

Génie génétique

I. DÉFINITION

L'expression génie génétique ou la technologie de l'ADN recombinant s'applique à la recombinaison de l'ADN *in vitro*, puis au transfert de l'ADN recombinant dans un hôte approprié qui en assure sa réplication, voir son expression.

Génie génétique

II. OBJECTIFS

Le génie génétique a principalement trois buts :

- 1- Obtenir de grandes quantités d'un ou plusieurs gènes pour en analyser la séquence, l'organisation, la régulation, etc
- 2- Obtenir à grande échelle l'expression d'un gène dont le produit est particulièrement intéressant (enzyme, hormone, antigène pour vaccin, etc.
- 3- Modifier le phénotype d'un organisme vivant (cellule, animal, végétale, virus) en leur insérant un gène provenant d'un autre organisme.

Génie génétique

III. APPLICATIONS

- Production de vaccins vivants
- Production de plantes résistantes à des insectes ou à des pesticides
- Production d'animaux transgéniques comme modèles de maladies humaines
- Thérapie génique

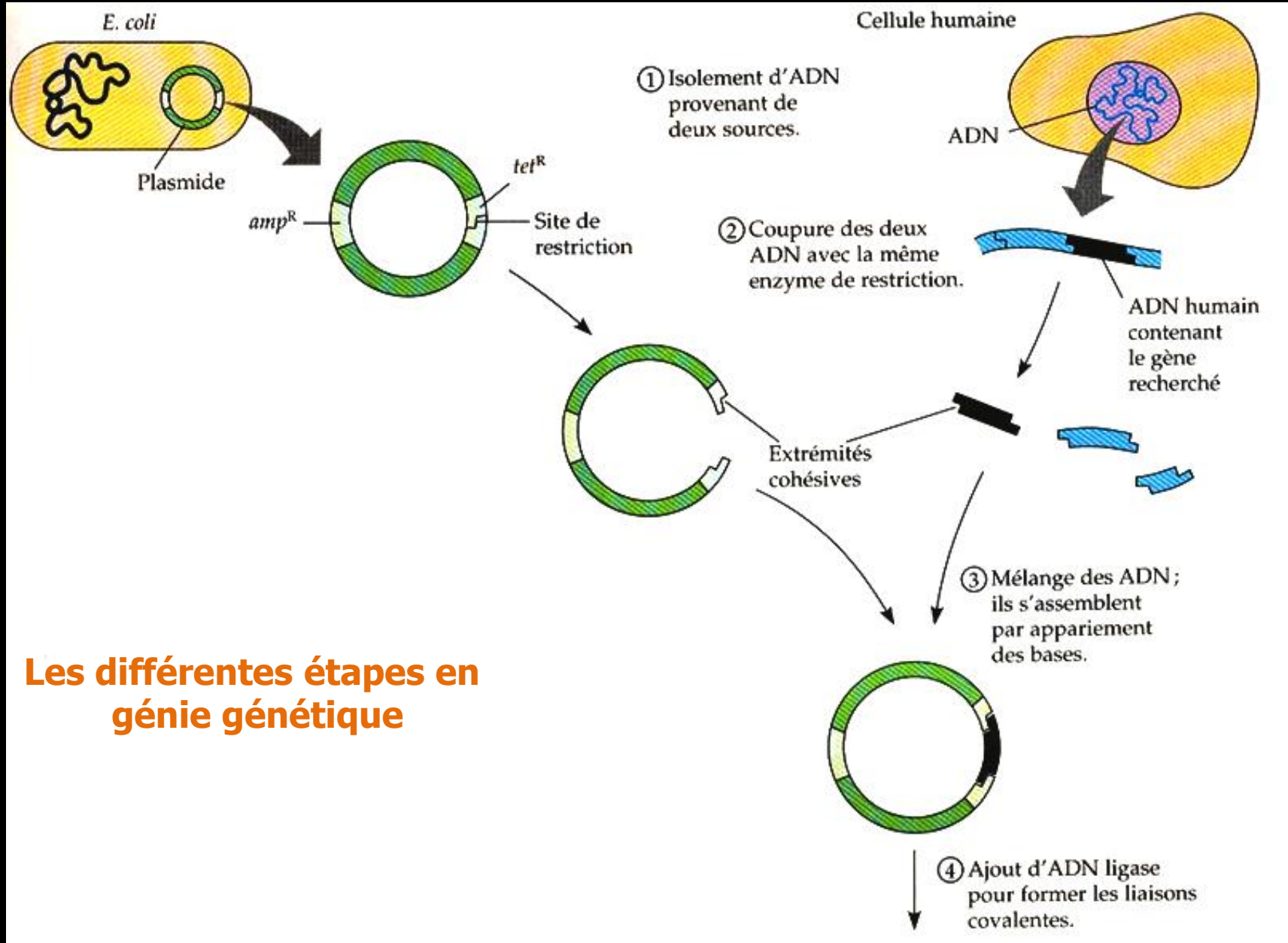
Génie génétique

III. METHODOLOGIE

Le clonage de gènes est à la base du génie génétique. Il implique :

- L'isolement et la fragmentation de la source de l'ADN et l'insertion des fragments d'ADN dans un vecteur (plasmides, ADN de phages ou de virus etc.)
- L'incorporation de l'ADN recombinant dans une cellule hôte capable d'assurer la réplication du vecteur
- La détection et l'isolement du clone cellulaire contenant le gène intéressant

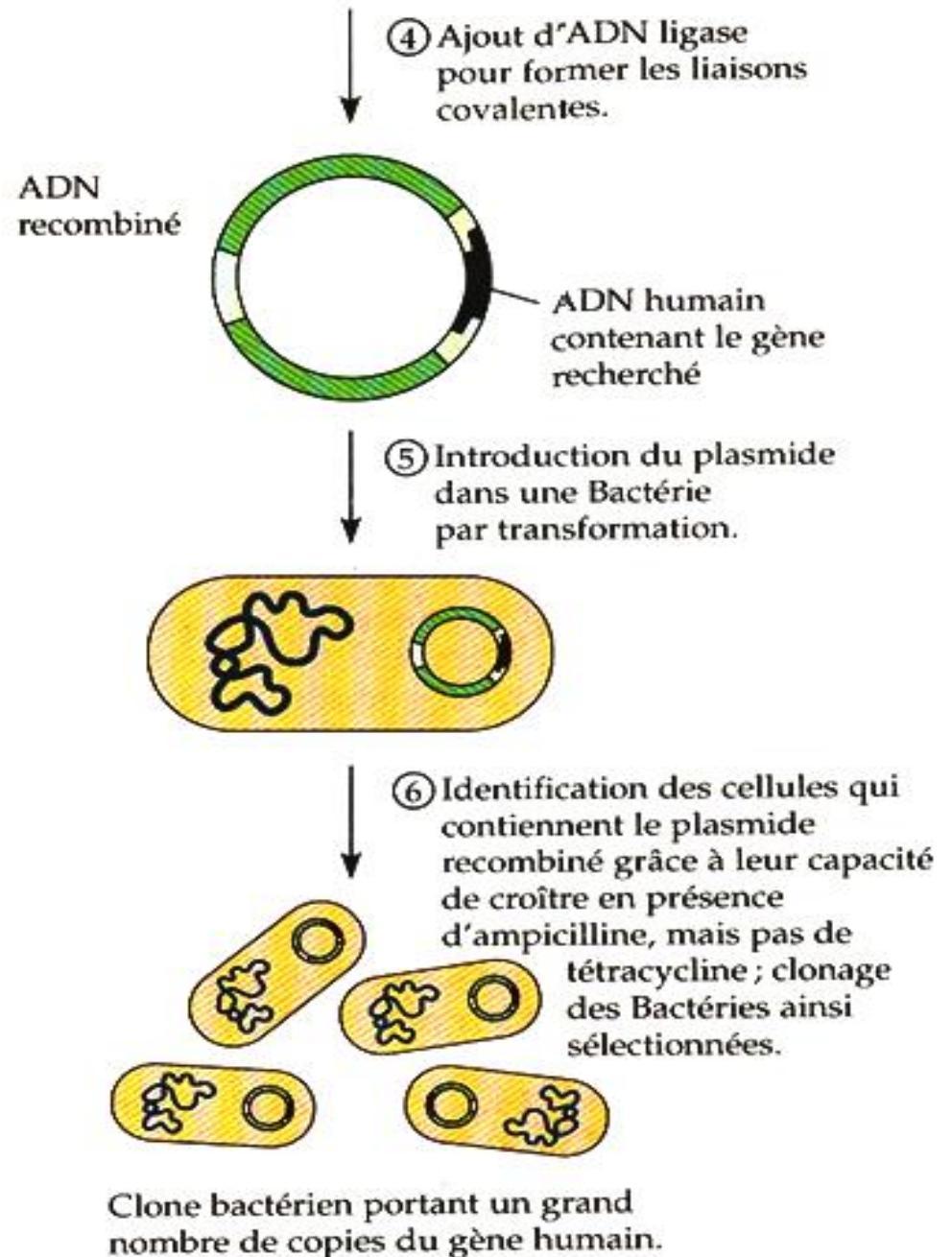
Génie génétique



Les différentes étapes en génie génétique

Génie génétique

Les différentes étapes en
génie génétique

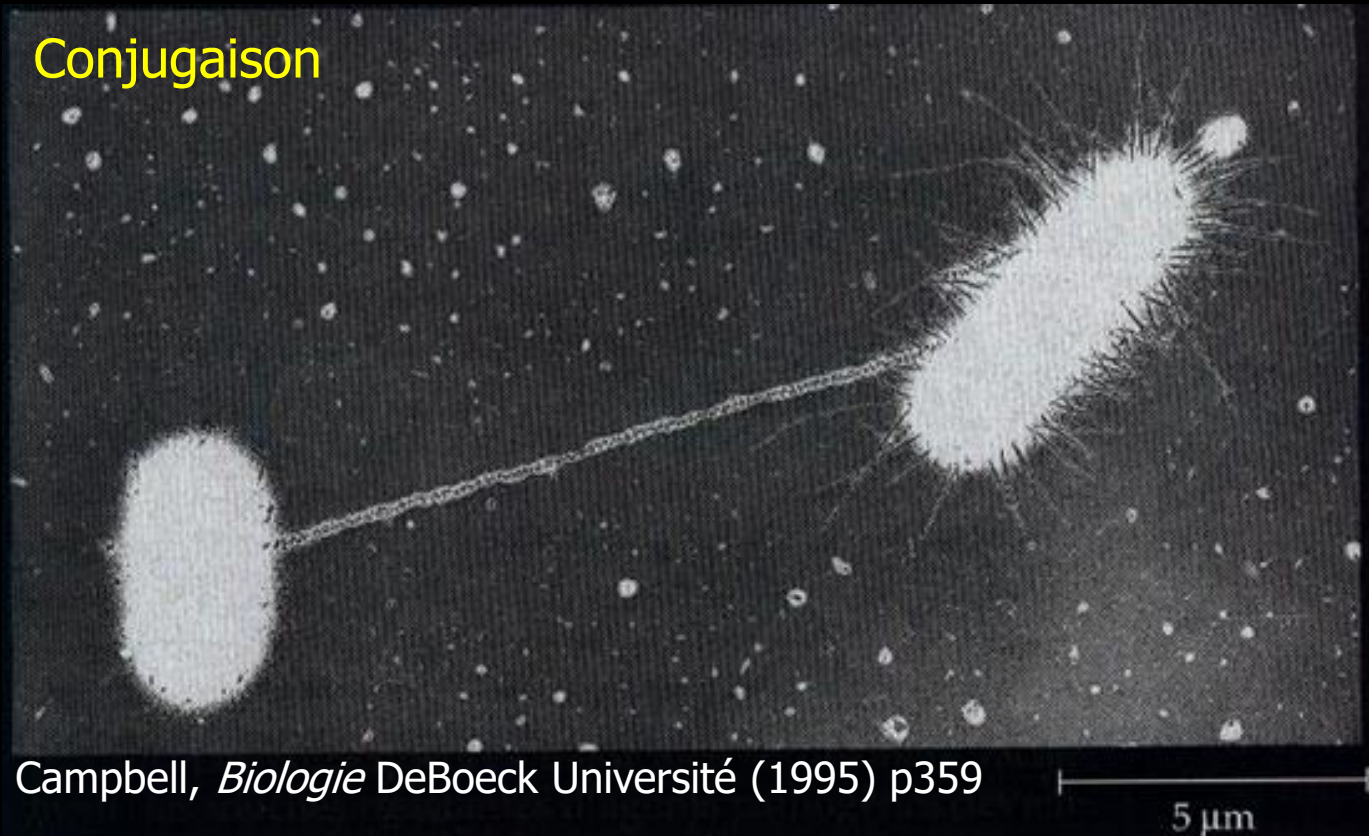


Génie génétique

Développement du génie génétique

Le génie génétique s'est développé grâce aux progrès réalisés dans les domaines de la microbiologie et de l'enzymologie

Conjugaison



Campbell, *Biologie* DeBoeck Université (1995) p359

5 μm

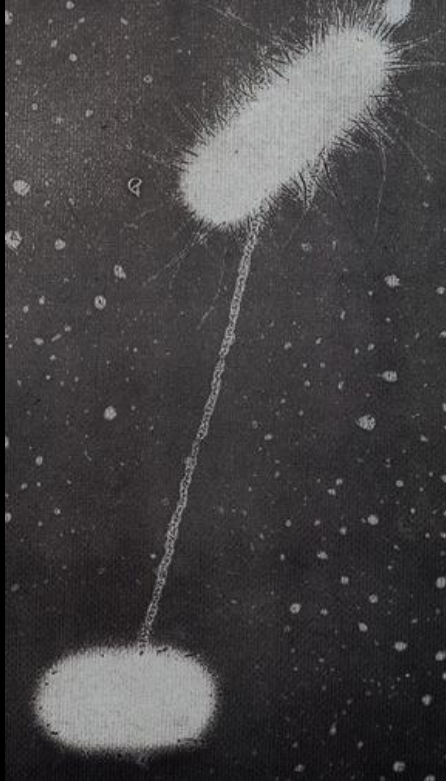
Le « mâle » *d'E. coli* montre des pili, dont un pilus sexuel qui se joint à une cellule « femelle ». Le pilus sexuel tubulaire établit une jonction cytoplasmique à travers laquelle le « mâle » transmettra de l'ADN à la « femelle ».

