

## Introduction:

Le génie génétique est un ensemble de techniques permettant d'identifier et d'isoler, de modifier et de transférer de façon contrôlée du matériel génétique. Il s'agit donc d'un outil aux applications extrêmement variées et qui permet en particulier d'intervenir avec précision sur le patrimoine génétique des êtres vivants.

Dans la nature il se peut qu'un gène soit transféré d'un être vivant pour s'incorporer dans le programme génétique d'un autre.

- Comment se produit le transfert naturel des gènes?
- Quelles sont les techniques utilisées en génie génétique?
- Quels sont les domaines d'application du génie génétique ?

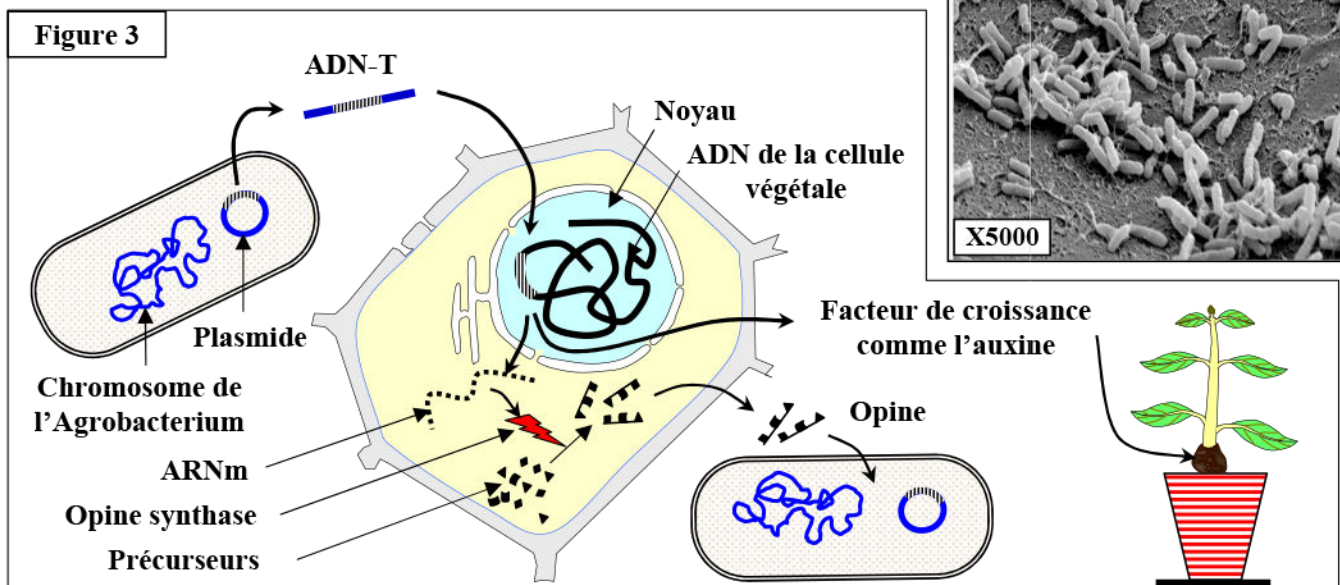
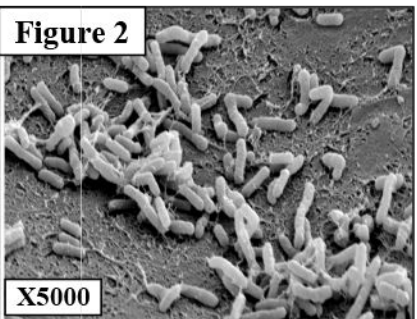
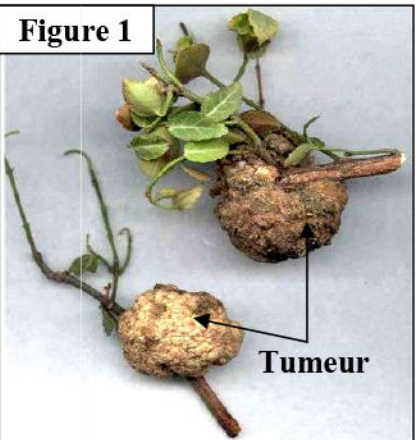
## I – Transfert naturel des gènes de l'Agrobacterium à une plante:

① **Données sur la galle du collet:** (Voir document 1)

### Document 1: Notion de transformation génétique naturelle:

*Agrobacterium tumefaciens* (Figure 1) est une bactérie qui vit dans le sol et infecte naturellement les végétaux présentant des blessures à la base de leur tige (collet). En réaction à cette infection, les cellules du végétal se multiplient de manière importante et forment une tumeur (Figure 2) qui libère dans le milieu des opines. Les bactéries présentes dans le sol près de la tumeur sont alors capables d'utiliser ces opines comme source d'azote, mais aussi de carbone et d'énergie. La réaction du végétal est due au transfert d'un petit ADN, l'ADN-T, depuis la bactérie jusque dans le génome des cellules de la plante par l'intermédiaire d'un plasmide (ADN circulaire bactérien de petite taille) appelé plasmide Ti.

Le schéma de la figure 3, montre les étapes du transfert naturel du gène de l'A. Tuméfaciens à une cellule végétale.

