

Université de Jijel

Cours de Biologie Moléculaire et Génie Génétique
Pour les étudiants en Licence Microbiologie

Pr. Mohamed Sifour
Université de Jijel
2024-2025

Contenu de la matière

Partie I : Biologie moléculaire :

1. Expression de l'information génétique: synthèse protéique (Transcription, Traduction).

2. Régulation de l'expression génique : Régulation transcriptionnelle, Régulation traductionnelle.

3. Techniques de base de la biologie moléculaire :

- préparation des acides nucléiques (extraction et purification)
- séparations des acides nucléiques (électrophorèse sur gel d'agarose, en champ pulsé,.....).
- détection, caractérisation et identification des acides nucléiques (transfert sur membrane, marquage, hybridation...).
- Le séquençage de l'ADN.
- amplification in vitro des acides nucléiques (PCR, RT (reverse-transcriptase)-PCR ...).

Partie II : génie génétique : **1. clonage in vivo :** **1.1. Éléments nécessaires au clonage :** l'ADN à cloner, enzymes de restriction, enzymes de ligation, les vecteurs de clonage, leur construction et leurs caractéristiques, les cellules hôte. **1.2. Les étapes du clonage :** construction du vecteur, insertion de l'ADN à cloner, transformation des bactéries, sélection des recombinants, analyse des recombinants. **2. Technologie de l'ADN recombinant :** Synthèse de protéines recombinantes, ADNc et vecteurs d'expression. Exemple de production de protéines par *E. coli* et par *Saccharomyces cerevisiae*.

4. Techniques de base de la biologie moléculaire

A- Extraction et purification des acides nucléiques

Il existe de nombreuses méthodes pour extraire les acides nucléiques, qui suivent approximativement le même schéma de principe.

- Lyse des cellules
- Elimination des protéines
- Extraction des protéines
- Précipitation de l'ADN

La méthode d'extraction se réalise en plusieurs étapes :

- Lyse des cellules

Le plus souvent à l'aide de détergent comme Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) qui permette la dissolution des lipides membranaires et leur solubilisation. Les détergents peuvent aussi dénaturer les protéines membranaires. Cette dénaturation contribue également à la lyse de la cellule. L'enzyme lysozyme est utilisée pour fragiliser la paroi de cellules bactériennes (Peptidoglycane).

D'autres techniques existent (choc mécanique par exemple).

- Elimination des protéines et de l'ARN

Elle est réalisée par une digestion enzymatique (la protéinase K).

On peut réduire la concentration en ARN par digestion à la RNase.

- Extraction des protéines

Du phénol et du chloroforme sont ajoutés à la solution aqueuse afin de faire précipiter les protéines. Le phénol est un déprotéinisant, il est utilisé pour débarrasser les acides nucléiques des protéines. Après centrifugation on obtient deux phases : une phase aqueuse supérieure contenant les acides nucléiques et une phase organique inférieure, avec les protéines précipitées à l'interface entre les deux phases. Le chloroforme est utilisé pour éliminer toutes traces de phénol.

- Précipitation de l'ADN

La précipitation est réalisée par addition deux volumes d'éthanol absolu (100%) froid à un volume de solution. On récupère les acides nucléiques sous forme solide après centrifugation. L'ADN obtenu est lavé avec de l'éthanol à 70 %. Puis le précipité est séché pour éliminer l'éthanol. L'ADN purifié est resolubilisé dans un tampon afin d'être conservé (souvent tampon TE = Tris-EDTA pH 8).

NB : Il existe aujourd'hui des kits commerciaux permettant de réaliser rapidement l'extraction et la purification à l'aide de réactifs prêts à l'emploi.

B- Les enzymes de restriction

Les enzymes de restriction sont des endonucléases capables de couper des séquences nucléotidiques à des emplacements reproductibles et définis de façon spécifique en termes de bases. Les plus utilisés des enzymes de restriction font des coupures sur des séquences dites palindromiques, ce qui veut dire que la séquence est identique sur les deux brins lorsqu'elle est lue de 5' en 3' dans les deux cas (EcoR I). Après ce type de coupure les extrémités de la séquence se chevauchent (« *sticky ends* »). Il y a des enzymes qui font des coupures franches.

