

Université des Frères MENTOURI
Constantine 1
Facultés des Sciences de la Nature
et de la Vie

Département de Biologie Appliquée
Licence Biotechnologie
Microbienne

Unité d'enseignement méthodologique: Techniques Biotechnologiques

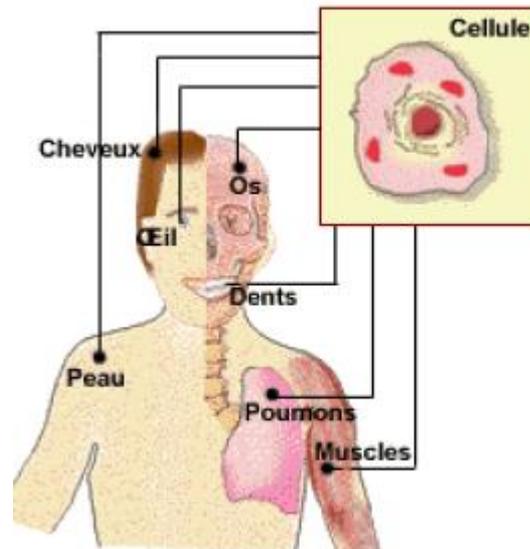
- Matière : Génie Génétique
- Objectifs de l'enseignement:

Faire comprendre les multiples applications du génie génétique et leurs applications biotechnologiques.

Responsable de la matière : Adjeroud Moussa

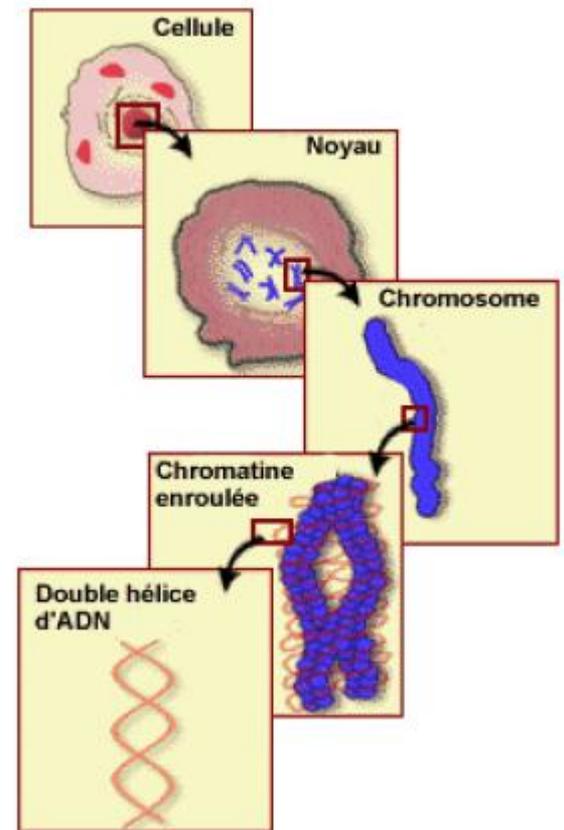
Qu'est-ce qu'une cellule?

La cellule est l'unité du monde vivant et les millions de types différents d'organismes qui peuplent la Terre ont tous un dénominateur commun : ils sont constitués de cellules. Elles sont

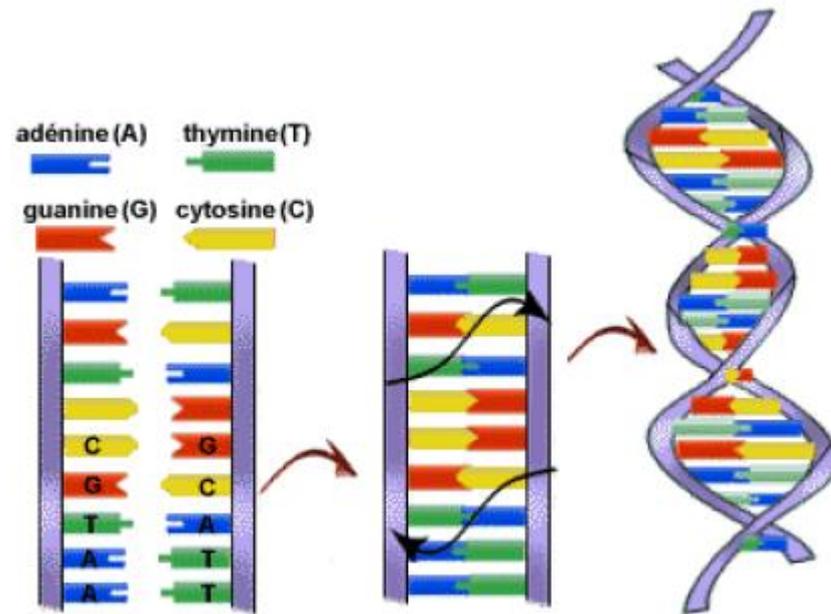


2) Qu'est-ce que l'ADN?

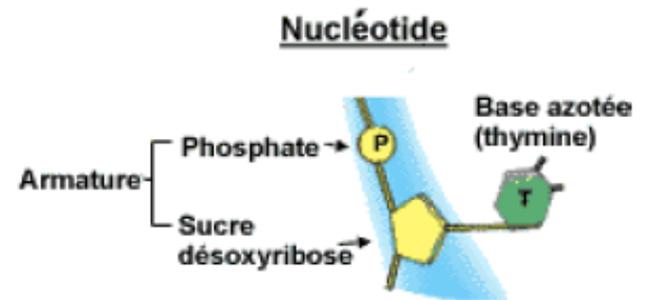
L'ADN, abréviation d'**acide désoxyribonucléique**, se trouve **dans le noyau** de la plupart des types de cellules. Il contient les instructions propres à la cellule et détermine comment les traits d'une personne seront transmis d'une génération à l'autre.]
le noyau d'une cellule humaine, on compte 23 paires de chromosomes, soit 46 chromosomes en tout. **Chaque**



Formation d'une molécule d'ADN : Nucléotides



Les « mots » de l'ADN sont de petites molécules appelées nucléotides. Le **génom humain**, constitué de **23 paires de chromosomes**, contient au total quelque **trois milliards de nucléotides**. Chaque nucléotide comprend une armature et une **base azotée**. L'armature sert à attacher les nucléotides ensemble.



3) Gènes: les phrases de l'ADN

Un gène est une série de nucléotides (mots d'ADN) qui constitue une unité d'information héréditaire. Chacun des chromosomes dans le noyau d'une cellule humaine contient des milliers de gènes. **Tout l'ADN contenu sur les 23 paires de chromosomes dans une cellule humaine renferme les 80 000 gènes (et en conséquence, toutes les instructions génétiques) qui constituent le génome humain.**

Un gène contient deux régions: • La région «codante»: la séquence des nucléotides, qui détermine l'enchaînement des acides aminés dans la protéine et donc la structure et la fonction de celle-ci; • Les régions régulatrices: elles déterminent dans quelle cellule, à quel moment, en réponse à quel stimulus, et en quelle quantité la protéine doit être synthétisée.

- **Le génie génétique est un ensemble de techniques de biologie moléculaire permettant d'isoler des gènes spécifiques, de les reconstruire puis de les réinsérer dans des cellules ou des organismes. Ces techniques ont fourni à la médecine et à l'industrie un moyen efficace de produire en grandes quantités des protéines spécifiques, qui, auparavant, n'étaient disponibles (si elles l'étaient) qu'en quantité extrêmement faibles. Ces techniques ont permis également d'étudier la régulation de leur expression et ainsi de mieux comprendre le développement de maladies génétiques.**

- Le premier apport de cette technologie à la médecine fut de rendre des protéines thérapeutiques telle: insuline, HGH (human growth hormone), disponibles en quantités suffisantes. La médecine a retiré bien d'autres bénéfices de la technologie de l'ADN recombinant, vaccins (anti hépatite, rage, ...etc.), sondes (diagnostique, identification ...etc.), agents thérapeutiques (acides nucléiques anti sens, thérapie génique, ...etc.).



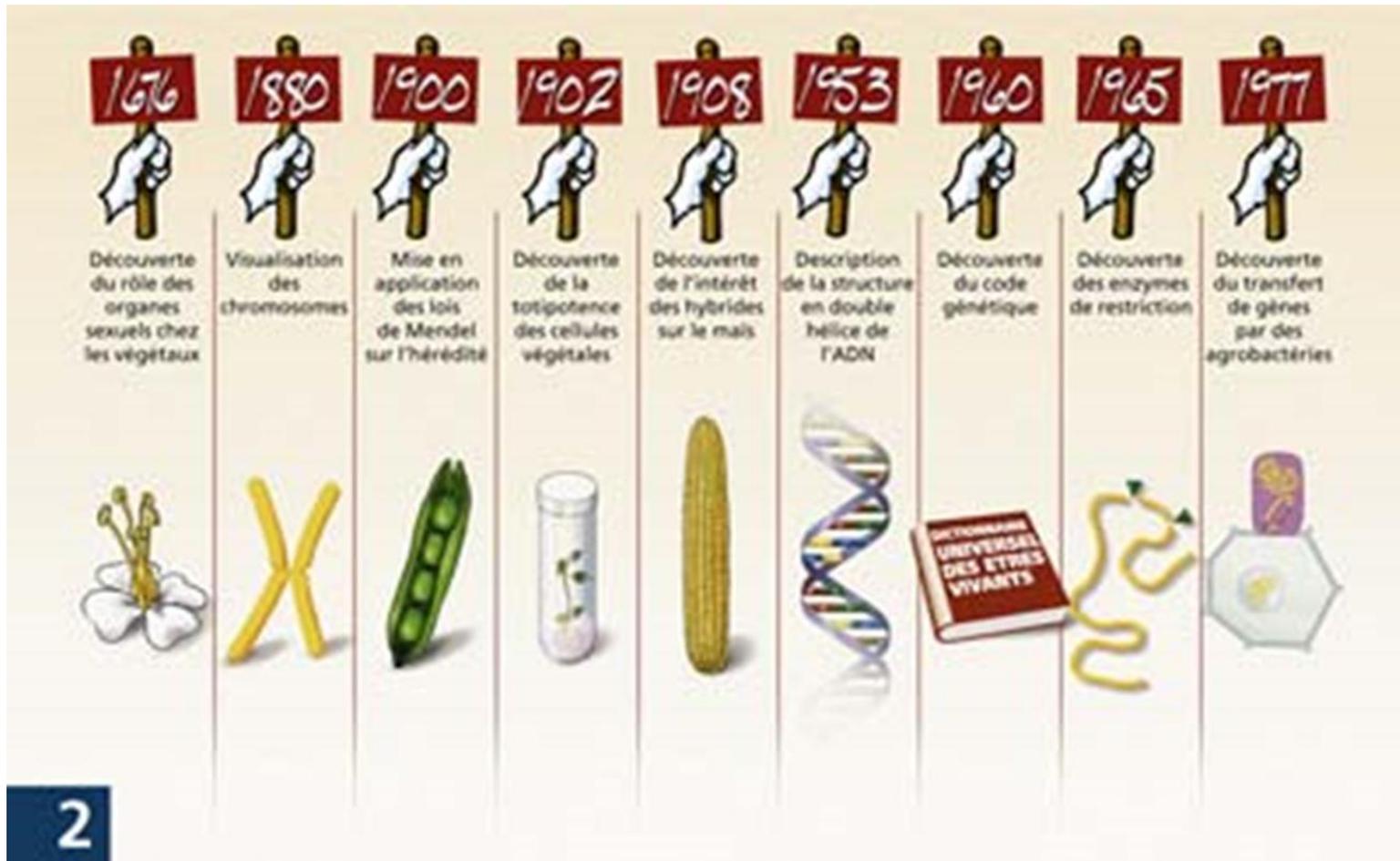
- La technologie de l'ADN recombinant a touché d'autres produits d'intérêt agroalimentaire et industriel, enzymes (présure, protéases, ...etc.), acides aminés (glutamate, succinate, ...etc.), vitamines (B2, B12, C ...etc.).

Transgénèse

- Transgénèse Les premières plantes transgéniques ont été cultivées commercialement aux Etats-Unis il y a 20 ans. Le Canada et plusieurs pays d'Amérique du Sud ont suivi. Les plantes auxquelles sont transférés un ou plusieurs gènes provenant d'un ou plusieurs organismes d'une espèce différente sont décrites comme transgéniques (trans = au-delà).

- La technologie de l'ADN recombinant a touché d'autres produits d'intérêt agroalimentaire et industriel, enzymes (présure, protéases, ...etc.), acides aminés (glutamate, succinate, ...etc.), vitamines (B2, B12, C ...etc.).

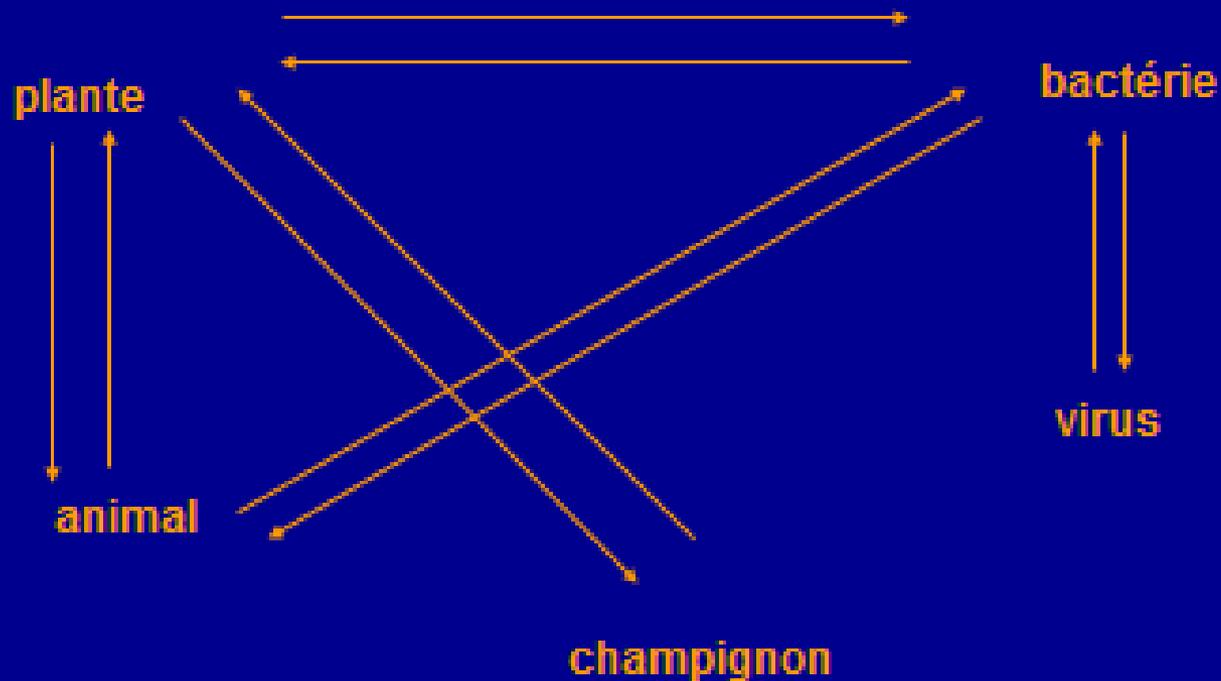
Les interventions sur l'information génétique



OGM définition

- Un OGM (Organisme Génétiquement Modifié) est défini par la réglementation européenne comme étant :
- **"un organisme dont le matériel génétique a été modifié d'une manière qui ne s'effectue pas naturellement par multiplication et/ou par recombinaison naturelle".**

- Les gènes introduits peuvent provenir de n'importe quel organisme :



On peut modifier les êtres vivants unicellulaires et pluricellulaires:



Les bactéries



Les végétaux



Les animaux

Grâce au GENIE GENETIQUE

POURQUOI ?

Le code de l'information génétique est UNIVERSEL .
c'est le même pour tous les êtres vivants



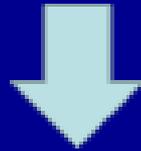
Pour tous de l'ADN

POUR tous
Il est convertit en
protéines

Cette caractéristique permet le transfert de gènes d'une espèce à l'autre = **génie génétique**

Le génie génétique permet ainsi de

- modifier,
- supprimer
- ou introduire certains caractères.

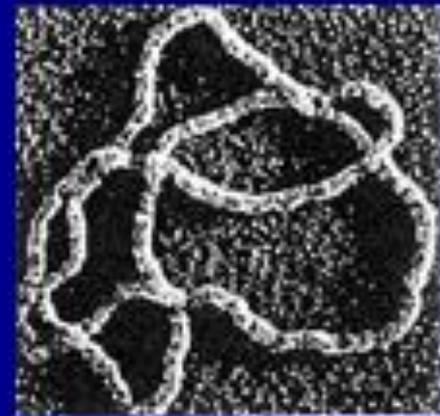
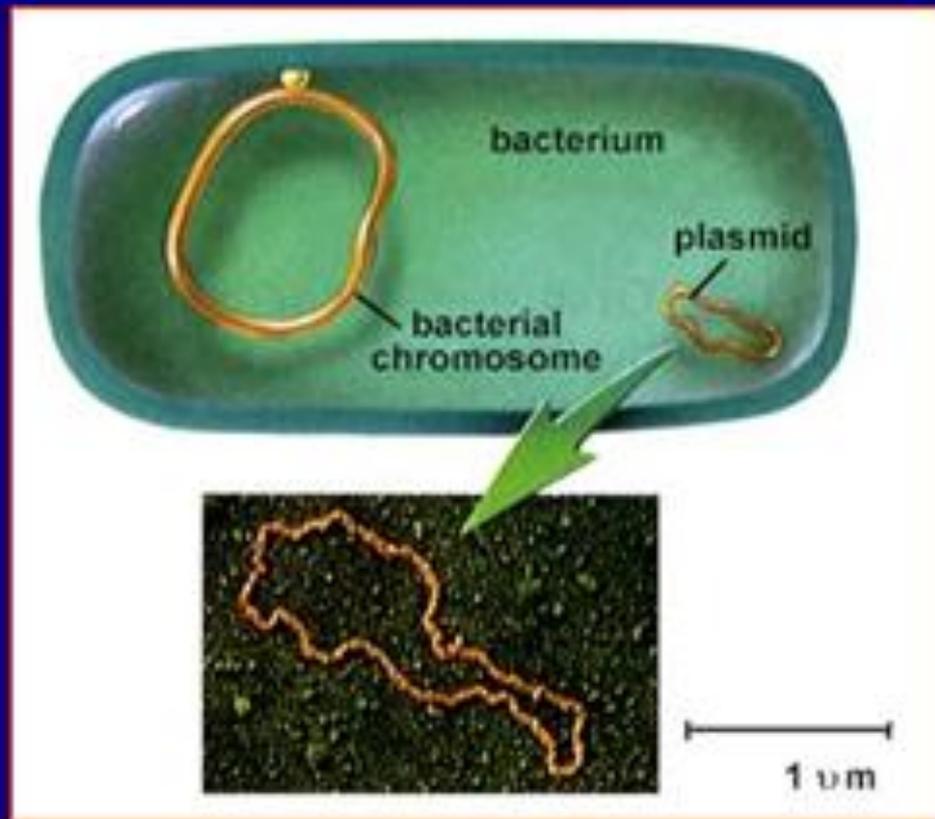


- La transformation peut consister selon les cas à:
 - Apporter une fonction nouvelle
 - Inactiver ou augmenter une fonction déjà existante

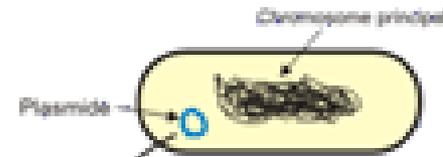
Les bactéries

Ex. production d'insuline humaine par une bactérie :

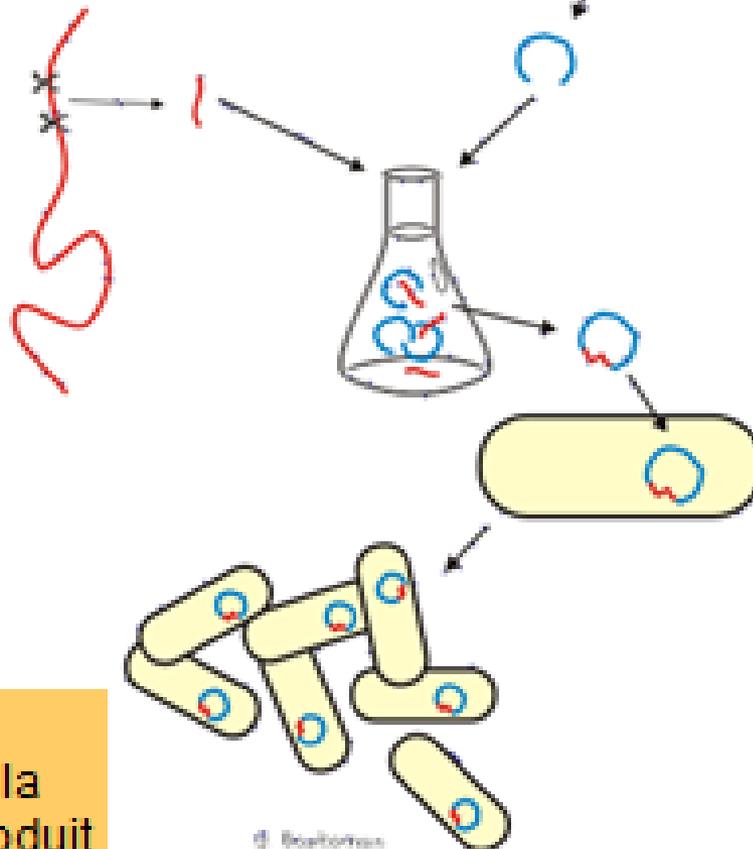
On prélève le gène de l'insuline humaine et on l'introduit dans le plasmide d'une bactérie.



