

**TP SV
F3**
GENETIQUE MOLECULAIRE : ETUDE DE L'EXPRESSION GENETIQUE

COURS : SV-F-1.1, SV-F-3, SV-D-2.3, SV-D2.4 TP : SV-D1, SV-D2, SV-F1



Au-delà d'études sur la structure des génomes et des gènes (TP F1), les techniques de génétique moléculaire permettent d'étudier l'expression des génomes.

Le but de ce TP est d'envisager différentes méthodes d'étude de l'expression génétique.

Programme officiel :

- Analyser des résultats issus d'expériences de transgénèse ou de mutagenèse.
- Analyser et interpréter des résultats expérimentaux utilisant les techniques d'hybridation *in situ* ou de puce à ADN.
- Analyser et interpréter des résultats expérimentaux utilisant les techniques de Southern blot, northern blot, western blot, PCR et RT-PCR.
- Identifier et justifier les témoins de charge des blots.

Compétences :

- Exploiter données utilisant des méthodes d'étude de l'expression des génomes :
 - transgénèse, mutagenèse dirigée et aléatoire
 - hybridation *in situ*, utilisation de gène rapporteur, puce à ADN
 - northern blot, western blot, PCR et RT-PCR

Plan du TP :
1. Des outils de génétique moléculaire : manipuler les acides nucléiques

- 1.1. Les enzymes
- 1.2. Les sondes
- 1.3. Principaux vecteurs d'ADN

2. La transgénèse : ajout d'une séquence génétique

- 2.1. Transgénèse bactérienne
- 2.2. Transgénèse de Mammifères et notion de gène rapporteur
- 2.3. Transgénèses chez les plantes

3. La mutagenèse : modifier une information présente dans le génome

- 3.1. Mutagenèse aléatoire ou dirigée
- 3.2. Un exemple de mutagenèse dirigée : l'invalidation d'un gène par « KO »
- 3.3. L'utilisation du système CRISPR/Cas9

4. Les puces à ADN : un outil pour étudier l'expression du génome
5. Les techniques d'hybridation *in situ*

- 5.1. La FISH : « coloriage chromosomique »
- 5.2. Hybridation *in situ* et expression génétique

6. Exercices
Travail préparatoire :

- Lecture très attentive des parties 1 et 2 : outils + transgénèse. Connaître les principes.
- Si vous avez le temps, lecture rapide de la suite du TP (parties 3, 4 et 5) pour avoir une idée de ce qui sera vu.

1. Des outils de génétique moléculaire : manipuler les acides nucléiques
1.1. Les enzymes

De nombreuses enzymes sont utilisées en biologie moléculaire. On peut citer quelques exemples, qui ne visent pas à être exhaustifs :

- **Enzymes de restriction** : endonucléases spécifiques à une séquence ; permettent de cliver un ADN au niveau d'une séquence précise
- **Nucléases non spécifiques** : ADNases qui hydrolysent l'ADN, ARNases qui hydrolysent l'ARN
- **Polymérases** : ADN polymérase (soit entière, soit partielle), plus rarement de l'ARN polymérase, Taq Polymérase (polymérase fonctionnant à 70-80°C et résistant à une température de 95°C (cf. PCR), Transcriptase inverse (ADN polymérase à matrice ARN, permettant la synthèse d'ADNc).
- **Ligases** : enzymes capables de coller deux fragments d'ADN, en catalysant la formation de ponts phosphodiester entre les nucléotides terminaux des deux ADN.

- **Phosphatases** : enzymes hydrolysant un groupement phosphate. Elles peuvent par exemple être utilisées afin de retirer le phosphate d'une extrémité 5'P d'un brin d'ADN et ainsi empêcher une ligation non voulue.
- **Etc.**

1.2. Les sondes

On appelle sonde nucléotidique, un **segment d'acide nucléique simple brin (ADN ou ARN)**, qui va être utilisé pour détecter par hybridation son complémentaire, auquel on s'intéresse.

La sonde possède un nombre de nucléotides variables, suffisamment pour être **spécifique** car complémentaire de la séquence recherchée, et elle peut **détecter sa copie complémentaire** parmi des milliers de fragments d'ADN différents. Dans beaucoup d'applications, les sondes sont **marquées** par des isotopes radioactifs ou par des marqueurs fluorescents.

Hybridation = Association de deux acides nucléiques simple brin par **complémentarité des bases**.

1.3. Principaux vecteurs d'ADN

Un vecteur est un outil utilisé pour « transporter » un (ou plusieurs) gène, sous forme d'ADN. Le gène doit dans un premier temps être cloné (c'est-à-dire que l'on isole son ADN), puis son ADN est inséré dans un vecteur : le vecteur permet alors de transférer l'ADN dans une cellule voulue. Un vecteur permet donc l'entrée d'un ADN de séquence précise dans le génome d'une cellule.

Il est aussi possible d'injecter directement un ADN purifié dans une cellule. Cette technique est utilisée pour la réalisation d'organismes transgéniques animaux.

Transfection = **Incorporation d'ADN étranger dans une cellule**. Chez *E. Coli*, l'entrée d'un plasmide nécessite une **perméabilisation** de la paroi bactérienne, qui laisse alors passer le plasmide. Cette perméabilisation peut être obtenue par divers moyens, dont un choc électrique ou thermique.

La transfection n'est jamais obtenue avec un rendement de 100%.

⇒ Les plasmides -----> bactéries

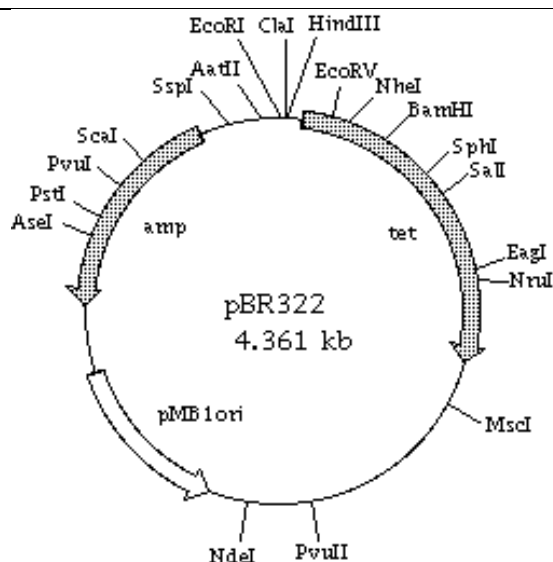
Ce sont des molécules **d'ADN double brin circulaires de petites tailles**.

Les plasmides utilisés couramment en laboratoire sont complètement séquencés, ce qui permet de connaître parfaitement les **sites de coupure par les enzymes de restriction**. Ils sont souvent très modifiés par insertion de gènes par rapport aux plasmides naturels.