Génie génétique

Développement du génie génétique

Le génie génétique s'est développé grâce aux progrès réalisés dans les domaines de la microbiologie et de l'enzymologie

Conjugaison



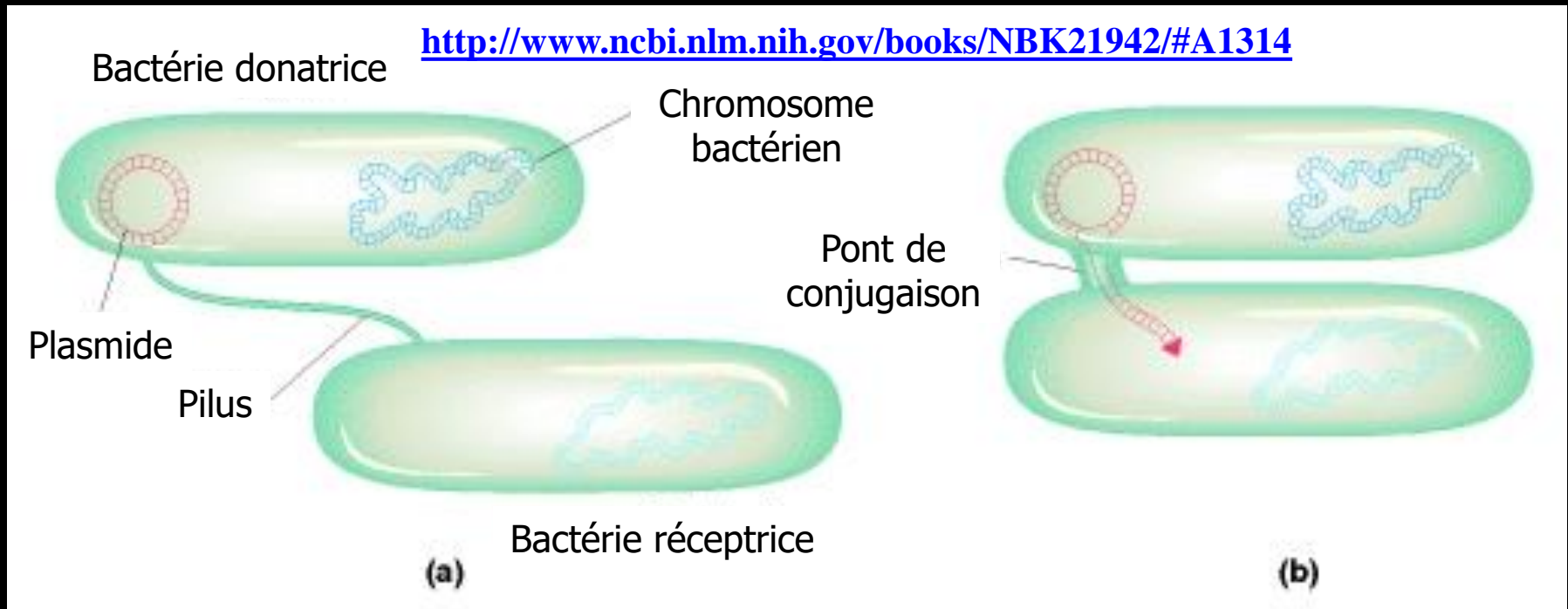
Pont cytoplasmique
permettant
l'échange de
matériel génétique

Génie génétique

Développement du génie génétique

Le génie génétique s'est développé grâce aux progrès réalisés dans les domaines de la microbiologie et de l'enzymologie

Conjugaison



Le schéma montre un transfert en cours : passage d'un monobrin avec réplication chez le donneur et l'accepteur. Il ne montre pas le résultat final : la bactérie donatrice reste F+ et la receveuse devient F+ (le monobrin qui passe et se réplique est recircularisé en plasmide F complet, fonctionnel).

Génie génétique

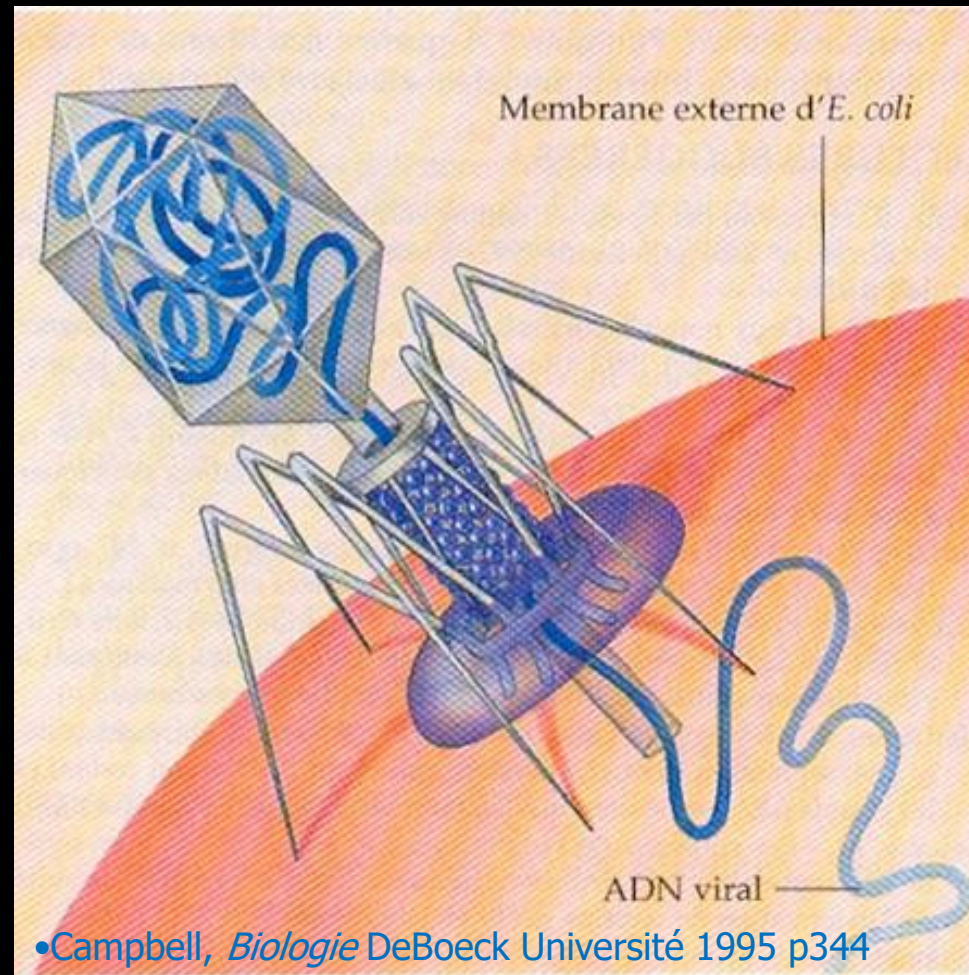
Développement du génie génétique

Le génie génétique s'est développé grâce aux progrès réalisés dans les domaines de la microbiologie et de l'enzymologie

Transduction

Figure 17.1

Virus injectant son ADN dans une bactérie. Ce schéma représente la première étape de l'un des phénomènes biologiques les plus remarquables : l'assujettissement génétique d'une cellule par un Virus. L'infection débute lorsque le Virus injecte son ADN dans la cellule hôte. Dans le cas présenté ici, la cellule est la Bactérie *E. coli* et le Virus est un Bactériophage T4. C'est en étudiant les Virus et les Bactéries que les biologistes ont entrevenu pour la première fois la subtilité des mécanismes moléculaires de l'hérédité.

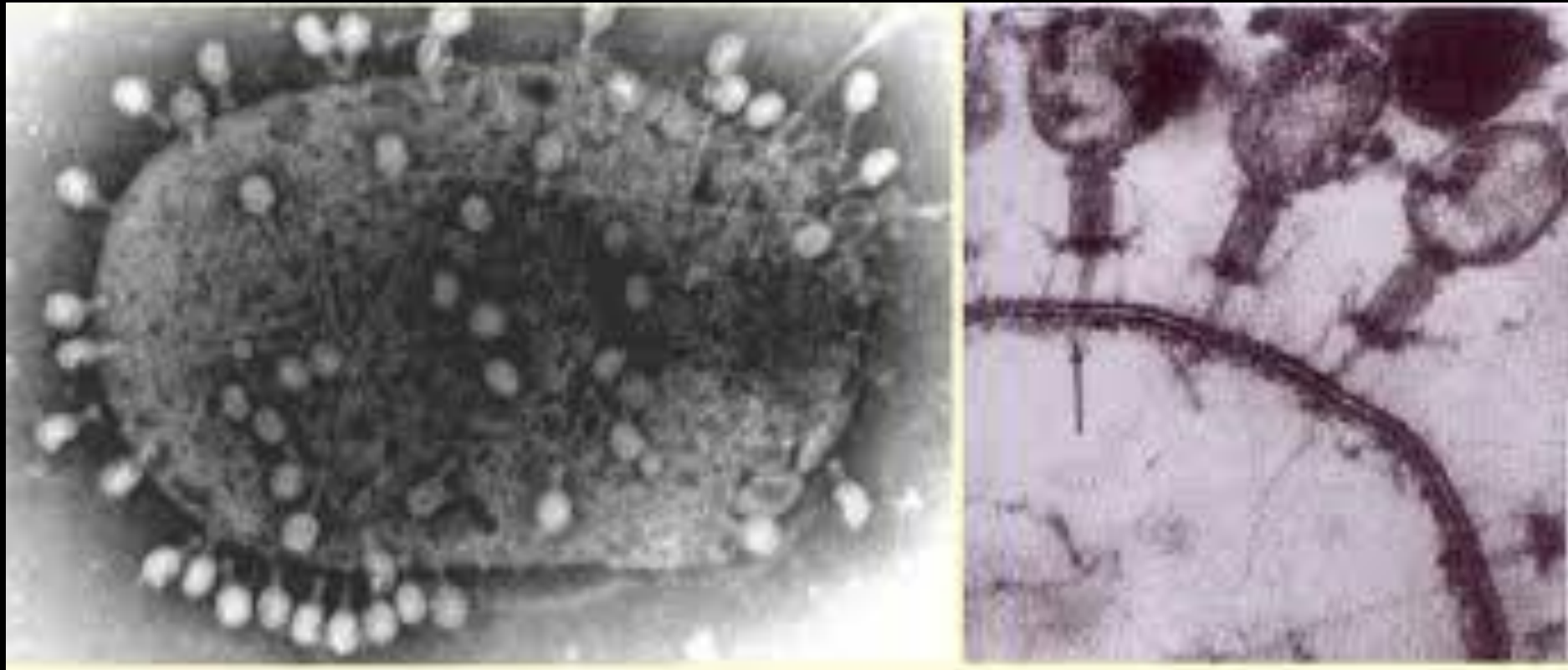


Génie génétique

Développement du génie génétique

Le génie génétique s'est développé grâce aux progrès réalisés dans les domaines de la microbiologie et de l'enzymologie

Transduction

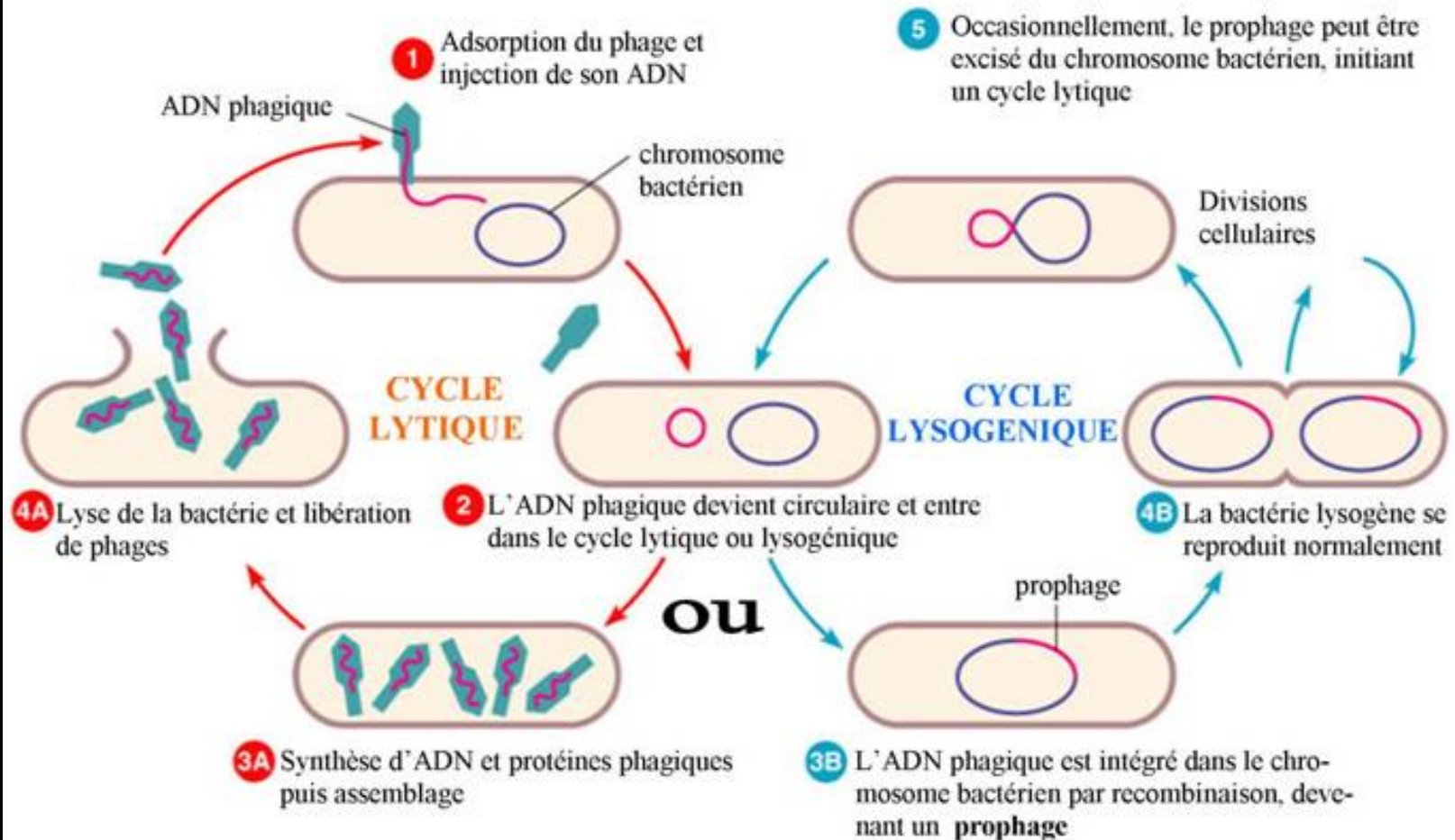


Génie génétique

Développement du génie génétique

Le génie génétique s'est développé grâce aux progrès réalisés dans les domaines de la microbiologie et de l'enzymologie

