



UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP  
DAKAR, SENEGAL



PLATEFORME DE GENOMIQUE FONCTIONNELLE  
LABORATOIRE DE BIOTECHNOLOGIES  
VEGETALES

# **COURS DE BIOLOGIE MOLECULAIRE**

Pour les étudiants de **Licence 2 SV**

## **Chapitre II : Les Outils du Génie Génétique**

Dr. **DIAGA DIOUF**  
Professeur titulaire

## Chapitre IV : La mutagénèse

### 1. La mutagénèse dirigée

#### 1.1. La mutagénèse dirigée par PCR

#### 1.2. La mutagénèse dirigée par PCR inverse

### 2. La mutagénèse aléatoire

#### 2.1. La mutagénèse physique

#### 2.2. La mutagénèse chimique

#### 2.3. L'application en amélioration végétale

#### 2.4. Mutagénèse par insertion

##### 2.4.1. Transformation génétique des bactéries

###### 2.4.1.1. Transformation génétiques des bactéries pour la production d'insuline humaine

##### 2.4.2. Transformation génétique des plantes

###### 2.4.2.1. Méthode directe : utilisation du canon à particules

###### 2.4.2.2. Méthode indirecte : utilisation d'*Agrobacterium*

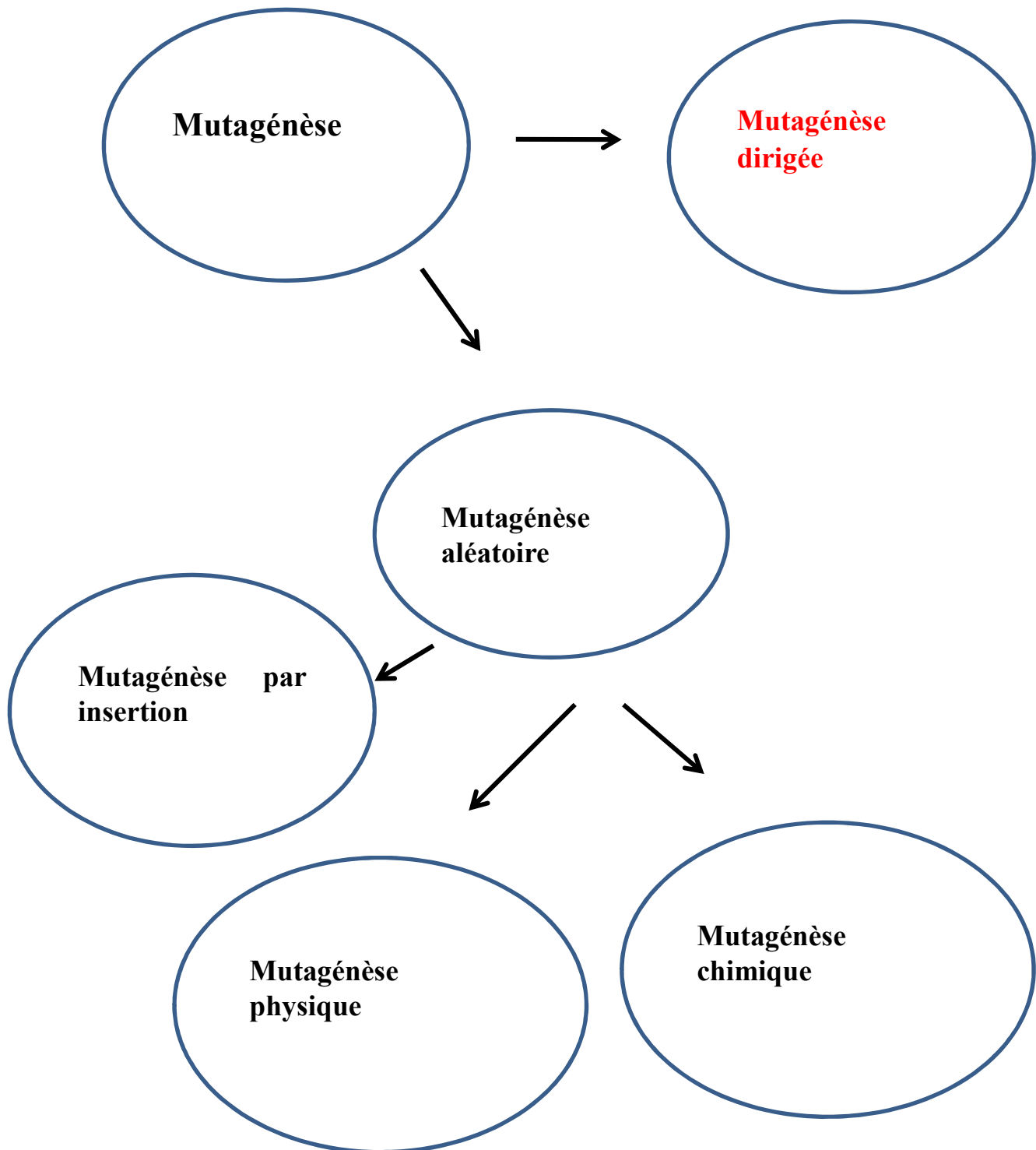
###### 2.4.2.3. Application de la transgénèse végétale à l'amélioration des plantes

##### 2.4.3. La transgénèse animale

###### 2.4.3.1. Application de la transgénèse animale pour l'amélioration de la production

# mutagénèse

La mutagénèse est la modification de la séquence d'ADN soit au hasard, on parle de mutagénèse aléatoire ou à un endroit précis, on parle de mutagénèse dirigée.

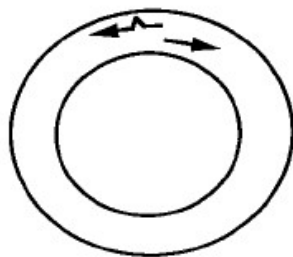


## Mutagenèse dirigée

### Mutation dirigée à partir d'un ADN double brin:

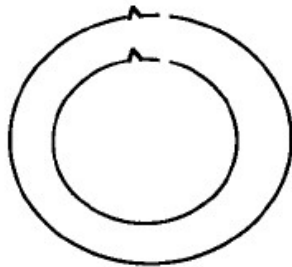
#### Par PCR inverse

La mutation est induite à un endroit précis au niveau de la séquence d'ADN. Elle est induite en utilisant un ADN simple brin ou un ADN double brin.

