B/ La diversité des techniques de l'ADN recombinant

I/ Différents vecteurs de clonage

Les vecteurs de clonage sont des fragments d'ADN capables d'intégrer un fragment plus ou moins grand d'ADN étranger

Ils peuvent provenir des bactéries (plasmides), des virus (bactériophages), des levures (Chromosome artificiel)...

1) Les plasmides

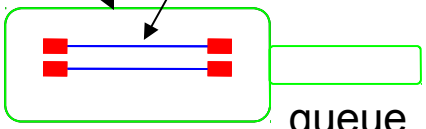
- Origine bactérienne
- Petite molécule d'ADN bicaténaire (3 à 10 kb) circulaire, extrachromosomique, capable de réplication autonome dans la bactérie, transfert possible dans une autre bactérie
- Possibilité de les purifier en grandes quantités car ils se multiplient beaucoup dans la cellule hôte bactérienne
- En génie génétique, utilisation de plasmides avec :
    - origine de réplication
    - marqueur de sélection (souvent résistance contre des antibiotiques)
    - site de clonage (succession de sites de restriction connus et uniques dans la séquence, pouvant être utilisés pour l'intégration de l'ADN étranger)

2) Les phages : utilisation du bactériophage Lambda

a) Présentation de son cycle viral lytique

Coque protéique

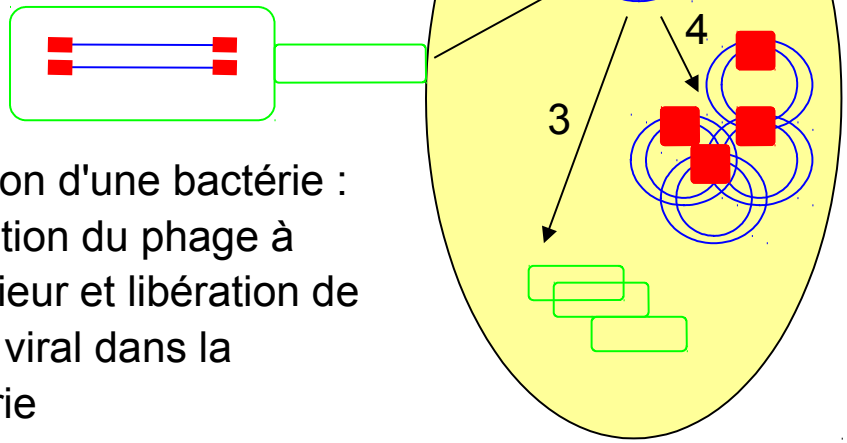
ADN bicaténaire linéaire avec extrémités cohésives Cos



queue

tête

Bactériophage



2) l'ADN viral se circularise grâce à ses extrémités cohésives

3) Utilisation de la machinerie bactérienne pour transcription et traduction des protéines virales

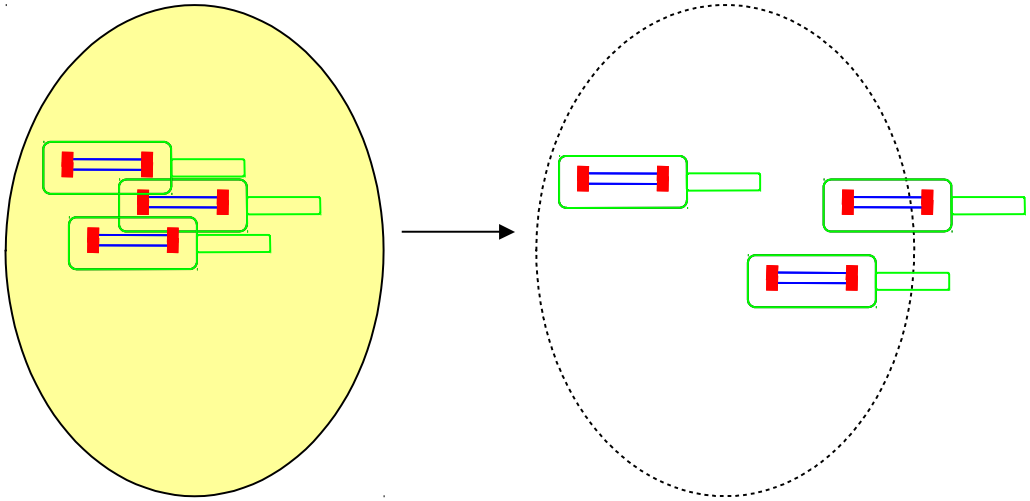
4) Réplication de l'ADN viral

Infection d'une bactérie :

1) fixation du phage à l'extérieur et libération de l'ADN viral dans la bactérie

2) Les phages : utilisation du bactériophage Lambda

a) Présentation de son cycle viral lytique



5) Molécules d'ADN synthétisées encapsidées dans de nouvelles coques protéiques => constitution de **virions**

6) Lyse de la cellules bactérienne, des milliers de phages identiques au premier sont libérés et peuvent infecter de nouvelles bactéries

Rq : le phage Lambda peut aussi faire un **cycle lysogénique** avant le cycle lytique : insertion de son ADN dans le chromosome bactérien, réplication de l'ADN viral grâce aux divisions bactériennes

2) Les phages : utilisation du bactériophage Lambda

b) Utilisation du phage pour les clonages

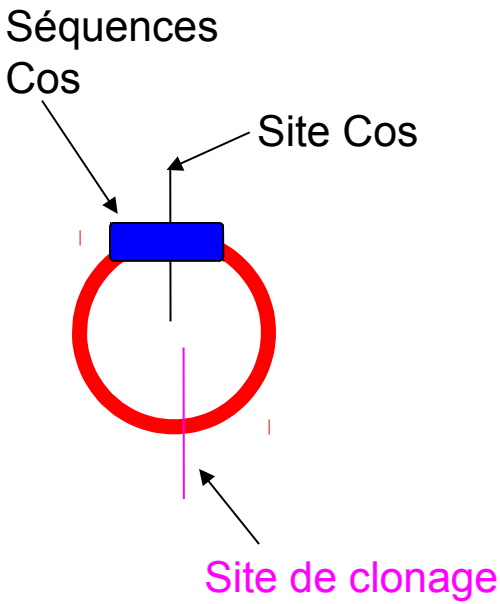
Les phages peuvent être utilisés pour cloner de grandes molécules d'ADN (~15kb) :

Il est en effet possible de remplacer la région centrale du génome de λ qui n'est pas essentielle par un fragment d'ADN d'intérêt.

