrifugation isopycnique

Procédé très coûteux de part la machine spécifique employée et le temps nécessaire à sa réalisation, mais permettant d'obtenir de forte quantité (mg) de matériel très pur. L'accélération doit atteindre 100 000 g (comparé aux 13 000 g des centrifugeuses classiques de laboratoire) et durer au moins 48 heures.

Mise en oeuvre :

-l'échantillon est mélangé à du chlorure de césium à une concentration finale telle que la densité de la solution saline approche de près celle de l'ADN bicaténaire ; du bromure d'éthidium est ajouté pour différencier l'ADN plasmidique superenroulé, de l'ADN chromosomique linéarisé par des coupures liées à la purification. Le premier (plasmide) reste plus dense que le second car du fait de son superenroulement négatif il ne peut pas être saturé par le BET contrairement à l'ADN plasmidique qui s'en trouve de fait allégé.

1.1.4 Purification d'ARN

1.1.3.1. Cas de l'ARN messenger eucaryote

cf. synthèse d'ADNc. Chromatographie d'affinité avec polydT fixé covalamment sur une résine.

1.1.3.2. Cas des autres ARN

Lorsque l'on étudie des génomes de virus à ARN, celui-ci est souvent rétrotranscrit en ADN, grâce à la mise au point d'une amorce spécifique permettant d'effectuer sa transcription inverse. On en profite alors pour introduire avec l'amorce un site de restriction pour faciliter le clonage de ce fragment.

1.2 A.D.N. c : synthèse d'A.D.N. complémentaire de l'A.R.N. messenger eucaryote

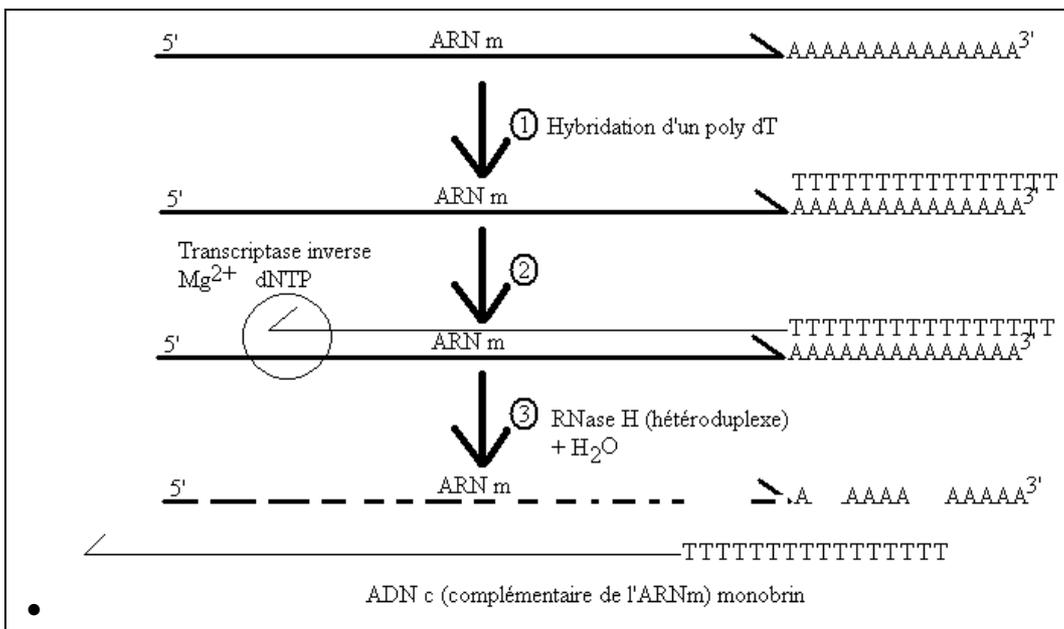
Lorsque la séquence à cloner est un gène eucaryote produisant une protéine, il est intéressant de produire l'insert à partir de l'A.R.N.m codant pour la protéine. Mais cet A.R.N. doit être exprimé par la cellule à partir de laquelle il est purifié (cf. technique de préparation de l'A.D.N.c).

L'ensemble des ADNc d'un type cellulaire représente à un moment donné le phénotype exprimé, il peut être collecté dans une **banque d'ADNc**.

Les banques d'ADNc de différents types cellulaires peuvent être comparées par des techniques d'hybridation sur support solide, les **puces à A.D.N.**

La technique de synthèse de l'ADNc est généralisable à l'étude de la séquence de tout ARN : par exemple le séquençage du génome des virus à ARN se fait de manière classique après avoir rétro transcrit l'ARN en ADN.

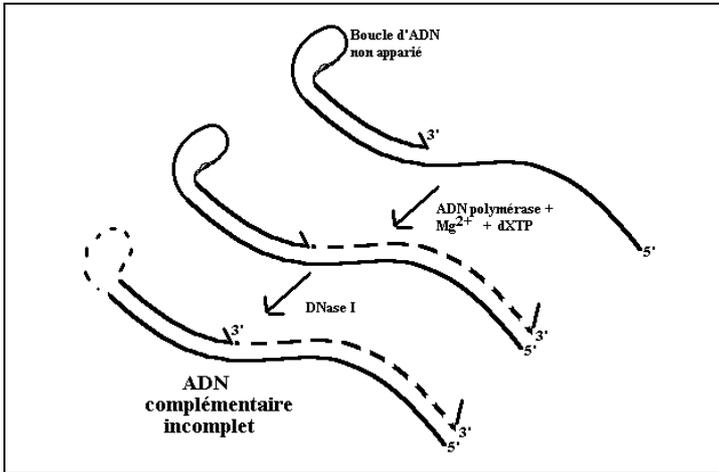
1.2.1. Etapes communes à toutes les méthodes de transcription inverse



Hybridation d'une amorce polydT (ADN) sur la queue polyA en 3'OH de l'ARNm eucaryote (la queue polyA n'existe pas chez les ARN procaryotes qui ne sont pas maturés). Transcription inverse de l'ARN en ADNc (matrice = ARN ; amorce polydT, dXTP, Mg²⁺) par une transcriptase inverse (reverse transcriptase = RT) d'origine rétrovirale ; c'est une ADN polymérase ARN dépendante. Destruction de la matrice

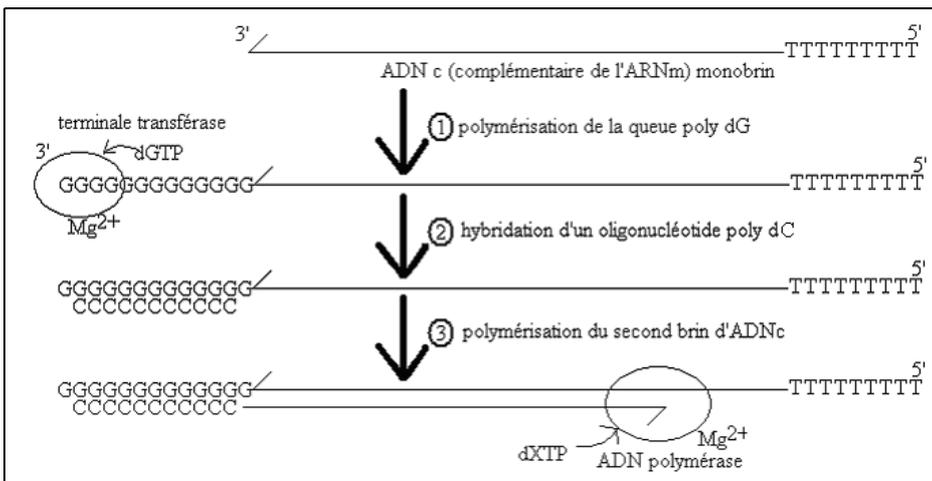
d'ARNm, soit chimiquement par hydrolyse alcaline (NaOH), soit de préférence par hydrolyse enzymatique (Rnase H => H pour Hétéroduplexe).

1.2.2. Méthode historique (désuète)



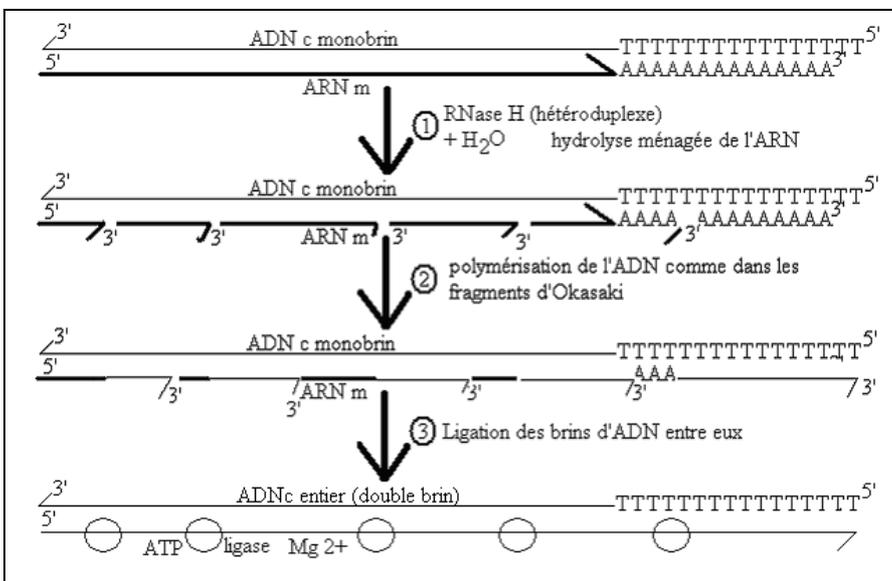
Après destruction de l'ARN, l'ADN peut se replier pour former un lasso et la partie 3'OH libre hybridée sert d'amorce. La boucle est hydrolysée par une Dnase I. Cette méthode ne permet pas de conserver l'intégralité de la séquence de l'ARNm, elle est abandonnée.

1.2.3. Méthode de "tailing"



Avant destruction de l'ARNm par hydrolyse, la **terminale transférase** permet d'incorporer uniquement en 3'OH du brin d'ADN des G provenant de la polymérisation de dGTP. Ensuite une amorce polydC est hybridée à la queue polyG pour servir d'amorce (primer) à une ADN polymérase (la Taq par exemple) de polymériser le deuxième brin de l'ADNc.

1.2.4. Méthode de type "nick translation" : déplacement de coupure



Dans le mélange réactionnel sont introduits en même temps : une RNase H (coupure monobrin de l'A.R.N. dans un hétéroduplexe A.R.N./A.D.N.) en quantité limitée qui crée des amorce 3'OH libre sur l'ARNm ; des dNTP pour permettre la polymérisation de l'A.D.N. néosynthétisé par l'A.D.N. polymérase ajoutée ; une ligase qui en présence de magnésium et d'ATP ligue les différents brins d'A.D.N. synthétisés par l'A.D.N. pol I. Les amorces d'A.R.N. issues de la coupure de l'ARNm sont hydrolysées par l'activité 5'→3' exonucléasique de l'A.D.N. pol I.

Tout comme la méthode de tailing, cette technique permet en principe d'obtenir des ADNc complets.

1.2.5. Multiamorçage aléatoire : *random priming*

Le deuxième brin d'ADNc est synthétisé par une ADN polymérase en de multiples fragments dont l'origine vient de l'hybridation d'hexamères (oligonucléotides très courts). Une ligase permet de ligaturer ces fragments pour obtenir un brin entier.

1.2.6. RT-PCR

La RT-PCR n'utilise pas de purification préalable des ARNm, seuls les ARN totaux ont besoin d'être purifiés. Il faut surtout **éviter de contaminer les ARN par des traces d'ADN génomiques** (utilisation de « Dnases RNases free ». La PCR débute dès que le premier d'ADN est rétrotranscrit. C'est l'ADN polymérase thermostable grâce à l'amorce sens qui synthétise le deuxième brin d'ADN de l'ADNc.

La RT-PCR n'amplifie pas forcément la totalité de l'ADNc, tout dépend de l'endroit où s'hybrident les deux amorces.

Cette technique permet de mettre en évidence la transcription d'un gène, c'est à dire son expression dans un type cellulaire à un instant donné (par exemple après stimulation par une drogue, un médicament, une hormone, au agent mutagène ou cancérigène. La Q-RT-PCR temps réel permet en outre de doser l'expression du gène étudié.

1.2.7. APPLICATIONS :

Etude de l'expression des gènes, transcriptome, permet de caractériser le phénotype spatio-temporel des cellules par l'étude de leur **protéome**.

Puces à ADN : criblage haut débit du **transcriptome** d'un type cellulaire, étude du phénotype cellulaire automatisée.

1.3 Cas particulier d'un sous clonage

Un sous clonage consiste à transférer un insert d'un vecteur primaire vers un autre vecteur. Dans ce cas, le site d'insertion dans le premier vecteur étant connu il suffit d'employer une ou deux enzymes de restriction appropriées pour récupérer l'insert.

