

République Algérienne Démocratique et Populaire
Université Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de Biochimie et de Biologie Moléculaire et Cellulaire
Biochimie Option Biochimie appliquée

Module:

**Production de protéines et d'enzymes
recombinantes**

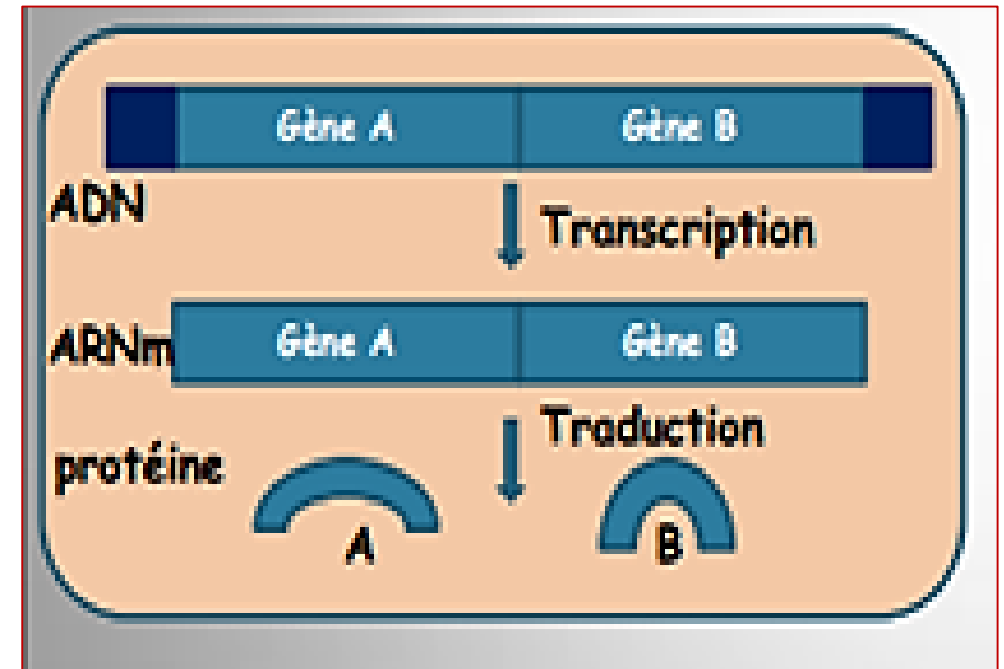
Niveau Master II

Par: Dr. MEDOUKALI I.

Différences et similitudes entre le génome procaryote et le génome eucaryote

Chez les eucaryotes comme chez les procaryotes, un **ADN double brin** est le **support** moléculaire de l'**information génétique**. La transmission des génomes procaryotes et eucaryotes se fait selon un processus commun : la réplication semi-conservative de l'ADN.

- **Chez les procaryotes**
 - Absence de noyau (on parle de nucléoïde),
 - **ADN circulaire**. Il est directement diffus dans le cytoplasme
 - Il existe un **chromosome unique** + un plasmide (circulaire, structure facultative).
 - L'ADN est associé à des protéines non-histones.
 - L'ADN procaryote présente une seule origine de réplication (Ori C)
 - Toutes les régions d'ADN sont codantes

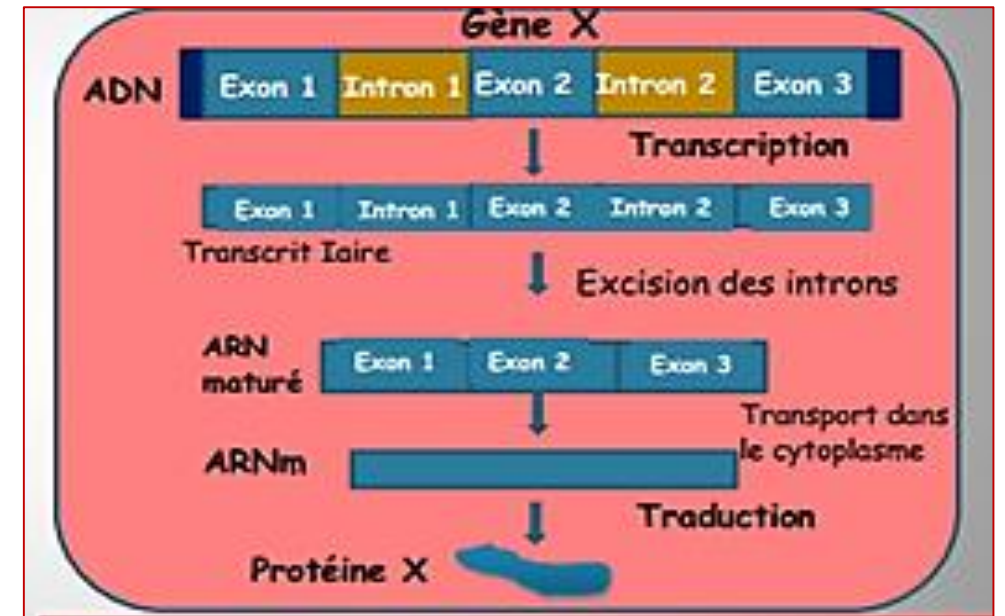


Différences et similitudes entre le génome procaryote et le génome eucaryote

Chez les eucaryotes comme chez les procaryotes, un **ADN double brin** est le **support moléculaire de l'information génétique**. La transmission des génomes procaryotes et eucaryotes se fait selon un processus commun : la réplication semi-conservative de l'ADN.

- **Chez les eucaryotes**

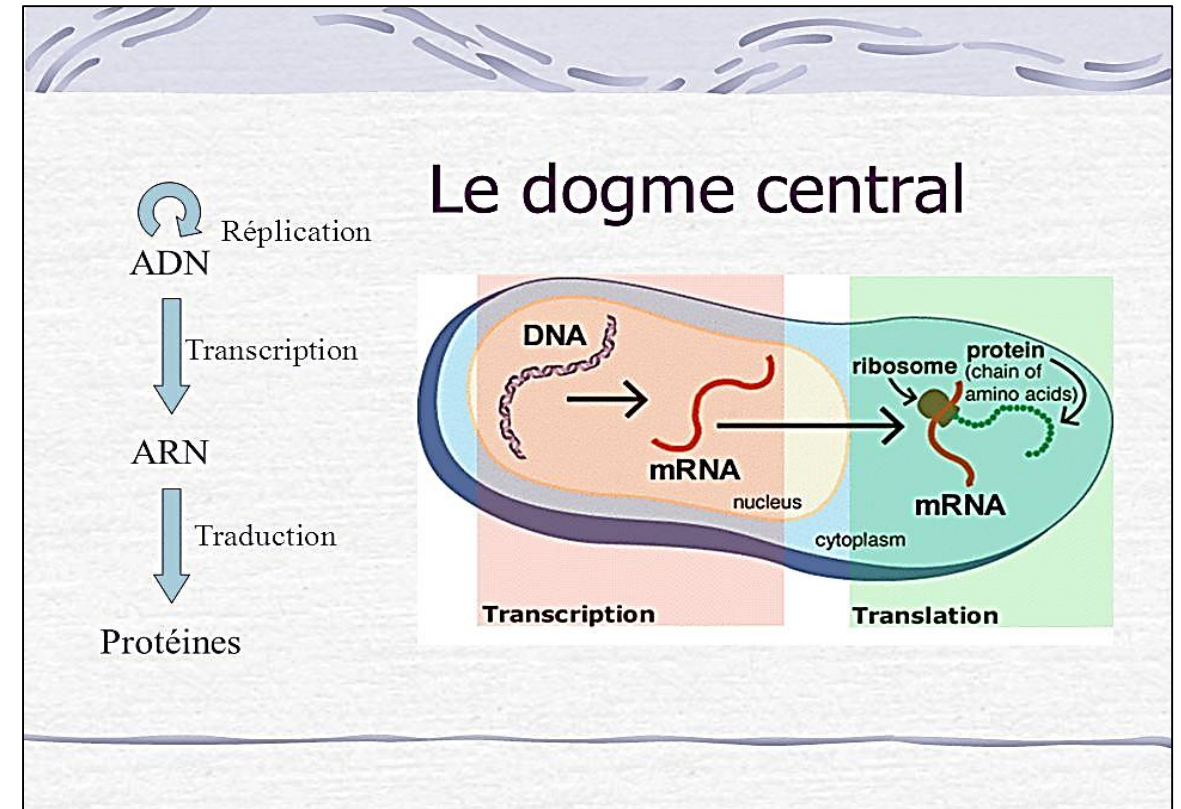
- Présence d'un « vrai » noyau délimité par une membrane nucléaire
- **ADN linéaire** individualisé sous forme de chromosomes dans le noyau.
- Plusieurs chromosomes nucléaires + génomes mitochondriaux et chloroplastiques
- ADN toujours associés à des protéines de type histones
- Un génome quantitativement plus important chez les eucaryotes
- L'ADN eucaryote peut être répliqué à plusieurs endroits en même temps, sans cela sa réplication durerait 800 heures
- Plusieurs copies possibles de chaque chromosome (suivant la ploïdie), une grande quantité de séquences non codantes. Organisation en introns et exons.



Le dogme central de la biologie moléculaire

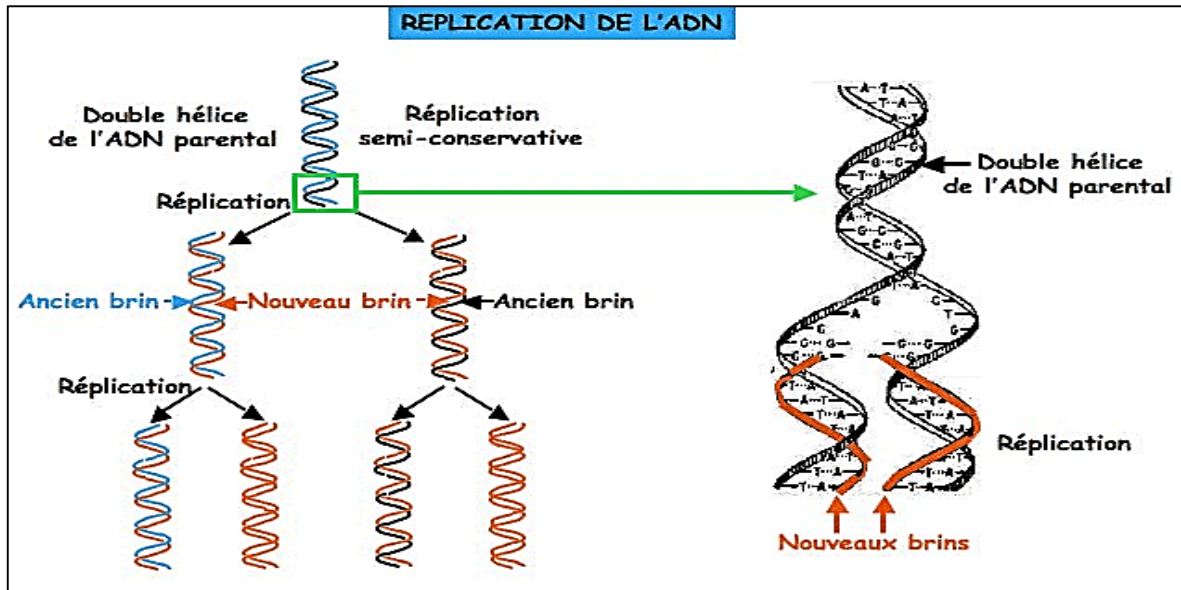
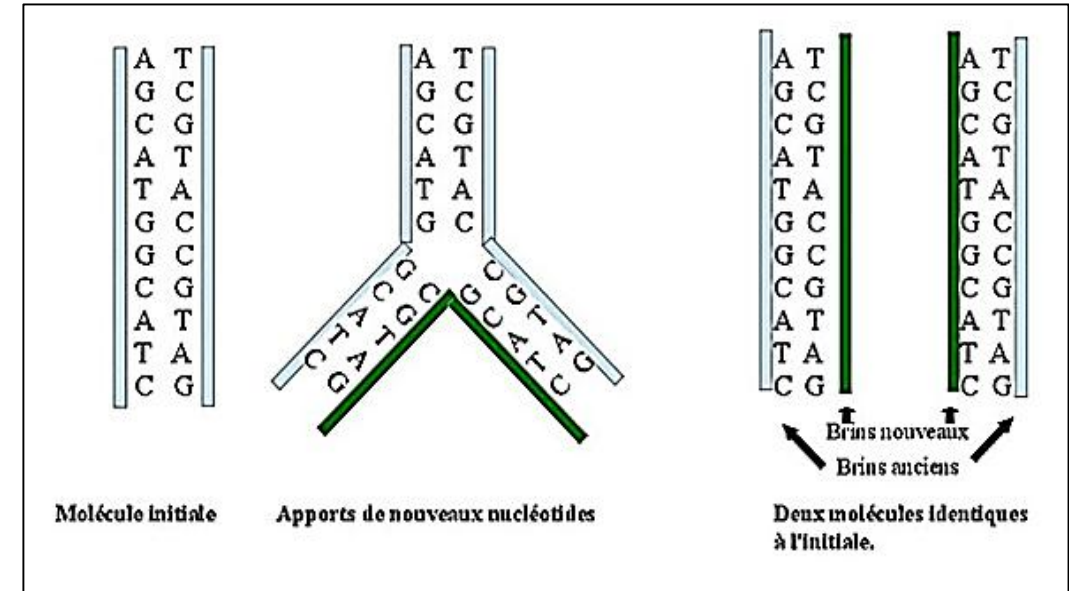
Selon le dogme central de la biologie moléculaire, le flux d'information génétique de l'ADN aux protéines suit une voie à sens unique :

- Dans la **réplication**, l'information passe d'une molécule d'**ADN** à d'autres molécules d'**ADN**.
- Dans la **transcription**, l'information passe de l'**ADN** à l'**ARN**.
- Dans la **traduction**, l'information passe de l'**ARN** aux **protéines**



Réplication de l'ADN

- séparation des deux brins d'ADN parental.
- Chaque brin servira de modèle pour la synthèse d'un nouveau brin complémentaire.
- On obtient donc deux molécules d'ADN identiques, chacune des deux contenant un brin parental et un brin fils.

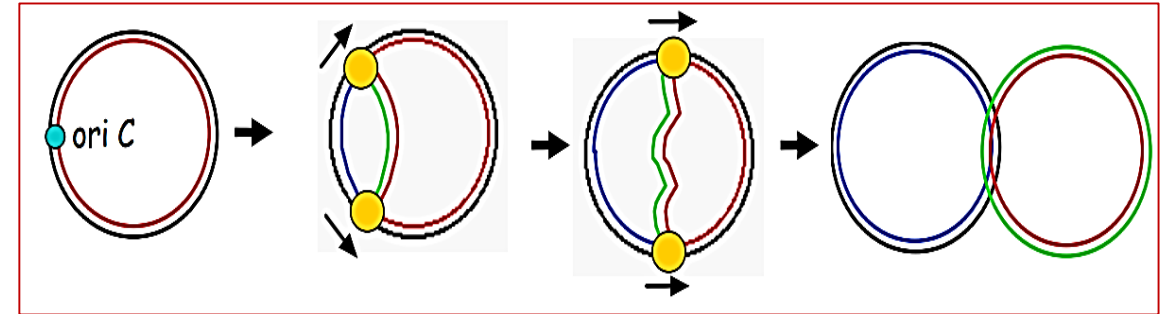


Sur les deux brins de toute molécule d'ADN, il y a toujours :

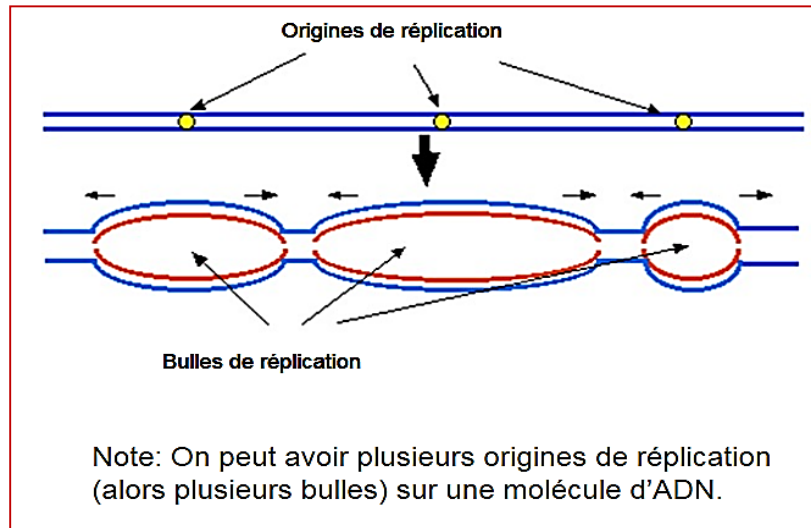
- Un **brin d'ADN ancien** qui provient de l'un des 2 brins d'ADN parental.
- Un **brin d'ADN jeune**, nouvellement formé.

