**Chapitre 2 : Génie génétique**

[I. Obtention d’un maïs transgénique pour le gène Bt 1](#_Toc312504625)

[1) Clonage du gène Bt bactérien 1](#_Toc312504626)

[2) Transformation du maïs 3](#_Toc312504627)

[3) Etude du maïs transformé 4](#_Toc312504628)

[II. Exemple de clonage d’ADN humain : gène codant pour le récepteur du glutamate 5](#_Toc312504629)

[1) Préparation du clone 5](#_Toc312504630)

[2) Stratégie d’identification du clone contenant ce gène 5](#_Toc312504631)

[3) Autres techniques de criblage d’une banque d’ADNc 6](#_Toc312504632)

[III. Etude du gène pg (polygalacturonidase) chez les tomates 6](#_Toc312504633)

[1) Etude du promoteur pg par gène rapporteur 6](#_Toc312504634)

[2) Stratégie anti-sens pour inactiver le gène 6](#_Toc312504635)

[IV. Synthèse de la protéine médicamenteuse ATIII dans le lait de chèvre 7](#_Toc312504636)

[1) Amélioration du potentiel thérapeutique par mutagénèse dirigée 7](#_Toc312504637)

[2) Obtention de chèvres transgéniques 7](#_Toc312504638)

[V. Clonage de semences… Premiers pas 8](#_Toc312504639)

[1) Les enjeux en agronomie 8](#_Toc312504640)

[2) L’apomixie 8](#_Toc312504641)

[3) Etat d’avancement des recherches 9](#_Toc312504642)

[VI. Génie génétique et éthique 9](#_Toc312504643)

[1) Etude de l’ADN dans le cas d’une maladie héréditaire 9](#_Toc312504644)

[2) Les plantes génétiquement modifiées peuvent-elles aider à nourrir le monde ? 9](#_Toc312504645)

**Chapitre 2 : Génie génétique**

Techniques permettant de manipuler ADN et ARN, de créer de nouvelles séquences, d’étudier/modifier l’expression des gènes.

# Obtention d’un maïs transgénique pour le gène Bt

Le gène Bt (= Bacillus Thuringiensis) est une bactérie présente dans le sol. Le gène Bt code pour une protéine Bt qui est toxique pour les insectes (surtout pour les chenilles). Cette protéine Bt est utilisée depuis longtemps pour éliminer les insectes ravageurs sur les cultures. L’idée du génie génétique a été d’introduire ce gène dans une plante qui produira elle-même cet insecticide directement dans les tissus mangés par les chenilles. Les premiers essais datent de 1985 sur le tabac et depuis sur le coton, le maïs, la tomate, le soja…

## Clonage du gène Bt bactérien

### Isolement du gène Bt

Il faut d’abord récupérer le gène dans le génome bactérien. Pour cela, on utilise des enzymes de restriction. On utilise une enzyme qui coupe de part et d’autre du gène pour le libérer du reste du génome.

(fiche1)

On utilise une ou plusieurs enzyme(s) qui coupe(nt) de part et d’autres du gène d’intérêt pour le libérer du reste du génome.

### Construction du gène recombinant

On veut construire un gène nouveau avec la séquence codante du gène Bt et un promoteur spécifique. Il existe différents types de promoteurs, certains promoteurs sont dits forts. Ils sont constitutifs, c’est-à-dire qu’ils s’expriment dans toute la plante, tout le temps et à hauts niveaux d’expressions. D’autres promoteurs sont spécifiques soit d’un tissu cellulaire (les feuilles par exemple) soit d’un stade de développement de la plante (lors de la germination par exemple).

Dans ce cas, on va choisir un promoteur avec un profil d’expression adéquate parmi les promoteurs connus chez le maïs. On va introduire ce promoteur et le gène Bt dans un plasmide qui servira de vecteur pour l’introduire dans une bactérie.

(fiche2)

#### Linéarisation du plasmide

On va choisir une enzyme dans le site de polyclonage qui soit compatible avec l’enzyme utilisée pour récupérer le gène Bt.

#### Ligation

On va mettre en présence le plasmide linéarisé avec l’insert et une ligase. La ligase est une enzyme qui permet de former la ou les liaison(s) covalente(s) phosphodiester(s) entre les extrémités 5’ et 3’. Lorsque la ligation est à bords collants, les deux extrémités peuvent s’apparier par liaisons hydrogène. Elles s’apparient sur quelques bases, ce qui les maintient en place et qui facilite le travail de la ligase. Lorsque que la ligation est à bords francs, il n’y a pas d’appariement des morceaux d’ADN à rattacher et donc cette ligation marche moins bien. On fait le travail pour le gène Bt et on recommence pour insérer le promoteur.