L'insert découpé est purifié après électrophorèse préparative, l'A.D.N. est extrait du gel d'agarose ou d'acrylamide par différentes méthodes :

1) centrifugation au travers d'un filtre ne retenant que le gel ;

2) après dissolution chimique ou enzymatique du gel;

3) une fente pratiqué du coté anode de la bande à récupérer permet d'introduire un morceau de papier DEAE cellulose, la migration est reprise un court instant de manière à ce que l'A.D.N. vienne s'y adsorber, il est ensuite élué dans un tampon de conservation.

Si on n'utilise qu'une seule enzyme à bouts collants ou bien 2 enzymes à bouts francs, l'insert peut s'orienter de deux façons. Stratégie bidirectionnelle ou non orientée.

Cf. partie Ligation

Ex : T.P. "clonage" schéma

Si l'on utilise deux enzymes incompatibles, elles vont ouvrir le vecteur en deux endroits, l'insert possédant un site différent à chacune de ses extrémités ne pourra donc s'intégrer que dans un seul sens. C'est une stratégie dite orientée ou monodirectionnelle.

1.4. La PCR (ou RPC)

La réaction de polymérisation en chaîne permet d'amplifier par polymérisation une portion d'ADN double brin (**ADN cible** ou **amplifié**) dont on connaît la séquence des deux extrémités. L'ADN polymérase utilisée est thermostable (Taq polymérase) et peut subir sans trop de dommages les cycles de chauffages qui permettent de dénaturer l'ADN double brin en ADN simple brin servant de matrice aux polymérisations des cycles suivant.

1.4.1. Milieu réactionnel

La réaction nécessite :

Une ADN polymérase thermorésistante (celle de *Thermus aquaticus* par exemple) ;

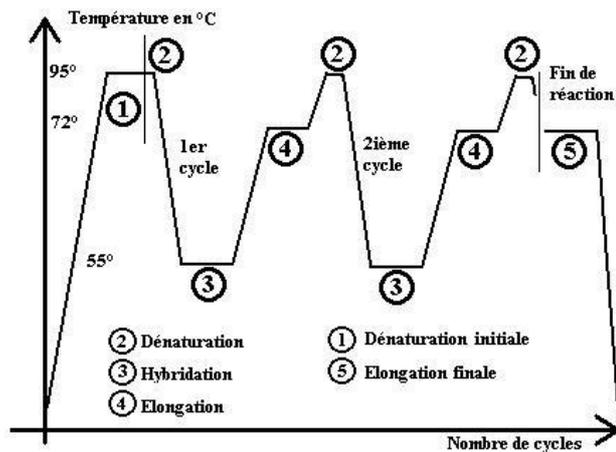
Du magnésium en quantité optimisée ;

Des dXTP, désoxynucléotides triphosphate (X = A, T, G ou C) ;

L'ADN contenant la séquence cible ;

Deux oligonucléotides différents complémentaires des séquences qui bordent la séquence à amplifier. Ces oligonucléotides servent à amorcer la polymérisation.

1.4.2. Déroulement des cycles



Classiquement les cycles répètent trois étapes :
Dénaturation à 95°C pour créer des matrices simple brin ;
Hybridation des amorces (50 à 55°C) ;
Elongation (polymérisation du brin complémentaire) à 72 °C.

La première dénaturation est plus longue que les autres : C'est surtout utile pour dénaturer l'ADN lorsqu'il n'est pas purifié : PCR sur colonie, sur échantillon biologique.

La dernière élongation est prolongée : cela permet à l'ADN polymérase de finir les élongations très nombreuses vers la fin de la PCR. Une partie des réactifs sont en voie d'épuisement l'élongation est plus lente à la fin.

1.4.3. Optimisation

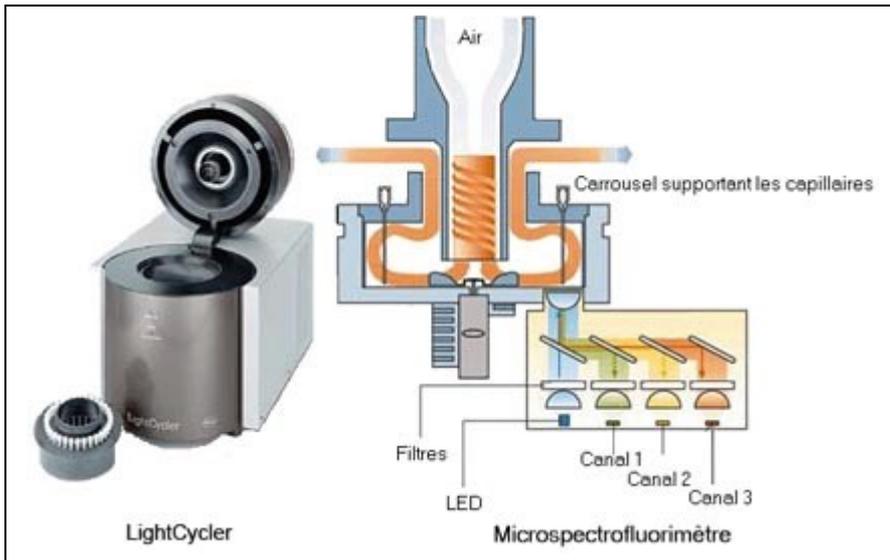
Le bon fonctionnement d'une PCR est tributaire de différents paramètres :

- Les deux amorces doivent posséder une T_m (proportionnel au %GC) proche. Certains thermocycleurs permettent de créer un gradient de température pour optimiser la température d'hybridation ; le but de ce travail est de déterminer à quelle température le **rendement** de l'amplification est **maximal** tout en restant **spécifique**.
- Les deux amorces ne doivent pas s'apparier entre elles (appariement inter) ou sur elles-mêmes (intra).
- La taille des amorces va jouer sur leur spécificité. 20mer \Rightarrow 1 configuration parmi $4^{20} = 2^{40}$ environ 10^{12} . On utilise rarement des amorces de moins de 16 bases pour cette raison.
- La concentration de Mg^{2+} doit être testée pour maximiser l'amplification sans occasionner d'amplification non spécifique en maximisant la stringence. La **stringence** est l'ensemble des conditions physicochimiques défavorisant les hybridations non spécifiques ; en d'autres termes lorsque la stringence est maximale (force ionique faible par exemple) seule les hybrides spécifiques peuvent s'apparier.
- La nature de l'enzyme permet une plus ou moins grande fidélité dans la répliation. La Taq pol est connue pour faire beaucoup d'erreurs car elle ne possède pas d'activité 3' \rightarrow 5' exonucléasique de correction d'erreurs d'appariements. La Taq pol ajoute en 3' un A. D'autres enzymes commercialisées n'ont pas ces défauts.
- La concentration en dNTP et amorces n'est pas optimisée car ces produits sont ajoutés en excès.
- La purification de l'ADN à amplifier peut améliorer l'amplification en éliminant des substances inhibitrices présentes dans l'échantillon.
- La durée de chaque étape doit être réduite au temps minimum en fonction de la longueur des séquences cibles, des amorces, de l'enzyme choisie (la Taq à besoin d'une minute pour polymériser 1 kb), du nombre de cycles choisis.

1.4.4. Appareillage :

- **Thermocycleur** : c'est un bain Marie à sec programmable, dans lequel le réchauffement et le refroidissement sont rendus très rapides grâce à des composants utilisant l'effet Peltier. Un couvercle chauffé à plus de 100 °C est mis en contact des bouchons des tubes pour éviter la déshydratation du mélange réactionnel par accumulation de gouttes de condensation en haut du tube. Si l'appareil ne

possède pas de couvercle chauffant, il faut ajouter une goutte d'huile de paraffine pour éviter l'évaporation (ce procédé est pénible et en voie de disparition).

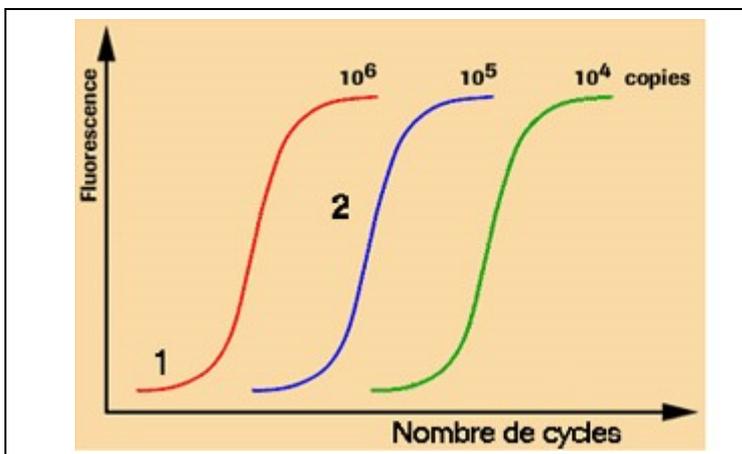


- **Lightcycleur** : thermocycleur et fluorimètre

la PCR temps réelle est rendu possible par la mesure en continu de la fluorescence émise par l'ADN double brin néosynthétisé. La plupart des appareils utilisent des capillaires transparents aux UV pour réaliser la réaction d'amplification. Le résultat est suivi en temps réel sur l'écran d'un ordinateur.

1.4.4. Quelques domaines d'application :

- Police scientifique : empreintes génétiques ; diagnostic rapide de maladies : SIDA, tuberculose ; Typage de souche pour accélérer la vitesse de sélection des semences ; séquençage (PCR asymétrique, avec amplification arithmétique) ;
- PCR quantitative, temps réel : un fluorochrome en s'intercalant spécifiquement dans l'ADN double brin permet de suivre en temps réel l'amplification réalisée dans un *light cycler*.



La spécificité de la détection peut être vérifiée en fin de réaction par analyse de la courbe de fusion du ou des amplifiats. L'amplification est spécifique lorsqu'une seule séquence est amplifiée, la dérivée première de la courbe de fusion donne un pic unique ; dans le cas contraire la dérivée première donne autant de pics que d'amplifiats différents (dans la mesure où chacun possède un %GC différent donc une température de fusion ou demi-dénaturation

différente).

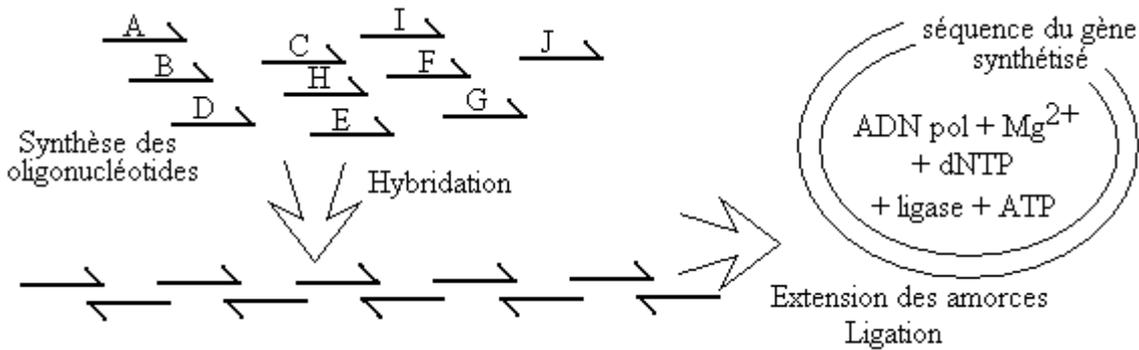
Remarque : de nombreux procédés utilisant des sondes fluorescentes couplées à des quencheurs permettent de s'assurer de la spécificité de l'amplification.

- **RT-PCR** : elle permet l'analyse de l'**expression des gènes** et leur quantification.
- Séquençage par PCR asymétrique (une seule amorce, plusieurs cycles), l'amplification est arithmétiques ; seule le brin séquencé est amplifié d'un facteur n ($= x n \neq 2^n$)
- PCR-multiplexes : plusieurs couples d'amorces permettent d'amplifier simultanément plusieurs amplifiats différents (utilisé en typage génétique et en diagnostic)
- Mutagenèse dirigée (cf. partie 5 du cours : applications du clonage)

1.5. Insert obtenu par pure synthèse chimique

La synthèse chimique des oligonucléotides est devenue une opération automatisée peu coûteuse. Cette synthèse chimique se fait par addition successive de bases en partant du côté 3' pour finir par le côté 5' ; elle se

fait donc dans le sens inverse de la synthèse biologique. Pour synthétiser un gène, plusieurs oligonucléotides correspondant à des portions chevauchantes des deux brins, sont hybridés ensemble. Une ADN polymérase, associée à du magnésium, des désoxynucléotides, de l'ATP et une ligase comble les lacunes pour reconstituer la séquence désirée. Ces opérations sont automatisées et fournies par des prestataires de service, souvent les mêmes qui synthétisent les oligonucléotides.