Réplication de l'ADN

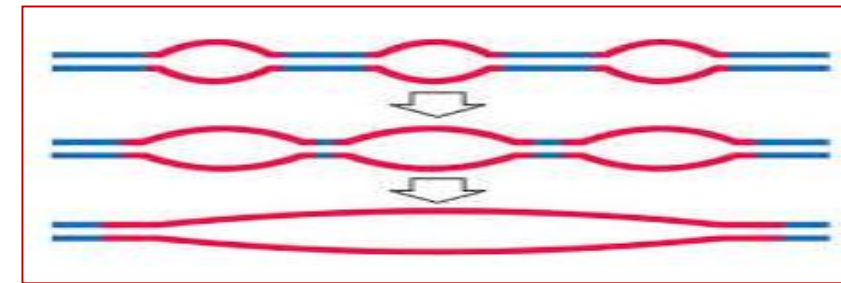
Chez les procaryotes
la réplication débute en un point précis du chromosome dit point **d'initiation** ou **origine de la réplication (ORI)**.



Point d'initiation ou origine de la réplication



Chez les eucaryotes



La réplication progresse de façon bidirectionnelle, jusqu'à ce que les deux réplicons adjacents entrent en contact et que l'ensemble de l'ADN soit dédoublé.

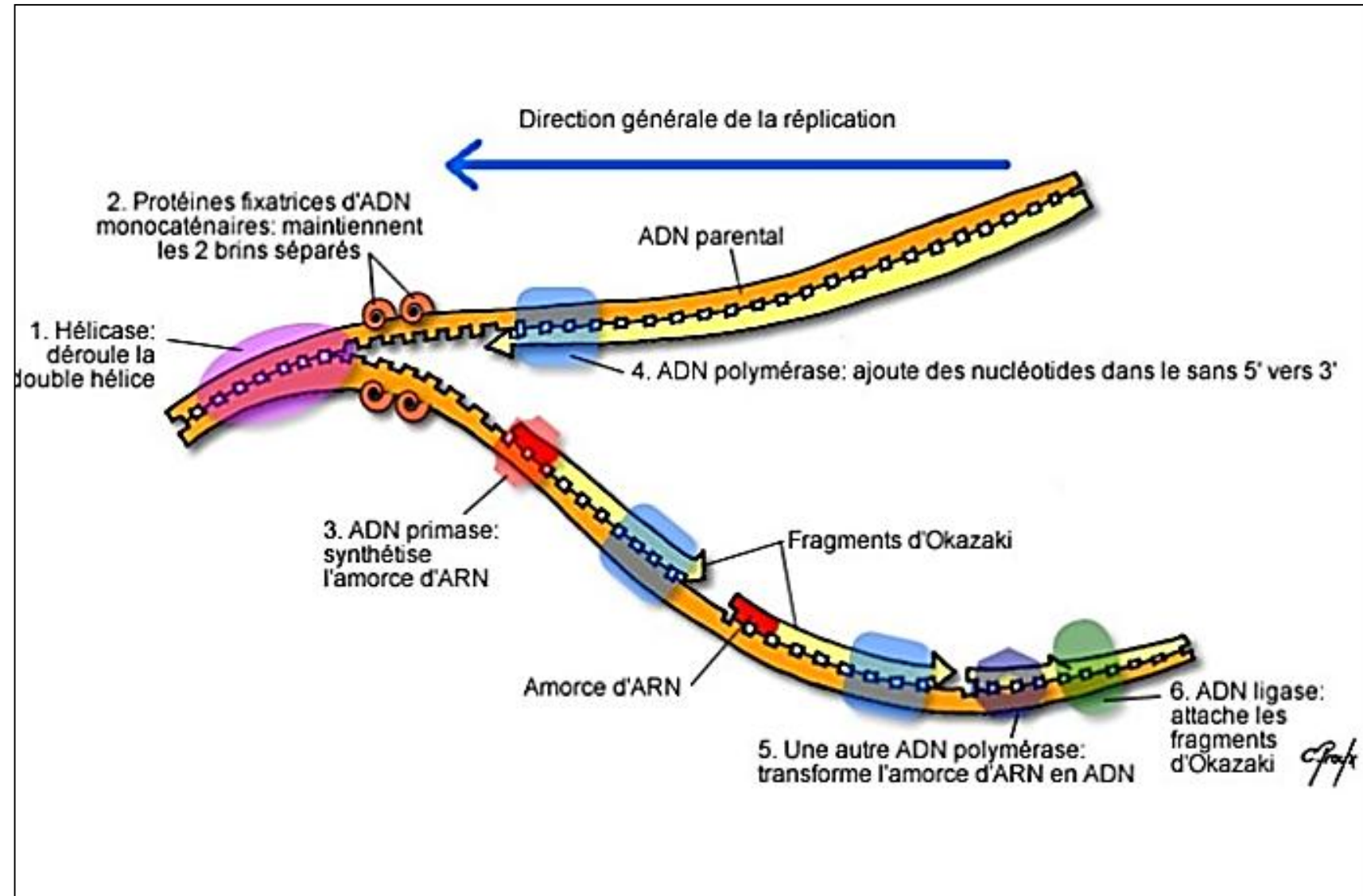
Réplication de l'ADN

➤ Les 3 phases de la réplication

- **Activation** : Les enzymes séparent les deux brins pour ouvrir **une bulle de réplication**. Les **protéines fixatrices** se lient aux brins exposés et les gardent séparés en bloquant la formation des liaisons hydrogènes

- **Elongation** : L'ADN polymérase utilise les brins parents comme matrice et commence à ajouter un nucléotide à la fois pour créer un nouveau brin complémentaire du brin existant. une **ligase** lie les fragments d'Okazaki pour créer un nouveau brin d'ADN continu

- **Achèvement** : Si l'ADN polymérase trouve une erreur, elle la remplace avec les nucléotides corrects. Les brins parentaux et les brins fils se reforment en hélice.



La transcription

LES DIFFERENTS TYPES D'ARN

Les cellules contiennent essentiellement quatre types d'ARN:

- Les ARN ribosomiques (ou rARN).
- Les ARN de transfert (ou tARN).
- Les ARN messagers (ou mARN).
- Les ARN nucléaires de petite taille (ou snRNA)(ou small nuclear RNA)(snRNA).

De nouvelles classes de petits ARNs :

- snoARN ou small nucleolar RNA ou petit ARN nucléolaire
- Les microARN (ARNmi) et les petits ARN interférents (ARNsi: small interfering RNA) qui remplissent de nombreuses fonctions, en particulier celle de l'inhibition post-transcriptionnelle des gènes.

Dans la cellule, les rARN sont les plus abondants (au moins 80% de l'ensemble des ARN de la cellule) alors que les ARNt ne représente que 16% et les ARNm 2% et les snRNA les moins abondants.

La transcription

LES ARN MESSAGERS (mARN)

- Les ARN messagers (ou mARN) constituent le support essentiel de l'information génétique entre l'ADN et le ribosome où s'effectuera la synthèse protéique.
- Leur durée de vie est très courte à la différence des tARN par exemple. Chez les bactéries, la durée de vie d'un mARN est de quelques minutes environ et quelques heures chez les eucaryotes) ;. Les mARN sont très rapidement synthétisés et dégradés.
- Ils sont formés d'une seule chaîne de nucléotides avec les bases communes aux ARN: A, U, C et G.
- leurs tailles sont très hétérogènes.
- Cette chaîne comporte une succession de triplets nucléotidiques.
- Chaque triplet nucléotidique constitue un codon spécifique d'un acide aminé donné.

La transcription

LES ARN DE TRANSFERT (ARNt)

Les tARN sont les vecteurs qui vont transférer les acides aminés jusqu'à l'usine ribosome où s'effectue la synthèse protéique.

- La structure spatiale des tARN: Les chaînes de tARN sont constituées d'une centaine environ de nucléotides qui se replient pour donner un aspect général en forme de trèfle.

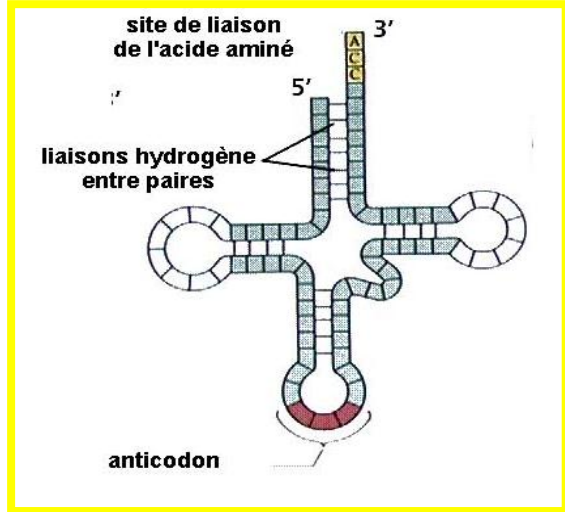
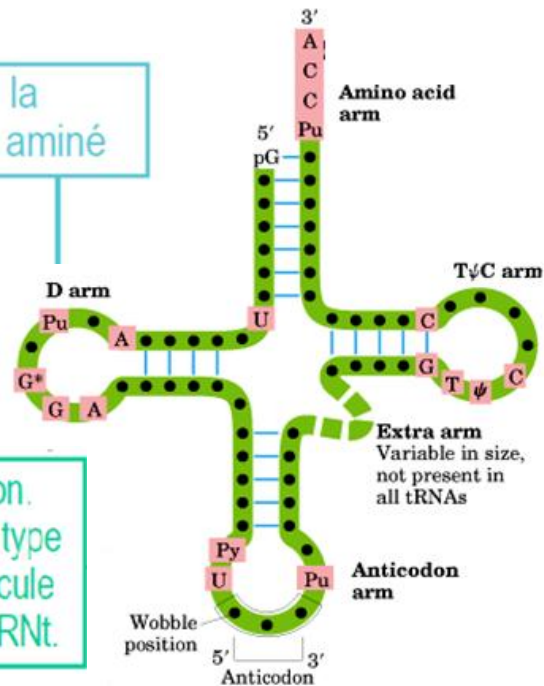


Boucle pour l'enzyme aidant la liaison de l'ARNt à son acide aminé

Site de liaison pour un acide aminé «spécifique»

Boucle qui se fixe au ribosome

- Boucle contenant l'anticodon.
- Partie spécifique à chaque type d'ARNt, le reste de la molécule étant identique pour tous ARNt.



La transcription

Les ARN ribosomiques ARNr

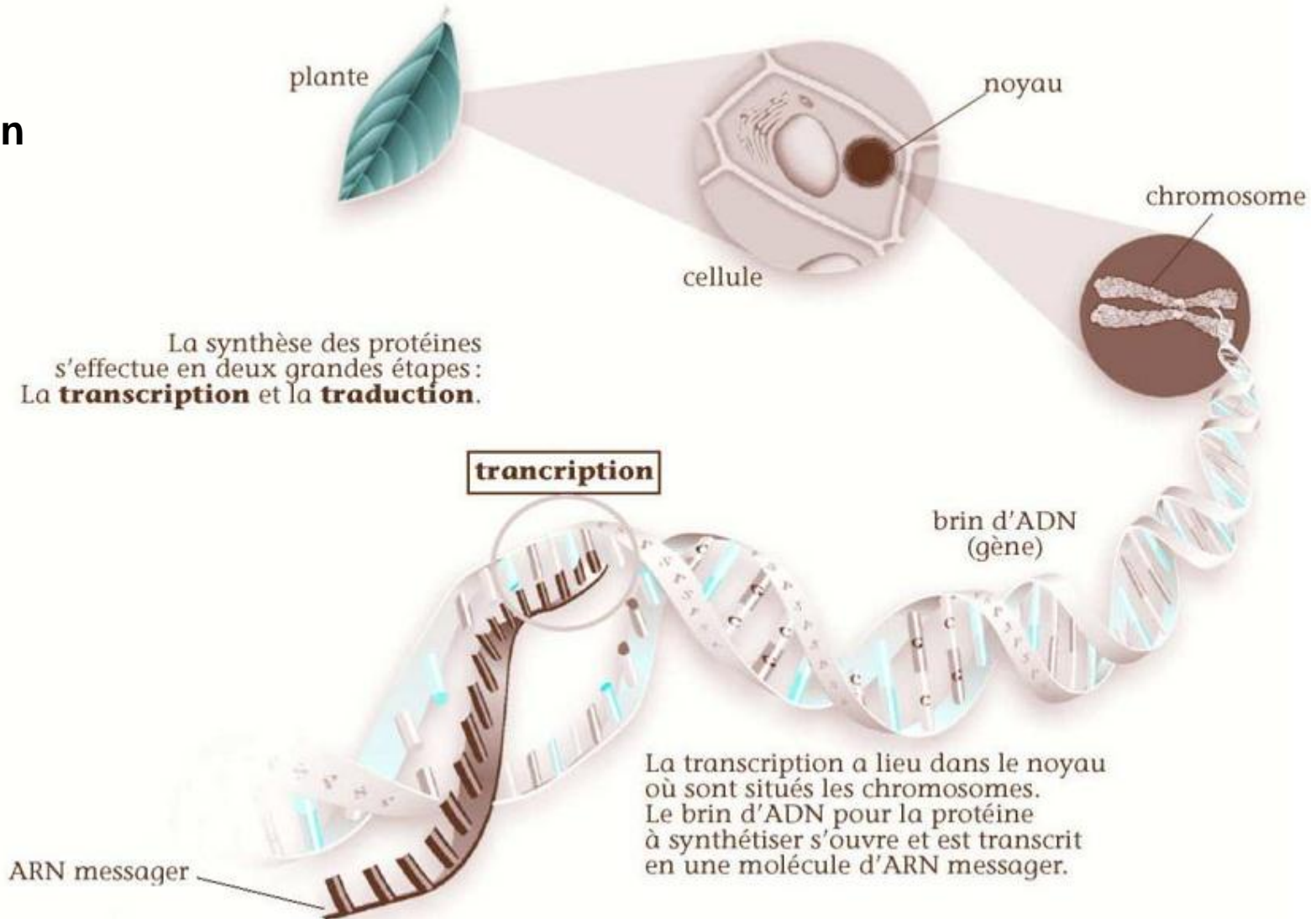
- Représentent environ 80% des ARN cellulaires totaux.
- Riche en G et C.
- Ils constituent les ribosomes.
- Les ribosomes sont des organites intra-cellulaires situés dans le cytoplasme (également dans les mitochondries) et qui sont l'usine de fabrication des protéines de la cellule.
- On peut distinguer les rARN des procaryotes (E. coli) et les rARN des eucaryotes.

