

LA RECOMBINAISON GENETIQUE IN VITRO.

See et vie.

Manipulations génétiques. Génie génétique.

Recombinaison génétique ou ϕ -procédure: Introduction artificielle d'un nouveau dsme ϕ qui ne le possédait pas.

Amer de nouvelles potentialités à un ϕ .

Faire travailler ds ϕ pour l'espèce humaine $\rightarrow$ biotechnologies.

I Principes généraux.

Cibles: cellules.

Pb: isoler le gène d'intérêt. et l'implanter.

On prend les ϕ qui le contiennent.

on extrait l'ADN et on le fragmente. On insère ce morceau ds un vecteur de l'origine de bactérie $\rightarrow$ clones.

Recherche du gène grâce à onde radioactive.

II Fabrication d'une onde radioactive.

Avec un ADN spécifique

A) Fabrication de l'ADN complémentaire au gène considéré.

Deux méthodes.

1) Par synthèse artificielle du gène

Elle est difficile: on part de la π qui exprime le gène on fait le séquençage.

on prend le code génétique ou code redondant

on fait ADN monocaténaire $\rightarrow$ double complémentaire, appariement

Plus difficile techniquement.

liaison à plus de la mm 5' $\rightarrow$ 3' très coûteux.

RECOMBINAISON GENETIQUE IN VITRO.

Ce sont des manipulations destinées à créer de nouvelles souches cellulaires avec de nouvelles potentialités. On utilise les termes de

- manipulations génétiques (un peu péjoratif)
- de recombinaisons in-vitro,
- de génie génétique.

PRINCIPE GENERAL DE LA METHODE.

ISOLER ET AMPLIFIER UN GENE
= CLONAGE D'UN GENE.

- fragmenter le génome
- inclure les fragments dans un vecteur
- intégrer le vecteur à un génome cellulaire pour obtenir un nouveau clone cellulaire.
- repérer le nouveau clone cellulaire grâce à une sonde radioactive.

FABRICATION DE LA SONDE
RADIOACTIVE : CLONAGE D'UN
ADN.

- préparation d'un fragment d'ADN correspondant au gène.
- amplification de ce fragment :
 - inclusion dans un vecteur
 - intégration dans cellule c'est un clonage d'ADN.
- marquage * de l'ADN sonde.

INTEGRATION DU GENE A
UN VECTEUR

INTRODUCTION DU VECTEUR
DANS LA SOUCHE CELLULAIRE
CHOISIE.

188

Préparation d'une sonde moléculaire d'un gène à partir de son ARN messager.

1 a) Synthèse du gène.

A l'ARN messager initial vecteur de son segment poly A à l'extrémité 3', on ajoute des segments poly dT qui s'associent au poly A et servent d'amorce pour la transcriptase inverse (A). Cette dernière polymérise un brin d'ADN complémentaire de l'ARN messager (B). On obtient une molécule bicaténaire hybride ARN-ADN. L'ARN est ensuite hydrolysé par la transcriptase elle-même qui se comporte comme une endonucléase. Par ailleurs, cette enzyme forme à l'extrémité 3' du brin d'ADN un court segment auto-complémentaire qui se reploie en crochet (C). L'extrémité de ce crochet constitue une amorce pour la polymérase I de l'ADN de *E. coli* qui achève la synthèse du gène en polymérisant le deuxième brin d'ADN (D). Une endonucléase spécifique appelée S1 ouvre l'extrémité en épingle à cheveu, d'autres endonucléases coupent les extrémités non appariées et éliminent quelques nucléotides aux extrémités 5' des doubles brins, libérant ainsi les extrémités 3' (E). Ces dernières servent d'amorce à une transférase terminale qui leur ajoute une séquence poly dC (F).

1 b) Purification de l'ADN d'un plasmide (épisode) de *E. coli*.

On utilise des plasmides portant des facteurs de résistance à des antibiotiques et possédant un site de coupure par une endonucléase de restriction, dans une région non essentielle ce qui permet d'ouvrir le plasmide circulaire en une molécule linéaire.

2) Confection d'un plasmide hybride.

Des extrémités monocaténaires poly dG sont ajoutées par une transférase aux extrémités 3' de l'ADN du plasmide (A). Les extrémités cohésives poly dC du gène et poly dG du plasmide se reconnaissent et s'apparient (B).

La continuité entre ces deux segments d'ADN est rétablie par des liaisons covalentes réalisées par une ligase (C).

Lorsqu'on utilise un phage λ comme véhicule moléculaire, on purifie les deux extrémités de l'ADN du phage dont on a éliminé la région moyenne. En mélangeant ces extrémités à de l'ADN du gène on obtient des recombinants avec le gène inséré entre les deux bras d'ADN du phage.

3) Transformation d'une bactérie, amplification du plasmide hybride, isolement du plasmide amplifié.

En plaçant des bactéries (*E. coli*) dépourvues de plasmides dans une solution de CaCl_2 et à basse température (0°C), leurs parois cellulaires fragilisées deviennent perméables au passage d'ADN étrangers. On intègre ainsi des plasmides hybrides aux bactéries (A). Le gène est donc multiplié avec la bactérie ; il est ensuite amplifié avec le plasmide qui, vecteur d'un facteur de résistance au chloramphénicol, se réplique en présence de cet agent qui bloque au contraire la réplication du chromosome bactérien (B). Isolement du plasmide hybride (C).