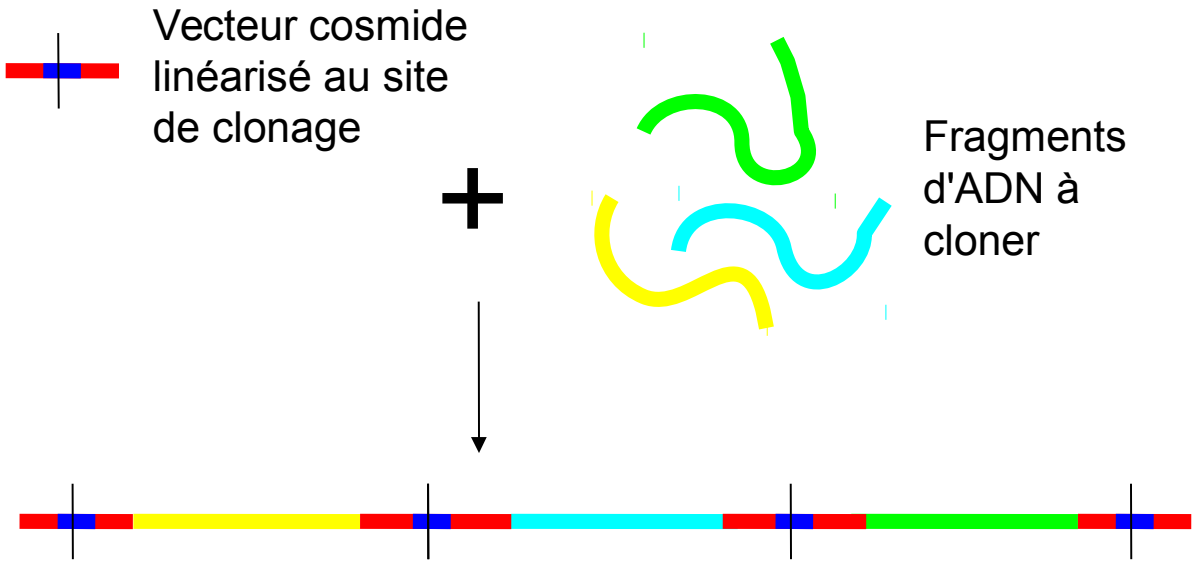
Il peut y avoir encapsidation *in vitro*. On obtient des phages viables qui pourront transférer cet ADN à des bactéries (voir cycle du bactériophage).

3) Les cosmides

Le cosmide est un plasmide dans lequel les séquences cos du bactériophage Lambda ont été insérées. Ces séquences sont nécessaires pour l'encapsidation de l'ADN du phage.



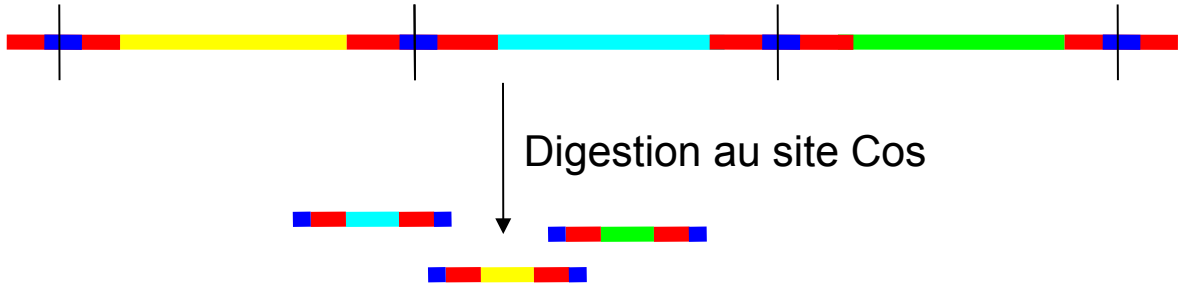
Vecteur cosmide (~5kb) avec une origine de réplication, un gène de sélection, un site de clonage



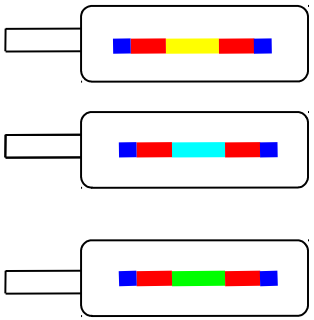
Ligation ddu vecteur cosmide avec les ADN à cloner

3) Les cosmides

ADN à cloner liés avec les ADN cosmidiques :