La transcription

Éléments nécessaires à la transcription

La transcription nécessite trois composants essentiels :

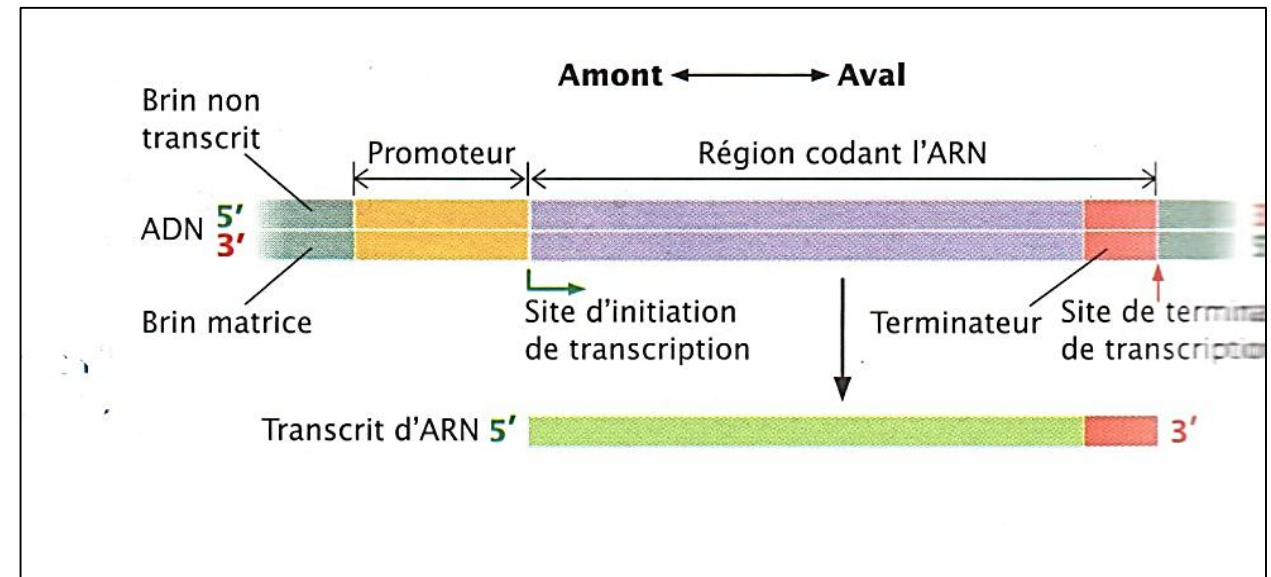
- Une **matrice d'ADN**
- Les matériaux de base (**les substrats**) pour produire une nouvelle molécule d'ARN
- Le **système de transcription**, comprenant les protéines nécessaires pour catalyser la synthèse d'ARN



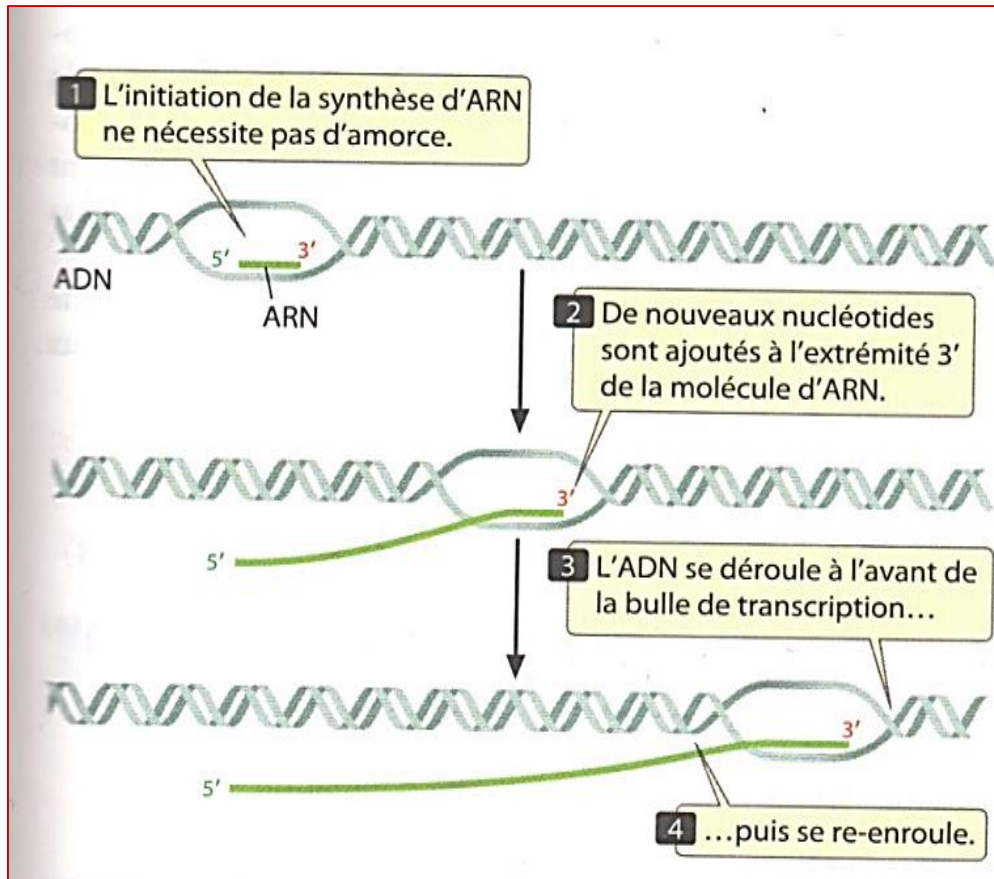
La transcription

- Le **promoteur** : une séquence d'ADN que le système de transcription reconnaît et à laquelle il se lie. Il indique le brin d'ADN qui doit être transcrit et le sens de la transcription. Il détermine aussi les sites d'initiation de la transcription, le premier nucléotide qui sera transcrit en ARN. Dans la plupart des unités de transcription, le promoteur est localisé à côté du site d'initiation de transcription, mais n'est pas, lui-même, transcrit.
- La **région codant l'ARN** : la séquence d'ADN qui est effectivement transcrite en molécule d'ARN.
- Le **terminateur** : une séquence nucléotidique qui signale l'endroit où doit s'arrêter la transcription. Les terminateurs font généralement partie de la séquence codante

L'unité de transcription

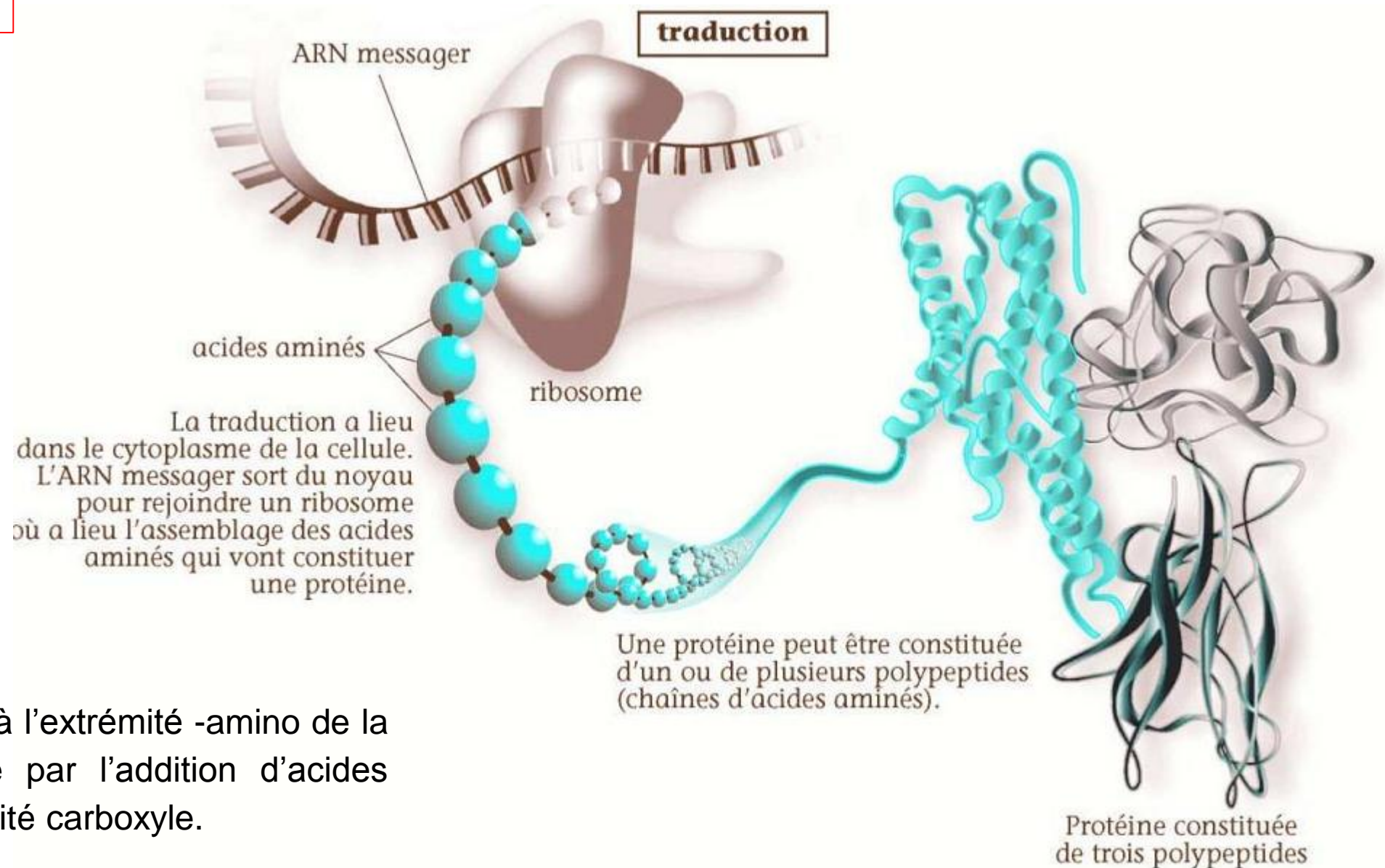


La transcription



- **Exemples de modifications post-transcriptionnelles**
 - La **méthylation** : addition d'un ou plusieurs groupements méthyl sur la base ou le sucre. Par exemple la méthylation de la guanosine donne la 7-méthylguanosine ;
 - La **désamination** : élimination d'un groupement aminé ($-\text{NH}_2$) de la base. Par exemple la désamination de l'adénosine donne l'inosine ;
 - La **substitution d'un S** : remplacement d'un oxygène par un soufre. Par exemple la 4-thiouridine ;
 - L'**isomérisation d'une base** : changement de position des atomes sur le noyau d'une base. Par exemple l'isomérisation de l'uridine donne la pseudo-uridine. ;
 - La **saturation d'une double liaison** : transforme une double liaison en simple liaison. Par exemple la conversion de l'uridine en dihydro-uridine ;
 - Le **changement de nucléotides** : remplace le nucléotide existant par un nouveau nucléotide.

La traduction



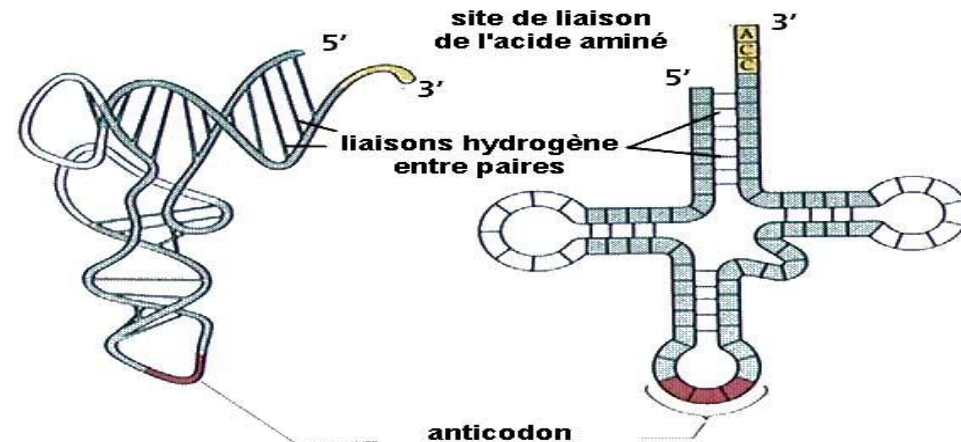
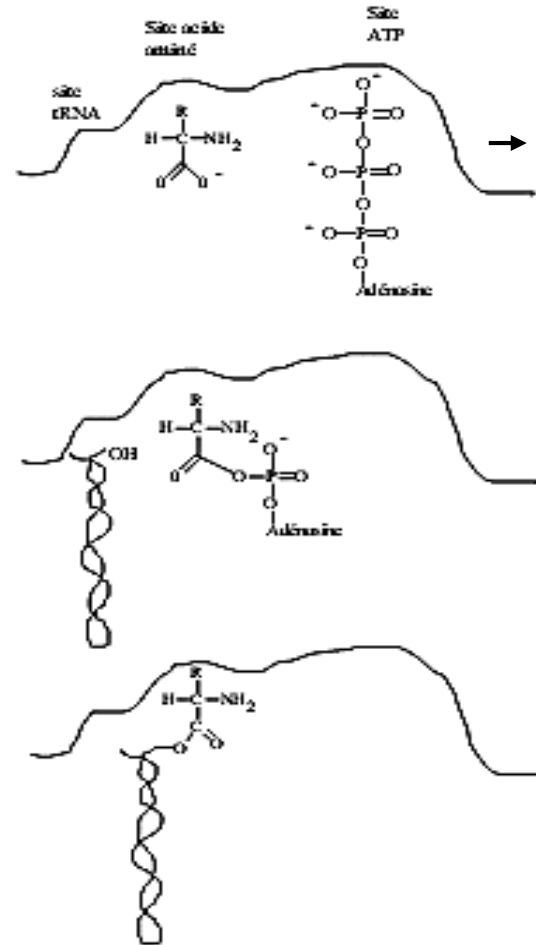
La synthèse débute à l'extrémité -amino de la protéine et procède par l'addition d'acides aminés à son extrémité carboxyle.

La traduction

La liaison des acides aminés aux ARNt

Chaque ARNt est spécifique d'un acide aminé. La formation du complexe amino-acyl-tARN (aa-tARN) nécessite une **Amino-acyl-tRNA-synthétase**. Chaque synthétase reconnaît un acide aminé spécifique et qui doit ainsi reconnaître toutes les formes de codon de cet acide aminé. L'acide aminé (aa) est tout d'abord activé et cette activation nécessite de l'énergie sous forme d'ATP pour permettre la formation d'aa-AMP (liaison anhydride mixte).

