

Chapitre 3 : Principes et techniques du génie génétique et ses applications.

Introduction :

Pour répondre aux besoins de l'humanité après l'explosion démographique, les spécialistes vont modifier les plantes et les animaux pour augmenter leur productivité. Cette modification est assurée par le génie génétique.

- Quels sont les principes et les techniques du génie génétique ?
- Quels sont les domaines d'application du génie génétique ?

I- Notion de la modification génétique :

1- Transmission des gènes de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* aux cellules végétales.

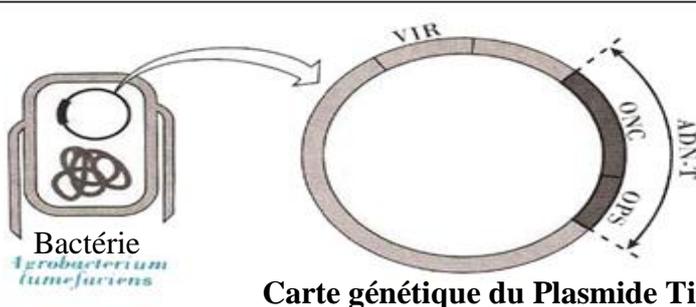
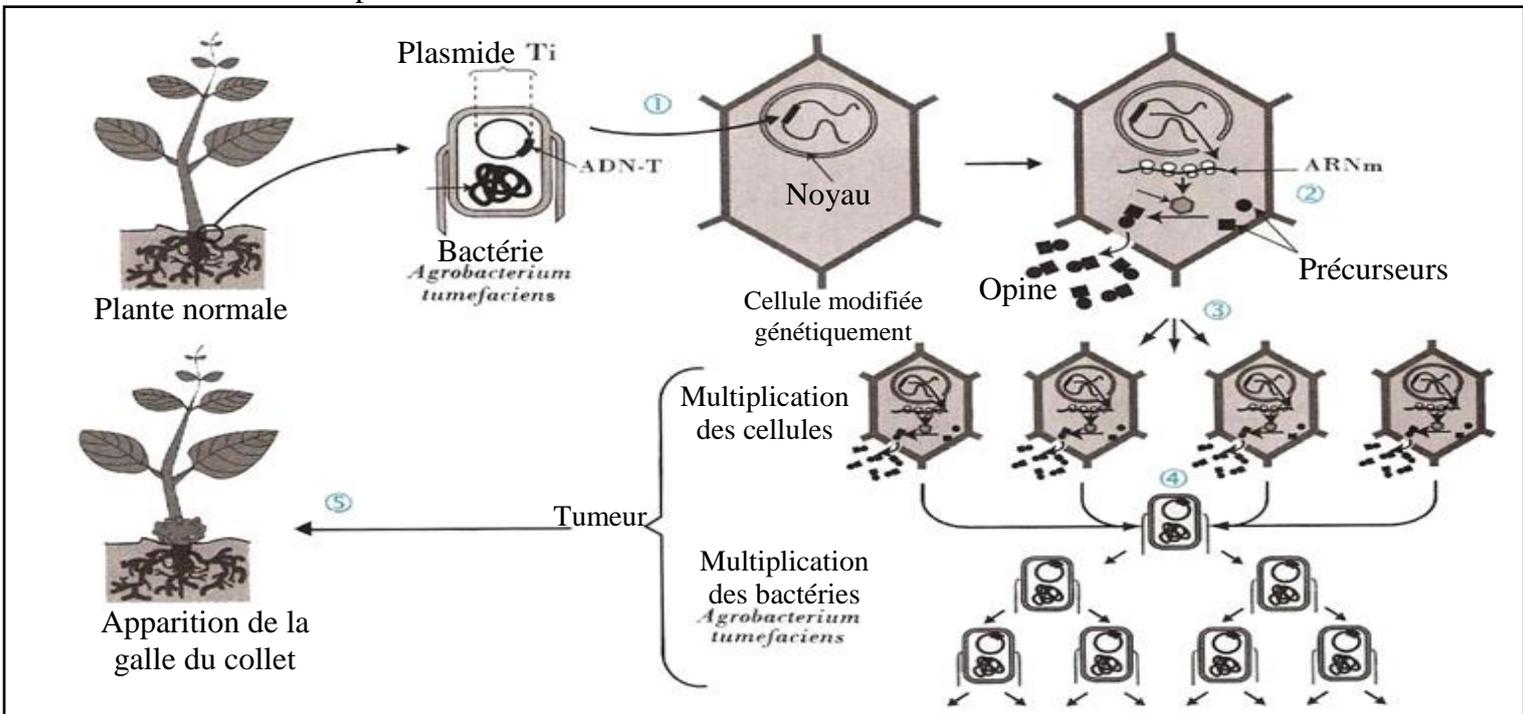
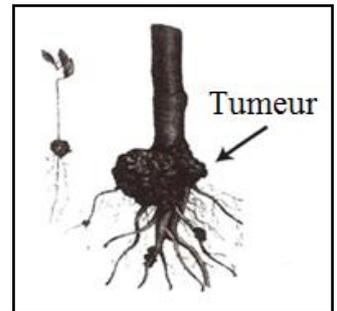
Activité 1 :

