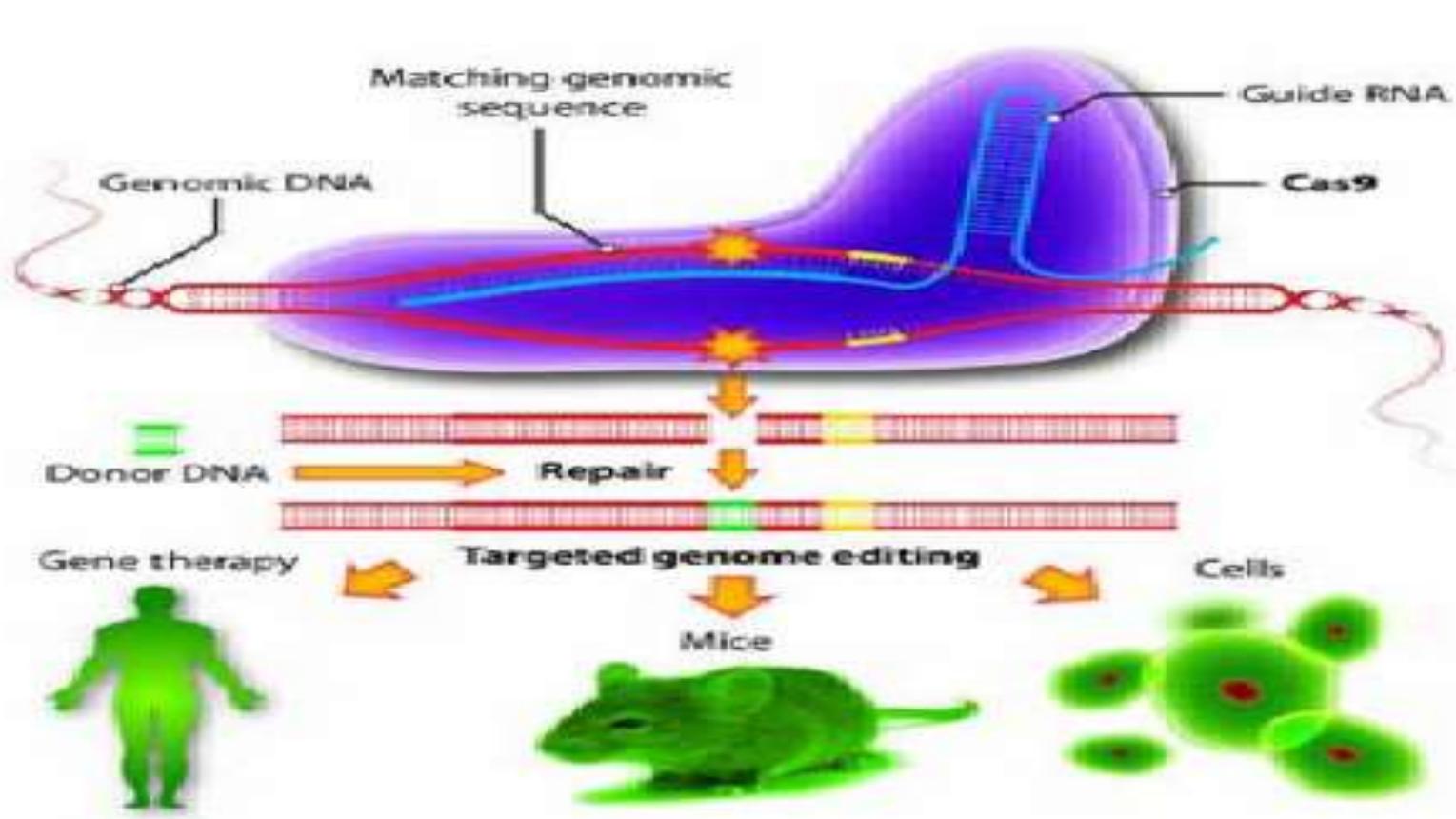


Chapitre 6: Génie génétique et Applications



INTRODUCTION

Techniques de l'ADN recombinant: **transfert de gènes d'un Organisme à un autre** 2 applications importantes:

- Production de protéines biologiquement utiles (protéines utilisées comme médicaments-Tab1-protéines utilisées en industrie-Tab2-)
- Crédit des Organismes (Végétales, Animaux ,microorganismes) ayant des caractéristiques modifiées

Tableau 1. Protéines recombinantes humaines utilisées comme médicaments

Protéine	Utilisée pour traiter
Antitrypsine $\alpha 1$	Emphysème
Calcitonine	Rachitisme
Gonadotrophine chorionique	Infertilité
Erythropoïétine	Anémie
Facteur VIII	Hémophilie
Insuline	Diabète
Interférons (α , β , γ)	Infections virales, cancer
Interleukines	Cancer
Activateur de plasminogène tissulaire	Caillots sanguins
Hormone de croissance	Retard de croissance

Tableau 2. Enzymes recombinants ayant des utilisations industrielles

Protéine	Usage industriel
Rénine	Fabrication de fromage
α -amylase	Fabrication de bière
Bromélaïne	Pour attendrir la viande, et clarifier les jus.
Catalase	Antioxydant en agro-alimentaire
Cellulase	Production de sucre et d'alcool
Lipase	Fabrication de fromage

1. Expression des protéines recombinantes:

- ❑ Nécessite l'utilisation de vecteurs spécialisés= **vecteurs d'expression** (séquences d'ADN signaux qui gouvernent la transcription et la traduction de la séquence par la cellule hôte)
- ❑ Les cellules hôtes (Bactérie, levure, cellule Végétale, cellule Animale)
- ❑ La technologie de l'ADN recombinant permet de produire des formes variantes de protéines naturelles. On parle du **génie de protéines**

1.2. Systèmes d'expression bactérien

- Les 1^{ers} systèmes d'expression de protéines → Bactérie comme cellule hôte.
- *E.coli* permet de produire des protéines rapidement et à faible cout.

Caractéristiques des systèmes bactériens

- ✓ Un promoteur en amont de la séquence clonée.