Le bilan global de la réaction est :



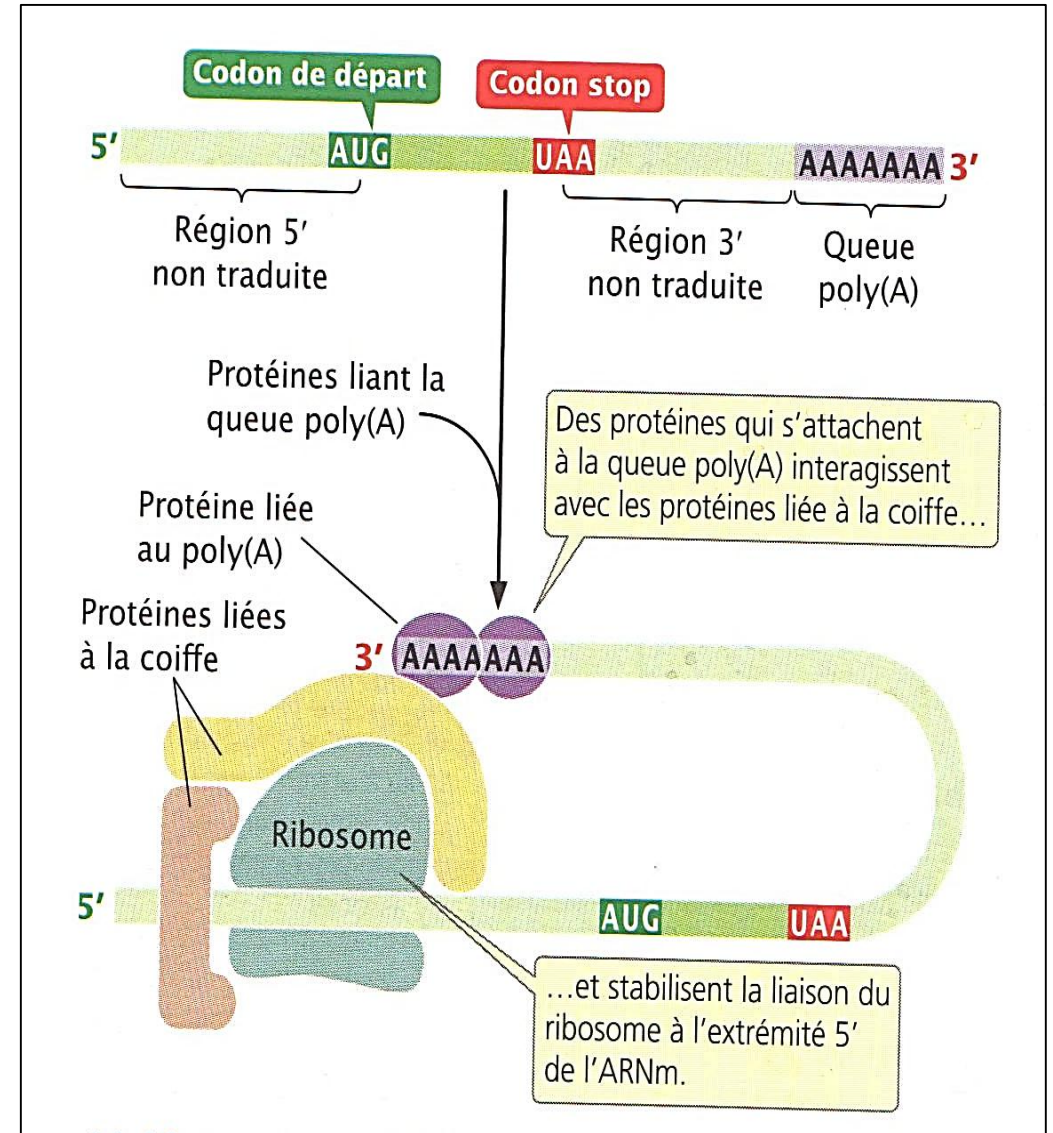
La traduction

• L'initiation de la traduction

L'initiation comporte 3 stades principaux.

- un ribosome reconnaît le début de la séquence codante (AUG).
- Ensuite, l'ARNt initiateur se lie à l'ARNm au niveau du codon d'initiation. Il y a appariement antiparallèle de bases entre l'ARNm et la petite sous-unité (30S) du ribosome, dû à une complémentarité de séquences entre l'ARNm et l'ARNr 16S. l'ARNm s'attache à la petite sous-unité du ribosome. Enfin, la grande sous-unité du ribosome s'unit au complexe d'initiation.
- C'est la **coiffe** à l'extrémité 5' de l'ARNm eucaryotique qui joue un rôle essentiel dans l'initiation de la traduction. La petite s/unité du ribosome, assistée par des facteurs d'initiation, reconnaît la coiffe 5' et s'y lie ; la petite s/unité balaie alors l'ARNm à la manière d'un scanner, jusqu'à ce qu'elle repère le 1^{er} codon AUG.

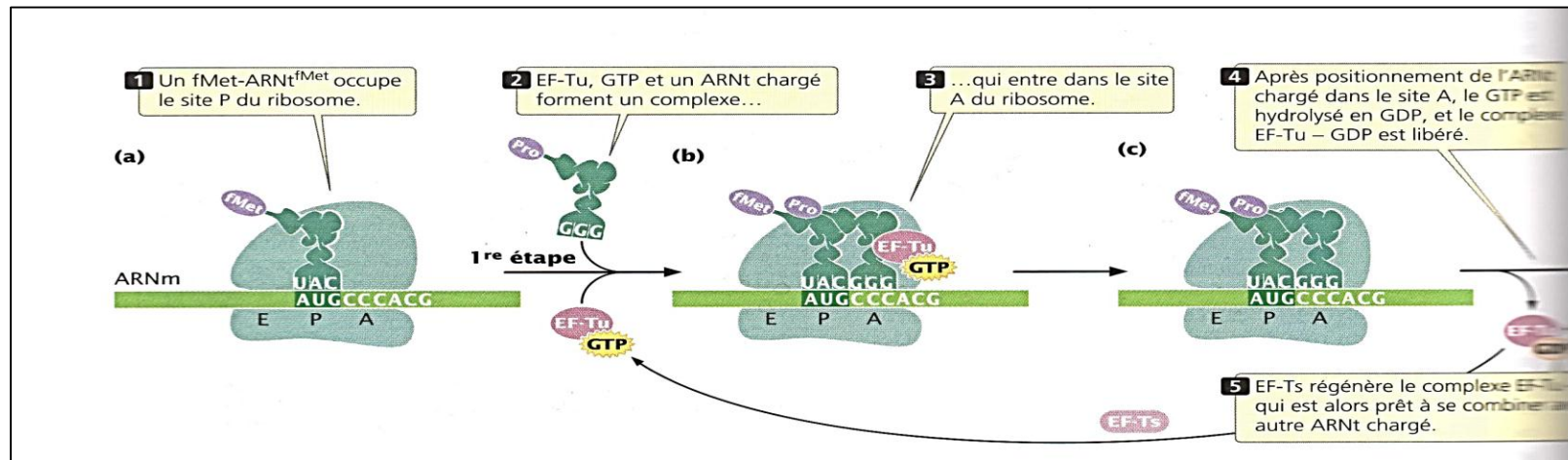
La queue poly(A) à l'extrémité 3' de l'ARNm eucaryotique joue aussi un rôle dans l'initiation de la traduction. Des protéines qui s'attachent à la queue poly(A) interagissent avec des protéines liant la coiffe 5', renforçant la liaison de la petite s/unité du ribosome à l'extrémité 5' de l'ARNm.



La traduction

• L'élongation

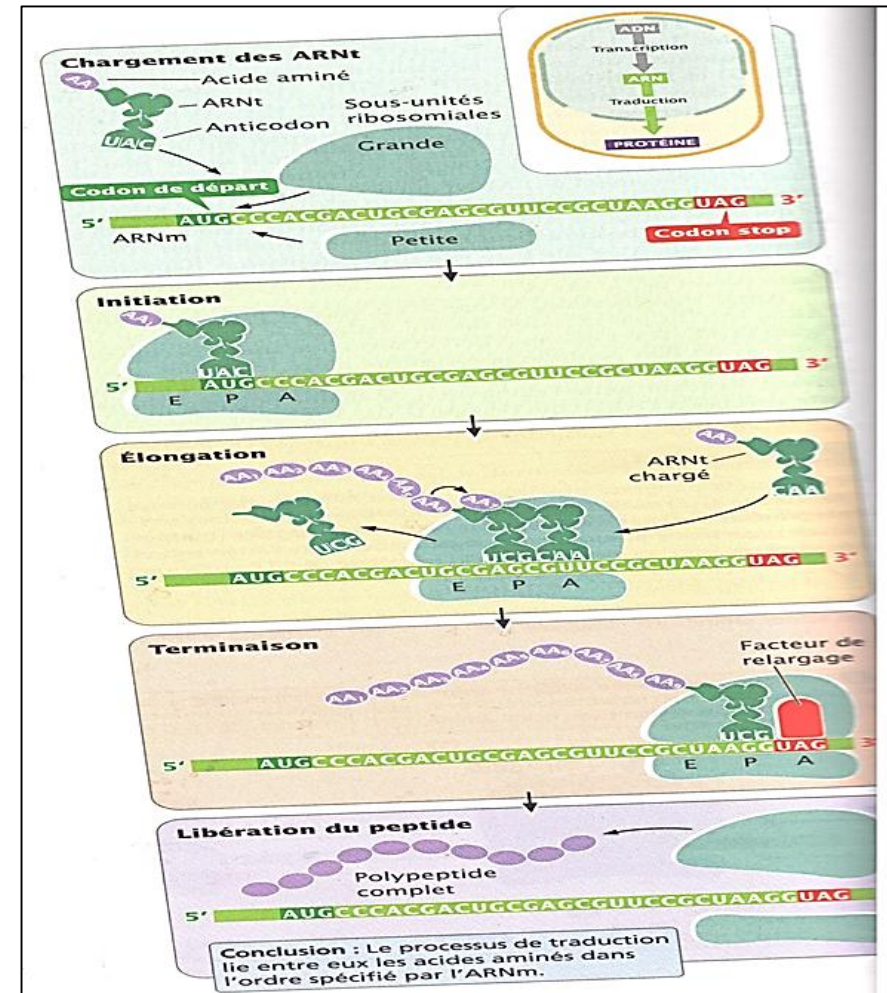
L'élongation correspond à une synthèse protéique par ajout d'acides aminés à l'extrémité C-Terminale de la chaîne peptidique naissante, réaction catalysée par l'activité peptidyl-transférase de la grande sous unité des ribosomes. L'élongation est permise par la présence de facteurs d'élongation



La traduction

- **La terminaison**

La terminaison de la traduction se fait au niveau des codons stop UAA, UAG et UGA qui ne codent pour aucun acide aminé. Ces codons stop sont reconnus par les facteurs de terminaison RF 1, RF 2 et RF 3 (RF pour Releasing Factor) Comme il n'y a pas d'ARNt avec des anticodons complémentaires aux codons de terminaison, aucun ARNt n'entre dans le site A. L'ARNt est libéré du site P, le ribosome se détache de l'ARNm et se dissocie.



La traduction

- **Modifications post-traductionnelles des protéines**
 - Certaines protéines sont synthétisées sous la forme de molécules précurseurs plus grandes qui doivent être clivées et adaptées par des enzymes pour acquérir leur fonction.
 - Pour d'autres, une glycosylation – l'ajout de chaînes glucidiques – peut être nécessaire à leur activation.
 - La fonction de nombreuses protéines dépend de façon critique de leur repliement correct. Certaines se replient spontanément pour acquérir leur forme correcte, mais le repliement de certaines autres doit être assisté initialement par d'autres molécules appelées des chaperons moléculaires.

La traduction

- **Modifications post-traductionnelles des protéines**

Modification	Site	Exemple
Acétylation	K	Histones
Gamma-carboxylation	carbone en position gamma de E	prothrombine
Amidation	G terminale	gastrine
Biotinylation	K	pyruvate carboxylase
Carboxylation	K, D, E	Prothrombine
Glycosylation	O-glycosylation sur S, T et hydroxylysine; N-glycosylation sur N	Groupes sanguins Collagène
Hydroxylation	P, K, D et Y	Collagène
Prénylation (farnesylation, geranylgeranylation)	C en C-terminal	Ras
S-acylation	C	rhodopsine
Myristoylation	G en N-terminal	NADH-cytochrome b5
Méthylation	K, H, R, D, E	Actine
Phosphorylation	Y, S, T	MAP kinases
Sulfatage	Y	APP, thyroglobuline
Ubiquitination	K	Histones H2A, H2B

La traduction

Glycosylation

Liaison covalente d'un sucre à :

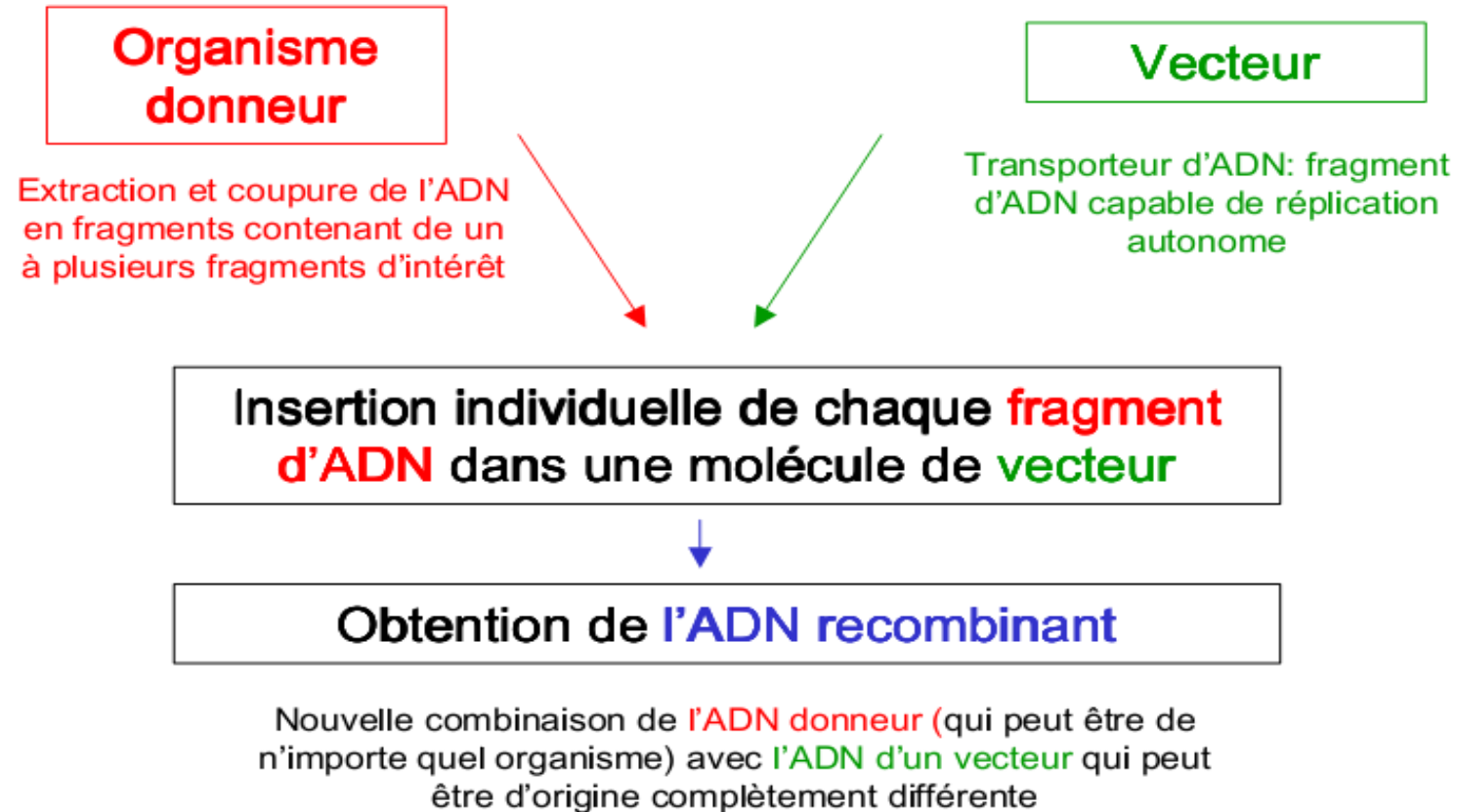
- O du groupement OH de Ser, Thr, Hydroxylysine (collagène)
- N du groupement amide de Asp

Catalysée par des 'glycoprotéines glycosyltransferases' ou 'oligosaccharide protein transferases'

Contribue à la stabilité du repliement, adressage, solubilité, antigénicité...

Présente chez toutes les cellules eucaryotes et certaines procaryotes

➤ Le clonage est l'action d'isoler et d'insérer dans un vecteur un fragment d'ADN d'intérêt pour le multiplier à l'identique.



➤ Le clonage est l'action d'isoler et d'insérer dans un vecteur un fragment d'ADN d'intérêt pour le multiplier à l'identique.

