

U.N.V Mostfa Benboulaid Batna2
Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de Biochimie et de
Microbiologie

Module : Techniques de Biologie
Moléculaire
Licence Biochimie appliquée

Chapitre VI :

Analyse et manipulation d'un gène

Enseignant : Dr DEKKICHE. S

Chapitre VI :

Analyse et manipulation d'un gène

Plan du cour

I- Analyse et caractérisation d'un gène

- 1- Notions de gène et allèles**
- 2- Gènes et Anomalies génétiques**
- 3- Types d'analyse d'un gène**
- 4-Exploitation d'un gène caractérisé**

II- Manipulation génétiques

- 1-Les techniques de manipulations génétiques**
- 2-Gènes utilisés dans la manipulation génétique**
- 3-Les organismes génétiquement modifiés**

I- Analyse et caractérisation d'un gène

-un gène ?

-quels sont ses principales caractères et propriétés (une grande importance dans différents domaines notamment celui qui s'intéresse a la santé et la bonne vie du vivant)???.



1- Notions de gène et allèles

- Un gène est un fragment d'ADN, représente une unité du chromosome
- support de l'information génétique, déterminant toutes les caractéristiques d'un individu (Couleur des yeux, taille, capacité de résister à une maladie, etc.....)
- chaque gène est également présent en double (comme les chromosomes)
- Les deux copies du gène sont appelés allèles

I- Analyse et caractérisation d'un gène

2- Gènes et Anomalies génétiques

2-1- Nature des anomalies génétiques

≡ Mutations

Une anomalie génétique (survenue par mutation au niveau des gènes ou anomalie chromosomique),

peut perturber la fabrication des protéines (dont chacune a un rôle bien définie dans le développement et la viabilité de l'individu.

-Une absence de protéines

-Un excès de fabrication

-Fabrication d'une protéine inattendue

« un mauvais ordre »
(dans la synthèse de protéines,

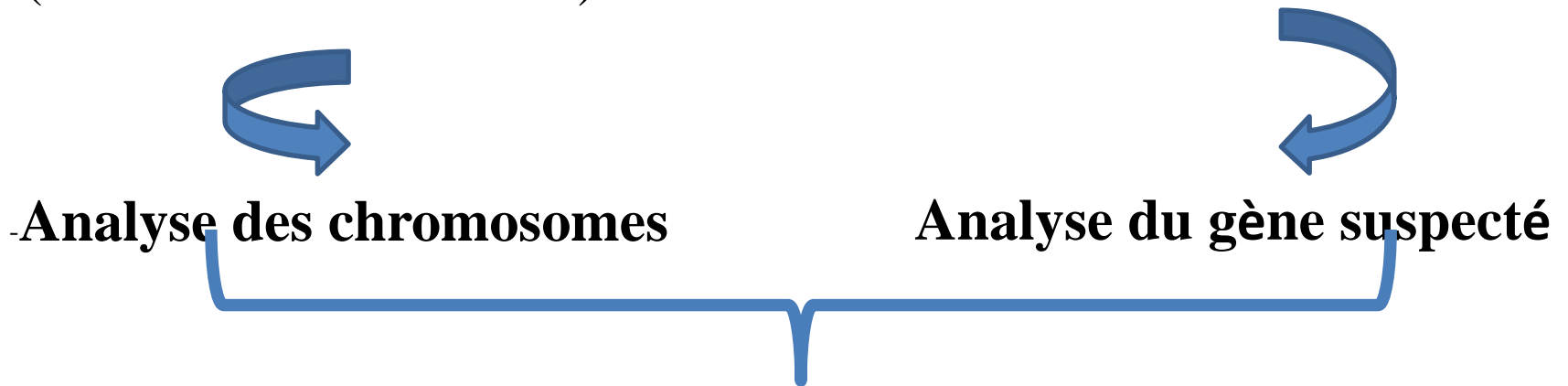
certaines erreurs (ou mutations), peuvent passer inaperçues ou ne s'expriment qu'en fonction de l'environnement (alimentation, tabac, mode de vie

I- Analyse et caractérisation d'un gène

Mise en évidence
des anomalies génétiques

2-2 Les examens génétiques

Le principe est d'analyser le matériel génétique d'un individu
(selon les circonstances)



Prise d'échantillon

(selon le type de maladie ou le type de mutation)

- **Post-natale** (sang, salive, cellules de peau, cellules de muscles)
- **prénatale (DPN)**, en fonction de la situation et du terme de grossesse (liquide amniotique, cellules de trophoblastes (futur placenta) ou prise du sang maternel)

I- Analyse et caractérisation d'un gène

Analyse du chromosome

Anomalie chromosomique

- **Nombre des chromosomes** (trisomie, monosomie)
- **Structure du chromosome** (une partie de chromosome est manquante ou en surplus.



