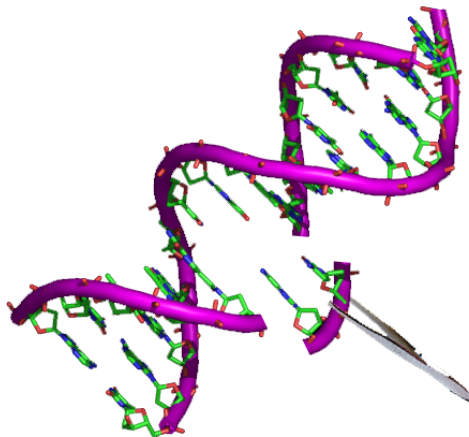


République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Amar Telidji-Laghouat
Faculté des Sciences
Département des Sciences Agronomiques

Polycopié de cours :

Master 2 Agroalimentaire Et Contrôle De Qualité



Aliments OGM

20/10/2021

Dr. MALLEM Hamida

Avant propos

Les organismes génétiquement modifiés (OGM) représentent une composante importante du marché mondial de l'alimentation humaine et animale, le taux de croissance des cultures génétiquement modifiées cultivées a augmenté de plus de 10% par an et a atteint 181,5 millions d'hectares dans le monde. Parallèlement à ce développement rapide des cultures GM, le public est toujours préoccupé par les risques potentiels des plantes GM et leurs dérivées. De ce fait une législation d'application a été mise en place pour vérifier la conformité avec les réglementations locales afin de donner le libre choix aux consommateurs, cette réglementation n'est néanmoins pas toujours appliquée, ce qui crée chez les consommateurs un profond doute et une non crédibilité quant aux produits importés tel que le maïs, le soja et le riz. L'utilisation d'organismes génétiquement modifiés et leur dérivés dans la chaîne alimentaire doit être soumise à une réglementation stricte et l'étiquetage des aliments doit être obligatoire.

Par conséquent, la mise au point de méthodes fiables pour la détection des OGM, leur identification, quantification et leur traçabilité est devenu de plus en plus importante. Afin d'exécuter ces règlements sur l'étiquetage des OGM, il est essentiel de développer et de standardiser de façon efficace et crédible les méthodes d'analyse pour le contrôle du contenu GM dans les produits alimentaires ainsi que dans les aliments pour animaux.

Dans ce contexte, le présent polycopie de cours aliments OGM (Les aliments issus des organismes génétiquement modifiés) est un cours destiné au étudiants du Master 2 de la spécialité Agroalimentaire et contrôle de qualité, c'est un cours inclut dans l'unité fondamentales de la spécialité. Dans ce cours l'étudiant apprendra à identifier un aliment OGM, les avantages et les risques que peut présenter cet aliment pour la santé et l'environnement. L'étudiant devra aussi savoir des notions de génétique moléculaire (ADN et sa réplication, la notion des gènes et de la synthèse des protéines, les techniques du clonage ...).

Ce cours est scindé en 10 chapitres, en commençant par des généralités sur la situation des OGM dans le monde, ensuite des rappels sur la structure de l'ADN et sa réplication , la synthèse des protéines , les techniques du clonage et les vecteurs utilisés . avant d'apprendre a l'étudiant comment analyser un aliment OGM, il apprendra comment on fabrique cet OGM, il apprendra aussi la technique de PCR et d'autres techniques qui lui serviront d'éléments complémentaire dans sa formation, ce cours est consolidé au fur et à mesure par des exercices et des test comme travaux dirigés. 53 figures et 3 tableaux sont inclus. Les dix chapitres sont présentés comme suit :

- Chapitre 1 : Généralité et historique sur les OGM
- Chapitre 2 : Structure et Réplication de l'ADN
- Chapitre 3 : Les enzymes de restriction
- Chapitre 4 : Le génie génétique et le clonage d'ADN
- Chapitre 5 : Fabrication d'un OGM
- Chapitre 6 : Techniques de transfert de l'ADN recombinant
- Chapitre 7 : Méthodes de détection des aliments OGM
- Chapitre 8 : Etiquetage des aliments OGM
- Chapitre 9 : Les risques et les avantages des OGM
- Chapitre 10 : Séries de Travaux dirigés

Dr . MALLEM Hamida

Liste des abréviations

	: Double dimensions
A	: Adénine
aa	: Acide aminé
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ARN	: Acide ribonucléique
ARNm	: Acide ribonucléique messenger
ARNr	: Acide ribonucléique ribosomique
ATP	: Adénosine triphosphate
BAC	: Bacterial artificial chromosome
BM	: Biologie moléculaire
C	: Cytosine
CaCl₂	: Chlorure de calcium
cDNA	: Acide désoxyribonucléique complémentaire
CHO	: Chinese Hamster Ovary
CMV	: Cytomégalovirus
<i>E. coli</i>	: Escherichia coli
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
G	: Guanine
GTP	: Guanosine triphosphate
Kb	: Kilobase
kDa	: Kilodalton
Mg⁺²	: Magnésium
min	: Minute
P	: Phosphore
pb	: Paire de base
PCR	: Polymerase chaine reaction
pH	: Potentiel hydrogène
PM	: Poids moléculaire
rHGH	: Hormone de croissance recombinante humaine
rNTP	: Ribonucléotides triphosphate
RT-PCR	: Reverse transcriptase polymerase chaine reaction
SDS	: Sodium-dodécyl sulfate
T	: Thymine
Taq	: Thermus aquaticus
Tm	: Temperature de fusion
YAC	: Yeast Artificial Chromosome

SOMMAIRE

Chapitre 1 : Généralité et historique sur les OGM	1
1.1 L'histoire du génie génétique :	1
1.2 L'aliment et la biotechnologie	1
1.3 La biotechnologie	2
1.4 Les organismes génétiquement modifiés	3
1.4.1 Définition OGM	3
1.4.2 La transgénèse	4
1.4.3 Les cinq catégories de gène en cause:	5
1.4.3.1 La résistance aux insectes	5
1.4.3.2 Les gènes conférant une résistance à certains herbicides	5
1.4.3.3 Les gènes marqueurs codant une résistance aux antibiotiques.	6
1.4.3.4 Gènes entraînant la « stérilité du mâle »	7
1.4.3.5 Gènes servant à en réduire d'autre au silence.	7
1.4.4 Les différents domaines d'utilisation des OGM	8
1.5 La Situation mondiale des OGM	9
1.5.1 Les pays producteurs de plantes génétiquement modifiées	10
Chapitre 2 : Structure et Réplication de l'ADN	12
2.1 La structure de l'ADN	12
2.1.1 Différences entre l'ADN et l'ARN	14
2.2 La réplication de l'ADN	15
Chapitre 3 : Les enzymes de restriction	22
3.1 Définition des enzymes de restriction	22
3.2 Méthode de la digestion des plasmides	24
Chapitre 4 : Le génie génétique et le clonage d'ADN	31
4.1 Définition du génie génétique	31
4.2 Construction d'une banque d'ADN : clonage de gène.	31
4.2.1 Préparation d'une banque d'ADN à l'aide d'enzymes de restriction (banque d'ADN génomique)	31
4.2.1.1 Préparation de l'ADN	31
4.2.1.2 Les vecteurs de clonage.	33
4.2.1.3 Insertion dans les vecteurs de clonage.	33
4.2.1.4 Transformation des cellules	33
4.2.1.5 Sélections des cellules transformées	35
4.2.1.6 Sélection des clones intéressants dans une banque d'ADN	36
4.2.2 Préparation d'une banque d'ADN à partir d'ARNm (banque d'ADNc)	38
4.3 Expression des gènes clones dans les microorganismes.	39
4.3.1 Promoteurs de transcription.	39

4.3.2	Terminateurs	40
4.3.3	Exemple de production : le cas de l'insuline humaine	40
Chapitre 5 : Fabrication d'un OGM		44
5.1	l'ADN recombinant	44
5.1.1	Le Clonage	44
5.1.2	But de l'ADN recombinant	44
5.2	Les proteines recombinantes	45
5.3	Les cellules hôtes d'un OGM	46
5.3.1	<i>Escherichia coli</i>	46
5.3.2	D'autres bactéries	46
5.3.3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	46
5.3.4	D'autres levures et champignons filamenteux	47
5.3.5	Cellules CHO (Chinese Hamster Ovary)	47
5.3.6	Des cellules d'insectes (<i>Spodoptera frugiperda</i>)	47
5.3.7	Cellules des animaux	47
5.3.8	Cellules végétales	49
5.4	Synthèse des protéines (rappel)	49
5.4.1	La transcription	49
5.4.2	La traduction	49
5.5	Production de protéine recombinante	50
5.5.1	Etapes Production de protéine recombinante	50
5.5.2	Clonage dans un vecteur d'expression	56
5.5.3	Propriétés des vecteurs de clonage	57
5.5.4	Différents vecteurs de clonage	57
5.5.5	La Ligation (ligature...)	58
5.5.6	La Transformation/transfection dans une cellule hôte	59
Chapitre 6 : Techniques de transfert de l'ADN recombinant		60
6.1	Techniques de transfert direct	60
6.1.1	L'électroporation	60
6.1.2	La micro-injection	61
6.1.3	La biolistique	62
6.1.4	La lipotransfection	62
6.2	Techniques de transfert indirect	64
6.2.1	La transfection biologique	65
Chapitre 7 : Méthodes de détection des aliments OGM		68
7.1	Détection des protéines recombinantes	68
7.1.1	Le Test ELISA	68
7.1.1.1	Description de la méthode Elisa	69
7.1.2	Les Strip tests	70
7.1.2.1	Cibles	71
7.1.2.2	Champ d'application	71
7.2	Détection des OGM par extraction d'ADN recombinant	71
7.2.1	La méthode PCR (real time)	71

7.2.2	La puce à ADN	79
7.2.2.1	Description des puces à ADN	80
7.2.2.2	Nature et choix des ADN déposés sur la puce	82
7.2.2.3	Utilisation des puces	82
7.2.3	Les méthodes Southern blot et Northern blot	82
7.2.3.1	Southern blot	82
Chapitre 8 : Etiquetage des aliments OGM		85
8.1	Les différents types des produits OGM	85
8.2	Normes de l'étiquetage des aliments OGM	85
Chapitre 9 : Les risques et les avantages des OGM		88
9.1	Les risques des OGM	88
9.1.1	Les OGM et la santé	88
9.1.2	Les OGM et l'environnement	89
9.2	Les avantages des OGM	91
9.2.1	Les OGM et la santé	91
9.2.2	Les OGM et l'environnement	94
9.2.3	Les OGM et l'agriculture	95
Chapitre 10 : Séries de Travaux dirigés		99
Td 1 : Structure de l'ADN		99
Td 2 : Purification de l'ADN. QCM		101
Td 3 : ADN recombinant et enzymes de restriction		105
Td 4 : Complimentarité des bases nucleiques		119
Td 5 : Propriétés des acides nucléiques (ADN, ARN).		124
Références bibliographiques		131
Annexe , programme du module Aliment OGM		

Liste des figures

Fig.1 : Principaux pays producteurs et cultures des OGM dans le monde	11
Fig.2 : structure des bases azotées et du désoxyribose	12
Fig.3 : Structure de l'ADN	13
Fig.4 : Comparaison entre la structure de l'ADN et de l'ARN	15
Fig.5 : Schéma général de la fourche de réplication de l'ADN	16
Fig.6 : fonction de l'Helicase et la topoisomérase	17
Fig.7. Description de l' Extrémité OH' libre et la liaison entre nucléotides	19
Fig.8 : Exemple d'enzyme de restriction commercialisée	22
Fig.9 : Un schéma représentant la coupure de l'ADN par l'enzyme <i>EcoRI</i>	23
Fig.10 : Schéma des plasmides bactériens	24
Fig.11 : Description du plasmide PUC19 et le PUC19-TIF	25
Fig.12. Schéma de l'expérience de la digestion des plasmides	25
Fig.13 : Migration des échantillons sur gel d'agarose	27
Fig.14 : Exemple Electrophorese : Separation de des brins d'ADN de deux plasmides (pUC) coupés par des enzymes de restrictions de 2 bacteries differentes Bam HI et MspI	29
Fig.15 : Séquence du plasmide PUC 19	30
Fig.16 : Insertion d'un fragment d'ADN dans un plasmide	33
Fig.17 : transformation bactérienne par des plasmides recombinés s et non recombinés	34
Fig.18 : obtention des plasmides recombinés	35
Fig.19 : méthodes de sélection et criblage des cellules transformées dans un milieu de culture	36
Fig.20 : Détection de l'ADN recombiné par l'utilisation d'une sonde radioactive	37
Fig. 21 : Synthèse de L'ADNc à partir d'un ARNm	38
Fig.22 : Schéma de l'opéron Lactose	40
Fig.23 : Le plasmide PBR322	41
Fig.24 : schéma de production d'insuline	43
Fig. 25 : <i>Escherichia coli</i> (x15000) Wikipedia	45
Fig.26 : <i>Bacillus subtilis</i>	46
Fig.27 : <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	46
Fig.28 : Levures et champignons hôtes pour les protéines recombinantes	48
Fig.29 : Synthèse des protéines	50
Fig. 30 : Principe du clonage	51
Fig.31 : Amplification de l'ADN génomique (gène d'intérêt) par la PCR	51
Fig.32 : La conversion de ARNm en ADN par l'utilisation de la technique de RTP	51
Fig.33 : Modes d'action des enzymes de restriction.	56
Fig.34 : Les ligases qui catalysent la formation d'une liaison phosphodiester entre deux segments d'ADN.	59
Fig.35 : Représentation schématique de la méthode de l'électroporation	61
Fig.36 : Schéma récapitulatif de la micro-injection	62
Fig.37 : La biolistique	63
Fig.38 : La lipotransfection	64
Fig.39 : Schéma de la conjugaison bacterienne	65
Fig. 40 : <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	66
Fig.41 : Schéma récapitulatif des différentes étapes de la transfection biologique	67

Fig.42 : Méthodes immunologiques	70
Fig. 43 : L'expression des gènes est régulée par un promoteur et par un terminateur	73
Fig.44 : La PCR méthode d'amplification du fragment D'ADN	76
Fig. 45. Résultat d'une PCR	78
Fig.46 : Types de puce à ADN	88
Fig.47 : Représentation schématique d'une portion de puce à ADN.	81
Fig. 48 : Schéma de principe du Southern blot (ADN)	83
Fig. 49 : Schéma de principe du Northern blot (ARNm)	83
Fig.50 : Normes d'étiquetage des aliments OGM	86
Fig.51 : Mentions obligatoire d'étiquetage	87
Fig. 52 : Codes démontrant un produit OGM	87
Fig.53: Aspect du maïs transgénique et non transgénique, infesté par la larve de Pyrale	90
Fig.54 : La tomate transgénique	91

Liste des tableaux

Tableau1 : Description de la composition des tubes de digestion des plasmides	26
Tableau 2 : Exemples de protéines recombinantes	45
Tableau 3 : Taille maximum approximative du fragment d'ADN qui peut être cloné dans chaque vecteur)	57

Chapitre 1 : Généralité et historique sur les OGM

1.1 L'histoire du génie génétique

La structure en double hélice de l'acide désoxyribonucléique (ADN) est élucidée par le biologiste américain James D. Watson et le biochimiste anglais Francis H.C. Crick en 1953. Cette découverte est le point de départ du développement spectaculaire de la génétique et de la biologie moléculaire.

En 1965, la présence et l'isolement des enzymes de restriction chez les bactéries permettent une avancée importante ; on peut maintenant découper l'ADN au niveau de sites précis et spécifiques à chaque enzyme. C'est ainsi que les chercheurs ont pu établir la cartographie des chromosomes et des gènes qui les composent. Le génome de nombreux végétaux a pu être étudié de façon précise et c'est au début des années 1980 que des techniques ont été développées pour isoler un grand nombre de gènes responsables d'événements majeurs dans l'évolution des plantes.

Ces cartes génétiques des espèces végétales ont permis la naissance du génie génétique. Le génie génétique est donc récent et ces méthodes ont étendu de façon importante les possibilités des biotechnologies, notamment en ce qui concerne l'amélioration des végétaux. » (Housset, 1999)

1.2 L'aliment et la biotechnologie

Housset (1999) a résumé l'ancienneté des biotechnologies « L'utilisation par l'homme d'organismes vivants à des fins de production de substances diverses, alimentaires ou non alimentaires » (KAHN, 1996). Cette définition induit le fait que depuis des millénaires l'homme est un "biotechnologue" (GROS, 1990), qu'il utilise sans le savoir de nombreux procédés pour améliorer ce qu'il trouve dans la nature. Il semble que depuis toujours l'homme et la nature soient indissociables ; en effet avant même de la comprendre, il chercha à la conserver, la modifier. Les premières pratiques humaines agricoles remontent à douze mille ans et l'homme s'efforçait déjà de choisir les meilleures plantes. Des le

Néolithique (-5000 ans avant J-C), il développa ses connaissances des plantes nutritives ou médicinales et de l'élevage.

Les techniques à l'œuvre dans la fermentation relevaient déjà des biotechnologies et l'utilisation des microorganismes sont immémoriale. Des exemples comme le fromage, la bière, le vin, le pain (symbole même de l'aliment) montrent l'emploi important des fermentations dans le domaine alimentaire et ceci dès l'Antiquité (FLANDRIN, MONTANARI , 1990) précise : ‘L'Archéologie prouve qu'il existait déjà de la bière au VI^e siècle avant J-C’ Les techniques, même modestes, peuvent donc être des témoins fidèles de nos civilisations, de la même façon que les vestiges de l'art et les textes littéraires ou philosophiques. Il faudra attendre le milieu du XIX^e siècle et les travaux de Pasteur pour identifier le rôle des microorganismes dans la fermentation ; celle-ci sera alors standardisée pour améliorer les procédés industriels : pour la première fois les connaissances biologiques acquises par l'homme servent l'industrie.

L'amélioration des plantes s'est par la suite renforcée avec la maîtrise des premières lois génétiques découvertes par Gregor Mendel en 1865. Dès 1900, les botanistes commencent, grâce à ces découvertes de la transmission des caractères héréditaires, à sélectionner les meilleures graines pour augmenter la productivité et la qualité des cultures.

En 1950, un nouveau pas est franchi avec les premières techniques de culture ‘in vitro’ qui ouvrent la possibilité de multiplier une plante à l'infini à partir de culture de fragments de tissus végétaux. Mais c'est avec la découverte de l'ADN que tout va s'accélérer. »

1.3 La biotechnologie

À première vue, le mot semble faire référence à une technologie faisant appel à la biologie, c'est-à-dire à l'étude des organismes vivants. C'est ce qu'on retrouve dans la première définition de la biotechnologie donnée en 1982 par l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economique) dans l'ouvrage Biotechnologie : tendances et perspectives internationales, et qui est encore admise aujourd'hui, à savoir : « **l'application des principes de la science et de l'ingénierie au traitement de matières par des agents biologiques dans la production de biens et de services** ». C'est une définition large, elle peut intégrer la culture de plantes et l'élevage d'animaux destinés à l'alimentation. Elle peut également signifier « l'utilisation de micro-organismes dans la production de produits alimentaires comme les yaourts, le fromage ou la bière, ou de produits pharmaceutiques comme les antibiotiques ». La définition est aussi suffisamment large pour inclure le recours à

des micro-organismes et à des plantes pour l'amélioration des procédés de production et pour le nettoyage de déchets chimiques.

Aujourd'hui, la biotechnologie est généralement assimilée au génie génétique, bien que certains préfèrent parler de « biotechnologie moderne », considérant qu'il s'agit d'une « sous-discipline ». [source : L'Observateur de l'OCDE, n° 216, mars 1999].

Il existe plusieurs définitions de la biotechnologie. Le secteur de la biotechnologie européen, surnommé « le secteur industriel des sciences de la vie » par Ernst & Young comptait 1 036 entreprises en 1997. La définition retenue par Ernst & Young s'applique aux entreprises qui utilisent des techniques modernes pour développer des produits et des services dans les domaines des soins de santé, des soins aux animaux, de l'agriculture, de la transformation des produits alimentaires, des ressources renouvelables et de l'environnement. Les entreprises qui utilisent des procédés biologiques traditionnels, telles que les brasseries ou les instituts à but non lucratif, n'entrent pas dans le champ de cette définition (Johnston, 1999).

1.4 Les organismes génétiquement modifiés

Les organismes génétiquement modifiés (OGM) sont des organismes dont le patrimoine génétique (l'ADN) a été transformé d'une manière qui ne survient pas spontanément dans la nature. Cette technologie moderne a plusieurs appellations courantes « biotechnologie moderne », « technologie génique », parfois aussi « technique de l'ADN recombinant » ou « génie génétique ». Elle permet de sélectionner des gènes à transférer d'un organisme à l'autre, même si ces organismes appartiennent à des espèces non apparentées. Ces méthodes permettent de produire des plantes génétiquement modifiées que l'on cultive et à partir desquelles on obtient les aliments transgéniques.

À travers que se déployés par Francine Casse (2000), Greenpeace (avril 2000) et Veronique Lorelle(1999) on peut tenter définit les OGM comme :

1.4.1 Définition OGM

Un organisme génétiquement modifié (OGM), est un organisme vivant qui a été créé artificiellement par l'homme en manipulant son patrimoine héréditaire.

Organisme issu des techniques très récent du génie génétique consistent à prélever un ou plusieurs gène de n'importe quelle organisme vivant (virus, bactérie ; animale , végétale) pour l'insérer dans le patrimoine génétique d'un autre organisme. A la différence des techniques antérieures d'amélioration des variétés agricoles, la transgénèse permet de franchir la barrière entre les espèces elle construit de nouveaux organisme vivant jusqu'à maintenant inconnues de la nature et de l'homme et de qui sont disséminés dans notre environnement, c'est-à-dire dans lequel l'homme a introduit des gènes provenant d'un autre organisme. Les cellules de cet organisme sont dès lors dotées de ce gène nouveau (dit transgénèse), et peuvent produire une protéine spécifique.

1.4. 2 La transgénèse

La technique du génie génétique –appelée **transgénèse**- consistent a extraire un ou plusieurs gènes d'un organisme (virus- bactérie- végétale ou animal), par exemple : d'une bactérie à une plante, ou d'un humain à un animal (par exemple dans un mouton) , et à les insérer dans le génome d'un autre organisme, d'une manière qui ne pourrait jamais se passer naturellement.

C'est transferts artificiels de gènes permettent de franchir les barrières entre espèces et produisent ainsi de nouvelle espèces jusqu'alors inconnus de l'homme et de l'environnement. Ces espèces modifiées dans leur structure génétique en particulier les plantes transgéniques, sont aujourd'hui disséminée dans la nature et la chaîne alimentaire à une très grande échelle sans que leurs impacts sur l'environnement et la santé n'aient été correctement évalués.

Le génie génétique permet de modifier les produits de l'agriculture pour leur apporter une meilleure résistance aux maladies, aux insectes ou aux produits chimiques. Les gènes qui permettent ces changements sont prélevés chez un grand nombre d'être vivants.

En laboratoire l'éventail est très large et concerne aussi bien la médecine que l'agriculture, par exemple la production d'anticorps humaine par des souris.

Ainsi, Pelt (1999) président de l'institut européen d'écologie et professeur émérite de l'université de Metz a publiée à la libération « Les organismes génétiquement modifiés(OGM) sont des chimères génétiques qui n'existaient pas il y a quelques années hors

des laboratoires, c'est-à-dire des hybrides ayant acquis des caractères des êtres vivants d'autres espèces, ou même d'autres règnes. Ainsi, l'on trouve dans le commerce du maïs avec du patrimoine génétique de virus ou de bactérie.

1.4.3 Les cinq catégories de gène en cause

Chesson et James (2000) distinguent cinq catégories de gènes en cause

1.4.3.1 La résistance aux insectes

Cette résistance est conférée aux plantes par des gènes codant une forme tronquée d'endotoxines protéiques fabriquées par certaines souches d'une bactérie du sol, *Bacillus thuringiensis*(BT). Il existe dans la nature de nombreuses formes de ces toxines, active sur différentes espèces d'insectes. Les plantes génétiquement modifiés résistantes aux insectes portent des gènes de type cry1(A), dont les produits sont spécifiquement toxiques pour des lépidoptères comme la pyrale.

Pendant près de quarante ans, tout en serre qu'en culture a ciel ouvert, on a utilisé comme pesticides des suspensions de bactéries productrices de ces toxines Cry1A, sans observer d'effet indésirable chez les personnes les manipulant ou chez les consommateurs des produits traités.

Ces pulvérisations sont officiellement, autorisées chez les producteurs 'bio' qui craignent fortement, aujourd'hui que les insectes soient en train de développer une résistance à leur endroit.

Le terme BT : initiales de *Bacillus thuringiensis*, bactérie naturelle des sols utilisée de longue date comme insecticide, plusieurs gènes insecticides de cette espèce ont été isolés et transférés par les technologies de biologie moléculaire dans le génome d'espèces végétales de grand culture comme le coton, le maïs, la pomme de terre .

1.4.3.2 Les gènes conférant une résistance à certains herbicides

En prévision de l'adoption par l'UE d'une législation favorable, on a introduit dans des plantes un gènes conférant une résistance à la fois à l'ammonium de glufosinate de

l'herbicide Basta (Basta est un herbicide fabriqué par AgrEvo , joint –venture entre Hoechst et scherling ‘group Avanti’) et au glyphosate du Roundup (Roundup est l'herbicide phare de Monsanto). Le glyphosate agit en inhibant une enzyme impliquée dans la synthèse d'acides aminés aromatiques nécessaires à la plante pour fabriquer ses nombreuses protéines et pour d'autre fonction.

On introduit dans la plante un gène bactérien codant cette même enzyme mais légèrement différente : elle reste capable de fabriquer les acides aminés tout en résistant aux effets du glyphosate. Les mauvaises herbes et les autres plantes sont donc tuées par l'herbicide, alors que la plante génétiquement modifiée prospère sans concurrence.

Il n'est pas inintéressant de savoir qu'on a identifié et commercialisé une lignée de maïs ‘naturellement’ résistant au glyphosate du fait d'une mutation aléatoire du gène codant l'enzyme cible. La culture de cette lignée résistante a été autorisée sans aucune étude préalable de la sécurité pour l'homme et pour l'environnement, bien qu'elle comporte théoriquement, elle aussi, des risques inconnus, comme le transfert du gène de résistance.

1.4.3.3 Les gènes marqueurs codant une résistance aux antibiotiques

On en a beaucoup parlé parce qu'ils font craindre que les bactéries pathogènes ne deviennent encore plus résistantes aux antibiotiques indispensables pour traiter les infections. Ces gènes ont été utilisés comme « marqueurs de sélection » pour faciliter le repérage des cellules dans lesquelles le gène voulu avait été introduit. Aujourd'hui cette fonction ne justifie plus le recours à ces gènes, qui témoigne plutôt de l'attitude cavalière de certaines firmes de biotechnologie face aux inquiétudes du public.

En pratique, les deux principaux marqueurs de sélection codant respectivement pour la résistance à la Kanamycine /neomycine et à la streptomycine, antibiotique très peu utilisés en médecine humaine.

Il existe bien un certain risque de voir ces gène de résistance se transformer et s'exprimer dans les bactéries normales du tube digestif, mais ce n'est pas très grave car environ 40% des micro-organismes de l'intestin humain sont déjà résistants à ces antibiotiques.

La nouvelle plante n'ajouterait donc pas grand-chose à cette masse de résistance bactérienne.

L'utilisation d'un gène de résistance à l'amikacine est en revanche plus préoccupante car il s'agit d'un antibiotique, majeur, que l'on réserve à certaines infections humaines particulièrement difficiles à traiter.

Tout le monde doit donc désormais admettre que l'utilisation des gènes de résistance aux antibiotiques n'est pas nécessaire et est même inacceptable.

1.4.3.4 Gènes entraînant la « stérilité du mâle »

C'est la fameuse technologie « **terminator** » à laquelle Monsanto a récemment renoncé. Le gène 'barnase' code une ribonucléase, et il est contrôlé de manière à ne s'exprimer que dans le pollen, où il s'oppose à l'expression des molécules d'acide ribonucléique nécessaires à la fécondité.

Ces gènes et sa contre partie, le gène « barstar », inhibiteur de la ribonucléase, ont été utilisés avec succès en Europe pour empêcher l'autofécondation et permettre la production de semences hybrides homogènes des salades.

1.4.3.5-Gènes servant à en réduire d'autre au silence

La technique consiste à introduire un exemplaire supplémentaire du gène cible, mais orienté en sens inverse (anti-sens) ou encore dans le sens normal mais sous une forme tronquée. La présence de cet exemplaire supplémentaire bloque le processus de l'enzyme cible.

L'exemple le plus connu est celui de la poly galacturonase responsable du ramollissement du fruit.

Deux demandes d'autorisation ont également été déposées en Europe pour des pommes de terre dont les synthèses granulaires sont inhibées afin de produire un amidon doté de propriétés intéressantes pour l'industrie.'

La question s'est longtemps posée de leur statut réglementaire, qui a été tranchée le 25 juillet 2018 par un arrêt de la Cour de justice de l'Union européenne, en réponse à des questions préjudicielles adressées par le Conseil d'État français suite à un recours déposé par des organisations non gouvernementales environnementales. Cet arrêt confirme que les produits de ces techniques doivent être encadrés par les règles appliquées aux OGM, et que seuls sont exclus du champ d'application de la directive 2001/18/CE « les organismes obtenus au moyen de techniques/méthodes de mutagenèse qui ont été traditionnellement utilisées pour diverses applications et dont la sécurité est avérée depuis longtemps ».

Le développement de ces techniques ouvre des potentialités nouvelles, et soulève plusieurs questions. Leur facilité de mise en œuvre pourrait en effet conduire à une démultiplication des interventions humaines sur le génome, dont les effets sont difficiles à anticiper. Elles ne sont en outre souvent pas détectables dans le produit final obtenu, ce qui pose des difficultés quant à leur traçabilité et au contrôle de leur utilisation, notamment de leur dissémination dans l'environnement. Elles sont enfin généralement protégées par des brevets, ce qui peut conduire à une appropriation et un verrouillage de l'accès aux ressources génétiques.

1.4.4 Les différents domaines d'utilisation des OGM

L'utilisation d'OGM la plus connue est celle qui est faite en agriculture pour conférer de nouveaux caractères aux plantes pour leur utilisation en alimentation animale et humaine. Plusieurs applications du génie génétique apparaissent dans le domaine animal. C'est le cas par exemple aux États-Unis et au Canada, où un saumon transgénique dont la croissance est multipliée par deux par rapport à un saumon non modifié a été autorisé pour la mise sur le marché en 2016.

Les OGM sont également utilisés dans d'autres domaines tels que :

- la recherche fondamentale pour répondre à des questions de compréhension du vivant ;
- le milieu industriel, où des micro-organismes génétiquement modifiés peuvent être utilisés pour produire des molécules ;

- la médecine, où des micro-organismes génétiquement modifiés peuvent servir de vecteurs en thérapie génique, ou pour la production de vaccins et de médicaments à usage humain ou vétérinaire. Des protéines d'intérêt thérapeutique sont ainsi produites en France, en milieu confiné, à partir de bactéries, de plantes ou d'animaux génétiquement modifiés, comme par exemple l'insuline ou des hormones de croissance.

D'autres applications apparaissent également comme l'utilisation de moustiques génétiquement modifiés à des fins de lutte contre les maladies vectorielles qu'ils transmettent comme le paludisme, la dengue, le chikungunya ou le zika.

1.5 La Situation mondiale des OGM

Les espèces végétales génétiquement modifiées les plus cultivées dans le monde sont le soja, le maïs, le coton et le colza. Le soja et le maïs occupent à eux seuls plus de 81 % des surfaces cultivées d'OGM (dont 50 % des surfaces pour le soja). Le riz, la papaye, l'aubergine, la pomme de terre ou la betterave font aussi régulièrement l'objet de modifications génétiques, mais couvrent des surfaces de culture moins importantes.

Les modifications génétiques portent essentiellement sur l'introduction de deux caractères dans les cultures : tolérance à un ou plusieurs herbicides et résistance aux ravageurs (insectes nuisibles pour les cultures agricoles) par production d'une molécule insecticide, ou une combinaison de ces deux caractères.

D'autres caractéristiques sont en développement (autres résistances aux maladies, efficacité de la photosynthèse ou de l'utilisation de l'azote, tolérance à la sécheresse, développement de qualités organoleptiques), mais ne font pas encore l'objet de mise en culture importante.

En 2017, les organisations internationales ont recensé 189,8 millions d'hectares cultivés dans 24 pays, par 17 millions d'agriculteurs. Les surfaces des cultures OGM ont augmenté de 3 % en 2017 par rapport à 2016.

1.5.1 Les pays producteurs de plantes génétiquement modifiées

Les principaux producteurs sont les États-Unis (75 millions d'hectares), le Brésil (50,2 millions d'hectares), l'Argentine (23,6 millions d'hectares), le Canada (13,1 millions d'hectares), et l'Inde (12,2 millions d'hectares). Le Vietnam a cultivé des plantes génétiquement modifiées pour la première fois en 2015.

En Europe, où seule la culture du maïs *Bt* génétiquement modifié MON810 est autorisée (maïs génétiquement modifié pour produire une toxine qui cible les insectes nuisibles du maïs : la pyrale et la sésamie), les surfaces cultivées en 2017 ont diminué de 4 % par rapport à 2016) et représentent moins de 0,1 % des surfaces mondiales d'OGM cultivées. L'Espagne et le Portugal ont cultivé 131 535 hectares de maïs *Bt* génétiquement modifié en 2017, dont 94,4 % des surfaces pour l'Espagne. La Roumanie ne cultive plus de maïs *Bt* génétiquement modifié depuis 2016. Quant à la République tchèque et la Slovaquie, elles ont abandonné sa culture en 2017.

L'Europe importe des OGM principalement pour l'alimentation des animaux. En effet, l'Union européenne importe 70% des protéines végétales qu'elle incorpore dans l'alimentation animale. On estime que 80 % des importations d'aliments pour animaux est OGM (principalement les tourteaux de soja, à 85 % OGM). Très peu d'OGM sont destinés à l'alimentation humaine (fig.1).