4) Marquage isotopique de l'ADN du gène par coupure-substitution (« nick translation »).

Ce marquage est basé sur l'activité exonucléasique $5' \rightarrow 3'$ propre à la polymérase de l'ADN I de *E. coli*. Dans une première étape on réalise des coupures haplotomiques (flèches) par une DNase dans les deux chaînes du plasmide hybride qui a été ouvert (A). Après élimination de la DNase, des désoxyribonucléosides triphosphates radioactifs et la polymérase I sont ajoutés au milieu. La polymérase s'associe aux extrémités 3' des incisions et allonge la chaîne en direction $5' \rightarrow 3'$ en polymérisant des précurseurs radioactifs, tout en excisant devant elle les nucléotides froids du bord 5' des incisions. Il y a substitution des nucléotides radioactifs aux nucléotides froids sur chaque brin et le marquage de l'ADN est très uniforme (B). Par des enzymes de restriction appropriées on peut éliminer les parties du plasmide qui ne correspondent pas au gène inséré. Les sondes ainsi obtenues sont très pures, fortement amplifiées et hautement radioactives.

Un fragment de gène ou un gène entier, voire un ensemble de gènes, sont initialement insérés dans la bactérie ou le phage, la population moléculaire finale dérive de ce seul segment initial qui a été rigoureusement reproduit en des millions d'exemplaires. On a réalisé un clone moléculaire.

2) Synthèse biochimique à partir de 2 ARN messages.

c) Exécuter l'ARN message

On récupère les ARN du gène $\rightarrow$ 4 bases actives sur la queue amide

Triage. Le fait isoler un message en ADN complémentaire ARNc

On ajoute de l'eau à avoir un poly T. + transcriptase reverse

establiant un ADN complémentaire. Cette E a le pouvoir d'hybrider l'ARN m. Dans

structure mono caténaire ADN ADN polymérase $\rightarrow$ Brn complémentaire

ADN bruché $\rightarrow$ on a l'ADN polymérase.

E: à donner S, l'hybride l'ADN à l'induit où il y a des bruchés.

$\rightarrow$ donc bruchés.

E: bruchés terminale: endue de nucléotide sur 3'. on se sert de cytosine.

$\rightarrow$ poly dC.

Petit ADN complémentaire de l'ARN (par d'induits)

D- la par polymérase à ces bases régulatrices: ce n'est ce - gène: ADN complémentaire.

B) Amplification de ce fragment.

1) Introduction de l'ADN complémentaire de un vecteur

qui est un plasmide bactérien

Sonde d'ADN $\times$ + plasmide.

on veut une population de la plasmide contient - gène de résistance aux antibiotiques.

De milieu de culture on ajoute antibiotique: la replication du $\times$ bruché est bloquée

les plasmides se multiplient.

On fait sécher les $\times$ $\rightarrow$ on centrifuge $\rightarrow$ récupération de plasmides.

