

Génie génétique

Définition : Ensemble de méthodes d'investigation et d'expérimentation sur les gènes.

Outils nécessaires : ADN recombinant, enzyme de restriction, vecteur, banque ADNc, sonde nucléique...

Techniques utilisées :

- Criblage de banque
- Électrophorèse sur gel
- Séquençage : méthode de Sanger
- Amplification : la PCR
- RFLP

Application du génie génétique :

- Production de protéines
- Animaux transgéniques
- Thérapie génique

Vocabulaire

- ★ ADN recombinant : ADN hybride obtenu in vitro par combinaison de 2 ADN provenant de 2 origines
- ★ Vecteur : C'est l'ADN dans lequel on insère l'ADN à étudier
- ★ Insert : C'est l'ADN à étudier, c'est-à-dire l'ADN inséré dans le vecteur
- ★ Clone : C'est un grand nombre de cellules, ou de molécules identiques, provenant d'un seul ancêtre
- ★ ADNc : C'est une copie complémentaire d'ARNm (exons sans introns)
- ★ Banques : Ce sont des collections formées d'un très grand nombre de clones différents, parmi lesquels on recherche le clone que l'on veut étudier.

Banque d'ADNc

Collection d'ADN recombinant de séquences codantes = vecteur + ADNc

Banque d'ADN génomique

Collection d'ADN recombinant représentant l'intégralité du génome

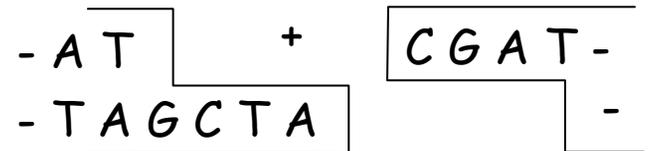
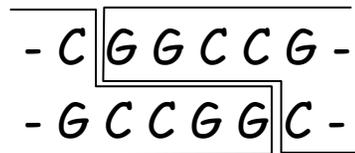
Les enzymes

★ Les enzymes de restriction :

Ce sont des protéines capables de couper des molécules d'ADN double brin en des points précis. Elles proviennent de bactéries (ex: EcoR I de Escherichia coli) où elles détruisent l'ADN étranger. Souvent, les enzymes de restriction reconnaissent des palindromes (ex: radar) à 6 ou 4 paires de bases:

Séquence palindrome : C/GCCG

AT/CGAT



Ces enzymes coupent l'ADN en chaque point où apparaît une séquence spécifique de nucléotides. Puisqu'une séquence donnée apparaît à intervalles irréguliers le long de l'ADN (ex: un site à 6 pdb, se rencontre en moyenne tous les 4^6 pdb = 4096), les fragments obtenus sont de tailles différentes.

★ Ligases : protéines qui permettent de lier, souder, 2 fragments d'ADN

★ Polymérases : Synthétisent de l'ADN ou de l'ARN

ADN → ADN **ADN polymérase, Taq polymérase** (Thermus aquaticus)

ARN → ADN **Rétrotranscriptase** (vient de rétrovirus)

Techniques de biologie Moléculaire

- ★ Criblage de banque
- ★ Séquençage des acides nucléiques : méthode de Sanger
- ★ Détecter et isoler des fragments :
 - d'ADN : Southern blot
 - d'ARN : Northern blot
 - de protéine : Western blot
- ★ Amplification d'ADN : la PCR
- ★ Comparer des séquences d'ADN : Technique du RFLP



Criblage d'une banque ADNc

★ **But:** Identifier le gène codant une protéine d'intérêt

★ **Méthode:**

1. Constituer une **banque d'ADNc** (copie d'ARNm) d'un tissu exprimant la protéine étudiée

2. Fabriquer une **sonde nucléique**, c'est-à-dire une oligonucléotide d'au moins 20 ou 30 bases qui soit capable de se lier spécifiquement au fragment de gène codant la protéine étudiée et soit fluorescente ou radioactive. Il faut connaître la séquence terminale de la protéine (au moins 7 ou 8 acides aminés) et la traduire (ex: Asp → GAC ou GAT) en tenant compte de la dégénérescence du code génétique (plus de codons possibles que d'acides aminés).

3. **Criblage** (screening): C'est l'étape qui permet de détecter quels sont les vecteurs possédant le segment d'ADN recherché dans la banque en les reconnaissant grâce au marquage radioactif ou fluorescent de la sonde nucléique.