La maladie de galle du collet est une maladie qui touche quelques plantes, surtout pendant l'hiver, on constate l'apparition d'une tumeur au niveau du collet (zone entre la racine et la tige) suite à une multiplication rapide et aléatoire de quelques cellules végétales à cause des bactéries *Agrobacterium tumefaciens* (AT), ces bactéries entrent dans les fissures puis elles injectent une partie de sa matière héréditaire sous forme d'un plasmide Ti qui contient des gènes ADNT responsable sur la multiplication rapide et aléatoire.

Pour savoir le mécanisme de fonctionnement de cette bactérie, on prépare les expériences suivantes :

Expérience 1 : (en 1907) isolement d'une bactérie *Agrobacterium tumefaciens* AT d'une tumeur, l'observation microscopique montre l'existence d'un chromosome principal filamenteux et un autre sous forme d'un anneau qui s'appel « Plasmide », l'introduction de cette bactérie dans un tissu d'une plante normale induit l'apparition d'une tumeur.

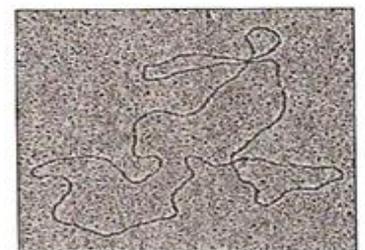
Expérience 2 : (en 1942) isolement d'une lignée de la bactérie E.coli sensible à la chaleur, puis elles sont cultivées dans milieu dont la température de 37°C, le plasmide est disparu, la culture de cette bactérie modifiée à côté des plantes normales ne forme aucune tumeur.



VIR : Fonction de virulence responsable de la transmission de l'ADNT

ONC : Fonction responsable de la multiplication cellulaire

OPS : Fonction de la synthèse des opines



Observation d'un Plasmide Ti

Etape 2 : Extraction du transporteur.

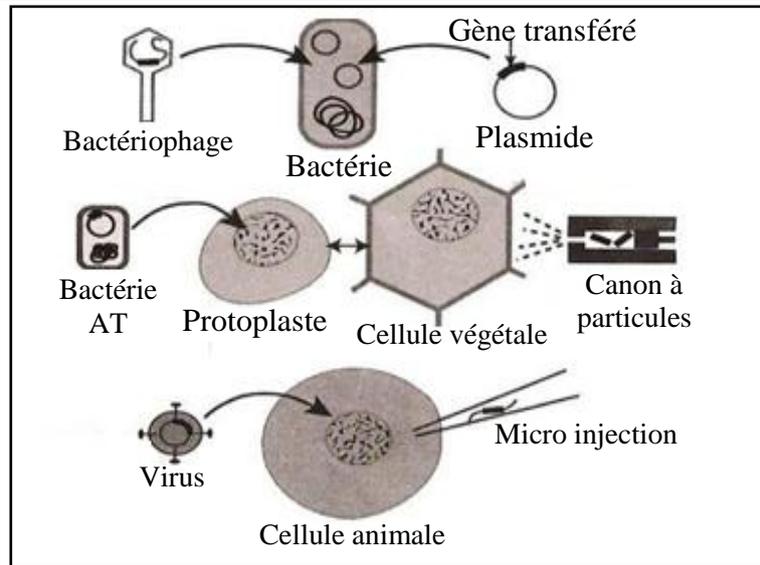
Le gène demandé est déplacé aux cellules hôtes pour s'exprimer, le transfert se fait par plusieurs moyens :

- Transporteurs biologiques : virus et plasmides.
- Transporteurs mécaniques : canon à particules ou l'injection microscopique...