(fiche3)

### Amplification du gène recombinant par clonage

Le gène recombinant est obtenu à quelques exemplaires, c’est insuffisant. Il faut donc le reproduire en très grand nombre. Pour cela, on utilise le potentiel de reproduction des bactéries (doublement de la population en 20min dans les conditions optimales). Le plasmide est introduit dans la bactérie par transformation génétique. Les bactéries seront sélectionnées dans un milieu contenant un antibiotique et mises à pousser dans des conditions optimales.

(fiche4)

### Purification du gène recombinant

#### Préparation de l’ADN plasmidique

(fiche5)

#### Extraction du gène encombrant

Le plasmide a été extrait des bactéries après culture. On va réutiliser des enzymes de restriction sur ce plasmide pour libérer le gène recombinant.

#### Vérification de la construction par électrophorèse

On vérifie que la construction est correcte et complète en mesurant la taille des fragments libérés par l’enzyme restriction. Cette technique est une électrophorèse sur gel d’agarose.

(fiche6)

#### Vérification de la construction par séquençage

On peut enfin vérifier qu’il n’y a pas eu de mutation introduite au hasard des manipulations en séquençant le gène recombinant et en comparant sa séquence à celle des promoteurs et du gène Bt utilisés.

(fiche9)

*Isolement du gène d’intérêt : utilisation de l’enzyme restriction -> clonage du gène d’intérêt (+promoteur) dans un plasmide -> transformation, sélection de bactéries pour multiplication du construit -> vérification, analyses moléculaires*

## Transformation du maïs

### Introduction du plasmide dans le cytoplasme de cellules de maïs

(fiche4)

#### Transformation par électroporation

Il existe cette paroi squelettique qui constitue une barrière pour l’entrée du plasmide. On la digère en utilisant des enzymes. On obtient des protoplastes = cellules végétales sans paroi. On met en contact le plasmide et le protoplaste et on réalise un choc électrique qui déstabilise la membrane et ainsi permet l’entrée du plasmide.

#### Transformation par biolistique

L’ADN est mis à la surface de petites billes qui sont projetées très violemment contre les cellules : certaines pénètrent dans le cytoplasme et amènent l’ADN avec elles.

#### Transformation par Agrobacterium tumefaciens

Les agrobactéries possèdent un plasmide Ti qui leur permet d’insérer une partie de leur ADN dans une cellule végétale. Ces bactéries sont capables d’absorber un morceau de leur propre ADN. Sur le plasmide Ti il y a des gènes de virulence qui permettent le transfert d’ADN et d’une zone d’ADN qui est insérée dans les cellules végétales et crée des tumeurs. Pour transformer des cellules végétales par agrobactéries, on modifie leur plasmide Ti afin de leur faire insérer notre gène d’intérêt et un gène de sélection.  
(Mise en contact d’une culture d’agrobactéries et de cellules végétales telles que les embryons de maïs)  
Le gène VIR est naturellement présent sur les plasmides Ti. Il permet de coder tout ce qui se trouve entre LB et RB. Le gène rapporteur est associé au gène d’intérêt pour visualiser les cellules transformées.

### Sélection et régénération de cellules transformées

L’ADN introduit doit entrer dans le noyau et s’intégrer au génome pour pouvoir s’exprimer. Les cellules ayant intégré le gène recombinant de manière stable sont sélectionnées sur le milieu nutritif et antibiotique. La sélection et la régénération de plantes sont faites à partir d’une cellule transformée. Les techniques de culture in vitro sont basées sur la totipotence. Les cellules végétales peuvent se différencier dans un environnement donné et se respécialiser en fonction des hormones présentes.

## Etude du maïs transformé

Il s’écoule entre deux et trois mois entre la transformation et la régénération. La régénération d’une plante entière se fait à partir d’une cellule ou d’un évènement de transformation.

(fiche10-fiche11)

### Vérification de l’insertion du gène recombinant Southern Blot

C’est une hybridation entre une sonde d’ADN et de l’ADN génomique. Cela permet de déterminer si un gène est présent ou non dans un génome.

*Protocole* :

* Extraire et purifier l’ADN génomique
* Fragmenter cet ADN avec des enzymes de restriction
  + Séparer les fragments par électrophorèse sur gel d’agarose
  + Transférer et fixer les fragments sur une membrane
  + Hybrider les fragments avec une sonde marquée, spécifique du gène étudié
  + Si le gène étudié est transcrit dans un échantillon, une bande sera observée, plus ou moins intense selon le taux de transcription

### Vérification du profil d’expression du gène par Northern Blot

On réalise un Southern Blot avec une sonde spécifique du gène Bt. Cela nous permet de vérifier si le transgène est bien présent, qu’il est entier et en un seul exemplaire. Seules les plantes correctes sont gardées.  
On réalise ensuite un Northern Blot avec une sonde spécifique du gène Bt. On vérifie l’expression du transgène dans toute la plante (feuilles, tige…) et durant tout le développement c’est-à-dire au stade plantule, plante adulte… Seules les plantes correctes sont gardées.