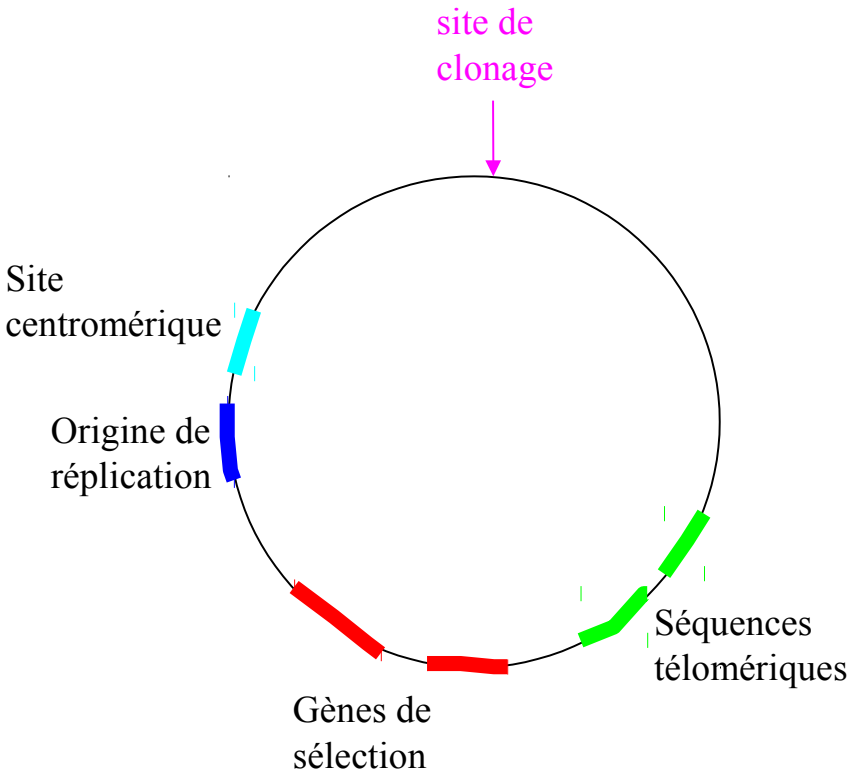
Si les fragments d'ADN entre deux sites Cos font environ 40 à 50kb, l'ADN recombinant pourra être encapsidé comme celui d'un phage



Mélange de l'ADN recombinant aux constituants du phage => assemblage spontané d'un phage recombinant

Ces phages infectent des bactéries. Une fois dans la bactérie, l'ADN recombinant se comporte comme un plasmide (il ne possède pas les gènes nécessaires à la production de virions)

4) Les chromosomes artificiels de levure et de bactérie



Les **YAC (yeast artificial chromosome** = chromosome artificiel de levure) sont construits à partir de séquences d'ADN chromosomiques de levure.
Une fois introduits sous forme linéarisée dans la levure, ils se comportent comme des chromosomes de levure. Ces vecteurs sont amplifiés dans les levures, sélectionnées grâce à l'expression de gènes de sélection (conférant par exemple une prototrophie pour un acide aminé donné).

Rq : Il existe aussi des **BAC (bacterial artificial chromosome)** qui se comportent comme des plasmides de très grande taille

5) Choix du vecteur : avantages et inconvénients

Vecteur	Nature	Cellule hôte	Taille de l'insert	Usage majeur	Avantages	Inconvénients
Plasmides	ADN circulaire db	bactérie	0.1 à 10 kb	banque ADNc	manipulation aisée	petit insert
Bactériophages	ADN viral db linéaire	bactérie	10 à 20 kb	banque génomique et ADNc	insert + important	manipulation moins aisée
Cosmides	ADN db circulaire	bactérie	40 kb	banque génomique		
YAC	chromosome artificiel de levure	levure	200 à 1000 kb	banque génomique	clonage de grands fragments d'ADN : possibilité de couvrir tout le génome avec un nombre restreint de vecteurs recombinants	instabilités
BAC	chromosome artificiel de bactérie	bactérie	100 à 500 kb	banque génomique	clonage ADN plus aisé, efficace, clones + stables en bactéries	taille des fragments limitée

Le choix du vecteur dépend de la taille de l'ADN à cloner.

II/ Différentes méthodes de transformation des cellules

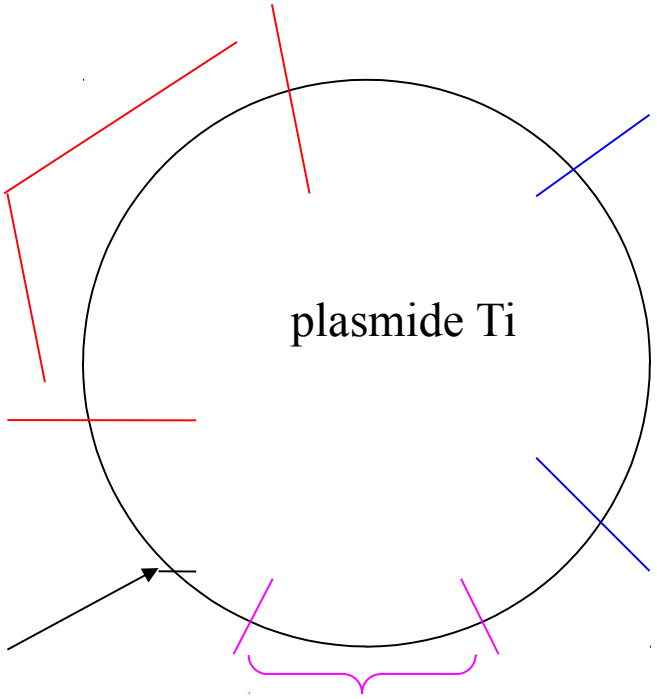
1) Transformation des bactéries

- Travail avec des bactéries compétentes (dont la membrane a été préalablement fragilisée)
- Mélange ADN et bactéries
- Stimulation de l'entrée de l'ADN par choc thermique ou choc électrique

2) Transformation des cellules végétales
a) Utilisation de *Agrobacterium tumefaciens*

Transformation par ***Agrobacterium tumefaciens*** (bactérie responsable de la galle du collet : développement d'une tumeur au niveau du collet)

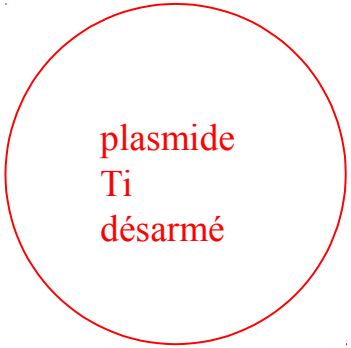
<u>Mécanisme naturel :</u> la bactérie possède un grand plasmide Ti (Tumor induction) important pour l'intégration de l'ADN bactérien (ADN-T) dans la plante hôte