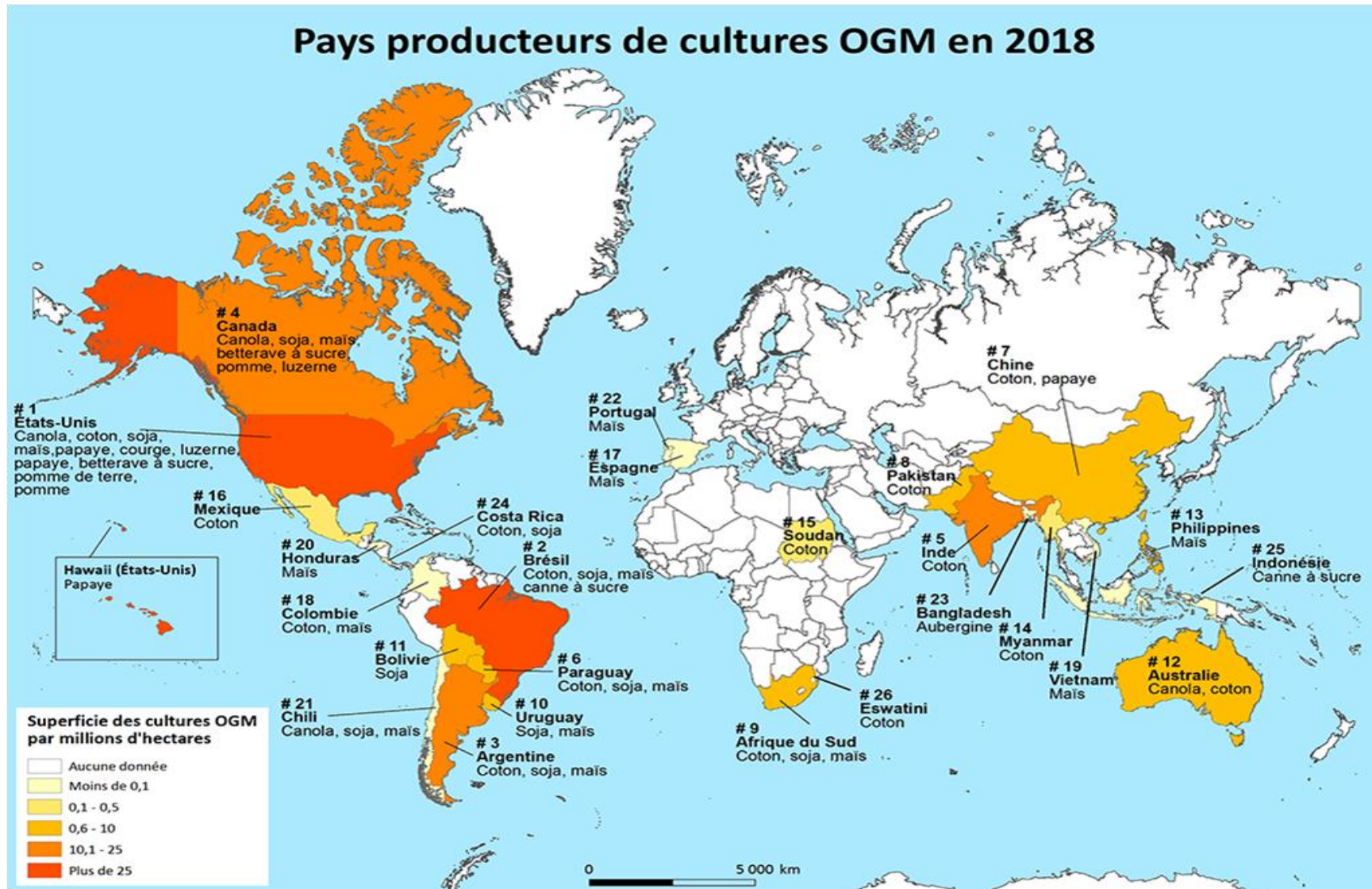


Fig.1 :Principaux pays producteurs et cultures des OGM dans le monde (MTE 2021 <https://www.ecologie.gouv.fr>)

Chapitre 2 : Structure et Réplication de l'ADN

2.1 La structure de l'ADN

Les molécules d'ADN (L'**acide désoxyribonucléique**) des cellules vivantes sont formées de deux brins antiparallèles enroulés l'un autour de l'autre pour former une double hélice. On dit que l'ADN est bicaténaire, ou double brin. Chacun de ces brins est un polymère appelé polynucléotide.

Chaque monomère qui le constitue est un nucléotide (fig.2), lequel est formé d'une base nucléique, ou base azotée— adénine (A), cytosine (C), guanine (G) ou thymine (T)— liée à un ose — ici, le désoxyribose — lui-même lié à un groupe phosphate.

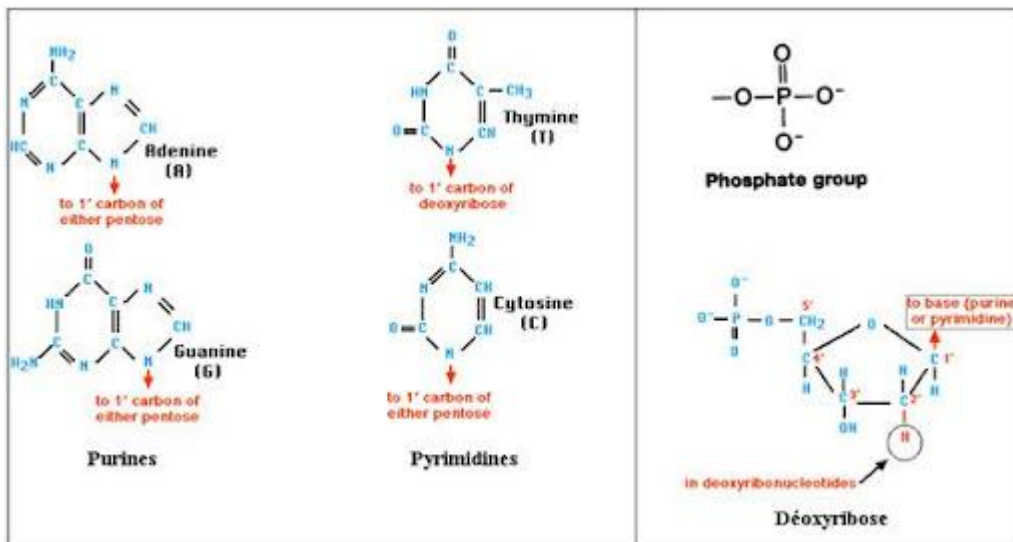


Fig.2 : Structure des bases azotées et du désoxyribose

Les bases nucléiques d'un brin d'ADN peuvent interagir avec les bases nucléiques d'un autre brin d'ADN à travers des liaisons hydrogène, qui déterminent des règles d'appariement entre paires de bases : l'adénine et la thymine s'apparient au moyen de deux liaisons hydrogène, tandis que la guanine et la cytosine s'apparient au moyen de trois liaisons hydrogène.

Les nucléotides polymérisés sont unis les uns aux autres par des liaisons covalentes entre le désoxyribose d'un nucléotide et le groupe phosphate du nucléotide suivant, formant ainsi une chaîne où alternent oses et phosphates (Fig.3), avec des bases nucléiques

liées chacune à un ose. L'ordre dans lequel se succèdent les nucléotides le long d'un brin d'ADN constitue la séquence de ce brin. C'est cette séquence qui porte l'information génétique. Celle-ci est structurée en gènes, qui sont exprimés à travers la transcription en ARN. Ces ARN peuvent être non codants — ARN de transfert et ARN ribosomique notamment — ou bien codants : il s'agit dans ce cas d'ARN messagers, qui sont traduits en protéines par des ribosomes. La succession des bases nucléiques sur l'ADN détermine la succession des acides aminés qui constituent les protéines issues de ces gènes. La correspondance entre bases nucléiques et acides aminés est le code génétique. L'ensemble des gènes d'un organisme constitue son génom.

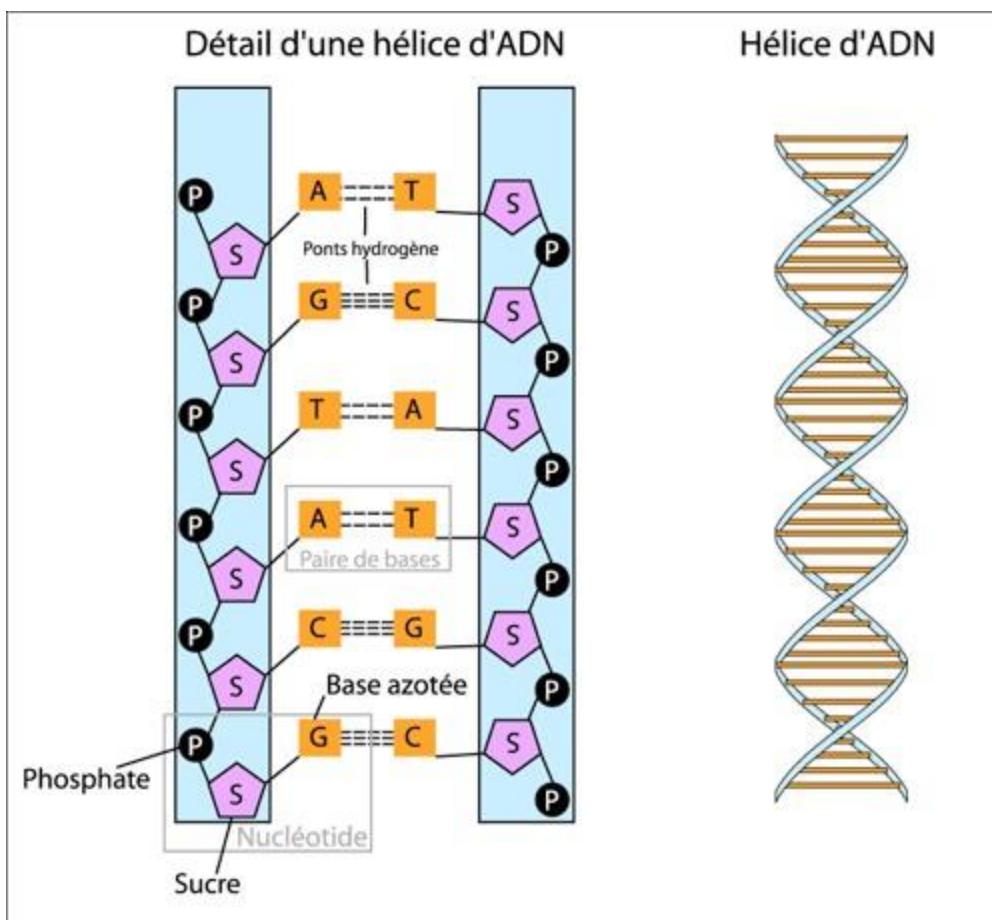


Fig.3 : Structure de l'ADN

Normalement, l'adénine et la cytosine ne s'apparient pas, tout comme la guanine et la thymine. Lorsque les séquences des deux brins sont complémentaires, ces brins peuvent s'apparier en formant une structure bicaténaire hélicoïdale caractéristique qu'on appelle double hélice d'ADN. Cette double hélice est bien adaptée au stockage de l'information génétique : la chaîne oses-phosphates est résistante aux réactions de clivage ; de plus, l'information est dupliquée sur les deux brins de la double hélice, ce qui permet de réparer un brin endommagé à partir de l'autre brin resté intact ; enfin, cette information peut être copiée à travers un mécanisme appelé réplication de l'ADN au cours duquel une double hélice d'ADN est recopiée fidèlement en une autre double hélice portant la même information. C'est en particulier ce qu'il se passe lors de la division cellulaire : chaque molécule d'ADN de la cellule mère est répliquée en deux molécules d'ADN, chacune des deux cellules filles recevant ainsi un jeu complet de molécules d'ADN, chaque jeu étant identique à l'autre.

2.1.1 Différences entre l'ADN et l'ARN

Les principales différences entre les deux molécules sont que :

- l'ARN a pour sucres le ribose là où l'ADN a du désoxyribose ;
- la base uracile remplit dans l'ARN la fonction assurée par la thymine dans l'ADN (Fig.4) ;
- l'ARN existe généralement sous forme monocaténaire (simple brin), hormis chez quelques virus tels que les réovirus où il existe sous forme d'ARN double brin, tandis que l'ADN est double brin (bicaténaire) avec une structure en double hélice ;
- l'ARN est court : de quelques dizaines à quelques milliers de nucléotides pour les ARN cellulaires (ARNm ou ARN structurés), contre quelques millions à quelques milliards (trois milliards chez l'Homme) dans l'ADN qui constitue le génome de la cellule.

Les trois premières différences donnent à l'ARN une stabilité bien moindre que celle de l'ADN .

STRUCTURE ARN/ADN

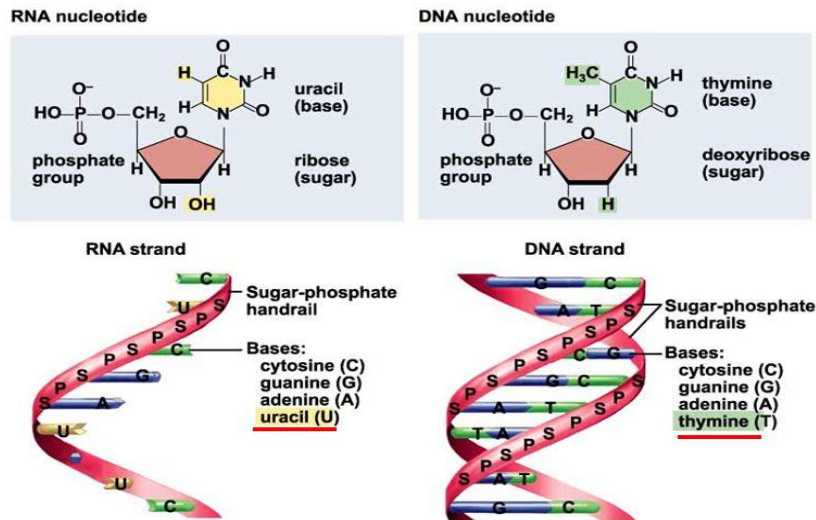


Fig.4 : Comparaison entre la structure de l'ADN et de l'ARN

2.2 La réplication de l'ADN,

Appelée aussi **duplication de l'ADN**, est le processus au cours duquel l'ADN est synthétisé grâce à l'ADN polymérase. Ce mécanisme permet d'obtenir, à partir d'une molécule d'ADN, deux molécules identiques à la molécule initiale, en vue de leur distribution aux deux cellules filles pendant la mitose. Puisque les deux chaînes de l'ADN parental se séparent et que deux nouvelles molécules sont formées, on qualifie ce processus de **semi-conservatif**. L'ADN a l'importante propriété de pouvoir être reproduit à l'identique, ce qui permet à l'information génétique de se transmettre d'une cellule mère aux cellules filles lors de la division cellulaire. La molécule d'ADN s'ouvre comme une fermeture éclair (ou tirette — par **rupture des liaisons hydrogène** entre bases appariées de liaisons faibles) libérant deux brins complémentaires. Chaque brin solitaire catalyse alors la synthèse de sa moitié manquante, intégrant, selon la règle de complémentarité des bases, des nucléotides qui sont dispersés dans le noyau. Ainsi, chaque nouvelle molécule est identique à la molécule d'ADN initiale.

La réplication va commencer à des endroits précis : les origines de réplication. Des protéines, les facteurs d'initiation de la réplication vont reconnaître ces endroits. Le rôle de ces facteurs d'initiation est de faciliter la fixation d'autres protéines qui elles aussi vont se

fixer à ces origines de réplication. Ces protéines permettent l'ouverture des deux brins de l'ADN et ainsi « faire apparaître » des fourches de réplication.

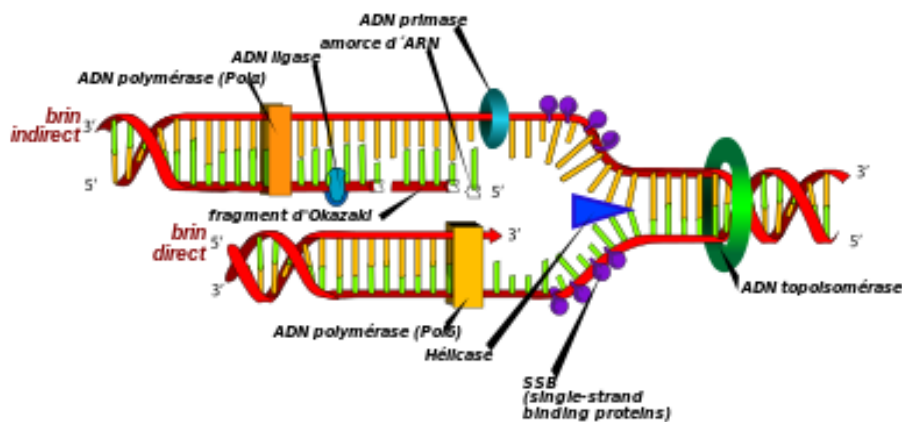


Fig.5 : Schéma général de la fourche de réplication de l'ADN

Un grand nombre de protéines interviennent dans le mécanisme moléculaire de la réplication de l'ADN formant le complexe enzymatique de réplication, appelé réplisome. Les enzymes et protéines intervenant dans la réplication de l'ADN sont homologues chez les eucaryotes et chez les archées mais ont des séquences en acides aminés très différentes chez les bactéries. Toutefois, au niveau fonctionnel comme au niveau structural, on retrouve des homologies frappantes entre les protéines bactériennes et les protéines eucaryotes, ce qui indique que les mécanismes de réplication sont analogues.

Le brin d'ADN qui sert de matrice à la réplication est le **brin parental**. Le nouveau brin complémentaire au brin parental est le **brin néoformé**. À l'issue de la réplication, chacune des deux molécules d'ADN nouvellement formée est constituée d'un brin parental et d'un brin néoformé. On qualifie ce processus de semi-conservateur. C'est l'expérience de Meselson et Stahl en 1958 qui a permis de le démontrer.

La réplication de l'ADN débute à partir d'une origine de réplication et progresse dans les deux sens à partir de ce point créant ainsi deux fourches de réplication. On dit que la réplication de l'ADN est **bidirectionnelle**.

a) Œil de réplication

En biologie, le terme d'œil de réplication est utilisé pour désigner la forme représentée par la molécule d'ADN lors de sa réplication. Cette réplication se fait lorsque l'ADN est à l'état de chromatine, pendant la phase S de l'interphase. L'ADN prend normalement la forme de deux brins entortillés en double hélice, mais pendant la réplication, cette forme change énormément. En effet, la réplication commence grâce à une ou plusieurs origines de réplication qui sont des séquences de nucléotides spécifiques reconnues par des protéines de réplication. Ces protéines vont s'attacher aux origines de réplication et séparer les deux brins d'ADN ce qui va former un « œil » de réplication.

b) Fourche de réplication

La fourche de réplication est une transformation de la forme de l'ADN. lorsqu'un œil de réplication est créé d'autres enzymes interviennent, les hélicases (fig.6).

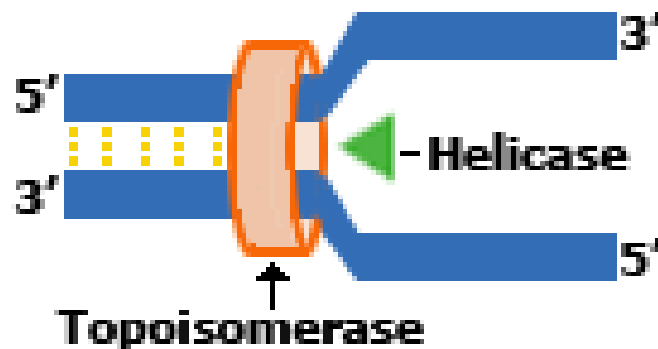


Fig.6 : Fonction de l'Hélicase et la topoisomérase

Ces enzymes vont se fixer aux extrémités de l'œil de réplication et la topoisomérase commence à dérouler l'ADN pour enlever les supers tours. L'hélicase va détacher les deux brins, pour pouvoir augmenter la taille de l'œil de réplication. En se faisant les hélicases vont transformer les extrémités des yeux de réplication en forme de Y, appelées fourches de réplication.

La fourche de réplication est la structure formée lorsque l'ADN se réplique, et sur laquelle l'ADN polymérase vient se fixer. L'ADN polymérase est une enzyme catalysant la

formation des liaisons nucléotidiques. Le complexe enzymatique intervenant dans la réplication est appelé réplicase.

La réplication peut être divisée en trois étapes principales : l'initiation, l'élongation et la terminaison.

c) **Initiation de la réplication**

L'initiation de la réplication a lieu à l'origine de réplication. Il n'y a qu'une seule origine de réplication dans les chromosomes bactériens alors qu'il en existe plusieurs chez les eucaryotes. La première étape débute par la fixation de la protéine [DnaA](#) (protéine capable de reconnaître ces origines) sur l'origine de réplication. Il s'ensuit un enroulement de l'ADN autour de la protéine qui provoque une dénaturation locale des deux brins, au niveau des 3 répétitions consécutives de 13bp. Une [hélicase](#) s'y engouffre et sépare les brins dans les deux sens en rompant les liaisons hydrogène (ou « ponts hydrogènes ») entre les deux brins de la double hélice d'ADN. Deux fourches de réplication sont ainsi créées, délimitant l'œil de réplication. D'autres protéines se lient à l'ADN simple brin (monocaténaire) ainsi formé et évitent la reformation de la double hélice. Ce sont les protéines [SSB](#) (*single strand binding*) chez les bactéries et les protéines RPA chez les eucaryotes et les archées. De part et d'autre des deux fourches de réplifications, un [gyrases](#) (topoisomérase de classe II) enlève les supertours positifs engendrés par la formation de l'œil de réplication.

Chez les procaryotes, le complexe multienzymatique composé de l'hélicase et de la primase est appelé le [primosome](#).

d) **Élongation ou la synthèse d'ADN-**

C'est au cours de cette phase qu'il y a formation du réplisome et synthèse d'ADN. L'élongation de l'ADN progresse toujours dans le [sens 5' vers 3'](#) pour le brin en création. C'est l'[ADN polymérase](#), qui ajoute à l'extrémité [3'](#) de la molécule en formation, des [désoxyribonucléotides](#). Cependant, les deux brins de la double hélice d'ADN sont enroulés dans des sens opposés : ils sont antiparallèles. Il existe de ce fait des mécanismes différents selon le brin d'ADN répliqué.

Il existe ainsi un « brin direct », ou « brin précoce » (*leading strand*) et un « brin indirect », ou « retardé », ou « tardif » (*lagging strand*) :

le « brin direct » est le brin complémentaire du brin parental orienté 3' vers 5' (le « brin direct » est donc orienté 5' vers 3'). Il est donc créé de façon continue, dans le sens 5' vers 3' ;

le « brin indirect » est le brin complémentaire du brin parental orienté 5' vers 3' (le « brin indirect » est donc orienté 3' vers 5'). Il est créé de façon discontinue, sous forme de fragments d'Okazaki, dans le sens 3' vers 5'.

→ Chez le procaryote, les fragments d'Okazaki mesurent de 1000 à 2000 bases, et chez l'eucaryote ils sont d'environ 200 bases.

L'ADN polymérase a besoin d'une amorce pour fonctionner, parce qu'elle ne commence à synthétiser que par une extrémité 3'OH Libre.

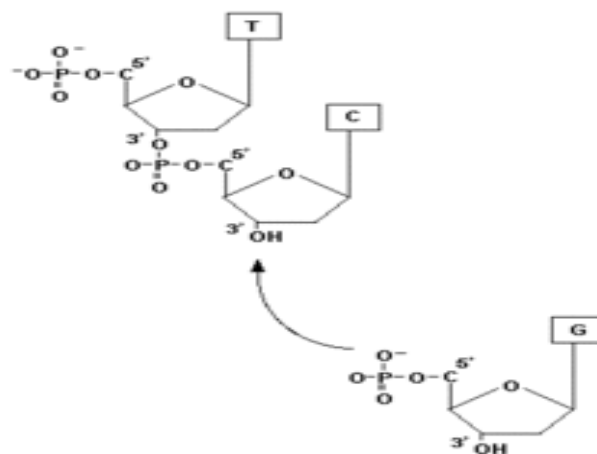


Fig7. Description de l'extrémité OH' libre et la liaison entre nucléotides

Et c'est l'amorce ARN qui va fournir cette extrémité libre. La présence ici d'ARN est expliquée par le fait que seules deux enzymes peuvent synthétiser les chaînes nucléotidiques : L'ARN Polymérase et L'ADN Polymérase. Dans le cas présent, l'ADN Polymérase ne pouvant fonctionner sans amorce, c'est L'ARN qui prend le relai pour fournir l'amorce nécessaire. La primase va en effet créer ces amorces d'ARN. Il y aura donc sur le brin retardé des jonctions ARN-ADN, qui seront par la suite éliminées par une RNase H. Des ADN polymérases particulières vont ensuite combler les lacunes laissées par l'ARN.

D'autres enzymes sont nécessaires au bon fonctionnement de la réplication. Puisque le placement des histones dans la chromatine régule l'expression génétique, des protéines

chaperon séparent les histones de l'ADN avant la réplication et les remettent après aux mêmes endroits⁷. Les polymérases sont retenues à l'ADN parental par des protéines tenons et des protéines à pince coulissante. C'est le PCNA des eucaryotes et des archées, et la sous unité b des bactéries. Une hélicase brise les liaisons H entre les deux brins, et des protéines SSB se fixent à l'ADN monocaténaire par des liaisons salines, pour éviter la reformation de liaisons entre les deux brins. Sur l'ADN double brin précédant l'hélicase se fixe une topoisomérase I qui va permettre d'éviter les torsions entraînées par l'ouverture de la double-chaîne par l'hélicase (comme pour une ficelle dont on écarte les deux brins), en coupant un des brins, puis le ressoudant après déroulement. Une topoisomérase II va se fixer sur une des molécules d'ADN filles, et par la scission des deux brins de celle-ci, va permettre le démêlement des 2 ADN filles. Elle ressoude ensuite (après le passage de l'autre molécule dans l'interstice formé) la molécule lysée.

e) **Terminaison**

Cette phase correspond à l'arrêt de la réplication lorsque deux fourches de réplication se rencontrent ou lorsqu'une fourche rencontre un signal de terminaison de la réplication. Il y a « ter » : terA terD terB terC qui freinent les fourches de réplication.

f) **Fidélité de la réplication**

La fidélité de réplication est très grande et elle est en très grande partie due à l'ADN polymérase, qui incorpore les bases nucléiques en fonction de la complémentarité des appariements Watson-Crick (A-T, C-G). En effet, ce très faible taux d'erreur de l'ADN polymérase pendant la réplication est dû au fait que les ADN polymérase répliquatives disposent d'une activité de relecture qui leur permet de vérifier que le dernier nucléotide incorporé est bien le bon.

En cas d'erreur, les ADN polymérase (I et III) les corrigent au moyen de leur activité exonucléase 3' → 5'. Ceci permet à la polymérase de reculer d'un cran en éliminant le nucléotide incorrect qui est hydrolysé, pour ensuite reprendre la synthèse du brin d'ADN.

Avant cette *relecture* de l'ADN le taux d'erreur est d'environ 10^{-5} (une erreur sur cent mille bases répliquées) ce qui est très peu compte tenu du nombre de bases répliquées par seconde qui est d'environ 500 bases par seconde chez les bactéries. L'étape de relecture fait

chuter le taux d'erreur de réplication à environ 10^{-7} . Enfin, les erreurs qui ont éventuellement échappé à ce mécanisme de contrôle sont réparées ensuite dans l'ADN double brin par un mécanisme spécifique de réparation des mésappariements ou MR ([mismatch repair](#)). L'ensemble du dispositif constitue donc un système extrêmement efficace puisque le taux d'erreur chute à environ une mutation pour 10 milliards de bases répliquées

Chapitre 3 : Les enzymes de restriction

3.1 Définition des enzymes de restriction

Les enzymes de restriction sont des protéines synthétisées par des bactéries pour se protéger des infections de virus (bactériophages). Ces enzymes coupent l'ADN viral à des endroits spécifiques. Ce mécanisme de résistance aux bactériophages, dénommé restriction, fut étudié par W. Arber à l'Université de Genève dans les années 60. Il obtint avec D. Nathans et H. Smith le prix Nobel de Médecine en 1978 pour la découverte et les applications des enzymes de restriction.



Fig.8 : Exemple d'enzyme de restriction commercialisée

Lorsqu'un bactériophage infecte une bactérie, il lui « injecte » son ADN. Sans système de défense adapté, de nombreux bactériophages seront alors produits dans la bactérie qui sera finalement lysée. De manière à résister à cette infection la bactérie synthétise des enzymes de restriction qui vont fragmenter l'ADN viral étranger. Parallèlement, la bactérie possède des méthylases capables de modifier (méthyliser) son propre ADN afin qu'il ne soit pas reconnu par les enzymes de restriction.

Aujourd'hui plusieurs centaines d'enzymes de restriction différentes sont disponibles commercialement. Elles font parties des outils (ciseaux moléculaires) indispensables aux biologistes moléculaires. Ces outils permettent de couper l'ADN afin d'isoler certains fragments, de construire des cartes génétiques (cartes de restriction), de créer de nouvelles combinaisons d'ADN, etc. Les enzymes de restrictions ont permis l'avènement de la biologie moléculaire.

Le nom d'une enzyme de restriction indique son origine: *Sau*3A provient de *Staphylococcus aureus* 3A, *Bam*HI provient de *Bacillus amyloliquefaciens* H, *Eco*RI provient de *Escherichia coli*, *Msp*I provient de *Moraxella* species, *Kpn*I provient de *Klebsiella pneumoniae*. Ces enzymes reconnaissent et coupent des séquences de nucléotides très spécifiques appelées sites de restriction. Ces sites sont pour la plupart palindromiques, c'est-à-dire qu'ils sont composés de séquences nucléotidiques identiques sur les deux brins mais en orientations antiparallèles fig.10



Fig.9 : Un schéma représentant la coupure de l'ADN par l'enzyme *Eco*RI

Suivant le nombre de nucléotides reconnus, l'enzyme de restriction coupe l'ADN plus ou moins fréquemment. Par exemple, pour cette expérience nous utilisons deux enzymes différentes qui reconnaissent respectivement quatre et six nucléotides: *Msp*I (CCGG) et *Bam*HI (GGATCC). En moyenne ces deux enzymes coupent l'ADN toutes les 256 (4^4) et 4096 (4^6) paires de bases. Suivant l'enzyme de restriction, les extrémités des fragments obtenus peuvent être formées de deux brins d'égales longueurs, appelés "bouts francs" (blunt ends) ou présenter un brin plus long que l'autre. Dans ce cas l'extrémité est dénommée "bouts collants" (sticky ends). Des exemples de coupures engendrées par différentes enzymes sont représentés dans la figure ci-jointe.

3.2 Méthode de la digestion des plasmides

L'ADN utilisé dans cette expérience est celui de plasmides souvent utilisés. Les plasmides sont des ADN circulaires, relativement petits.

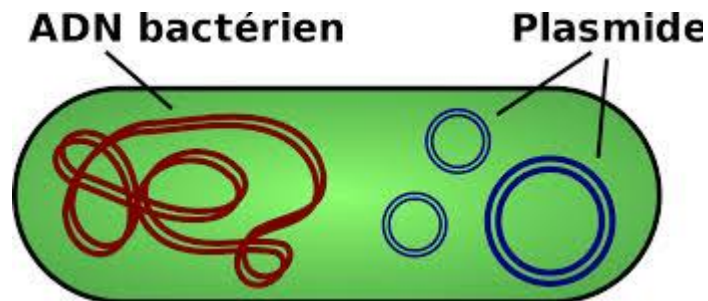


Fig.10 : Schéma des plasmides bactériens

Le plasmide pUC19 (fig.11) compte environ 2600 nucléotides. Il sert de "vecteur" pour cloner des gènes. Le plasmide pUC19-TIF1 contient en plus un fragment d'ADN de levure d'environ 5800 paires de bases. En comparaison, l'ADN du bactériophage λ (lambda) est plus grand (environ 50'000 paires de bases, 50kpb), le chromosome d'une bactérie (*Escherichia coli*) contient 3'500'000 paires de bases (3'500 kpb), le génome d'une levure (2 x 16 chromosomes) contient 2x 14'000'000 paires de bases (14'000 kbp) et les 2 x 23 chromosomes d'un être humain contiennent 2 x 3'000'000'000 bp (6'000'000 kbp). En longueur cela correspond à 1.4 mm pour le chromosome bactérien, 4.3 mm pour les chromosomes de la levure et 2 m pour les chromosomes d'un être humain.

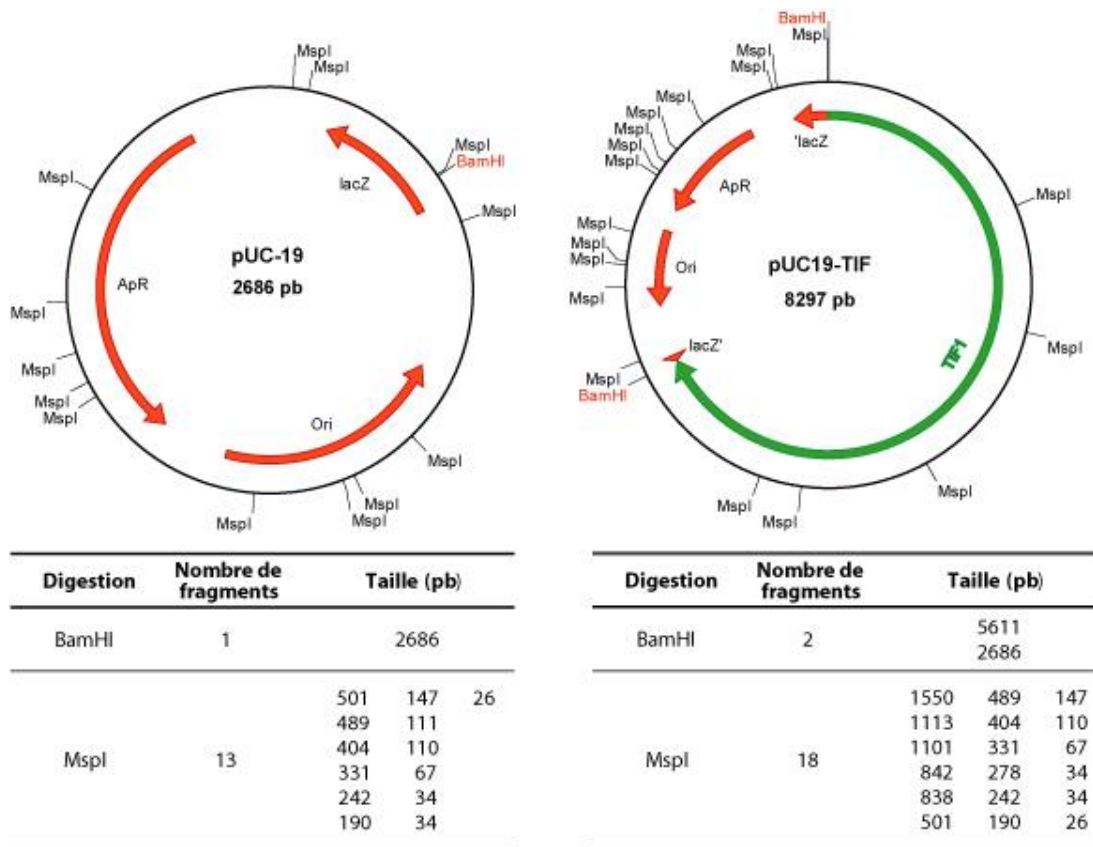
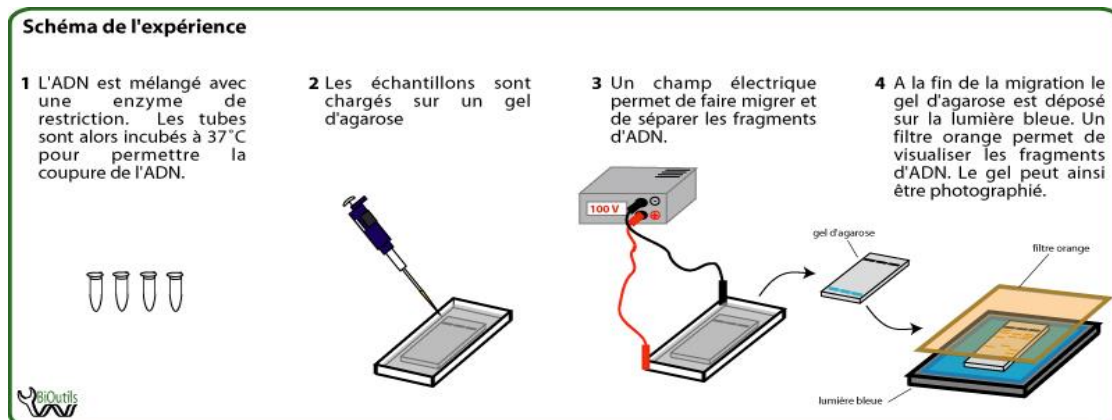


Fig.11 : Description du plasmide PUC19 et le PUC19-TIF

a) Protocole de l'expérience (fig.12) :

Pour des raisons de difficulté de pipettage et de temps, nous conseillons que 4 groupes digèrent le plasmide pUC19 (tubes 1, 2, 3) et les 4 autres groupes digèrent le plasmide pUC19-TIF1 (tubes 4, 5, 6)



. Fig.12. Schéma de l'expérience de la digestion des plasmides

1) Digestion :

- Numéroter 6 tubes Eppendorf.
- Ajouter les éléments comme décrit dans le tableau ci-dessous (les volumes sont en μl).