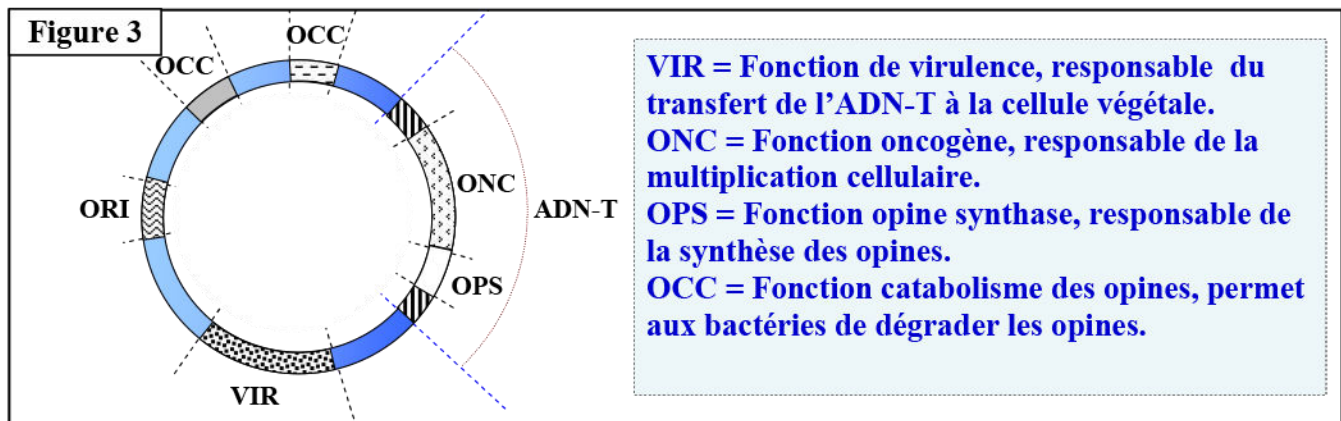


L'ADN-T ou ADN de transfert, est la région d'ADN transférée dans la plante après infection par les bactéries, *Agrobacterium Tuméfaciens*.

## Document 1: (Suite)

L'ADN-T est contenu dans le plasmide Ti, qui est responsable des propriétés transformantes (pénétration et intégration d'ADN).

Des études ont permis d'établir la carte génétique du plasmide Ti. La figure 3 présente une carte génétique simplifiée du plasmide Ti.



À partir des informations présentées par ce document et de vos connaissances, dégagez les arguments permettant de justifier que la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* effectue un transfert naturel des gènes.

### ② Exploitation des données:

La galle du collet qui arrive chez certaines plantes est une manifestation d'une transformation génétique commençant par affecter l'ADN de ces plantes, suite à l'introduction dans leur génome d'un petit morceau d'ADN venant d'un plasmide du bacille *Agrobacterium tumefaciens*. Cette bactérie présente un plasmide appelé Ti (Tumor inducing) qui contient une région nommée ADN-T (ADN transféré). Ce dernier est injecté dans la plante hôte.

En réaction à l'injection de l'ADN-T, les cellules du végétal se multiplient et forment une tumeur qui libère dans le milieu des opines. Les bactéries présentes dans le sol près de la tumeur sont alors capables d'utiliser ces opines comme source d'azote, de carbone et d'énergie.

L'incorporation naturelle des gènes ADN-T au sein du matériel génétique des cellules végétales et leur expression permettent à ces cellules d'acquiescer deux nouvelles caractéristiques qui sont :

- ✓ La tuméfaction, due à une multiplication désorganisée des cellules végétales.
- ✓ La synthèse des opines nécessaire à la croissance des bactéries.

### ③ Conclusion:

Ainsi la bactérie *Agrobacterium* oriente l'activité de la cellule végétale à son profit. Elle réalise donc, naturellement, une transformation génétique d'un organisme végétal. Une fois ce mécanisme connu, ADN-T a été rapidement proposé, de le détourner dans un but de transgénèse (implanter un ou plusieurs gènes dans un organisme vivant). Pour cela, il « suffit » de remplacer l'ADN-T par un autre ADN portant un gène d'intérêt.

L'homme s'est inspiré de cette transformation génétique naturelle pour commencer en 1970 à faire les biotechnologies modernes basées sur l'ADN recombiné.

## II – Les techniques du génie génétique:

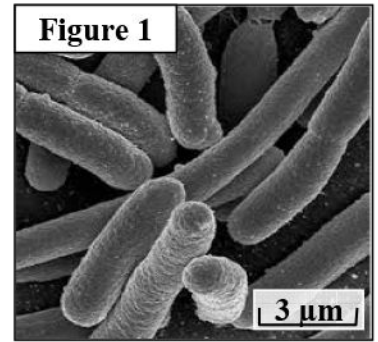
### ① Matériel biologique employé dans le génie génétique: (Voir document 2)

## Document 2: Matériel biologique employé dans le génie génétique:

### ★ La bactérie *Escherichia coli*:

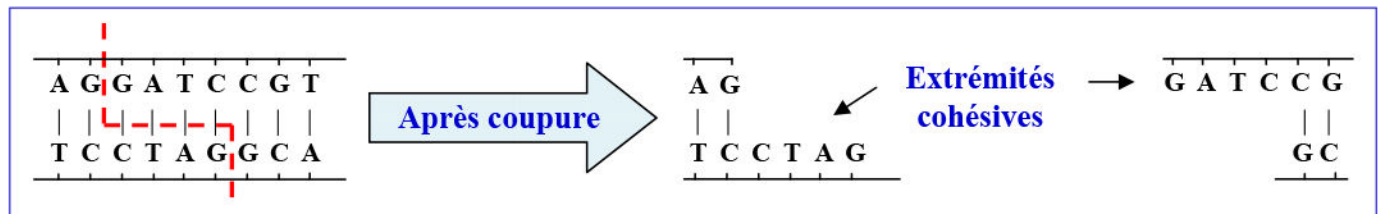
Le matériel biologique le plus utilisé dans le génie génétique, est la bactérie *Escherichia coli*, et ce pour deux raisons essentielles :

- ✓ Elle possède en plus de son unique chromosome, des plasmides
- ✓ Elle se reproduit très vite permettant d'obtenir rapidement plusieurs générations successives.
- ✓ Le cytoplasme de cette bactérie est riche en ribosomes, et possède tous les éléments nécessaires à la synthèse des protéines.