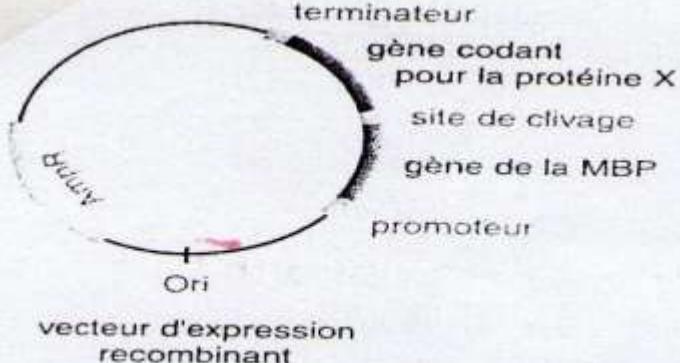
NB: sélection d'un promoteur qui se fixe fortement à l'ARN pol

- ✓ Un signal de terminaison de la transcription en aval de la séquence clonée

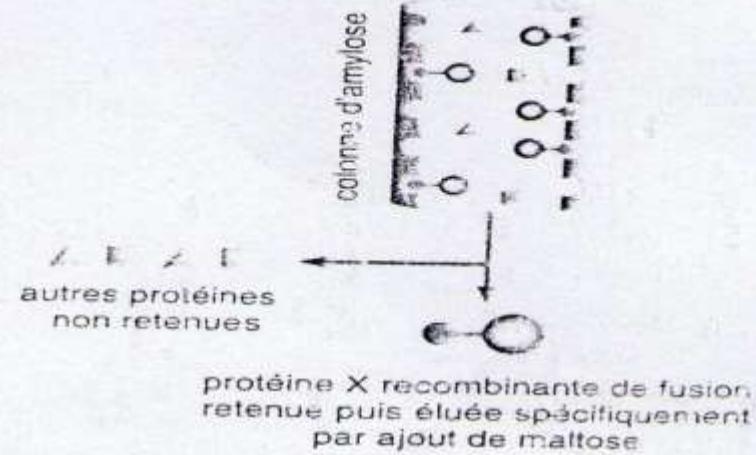
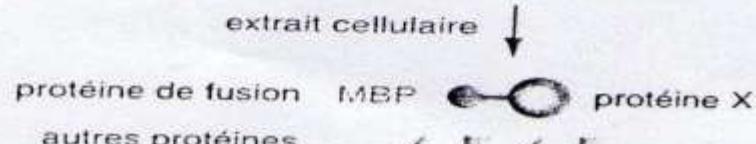
- ✓ Un site de fixation au ribosome en aval du startsite de la transcription

NB: la force de fixation au ribosome

- ✓ La séquence d'ADN clonée doit avoir un codon d'initiation AUG au début et un codon de terminaison à la fin=**ORF**



1. transformation d'*E. coli*
2. sélection sur milieu + ampicilline
3. culture en masse des bactéries sélectionnées



clivage spécifique



colonne d'affinité

protéine X purifiée

Proteines recombinantes

Systèmes d'expression eucaryotes

- Bien que de nombreuses protéines eucaryotes puissent être exprimés avec succès dans des systèmes bactériens → certaines protéines exprimées sont instables ou biologiquement inactives
- Des systèmes d'expression eucaryotes ont été développés → produire des versions de protéines ressemblant d'avantage à la forme native

Production de protéines recombinantes

a) Protocole : contraintes et solutions

- Expression des protéines dans des bactéries *E. coli* dépourvues de protéases (préservation de la protéine produite)
- Les cellules sont cultivées en grandes quantités (dans des fermentateurs pour la production de protéines à l'échelle industrielle)
- **Problème : avec un fort taux de croissance et une synthèse très importante des protéines recombinantes, les cellules meurent rapidement, ce qui limite alors l'expression des protéines recombinantes**
- Pour résoudre ce problème : découplage entre une **phase de croissance** (multiplication des bactéries, et donc amplification du gène de la protéine d'intérêt) et une **phase d'expression** (transcription du gène qui conduira à la synthèse de la protéine)

Production de protéines recombinantes

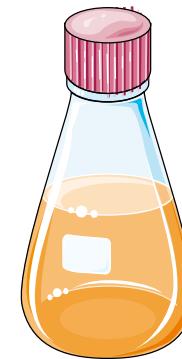
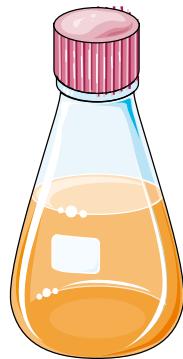
a) Protocole : contraintes et solutions

- Une cellule hôte procaryote présente certaines contraintes :
 - nécessité d'un **promoteur procaryote** pour que la bactérie puisse transcrire le gène d'intérêt (il faut donc travailler avec un vecteur adéquat)
 - la bactérie ne fait **pas d'épissage**. Ce problème est évité par une construction à partir d'un ADNc (comme il est obtenu à partir d'un ARNm mature, il est dépourvu d'introns)
- **Cependant, culture facile et croissance rapide des bactéries** (contrairement aux cellules eucaryotes comme levures et ovules)

Production de protéines recombinantes

a) Protocole

0) Transformation de bactéries compétentes par le plasmide d'intérêt, culture à partir des colonies obtenues



1) Culture des bactéries dans du milieu nutritif + antibiotique nécessaire à la sélection => à 37°C, jusqu'à une densité optique de 0,6 environ (cela correspond à la phase exponentielle, les bactéries sont en pleine croissance)

2) Induction de l'expression des protéines par activation de la transcription du gène de la protéine



3) Récupération des protéines

Production de protéines recombinantes

b) Contrôle transcriptionnel

La transcription du gène codant pour la protéine d'intérêt est contrôlée à l'aide de **promoteurs inductibles** :

- Promoteurs thermosensibles (changement de l'expression suivant la température)
- Promoteur de l'opéron lactose

Production de protéines recombinantes

c) Extraction des protéines

Les protéines sont dans le cytoplasme des bactéries, qui ont aussi une paroi.

Il est donc nécessaire de lyser les bactéries pour récupérer les protéines.

Etape de **sonication** (destruction mécanique par des ultrasons) et ajout d'un **détergent** (lyse chimique)

Production de protéines recombinantes

d) Vérification de l'expression des protéines : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS

Prélèvement d'un échantillon
de l'extrait bactérien,
supposé contenir nos
protéines

↓
Electrophorèse sur gel
de polyacrylamide
dénaturant

Le gel de polyacrylamide est une matrice inerte formant beaucoup de liaisons croisées à travers lesquelles migrent les protéines. Il joue le rôle d'un **tamis moléculaire**. La taille des pores peut être ajustée suivant la taille des protéines que l'on souhaite visualiser.