Tableau1 : Description de la composition des tubes de digestion des plasmides

	H2O	pUC19	pUC19-tif1	Tampon de digestion 10x	BamHi	MspI
tube 1	12.5 μl	1 μl	-	1.5 μl	-	-
tube 2	11.5 μl	1 μl	-	1.5 μl	1 μl	-
tube 3	8.5 μl	4 μl	-	1.5 μl	-	1 μl
tube 4	12.5 μl	-	1 μl	1.5 μl	-	-
tube 5	11.5 μl	-	1 μl	1.5 μl	1 μl	-
tube 6	8.5 μl	-	4 μl	1.5 μl	-	1 μl

Attention : Garder les enzymes de restriction sur glace - Utiliser une pointe neuve pour chaque pipetage

- Mélanger en pipetant plusieurs fois
- Incuber la réaction à 37°C de 30 à 60 minutes.

A cette étape il est possible de congeler les réactions et de poursuivre l'expérience lors d'une prochaine séance.

2) Préparation du gel d'agarose

Pendant la digestion préparer le gel d'agarose. Ce gel est une matrice permettant de séparer les molécules d'ADN selon leurs tailles dans un champ électrique. Les petits fragments migrent plus vite que les grands, la concentration d'agarose est choisie en fonction de la taille des fragments à séparer. Ici nous allons utiliser un gel à 1.5% d'agarose.

- Peser 1.05 g d'agarose et mettez-le dans un Erlenmeyer de 250 ml.
- Ajouter 70 ml de tampon d'électrophorèse (TBE 1x).

- Faire bouillir (four à micro-ondes, plaque chauffante ou bec bunsen). Veillez à ce que l'agarose ne déborde pas en bouillant ! L'agarose fondu est complètement transparent. Si des résidus sont toujours visibles, remettre la solution à chauffer.
- Laisser refroidir le liquide (à environ 60°C).
- Mettre des gants de protection
- Ajouter 7 μ l de SYBR-safe (intercalant qui permettra de visualiser l'ADN) et mélanger en agitant l'Erlenmeyer.
- Verser l'agarose dans la cuve préparée avec un peigne pour former les puits (attention si l'agarose est trop chaud la cuve d'électrophorèse se déforme !). Vérifier qu'il n'y a pas de bulles dans le gel, les enlever le cas échéant.
- Lorsque le gel est refroidi et solidifié, découper une petite lamelle d'agarose en haut et en bas du gel pour libérer les électrodes, ajouter du tampon d'électrophorèse (TBE 1x) de manière à bien recouvrir le gel (env. 150 ml) et enlever le peigne.

3) Migration des échantillons sur gel d'agarose ([voir le schéma](#))

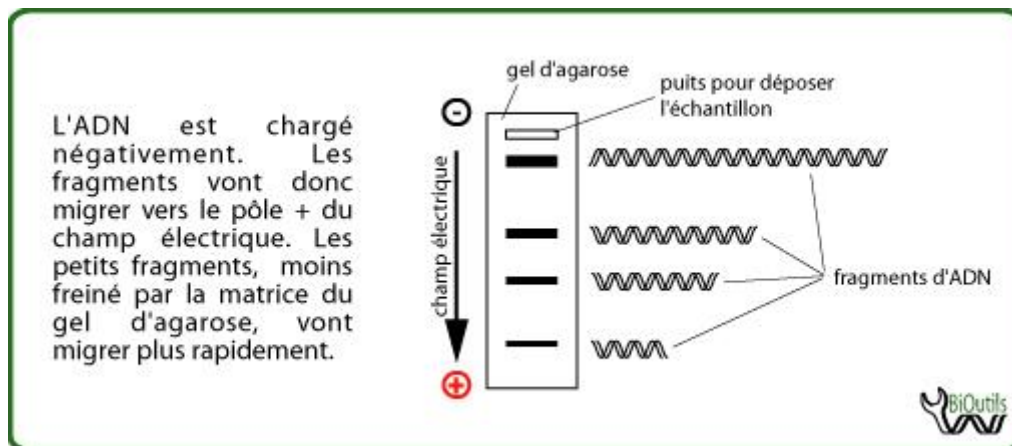


Fig.13 : Migration des échantillons sur gel d'agarose

- Récupérer vos tubes Eppendorf
- Ajouter 3 μ l de tampon de charge (bleu). Cette solution dense permet de bien déposer les échantillons dans les puits du gel d'agarose. Elle contient un colorant bleu afin de suivre la migration des échantillons pendant l'électrophorèse
- Charger le gel en mettant 5 μ l de marqueur dans le premier puits et les 17 μ l des digestions dans les puits suivants.
- Allumer le transformateur. Les molécules d'ADN sont chargées négativement par les groupements phosphates... (!! attention à la polarité; du noir vers le rouge !!)
- Faire migrer à 100V.
- Quand le bleu de migration arrive à environ 1 cm du bas du gel, arrêter le transformateur.
- Mettre des gants et prendre le gel. Déposez-le sur la lampe bleue et mettez le filtre orange dessus afin de visualiser les fragments d'ADN.
- Prendre une photo.

4) Analyse des résultats

- Observer les cartes de restriction ci-dessous. (si besoin, les séquences en format texte sont disponibles ici: [pUC19](#), [pUC19-Tif](#) fig.15)
- Observer les fragments que vous avez obtenus. Repérez-les sur la carte de restriction. Certains ont des tailles trop proches pour être séparés sur gel d'agarose. Les fragments trop petits ne sont pas visibles sur ce gel à 1.5% d'agarose.
- Les plasmides non digérés ont des formes particulières qui ne migrent pas à la taille de l'ADN linéaire. Un exemple de résultat obtenu est visible ci-dessous (fig.13):

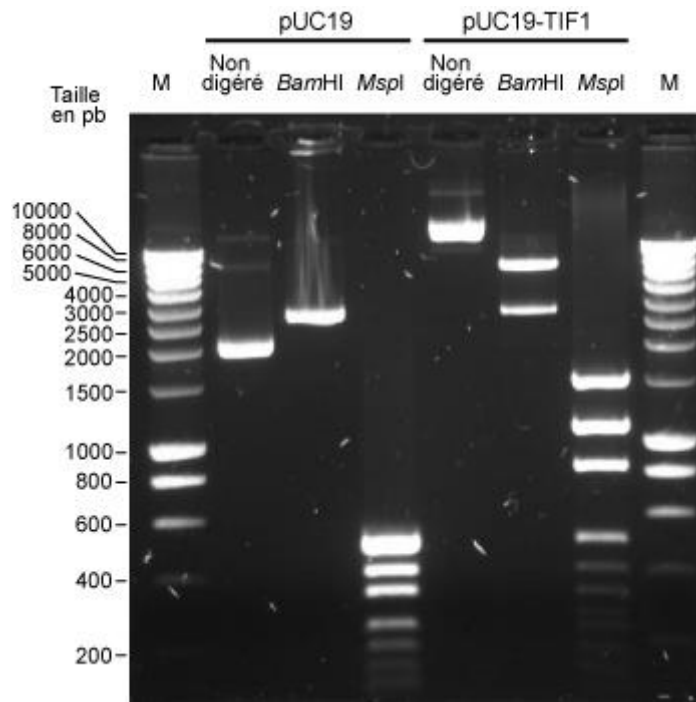


Fig.14 : Exemple Electrophorese : Separation de des brins d'ADN de deux plasmides (pUC) coupés par des enzymes de restrictions de 2 bacteries differentes Bam HI et MspI

pUC19

```

TCGCGCGTTTTCGGTGATGACGGTGAAAACTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCA
CAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTG
TTGGCGGGTGTGCGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTA CTGAGAGTGC
ACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGCGCC
ATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTAT
TACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGT
TTTCCAGTCACGACGTTGTA AACGACGCGCCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGAT
CCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTCCCT
GTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGT
AAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCC
GCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGG
AGAGGCGGTTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCG
GTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACA
GAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAAC
CGTAAAAAGGCCGCGTGTGCGGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAC
AAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCG
TTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATAC
CTGTCCGCTTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTAT
CTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTACG
CCCCACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGAC
TTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGT
GCTACAGAGTTCCTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGT
ATCTCGCCTCTGAGTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGCGC
AAACAAACCACCGTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGA
AAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAC
GAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATC
TTTTTAAATTA AAAATGAAGTTTTTAAATCAATCTAAAATATATATGAGTAAACTTGGTCT
GACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTCA
TCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCT
GGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCA
ATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTTGCAACTTTATCCGCCTCC
ATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTG
CGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTTCGTTGGTATGGCT
TCATTCAGCTCCGGTTC CAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAA
AAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTG CAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTA
TCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTGTCATGCCATCCGTAAGATGC
TTTTCTGTGACTGGT GAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCG
AGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAA
GTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTG
AGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTC
ACCAGCTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGG
CGGACACGGAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATGGAAGCATTTAT
CAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATA
GGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAAACCATTATTATC
ATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTTCGTC

```

Fig.15 : Séquence du plasmide PUC 19

Chapitre 4 : Le génie génétique et le clonage d'ADN

4.1 Définition du génie génétique

Le génie génétique est un ensemble de techniques de biologie moléculaire permettant d'isoler des gènes spécifiques, de les reconstruire puis de les réinsérer dans des cellules ou des organismes. Ces techniques ont fourni à la médecine et à l'industrie un moyen efficace de produire en grandes quantités des protéines spécifiques, qui, auparavant, n'étaient disponibles qu'en quantité extrêmement faibles ou non disponibles. Ces techniques ont permis également d'étudier la régulation de leur expression et ainsi de mieux comprendre le développement de maladies génétiques.

Les différentes étapes passent par : la construction d'une banque d'ADN, le criblage de la banque et l'expression du gène.

4.2 Construction d'une banque d'ADN : clonage de gène.

On peut distinguer 2 méthodes permettant de construire une banque d'ADN. La première consiste à fragmenter la molécule d'ADN à l'aide d'enzymes de restriction, la seconde consiste à purifier de l'ARN messager qui sera ensuite transcrit en ADN complémentaire (ADNc) par une transcriptase inverse.

Préparation d'une banque d'ADN à l'aide d'enzymes de restriction (banque d'ADN génomique)

4.2.1.1 Préparation de l'ADN

Les enzymes de restriction sont des nucléases purifiées à partir de bactéries qui coupent l'ADN au niveau de séquences spécifiques de 4 à 8 nucléotides, produisant des fragments d'ADN de tailles strictement définies, les fragments de restriction. Les enzymes de restriction sont utilisées pour produire de petits fragments d'ADN renfermant un gène particulier.

Une autre propriété des enzymes de restriction, commode pour le clonage des gènes, est la capacité, pour beaucoup d'entre elles, de provoquer des coupures en « zig-zag » qui laissent de courtes extrémités monocaténares aux 2 extrémités du fragment d'ADN : les extrémités cohésives. Ces extrémités peuvent former des paires de bases complémentaires avec n'importe quelle autre extrémité produite par la même enzyme. Ainsi, cela permet de

relier 2 fragments d'ADN double hélice provenant de génome différents par appariement de bases complémentaires.

Par exemple, un fragment d'ADN contenant un gène humain peut être relié au chromosome d'un virus bactérien en tube à essai. La nouvelle molécule d'ADN recombinante peut ensuite être introduite dans une cellule bactérienne. Sachant que le mécanisme de réplication normal d'un virus peut engendrer plus de 10¹² molécules d'ADN viral identiques en moins d'un jour, l'ADN humain est ainsi considérablement amplifié. Le virus est appelé vecteur de clonage.

4.2.1.2 Les vecteurs de clonage

Un vecteur de clonage est une petite molécule d'ADN qui possède les propriétés suivantes :

- a. pouvoir se répliquer dans une bactérie fortement amplifiable
- b. posséder des sites de restriction permettant d'introduire le fragment d'ADN à cloner
- c. posséder 2 types de marqueurs : marqueurs de transformation qui permet de faire la distinction entre des bactéries transformées (ayant reçu le vecteur) et les autres marqueurs de recombinaison qui permet de faire la différence entre des bactéries ayant reçu le vecteur seul de celles ayant reçu le vecteur recombinant (c'est à dire avec l'ADN d'intérêt).

Il existe 3 types de vecteur de clonage : plasmidiques, viraux et cosmides (phage associés à des plasmides).

- a) Les vecteurs plasmidiques de première génération sont dérivés du plasmide pBR322
- b) Actuellement, on utilise préférentiellement des vecteurs plasmidiques de seconde génération : le plasmide pUCIS et ses dérivés.
- c) Parmi les vecteurs viraux, un des plus classiques est celui du bactériophage M13.

4.2.1.3. Insertion dans les vecteurs de clonage.

Les principes fondamentaux des méthodes utilisées pour cloner des gènes sont les mêmes pour les différents types de vecteurs, bien que les détails techniques puissent être différents. Pour simplifier, nous n'exposerons que les méthodes utilisées pour les vecteurs plasmidiques. Quand on dispose de plasmides purifiés, les ADN circulaires de plasmides sont tout d'abord coupés par une nucléase de restriction afin de créer des molécules d'ADN linéaires (fig.16).



Fig.16 : Insertion d'un fragment d'ADN dans un plasmide

Par ailleurs, l'ADN génomique utilisé pour constituer la banque est lui aussi coupé par la même nucléase et les fragments de restriction résultants sont alors ajoutés aux plasmides coupés et réassociés pour former des ADN circulaires recombinants. Ces molécules recombinantes contenant des insertions d'ADN étrangers sont ensuite scellées de façon covalente par l'ADN ligase pour former des ADN circulaires intacts. Il faut alors indiquer qu'à cette étape, certains plasmides sont refermés sans aucune molécule d'ADN étrangère.

4. 2. 1. 4. Transformation des cellules

Dans l'étape suivante de préparation de la banque, les molécules d'ADN recombinantes ainsi préparées sont introduites dans des cellules (habituellement des bactéries ou des levures, parfois d'autres cellules eucaryotes) qui ont été rendues perméables à l'ADN de façon transitoire. De telles cellules sont dites alors transformées par les plasmides (on parle aussi de transfection de cellules).

Pour faciliter l'introduction d'un gène dans une bactérie, il faut rendre les bactéries

compétentes en fragilisant leur paroi cellulaire. C'est ce que l'on fait par exemple lorsque l'on plonge des bactéries Gram - dans une solution froide de CaCl_2 (50 mM). Ce procédé permet à l'ADN extérieur de se fixer sur la paroi cellulaire. L'entrée de l'ADN est ensuite stimulée par une brève incubation à 42 °C (fig.17).

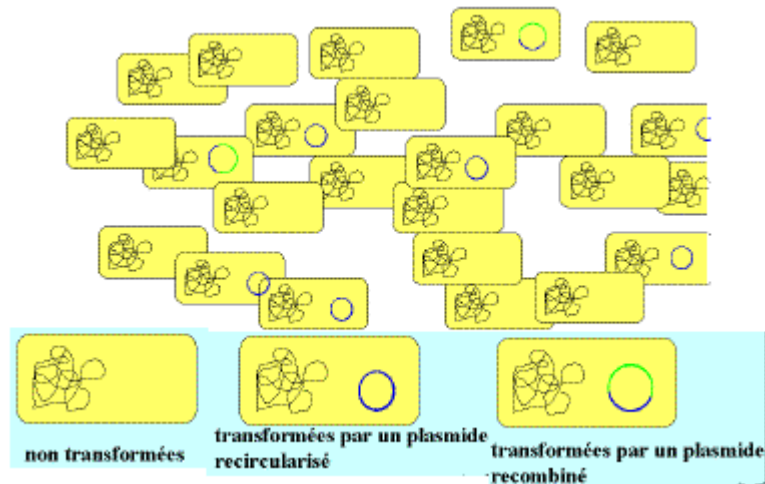


Fig.17 : Transformation bactérienne par des plasmides recombinés et non recombinés

Pour les cellules eucaryotes, on a recours à des molécules comme le DEAE-dextran ou le phosphate de calcium qui fragilise la membrane cellulaire et favorise la formation de pore par lesquels les vecteurs plasmidiques peuvent pénétrer. Lorsque les cellules se divisent et se multiplient, les plasmides recombinants se Répliquent également pour produire un très grand nombre de copies d'ADN renfermant l'ADN étranger (Fig.18).

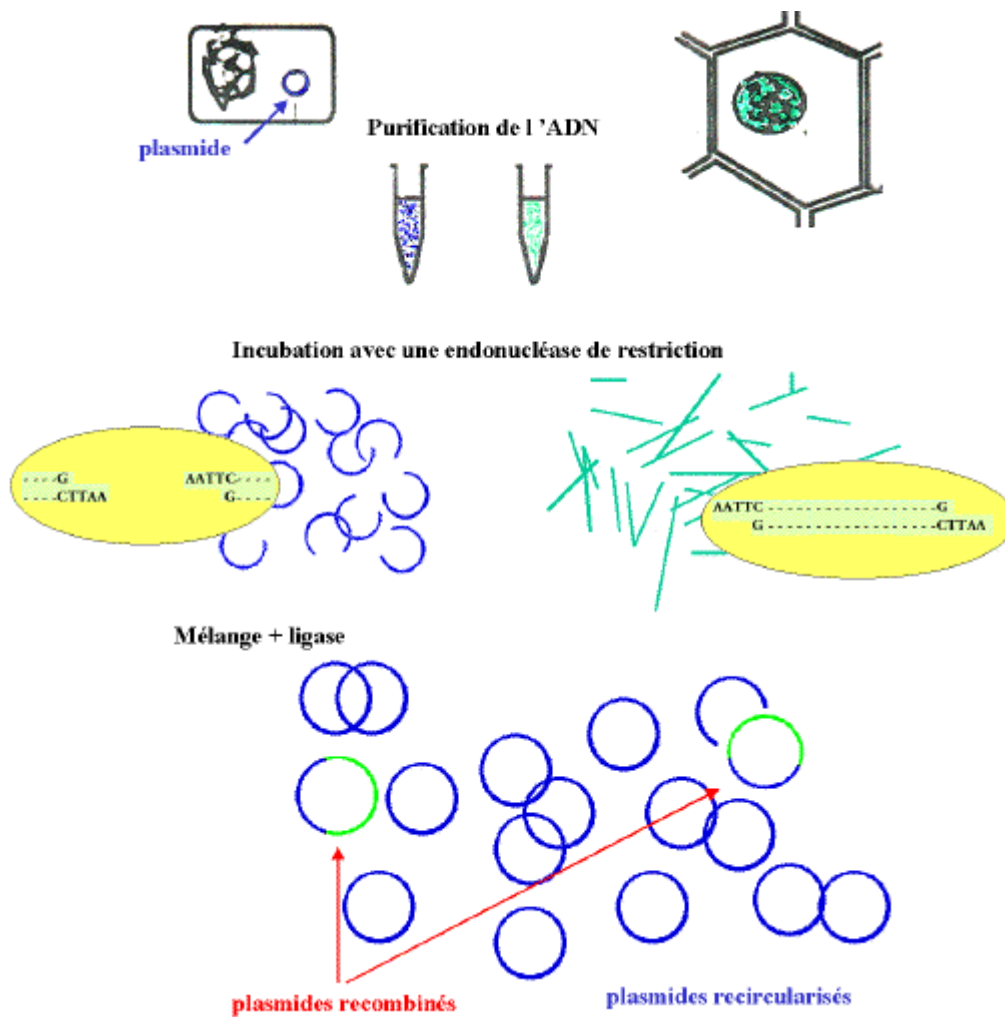


Fig.18 : Obtention des plasmides recombinés

4.2. 1.5. Sélections des cellules transformées

Les vecteurs utilisés portent des marqueurs de transformation. Dans le cas des plasmides, il s'agit de gènes de résistance aux antibiotiques. Ainsi, si des bactéries transformées avec ce plasmide arrivent à cultiver sur un milieu contenant l'antibiotique (fig.19), c'est que ces bactéries initialement sensibles à l'antibiotique sont devenues résistantes. Seule l'intégration du plasmide porteur du gène de résistance peut expliquer l'apparition soudaine de cette résistance. Ces bactéries contiennent la banque d'ADN.

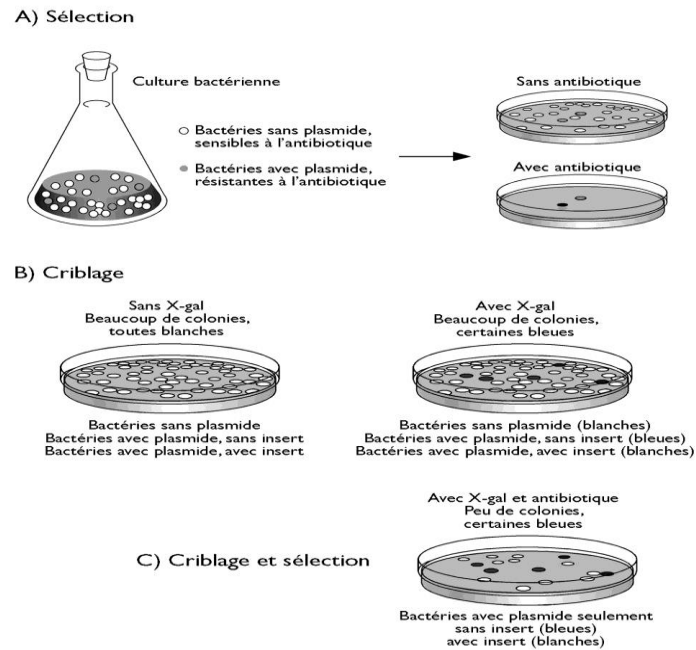


Fig.19 : Méthodes de sélection et criblage des cellules transformées dans un milieu de culture

Cependant, parmi ces bactéries transformées, certaines peuvent avoir reçues le plasmide sans ADN étranger, d'autres possèdent un plasmide recombinant et parmi ces dernières, seules une infime minorité peuvent posséder le plasmide recombinant qui contient le gène que l'on veut isoler. Il faut être capable d'identifier ces cellules afin de récupérer l'ADN intéressant sous forme pure et en quantité suffisante.

4.2.1.6. Sélection des clones intéressants dans une banque d'ADN

La sélection des rares colonies de la banque qui contiennent le fragment d'ADN intéressant est souvent la partie la plus délicate du clonage des gènes.

Une des techniques fréquemment utilisée est une forme d'hybridation in situ qui se sert de l'extrême spécificité des interactions d'appariement entre 2 molécules d'acide nucléique complémentaires.

Des boîtes de cultures contenant les colonies bactériennes en croissance sont transférées avec un morceau de papier filtre, auquel quelques bactéries de chaque colonie

adhèrent. Ces bactéries sont ensuite traitées afin de faire éclater les cellules et de dénaturer l'ADN du plasmide puis hybridées avec une sonde radioactive contenant une partie de la séquence de l'ADN du gène d'intérêt.

Les colonies bactériennes qui ont fixé la sonde sont identifiées par autoradiographie.

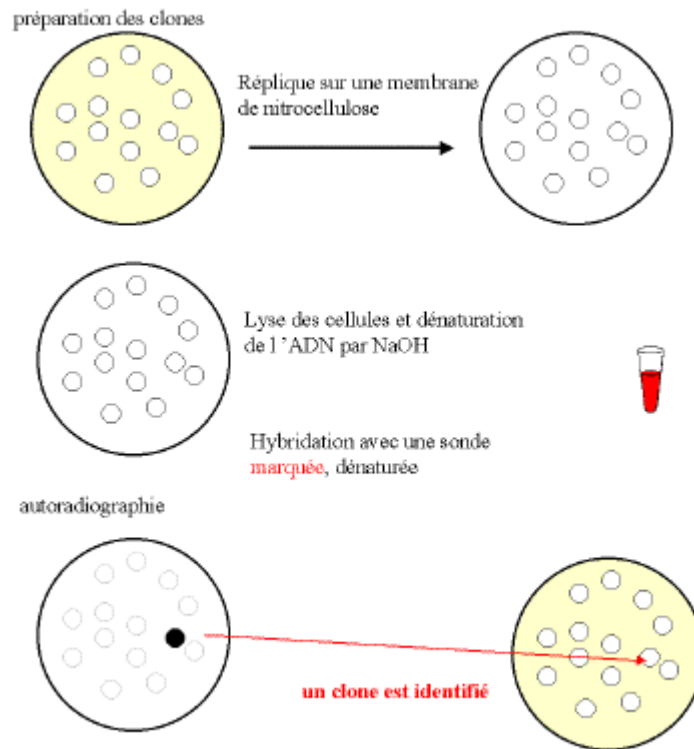


Fig.20 : Détection de l'ADN recombiné par l'utilisation d'une sonde radioactive

Il est alors possible de reprendre la colonie bactérienne correspondante, de l'inoculer pour une culture de grande ampleur et de purifier les plasmides recombinants.

Remarques : de nombreuses techniques peuvent être utilisées pour vérifier que le gène cloné dans un vecteur correspond à un gène d'intérêt : séquençage d'ADN, contrôle de taille par électrophorèse sur gel d'agarose, etc...

4.2.1 Préparation d'une banque d'ADN à partir d'ARNm (banque d'ADNc)

Le clivage de la totalité du génome d'une cellule avec une nucléase de restriction spécifique pour le clonage d'un gène est parfois qualifié de pêche à la ligne. En effet, on obtient des millions de fragments d'ADN qui produisent des millions de colonies différentes de cellules transformées.

Une autre stratégie possible est de commencer le processus de clonage en sélectionnant les seules séquences d'ADN qui sont transcrites en ARN et qui sont donc supposées correspondre à des gènes : les ARN messagers.

Cette méthode consiste à extraire l'ARNm à partir des cellules et à faire ensuite une copie d'ADN complémentaire (ADNc) de chaque molécule d'ARNm présente grâce à une transcriptase inverse (Fig.21).

La transcriptase inverse (ou reverse) isolée des rétrovirus est capable de catalyser la synthèse d'une chaîne d'ADN à partir d'une matrice d'ARN. Les molécules d'ADN monocaténaire synthétisées par cette enzyme sont ensuite converties en molécules d'ADN bicaténaire par l'ADN polymérase.

Ces molécules d'ADNc sont ensuite insérées dans des plasmides et clonées comme précédemment. On obtient alors une banque d'ADNc.

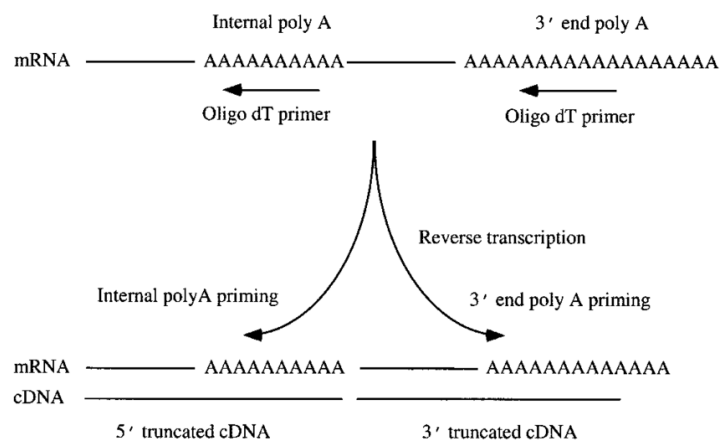


Fig.21 : Synthèse de l'ADNc à partir d'un ARNm

Une copie d'ADN (ADNc) d'une molécule d'ARNm est effectuée par la transcriptase reverse, une enzyme virale qui utilise une chaîne d'ARN comme matrice pour la synthèse d'une chaîne d'ADN complémentaire, formant ainsi une hélice hybride ADN/ARN. Le traitement de l'hybride ADN/ARN avec un alcali dégrade sélectivement la chaîne d'ARN en nucléotides. L'ADNc monocaténaire restant est alors copié en ADNc bicaténaire par l'ADN polymérase. Comme l'indique la figure, la transcriptase reverse et l'ADN polymérase requièrent toutes les deux une amorce pour commencer leur synthèse. Pour la transcriptase reverse, un petit oligonucléotide est utilisé ; dans cet exemple, l'oligo(dT) a été associé au poly A à l'extrémité 3' de la plupart des ARNm. Noter que la molécule d'ADN bicaténaire produite ici ne possède pas d'extrémités cohésives ; de telles molécules d'ADN à extrémités « tronquées » peuvent être clonées par un seul ou plusieurs procédés analogues à celui que montre la Fig.21 mais moins efficaces. Par exemple, des oligonucléotides synthétiques qui contiennent des sites de coupure par les enzymes de restriction peuvent être liés aux extrémités d'ADN, ou des « queues » d'ADN monocaténaires peuvent être additionnées par voie enzymatique pour faciliter l'insertion d'une molécule d'ADNc dans un vecteur de clonage.

4.3 Expression des gènes clones dans les microorganismes.

Quand on dispose d'une banque d'ADN d'intérêt (banque génomique ou banque d'ADNc) dont on a vérifié que le gène clone est celui que l'on veut faire exprimer, il faut alors transformer à nouveau des cellules avec le vecteur de clonage purifié (avec les mêmes techniques de transformation présentées précédemment) Cependant, pour que le gène s'exprime dans la cellule, celui-ci doit être entouré d'un ensemble de signaux que la bactérie (ou tout autre cellule transformée) devra reconnaître.

4.3.1 Promoteurs de transcription.

Les vecteurs d'expression possèdent un ou plusieurs promoteurs qui doivent être puissants et aisément régulés. En effet, chaque cellule possède des promoteurs faibles de transcription de gènes codant pour des molécules requises en faible quantité par la cellule et des promoteurs forts pour des substances devant être produites en quantité importantes.

De plus, l'expression d'un gène peut être induite ou réprimée par la présence d'un composé spécifique. Un des promoteurs le plus couramment utilisé est le promoteur_Lac qui est la séquence contrôlant la transcription du gène Lac Z codant pour la β galactosidase bactérienne. Ce promoteur est induit par l'IPTG.

Il est aussi possible d'utiliser d'autres promoteurs de transcription comme celui du gène de la tryptophane synthétase (Tryp E).

Il est possible d'augmenter la puissance du promoteur par des séries de mutations ou de délétions dans la séquence promotrice. On arrive alors dans certains cas à obtenir une efficacité de transcription multipliée par un facteur 10.

Le gène de la protéine à exprimer doit donc être clone de telle sorte que sa transcription soit

sous la dépendance de ce promoteur et introduit dans la bonne phase de lecture.

Ensuite, l'expression peut être améliorée sous les conditions environnementales qui normalement activent le promoteur : c'est le cas par addition d'IPTG dans le cas du promoteur Lac.

4.3. 2 Terminateurs

La présence de terminateurs de transcription à la fin des gènes clones est importante pour plusieurs raisons : la synthèse de longs transcrits non nécessaires va exiger de l'énergie et des structures secondaires indésirables peuvent se former dans le transcrit ce qui peut diminuer l'efficacité de la traduction du côté 5'.



Fig.22 : Schéma de l'opéron Lactose

4.3.3 Exemple de production : le cas de l'insuline humaine

L'insuline est une hormone peptidique constituée de 2 chaînes (A) et (B) reliées par des ponts disulfures et formées à partir de la préproinsuline par clivage d'une partie de la chaîne peptidique, utilisée pour le traitement des diabètes insulino-dépendants, elle fut tout d'abord extraite du bœuf (3 acides aminés différents avec l'insuline humaine) puis du porc (un seul acide aminé différent). Cependant, du fait de ces différences, ces insulines exogènes étaient immunogènes. Le génie génétique a permis de produire de l'insuline humaine à partir de bactéries génétiquement modifiées.

La stratégie expérimentale suivante a été utilisée :

- a) Isolement du gène de l'insuline : L'ARNm codant pour la proinsuline est isolé de cellules du pancréas. Par utilisation de la reverse transcriptase, on obtient de l'ADNc puis avec la polymérase, de l'ADNc bicaténaire.
- b) Le Vecteur : 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. Il contient aussi un promoteur puissant, celui de la (3 galactosidase (P_{gal}) ou celui de tryptophane

synthétase (Tryp E).

On a commencé par utiliser le promoteur de la p gai mais celui-ci produisant moins d'insuline que le promoteur Tryp E, c'est finalement ce second promoteur qui a été utilisé.

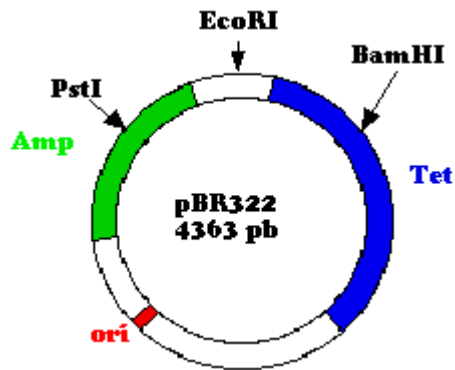


Fig.23 : Le plasmide PBR322

a) Insertion dans le vecteur

Le plasmide est ouvert au site Bam HI. L'ADNc codant pour la proinsuline est flanqué de 2 linkers (séquence d'ADN bicaténiare artificiellement ajouté) pour avoir la séquence de nucléotides appropriée à la ligation (compatibilité). La ligation des 2 molécules d'ADN (vecteurs et ADNc) se fait par une ligase.

b) Hôte : cellule transformée

Le plasmide ainsi modifié est introduit dans une bactérie. La souche choisie est E coli K12 initialement sensible à la tétracycline et à l'ampicilline

c) Sélection des clones

Le plasmide pBR322 apporte initialement les 2 résistances à l'ampicilline et à la tétracycline. Cependant, l'insertion du gène de la proinsuline au site Bam HI du plasmide ne lui permet pas d'apporter cette seconde 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 proinsuline.

d) Vérification de la production de proinsuline

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

e) Modification et caractérisation du produit

Les clones sélectionnés sont mis à cultiver à grande échelle. Le produit obtenu est purifié puis convertie en insuline par un mélange de trypsine et de carboxypeptidase B

L'insuline est ensuite analysée par HPLC et sa stéréochimie vérifiée. Enfin, des tests de toxicité et d'activité biologique sont effectués sur animal en mêmes temps que des études pharmacologiques et cliniques.

Autres applications possibles : de nombreuses molécules sont aujourd'hui synthétisées par génie génétique (vaccins, hormones, vitamines...). Actuellement, une autre voie de d'applications nombreuses sont la création d'organismes transgéniques, organismes dans lesquels on introduit dès les premiers stades embryonnaires des gènes modifiés. Une autre voie d'application est celle de la thérapie génique qui permettrait d'introduire des gènes sains dans un organisme contenant des gènes défectueux provoquant des maladies génétiques.

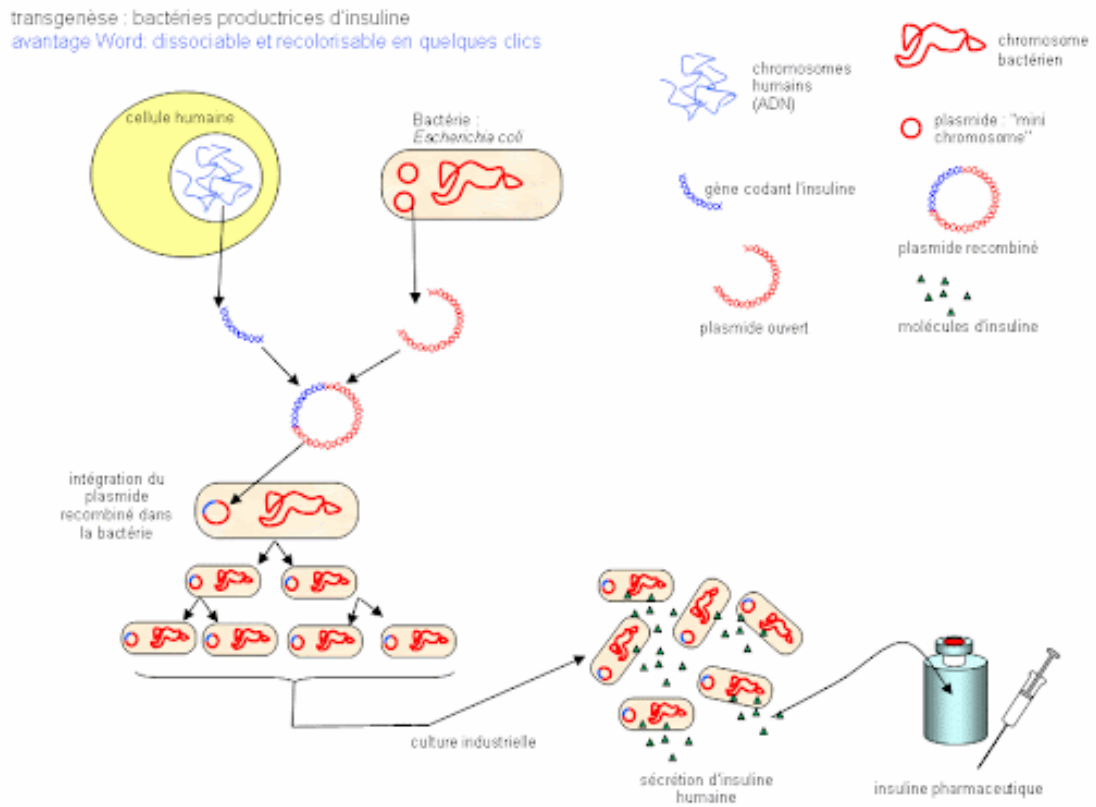


Fig.24 : Schéma de production d'insuline

Chapitre 5 : Fabrication d'un OGM

5.1 l'ADN recombinant

L'ADN recombinant est une molécule d'acide désoxyribonucléique composée de séquences nucléotidiques provenant de plusieurs sources. L'ADN recombinant provient d'une combinaison entre l'ADN d'un organisme donneur (ADN d'intérêt) et celui d'un vecteur (qui peut être d'une espèce totalement différente).