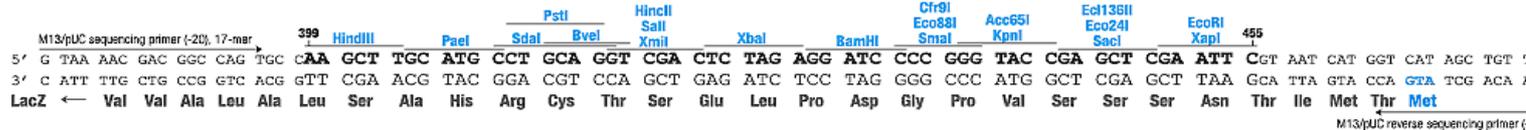


2. Ligature de l'insert dans le vecteur : l'opération de ligation

2.1. Adaptateurs : (linkers)

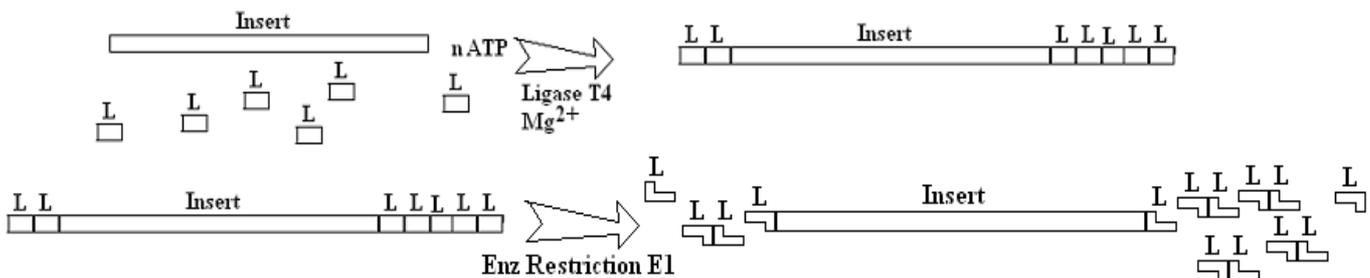
Pour faciliter le passage d'un insert d'un vecteur à un autre, il est intéressant que celui-ci soit encadré par une grande variété de sites de restriction uniques.

Figure ci-dessous : site multiple de clonage dans la carte de pUC18.



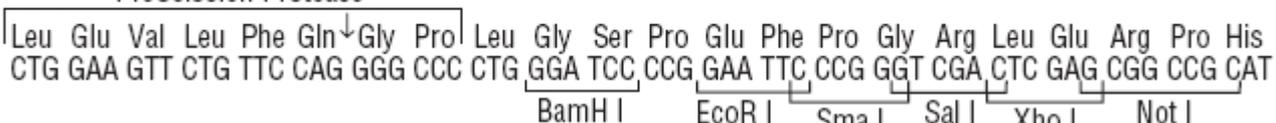
Pour créer cette situation après, avoir préparé les inserts, on y adapte des séquences d'origine artificielle contenant sur une courte séquence un grand nombre de sites de restriction différents et uniques. Ces séquences sont ajoutées aux deux extrémités de l'insert (on en met au moins deux fois plus que d'inserts) et on les relie en utilisant la plupart du temps la ligase du phage T4 (ligation des doubles brins francs).

Le vecteur pourra être ouvert à un site précis avec une ou deux enzymes qui coupent aussi les linkers.



pGEX-6P-1 (27-4597-01)

PreScission Protease



Les adaptateurs peuvent être déjà présent dans les vecteurs (cf. pGEX-6P-1 ci-dessus) et permettent un clonage plus aisé.

Notion importante : il est impératif d'utiliser des enzymes à sites uniques de restriction sur le vecteur pour préparer l'insert, sinon le vecteur est fragmenté et il est très difficile de le reconstituer lors de l'opération de ligation.

2.2. Action de la phosphatase alcaline (empêcher la circularisation des vecteurs)

Le vecteur ouvert est traité à la phosphatase alcaline qui hydrolyse les phosphates libres en 5'. Si le vecteur se referme sur lui-même les ligases ne pourront pas lier les brins entre eux.

Le vecteur associé à un insert sera lié sur un des deux brins ce qui est suffisant pour stabiliser cette construction dans les cellules transformées. Le système SOS réalise la réparation des brèches simple brin déphosphorylées en déléant la partie déphosphorylée puis en assurant la synthèse du brin manquant et enfin refermant la brèche avec une ligase.

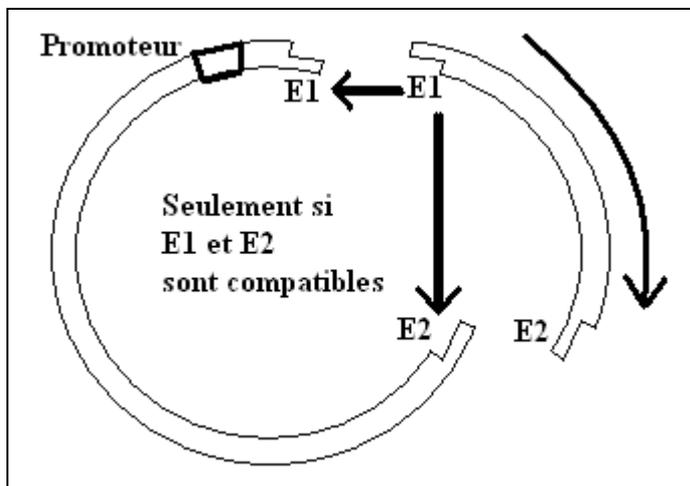
2.3. Choix d'une ligase

C'est presque toujours la **ligase du phage T4** qui est utilisée car elle est capable de ligaturer des brins à bouts collants aussi bien que des brins à extrémités franches. Elle nécessite de l'**ATP** et du **magnésium**.

2.4. Stratégies directionnelles de clonage

L'introduction de l'insert dans le vecteur peut se faire dans deux directions ou bien une seule :

La stratégie bidirectionnelle, implique que les deux extrémités de l'insert sont identiques entre elles et avec celles obtenues sur le site d'insertion du vecteur, après digestion par une seule enzyme de restriction, ou bien deux enzymes dont les sites de restriction sont **compatibles** (bouts francs ou ayant des extrémités cohésives de séquence complémentaires).



La stratégie unidirectionnelle ou monodirectionnelle, implique que les deux extrémités de l'insert sont différentes et incompatibles entre elles. L'insert a été préparé à l'aide des deux mêmes enzymes que celles qui ont ouvert le vecteur. L'insert ne peut donc s'orienter que dans une seule direction.

1 enzyme ou 2 enzymes compatibles => deux orientations possibles pour l'insert.

2 enzymes incompatibles => une seule orientation possible.

3 Choix et préparation d'un vecteur de clonage

Définition : un vecteur de clonage est constitué d'un acide nucléique (souvent ADN ds, mais pas toujours!) capable de se répliquer ou d'être répliqué dans des conditions particulières et de transporter un séquence étrangère appelée l'insert. Il doit en outre posséder des sites uniques de restriction pour y introduire l'insert après digestion et ligation, ainsi qu'un ou plusieurs marqueurs de sélection (3 éléments essentiels).

Chez les procaryotes il y a trois types de vecteurs :

- 1) plasmidiques ;
- 2) les virus ou phage ;
- 3) les phagémides ou cosmides.
- 4) chromosomes artificiels (B.A.C)

Chez les eucaryotes il y a aussi 3 types de vecteurs :

- 1) plasmides
- 2) chromosomes artificiels
- 3) les virus

Il existe enfin des vecteurs dits navettes qui peuvent être multipliés aussi bien chez une bactérie qu'un eucaryote ; ils possèdent donc deux systèmes de répllication et de sélection de transfection.

Le choix du vecteur (entre autre) dépend très souvent de la taille de l'insert à cloner :

Vecteur de clonage	Taille de l'insert
Plasmide bactérien standard à grand nombre de copies	0-10 Kb
Bactériophage λ à insertion	0-10 Kb
Bactériophage λ à remplacement	9-23 Kb
cosmides	30-44 Kb
BAC (chromosome bactérien artificiel)	jusqu'à 300 Kb
YAC (chromosome artificiel de levure = <i>yeast</i>)	0.2-2.0 Mb

III. 1. Eléments communs à tous les vecteurs de clonage

III. 1. 1. Le système de répllication

Le vecteur doit pouvoir être répliqué dans la cellule qui l'héberge. S'il s'agit d'un plasmide procaryote il possède une origine de répllication dérivée d'un plasmide naturel. Dans les schémas on la note Ori.

Si le vecteur est un virus, il doit posséder outre une origine de répllication spécifique, un ensemble de gènes codant pour des protéines indispensables à sa répllication.

Les vecteurs eucaryotes peuvent posséder comme les chromosomes naturels plusieurs origines de répllication dispersées le long de la séquence du vecteur. Chez la levure on parle de séquences A.R.S. ("*autonomous replicating sequence*").

Un vecteur navette possède les différents types d'origines de répllication lui permettant de passer d'un procaryote à un eucaryote (Ori et A.R.S. pour les pYAC).

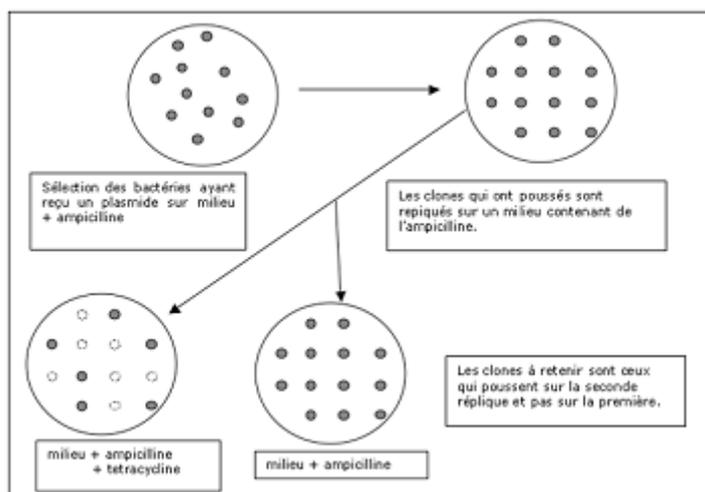
III. 1. 2. Les sites uniques de restriction

L'existence de sites uniques de restriction est indispensable pour ouvrir les vecteurs en un nombre le plus petit possible de fragments : 1 pour les plasmides, 2 pour les vecteurs viraux à génome linéaire. Les fragments obtenus après ouverture peuvent être purifiés par électrophorèse préparative.

Des sites de restrictions peuvent être ajoutés aux extrémités d'un insert, soit par ligature d'adaptateurs, soit lorsqu'ils sont obtenus par PCR en ajoutant en 5' des oligonucléotides des sites de restrictions.

Ces sites sont rassemblés dans des portions restreintes des vecteurs modernes sous forme de **site de clonage multiple** : MCS, qui sont des **polylinkers**. Cf. pUC18, pGex

III. 1. 3. Les marqueurs de sélection



Les marqueurs de sélection servent à sélectionner les clones à différentes étapes.

1) sélectionner les clones **transfectés** ; le marqueur associé uniquement aux cellules contenant le vecteur leur permet de survivre dans des conditions sélectives (antibiotique, auxotrophie, poison métabolique...), les cellules non transfectées

sont ainsi facilement éliminées. Cela est très souhaitable lorsque le système de transfection est peu efficace (par exemple pour la transformation d'une bactérie E. coli par un plasmide, seule 1 cellule sur un million accepte le vecteur plasmidique).

Ces marqueurs sont souvent des gènes de résistances à des substances toxiques (antibiotiques pour les bactéries) ou des gènes liés à l'anabolisme (marqueur d'auxotrophie).

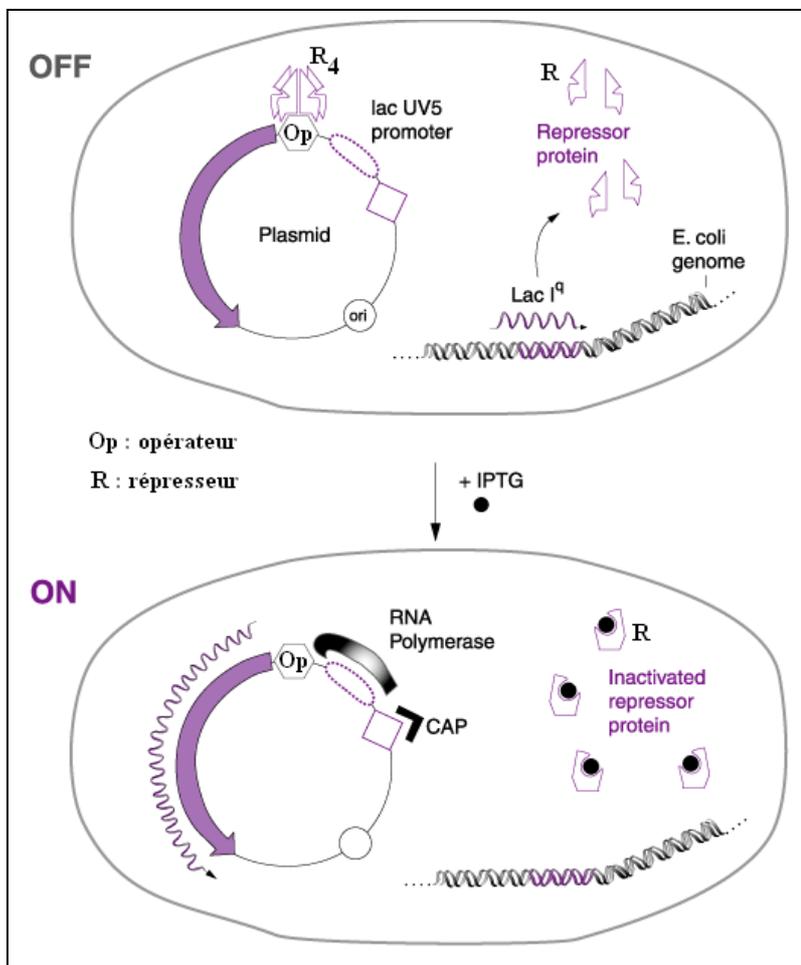
exemples : Amp^R = Bla = β-lactamase, URA, LEU

2) sélectionner les clones transformés **recombinant** : il arrive assez souvent pour les méthodes de clonage général que les vecteurs n'intègrent pas l'insert. Il existe des méthodes simples permettant de repérer alors les clones recombinés.