Nomenclature

Escherichia coli R y13

EcoR I : 1^{ère} enzyme trouvée chez *E. coli*

EcoR V : 5^{ème} enzyme trouvée chez *E. coli*

Types de coupure

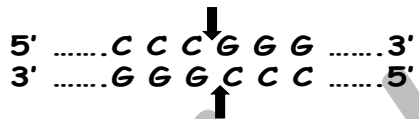
COUPURES A BOUTS COHESIFS



Ex : EcoR I



COUPURES A BOUTS FRANCS (BLUNT ENDS) ex : Sma I



Deux enzymes sont compatibles lorsqu'elles ont des sites de restriction différents mais donnent naissance aux mêmes extrémités cohésives.

Les enzymes de restriction qui proviennent de deux souches bactériennes différentes et qui reconnaissent les mêmes séquences sont appelées isoschizomères

Les ligases

(ADN ligase, T4 DNA ligase)

La ligase est capable de lier de façon covalente deux molécules d'ADN en une.

Formation de liaisons phospho-diester entre 3'OH et 5'P

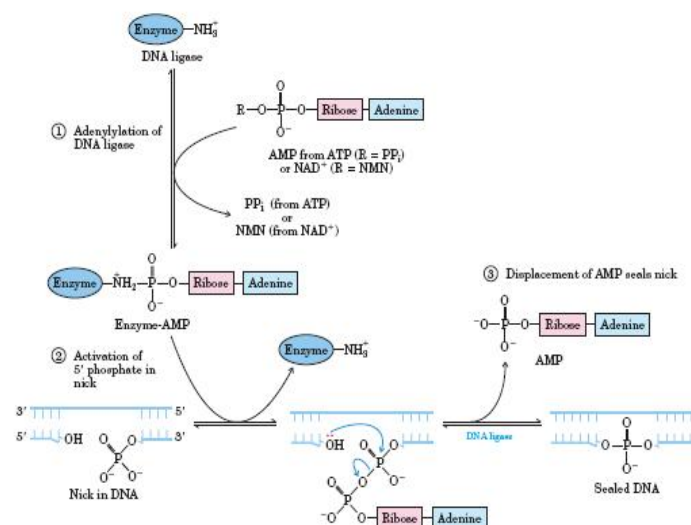


FIGURE 25-16 Mechanism of the DNA ligase reaction. In each of the three steps, one phosphodiester bond is formed at the expense of another. Steps ① and ② lead to activation of the 5' phosphate in the nick. An AMP group is transferred first to a lys residue on the enzyme and then to the 5' phosphate in the nick. In step ③, the 3'-hydroxyl group attacks this phosphate and displaces AMP, producing a

phosphodiester bond to seal the nick. In the *E. coli* DNA ligase reaction, AMP is derived from NAD⁺. The DNA ligases isolated from a number of viral and eukaryotic sources use ATP rather than NAD⁺, and they release pyrophosphate rather than nicotinamide mononucleotide (NMN) in step ①.

C- Séparation des acides nucléiques

L'électrophorèse est une technique de séparation des molécules chargées sous l'action d'un champ électrique.

L'ADN étant molécules chargée négativement, il est possible de la faire migrer sous l'effet d'un champ électrique vers le pôle positif (anode).

La vitesse de migration d'une molécule d'ADN sera fonction :

- de sa taille donc du nombre de bases. Plus un fragment d'ADN est petit, plus sa vitesse de migration est élevée.
- de la concentration du gel. Les gels les plus concentrés permettent de mieux séparer les petits fragments alors que les plus gros sont séparés sur des gels faiblement concentrés.

La migration se fait également avec un tampon de migration, dont les rôles sont de maintenir le pH constant, assurer la solubilité des molécules qui migrent et permettre une bonne séparation.

Des marqueurs de masse moléculaires (fragment d'ADN de tailles connues) sont utilisés pour déterminer, après migration électrophorétique, la taille des fragments d'ADN isolés (exprimée en général en nombre de paires de bases). Une corrélation linéaire négative existe entre la distance de migration et le logarithme de leur a masse moléculaire.