Production de protéines recombinantes

d) Vérification de l'expression des protéines : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS

Prélèvement d'un échantillon de l'extrait bactérien, supposé contenir nos protéines



Dénaturation des protéines par mélange avec du tampon de charge, et chauffage 5min à 95°C



Electrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant

Le tampon de charge (Laemmli) contient notamment :

- du **glycérol** qui augmente la densité de l'échantillon et facilite son dépôt dans les puits du gel
 - un **colorant**, qui facilite le suivi de la migration des échantillons sur gel
- ET SURTOUT :
- des **agents réducteurs** : *destruction des ponts disulfures* des protéines,
 - un **déturgent anionique SDS (sodium dodécylsulfate)** : *fixation sur les régions hydrophobes de la protéine, cela provoque alors son dépliement => la protéine est soluble dans la solution de détergent*

1) Production de protéines recombinantes

d) Vérification de l'expression des protéines : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS

Prélèvement d'un échantillon
de l'extrait bactérien, supposé contenir nos
protéines



Dénaturation des protéines



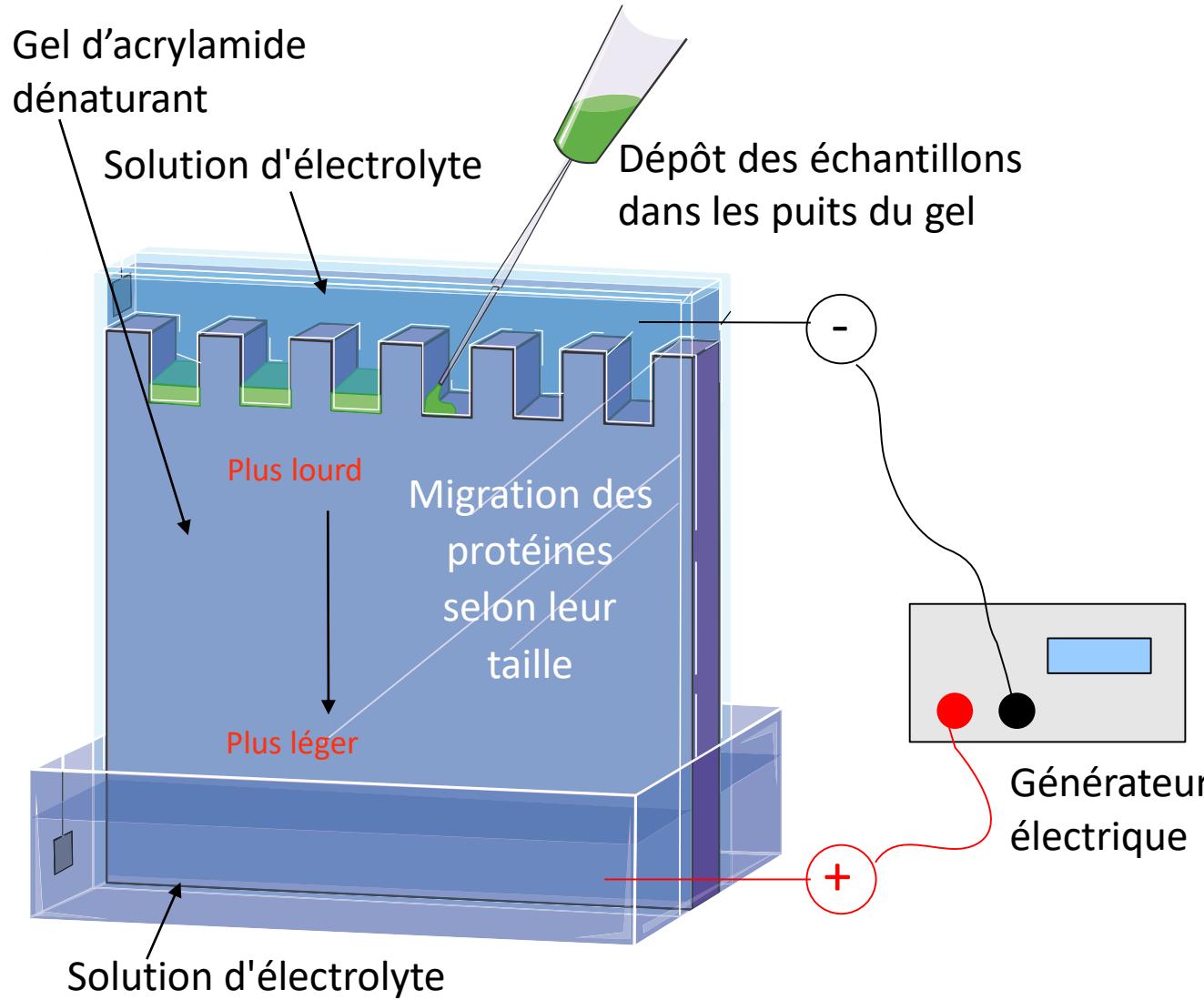
Electrophorèse sur gel de
polyacrylamide dénaturant

La charge intrinsèque de la protéine est masquée par les charges négatives du SDS. Les protéines vont donc migrer vers le pôle positif lors de l'application d'une tension. Les grandes protéines, quoi que plus chargées négativement migrent moins loin car elles sont davantage retenues par le maillage du gel. **Les protéines sont alors fractionnées selon leur masse moléculaire.**

Rq : Cette méthode est très puissante : elle permet d'analyser des protéines insolubles dans l'eau, protéines membranaires, protéines de gros agrégats... Elle apporte des informations sur la composition des sous-unités d'un complexe protéique.

1) Production de protéines recombinantes

d) Vérification de l'expression des protéines : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS



Electrophorèse en conditions dénaturantes (destruction des structures tertiaires et quaternaires), migration des protéines **inversement proportionnelle à leur masse**