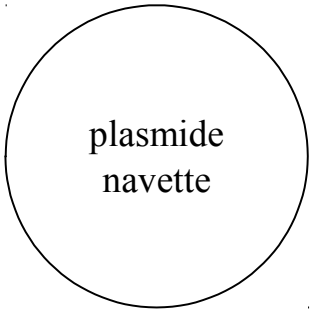
ADN-T
- Extrêmité
- Gènes pour synthèse d'auxine et cytokine (perturbation de la balance hormonale de la cellule végétale => multiplication incontrôlée des cellules : apparition d'une tumeur)
- Gène pour synthèse d'opines (substrat utilisable pour la bactérie mais pas pour la cellule végétale)
- Extrêmité

2) Transformation des cellules végétales
a) Utilisation de *Agrobacterium tumefaciens*

Modification du plasmide Ti pour utilisation en biotechnologie :



Plasmide avec les gènes de virulence, mais pas l'ADN-T



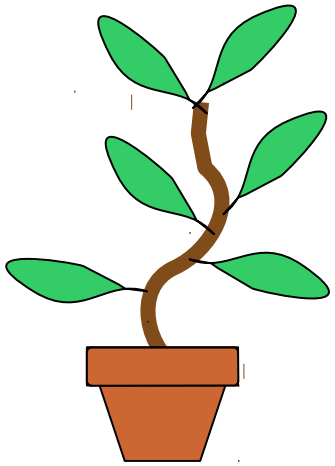
Plasmide comportant l'ADN à transférer dans la cellule végétale :
- Extrémités de l'ADN-T bactérien (nécessaires au transfert d'ADN dans la cellule végétale)
- Entre les extrémités bactériennes : gène d'intérêt à transférer
+ gène de sélection pour criblage des cellules transformées

Vecteurs binaires (plasmide désarmé et plasmide navette) dans A*grobactérium* : transfert du plasmide navette aux cellules végétales

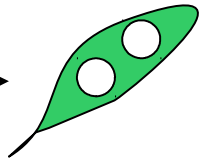
2) Transformation des cellules végétales

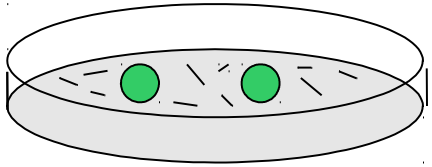
a) Utilisation de *Agrobacterium tumefaciens*

Méthode de transformation :



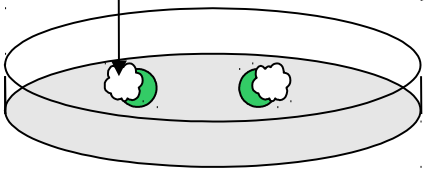
Récupération de disques foliaires





Incubation des disques foliaires avec *Agrobactérium* génétiquement modifiées

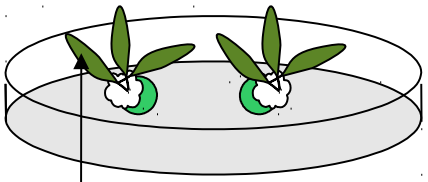
cal : massif de cellules indifférenciées



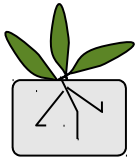
Culture sur milieu sélectif : prolifération des cellules transformées seulement

Végétal génétiquement modifié

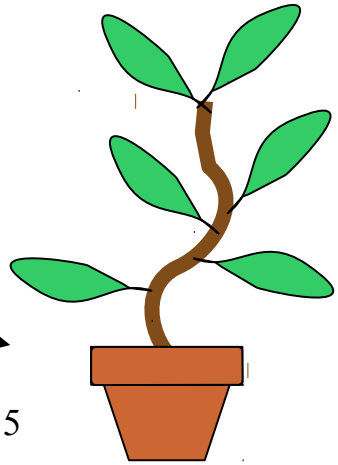
Culture sur milieu induisant la caulogenèse



pousse



Repiquage des pousses sur milieu induisant la rhizogenèse



2) Transformation des cellules végétales
b) Autres méthodes

Transfert direct de gènes dans des protoplastes végétaux

- Les protoplastes sont obtenus après digestion de la paroi de la cellule végétale
- Introduction de l'ADN avec du polyéthylène glycol (polymère qui provoque la fusion des membranes plasmiques, déstabilisation locale et réversible de la membrane), électroporation (choc électrique qui déstabilise transitoirement la membrane), biolistique
- régénération pour obtenir plante avec cellules transformées

Rq : des techniques de biolistique peuvent également être utilisées :

- pour introduction dans des protoplastes ou des cellules entières
- ADN nu précipité sur des billes de tungstène ou or, injection de ces microprojectiles (1micron de diamètre) par propulsion

3) Transformation des cellules animales
a) Méthodes

- Transfection par un processus d'infection virale (souvent des adénovirus ou rétrovirus, cela dépend des types cellulaires utilisés. Les virus sont génétiquement modifiés pour contenir la séquence d'intérêt et ne pas être infectieux)
- Transfection d'ADN (sous forme d'un plasmide):
    - souvent, association de l'ADN à des molécules chargées positivement pour favoriser le rapprochement avec la membrane plasmique
    - liposomes : piégeage de l'ADN dans des vésicules artificielles entrant dans la cellule par endocytose
    - électroporation : Une brève impulsion électrique crée des pores transitoires permettant l'entrée de l'ADN dans la cellule
    - biolistique
    - micro-injection : injection directe dans le noyau