Détection

- **Caryotype** (photo ou image de l'ensemble des chromosomes du noyau de la cellule)
- **Technique de Fish** (Fluorescent Insitu Hybridation), qui permet de voir une zone spécifique d'un chromosome donné et peut visualiser des anomalies de trop petite taille.

I- Analyse et caractérisation d'un gène

Analyse des gènes

Si l'anomalie résulte de la **modification d'un gène**



Maladie génique

- mono génique (un seul gène),
- polygénique (plusieurs gènes)



Détection par

-Les techniques de base dont le principe repose sur de la détection ou d'identification d'un fragment d'ADN (traité dans les chapitres précédents, tels que le séquençage, les techniques d'hybridations ou le profil de digestion électrophorétique)

-Autres techniques (selon le type d'analyse du gène)

Remarque : il existe une analyse génétique mixte (traitant les chromosomes et les gènes en même temps)

- l'analyse chromosomique à puce d'ADN (ACPA) aussi appelé la CGH arrays et
- le séquençage de nouvelles générations (NGS).

I- Analyse et caractérisation d'un gène

Types d'analyse d'un gène



Analyse structurale



- Déterminer la séquence complète du gène et ainsi
- mettre à disposition des données précises et détaillées de ce gène



Analyse fonctionnelle



une compréhension du fonctionnement biologique du gène

I- Analyse et caractérisation d'un gène

Analyse structurale

Mettre à disposition des données précises et détaillées de ce gène



- Déterminer les cadres de lecture ouvert ou ORF ("*Open Reading Frame*")
- localiser les régions codantes (exons)
- localiser les sites d'épissage aux bornes exon / intron ext.....



Déterminer la cartographie précise du gène (trouver l'organisation exacte des *marqueurs génétiques*, et leur positionnement sur ce gène ou sur une région chromosomique ainsi que sur un chromosome.

Les meilleurs marqueurs génétiques utilisés



Les SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*)

mutations ponctuelles, (de l'ordre du nucléotide), créant un polymorphisme entre individus différents.

Les Microsatellites

Polymorphisme de séquences répétées (en leur nombre et en leur dispersion dans les génomes des mammifères)



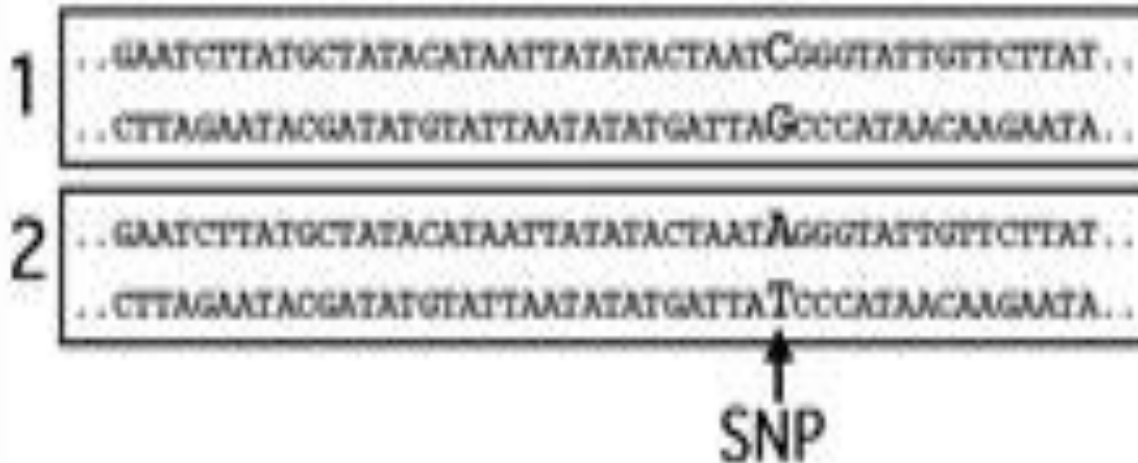
I- Analyse et caractérisation d'un gène

Les SNP

Différence d'une lettre au niveau de l'ADN

(mutation ponctuelle)

Comparaison de séquence pour 2 individus (1 et 2)



Avantages

- Abondance de ce type de polymorphisme au niveau du génome (au moins un tous les mille nucléotides),
- Facilité d'analyse, de lecture et d'interprétation
- Capacité d'automatisation

I- Analyse et caractérisation d'un gène

Analyse fonctionnelle



Premier objectif :

-Trouver la fonction du gène et sa responsabilité dans les variations des caractères



-Identifier la fonction du gène d'intérêt.
(-a quel moment, dans quel(s) organe(s), dans quelle quantité, pour quelle fonction ou pour quel caractère ?)