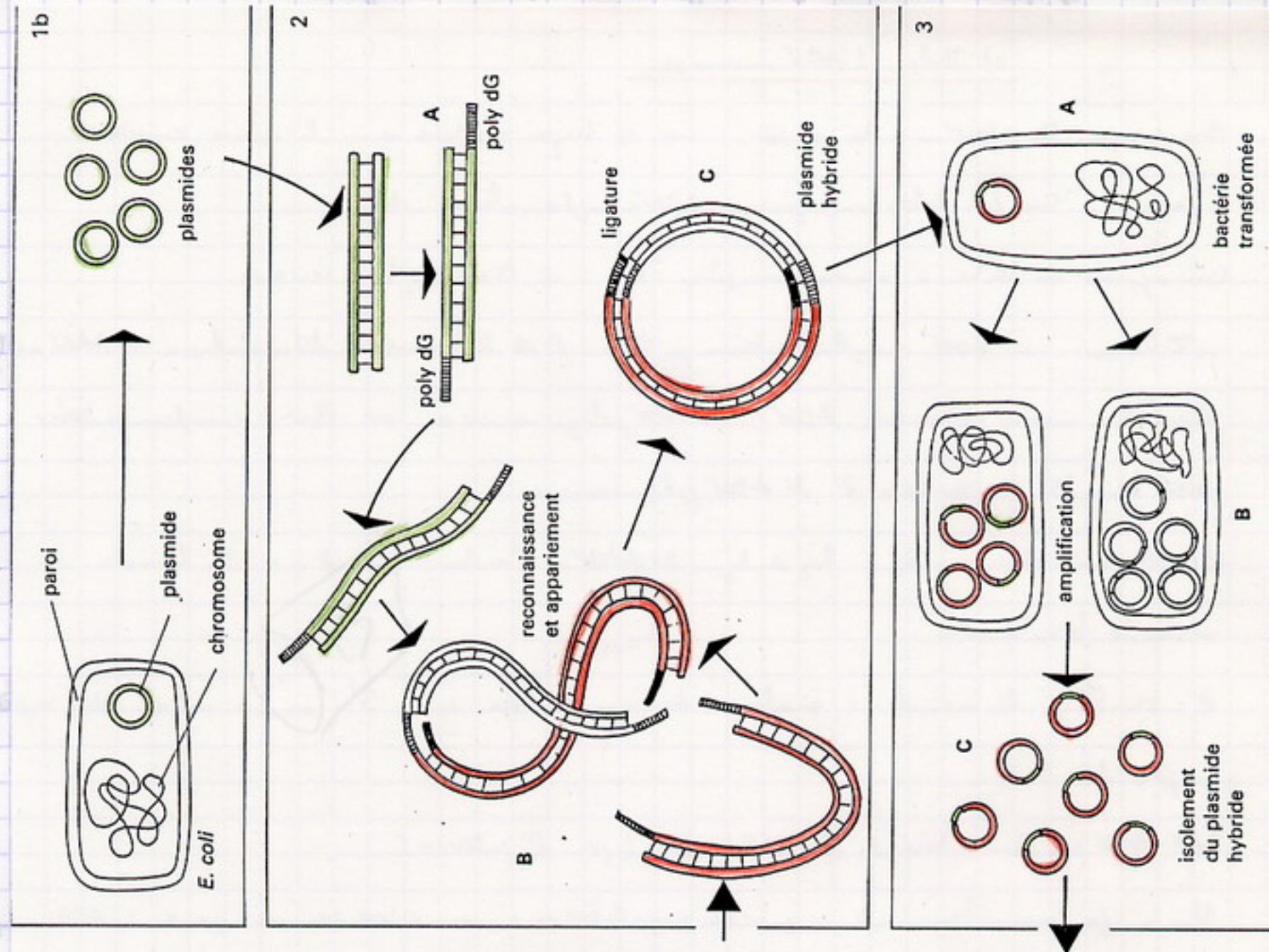
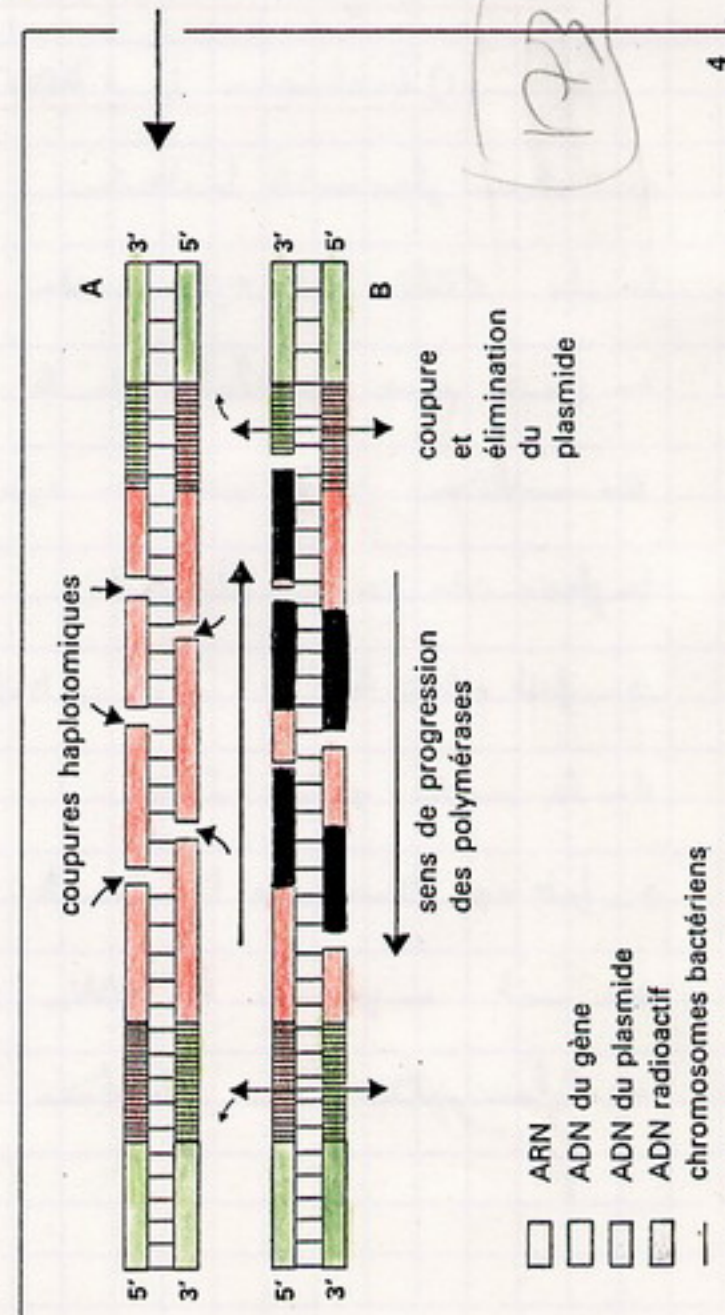
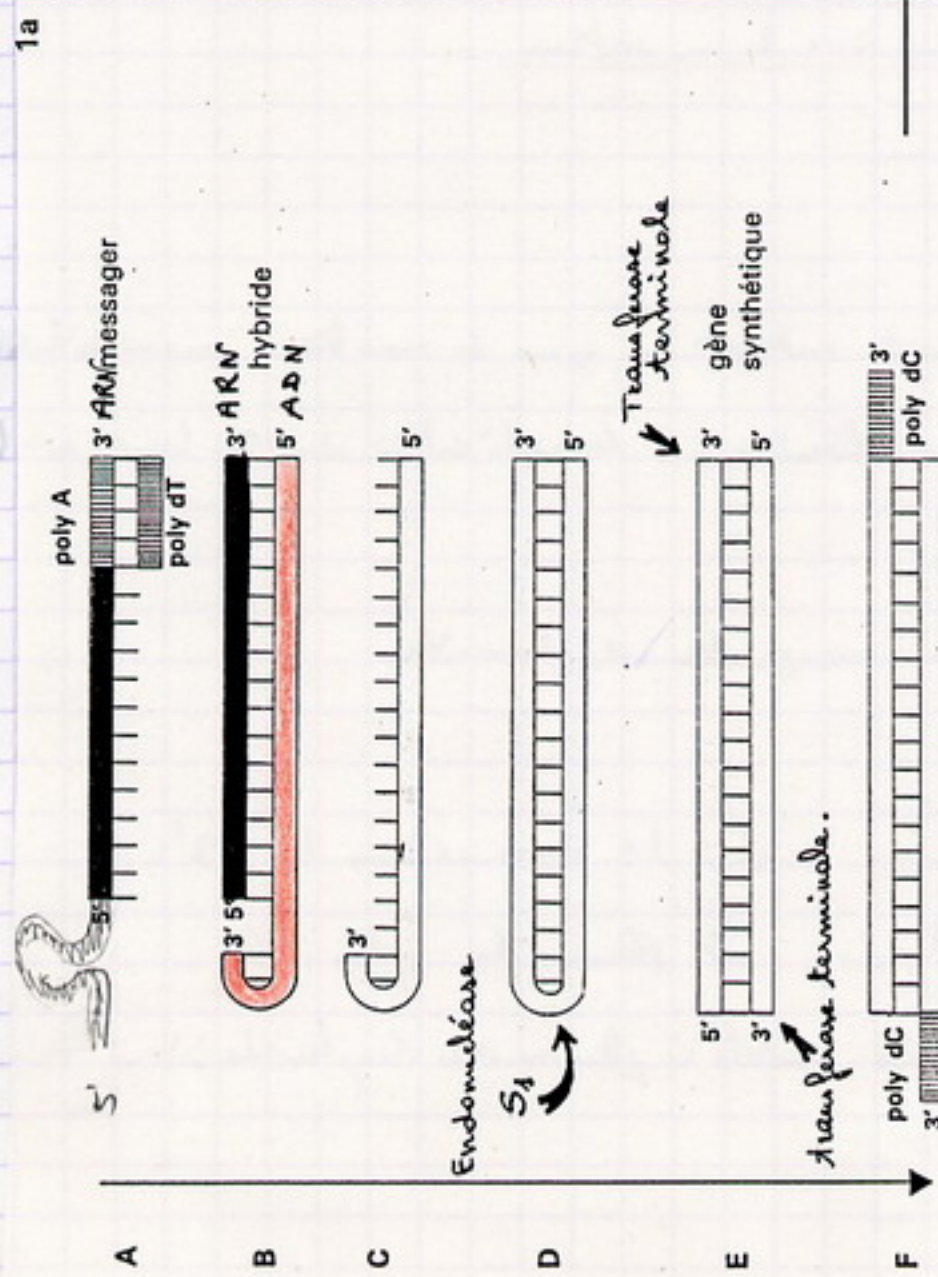
On les ouvre grâce à E.