Il est possible de **d'introduire les plasmides dans des bactéries** par transfection. On peut alors **produire** ces plasmides en grande quantité (= clonage), en faisant proliférer les bactéries qui les contiennent, puis en extrayant leur ADN plasmidique. La reproduction de leur ADN, dans le cytoplasme bactérien, est indépendante de celle du chromosome bactérien.

Il est également possible de **faire exprimer des gènes** insérés dans des plasmides par les bactéries transfectées, et **d'extraire les protéines produites**.

Exemples de plasmides classiques : pBR 322, pUC, pET, etc.



pBR 322 : un exemple de plasmide

la carte ci-contre présente les zones d'intérêt du plasmide.

Amp = gène de résistance à l'ampicilline (un antibiotique)

Tet = gène de résistance à la tétracycline (un antibiotique)

Ori = origine de réplication du plasmide

EcoRI, PstI, BamHI, etc : sites d'action d'enzymes de restriction.

⇒ Les phages = virus parasitant des bactéries → bactéries

On sait modifier de nombreux **génomés de phages** (en particulier le phage λ , qui infecte *E. Coli* en injectant son génome dans la bactérie) et utiliser ces phages pour **faire pénétrer** et exprimer un (ou des) gène(s) dans une bactérie.

Exemple de phage classique : *phage λ*

⇒ Autres vecteurs viraux → eucaryotes

Différents virus parasitant les cellules eucaryotes peuvent être utilisés pour faire pénétrer puis exprimer des gènes dans une cellule eucaryote. Ces vecteurs sont aussi envisagés dans les essais de thérapie génique, c'est-à-dire pour faire pénétrer un ADN dans plusieurs cellules d'un organisme pluricellulaire.

Exemples de vecteurs viraux eucaryotes : l'*adénovirus* (virus à ADN), les *lentivirus* (rétrovirus : le matériel génétique est sous forme d'ARN), *SV 40* (virus simien, à ADN)

2. La transgénèse : ajout d'une séquence génétique

La transgénèse correspond à l'**intégration d'un ADN étranger dans le génome d'un organisme**. L'ADN intégré (= le transgène) est une construction génétique. Il peut être intégré dans le génome hôte en utilisant diverses techniques.

Quelques **exemples** de méthodes sont présentés ici.

2.1. Transgénèse bactérienne

La transgénèse bactérienne est une technique utilisée très couramment en biologie moléculaire. En effet, le clonage d'un gène consiste à isoler l'ADN génomique du gène en question, puis à l'insérer dans un génome bactérien : il est ainsi possible de mettre en culture la bactérie transgénique, ce qui permet d'obtenir une multiplication du gène cloné. En général le gène en question est inséré dans un plasmide : il est alors très facile de le « récupérer », en extrayant l'ADN plasmidique de la colonie bactérienne.

Concrètement, la transgénèse en elle-même peut être réalisée par deux grandes méthodes « classiques » :

- **Transformation** bactérienne : des bactéries compétentes (c'est-à-dire ayant subi au préalable un traitement stimulant leur capacité à intégrer un ADN étranger) sont soumises à un choc thermique (passage brutal d'une température élevée de l'ordre de 42°C à un milieu à 0°C), en présence de l'ADN étranger. Le stress induit par le choc thermique permet à certaines des bactéries d'intégrer les ADN étrangers du milieu.
- **Electroporation** : des bactéries sont soumises à un choc électrique qui induit la formation de pores dans la membrane, en présence de l'ADN étranger, qui peut ainsi pénétrer le cytoplasme bactérien.

Dans tous les cas, il est nécessaire de procéder dans un deuxième temps à un **criblage** des bactéries traitées, afin d'isoler les clones ayant effectivement intégré le transgène (le taux de réussite est en effet très faible).

Dans cette optique, on utilise en général un vecteur porteur d'au moins un gène de résistance bactérien : les bactéries transformées ou électroporées sont cultivées en présence de l'antibiotique correspondant → seules celles ayant intégré le vecteur peuvent alors se développer. On vérifie dans un deuxième temps que le vecteur contenait bien le transgène (par exemple en réalisant une carte de restriction).

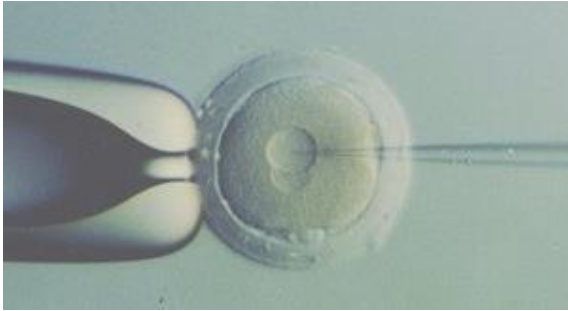
2.2. Transgénèse de Mammifères et notion de gène rapporteur

Une transgénèse peut être réalisée sur des cellules isolées, par exemple en utilisant des vecteurs viraux : Il s'agit de particules virales « transportant » l'ADN et permettant son intégration dans le génome de la cellule.

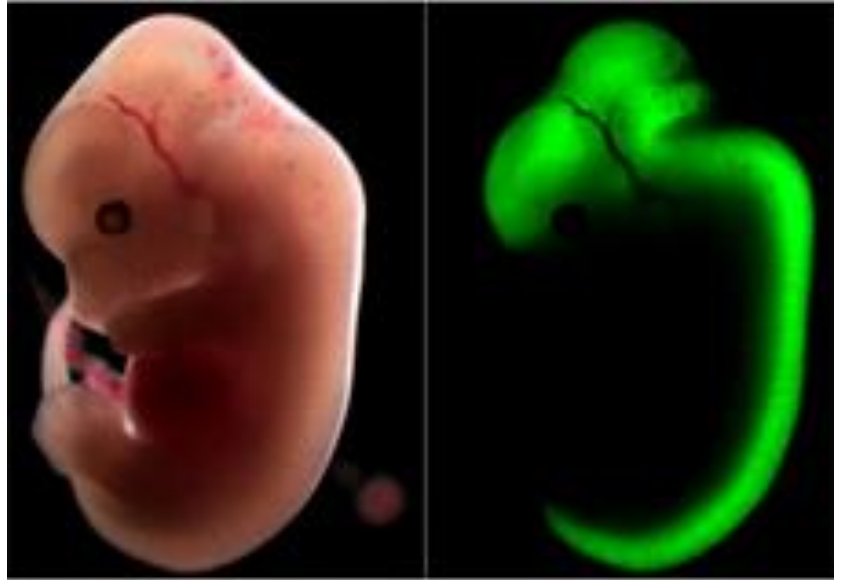
De nombreuses études, toutefois, nécessitent la réalisation d'organismes transgéniques : Il est alors nécessaire que toutes les cellules de l'organisme soient transgéniques, ce qui signifie que la transgénèse doit être réalisée au stade unicellulaire, au niveau de l'œuf fécondé.