5.1.1 Le Clonage

Le terme clonage est l'opération faisant appel au génie génétique et permettant la production d'un clone. À partir de cellules isolées, il s'agit d'obtenir une lignée (plusieurs cellules similaires appelées clones) dérivant d'un seul ancêtre. La spécificité de ce processus est le fait d'avoir un patrimoine génétique rigoureusement **identique**. Autrement dit le clonage permet d'obtenir un grand nombre de copies absolument identiques soit d'une cellule et l'on parle alors de clonage cellulaire soit d'un fragment d'ADN et l'on parle alors de clonage moléculaire.

5.1.2 But de l'ADN recombinant

La technologie de l'ADN recombinant est un outil pour comprendre la structure, la fonction et la régulation des gènes et leurs produits. Les objectifs de cette technologie sont :

- a) L'identification des gènes.
- b) L'isolement des gènes.
- c) La modification des gènes.
- d) La réexpression des gènes dans d'autres systèmes

Les autres buts de cette technologie sont :

- a) La production d'une petite quantité de protéines d'intérêt scientifique comme les anticorps pour des applications expérimentales (ELISA, Western Blot...).
- b) La production de **protéines** d'intérêt médical comme les anticorps, les vaccins ou les enzymes pour le traitement et parfois dans des cas d'un manque ou d'une déficience. Produire des anticorps pour le diagnostic.
- c) La production d'une grande quantité de **protéines** d'intérêt économique et commercial.

5.2 Les protéines recombinantes

L'exemple connu des protéines recombinantes est l'insuline recombinante. L'insuline fut cristallisée en 1926. Elle fut la première protéine à être complètement séquencée en 1955, la première à être synthétisée chimiquement en 1958 et la première protéine humaine produite par biotechnologies en 1979 et commercialisée en 1982.

L'autre exemple de protéines recombinantes est l'hormone de croissance (tab.2). L'hormone de croissance est une substance chimique naturelle que sécrète l'hypophyse. Elle règle la croissance et le développement normal chez les enfants. L'hormone de croissance recombinante humaine (rHGH) est produite à partir de cellules modifiées par génie génétique afin de produire cette hormone. Un déficit en hormones de croissance entraîne une maladie appelée le nanisme hypophysaire. Les autres exemples sont résumés ci-dessous.

Tableau 2 : Exemples de protéines recombinantes

Protéines recombinantes	Cellule hôte
Anticoagulants	
Erythropoïétine	CHO
Interférons α , β et γ	
Facteurs VIII et IX de la coagulation	
Antithrombine	
α 1-antitrypsine	
TNF (tumor necrosis factor)	
Insuline	<i>E. coli</i>
EGF (epidermal growth factor)	
G-CSF (granulocyte colony stimulating factor)	
Anticorps	
Interleukine 2	<i>E. coli</i>
Vaccin contre l'hépatite B	
Lipocortine	

5.3 Les cellules hôtes d'un OGM

Une vaste gamme de systèmes de production de protéines recombinantes -c'est-à-dire, au sens restreint, de couples **vecteurs-hôtes** est aujourd'hui disponible, chacun d'eux présentant des avantages et des inconvénients. **Les hôtes** les plus utilisés à l'heure actuelle sont incontestablement la **bactérie** *Escherichia coli*, la **levure** *Saccharomyces cerevisiae* et les **cellules CHO** extraites des ovaires de hamster.

5.3.1 *Escherichia coli*

Elle fut et reste encore le premier hôte utilisé pour la fabrication de protéines recombinantes. Par exemple : hormone de croissance humaine, insuline, interféron α et interleukine-2.

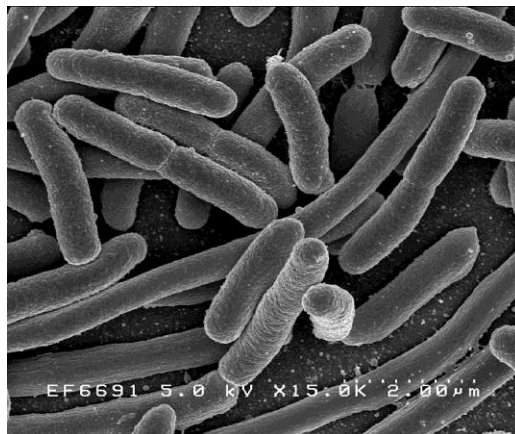


Fig. 25 : *Escherichia coli* (x15000) Wikipedia

5.3.2 D'autres bactéries :

Bacillus subtilis (fig.26), *Streptomyces*... A leur actif, celles-ci possèdent des capacités de sécrétion supérieures à *E. coli*. Cependant leur génétique est moins connue.

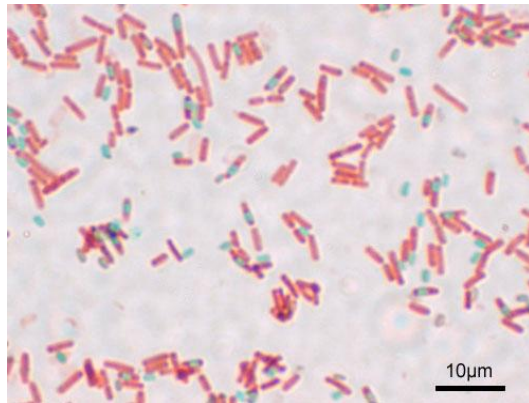
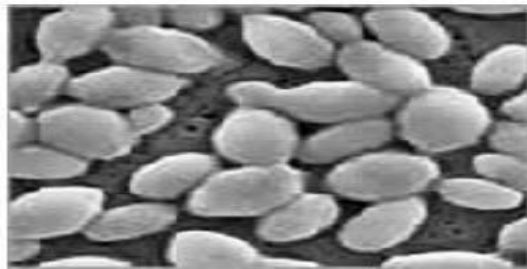


Fig.26 : *Bacillus subtilis*

5.3.3 *Saccharomyces cerevisiae*

Il s'agit de la levure de boulanger, utilisée depuis des millénaires dans l'alimentation humaine. Exemples de protéines recombinantes produites : antigène de surface du virus de l'hépatite B, insuline...

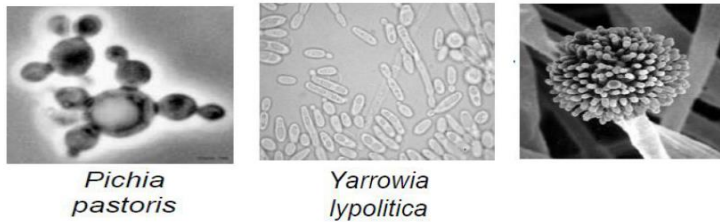


Saccharomyces cerevisiae

fig.27 *Saccharomyces cerevisiae*

5.3.4 D'autres levures et champignons filamenteux :

Pichia pastoris, *Kluyveromyces lactis*, *Hanseluna polymorpha*, *Yarrowia lipolytica*,
Aspergillus niger.



Champignon

Fig.28 : Levures et champignons hôtes pour les protéines recombinantes

5.3.5 Cellules CHO (Chinese Hamster Ovary)

Exemples de protéines , recombinantes produites : antigène du virus de l'hépatite B, hormone de croissance humaine, cytokines, facteurs de coagulation

5.3.6 Des cellules d'insectes (*Spodoptera frugiperda*)

Utilisant des vecteurs d'expression développés à partir du Baculovirus. Ces cellules sont capables de sécréter la protéine recombinante et d'effectuer les opérations post-traductionnelles. Par ailleurs il est possible également d'utiliser des larves de vers à soie vivants

Une autre voie consiste aujourd'hui à utiliser des bioréacteurs vivants en tant que système de production de protéines recombinantes, c'est-à-dire des plantes et animaux vivants transgéniques.

5.3.7 Cellules des animaux

Différents types de cellules animales sont utilisées ; les principales techniques de transgénèse utilisées sont la **micro-injection** dans les pronucléus ou dans le cytoplasme de l'embryon. Les animaux transgéniques peuvent être utilisés afin de produire des protéines hétérologues : production de facteur

IX de la coagulation dans le lait de brebis transgéniques, lactoferrine humaine obtenue dans le lait de vache transgénique, hormone de croissance humaine dans le lait de souris, hémoglobine humaine produite dans le sang du porc...

L'intérêt d'une production de protéines recombinantes dans le lait ou le sang d'animaux transgéniques se heurte cependant à des niveaux d'investissements très lourds pour des marchés *a priori* très restreints.

5.3.7 Cellules végétales

Différentes techniques sont employées afin de transférer un gène d'intérêt dans le patrimoine génétique d'une plante : vecteurs bactériens, injection de cellules embryonnaires totipotentes, biolistique, électroporation du protoplaste. La mise au point de plantes transgéniques à partir de végétaux comme le tabac, le colza ou encore la pomme de terre, permet de produire une variété de protéines recombinantes précieuses (**molecular farming**) : interféron, interleukine, facteur VIII de la coagulation. Dans ce domaine, restent principalement à résoudre les problèmes de niveau d'expression des protéines (rendements faibles), ainsi que d'extraction et de purification. Les plantes transgéniques pourraient représenter un moyen de production peu coûteux.

5.4 Synthèse des protéines (rappel)

La synthèse des protéines comprend deux étapes :

5.4.1 la transcription

Permet de copier l'ADN en ARN messager (ARNm). Elle se déroule dans le noyau chez les eucaryotes et dans le cytoplasme chez les procaryotes. On parle de transcription car l'ADN est copié en ARNm sans changement de langage (langage de nucléotides). Elle est réalisée grâce à l'ARN polymérase qui se fixe sur l'ADN déroulé et synthétise un brin d'ARN complémentaire à l'ADN. Elle nécessite des Nucléosides triphosphates et progresse dans le sens 5'-3'.

5.4.2 La traduction

Correspond au décodage de l'information portée par l'ARN messager en protéines. Dans ce cas on passe du langage de nucléotides au langage des acides aminés grâce au code génétique.

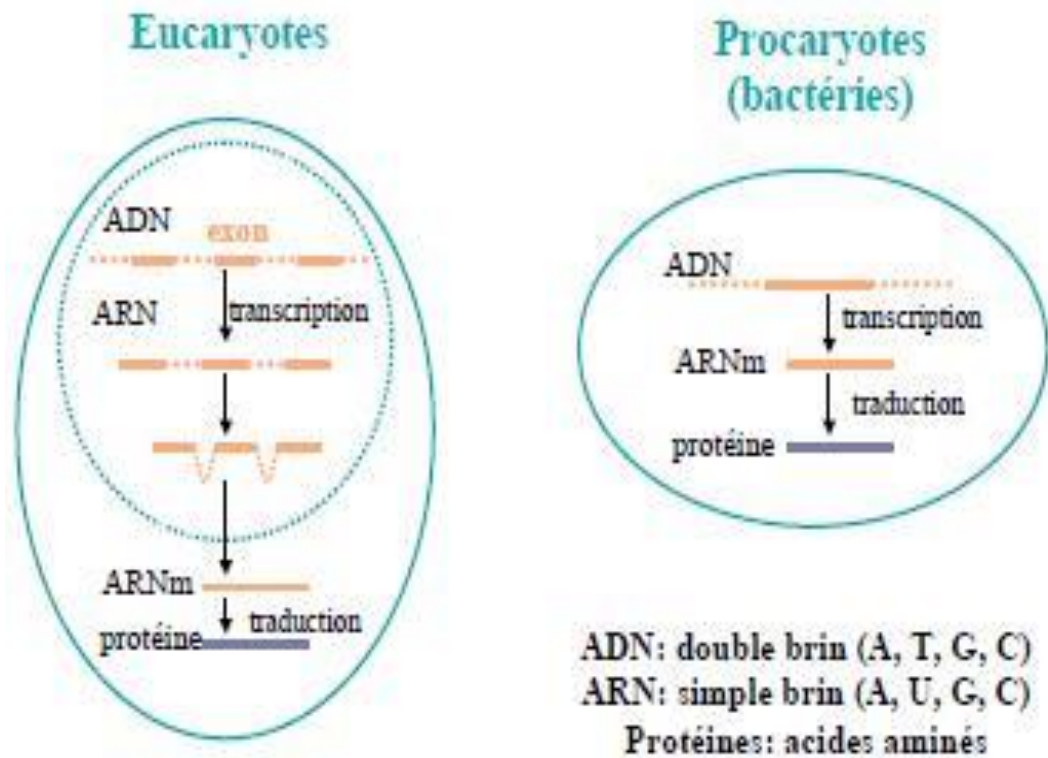


Fig.29 : Synthèse des protéines

5.5 Production de protéine recombinante

5.5.1 Etapes Production de protéine recombinante

La production des protéines recombinantes (fig.30) dans une cellule hôte suit les étapes suivantes :

- Obtention de cDNA correspondant à la protéine d'intérêt
- Clonage dans un vecteur d'expression
- Transformation/transfection dans une cellule hôte
- Purification et analyse de la protéine d'intérêt

Pour le clonage en vue de l'obtention d'une protéine recombinante on doit utiliser soit l'ADN génomique (l'ADN génomique est obtenu à partir de lignées cellulaires, de tissus ou d'organismes entiers en fonction de la taille de l'organisme. Pour un organisme donné on part de n'importe quel lot de cellules, l'ADN génomique sera le même) et l'amplifier par la PCR (fig.31) ou l'ARNm, si la protéine n'est exprimée que dans certains tissus : on doit récupérer l'ARNm à partir de ces cellules puis la conversion de ARNm en ADN par l'utilisation de la technique de RT-PCR (fig.32). Comme pour l'ADN génomique, l'ARN est obtenu à partir de lignées cellulaires, de tissus ou d'organismes entiers. Mais chaque type cellulaire exprime un lot donné de gènes donc pour un organisme donné on part d'un lot de cellules ; l'ARN est différent pour chaque type cellulaire

- **Informations portées par l'ADN donneur**

- **Sur l'ADN génomique** : région codante et non codante (régions promotrices, régulatrices).
- **Sur l'ADN complémentaire** : région codante, mais il y a aussi les régions (5'et 3' non traduites).

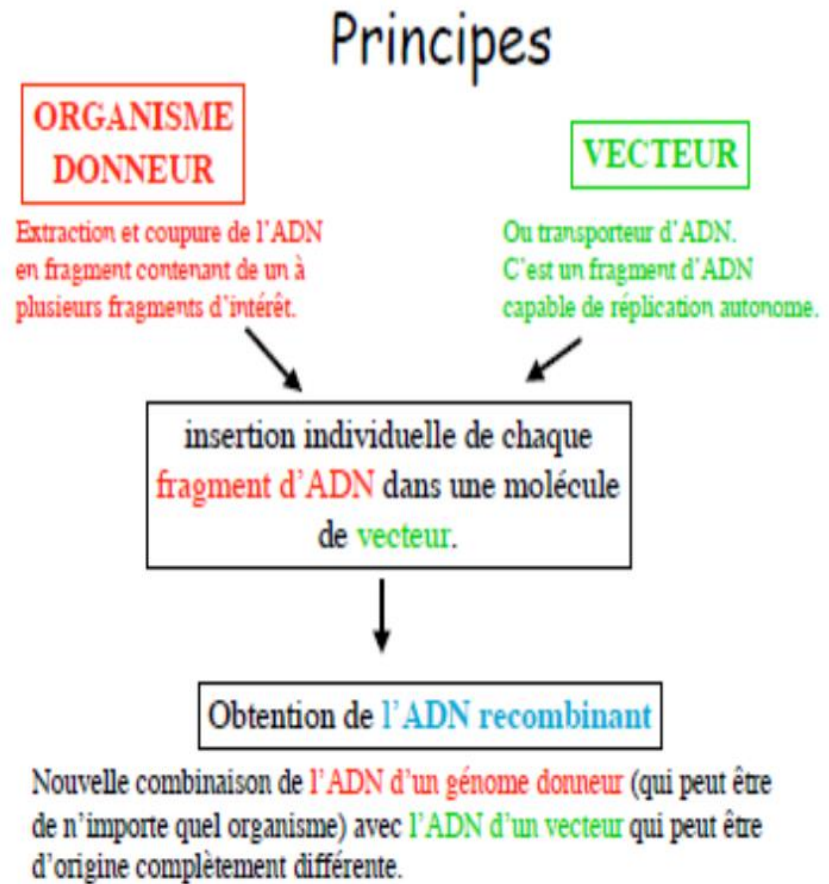
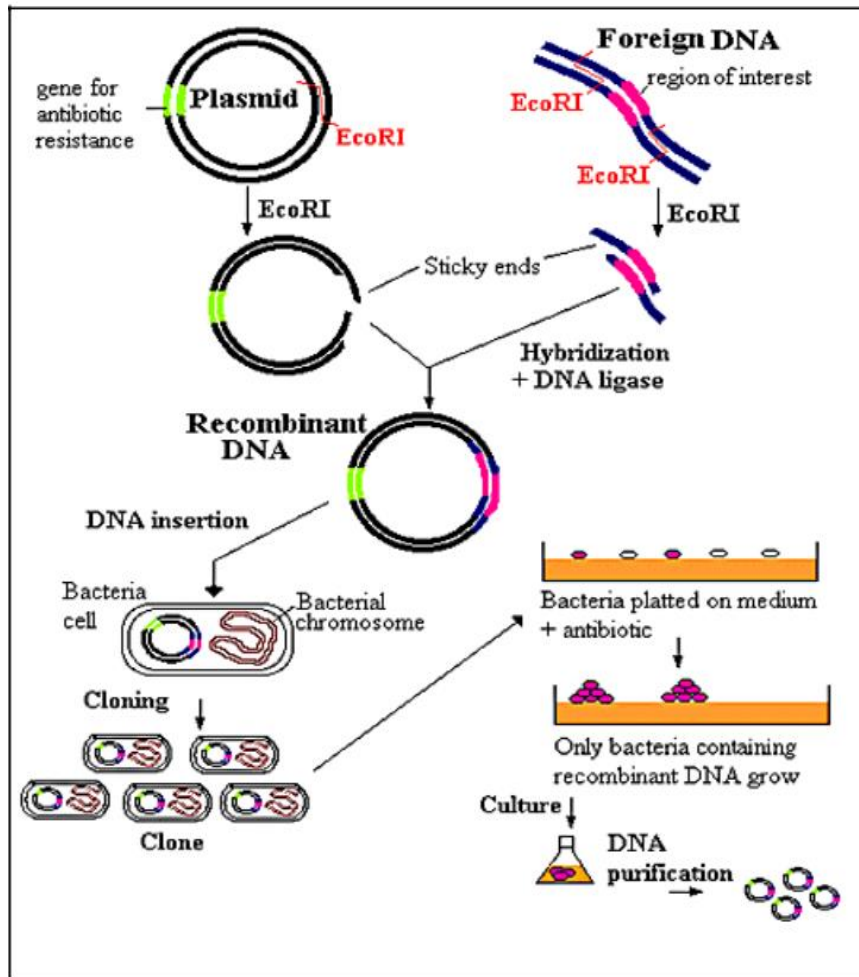


Fig. 30 : Principe du clonage

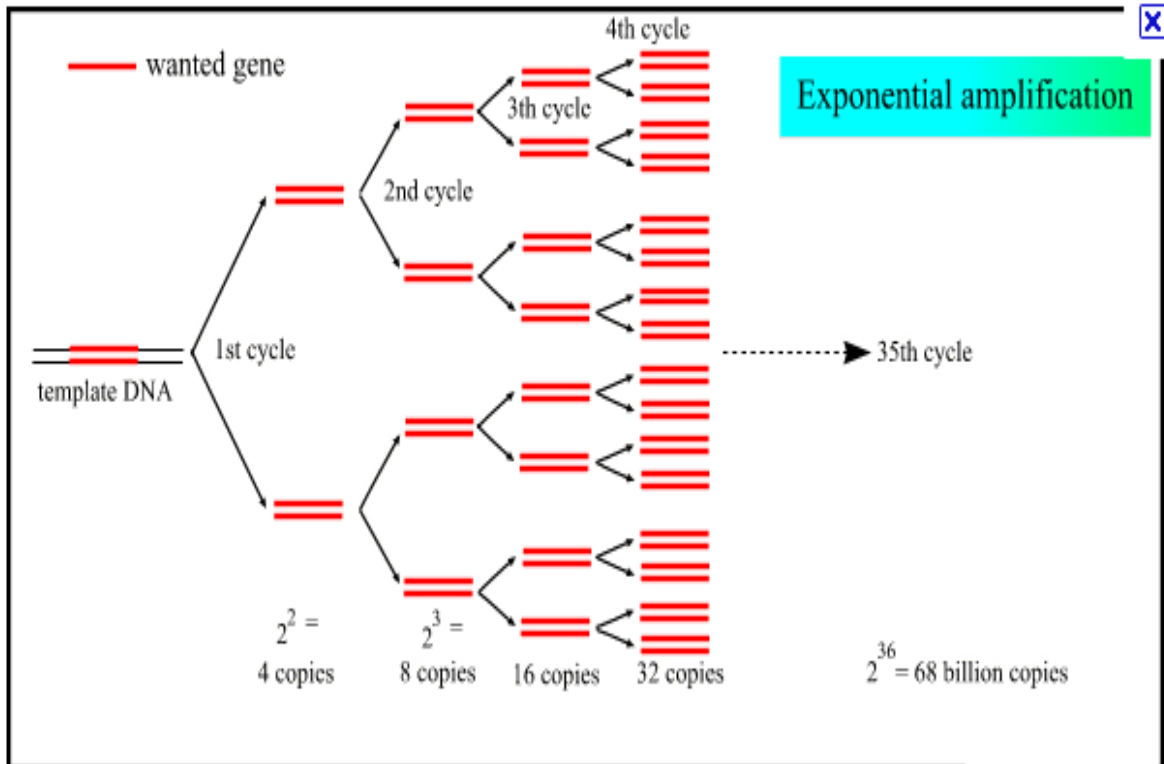


Fig.31 : Amplification de l'ADN génomique (gène d'intérêt) par la PCR

Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

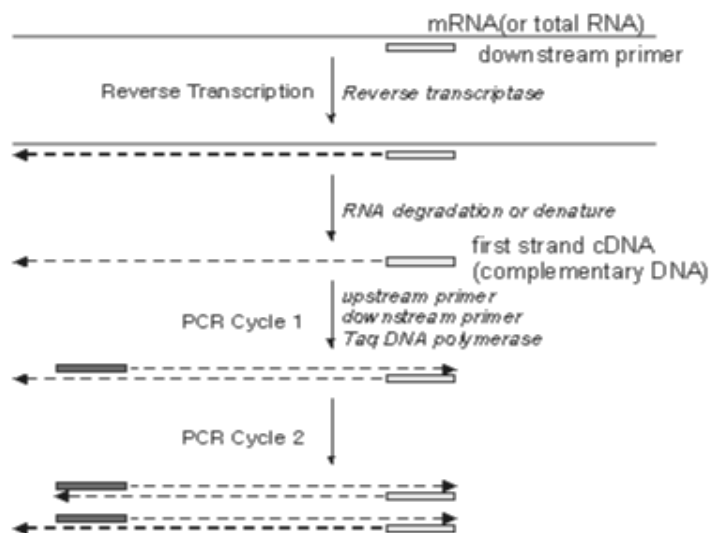


Fig .32 : La conversion de ARNm en ADN par l'utilisation de la technique de RT-PCR

Principe de RT-PCR

1) Pour réaliser une RT-PCR en tube (par opposition à la RT-PCR *in situ*), il faut commencer par extraire les ARN et les recopier *in vitro* en ADNc simple brin.

2) La synthèse du second brin d'ADNc ainsi que la PCR sont effectués dans un deuxième temps par la Taq polymérase (ou par une autre ADN polymérase thermorésistante).

1) Synthèse de l'ADNc

La synthèse d'ADNc est catalysée par des transcriptases inverses (reverse transcriptase RT en anglais). Ces enzymes sont des ADN polymérases ARN dépendantes, capables d'utiliser un brin d'ARN comme matrice pour catalyser la synthèse du brin d'ADN complémentaire (cf. tableau ci-dessous). Cela correspond effectivement à l'«inverse» d'une réaction de transcription de l'ADN en ARN.

ARN matrice	Appariement	ADNc synthétisé
A	Avec	T
U	Avec	A
G	Avec	C
C	Avec	G

Les transcriptases inverses sont issues de rétrovirus dont elles sont une des principales caractéristiques. Exemples : la transcriptase inverse du Virus du Myéloblastome Aviaire (AMV), celle du Virus de la Leucémie Murine (Mo-MLV ou Mu-LV).

Comme toutes les ADN polymérases, les transcriptases inverses ne peuvent pas initier seules la synthèse d'un brin d'ADN. Elles ont besoin d'une amorce possédant une extrémité 3'-OH libre. Lorsque les ARN à amplifier sont polyadénylés en 3' (ARNm eucaryotes par exemple), l'amorce choisie peut être simplement une séquence polyT constituée d'une succession de désoxythymidines (comme sur le schéma ci-dessous en rouge). Dans ce cas, tous les ARNm sont a priori copiés en ADNc.

Remarque : il est aussi possible de réaliser l'étape de transcription inverse directement avec les amorces spécifiques de l'ARN d'intérêt, sans utiliser d'amorce polyT (non illustré). Dans ce cas, l'ADNc obtenu est complémentaire du seul ARN d'intérêt.

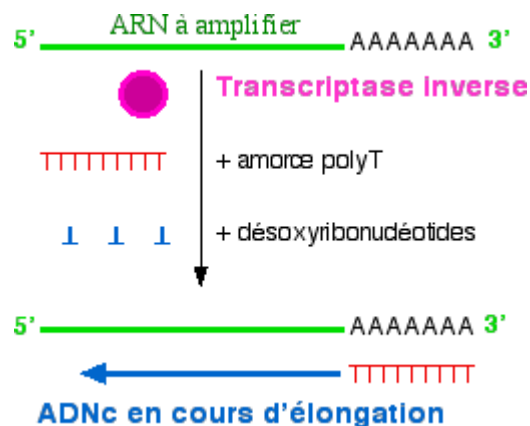


Schéma simplifié du principe de la réaction de transcription inverse en présence d'amorce polyT

2) Principe de la PCR

Selon les protocoles (nombreux et variés), il est recommandé d'inhiber la réaction de transcription inverse et de détruire ou dénaturer l'hybride ARN/ADNc.

Dans un premier temps, la Taq polymérase catalyse la synthèse du second brin d'ADNc en utilisant le premier brin comme matrice.

Ensuite, la PCR permet d'amplifier le fragment d'ADNc.

Remarque : Certaines ADN polymérase ADN dépendantes thermostables comme celle de *Thermus thermophilus* (*Tth*), ont naturellement une activité transcriptase inverse en présence d'ions manganèse. D'où l'idée d'effectuer la réaction de transcription inverse et la PCR dans le même tube et avec la même enzyme.

(Nous ne discuterons pas ici des avantages et inconvénients respectifs de cette méthode).

ADNc obtenu par transcription inverse



La synthèse du second brin d'ADNc ainsi que la PCR sont effectués dans un deuxième temps par la Taq polymérase

Le produit final est un ADN dont l'un des brins est complémentaire de l'ARN d'intérêt et l'autre brin a la même séquence que cet ARN d'intérêt (à la substitution près de U par T).

5.5.2 Clonage dans un vecteur d'expression

Le ADNc et le vecteur doivent être coupés par l'utilisation des enzymes de restrictions qui sont des enzymes bactériennes qui reconnaissent des séquences spécifiques sur l'ADN (le cDNA ou le vecteur) de 4 à 8 paires de bases, et qui clivent l'ADN sur les deux brins au niveau de ces sites. Elles coupent l'ADN au niveau des ponts phosphodiester.

o Caractéristiques :

- La plupart des sites sont des séquences inversées répétées (**palindromes**) cas de *EcoRI* : 5'GAATTC 3' ; 3'CTTAAG 5'.
- Coupure avec formation de **bouts collants** ou à **bouts francs** :

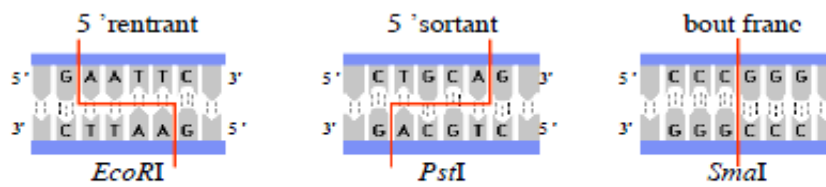


Fig.33 : Modes d'action des enzymes de restriction.

5.5.3 Propriétés des vecteurs de clonage

Les vecteurs de clonage utilisés pour la production d'un OGM doivent avoir les caractéristiques suivantes :

- Capables de réplication autonome dans une cellule hôte donnée (origine de réplication de type procaryotique et/ ou eucaryotique).
- Possèdent un polylinker ou site multiple de clonage.
- Supportent l'insertion d'un fragment d'ADN plus ou moins grand.

5.5.4 Différents vecteurs de clonage

Les vecteurs décrits dans le chapitre précédents sont soit des plasmides , soit des phages, soit des cosmide ou des vecteurs artificiels , Ils sont choisis en fonction de leur capacité à cloner des fragments d'ADN selon leur tailles (Tab.3).

Tableau 3 : Taille maximum approximative du fragment d'ADN qui peut être cloné dans chaque vecteur).

Type de vecteur	ADN cloné en Kb
Plasmide	20
Phage lambda	25
Cosmide	45
Phage P1	100
Bac (bacterial artificial chromosome)	300
Yak (yeast artificial chromosome)	1000

5.5.5 La Ligation (ligature...)

Les **ADN ligases** (fig.34) sont des enzymes de la classe des ligases qui catalysent la formation d'une liaison phosphodiester entre deux segments d'ADN. Les ADN ligases interviennent dans plusieurs processus cellulaires essentiels du métabolisme de l'ADN : dans la réplication de l'ADN, pour la suture des fragments d'Okazaki et dans la réparation de l'ADN et dans la recombinaison homologe.

L'ADN ligase permet de former une liaison entre le groupement 5'-phosphate d'un segment d'ADN et le groupement 3'-OH du segment précédent sur le même brin. En général, ces deux segments sont associés au brin d'ADN complémentaire qui sert de matrice pour la suture des brins. Certaines ADN ligases (ADN ligase IV) sont capables de faire de la suture d'ADN présentant des cassures double-brin.

La formation de la liaison phosphodiester nécessite un cofacteur, en général l'ATP (parfois le NAD⁺) qui est hydrolysé en AMP (ou NMN) lors de la réaction.

Les ADN ligases sont des enzymes qui jouent un rôle essentiel en biologie moléculaire et en génie génétique, comme l'un des outils majeurs de production d'ADN recombinant. L'ADN ligase permet en particulier de suturer les fragments d'ADN produits par des enzymes de restriction.

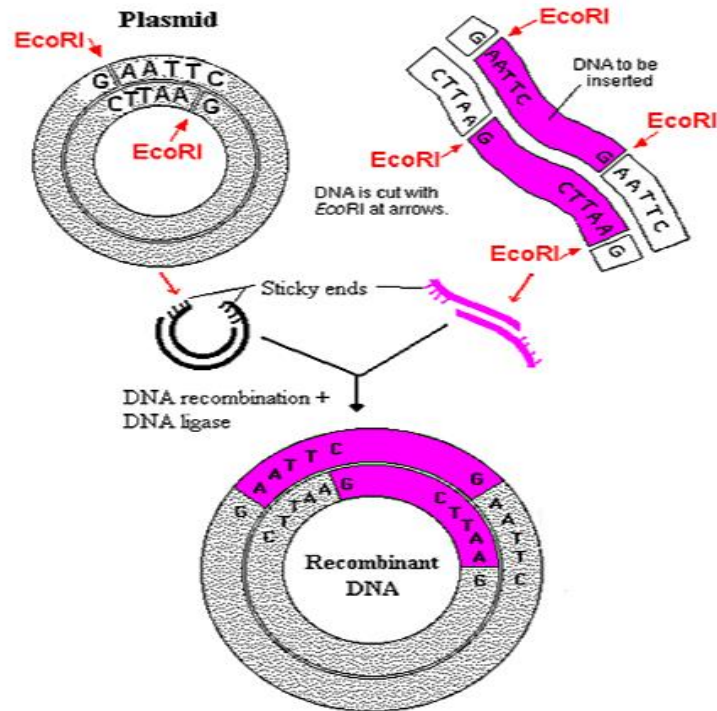


Fig.34 : Les ligases qui catalysent la formation d'une liaison phosphodiester entre deux segments d'ADN.

5.5.6 La Transformation/transfection dans une cellule hôte

Il existe plusieurs méthodes de transformation/transfection de l'ADN recombinant dans les cellules hôtes qui seront décrits ci-dessous et détaillés dans le chapitre 6 :

- **Chlorure de calcium et choc thermique** : Méthode de transformation des bactéries compétente.
- **Électroporation** : Brève impulsion électrique provoquant l'ouverture temporaire de pores laissant passer l'ADN.
- **Lipofection** : Complexe ADN/Lipide qui entre par fusion avec la membrane plasmique.
- **Biolistique** : L'ADN adsorbé sur des particules d'or ou de tungstène est projeté sur les cellules sous pression d'hélium par exemple.
- **Infection virale** : Réservé aux vecteurs viraux par exemple : Baculovirus (cellules d'insectes), Adénovirus (cellules de mammifères), Bactériophages (bactéries).

Chapitre 6 : Techniques de transfert de l'ADN recombinant

6.1 Techniques de transfert direct

La transformation directe consiste en l'introduction dans l'ADN d'un gène véhiculé, le plus souvent par un plasmide classique, par le biais de techniques physico-chimiques.

Il existe plusieurs techniques de transfert direct que nous allons expliciter : l'électroporation, la micro-injection et la biolistique.

6.1.1 L'électroporation

L'électroporation est une des techniques les plus simples à mettre en œuvre. Elle consiste à soumettre un mélange de protoplastes et d'ADN à des chocs électriques. C'est Brève impulsion électrique provoquant l'ouverture temporaire de pores laissant passer l'ADN. Cette technique nécessite beaucoup de cellule, car 50% de cellules sont mort.. Ces Application sont chez : Bactéries (protoplastes *E. coli*), Levure (*S. cerevisiae*),

Le champ électrique provoque la déstabilisation de la membrane plasmique du protoplaste et conduit à l'ouverture des pores membranaires, facilitant ainsi le passage de l'ADN dans le noyau. Or, les protoplastes baignent dans une solution de plasmides. Ces derniers passent donc très facilement dans la cellule qui se trouve à son tour génétiquement modifiée.

Cette manipulation est possible car le phénomène d'ouverture des pores est réversible. En effet, si le choc électrique n'a pas été trop violent, la membrane peut alors reprendre son état initial.

Cellules de mammifères en suspension C'est grâce à cette technique que le riz, le maïs ou l'orge ont été transformés pour la première fois.