Électrophorèse

★ principe :

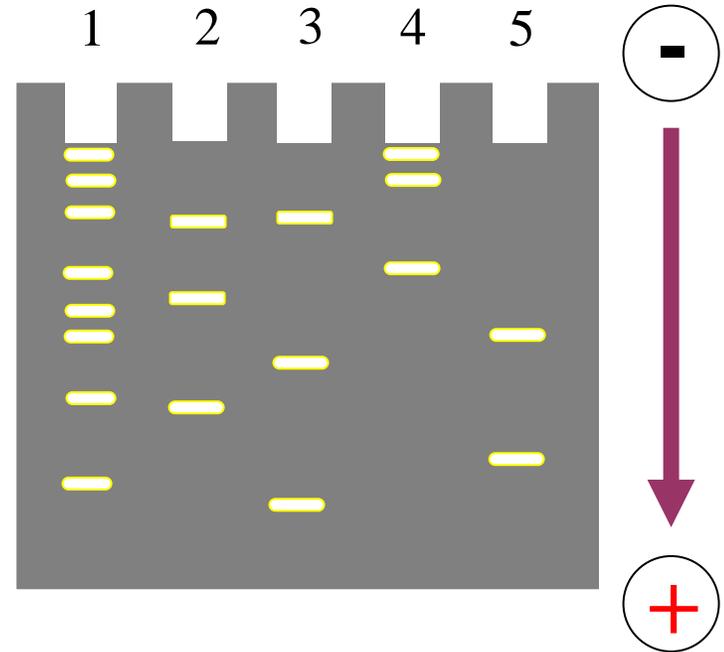
Lorsqu'une particule chargée positivement ou négativement est placée dans un gel et soumise à un champ électrique, cette particule migre dans le gel

La vitesse de migration des molécules dépend :

- de la charge portée par la molécule (plus elle est chargée, plus vite elle migre)
- de la masse (plus elle est petite et plus elle migre) et de la forme de la molécule

★ L'électrophorèse permet donc de **séparer des molécules de tailles différentes** sous l'action d'un champ électrique. Les particules se déplacent dans un gel.

★ Si les particules sont des ADN, on parle de **Southern blot**, si les particules sont des ARN : **Northern Blot**, et si c'est des protéines : **Western blot**



Séquençage des gènes (1)

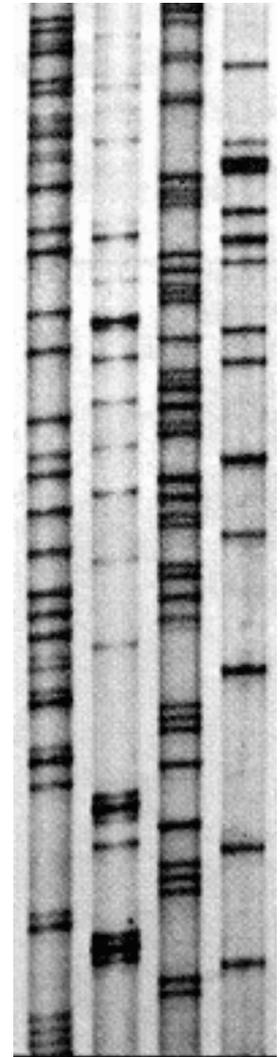
- ★ Il est essentiel de connaître la **séquence d'un gène** pour comprendre son fonctionnement et pouvoir le modifier. La méthode de séquençage la plus utilisée (ex: Génome humain) est la **technique de Sanger**.

Principe : On mélange dans une solution

- 1) Le fragment d'ADN à brin unique que l'on souhaite séquencer, obtenu en grande quantité au moyen d'un clonage ou d'une PCR
- 2) Les 4 nucléotides de base (désoxyribonucléotides triphosphates ou dNTP avec N = A, C, G ou T) nécessaires pour reconstruire le 2^{ème} brin
- 3) Une amorce, c'est-à-dire d'une courte séquence de nucléotides qui va se fixer au début du fragment d'ADN étudié
- 4) De l'ADN polymérase, qui utilise les dNTPs pour synthétiser le 2^{ème} brin à partir de l'amorce.
- 5) Une petite quantité de nucléotides modifiés, les didésoxynucléotides triphosphates, ou ddNTP (N = A, C, G ou T). Ces ddNTP sont marqués (fluorescents ou radioactifs). Lorsqu'un ddNTP est utilisé à la place d'un dNTP dans la reconstruction du 2^{ème} brin, la reconstruction s'arrête et le fragment d'ADN demeure incomplet.

Séquençage des gènes (2)

- ★ On obtient dans la solution une grande quantité de fragments d'ADN incomplets de différentes longueurs se terminant tous par ddATP, ddGTP, ddCTP ou ddTTP
- ★ Par **électrophorèse sur gel** on sépare en fonction de la taille les différents fragments d'ADN obtenus. Le phosphore radioactif présent dans chaque fragment permet une détection des bandes
- ★ La position des bandes dans les quatre tracés donne la séquence des bases complémentaires et inversés de l'ADN inconnu (avec des ddNTP fluorescents de couleurs différentes, on peut aussi obtenir une seule bande avec des traits de 4 couleurs différentes permettant de lire directement la séquence de bases du gène).