### ★ Les enzymes de restriction:

Ce sont des enzymes capables de couper l'ADN au niveau des sites précis, après avoir reconnu des séquences nucléotidiques bien déterminées. Ainsi une molécule d'ADN peut-être découpé en plusieurs fragments; les fragments de restriction.



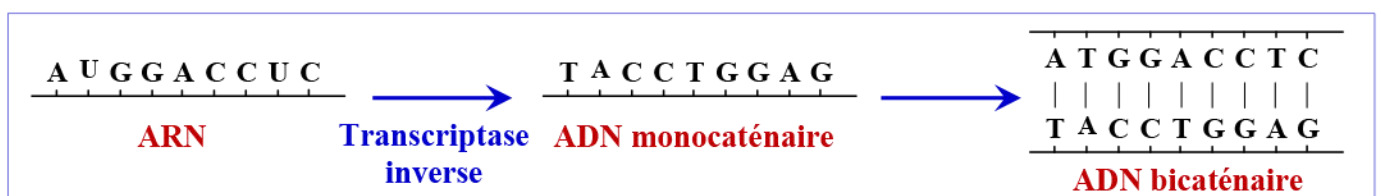
Enzyme	Source	Séquence reconnue	Coupure : //	Après coupure
<b>BamHI</b>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	5'GGATCC3' 3'CCTAGG5'	5'---G//GATCC---3' 3'---CCTAG//G---5'	
<b>HaeIII</b>	<i>Haemophilus aegyptius</i>	5'GGCC3' 3'CCGG5'	5'---GG//CC---3' 3'---CC//GG---5'	
<b>PstI</b>	<i>Providencia stuartii</i>	5'CTGCAG3' 3'GACGTC5'	5'---CTGCA//G---3' 3'---G//ACGTC---5'	
<b>EcoRI</b>	<i>Escherichia coli</i>	5'GAATTC3' 3'CTTAAG5'	5'---G//AATTC---3' 3'---CTTAA//G---5'	

### ★ Les ligases:

Ce sont des enzymes qui ont la propriété de coller ensemble des extrémités simples d'ADN, selon des séquences nucléotidiques bien déterminées.

### ★ La transcriptase inverse (ou rétro-transcriptase):

C'est un enzyme qui permet de convertir l'ARN en ADN. Le brin d'ADN résultant de cette réaction est appelé ADN complémentaire (ADNc).



### a) Bactérie *Escherichia coli* :

La bactérie *Escherichia coli* est le moyen le plus utilisé comme vecteur de gène d'une cellule à une autre, grâce à son plasmide qui intègre le gène qu'on veut transférer.

### b) Les enzymes de restriction:

Les enzymes de restriction sont des protéines qui reconnaissent et clivent l'ADN, selon des séquences nucléotidiques spécifiques.

Généralement un enzyme de restriction coupe les deux brins au niveau de deux points décalés. Ce qui donne des extrémités monocaténaires appelées « bout cohésif ».

Sous l'effet d'un enzyme de restriction, une longue molécule d'ADN est découpée en petits morceaux appelés les « fragments de restriction ».

### c) Les ligases:

Les ligases sont des enzymes qui sont capables de coller ensemble des fragments d'ADN, selon des séquences nucléotidiques spécifiques.

### d) La transcriptase inverse:

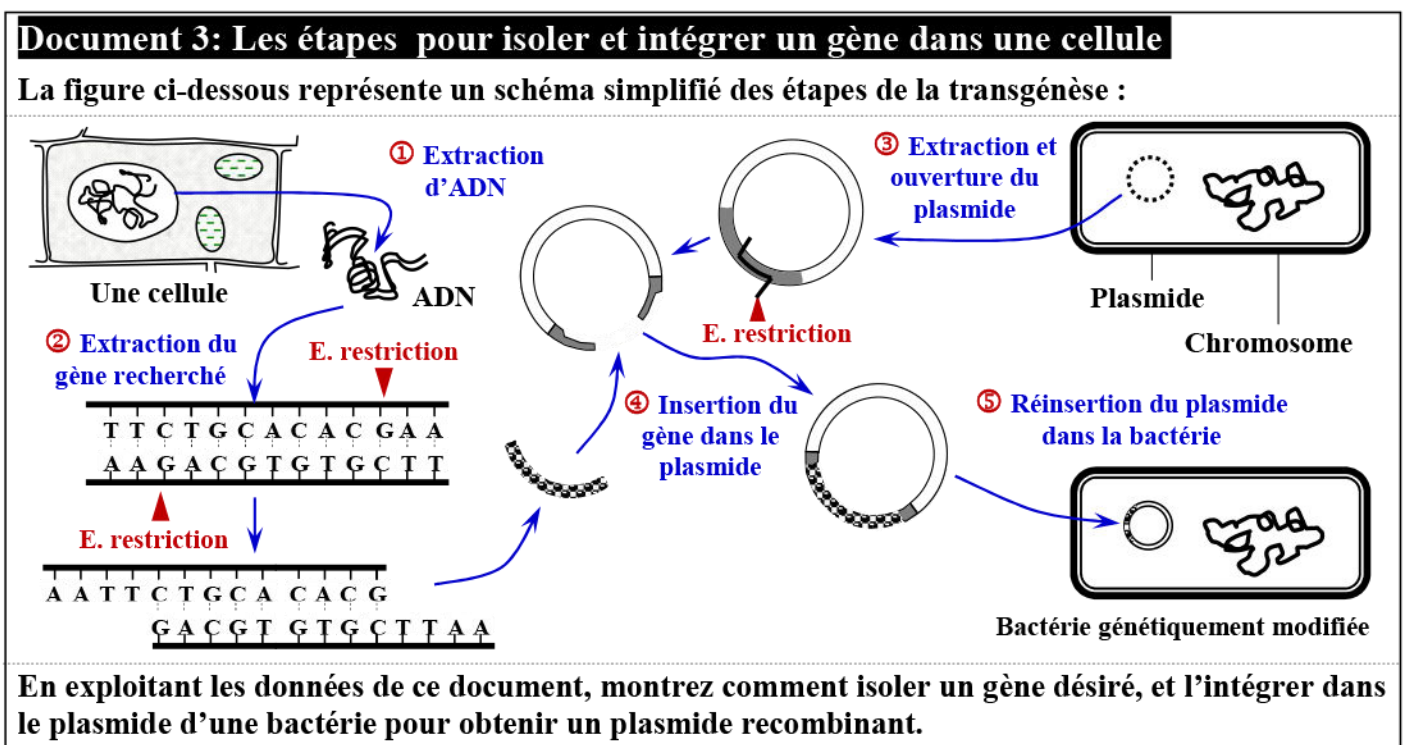
C'est une enzyme qui est impliquée dans le processus de conversion de l'ARN en ADN complémentaire (ADNc). Ce type d'enzyme est utilisé par les rétrovirus contenant de l'ARN.