On peut schématiser cette technique ainsi (fig.35):

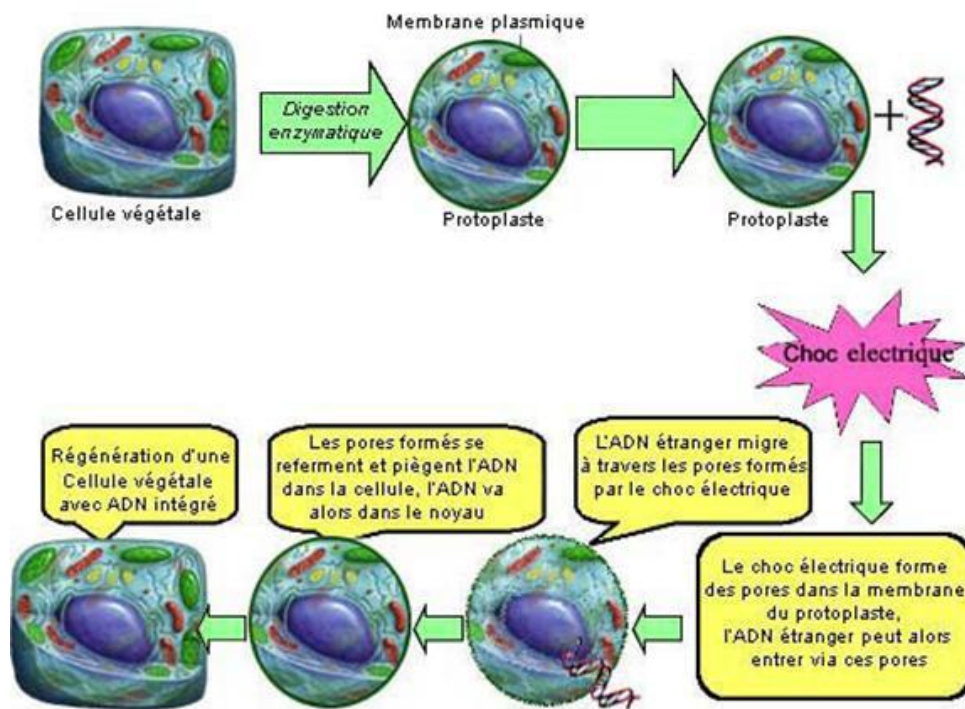


Fig.35 : Représentation schématique de la méthode de l'électroporation

6.1.2 La micro-injection

La micro-injection se réalise sur des protoplastes. L'opération consiste à introduire directement le gène étranger dans la cellule à modifier, à l'aide d'un micromanipulateur monté avec un microscope.

On maintient le protoplaste à transformer avec une micro-aiguille et on introduit le gène accompagné de son complexe **promoteur-terminateur** dans le noyau, à l'aide d'une micro-pipette. La cellule est alors génétiquement modifiée. Après l'injection, le protoplaste est libéré et mis en culture sur un milieu approprié.

Un promoteur est une séquence d'ADN placée en amont du gène et qui est nécessaire à sa transcription, c'est-à-dire à la formation d'un messager : l'ARN (Acide RiboNucléique), ce dernier étant une copie d'un brin de l'ADN qui est capable de sortir du noyau. Un

terminateur est une séquence d'ADN présente en aval du gène et au niveau de laquelle l'élongation de l'ARN prend fin (fin de la transcription).

Cependant cette méthode ne s'applique que dans des cas particuliers car elle est complexe et lourde à utiliser : pour réussir l'opération, il faut injecter mille copies du gène dans l'espoir qu'une cellule puisse accepter cet ADN étranger.

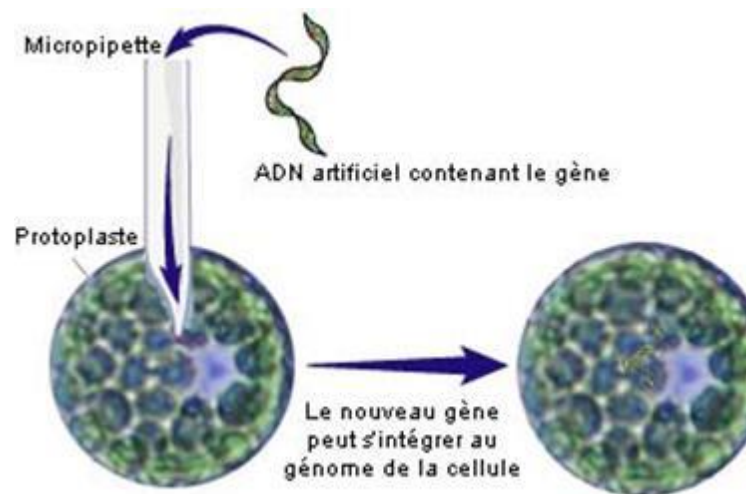


Fig.36 : Schéma récapitulatif de la micro-injection

6.1.3 La biolistique

La biolistique, ou balistique biologique, est la méthode la plus courante. Elle consiste à propulser le transgène dans les cellules végétales.

On utilise des microbilles de métal enrobées d'ADN (billes d'or ou de tungstène de un micron). Elles sont projetées à grande vitesse sur les cellules à transformer afin de traverser leur paroi (fig.37). Ces billes seront progressivement freinées en traversant les différentes couches cellulaires. Quelques-unes des cellules atteintes vont alors insérer spontanément les transgènes dans leur génome. Mais le noyau de la cellule intègre l'ADN de façon aléatoire. Il

faudra environ quinze jours pour s'assurer que les nouveaux gènes introduit se sont bien intégrés au génome.

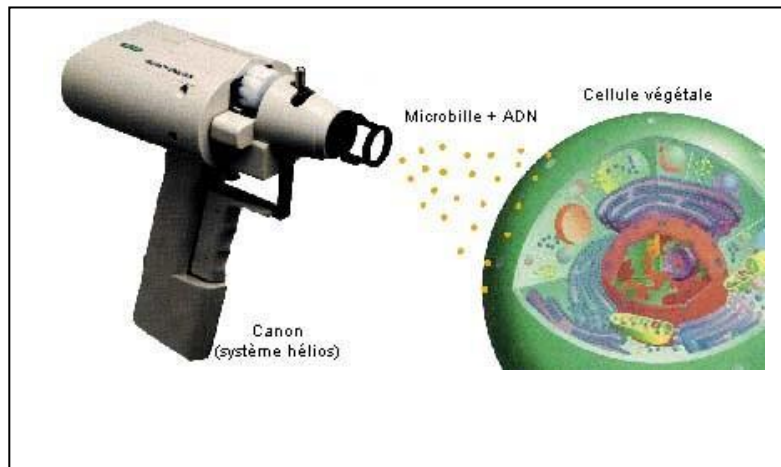


Fig.37 : La biolistique

Cette méthode est très prometteuse, car elle permet de façon simple et rapide d'injecter de l'ADN dans une grande quantité de cellules sans passer par une phase protoplasmique, encore très mal maîtrisée chez certaines espèces. De plus, cette injection peut être réalisée sur un tissu non désolidarisé de l'organe d'origine.

Il existe également d'autres procédés pour fabriquer un OGM : les techniques de transfert indirect. Celles-ci utilisent l'intermédiaire de bactéries qui véhiculent le transgène jusqu'à la cellule souhaitée. Nous allons voir comment ces méthodes sont mises en action concrètement.

6.1.4 La lipotransfection

La technique de la lipotransfection est également une méthode dite directe. Le but de cette méthode est d'« emprisonner » le gène d'intérêt dans un liposome, c'est-à-dire une structure sphérique constituée de lipides. Ceux-ci ont la capacité de fusionner avec la membrane de protoplastes, ils libèrent ainsi leur contenu (ici le gène d'intérêt) dans le cytoplasme du protoplaste. Cependant, seulement une minorité de ces gènes pourront parvenir jusqu'au noyau et s'intégrer par la suite au génome de la cellule, c'est pourquoi cette méthode est peu utilisée.

Application : Cellules de mammifères adhérentes et en suspension. Méthode moins toxique et parfois beaucoup plus efficace

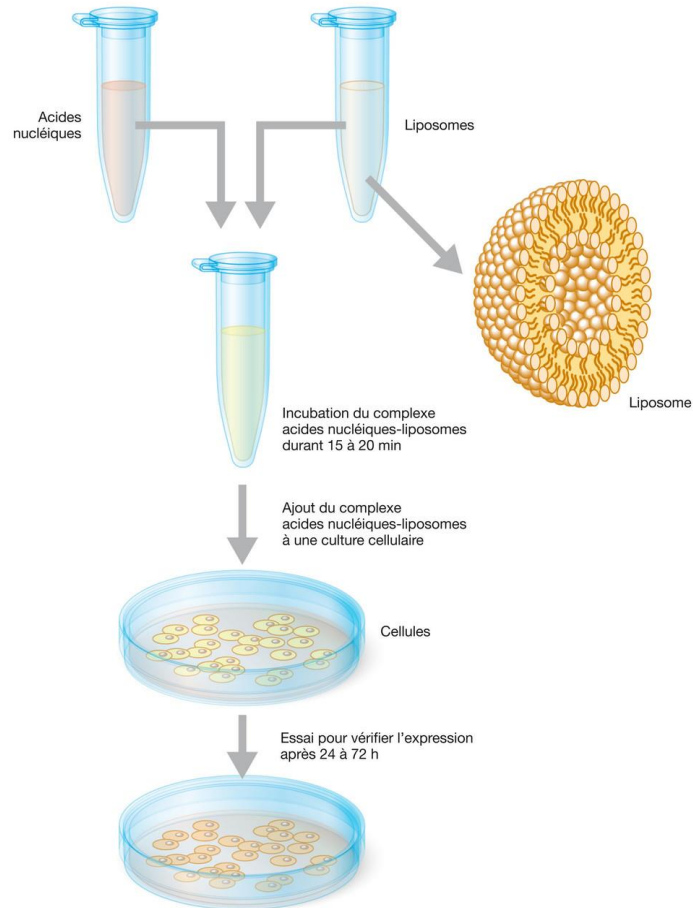


Fig.38 : La lipotransfection

6.2 Techniques de transfert indirect

Le développement de la transgénèse végétale a connu son essor grâce à la découverte de bactéries telluriques phytopathogènes : *Agrobacterium tumefaciens* et *Agrobacterium rhizogenes*.

6.2.1 La transfection biologique

La méthode de la transfection biologique utilise les propriétés de ces bactéries. C'est une méthode plus « naturelle » que celles que nous avons vues précédemment.

● Première étape :

Tout d'abord, on introduit le gène d'intérêt dans un plasmide. Pour cela, on utilise différentes enzymes, notamment une enzyme de restriction et la ligase. On obtient donc un plasmide génétiquement modifié comprenant le gène d'intérêt.

● Deuxième étape :

Dans un second temps, ce plasmide est transféré dans une bactérie, généralement de l'espèce *Escherichia coli* (*E. coli*). On cultive les colonies de *E. coli* transformées pour préparer le plasmide vecteur.

● Troisième étape :

L'étape suivante a pour but de sélectionner les bactéries *E. coli* qui ont été transformées. Les bactéries ayant intégré le plasmide possèdent maintenant le gène d'intérêt, mais également un gène de résistance à un antibiotique particulier. Les bactéries sont donc placées dans un milieu de culture qui contient cet antibiotique. Les bactéries transformées génétiquement seront les seules à se développer dans ce milieu, c'est ainsi qu'elles sont sélectionnées.

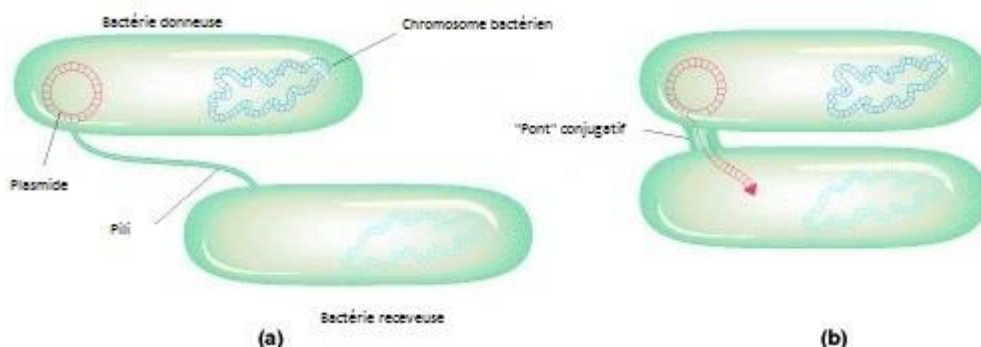


Fig.39 : Schéma de la conjugaison bactérienne

● Quatrième étape :

On intègre alors le plasmide transformé dans une plante à l'aide d'une autre bactérie : *Agrobacterium tumefaciens* (A. tumefaciens), qui possède la capacité à introduire des fragments précis de son ADN (ADN-T) dans le génome des plantes. Le plasmide est transféré de E. coli à A. *tumefaciens* par choc thermique ou par conjugaison (voir schéma ci-dessous).

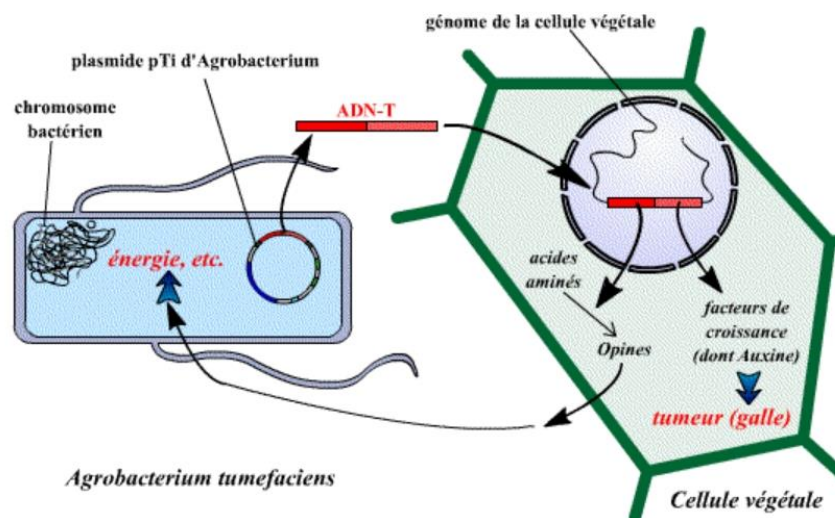


Fig. 40 : *Agrobacterium tumefaciens*

● Cinquième étape :

Enfin, on place dans un milieu de culture commun des bactéries A. tumefaciens et un fragment de tissu végétal (un morceau de feuille ou de tige par exemple). Grâce aux propriétés de la bactérie, la partie du plasmide qui contient le gène d'intérêt est transférée dans le noyau de la cellule végétale qui l'intègre alors dans son génome. La dernière étape est alors la régénération de plantes entières à partir de ces cellules.

Malheureusement, cette méthode plus « naturelle » ne fonctionne que chez certaines espèces (tabac, colza, tomate, pomme de terre, melon et tournesol).

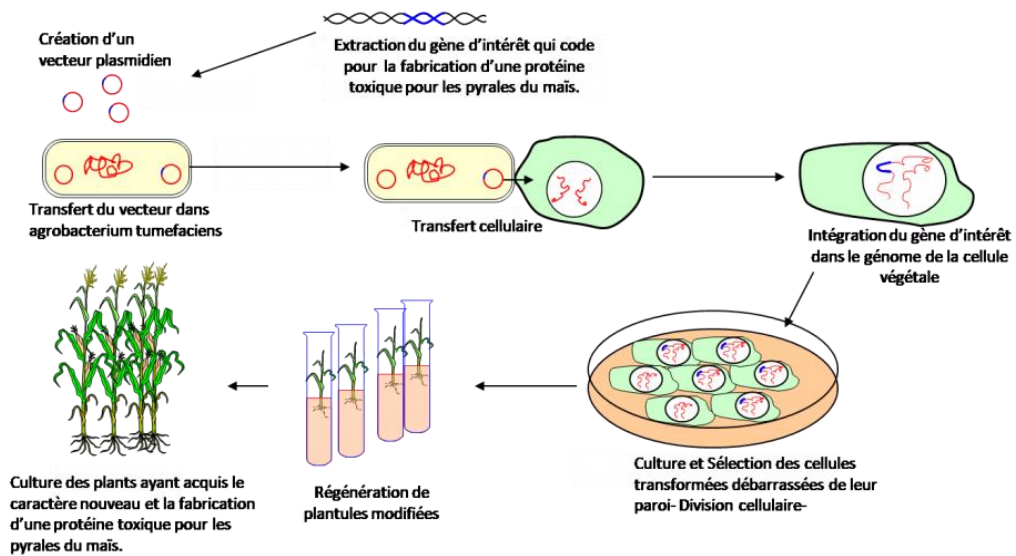


Fig.41 : Schéma récapitulatif des différentes étapes de la transfection biologique

Conclusion :

Il existe donc diverses méthodes de fabrication d'un OGM, basées sur des principes différents. Ces techniques fonctionnent toutes sur des cellules végétales. Cependant les cellules animales sont spécifiques, elles ont un rôle déterminé au sein de l'organisme, ainsi, pour créer un OGM animal, il faut agir sur la cellule à la base de toutes les autres : la cellule-œuf (qui donnera alors naissance à un nouvel organisme génétiquement modifié). On utilise donc plus particulièrement la technique de la micro-injection en ce qui concerne la transgénèse animale.

Chapitre 7 : Méthodes de détection des aliments OGM

Une fois l'organisme modifié, il est nécessaire de pouvoir vérifier que l'opération de transgénèse a correctement fonctionné, c'est pourquoi les chercheurs ont mis en place des méthodes de détection des OGM. De plus, cette détection est nécessaire pour informer les consommateurs sur la véritable nature de leurs aliments : génétiquement modifiés ou non.

La détection des OGM dans les aliments humains est une obligation réglementaire (directive européenne) depuis septembre 1998. La réglementation retient les protéines (Test ELISA, le strip test , l'électrophorèse , le western blot) et ADN issus des OGM comme critère de détection (La PCR, la puce a ADN, le southern Blot) . Il n'existe pas actuellement de méthode normalisée de détection des OGM.

7.1 Détection des protéines recombinantes

Les méthodes de détection des protéines transgéniques sont basées sur une réaction immunologique, celle des anticorps. Ces derniers, molécules de base de notre système immunitaire, sont capables de se lier spécifiquement à une protéine précise. Ainsi, en utilisant des anticorps se liant spécifiquement à la protéine Cry1Ab d'un maïs Bt, il sera possible de détecter cette protéine au milieu de plusieurs autres.

La révélation de la présence de PGM peut s'effectuer par la détection des protéines issues du transgène. Hormis quelques cas de dosages d'activité enzymatique, quasiment abandonnés, il s'agit de méthodes immunologiques, c'est-à-dire basées sur l'utilisation d'anticorps dirigés sur les protéines codées par le transgène.

7.1.1 Le Test ELISA

Ce test est effectué en laboratoire. Il repose sur l'interaction spécifique entre la protéine codée par le transgène et l'anticorps reconnaissant cette protéine. Cette interaction est révélée par une réaction colorimétrique proportionnelle au nombre d'anticorps liés et donc à la quantité de protéines du transgène présente : plus il y a de protéine transgénique, plus il y a d'anticorps la reconnaissant. Les quantités d'anticorps et donc de protéines transgéniques présents dans la solution induisent des couleurs différentes, témoignant des quantités en jeu.

Techniquement, les protéines extraites sont disposées sur des plaques à 96 puits, chacun recevant ensuite des solutions contenant des anticorps. Les mesures de quantité d'anticorps retenus sur cette plaque, par une réaction fluorométrique ou colorimétrique directe ou par l'ajout d'un autre système (ex : biotine - streptavidine), permettent de mesurer la quantité initiale de protéines retenues et donc présentes. Ces analyses ne peuvent se faire qu'en laboratoire.

6.1.1.1 Description de la méthode Elisa

On peut réaliser la même expérience avec une plante transgénique et une plante naturelle. Après avoir extrait les protéines de la plante, on les met en présence d'un anticorps spécifique de la protéine codée par un gène transgénique. Cela signifie que cet anticorps ne peut se fixer qu'à la protéine codée par le gène transgénique. Deux cas peuvent alors se présenter.

- Une protéine se fixe à l'anticorps. Elle correspond donc à la protéine que l'on recherche. Un gène a donc été introduit artificiellement dans la plante et a codé cette protéine.
- Aucune des protéines ne se fixe à l'anticorps. Le type de protéine que l'on recherche, spécifique à l'anticorps introduit, ne se trouve donc pas dans la plante.

Pour visualiser les résultats de l'expérience, on effectue par la suite un lavage, c'est-à-dire que l'on enlève toutes les protéines qui ne se sont pas fixées à l'anticorps. On ajoute ensuite un autre anticorps, qui est lui aussi spécifique de la protéine recherchée et fluorescent. Ceci nous permet de le repérer facilement.

On procède ensuite à un nouveau lavage. Si une protéine est fixée sur l'anticorps, le deuxième anticorps fluorescent peut alors se fixer sur l'autre côté de la protéine. Le test est ainsi positif (1er cas). Si au contraire aucune protéine ne correspond au premier anticorps, l'anticorps fluorescent ne se fixe pas. Le test est négatif (2^{ème} cas) fig.42.

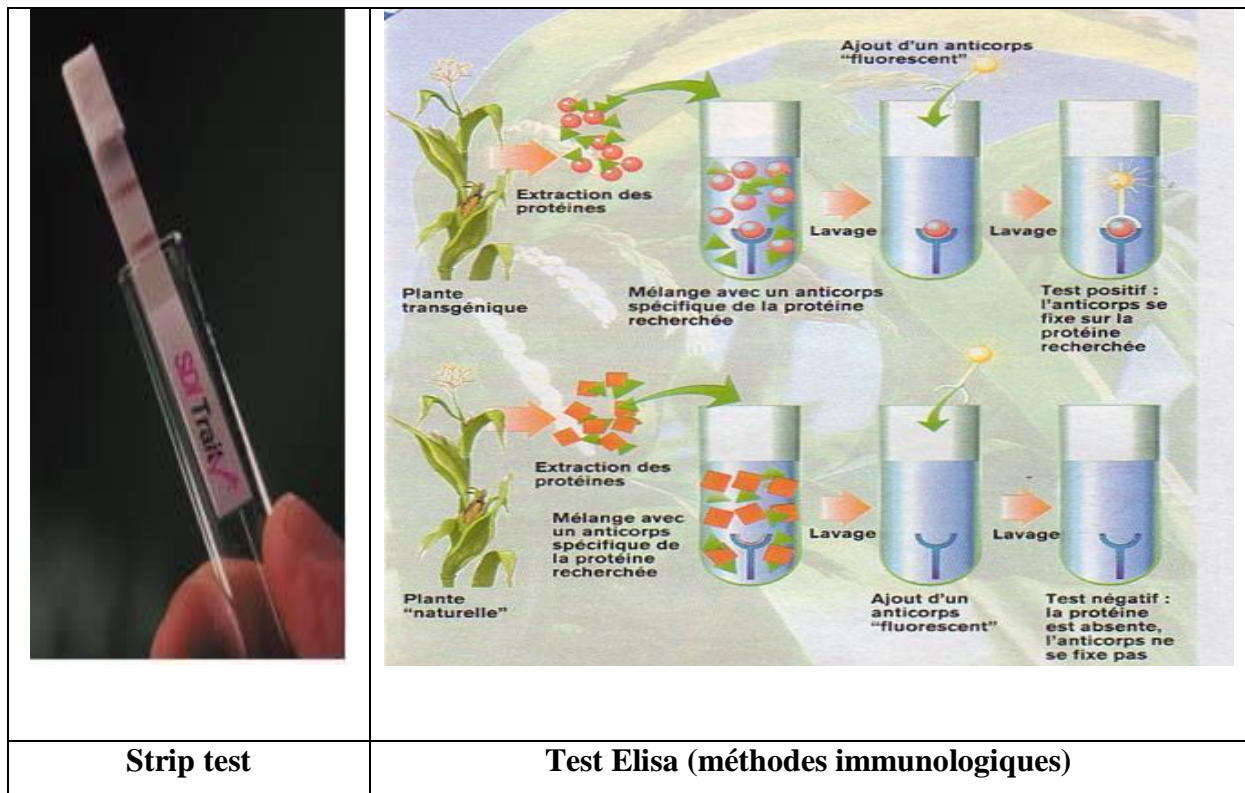


Fig.42 : Méthodes immunologiques

7.1.2 Les Strip tests

Ce test peut être effectué par l'agriculteur, sans que le résultat n'ait de valeur autre qu'indicative. Le principe de base est le même que celui du test ELISA (réaction avec les anticorps) mais il se réalise sur des bandelettes (fig.42 gauche), avec une migration d'une partie des composants et de l'échantillon le long de la bandelette. La partie inférieure est trempée dans la solution préparée avec le broyat de l'échantillon à analyser, les protéines de l'échantillon de plantes remontent le long de la bandelette. Elles rencontrent tout d'abord les anticorps spécifiques avec qui elles forment un complexe, ces anticorps sont liés à des molécules appelées or colloïdal (couleur rouge en cas de grande quantité). Ce complexe continue de migrer et rencontre alors une deuxième série d'anticorps qui l'immobilise au niveau d'une ligne sur laquelle l'or colloïdal est visible.

7.2. Cibles

La plupart des variétés transgéniques cultivées actuellement sont des variétés insecticides exprimant des protéines de type Cry (toxine produite par *Bacillus thuringiensis* (Bt) ou des variétés tolérantes à des herbicides exprimant les protéines ESPS ou PAT.

La plupart des variétés transgéniques expriment également des protéines codées par des gènes marqueurs de résistance aux antibiotiques comme nptII ou des marqueurs enzymatique comme uidA. Il existe des tests immunologiques pour chaque type de protéine évoqué ci-dessus.

7.3 Champ d'application

Les méthodes basées sur les protéines s'adressent aux produits peu transformés : plante, semences, tourteaux et farines, car les protéines sont fragiles et donc facilement altérées par les traitements thermiques et chimiques.

Les OGM peuvent se trouver dans les plantes, telles que le maïs, le soja, le colza ou la pomme de terre. Les produits issus de ces plantes peuvent se rencontrer dans plus de trente mille aliments différents dont les céréales pour petit déjeuner, les confiseries, le chocolat, les produits à base de viande, les plats préparés et les aliments pour animaux.

7.2 Détection des OGM par extraction d'ADN recombinant

7.2.1 La méthode PCR

a) Principe :

La réaction de polymérisation en chaîne, ou PCR, est une méthode pour **copier** des milliers de fois des brins d'ADN en l'espace de quelques minutes, en utilisant les capacités naturelles d'une enzyme appelée la **polymérase**. La réaction de polymérisation en chaîne facilite le travail des scientifiques qui étudient un certain morceau d'ADN, qui aurait pu avoir été prélevé à partir d'un échantillon minuscule de liquide organique en grossissant sa présence. De cette manière, à partir d'un tout petit nombre de molécules, il est possible de produire un grand nombre de copies du gène cible.

Imaginée par M. Mullis en 1985 (Prix Nobel en 1993), la technique connu un essor considérable à partir de la commercialisation, vers 1988, d'une ADN polymérase résistante aux températures élevées : la Taq polymérase, qui permet une automatisation de la technique.

Puisque les séquences d'ADN sont spécifiques à une espèce ainsi qu'aux individus dans cette espèce, la réaction de polymérisation en chaîne peut être utilisée pour identifier l'espèce et l'individu exact à partir d'un seul morceau d'ADN.

Avant de débiter la PCR, une région cible de l'ADN est choisie. La séquence de nucléotides de cette région ne doit pas nécessairement être connue, à l'exception de deux courtes séquences situées à chaque extrémité. Des copies complémentaires des séquences sont créées en utilisant des enzymes spéciales : les « amorces ». Elles identifient le début et la fin du processus de copie. Par exemple, si l'on veut copier un brin d'ADN qui est long de 20 nucléotides mais que l'on ne désire que la séquence entre les numéros 3 et 7 ; les séquences des nucléotides jusqu'au 3 et après le 7 sont identifiées et ensuite deux segments complémentaires de ces séquences, les amorces, sont formés avant que la réaction de polymérisation en chaîne ne commence.

Le cycle entier est répété à plusieurs reprises jusqu'à l'obtention de millions de brins d'ADN. La copie d'un cycle prend environ une à trois minutes. Étant donné qu'à chaque cycle, le nombre de molécules est doublé, le nombre de molécules d'ADN après n cycles est de 2^n . L'ordre de grandeur à retenir est celui du million de copies en quelques heures.

b) Les deux types d'analyse que permet la PCR :

La PCR est une technique permettant de détecter la présence d'OGM mais aussi l'identification d'un gène transgénique.

● La détection :

Pour déceler la présence d'ADN génétiquement modifié, on a recours à des amorces non spécifiques mais présentes dans la plupart des constructions génétiques. En effet, certains OGM sont construits selon les mêmes modèles. Cela signifie que l'on retrouve des régions communes à plusieurs OGM (promoteurs, gènes de résistance, gènes de visualisation, etc.). Il

s'agit simplement de détecter l'un de ces motifs pour pouvoir affirmer la présence d'OGM. Cependant on ne sait pas quel type d'OGM est alors impliqué.

Par contre, s'il n'y a pas de détection, il est impossible de conclure à l'absence de ce type d'ADN. En effet, l'OGM peut avoir été construit avec un autre promoteur et un autre terminateur que ceux que l'on a cherché à détecter. De plus certains végétaux, appelés « faux positifs », ont la particularité d'être toujours reconnus positifs par le test.

● L'identification :

La deuxième stratégie permettant d'identifier un ADN d'origine OGM nécessite cette fois-ci des amorces spécifiques à chacune des constitutions génétiques possibles et connues. L'inconvénient de cette technique est qu'elle implique de savoir exactement ce que l'on recherche, il faut alors utiliser des banques de gènes et des logiciels spécifiques pour déterminer les amorces à utiliser. Dans le génome de la plante GM n'est normalement inséré, après diverses sélections au laboratoire, qu'un seul fragment d'ADN exogène appelé transgène. Ce transgène contient un ou plusieurs gènes, avec chacun au moins un promoteur et un terminateur pour réguler l'expression des gènes (fig.43).

Pour beaucoup de PGM de première génération, le promoteur utilisé est le P35S et le terminateur, le Tnos. Ces deux cibles à forte occurrence sont souvent utilisées pour cribler la présence de PGM.

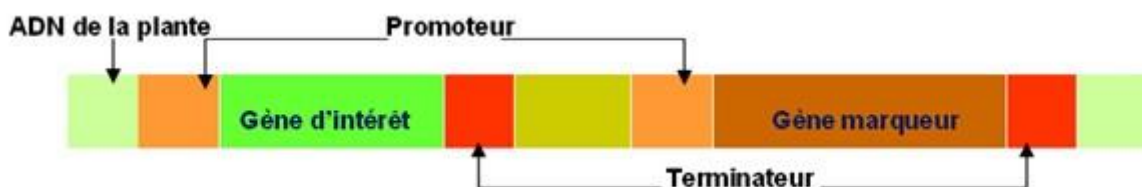


Fig. 43 : L'expression des gènes est régulée par un promoteur et par un terminateur.

Dans la plupart des OGM, le gène inséré (le gène d'intérêt ou le gène marqueur) est activé par un promoteur viral (le P35S par exemple) et son expression est ponctuée par un terminateur d'origine bactérienne (le Tnos par exemple).

Les tests d'OGM permettent de détecter la présence du promoteur, d'un terminateur ou d'un gène d'intérêt

c) Méthodes

Les séquences d'ADN insérées dans les PGM permettent de les détecter, la jonction entre l'ADN de la plante et le transgène permet de les identifier. Une seule séquence par génome étant difficile à détecter, il est généralement fait appel à des méthodes d'amplification de l'ADN cible, des sortes de systèmes de photocopies, pour améliorer la sensibilité de la détection.

La méthode d'amplification la plus utilisée est la PCR (Polymerase Chain Reaction). C'est une technique qui permet de repérer un fragment d'ADN précis même lorsque celui-ci est présent en très faible quantité dans un mélange. La PCR consiste à amplifier un fragment d'ADN in vitro grâce à une enzyme d'origine bactérienne thermorésistante et thermostable Taq Polymérase. Elle nécessite pour s'initier des fragments d'ADN et de petits fragments d'acides nucléiques, appelés amorces. En choisissant correctement la séquence de ces fragments, il est possible d'amplifier uniquement la portion d'ADN souhaitée. Selon les cibles de la PCR, on peut :

- détecter des PGM via des éléments présents dans la majorité d'entre elles : P35S, Tnos.
- identifier un transgène et le différencier d'autres transgènes codant la même protéine.
- identifier une PGM particulière à simple transgène (pas celles résultant d'empilages de gènes car elles sont équivalentes à plusieurs PGM différentes) : détection d'un élément présent uniquement dans la PGM recherchée. On dispose alors d'une signature univoque de chaque évènement de transformation.

Cette méthode est effectuée en laboratoire. Comme pour les techniques immunologiques, il faut tout d'abord extraire la molécule à analyser, ici l'ADN, de l'échantillon avant de procéder à l'amplification.

Les PCR sont effectuées dans des appareils dits thermo-cycleurs capables de réaliser rapidement les variations de températures nécessaires à la réaction. Plusieurs cycles (généralement 45) de réaction sont effectués pour avoir une très grande quantité d'ADN. Il faut ensuite détecter les produits de l'amplification, appelés amplicons. Ensuite, l'identification peut être assurée par hybridation avec une sonde fluorescente ou non, migration sur gel et détermination de la taille, séquençage ou profil de restriction de l'amplicon. Les étapes de la PCR sont (fig.44):

- Dénaturations de L'ADN : ouverture et séparation des deux brins D'ADN
- Hybridation : fixation d'un couple d'amorces
- Elongation : synthèse d'un brin d'ADN complémentaire par l'utilisation de la taqpolymérase et la présence des nucléotides.

La PCR peut être qualitative (avec ou sans plan de contrôle multiple par attributs comme pour les méthodes immunologiques pour connaître la position d'un échantillon par rapport à un seuil) ou quantitative (par PCR compétitive ou PCR quantitative en "temps réel", la méthodologie actuellement la plus employée).

- La PCR qualitative

Pour un criblage, la PCR est réalisée à partir d'amorces de séquences cibles comme P35S et Tnos, non spécifiques d'une PGM. Un résultat négatif indique l'absence d'un grand nombre de PGM, mais pas, par exemple, l'absence du maïs GA21, ce dernier ne contenant pas le promoteur 35S mais un autre promoteur présent chez le riz. En revanche, en cas de résultat positif, il faut s'assurer que les séquences P35S et Tnos ne sont pas présentes en raison de la présence des organismes donneurs dont ils sont issus : *Agrobacterium tumefaciens* et le virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV). Car si tel est le cas, on a affaire à des "faux positifs".