3) Transformation des cellules animales
a) Méthodes

- Type de transfection choisi dépend des cellules à transformer... Micro-injection la plus efficace mais nécessite un très gros appareillage par exemple
- Importance du choix du vecteur (dépend des cellules à transformer...)
- Le vecteur doit cependant contenir des éléments clés :
    - origine de réplication bactérienne et gène de sélection pour amplification dans les bactéries
    - séquences eucaryotes nécessaires à la transcription (promoteurs) et à la maturation des transcrits (signaux d'épissage, de polyadénylation...)
    - gène à exprimer
    - éventuellement un marqueur de sélection pour réaliser des transfections stables (permanentes)

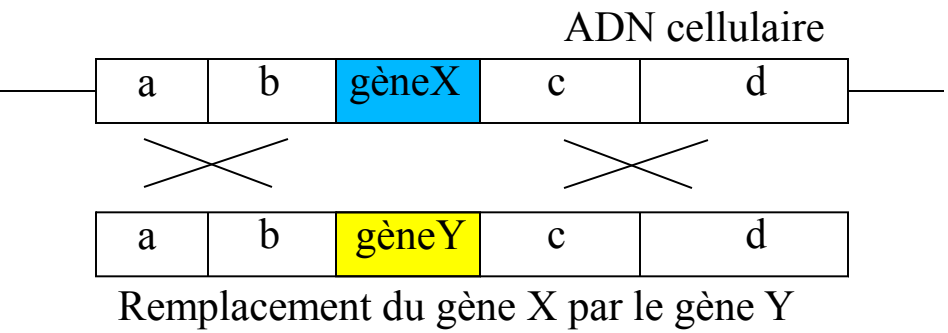
3) Transformation des cellules animales
b) Transfection stable ou transitoire

- Pour de nombreuses expériences (profil d'expression des protéines, purification de protéines associées...), une **transfection transitoire** suffit. Le plasmide non intégré dans le génome (reste sous forme de plasmide) peut s'exprimer 24h à 72h après la transfection, ensuite il est perdu.

- Dans certains cas (thérapie génique par exemple : apport d'un gène à une cellule malade, pour remplacer un allèle mutant par un allèle fonctionnel), la **transfection doit être stable**. Le plasmide doit être intégré au génome de la cellule, afin d'être conservé lors des divisions cellulaires.

3) Transformation des cellules animales
b) Transfection stable ou transitoire

- L'insertion d'un fragment d'ADN étranger dans le génome est un évènement rare. Le plasmide transfecté porte, en plus du gène d'intérêt, un gène de résistance à une drogue. La culture des cellules avec un milieu contenant la drogue permet de sélectionner les cellules stablement transfectées. (Des rétrovirus peuvent aussi être utilisés pour insérer le gène d'intérêt dans le génome. Des tests cliniques de thérapie génique ont été faits avec ces virus)
- Cependant l'endroit d'insertion de l'ADN transfecté dans le génome n'est pas connu, et cela peut perturber d'autres fonctions cellulaires. Il est possible de cibler l'insertion par **recombinaison homologue**.



Remplacement du gène X par le gène Y

La recombinaison homologue fait appel à la machinerie cellulaire. Elle est très efficace chez les bactéries, mais peu pour des cellules animales.

3) Transformation des cellules animales
c) Thérapie génique, transgenèse, clonage

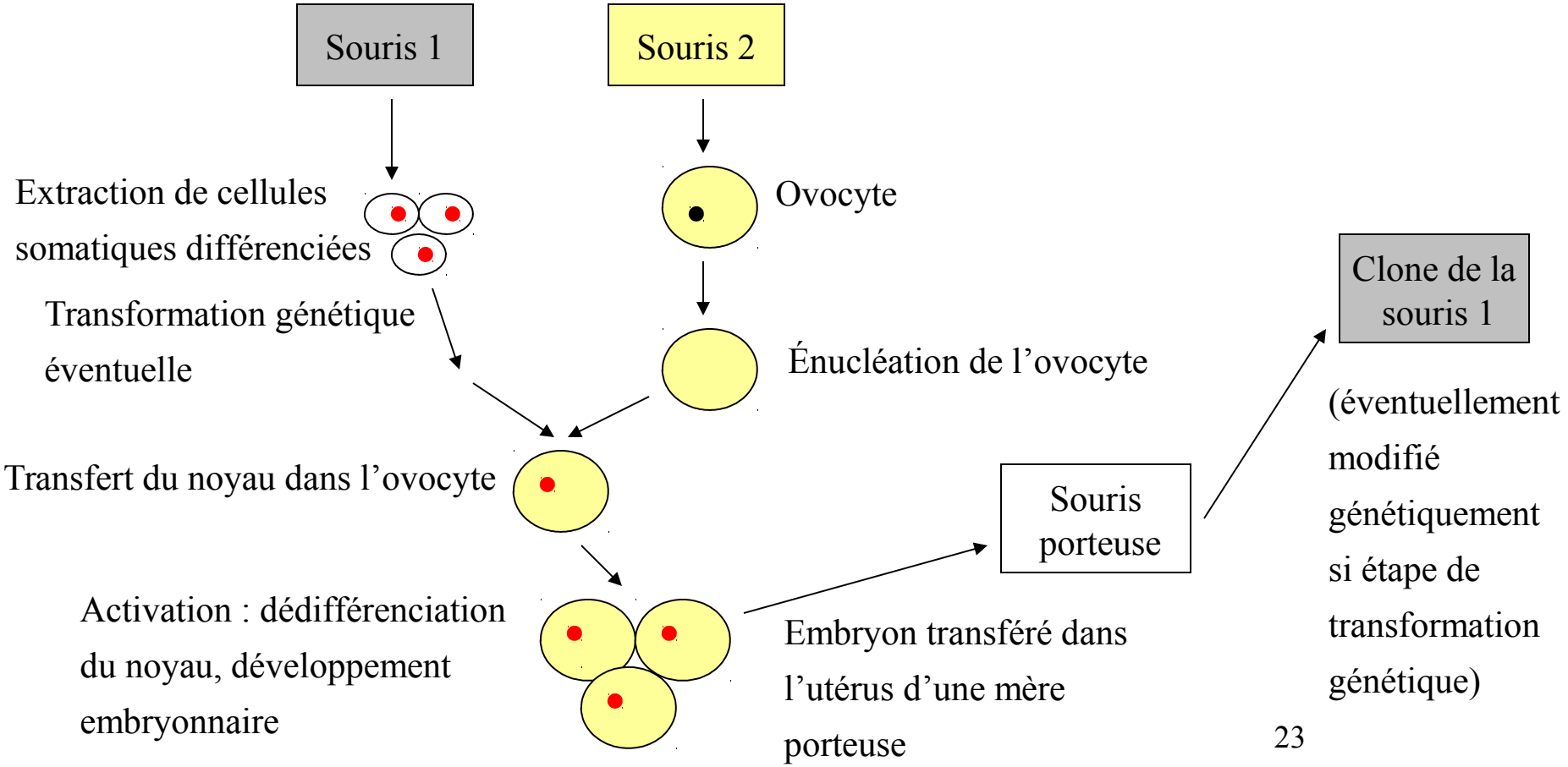
- La **thérapie génique** consiste à transférer un gène dans les cellules d'un malade pour corriger l'absence ou la déficience d'un (ou plusieurs) gène responsable de la maladie. On peut procéder par une *injection directe* dans les cellules ou en utilisant des *virus non pathogènes*, de façon *in vivo* ou *ex vivo* (prélèvement des cellules, transformation puis réinjection des cellules). De nombreuses études sont menées dans le cas des cancers. Pour le moment, les essais cliniques n'ont pas été couronnés de succès, mis à part une tentative de traitement des enfants bulles (Alain Fisher). Cela vient des problèmes liés au vecteur peu efficaces pour la transformation, à la mauvaise connaissance des fonctions précises des gènes (réseaux de régulation complexes chez l'homme)… Dans ce cas, **seules des cellules somatiques sont affectées par la modification génétique**.