-Identifier, parmi les gènes de ce répertoire, celui ou ceux dont la variabilité pourrait entraîner une modification de la fonction ou du caractère étudié



**Deuxième objectif :
déterminer le niveau
d'expression du gène**



-Détecter des changements dans l'expression des gènes suite à des variations physiologiques, pathologiques ou pharmacologiques



Un profil d'expression de gènes qui peut être comparé à d'autres profils afin d'associer l'expression de certains gènes à un phénotype particulier.

I- Analyse et caractérisation d'un gène

Exploitation d'un gène caractérisé

Sur le plan économique

-sélection de caractères à importance économique (microorganismes et chez animaux domestiques).

Tableau 1 Quelques tests génétiques actuellement disponibles chez les bovins

Anomalies génétiques	BLAD, Citrullinémie, DUMPS, Mannosidase, Leucinose, Maladie de Pompe, CVM, Achondroplasie, Maladie des génisses blanches, Syndrome de "Chediak-Higashi"
Gènes de coloration	MC1R, MGF
Caractères de production laitière	Caséine kappa, Caséine beta, Beta-Lactoglobuline, DGAT1, GHR
Caractères de production de viande	Myostatin, Calpastatine, Calpaine, Thyroglobuline, Leptine

I- Analyse et caractérisation d'un gène

Exploitation d'un gène caractérisé

Sur le plan médical

Mutations des gènes



Dysfonctionnements plus ou moins graves (maladies géniques)

Les objectifs de l'analyse des gènes

- mieux caractériser la maladie (permettant d'adapter et d'améliorer la prise en charge)
- adapter au mieux les options thérapeutiques disponibles pour une plus grande efficacité tout en préservant au maximum la qualité de vie.



Plusieurs types d'exploitations médicales

I- Analyse et caractérisation d'un gène

Exploitation d'un gène caractérisé

Types d'exploitations médicales



Mise en évidence de l'efficacité ou la résistance à un traitement



- **Prédire l'efficacité ou la résistance d'un individu** pour un traitement donné, (chimiothérapie)
- **Réaliser un traitement** qui est prescrit individuellement, en fonction de la signature génomique et des données biologiques et les caractéristiques du patient



Recherche des gènes à risque, établissement d'un diagnostic précis et prédiction de la maladie



- **Réaliser des tests génétiques** pour la recherche des gènes à risque (diagnostic prénatal chez la femme enceinte ayant plus de 38 ans)
- **dépistages précoces**, pour bénéficier d'une chirurgie préventive stoppant l'évolution vers des cas graves (cancers mortels).
 - prédire l'évolution de la maladie (agressivité de la tumeur, risque potentiel de métastases)

II- Manipulation génétiques

Principe

- Soit d'intégrer** des gènes étrangers, végétaux ou animaux, dans le corps d'un membre d'une espèce différente,
- Soit de modifier** les gènes d'un organisme pour en changer ou optimiser un caractère.



But

- Améliorer la quantité et la qualité** de production (agriculture, microorganismes, animaux)
- optimiser une race d'élevage** (animaux pour production de lait par exemple ou une viande plus savoureuse. -

Les techniques de manipulations génétiques



Méthode conventionnelle



Méthodes modernes

II- Manipulation génétiques

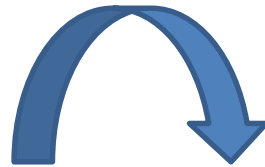
Les techniques de manipulations génétiques

Méthode conventionnelle :

Manipulation par ODM (Mutagénèse dirigée par oligonucléotides)

L'idée est d'introduire une mutation à un endroit choisi du génome (pour par exemple créer une plante tolérante à un herbicide).

Introduction des
"oligonucléotides"
dans la cellule



Activation des mécanismes de réparation de l'ADN propres aux cellules en utilisant le fragment introduit comme modèle et le copie

II- Manipulation génétiques

Les techniques de manipulations génétiques

Méthodes modernes



sont utilisées pour modifier de manière permanente le matériel génétique des organismes vivants.