1) Production de protéines recombinantes

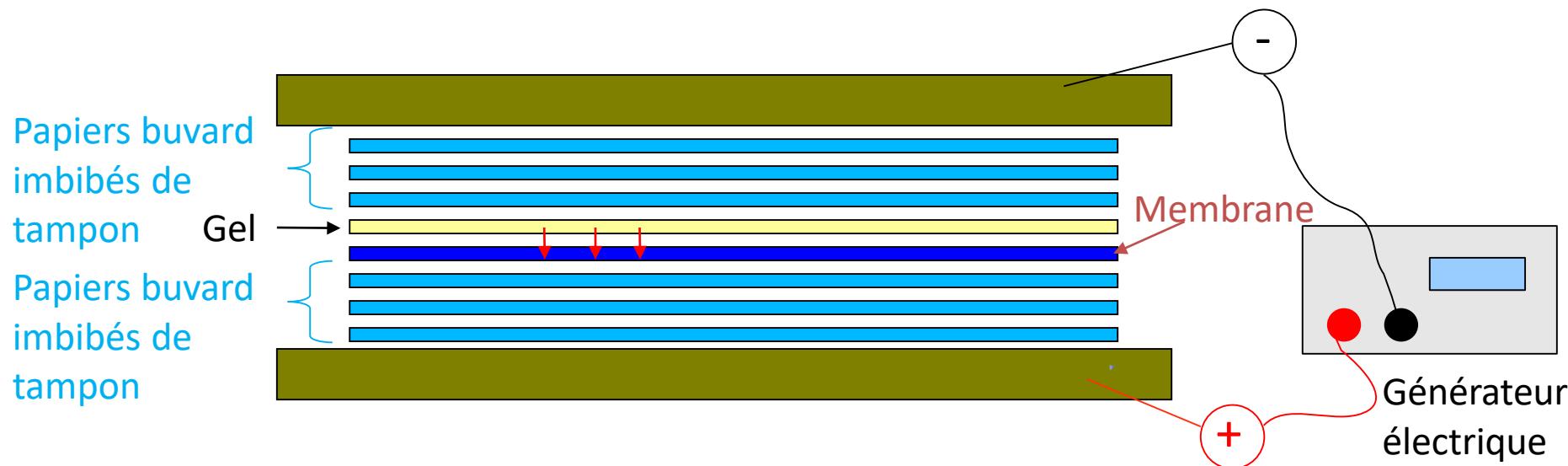
d) Vérification de l'expression des protéines : Coloration ou transfert sur membrane

- Toutes les protéines fortement exprimées peuvent être détectées par leur **coloration dans le gel** (au bleu de Coomassie ou avec du nitrate d'argent pour des protéines moins concentrées). C'est une **détection globale** de toutes les protéines fortement exprimées.
- Des protéines en plus faibles quantités peuvent être détectées par **Western Blot** après **transfert sur membrane** (ex : membrane de nitrocellulose). Cette détection est **spécifique**.

1) Production de protéines recombinantes

d) Vérification de l'expression des protéines : Transfert sur membrane

Principe du transfert sur membrane :



Les protéines se déplacent selon le champ électrique, elles passent du gel à la membrane.
Le transfert se déroule pendant une à 2 heures.

Le même principe est utilisé pour le transfert des acides nucléiques (qui peuvent aussi être transférés en une nuit par capillarité, en absence de champ électrique)

1) Production de protéines recombinantes

d) Vérification de l'expression des protéines : Détection des protéines par Western blot

Détection des protéines sur la membrane par **WESTERN BLOT** : reconnaissance spécifique de la protéine qui nous intéresse à l'aide d'un *anticorps dirigé contre cette protéine*.

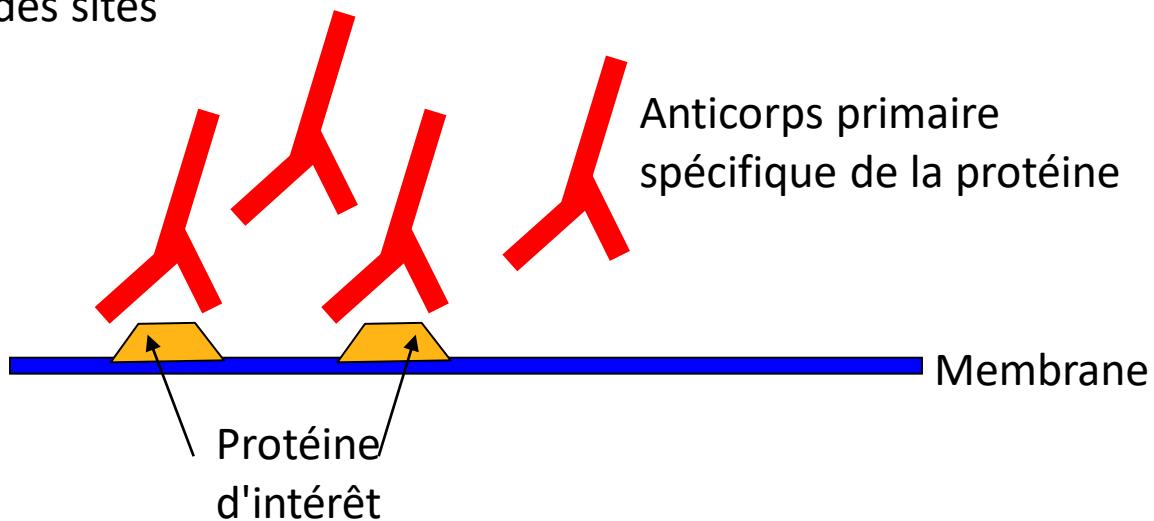
1) Saturation des sites non spécifiques

par incubation avec du lait (les protéines du lait vont se fixer sur la membrane, ce qui limite la liaison des anticorps sur des sites non spécifiques)



2) Incubation avec l'anticorps primaire spécifique de la protéine :

Reconnaissance de la protéine par l'anticorps



1) Production de protéines recombinantes

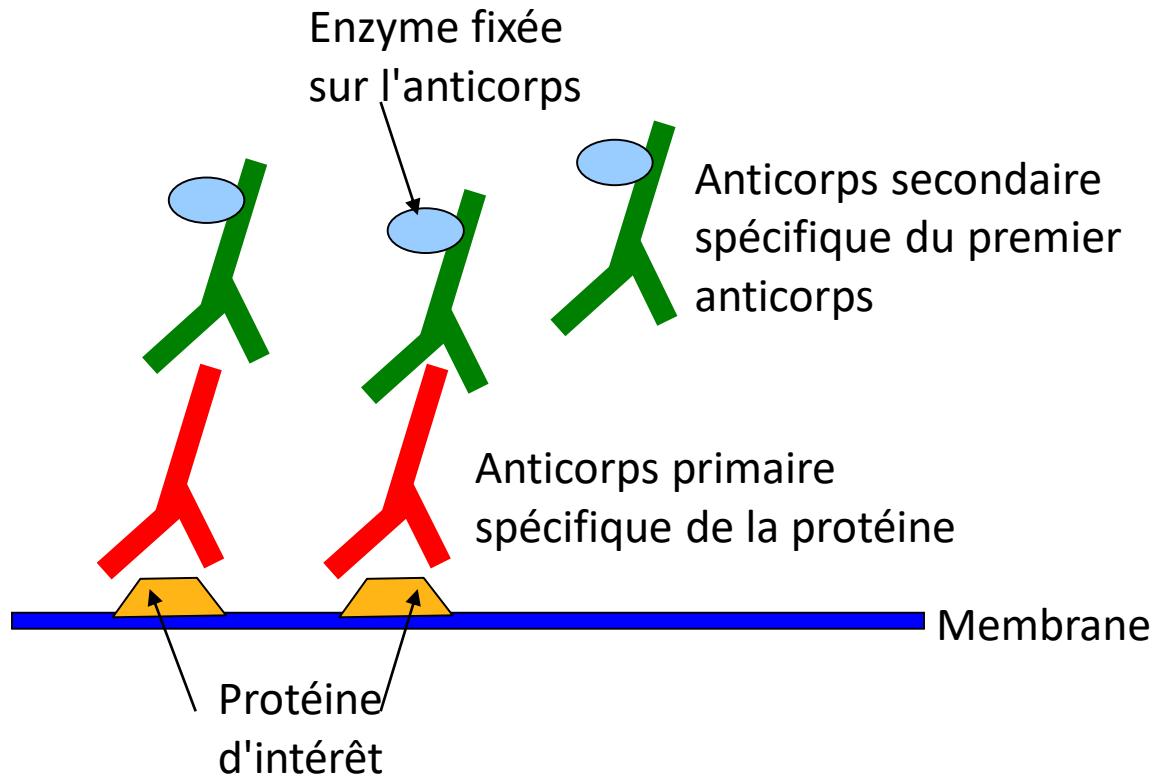
d) Vérification de l'expression des protéines :