Pour une identification, la PCR est réalisée avec des amorces "événement spécifique" (amorces à cheval sur l'ADN génomique et l'ADN du transgène) et quelquefois avec des amorces "construit spécifique" (amorces à l'intérieur du transgène)



L'amplification de fragments d'ADN *in vitro* : la PCR

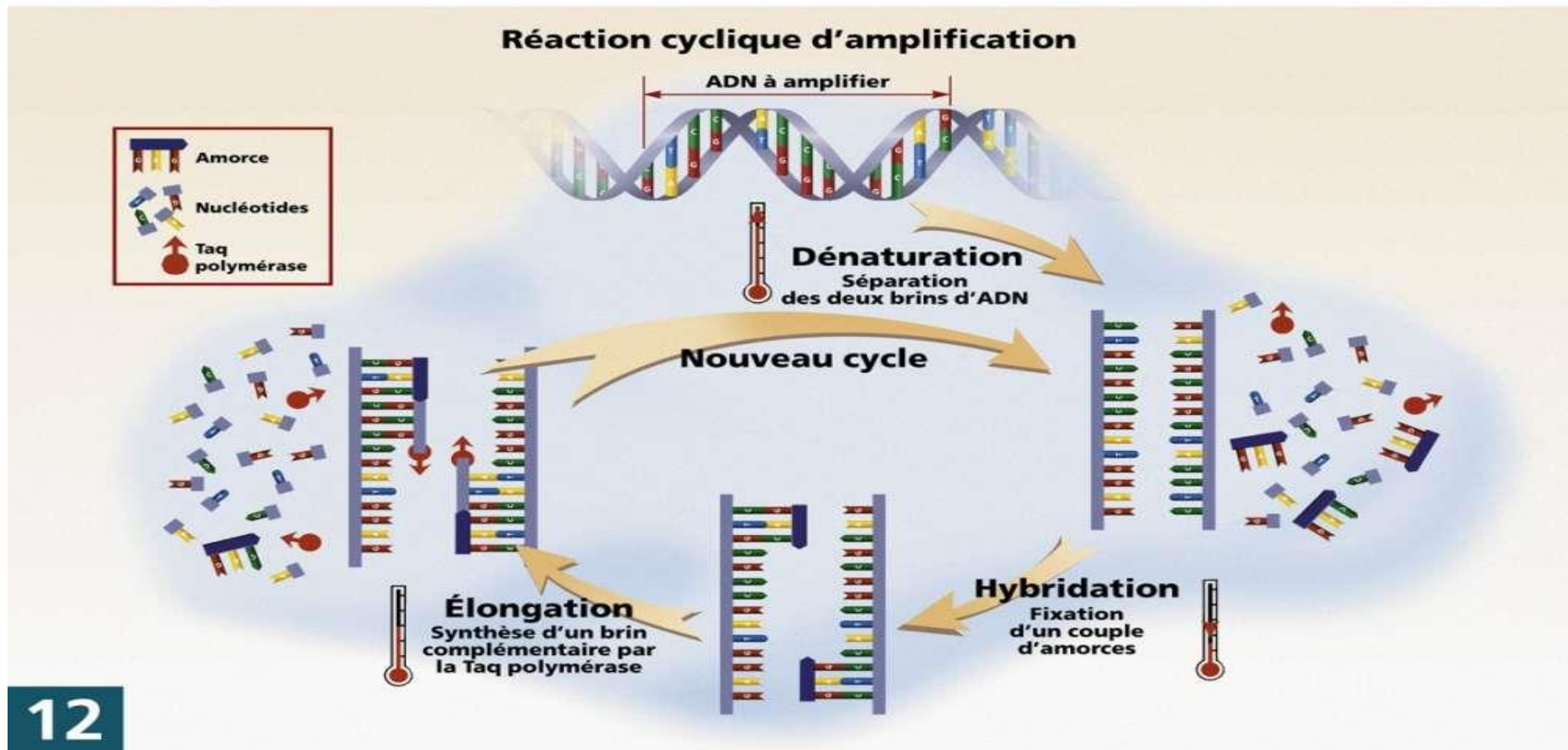


Fig.44 : La PCR méthode d'amplification du fragment D'ADN

Ce dernier système ne donne pourtant pas une spécificité univoque (ex : pas de différenciation de Bt10 et Bt11, deux maïs GM, c'est-à-dire deux événements de transformation, issus de la transformation par le même plasmide).

- La PCR quantitative

La PCR quantitative consiste à quantifier le nombre de molécules d'ADN initiales. Plusieurs méthodes existent, la PCR quantitative en "temps réel" étant actuellement la plus "à la mode" et la plus utilisée.

La quantification absolue vise à déterminer le nombre de copies d'ADN et utilise des standards ou "matériel de référence" généralement achetés auprès d'un fournisseur. La quantification relative cherche à déterminer la quantité relative de deux cibles. C'est celle qui est utilisée majoritairement pour déterminer la teneur relative en PGM d'un échantillon.

La PCR se fait en point final ou en temps réel (fig.45) . La quantification en point final s'effectue selon les appareils au cours de l'amplification ou à la fin des cycles de PCR. La quantification du nombre croissant d'amplicons au cours de la PCR en temps réel se fait généralement par une sonde fluorescente, pour la technique Taqman®, dégradée au fur et à mesure de l'amplification de l'ADN. La fluorescence émise est mesurée tout au long de la réaction. La PCR en point final est commercialisée à un coût inférieur à celui de la PCR en temps réel. Cette dernière donne une quantification aussi précise mais plus facile à utiliser et demandant moins de précaution.

Deux modes d'analyse du résultat de l'amplification par PCR

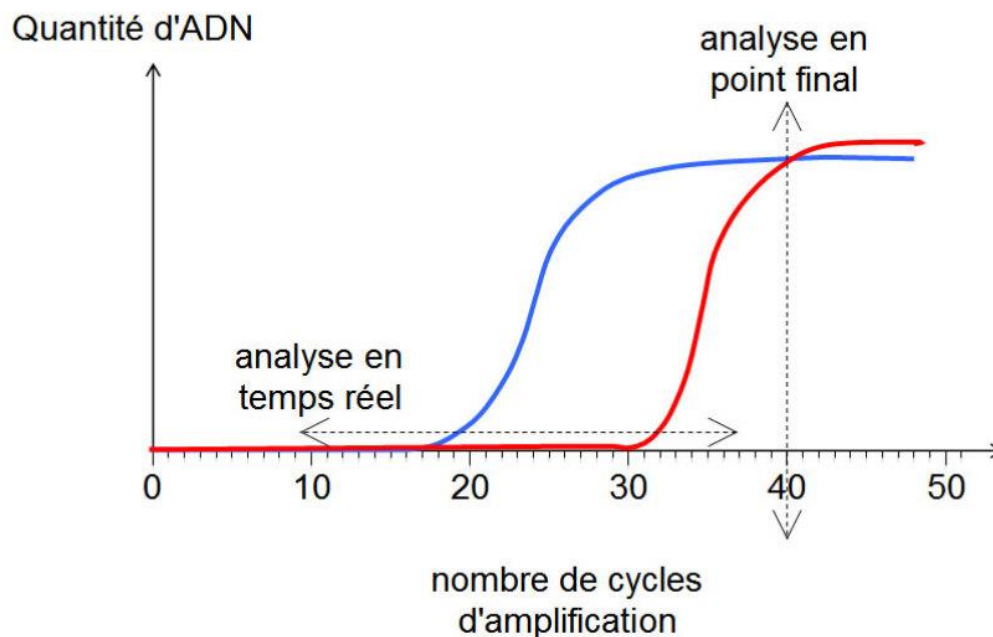


Fig 45 . Résultat d'une PCR

Si on analyse le résultat de la PCR au bout de 40 cycles, on constate que les quantités d'ADN amplifiées sont à peu près similaires pour tous les échantillons.

Or ces différents échantillons possédaient des quantités initiales très différentes. En effet, il faut moins d'une vingtaine de cycles de PCR pour pouvoir détecter des quantités significatives d'ADN dans l'échantillon bleu, alors qu'il faut plus de 30 cycles pour obtenir le même résultat à partir de l'échantillon rouge.

Par conséquent, si l'efficacité d'amplification est la même, l'échantillon rouge possédait beaucoup moins d'ADN matrice que l'échantillon bleu au début de l'expérience.

L'analyse "en point final" n'est donc pas appropriée pour déterminer la quantité d'une molécule d'ADN particulière dans un échantillon.

d) Champ d'application

La PCR peut se faire sur des produits bruts (semences, graines, tissus de la plante) ou transformés. La difficulté, d'extraction de l'ADN en particulier, croît avec le degré de transformation. Certains produits, comme les huiles raffinées, n'ont que peu voire aucune des molécules à analyser.

Conclusion :

Le principal défaut de ces deux techniques est également leur avantage. Elles sont capables de détecter des OGM pour des niveaux de un millième à dix millionièmes. Or ce seuil de sensibilité très faible rend difficile la quantification précise du taux en OGM d'un aliment. Si un test quantitatif est nécessaire, la technique de PCR peut également être utilisée, mais dans des conditions particulières qui demandent une mise au point spécifique. La PCR est donc une technique essentiellement qualitative. D'autre part, l'introduction des amorces implique que l'on ne peut détecter que des gènes que l'on connaît déjà.

7.2.2 - La puce à ADN

Aujourd'hui une nouvelle perspective se développe : la puce à ADN. Celle-ci est le résultat du développement simultané de la microélectronique, l'informatique, la chimie et la biochimie moléculaire. Ces puces sont d'ailleurs déjà utilisées dans le domaine médical.

Des séquences d'ADN greffées sur une puce constituent des sondes constituent des sondes dont le rôle est de détecter les cibles, c'est-à-dire les séquences qui leur sont complémentaires.

Ces puces à ADN représentent un grand progrès en matière de détection des OGM. En effet, elles permettent un important gain de temps et sont moins coûteuses que les autres méthodes. Dans la figure 3 suivante sont présentés 3 types : les macroarrays, microarrays et puces à oligonucléotides.

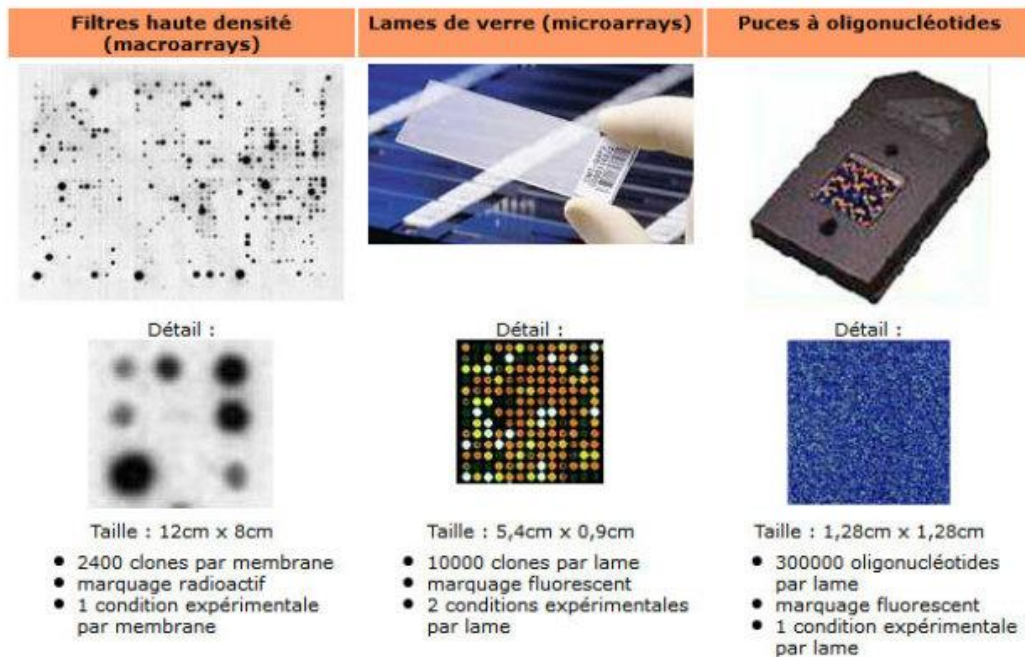


Fig.46 : Types de puce à ADN

légendes : Dans les **macroarrays**, on a une densité de fragments d'ADN d'environ 25 spots/cm² et les dépôts se font sur une membrane de nylon (photo de gauche), pour les **microarrays** la densité du dépôt est plus élevée (1000 ADN/cm²) et il se fait sur une lame de verre (photo du centre). Les ADN sont des fragments amplifiés dont la taille varie entre 200 et 2000 pb (paires de base) mais peuvent aussi être des oligonucléotides de 50 à 70 pb. Les **puces à oligonucléotides** représentent la miniaturisation la plus poussée (300 000 oligonucléotides/cm²) dans ce cas la taille des oligonucléotides est d'environ 25 pb.----***

7.2.2.1 Description des puces à ADN

Un grand nombre de fragments d'ADN sont fixés sur un support solide, on va hybrider ces fragments d'ADN fixés sur la puce avec une population d'acides nucléiques marqués. Sur la puce on peut définir une unité d'hybridation comme un spot.

Chaque spot correspond au dépôt d'un fragment d'ADN de séquence connue, en quantité donnée et en un point précis (un même ADN est souvent déposé en deux spots pour faire une répétition).

Les ADNs fixés sur la puce s'appellent des **sondes**, l'avantage des puces c'est qu'on peut réaliser l'hybridation de milliers de sondes vis à vis d'une population choisie d'acides nucléiques.

Alors que dans les expériences prochainement décrites (Southern blot, Northern blot), on hybridait la population d'acides nucléiques avec UNE sonde marquée.

Différents supports peuvent être utilisés (nylon, verre) ainsi que différentes techniques pour déposer les acides nucléiques sur la puce. Le dépôt de l'acide nucléique peut se faire après synthèse ou bien on réalise une synthèse in situ par photolithographie.

Des Illustration montrant différents types de puces sont présentés dans la fig.47

La phase d'hybridation est réalisée dans un incubateur et est suivie d'un lavage destiné à débarrasser la puce des cibles nucléiques non hybridées fig. 4 .

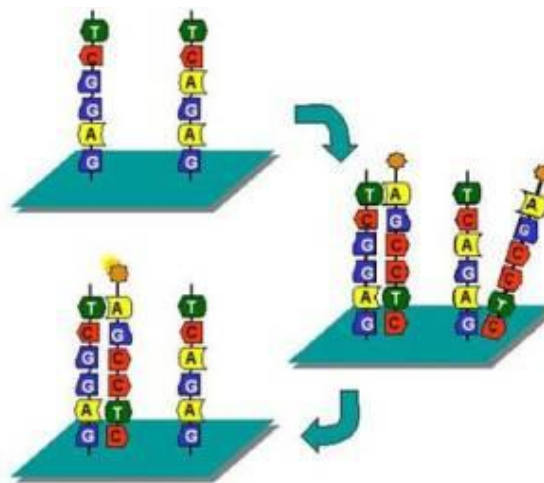


Fig.47 : Représentation schématique d'une portion de puce à ADN. L'ADN analysé est marqué par un fluorochrome

7.2.2.2 Nature et choix des ADN déposés sur la puce

Dans le cas des ADN déposés physiquement on peut utiliser différents types d'ADN :

- des fragments de gènes, des oligonucléotides par exemple, plusieurs ADN correspondant à différentes régions peuvent être déposés pour le même gène ;
- des amplifiats obtenus avec des amorces très dégénérées et qui contiendront une bonne partie du génome ;
- des EST (Expressed Short Tags) : petits fragments de gènes identifiés . Ces fragments ont été obtenus à partir d'une banque d'ADNc .

7.2.2.3 Utilisation des puces

Les utilisations sont multiples : analyse de l'expression de gènes, détection et caractérisation d'espèces, recherche de mutations...

Dans le cours est illustrée l'utilisation d'une même puce à ADN pour hybrider deux populations d'ADNc marqués différemment, le but est de comparer le profil d'expression des gènes (dont les sondes sont sur la puce) dans les deux conditions expérimentales.

7.2.3 Les méthodes Southern blot et Northern blot

Dans ces deux types d'expériences, on cherche à repérer soit dans le génome soit dans les ARNm d'une cellule un fragment particulier, par exemple un gène donné. Pour cela, on utilise une sonde marquée d'ADN dont la séquence est complémentaire du fragment recherché. Le « repérage » se fait par hybridation entre la sonde marquée et le fragment d'ADN (fig .48) ou d'ARNm (fig.49 , la Northern blot) correspondant. Le marquage de la sonde avec un radioélément ou un fluorochrome permet de visualiser et de quantifier l'hybridation.

7.2.3.1 Southern blot

On débute l'expérience (fig.48) par une extraction de génome total, on fait subir une restriction à cet ADN total par une enzyme de restriction (étape 1 du schéma).

Les fragments de restriction sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (étapes 2 et 3). Suivant la taille du génome total extrait on peut obtenir jusqu'à 106 fragments, on verra sur le gel non pas des fragments séparés mais une trainée d'ADN due aux fragments de taille très proche les uns des autres.

Ensuite après dénaturation des ADN par la soude (étape 4), l'empreinte du gel est réalisée par transfert et fixation des fragments d'ADN sur une membrane de nylon (étape 5).

Cette membrane est ensuite hybridée avec une sonde marquée (étape 6). L'hybridation est réalisée en milieu liquide sous agitation, cette opération est suivie de lavages pour éliminer les sondes non appariées (étape 7).

C'est la trace de la sonde sur un film d'autoradiographie qui est mesurée (étape 8). Les fragments hybridés avec la sonde apparaissent sur l'autoradiographie.

Cette technique permet de repérer un fragment d'ADN particulier dans un génome.

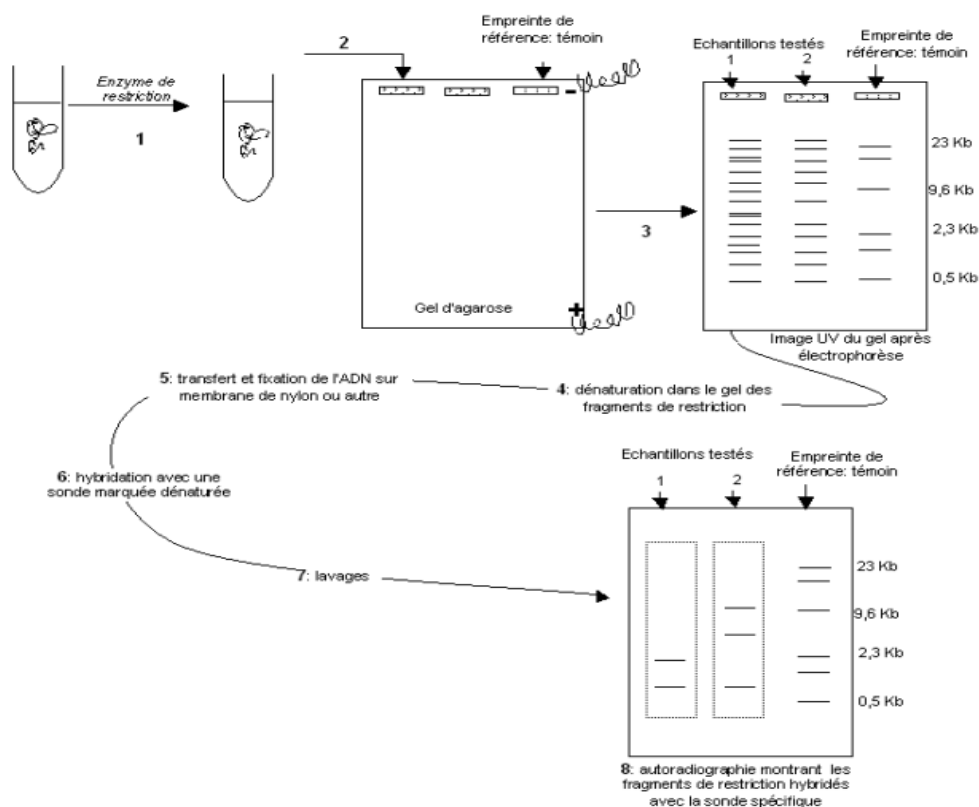


Fig. 48 : Schéma de principe du Southern blot (ADN)

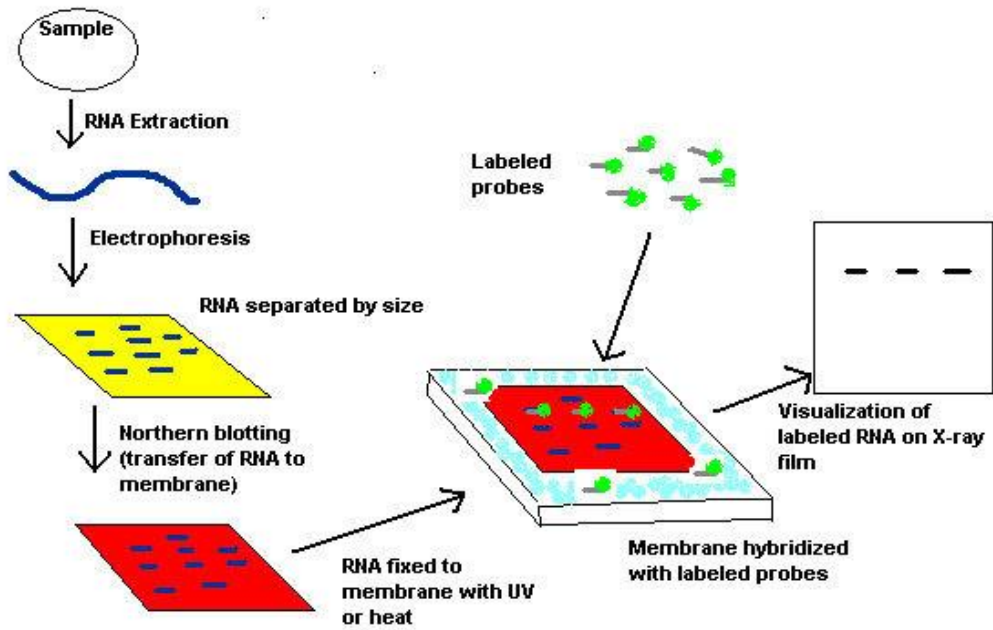


Fig. 49 : Schéma de principe du Northern blot (ARNm)

Chapitre 8 : Etiquetage des aliments OGM

Introduction du chapitre: Dans ce chapitre, nous aborderons les questions suivantes : est ce que l'étiquetage des produits OGM est obligatoire ou non ?, est ce qu'il est destiné aux produits bruts ou transformés ?, qu'elles sont les pays qui obligent l'étiquetage ?, et enfin quelle est la forme de l'étiquetage adopté ?.

8.1 Les différents types des produits OGM

Dans le marché les Aliments OGM peuvent se présenter sous forme brut ou dérivés ;

- a) Les **aliments entiers OGM**, comme le soya, le maïs, les fruits ou les légumes transgéniques.
- b) Les **produits alimentaires dérivés d'OGM**, qui sont produits à partir d'OGM. Ils entrent généralement dans la composition de produits alimentaires sous forme **d'ingrédients**. Ils ne sont pas considérés comme des OGM, car ils ne peuvent ni se reproduire, ni transmettre de matériel génétique. On en distingue deux sortes :
 - **ceux qui contiennent du matériel transgénique** : par exemple, de la sauce soya, produite à partir de soya transgénique, ou de la farine de maïs faite à partir de maïs transgénique;
 - **ceux qui ne contiennent pas de matériel transgénique**, celui-ci ayant été éliminé au moment de la fabrication du produit : par exemple, de la lécithine de soya faite à partir de soya transgénique ou de l'huile de canola obtenue de canola transgénique.

8.2 Normes de l'étiquetage des aliments OGM

Dans les pays de l'Union européenne, les aliments contenant plus de 0,9 % de matériel génétiquement modifié doivent être étiquetés OGM (de la manière décrite dans l'encadré ci-dessous fig.50). Au Canada et aux États-Unis, ce seuil est fixé à 5 % au-delà duquel un étiquetage est possible, **mais pas obligatoire**.

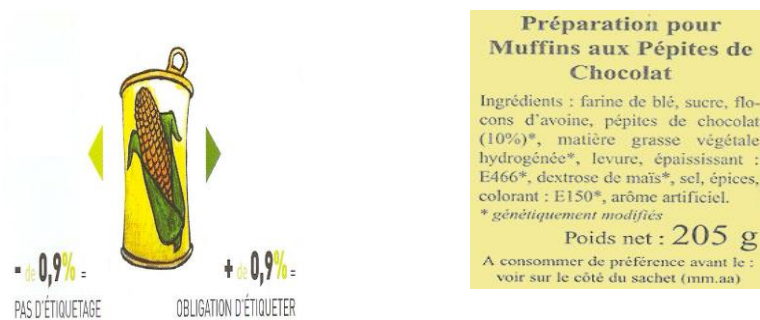


Fig.50 : Normes d'étiquetage en aliments OGM

- L'étiquetage obligatoire

Plus de **30 pays** ont adopté ou du moins prévu un **étiquetage obligatoire**. Les pays de l'Union européenne possèdent les normes les plus restrictives, avec un étiquetage obligatoire de tous les aliments transgéniques (fruits et légumes frais, par exemple) et des dérivés d'OGM (farines, semoules, huiles, etc.) depuis la levée du moratoire empêchant leur commerce, en avril 2004. L'Australie et la Russie ont également adopté un système d'étiquetage obligatoire, mais qui exclut certains dérivés d'OGM.

Plusieurs groupes de consommateurs réclament des normes d'étiquetage obligatoire à l'échelle internationale. Ils font valoir de nombreuses questions éthiques qui entrent en ligne de compte dans ce dossier : l'autonomie des agriculteurs, le brevetage du vivant, le manque de transparence des entreprises qui développent les OGM, etc. Aussi, ils font échos aux préoccupations des citoyens, notamment au sujet des risques pour la santé publique et l'environnement, liés à l'utilisation et à la consommation d'OGM.

Les **mentions** à surveiller sur les étiquettes dans les pays où des règles d'étiquetage obligatoire sont en vigueur (fig.51).

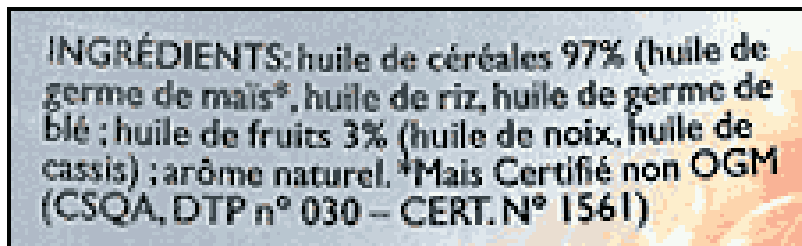


Fig .51 : Mentions obligatoire d'étiquetage

Les mentions suivantes peuvent être signalées sur l'étiquetage :

- « ce produit contient des organismes génétiquement modifiés »;
- « ce produit contient du (nom du ou des organismes) génétiquement modifié(s) »;
- « (nom du ou des organismes) génétiquement modifié(s) »

De manière générale, **les fruits et les légumes américains** cultivés de façon conventionnelle ont un code à quatre chiffres (XXXX) commençant par 3 ou 4 (Fig.52). Les produits **biologiques** ont un code à cinq chiffres dont le premier chiffre est un 9 (**9**XXXX). Les produits **transgéniques** ont un code également à cinq chiffres - le premier chiffre étant un 8 (**8**XXXX)

Pour résumer :

1. Si le code comporte 4 chiffres et commence par 3 ou par 4, cela signifie que le produit utilise des engrais artificiels.

2. Si le code comporte 5 chiffres et commence par 9, votre fruit ou légume a été cultivé de façon traditionnelle, sans pesticide ni engrais. C'est un produit biologique.

3. Si le code comporte plus de cinq chiffres et commence par 8, alors c'est un fruit génétiquement modifié. C'est un produit OGM, tout simplement .

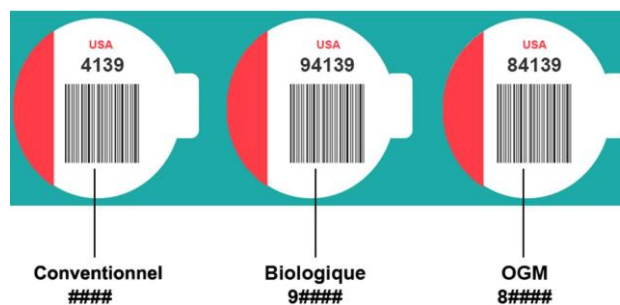


Fig. 52 : Codes démontrant un produit OGM

Chapitre 9 : Les risques et les avantages des OGM

Introduction du chapitre: Quels sont les enjeux de la technologie transgénique? Pourquoi est-elle aussi controversée? Pourquoi suscite-t-elle autant débats? Comment démêler le vrai du faux? Nous avons tenté de faire un tour d'horizon rapide pour donner une vision globale de la problématique et ainsi arriver à se faire une opinion éclairée.

9.1 - Les risques des OGM

A l'heure actuelle, alors que la Commission Européenne a levé un moratoire de cinq ans sur les autorisations de nouveaux OGM, le consommateur européen reste majoritairement opposé à leur introduction.

En effet, les OGM peuvent induire différentes maladies qui peuvent toucher aussi bien les animaux que l'environnement dans lequel il évolue.

9.1.1- Les OGM et la santé

● Les allergies :

Tout OGM est potentiellement allergisant car il n'est pas reconnu par l'organisme qui le reçoit, que ce soit par voie digestive ou par voie aérienne.

● Les intoxications :

Aucune preuve expérimentale n'a permis d'éliminer les risques potentiels des molécules insecticides fabriquées par les plantes transgéniques. Ces substances peuvent être toxiques pour le foie, les reins, le cerveau. De même les aliments fabriqués à partir des végétaux qui tolèrent les herbicides peuvent devenir toxiques en raison de leur forte teneur en poisons. Ces derniers peuvent aussi se retrouver dans toute la chaîne alimentaire (lait, viande) jusqu'à des doses maximales autorisées.

● Les maladies auto-immunes :

Certaines maladies auto-immunes sont secondaires à l'apparition de complexes immuns circulants formés de substances étrangères fixant des anticorps spécifiques développés contre ces substances extérieures. Les nouveaux aliments OGM, leurs virus, ne peuvent-ils pas passer la barrière digestive et ne peuvent-ils pas créer des phénomènes identiques?. Il est donc fort probable que le corps mette un certain temps avant d'apprendre à dégrader les brins d'ADN manipulés. Ce qui renforce conséquemment les risques de pénétration digestive, d'allergies et de maladies auto-immunes.

● Les résistances aux antibiotiques :

Comme nous l'avons vu précédemment, les chercheurs intègrent souvent un gène de résistance à un antibiotique en même temps que le transgène à la cellule qu'ils veulent modifier. Le développement de la résistance aux antibiotiques doit être envisagé comme une fatalité.

9.1.2 - Les OGM et l'environnement

● Les mutations génétiques :

Les plantes génétiquement modifiées pour s'auto protéger contre un insecte, par exemple, pourraient susciter l'apparition d'insectes résistants à ces plantes transgéniques, à la suite d'une mutation génétique « naturelle » chez ces derniers.

Il existe des indices de probabilité de réalisation de ce risque, qui ne découlent pourtant pas des plantes génétiquement modifiées, mais bien des méthodes utilisées classiquement en agriculture.

Le bacille Thuringiensis est une bactérie à tiges génératrices de spores. Pendant la production de spores, des corps cristallins sont formés. Le bacille a une structure en cristal comme le triangle à gauche sur cette image. Les cristaux se dissolvent dans l'intestin de l'insecte affecté et paralysent les cellules épithéliales. L'insecte cesse alors de manger et meurt par la suite pendant que le bacille développe des spores et se reproduit dans le sang de celui-ci. Ce bacille affecte plus de 150 insectes.

Or, dans certains pays (Malaisie, Japon, Hawaï), son application répétée, sous forme de pesticide, a entraîné la sélection de populations d'insectes ravageurs capables de résister à l'action de ce produit.

● Les effets non désirés :

Les Plantes Génétiquement Modifiées (PGM) en vue de leur donner une résistance naturelle à un insecte peuvent affecter des insectes non visés par la modification de la plante. C'est le cas par exemple pour les **abeilles** et le monarque qui, bien que non indésirables, sont éliminés par certaines plantes génétiquement modifiées.

En effet, il a été mené en 1999 une expérience sur le monarque, papillon d'Amérique du Nord réputé pour sa beauté. Des chenilles de ce papillon ont été nourries avec des feuilles artificiellement recouvertes de pollen d'une variété de maïs génétiquement modifié par l'introduction d'un gène commandant la production d'un insecticide contre la Pyrale. Ces chenilles ont connu une croissance plus lente et une mortalité plus élevée que d'autres nourries de feuilles recouvertes de pollen de maïs classique. L'expérience a donc démontré le « danger » encouru par le papillon.



a : Epi de maïs non transgénique



b : Epi de maïs transgénique



c : Chenille ayant consommé du maïs transgénique

Fig.53 : Aspect du maïs transgénique et non transgénique, infesté par la larve de Pyrale

Légende : *a* : Cet épi de maïs a été obtenu sur un plant normal, non transgénique, infesté par la chenille de la Pyrale. *b* : Cet autre épi de maïs provient d'un plant transgénique, infesté par la chenille de la Pyrale. On remarque bien sur cette photo que le maïs est de bonne qualité, c'est-à-dire que l'insecticide empêche la Pyrale

de l'attaquer. c :Celles s'étant nourries avec le maïs transgénique présentent une paralysie du système digestif, cessent de s'alimenter et meurent rapidement.

9.2 Les avantages des OGM

9.2.1 Les OGM et la santé

Quels sont les avantages des produits génétiquement modifiés pour la santé des consommateurs ?

● *Des fruits, légumes et féculents améliorés sur le plan gustatif :*

Les biotechnologies contribuent à l'amélioration des qualités gustatives des aliments. L'objectif est de fournir à des consommateurs éloignés des lieux de production des produits aux arômes développés. Des tomates, des melons, des bananes à maturation retardée plus savoureuses.

Par transgénèse, on introduit un gène permettant de différer le ramollissement qui accompagne le mûrissement.

Ainsi, ils se conservent mieux, sont plus savoureux et contiennent plus de vitamines car ils peuvent être récoltés à un stade de maturation avancée



Fig.54 : La tomate transgénique

● Des aliments plus diététiques et respectueux de notre santé :

Les biotechnologies sont également fortement porteuses d'espoirs dans le domaine de l'amélioration de la qualité nutritionnelle des aliments.

- Des plantes produisant des sucres et aliments « zéro calorie »

De nombreux consommateurs recherchent ces sucres afin de réduire leur ration journalière de calories apportées par l'alimentation. Ainsi, par transfert de gène, on fait produire à des betteraves un type de sucre comestible mais n'apportant aucune calorie. On peut aussi améliorer la qualité gustative de fruits ou de légumes par l'introduction d'un gène produisant une protéine naturelle sucrée (la brazzéine) sans apporter la moindre calorie.

- Des plantes enrichies au bêta carotène

Aujourd'hui, un milliard de personnes souffrent de carence en vitamine A (notamment en Afrique, en Asie). Or, la vitamine A, fournie par le bêta carotène, est un élément nutritif essentiel pour la vue et la croissance. Par ailleurs, cet antioxydant naturel constituerait également un élément de prévention du cancer et des maladies cardiaques. Les gènes du bêta carotène peuvent être introduits dans les tomates, le riz et le colza, augmentant ainsi leur qualité nutritionnelle.

- Des plantes enrichies en fer

Selon l'Unicef, la carence en fer concernerait presque 3,7 milliards de personnes aujourd'hui dans le monde, dont la majorité sont les femmes et les enfants de moins de cinq ans dans les pays en voie de développement.

Ici aussi, les OGM pourraient apporter un progrès. En effet, des travaux ont permis de doubler le contenu **en fer du riz** en y introduisant le gène de la **ferritine**.

- Des huiles riches en acides gras spécifiques

Des recherches sont en cours sur la réduction de la teneur en acide gras **mono-insaturés** (graisses animales) contenues dans les huiles afin de limiter les risques **cardio-vasculaires**. Il s'agit d'introduire des gènes de **désaturases** dans les plantes oléagineuses comme le colza et le soja pour augmenter les proportions d'acides gras **saturés**. Ces acides gras sont les « bonnes graisses » indispensables à notre organisme.

- La réduction des toxiques dans certains aliments

Enfin, de nombreuses études ont montré qu'il est possible de réduire, voire éliminer, les **protéines allergisantes** des céréales comme le riz et le soja. En Asie, nombreux sont les consommateurs qui souffrent d'allergie au riz. Or le riz constitue l'aliment de base de plus de deux milliards de personnes.

● *Des plantes produisant des médicaments, les « alicaments » :*

Dans le domaine de la médecine, la modification génétique présente des avantages divers et variés et pour le moins intéressants.

La solution des plantes transgéniques pour produire des médicaments est considérée comme une voie d'avenir sûre, en termes de risques de contamination. En effet, il n'y a pas de maladies transmissibles entre l'homme et la plante, ce qui n'est pas le cas entre l'homme et l'animal. Ainsi, l'équivalent de la **lipase gastrique du chien**, utilisée dans la lutte contre la mucoviscidose, a été produit expérimentalement par des colzas et des maïs transgéniques.