On extrait les plasmides de bactéries



Une enzyme de restriction ouvre les plasmides



On extrait ou on synthétise le gène à greffer et on le multiplie en de nombreux exemplaires.

On mélange des copies du gène et des plasmides. Une enzyme (**ligase**) fusionne les brins d'ADN

Les plasmides sont réintroduits dans des bactéries

Le gène est reproduit quand la bactérie se reproduit

Exemples: bactéries qui synthétisent:

Insuline

Facteurs de coagulation

Hormone de croissance

Enzymes pouvant métaboliser certains polluants
(pétrole par exemple)

Protéines synthétiques qui n'existent pas dans la nature

ETC.

L'AMÉLIORATION DES ALIMENTS : QUELQUES EXEMPLES



Et de nombreuses autres, parfois étonnantes, comme la production de café décaféiné !

Blé	· Amélioration des caractéristiques requises pour la panification
Huiles végétales (colza, tournesol)	· Modification de la composition en acides gras pour répondre aux besoins nutritionnels (maladies cardio-vasculaires) et pour faciliter la fabrication de margarine à partir de certaines huiles
Pomme de terre	· Augmentation de la teneur en amidon pour des utilisations industrielles (purée, féculé, frites absorbant moins d'huile de friture), réduction du brunissement (frites), amélioration des propriétés organoleptiques
Laitue, épinard	· Réduction de la teneur en nitrates en augmentant l'expression de nitrate-réductase
Tomate, melon, brocoli	· Augmentation de la durée de conservation des fruits et légumes. En France, l'INRA développe des recherches pour tenter de réguler la production d'éthylène, substance qui participe à la maturation du fruit. Aux USA, une tomate transgénique a été commercialisée en 1994. Un procédé similaire a permis à une équipe de recherche Ensat-Inra d'obtenir un melon dont la conservation et la teneur en sucre sont augmentées, mais qui n'est pas encore commercialisé
Riz	· Diminution des propriétés allergisantes
Soja	· Enrichissement en acide aminé essentiel (méthionine)

Les animaux

- Le gène est introduit dans un ovule fécondé ou une cellule embryonnaire.
- L'ovule fécondé est implanté ensuite dans l'utérus d'une mère porteuse.



Animaux à croissance plus rapide.

Animaux plus faibles en gras.

Animaux plus productifs (en lait, en viande, en œufs).

Production de protéines à usage pharmaceutique (insuline, par exemple).

ETC.

DANGERS ??????

Pour la santé?

Pour l'environnement ?

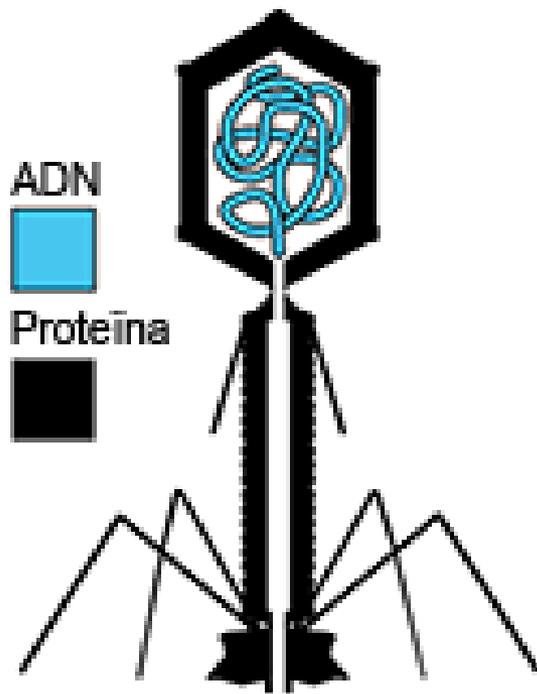


**Ces saumons ont le même âge.
Celui du bas est un OGM**

Introduction aux outils du génie génétique

: les enzymes du génie génétique

- **1. Les nucléases** Définition : les nucléases dégradent les molécules d'ADN en rompant les liaisons phosphodiester liant un nucléotide au suivant . Il existe 2 types de nucléases.
- **1.1. Exonucléases** Ces enzymes éliminent des nucléotides un à un à partir d'une extrémité de l'ADN. Il en existe différents types, par exemple la Bal31 (obtenue de cultures d'*Aeromonas espejana*) éliminant des nucléotides à partir des 2 extrémités des 2 brins, l'exonucléase 3 (obtenue à partir de cultures d'*E. coli*) catalysant l'hydrolyse séquentielle des nucléotides d'un ADN à partir d'une extrémité 3' libre.



1.2. Endonucléases

les enzymes de restriction

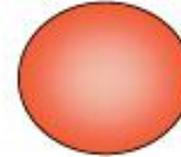
- Elles coupent de manière définie et reproductible l'ADN bicaténaire. Ce sont les enzymes permettant l'ouverture spécifique du vecteur et le découpage défini de l'ADN à cloner. Ce sont des enzymes produites par de très nombreuses bactéries au moment des infections lysogéniques (voir cours sur la lysogénie). L'analyse de leurs coupures de l'ADN montre qu'elles se font en des sites spécifiques. Plus de 1200 différentes enzymes de restriction ont été caractérisées et elles sont classées en 3 types :
- **Type I** : l'enzyme reconnaît sa séquence puis se déplace sur l'ADN et s'arrête de manière aléatoire 1000 à 5000 paires plus loin et libère quelques dizaines de nucléotides.
- **Type II** : une fois la séquence reconnue, l'enzyme coupe l'ADN au niveau de cette séquence (les plus courante en biologie moléculaire).
- **Type III** : après reconnaissance de la séquence spécifique, ces enzymes découpent l'ADN une vingtaine de nucléotides plus loin. La longueur des séquences reconnues est comprise entre 4 et 8 bases. Elle est identique sur les 2 brins.

1 L'enzyme de restriction est mise en présence d'ADN double brin.

ADN double brin



Enzyme de restriction
EcoRI



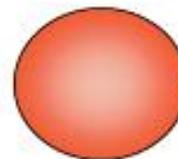
2 L'enzyme de restriction se lie à une séquence spécifique sur l'ADN.



3 L'enzyme de restriction coupe les deux brins d'ADN à des endroits précis.



4 L'enzyme se libère de l'ADN qui est maintenant fragmenté en deux morceaux.



Origine microbienne	Enzyme	Site de coupure
<i>E. coli</i> KY13	<i>EcoRI</i>	G↓AA*TTC
<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	<i>HindII</i>	*A↓AGCTT
<i>Haemophilus parainfluenza</i>	<i>HpaII</i>	C↓C*GG
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	<i>BamHI</i>	G↓GA*TCC
<i>Haemophilus aegypticus</i>	<i>HaeIII</i>	GG↓CC

* indique la méthylation.

1-1- Nomenclature des enzymes de restriction

Les trois premières lettres de chacune d'entre elle concernent

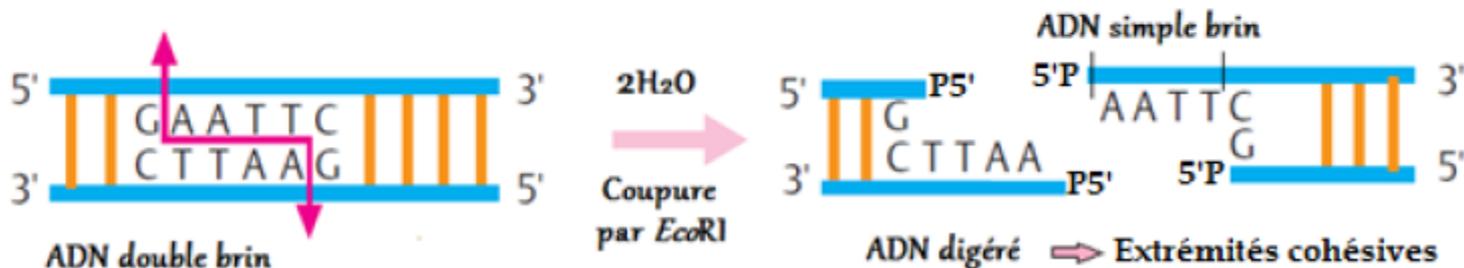
- La première lettre du nom de genre, par exemple E (*Escherichia*)
- Les deux premières lettres du nom de l'espèce, par exemple co (*coli*).
- La quatrième concerne la souche bactérienne d'où est extraite l'enzyme en question.
- Le chiffre romain: indique l'ordre de la caractérisation de l'enzyme chez la même souche. *HindIII* signifie que c'est la troisième (III) Enzyme de restriction isolée et caractérisée de la souche bactérienne *Haemophilus influenzae* Rd.

Le site de coupure, compris dans le site de reconnaissance est représenté par une flèche verticale (tab.1), et les produits de la digestion d'un génome par les enzymes de restriction sont appelés les fragments de restriction. Selon la position de la coupure (dans l'axe ou loin de l'axe) on distingue deux types de coupure:

- Coupure **franche** : Dans l'axe \longrightarrow Extrémités franches
- Coupure **cohésive** (collant) : N'est pas dans l'axe. \longrightarrow Extrémités cohésives

Exemples d'enzymes de restriction de type II

1- **EcoRI** : E.C. 3.1.21.4: C'est la deuxième enzyme caractérisée et identifiée chez *E. coli* souche R, le site de reconnaissance et de coupure est formé de six paires de bases (nucléotides).



2- ***HaeIII***: C'est la troisième enzyme de restriction caractérisée et identifiée chez la bactérie *Haemophilus aegypticus*.

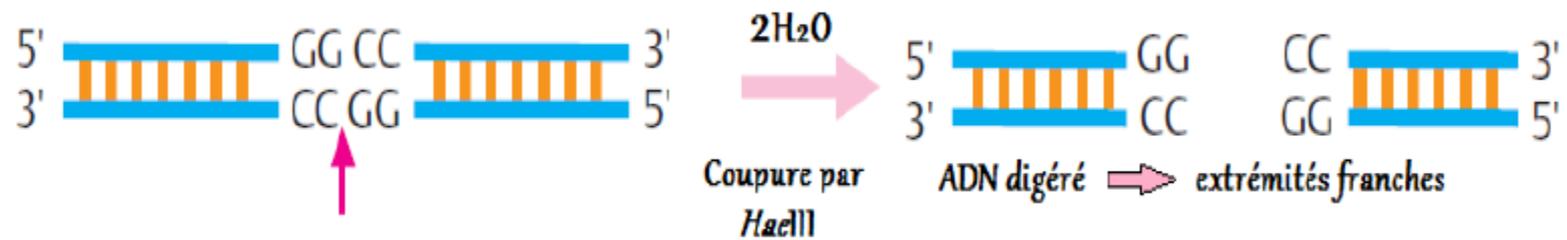


Fig.4: Coupure de l'ADN double brin par *HaeIII*, générant des extrémités franches.

Sites de restriction

Résultats après coupure

EcoRI

NNNNG|AATTCNNNN
NNNNCTTAA|GNNNN



NNNNG AATTCNNNN
NNNNCTTAA GNNNN

MspI

NNNNC|CGGNNNN
NNNNGGGC|NNNN



NNNNC CGGNNNN
NNNNGGGC CNNNN

EcoRV

NNNNGAT|ATCNNNN
NNNNCTA|TAGNNNN



NNNNGAT ATCNNNN
NNNNCTA TAGNNNN

KpnI

NNNNGGTACC|NNNN
NNNNCCATGG|NNNN

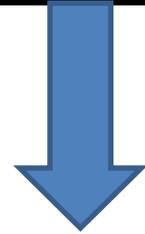


NNNNGGTAC CNNNN
NNNNCCATGG CATGGNNNN

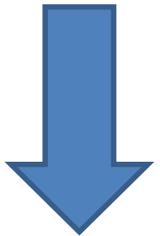
Électrophorèse de l'ADN sur gel d'agarose.



Molécules migrent dans un champ électrique



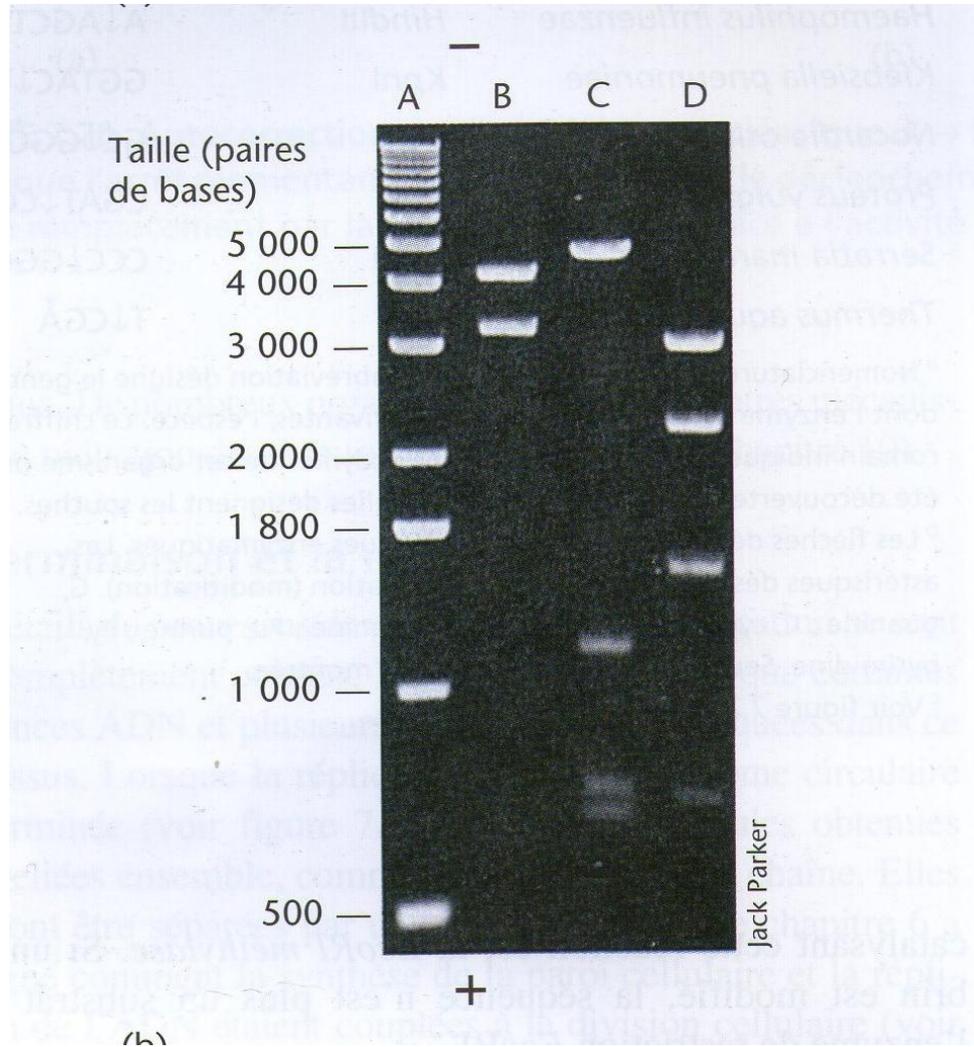
Charge, Taille et de leur forme

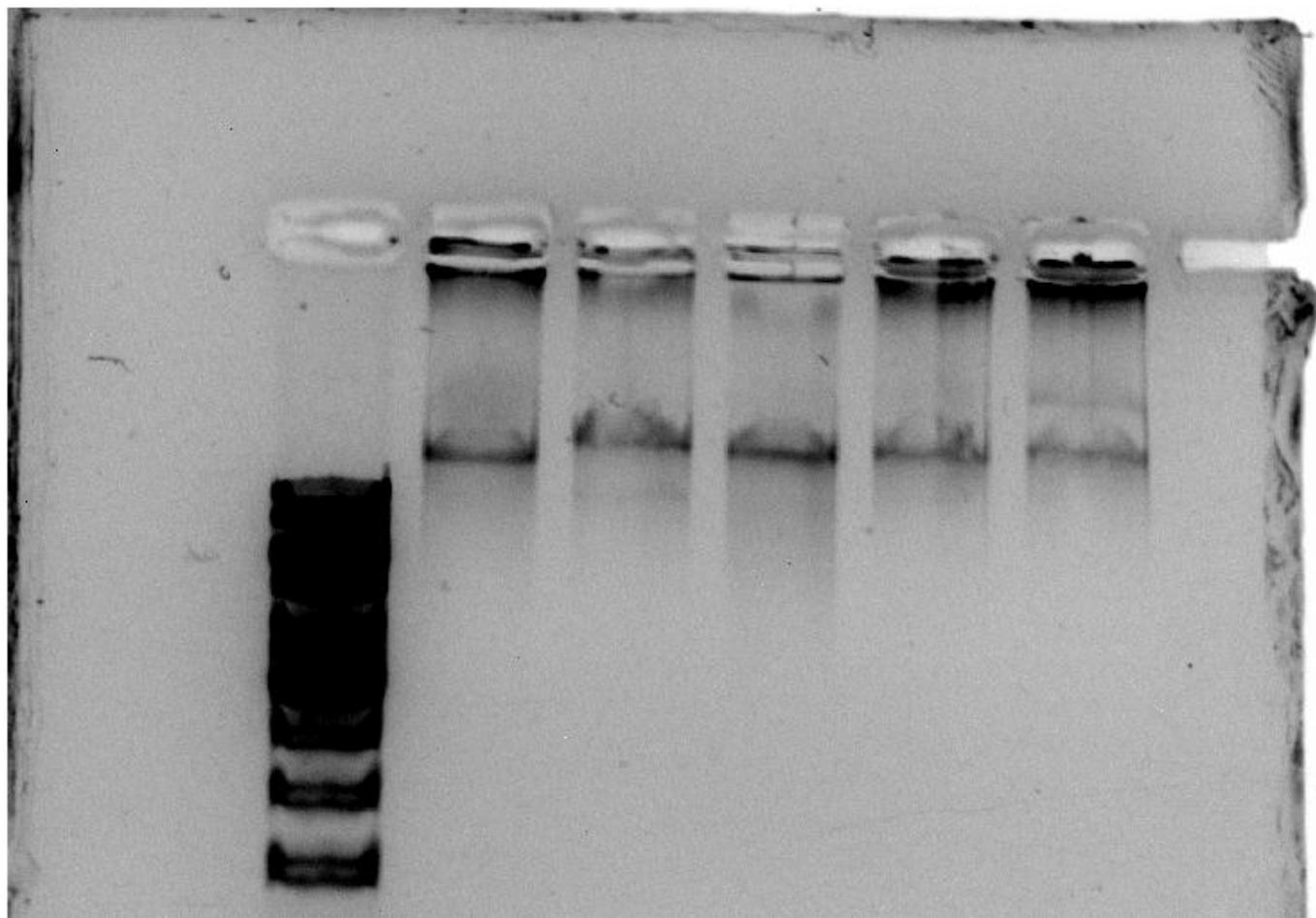


Coloration au bromure ethidium
Cancérigène



Électrophorèse de l'ADN sur gel d'agarose.