La **transgénèse chez la Souris** comporte trois étapes successives, liées à la viviparité des Mammifères :

- 1- Prélèvement d'œufs fécondés au stade une cellule (on réalise ce prélèvement sur une souris femelle ayant copulé la nuit précédente)
- 2- Micro-injection de l'ADN transgénique purifié. La cellule œuf (50 μm de diamètre) est maintenue sous l'objectif d'un microscope par une pipette exerçant une légère aspiration, pendant qu'une autre pipette réalise l'injection d'ADN dans le pronucléus mâle (qui présente une taille légèrement supérieure à celle du pronucléus femelle).
- 3- Ré-implantation des œufs dans un utérus d'une souris femelle stimulée (on utilise une souris d'une souche différente – couleur de pelage différent – de la cellule donneuse d'ovocyte, afin de pouvoir repérer les souris potentiellement transgéniques par leur couleur de pelage, quelques jours après la naissance)



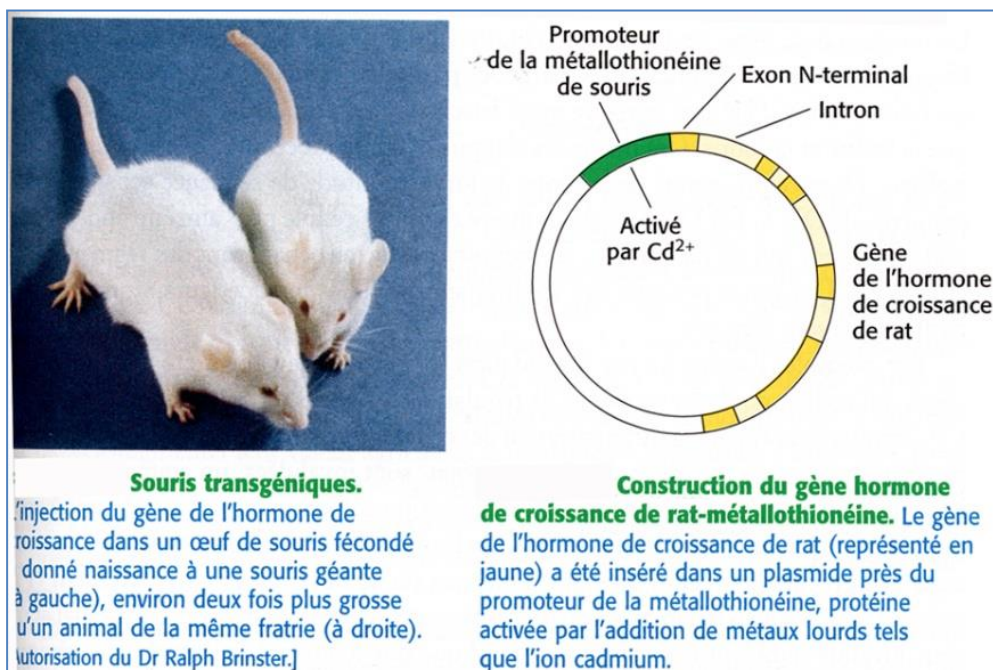
Micro-injection d'ADN dans le pronucléus mâle d'un ovocyte de souris fécondé



Le transgène peut être un gène rapporteur : il s'agit alors d'un gène codant une protéine facilement détectable, placé sous le contrôle d'un promoteur spécifique. L'observation de la présence de la protéine renseigne sur les lieux (et temps) d'expression liés au promoteur utilisé.

On peut en particulier utiliser la **GFP** : *Green Fluorescent Protein*. Cette protéine émet une fluorescence verte qui la rend facilement repérable. Exemple ci-dessus : embryon de souris exprimant une GFP placée sous le contrôle d'un promoteur conduisant à une expression générale dans le tissu nerveux central.

Une autre possibilité « classique » est l'utilisation de **LacZ** (bêta-galactosidase) comme gène rapporteur : il est en effet possible d'utiliser la réaction enzymatique de cette protéine pour induire la formation d'un produit coloré.

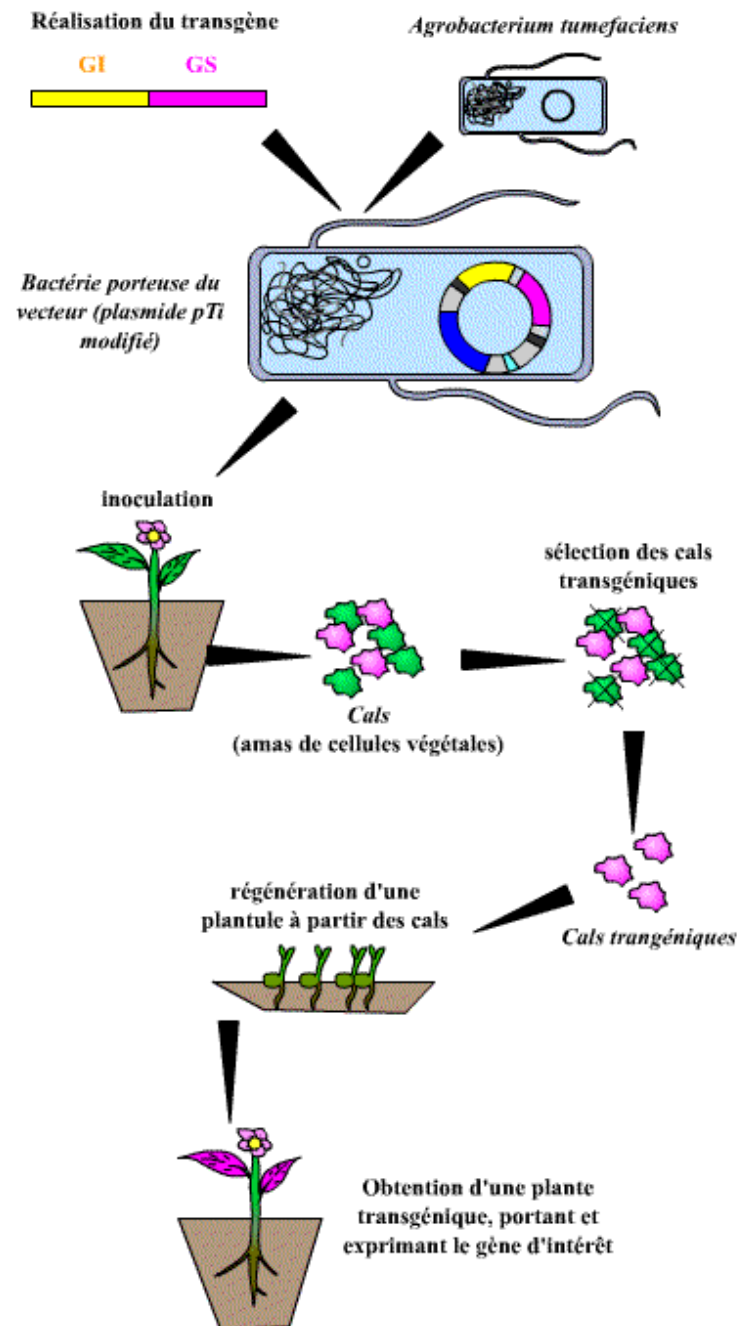


2.3. Transgénèses chez les plantes

Chez les plantes, la microinjection n'est pas possible facilement, du fait de la présence de la paroi végétale. On utilise alors classiquement deux types de technique :