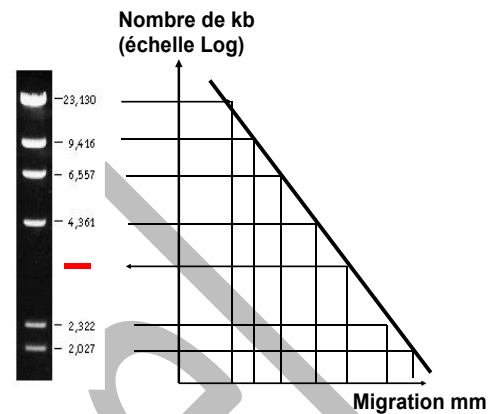


Figure : détermination des masses moléculaires des fragments d'ADN après l'électrophorèse

Il existe plusieurs supports de l'électrophorèse :

- le gel d'agarose est le support le plus utilisé. Il permet de séparer les fragments de tailles comprises entre 0,1 et 30 kb en position horizontale.
- le gel de polyacrylamide est utilisé pour la séparation des petits fragments de moins de 0,1kb (100 pb) en position verticale (On peut séparer les fragments d'ADN à une base près). L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide est utilisée dans la méthode de séquençage de l'ADN.

Révélation des bandes d'ADN :

Le bromure d'éthidium (BET) fluorescent aux UV s'est fixé sur l'ADN (cette molécule s'intercale entre les plateaux de paires de bases de la molécule d'ADN) et va permettre de visualiser les fragments d'ADN dans le gel placé sur la table UV (transilluminateur UV).

Le bromure d'éthidium (concentration d'utilisation finale : 0.5 µg/ml) est extrêmement dangereux et nécessite de porter des gants pour manipuler les gels lors de la révélation et après. Les rayons UV sont dangereux pour les yeux : il faut porter des lunettes, ou disposer d'une enceinte dans laquelle sont placés le transilluminateur et une caméra.

NB : L'électrophorèse permet aussi de séparer des molécules d'acides nucléiques suivant leur structure, par exemple les différentes formes d'un plasmide.

D- Le séquençage

Le séquençage consiste à déterminer la nature et l'ordre des nucléotides dans un acide nucléique.

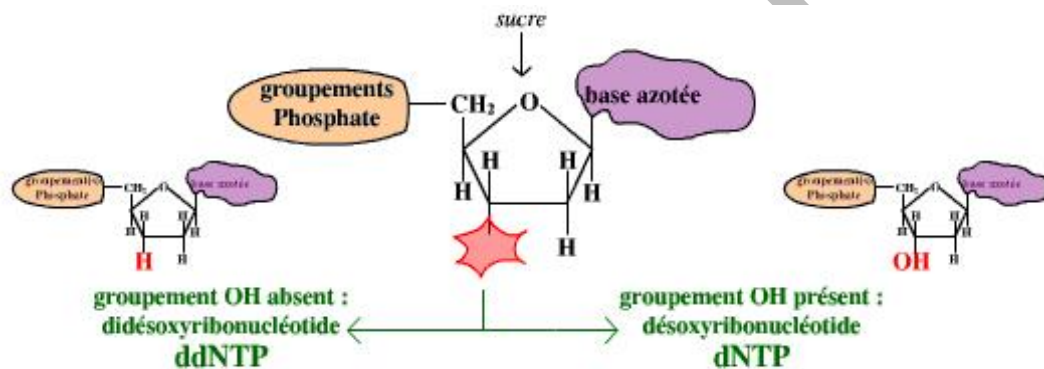
Il existe deux méthodes de séquençage : la méthode de Maxam et Gilbert et la méthode de Sanger.

La méthode de Maxam et Gilbert : méthode de dégradation chimique

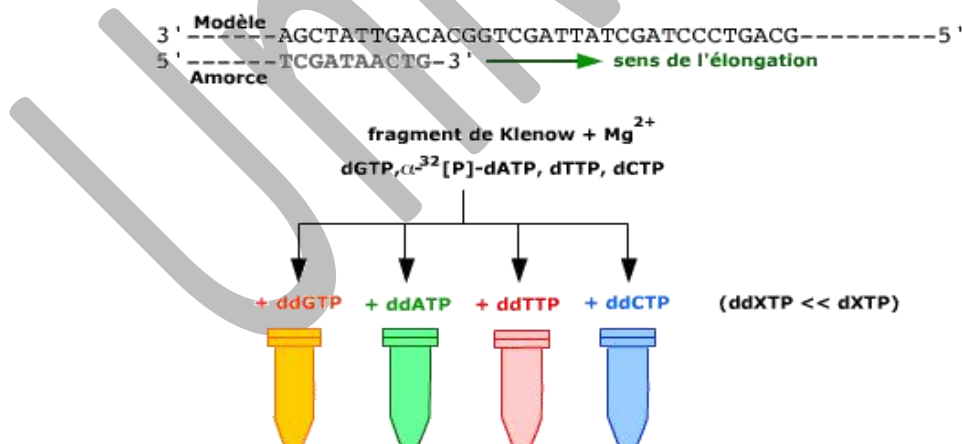
On prépare un tube par type de coupure (une après G, après A, après T, après C). En fonction des concentrations d'enzyme et d'ADN, on obtient (statistiquement) une coupure par molécule avec tous les cas différents présents.