- Des vaccins sans piqûres

Désormais, le génie génétique permet, par la modification du patrimoine génétique de plantes, de leur faire synthétiser des substances vaccinales. Il s'agira alors simplement de manger un aliment pour être vacciné contre une maladie précise. En effet, les chercheurs prévoient déjà d'utiliser des bananiers génétiquement modifiés pour produire ces vaccins,

- Des animaux transgéniques produisent des médicaments :

Un an après sa naissance, une truie (Femelle du porc) expérimentale, Génie, a été la première truie du monde à produire dans son lait, de grandes quantités de **protéines C humaine**.

De nombreux malades en ont besoin, comme les personnes **hémophiles**, qui manquent de protéines C pour assurer la coagulation du sang. La mise au point d'animaux transgéniques coûte moins cher et permet de fabriquer de grandes quantités de protéines C humaines.

- La production de molécules :

Depuis les années 1970, les scientifiques savent modifier des micro-organismes en vue de la synthèse de molécules. Grâce à des **micro-organismes** conçus sur mesure, il est possible de produire de **l'insuline** ou des **hormones** de croissance, jusque-là extraites de pancréas de porc ou d'hypophyse humaine (chez des cadavres).

D'autre part, des études sont en cours sur des plants de tabac qui pourraient synthétiser de la **lipase**, une enzyme permettant de combattre la mucoviscidose.

Ainsi, le recours aux médicaments biologiques présente deux avantages :

Premièrement, sur le plan économique, la fabrication de médicaments par les « usines biologiques » coûte moins cher que les méthodes « traditionnelles ».

Ensuite, sur le plan médical, le traitement par des médicaments provenant de plantes génétiquement modifiées supprime les risques de transmission d'agents pathogènes des tissus humains ou animaux. En effet, les virus des plantes ne sont pas transmissibles à l'homme ou tout du moins n'ont aucun effet sur son organisme.

9.2.2 - Les OGM et l'environnement

● Une pollution et une exploitation des sols moins importante :

Quelques plantes génétiquement modifiées, les PGM, sont capables de synthétiser elles-mêmes un insecticide. Il n'y aurait alors plus besoin de pulvériser les champs, et donc le sol, avec des insecticides. Ceci permettrait une baisse de la pollution dans les régions agricoles.

D'autres PGM peuvent également être résistantes à des herbicides totaux. Il suffit alors de le pulvériser dans le champ : toutes les plantes présentes meurent, sauf la plante transgénique. Un seul herbicide est donc nécessaire.

D'autre part, une nouvelle variété de coton génétiquement modifiée a été créée : les gènes introduits produisent une coloration de la plante. Cela permet une réduction de l'utilisation de teinture chimique, très polluante pour l'environnement.

9.2.3 - Les OGM et l'agriculture

● La protection des cultures :

La transformation génétique des plantes vise à améliorer les conditions de culture en développant des mécanismes de tolérance ou de résistance ayant pour effet d'augmenter les rendements.

- *La résistance aux conditions climatiques extrêmes :*

Par exemple, on a prélevé des gènes du flet (un poisson de l'Arctique capable de survivre à des températures très basses) pour les insérer dans la fraise en espérant lui donner une certaine résistance au gel. Ainsi nous pourrions cultiver des fraises dans des régions où il était impossible de le faire auparavant.

- *La résistance aux insectes :*

Les pertes occasionnées par les insectes représentent une part non négligeable des récoltes. En effet, les insecticides employés jusqu'à maintenant présentent des inconvénients : des atteintes à l'environnement et l'apparition de formes résistantes d'insectes. Or, ceci entraîne donc l'emploi de doses croissantes de ces produits. La synthèse de protéines toxiques pour ces insectes, par modification génétique de la plante, constitue donc une voie majeure de progrès. La Pyrale est détruite par un insecticide fabriqué par le maïs transgénique dit « Bt » : le maïs reçoit un gène de scorpion pour résister aux insectes, ou de pétunia pour résister aux herbicides.

- La résistance aux maladies :

Sur le même principe, les biotechnologies s'orientent vers la lutte contre les virus, bactéries, et autres champignons. Des résultats ont déjà été obtenus sur des plantes comme la pomme de terre, la tomate ou la betterave : la pomme de terre est dotée d'un gène de poulet pour résister aux maladies, ainsi que d'un gène humain pour digérer les métaux lourds.

● *L'amélioration des conditions d'élevage :*

- La lutte contre les maladies animales :

La modification par génie génétique des aliments destinés à l'élevage peut être un moyen de lutter contre les maladies animales. Cette alimentation pourrait produire directement des anticorps ou des vaccins.

- L'amélioration de la nutrition animale :

L'utilisation du génie génétique pourrait permettre d'améliorer la qualité nutritionnelle des plantes utilisées en alimentation animale, en augmentant la teneur en certains acides aminés (méthionine, lysine, thréonine, tryptophane). Ces éléments, synthétisés en trop faible quantité par ces plantes, sont actuellement amenés sous forme de compléments nutritifs. De plus, l'accumulation de certaines enzymes pourrait permettre d'améliorer la digestibilité des aliments.

● *Application aux industries agro-alimentaires :*

- L'amélioration de la qualité des aliments :

- Le blé : amélioration des caractéristiques requises pour la panification.
- La pomme de terre : augmentation de la teneur en amidon pour des utilisations industrielles (purée, fécule et frites absorbant moins d'huile).

- Intervention dans le processus de transformation alimentaire :

Les OGM peuvent intervenir directement ou indirectement dans le processus de transformation alimentaire. Deux cas se présentent :

- soit les organismes modifiés se retrouvent dans le produit fini, c'est le cas des produits laitiers où les bactéries améliorant la régularité de la production restent présentes dans l'aliment,

- soit ils sont éliminés par la chaleur ou par filtration. On peut citer les levures qui réduisent le temps de fermentation de la pâte à pain ou éliminent les saveurs indésirables en produisant des bières plus légères. L'application du génie génétique dans ces domaines en est pour l'instant à la recherche expérimentale.

Ainsi les OGM présentent de nombreux avantages, tant dans le domaine de l'environnement que celui de l'agriculture, ou encore en matière de santé. Ceci nous incite donc à penser que le génie génétique représente un grand progrès pour la science.

Conclusion :

La technique de transgénèse est encore toute jeune et de nombreuses questions restent en suspens. On constate qu'elle présente de nombreux avantages mais également des risques non négligeables. Utilisés de façon appropriée, les OGM pourraient apporter de nombreux moyens pour contribuer à l'amélioration des conditions de vie. Cependant, la rapidité avec laquelle peuvent survenir les modifications entraînées par le génie génétique peut avoir des effets encore inconnus.

Le développement technologique intéresse directement la population. Dans la plupart des cas, les interrogations relatives aux OGM sont en lien avec l'environnement. Quant au processus d'obtention de ces derniers, c'est la transformation du vivant qui fait l'objet de préoccupations et soulève des questions de nature éthique sur l'impact que l'avènement de cette nouvelle technologie peut avoir sur la société et sur les individus qui la composent.

Il y aurait moins de controverses et le débat serait plus constructif si les applications des OGM étaient évaluées de façon exhaustive et transparente, et si leurs répercussions

éventuelles étaient prises en considération. Le génie génétique, comme toutes les innovations scientifiques peut aboutir au pire comme au meilleur. Mais les inquiétudes qui empêchent la réflexion et l'étude, à moyen et long terme, des conséquences des modifications du vivant sont mauvaises conseillères. « Toute découverte de la science pure est subversive en puissance », disait Huxley. Et il ajouta « Toute science doit parfois être traitée comme un ennemi possible ». Quelles limites doivent alors être imposées aux recherches scientifiques ? Et par qui ?

Chapitre 10: Séries de Travaux dirigés

TD 1 : Structure de l'ADN

QUESTION 1. Les nucléotides pyrimidiques sont plus lourds que les nucléotides puriques (cocher une seule réponse)

- a) Vrai
 b) Faux

La purine a 2 noyaux

QUESTION 2. Les nucléotides sont composés d'un pentose, d'une base azotée cyclique et d'au moins un groupement phosphate (cocher une seule réponse) - -

- a) Vrai - صحيح
 x b) Faux - خطأ

Un nucleotide = 1 base+1 sucre+1 groupement phosphaté

QUESTION 3. Les nucléotides se distinguent des nucléosides par ce qu'ils contiennent au moins un groupement phosphate (cocher une seule réponse)

- a) Vrai - صحيح
 b) Faux - خطأ

Un nucleoside n'a pas un groupement phosphate

QUESTION 4. L'acide ribonucléique (RNA) est un acide nucléique bicaténaire (cocher une seule réponse)-

- a) Vrai - صحيح
 b) Faux - خطأ

Arn est monocatenaire

QUESTION 5. RNA est un polynucléotide constitué des nucléotides adénosine, thymidine, guanosine et cytidine (cocher une seule réponse) -

- a) Vrai - صحيح
 x b) Faux - خطأ

QUESTION 6. Les ARN (RNA) sont polyanioniques (cocher une seule réponse)

- a) Vrai - صحيح
x b) Faux - خطأ

Il est anionique car un seul groupe phosphaté

QUESTION 7. Cocher la phrase juste relative à la structure de l'ADN (DNA) (choisir une seule réponse)

- !a) L'acide désoxyribonucléique (DNA) est marqué par l'appariement des bases A à U et C à G.-
x b) Le DNA est une association de deux chaînes polynucléotidiques par des liaisons hydrogènes

QUESTION 8. Cocher la phrase juste relative à l'ADN (DNA) des plasmides (choisir une seule réponse)

- a) Le DNA d'un plasmide a une structure différente de celle du DNA chromosomique par l'existence de bases distinctes
x b) L'ADN d'un plasmide est circulaire
 c) L'ADN d'un plasmide est dénaturé par la chaleur d'autant plus difficilement qu'il est riche en appariement A-T
|
 d) L'ADN d'un plasmide est un DNA viral intégré dans le génôme dun hôte infecté -

QUESTION 10. Cocher la phrase juste (choisir une seule réponse)

- a) Les endonucléases de restriction agissent sur les DNA monocaténares et bicaténares
x b) Les endonucléases de restriction sont des enzymes reconnaissant des séquences déterminées du DNA appelées 'sites de restrictions'
 c) Les endonucléases de restriction coupent toujours le DNA double brin de façon décalée

TD 2 Purification de l'ADN. QCM

La réussite de l'extraction et la purification de l'ADN est liée à l'élimination du maximum des protéines (+ polyphénols + polysaccharides chez les plantes) de l'extrait tout en maintenant un ADN non altéré par les DNases

QUESTION 1. Il est facile d'extraire et purifier l'ADN d'une bactérie que l'ADN de la courge, parce que : -cocher la réponse juste-:

1. L'ADN des plantes se dénature rapidement
2. L'ADN des bactéries est petit et circulaire et associé à des histones en quantité faible
3. L'ADN des bactéries est riche en introns
4. L'ADN de la courge est associé aux histones

QUESTION 2. Le rôle de l'azote liquide dans les extractions et purification de l'ADN à - choisir une seule réponse-

1. Conservation de l'ADN contre l'action des DNases
2. Attaque mécanique et chimique du matériel biologique
3. Lyse chimique du matériel biologique
4. Attaque mécanique du matériel biologique

QUESTION 3. Il est facile d'extraire et purifier l'ADN des folioles de palmier dattier que l'ADN du thymus de veau-choisir une seule réponse-

1. C'est faux, car l'extrait d'ADN des plantes est associé aux histones, polyphénols et polysaccharides
2. C'est vrai, car les folioles de palmier dattier contiennent peu d'ADN
3. C'est vrai, car le thymus ne contient pas d'autres sources de l'ADN, comme l'ADN chloroplastique
4. C'est faux, car l'ADN des plantes est entouré par de nombreuses histones

QUESTION 4. Le(s) critère(s) d'une solution d'ADN bien purifié est (sont):-choisir une seule réponse-

1. Contenu riche en ADN non altéré et en protéines associées
2. Contenu riche en ADN non altéré avec très peu de protéines
3. Contenu riche en ADN peu importe son état de conservation

4. Contenu riche en ADN non altéré avec des protéines dénaturées
5. Contenu riche en ADN peu importe son état mais avec très peu de protéines

QUESTION 5. Par rapport aux enzymes, l'extraction et la purification de l'ADN nécessite l'emploi de matériel biologique frais ou conservé à températures basses -cocher la réponse juste-:

1. C'est vrai, car l'ADN peut être facilement dénaturé
2. C'est faux, car l'ADN est résistant à la dénaturation par rapport aux enzymes
3. C'est vrai, car les enzymes sont plus résistantes à l'hydrolyse, lors de la purification
4. C'est faux, car l'ADN bicaténaire se transforme facilement en ADN monocaténaire, lors de la purification
5. C'est vrai, car les enzymes et l'ADN sont toutes des molécules fragiles

QUESTION 6. Le rôle de la basicité élevée du tampon d'extraction et la purification de l'ADN des plantes est: -cocher deux réponses justes-:

1. Neutralisation de la charge électrique des histones de point isoélectrique égal au pH du tampon d'extraction de l'ADN et affaiblissement de l'interaction ADN-histones
2. Contribution à l'élimination des polyphénols et des polysaccharides
3. Contribution à l'inactivation des DNases
4. Acquisition d'une charge positive aux histones pour faciliter leur séparation
5. Contribution à la destruction des structures lipidiques membranaires

QUESTION 7. Le rôle de EDTA dans l'extraction et la purification de l'ADN des plantes est : -cocher la réponse juste-

1. Fixation des ions divalents pour bloquer l'activité des kinases
2. Affaiblissement de l'interaction histones-ADN
3. Contribution à la dénaturation des protéines
4. Adsorption et précipitation des polyphénols
5. Fixation des ions divalents pour bloquer l'action des DNases

QUESTION 8. Le rôle du CTAB (Cetyl triméthylammonium bromide) dans l'extraction et la purification de l'ADN des plantes est: -cocher une seule réponse -

1. Fixation des ions divalents pour bloquer l'action des DNases

2. Solubilisation des protéines
3. Dénaturation des protéines pour faciliter leur solubilisation

4. Rupture des structures lipidiques au niveau des membranes et complexation avec l'ADN et les polysaccharides

QUESTION 9. Le rôle des concentrations élevées en sels (comme NaCl) dans l'extraction et la purification de l'ADN des plantes est: -cocher la réponse juste-

1. Affaiblissement de la liaison ionique entre l'ADN et les protéines par compétitivité aux molécules d'eau entre les sels et les protéines

2. Stabilisation de l'ADN
3. Elimination des polyphénols et polysaccharides
4. Rupture des structures membranaires

QUESTION 10. Le rôle du mélange chloroforme-alcool isoamylique dans l'extraction et la purification de l'ADN des plantes est : -cocher la réponse juste-

1. Formation de phases pour récupérer l'ADN dans la phase organique
2. Précipitation de l'ADN à -20°C
3. Formation de phases pour récupérer l'ADN dans l'interface
4. Séparation de l'ARN copurifié avec l'ARN

5. Formation de phases pour récupérer l'ADN dans la phase aqueuse

QUESTION 11. Le caractère moussant du tampon d'extraction est dû à : -cocher la réponse juste-

1. EDTA + NaCl 1,4 M

2. CTAB

3. EDTA + Mercaptoéthanol

4. Mercaptoéthanol

QUESTION 12. Choisir l'information fautive concernant les étapes d'extraction et de purification de l'ADN des plantes: -cocher la réponse juste-

1. Les acides nucléiques sont précipités par l'isopropanol ou par le mélange éthanol et sels

2. Les acides nucléiques sont solubles dans l'eau pure et dans les solutions aqueuses à faibles concentrations en sels

3. Les protéines sont solubles dans les solvants organiques comme le chloroforme

4. Les protéines sont solubles dans les solutions aqueuses à concentrations élevées en sels

QUESTION 13. Choisir l'information fautive concernant l'évaluation de la pureté de l'ADN purifié à partir d'une plante: -cocher la réponse juste-

1. Les protéines présentent un pic d'absorption maximal à 280 nm

2. Ce sont les bases azotées qui donnent l'absorption de l'ADN à 260 nm

3. La recherche de contamination des acides nucléiques par des protéines s'effectue en mesurant le rapport DO à 280 nm sur DO à 260 nm. Celui-ci doit être de l'ordre de 1,8 - 2,0 pour une pureté optimale

4. Le rapport DO à 260 nm sur DO à 280 nm de l'ordre de 1,8 - 2,0 renseigne sur une purification meilleure de l'ADN

QUESTION 14. Choisir l'information fautive relative aux composés chimiques CTAB (voir image ci dessus) et SDS (voir image) souvent utilisés dans la purification de l'ADN: -cocher la réponse juste-

1. CTAB et SDS sont des agents moussants

2. Par des interactions hydrophobes avec les structures lipidiques, CTAB et SDS entraînent la rupture des membranes

3. par sa 'tête', SDS se lie à l'ADN

4. par sa charge électrique positive, CTAB se lie à l'ADN

QUESTION 15. Choisir l'information correcte concernant le rôle du béta-mercaptoéthanol dans la purification de l'ADN des plantes: -cocher la réponse juste-

1. Rupture des structures membranaires et précipitation de l'ADN

2. Inhibition des DNases pouvant altérer l'ADN au cours de la purification par coupure des ponts dissulfures

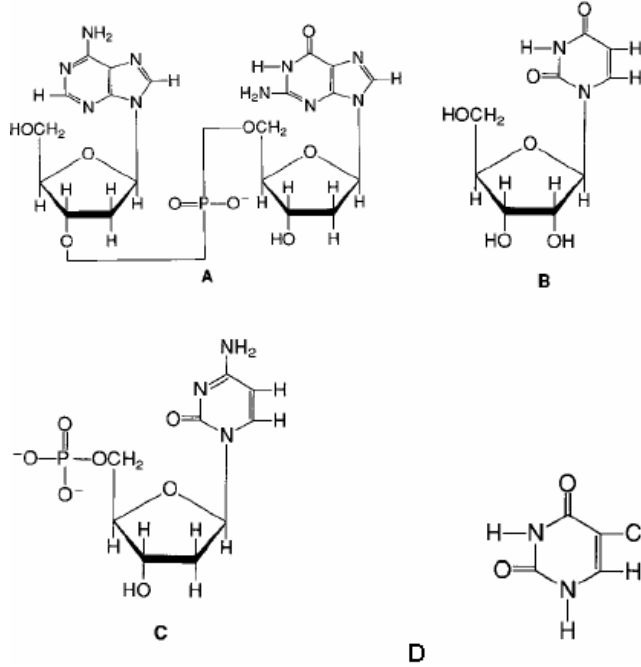
3. Protection contre l'oxydation des phénols en tanins se liant de façon covalente à l'ADN et dénaturation des protéines par réduction des ponts dissulfures

4. Elimination des polysaccharides qui empêchent l'action des enzymes de restriction sur l'ADN, une fois purifié

Td 3 ADN recombinant et enzymes de restriction (avec corrigé)

Exercice 1

1) Identifier les bases présentes dans les structures suivantes :

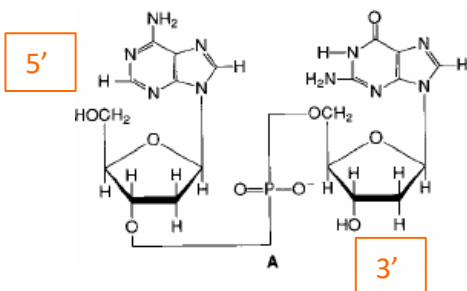


A = adénosine et guanine, B = uracile, C = cytosine, D = thymine

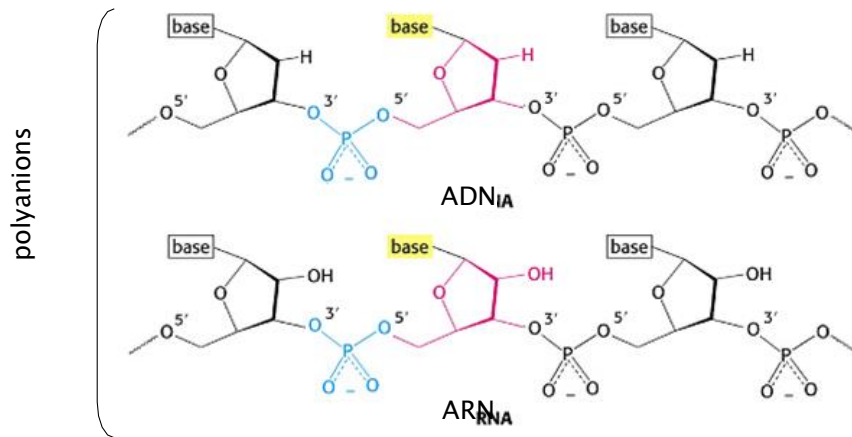
2) Parmi ces bases, lesquelles :

- | | |
|---------------------------------|---------------------|
| a) contiennent du ribose. | B |
| b) contiennent du désoxyribose. | A, C |
| c) contiennent une purine. | A |
| d) contiennent une pyrimidine | B, C, D |
| e) contiennent de la guanine. | A |
| f) sont des nucléosides. | B |
| g) sont des nucléotides. | A (dinucléotide), C |
| h) se trouvent dans l'ARN. | B |
| i) se trouvent dans l'ADN. | A, C, D |

3) indiquer les extrémités 5' et 3' de la molécule A



et ceci sur la base de la représentation schématique suivante de la structure de l'ADN :



Exercice 2

La séquence d'un ADN bicaténaire (**double brin**), correspondant à un gène, est partiellement reportée ci-dessous.

5' ATACGGGATCCGAGCTCTCGATCGTCTGCAGAAATTCC 3'

1) Ecrire la séquence et l'orientation du second brin de ce fragment.

3' TATGCCCTAGGCTCGAGAGCTAGCAGACGTCTTTAAGG 5'

Soit si l'on respecte les conventions d'écriture :

5' GGAATTTCTGCAGACGATCGAGAGCTCGGATCCCGTAT 3'

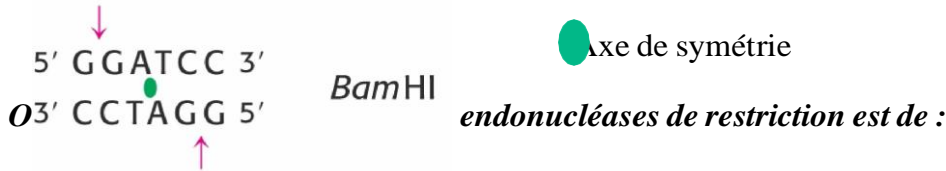
2) Donner le brin complémentaire d'ARN

L'uracile remplace la thymine

3' UAUGCCCUAGGCUCGAGAGCUAGCAGACGUCUUUAAGG 5'

Soit : 5' GGAAUUUCUGCAGACGAUCGAGAGCUCGGAUCCCGUAU 3'

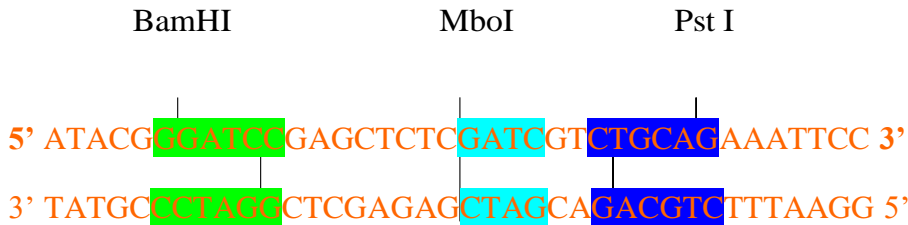
3) Sur une représentation détaillée de l'enchaînement de deux nucléotides d'un brin d'ADN « du site *BamH I* » dont les bases seront représentées par les lettres correspondantes, indiquer (à l'aide d'une flèche) quelle liaison est rompue sous l'action de l'enzyme *BamH I*.



- **Reconnaître** des séquences de bases spécifiques dans la double hélice d'ADN
 - 4 à 15 paires de bases
 - usuellement des palindromes
- **Cliver** les deux brins du duplex en des endroits très spécifiques par hydrolyse de la liaison phosphodiester pour obtention d'un fragment de restriction

4) Soient les enzymes de restriction *BamH I*, *Pst I*, *Xho I* et *Mbo I* dont les sites reconnus sont : *BamH I* : 5' G/GATCC 3' ; *Pst I* : 5' CTGCA/G 3' ; *Xho I* : 5' C/TCGAG 3' ; *Mbo I* : 5' /GATC 3'. Recopier la séquence de l'ADN et encadrer les sites de restriction en indiquant la position des coupures.

en surligné, les sites reconnus respectivement par les enzymes avec en noir, la coupure correspondante



BamH I : 5' G/GATCC 3'
3' CCTAG/G 5'

Pst I : 5' CTGCA/G 3'
3' G/ACGTC 5'

Xho I : 5' C/TCGAG 3'
3' GAGCT/C 5'

Xho I ne reconnaît pas de site sur ce fragment d'ADN donc n'aura pas d'action (attention à l'orientation du fragment d'ADN)

Mbo I : 5' /GATC 3'.

3' /CTAG 5'

5) Pour chaque enzyme, écrire les séquences des extrémités des molécules d'ADN digérées et préciser le type d'extrémités obtenu.

Pour BamH I (terminaisons à bouts collants)

Fragment 1 : Fragment 2

:

5' ATACGG GATCCGAGCTCTCGATCGTCTGCAGAAATTCC 3'
3' TATGCCCTAG GCTCGAGAGCTAGCAGACGTCTTTAAGG 5'

Pour Pst I (terminaisons à bouts collants)

Fragment 1 :

Fragment 2 :

5' ATACGGGATCCGAGCTCTCGATCGTCTGCA GAAATTCC 3'
3' TATGCCCTAGGCTCGAGAGCTAGCAG ACGTCTTTAAGG 5'

Pour Mbo I (terminaisons à bouts francs)

Fragment 1 :

5' ATACGGGATCCGAGCTCTC
3' TATGCCCTAGGCTCGAGAG

Fragment 2 :

GATCGTCTGCAGAAATTCC 3'
CTAGCAGACGTCTTTAAGG 5'

6) On mélange ce brin d'ADN apparié avec son brin complémentaire à un autre fragment d'ADN double brin. La solution est portée à une température supérieure à leurs T_m respectives, puis refroidie. Que peut-on attendre?

Les brins dissociés (dénaturés) d'ADN de chaque espèce vont se réappairier (se renaturer) avec leur séquence complémentaire sans mélange d'ADN des deux espèces. L'appariement des bases complémentaires est le plus stable énergétiquement.

8) Voici la séquence d'une amorce (ou primer) : 5' - TTTCTGCA- 3'

Où cette amorce se fixera-t-elle sur la séquence d'ADN ? Quelle séquence obtiendra-t-on après élongation par la DNA-polymérase ?

3' -ACGTCTTT-
5'

5' ATACGGGATCCGAGCTCTCGATCGTCTGCAGAAATTCC 3'

*En vert, site reconnu par l'amorce
En turquoise, l'amorce*

La DNA polymerase permet l'ajout d'un dNTP (nucléotides triphosphates) à l'extrémité hydroxyle en 3' de l'ADN :

3' TATGCCCTAGGCTCGAGAGCTAGCAGACGTCTTTAAGG 5'

3' TATGCCCTAGGCTCGAGAGCTAGCAGACGTCTTT- 5'
5' ATACGGGATCCGAGCTCTCGATCGTCTGCAGAAATTCC 3'

En rose, séquence obtenue après élongation

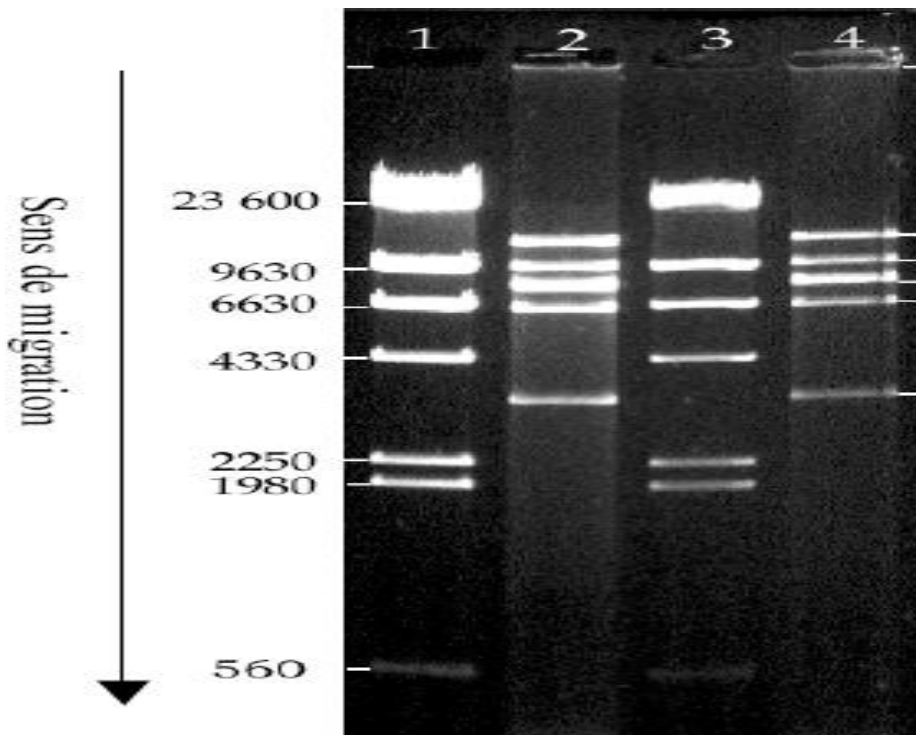
Exercice 3

L'ADN d'un cosmide recombinant* de 48,6 kpb a été hydrolysé par l'enzyme de restriction Sal I. Cet ADN est analysé par électrophorèse sur gel d'agarose (pistes 2 et 4). Un marqueur de taille (l'ADN du phage lambda hydrolysé par l'enzyme de restriction Hind III) est déposé

dans les puits 1 et 3. Ce marqueur de taille est un mélange équimolaire de fragments d'ADN de tailles connues. La quantité d'ADN total déposé dans les puits 1 et 2 est le double de celle des puits 3 et 4. Après coloration par le bromure d'éthidium**, l'image suivante est obtenue.

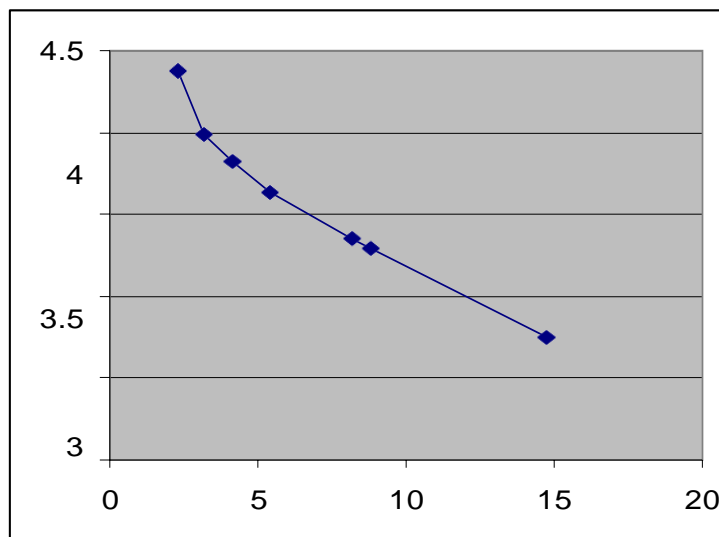
* On rappelle qu'un cosmide est un vecteur artificiel constitué d'un plasmide auquel a été ajouté le site COS du bactériophage lambda. L'intérêt des cosmides réside dans le fait qu'ils permettent le clonage de fragments d'ADN de grande taille soit environ de 45kpb.

** Le bromure d'éthidium (BET) une molécule aromatique plane qui s'intercale entre les paires de bases de la double hélice et devient fluorescent. Il suffit ensuite d'éclairer le gel avec une lumière ultra-violette (vers 310 nm) pour voir la fluorescence orange du complexe ADN-BET dans les bandes.



1) À l'aide des valeurs du tableau I, tracer la courbe étalon : $\text{Log taille(pb)} = f(\text{distance de migration})$.

Type de courbe à obtenir :



2) À partir de cette courbe, déduire la taille des fragments issus de la digestion par l'enzyme de restriction Sal I de l'ADN du cosmide recombinant (pistes 2 et 4).

Migration (cm)	Taille (pb)
2.8	14692
3.2	11434
3.6	9165
4.1	7179
6.5	3021
SOMME	45490

3) La somme des tailles des fragments obtenus vous semble-t-elle en accord avec la taille attendue de 48,6 kpb ?

La somme est plus faible. Cela peut être dû notamment aux incertitudes qui peuvent être importantes en particulier pour les fragments de grande taille (voir allure courbe) ou à deux bandes très proches qui n'auraient pas été différenciées à la lecture.

4) Le bromure d'éthidium s'intercale entre les bases de l'ADN de manière uniforme sur une molécule d'ADN linéaire. Étudiez attentivement la photo du profil de restriction, que remarquez- vous ? Qu'en déduisez-vous ?

La fluorescence des bandes 1 et 2 est plus intense. Or la quantité d'ADN total déposé dans les puits 1 et 2 est le double de celle des puits 3 et 4. La lecture du gel permet donc, au travers de l'intensité de la fluorescence émise, d'obtenir une information semi-quantitative et de comparer de manière relative les quantités d'ADN au niveau de chaque bande.

Tableau I :

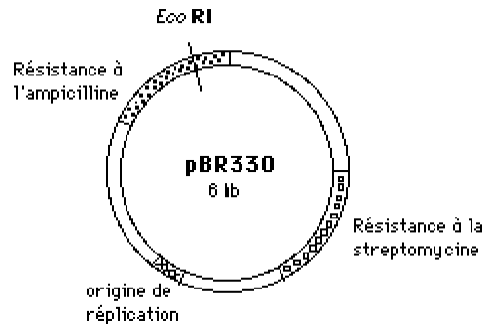
Phage lambda digéré par <i>Hind III</i> pistes 1 et 3		ADN cosmique digéré par Sal I pistes 2 et 4	
Migration en cm	Taille en pb	Migration en cm	Taille en pb
2,3	23 600	2,8	
3,2	9 630	3,2	
4,1	6 630	3,6	
5,4	4 330	4,1	
8,2	2 250	6,5	
8,8	1 980		
14,7	560		

Exercice 4 : Clonage et analyse de l'ADN recombinant

On souhaite étudier la fonctionnalité d'un gène M d'une bactérie. Pour cela, on essaie de cloner au site *Eco RI* du vecteur plasmidique pBR330 (voir schéma) un fragment *Eco RI-Eco*

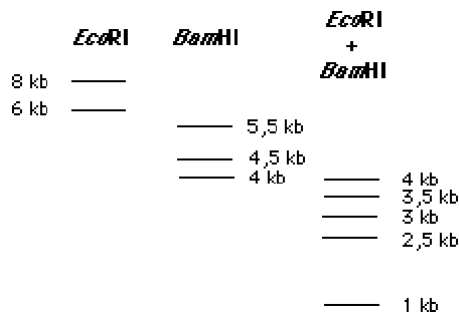
RI d'ADN génomique de la bactérie d'intérêt

a- Proposez un protocole de clonage et indiquez comment vous sélectionnez les clones recombinants.