- Un canon à particule peut projeter des microbilles couvertes d'ADN à travers des cellules végétales. Certaines de ces billes permettent de « laisser » de l'ADN dans le noyau, qui peut éventuellement être intégré dans le génome.
- Utilisation d'un vecteur bactérien, *Agrobacterium tumefaciens*. Cette bactérie du sol est capable d'infecter certaines plantes : la mise en place de cette association s'accompagne du transfert d'un ADN plasmidique de la bactérie vers le génome de la plante hôte. Il est donc possible de réaliser des bactéries *A. tumefaciens* modifiées, qui transfèrent un transgène dans une plante donnée.

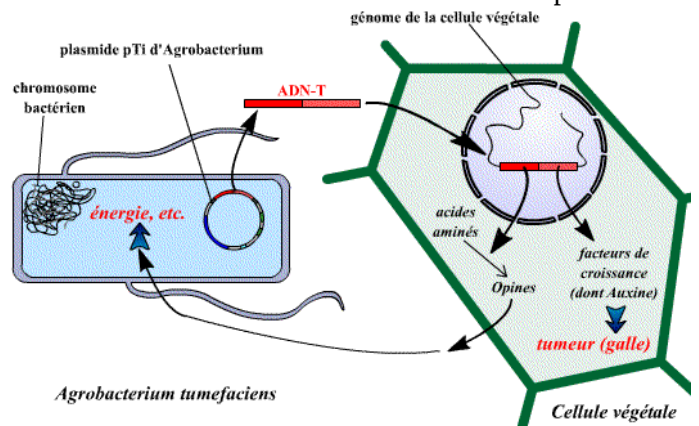
Cf figure page suivante.



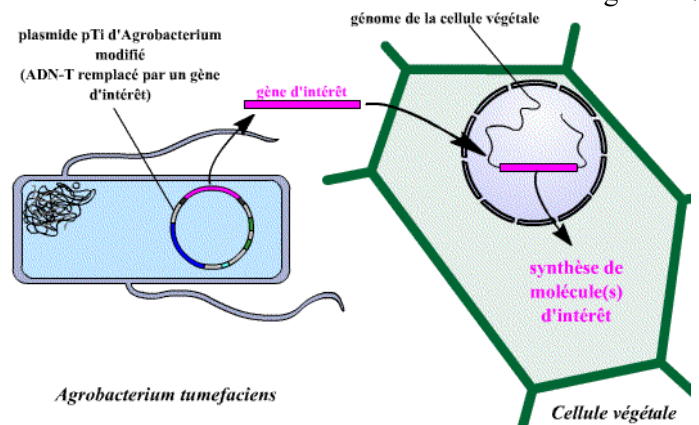
La transgénèse par *Agrobacterium tumefaciens*

← principe de la transgénèse

Le transfert d'un ADN issu du plasmide T de *A.t.* vers les cellules de la plante hôte :



Et dans le cas d'une transgénèse :



Images issues de la page Internet suivante, présentant la technique : <http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/transgenese/agrobacterium/agro.htm>

3. La mutagenèse : modifier une information présente dans le génome

3.1. Mutagenèse aléatoire ou dirigée

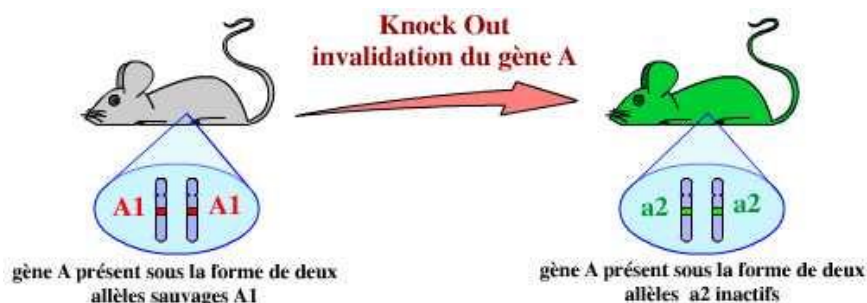
On parle de mutagenèse lorsque l'on modifie une séquence de l'ADN génomique. D'un point de vue strict, une transgénèse est une modification de l'information génétique, mais il s'agit d'un ajout sans modifier les séquences pré-existantes.

La **mutagenèse aléatoire** correspond au fait de soumettre une cellule ou un organisme à des agents mutagènes :

- Rayonnements (UV, X, radioactifs...)
- Molécules chimiques (= mutagènes)

Les agents mutagènes induisent des mutations de manière aléatoire, et l'on procède ensuite à un crible, c'est-à-dire à une sélection des mutants montrant une altération du phénotype étudié.

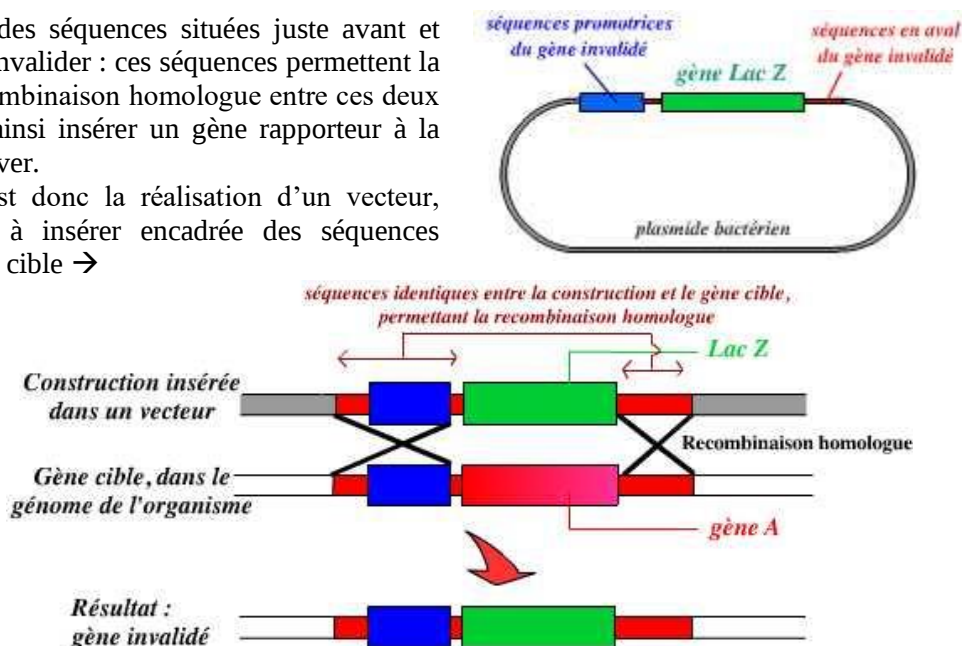
3.2. Un exemple de mutagenèse dirigée : l'invalidation d'un gène par « KO »