Organisme donneur

Extraction et coupure de l'ADN en fragments contenant de un à plusieurs fragments d'intérêt

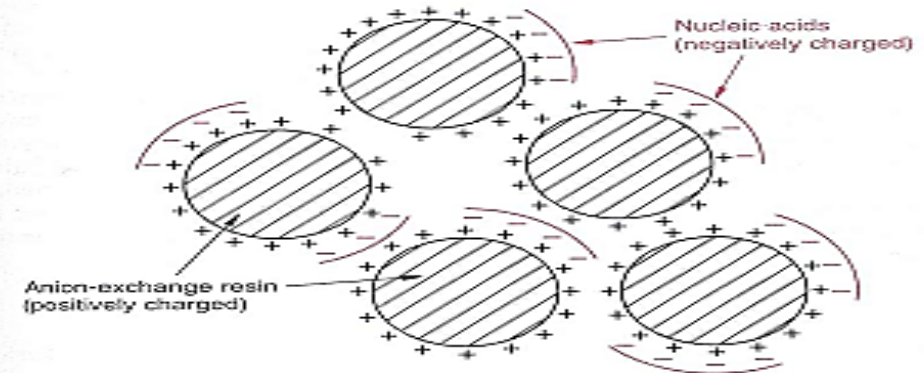
A partir de l'ADN génomique (chromosomique)

(lignées cellulaires, tissus, organismes entiers)

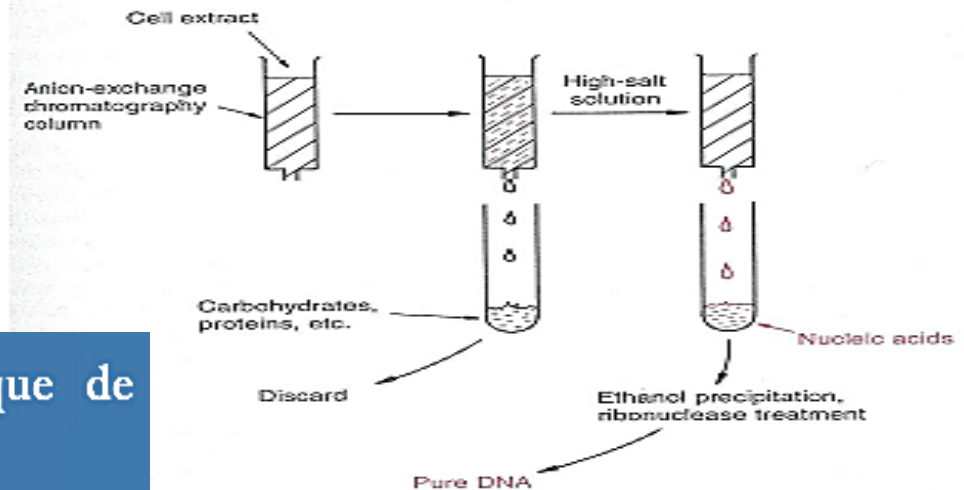
Pour un organisme donné, l'ADN génomique est le même quel que soit le type cellulaire

➤ L'ADN génomique est le support physique de l'ensemble des gènes de la cellule.

(a) Attachment of nucleic acids to an anion-exchange resin



(b) DNA purification by column chromatography



➤ Le clonage est l'action d'isoler et d'insérer dans un vecteur un fragment d'ADN d'intérêt pour le multiplier à l'identique.

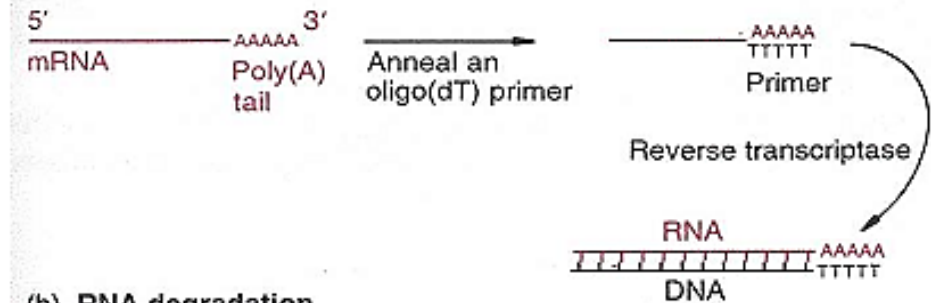
Organisme donneur

Extraction et coupure de l'ADN en fragments contenant de un à plusieurs fragments d'intérêt

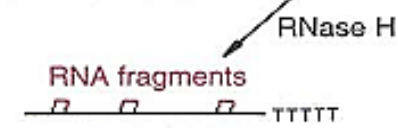
A partir de l'ARNm : reverse transcription
(lignées cellulaires, tissus, organismes entiers)
L'ARNm diffère en fonction du type cellulaire

➤ l'ADN complémentaire (ADNc) est la copie en ADN des ARNm.

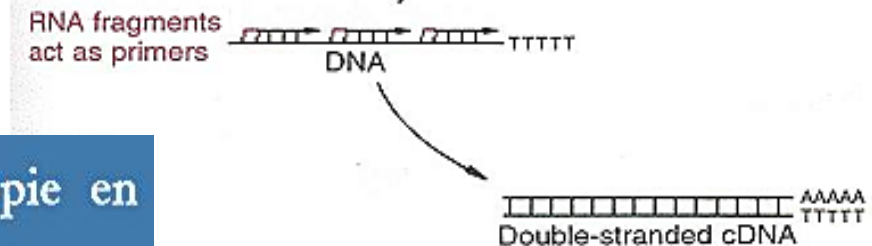
(a) First strand synthesis



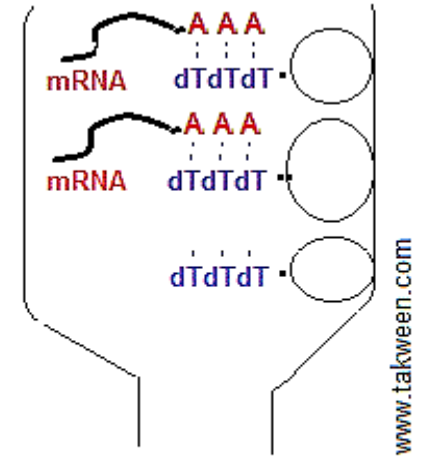
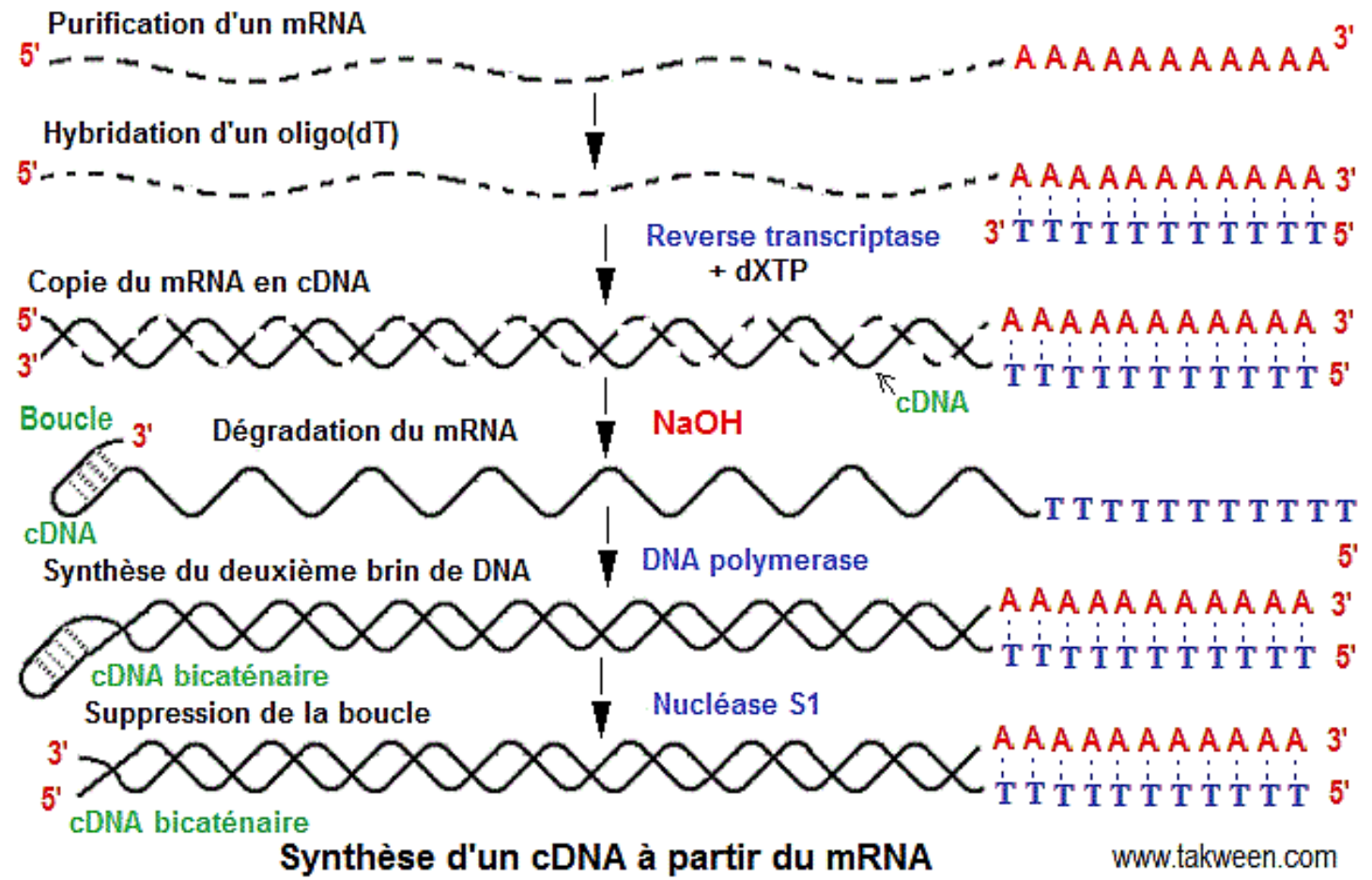
(b) RNA degradation



(c) Second strand synthesis



Le clonage



mRNA purification by affinity chromatography

Vecteurs de clonage

Vecteur

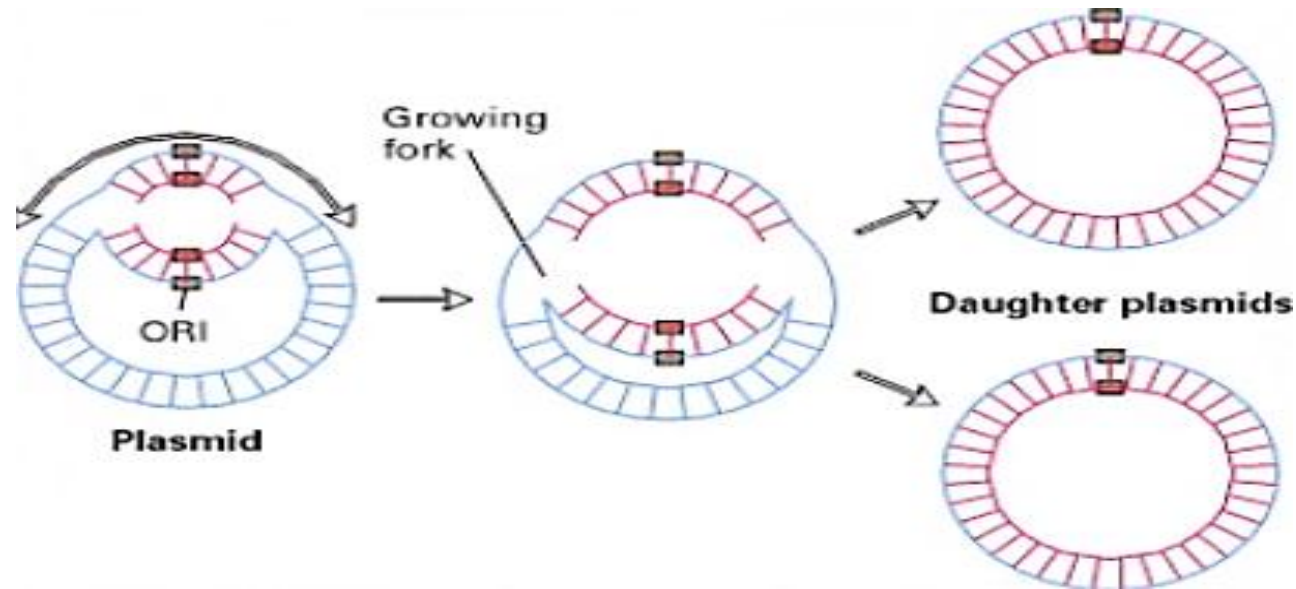
➤ Un vecteur est une séquence d'ADN permettant la propagation, la sélection, la modification d'une séquence d'ADN d'intérêt. En bref l'étude et la manipulation d'une séquence d'ADN isolée.

Transporteur d'ADN: fragment d'ADN capable de réplication autonome

- Permet de conserver une séquence d'ADN donnée.
- Permet de la multiplier pour en accroître la quantité.
- Permet de la modifier pour y introduire des mutations, délétions.
- Permet de la réintroduire dans des cellules.

Vecteurs de clonage

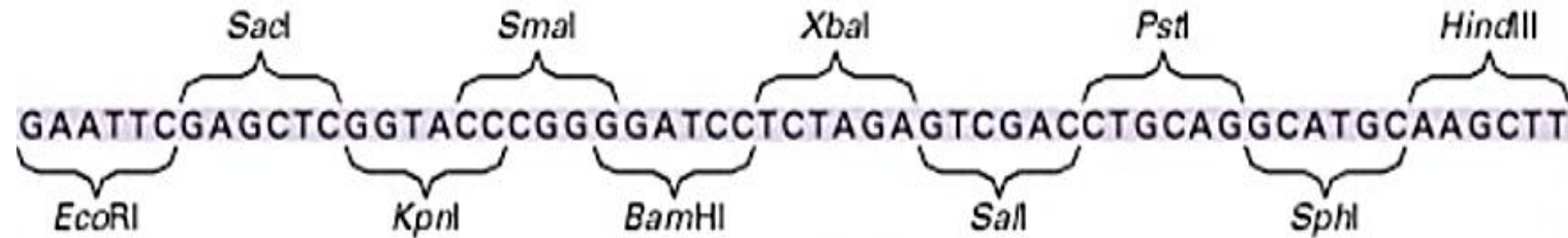
Capable de réplication autonome dans une cellule hôte donnée
(origine de réplication de type procaryotique et / ou eucaryotique)



Vecteurs de clonage

Possède un polylinker (site multiple de clonage)

(a) Sequence of polylinker



Vecteurs de clonage

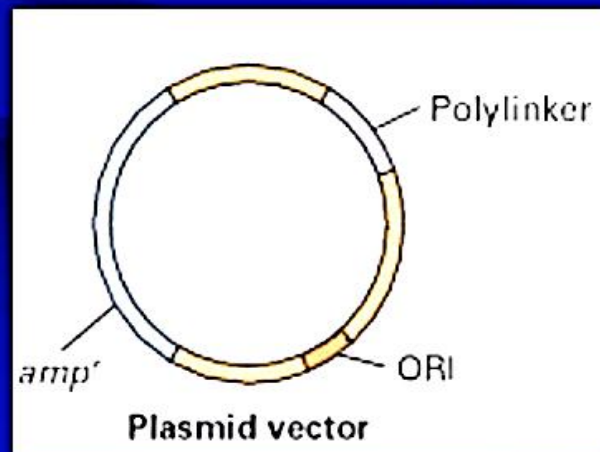
Supporte l'insertion d'un fragment d'ADN de taille variable

Différents vecteurs pour différentes utilisations		
Taille maximum approximative du fragment d'ADN qui peut être cloné dans chaque vecteur		
VECTEURS	HOTE	INSERT (Kb)
Plasmides	Bactérie	10
Phage lambda	Bactérie	25
Cosmide	Bactérie	45
Phage P1	Bactérie	100
BAC (bacterial artificial chromosome)	Bactérie	300
YAC (yeast artificial chromosome)	Levure	1000

Vecteurs de clonage

Les plasmides comme vecteurs de clonage

- Molécule d'ADN de taille réduite, d'origine bactérienne
- Molécule d'ADN circulaire – taille 2kb à 5kb
- Peut accepter jusqu'à 10kb d'ADN exogène
- Peut être considérée comme un minichromosome capable de réplication autonome
- Confère la résistance à un ou plusieurs antibiotiques = sélection



Vecteurs de clonage

Les plasmides comme vecteurs de clonage

Les classes de plasmides

Les plasmides de première génération :

Ce sont les premiers à avoir été utilisés en génie génétique. Ce sont des plasmides à l'état naturel, non modifiés au laboratoire. Il s'agit des plasmides suivants :

- **ColE1**
- **RSF 2124**
- **pSC 101**

Vecteurs de clonage

Le clonage

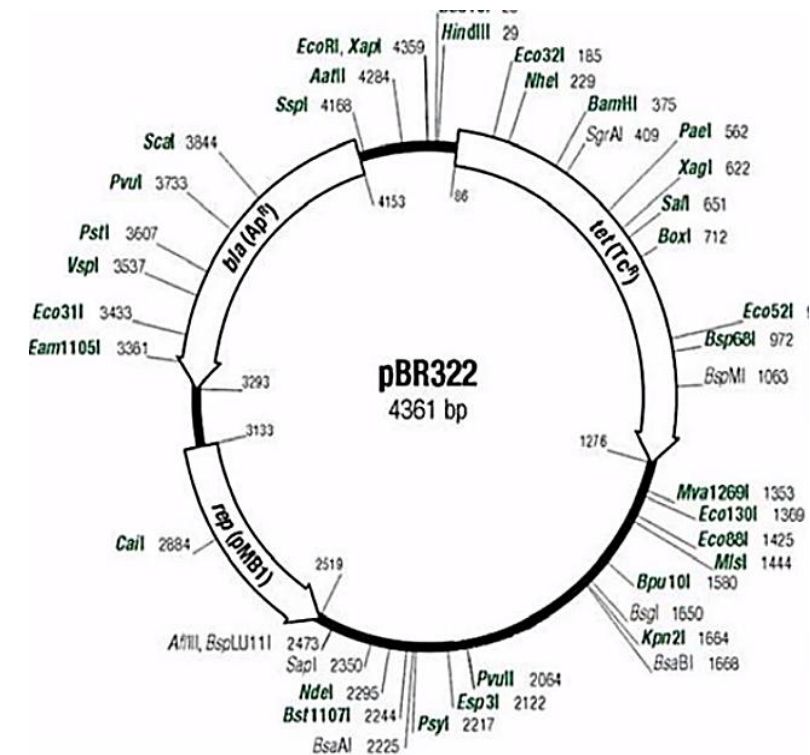
Les plasmides comme vecteurs de clonage

Les classes de plasmides

Les plasmides de deuxième génération :

Ce ne sont pas des plasmides naturels mais résultent de plusieurs transformations : plasmides "artificiels".