2 exemples :

A) La disparition d'une fonction : un insert cloné dans le gène TetR de pBR322 fera perdre à la bactérie hôte la faculté de résister à la tétracycline. Les clones sont d'abord étalés sur un milieu contenant de l'ampicilline pour tuer les cellules non transformées, puis par réplique au velours les colonies sont repiquées sur un milieu additionné de tétracycline. Les colonies manquantes sont celles qui contiennent le vecteur avec l'insert situé dans le gène Tet^R. C'est un exemple de sélection négative.

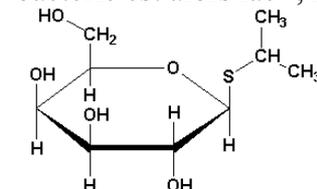
B) le système Blanc Bleu ou α complémentation



La β-galactosidase hydrolyse la liaison osidique β-1,4 du lactose et de plusieurs substrats artificiels chromogènes (O.N.P.G, X-Gal). Pour réaliser le test blanc bleu on utilise toujours un couple bactérie vecteur bien choisi. La souche réceptrice possède une β-galactosidase tronquée dans sa partie N-terminale dont le gène est noté ΔlacZ, elle est donc lac -, en outre elle est sensible à l'ampicilline Amp^S.

Le vecteur utilisé (plasmide ou virus) possède un gène inducible par l'I.P.T.G. appelé lacZ' codant pour la partie N-terminale manquante (le produit du gène est appelé peptide α). Il se trouve par hasard que le peptide alpha s'il est présent dans la souche réceptrice va compléter l'enzyme défectueuse et rétablir sa fonction, la souche est alors lac +, AmpR.

Si on introduit un insert dans lacZ' on obtient une protéine de fusion qui n'est plus capable de compléter le gène chromosomique, la bactérie est alors lac -, mais AmpR.



Isopropyl Thiogalactoside (IPTG)

Le caractère lac est visualisé après induction par présence d'X-gal

X + gal, X qui est

l'I.P.T.G. (c'est le système de l'opéron lactose) et culture en

qui est incolore. Si la bactérie est lac + elle hydrolyse X-gal en apolaire et bleu s'accumule dans les membranes et donne aux colonies une couleur bleu cyan. Si la bactérie est lac -, elle donne des colonies blanche (d'où le nom de test blanc bleu).

L'IPTG est un analogue structural du lactose, qui est très affiné pour le récepteur. N'étant pas hydrolysable, il est appelé **inducteur gratuit**.

III. 2. Les vecteurs plasmidiques

Définition : les plasmides sont de petites molécules d'A.D.N. ds. superenroulée capable de répllication autonome pourvus de fonctions non essentielles pour l'espèce les abritant. Leur taille représente rarement plus de quelques pour-cent de celle du génome.

Nomenclature : les plasmides sont nommés en utilisant des lettres symbolisant le plasmide (p) un nom de laboratoire (EMBL : european molecular biology laboratory), de découvreur (Bolivar Rodriguez : BR) ou de fonction connue (Col E) et un numéro donnant l'ordre d'apparition d'un nouveau plasmide dérivé de l'original (ex : pUC 1, 2, 3, ..., 18, 19, etc ...).

Par rapport au critère du nombre de copie par cellule, il existe deux classes de plasmides :

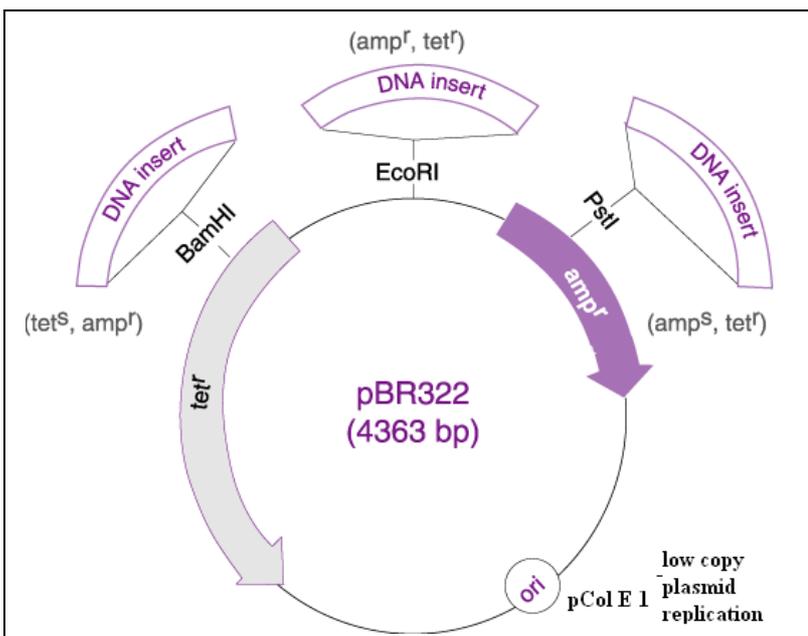
- 1) ceux dont le nombre de copie peut être élevé, ce sont ceux qui sont utilisés pour le clonage, ils sont ségrégués au hasard lors de la répllication (probabilité de 2^{-N} qu'une cellule n'hérite d'aucun plasmide)
- 2) les plasmides comme le facteur sexuel F qui possèdent un système de régulation de la répllication très sévère couplé à celui du chromosome. Ils ne sont pas utilisés comme outils à cause de leur unicité par cellule => trop faible rendement de production du vecteur et faible amplification de l'insert.

(le facteur F code pour deux gènes *ccd* : *ccd A* une toxine létale dont la durée de vie est plus grande que le produit du gène *ccd B* l'antitoxine. En conséquence, si la cellule perd le plasmide elle est tuée par la toxine *ccdA*)

II. 2. 1. Origine : pCol E1 plasmide à faible nombre de copies par cellules

Le plasmide pCol E1 (rèf D5264 SIGMA 12,5 µg) fut l'un des premiers étudiés chez E. coli. Il confère à la souche l'hébergeant un avantage sélectif sur les autres souches d'E. coli. Ce plasmide code pour la synthèse de colicine qui est un antibiotique peptidique ainsi que pour un gène de résistance à ce même antibiotique. Ce plasmide possède quelques sites uniques de clonage dans le gène de production de la colicine (Ava I, Eco RI, Sac II, Sca I, Sma I) qui ont servi pour les premiers essais de clonage de gènes.

III. 2. 2. Plasmide de première génération : le famille pBR



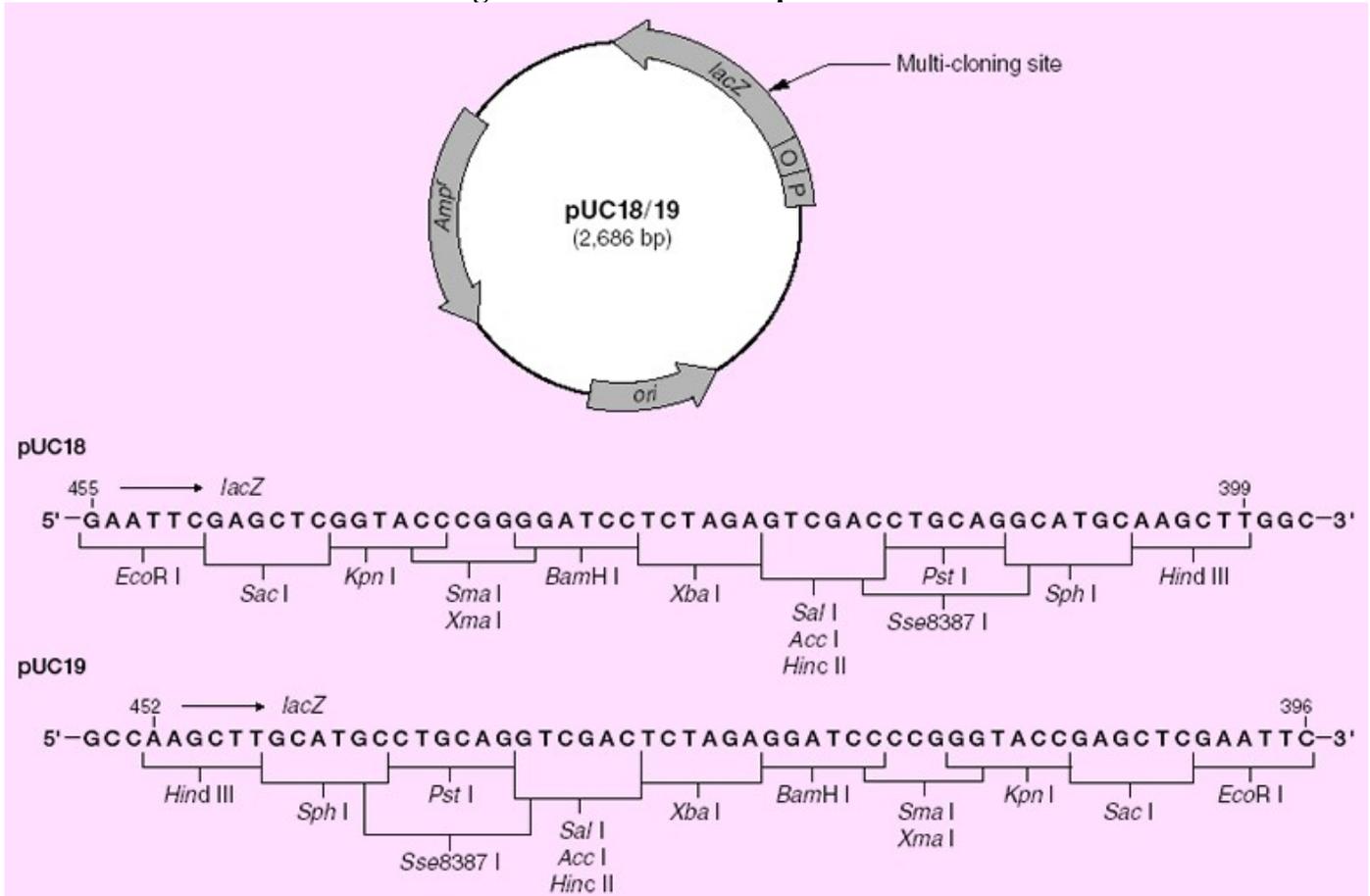
Les premiers plasmides dérivés de pCol E1 furent ceux de la série pBR dans lesquels est conservé l'origine de répllication du premier plasmide et son système de contrôle du nombre de copie par cellules (20 à 30 par cellule). A cela ont été ajoutés une ou plusieurs séquences de gènes conférant la résistance à des antibiotiques (ex : pBR322 contenant les gènes *Amp^R* qui code pour une β -lactamase et *Tet^R* qui code pour une pompe ATPasique membranaire qui évacue la tétracycline).

Inconvénient : faible choix dans les sites uniques de restriction, nombre de copie par cellule assez faible impliquant un rendement de purification assez bas (0,2 µg/mL de culture). Taille : 4361 pb

Source de la figure ci-contre :

<http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc471/pages/Lecture4/Lecture4.html>

III. 2. 3. Plasmide de deuxième génération : la famille pUC



Pour améliorer les plasmides de première génération plusieurs améliorations ont été apportées :

1) les sites de restriction uniques ont été rassemblés pour la plupart dans une zone bien précise du vecteur, un M.C.S. (multiple cloning site) ou site multiple de clonage. Cela laisse plus de choix vis à vis des enzymes de restriction.

2) l'insert est cloné dans un gène qui sert de marqueur de sélection. Cela permet de repérer les clones recombinés. Exemple : système Blanc Bleu

Schéma du gène : Opérateur (site de fixation du répresseur inactivé par l'I.P.T.G.), Promoteur (site de fixation de la RNA polymérase), gène *lacZ'* avec M.C.S. dans la région N-terminale.