Transduction

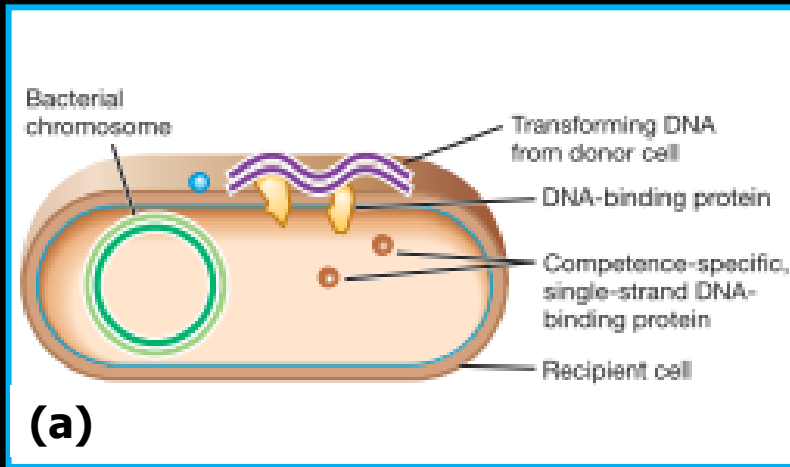


Génie génétique

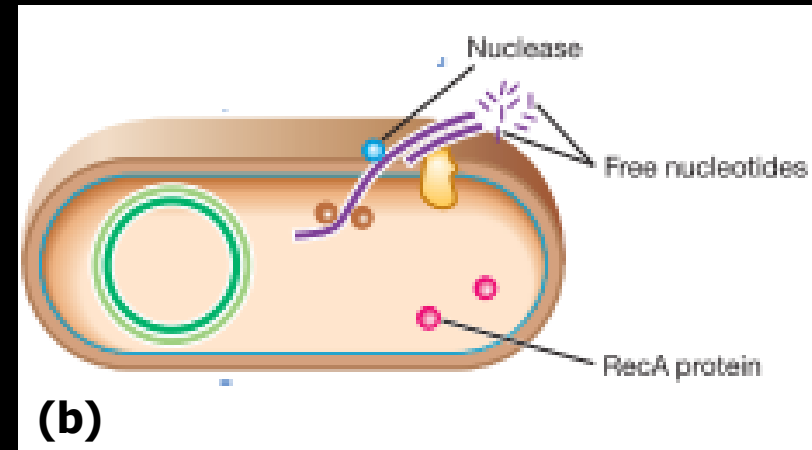
Développement du génie génétique

Le génie génétique s'est développé grâce aux progrès réalisés dans les domaines de la microbiologie et de l'enzymologie

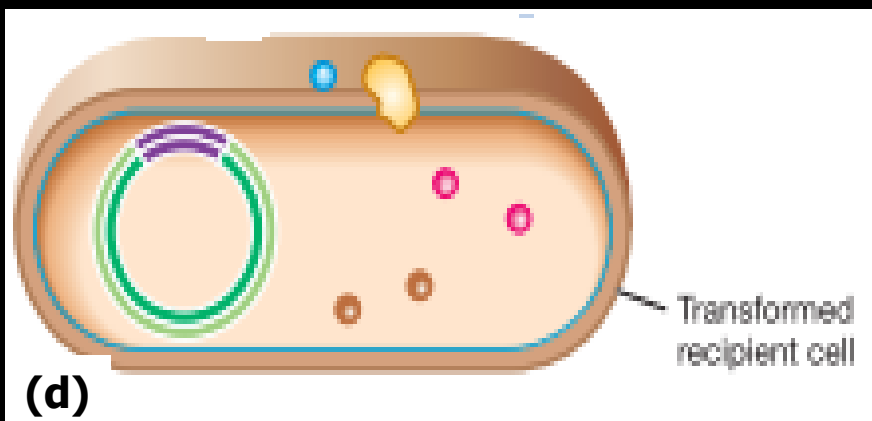
Transformation



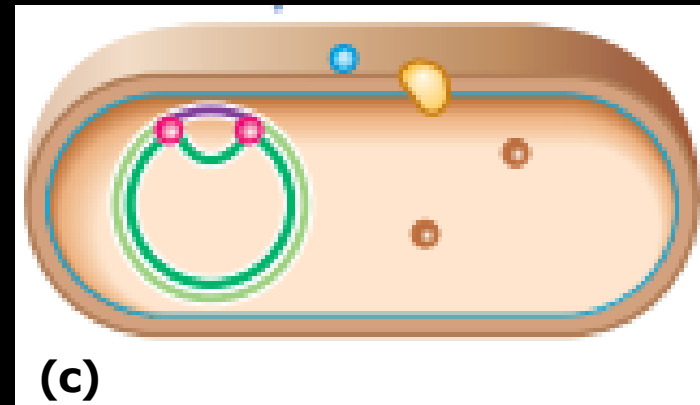
Binding
DNA



Uptake of DNA



RecA-mediated
homologous
recombination



Génie génétique

Développement du génie génétique

Le génie génétique s'est développé grâce aux progrès réalisés dans les domaines de la microbiologie et de l'enzymologie

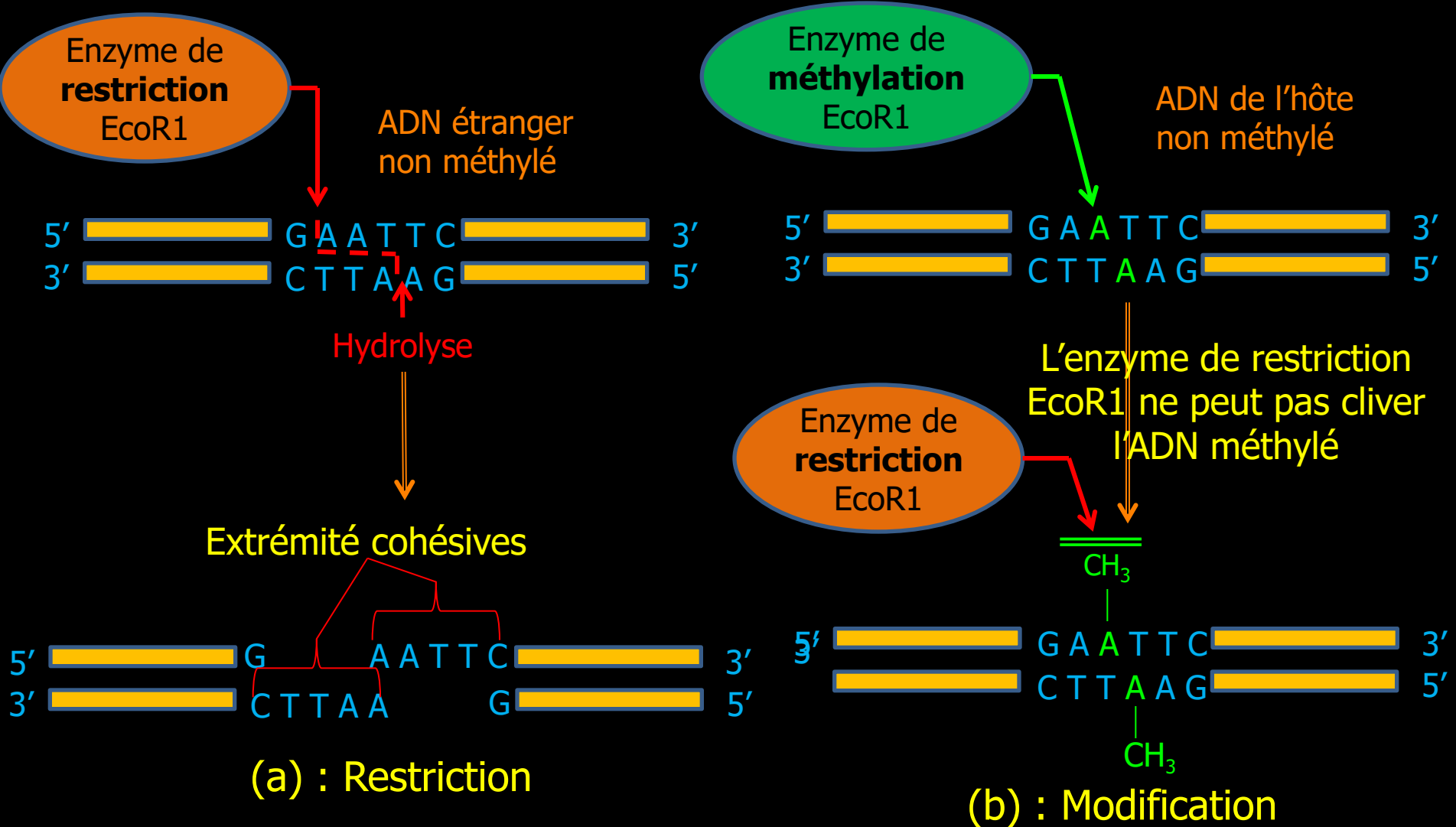
Enzymes agissant sur les acides nucléiques

La polynucléotide kinase, la terminal transferase, la phosphatase alcaline, la DNA polymérases, la reverse transcriptase, la RNA polymérases, la poly(A) polymérase, la DNA ligases, la RNA ligase, la topoisomérase, les enzymes de restriction, les ribonucléases (A, T1, H), les désoxyribonucléases, la protéinase K, la β -galactosidase.

Génie génétique

Développement du génie génétique

Le génie génétique s'est développé grâce aux progrès réalisés dans les domaines de la microbiologie et de l'enzymologie



Génie génétique

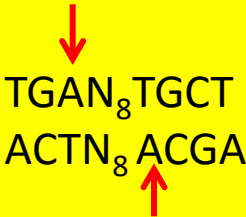


Les enzymes de restriction

- Les endonucléases de restriction sont des enzymes bactériennes participant à un mécanisme de défense des bactéries vis-à-vis des virus : système de restriction-modification.
- Elles catalysent la coupure de l'ADN non méthylé en des endroits caractérisés par une séquence spécifique de nucléotides (site de restriction). Les produits de cette digestion sont les fragments de restriction, dont la longueur, toujours la même pour un ADN donné, ne dépend que de la séquence primaire de cet ADN.

Génie génétique

Les enzymes de restriction

Il existe trois types isolés des bactéries

	Type 1	Type II	Type III
Exemple	EcoB	EcoRI	EcoPI
Site de reconnaissance	TGAN ₈ TGCT	GAATTC	AGACC
Site d'action (clivage)	Environ 1kb après le site de reconnaissance	Entre G et A (des deux brins)	24-26 pb 3' au site de reconnaissance
Site de méthylation	 TGAN ₈ TGCT ACTN ₈ ACGA	 GAATTC CTTAAG	 AGACC Un seul brin méthylé
Nucléase et méthylase sur la même enzyme	Oui	Non	Oui
Besoin pour le clivage	ATP, Mg ²⁺ , S-AdoMet	Mg ²⁺ , Mn ²⁺	Mg ²⁺ , S-AdoMet
Besoin pour la méthylation	ATP, Mg ²⁺ , S-AdoMet	S-AdoMet	Mg ²⁺ , S-AdoMet

S-AdoMet : S-adénosyle-méthionine

Génie génétique

Les enzymes de restriction

- L'analyse de la longueur des fragments de restriction, à la recherche de variations individuelles (polymorphismes de longueur des fragments de restriction = RFLP) est une des techniques d'analyse de la séquence primaire de l'ADN à la recherche de substitutions, d'insertions ou de délétions qui modifient le nombre de sites de restriction et donc la longueur des fragments de restriction.
- Le type II est le plus utilisé car le site de reconnaissance est lui-même le site de coupure,
- Les extrémités des fragments de restriction peuvent être formées de deux brins d'égale longueur (bouts francs) ou bien présenter un brin plus long que l'autre de quelques nucléotides (bouts collants).

Génie génétique

Les enzymes de restriction

HpaI



← bouts francs

EcoRI



HindIII



PstI



bouts collants
(cohésifs)

Génie génétique

Les enzymes de restriction

Nomenclature des enzymes de restriction

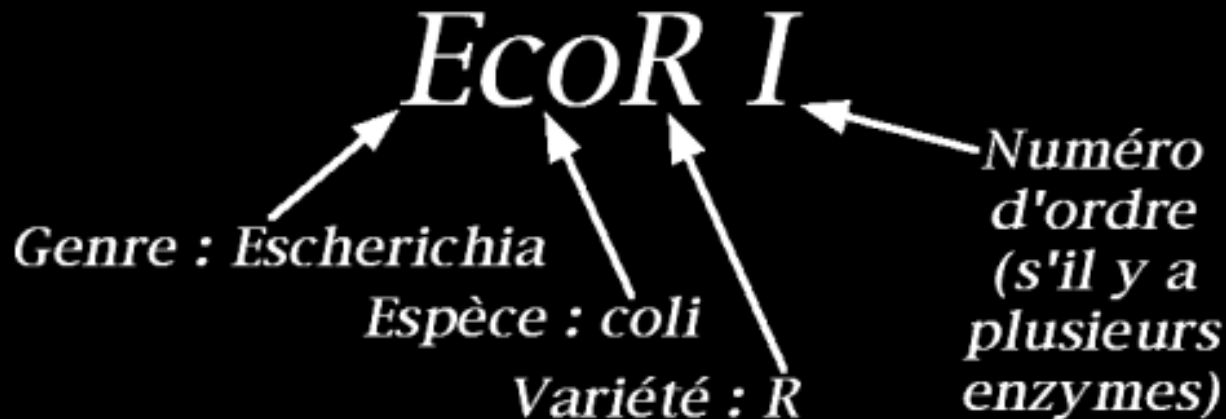
3 = Hydrolase

3.1.21.4

3.1 = Esterase

3.1.21 = Endonucléase produisant un 5'-phosphate

3.1.21.4 = Enzyme avec Mg (seul cofacteur)



Génie génétique

Les enzymes de restriction

Nomenclature des enzymes de restriction

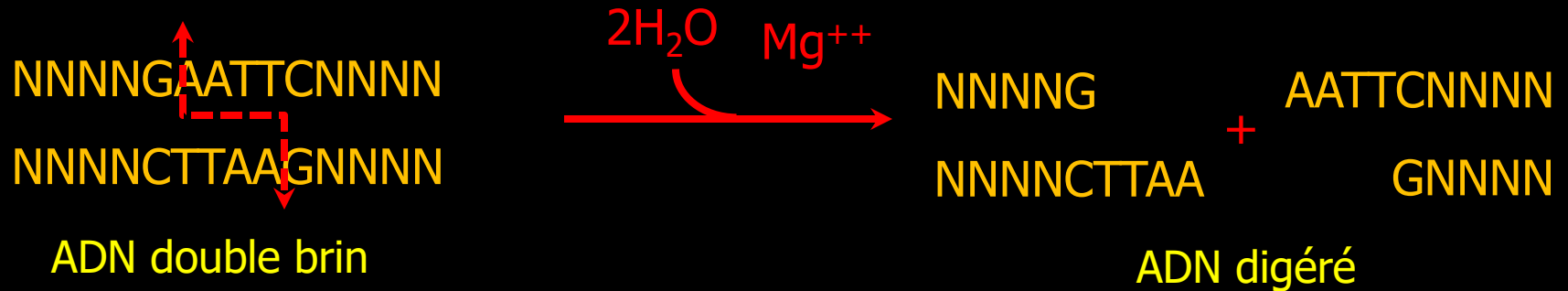
- Les enzymes de restriction sont des hydrolases (classe 3 de la E.C.) agissant sur des liaisons esters (sous-classe 3.1), c'est-à-dire des estérases.
- Parmi les estérases on distingue celles qui hydrolysent un acide nucléique en fragments polynucléotidiques (endonucléases) et en particulier celles dont les produits gardent leur phosphate 5' initial (sous-sous-classe 3.1.21).
- Enfin en fonction des cofacteurs, les enzymes de restriction ne nécessitent que la présence de l'ion Mg^{++} dans le milieu (3.1.21.4)
- Le nom de chaque enzyme est dérivé du nom d'espèce ou de variété de la Bactérie qui la produit. On écrit l'initiale du nom du genre, les deux initiales du nom de l'espèce, 1 lettre ou 1 nombre pour désigner la variété (ou souche) et après un espace un chiffre romain pour désigner successivement les différentes enzymes de restriction obtenues à partir de la même souche.