A C G T

PCR

★ La **réaction de polymérisation en chaîne** (PCR) est une méthode *in vitro* qui permet la synthèse en quelques heures, de millions de copies de fragments d'ADN connu ou inconnu. Mise au point en 1985

★ **Matériel** : Amorce, nucléotides, Taq polymérase, thermocycleur

La Taq polymérase remplit les mêmes fonctions que l'ADN polymérase (càd allonge la chaîne d'ADN) mais à des températures élevées ($\sim 70^{\circ}\text{C}$)

★ **Principe** : Répétition d'un cycle de 3 étapes

1) Quelques minutes à 95°C pour transformer l'ADN double brin en 2 ADN mono brin

2) Quelques minutes à 60°C pour permettre la liaison spécifique avec une amorce

3) Plusieurs minutes à 70°C pour permettre la synthèse de l'ADN

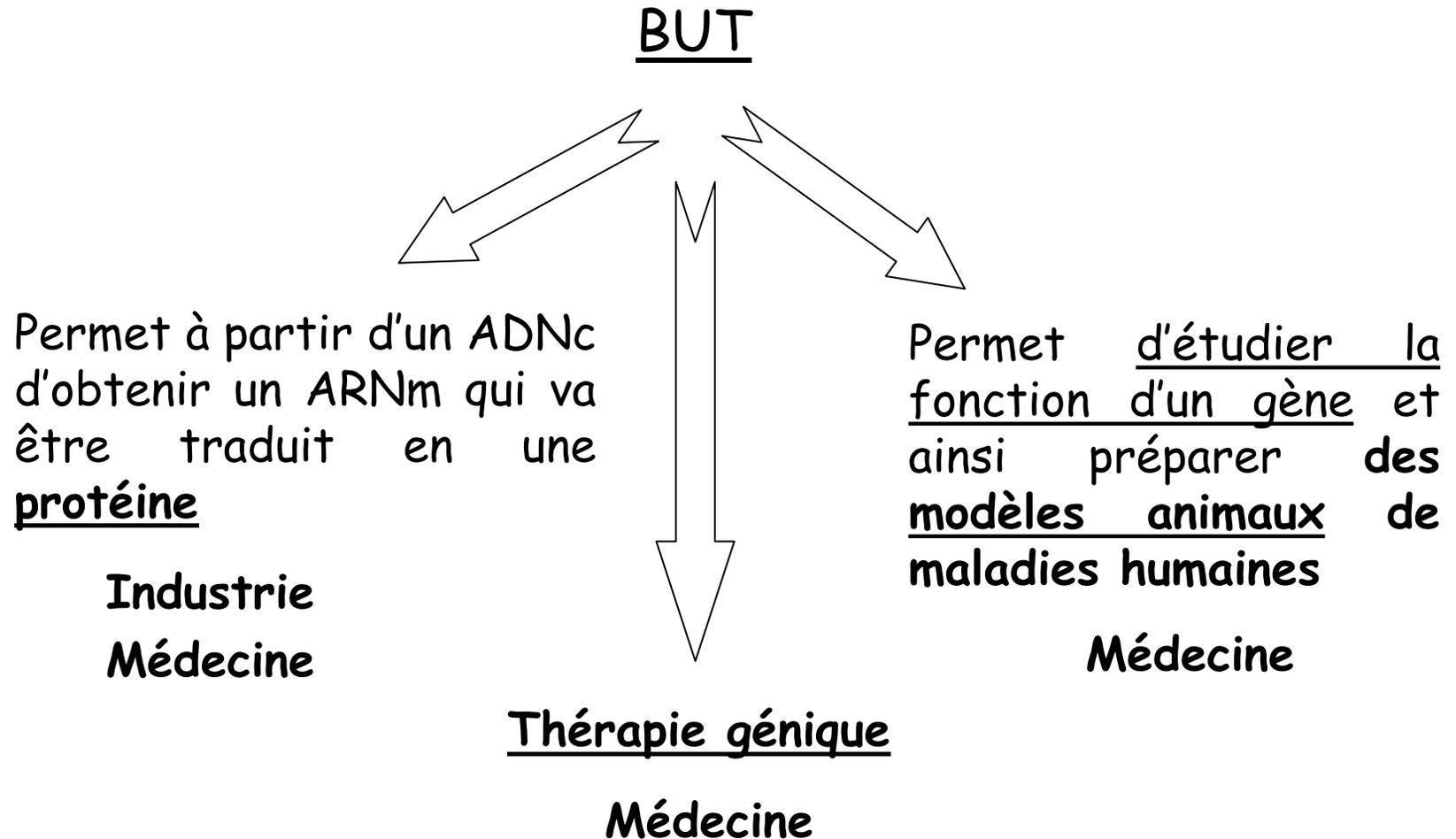
★ **Résultat** : Doublement du nombre de fragments d'ADN à chaque cycle. Un milliard de copies en 30 cycles, c'est-à-dire environ 15 h