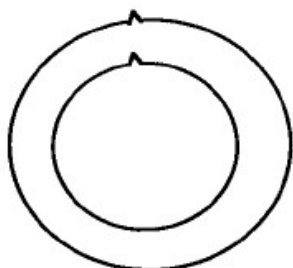


On amplifie avec deux amorces dont l'une porte une mutation

↓ PCR



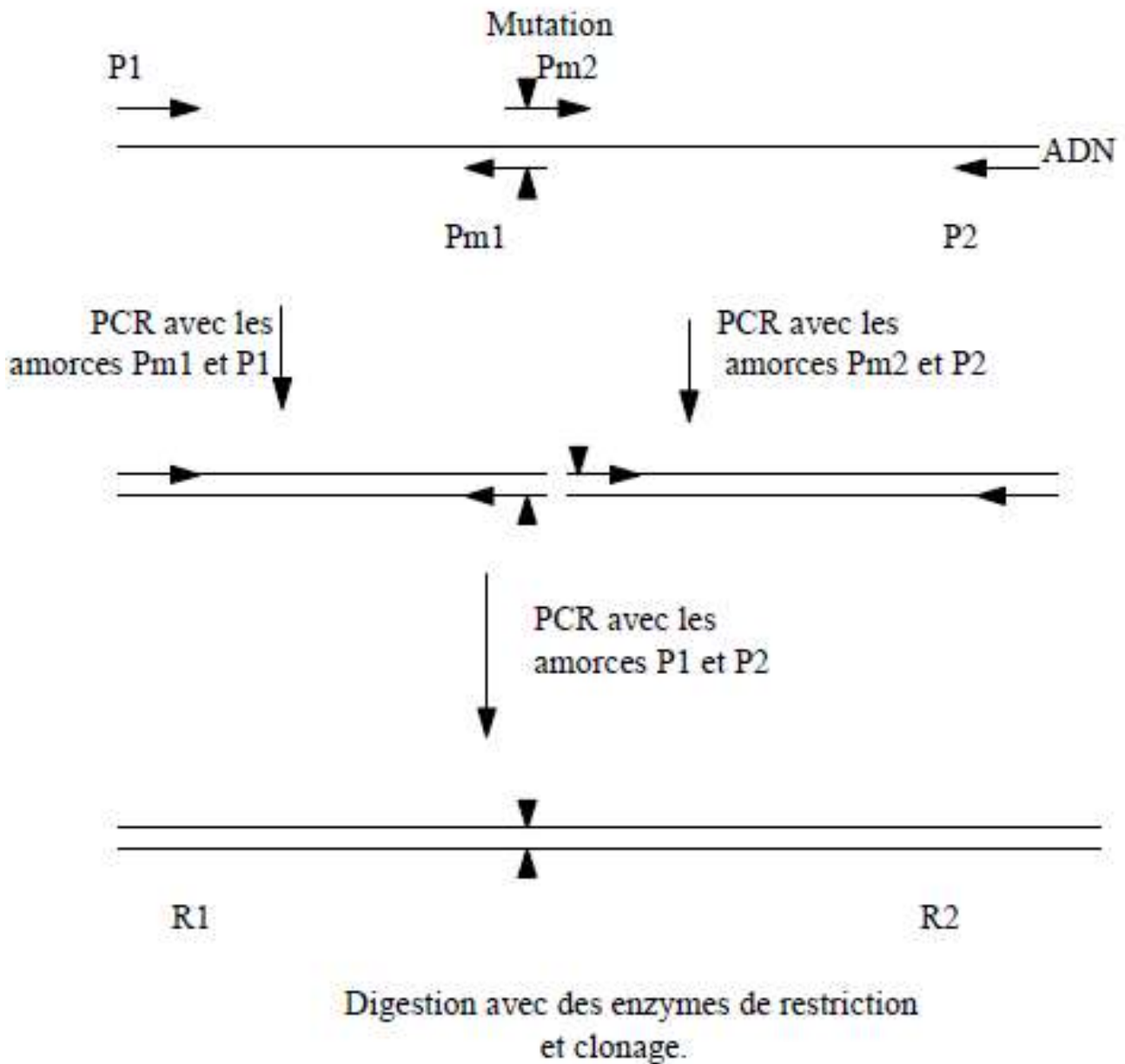
↓ Ligation



Après la PCR on réalise une ligation

Les amplifiats ou bien les amorces sont phosphorylés afin de permettre la ligation

## Mutagenèse par PCR méthode avec 4 amorces



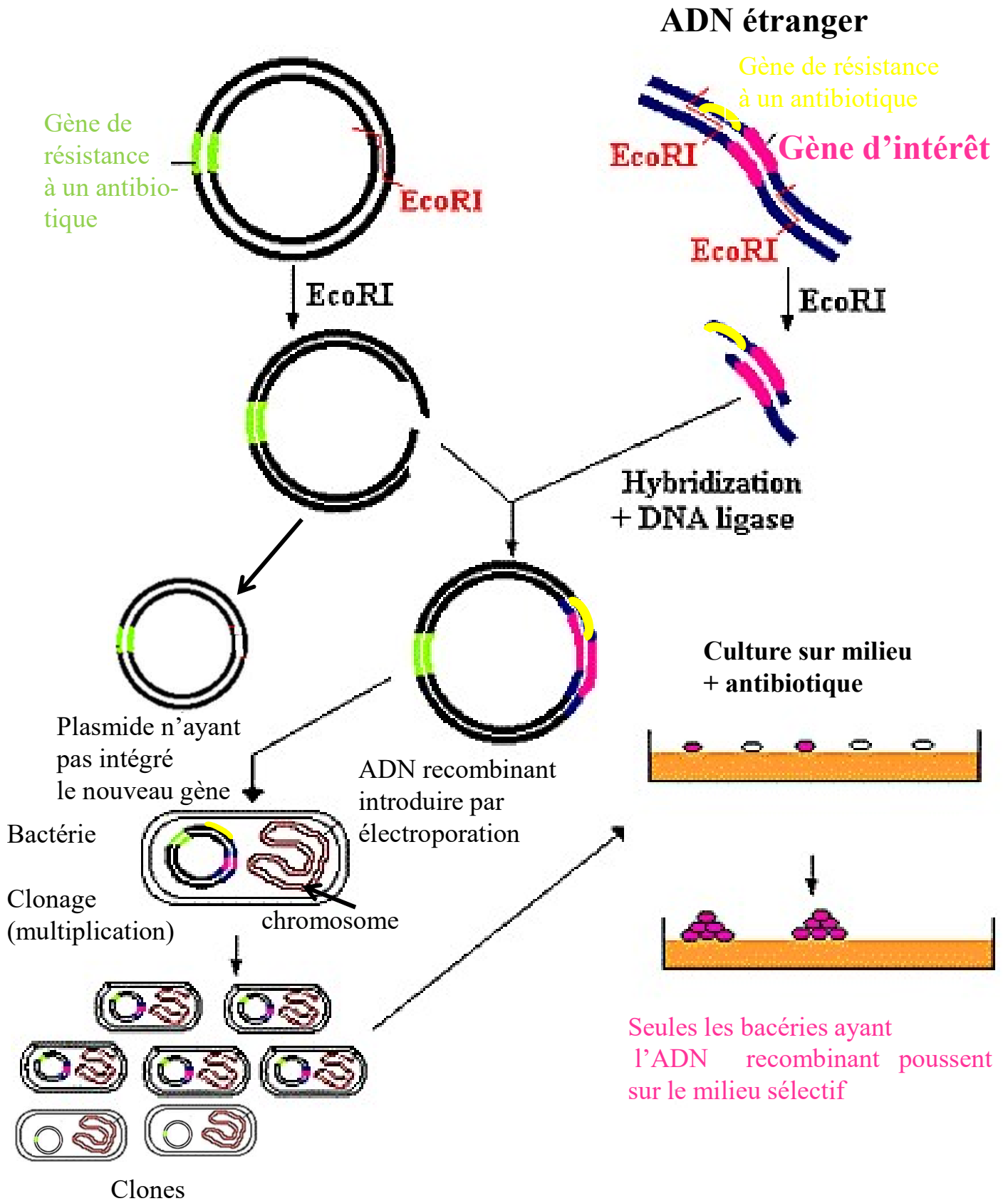
On réalise deux amplifications séparées, chacune avec un oligonucléotide externe et un oligonucléotide portant la mutation. Les deux fragments obtenus séparément sont ensuite amplifiés ensemble avec les deux amorces les plus externes. On digère ensuite les deux extrémités par des enzymes de restriction et on ligature dans le plasmide original.