Les recherches en génie génétiques se basent sur les bactéries comme cellules hôtes pour les raisons suivantes :

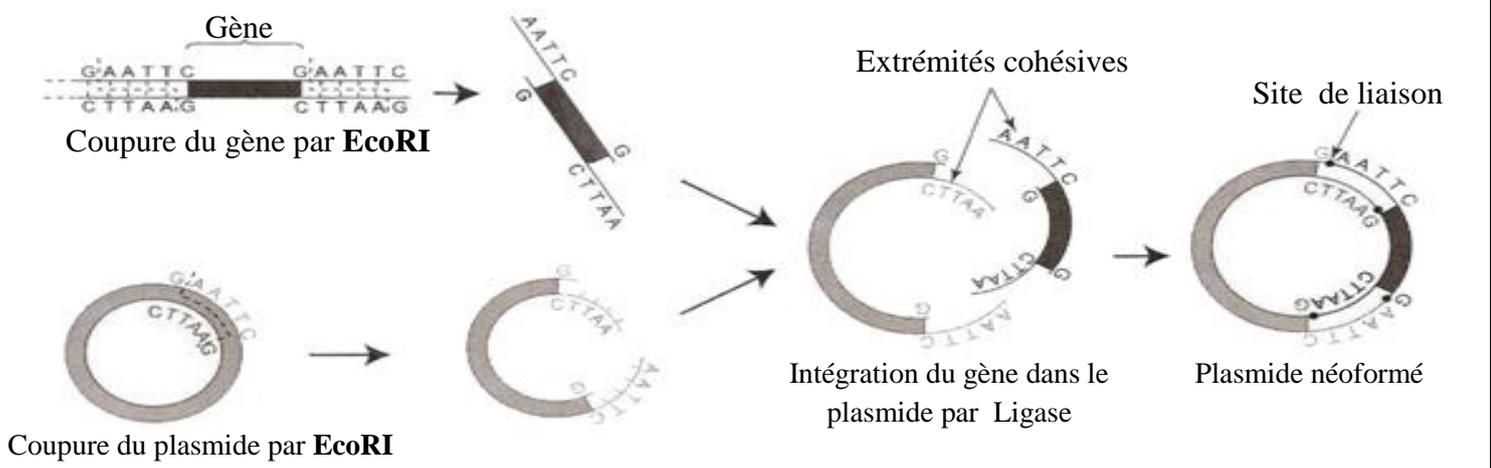
- Sa culture facile.
- Sa multiplication rapide
- Contient des plasmides capables de se déplacer facilement d'une cellule à l'autre.

La figure à côté montre quelques moyens utilisés pour transférer les gènes chez les organismes.



Etape 3: Intégration du plasmide hybride (synthétisé) dans la bactérie (modification bactérienne).

Intégration du gène isolé dans le plasmide à l'aide de l'enzyme Ligase enlevée généralement des bactéries.