3) la régulation du nombre de copie par cellule est partiellement levée, ce qui permet d'obtenir un nombre de plasmides de 10 à 20 fois supérieur à celui de pBR322 (soit aux alentours de 200).

Désavantages : si l'A.D.N. cloné contient un gène qui est inséré dans la bonne phase de lecture, il peut devenir toxique pour la cellule par simple accumulation. D'autre part la taille des inserts ne peut pas dépasser quelques milliers de paires de bases (10 kpb au max.). Pour ces deux raisons on préférera parfois utiliser un vecteur viral.

III. 2. 4. Plasmides eucaryotes : 2 μ et Ti

Il peut exister chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* des plasmides (ADN circulaire), ce qui est rare chez les eucaryotes. Un de ceux-ci appelé le plasmide 2 μ (qui fait 2 micromètres) a été utilisé comme base pour créer différentes générations de vecteurs possédant des caractères comparables aux plasmides procaryotes : une origine de répllication, des marqueurs de sélection de type métaboliques (*Trp1*, *His3*, *Leu2*, *Ura3*, ...) et des gènes rapporteurs contenant un site multiple de clonage (M.C.S.). Ce type de

vecteur est peu stable chez la levure car il n'est pas ségrégué aussi régulièrement que les chromosomes, la maintenance des clones nécessite une pression de sélection permanente (culture sur milieu minimum sans facteur de croissance : tryptophane, histidine, leucine ou uracile). Les vecteurs de ce type peuvent également posséder une origine de répllication provenant d'un chromosome : une séquence A.R.S (= "autonomous replicating sequence") dont la nature conditionnera le nombre de copies par cellule. Pour améliorer la stabilité de ce type de vecteur, une région centromérique y a été adjointe pour permettre une bonne répartition des vecteurs lors de la division cellulaire.

Chez certaines plantes (le rosier), il existe une maladie bactérienne causée par l'injection d'un plasmide qui entraîne la prolifération des cellules du collet de la plante. La bactérie *Agrobacterium tumefaciens* cause ainsi la galle du collet ("Crown gall") en injectant le plasmide appelé Ti ("Tumor inducing"). Ce système peut être utilisé pour fabriquer des vecteurs stables dans des cultures de cellules végétales.

III. 2. 5. Plasmides navette

Les plasmides navette sont des plasmides chimériques (hybrides) obtenus en combinant les attributs de plasmides procaryotes et eucaryotes. Ils possèdent les différents types d'origine de répllication et de marqueurs de sélection.

Schéma : (ori + ARS + AmpR + Leu : minimum)

option : prom euc + proc (+ op) + LacZ' + MCS) + CEN

III. 3. Les vecteurs viraux

L'intérêt des vecteurs viraux par rapport aux vecteurs plasmidiques est important et double :

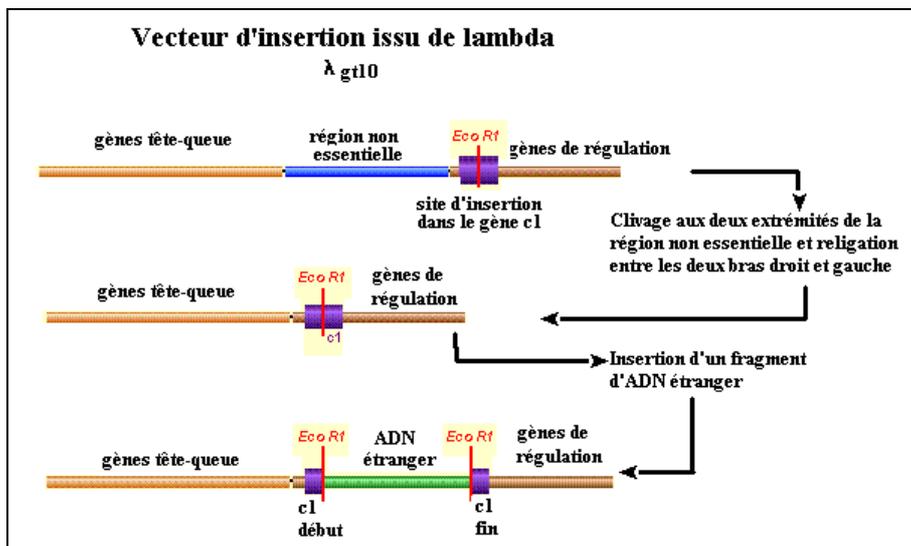
- leur pénétration dans les cellules est très efficace (presque 100 % par rapport à 10⁻⁶ UFC/μg A.D.N.)
- dans le cas d'expression de gènes létiaux pour les cellules, ils permettent de les exprimer avant la mort de la cellule qui mourra de toute manière.

III. 3. 1. Bactériophages : lambda et M13

III. 3. 1. 1. Le phage lambda : EMBL, gt10

Le premier vecteur viral utilisé dérivait du phage lambda d'E. coli. dont le génome fait 48 kpb linéaire à bouts collants (les **extrémités COS**).

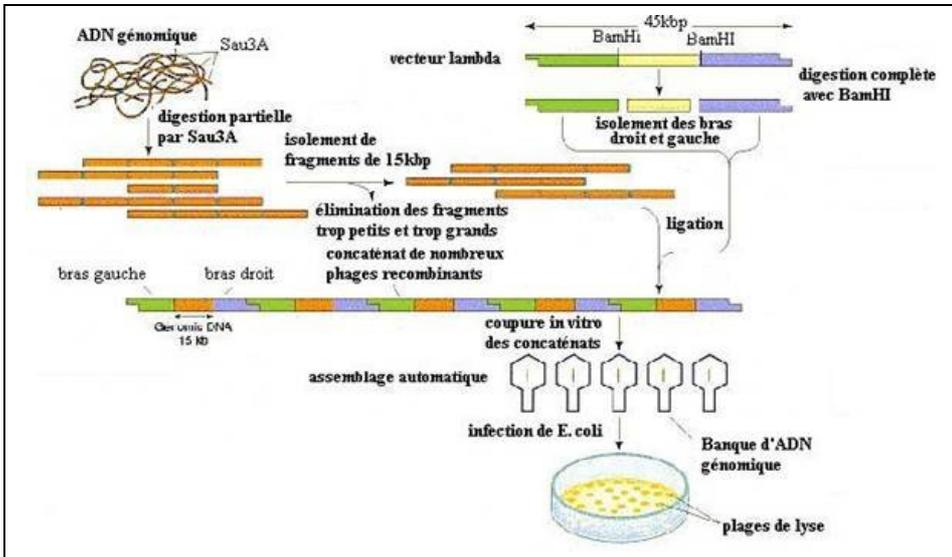
Rappels : l'infection se fait par fixation sur le récepteur au maltose. Après injection de l'ADN linéaire par la contraction de la queue du phage, celui-ci se recircularise grâce à ces extrémités cohésives de 10 paires de bases, appelée Cos. L'ADN est répliqué par un processus de cercle roulant en une longue molécule concatémère. Pendant ce temps les protéines de la capsidie sont synthétisées et la tête s'assemble. La tête se fixe sur les sites Cos et une endonucléase coupe le **concatémère**. La molécule d'ADN linéaire est **encapsidée**, etc.



La capsidie peut contenir entre 78 % (37,5 kpb) et 105 % (50 kpb) du génome du virus. Pour en faire un vecteur, tous les gènes non essentiels pour la répllication ont été enlevés (par mutation délétionnelle); le vecteur contient un **bras gauche** codant pour les protéines de la capsidie et un **bras droit** codant pour les enzymes de la répllication. Des sites uniques de restriction ont été créés par mutation (pour faire disparaître les sites des bras droit et gauche) dans la région centrale. La première génération de vecteur fut appelée EMBL.

La seconde génération intègre en plus un marqueur de sélection de recombinaison : le gène lacZ' du système blanc-bleu (milieu + XGal + IPTG) et un MCS : ex lambda gt11.

Clonage : dans les phages classiques on ne peut insérer qu'au maximum 7,5 kpb (ou 15 kpb pour des phages spéciaux dits de remplacement). Le bras gauche et le bras droit sont préparés par digestion enzymatique, puis purifiés par électrophorèse préparative. Après ligation de l'insert l'ADN du vecteur doit être empaqueté.



Ces vecteurs nécessitent une encapsidation in vitro dans laquelle l'ADN recombiné est encapsidé en y ajoutant des extraits cellulaires de protéines capsidaires et de fixation (queue + filaments). Ce clonage est rendu routinier grâce à l'existence de kits commerciaux complets.

Schéma : avec système blanc bleu et réplique sur filtre de nitrocellulose pour la conservation de la banque.

III. 3. 1. 2. Le phage M13 : M13mp18, Bluescript

Le grand intérêt du phage M13 et de ses dérivés est qu'ils sont sous forme simple brin lorsqu'ils sont encapsidés et double brin lorsqu'ils sont intracytoplasmique. Il est utilisé de ce fait pour le séquençage par la méthode de Sanger et la mutagenèse dirigée.

Rappels : le phage se fixe à l'extrémité des pili sexuels chez les souches Hfr ou F+. L'ADN est injecté dans la lumière du pilus, il se circularise et est répliqué par un mécanisme de cercle roulant en un long concatémère. L'encapsidation est suivie d'une séparation des monomères. Ce phage ne lyse pas la cellule hôte comme lambda et permet d'obtenir des titres énormes (10¹³ phages par mL). Il est dénombrable en gélose molle (comme lambda), mais ne forme que des plages troubles.

Schéma :

Pour le séquençage on utilise le vecteur bluescript proche de M13mp18 qui contient le gène lacZ' et le MCS de pUC18 (avec XGal et IPTG on obtient des plages de lyse bleues).

III. 3. 2. Animaux : baculovirus, adénovirus, rétrovirus, ...

La **baculovirus** infecte spécifiquement des cellules de lépidoptères (papillon). Il est emballé dans une énorme quantité de polyédricine codée par un gène qui est exprimé de manière très forte (taux de transcription élevé). La partie codante d'un gène cloné en aval du promoteur de la **polyédricine** sera donc exprimé à un taux très élevé. Il existe des lignées immortelles de cellules de lépidoptères sensibles au baculovirus, elles ne sont pas sensibles aux faibles variations de pH (pas besoin de CO₂), aux variations de températures, et sont facilement détachable des supports de culture. On peut cultiver également cultiver ces cellules en suspension.

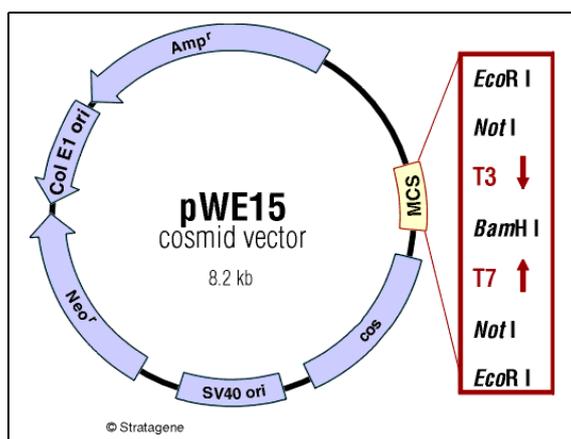
La production passe par une phase préliminaire de production de biomasse, puis par une phase d'infection létale, lors de laquelle on peut arriver à produire plusieurs grammes de protéines par litres de culture.

Le baculovirus est donc utilisé comme système (très efficace) de production de protéines eucaryotes, permettant d'obtenir des protéines maturées dans l'appareil de Golgi (glycosylation et autres modifications post traductionnelles).

Adénovirus et rétrovirus ont été utilisés comme **vecteurs médicaments en thérapie génique**. Le gène défectueux (mutant) responsable de la maladie génétique est complété par la recombinaison d'un gène non muté permettant de pallier au défaut génétique. Malheureusement l'adénovirus ne permet pas d'obtenir une expression stable, car son ADN n'est pas intégratif ; il ne se recombine pas dans le génome des cellules souches, de plus la réponse immunitaire n'autorise pas la répétition du traitement. Pour les rétrovirus, l'intégration est stable mais dangereuse par son effet potentiellement mutagène et par son action d'activation d'oncogènes à distance.

Remarque : les virus végétaux ne sont pas encore ou peu utilisés comme vecteurs.

III. 4. Les vecteurs hybrides plasmide-phage : cosmide ou phagémide



Les cosmides sont des vecteurs de type plasmidique (Amp^R + Ori + MCS) dans lesquels se trouve une séquence Cos du phage lambda. Leur taille est modeste (8 kpb) mais on peut y cloner des fragments de plus de 40 kpb. La transfection est réalisée après une encapsidation in vitro. C'est le vecteur procaryote qui permet de cloner les plus gros fragments après les chromosome artificiels (BAC). On s'en sert pour réaliser des banques génomiques intermédiaires chez les procaryotes.

Figure ci-contre : carte de cosmide non recombiné ; il s'agit ici d'un vecteur navette (E. coli ↔ cellule de mammifère)

Source : <http://www.stratagene.com/vectors/maps/pdf/pwe15.gif>

III. 5. Les chromosomes eucaryotes artificiels

Certains chromosomes ont des tailles pouvant dépasser la méga paire de bases, des chromosomes artificiels peuvent donc en théorie permettre de cloner de très longs fragments de génome (200 à 800 kpb).