## ② Les étapes du génie génétique:

Quel que soit l'objectif visé de la manipulation génétique, le transfert du gène, d'une cellule à l'autre, nécessite trois étapes essentielles qui sont :

- ✓ La recombinaison de l'ADN in vitro.
- ✓ Le clonage du gène.
- ✓ Criblage des clones transformants.
- ✓ L'expression du gène.

### a) Recombinaison de l'ADN in vitro: (Voir document 3)



La recombinaison consiste à isoler le gène désiré du chromosome d'une cellule et à l'insérer sur le plasmide bactérien. On obtient, alors, un plasmide recombinant.

Cette technique se déroule selon les étapes suivantes:

⇒ **1<sup>ère</sup> étape:** Isolement du gène désiré.

Le gène d'intérêt que l'on veut introduire dans une cellule, peut provenir de tout organisme vivant, plante, animal ou bactérie, puisque le code génétique est universel. Ce gène doit être isolé de l'organisme donneur, et cela se fait selon deux méthodes :

- ✓ On extrait le gène par l'intermédiaire des enzymes de restriction qui permettent de donner des fragments d'ADN avec des bouts cohésifs (bout unifiant).
- ✓ On utilise l'ARNm compatible au polypeptide qu'on veut produire: cet ARNm est transcrit en ADN complémentaire (ADNc), par l'intermédiaire de l'enzyme transcriptase inverse.

⇒ **2<sup>ème</sup> étape** ☺ : Greffage du plasmide par le gène désiré.

Le transfert des gènes vers d'autres organismes nécessite un vecteur capable de se transférer dans une cellule cible. Le vecteur utilisé dans ce cas est un plasmide. On procède à l'ouverture du plasmide avec des enzymes de restriction (souvent les mêmes utilisées pour la restriction du gène d'intérêt).

On mélange les plasmides ouverts et les fragments de restriction dans le même tube à essai en présence d'une ligase pour lier les fragments de restriction et les plasmides. L'appariement des bouts cohésif se fait spontanément. Ainsi on obtient des plasmides composés (Plasmide recombinant ou hybride).

Nous sommes maintenant en présence d'un plasmide contenant le «gène d'intérêt». Cependant, un plasmide ne peut pas cloner un gène par lui-même; il a besoin d'un système hôte pour faire des copies du plasmide (et ainsi, faire des copies du « gène d'intérêt »).

### **b) Clonage du gène désiré:**

Le clonage nécessite l'introduction du plasmide recombinant dans un système hôte, puis la mise en culture de cette bactérie dans un milieu favorable

Généralement on utilise comme hôte les bactéries E. coli sans plasmide. On rassemble donc les plasmides recombinants et des bactéries dans un milieu convenable, et on l'incite à se multiplier, formant ainsi des colonies sous forme de clones. Cela permet à certaines bactéries d'intégrer les plasmides recombinés.

Comment donc déterminer les bactéries qui ont incorporées le plasmide recombiné ?

### **c) Criblage des clones transformants (Isolement des transformants):**

L'identification du clone transformant exige l'utilisation de marqueurs de sélection. Les marqueurs de sélection sont associés au vecteur ou au fragment d'ADN à détecter.

★ **Criblage des bactéries transformant par l'utilisation des antibiotiques:**  
(Voir document 4)