La série la plus importante de ces plasmides est la série pBR 312 à pBR 322. Le plasmide pBR 322 est constitué de 4,4 Kb et possède deux gènes de résistance : un pour la tétracycline (TcR), l'autre pour l'ampicilline (ApR). il possède, en plus, 20 sites uniques pour les endonucléases de restriction dont 11 localisés sur les deux gènes de résistance.



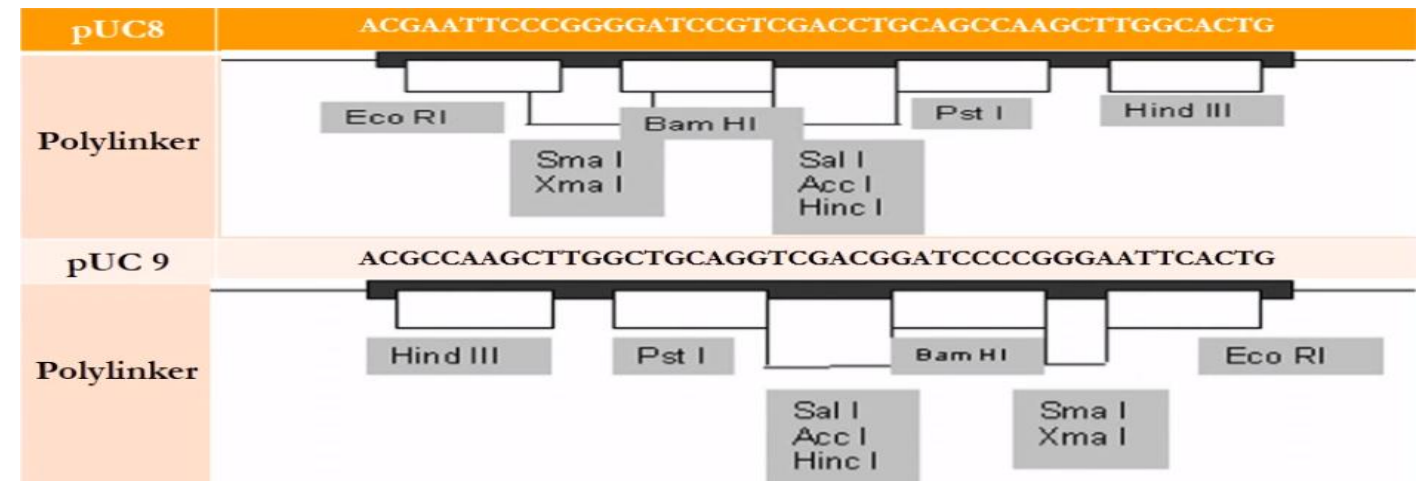
Vecteurs de clonage

Les plasmides comme vecteurs de clonage

Les classes de plasmides

Les plasmides de troisième génération :

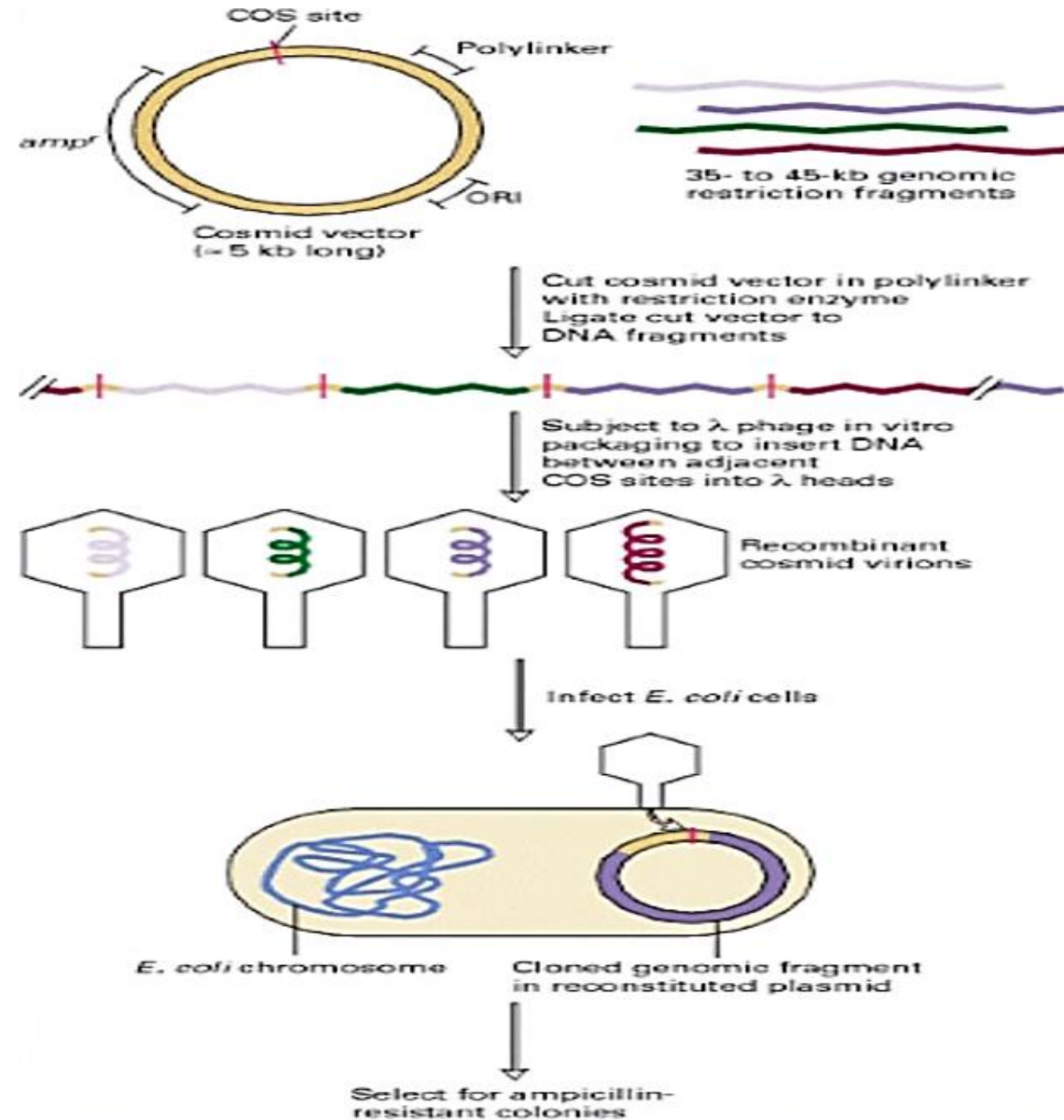
La famille pUC : Ont une taille qui avoisine 2,6 Kb et ayant intégré les gènes de résistance à l'ampicilline (ApR) et *lacZ*. Un polylinker identique à celui du phage M13 est associé à *lacZ*. Les différents pUC (de pUC8 à pUC19) ne diffèrent que par le nombre de nucléotides et l'emplacement du polylinker



Vecteurs de clonage

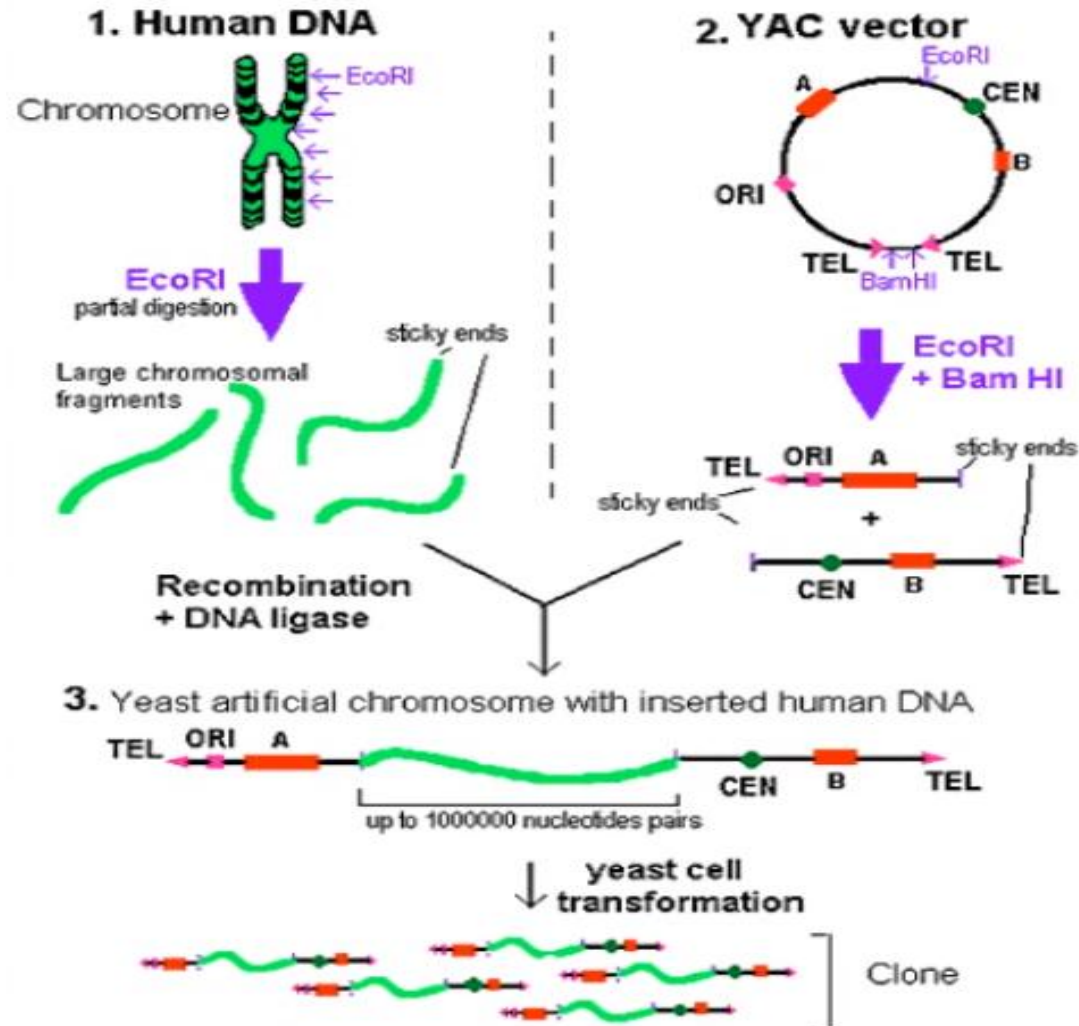
Le clonage

Les cosmides comme vecteurs de clonage



Vecteurs de clonage

Les YACs comme vecteurs de clonage



YAC : Yeast Artificial chromosome

FEATURES OF A YEAST ARTIFICIAL CHROMOSOME



- ARS → autonomously replicating sequences
- CEN → centromer
- TRP1, URA3 → marker genes

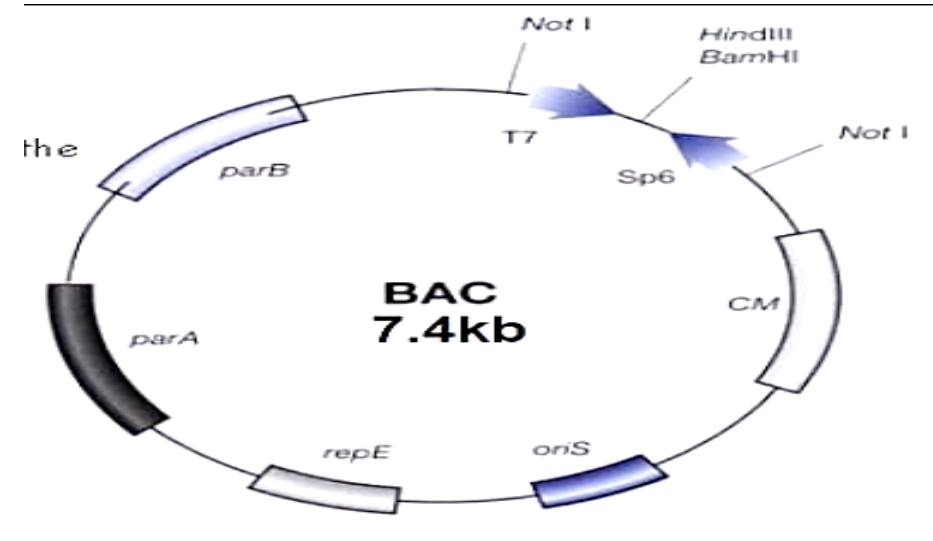
Vecteurs de clonage

Le clonage

Bacterial Artificial Chromosomes BAC

- **Avantages :**

- Grande capacité d'insertion
- Facilité de manipulation (comme plasmide)
- Hôte bactérien
- Copie unique
- Pas (peu) de réarrangement