Le premier chromosome artificiel créé l'a été chez la levure *S. cerevisiae* pour cela on a d'abord construit un chromosome de base possédant deux télomères notés TEL (séquence répétée empêchant le grignotage des extrémités du chromosome linéaire), une séquence centromérique noté CEN (site d'attachement du fuseau mitotique), est au moins un site de réplication (A.R.S). A cela on a pu adjoindre un "M.C.S." et des marqueurs de sélection de type auxotrophiques (URA, LEU). On a obtenu des Y.A.C. ("yeast artificial chromosome") capable de contenir des séquences de plus de 300 000 pb.

Leur purification est délicate à cause de leur taille, elle passe par la réalisation d'une électrophorèse en champs pulsés.

Le vecteur Y.A.C. est l'exemple type du vecteur navette : pYAC est multiplié chez *E. coli*, après purification la séquence à cloner est ligaturée dans un M.C.S., ensuite une enzyme de restriction permet de linéariser le vecteur en coupant entre les loci télomériques. Schéma :

Désavantage : lorsque les séquences deviennent trop longues la probabilité de recombinaisons homologue intracaténaire est d'autant plus élevée et les séquences deviennent très discontinues ou mélangées par rapport aux séquences d'origines.

Cette technologie a permis de réaliser des banques génomiques d'organismes supérieurs (homme, souris, *Arabidopsis thaliana* : la plante arabette, *Caenorhabditis elegans* : un vers nématode, zebra fish : le poisson danio rerio) en vue du séquençage de leur génome de 100 à 1000 fois plus grand que celui de *E. coli*.

IV. Transfert du mélange de ligation dans une cellule hôte : transfection

En génie génétique la **transfection** (terme générique) désigne toutes les opérations permettant de faire pénétrer une molécule d'ADN dans une cellule pour laquelle il est étranger (d'une autre origine). La transfection peut utiliser des moyens naturels (**transformation**, **transduction** [injection par un système viral], **conjugaison**, *Agrobacterium tumefaciens* [pour les plantes uniquement]) ou artificiels (bombardement, électroporation, liposomes, molécules chimiques transporteuses, ...).

L'ADN étranger peut exprimer ou non (on peut cloner des séquences qui ne sont pas des gènes) des gènes qu'il contient de manière **constitutive** (AMP^R par exemple, c'est rarement le cas) ou **régulée** (sous la dépendance de facteurs contrôlés : [I.P.T.G. ; métabolite]). Cet ADN est souvent associé à une molécule d'ADN porteuse (le **vecteur de clonage**) qui lui confère certaines propriétés (stabilité : réplication autonome ; sélectivité : présence d'au moins un marqueur de sélection [résistance à l'ampicilline]; manipulable au moyens de sites uniques de restriction).

Un organisme génétiquement modifié sera créé dès qu'il aura reçu un ADN codant ou non qui n'a encore jamais existé dans son espèce, ou bien lorsque l'on aura utilisé une technique artificielle pour le transférer. Tous les **O.G.M.** doivent être déclarés aux autorités compétentes (commission de génie génétique) et faire l'objet d'un confinement approprié pour éviter leur dissémination dans l'environnement. Son A.D.N. doit être détruit avant rejet des déchets dans l'environnement.

IV. 1. Méthode physico-chimiques

IV.1.1. Méthodes au chlorure de calcium et choc thermique

Cette méthode est la plus ancienne, et est toujours employée pour les bactéries de type Gram- (*E. coli*).

Avant sa transformation la bactérie est rendue **compétente** ; c'est à dire que l'on s'assure que son état physiologique garantira une **efficacité maximum de transformation** (exprimée en nombre d'U.F.C. par µg d'ADN transformant). Pour cela il faudra obtenir des cellules venant de se diviser plusieurs fois au cours de la **phase exponentielle** de croissance : à ce moment les membranes sont étirées au maximum et la paroi cellulaire est plus perméable (un vieille paroi est plus réticulée, plus consolidée), d'autre part la cellule est dans un état énergétique lui permettant de résister au mieux aux traitements traumatisants de la transformation. Pour compléter le traitement, les cellules compétentes refroidies sont mises en contact d'une solution concentrée de **chlorure de calcium**.

Le **calcium chélate les phospholipides** des membranes et participe à la **rigidification** des membranes à **froid**. De plus le calcium **neutralise l'ADN transformant** et lui permet de sédimenter au contact de la membrane avant sa pénétration.

Techniquement il est très important d'utiliser du matériel refroidi pour éviter tout choc thermique prématuré.

La pénétration de l'ADN transformant se fait au cours du **choc thermique** qui crée des pores dans les membranes qui laisse entrer l'ADN, mais également laisse sortir des nutriments vitaux.

La mortalité des cellules est très importante lors du choc thermique.

En résumé cette transformation qui utilise des cellules rendues compétentes consiste en deux étapes :

- la neutralisation des charges de l'ADN par complexation avec des cations divalents (Ca²⁺ ou Mg²⁺), précipitation sur les membranes ;
- choc thermique créant des trous par lesquels l'ADN pénètre (cf. TP)

Remarque : L'**efficacité de transfection** est très faible (de 10⁵ à 10⁸ bactéries transformées [UFC] par microgramme d'A.D.N., soit moins d'une molécule efficace sur plus d'un million). Le calcul de ce rendement se fait en déterminant combien d'UFC on obtiendrait en étalant la totalité des cellules ayant subi le choc thermique et en divisant ce nombre par la quantité d'ADN utilisée exprimée en µg.

Par exemple : à 200 µL de cellules compétentes est ajouté 2 µl d'ADN à 0,5 ng/µL. Après 45 minutes de sédimentation et le choc thermique sont ajoutés 1,8 mL de milieu riche. Après étalement de 50 µL de cette suspension on dénombre au bout de 18 heures 569 UFC (il n'y a pas de norme $N < 300$).

Raisonnement : 1 ng d'ADN a permis d'obtenir une suspension de 2 mL, 50 µL donne 569 UFC, 2 mL aurait donné 40 fois plus, soit 22360 UFC. L'efficacité est donc de $E = 22360 / 1.10^{-3} \approx 2,2.10^7 \text{ UFC}/\mu\text{g}$

IV1.2. Transformation des cellules eucaryotes sans paroi par le phosphate de calcium

Les cellules animales adhérentes et les protoplastes peuvent être transformés par la précipitation sur les tapis cellulaires d'**agrégats de phosphate de calcium** complexé avec l'ADN transgénique.

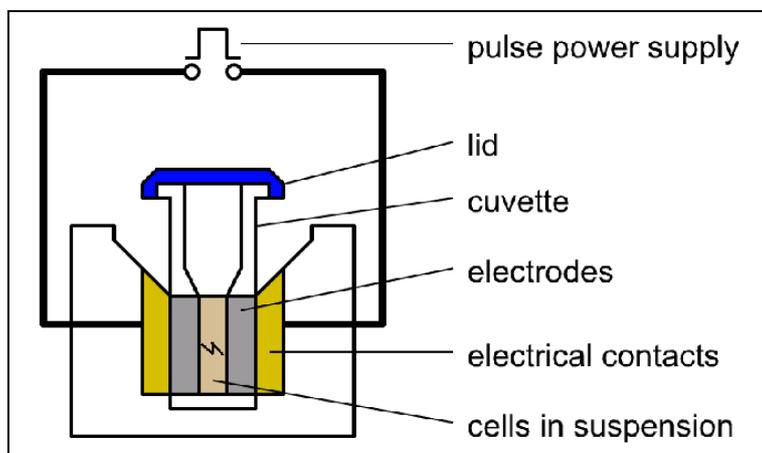
L'ADN est ajouté à une solution de phosphate de calcium, puis homogénéisé en créant un courant ascensionnel dans le tube provoqué par l'envoi de bulles stériles dans le tube. Lorsque l'on peut observer la formation de petits agrégats dans le tube, la suspension de cristaux est disséminée sur le tapis de cellule en culture (une goutte par ci une par là).

Le phénomène de transport intracellulaire n'est pas compris, mais se fait sans choc thermique (endocytose ?).

IV1.3. Transformation des cellules bactéries GRAM+

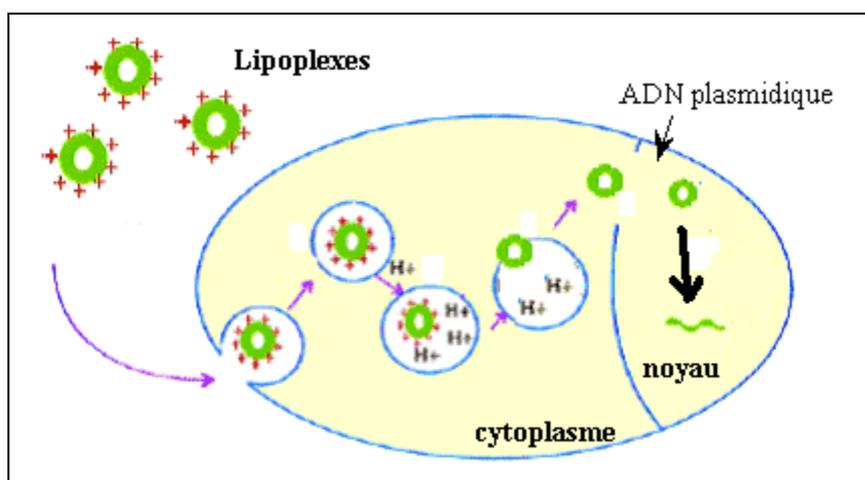
La transformation de *Bacillus subtilis* Gram + (domaine industriel) se fait naturellement grâce à l'existence d'un système de transport membranaire d'A.D.N. étranger situé au niveau de la membrane plasmique. Il suffit donc de mettre en contact une culture de ces bactéries avec le vecteur recombiné pour obtenir des bactéries transformées. Ces bactéries sont très faciles à transformer et sont souvent capables d'excréter les protéines transgéniques pourvu que leur gène soit fusionné (en phase) avec une séquence codant pour une sorte de **peptide signal**.

IV. 2. Electroporation (remplacement du choc thermique)



Cette méthode utilise une machine (**électroporateur**) capable de créer un **instant très bref un champ électrique intense** (réglable) qui provoque la formation fugace de trous dans les membranes phospholipidiques. L'A.D.N. à transférer est mis en solution dans de l'eau très pure ou fortement désionisée (sinon un arc électrique peut se déclencher). Le courant électrique ne peut passer que par les membranes cellulaires chargées, ce qui crée les ouvertures. L'efficacité de transfection est améliorée par rapport aux méthodes utilisant le choc thermique.

IV. 3. Association à des liposomes artificiels, à la transferrine, à des polycations : internalisation

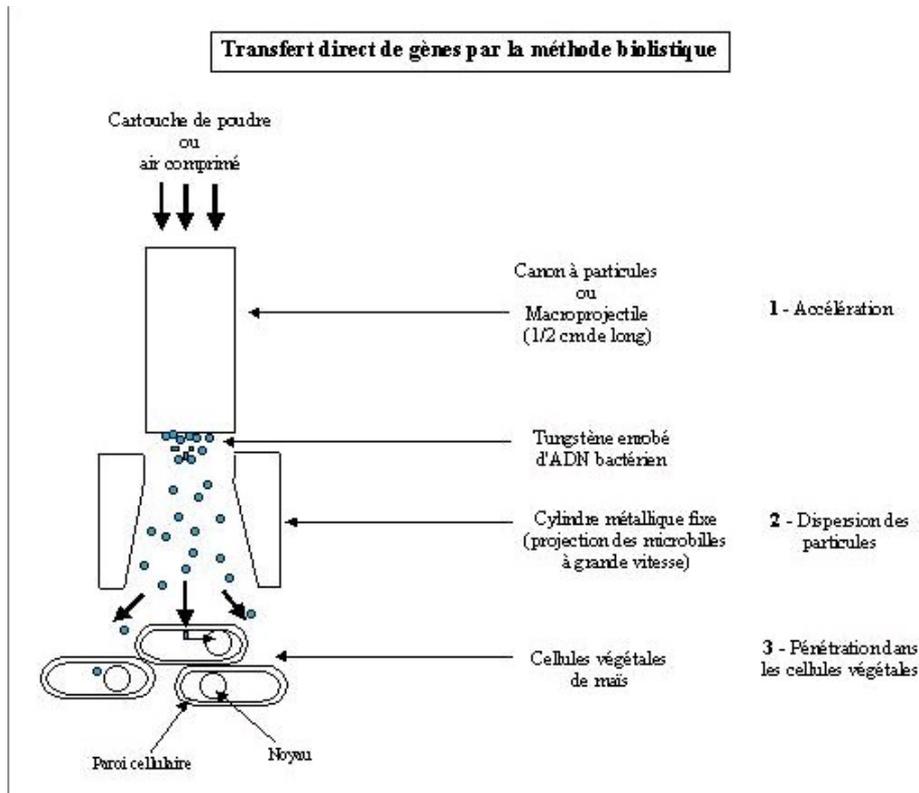


Des polymères cationiques peuvent servir à neutraliser l'A.D.N. et à le complexer en gros agrégats. Cela peut lui permettre de traverser aisément la membrane plasmique des cellules sans paroi.