# Mutagenèse par insertion

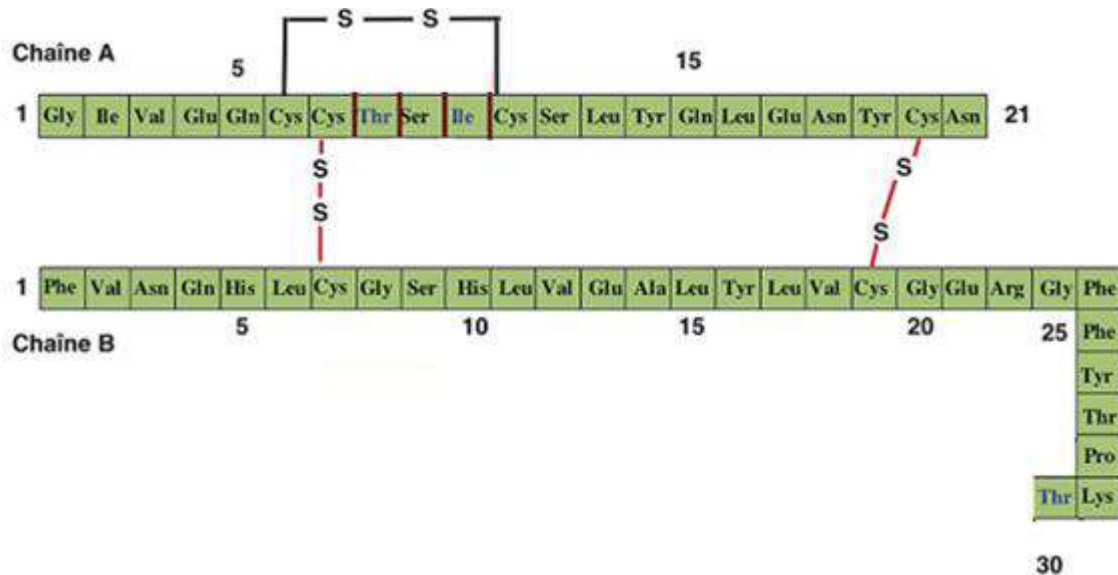
## Utilisation

- d'*Agrobacterium tumefaciens* permet d'insérer d'une manière stable et au hasard des gènes dans le génome des plantes
- de transposons ou de rétrotransposons ce qui a permis de caractériser certains gènes
- d'ARNi (ARN interférant)

# Transformation génétique des bactéries et sélection sur milieu de culture



## Structure primaire de l'insuline humaine



## Production de l'insuline humaine par génie génétique

### Méthode 1. Production de bactéries compétentes

Elle consiste à cultiver les bactéries (généralement *E. coli*) sur un milieu contenant du  $\text{CaCl}_2$  afin de fragiliser leur paroi pour favoriser l'entrée de l'ADN (plasmide recombinant qui porte le gène qui code pour l'insuline).

# Production de l'insuline par génie génétique

## 2. Production séparée des deux chaînes

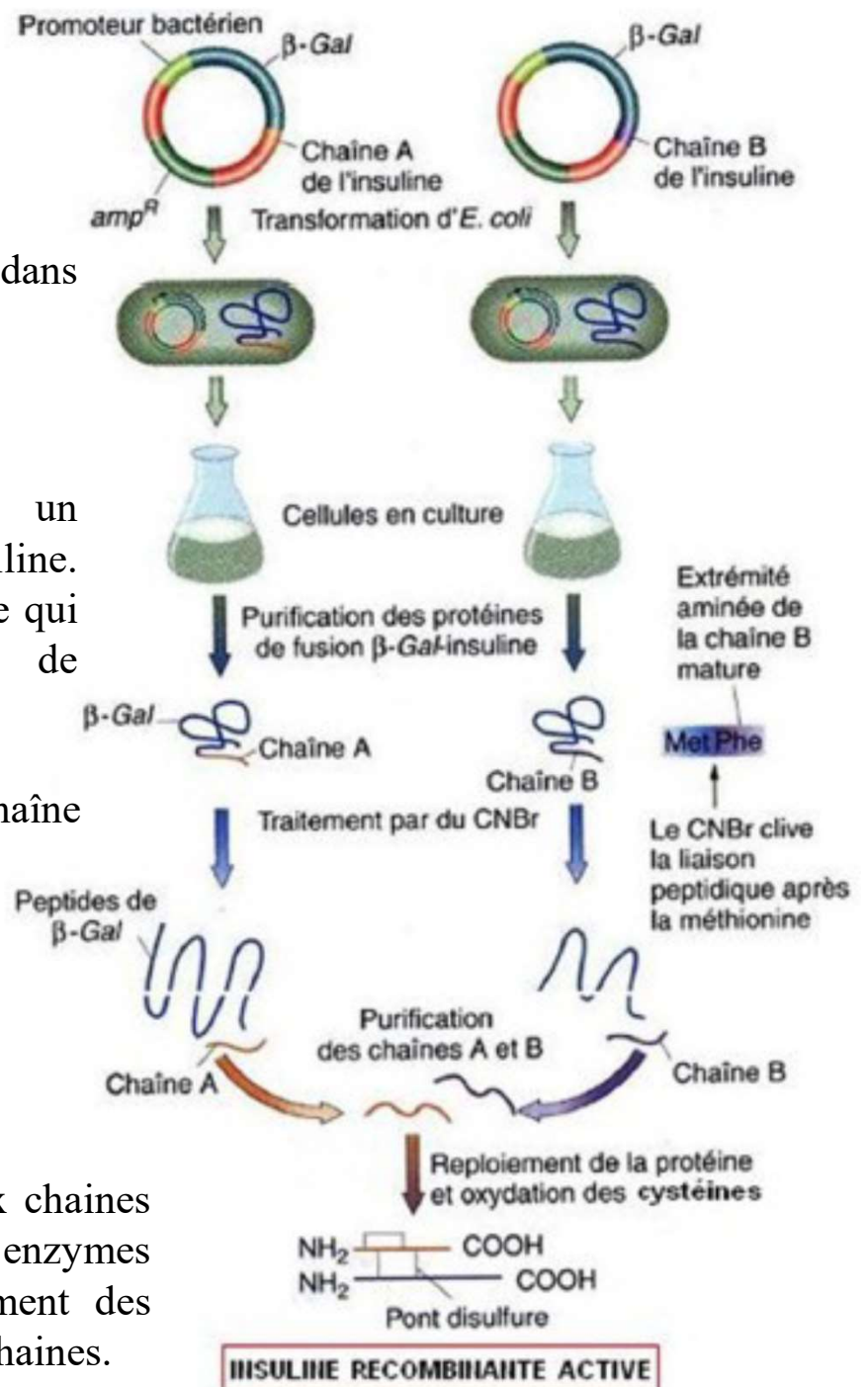
Introduction des plasmides dans des bactéries compétentes

Culture des bactéries dans un milieu contenant de l'ampicilline. On induit l'expression du gène qui code pour chaque chaîne de l'insuline

Extraction de chaque chaîne séparément et clivage

Purification des chaînes A et B

On incube ensemble les deux chaînes A et B en présence d'enzymes appropriées pour l'établissement des ponts disulfures intra et interchaînes.