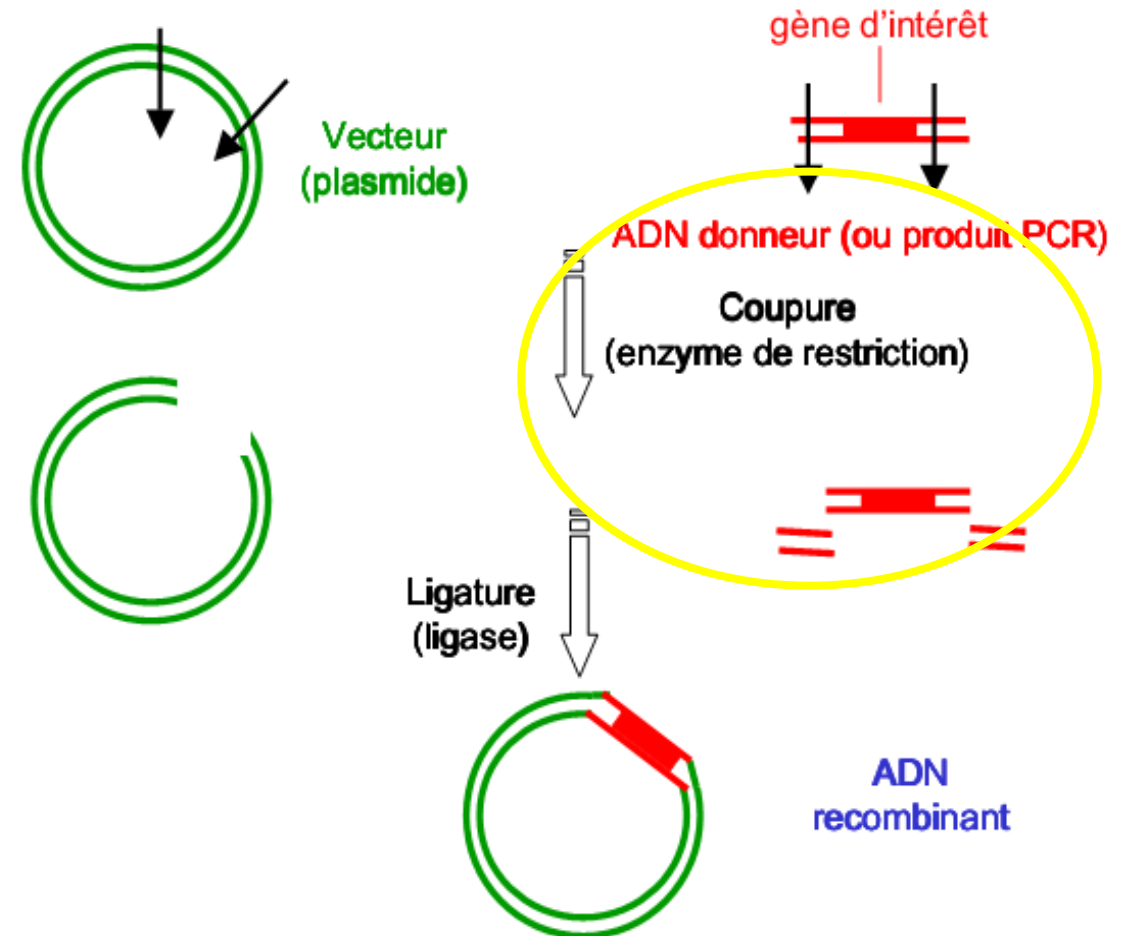
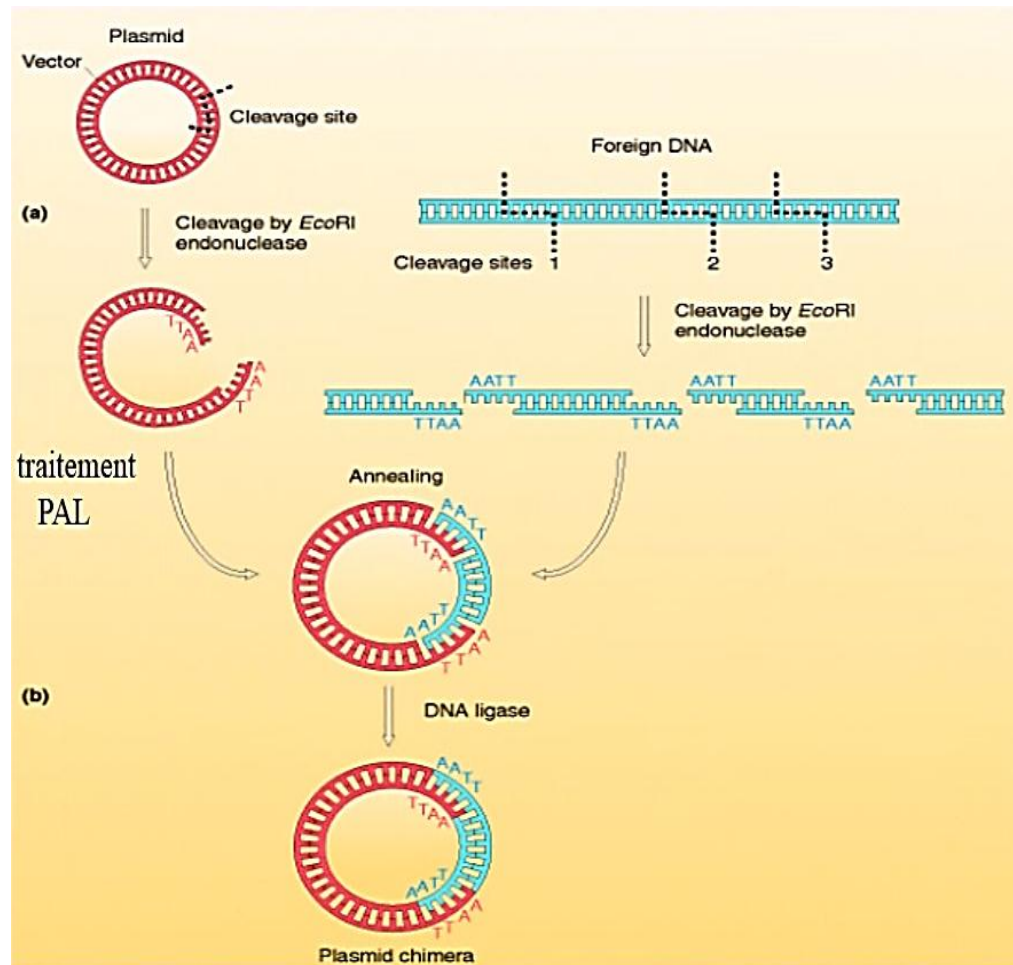
- **parA, parB and repE** sont des genes requis pour la stabilité du BAC.
- **OriS** est une origine de réplication
- **CM** : gène de résistance au chloramphenicol

Le clonage

Insertion individuelle de chaque **fragment d'ADN** dans une molécule de **vecteur**

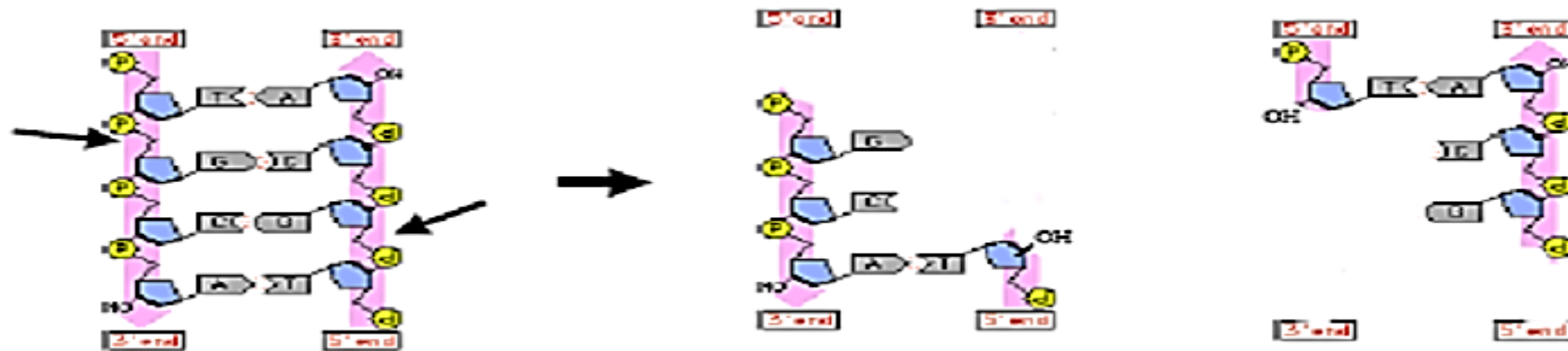


Obtention de l'**ADN recombinant**



Enzymes de restriction

- Enzymes bactériennes
- Reconnaissent des séquences spécifiques sur l'ADN de 4 à 8 paires de bases (pb)
- Clivent l'ADN sur les 2 brins au niveau de ces sites (coupure des ponts phosphodiesters)

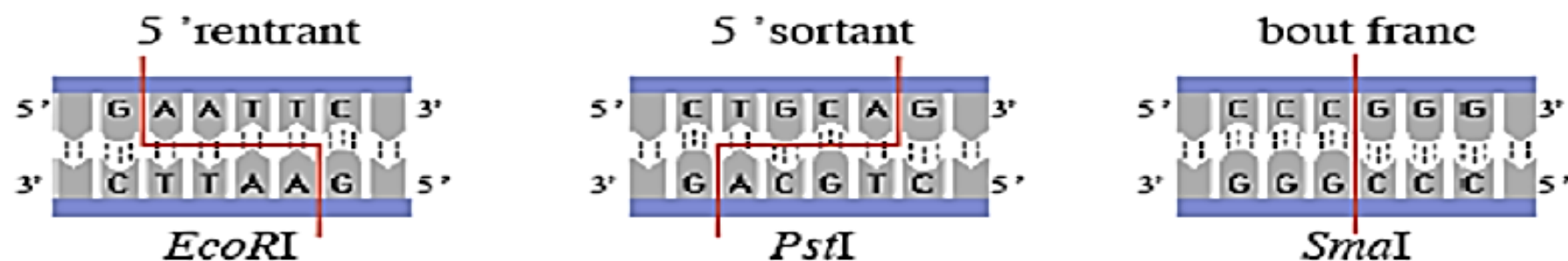


Enzymes de restriction

- La plupart des sites de reconnaissance sont des séquences inversées répétées (palindromes)

Cas de *EcoRI* : 5' GAATTC 3'
 3' CTTAAG 5'

- Formation de bouts collants ou de bouts francs



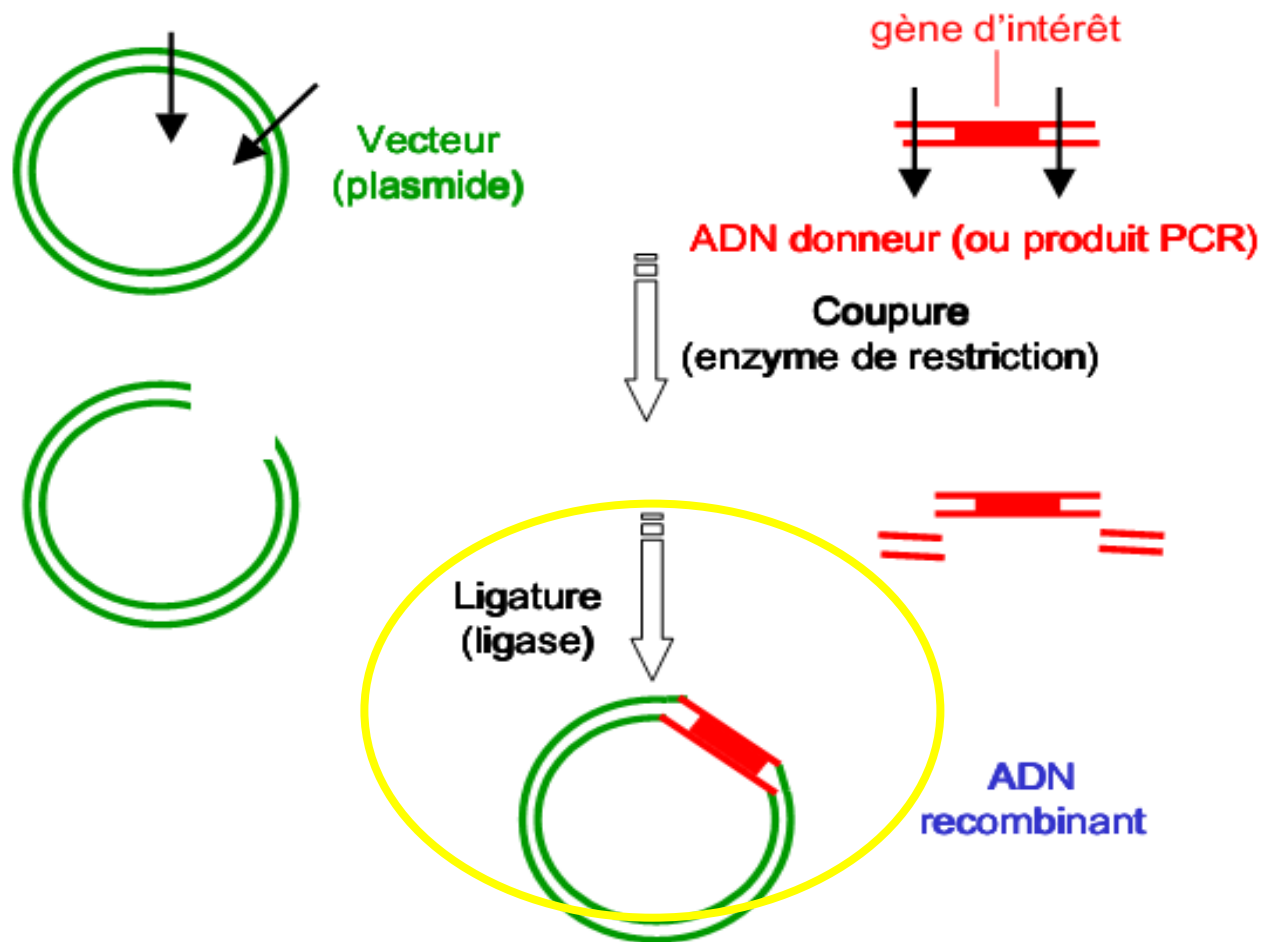
Le clonage

Insertion individuelle de chaque **fragment d'ADN** dans une molécule de **vecteur**



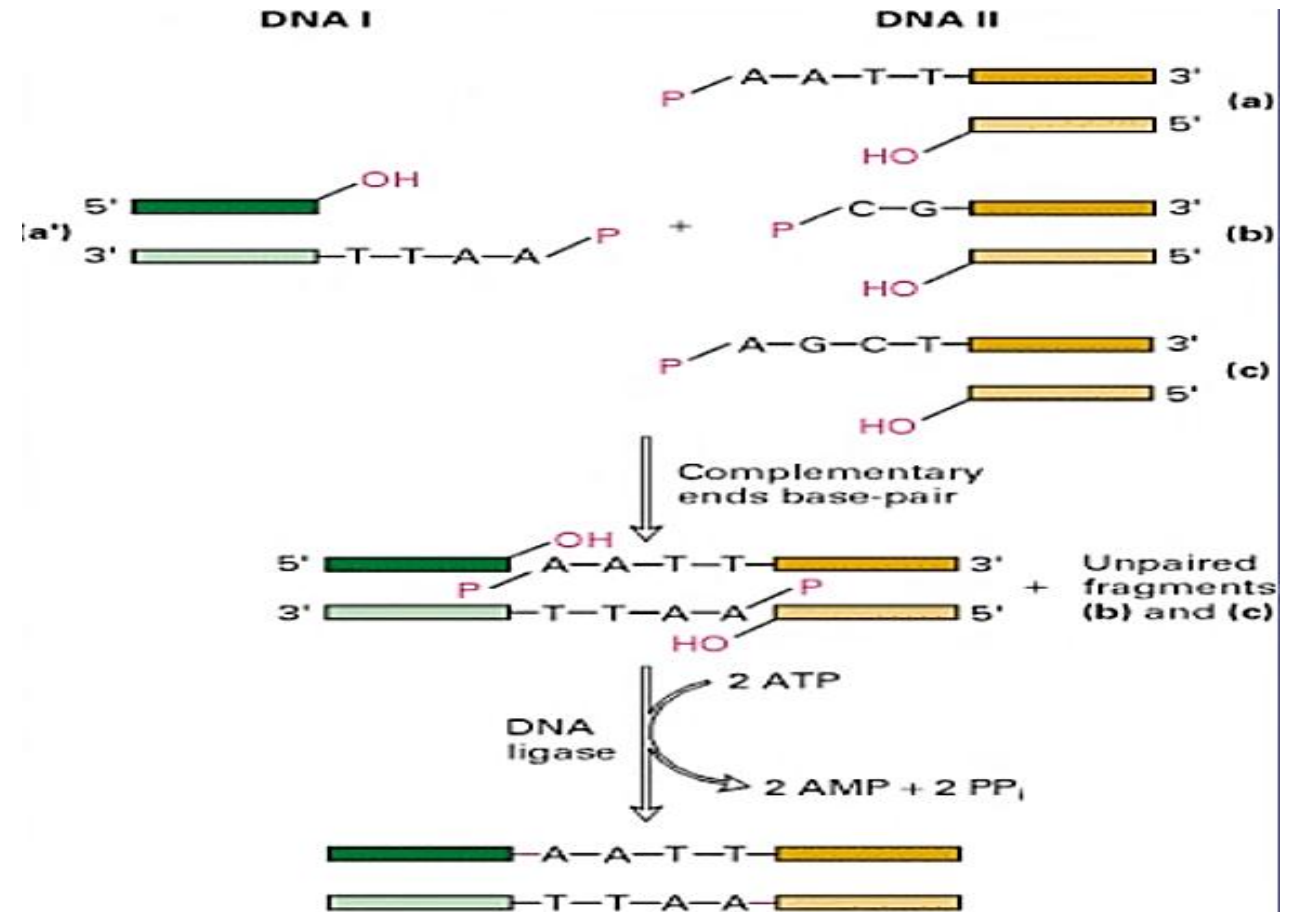
Obtention de l'**ADN recombinant**

ADN recombinant définition??