Génie génétique

Les enzymes de restriction

Exemples d'enzymes de restriction

EcoR I



- **EcoR I** est une enzyme de restriction produite par *Escherichia coli*, souche R.
- Le site de liaison à l'ADN est formé de six paires de nucléotides :
5' GAATTC 3'
3' CTTAAG 5'

Génie génétique

Les enzymes de restriction

Exemples d'enzymes de restriction

EcoR I

- Les sites de restriction sont souvent de type palindrome, c'est à dire qu'ils sont identiques sur les deux brins de l'ADN (mais antiparallèles sur l'autre brin). Lorsque l'hydrolyse des liaisons phosphodiester se fait **loin du centre de symétrie** du palindrome certaines paires de nucléotides restent non appariées : les fragments qui en résultent sont dits « à bouts collants ».

5' GAATTC 3'
3' CTTAAG 5'

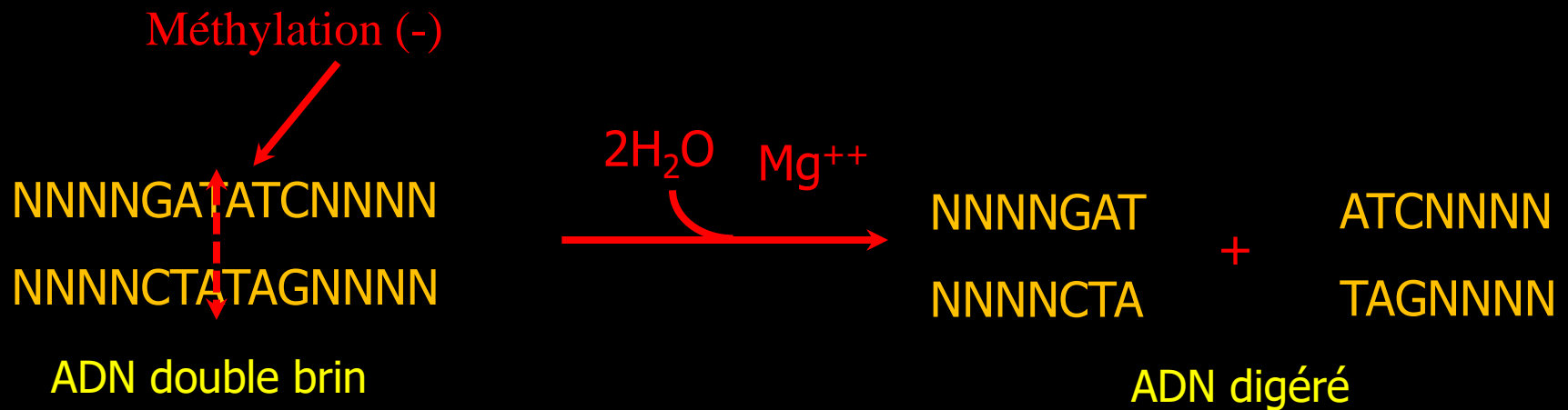
- La méthylation des adénines ou de la cytosine du site d'hydrolyse inhibent la reconnaissance du site par **EcoR I**. L'ADN de la bactérie ainsi méthylé n'est pas hydrolysé alors que l'ADN parasite qui n'est pas méthylé sera hydrolysé.

Génie génétique

Les enzymes de restriction

Exemples d'enzymes de restriction

EcoR V



- **EcoR V** est une enzyme de restriction produite par Escherichia coli, souche R.

- Le site de liaison à l'ADN est formé de six paires de nucléotides :

5' GATATC 3'
3' CTATAG 5'

Génie génétique

Les enzymes de restriction

Exemples d'enzymes de restriction

EcoR V

- Les sites de restriction sont souvent de type palindrome, c'est à dire qu'ils sont identiques sur les deux brins de l'ADN (mais antiparallèles sur l'autre brin). Lorsque l'hydrolyse des liaisons phosphodiester se fait **au centre de symétrie** du palindrome toutes les paires de nucléotides restent appariées : les fragments qui en résultent sont dits « à bouts francs ».

5' GATATC 3'
3' CTATAG 5'

- La méthylation des adénines du site d'hydrolyse inhibent la reconnaissance du site par **EcoR V**. L'ADN de la bactérie ainsi méthylé n'est pas hydrolysé alors que l'ADN parasite qui n'est pas méthylé sera hydrolysé.

Génie génétique

Les vecteurs

Le vecteur est une molécule de DNA auto-répliquable dans laquelle on insère, on clone, un fragment de DNA provenant d'une autre source (bactérie, virus, eucaryote, etc.). C'est le vecteur qui, par sa propre réplication, assurera l'amplification de la séquence de DNA cloné. C'est aussi le vecteur qui, par sa propre construction (exemple: présence de promoteurs forts), pourra assurer ou contrôler l'expression des gènes clonés (vecteurs d'expression).

Génie génétique

Vecteurs généralement utilisés

1) Les plasmides

a) Propriétés générales des plasmides

Les plasmides présentent les caractéristiques suivantes :

- Leur ADN est bicaténaire, circulaire avec un nombre de nucléotides inférieur à 10 kb (1 kilobase = kb = 1000 nucléotides).
- Le nombre de plasmides dans une cellule bactérienne peut être considérable (plusieurs centaines).
- Les plasmides portent normalement des gènes qui leur confèrent un avantage sélectif, par exemple une résistance à un antibiotique.
- Leur réplication est indépendante de celle du génome bactérien.

Génie génétique

Vecteurs généralement utilisés

c) Préparation des plasmides pour la recombinaison, constitution de l'hybride et transformation bactérienne

- L'insertion d'une séquence d'ADN bicaténaire dans un plasmide nécessite un traitement préalable par une enzyme de restriction.
- Traitement des plasmides linéarisés par une phosphatase alcaline.
- Ajouter aux plasmides linéarisés et traités par une phosphatase alcaline aux fragments d'ADN à insérer en présence d'une ligase.
- L'ensemble de ces étapes produit un plasmide recombinant.
- Transformation des bactéries compétentes par les plasmides

Génie génétique

Vecteurs généralement utilisés

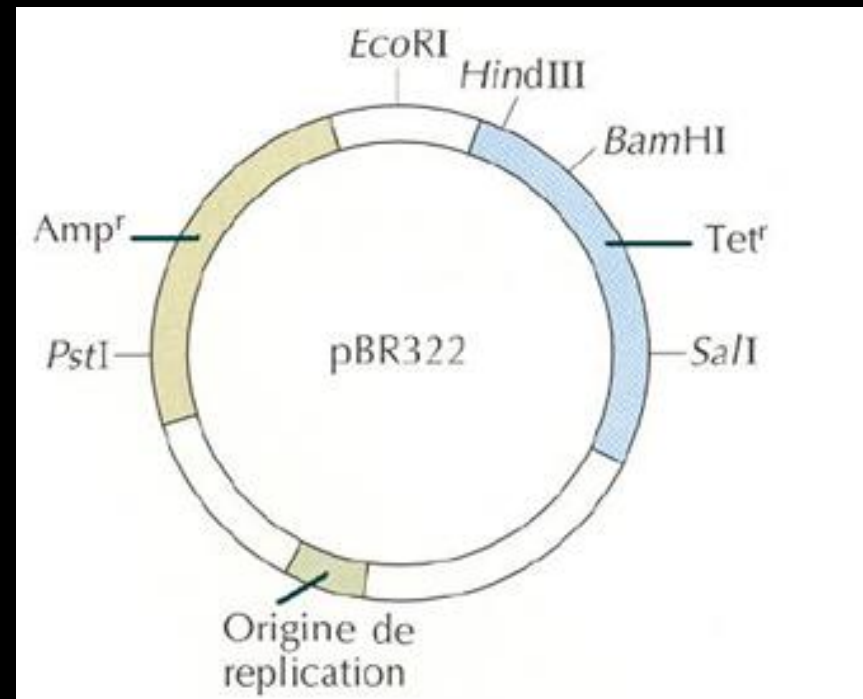
d) Exemples de plasmides

Le plasmide bactérien pBR322.

La nomenclature des plasmides est la suivante :

- p indique qu'il s'agit d'un plasmide
- BR indique le laboratoire d'origine (dans le cas présent Bolivas et Rodriguez)
- 322 correspond au numéro du plasmide dans ce laboratoire.

Carte simplifiée du plasmide pBR322. Sont représentés quelques sites de restriction souvent utilisés pour le clonage. L'insertion d'un fragment de DNA étranger dans un gène de résistance entraîne la perte de la résistance à l'antibiotique correspondant (ampicilline ou tétracycline), d'où la possibilité d'une sélection négative.