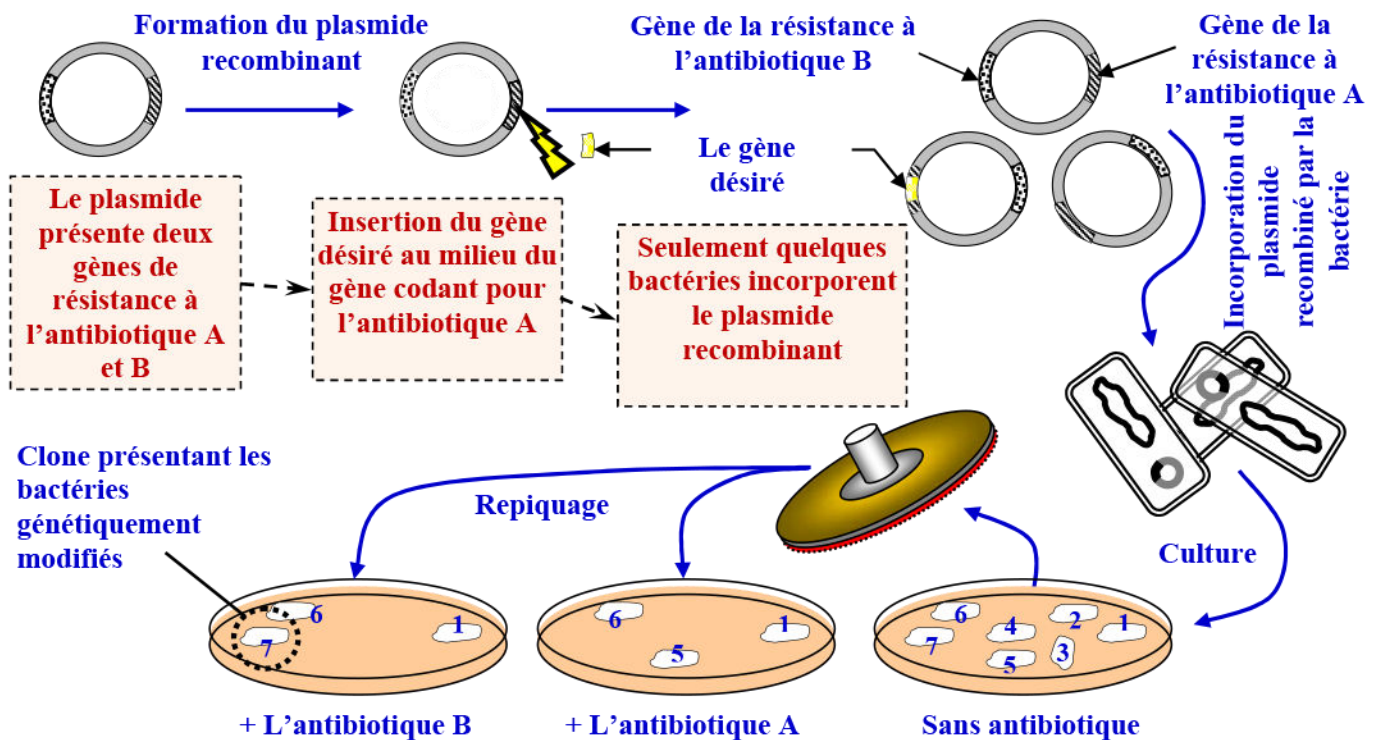
## Document 4: Criblage des bactéries transformant par les antibiotiques

Après le clonage du gène d'intérêt, ce ne sont pas toutes les bactéries qui intégreront les plasmides, alors les cellules doivent être sélectionnées afin d'identifier celles qui auront intégré les plasmides et celles qui ne l'auront pas fait.

Afin de déterminer les bactéries génétiquement modifiées, on utilise le caractère de la résistance aux antibiotiques. Les plasmides renferment généralement des gènes qui favorisent la résistance aux antibiotiques (la pénicilline, l'ampicilline, etc.).

Le principe de cette technique est la culture de bactéries dans des milieux qui contiennent des antibiotiques, puis analyser les résultats obtenus dans chaque milieu de culture, pour déterminer les clones contenant le gène désiré.

Le document ci-dessous décrit les circonstances et les résultats de ces expériences:



Que peut-on déduire de l'analyse des résultats de cette expérience ?

Le plasmide utilisé dans cet expérience est caractérisé par la présence de deux gènes: A (résistance à l'antibiotique A) et B (résistance à l'antibiotique B).

On constate que le gène désiré s'intègre au sein du gène responsable de la résistance aux antibiotiques A.

Après son intégration du gène désiré, le plasmide perd le gène A sans perdre le gène B, donc les bactéries portant le plasmide modifiés, seront sensibles à l'antibiotique A et résistantes à l'antibiotique B.

Une fois la transformation réalisée, on doit d'abord sélectionner les bactéries ayant reçu le plasmide recombinant. Pour ce faire, on ajoute des antibiotiques au milieu de culture.

- ⇒ Dans un milieu de culture contenant l'antibiotique A, seules les bactéries non transformées, ayant préservées le gène de résistance à l'antibiotique A, pourront se développer (clone 1, 5 et 6). Par contre les bactéries ayant intégrées le gène désiré disparaissent, car elles deviennent sensibles à l'antibiotique A (clone 2, 3, 4 et 7).

- ⇒ Dans un milieu de culture contenant l'antibiotique B, seules les bactéries résistantes à l'antibiotique B, pourront se développer (clone 1, 6 et 7). Par contre les bactéries ne présentant pas le gène B disparaissent.

Les bactéries génétiquement modifiées seront alors résistantes à l'antibiotique B, sensibles à l'antibiotique A et sont donc des bactéries du clone 7.

- ★ **Criblage des bactéries transformant par l'utilisation des sondes radioactives:** (Voir document 5)

**Document 5: Criblage des bactéries transformant par les sondes radioactives**

Les sondes radioactives sont des molécules d'ADN monocaténaire contenant des atomes radioactifs, ayant une séquence complémentaire à une partie du gène recherché. Le schéma ci-dessous présente les étapes de criblage par sondes radioactives:

En se basant sur les données de ce document décrire les étapes de cette technique.

La technique de criblage par les sondes radioactives se fait selon les étapes suivantes:

- ⇒ On transfère les bactéries sur une membrane de nylon ou de nitrocellulose (en déposant tout simplement la membrane sur la boîte de Pétri).
- ⇒ On fait chauffer puis tremper la membrane dans une solution contenant des sondes radioactives. En diminuant la température, les sondes pourront se fixer sur la partie de l'ADN ayant une séquence complémentaire, c'est ce que l'on nomme hybridation.
- ⇒ Un rinçage permet de retirer les sondes qui ne se seront pas hybridées.
- ⇒ Comme les sondes contiennent des atomes radioactifs, on peut procéder à une autoradiographie. C'est-à-dire que l'on dépose la membrane sur un film radiographique pendant quelques jours dans le congélateur puis on développe le film. Les atomes radiographiques réagiront avec le film ce qui permettra d'identifier les colonies contenant le gène recherché.

**Remarque:**

Au moment du clonage, pour isoler le gène désiré, on peut utiliser la technique d'électrophorèse (Voir document 6).

## Document 6: L'électrophorèse pour isoler le gène désiré

L'électrophorèse est utilisée en biologie moléculaire pour la séparation des acides nucléiques ou des protéines (Voir figure 1).