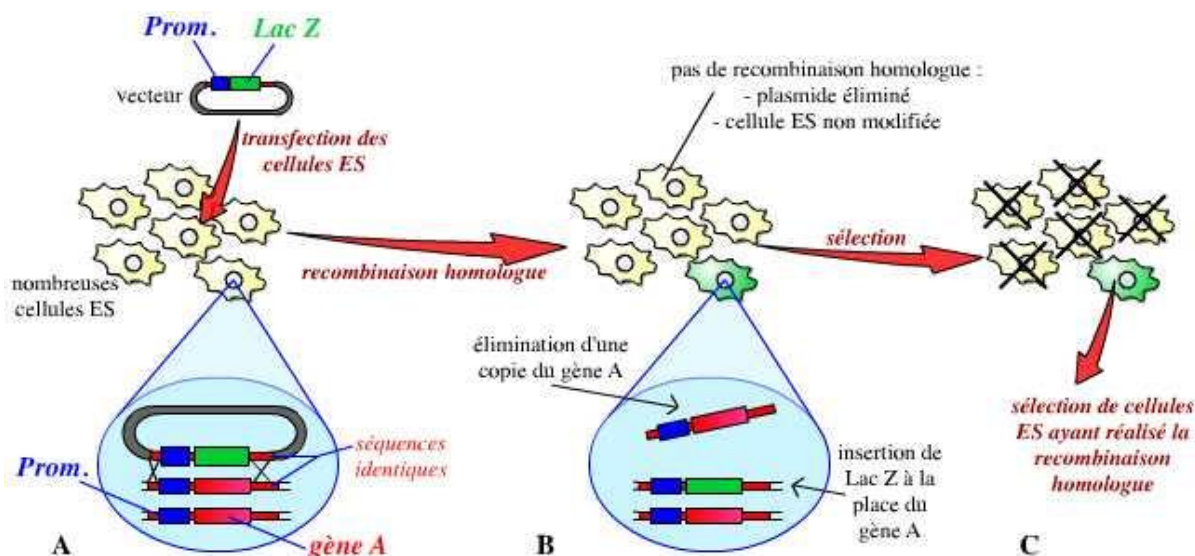
Le KO d'un gène correspond à son invalidation : il s'agit donc de remplacer les deux copies d'un gène par un allèle totalement inactif. La technique nécessite donc de réaliser une transgénèse dirigée sur une position bien précise du génome.

La technique utilise des séquences situées juste avant et juste après le gène à invalider : ces séquences permettent la réalisation d'une recombinaison homologue entre ces deux séquences. On peut ainsi insérer un gène rapporteur à la place du gène à inactiver.

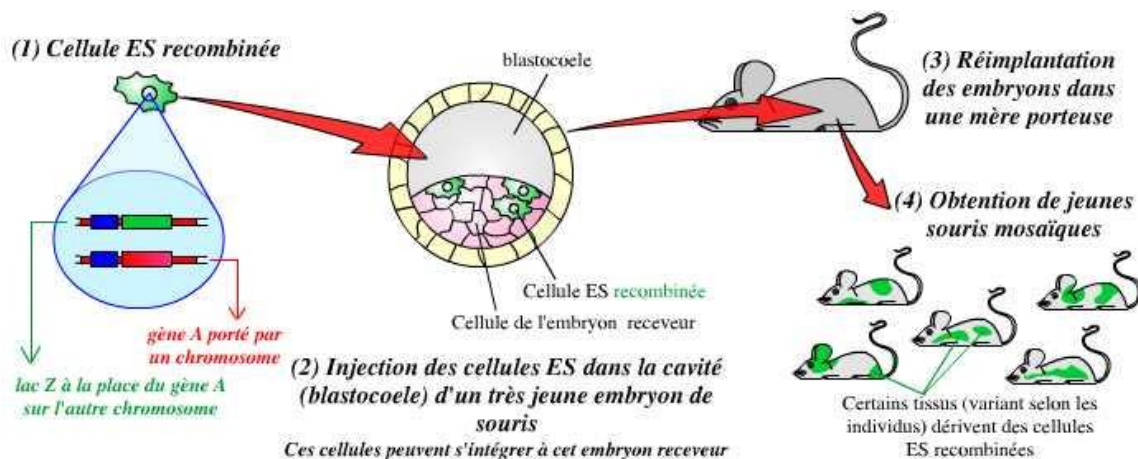
La première étape est donc la réalisation d'un vecteur, portant la séquence à insérer encadrée des séquences amont et aval du gène cible →



Une fois la construction réalisée, ce vecteur est introduit dans des cellules ES par électroporation. On utilise des cellules ES (Souches Embryonnaires) car ces cellules sont capables de donner toutes les cellules de l'organisme (elles sont totipotentes). Une étape longue et fastidieuse est alors de sélectionner un clone de cellules ES ayant effectivement reçu le vecteur, et ayant procédé à la recombinaison homologue. Une des deux copies du gène est ainsi invalidée dans leur génome :