Détection des protéines par Western blot

3) **Lavages** de la membrane (les anticorps non fixés sont éliminés)



4) Incubation avec
l'anticorps secondaire, qui
reconnaît l'anticorps
primaire. Une enzyme est
fixée sur l'anticorps
secondaire



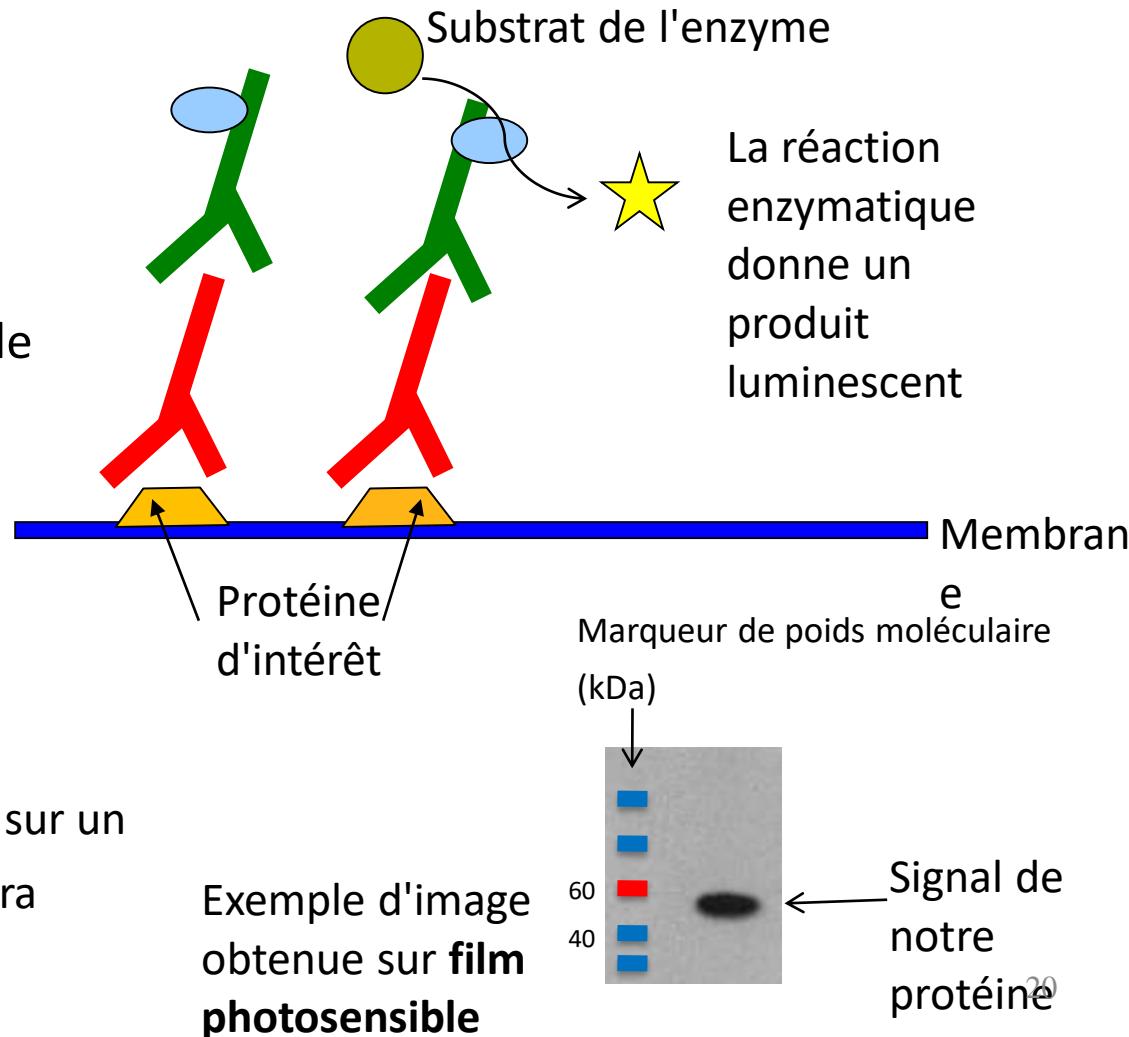
1) Production de protéines recombinantes

d) Vérification de l'expression des protéines : Détection des protéines par Western blot

5) Lavages de la membrane (les anticorps non fixés sont éliminés)

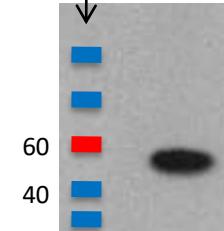


6) Révélation du Western Blot : le substrat de l'enzyme est ajouté. La réaction enzymatique transforme ce substrat en un **produit luminescent**