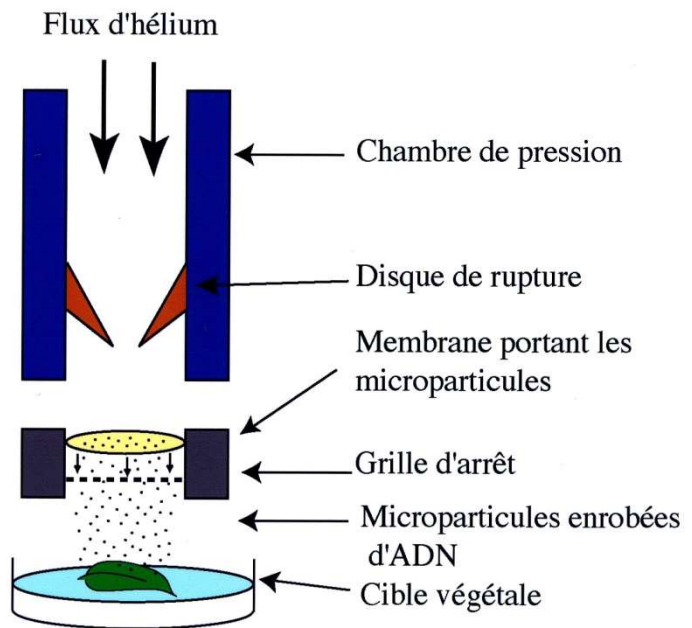
## Méthode 2. Production de la pro-insuline puis élimination du pepti

# Transformation génétique des plantes

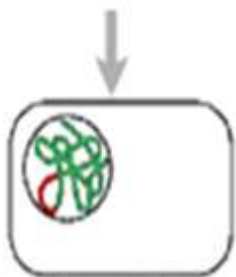
Il existe deux méthodes: méthode directe et méthode indirecte

## 1. Transfert direct d'ADN par canon à particules

Canon à particules



Particule d'or de tungstène enveloppée d'ADN



Cellule ayant Intégré l'ADN étranger



Culture dans un milieu de sélection (antibiotique ou sucre)