Cette technique est basée sur le déplacement de molécules ioniques sous l'effet d'un champ électrique. Les molécules anioniques (chargées négativement) migrent vers la cathode et les molécules cationiques (chargées positivement) se déplacent vers l'anode. L'ADN est une molécule chargée négativement qui se déplacera donc vers la cathode. Les plus petites molécules pourront plus facilement se frayer un chemin dans le gel d'agarose et migreront plus loin. Les plus grosses molécules resteront plus près des puits.

Les fragments d'ADN résultant de l'action des enzymes de restriction sont soumis à l'électrophorèse, puis à l'action des sondes radioactives. Les résultats obtenus sont présentés par un électrophorègramme (Voir figure 2).

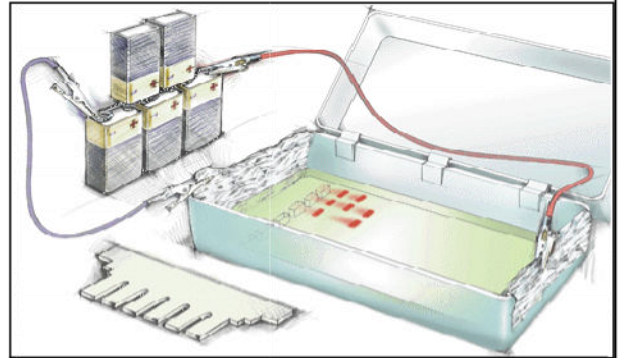


Figure 1: Dispositif d'électrophorèse

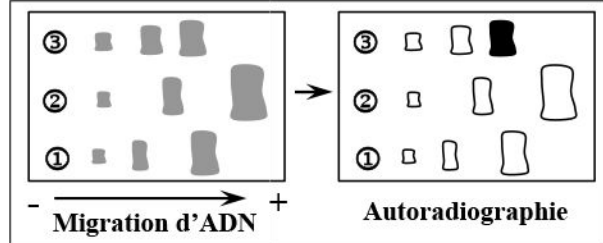


Figure 2: Électrophorègramme

L'isolement du gène désiré se fait selon les étapes suivantes:

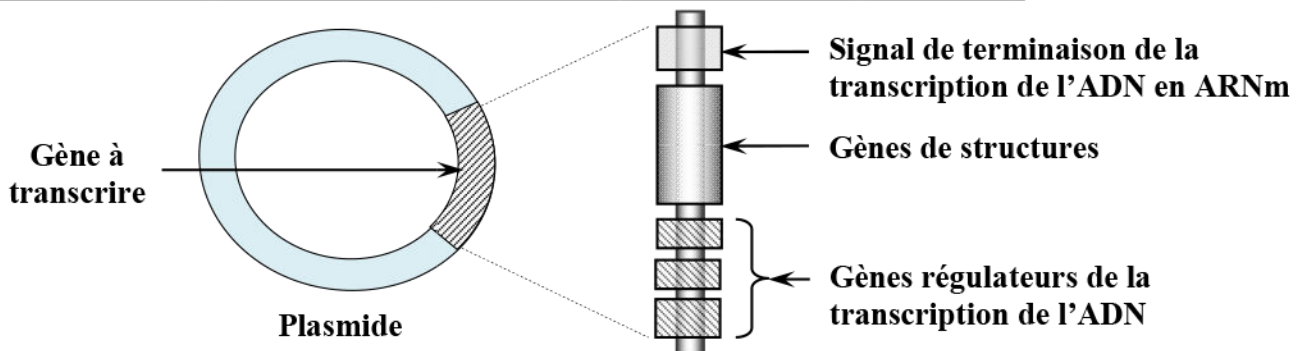
- ✓ L'électrophorèse permet de séparer les fragments de restriction selon leur taille. On peut donc les déterminer par comparaison avec la migration de fragments de taille connue (Fragments étalons).
- ✓ Séparation des deux brins d'ADN par la soude.
- ✓ Addition des sondes radioactives.
- ✓ Repérer les fragments d'ADN hybrides par autoradiographie.

### d) Expression du gène désiré:

Pour que le gène intégré dans le plasmide, s'exprime dans la cellule hôte, celui-ci doit être entouré d'un système de contrôle. Ce système est constitué de séquences de gènes régulateurs et de gènes de structure, que la cellule hôte devra reconnaître.

Le système de contrôle permet de connaître les signaux d'initiation de la transcription de l'ADN du gène suivie de l'élongation et de la terminaison de l'ARNm (Document 7).

## Document 7: Système de contrôle de l'expression d'un gène désiré



## III – Quelques domaines d'application du génie génétique:

① Production industrielle de l'insuline: (Voir document 8)



## Document 8: Production industrielle de l'insuline

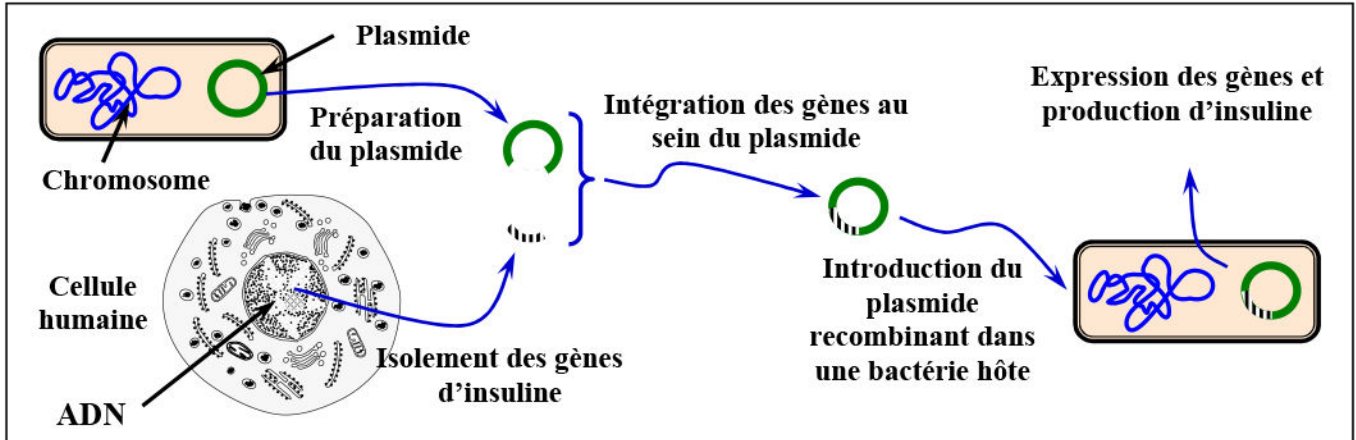
L'insuline est une hormone peptidique synthétisée par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas. Cette hormone est constituée de 51 acides aminés répartis, sur deux chaînes (A) et (B) reliées entre elles par des ponts disulfures.