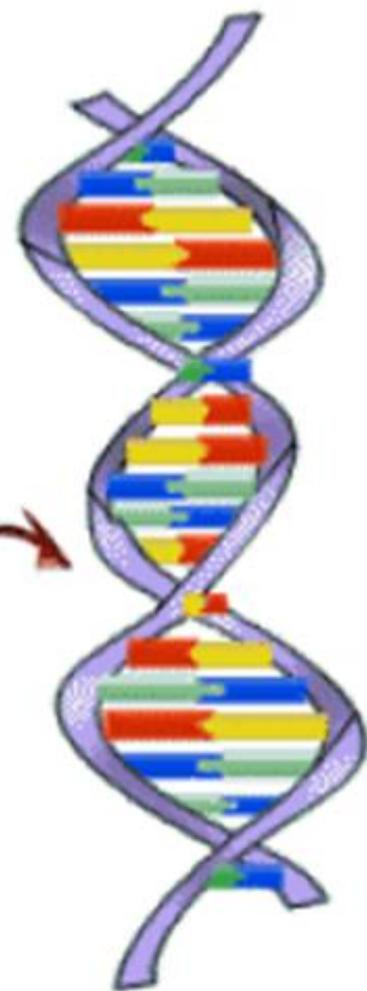
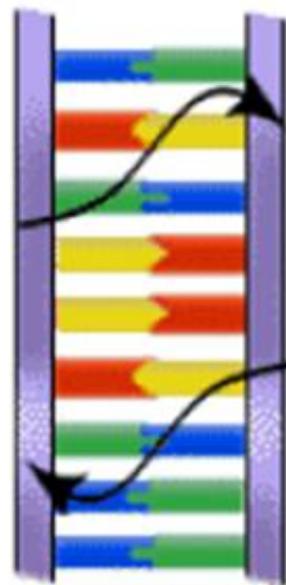
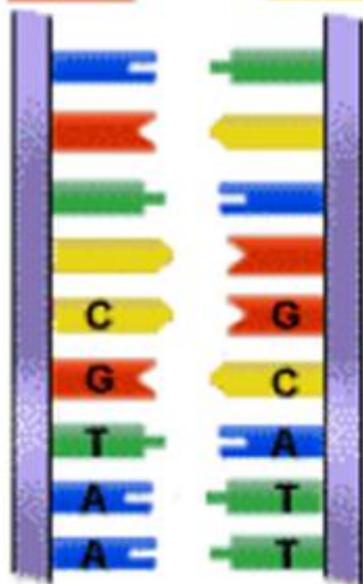




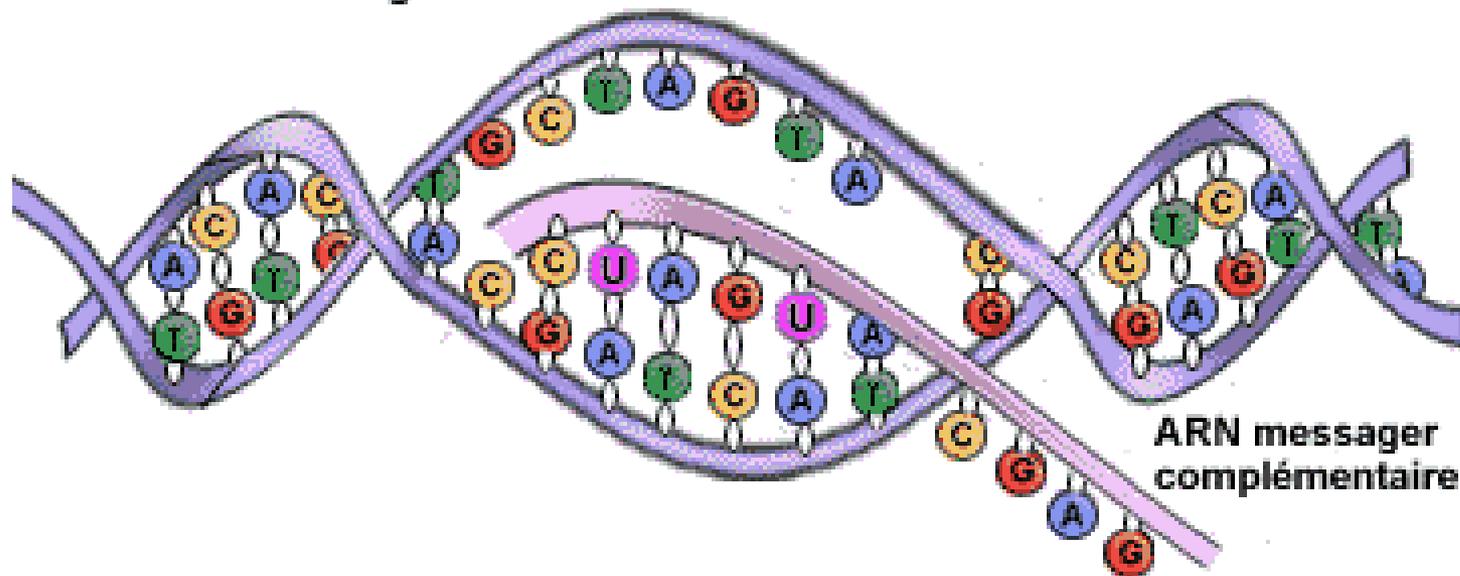
adénine (A) thymine (T)



guanine (G) cytosine (C)



Molécule d'ADN non déroulée -- un brin sert de matrice pour la synthèse de l'ARN messager



La mutation n'est toujours perceptible ex: acquisition de la résistance à un antibiotique

Techniques de révélation

Pour la révéler on utilise la **méthode des répliques** qui permet de conserver toutes les colonies poussant sur milieu minimum en réalisant le transfert de quelques Bactéries de ces colonies sur le milieu renfermant l'antibiotique grâce à un tampon :

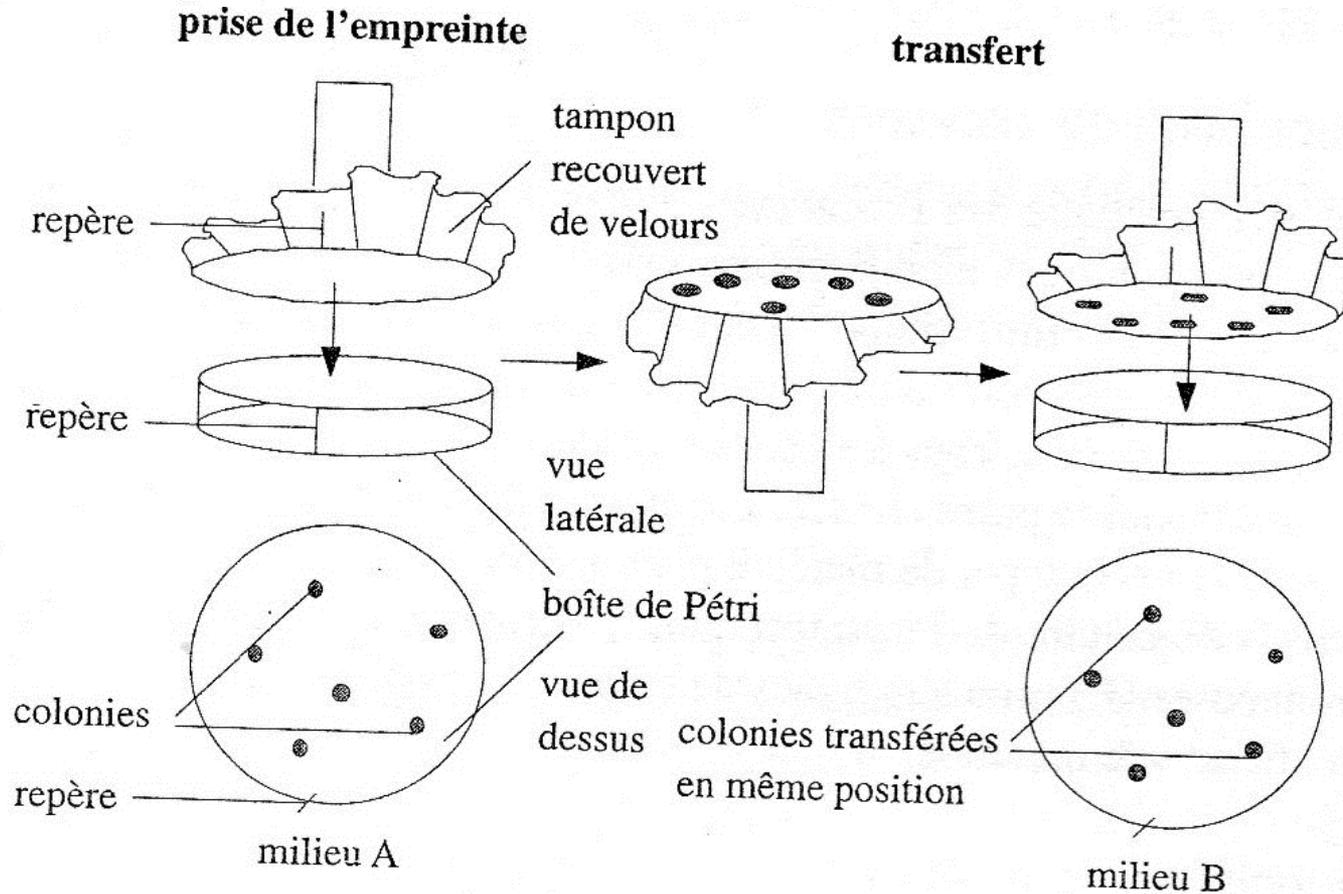


Figure Technique des répliques

Bases moléculaire des mutations

Les mutations peuvent revêtir un caractère *spontané* ou bien être *induites*. Les **mutations spontanées** peuvent résulter d'une exposition aux radiations (radiations cosmiques, par exemple) qui endommagent la structure de la double chaîne d'ADN. Les radicaux libres sont également responsables de modifications chimiques de l'ADN. Par exemple, la guanine peut être modifiée en 8-hydroxyguanine conduisant ainsi à des mutations au niveau de l'appariement des bases de la molécule d'ADN. Cependant la majorité des mutations spontanées résultent d'erreurs d'appariement de base qui apparaissent pendant la réplication de l'ADN.

Les mutations qui portent sur un changement dans une paire de bases sont des mutations dites **ponctuelles**. Ces mutations ponctuelles naissent par *substitution d'une paire de bases* par une autre au cours de la réplication et peuvent conduire à une variation phénotypique selon que la modification touche ou non une région codante de l'ADN et selon l'emplacement exact du changement de base dans la séquence nucléotidique du gène.

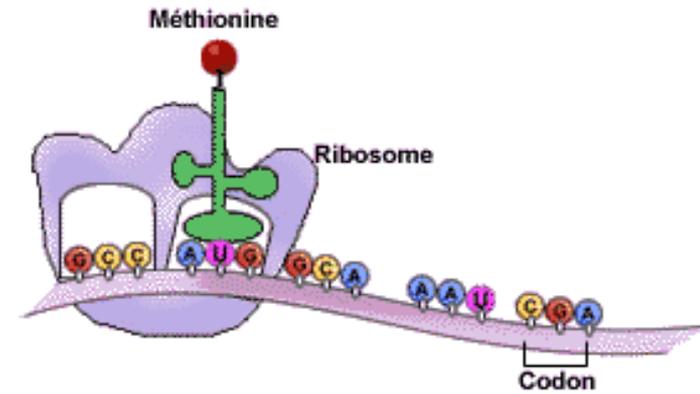
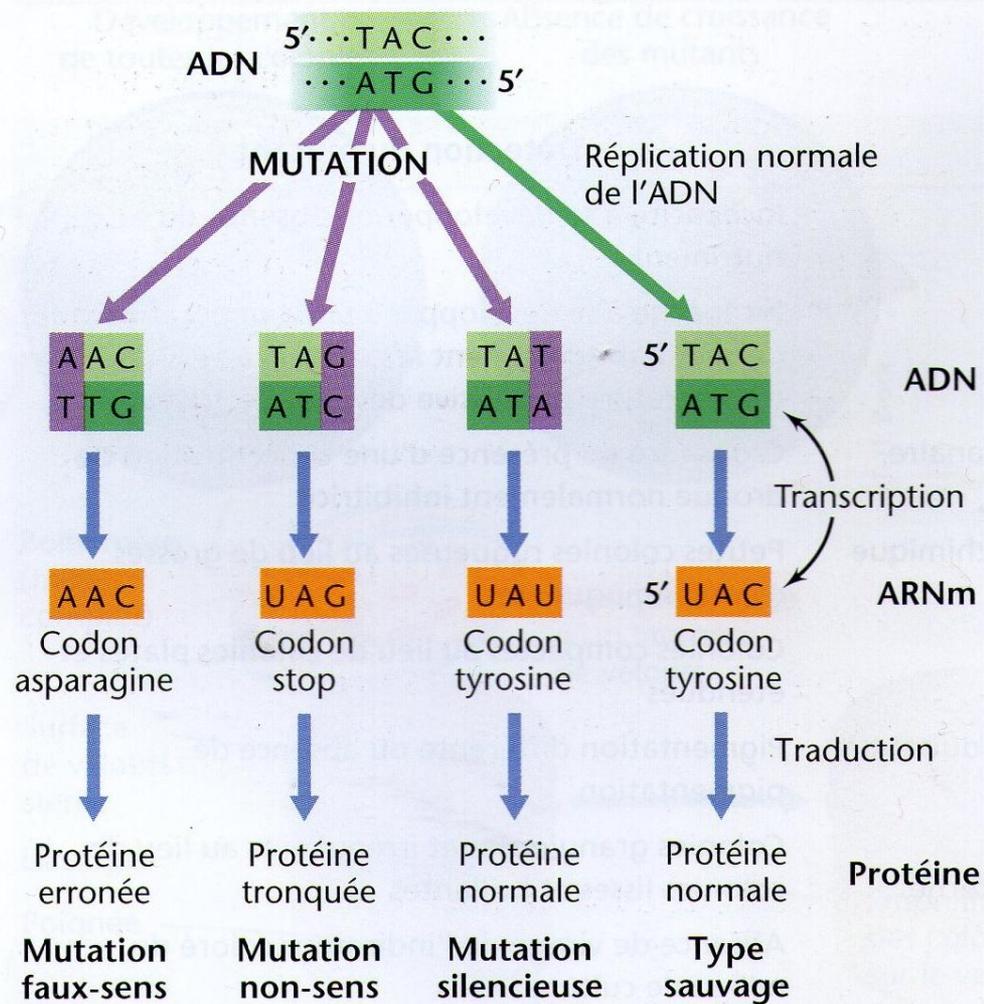
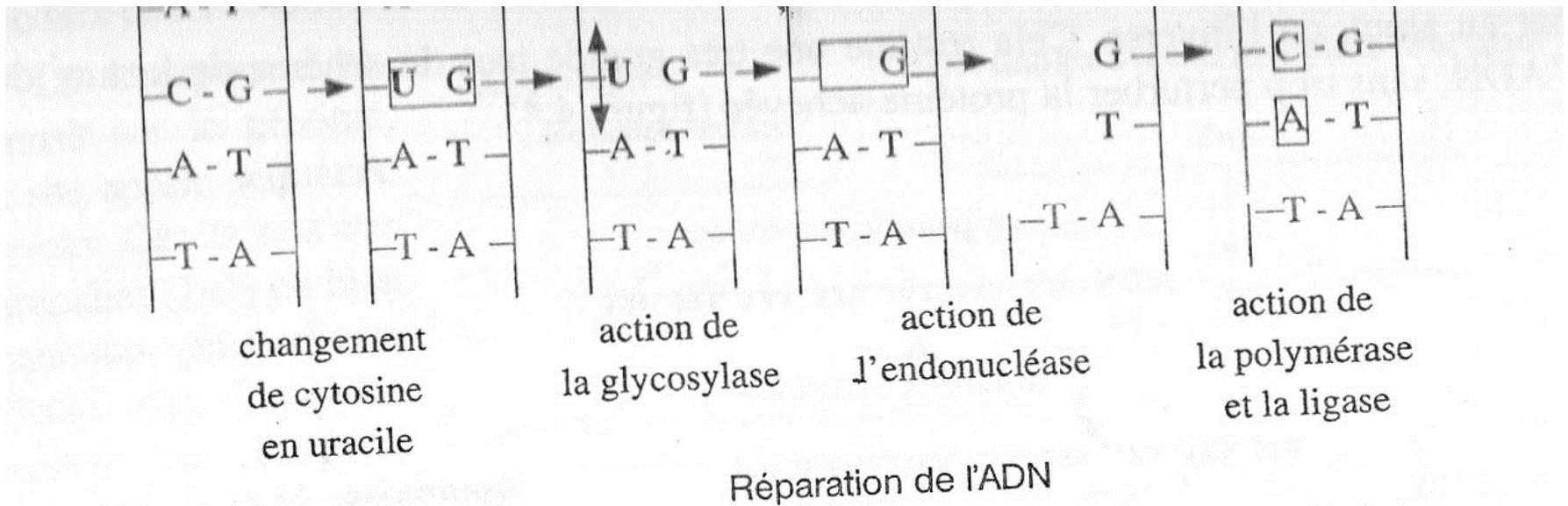


FIGURE 10.3 Conséquences d'une mutation ponctuelle par substitution sur l'information génétique. La modification d'une seule base d'un codon peut aboutir à l'expression de trois formes protéiques différentes.