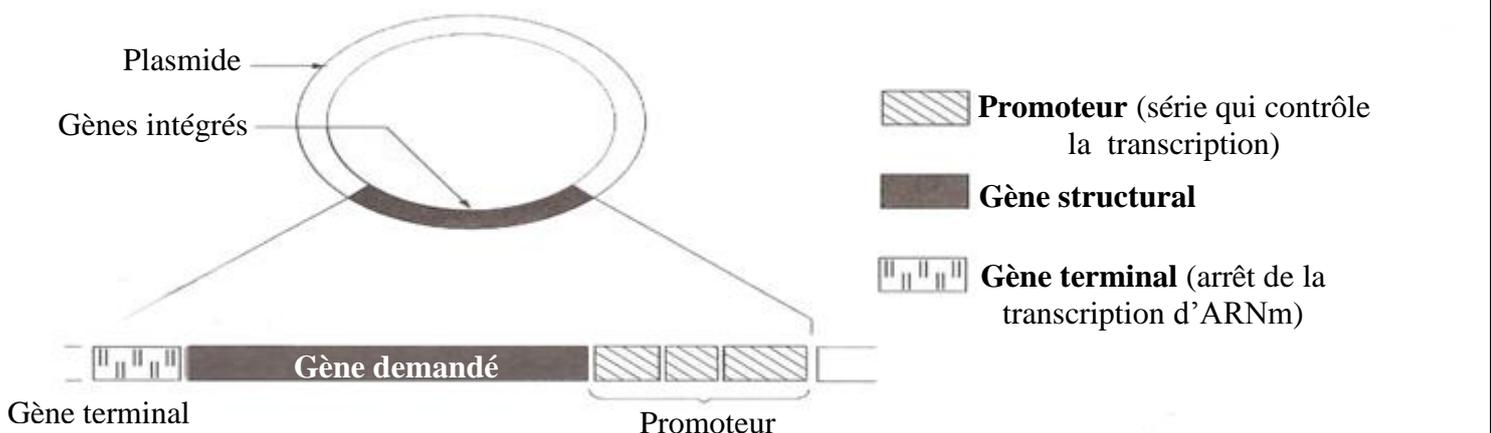
Question : décris le mécanisme d'intégration d'un gène isolé au niveau du plasmide transporteur.

Réponse :

Remarque : l'expression du gène transféré à une bactérie, demande un ensemble des gènes intégrés avec le gène demandé dans le plasmide, cet ensemble s'appel unité héréditaire fonctionnel ou **OPERON**.

Pour provoquer le gène structural à s'exprimer dans la cellule hôte, il faut le préparer en ajoutant des gènes à côté du gène structural.

Il faut ajouter aussi la **série du signal** pour la sécrétion de la protéine à l'extérieur de la cellule.



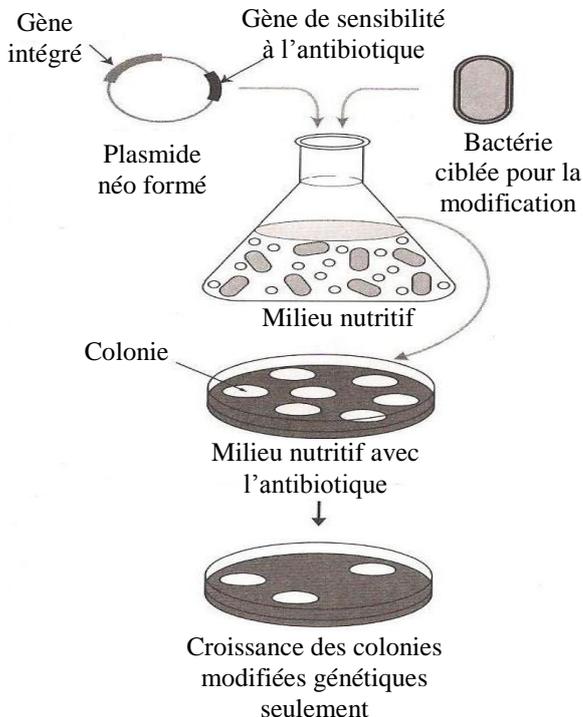
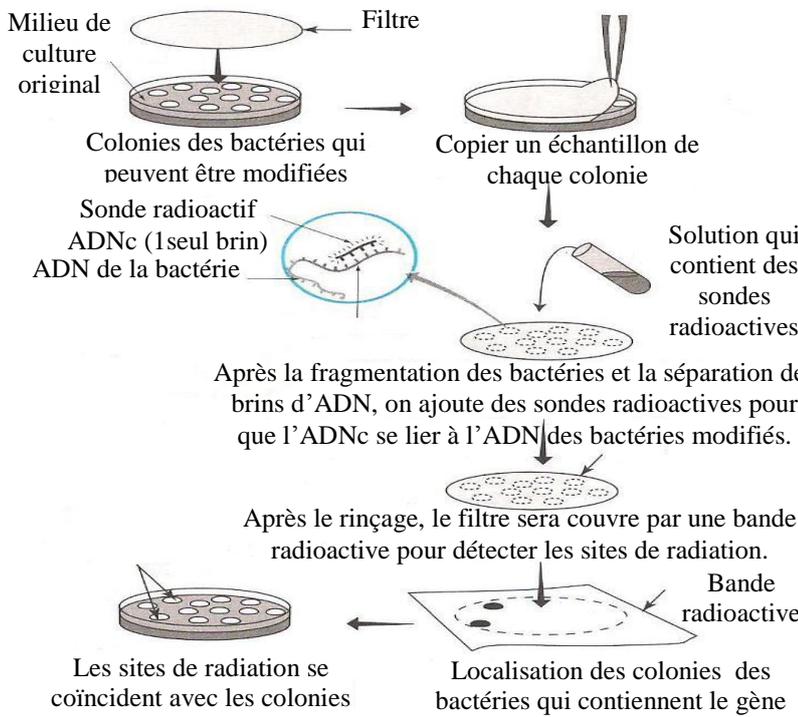
Etape 4: Amplification du gène :