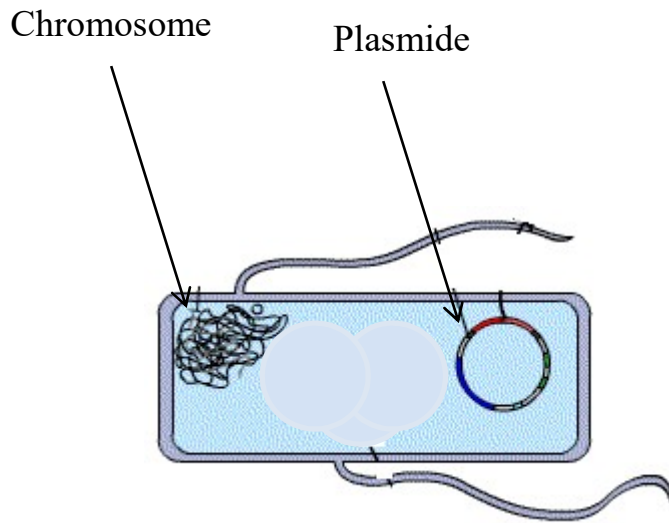


Régénération de plante

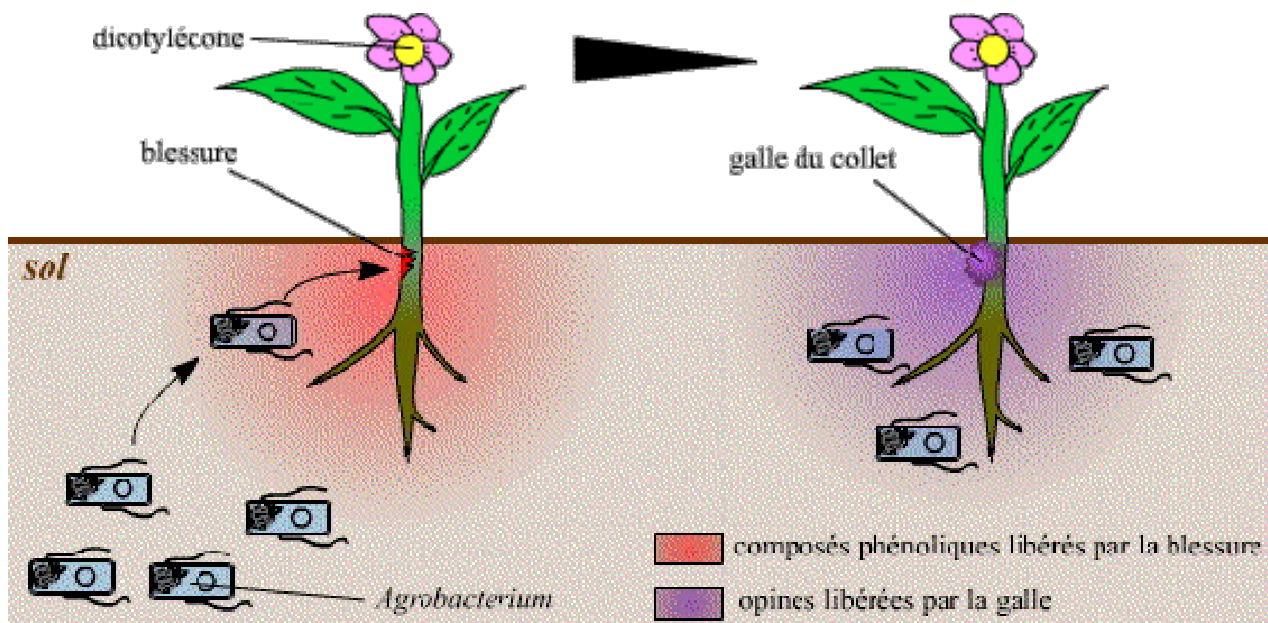


Acclimatation en serre

## 2. Transfert indirect d'ADN par *Agrobacterium tumefaciens*



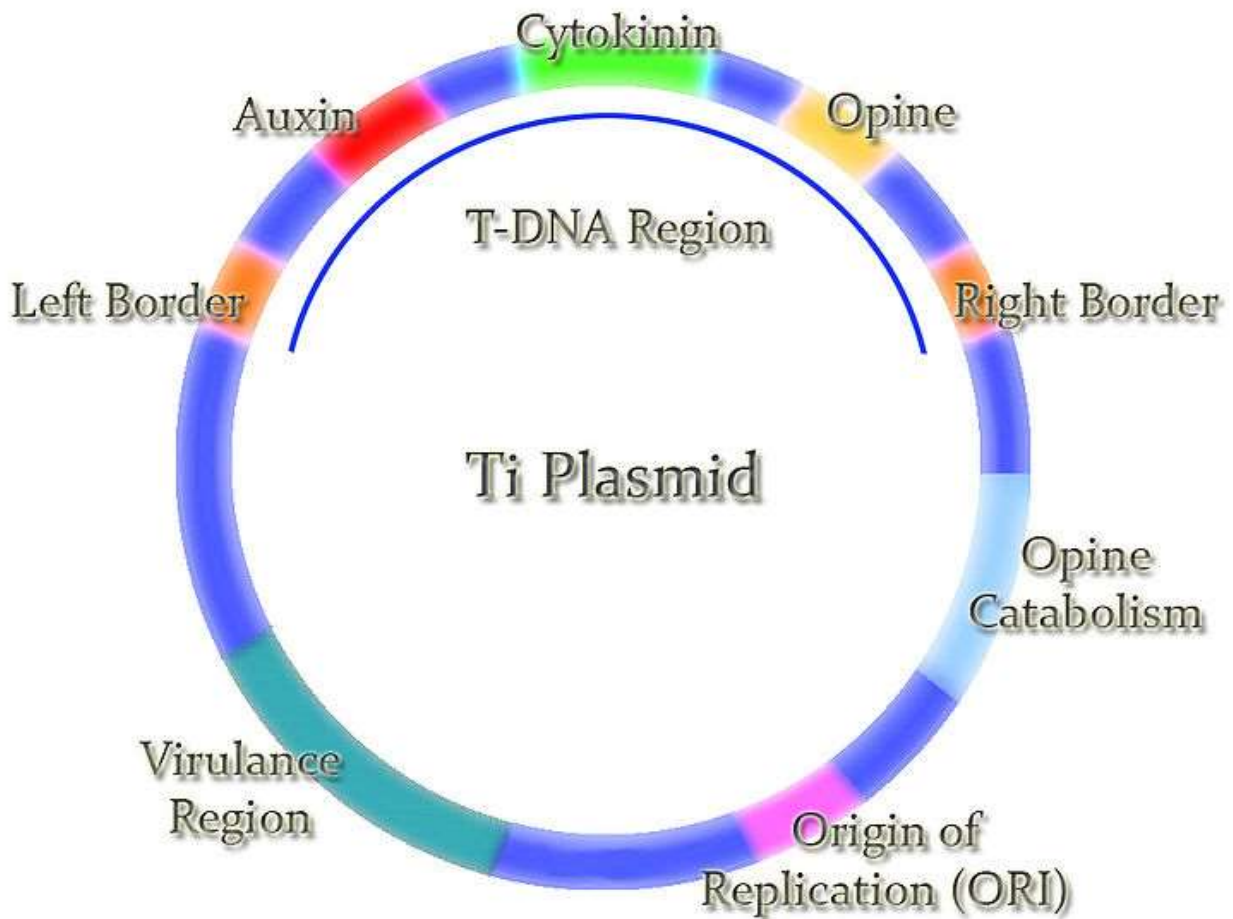
*Agrobacterium* transfère un fragment d'ADN (l'ADN-T) dans le génome de la plante



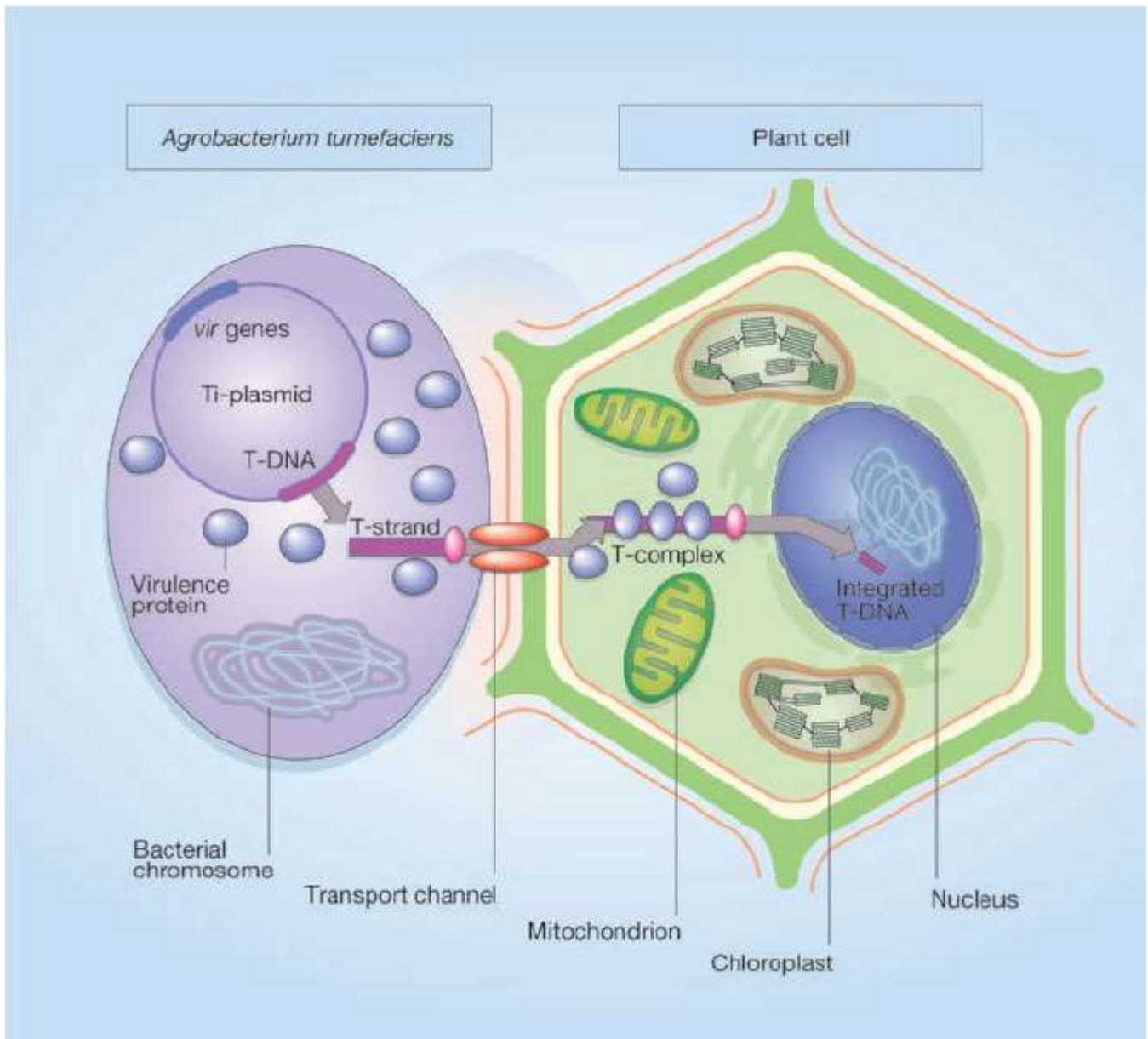
L'infection de la plante par *Agrobacterium tumefaciens* induit le développement d'une galle suite au transfert d'un fragment d'ADN (ADN-T)

Plantes hôtes: en majorité les dicotylédones (mais pas toutes)