Taux de mutation

Le taux de mutation spontanée est très faible, de 10^{-7} à 10^{-9}



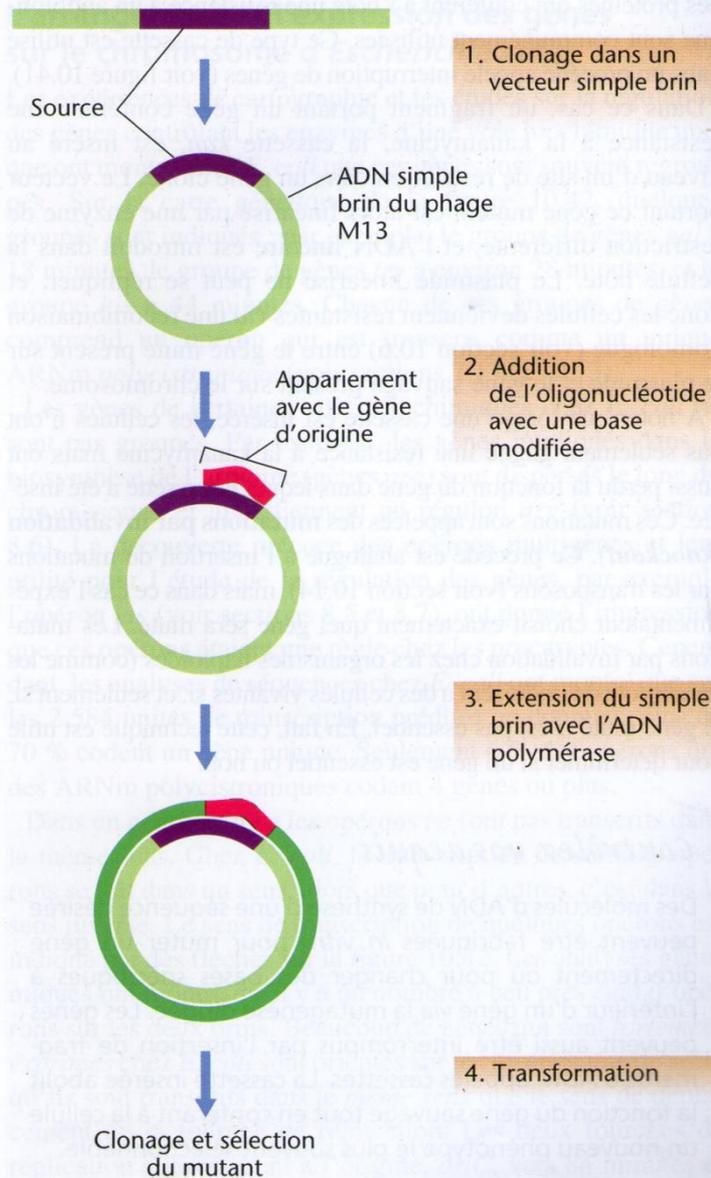


FIGURE 10.40 Mutagenèse dirigée en utilisant de courts oligonucléotides de synthèse. Notez que le clonage dans le bactériophage M13 permet de produire de l'ADN simple brin nécessaire dans les expériences de mutagenèse dirigée.

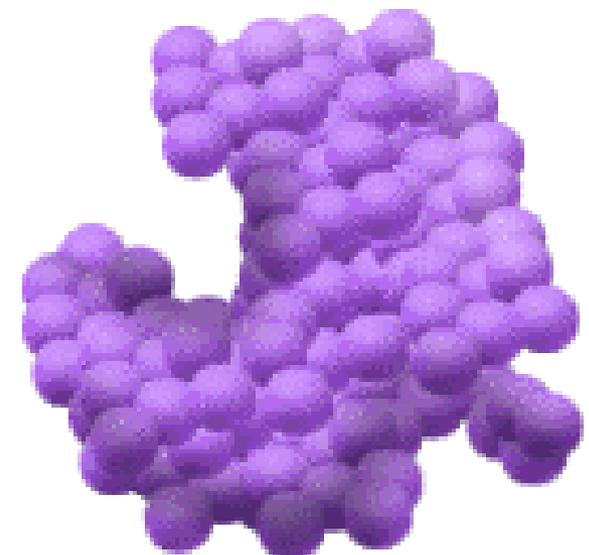
La mutagenèse dirigée peut être utilisée pour tester l'efficacité de protéines contenant des substitutions connues d'acides aminés. Par exemple, si l'on souhaite étudier le site actif d'une enzyme pour connaître l'importance d'acides aminés particuliers dans cette région, la mutagenèse dirigée peut être utilisée pour changer un acide aminé spécifique et l'enzyme ainsi modifiée est testée et comparée à l'enzyme sauvage. Dans ce type d'expérience, le vecteur contenant l'ADN muté devra être transféré dans une souche mutante incapable de produire l'enzyme en question. De ce fait, l'activité enzymatique mesurée sera seulement celle engendrée par l'enzyme mutée.

L'utilisation de la mutagenèse dirigée a permis aux enzymologistes d'obtenir des informations par exemple sur les *acides aminés essentiels* pour qu'une enzyme soit fonctionnelle ; sur la façon dont les enzymes catalysent les réactions chimiques ; sur les interactions avec d'autres protéines, etc.



**Certaines protéines sont formées
de plusieurs polypeptides**

Enzyme



La technologie de l'ADN recombinant

- Regroupe un ensemble de méthodes de manipulation de l'ADN qui permet d'étudier dans le détail la structure des génomes et les fonction associées à leurs séquences
- parmi ces méthodes le clonage permet d'isoler et de produire sous une forme pure un gène d'intérêt en copies multiples

Les principales étapes du clonage

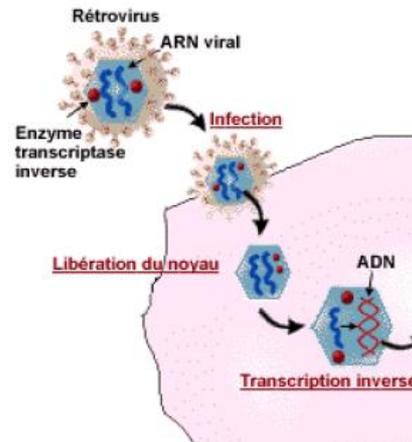
- 1. Extraction et fragmentation de l'ADN contenant la séquence d'intérêt

➔ Il peut s'agir de l'ADN génomique

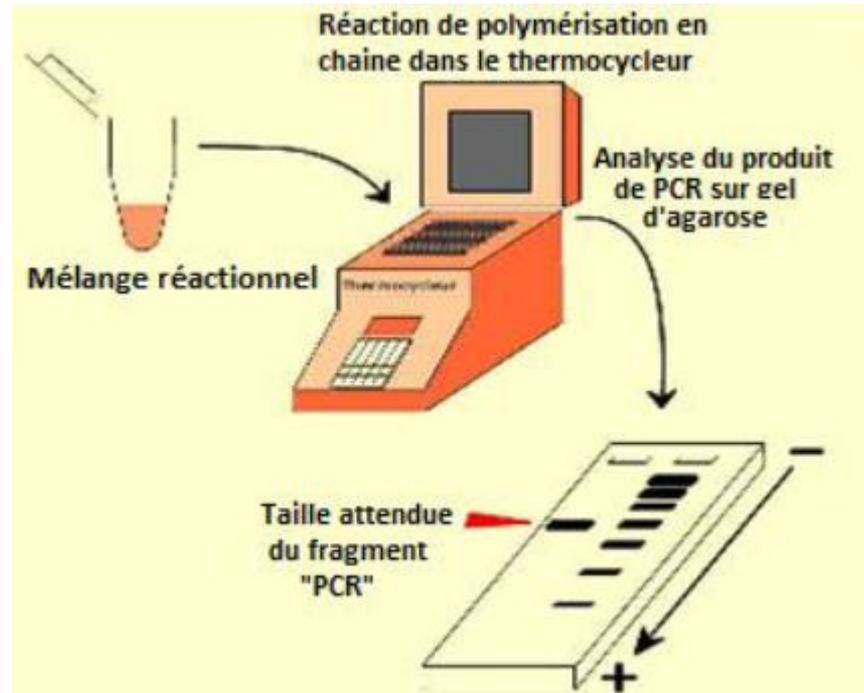
ADN double brin



➔ Il peut s'agir de l'ADNc, obtenue par transcription inverse à partir d'un ARNm



➔ **D'un gène ou d'une séquence pluri génique**
amplifiée par pcr

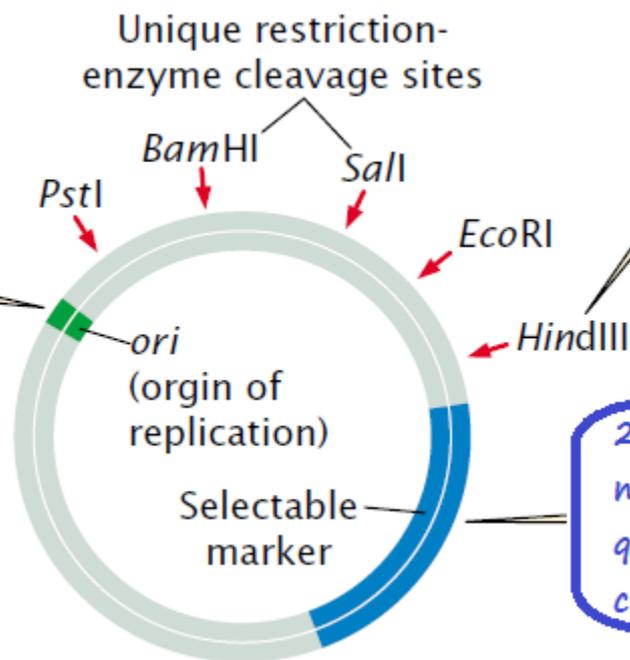


➔ **Molécule d'ADN entièrement synthétique**
fabriquée in vitro

2. Insertion d'ADN dans un vecteur de clonage

- Un vecteur de clonage est un petit élément génétique à répllication autonome, utilisé pour produire de multitude de copie du gène d'intérêt. Ces vecteurs de clonage sont spécialement conçus pour permettre l'intégration de la portion d'ADN exogène dans un site spécifique sans que cela affecte sa propre répllication. Il existe plusieurs types de vecteurs pouvant introduire des molécules d'ADN recombinées dans les bactéries, les levures, les cellules végétales ou les cellules de mammifères et humaines.

1. En premier, un vecteur de clonage doit posséder un origine de réplication connu par la cellule hôte, ce qui permet sa réplication.

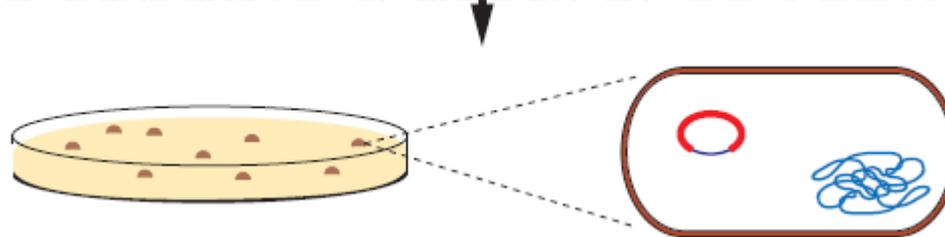


3. Un vecteur de clonage doit posséder un site de coupure unique pour un ou plusieurs enzymes de restriction.

2. Il faut qu'il contienne un marqueur de sélection, ce qui permet la sélection des clones transformés

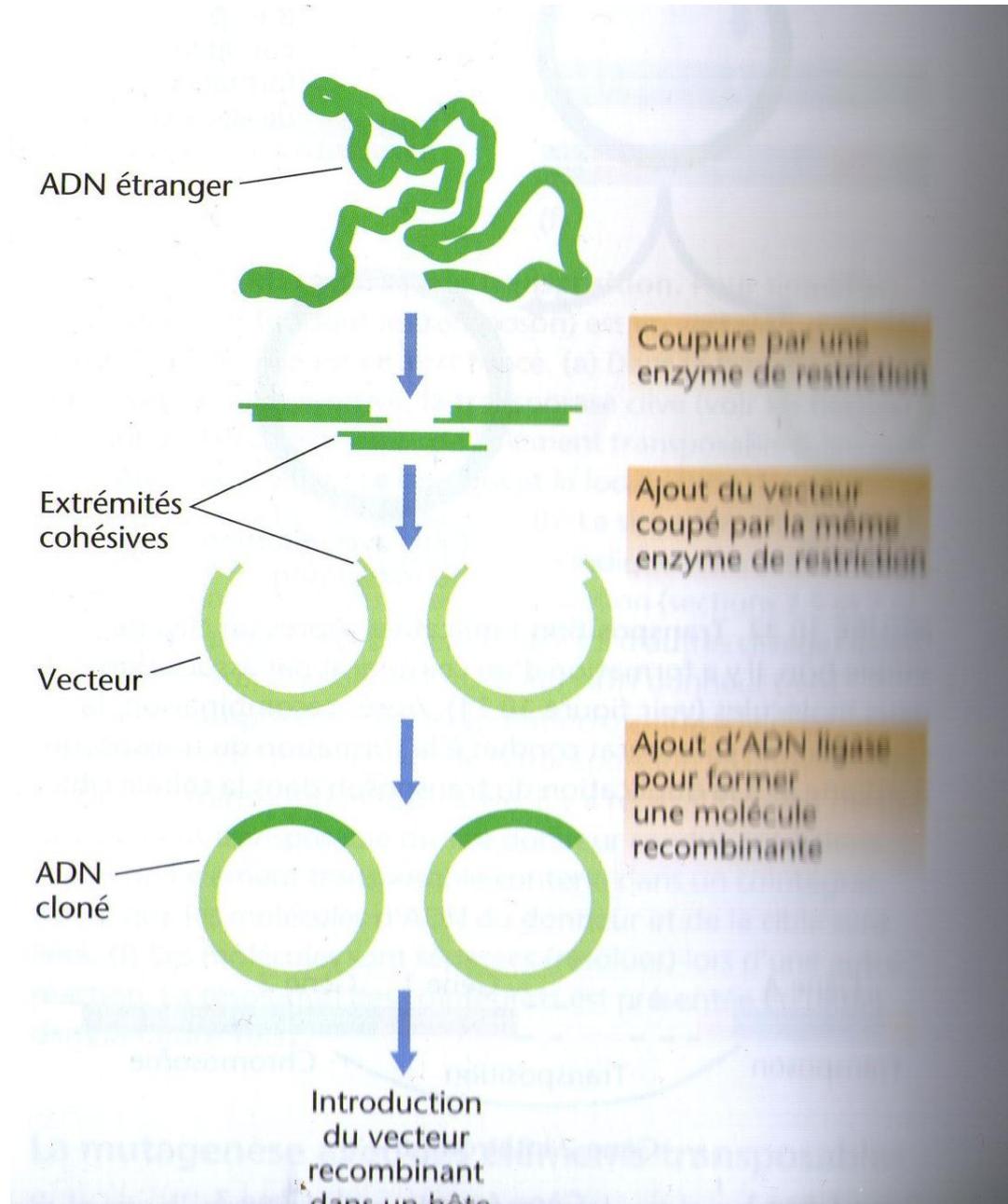
3. Introduction de l'ADN cloné dans un organisme hôte

- introduction du vecteur recombinant **par transformation** dans une cellule bactérienne hôte capable d'assurer sa **réplication**



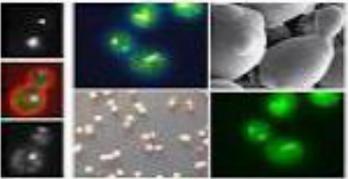
- Clonage en aveugle ou aléatoire
 - Shotgun cloning

Le clonage moléculaire



Hôtes de clonage

- **1- L'hôte idéal**
- Pour obtenir de grande quantité d'ADN cloné l'hôte idéal doit
- Se développer rapidement dans un milieu de culture peu onéreux.
- Être non pathogène.
- Être capable d'incorporer l'ADN.
- Être stable en culture
- Possède des enzymes appropriées pour la réplication du vecteur.
- Les hôtes répondant à ces critères sont des microorganismes eucaryotes ou procaryotes dont les génomes sont bien connus car entièrement séquencés, génétiquement manipulables.