3) Transformation des cellules animales
c) Thérapie génique, transgenèse, clonage

- La **transgenèse vise à modifier la majorité des cellules, voire à affecter la descendance**. Le plus courant est la microinjection du gène étranger dans les pronoyaux de l'embryon au stade une cellule. Aujourd'hui les embryons sont produits *in vitro*, ils sont micro-injectés et cultivés jusqu'au stade blastocyste avant d'être transférés dans des femelles pseudogestantes. Les cellules somatiques de la descendance sont alors testées pour la présence du transgène. L'expression du transgène peut être restreinte à des cellules particulières. L'efficacité de la transgenèse n'est pas très élevée. La transgenèse peut être associée aux techniques de clonage.

3) Transformation des cellules animales
c) Thérapie génique, transgenèse, clonage

- Le **clonage est la production d'organismes génétiquement identiques**. Technique de clonage par *transfert de noyau* :



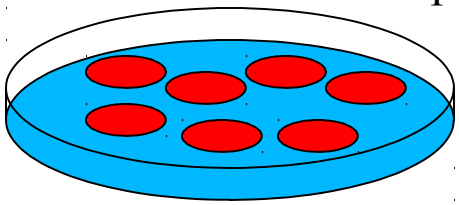
C/ Applications de la technologie de l'ADN recombinant

I/ Intérêts scientifiques

- Possibilité de **cartographier le génome** :
  - **cartographie chromosomique** (position des locus géniques les uns par rapport aux autres avec l'hybridation *in situ*)
  - **cartographie physique** = cartographie des sites de restriction
  - **séquençage** : caractérisation des gènes de différentes espèces (étude du nombre de gènes, du polymorphisme... dans un cadre fonctionnel et évolutif) ; caractérisation des nombreuses séquences non codantes du génome...

1) Intérêts scientifiques

- Etude des gènes à grande échelle :
  - On peut constituer des **banques génomiques ou d'ADNc** (ensemble de clones bactériens contenant un fragment du génome ou d'ADNc (obtenus à partir des ARNm))
  - Possiblités de **cribler la banque** : identification de gènes exprimés dans des conditions particulières par exemple :

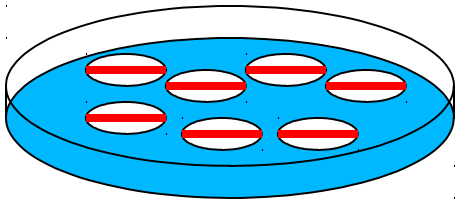


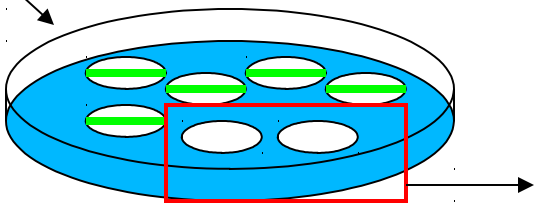
Banque d'ADNc de cellules cultivées en condition de stress