RFLP

- ★ On trouve dans les parties non codantes de notre ADN (99%) des séquences appelés « **minisatellites** » qui consistent en répétitions adjacentes d'une même chaîne de 10 à 100 paires de bases (ex: $ATTCGGGCG^*4 \rightarrow ATTCGGGCGATTCGGGCGATTCGGGCGATTCGGGCG$).
- ★ Pour certains minisatellites appelés **VNTR** (Variable Number Tandem repeats) le nombre de répétitions varie considérablement entre individus, et d'un site à un autre chez un même individu. C'est ce qu'on appelle le **polymorphisme de répétition**. Le nombre de répétitions se transmet des parents aux enfants (à quelques erreurs près)
- ★ Le **RFLP** (Restricted Fragment Length Polymorphism) consiste à fragmenter l'ADN à l'aide d'enzymes de restriction pour obtenir des segments contenant des VNTR variant beaucoup d'un individu à l'autre (sauf entre vrais jumeaux). Comme pour le séquençage, une électrophorèse permet de séparer les segments d'ADN selon leur taille et d'obtenir une sorte de code-barres caractéristique d'un individu. Cette technique d'**identification génétique** est utilisée pour la recherche de criminels, viol, délit de fuite, paternité, maternité, identification d'individus...

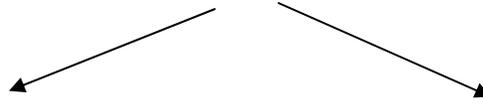
Application des techniques de génie génétique

Transfert et expression des gènes : Transgenèse



Production de protéines

Des protéines utiles à l'homme (médicaments, vaccins...) peuvent être synthétisées en utilisant les techniques de biologie moléculaire. Le but étant d'obtenir des produits plus purs, moins onéreux, et avec un meilleur rendement.



Transfert dans des cellules bactériennes :

synthèse de la protéine avec un très fort rendement

protéine incomplète

Transfert dans des cellules d'eucaryotes :

protéine fonctionnelle

plus compliqué, plus cher, plus long

AVANTAGE :

DESAVANTAGE :

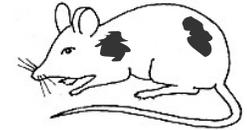
Ex: insuline, hormone de croissance, érythropoïétine (EPO), interférons, interleukines, ...

Animaux transgéniques

- ★ **Intérêt** : Étudier la fonction d'un gène ou développer des modèles animaux de maladies humaines.

1982 : 1er animal transgénique, une souris géante grâce aux hormones de rat.

- ★ **Méthode** : micro-injection d'ADN exogène dans le noyau d'un œuf qui vient juste d'être fécondé. Puis l'œuf va être implanté dans l'oviducte d'une femelle pseudo gestante. Comme le transfert s'effectue avant la 1er division cellulaire, toutes les cellules de l'organismes, même sexuelles, possèdent le gène exogène



- ★ **Inconvénient** :

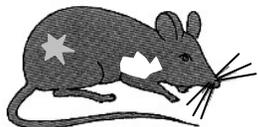
- taux très faible de réussite
- possibilité que le gène ne s'intègre pas à l'endroit attendu.

risque de n'être pas exprimer

s'insère à la place d'un autre gène

s'insère près d'un oncogène et l'active

cancer



Thérapie génique

★ C'est le traitement d'une maladie génétique par l'introduction, dans l'organisme, de la version saine d'un gène défectueux responsable de cette affection.

Le gène sain n'est pas introduit juste à la place du gène déficient (on sait le faire depuis 1998 chez la souris, mais pas encore chez l'homme), mais est ajouté en plus aux cellules. Il est cependant transcrit et traduit, libérant ainsi, *in situ*, la protéine manquante ou une autre protéine thérapeutique. 1er déficit génique traité en 1990 contre la maladie ADA (Adénosine désaminase)

★ **Technique *in vivo***: on administre directement le vecteur recombinant dans l'organisme malade (par injection, inhalation...)

★ **Technique *in vitro***: les cellules à traiter sont prélevées chez le patient et mises en culture. Le vecteur porteur du gène thérapeutique est ajouté. Les cellules où le gène est bien inséré sont ensuite sélectionnées et réintroduites dans l'organisme du patient.



Le transfert de gènes peut-être réalisé dans les cellules germinales ou les cellules somatiques. Pour des raisons éthiques, il n'est pas autorisé de procéder à des modifications germinales chez l'homme (jusqu'à quand... !).