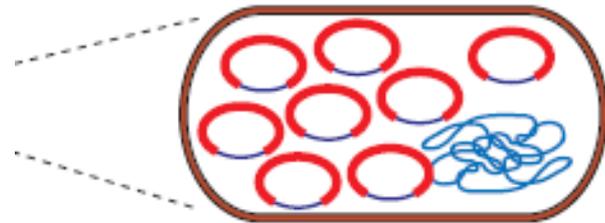
<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Procaryotes		Eucaryotes
Bacille à Gram – 	Bacilles à Gram + Spore + 	
Avantages		
<ul style="list-style-type: none"> - Génétiquement très bien connue. - Nombreuses souches disponibles - Procaryote le plus connu 	<ul style="list-style-type: none"> - Facilement transformable - Non pathogène - Protéines secrétés naturellement - Formation d'endospores facilitant les cultures. 	<ul style="list-style-type: none"> - Génétiquement très bien connue - Non pathogènes - Assure la maturation des ARNm et des protéines - Facile à cultiver.
Inconvénients		
<ul style="list-style-type: none"> - Potentiellement pathogènes -Périplasme piégeant les 	<ul style="list-style-type: none"> - Génétiquement instable - Génétique moins connue 	<ul style="list-style-type: none"> - Plasmides instables -Pas de réplication pour la

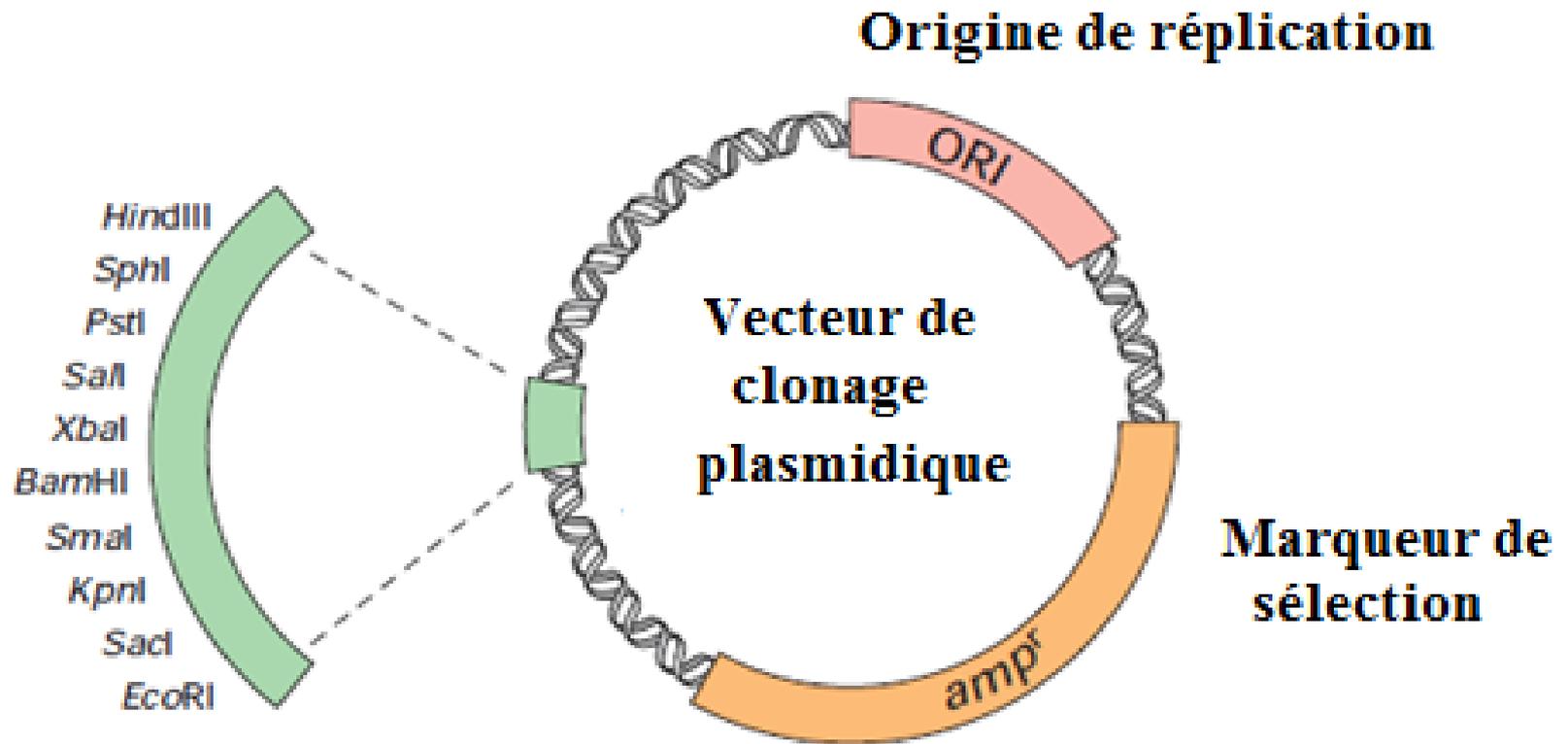
1- Vecteurs bactériens

- La bactérie *E. coli* est la bactérie la plus utilisée en clonage moléculaire, l'ADN recombinant peut être introduit sous forme de plasmides, Phages, phagmides, cosmides, BAC etc.
- **1-1- Plasmides**
- Les plasmides sont des petits éléments génétiques extra-chromosomiques doués de la réplication autonome, ce sont typiquement des molécules d'ADN double brin, circulaires, Ils contiennent des gènes codants souvent pour des protéines qui donnent un ou des avantage(s) à la cellule hôte.
Comme par exemple :
- - Résistance aux antibiotiques
- - Résistance aux métaux lourds
- - Dégradation de composés aromatiques

Avantages des plasmides comme vecteurs de clonage

- Petite taille donc facile à isoler et à manipuler
- Possèdent leurs propre origine de réplication: réplication autonome
- Peuvent être présents en copies multiples dans la cellule hôte amplifiant d'autant l'ADN d'intérêt qui est insérée





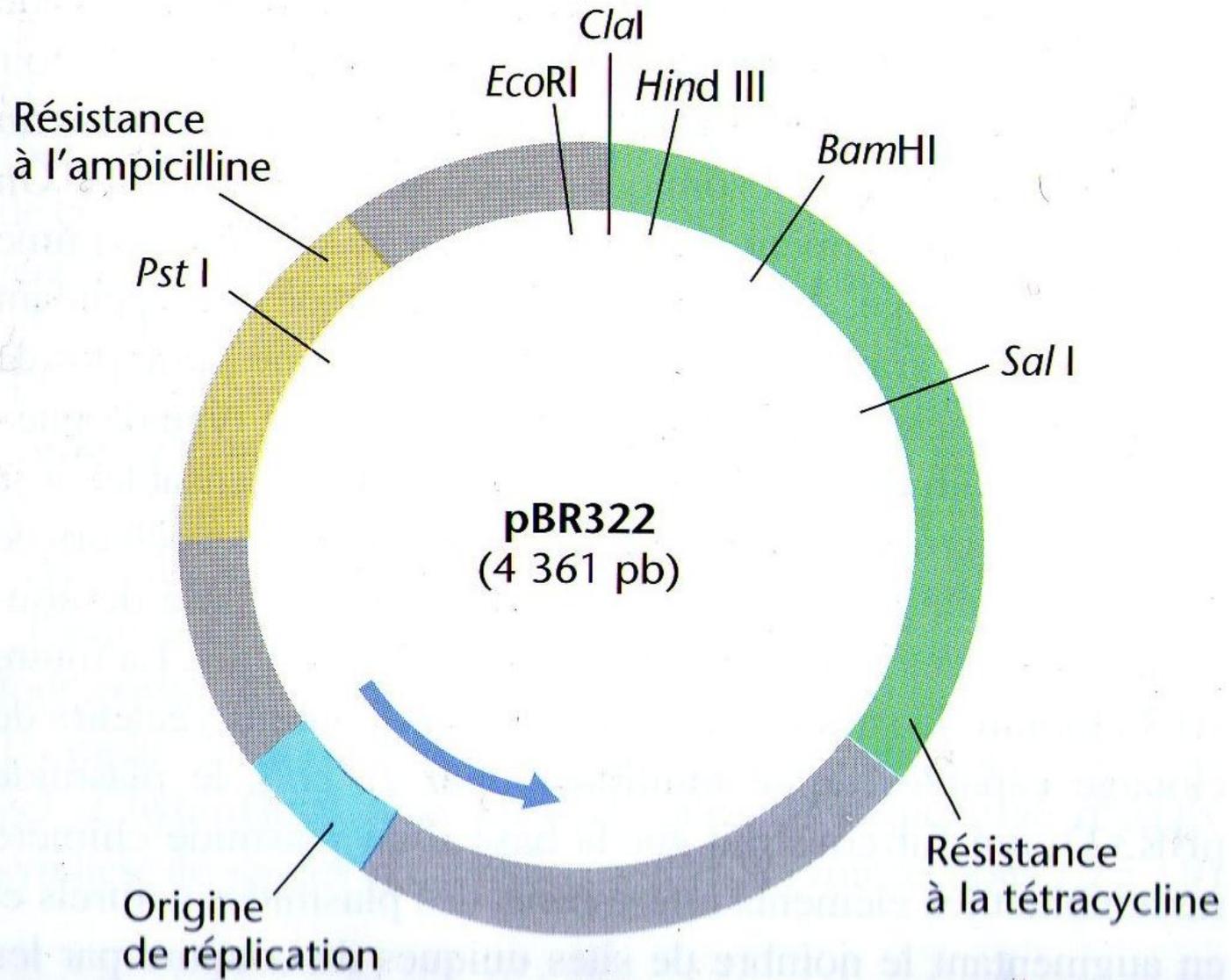
Polylinker :
"site de clonage multiple"

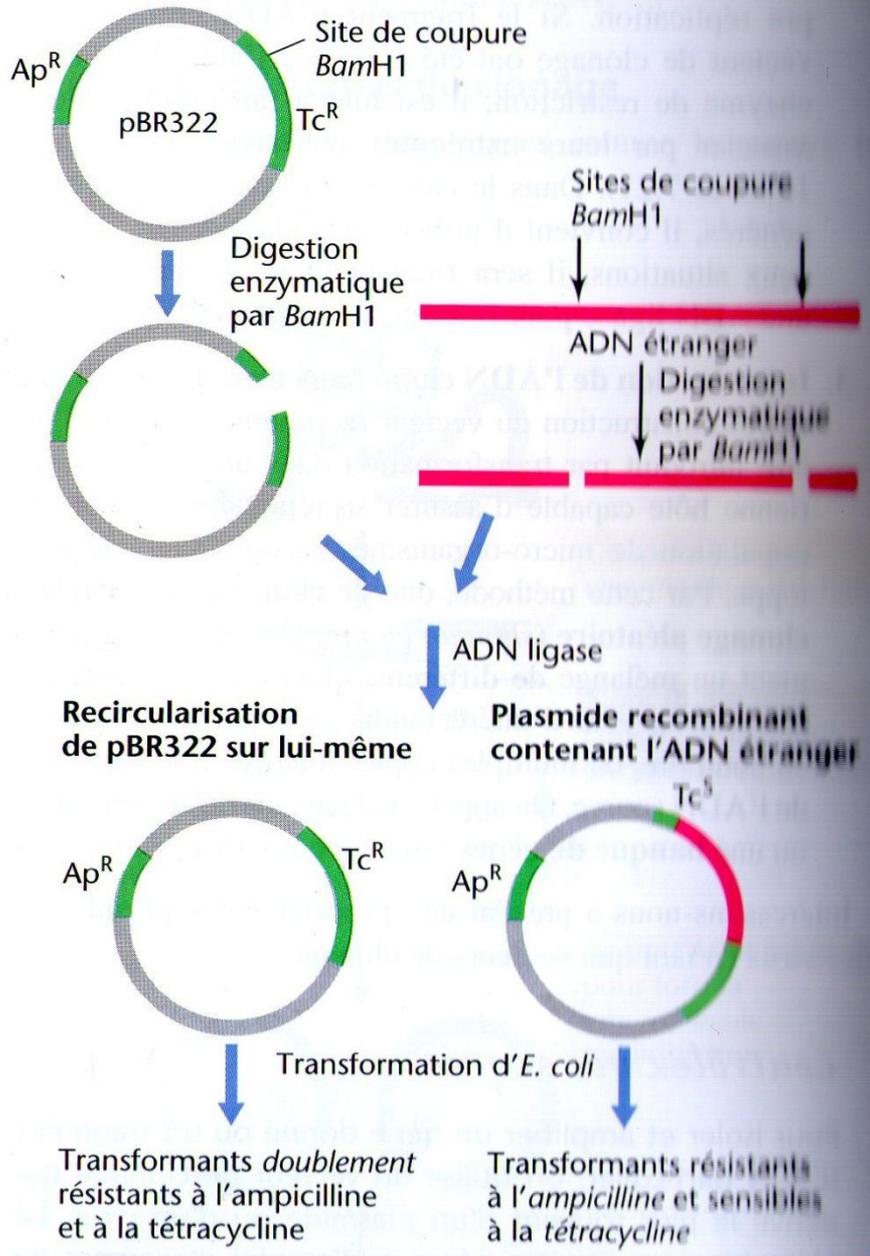
1-1-1-Plasmide pBR322

- Le pBR322 appartient à une série de vecteurs de clonage de première génération, partiellement construit par génie génétique. Qui fut construit sur la base d'une chimère rassemblant les éléments intéressants des plasmides naturels et en augmentant le nombre de sites uniques de coupure par les enzymes de restriction.

1-1-1-1-Caractéristiques du plasmide pBR322

- 1- pBR322 est un petit plasmide constitué de 4361 paires de bases, dont la séquence nucléotidique est complètement connue.
- 2- Il est maintenu de façon stable dans son hôte à un niveau voisin de 20 à 30 copies par cellule.
- 3- Sa production peut être portée à plusieurs milliers de copies (1000 à 3000 copies par cellule) lorsque l'on inhibe la synthèse protéique par l'addition de chloramphénicol dans la culture.
- 4- Il est facilement purifiable sous la forme superenroulée par les techniques usuelles d'extraction et d'isolement.
- 5- Il est possible d'y insérer un fragment d'ADN de bonne dimension sans toutefois dépasser la taille de 10kpb sous peine de l'instabilité plasmidique.
- 6- Il possède deux gènes de résistances aux antibiotiques : l'un pour l'ampicilline (ApR), l'autre pour la tétracycline (TcR), l'expression de l'un de ces deux gènes facilite la sélection des clones recombinants.
- 7- Il possède également vingt sites uniques pour des enzymes de restriction.
- 8- Il est facilement transférable par transformation ou par électroporation.



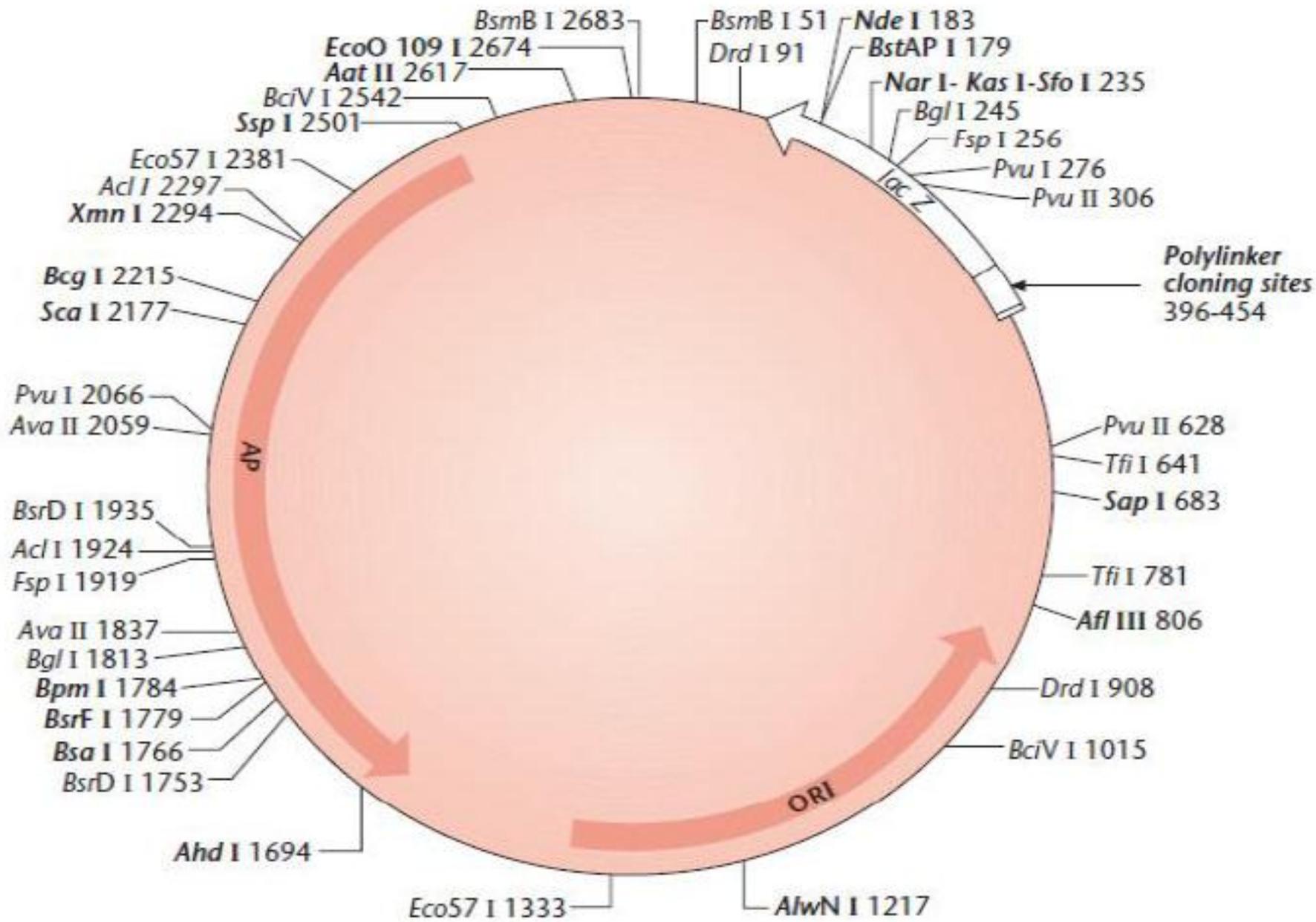


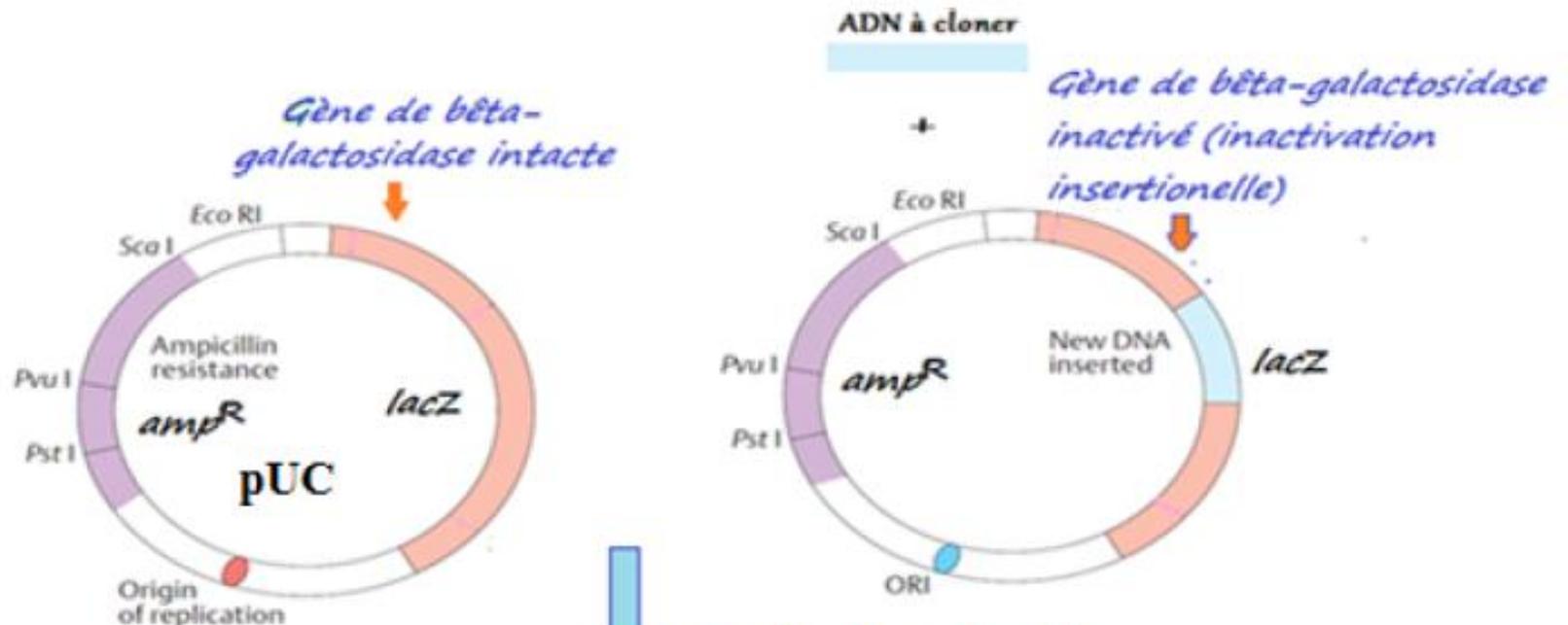
INACTIVATION INSERTIONNELLE



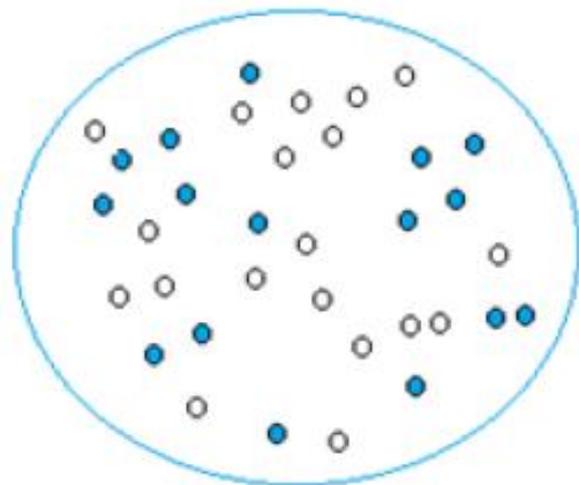
Vecteurs de seconde génération

- De nouvelle génération de plasmides plus puissants sans cesse croissantes ont été développés depuis pBR322 et ces dérivés. C'est le cas de la famille pUC appelés (les vecteurs de clonage de secondes génération).
- Les vecteurs de clonage de seconde génération ce sont des petits plasmides d'environ **2700pb**. Le plasmide pUC19 contient **le gène de résistance à l'ampicilline de pBR322**, mais en plus il possède une partie du gène lacZ dans lequel a été introduit un site multiple de clonage (Polylinker), contenant toute une série de sites de coupure unique.
- Le fait que ce polylinker soit inséré dans le gène *lacZ* qui intervient dans le catabolisme du lactose permet de révéler facilement l'intégration d'un insert par « inactivation insertionnelle ».
- L'utilisation d'un inducteur coloré comme le X-gal (5-bromo-4chloro-3-indonyl- β -D-galactoside), l'hydrolyse de ce dernier en dibromo-5,5-dichloro-4, 4-indigo (de couleur bleu), indique la production de β -galactosidase.