Sondes ADNc marquées correspondants aux ARNm présents en condition de stress

Sondes d'ADNc obtenues à partir des ARNm de cellules cultivées sans stress

Répliques sur membrane, hybridation avec les sondes, lavages et révélation

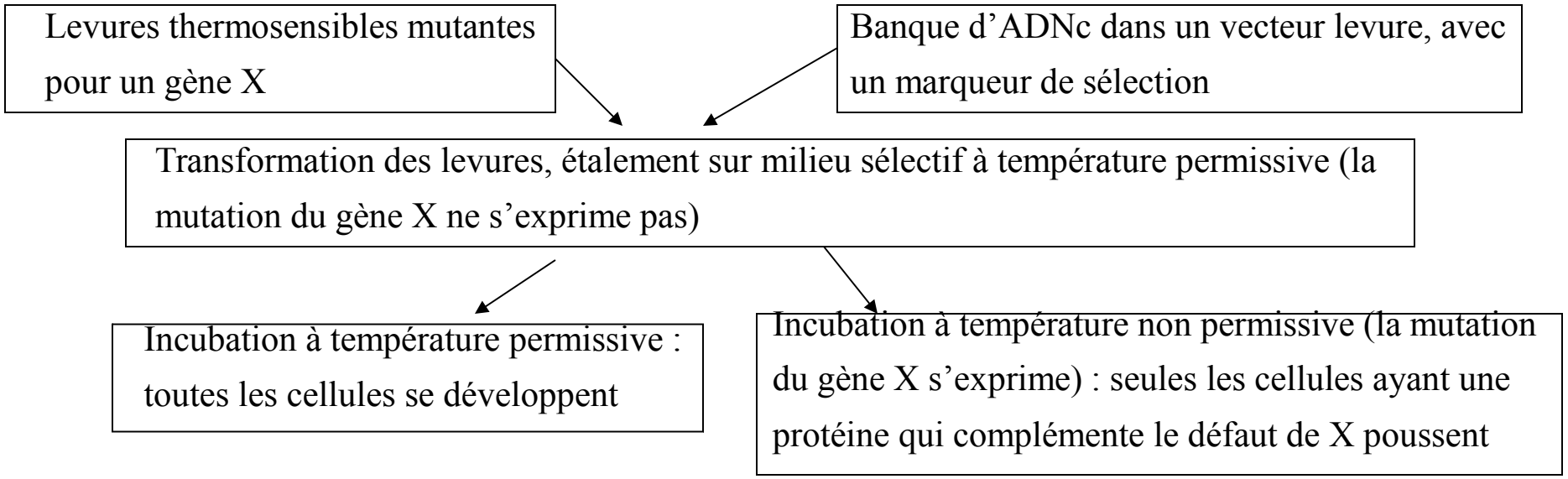




Ces deux clones contiennent des ARNm seulement présents en condition de stress => expression de gènes induits par le stress

1) Intérêts scientifiques

- Etude des gènes à grande échelle :
  - De nouveaux gènes peuvent être identifiés dans les banques. Ils peuvent être caractérisés notamment par **complémentation hétérologue** :



- Étude du fonctionnement des gènes : caractérisation de la **fonction d'un gène** (complémentation hétérologue, mutagenèse, étude des partenaires des protéines…) et de l'**expression d'un gène** (patron d'expression avec techniques d'hybridation, gènes rapporteurs…)
- Étude du développement au travers du clonage…

II/ Intérêts biomédicaux

2) Intérêts biomédicaux

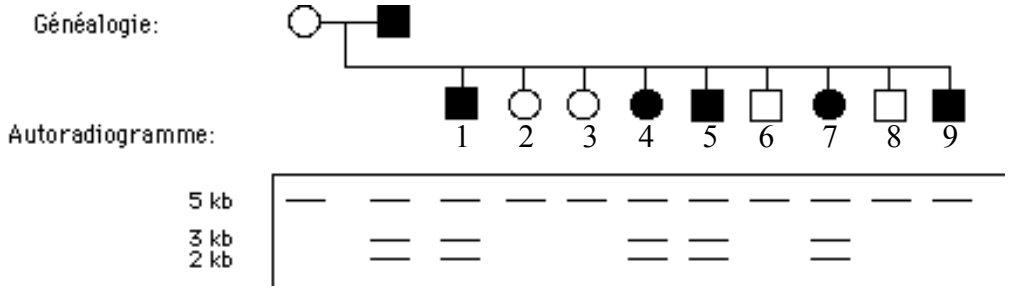
- Clonage de gènes codant pour des protéines responsables de maladies ; **étude de leurs diverses propriétés afin de trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques**
- Recherche en **thérapie génique**
- Mise en place de **modèles animaux** pour étudier les maladies humaines à partir de la **transgenèse**
- Recherche sur les **xénogreffes** (comment rendre les organes du porc compatibles pour l'homme ? ; transgenèse chez le porc)
- **Diagnostic** : la cartographie de restriction met en évidence un **polymorphisme de longueur des séquences de restriction (RFLP)**. Les individus n'ont pas les mêmes profils de restriction entre eux, mais ces profils montrent une similitude familiale. Ceci permet notamment des identifications (criminologie) et la détection de gènes anormaux.

2) Intérêts biomédicaux

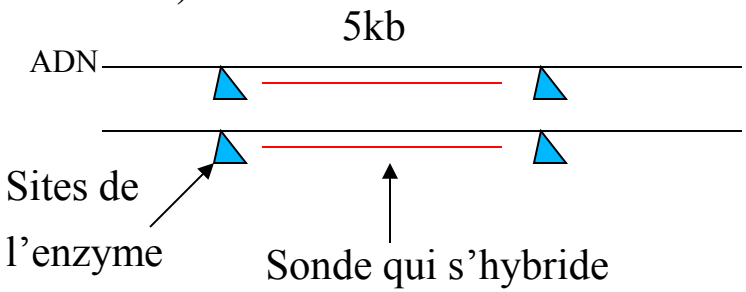
Diagnostic et RFLP : *étude d'un exemple*

Des études de polymorphisme d'ADN ont été effectuées sur une famille nombreuse qui présente une maladie génétique à caractère dominant. Un échantillon d'ADN de chacun des membres a été digéré. Les fragments de restriction ont été séparés par électrophorèse. Une hybridation de type Southern a ensuite été réalisée au moyen d'une sonde constituée d'une partie d'ADN humain cloné dans un plasmide bactérien.