La méthode de Sanger : méthode de terminaison des chaînes par un didésoxy

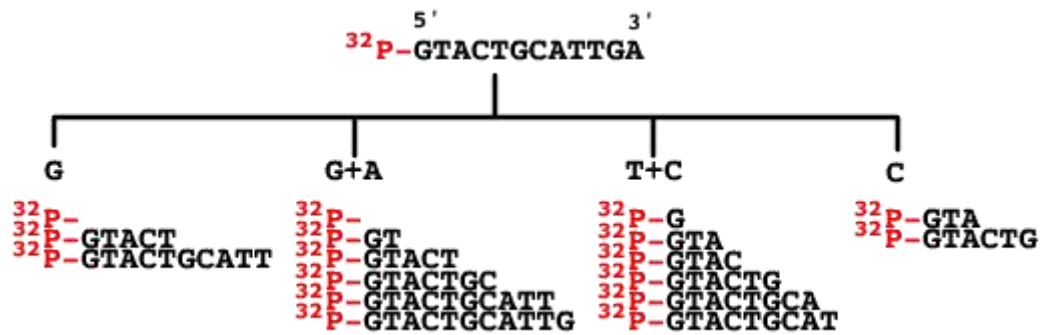
Dans ce cas, on va réaliser la synthèse d'ADN avec des arrêts de synthèse, en utilisant des didésoxynucléotides triphosphates. L'amorce pour démarrer la synthèse est connue (et vient du commerce). On réalise ensuite la synthèse avec un ddNTP présent.



La technique consiste à effectuer la synthèse d'un brin complémentaire d'un fragment d'ADN monobrin que l'on désire séquencer. On fournit donc à l'ADN polymérase une amorce et des ddNTP contenant du phosphore radioactif (parfois l'amorce est marquée radioactivement). On prépare quatre milieux réactionnels différents. Tout contiennent l'ADN matrice, l'ADN polymérase, des amorces et les quatre dNTP. On ajoute à chaque tube un ddNTP différent (ils diffèrent des dNTP par l'absence de groupe hydroxyle sur le carbone 3' du sucre).



Lorsque l'ADN polymérase va intégrer un nucléotide modifié (ddNTP), la polymérisation va s'arrêter juste après lui (pas de OH libre). Comme l'intégration de ces ddNTP est aléatoire pour les quatre bases, on obtiendra un mélange de fragments d'ADN de tailles différentes en fonction du point d'arrêt de la polymérisation.



Il suffit ensuite de faire migrer ces différents fragments d'ADN de quatre tubes un gel de polyacrylamide, puis les analyser pour connaître la séquence du fragment d'ADN étudié. On peut lire la séquence du bas vers le haut dans le sens 5' → 3' le brin complémentaire. Il suffit d'en déduire la séquence du brin matriciel par complémentarité dans le sens 3' → 5', puis de l'écrire dans le sens conventionnel 5' → 3'.



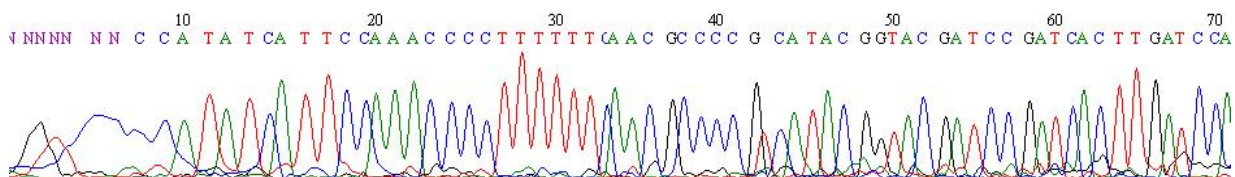
dans
pour

La méthode de Sanger a aujourd'hui surpassé la méthode chimique car elle est à la fois efficace et plus facile à mettre en œuvre. Cette méthode est valable pour séquencer des brins dont la taille n'excède pas 600 nucléotides.