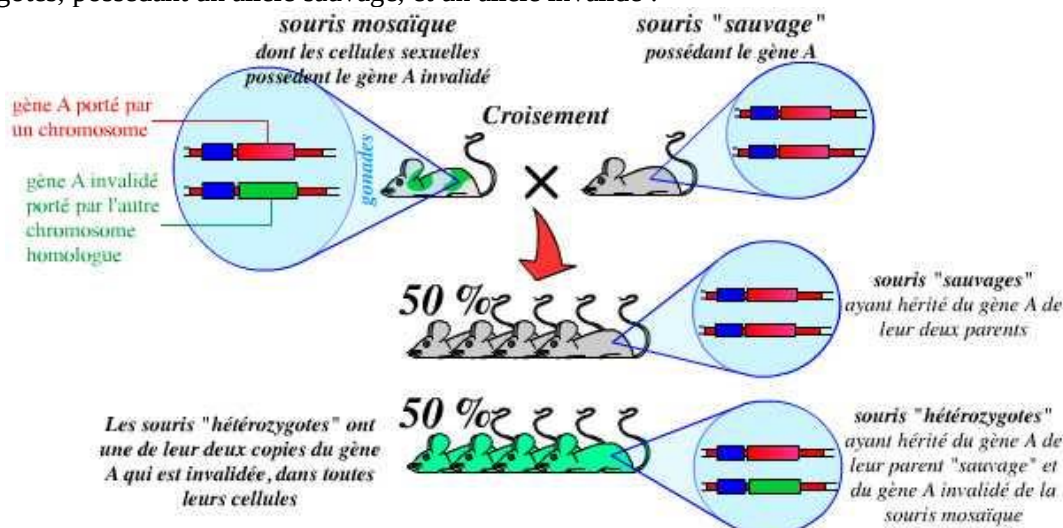


La deuxième étape consiste en l'obtention d'animaux génétiquement modifiés. Pour cela, on procède à l'injection de quelques cellules ES modifiées dans le blastocœle (cavité) de très jeunes embryons de souris. Ces cellules s'intègrent naturellement à la Masse Cellulaire Interne (MCI), ensemble de cellules dont dérivent toutes les cellules du futur organisme. Les embryons ayant reçu ces cellules ES sont alors réimplantés dans des mères porteuses. On obtient ainsi, à la naissance, des souris "mosaïques", dont les tissus dérivent pour partie des cellules de la MCI "normales", et pour partie de cellules ES modifiées :

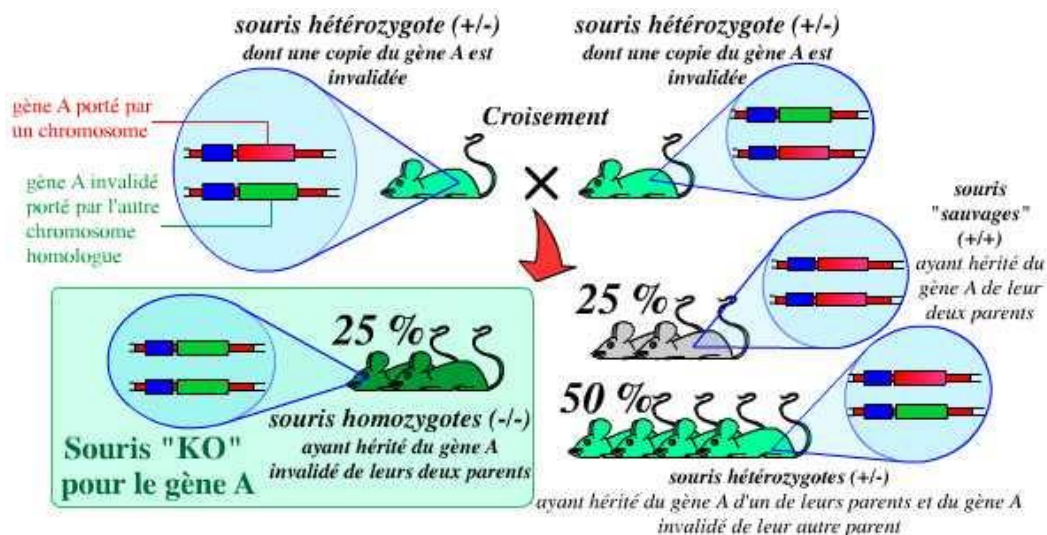


Parmi ces individus mosaïques, il est alors nécessaire de sélectionner ceux dont les cellules de la lignée germinale dérivent de cellules ES : eux seuls seront capables de transmettre le gène invalidé à leur descendance.

A partir du moment où l'on dispose de tels individus mosaïques, la troisième étape consiste en un croisement entre ces souris et des souris "sauvages" (c'est à dire possédant le gène normal, non modifié). Ce croisement permet d'obtenir des souris hétérozygotes, possédant un allèle sauvage, et un allèle invalidé :



La dernière étape consiste alors à croiser ces souris hétérozygotes entre elles pour obtenir (dans une proportion de 25%) des souris homozygotes, possédant deux copies du gène invalidé (et donc, logiquement, aucune copie du gène fonctionnel) :



3.3.L'utilisation du système CRISPR/Cas9

Le système CRISPR/Cas9 est un système présent dans certaines bactéries, et a priori jouant un rôle dans leur défense immunitaire contre les virus. Il est constitué de deux ensembles :

- Un ARN guide (codé par le locus CRISPR)
- Une enzyme de type endonucléase (Cas9)

Ce système a été utilisé au début des années 2010 pour mettre au point une puissante technique d'édition du génome, par Emmanuelle Charpentier et Jennifer Doudna (Nobel 2020).

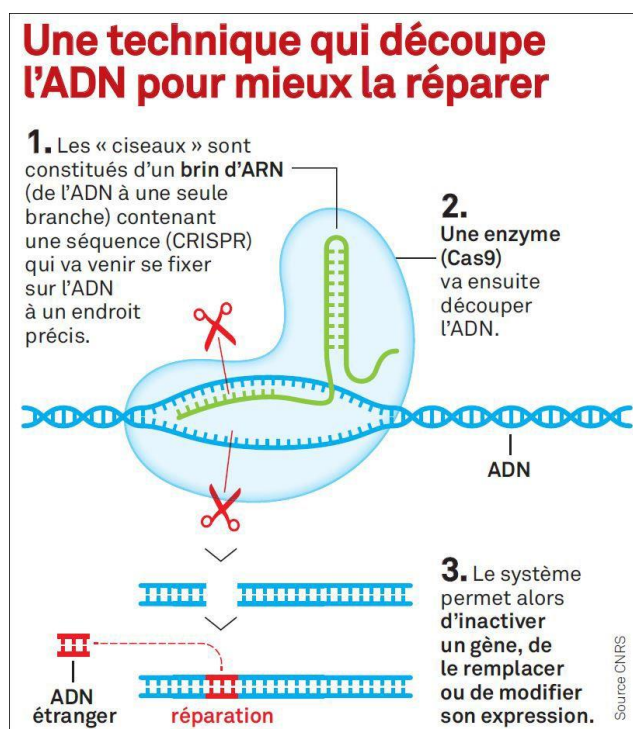
Le principe est de produire une cellule transgénique pour le système CRISPR/Cas9, avec une séquence choisie pour l'ARN guide, ce qui permet la fixation du complexe Cas9-ARN guide au niveau d'une séquence spécifique de l'ADN.