Introduction dans la cellule hôte *Ex. E. coli*



Colonies colorées en bleu
 " Bactérie contenant un vecteur intacte "

Colonies colorée en blanc
 " Bactérie contenant le gène d'intérêt "

- L'inactivation insertionnelle du gène *lacZ* permet de révéler facilement les colonies contenant le gène d'intérêt (sélection positive: colonies blanche). Le milieu de sélection est supplémenté par l'ampicilline.
- La sélection des clones contenant le gène d'intérêt par le test x-gal. Cette stratégie a également été largement employée dans le développement de vecteurs de clonage de type viraux.

- **Dans certains vecteurs le polylinker est introduit dans un gène qui lorsqu'il est exprimé, est létal pour la cellule. Donc seules les cellules qui contiennent un plasmide dans lequel le gène létal est inactivé sont capables de se développer.**
- **La nécessité de vecteur pour le clonage de grands fragments d'ADN et d'autres objectifs pour répondre à des besoins précis. Une collection de vecteurs très spécialisés s'est constituée**

Les Cosmides

Propriétés générales des cosmides

Les cosmides sont des vecteurs artificiels hybrides : phage lambda-plasmides. En fait, ils se comportent comme des plasmides avec des sites de restriction permettant l'insertion d'ADN étranger. Ils renferment également un gène de résistance aux antibiotiques (ampicilline). De plus, un site cos d'un virus lambda a été inclus dans leur ADN circulaire ce qui permettra au cosmide d'être empaqueté dans la tête d'un virus lambda.

Avantages et désavantages des cosmides

Avantages :

La taille des fragments insérables peut atteindre 50 kb. Leur incorporation dans les bactéries (transformation) est plus efficace que pour les plasmides.

Désavantages :

Obligation d'empaqueter l'ADN.

- Les BAC
(Bacterial Artificial Chromosome)
Peuvent cloner des fragments d'ADN de taille variant de 100 à 200kb
- Les YAC
(Yeast Artificial Chromosome : Chromosome artificiel de levure).
Peuvent intégrer des fragments de grande taille (jusqu'à 400kb). Indispensables pour analyser les grands génomes (notamment, le génome humain).
A noter : pour obtenir de grands fragments d'ADN, on utilise des enzymes de restriction qui ne coupent que très rarement.
Inconvénient : les fragments insérés subissent parfois des réarrangements (insertions, chimérismes, délétions) : les YAC ne peuvent être considérés comme absolument représentatifs de la région initiale introduite.

5-Vecteurs spécifiques

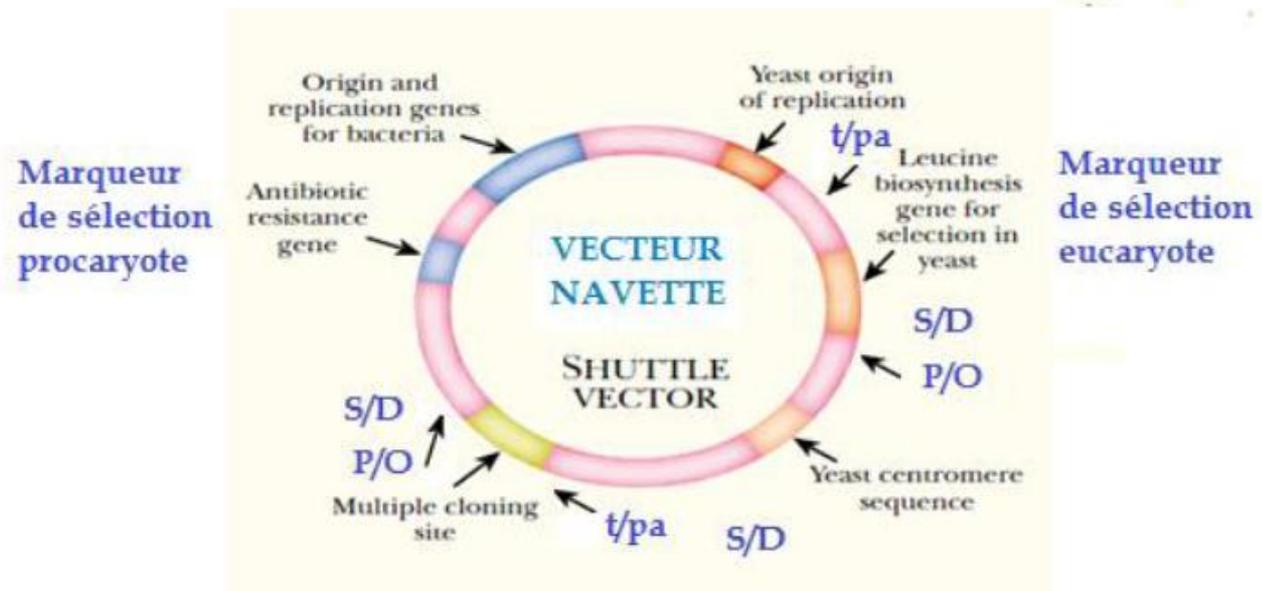
Pour répondre aux besoins de la biotechnologie, surtout si c'est le but du clonage est d'obtenir un niveau d'expression élevé d'un gène dans un hôte approprié, d'autres vecteurs spécialisés ont été produits.

5-1- Vecteurs navettes et d'expression

Les vecteurs navettes peuvent transporter un ADN cloné entre deux organismes différents et se répliquer de manière stable dans chacun d'eux.

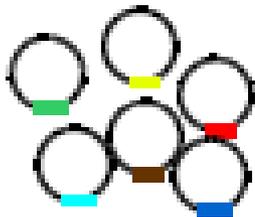
Exemple: Un vecteur se réplique chez *E. coli* et dans une levure (fig. 14), ou bien autre bactérie et même une cellule de mammifère.

Il faut noter que les organismes possèdent des systèmes de régulation complexe qui sont des obstacles à l'expression des gènes étrangers. Pour cette raison les vecteurs d'expression ont été élaborés.



Définition

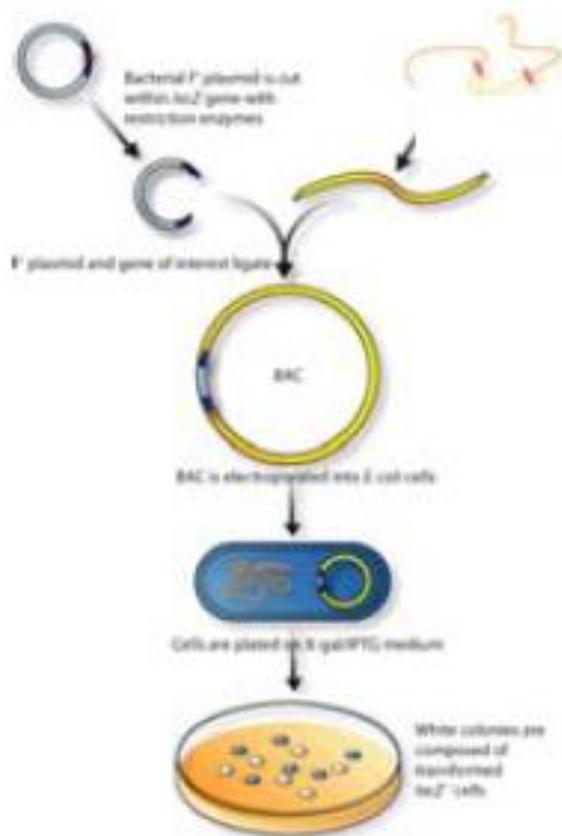
Une banque d'ADN est une POPULATION de vecteurs contenant des fragment d'ADN divers représentatif d'un type cellulaire, d'un génome, d'un stade particulier de développement.



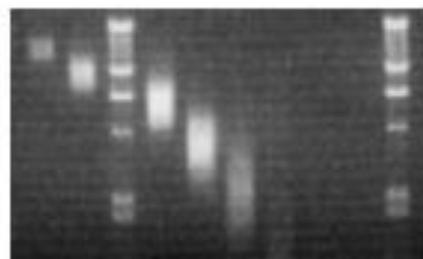
Une Banque est caractérisée par :

- le type de vecteur
- la nature des inserts (ADN génomique, ADNc), leur origine
- le pourcentage de vecteurs possédant un insert
- la taille moyenne des inserts
- la taille de la banque c.a.d la quantité de clones / ml de banque

Construction d'une banque d'ADN génomique dans un BAC



ADN Génomique fragmenté



Construction de banques de gènes

- Le vecteur étant choisi, la première étape est celle de la préparation de ADN à insérer
- On distingue deux procédures:

Il peut s'agir de l'ADN génomique

Il peut s'agir de l'ADNc, obtenue par transcription inverse à partir d'un ARNm

Cas de la construction de banque génomique

- ADN est découpé de façon aléatoire (par cassures mécaniques ou par digestion incomplète par une nucléase de restriction)



**La construction de banques génomique
implique le clonage de la totalité du
génom**

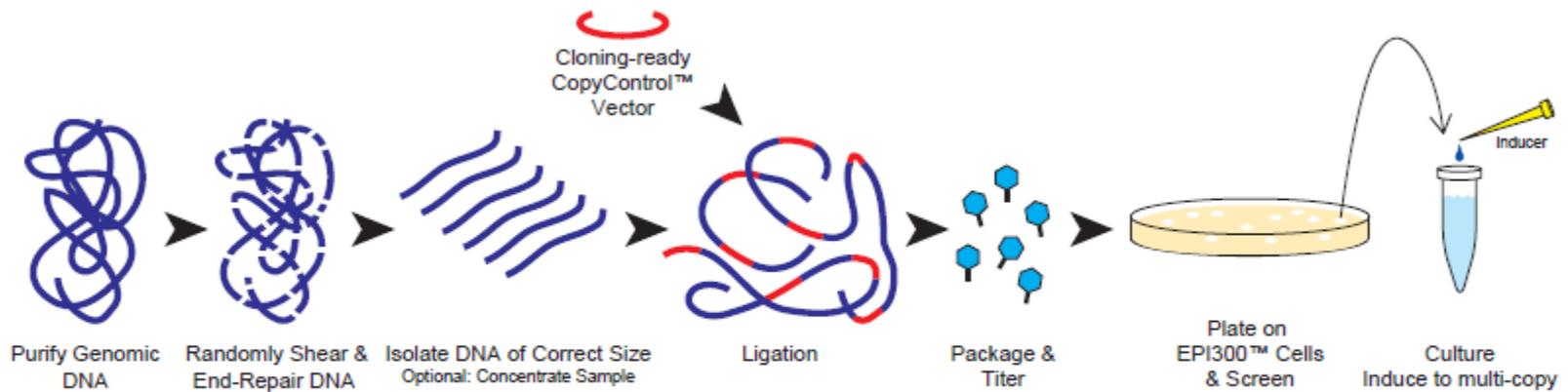


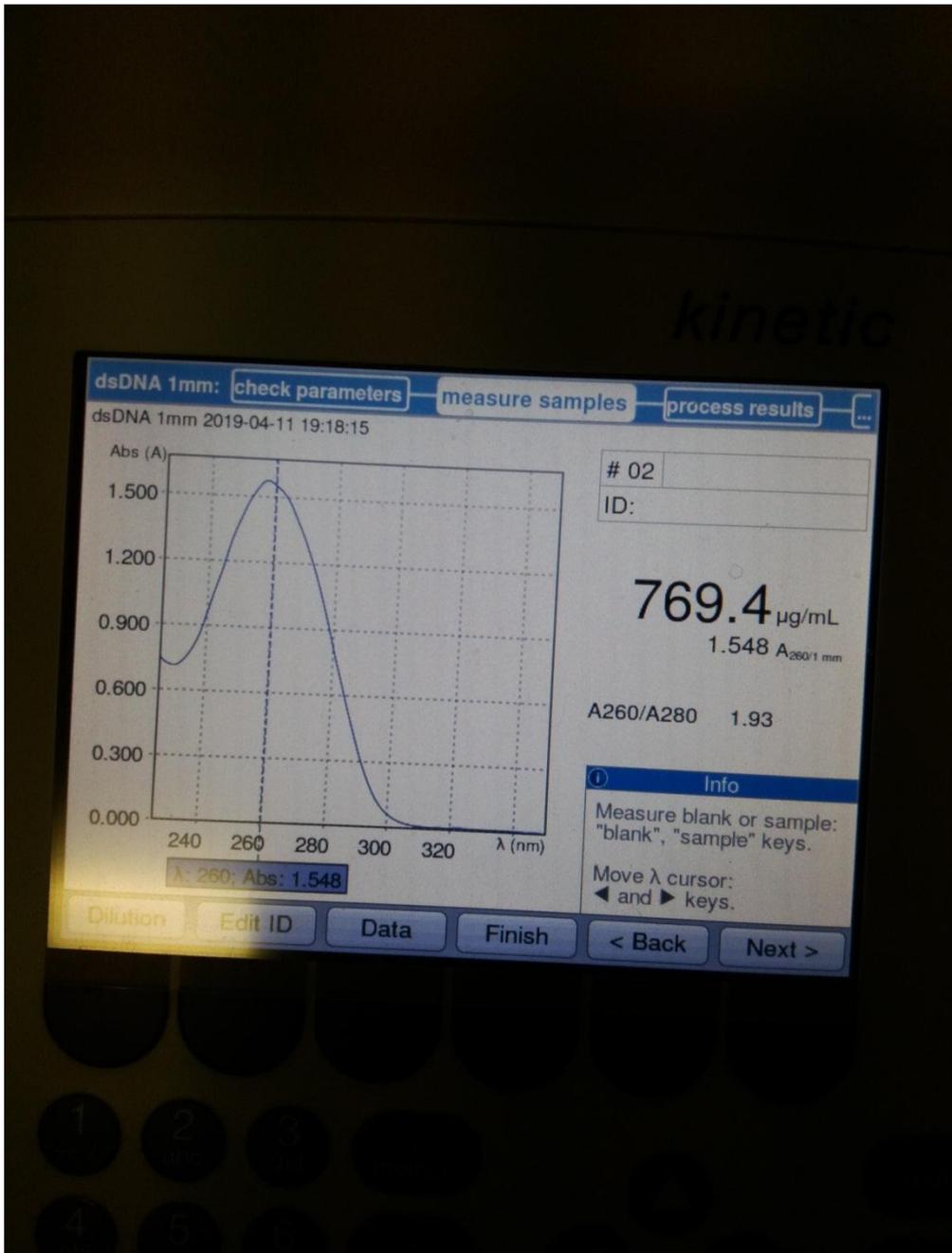
Figure 4. Production of a CopyControl™ Fosmid library and subsequent induction of clones to high-copy number.