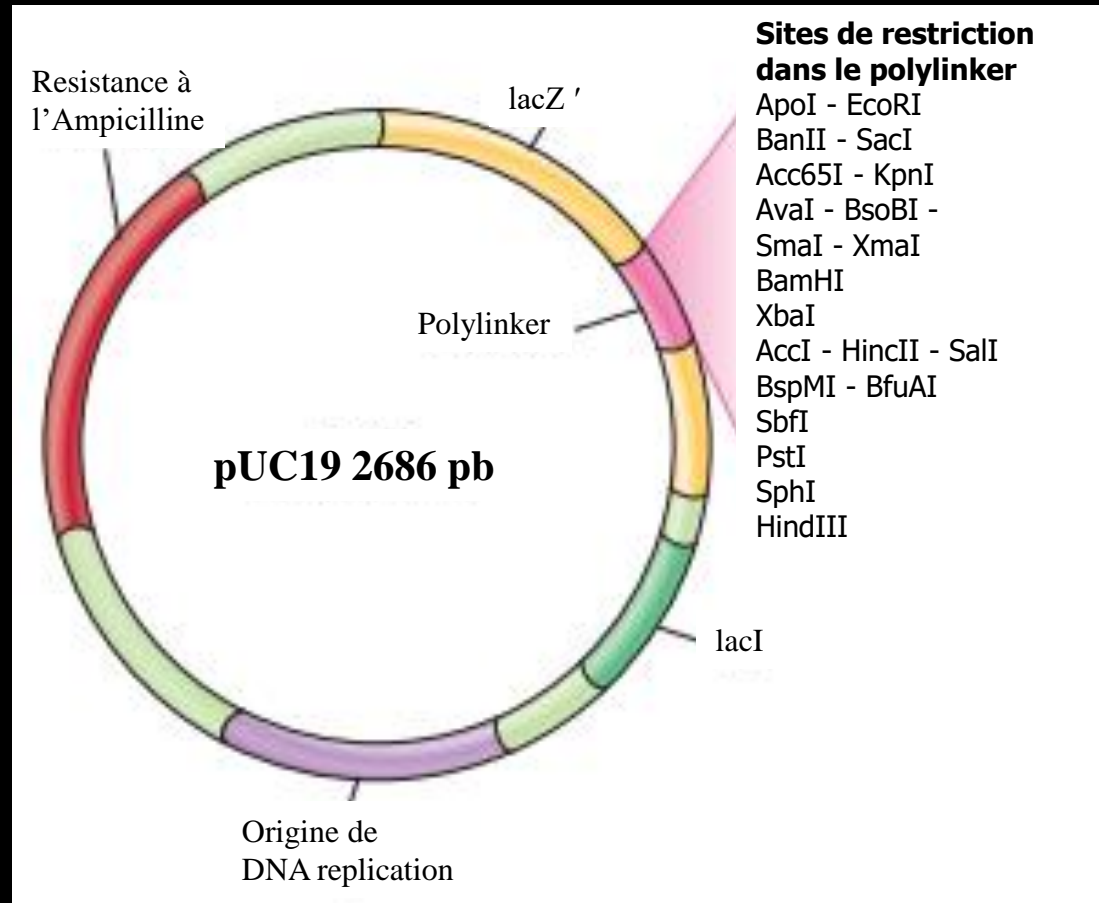


Génie génétique

Vecteurs généralement utilisés

d) Exemples de plasmides

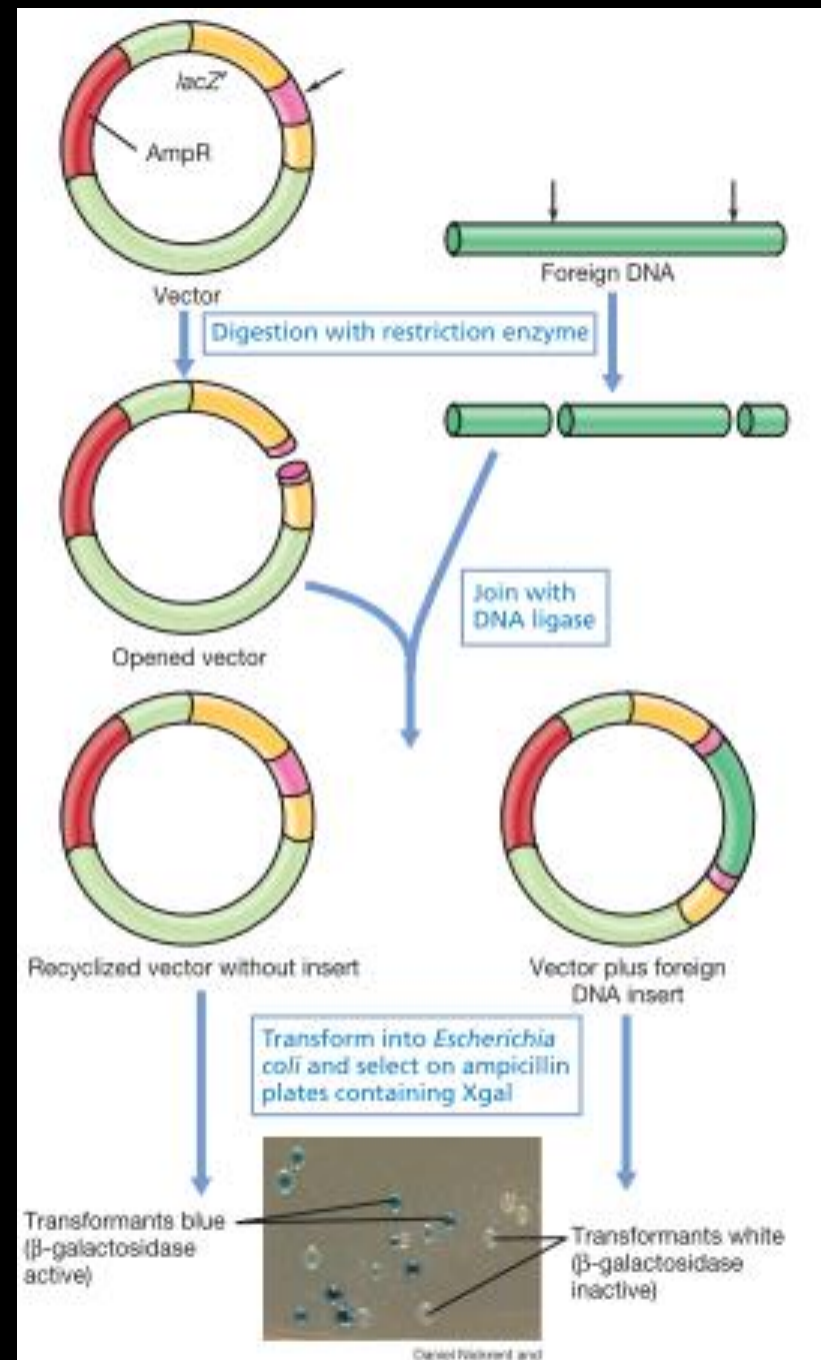
Le plasmide bactérien **pUC19**



Le vecteur de clonage le plasmide pUC19. Les caractéristiques essentielles comprennent un marqueur de résistance à l'ampicilline et un polylinker avec plusieurs sites de coupure des enzymes de restriction. L'insertion d'ADN cloné dans le polylinker inactive le gène lacZ qui code une partie de la β -galactosidase et permet facilement l'identification des hôtes transformés par criblage bleu-blanc.

La figure 11.12 Le clonage dans le vecteur pUC19. Le vecteur de clonage est ouvert par une enzyme de restriction approprié au niveau du polylinker.

L'insertion d'ADN inactivant la β -galactosidase, ce qui permet le criblage bleu-blanc de la présence ou l'absence de l'insert. La photo en bas montre les colonies d'*Escherichia coli* sur une plaque X-gal. L'enzyme β -galactosidase peut cliver le Xgal normalement incolore pour former un produit bleu.



Vecteurs navettes (hôtes eucaryotes et procaryotes)

Lorsque la manipulation comporte le passage d'une amplification chez un procaryote suivi d'une expression chez un eucaryote, on peut utiliser des vecteurs-navettes capables de transporter l'insert d'une cellule à l'autre.

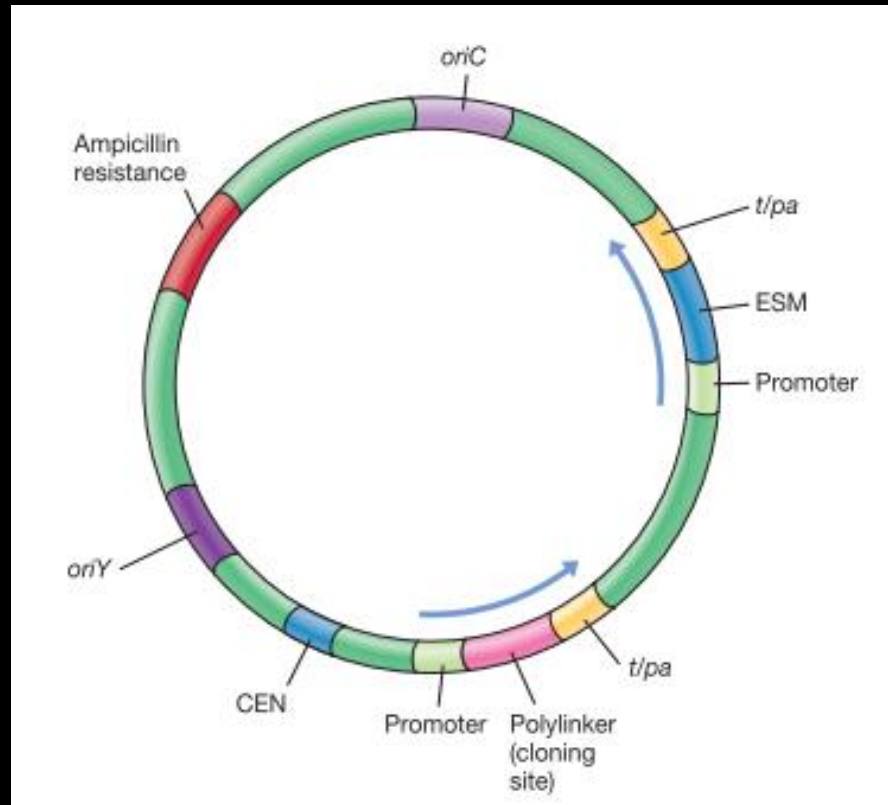


Figure 11.15 : Carte génétique d'un vecteur navette utilisé chez la levure. Le vecteur contient des éléments qui lui permettent de faire la navette entre *Escherichia coli* et la levure et peut être sélectionné dans chaque organisme: **oriC**, l'origine de réplication dans *E. coli*; **oriY**, origine de réplication dans la levure; **ESM**, marqueur de sélection eucaryote; **CEN**, séquence du centromère de la levure; **promoteur**; **t/pa** signaux de terminaison de transcription/polyadénylation. Les flèches indiquent la direction de transcription.

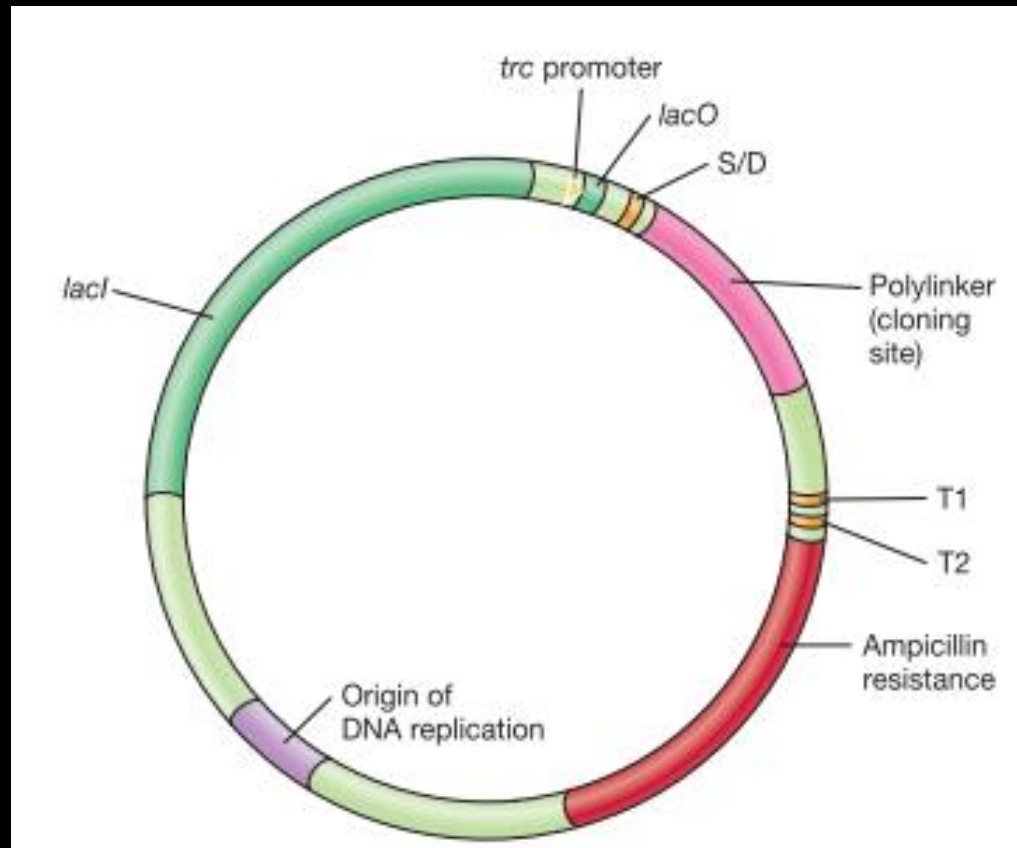


Figure 11.16 Carte génétique du vecteur d'expression pSE420. Ce vecteur a été développé par Invitrogen. Le polylinker contient beaucoup de sites de restriction pour faciliter le clonage. Cette région, ainsi que le gène inséré, sont transcrits par le promoteur trc, qui est immédiatement en amont de l'opérateur lac (*lacO*). Immédiatement en amont du polylinker la séquence de Shine-Dalgarno (S/D) site de fixation des ribosomes sur l'ARNm résultant. En aval du polylinker deux terminateurs de transcription (T1 et T2). Le plasmide contient également le gène *lacI*, qui code pour le répresseur lac, et un gène conférant une résistance à l'antibiotique ampicilline. Ces deux gènes sont sous le contrôle de leurs propres promoteurs, qui ne sont pas représentés.

AVANTAGES ET DÉSAVANTAGES DES PLASMIDES.

Avantages:

- Petite taille du vecteur, permettant un travail expérimental aisé.
- Sélection des plasmides recombinants (sélection par les antibiotiques).

Désavantages:

- Faible efficacité pour la transformation des bactéries (pénétration de plasmides).
- Impossibilité d'insérer des larges fragments d'ADN.

LES PHAGES.

PROPRIÉTÉS GÉNÉRALES.

Définition :

Les phages sont des virus qui infectent les bactéries. Deux phages sont très utilisés comme vecteurs : le phage lambda et le phage M13 (mais maintenant les phages dérivés de ces deux phages). Les séquences de ces phages utilisés comme vecteurs sont connues (40 à 50 kb d'ADN double brin). Les extrémités de cet ADN sont simples brins sur une longueur réduite, et complémentaires l'une de l'autre et surtout formant *des extrémités cohésives*. Ces séquences sont appelées *séquences cos (pour cohésives)*.

Deux parties sont individualisées dans le phage lambda:

- La tête du virus: elle renferme l'ADN viral.
- La queue du virus: elle renferme des protéines. Elle permet la fixation du virus sur la cellule-hôte bactérienne.

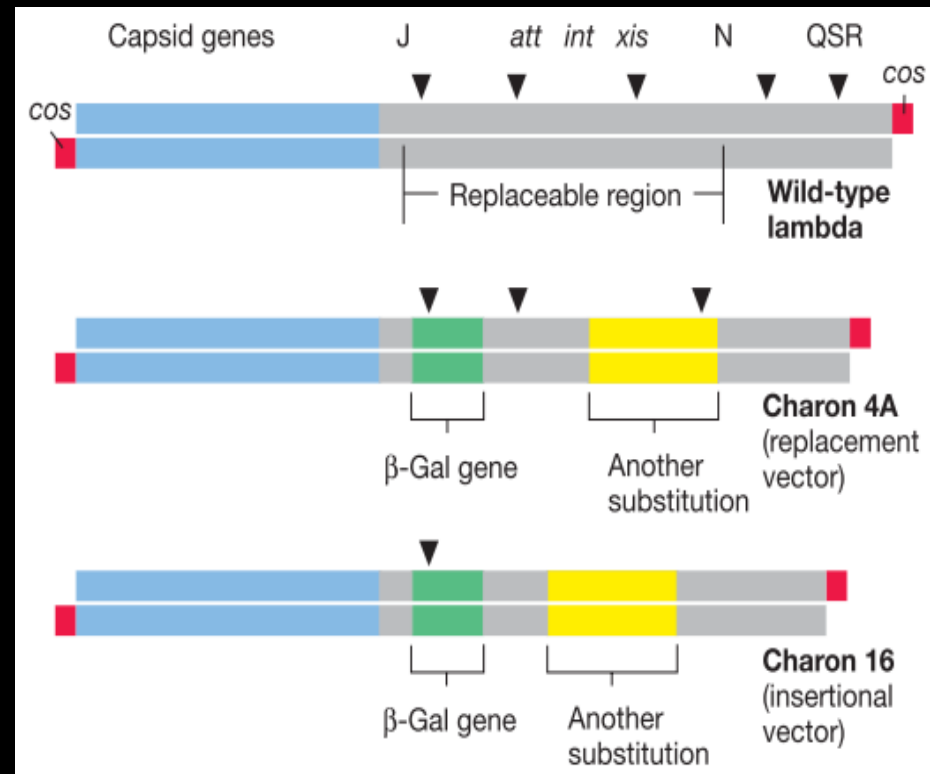
Le virus lambda se multiplie selon deux modes possibles: soit par *multiplication lytique*, soit par *multiplication lysogénique*.