L'insuline est une hormone hypoglycémiante, produite par le pancréas. Sa production insuffisante entraîne le diabète.

A partir de 1978, l'insuline est extraite des cellules des porcs et des vaches. Désormais, l'utilisation de cette insuline d'origine animale provoque des effets secondaires tels que l'allergie.

Aujourd'hui, les diabétiques disposent d'insuline humaine produite par génie génétique.

La figure ci-dessous présente les étapes de synthèse de l'insuline par génie génétique.



En exploitant les données de ce document, décrire les étapes de la production d'insuline par génie génétique.

L'insuline est une hormone utilisée pour le traitement des diabètes. Le génie génétique a permis de produire de l'insuline humaine à partir de bactéries génétiquement modifiées, à travers la stratégie expérimentale suivante :

### a) Isolement du gène de l'insuline :

L'ARNm codant pour la synthèse des deux chaînes peptidiques A et B de l'insuline, est isolé des cellules du pancréas. Par utilisation de la transcriptase inverse, on obtient de l'ADNc puis avec la polymérase, de l'ADNc bicaténaire, qui est le gène codant pour l'insuline.

### b) Préparation d'un vecteur de clonage :

Le plasmide pBR322 portant les gènes de résistance à l'ampicilline et à la tétracycline est choisi comme vecteur de clonage. Le gène de résistance à la tétracycline contient un site de 6 bases reconnu par l'enzyme de restriction Bam HI. On intègre les gènes de l'insuline au sein de ce plasmide.

### c) Préparation de la cellule hôte :

Le plasmide recombinant est introduit dans une bactérie sans plasmide. La souche choisie est E. coli K<sub>12</sub> initialement sensible à la tétracycline et à l'ampicilline.

### d) Sélection des clones porteurs des gènes d'insuline :

Le plasmide recombinant perd la résistance à la tétracycline. Ainsi, les colonies bactérienne capable de se développer sur un milieu contenant de l'ampicilline sont des bactéries ayant intégrées le

plasmide Par réplique (à l'aide d'un papier buvard) sur un milieu contenant de la tétracycline, on repère alors les colonies d'E. coli qui sont à la fois résistante à l'ampicilline et sensible à la tétracycline; Ces dernières sont alors celles qui ont intégrées le plasmide transformé avec le gène de la insuline.

### e) Vérification de la production de l'insuline :

Il faut ensuite vérifier que les clones sélectionnés produisent bien de l'insuline. Pour cela, on applique sur les clones choisis une membrane sur laquelle ont été fixés des anticorps capables de reconnaître l'insuline. A l'aide d'un second anticorps marqué (méthode indirecte), on détecte alors les clones bactériens capables de produire l'insuline.

### f) Expression des gènes d'insuline :

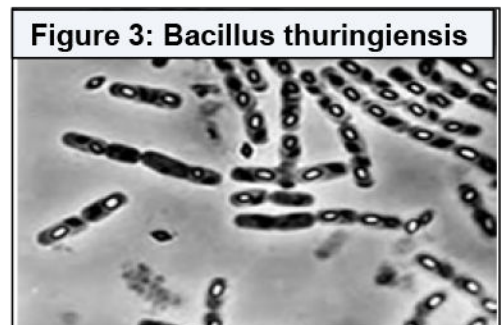
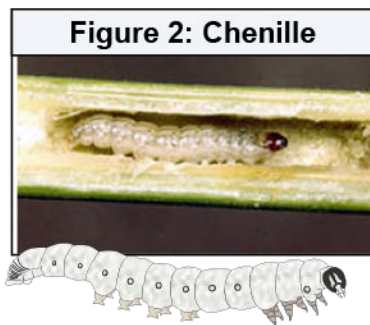
Les clones sélectionnés sont mis à cultiver à grande échelle. Le produit obtenu est purifié. L'insuline est ensuite analysée et testée sur les animaux.

## ② Lutte contre les insectes nuisibles en agriculture: (Voir document 8)

### Document 9: Lutte contre les insectes nuisibles en agriculture

La pyrale du maïs est un papillon nocturne (Figure 1). La femelle pond ses œufs à l'aisselle des feuilles du maïs. Après éclosion, les chenilles (Figure 2) pénètrent dans la plante et provoquent des dégâts importants: sensibilité à la casse des canes, affaiblissement physiologique des plantes (canaux de sève endommagés), risque de chute d'épis avant récolte.

Les chercheurs ont découvert une protéine toxique, capable de détruire les chenilles de la pyrale, mais inoffensif pour les vertébrés. Le gène qui code pour cette protéine se trouve d'une façon naturelle, dans le programme génétique de la bactérie *Bacillus thuringiensis* (Figure 3).