On fait agir transcriptase terminale. dG.

poly dG aux extrémités 3'.

on est en présence d'ADNc + poly dC et plasmide poly dG

$\rightarrow$ Reformation d'une structure circulaire - exte: plasmide cyclique.



2) Intégration du clone de ϕ bact.

on fragmente la source $\rightarrow$ plasmide entre de bactérie transformée.

$\rightarrow$ donc. Recherche bact qui héberge l'ADNc.

+ Antibiotique $\times$ plasmides $\Rightarrow$ récupérer ADN $\rightarrow$ la.

C) Marquage de l'ADNc

on le rend radioactif.

grâce à E on fait avoir $3E$:

$\rightarrow$ qui coupe la molécule (à droite à la fin)

on ajoute de l'ADN pré-existant $\rightarrow$ repère et qu'on a extrémité $5'$ $\rightarrow$ nucléotides remplacés par nucléotides $*$

$\rightarrow$ comme E remplace CG $\rightarrow$ obtenir le plasmide.

Résultat: on a une quantité de l'ADNc et de plus il est radioactif.

Il servira à repérer le gène correspondant (dénaturation et reassociation).

14) Repérage du gène candidat grâce à l'ADNc plasmidique radioactif.

Genome humain 100 000 gènes.

A) Fragmentation du genome.

grâce à E de restriction hydrolyse l'ADN aux sites spécifiques (les $\rightarrow$).

Travail sur population cellulaire

Les fragments ADN sont séparés par électrophorèse (dans électrique)

Reporteur ff de leur taille. Équivalent ff de leur longueur.