A. Shearing the Insert DNA

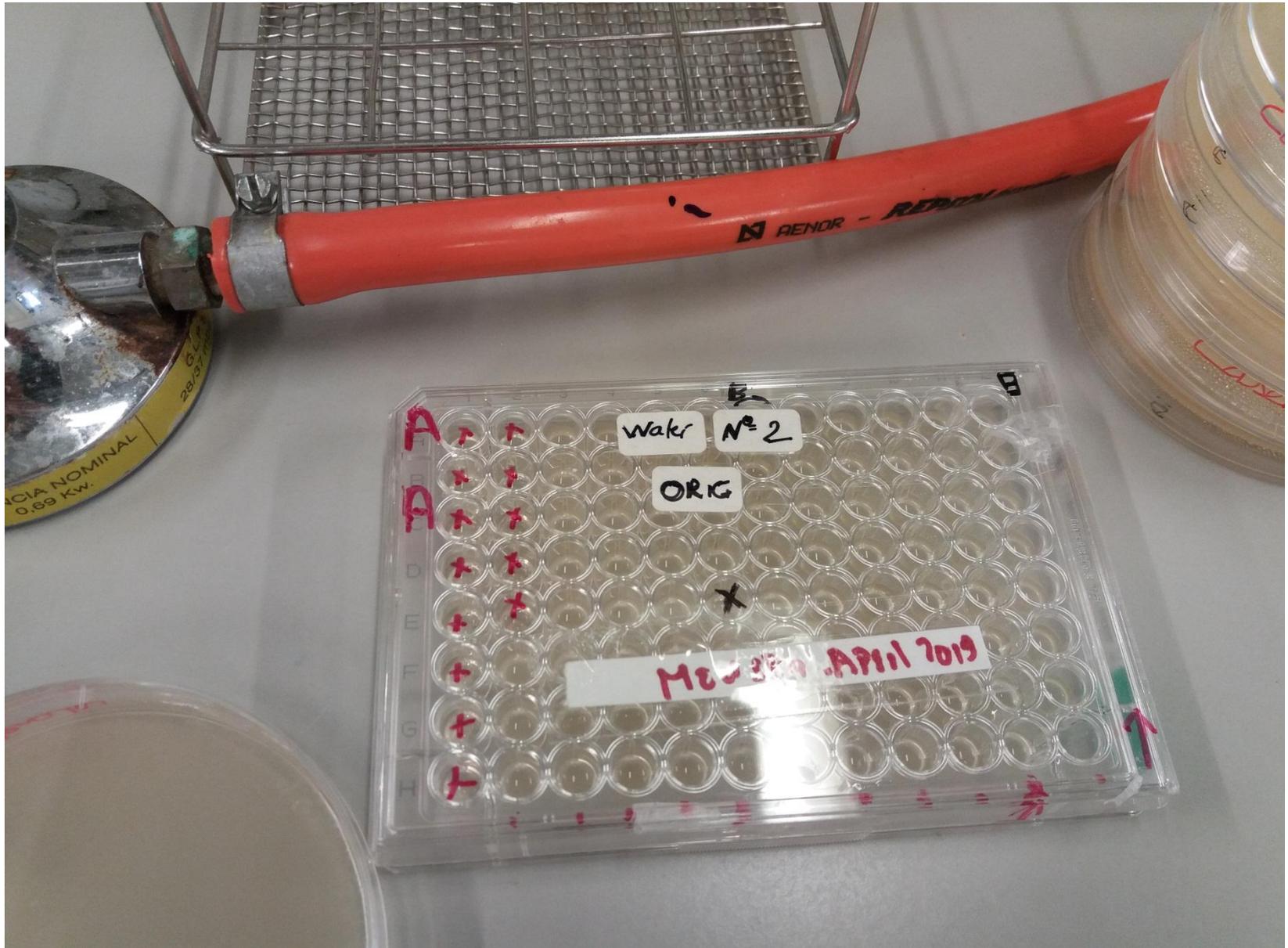
Tous les fragments de taille admissible par le vecteur choisi auront la possibilité d'être cloné



Tout le génome peut être représenté







Banque non ordonnée vs banque ordonnées



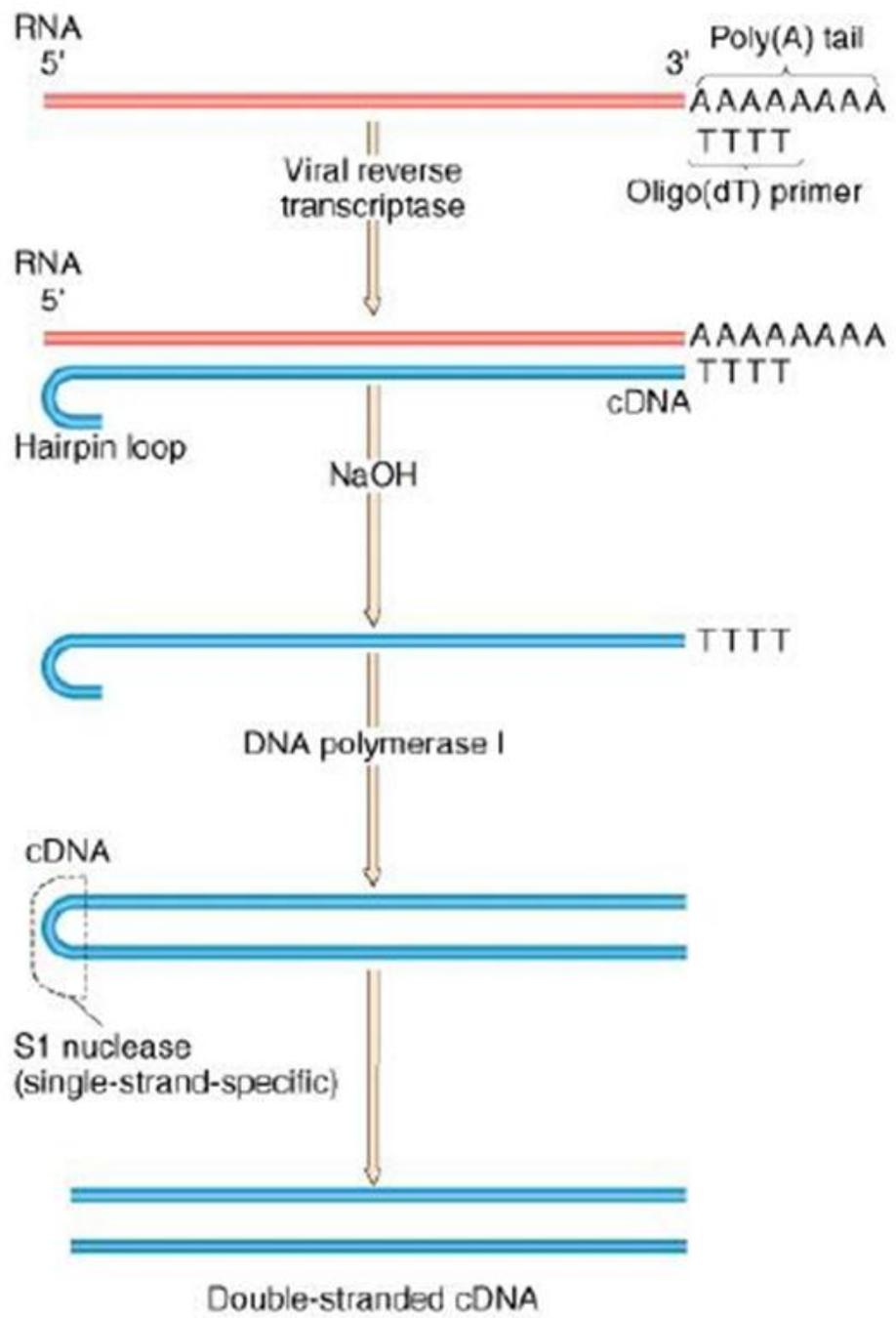
Chaque colonie est repiquée individuellement dans un puit de la plaque de 384 puits.

2- Banque d'ADN complémentaire ou ADNc:

Banque constituée d'ADNc, qui ne représentent pas nécessairement la totalité des ARNm. Il s'agit plutôt d'une banque fabriquée à partir uniquement des régions transcrites du génome.



Dans toutes cellule , une très faible partie du génome est transcrit en ARN, quel que soit la catégorie cellulaire qui va servir de point de départ



Avantages des banques d'ADN complémentaire

- **La banque nécessitera beaucoup moins de clones.**
- **on ne collectionne que des séquences codantes (sans introns) qui pourront s'exprimer dans un hôte procaryote même si elle sont d'origine eucaryote.**
- **Elle sont obligatoires pour cloner les gènes des virus à ARN.**

3- Banque d'expression: Banque dans laquelle le vecteur porte des signaux transcriptionnels permettant à n'importe quel insert cloné de produire un ARNm et en dernier lieu, une protéine.

EXPLOITATION DES BANQUES

Plusieurs techniques éprouvées permettent de construire des banques. Il reste à les exploiter, même avec une banque d'ADNc, le nombre de clones est important et le tri représente la partie la plus délicate des expériences de clonage, il existe de nombreuses stratégies mais aucune n'est universelle.

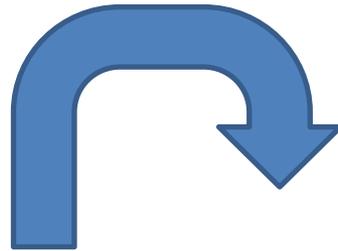
* Remarque : les termes de **cribler** et de **sélectionner** n'ont pas la même signification: lors de la sélection, on **élimine** tous les clones non intéressants, le criblage permet de **repérer** le clone intéressant.

l'identification des cellules possédant de l'ADN cloné ne représente que la première étape. *Trouver le clone* qui possède le gène d'intérêt reste l'objectif principal. Parfois le gène cloné peut être *exprimé* (la protéine est synthétisée), mais le plus souvent il ne l'est pas et la seule possibilité est alors de le chercher au niveau de l'ADN.

Les gènes étrangers exprimés dans l'hôte de clonage

Si le gène étranger est exprimé, la recherche de protéines s'effectue au niveau des colonies de l'organisme hôte. L'organisme hôte *ne devant évidemment pas* lui-même produire cette protéine. Si c'est le cas, l'hôte sélectionné doit être déficient,

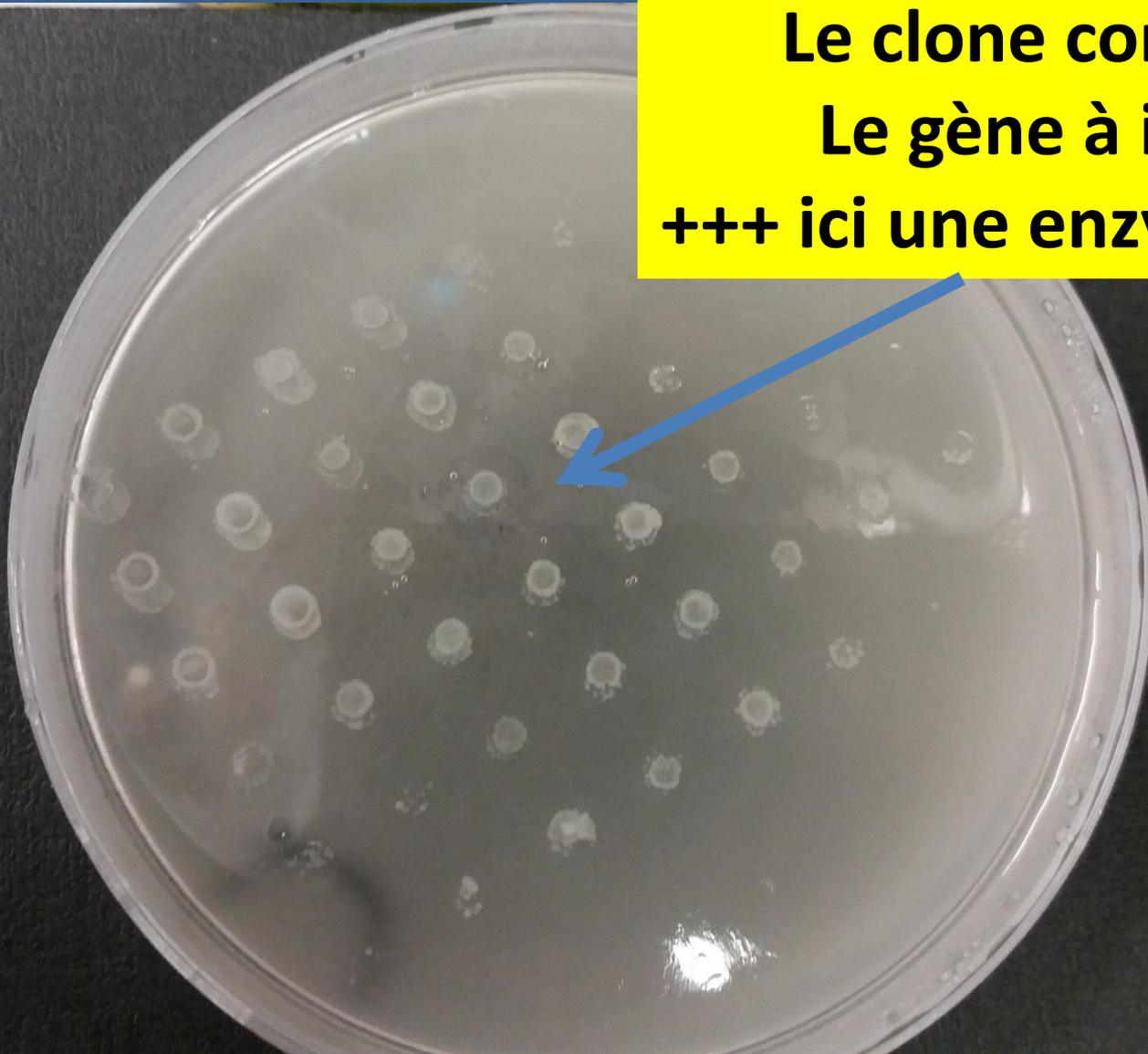
Criblage



**Recherche de
fonction**

LB+CAM+Tributyrine

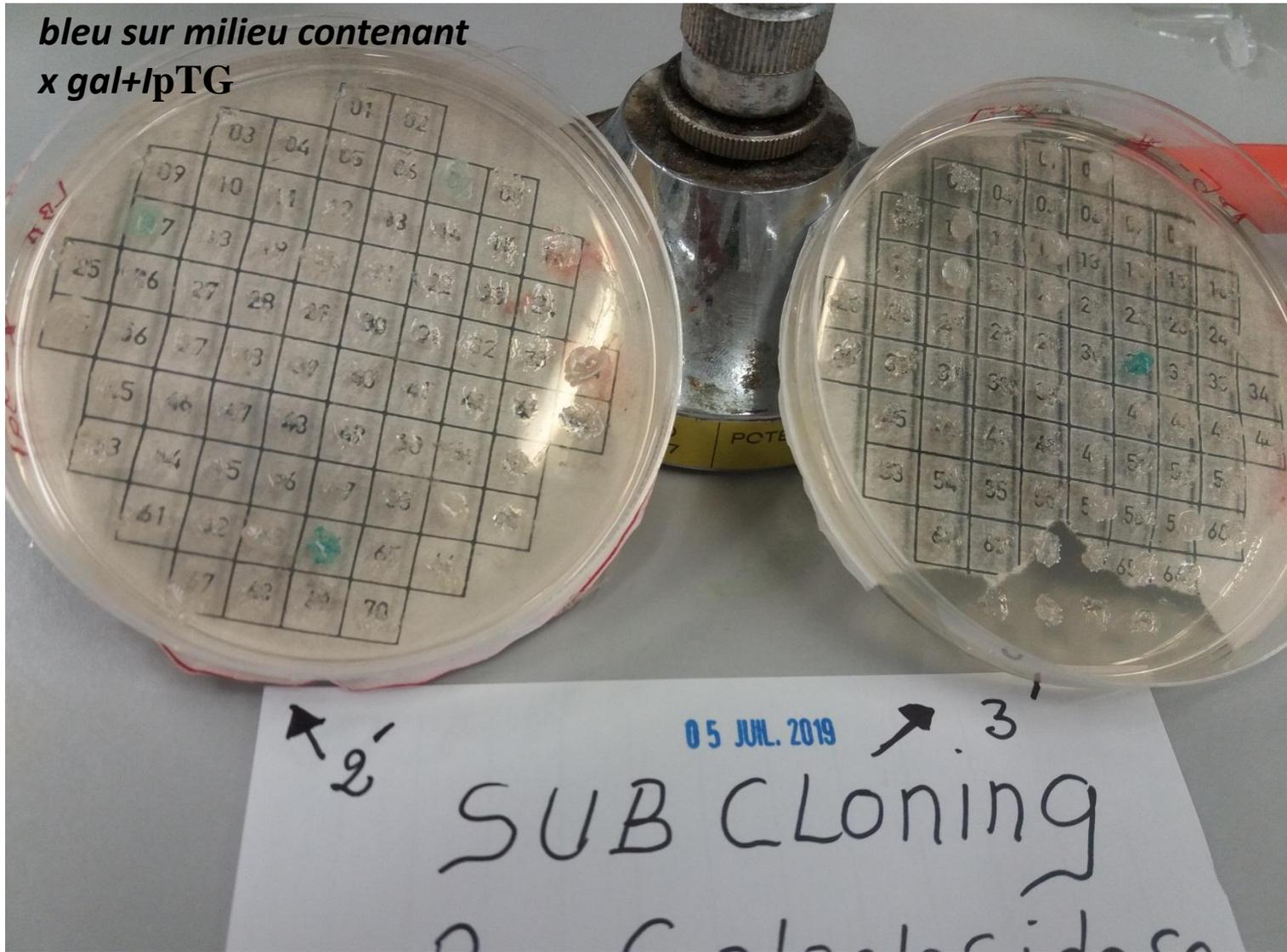
Le clone contenant
Le gène à intérêt
+++ ici une enzyme (lipa



Zone de lyse



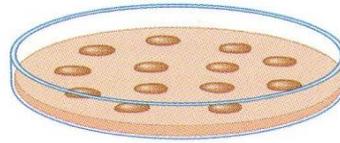
**Ici une enzyme aussi
B-Galactosidase : colonie
bleu sur milieu contenant
x gal+IpTG**



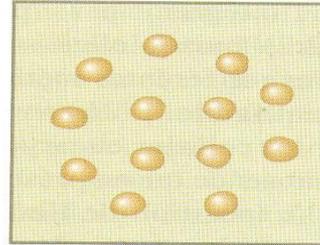
La détection de protéines par des anticorps

Un anticorps est une protéine sérique qui a été produite par un animal et qui forme un complexe hautement spécifique avec une autre protéine, un *antigène*

Dans le cas présent, la protéine produite par le gène cloné est l'antigène (qui a été utilisé pour produire des anticorps dans le corps d'un animal de laboratoire). Lorsque l'antigène est présent dans une ou plusieurs colonies, ces dernières sont visualisées par la formation de complexes avec les anticorps.

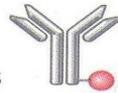


Croissance de colonies transformées sur de l'agar

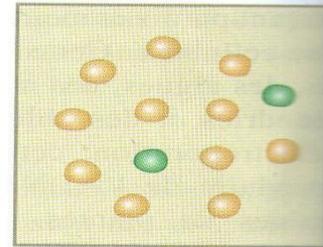
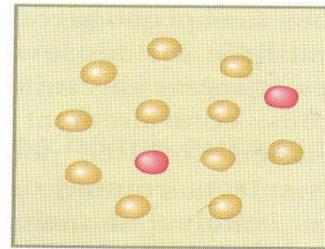


Réplication des colonies sur une membrane

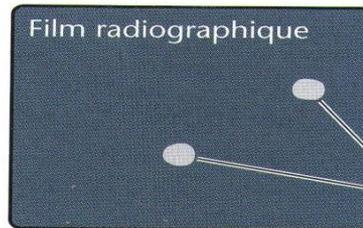
Cellules partiellement lysées ; ajout d'anticorps spécifiques ; ajout d'agents radioactifs spécifiques de l'anticorps



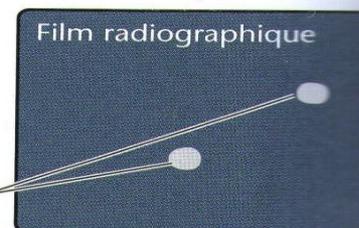
Lyse bactérienne et dénaturation de l'ADN ; ajout de sonde nucléique radioactive (ADN ou ARN) ; élution des sondes non hybridées



autoradiographie



(a)



(b)

Clones positifs

APPLICATIONS PRATIQUES DU GENIE GENETIQUE

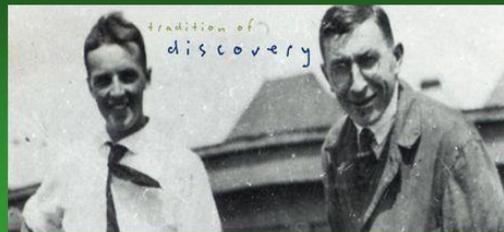
Production d'insuline : les débuts de la biotechnologie commerciale

- La production de protéines humaines est le secteur des biotechnologies le plus rentable. Les protéines de cellules de mammifères ont une très grande valeur pharmaceutique mais elles sont présentes en très faible quantité dans les tissus normaux ce qui rend leur purification extrêmement onéreuse. De plus, même si ces protéines peuvent être produites par des cultures cellulaires, c'est une voie beaucoup plus coûteuse et difficile que la production par une culture microbienne à fort rendement. En conséquence, l'industrie de la biotechnologie a mis au point des micro-organismes génétiquement modifiés pour produire ces protéines.-

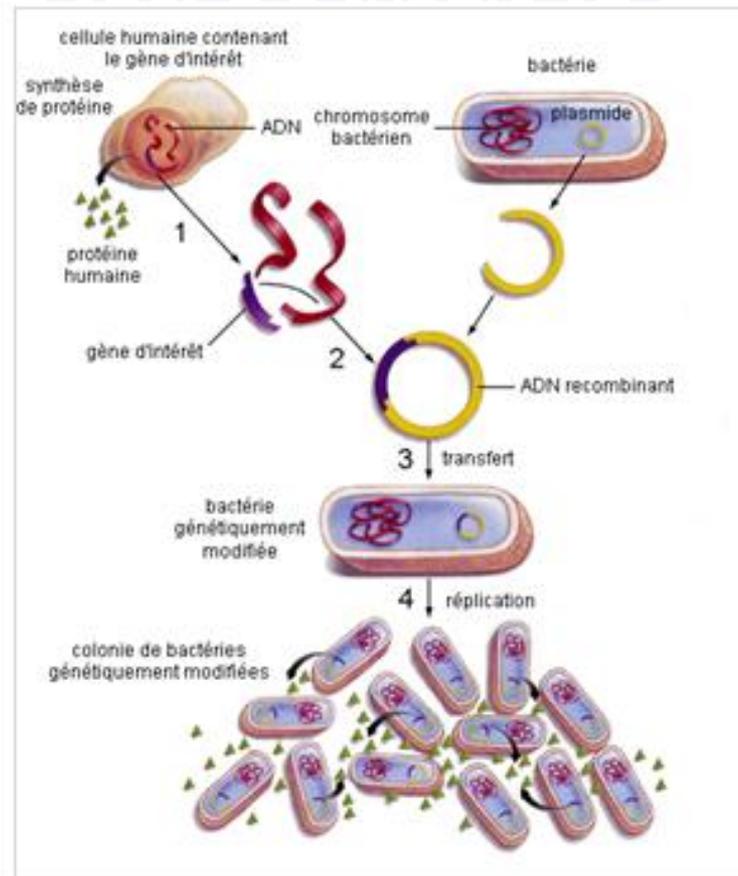
Il faut attendre en 1921 pour assister à la découverte de l'insuline par Banting et Best, deux professeurs de l'Université de Toronto. Ils avaient isolé l'insuline à partir d'extraits pancréatiques et avaient démontré que le pancréas sécrétait dans le sang une substance qui permettait l'assimilation du sucre.