La technique la plus répandue est celle qui utilise les liposomes cationiques formés d'une substance de type lipidique dont la partie hydrophile est **cationique** (ammonium quaternaire).

Ces molécules forment des **liposomes** (vésicules à double couche) qui neutralisent et cotransportent le vecteur à travers la membrane plasmique. Le phénomène de libération de l'ADN est mal connu.

IV. 4. Projection de l'A.D.N. associé à des particules solides : Biolistique



Les cellules des plantes sont entourées d'une paroi très difficile à éliminer. Pour transformer des cellules végétales sans supprimer la paroi on utilise des canons projetant des **particules métalliques** d'or ou de tungstène sur lesquelles sont **adsorbés** les vecteurs de clonage : cette méthode est appelée **Biolistique**.

Cette technique peut également être employée pour transférer des cellules animales *in situ*, c'est à dire dans des tissus épais.

IV. 5. Utilisation des virus adaptés au clonage

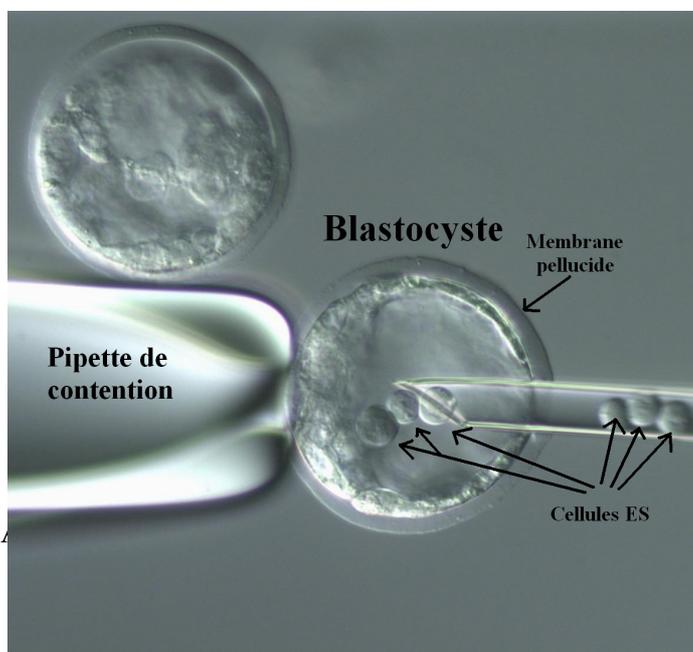
Les virus possèdent des méthodes très efficace pour injecter leur génome dans les cellules parasitées, ces systèmes peuvent être mis à profit pour s'assurer d'un excellent taux de transfection. Le seul paramètre à régler est la multiplicité d'infection.

IV. 6. Création d'animaux et de plantes transgéniques

VI. 6. 1. Techniques d'obtention d'animaux transgéniques

IV. 6. 1. 1. Animaux chimère

Des cellules embryonnaires (**Embryonal stems** : ES) sont transfectées, cultivées sur milieu sélectif puis injectées dans des embryons. Ces cellules vont participer au développement de l'organisme hôte. L'origine des organes (ES ou hôte) s'analyse à l'aide de marqueurs enzymatiques ou par PCR.



Le blastocyste est un embryon pourvu de nombreuses cellules indifférenciées, une zone creuse appelée blastocoele peut accueillir de nouvelles cellules dans l'embryon (les cellules ES par exemple) ; ces nouvelles cellules vont ensuite se mélanger aux cellules de l'embryon et participer à son développement.

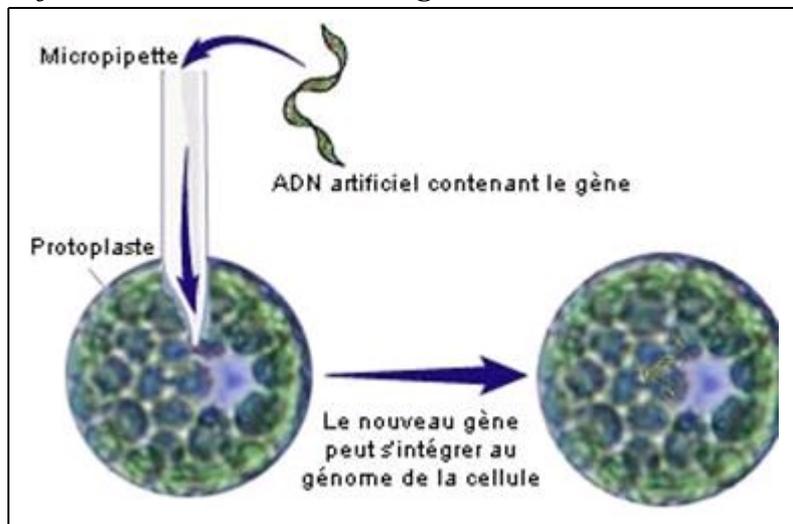
Les animaux obtenus sont appelés **chimères**, leurs organes sont constitués d'un mélange des cellules qui descendent de l'embryon hôte et des cellules ES.

Lorsque l'embryon est obtenu à partir de souris blanches et que les cellules ES sont obtenus à partir d'embryons de souris noires, les souris chimères sont bicolores.

Les souris chimères possèdent des gonades également d'origine mixte, les gamètes sont donc de deux types : soit issus de l'embryon receveur, soit issues des cellules ES transfectées. Le croisement de deux souris chimères permet d'obtenir des lignées pures.

IV. 6. 1. 2. Injection d'ADN dans de grosses cellules :

Injection dans les cellules végétales

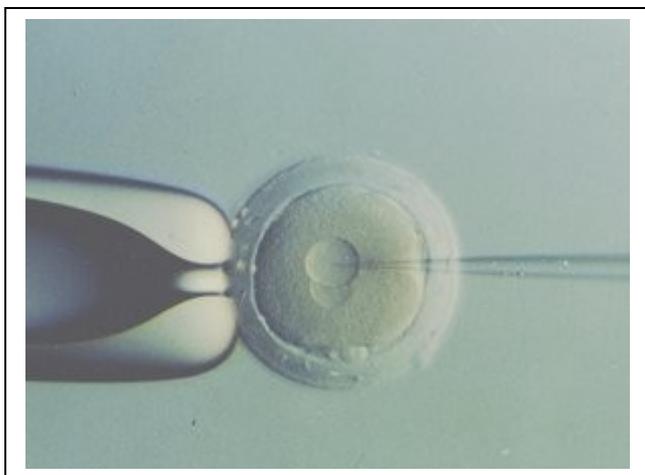


L'injection d'ADN dans les grandes cellules eucaryotes réussit d'autant mieux que l'ADN est linéaire et en concentration assez élevée. En effet, les molécules circulaires sont éliminées par le système de défense antiviral, et l'ADN doit être intégré au génome par recombinaison (hétérologue) pour se stabiliser, ce phénomène étant très rare, il faut injecter de nombreuses molécules pour espérer qu'au moins une soit intégrée. Référence : <http://www.chimie-sup.fr/OGM.htm>

Injection dans les ovocytes

L'A.D.N. (sous forme de nombreuses molécules de vecteurs recombinés) peut être directement injecté par micromanipulation dans le **pronucleus** mâle (c'est le plus gros des deux **pronucléi**) d'un œuf fécondé.

La recombinaison hétérologue (au hasard dans un ou plusieurs chromosomes) n'est pas contrôlée. Le taux de réussite est faible et aléatoire (quelques pourcent d'embryons transgéniques).



Dans l'image ci-contre on distingue bien les deux pronucléi.

Technique : des ovules sont prélevés sur un animal stimulé hormonalement. La fécondation est réalisée in vitro pour contrôler la maturation des œufs. Les œufs sont maintenus par une pipette de contention (à gauche) par effet de ventouse sur la membrane pellucide. L'injection se fait en perçant la membrane pellucide à l'aide d'une aiguille de verre creuse obtenue par étirement à chaud (par une machine).

N.B : si l'œuf est énucléé, l'injection d'un noyau de cellule

somatique permet de réaliser un clonage.

IV. 6. 2. Techniques d'obtention de plantes transgéniques

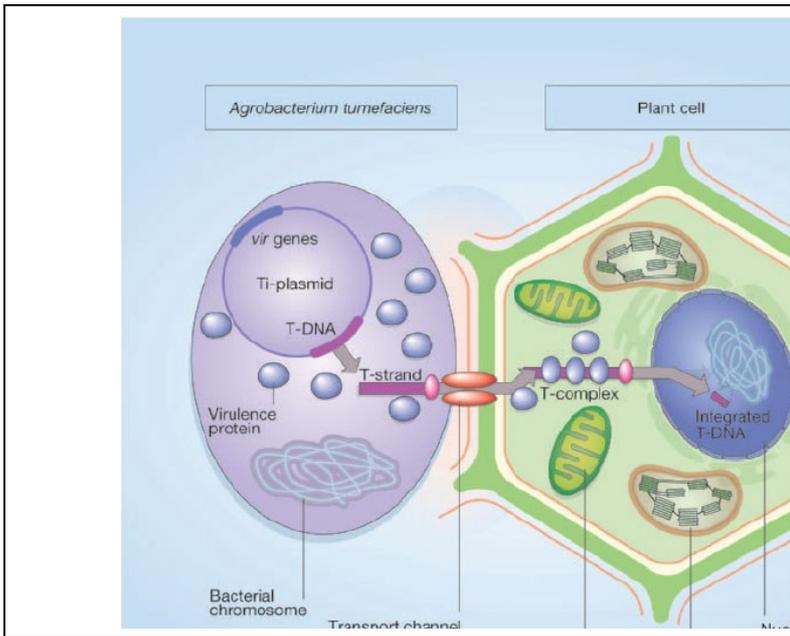
IV. 6. 2. 1. Transformation de protoplastes

Si l'on peut régénérer une plante à partir de protoplaste, c'est la technique la plus simple. Une fois la paroi hydrolysée par des **cellulases**, la membrane mise à nu oblige à travailler dans un **milieu nutritif isotonique**. La transfection utilise alors l'**électroporation**, la **lipofection**, l'injection, ...

IV. 6. 2. 2. Biolistique : bombardement de transgènes

L'A.D.N. adsorbé sur des particules solides (or, tungstène) est projeté par un canon à air comprimé, ce qui lui permet de traverser les parois cellulaires les plus épaisses, ou des tissus épais. Voir IV.4.

IV. 6. 2. 3. Utilisation du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*



Agrobacterium tumefaciens est une bactérie **parasite** de plantes de type dicotylédone (graines germant en donnant deux parties, feuilles à nervures ramifiée) comme les rosiers, le haricot.

Elle pénètre dans la plante au niveau du **collet** (jonction racine - tige) à la suite d'une lésion. La bactérie est guidée par **chimiotaxie** vers la blessure en remontant le gradient d'hormones végétales.

Dans les tissus de la plante, la bactérie se développe en injectant un fragment d'A.D.N. (**ADN-T**) dans le cytoplasme des cellules végétales.

Cet A.D.N. transféré (t) s'insère dans l'A.D.N. chromosomique par recombinaison hétérologue et provoque la synthèse d'hormones de croissance et d'un analogue d'acide aminé (opine). Les tissus prolifèrent et forment un galle où prolifèrent les bactéries nourries par les **opines**. Cette bactérie provoque la « galle du collet » ou **crown gall**.

Ci-contre : plasmide Ti (**Tumor inducing**) sauvage

Les souches utilisées en génie génétique ont leur gènes de

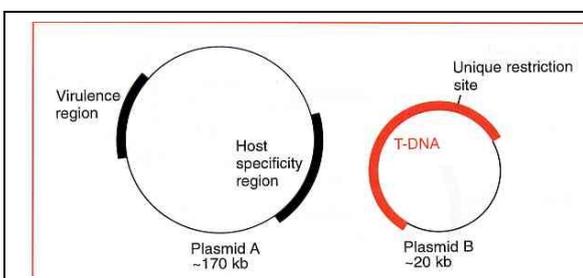
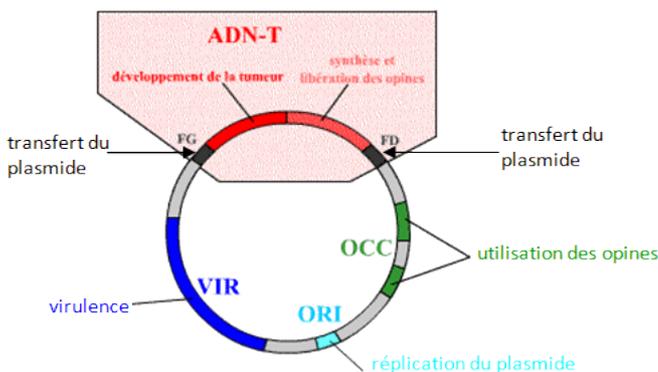


Figure ci-contre : le **système binaire** de transfection est constitué d'un plasmide Ti désarmé présent dans la souche hôte (*Agrobacterium tumefaciens*), il ne possède plus de région T. La région T contenant le ou les gène(s) à transférer est portée par un plasmide de *E. coli*, page 24/29 le gène de résistance à l'ampicilline. Ce vecteur une fois transfecté dans la souche hôte la rend résistante à l'ampicilline.