On repère le bon gène par hybridation grâce à la sonde $*$

Tous les fragments sont séparés on prend une empreinte.

Mix de milieu: phase incubatoire ou présence sonde $*$. Chaude $\rightarrow$ dénaturation

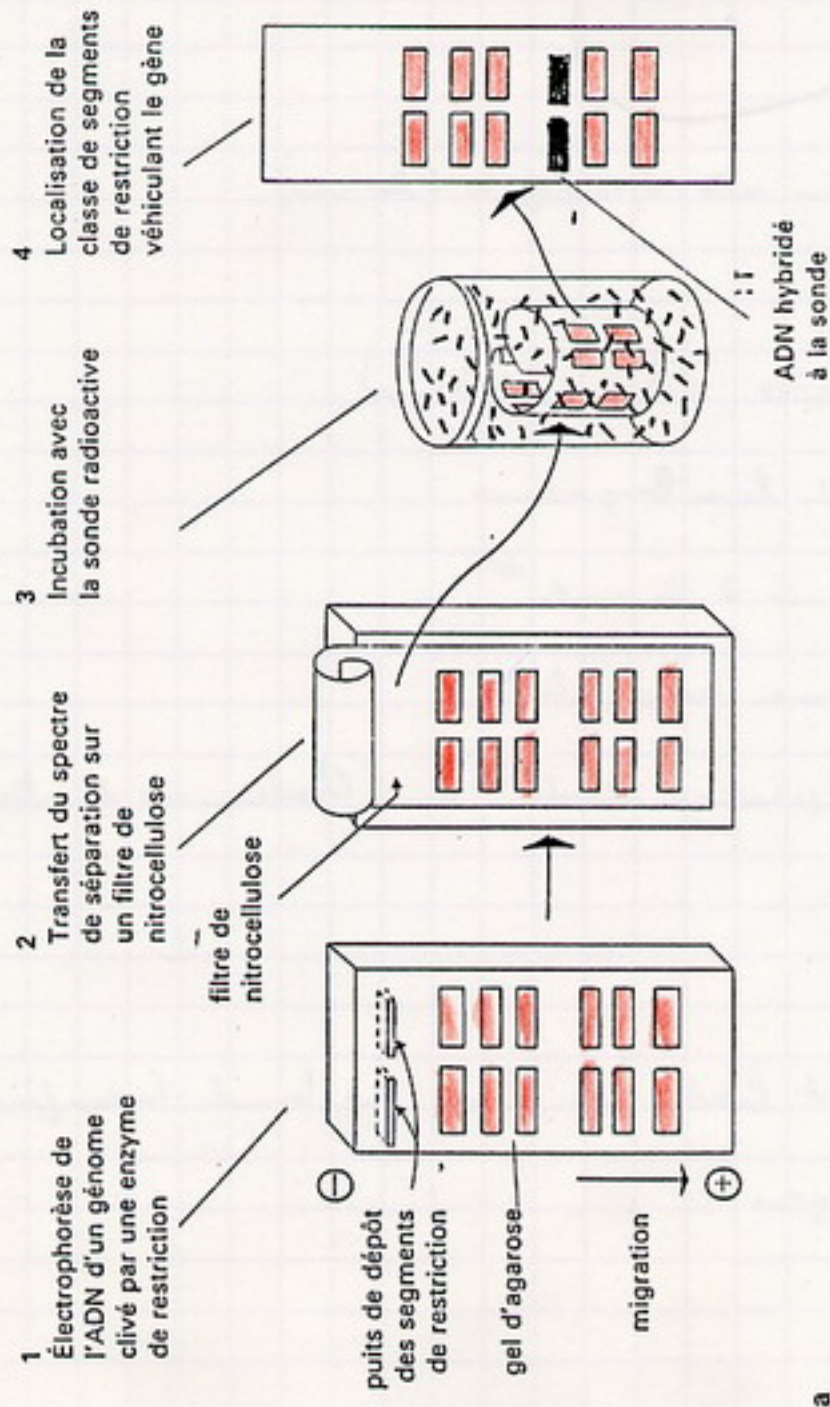
Puis reassociation.

ADNc $*$ se lie avec gène correspondant.

Récupération et on regarde où la $*$ s'est fixée $\rightarrow$ lire une bande bien précise.