La protéine Cas9 réalise alors une coupure double brin au niveau de la séquence ciblée. Il y a alors deux possibilités :

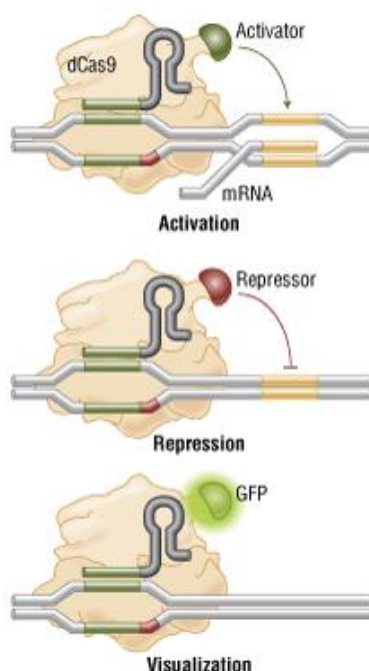
- Laisser les systèmes de réparation de la cellule agir : il y a alors soit insertion aléatoire de quelques nucléotides, soit délétion de quelques nucléotides. Dans les deux cas, on induit donc une mutation dirigée sur la séquence ciblée.
- Introduire dans le même temps (par microinjection) un ADN, qui est alors inséré au niveau du site clivé. On introduit donc une nouvelle séquence dans un contexte génétique précis.

Il est aussi possible d'utiliser la capacité de localisation précise sur l'ADN du système CRISPR/Cas9 en utilisant une version désactivée de Cas9 : Il n'y a dans ce cas là pas de coupure de l'ADN. La protéine Cas9 modifiée peut permettre, par exemple :

- D'apporter une protéine qui active ou inhibe l'expression d'un gène situé à côté de la séquence ciblée ;
- De localiser la zone de fixation grâce au couplage à la GFP
- D'apporter une protéine modifiant chimiquement la chromatine (acétylation ou méthylation des histones ou de l'ADN)



C. Localization With Defective Cas9 Nuclease



4. Les puces à ADN : un outil pour étudier l'expression du génome

Une puce à ADN est une lame (généralement en verre), sur laquelle on a fixé un **grand nombre de sondes** différentes, chacune en un endroit précis de la lame. Ces sondes sont des segments d'ADN simple brin (ici, non marquées).

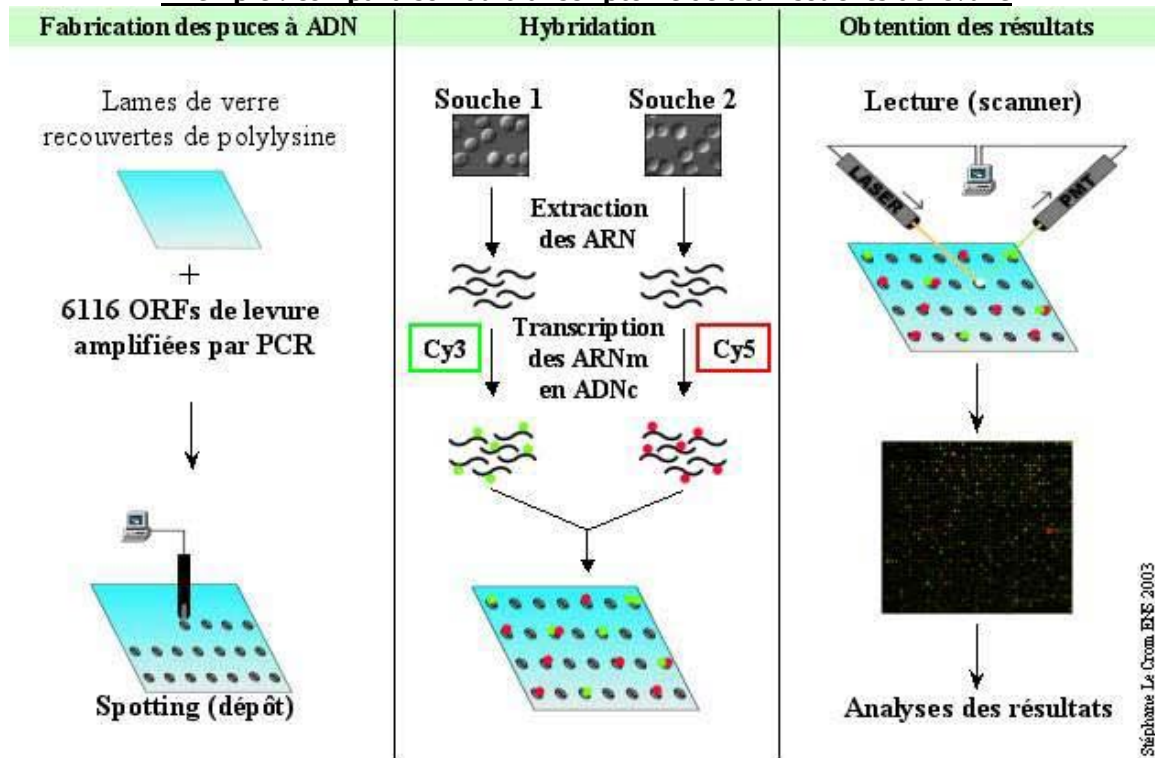
On vient mettre en contact un mélange de fragments d'ADN à tester avec l'ensemble de la surface de la puce. Ce mélange d'ADN a été préalablement chauffé pour séparer les doubles hélices en simples brins, et chacun des fragments d'ADN est marqué par un **marqueur fluorescent**.

Lorsque une des sondes rencontre son complémentaire dans le mélange d'ADN, les deux molécules simple brin **s'hybrident** ensemble.

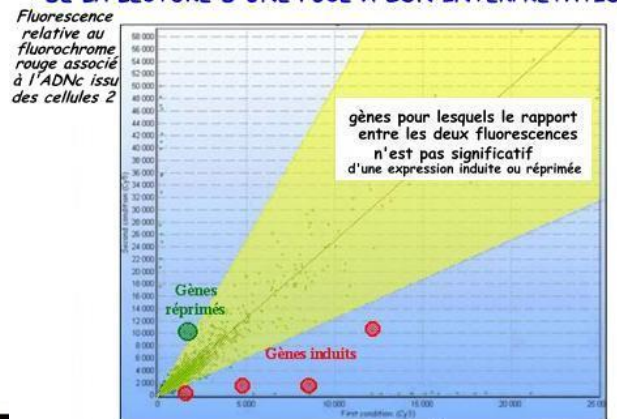
Des lavages permettent d'éliminer les fragments d'ADN non hybridés à la puce. La puce peut ensuite être observée au microscope à fluorescence, et **chaque point fluorescent observé correspond à une hybridation**.

Applications: recherche de gènes dans un génome, recherche d'ARNm exprimés dans une population cellulaire (en passant par la synthèse *d'ADNc*)....