VI. 1. Production de protéines à haute valeur ajoutée

VI. 1. 1. Contraintes à respecter pour la production

Si l'ADN insert contient un gène dont on veut faire produire la protéine, il faut faire attention au contexte dans lequel il est inséré :

- il doit exister dans le vecteur de clonage en amont du gène un site promoteur fort pour permettre une production élevée de la protéine. Ce promoteur est souvent un promoteur de gène viral dont les protéines sont fortement exprimées lors de la phase de multiplication.
- le gène peut être produit sur commande si il existe une ou plusieurs séquences régulatrices capable d'en induire la transcription (chez les procaryote c'est un opérateur, chez les eucaryotes un "enhancer" (amplificateur) qui est associé à un promoteur fort (souvent de gène viral).
- le gène produit est souvent une protéine de fusion avec un morceau de gène (peptide □ dans le système "blanc-bleu"), ou peptide signal pour son exportation. Si l'insertion se fait sans connaître la séquence du gène, il y a une chance sur 6 que celui-ci soit inséré dans le bon sens (50 %), et dans la phase de lecture du peptide de fusion (il y a 3 phases de lecture).

Exemple :

partie 5' de l'insert
 Met Pro Gly Ser Thr Arg Leu Glu Arg Pro His
 GTAGGATTCGCTCTAGAT GAA TTC ATG CCC GGG TCG ACT CGA CTC GAG CGG CCG CAT
 EcoR I

pGEX-6P-1 (27-4597-01)

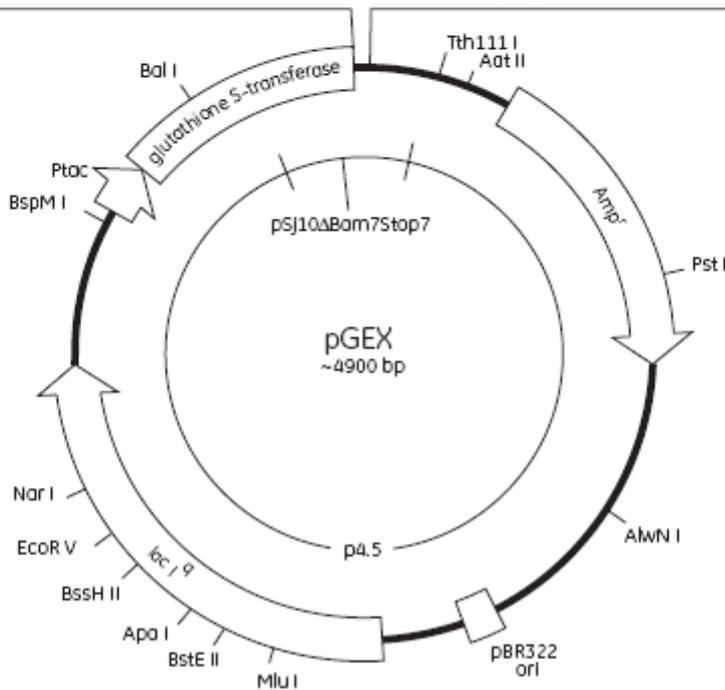
PreScission™ Protease
 Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro Leu Gly Ser Pro Glu Phe Pro Gly Arg Leu Glu Arg Pro His
 CTG GAA GTT CTG TTC CAG GGG CCC CTG GGA TCC CCG GAA TTC CCG GGT CGA CTC GAG CGG CCG CAT
 BamH I EcoR I Sma I Sal I Xho I Not I

pGEX-6P-2 (27-4598-01)

PreScission™ Protease
 Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro Leu Gly Ser Pro Gly Ile Pro Gly Ser Thr Arg Ala Ala Ala Ser
 CTG GAA GTT CTG TTC CAG GGG CCC CTG GGA TCC CCA GGA ATT CCC GGG TCG ACT CGA GCG GCC GCA TCG
 BamH I EcoR I Sma I Sal I Xho I Not I

pGEX-6P-3 (27-4599-01)

PreScission™ Protease
 Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro Leu Gly Ser Pro Asn Ser Arg Val Asp Ser Ser Gly Arg
 CTG GAA GTT CTG TTC CAG GGG CCC CTG GGA TCC CCG AAT TCC CGG GTC GAC TCG AGC GGC CGC
 BamH I EcoR I Sma I Sal I Xho I Not I



Quel est le vecteur qu'il faut choisir pour cloner en phase l'insert présenté en haut ?

Remarque : les protéines produites peuvent être synthétisées sous forme native ou dénaturée

VI. 1. 2. production par des bactéries

L'avantage de faire produire aux bactéries des protéines est qu'elles se multiplient rapidement (même si la production allonge leur G) et à faible coût (culture en batch sur milieux peu coûteux : mélasses, "corn steep").

Les protéines peuvent être accumulées à différents niveaux :

- dans le cytoplasme sous forme cristalline : ce sont les formes d'inclusion. Leur purification nécessite un traitement de dénaturation assez agressif et une étape de renaturation si elle est possible.

- dans le périplasme pour les bactéries Gram -, il est alors nécessaire de fusionner le gène à cloner avec un "peptide signal" ("Flag peptide") (souvent celui de OmpA chez E. coli) dans la même phase de lecture. L'extraction est réalisée en soumettant successivement la bactérie à une déshydratation dans une solution hypersaccharosée (hypertonique), puis une turgescence (gonflement) dans une solution hypotonique ; il en

résulte un choc osmotique qui chasse les protéines périplasmiques vers le milieu extérieur. La protéine peut être purifiée en utilisant une chromatographie de ligand spécifique du peptide signal. Après élution une endopeptidase spécifique libère le peptide signal, la protéine peut alors être récupérée très pure après une électrophorèse préparative non dénaturante ou une CLHP. (système SIGMA pFLAG réf. : E5769 page 1618)

Schéma :

- directement dans le milieu de culture : ceci est rare, mais certains systèmes mettent à profit la capacité de *Bacillus subtilis* d'exporter dans le milieu des protéines (protéases, lécithinase, ...). Pour cela il faut que la protéine soit fusionnée avec un peptide signal particulier. Une peptidase permet de libérer la protéine dans le milieu. L'avantage de cette technique est de produire une protéine pré purifiée dans le milieu de culture.

VI. 1. 3. production par des cellules animales ou végétales en culture

La production de protéines par les cellules animales est utilisée dans l'industrie pharmaceutique pour produire des peptides ou protéines qui nécessitent maturation post-traductionnelle (une ovocytaire). Le système génétique doit obligatoirement comporter un système d'exportation de protéine via l'appareil de Golgi qui nécessite la présence de peptide signal particulier (il doit être clivé par une ovocytaire spécifique une fois que la protéine est arrivée dans la lumière du R.E.G. Les cellules animales sont cultivées en "batch" perfusé par du milieu neuf avec recyclage de la biomasse par ultrafiltration en continu. La production est longue (G □ 24 heures) et coûteuse (milieu nécessitant du sérum de veau foetal).

La production de protéine peut se faire aussi avec des cellules d'insectes infectées par des virus (baculovirus), l'avantage sur la culture de cellules de mammifères est la production élevée obtenue (> 100 mg/L) et le faible coût comparé des milieux de culture.

Chez les végétaux les systèmes de culture de cellules recombinées sont peu ou pas développés à cause des problèmes de purification des protéines et des maturations spécifiques aux végétaux.

VI. 1. 4. production par des animaux transgéniques

Exemple : production dans le lait (ou le sperme). L'expression du gène codant pour la protéine à produire est régulée par un promoteur qui n'est suffisamment actif que dans les cellules sécrétrices de lait de la glande mammaire.

VI. 1. 5. production par des plantes transgéniques

Banane vaccin, Tabac Hémoglobine humaine, Maïs et Coton BT (toxine de *Bacillus thuringiensis*) résistant à la chenille de la pyrale, Tomate et Melon ne pourrissant pas (conservation et augmentation du taux de sucres), colza résistant au glyphosate (Round Up□), ...

Utilisation du plasmide Ti (« Tumor inducing ») d'*Agrobacterium tumefaciens* (responsable de la galle du collet [« crown gall »] des dicotylédones) comme vecteur. Seule la région t du plasmide Ti est envoyée dans le cytoplasme des cellules végétales. Cette région t encadrée de deux régions répétées inversées, code pour la synthèse d'hormones végétales et d'enzymes permettant la synthèse des opines qui fournissent *A. tumefaciens* en énergie, carbone et azote. Ces gènes délétères peuvent être remplacés par des gènes d'intérêt biotechnologiques (cf. introduction du chapitre).

VI. 2. Mutagenèse dirigée

Définition : mutation provoquée dans une région précise du génome d'un organisme et réalisée à l'aide de techniques in vitro (l'A.D.N. est toujours purifié in vitro à un moment).

Conséquences : - l'intégralité du génome n'est pas affectée par la mutagenèse dirigée contrairement à la mutagenèse classique, dite "aveugle".

- les mutations sont plus finement déterminées par leur nature et où leur localisation.

VI. 2. 1. Méthodes utilisant les délétions

A) Délétions étendues : action de ovocytaire III et de la nucléase S1

B) Délétions limitées : E.R. puis nucléase S1

VI. 2. 2. Méthodes utilisant insertions (au hasard, localement)

A) Utilisation des transposons et des virus.

B) Knock out de gène chez les eucaryotes (cellules animales) par recombinaison homologue, souris chimères.

C) Utilisation de terminale transférase, puis synthèse brin manquant par multiamorçage aléatoire avec l'ADNpoll.

VI. 2. 3. Méthodes utilisant des modifications locales

Avantage : ne perturbe pas la phase de lecture des gènes.

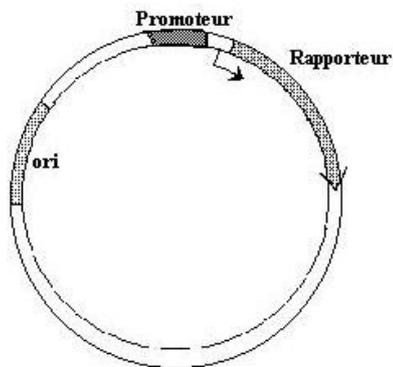
A) utilisations des oligonucléotides et le phage M13

Schéma :

B) Mutation d'origine chimique

Le bisulfite de sodium désamine les C en U, après réplication les G□C deviennent des A=T.

VI. 3. Etude des promoteurs et des sites de régulation des gènes



Etude de la spécificité et de la force des séquences régulatrices inconnues en utilisant des gènes rapporteurs (**luciférase, GFP, chloramphénicol acétyl transférase : CAT**). Ex : cf. TD informatique sur CAT
Schéma d'une construction :

Application industrielle : recherche de nouveaux médicaments : criblage des chimiothèques en testant la capacité des produit à induire la synthèse des gènes rapporteurs par l'intermédiaire de facteurs de transcription

se fixant sur des séquences de régulation. Recherche d'antagonistes (inhibiteurs des effets de ...) ou d'agonistes (activateurs) des récepteurs aux hormones stéroïdiennes.

VI. 4. Projets génomiques : cartographie, séquençage, détection des exons

Plusieurs génomes de bactéries (plusieurs génomes de bactéries (plus de 50) ont été séquencés à l'heure actuelle (Haemophilus influenzae, Bacillus subtilis, E. coli), ainsi que ceux de Saccharomyces cerevisiae et Drosophila melanogaster. Celui de l'homme, de la souris, d'une petite plante Arabidopsis thaliana et Caenorhabditis elegans sont réalisés. Ce type de projet devient presque routinier et très automatisé.

Un gros travail informatique est à mettre en oeuvre pour décrypter l'organisation des gènes, de leur régulateurs dans les génomes et surtout de leur fonction (c'est l'objet de la transcriptomique et de la protéomique : cf. puces à ADN).

VI. 5. Thérapie génique

Définition : technique de soin d'une maladie occasionnée par la présence d'un ou deux gènes défectueux (gène à caractère dominant ou récessif), qui utilise une technique de transgénèse pour apporter aux cellules utilisant ce gène, une ou plusieurs copies saines.

La thérapie se fait in vivo (directement dans l'organisme à soigner) en utilisant des vecteurs qui ciblent l'organe à soigner (virus : adénovirus pour le poumon), ou ex vivo ; l'organe ou les tissus sont traités hors du corps du patient puis greffés chez le malade (autogreffe de moëlle osseuse traitée par un retrovirus).