Les bactéries hôtes ont connu plusieurs mitoses pour obtenir des colonies des bactéries.

Etape 5: Détection des bactéries modifiées génétiquement :

En cultivant les bactéries dans un milieu qui contient la streptomycine, c'est-à-dire que seulement les bactéries qui contiennent le plasmide modifié génétiquement qui peuvent se développer.

Pour amplifier le gène, on doit réintégrer le plasmide dans une cellule hôte puis cultiver cette dernière pour se multiplier et former des colonies, et par suite on va détecter les colonies modifiées. Pour cette raison on va utiliser l'une de ces deux techniques :

Technique 1 : la sensibilité à un antibiotique	Technique 2 : les sondes radioactives
<p>Pour détecter et sélectionner les bactéries qui intègrent les nouveaux plasmides, on peut se baser sur le caractère de la sensibilité à un antibiotique, en ajoutant ce dernier au milieu de culture.</p>  <p>Gène intégré Plasmide néo formé Gène de sensibilité à l'antibiotique Bactérie ciblée pour la modification Milieu nutritif Colonie Milieu nutritif avec l'antibiotique Croissance des colonies modifiées génétiques seulement</p>	<p>on peut détecter l'ADN au niveau de la bactérie à l'aide des sondes radioactives (ce sont des nucléotides radioactives complémentaires aux nucléotides du gène) puis on va suivre sa localisation par autoradiographie selon les étapes suivantes :</p>  <p>Milieu de culture original Filtre Colonies des bactéries qui peuvent être modifiées Copier un échantillon de chaque colonie Sonde radioactif ADNc (1 seul brin) ADN de la bactérie Solution qui contient des sondes radioactives Après la fragmentation des bactéries et la séparation des brins d'ADN, on ajoute des sondes radioactives pour que l'ADNc se lie à l'ADN des bactéries modifiés. Après le rinçage, le filtre sera couvrir par une bande radioactive pour détecter les sites de radiation. Bande radioactive Localisation des colonies des bactéries qui contiennent le gène demandé. Les sites de radiation se coïncident avec les colonies génétiquement modifiés.</p>

Etape 6: Exploitation du gène modifié :

Après la détection des bactéries qui contiennent le gène demandé (précédemment repérée). On va les cultiver dans des fermenteurs (grands bassins où on peut régler la température, les nutriments, l'oxygène...).

Conclusion :

Résume les techniques de génie génétique sous forme d'un schéma :

Techniques de génie génétique	Isolement du gène demandé	Isolement à l'aide des enzymes de restriction ou la transcriptase reverse.
	Intégration du gène isolé d'une cellule hôte	Intégration du gène par un plasmide ou virus ou transporteurs mécaniques.
	Amplification et bactéries puis détecter les bactéries modifiés	Culture des bactéries dans un milieu convenable, puis détecter celles qui intègrent le gène.
	Culture des bactéries contenant le gène puis extraction de la protéine	Après l'isolement des bactéries modifiées génétiquement on les induit pour s'exprimer et synthétiser la protéine demandée.