Clonage par le bacteriophage lambda

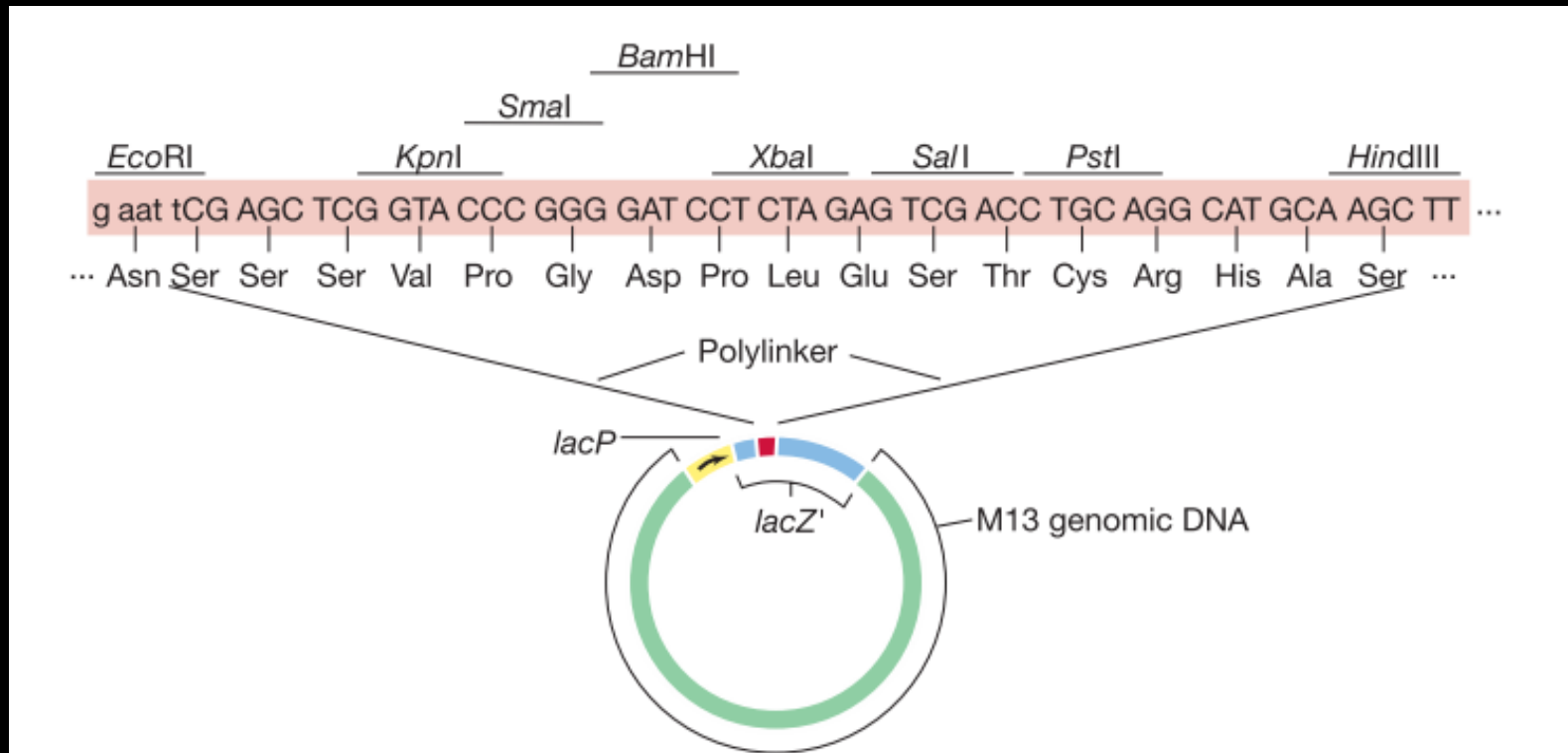
Le génome du phage lambda peut être divisé en:

- Parties essentielles comprenant:
 - les gènes codant pour les protéines situées dans la tête et les protéines situées dans la queue du virus.
 - Les sites cos.
 - Le site de réplication de l'ADN viral.
- Parties non essentielles:
 - Ce sont les gènes impliqués dans la lysogénie.

Carte simplifiée des vecteurs de clonage Lambda montrant les extrémités cohésives en rouge. Charon 4A et 16 sont deux des dérivés de lambda avec diverses substitutions et suppressions dans la région non essentielle. Chacune possède le gène lacZ, codant pour l'enzyme la β -galactosidase, ce qui permet la détection de phage contenant l'inséré cloné. Alors que le génome lambda de type sauvage est de 48,5 kbp, Charon 4A est de 45,4 kbp et Charon 16 est de 41,7 kbp. les flèche au-dessus des cartes de chaque phage indiquent les sites reconnus par l'enzyme de restriction EcoRI.

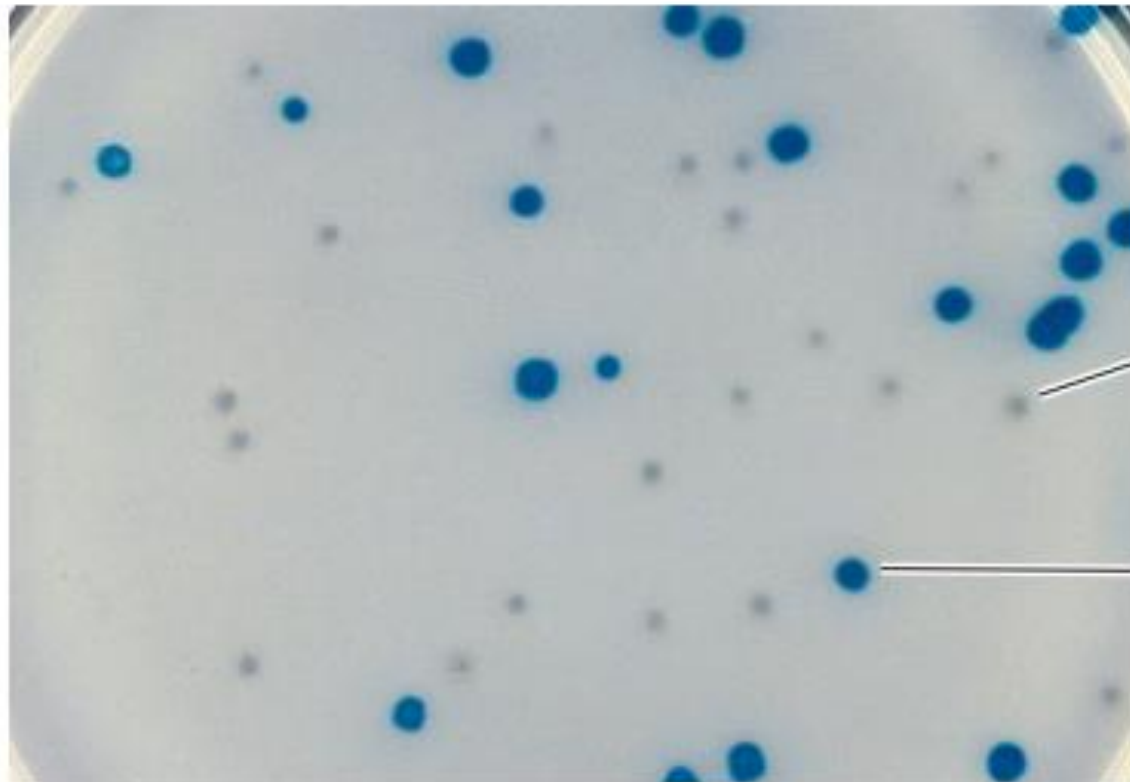


Clonage par le bacteriophage M13



Une carte partielle de M13mp18, un dérivé de M13 construit pour une utilisation comme vecteur de clonage. Le vecteur contient le promoteur lac (LACP) et un gène tronqué 9 *lacZ*, qui code pour une partie fonctionnelle de la β -galactosidase. Au début de ce gène est un polylinker qui contient plusieurs sites de restriction mais maintient le cadre de lecture approprié. Les acides aminés codés par le polylinker sont affichés. La plupart des fragments d'ADN clonés dans le polylinker inhibent l'activité β -galactosidase.

Clonage par le bacteriophage M13



Phage in
clear plaques
have cloned DNA

Phage in blue
plaques do not
have cloned DNA

J. Parker

Partie d'une gélose contenant Xgal montrant des plaques blanches formées par le phage contenant de l'ADN cloné et des plaques bleues formées par des phages sans ADN cloné.

AVANTAGES ET DÉSAVANTAGES DES PHAGES.

Avantages:

- La taille des fragments d'ADN insérables est supérieure à celle des plasmides (40-50 kb).
- La transformation des bactéries (=incorporation des phages) est plus efficace que pour les plasmides.

Désavantages:

- Nombre de sites de restriction restreints dans le génome des phages.
- Obligation d'empaqueter l'ADN.
- Contraintes de taille pour l'ADN à insérer

Vecteurs hybrides

Les cosmides

Propriétés générales

Les cosmides sont des vecteurs artificiels hybrides: phage lambda-plasmides. En fait, ils se comportent comme des plasmides avec des sites de restriction permettant l'insertion d'ADN étranger. Ils renferment également un gène de résistance aux antibiotiques (ampicilline). De plus, un site cos d'un virus lambda a été inclus dans leur ADN circulaire ce qui permettra au cosmide d'être empaqueté dans la tête d'un virus lambda.

Avantages des cosmides :

- La taille des fragments insérables peut atteindre 50 kb.
- Leur incorporation dans les bactéries (transformation) est plus efficace que pour les plasmides.

Désavantages des cosmides :

- Obligation d'empaqueter l'ADN.

Le DNA de virus eucaryotiques

Ces vecteurs sont utilisés pour le clonage chez les eucaryotes. Parmi les plus utilisés, on peut citer le virus de la vaccine, l'adénovirus et les rétrovirus. Leur maniement est complexe.

Les phagémides

Les phagémides sont des plasmides dans lesquels ont été incorporés le signal d'encapsidation et l'origine de réplication du phage M13. Ces vecteurs ont la capacité de se maintenir et de se répliquer comme n'importe quel plasmide dans *E. coli*.

Chromosomes artificiels de levure (YAC)

Pour permettre l'insertion de fragments d'ADN de grande longueur, on utilise des cosmides, construits à partir de phage λ et de plasmides ou bien , dans le cas des cellules eucaryotes, des YAC (*Yeast Artificial Chromosome* = chromosome artificiel de levure).

chromosome artificiel bactérien

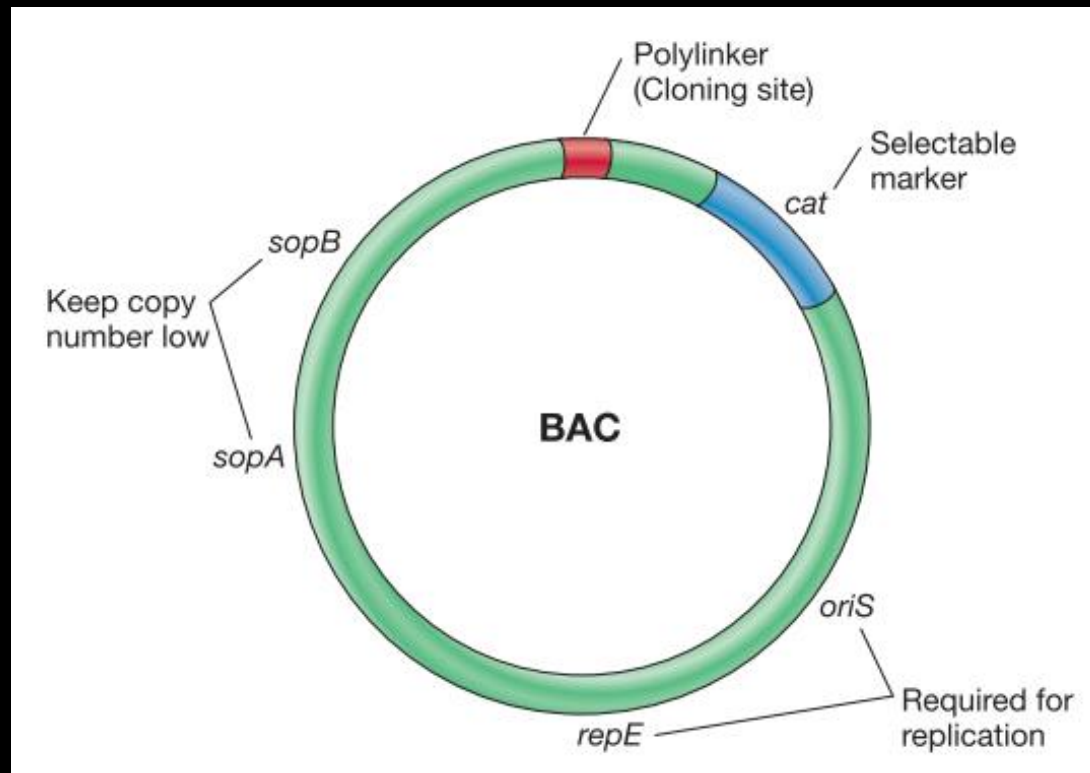


Figure 11,21 carte génétique d'un chromosome artificiel bactérien. Le BAC montre 6,7 kb. La région de clonage a plusieurs sites uniques de restriction. Cette BAC contient seulement une petite fraction du plasmide F 99,2 kp.

Insertion de DNA recombinant dans des cellules eucaryotes

a) Electroporation

Les cellules sont mélangées à une préparation de DNA, puis soumises brièvement à un champ électrique de haut voltage (de quelques centaines à quelques milliers de V/cm). Ce traitement forme des pores dans la membrane plasmique des cellules, ce qui permet la pénétration du DNA. Il s'agit donc d'une sorte de transformation forcée. L'électroporation peut être appliquée aux bactéries, aux cellules de mammifères et aux protoplastes de cellules végétales.

b) Le fusil à gènes (méthode biolistique)

A l'aide d'une cartouche de calibre 0.22 ou de gaz sous haute pression, on bombarde les cellules par des microprojectiles métalliques (par exemple, des particules d'or) recouverts de DNA. Cette technique est utilisée pour les cellules végétales et animales.

c) La micro-injection

Cette technique est surtout utilisée pour obtenir des animaux transgéniques. Le matériel génétique est injecté directement dans des cellules telles que les oeufs fécondés: parfois ce matériel s'incorpore de manière stable dans le génome de l'hôte pour produire l'organisme recombinant souhaité.

Insertion de DNA recombinant dans des cellules eucaryotes

d) Méthodes biologiques

Certaines plantes peuvent être transformées par des plasmides recombinants dérivés de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*. Ce système est basé sur la possibilité naturelle de transfert de matériel génétique des bactéries (*A. tumefaciens*) aux plantes.

Du matériel génétique peut être introduit dans les cellules animales en utilisant des vecteurs viraux ou non viraux (voir: Thérapie génique).

Les hôtes pour la propagation des vecteurs

Le choix de l'hôte dépend naturellement de celui du vecteur.

Propriétés requises pour un hôte

- croissance rapide, croissance dans des milieux non coûteux, absence de pathogénicité, bonne incorporation du DNA vecteur (transformation, infection, transfection) et stabilité.