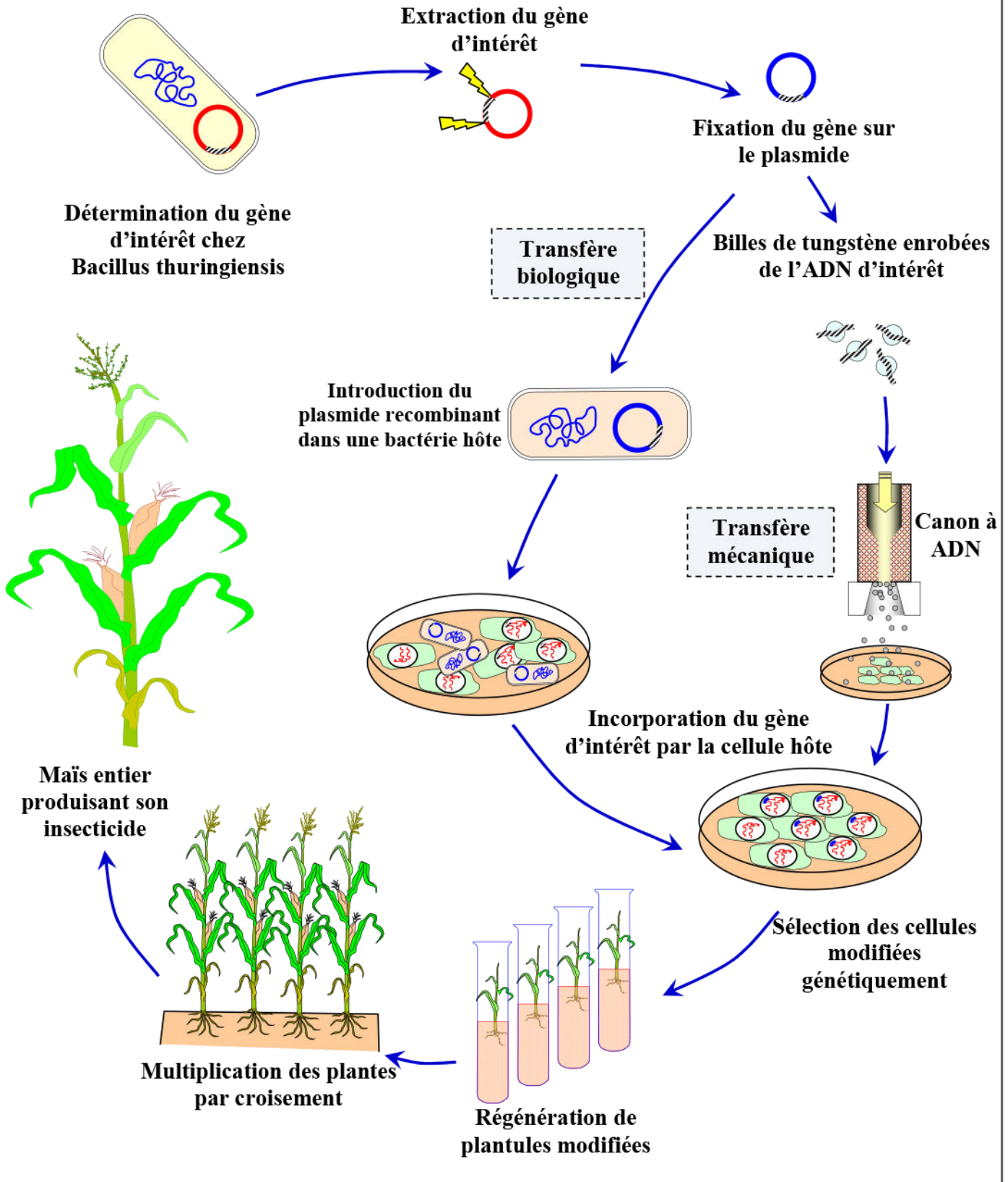


Grâce aux techniques du génie génétique, on a pu produire des plantes génétiquement modifiées résistantes aux chenilles. Ces plantes sont capables de sécréter la protéine toxique pour les chenilles.

La figure du document 10 présente un schéma résumant les étapes de la transgénèse par biolistique, ou méthode du « canon à ADN ».

En exploitant les données du document 9 et 10, décrire les étapes de la transgénèse permettant d'obtenir une plante de maïs résistante à la pyrale.

# Document 10: Les étapes de la transgénèse chez le maïs



La transgénèse dans ce cas peut être réalisée soit en isolant un gène bénéfique et l'incorporer au sein d'un vecteur biologique, soit en utilisant la technique de bombe ou canon à ADN (Biolistique).

La transgénèse permettant d'obtenir une plante de maïs résistante à la pyrale, se fait selon les étapes suivantes :

- 1- Extraction du gène qui code pour la protéine toxique, à partir des cellules de la bactérie *Bacillus thuringiensis*.
- 2- Extraction d'un vecteur biologique. Généralement le plasmide Ti de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*. Ensuite on incorpore au sein du plasmide, le gène qui code pour la protéine toxique.
- 3- Intégration du plasmide génétiquement modifié dans des cellules végétales que l'on veut modifier, de deux manières:

⇒ **Mécanique par biolistique (Canon à ADN):**

Le principe du canon à ADN consiste à projeter sur le tissu à transformer de toutes petites billes d'or ou de tungstène enrobés d'ADN. Ces billes projetées ont suffisamment d'énergie cinétique pour traverser la paroi et la membrane des cellules sans leur infliger de dommages irréparables.

⇒ **Chimique par un vecteur biologique:**

Les bactéries *Agrobacterium tumefaciens*, qui portent le plasmide modifié, sont introduites dans un milieu qui contient des protoplastes du végétal que l'on veut modifier (Des cellules sans paroi, non jointives). L'*Agrobacterium tumefaciens* parasite spontanément les protoplastes. Ainsi elles insèrent dans ces cellules, les gènes de la protéine toxique.

- 4- Les protoplastes se multiplient dans le cadre de la culture in vitro. Ainsi on obtient un grand nombre de plantules génétiquement modifié.