La découverte de l'insuline

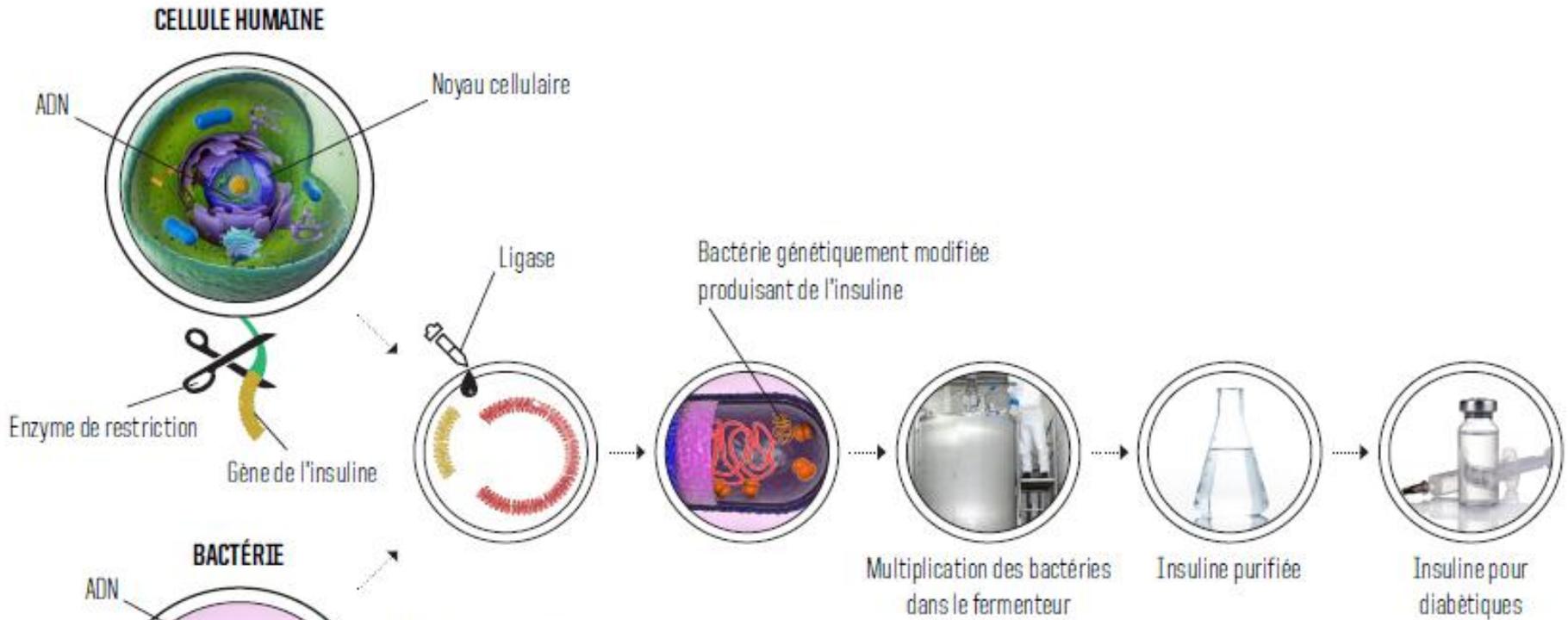
Sir Frederick Banting, Charles Best, J.J.R Macloed, J.B Collip, chercheur à l'Université de Toronto, découvrent l'insuline en 1921-1922. L'injection d'insuline sauve la vie des personnes atteintes de diabète.



LA PRODUCTION D'INSULINE : LES DÉBUTS DE LA BIOTECHNOLOGIE COMMERCIALE : LA PRODUCTION DE PROTÉINES HUMAINES EST LE SECTEUR DES BIOTECHNOLOGIES LE PLUS RENTABLE.



L'insuline recombinante



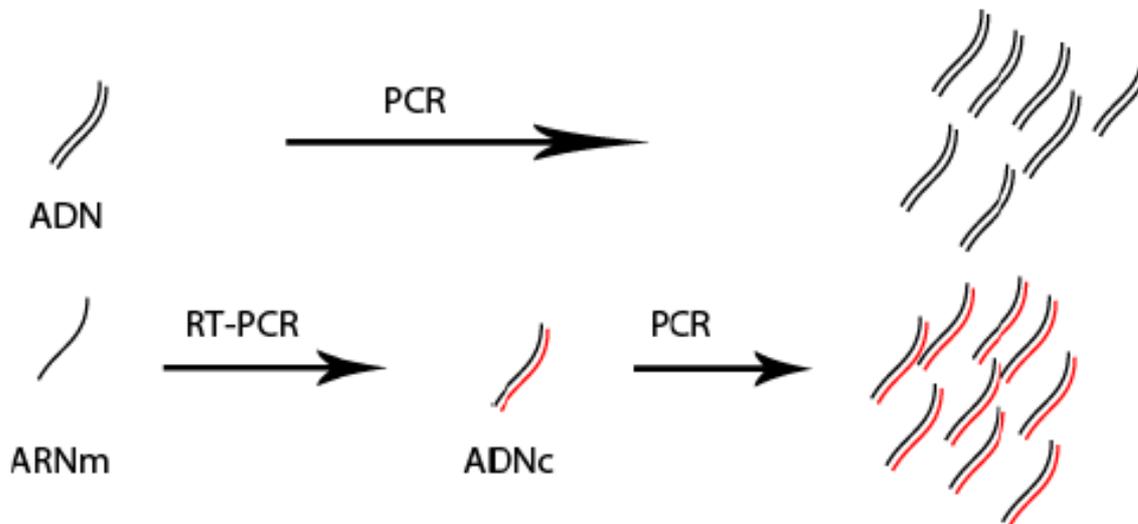
DEPUIS 1983, LA PRODUCTION À GRANDE ÉCHELLE DE L'INSULINE EST RÉALISÉE COMMERCIALEMENT AVEC LA BACTÉRIE E. COLI EN 1987, ON A ÉGALEMENT COMMENCÉ À PRODUIRE DE L'INSULINE AVEC LES LEVURES SACCHAROMYCES CEREVISIAE

L'exemple des protéines recombinantes



Les étapes de la production

- Amplification de la séquence d'intérêt



L'exemple des protéines recombinantes

Les étapes de la production

- Insertion dans un vecteur

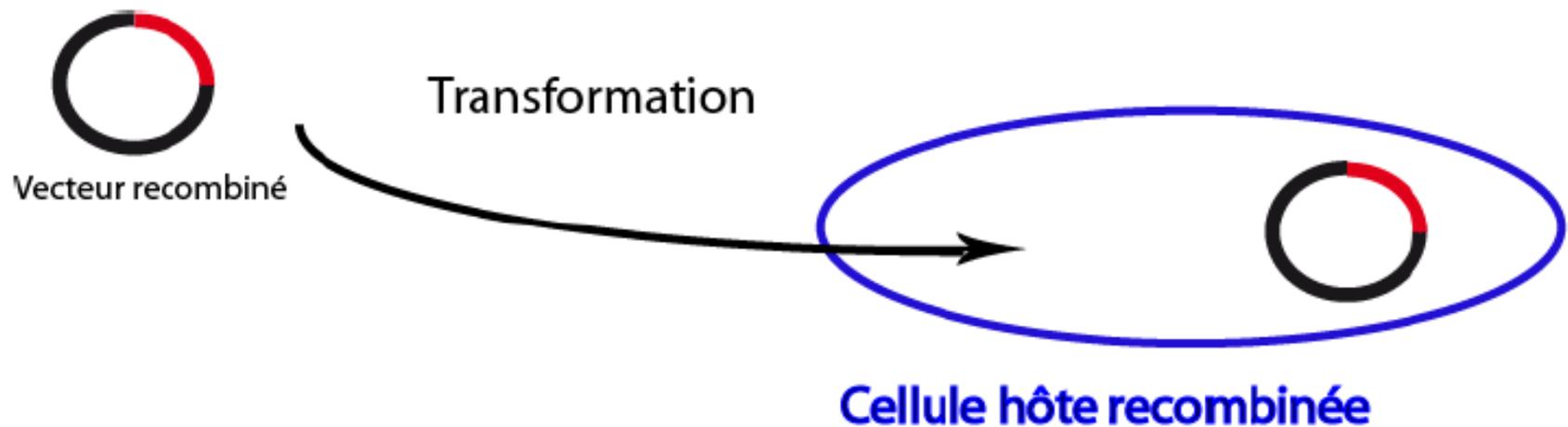


L'exemple des protéines recombinantes



Les étapes de la production

- Transfert dans l'organisme receveur

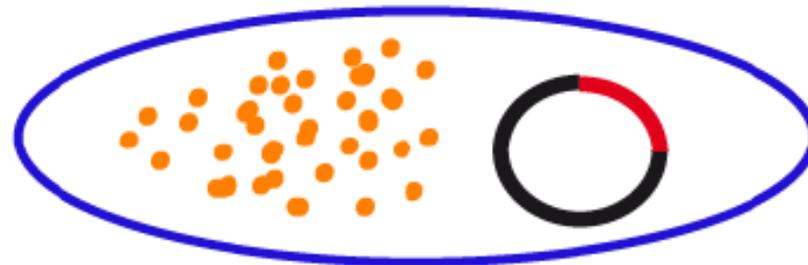


L'exemple des protéines recombinantes

Les étapes de la production

- Production

Protéine recombinante



Cellule hôte recombinée

L'exemple des protéines recombinantes

Pourquoi produire dans un autre organisme ?

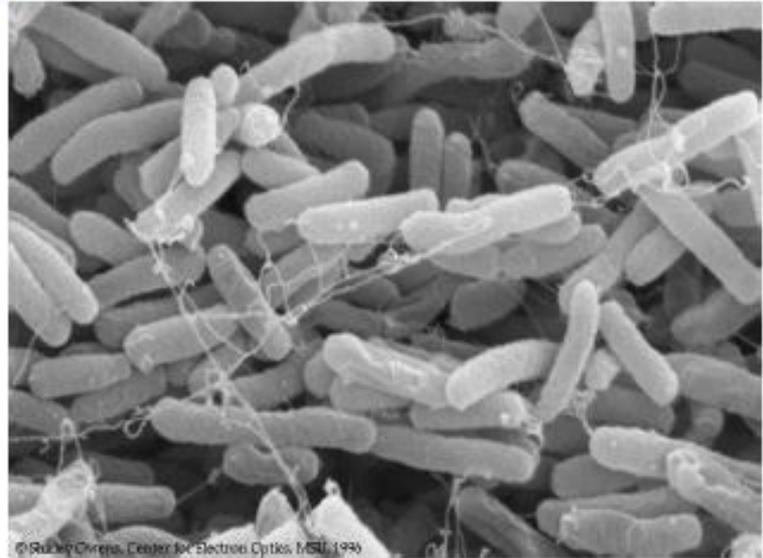
- Obtenir une protéine isolée de son environnement
 - Maîtriser ce qui est produit et comment
 - Purifier facilement le produit
 - Produire en quantité et quand on veut
 - Transformer "à volonté"
-

Organismes production

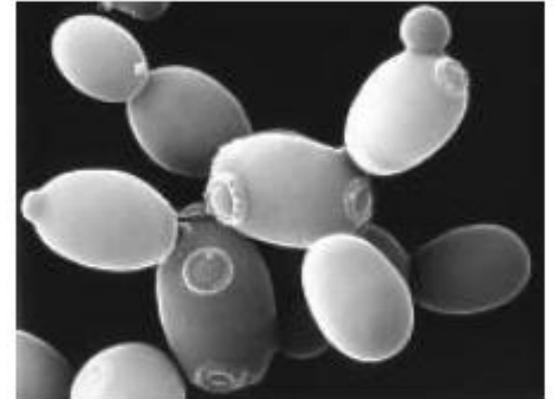
Bactéries

E. coli

- production moins chère
- Limité aux protéines simples
- Peu ou pas de modifications post-traductionnelles
- Utilisée en recherche et en production



Organismes production

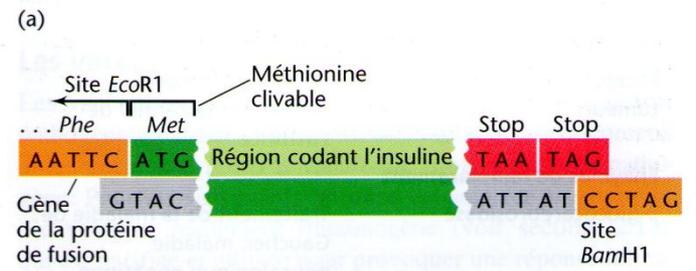
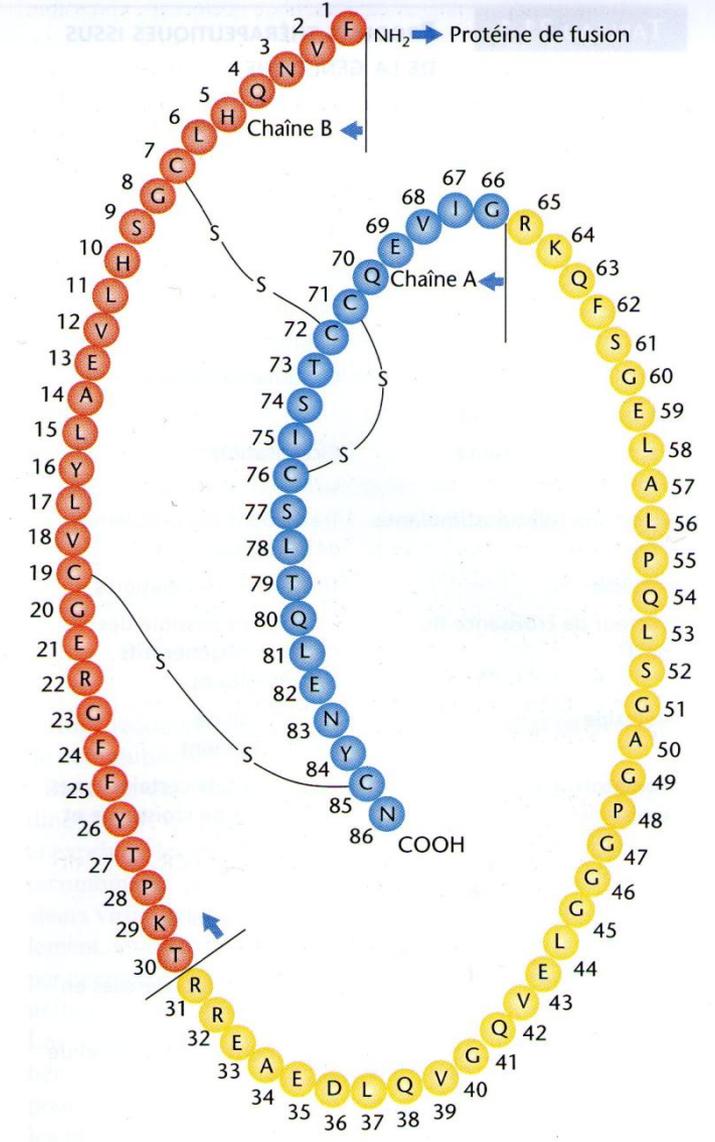


Levures

Saccharomyces cerevisiae

- Mêmes avantages que les bactéries
- Risques immunogènes élevés pour l'homme

FIGURE Utilisation du génie génétique pour la production d'insuline humaine par une bactérie. (a) Structure de la proinsuline humaine. Une lettre représente chaque acide aminé de cette protéine (voir figure 3.12). Le peptide apparaissant en jaune doit être éliminé des chaînes A et B pour produire de l'insuline. (b) La synthèse chimique du gène de l'insuline et des séquences de liaison appropriées permet le clonage et l'expression. Les fragments synthétisés ont été liés à un vecteur plasmidique par les sites de restriction *EcoR1* et *BamH1*, afin que les chaînes d'insuline soient formées comme une protéine de fusion (voir section 31.5), avec une portion d'un gène du vecteur (N.B. le site *EcoR1* fait partie de la région codante). La séquence codante pour la méthionine a été insérée afin de permettre le clivage chimique des chaînes A et B à partir de la protéine de fusion. En effet, le cyanate de bromure clive spécifiquement au niveau des résidus méthionine, et l'insuline n'en contient pas. L'insertion de deux codons stop en fin de séquence codante détermine la fin de la traduction.



Voir le polycopie pour plus de détails

References

Madigan MT, Martinko JM: Brock Biology of Microorganisms. Upper Saddle River: Pearson/Prentice Hall, 11.

Vincent, Rachel. Génétiques moléculaire: de boech et larcier, 2007. Paris.
Dr. Aouf Abdelhakim. Polycopie de cours de biologie moléculaire de l'Université Ferhat Abbas.

Robert, P. Génétique : Ediscience, 1969. Paris

F Perrin, Schmidt: Biotechnologies et Applications Genie Génétique, UE2 Broché 2011.