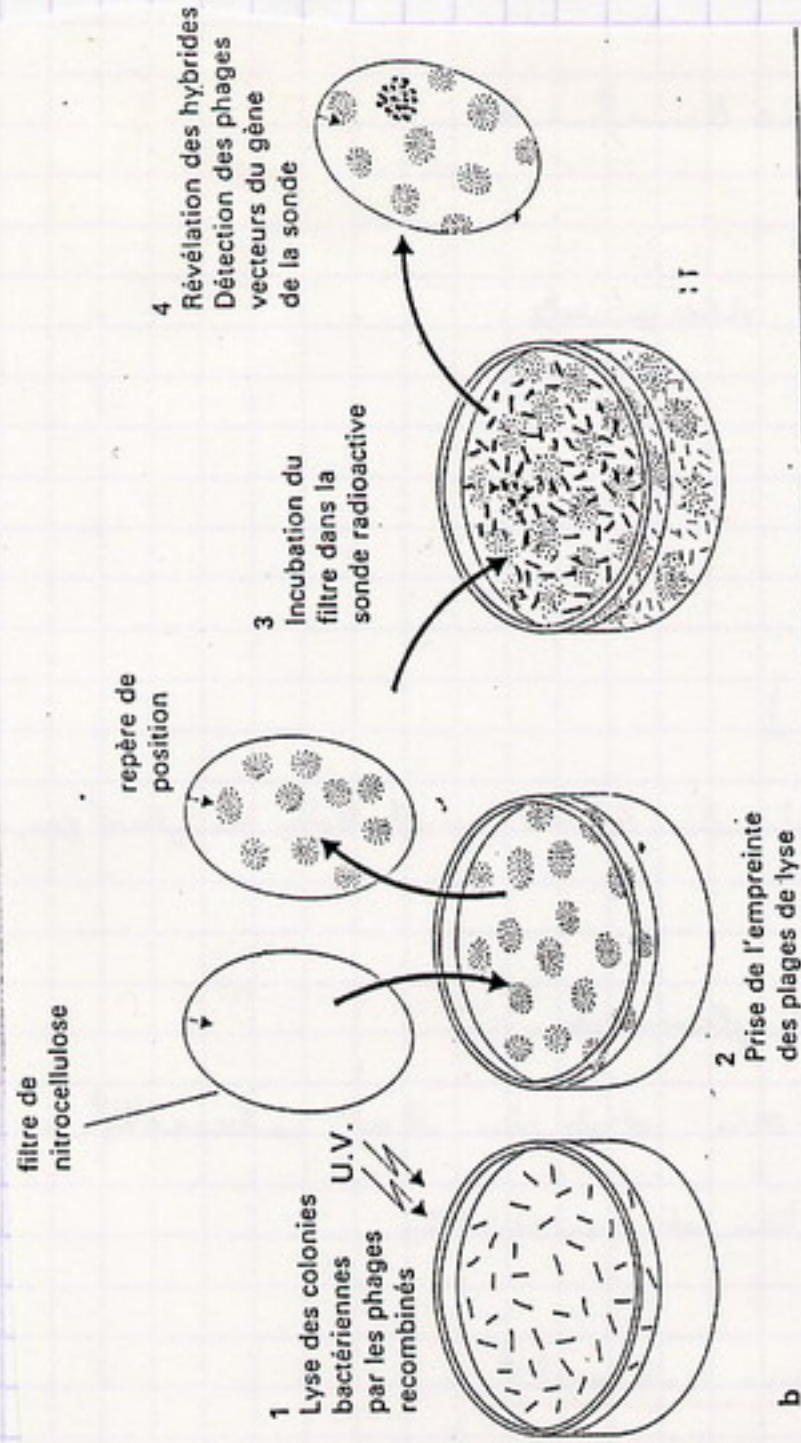
Retour à l'électrophorèse et localisation du gène.

Il est intégré à un vecteur



Utilisation de sondes spécifiques de gènes.

a) Identification et isolement du segment d'ADN vecteur d'un gène. L'ADN d'un tissu est purifié puis découpé par une enzyme de restriction. Les différentes classes de tailles de segments d'ADN ainsi obtenues sont séparées par électrophorèse sur gel d'agarose (1). Les fragments d'une même classe, en raison de la méthode de découpage utilisée, possèdent le même contenu informatif. Une feuille de nitrocellulose appliquée sur le gel en absorbant une fraction des ADN du gel dans leurs positions relatives, prend une empreinte du spectre électrophorétique : c'est la méthode de transfert (« blotting technique ») (2). Les ADN de l'empreinte, dénaturés, sont alors hybridés *in situ* avec la sonde radioactive également dénaturée (3). Après élimination des molécules non hybridées, les hybrides sont localisés sur l'empreinte par autoradiographie ou fluorographie (4). La position de l'hybride localise et identifie la classe d'ADN vectrice du gène dont la fraction principale restée dans le gel peut être récupérée.



b) Sélection d'un plasmide hybride ou d'un phage recombiné véhiculant un gène. L'ADN total du génome d'un organisme est fragmenté et mélangé à des véhicules moléculaires (plasmides ou phages) pour être recombiné à ces derniers et ensuite inséré dans des bactéries selon la technique décrite. Tout le génome d'une espèce peut être ainsi intégré. On obtient, dès lors, une véritable banque de gènes de laquelle on peut retirer les gènes à l'aide de sondes spécifiques. Dans le cas où le véhicule moléculaire est un phage on induit par action des ultraviolets la lyse des colonies bactériennes contenant ce phage (1). Puis on applique directement à la surface de la culture un disque de nitrocellulose qui absorbe l'ADN libre des plages de lyse (2). On prend ainsi l'empreinte des ADN libérés. Les ADN du disque sont hybridés avec une sonde radioactive (3) et les vecteurs du gène repérés sur le filtre (4). Les phages recombinés correspondants sont isolés.

Dans le cas d'un plasmide, on réalise une empreinte des colonies bactériennes transformées, à l'aide d'un disque de papier filtre lequel est trempé dans un détergent qui lyse les bactéries et libère leurs plasmides. Ce disque est alors appliqué sur un deuxième disque de nitrocellulose qui prend une empreinte des ADN libérés (non schématisé).