La lumière émise peut être détectée sur un film photosensible, ou par une caméra

Exemple d'image obtenue sur **film photosensible**



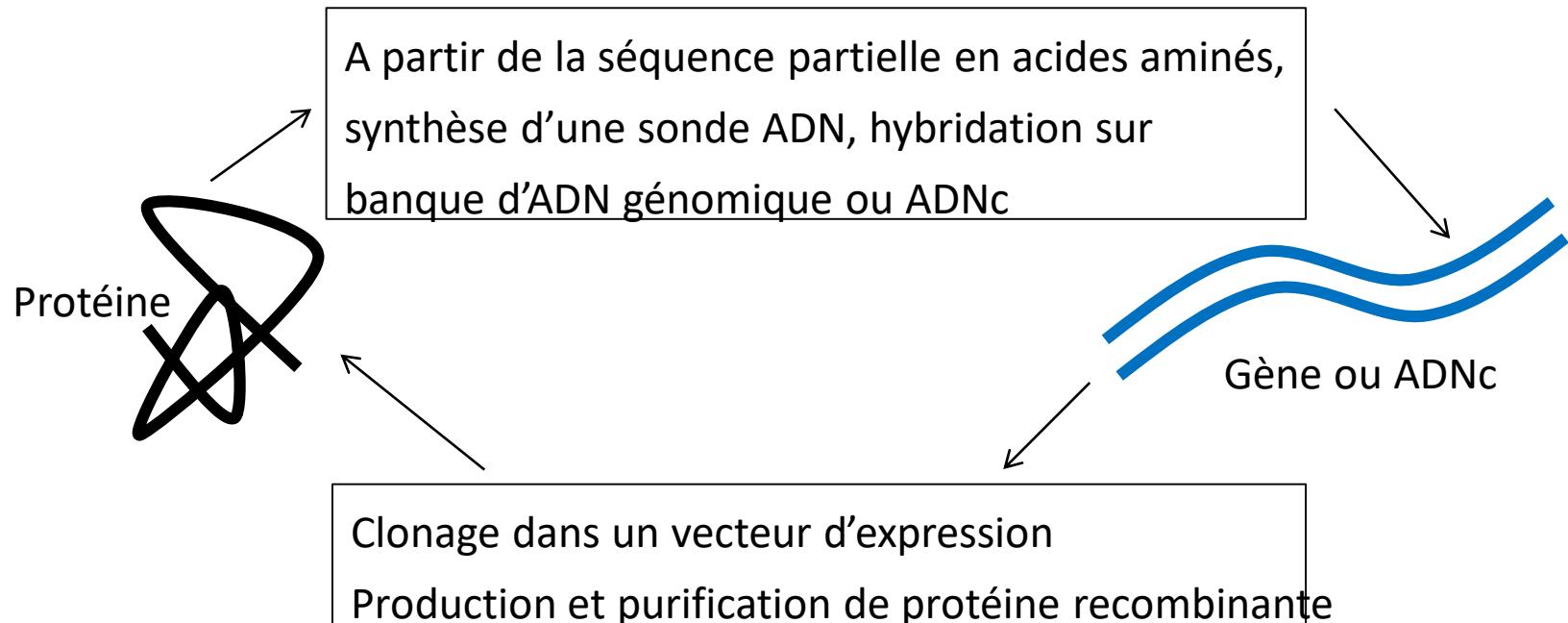
Signal de notre protéine

Utilisation de l'ADN recombinant

Les protéines recombinantes sont exprimées en grandes quantités, mais sont mélangées avec les protéines bactériennes. Il est donc nécessaire de purifier la protéine d'intérêt.

2) Purification des protéines

Utilisation de l'ADN recombinant : Conclusion



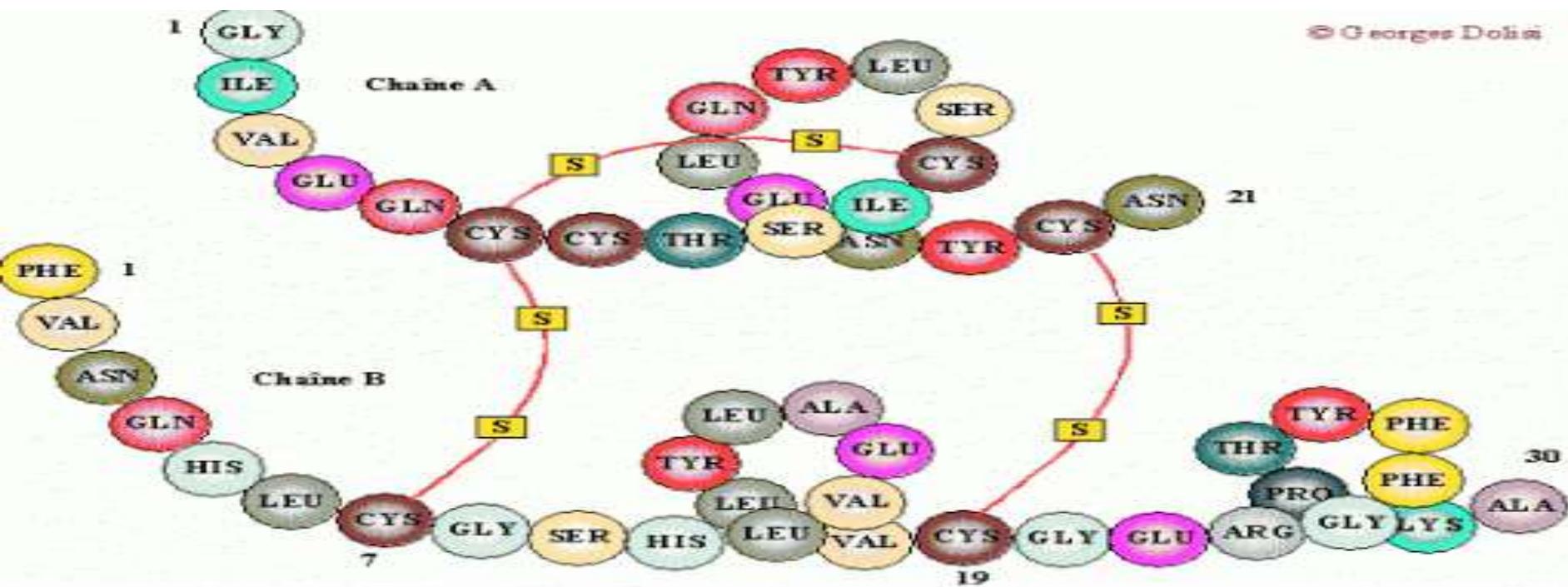
2. Exemples de synthèses de protéines médicaments

ex 1: l'insuline

Insuline = 1^{ère} protéine obtenue par les techniques du GG avoir été commercialisé (1982)

=hormone synthétisée par le pancréas, et qui fait défaut dans certains types de diabète.