Ligature

T4 DNA Ligase : lie de façon covalente les extrémités 5' et 3' de deux brins d'ADN lorsqu'elles sont complémentaires



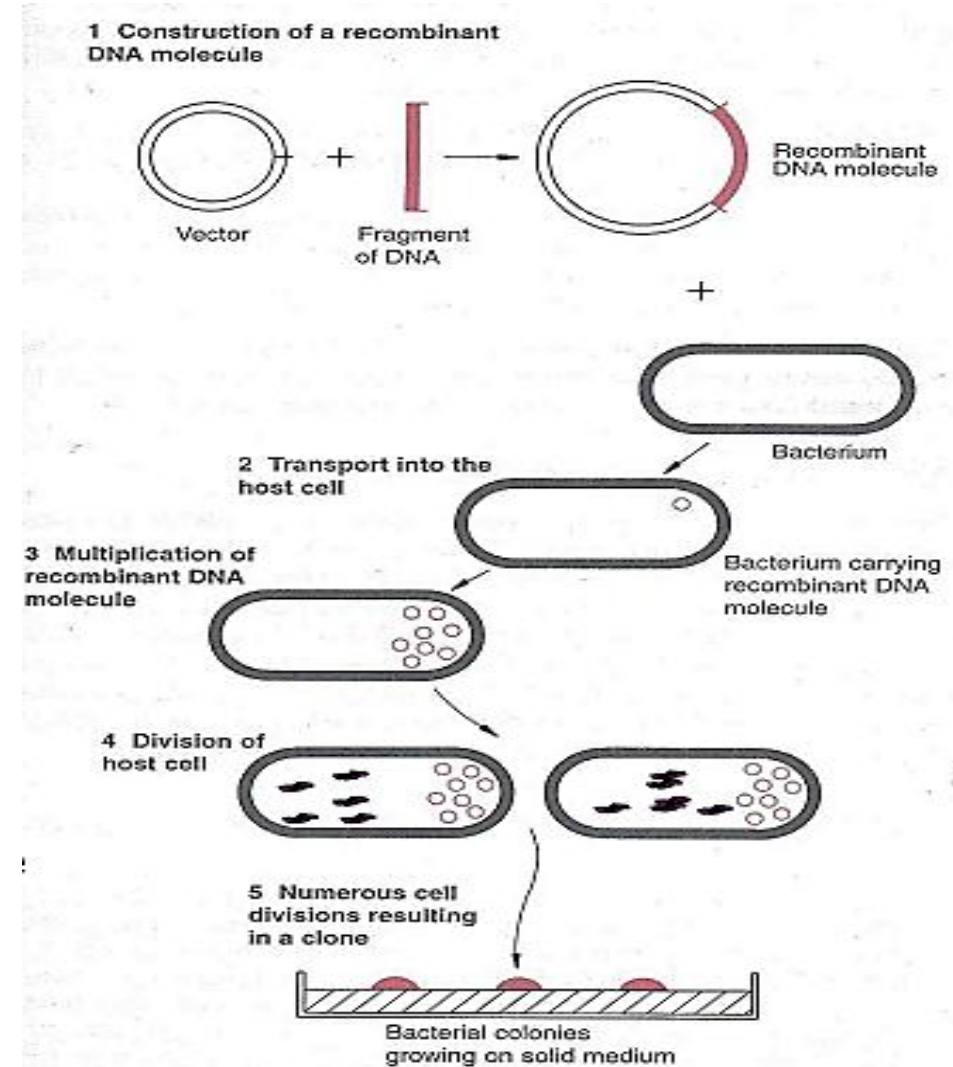
Clonage : les étapes

1 - Insertion du fragment dans le vecteur

2 - Transformation des cellules hôtes

3 - Amplification des plasmides

4 - Induction de l'expression génique
Production de la protéine recombinante

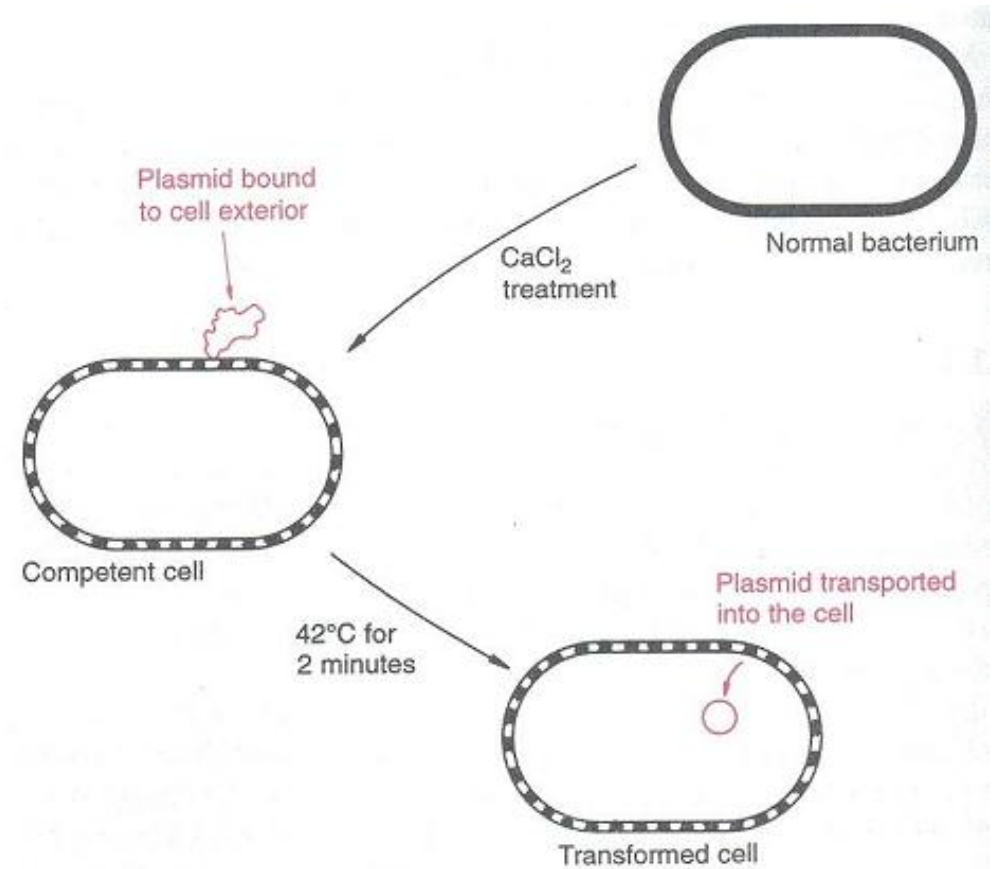


Transformation des cellules hôtes

Bactéries chimio-compétentes :

- Fragilisation de la membrane par traitement chimique
- Entrée de l'ADN recombinant par choc thermique

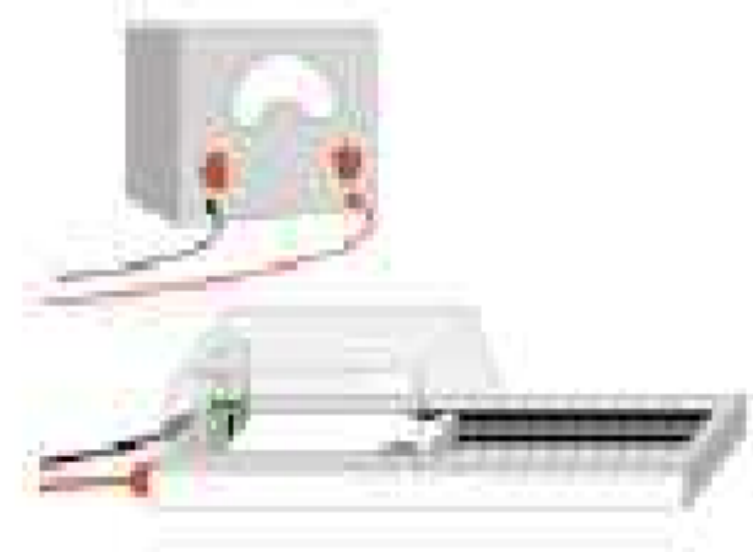
$10^6 - 10^8$ cellules / μg d'ADN



Transformation des cellules hôtes

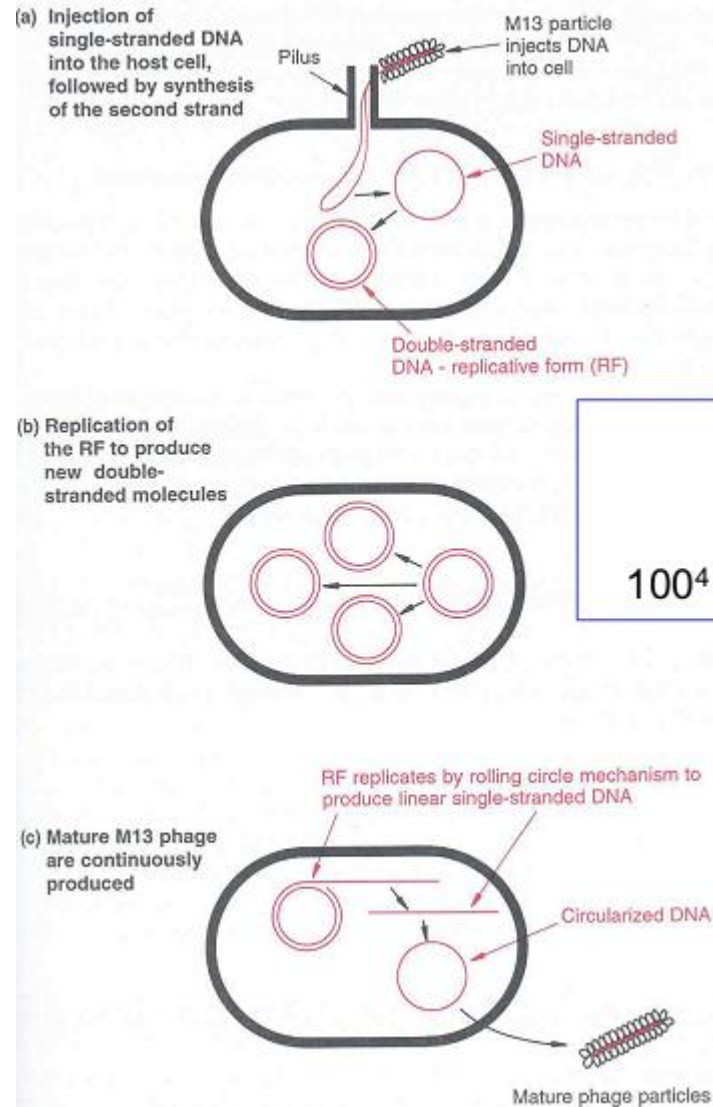
Bactéries électro-compétentes :

- Electroporation : choc électrique
- Fragilisation de la membrane et entrée de l'ADN chargé par les pores
- 10^{10} cellules / μg d'ADN



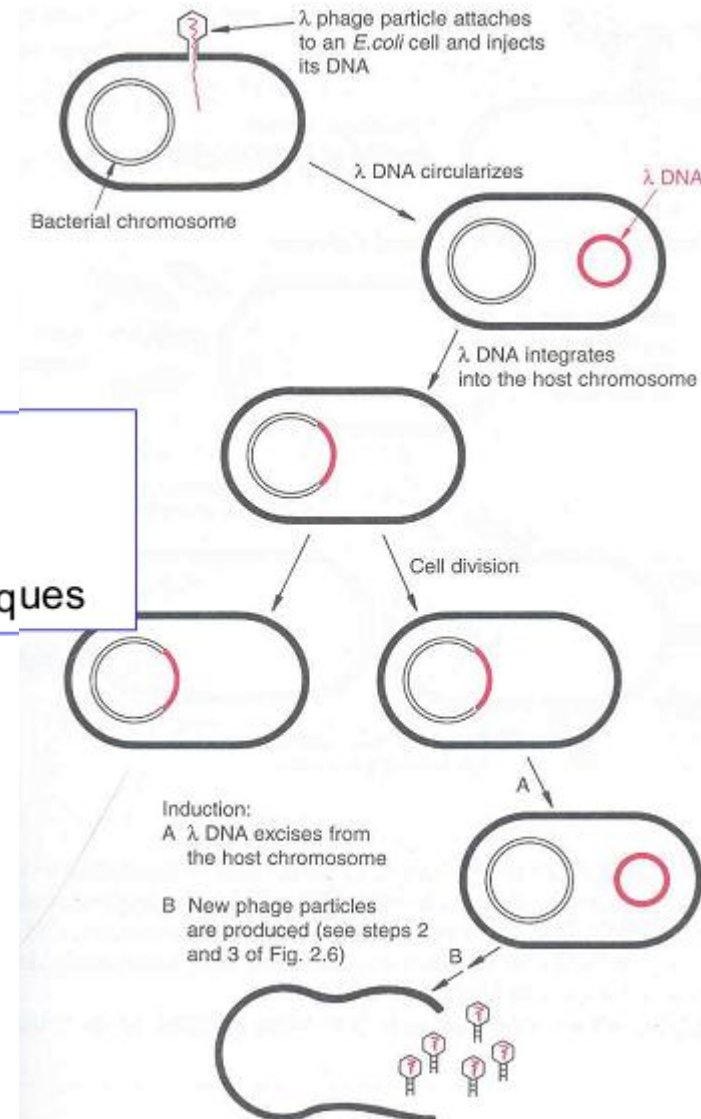
Le clonage

Phage M13



2 heures :
4 cycles d'infection
 $2^4 = 16$ bactéries
 $100^4 = 10^8$ particules phagiques

Phage λ



Le clonage

1) Digestion: L'**ADN phagique** et l'**ADN génomique** sont digérés par la **même enzyme de restriction**. L'ADN phagique est ouvert au niveau du site de restriction. L'ADN génomique est fragmenté.

2) Traitement: L'**ADN phagique** ouvert est traité par la phosphatase alcaline de façon à ce qu'il ne puisse se refermer sur lui-même sans avoir intégré un ADN étranger (fragment d'ADN génomique). La phosphatase alcaline est capable d'hydrolyser les ADN, ARN et nucléotides libres. Elle retire le P en 5' et libère un P inorganique et une extrémité 5'OH. Ainsi, elle empêche l'action des ligases sur les acides nucléiques (car elles ont besoin d'une extrémité 5'P libre sur le brin à lier).

3) Ligation: On réunit les deux digestions en présence de T4 DNA Ligase. On obtient un ADN phagique recombinant.

4) Encapsidation.

5) Infection.

6) Sélection sur plaque de lyse: Chaque plaque correspond à 1 phage recombinant avec un insert particulier. L'ensemble des plaques de lyses correspond à la banque d'ADN génomique eucaryote.

7) Criblage: Hybridation de plaque de lyse