*L’objectif au niveau moléculaire est un transgène simple :*

* C’est l’insertion d’un transgène en entier
* Insertion dans une zone qui permet l’expression
* Une ou deux copies

Validation fonctionnelle sur plusieurs générations.  
Essai au champ dans des conditions confinées. On observe comment se comportent les plantes.  
Evaluation agronomique  
Homologation  
Commercialisation  
Mise sur le marché

# Exemple de clonage d’ADN humain : gène codant pour le récepteur du glutamate

## Préparation du clone

Le glutamate est l’un des plus importants transmetteurs du cerveau.  
Pendant de nombreuses années il était impossible de coder le gène codant pour le récepteur du glutamate.  
Son succès est lié à une technique de clonage astucieuse fondée sur la fonction du récepteur.  
L’ARNm a été isolé des cellules du cerveau puis utilisé comme matrice pour la production de molécules d’ADNc.

(fiche3)

Les ADNc sont insérés dans un vecteur d’expression plasmidique. Une banque d’ADNc représentative de tous les ADNc des cellules du cerveau a été produite.

## Stratégie d’identification du clone contenant ce gène

Les clones ont été répartis en pools. Ils ont été injectés dans un œuf de grenouille qui a transcrit l’ADNc en ARNm puis traduit en protéine. Pour identifier l’ovocyte de grenouille possédant le récepteur du glutamate, on a utilisé la technique du patch clamp : du glutamate est appliqué sur les ovocytes, le pool possédant l’ADNc avec le récepteur du glutamate répond par un influx de sodium indiquant la présence de ce récepteur dans la membrane plasmique. Le pool donnant cette réponse est réparti en pools plus petits. Il est de nouveau criblé en fonction de la présence de l’activité du récepteur glutamate. A la fin, chaque pool contient un ADNc qui permet d’identifier le récepteur.

Les ovocytes produisant un influx de sodium à la suite d’une application de glutamate identifient le pool contenant l’ADNc codant pour le récepteur du glutamate. On répète les différentes étapes (extraire les ADNc et les injecter dans des ovocytes puis identification des ADNc portant les récepteurs du glutamate) sur les ADNc du pool1, en utilisant à chaque fois une sous-population d’ADN plus petit, jusqu’à ce qu’un seul ADNc donnant une réponse positive dans le dosage du récepteur ait été identifié.

## Autres techniques de criblage d’une banque d’ADNc

On connait la séquence de la protéine.

(fiche7)

(fiche8) On veut cribler une banque d’ADN génomique.

# Etude du gène pg (polygalacturonidase) chez les tomates

Ce gène est impliqué dans le murissement de la tomate. L’enzyme dégrade la peptine des parois du fruit ce qui conduit à un ramollissement du fruit donc à une durée de conservation qui diminue, ce qui rend les fruits plus fragiles. Comment ce gène va être impliqué dans le ramollissement ? Comment fonctionne son promoteur ?

## Etude du promoteur pg par gène rapporteur

*Objectif :* rechercher à quel moment du développement s’active ce gène et dans quels tissus.

(fiche12)

*Déroulement :*

* Construction   
  promoteur pg + séquence codante du gène GFP + signaux de fin de transcription
* Transformation des cellules de tomate, régénération de plantes transgéniques
* Récolte, analyse des fruits : différents stade de murissement et réalisation de coupes fines dans les fruits, observation microscopique pour rechercher les zones de fluorescence

*Conclusion :* Ce gène s’active tôt dans le murissement, avant le stade organoleptique.

## Stratégie anti-sens pour inactiver le gène

Pour l’exemple de la tomate, l’objectif est de bloquer l’expression du gène pg dans la tomate pour diminuer le ramollissement du fruit à maturité optimale.

(fiche13)

Déroulement :

* Construction
* Transformation de cellules de tomate  
  promoteur pg + séquence antisens du gène pg + signaux de fin de transcription

On va chercher à sélectionner les lignées les plus inhibées (activité résiduelle de 5 à 10%).

### Vérification de la présence du gène anti-sens par PCR

(fiche11)

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

(fiche10)

# Synthèse de la protéine médicamenteuse ATIII dans le lait de chèvre

*ATIII = Antithrombine III*

C’est une protéine utilisée comme anticoagulant après une crise cardiaque. Elle est extraite du corps humain : cout élevé, faible production, risque de transmission d’agents pathogènes.