Rappel de la formule des insulines animales



Les insulines bovines et porcines ont une formule voisine de l'insuline , ils peuvent être utilisés comme médicaments par extraction du pancréas du bœuf ou le porc et purification.

➤ **Obtention de l'insuline humaine**

Pour certains traitements on ne peut utiliser une insuline d'origine animale. La synthèse chimique de l'insuline humaine serait trop onéreuse.

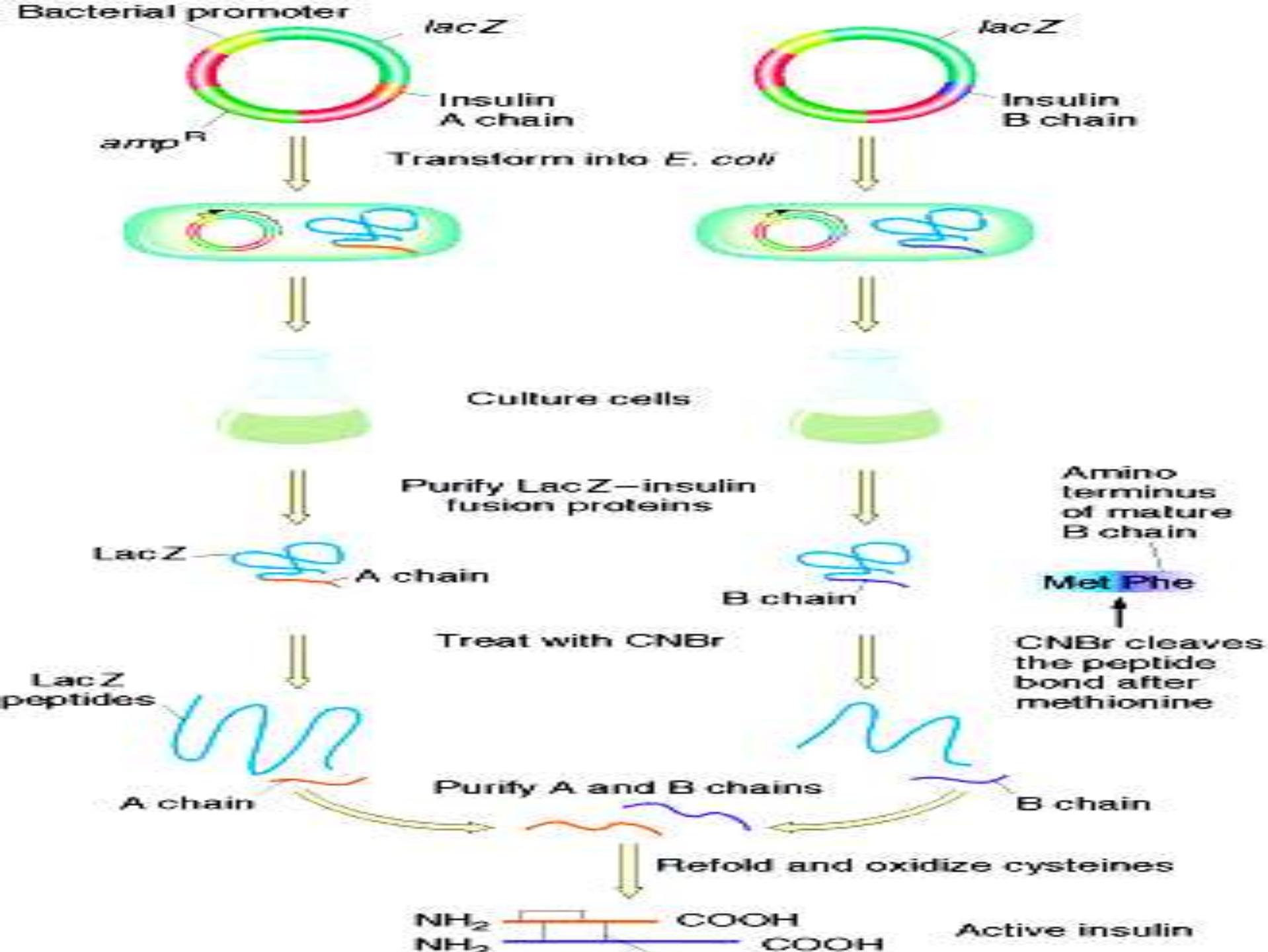
Actuellement, 2 procédés —> insuline humaine

✓ Insuline semi synthétique: « insuline humanisée »; substitution de l'**ala** porcine (COOH) de la chaîne **B** par la **thr** (**Transpeptidation**).

✓ Insuline humaine par les **techniques du GG**

Protocole:

- Synthèse par voie chimique d'un gène qui comprend: **un promoteur + le gène bactérien codant la Trp synthétase + codon Met+ gène de la proinsuline humaine.**
- La protéine chimérique « **Trp synthétase – Met Proinsuline** » sera extraite puis coupée en aval de la Met par le bromure du cyanogène
- Clivage enzymatique pour libérer l'insuline.



Ex 2: VACCINS les vaccins recombinants vivants

- ✓ Une nouvelle forme de vaccin
- ✓ Le gène codant la/s unité(s) antigénique(s) est inséré dans le virus de la vaccine
- ✓ Ce virus (porteur du gène) est injecté au sujet
- ✓ Production, *in vivo*, de la protéine antigénique recherchée

NB/l'ADN du virus de la vaccine est très long (190kb)

→ partie indispensable à la réplication est remplacée par l'ADN étranger

➤ Cette stratégie pose encore des problèmes chez l'homme (risques d'infections dues au virus Ex: encéphalites surtout chez les immunodéprimés)

PERSPECTIVES D'AVENIR

- ✓ Au début: préparer des médicaments de structure identique a celles protéines naturelles
 - ✓ Actuellement: recherche de produits ayant des propriétés biologiques améliorées (meilleure spécificité d'action,...)
 - ✓ Les médicaments produits par GG n'ont pas tous un prix de revient inférieur ou équivalent au médicament préparé par extraction
- diminution du prix de revient

3. GENIE GENETIQUE DES PLANTES

- GG → méthode directe pour produire des plantes modifiées
- Plantes → particulièrement adaptées à des modifications (totipotentes?)
- ++ systèmes de transfert des gènes aux plantes

Ex à succès: plasmide Ti

3.1.Caractéristiques conférées aux plantes par GG:

Resistance aux attaques des insectes:

Fabriquer par GG des plantes ayant une activité insecticide Ex: expression par GG de protéines inhibitrices de protéases?