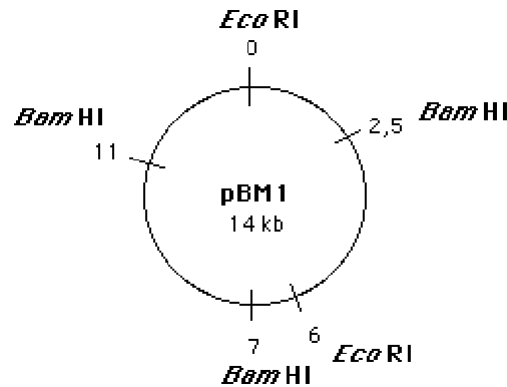


- **Préparation de l'insert:** Extraction d'ADN génomique de la bactérie. Digestion partielle de cet ADN par l'enzyme de restriction *Eco RI*, de manière à générer des fragments de 5 à 10 kb. Electrophorèse préparative pour purifier sur gel les fragments de 5 à 10 kb.
- **Préparation du vecteur:** Digestion complète de pBR330 par *Eco RI*. Déphosphorylation des extrémités.
- **Clonage:** ligature des inserts et des vecteurs. Transformation de cellules d'*E. coli*. Recommencer les étapes précédentes jusqu'à avoir 10 e+6 colonies transformées indépendantes.
- **Sélection:** sélection des colonies transformées sur milieu contenant de la streptomycine. Pour estimer le taux de colonies qui ont reçu un plasmide contenant de l'ADN génomique de la bactérie étudiée, repiquage d'environ 500 colonies sur milieu contenant de l'ampicilline: seule les colonies qui ont reçu un plasmide ne contenant pas d'ADN génomique de la bactérie étudiée poussent.
- **Sélection des clones contenant le gène d'intérêt:** transfert des 10 e+6 colonies sur filtre et hybridation moléculaire avec une sonde appropriée (technique dite de "l'hybridation sur colonies").

b- : Un des plasmides recombinants contenant le gène M (appelé pBM1) est digéré par les enzymes de restriction *Bam HI* et *Eco RI*. Après migration et séparation des fragments d'ADN sur gel d'agarose puis coloration au bromure d'éthidium, on obtient les profils de restriction suivants:



Donnez la carte de restriction du plasmide recombinant pBM1



Exercice 5 : Séquençage

Vous disposez d'un brin d'ADN à séquencer (matrice), d'une amorce, d'ADN polymérase tronquée*, des quatre 2'-désoxyribonucléotides (dXTP) et d'un jeu des différents 2',3'-didésoxyribo-nucléotides (ddXTP). L'amorce est radiomarquée par du phosphore radioactif ^{32}P . L'ADN matriciel à séquencer ACGTAATCGC---- comporte, à son extrémité 3', une séquencesupplémentaire (représentée ici par un segment de droite en pointillé) sur laquelle l'amorce vas'hybrider, créant ainsi le site d'initiation de l'ADN polymérase.

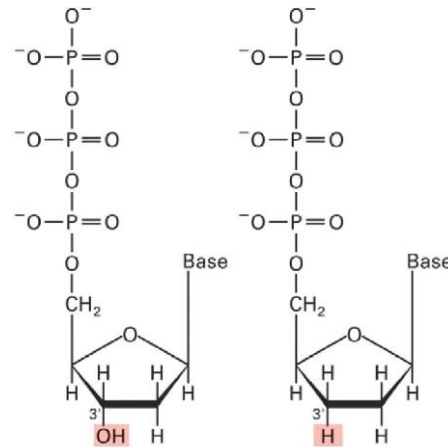
**l'enzyme est constituée de plusieurs domaines dont l'un est responsable de la destruction " programmée " de l'amorce ; après élimination de ce domaine, la fraction restante, désignée " fragment de Klenow ", conserve l'activité ADN polymérase*

1 — Résumez brièvement le principe de la méthode en indiquant le rôle du didésoxyribonucléotide.

L'originalité du ddXTP (fluorescent ou radioactif) dans la méthode utilisée (Méthode de Sanger) est qu'il stoppe la progression de la synthèse (absence du groupement OH)

Désoxyribonucléotidetriphosphate

(dXTP) Didésoxyribonucléotidetriphosphate



Rappel de la méthode :

1 — la réplication (ou duplication) de l'ADN nécessite la présence d'un brin modèle (matrice), d'une amorce complémentaire d'un fragment d'ADN qui jouxte la région à séquencer, des 4 nucléotides dXTP, d'ADN polymérase.

2 — la synthèse du brin complémentaire se faisant dans la direction 5'P vers 3'OH, le brin matriciel a l'orientation inverse ; l'amorce se lie du côté 3' de l'ADN matriciel ; l'ADN polymérase parcourt ce brin dans sa direction 3'-5' pour allonger l'amorce dans la direction correcte 5'-3'.

3 — lorsque l'ADN polymérase identifie A sur le brin modèle, elle place T sur le brin en cours de synthèse (de même pour C et G).

Quand des ddXTP sont utilisés :

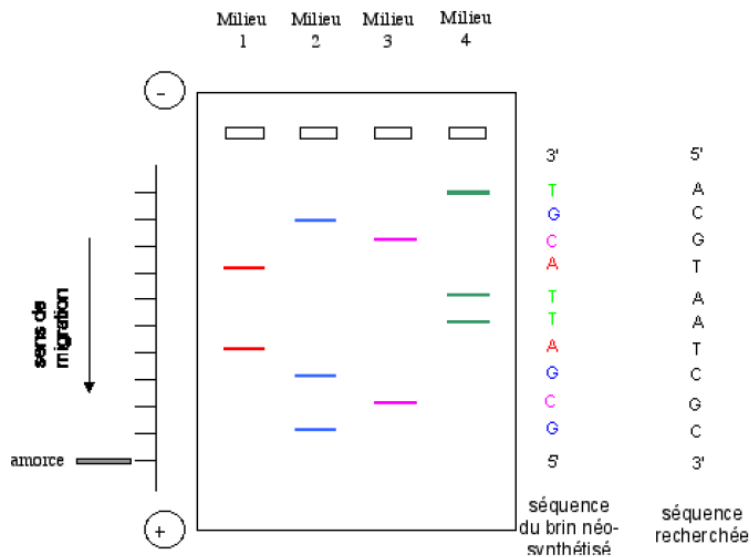
L'enzyme place soit 1 dXTP et l'élongation de l'amorce se poursuit, soit 1 ddXTP et la synthèse s'arrête. On obtient au final une série d'oligonucléotides de taille variable, tous terminés par ddX (X = A, G, C, T selon le milieu). Le résultat de l'électrophorèse des 4 milieux donne directement la séquence de l'ADN complémentaire à la séquence recherchée.

2 — Compléter le tableau en indiquant la composition des différents milieux réactionnels et, pour chaque milieu, le type et la taille des fragments néosynthétisés.

Composition des milieux			
Milieu 1	Milieu 2	Milieu 3	Milieu 4
ADN matrice, amorce, 4 dXTP, ADN polymérase, Mg ⁺⁺	ADN matrice, amorce, 4 dXTP, ADN polymérase, Mg ⁺⁺	ADN matrice, amorce, 4 dXTP, ADN polymérase, Mg ⁺⁺	ADN matrice, amorce, 4 dXTP, ADN polymérase, Mg ⁺⁺
+ ddATP	+ ddGTP	+ ddCTP	+ ddTTP
Composition des fragments néosynthétisés			
Milieu 1	Milieu 2	Milieu 3	Milieu 4
-GCGddA(4)	-ddG(1)	-GddC(2)	-GCGAddT(5)
-GCGATTddA(7)	-GCddG(3)	-GCGATTAddC(8)	-GCGATddT(6)
	-GCGATTACddG(9)		-GCGATTACGddT(10)

3 — Sur le gel ci-dessous, représenter la taille des fragments néosynthétisés dans chaque milieu réactionnel (utiliser l'échelle de taille représentée à gauche du schéma)

4 — Reporter, à droite, la séquence du brin synthétisé puis la séquence recherchée, en indiquant le sens de lecture des séquences établies.



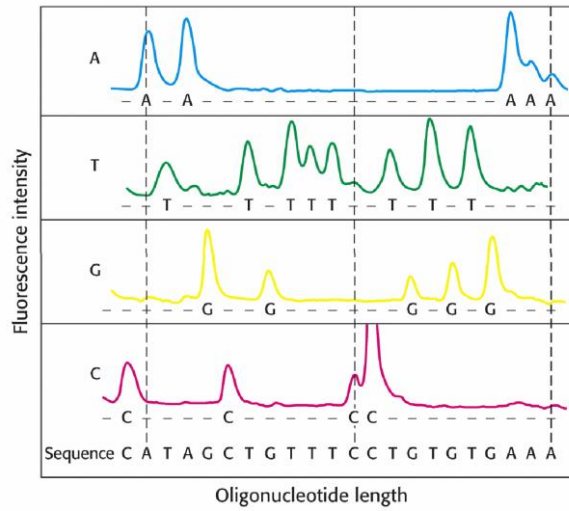
NB : Il est possible de repérer les différents oligonucléotides en marquant non pas l'amorce mais les ddXTP ; ceux-ci peuvent être marqués par un atome radioactif (^{32}P) ou par des réactifs fluorescents.

Exercice 6 : Séquençage

Un petit fragment d'ADN a été séquencé selon la méthode d'interruption des chaînes (méthode de Sanger). Une fois la réaction de séquence terminée, la taille des fragments obtenus est déterminée par une chromatographie. Le séquenceur automatique pourvu d'une source laser ou infra-rouge qui excite les fluorochromes portés par les ddNTP, détecte la fluorescence sortant des colonnes de chromatographie, repérant ainsi les fragments d'ADN et leur taille précise. Le résultat est présenté sous forme de courbes présentant la fluorescence détectée, et l'interprétation qui en faite en terme de nucléotides Donner la séquence de l'ADN (la flèche sur le dessin indique le sens de migration)

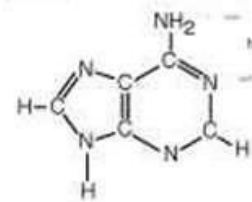
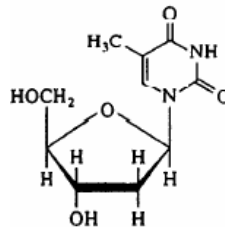
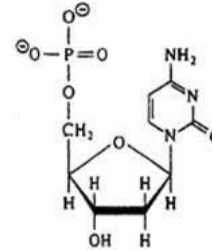
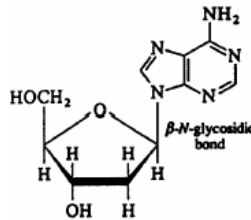
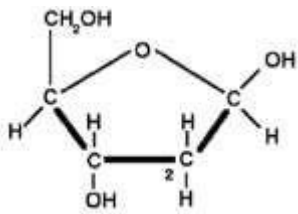
←

Des séquences de 300 nucléotides sont séquencées de manière correcte sur gel (« à la main »). Les séquenceurs permettent de lire plusieurs centaines de nucléotides avec une très bonne qualité et ceci jusqu'à 1000



TD4 : Complimentarité des bases nucleiques

Exercice 1 : Donner le nom exact et complet des composés suivants :

**Exercice 2****1.1**

a. Par convention la séquence d'un simple brin d'une molécule d'ADN est écrite dans le sens 5' (gauche) - 3' (droite). Quels sont les **groupements chimiques correspondant à ces extrémités** ?

b. Un échantillon d'ADN contient **30,5 moles pour 100 d'adénine**. Quels sont les **pourcentages de thymine, guanine et cytosine** ? Quelles caractéristiques structurales permettent de différencier ces bases ?

1.2 Soit le fragment d'ADN suivant:

5'CTTCA3'

3'GAAGT5'

a. Par l'intermédiaire de **quels atomes** et de **quel type de liaison** cette structure est-elle **stabilisée**?

b. Comment peut-on **dénaturer** cette molécule?

Exercice 3 :

On a déterminé les nombres de bases azotées présentes dans l'ADN de différentes espèces et établi les rapports présentés dans le tableau ci-dessous :

Espèces	$\frac{A + T}{C + G}$	$\frac{A+G}{T+C}$
Bactérie	0,92	1,03
Levure	1,80	1,00
Ail	1,73	1,01
Blé	1,22	0,98

1/ **Rappeler** ce qu'est l'appariement des bases.

2/ **Expliquer** pourquoi le rapport $(A+G)/(T+C)$ est toujours très voisin de 1, quelle que soit l'espèce.

3/ **Expliquer** pourquoi le rapport $(A+T)/(C+G)$ diffère selon les espèces.

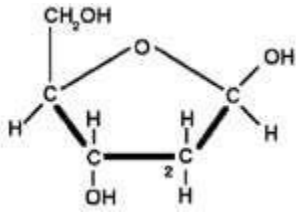
4/ **Construire** un modèle possible (plusieurs possibilités !) d'un fragment d'ADN qui comporterait 10 nucléotides par brin et dont le rapport $(A+T)/(C+G)$ serait de 1,5. La représentation sera schématisée sous forme déroulée.

Exercice 4

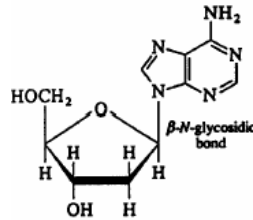
Un certain gène mesure environ $1\mu\text{m}$ de long sur une molécule d'ADN à double brin. Sachant qu'un tour de spire **complet** mesure 3,4 nm, quel est approximativement le nombre de paires de bases que porte ce gène ?

Corrigé-type TD 4

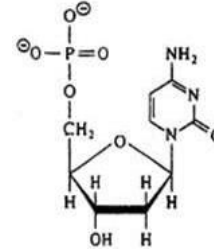
Exercice 1 : Donner le nom exact et complet des composés suivants :



2-désoxy-βD ribose
5' Monophosphate



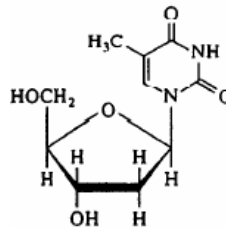
2' désoxy-adénosine



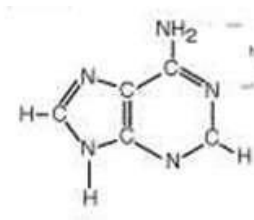
2' Désoxy-cytidine



Guanine



2' Désoxy-thymidine



Adénine

Exercice 2

a. Par convention la séquence d'un simple brin d'une molécule d'ADN est écrite dans le sens 5' (gauche) - 3' (droite). Quels sont les **groupements chimiques correspondant à ces extrémités** ?

5' phosphate « P » et 3' OH

b. Un échantillon d'ADN contient **30,5 moles pour 100 d'adénine**. Quels sont les **pourcentages de thymine, guanine et cytosine** ? Quelles caractéristiques structurales permettent de différencier ces bases ?

$$A+T+G+C=100\%, A=T \text{ et } G=C$$

$$A= 30,5, 2A+2G= 100\%$$

$$2G= 100 - 61, G= 39/2= 19,5\%.$$

Donc : A=T= 30,5% et G=C= 19,5%

Caractéristiques de chaque base :

L'adénine et la Guanine sont des bases puriques, formées d'un noyau purine hétérocyclique. Le C6 de l'adénine est substitué d'un groupement amine, alors que la guanine porte un groupement amine sur le C2 et une cétone sur C6.

La cytosine et la thymine sont des bases pyrimidiques, formées d'un noyau pyrimidique « un seul cycle ». Le C4 de la cytosine porte une amine et le C2 porte une cétone, alors que la thymine en plus des deux fonctions cétone porté par le C2 et le C4, il porte aussi un groupement méthyl sur le C5.

1.2

a. Entre les atomes **d'azote** et les atomes **d'oxygène** des bases azotées sont établis des liaisons faible de type **hydrogènes**.

b. Cette molécule double brin d'ADN peut être dénaturée par **la chaleur**. Le chauffage de la molécule casse les liaisons hydrogènes, ce qui sépare les deux brins d'ADN. Plus la molécule d'ADN est riche en GC plus la température nécessaire à la séparation des deux brins est importante.

Exercice 3 :

1/ L'appariement de base correspond à l'association d'une adénine avec une thymine d'une part (2 liaisons hydrogènes), d'une cytosine avec une guanine d'autre part (3liaisons hydrogènes).

2/ **Puisque A = T et C = G (à cause de l'appariement)**, le rapport $(A+G)/(T+C)$ peut s'écrire $(T+C)/(T+C)$ ce qui correspond bien à un résultat égal à 1.

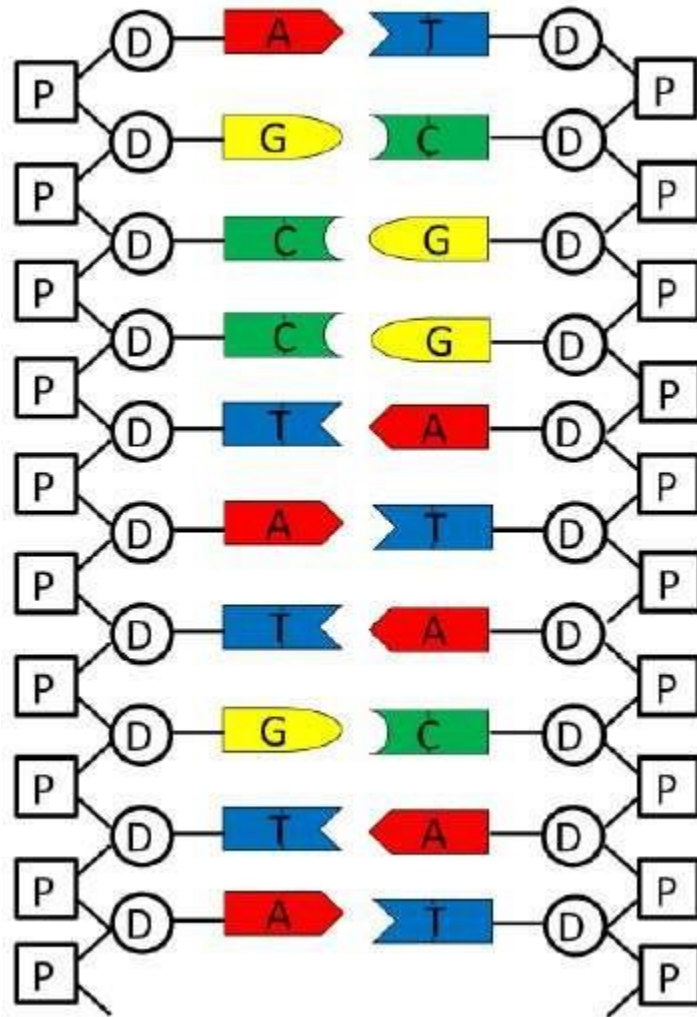
3/ Ce rapport est différent d'une espèce à l'autre car il n'existe aucun lien entre le nombre de paires (A+T) et les paires (C+G), donc le résultat de cette division est différent selon les espèces qui n'ont pas la même information génétique.

4/ Je lis attentivement les informations du sujet :

- « 10 nucléotides par brin » : je dois donc écrire 20 nucléotides en tout, 10 « à gauche » et 10 « à droite ».

- Rapport de 1,5 : le nombre de paires (A+T) doit être 1,5 fois plus grand que le nombre de paires (C+G)

Un modèle possible :



On vérifie le rapport : $(A+T) / (C+G) = 12/8 = 3/2 = 1,5$

Exercice 4 :

$1\mu\text{m} = 1000\text{nm}$

Le nombre de tour = $1000/3,4 =$

$294,11$ tours. Par tours nous 10 paire de

base ;

Le nombre de paire de base = $294,11 \times 10 = 2941,1$ (approximativement = 2942 paire de base)

Td5 : structure et propriétés des acides nucléiques (ADN, ARN).

QUESTION 1 (acides nucléiques). Parmi les propositions suivantes relatives à la structure normale de l'ADN, choisir la proposition correcte:- cocher une seule réponse -

1. L'ADN contient des nucléosides tri-phosphates
2. L'ADN contient du ribose ou du désoxyribose
3. L'ADN contient des désoxyribonucléosides monophosphate
4. L'ADN renferme des molécules de pyrophosphate

QUESTION 2 (acides nucléiques). Choisir l'information correcte relative aux règles d'appariement entre 2 brins d'ADN- cocher une seule réponse -

1. L'appariement d'une base T avec une base A ou d'une base G avec une base C nécessite un nombre variable de liaisons hydrogènes variant en fonction de la séquence nucléotidique environnante
2. Une base A s'apparie avec une base T par une liaison phosphodiester
3. Une base C s'apparie avec une base G par 2 liaisons hydrogènes
4. Une base A s'apparie avec une base T par 3 liaisons hydrogènes
5. Une base C s'apparie avec une base G par 3 liaisons hydrogènes

QUESTION 3 (acides nucléiques). Choisir l'information correcte relative à L'ADN sous forme hélicoïdale A - cocher une seule réponse -

1. Le pas de l'hélice A est de 10 paires de bases par tour
2. L'hélice A est la plus fréquente des 3 hélices
3. L'hélice A est une hélice dont le sens de rotation est droit
4. L'hélice A a une structure sous forme de grands sillons
5. La distance entre 2 paires de bases est d'environ 3,4 Å

QUESTION 4 (acides nucléiques). Choisir l'information fautive relative à L'ADN sous forme hélicoïdale B- cocher une seule réponse -

1. L'hélice B contient une alternance de grands sillons et de petits sillons
2. La distance entre 2 paires de bases est d'environ 3,4 Å
3. Le pas de l'hélice B est de 10 paires de bases par tour
4. L'hélice B est la plus fréquente des 3 hélices

5. L'hélice B est une hélice dont le sens de rotation est gauche

QUESTION 5 (acides nucléiques). Contrairement à l'anomérie 'alpha', l'anomérie 'béta' des glucides (sucres) est caractérisée par l'orientation de l'hydroxyle porté par le carbone anomérique -C1 pour les aldoses- au dessus du plan du cycle:- cocher une seule réponse -

1. L'hélice Z est une hélice dont le sens de rotation est droit
2. La distance entre 2 paires de bases est d'environ 3,4 Å
3. Le nombre des grands sillons de l'hélice Z est négligeable
4. Le pas de l'hélice Z est de 10 paires de bases par tour
5. L'hélice Z est la plus rare des 3 hélices

QUESTION 6 (acides nucléiques). Parmi les liaisons chimiques suivantes, choisir celle qui n'existe pas dans l'ADN:

1. Liaison phosphodiester
2. Liaison amide
3. Liaison hydrogène
4. Liaison glycosidique

QUESTION 7 (acides nucléiques). Choisir l'information correcte relative aux différences entre l'ADN et l'ARN:- cocher une seule réponse -

1. Un brin d'ARN est différent d'un brin d'ADN par son sucre, uniquement.
2. Les liaisons unissant 2 nucléotides au sein d'un brin d'ARN sont de différente nature que celles liant 2 nucléotides au sein d'un brin d'ADN
3. A l'encontre de deux brins d'ADN, un brin d'ADN et un brin d'ARN ne peuvent s'apparier entre eux grâce à leurs bases azotées
4. A la différence de l'ARN, l'ADN contient autant de thymine que d'adénine.
5. Un brin d'ARN, de façon identique à un brin d'ADN, comporte deux extrémités :
une extrémité 5'-phosphate et une extrémité 3'-phosphate.

QUESTION 8 (acides nucléiques). Choisir l'information fautive concernant les propriétés physico-chimiques de l'ADN bicaténaire (ou ADN double-brin):- cocher une seule réponse -

1. Après fusion, les brins d'ADN après sont monocaténaires -ou simples brins-

2. Le chauffage d'une solution d'ADN conduit à une élévation de l'absorption à 260 nm
3. La température de fusion d'un ADN bicaténaire augmente fortement avec une augmentation du pourcentage de paires AT dans l'ADN
4. La température à laquelle survient la séparation des chaînes d'ADN est la température de fusion -T_m-
5. Les deux brins d'ADN peuvent s'hybrider à nouveau quand la température est abaissée

QUESTION 9 (acides nucléiques). Choisir l'information fautive concernant l'hybridation moléculaire: - cocher une seule réponse -

1. Peut se réaliser entre une sonde oligonucléotidique et un produit d'amplification PCR, mais exigeant la transformation préalable du produit de la PCR en ADN monocaténaire
2. La formation de boucles au niveau des portions de brin non appariées est due au non-appariement entre brins monocaténaires
3. Correspond à l'appariement de séquences polynucléotidiques selon la règle de complémentarité A et T, G et C
4. N'est possible qu'entre des brins monocaténaires d'ADN ou d'ARN, et ne permet pas la constitution d'hybrides d'ADN et d'ARN
5. Permet l'exploration de l'ADN génomique par des sondes moléculaires - Southern Blot-

QUESTION 10 (acides nucléiques). Choisir l'information fautive concernant les acides ribonucléiques (ARN): - cocher une seule réponse -

1. Des bases inhabituelles peuvent être présentes dans certains ARN comme les ARN de transfert où l'hypoxanthine est absente et la thymine est présente
2. Les ARN sont monocaténaires -une seule chaîne-. Cependant, ils peuvent présenter des régions avec des interactions entre des bases d'une seule chaîne.
3. Les cellules contiennent principalement les ARNs de transfert, ARNs ribosomiques, ARNs messagers et ARNs nucléaires -" small nuclear RNAs "-
4. L'enchaînement des nucléotides constitutifs des ARNs est assuré par des groupements phosphodiester 5' à 3'
5. Les bases azotées de l'ARN sont: l'uracile, la cytosine, l'adénine et la guanine

QUESTION 11 (acides nucléiques). Choisir l'information fautive concernant les ARNs de transfert: - cocher une seule réponse -

1. Présentent une extrémité non phosphorylée -3' dont la séquence est : -CCA-OH-

2. Interviennent dans la biosynthèse des protéines comme adaptateurs entre l'ARN messager et les acides aminés
3. Possèdent généralement plusieurs bases inhabituelles -thymine par exemple-
4. Présentent une extrémité -5' phosphorylée
5. Possèdent à leur extrémité 5', une boucle avec une séquence de trois nucléotides -ou triplet- correspondant à l'anticodon du codon porté par l'ARN messager

QUESTION 12 (acides nucléiques). Choisir l'information fausse concernant les ARNs ribosomiques (ou rRNAs): - cocher une seule réponse -

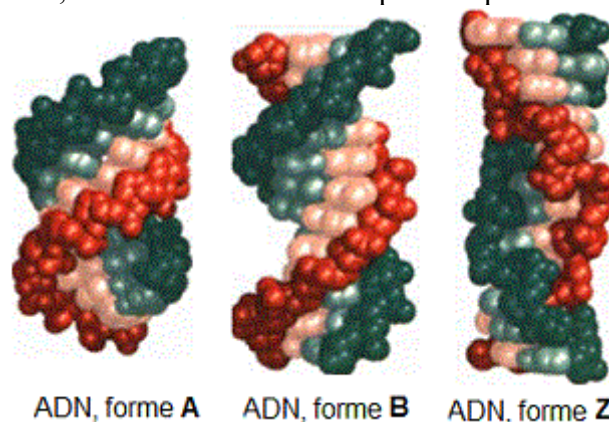
1. Les eucaryotes présentent un ARN 16 S dans la petite sous-unité -40 S- des ribosomes
2. La taille des rARNs varient selon leur appartenance aux eucaryotes ou aux procaryotes
3. La grande sous-unité -60 S- des ribosomes contient trois rRNAs : 5 S, 5,8 S et 28 S
4. Les rARNs sont hétérogènes en taille avec des grands rRNAs et des petits rRNAs
5. Les eucaryotes présentent un ARN 18 S dans la petite sous-unité -40 S- des ribosomes

Corrigé Td 05

Question 1. Réponse d. Un ADN ne peut contenir que des nucléosides mono-phosphates dont le sucre est le désoxyribose.

Question 2. Réponse c. Une base C s'apparie avec une base G par 3 liaisons hydrogènes. Le nombre de liaisons hydrogène contracté lors de l'appariement des bases A et T (deux liaisons hydrogène) et C et G (trois liaisons hydrogène) est fixe et indépendant de la séquence nucléotidique environnante.

Question 3. Réponse a. L'hélice A est une hélice dont le sens de rotation est droit. L'hélice d'ADN A possède un pas d'environ 11 paires de bases par tour. La distance entre 2 paires de bases est d'environ 2,3 Å. L'hélice d'ADN la plus fréquente est l'hélice B.



Question 4. Réponse e. L'hélice B est une hélice dont le sens de rotation est droit

Question 5. Réponse d. L'hélice d'ADN sous forme hélicoïdale Z dont le sens de rotation est gauche, possède un pas d'environ 12 paires de bases par tour. La distance entre 2 paires de bases est d'environ 3,8 Å. L'hélice Z, plus rare, elle est rencontrée lorsque l'ADN présente une alternance de bases puriques et pyrimidiques.

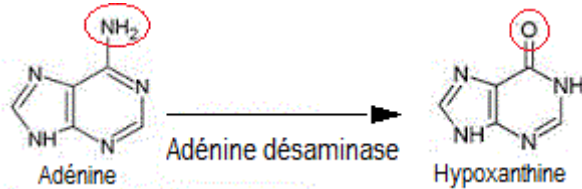
Question 6. Réponse c. La liaison amide (liaison peptidique) n'est pas impliquée dans la structure de l'ADN.

Question 7. Réponse b. Un couple ADN/ARN est réalisable. En effet, lors de la transcription, L'ADN donne l'ARN en passant par les appariements entre les bases de l'ADN et de l'ARN. Un brin d'ADN diffère d'un brin d'ARN par le pentose et par les bases azotées (uracile dans l'ARN au lieu de la thymine dans l'ADN). Comme l'ADN, l'ARN comporte une extrémité 5'-phosphate et une extrémité 3'-hydroxyle.

Question 8. Réponse e. La température de fusion d'un ADN bicaténaire augmente fortement avec une augmentation du pourcentage des paires CG dans l'ADN.

Question 9. Réponse b. L'hybridation moléculaire est possible qu'entre des brins monocaténares d'ADN ou d'ARN, et permet pas la constitution d'hybrides d'ADN et d'ARN.

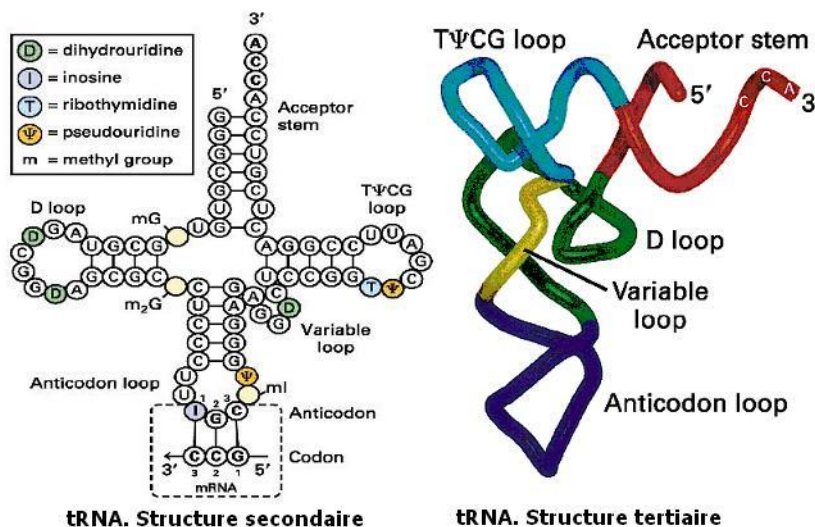
Question 10. Réponse d. Des bases inhabituelles peuvent être présentes dans certains ARN comme les ARN de transfert où l'hypoxanthine est présente (dans les anticodons d'ARNt) ainsi que la thymine (nucléotides à ribothymidine) présente dans le bras T. Pour rappel, l'hypoxanthine est une base azotée de nature purique (6-oxypurine). Son nucléoside associé est appelé inosine.



Elle provient de la réaction de déamination oxydative de l'adénine.

Question 11. Réponse e. Les ARN t possèdent à leur extrémité 5', une boucle avec une séquence de trois nucléotides (ou triplet) correspondant à l'anticodon du codon porté par l'ARN messager.

*Rappel: La tige supérieure, qui porte les extrémités 5' et 3' s'appelle le **bras accepteur** (Acceptor stem), car c'est lui qui porte (accepte) les acides aminés. La tige inférieure, terminée par la boucle de l'anticodon s'appelle **bras anticodon**, les deux autres tiges s'appellent **bras T** et **bras D**, car ils portent, respectivement des ribonucléotides modifiés, (autres que A, G, C et U) : la ribothymidine (T), pour le bras T et la dihydrouridine (D) pour le bras D.*



Question 12. Réponse b. Les eucaryotes présentent un ARN 18 S dans la petite sous-unité (40 S) des ribosomes. *Pour rappel: la petite sous-unité des ribosomes des eucaryotes n'est constituée que d'une molécule d'ARNr (18S, comportant 1 900 nucléotides) et de 33 protéines ribosomiques. Chez les procaryotes, la petite sous-unité (30 svedbergs) est constituée d'ARNr 16S (1 540 nucléotides) et de 21 protéines.*

Références

- Babinet C et Morello D. Animaux transgéniques : une voie nouvelle pour l'étude du développement. *Médecine/sciences*, 2: 253-259, 1986.
- Bouzahar K. production de protéines recombinantes , polycopie de cours , Univ . Ferhat Abbas , Setif .2017
- Desmond STN. An Introduction to Genetic Engineering, Third Edition, Cambridge University Press, ISBN: 978-0-511-39858-2 (eBook), 2008.
- Donald J. Johnaston (1999) : Biotechnologies, économie et environnement : Une union pleine de promesse. *Problèmes Économiques* n°2628, 25 août ,22-25.
- GROS F.,(1990) L'ingénierie du vivant, Odile Jacob,p 21-222.
Herouet C., *Evaluation de l'innocuité des plantes issues de l'agrobiotechnologie*, Toxinogénèse - biosynthèse, ingénierie, polymorphisme, neutralisation des toxines. Goudey-Perrière F., Bon C., Ménez A., Puiseux-Dao S, Eds. Elsevier SAS, 181-190, 2003.
- Houdebine LM. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 32: 107-121, 2009.
- Housset C et Raisonnier A. Biologie Moléculaire. Faculté de Médecine, Université Paris VI, 2006.
- INF'OGM (2007) comment détecter des plantes transgéniques aux champs www.infogm.org
- Jacqueline E. Biochimie génétique Biologie moléculaire, 6ème Édition. Masson, Paris. ISBN : 2-294-000420, 2000.
- [Jacques Testart](#), *À qui profitent les OGM ?*, CNRS éditions, 2013 (ISBN 978-2-271-07669-4).
- KAHN A. (1996) Les plantes transgénique : 10 ans d'expériences de la commission de Génie Bio moléculaire, John Libbey Eurotext, 1996, p121.
- Karine Housset(1999) ; Problèmes liés à L'information diffusée et au débat social autour des organismes génétiquement modifiés (OGM). Université René Descartes Paris V. DEA d'éthique médicale et biologique Domaine : Génétique et application.
- Malacinski GM and Freifelder D. Essentials of Molecular Biology, Third Edition. ISBN: 7-03-010312-2, 2002.
- Potocki-Veronese G. Produire une protéine recombinante, Principes et Méthodes de Biologie Moléculaire. Laboratoire Biotechnologie-Bioprocédés Toulouse, 2009.
- Robert FW. Molecular Biology, Second Edition, University of Kasnas, ISBN: 7-03-010549-4, 2002.
- Romanos M. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. *Current Opinion in Biotechnology*, 6:527-533, 1995.
- Romanos MA, Scorer CA and JJ. Clare. Foreign Gene Expression in Yeast: a Review. *Wiley, Yeast* 8: 423-488, 1992.
- Shuman S. , « DNA Ligases: Progress and Prospects », *J. Biol. Chem.*, vol. 284, 2009, p. 17365-17369 ([PMID 19329793](#), [DOI 10.1074/jbc.R900017200](#))

Sites web

<http://www.accessexcellence.org/AB/GG/plasmide.htm>
<http://biotech-btk.wifeo.com/proteine-heterologue.php>

<http://www.takween.com/techniques/proteomique.html>
<http://www.takween.com/gene-genie-genetique-cours.html>
<http://www.web-books.com/MoBio/Free/Chap9.htm>
http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/insectselfiz_man.pdf
http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/virapower_lentiviral_system_man.pdf
http://miller-lab.net/MillerLab/wp-content/uploads/pichia_system.pdf
https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/pich_man.pdf
<http://tools.thermofisher.com/downloads/PichiaBrochureP40.pdf>
<http://www.cours-pharmacie.com/biologie-moleculaire/transcription-de-ladn.html>
<http://genet.univ-tours.fr/angers/chap4-2.htm> consulté le 02/092021