**Manipulation par édition
génomique** (plusieurs méthodes)



**Manipulation par
Interférence à ARN**

II- Manipulation génétiques

Manipulation par édition génomique

Basée sur l'utilisation de ciseaux moléculaires, qui coupent dans le génome et permettent, au travers le système de réparation de l'ADN des cellules, de muter, modifier et insérer des gènes existants ou entièrement synthétiques dans une multitude d'organismes végétaux et animaux et de passer outre la barrière des espèces.



Plusieurs méthodes

(Selon la nature des ciseaux moléculaires utilisés, et la séquence ciblée pour la coupure)



**Utilisation des nucléases
Programmables**



Technique CRISPR

II- Manipulation génétiques

Manipulation par édition génomique Utilisation des nucléases programmables

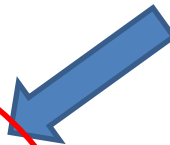
- Enzymes qui peuvent être programmées pour reconnaître une séquence choisie du génome, permettant ainsi de choisir quel gène couper et « quelle longueur » pour couper dans le génome de l'organisme
- permettent un multiplexing et sont applicables à un nombre plus important d'organismes vivants.

Coupage des deux
brins d'ADN



Déclenchement du mécanisme de
réparation cellulaire de l'ADN

(qui peut être de deux types)



Le deuxième « **recolle** » les
**brins en faisant des
erreurs**, (le plus utilisé par la
cellule et utilisé pour muter ou
inactiver les gènes.

Le premier reconstitue
presque **sans erreur la
séquence d'origine**

II- Manipulation génétiques

Manipulation par édition génomique

Technique CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)

C'est une technique, **dérivée du système immunitaire de bactéries**, basée pour **induire des cassures double brin dans l'ADN**, sur

-la coupure des **courtes répétitions palindromiques** groupées et régulièrement espacées

-une nucléase Cas9

-- un **ARN guide complémentaire à une séquence de 20 nucléotides d'un gène**



-**permet de modifier de façon spécifique** la séquence des nucléotides d'un gène, ou d'un élément non codant (comme un microARN), pour les rendre non fonctionnel

- **permet d'éliminer ou d'introduire de un à plusieurs milliers de nucléotides** afin de corriger une mutation responsable de maladie héréditaire.

II- Manipulation génétiques

Manipulation par édition génomique

Technique CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)

Les modifications
apportées



- Identifier la fonction d'un gène qui est alors rendu non fonctionnel,
- évaluer les conséquences phénotypiques de mutations induites dans des cellules ou des organismes entiers

NB: Technique
d'édition des cellules
germinales
(manipulation des
cellules reproductrices)



- permet d'apporter des modifications permanentes aux embryons.**
- éliminer certaines maladies héréditaires
 - changer la couleur des cheveux, la couleur des yeux ou la taille de l'enfant
 - pourrait créer un enfant selon les souhaits des futurs parents

II- Manipulation génétiques

Manipulation par édition génomique

Manipulation par Interférence à ARN

-**Processus cellulaire endogène**, utilisé par les cellules pour réguler l'expression des gènes en fonction de l'environnement et des besoins.

-- Dans ce mécanisme, les **molécules d'ARN** sont utilisées pour bloquer l'expression des gènes de manière ciblée et donc empêcher la synthèse de la protéine correspondante.



Ce procédé est souvent utilisé en biotechnologie pour produire des **plantes génétiquement modifiées** aux caractères divers (par exemple une pomme qui ne produit pas une certaine substance indésirée).

II- Manipulation génétiques

Gènes utilisés dans la manipulation génétique

(différentes grandes catégories de gènes)

1- Gènes marqueurs

Les gènes de résistance aux antibiotiques sont souvent utilisés comme marqueurs de sélection simples et pratiques (Résistance a la **Kanamycine/néomycine, ampicilline et streptomycine**).