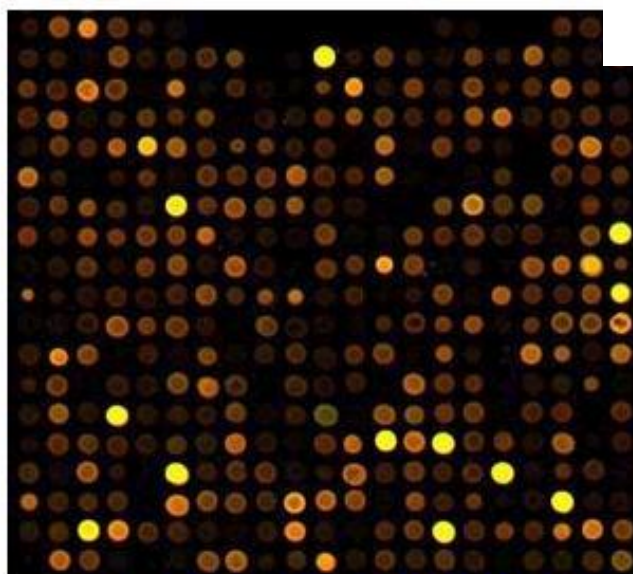
Exemple : comparaison du transcriptome de deux souches de levure



DE LA LECTURE D'UNE PUCE A SON INTERPRETATION



- spot où l'ADN des cellules 1 et 2 s'est fixé à la sonde
- spot où seul l'ADN des cellules 1 s'est fixé à la sonde
- spot où seul l'ADN des cellules 2 s'est fixé à la sonde



intensité de la fluorescence

MODE DE LECTURE DE LA PUCE A ADN

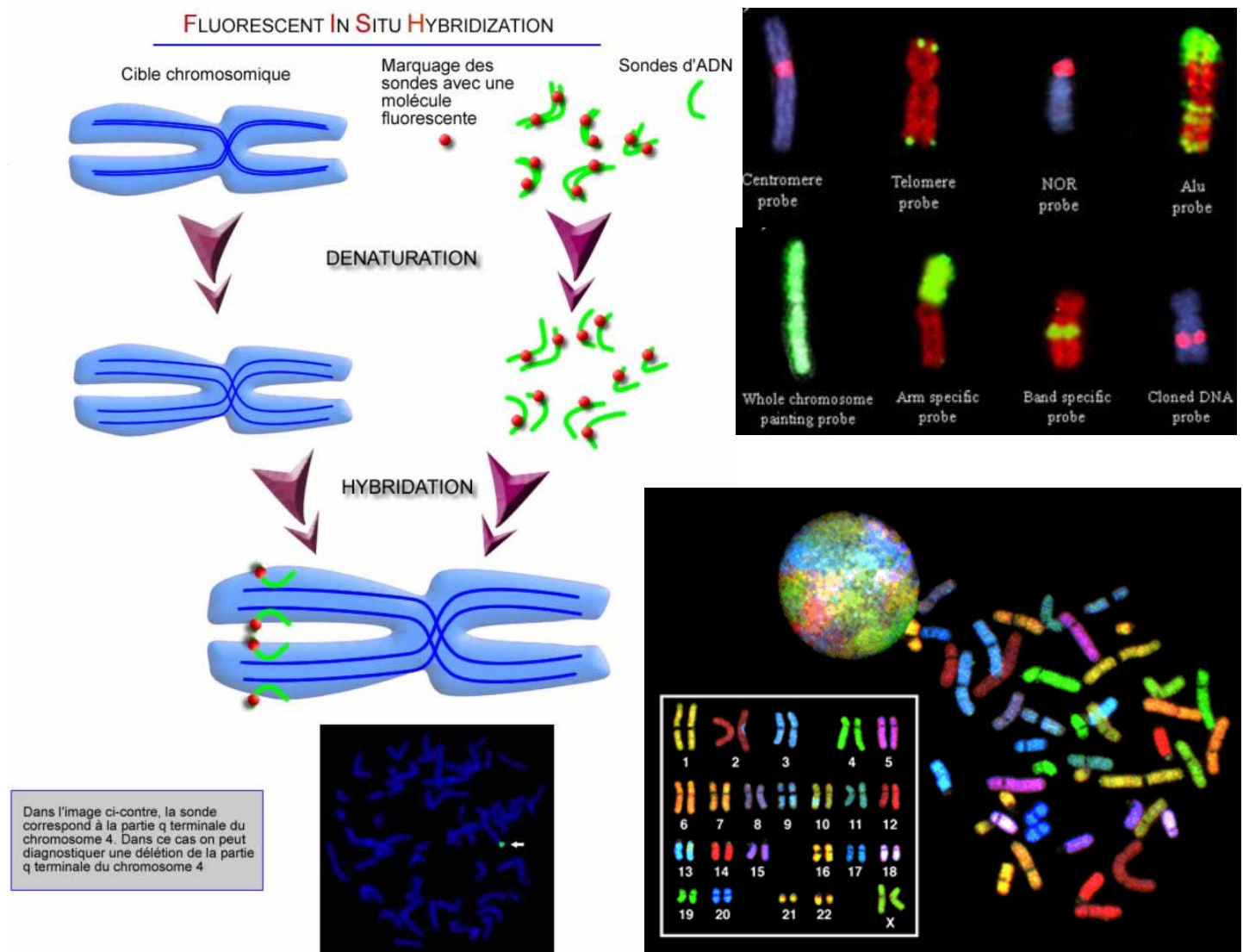
5. Les techniques d'hybridation *in situ*

Une hybridation *in situ* est une technique de visualisation de la présence d'un acide nucléique : On réalise une incubation avec une sonde marquée, puis on révèle la présence de la sonde. La localisation du marquage permet d'observer la localisation de l'acide nucléique ciblé.

5.1. La FISH : « coloriage chromosomique »

La FISH est une technique permettant une « coloration » des chromosomes : on utilise une ou plusieurs sondes fluorescentes, qui s'hybrident à des zones précises des chromosomes métaphasiques. On observe ensuite en microscopie à fluorescence.

En fonction de la sonde utilisée, on peut observer soit un chromosome entier spécifique, soit un fragment de chromosome (par exemple le centromère ou le télomère), ou un gène précis. En combinant des sondes avec des fluorescences différentes, ou en utilisant plusieurs sondes de manière successive sur un même ensemble de chromosomes bloqués en métaphase et fixés, on peut réaliser une véritable « peinture » des chromosomes selon des caractéristiques voulues.



5.2. Hybridation *in situ* et expression génétique

L'hybridation *in situ* permet de mettre en évidence la présence et la localisation d'ARNm au sein d'un tissu, d'un embryon : Il est alors possible de voir où s'exprime un gène précis.

La sonde utilisée est complémentaire d'une séquence spécifique de l'ARNm ciblé.

Voir exercices.

Exercices : voir poly 2 - séance