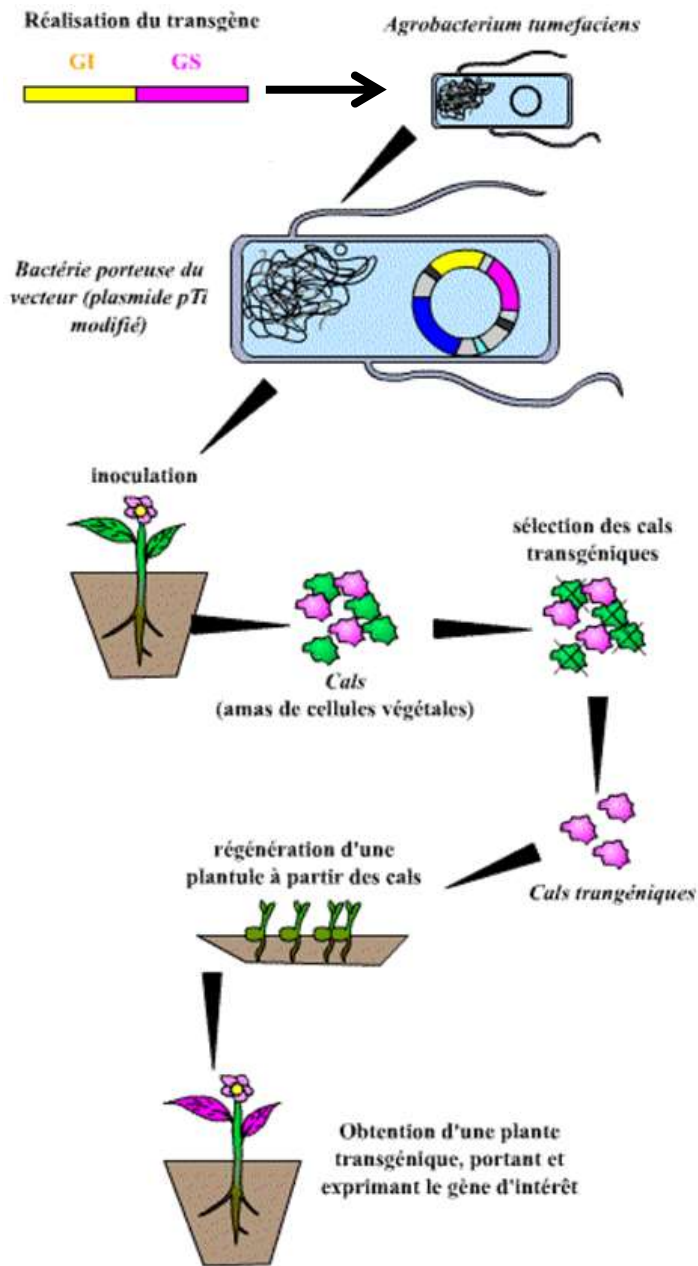
## Carte du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*



## Mécanisme de transfert direct de l'ADN-T



# Processus d'obtention de plantes transgéniques grâce à *A. tumefaciens*



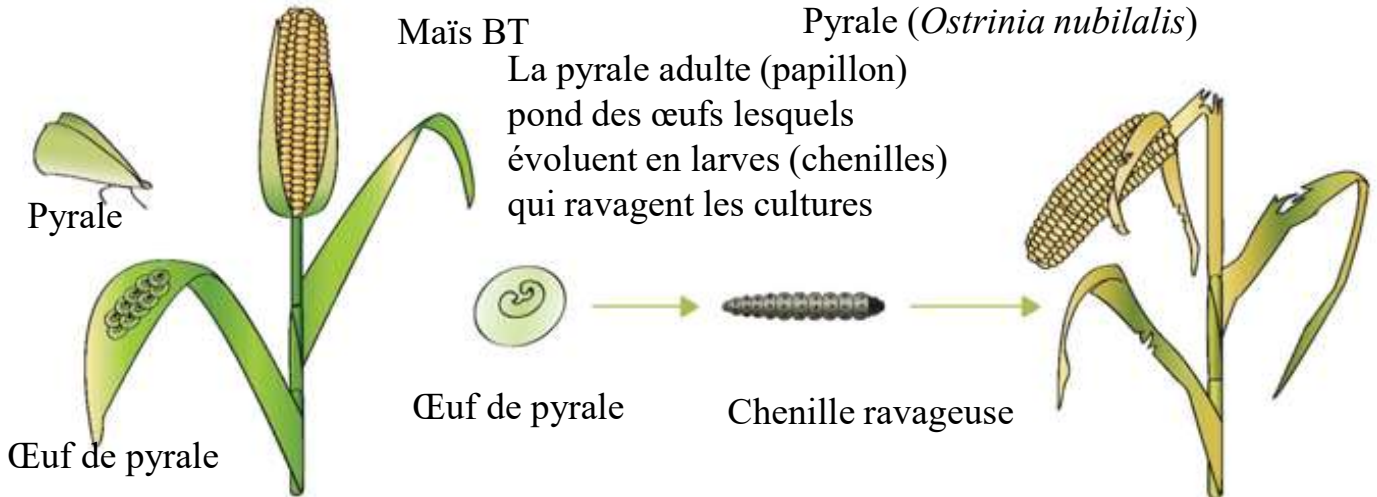
# Application de la transgénèse végétale



Maïs BT

Pyrale (*Ostrinia nubilalis*)

La pyrale adulte (papillon) pond des œufs lesquels évoluent en larves (chenilles) qui ravagent les cultures