*Objectif :* faire produire cette protéine par des chèvres, dans leur lait  
 => production plus importante  
 => moins de risques pathogènes

## Amélioration du potentiel thérapeutique par mutagénèse dirigée

ATIII est vite dégradée par une enzyme sanguine. C’est une tyrosine, la tyrosine 147, qui joue un rôle particulièrement important dans la reconnaissance de l’ATIII par cette enzyme, mais pas de rôle particulier dans l’action de l’ATIII (loin du site actif).

*Objectif :* modifier cet acide aminé par mutagénèse dirigée pour :

* Conserver les propriétés thérapeutiques de l’ATIII
* Eviter la fixation de l’ATIII sur l’enzyme

(fiche14)

*Déroulement :*   
PCR réalisée avec une amorce non parfaitement complémentaire du gène codant pour ATIII  
 => UAU -> UGU  
 Tyr Cys  
\* Ce fragment est cloné pour remplacer le fragment d’origine.

## Obtention de chèvres transgéniques

*Objectif :* introduire le gène de l’ATIII dans le génome des chèvres de sorte qu’il soit produit dans le lait.

*Déroulement :*

* Construction : promoteur de la caséine (activé uniquement dans les glandes mammaires) + séquence codante de l’ATIII + signaux de fin de transcription
* Transformation des œufs fécondés par micro-injection
* Dans certains œufs, le gène s’intègre au génome et sera transmis à toutes les cellules
* Chaque embryon est testé en prélevant une cellule : extraction ADN, PCR

\*Les embryons sont implantés dans les chèvres.  
\*Les chèvres transgéniques femelles synthétisent l’ATIII dans les glandes mammaires et la sécrète dans le lait où la protéine ATIII peut être extraite facilement.

Il faudrait seulement une centaine de chèvres transgéniques pour couvrir les besoins de l’humanité.

# Clonage de semences… Premiers pas

Travaux réalisés par l’INRA de Versailles-Grignon, en collaboration avec des chercheurs américains et indiens, février 2011

## Les enjeux en agronomie

Semences hybrides :

* Cumulent avantages de leurs parents  
  *exemple : un maïs donnera plus de grains comme son père et résistera à un virus lambda de sa mère*
* Vigueur hybride : rendement en moyenne supérieur de 20%
* Problème : obtention difficile pour certaines plantes qui s’autoféconderont (blé, pois, riz…)
* Couteuses puisque ressemer des graines = réduction de productibilité  
  En effet : loi mendélienne de ségrégation des caractères
* Recherche d’un nouveau système depuis 1980

## L’apomixie

L’apomixie ou reproduction clonale par graines est un mode de reproduction particulier observé chez plus de 400 espèces de plantes sauvages.

Les descendants sont génétiquement identiques à la plante mère.

Obtention par modification de deux étapes de la reproduction sexuée :

* Formation de gamètes contenant la totalité de l’information génétique maternelle au lieu de la moitié (2n chromosomes au lieu de n)
* Initiation de l’embryogénèse sans pollinisation (c’est-à-dire sans apport de l’information génétique paternelle)

*Objectif :* reproduire par apomixie de nouvelles variétés élites  
\* Leur descendance conserverait leurs caractéristiques  
\* et pourrait être reproduite et distribuée à l’infini.

## Etat d’avancement des recherches

2000 : impasse : fautes de résultats recherches abandonnées

Nouvel espoir : par mutation dirigée

L’équipe de l’INRA a identifié trois gènes responsables de la reproduction sexuée.  
But : Transformation d’une reproduction sexuée en asexuée

* Création d’une lignée MiMe : réalisant une Mitose au lieu d’une Méiose en ne modifiant que trois gènes. Mais c’est toujours une plante sexuée
* Croisement avec une lignée GEM : dont les chromosomes ont tendance à être éliminés lors d’un croisement = modification d’un gène

(fiche15)

La propagation clonale par graines est possible sur plusieurs générations.

Ce sont donc des résultats encourageants : l’apomixie est donc théoriquement possible par modification de quatre gènes. On peut donc faire ces modifications par mutagénèse grâce à des agents chimiques ou à des radiations ioniques mais ces méthodes ne sont pas précises ou on peut utiliser la transgénèse mais cela pose la question de l’acceptabilité auprès du public européen.

# Génie génétique et éthique

## Etude de l’ADN dans le cas d’une maladie héréditaire

Applications de la technologie de l’ADN recombinant excitantes…

## Les plantes génétiquement modifiées peuvent-elles aider à nourrir le monde ?

Valeur des produits OGM ?  
Dommage sur l’environnement ? Plantes insecticides, résistantes à un herbicide…