Soit une cellule sensible a un antibiotique donné



manipulation de son gène pour la rendre résistante



ne conserver que les cellules chez lesquelles l'opération a réussi



repiquer les cellules dans un milieu contenant l'antibiotique,

II- Manipulation génétiques

Gènes utilisés dans la manipulation génétique (différentes grandes catégories de gènes)

2- Gènes de résistances

-Introduction des gènes de résistance aux insectes (gènes codant une forme tronquée de protéines endotoxines), fabriquées par certaines souches de *Bacillus thuringiensis* dans certaines plantes (ou modification de leurs gènes) pour résister aux insectes

-Idem pour conférer la résistance des plantes aux herbicides (glufosinate d'ammonium et glyphosate)

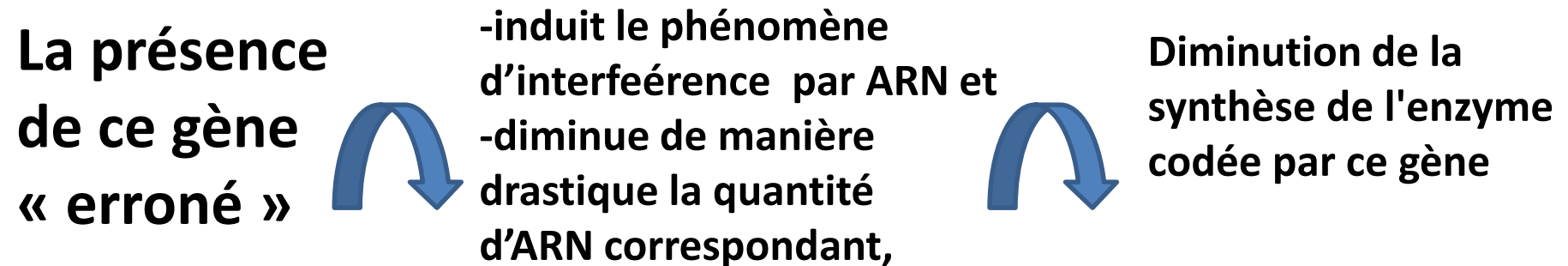
II- Manipulation génétiques

Gènes utilisés dans la manipulation génétique

(différentes grandes catégories de gènes)

3- Gènes antisens ou sens bloquant la traduction d'autres gènes

Il s'agit d'introduire un exemplaire supplémentaire d'un gène donné, mais en orientation inverse (on parle alors de gène « antisens »), ou, parfois, dans le même sens, mais tronqué.



Exemple le cas de la variété de pomme de terre (Amflora), dont

- les synthétases sont produites en quantités limitées, de façon à produire un amidon différent (en inhibant la synthèse d'amylose).

II- Manipulation génétiques

Gènes utilisés dans la manipulation génétique

(différentes grandes catégories de gènes)

4- Gènes rapporteurs

Un gène rapporteur est un gène codant une protéine fluorescente comme la GFP ou encore une enzyme dont l'action peut être visualisée comme la Beta-glucuronidase

Ce gène est souvent fusionné a un gène d'intérêt dans la recherche fondamentale dans laquelle, les gènes peuvent être modifiés pour étudier le profil d'expression et/ou la localisation de la protéine associée

II- Manipulation génétiques

Les organismes génétiquement modifiés et objectifs de modification

1-Microorganismes

Bactéries, micro-algues, levures, micro-champignons
- faciles à modifier et à cultiver



Sont un moyen relativement économique pour produire des protéines particulières à visée médicale: insuline, hormone de croissance, etc.

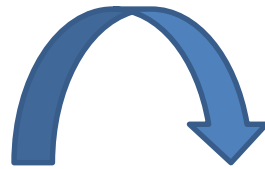
II- Manipulation génétiques

Les organismes génétiquement modifiés et objectifs de modification

2- Les végétaux

-**En 2006** , les principales plantes GM (PGM) sont le soja et le maïs (essentiellement pour alimentation du bétail), le furent pour être rendues tolérantes à un herbicide.

-**Actuellement**, en plus de ces deux, on compte plusieurs dizaines de végétaux génétiquement modifiés cultivés dans le monde (du coton, du canola de la betterave sucrière et du lin)



Plusieurs objectifs des PGM sont soulignés

II- Manipulation génétiques

Principales objectifs des PGM

1- Augmentation de la qualité nutritive et résistance aux climats

-Le riz doré est un exemple de PGM dont la qualité nutritive est augmenté
-- certaines variétés de céréales qui sont toujours en développement, sont un exemple de PGM qui sont dites OGM de 2^e génération, ont une capacité de résistance aux variations de climat (sécheresse, moussons, etc.)

2- Résistance aux insectes

Actuellement,

-le maïs transgénique possède un gène qui fabrique une toxine détruisant la pyrale, parasite de la plante.
- Le coton, le canola, la betterave sucrière PGM, peuvent résister à une molécule contenue dans des herbicides totaux, le glyphosate.