Resistance à l'infection virale:

Transférer un gène codant une protéine capsidale virale

Resistance aux herbicides:

10% de la production totale est perdue par les mauvaises herbes → Utilisation des herbicides

Les herbicides sont couteux, potentiellement toxiques pour l'environnement, et peuvent tuer aussi bien des cultures que des mauvaises herbes.

Transfert des gènes pour conférer une résistance aux herbicides des plantes → **destruction sélective des graines**

Le glyphosate :herbicide très utilisé (inhibe une enzyme impliquée dans la synthèse d'acide aminés aromatiques par la plantes)

Resistance au glyphosate par transfert d'une forme bactérienne de l'enzyme qui n'est pas affecté par herbicide

4. LES ANIMAUX TRANSGENIQUES

➤ Sélection génétique sur les population d'élevage → très utilisé → Animaux ayant des caractéristiques intéressantes

Ex:

- ✓ Haut rendement en lait
- ✓ Vitesse de croissance importante...

→ l'élevage sélectif est très efficace, mais il est difficile d'introduire de nouvelles caractéristiques sans modifier les traits existants

→ Introduire directement des caractères souhaités chez les Animaux par transfert de gènes

L' Animal génétiquement modifié = Animal transgénique

Le gène transféré= transgène

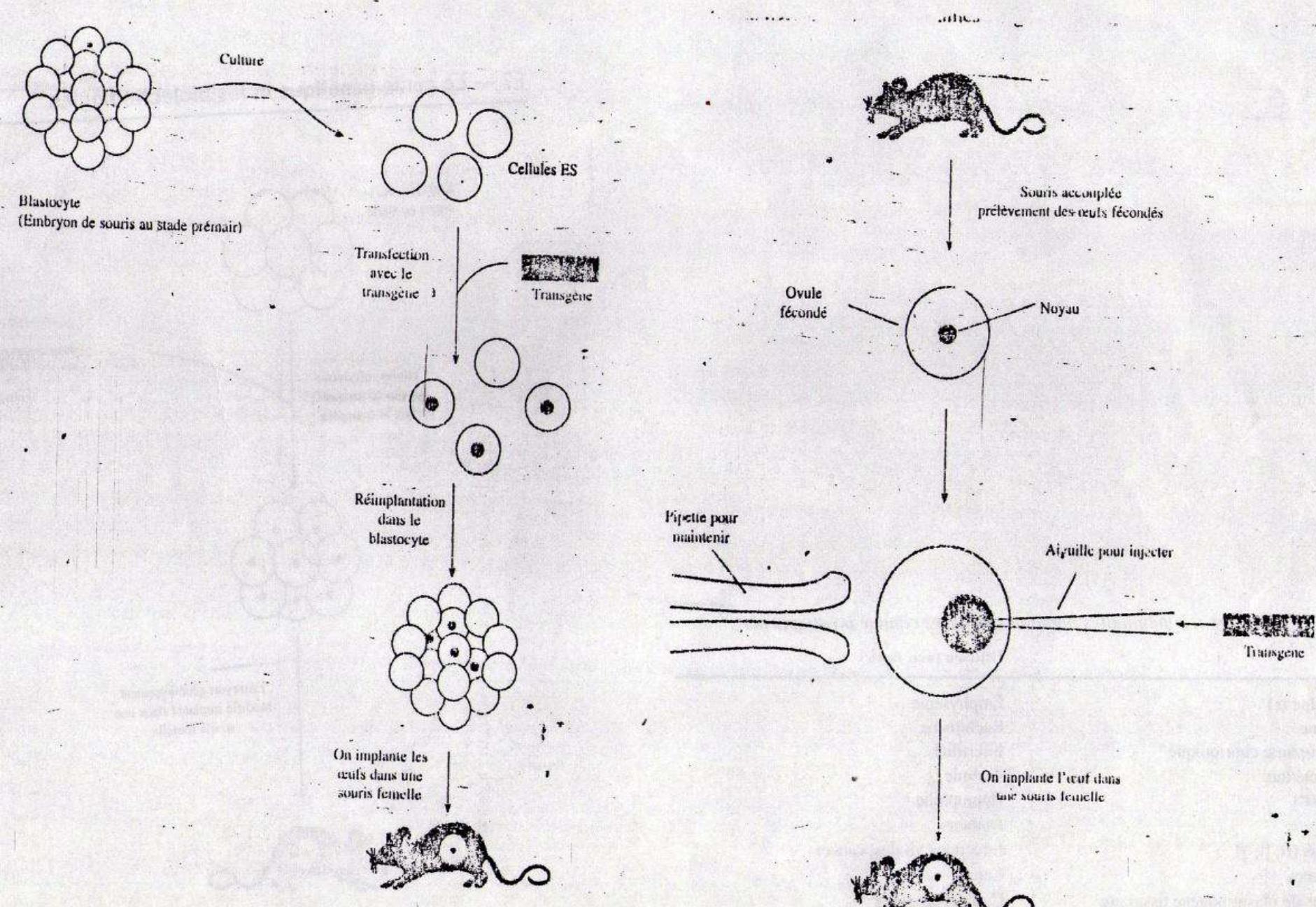
Les transgènes peuvent être introduit dans les Animaux suivant 3 méthodes

Chacune implique un transfert de gène dans

- Un ovule fécondé
- Des cellules à un stade embryonnaire précoce

Les embryons modifiés → implantés dans l'utérus de l'Animal

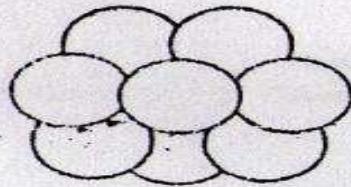
- Se développent en descendance
- Vecteurs retroviraux
- Microinjection
- Cellule souches embryonnaires: ES :embryonic stem



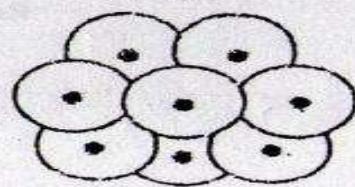
de gène utilisant des cellules ES.

Fig. 3 Transfert de gène par micro-injection.

Embryon de souris au stade huit cellules



Cellules infectées par des rétrovirus portant le transgène



Vecteur



Transgène

Embryon génétiquement modifié implanter dans une souris femelle

Mère



Descendance portant le transgène



Fig. 2. Transfert de gène à l'aide d'un vecteur rétroviral.

Les principales applications des Animaux transgéniques:

- **Etudier la fraction des gènes**
- **Systèmes modèles pour les maladies humaines:**
 1. Suivre l'apparition et la progression de maladies
 2. Systèmes pour tester les nouveaux médicaments