Hôtes généralement utilisés

- Bactéries (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas*), levures (*Saccharomyces cerevisiae*) et cultures cellulaires eucaryotes

Transformation (artificielle d'E. coli)

Deux méthodes :

1- chimique

Traitement des bactéries au chlorure de calcium qui perméabilise les membranes perméabilise les membranes

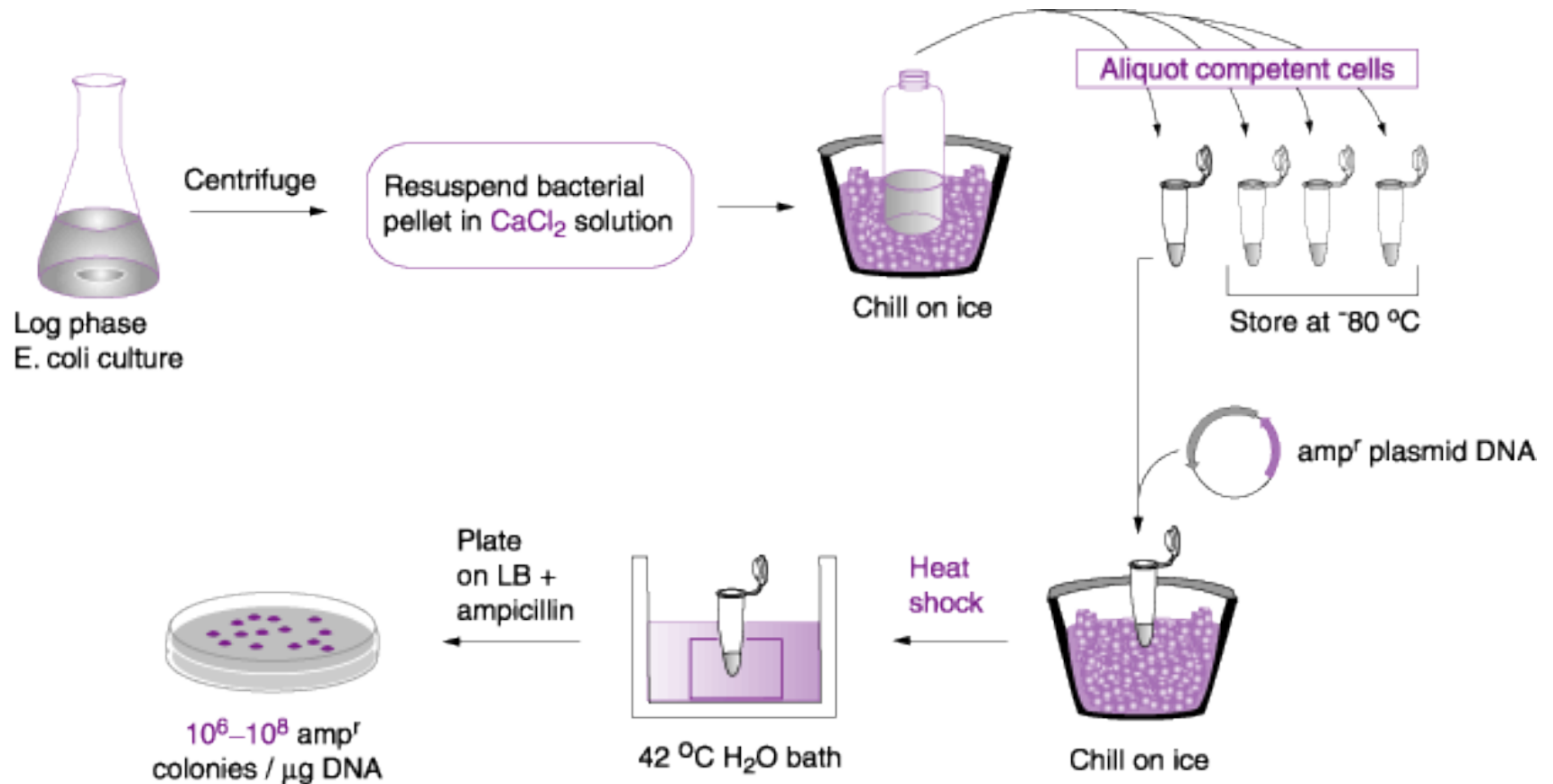
Ou

2- Physique

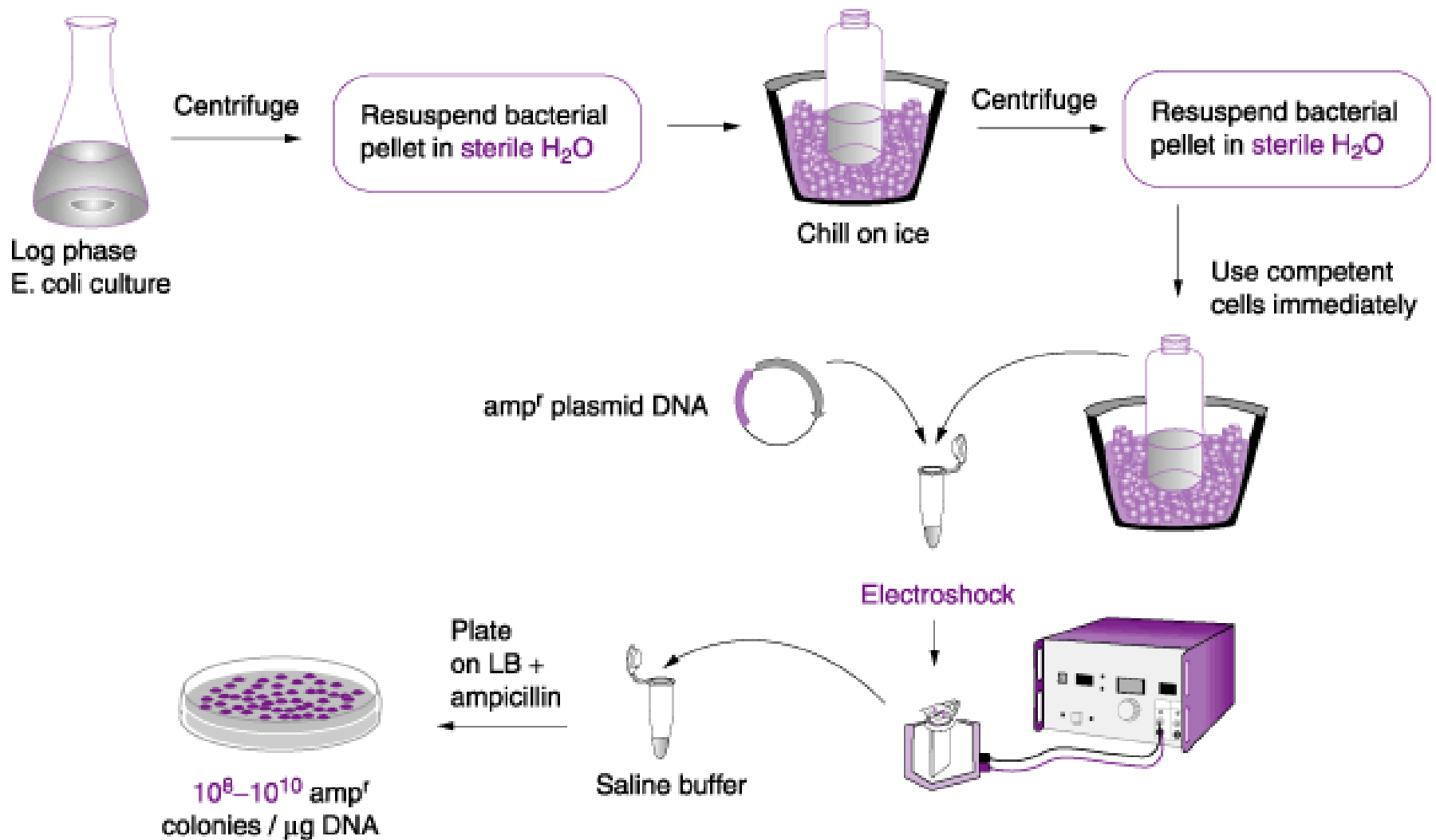
Traitement des bactéries par un choc électrique permettant de rendre les membranes perméables

Les cellules sont rendues compétentes compétentes

Transformation (artificielle d'E. coli)



Transformation (artificielle d'E. coli)

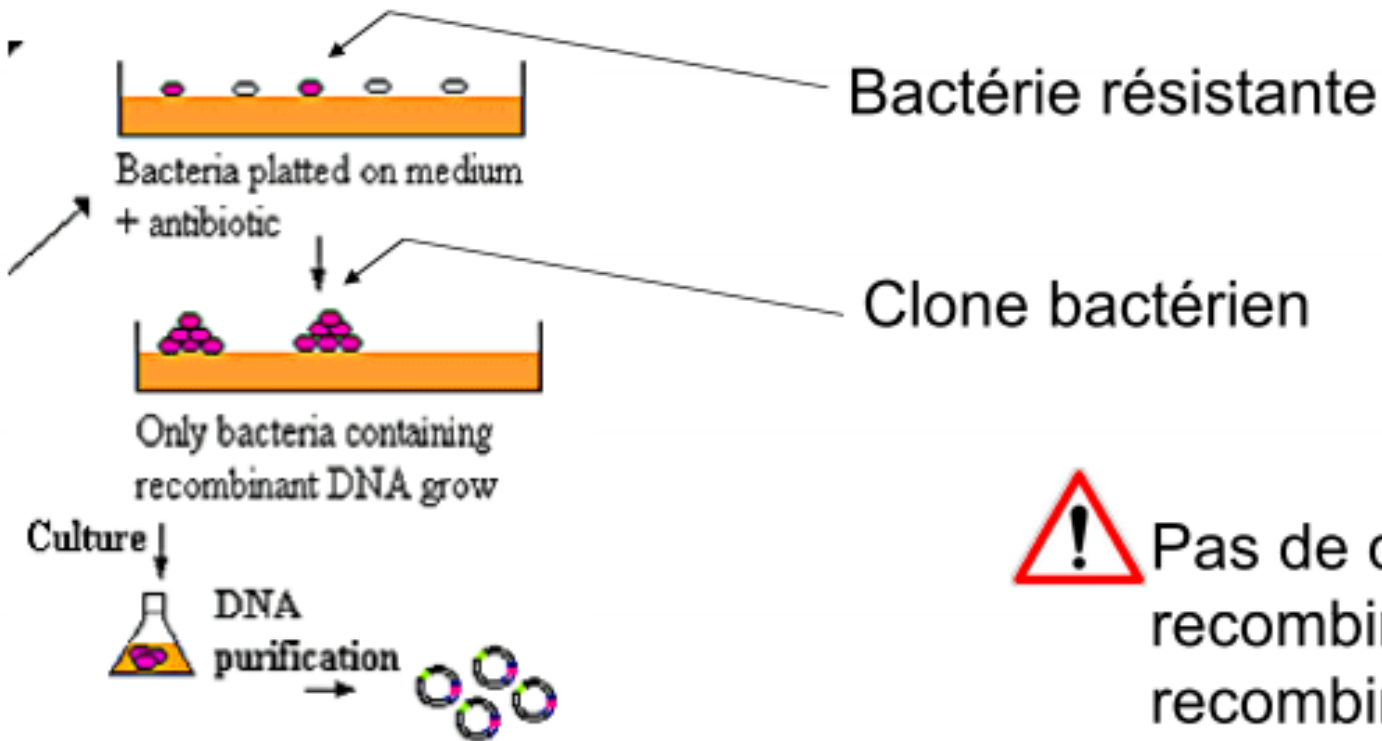



Sélection des bactéries recombinantes

Rendement de transformation $\sim 1 / 10^5 - 10^7$

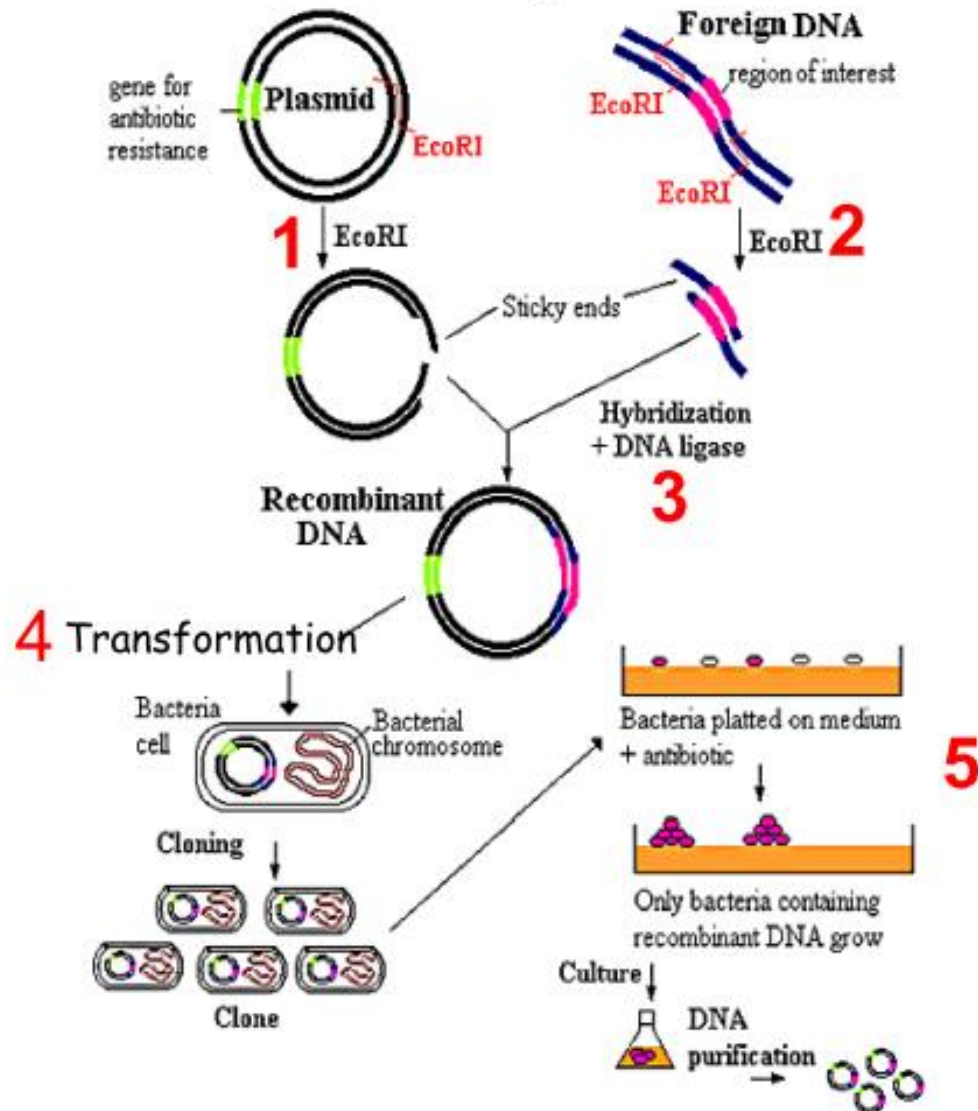
Nécessité de sélectionner les recombinants