Perspectives

-Elaboration de plantes sécrétant un insecticide (**mais Bt et coton Bt** qui doivent leur nom à *Bacillus thuringiensis*, et résistent contre la pyrale du maïs et la noctuelle de la tomate , dans le cas du coton
-Obtention des plantes qui aient moins besoin d'engrais et d'insecticides.

II- Manipulation génétiques

Principales objectifs des PGM

3- Production de molécules pharmaceutiques

Principe: utilisation des plantes pour fabriquer des protéines utiles à l'homme. C'est le principe du «molecular pharming»

-au stade expérimental: produire de l'hémoglobine et de l'albumine humaines par le tabac,, des vaccins contre la grippe et la rage s par du colza, et contre l'hépatite B par des pommes de terre ou des tomates...

4- Exploitation multiples

Repose sur la modification de plusieurs traits dans une seule plante PGM;
Exemple: le projet chinois du riz, nommé GREEN SUPER RICE, qui devrait comporter plusieurs gènes: de résistances à des insectes et maladies, amélioration de la qualité nutritive et son adaptation aux environnements stressants (sécheresse, salinité, etc.).

Perspectives: améliorer la qualité nutritionnelle des plantes pour obtenir des aliments » à valeur ajoutée >>, des aliments moins allergisants, ou encore capables de nous protéger contre certaines maladies (aliments).

II- Manipulation génétiques

Les organismes génétiquement modifiés et objectifs de modification

3- Animaux

Peu d'animaux transgéniques ont été autorisés, on trouve:

-**Deux poissons d'aquarium** (-GloFish, un moustique GM , male stérile destiné à combattre la dengue et -un saumon GM pour grossir plus vite)

- En 2011, **création de poulets GM**, pour inhiber l'activité de la polymérase du virus de la grippe aviaire. (Cette inhibition empêche le virus de passer la phase de réplication virale et empêche donc sa propagation dans l'élevage de volailles)

II- Manipulation génétiques

Principales applications des OGM



Recherche fondamentale

Un grand nombre d'OGM servent pour
Répondre a certaines problématiques
telles que:

- comprendre le fonctionnement d'un organisme?
- comment les gènes contrôlent-ils le développement d'un embryon ?
- Quelles sont les étapes de division de la cellule ?
- À quoi correspond chaque moment de son développement ?
-?



Domaine médical

plusieurs types d'exploitations
telles que:

- Production de substances médicales
- Réalisation du Xénogreffe*
- Thérapie génique

II- Manipulation génétiques

Principales applications des OGM

Domaine médical

1- Production de substances médicales

- L'insuline utilisée pour soigner le diabète,
 - l'hormone de croissance humaine utilisée pour soigner certaines formes de nanisme,
 - les vaccins : le vaccin contre l'hépatite B, des vaccins contre les HPV contenant des protéines virales fabriqués à partir de levures GM.
- Production de Lipase gastrique par le maïs GM (cas l'insuffisance pancréatique des patients atteints de mucoviscidose et de pathologies du pancréas),
- Production de la Béta-caroténe par le riz doré GM
- Production du sang, lait, liquide séminal, urine, soie, blanc d'oeuf par des animaux GM
- Production des cannabinoïdes médicaux (comme antidouleur ou anxiolytique par une levure GM.

II- Manipulation génétiques

Principales applications des OGM

Domaine médical

2- Réalisation du Xénogreffe

- Possibilité d'utilisation des organes d'animaux pour des greffes humaines (idée ancienne)
- Le porc est considéré le meilleur donneur d'organes possible (à la fois physiologiquement assez proche de l'espèce humaine et n'a que très peu de maladies transmissibles à celle-ci)
- Des porcs GM, pourraient fournir des organes « humanisés ».
- perspectives dans la découverte de gènes inhibiteurs des réactions de rejet chez le porc GM

II- Manipulation génétiques

Principales applications des OGM

Domaine médical

3- Thérapie génique

Principe: consiste à transférer du matériel génétique dans les cellules d'un malade pour corriger l'absence ou la déficience d'un ou de plusieurs gènes qui provoque une maladie.

La thérapie génique est encore **en phase de recherche clinique** (essais cliniques sur une **quinzaine de maladies héréditaires, dont la mucoviscidose**)

Remarque/ La maîtrise du vivant, qui ne fait que commencer, offre donc une source d'applications potentielles inespérées, dont les hommes pourront tirer le meilleur, s'ils savent en éviter le pire.