Les sondes sont également utilisées pour localiser les gènes sur les chromosomes. Pour cela les chromosomes sont préparés pour l'observation. Après dénaturation de leur ADN ils sont incubés avec les sondes radioactives. L'hybridation a donc lieu au niveau même du chromosome : on parle d'hybridation moléculaire *in situ*. Après élimination des sondes non hybridées, on localise par autoradiographie la position des hybrides sur les chromosomes.

IV Intégration du gène de un vecteur et transformation cellulaire.

A) quels vecteurs utilise-t-on?

1) chez les eucaryotes.

- Travail sur soya et clover : Injection directe du gène - qd fin ça marche.

- Vecteur = transposon.

Déjà transposon, inclure le gène de la transposon et injecter ces transposons de la q
Le transposon s'intègre naturellement au génome.

(Travail précédent : isolation - libération...).

- Vecteur = virus rétro.

On injecte les rétrovirus de la q → s'intègrent au génome

On peut travailler directement avec l'ADN.

- Vecteur = Plasmide bactérien. Injecté à q.

2) chez les procaryotes.

- Plages bactérielles. Injecté de l'ADN de la q.

- Plasmides

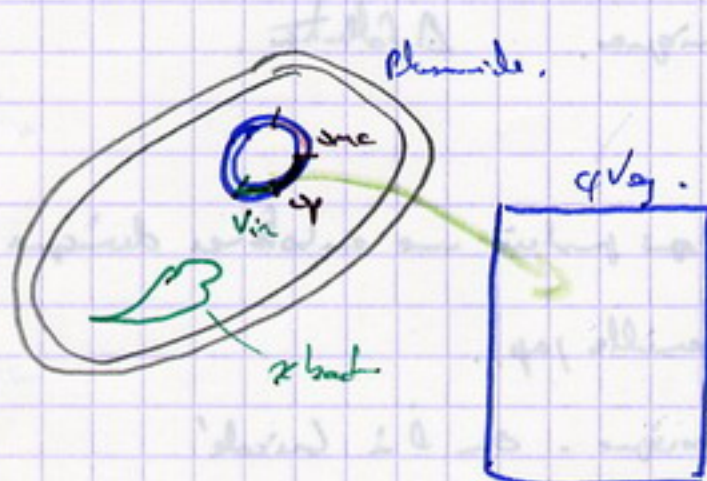
- Plasmides bicodants = Comètes

B) Un exemple de manipulation génétique des plantes grâce à Agrobacterium Tumefaciens

Bactérie responsable de la galle du

1) Cette bactérie est responsable de la galle du collet des plantes.

Collet : entre racine et tige.



onc : responsable de la tumeur végétale : oncogène

op : code pour les opérons.

vir : responsable de la transmission du plasmide bactérien aux cellules végétales.

Le plasmide est transmis à la q/Veg.

Récupération des gènes ouverts → q/Veg.

→ Tumeur : prolifération de q.

bactérie qui transmet naturellement un plasmide à une & vég qui va s'hybrider :
le plasmide sera exposé.

2) Utilisation.

Manipulation du plasmide pour modifier la queue onc de façon à la rendre inactive :

le plasmide est decouper. On se touche pas au gène vir (transmission vers la & vég).

On intègre le nouveau gène entre onc et op

Culture des bactéries → donne avec plasmide modifié avec gène d'encapsule.

Bact au contact de culture & . la bact transmet un plasmide avec & en culture

le plasmide s'intègre au genome et on s'expose

la & eucaryote végétale est transformée.

À partir d'une culture de tissu végétal on peut obtenir une plante entière (Hamon).

Reproduction ou multiplication → descendance de plants qui ont intégré le gène &
le végétative
un nouveau gène : Plante transgénique

3) Quels types de gènes peut-on transférer ?

- Gène de résistance aux herbicides.

Plante naturellement résistante à certains herbicides (capable de les dégrader)

→ des herbicides d'origine du maïs.

Isolation de ce gène, amplification, introduit du plasmide Agrobacterium

→ transféré de d'autres espèces végétales : tabac, soja, tomate, pomme de terre

Nouvelle espèce résistante à certains pesticides d'origine. Δ Polenta.

- gène de résistance aux insectes.

On utilise un bact : *Bacillus Thuringiensis* qui produit une substance toxique lorsque
par certains insectes : larves des lépidoptères (chenilles, pap).

On isole le gène qui produit la substance toxique. On l'intègre

à un vecteur & vég.

Mixé au & vég → & vég

ou les plantes ne sont pas les & et les ARN polymérase ne reconnaissent pas les
promoteurs vég

On obtient de nouvelles variétés de plantes transgéniques fabriquant toxines contre les phytophages.

Tabac ...

Intégrer de 4-5 gènes qui permettent à certaines bactéries d'utiliser l'Azote atmosphérique de manière efficace.

Plante verte $\rightarrow$ N_2 présent dans le sol : Nitrates, nitrites.

Pollution par les nitrates.

On parle de gènes : gène Nif on cherche de faire des plantes transgéniques : on n'y est pas arrivé.

Conséquences écologiques : teneur de N_2 .

C) Programmation d'une bactérie pour les faire produire une π .