Culture sur milieu sélectif : le plus souvent un antibiotique

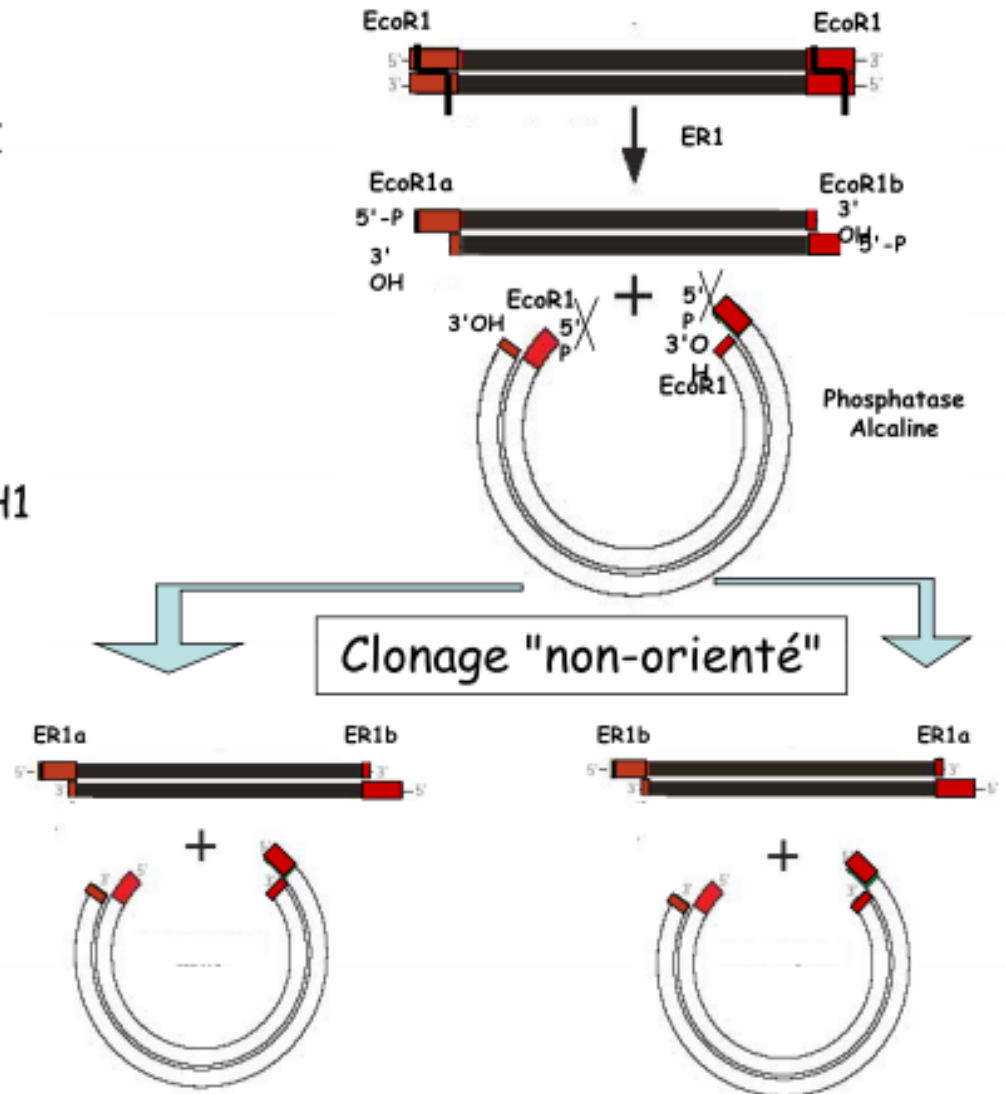
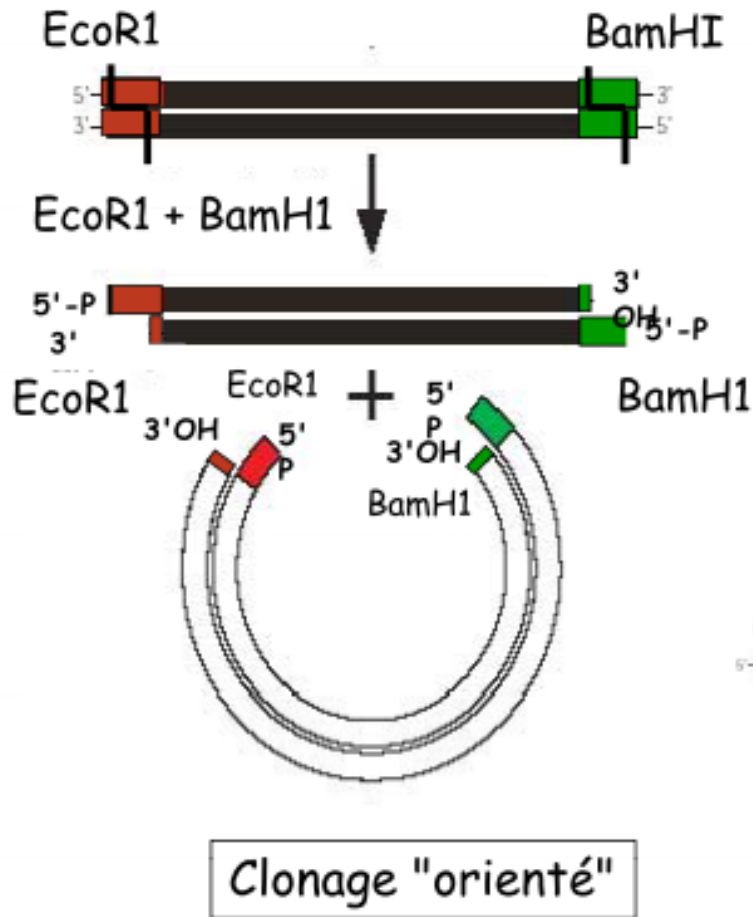


 Pas de distinction entre recombinants et non recombinants

Pour récapituler



clonage orienté et clonage non orienté



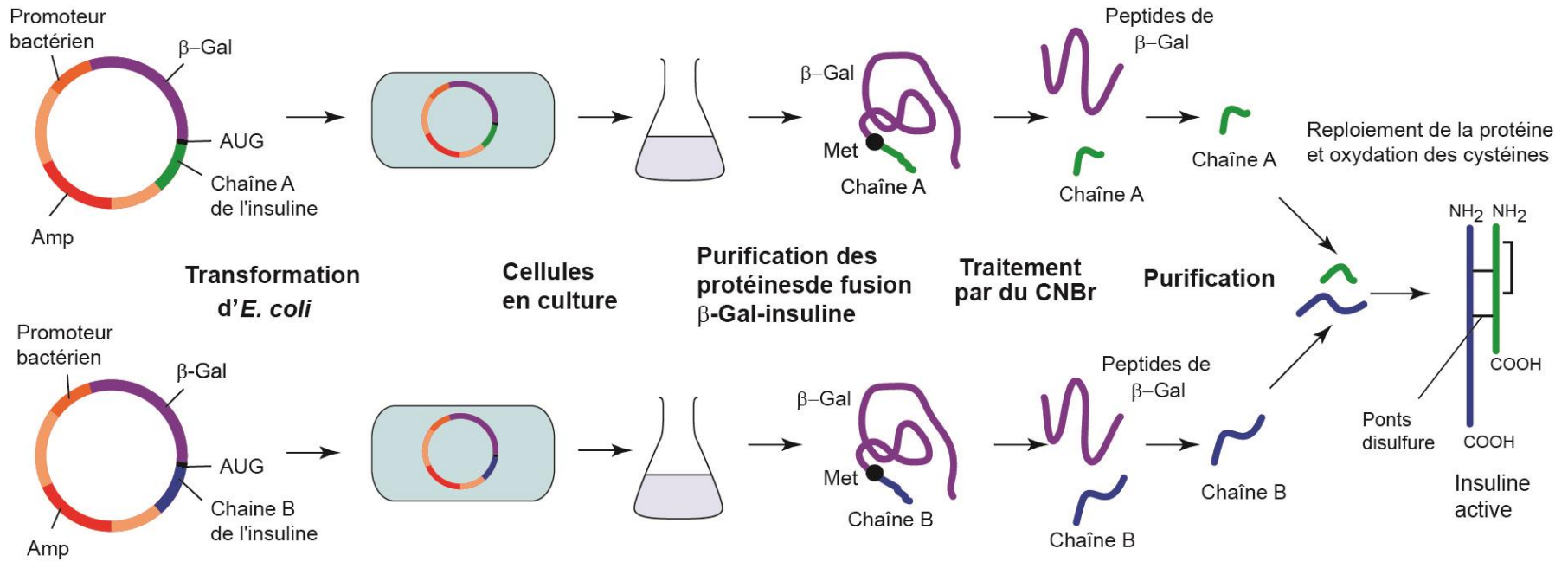


Figure 1 Étapes de production de l'insuline recombinante

1 Production de protéines recombinantes

L'insuline est un exemple de protéine produite par génie génétique. L'un des procédés consiste à produire les deux chaînes de l'insuline séparément en insérant le gène codant pour chacune d'entre elles dans deux vecteurs plasmidiques différents (figure 1).

Les vecteurs recombinants sont introduits par transformation dans des lots différents d'*Escherichia coli*. Ces dernières sont mises en culture sur un milieu contenant de l'ampicilline et, dans un premier temps, dépourvu de lactose, afin d'obtenir une biomasse de cellules transformées importante.

L'ajout, dans un second temps, de lactose dans le milieu induit l'expression du gène, ce qui conduit à la synthèse d'une protéine hybride b gal-chaîne A ou b gal-chaîne B de l'insuline. La présence d'une partie de la b galactosidase associée à la protéine d'intérêt évite sa dégradation par la bactérie.

Dans les deux cas, le gène d'intérêt est placé sous le contrôle du promoteur de l'opéron lactose. Il est également associé à une partie du gène de la β galactosidase et au codon de la méthionine. Par ailleurs, le plasmide contient un gène de résistance à l'ampicilline.

Produite en grande quantité, les protéines hybrides précipitent ce qui facilite leur récupération. Les chaînes de l'insuline sont séparées des protéines hybrides, par action du bromure de cyanogène qui coupe les liaisons peptidiques après les résidus méthionines. Les deux chaînes sont alors purifiées, mélangées et placées en milieu oxydant pour permettre la formation de ponts disulfures.

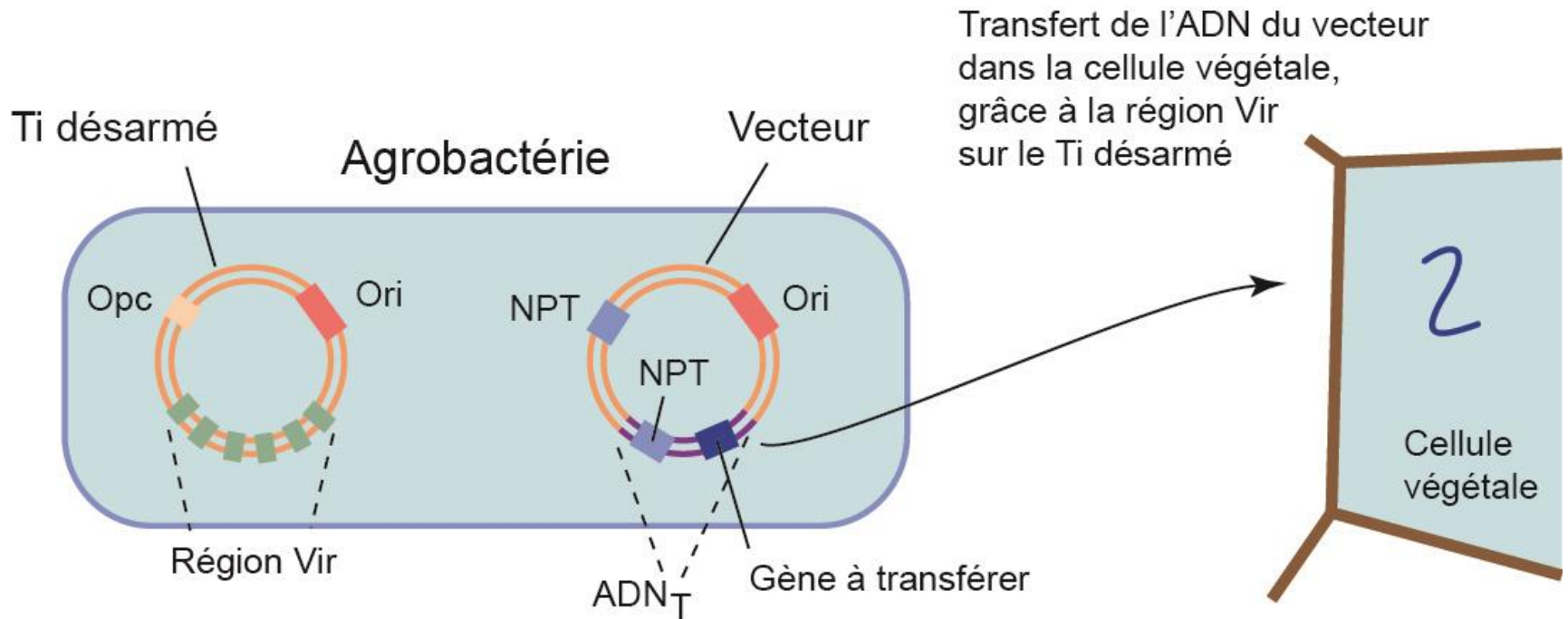


Figure 3 Principe de la transgénèse végétale par *Agrobacterium* selon la technique du vecteur binaire

3 Transgénése végétale

La modification génétique des cellules végétales peut être réalisée à l'aide de bactéries du type *Agrobacterium*. Elles infectent les plantes, au niveau du collet ou des racines, selon les espèces, provoquant des tumeurs suivies de nécroses tissulaires.

L'une des espèces les plus utilisées pour la transgénése est *A. tumefaciens*. Elle héberge le plasmide Ti (*tumor inducing*) qui contient :

- une région T, ou ADN T, pouvant être transférée dans les cellules végétales, et renfermant, entre autres, les gènes responsables de la formation de tumeur ;
- des gènes impliqués dans le transfert de l'ADN T (région *vir*) et une origine de réplication.

Lors de la transgénèse, un plasmide vecteur est construit à partir du plasmide Ti. Il contient les extrémités de l'ADN T, le gène d'intérêt, à la place des gènes responsables de la formation des tumeurs et un gène de sélection chez les plantes, en général le gène NPT (néomycine phospho-transférase), qui confère à la plante une résistance spécifique à la kanamycine (figure 3).

Ce plasmide vecteur est introduit dans une agrobactérie transformée par un plasmide Ti désarmé, c'est-à-dire sans ADN T mais exprimant les protéines nécessaires au transfert de la région T du plasmide vecteur.