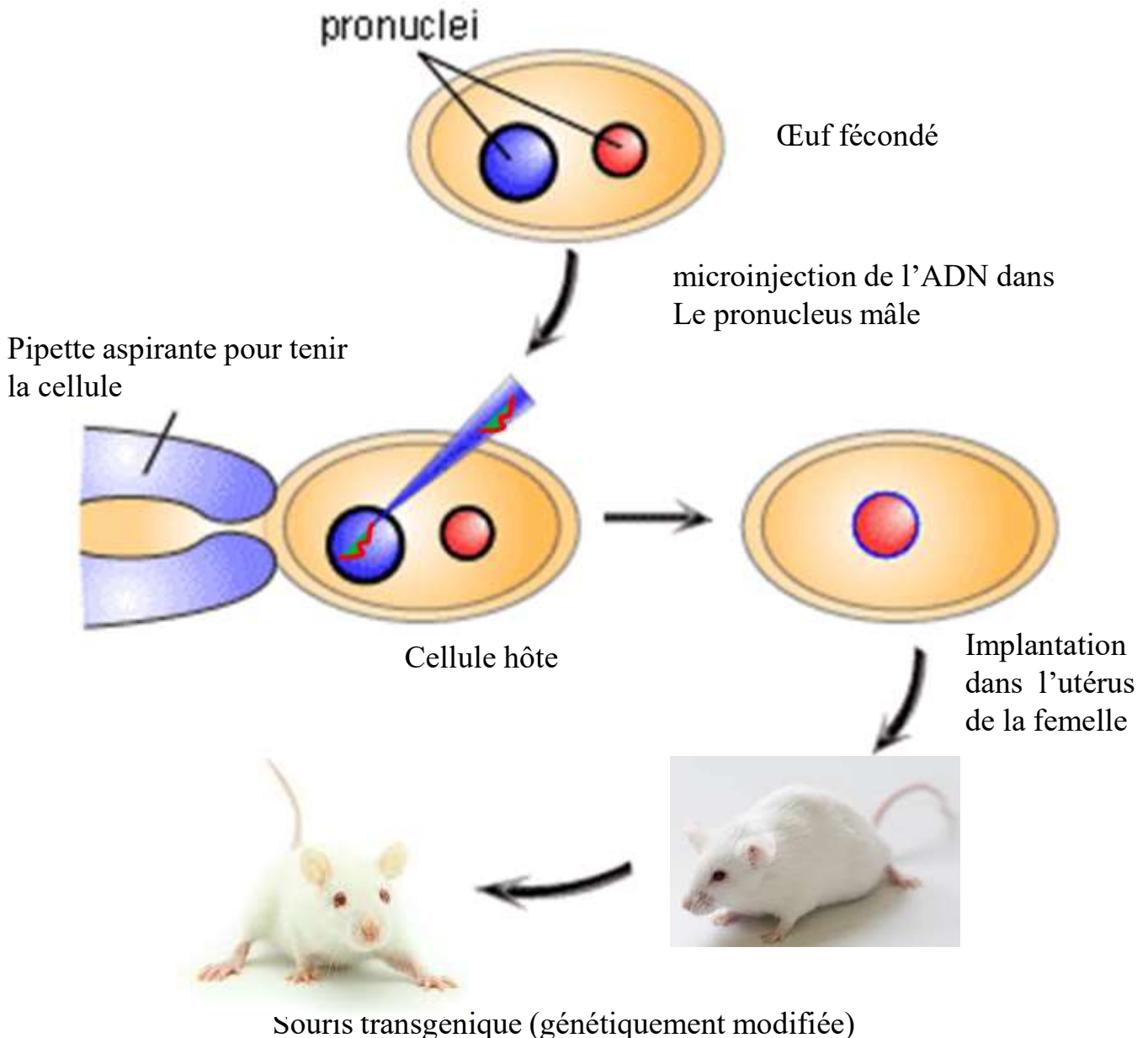


Dégâts de la pyrale sur le maïs

# Transgénèse animale

## 1. Microinjection

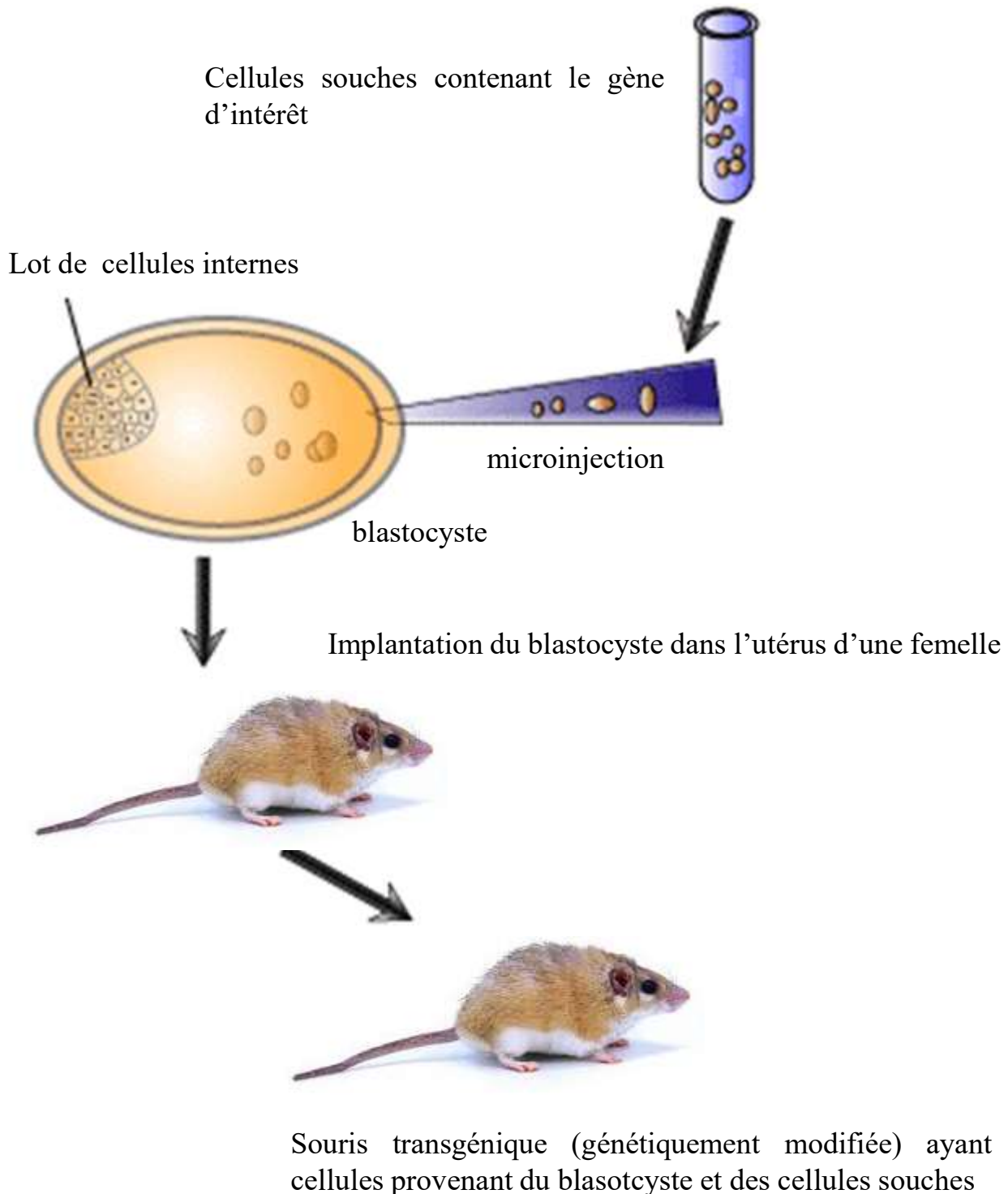
La microinjection est la première technique mise au point pour obtenir des animaux transgéniques. Elle a été mise au point par Gordon et al. en 1980. Après injection dans le pronucleus, l'ADN va s'intégrer dans le génome mais on ne sait pas le site d'intégration du gène étranger



Gordon et al. (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 77: 7380-7384.