Proteins produites à la bactérie des π différents à isoler et qui permettent un intérêt médical ou cosmétique.

De l'âge croissant.

(1^e semaine ...)
(interféron, anti-tumeur ...)

Cancer : Nanisme.

Utilisation d'HSP le boudin (secréter par le hypophyse). $n \neq$ séquences d'AA : in-éliminable.

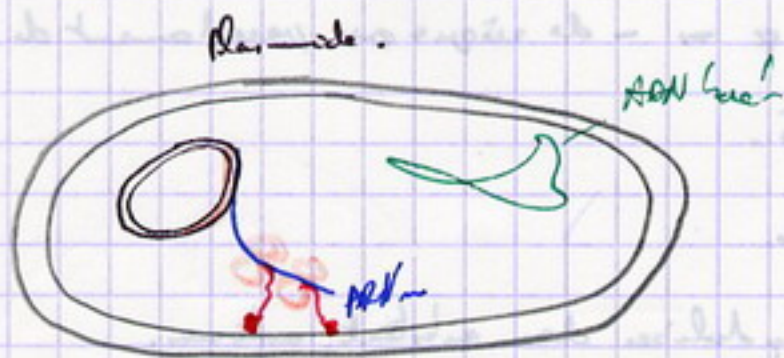
$\rightarrow$ peuples hypophyse sur cadavres $\rightarrow$ qualité faible.

Risque d'infection par virus du système nerveux.

Techniques de 1^o par bactérie.

1) Technique Genetech

Souche bactérienne : Utiliser des bactéries



Gène de 1^o H : LGH

Gène LGH : encodant, int-, ...

Reconstitution des APV.

On se peut même directement le gène

(le promoteur ne peut pas être directement par ADN phage).

On met le promoteur de l'opéron lactose associé à l'ADN bactérien qui correspond à la partie codante du gène : 191 aa + Codon Family Release $\rightarrow$ 192 aa.

on fait des clones, la T est produite.

on clone la bact. on repare les molécules Recupération de l' hGH + fentanyl Naloxone.

l'antigène agit cette molécule 1^{er} effet mais effets secondaires: allergiques

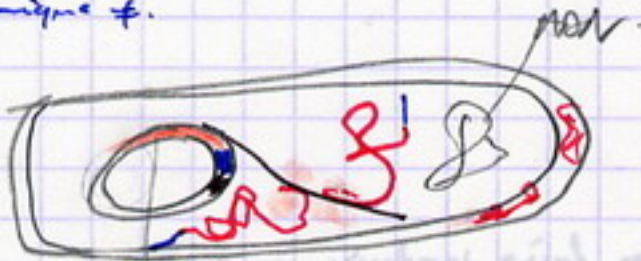
Séquence d'intégration: Restant attaché à l' hGH: petits et bactériens.

hGH légèrement cellulaire

la protéine est en l'organisme - la vie à voir avec celle du donneur.

2) Technique SANDO FL.

Technique #.



AON $\Rightarrow$ 191 aa
+ séquence de signalisation: 28 aa.
+ Remarque: on l'active.

Formation de la T avec séquence de signalisation.

Cette séquence se place contre la membrane et fait

passer la molécule entre la membrane et la paroi:

Elle est de la q comme q en q RER.

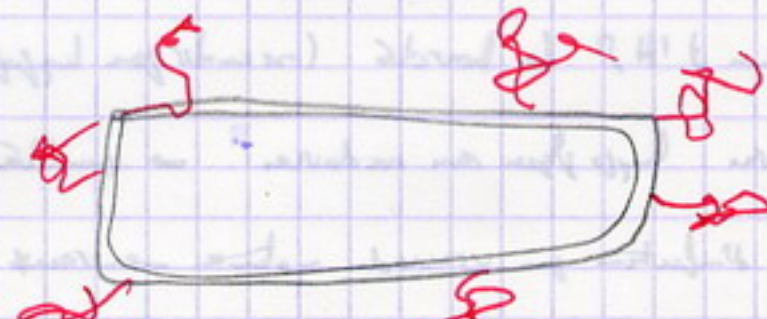
La séquence de signalisation est maintenant hydrophobe

et s'insère entre la membrane et la paroi. On passe ces q de la membrane hydrophobe

la membrane se déplace



Milieu hypotonique



Milieu très hypotonique

Pour passer la T passent à travers la paroi.

on détermine la T de 191 aa de la séquence de signalisation. on fentanyl Naloxone (hydrophobe)

on récupère l' hGH par le biais de la T - de séquence ou précédemment de séquence de la bact.

Cette hGH est utilisée avec succès.

Produit pur, efficace, sans effet secondaires.

La bact. rendant naturellement E qui est hydrophobe des substrats externes.

La E est de la q - passage de l'int à l'ext & exocytose - passage - la.

Conclusion: les biotechnologies n'ont pas eu l'espérance de succès.

L'expérience montre que ce sont des techniques délicates et difficiles à maîtriser.

Ambition: Séquence de la génie génétique - à combiner les séquences - repare les

maladies génétiques

Manipulation génétique de l'espèce humaine? Gène déficient → gène normal

Est-on transfère ces techniques à l'espèce humaine.

Biologie de l'ovule? Psychiques

Débat de société.