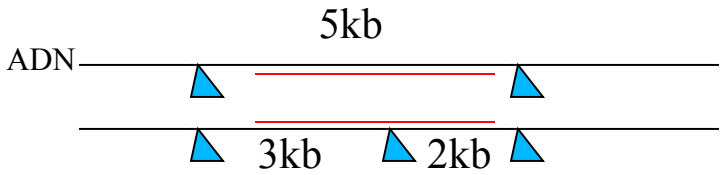
L'autoradiogramme correspondant (image obtenue du gel après hybridation) est schématisé en dessous de chacun des membres de la famille, les individus affectés sont indiqués en noir (rond: sexe féminin, carré: masculin).



(tiré de http://www.montpellier.inra.fr/biochimie/td/UB/sommaire_exos.html)



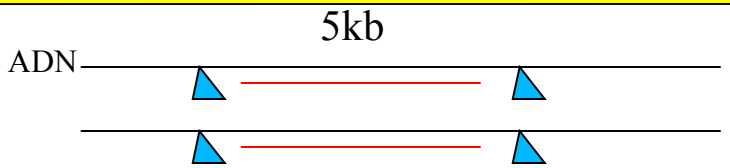
Dans ce cas : 2 fragments de 5kb => cas des individus sains



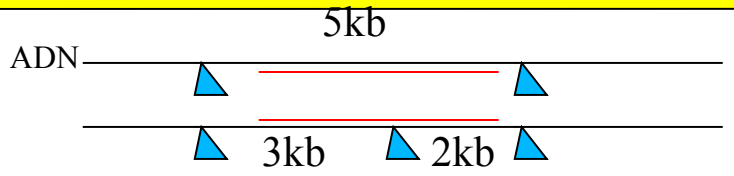
Dans ce cas : 1 fragment de 5kb, un de 3kb et un de 2kb => Cas des individus malades

2) Intérêts biomédicaux

Diagnostic et RFLP : *étude d'un exemple*

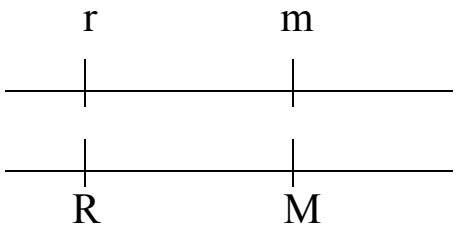


Dans ce cas : 2 fragments de 5kb => cas des individus sains



Dans ce cas : 1 fragment de 5kb, un de 3kb et un de 2kb => Cas des individus malades

On voit une corrélation entre la présence de l'allèle malade et la présence d'un site de restriction supplémentaire chez les individus malades. Le polymorphisme de restriction permet donc un diagnostic de la maladie. Mais ceci a ces limites. Regardons le cas du dernier fils sur l'arbre généalogique. Il est malade pourtant il ne présente qu'un seul fragment de 5kb. Que s'est-il passé ? Il y a eu une recombinaison entre le site de la maladie M (M allèle sain/m allèle de la maladie) et le site de restriction R (R site absent, r site présent).



Génotype du père malade

Gamètes possibles :

R,M → Reçus par les enfants 2, 3, 6 et 8

r,m → Reçus par les enfants 1, 4, 5 et 7

R,m → Reçu par le fils 9 :allèle dominant de la maladie, mais absence du site de restriction

r,M

La mère est (M/M, R/R) => gamète (R,M)

2) Intérêts biomédicaux

Diagnostic et RFLP : *étude d'un exemple*

Les marqueurs de polymorphisme de restriction peuvent être utilisés pour faire un diagnostic prénatal, mais ils peuvent être perdus par recombinaison.
D'autres marqueurs peuvent être utilisés, notamment les répétitions variables d'unité de séquence
(VNTR : nombre variable de répétition en tandem).

Dans tous les cas, un marqueur doit être fréquemment répété dans le génome, et présenter un polymorphisme.

Afin de faire un diagnostic prénatal , on peut faire une **amniocentèse** (extraction d'une petite quantité de liquide amniotique de la cavité amniotique contenant le fœtus).

III/ Intérêts industriels et agroalimentaires

INTERETS INDUSTRIELS :

- Fabrication de molécules peu onéreuses et commercialisables :
  - production d'hormones protéiques (insuline...)
  - production de protéines pour fabrication des vaccins
  - productions de facteurs anti-coagulants...

INTERETS AGROALIMENTAIRES :

- Production d'animaux ou végétaux transgéniques:
  - pour les rendre plus résistants aux facteurs externes (exemple : plantes résistantes aux herbicides...)
  - pour améliorer leur qualité
  - pour augmenter leur vitesse de croissance

Débordements possibles et nouvelles perspectives

- La technologie de l'ADN recombinant a permis des progrès très rapides quant à la connaissance des génomes, l'étude de leur fonctionnement… Mais elle laisse planer quelques craintes. Quelle est la limite entre clonage thérapeutique et clonage reproductif ????
- Le problème principal des greffes est le rejet. Si les cellules provenaient de l'individu en question, il n'y aurait plus d'incompatibilité. Ceci est possible dans l'hypothèse du clonage thérapeutique :

Transfert du noyau du donneur dans un ovocyte énucléé → Obtention de cellules totipotentes → Dans de bonnes conditions de culture, les cellules peuvent se différencier en un type souhaité (cellules nerveuses, du foie…) => **Clonage thérapeutique**

Obtention de cellules totipotentes ↓ MAIS : si on laisse cet embryon se développer : **clonage reproductif** !!! On obtient un individu identique au premier

Débordements possibles et nouvelles perspectives

- Les cellules embryonnaires sont des cellules souches multipotentes pouvant s'engager dans des voies particulières de différenciation. Le travail sur des cellules embryonnaires soulèvent beaucoup de problèmes d'éthique.
- Mais on a découvert dans tous les organes d'adulte des cellules souches qui pourraient être différenciées et réinjectées chez l'individu sans problèmes immunologiques.