## 2. Transfert de gènes dans des cellules souches

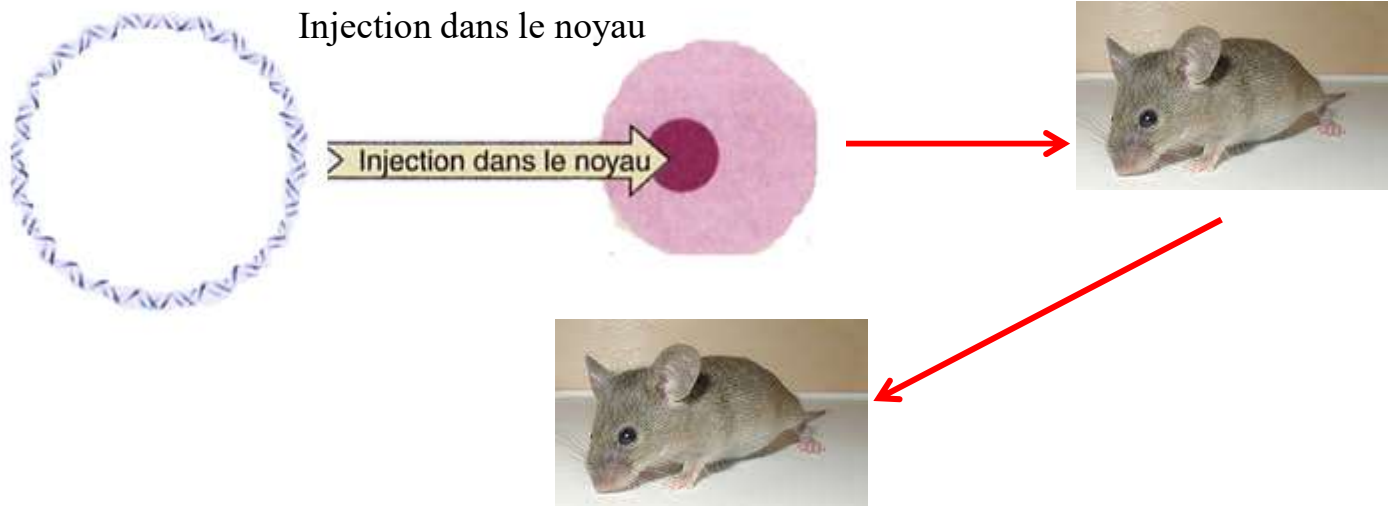
Les cellules souches sont des cellules embryonnaires totipotentes (propriété d'une cellule de se différencier en n'importe quelle cellule pour donner un individu entier). Elles sont isolées à partir de la masse cellulaire interne d'un blastocyste



### 3. Transfection d'embryons précoces avec des vecteurs porteurs d'un gène d'intérêt

Plasmide portant un gène d'intérêt

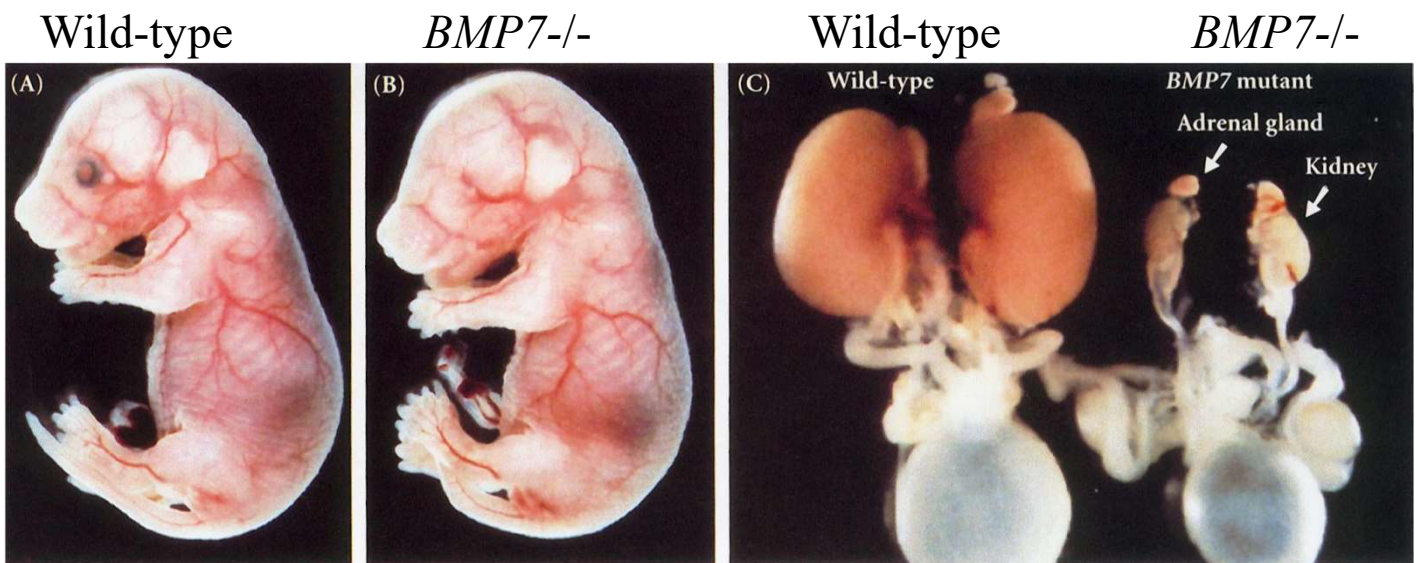
Transfert dans l'utérus d'une souris



Souris transgénique (génétiquement modifiée)

Ex: Etude la fonction d'un gène: Inactivation du gène *BMP-7* par recombinaison homologue

- Agénésie oculaire
- Hypoplasie rénale



(Dudley et al., 1995)

Le gène *BMP7* est nécessaire à l'organogenèse de l'oeil et du rein

## Applications de la transgénèse animale

**Augmentation de la production de lait** chez le porc et la **croissance des descendants** suite à l'introduction du gène  **$\alpha$ -lactalbumine bovine**. **Augmentation de la production accroît la survie des petits**

**Réduction de la pollution par introduction du gène de la phytase (gène bactérien)**. Expression spécifique dans les glandes salivaires d'où digestion de la phytate et moins de pollution par phosphore de l'environnement.

**Réduction du temps d'élevage** suite à une croissance rapide

**Lutter contre le paludisme**

**Mieux comprendre le développement** de certaines maladies et dégager des solutions

Transgenic livestock for agricultural production.

Transgenic trait	Key molecule	Gene transfer method	Species	Reference
Increased growth rate	Growth hormone (GH)	Microinjection	Pig	Nottle et al. (1999)
Increased growth rate	Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)	Microinjection	Pig	Pursel et al. (1999)
Increased level of poly-un-saturated fatty acids in pork	Desaturase (from spinach)	Microinjection	Pig	Saeki et al. (2004)
Phosphate metabolism	Desaturase (from <i>C. elegans</i> )	Somatic cloning	Pig	Lai et al. (2006)
Milk composition	Phytase	Microinjection	Pig	Golovan et al. (2001)
Influenza resistance	$\alpha$ -Lactalbumin	Microinjection	Pig	Wheeler et al. (2001)
	Mx protein (Myxovirus resistance 1, interferon-inducible protein)	Microinjection	Pig	Müller et al. (1992)
Enhanced disease resistance	Immunoglobulin (IgA)	Microinjection	Pig, sheep	Lo et al. (1991)
Wool growth	Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)	Microinjection	Sheep	Damak et al. (1996)
Visna virus resistance	Visna virus envelope	Microinjection	Sheep	Clements et al. (1994)
BSE resistance	Prion protein gene	Somatic cloning	Sheep	Denning et al. (2001)
Milk fat composition	Stearoyl desaturase	Microinjection	Goat	Reh et al. (2004)
Milk composition (increase of whey proteins)	$\beta$ -Casein	Somatic cloning	Cattle	Brophy et al. (2003)
	$\kappa$ -Casein			
Milk composition (increase of lactoferrin)	Human lactoferrin	Microinjection	Cattle	Platenburg et al. (1994)
Mastitis resistance	Lysostaphin	Somatic cloning	Cattle	Wall et al. (2005)
BSE resistance	Prion protein gene	Somatic cloning	Cattle	Richt et al. (2007)
Influenza resistance	Short hairpin RNA	Lentiviral transduction	Chicken	Lyall et al. (2011)