L'automatisation du séquençage

La très grande majorité des séquences réalisées et publiées aujourd'hui sont réalisées sur des séquenceurs automatiques. Ceux-ci sont capables de réaliser les réactions de séquence, puis de les lire. Le séquençage est devenu facile à réaliser depuis que l'on sait marquer les fragments d'ADN par des molécules fluorescentes (fluorophores). On utilise un seul milieu réactionnel qui contient les 4 bases marquées. Le séquenceur détecte la fluorescence sortant des colonnes de chromatographie (ou après migration sur un gel de polyacrylamide), repérant ainsi les fragments d'ADN et leur taille précise. Un faisceau de laser excite les marqueurs attachés et un système de détection identifie la base terminale en fonction de la longueur d'onde de la fluorescence émise.

Le résultat est présenté par le séquenceur sous forme de courbes présentant la fluorescence détectée, et l'interprétation qui en est faite en terme de nucléotides.



E- PCR (Polymerase Chain Reaction)

Cette technique développée en 1985 par Kary Mullis permet d'amplifier en un nombre très élevé de copies une séquence particulière d'ADN, ce qui facilite grandement son étude et son exploitation. L'ADN polymérase copiant jusqu'à un milliard de fois cette région cible (quantité suffisante pour être révélée).

Des séquences oligonucléotidiques (17-30 nucléotides) complémentaires des extrémités 3' des deux brins du fragment d'ADN à amplifier sont utilisées comme amorces (primers) pour l'ADN polymérase.

Etapes de la PCR

La technique se fait par une succession de cycles comportant les étapes suivantes :

1- Dénaturation de l'ADN à la chaleur (autour de 95°C) : pour séparer les deux brins (obtention des matrices simple brin).

2- Hybridation des amorces ($\approx 50-65^\circ\text{C}$): hybridation de chaque brin avec une amorce spécifique (les amorces étant en excès, la plupart des brins d'ADN cibles se fixent à celles et non entre eux).

The T_m can be determined experimentally but is more usually calculated from the simple formula:

$$T_m = (4 \times [G + C]) + (2 \times [A + T])^\circ\text{C}$$

3- Extension: élongation des amorces grâce à une ADN polymérase (à 72°C) en utilisant les brins cibles comme matrice.

Chaque molécule d'ADN produite par un cycle agit comme une matrice pour la synthèse d'un nouvel ADN au cycle suivant. Lorsque les trois étapes du cycle sont répétées, les quatre chaînes du premier cycle sont copiées pour produire 8 copies. En théorie, 20 cycles produiront environ 1 million de copies de la séquence désirée.

La dénaturation se déroule à une haute température autour de 95°C, donc l'enzyme utilisée doit être résistante à cette température élevée. Une ADN polymérase thermiquement stable extraite de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus*, isolée d'une source chaude (ADN Taq polymérase) est utilisée dans la PCR. 72°C est la température optimale de fonctionnement de l'ADN Taq polymérase. L'utilisation de l'ADN Taq polymérase augmente la spécificité de la PCR, car à une température élevée l'hybridation non spécifique d'amorces à l'ADN non cible est rare.

La réaction s'effectue dans un thermocycleur (un appareil programmable permet d'exposer les tubes à des températures choisies et pour des durées déterminées par l'utilisateur).

- Dans le cas où l'on travaille avec de l'ARN, on utilise une technique analogue appelée RT-PCR (pour Reverse Transcriptase). Un fragment d'ADNc est donc synthétisé à partir d'un ARNm.

- Real-time PCR: Today, quantification is carried out by real-time PCR (qPCR), a modification of the standard PCR technique in which synthesis of the product is measured over time, as the PCR proceeds through its series of cycles.



Les applications de la PCR

La PCR a de nombreuses applications en biologie et en médecine et a apporté des contributions importantes à l'étude des maladies héréditaires et dans la recherche contre le cancer. Elle a aussi des applications pratiques dans d'autres domaines comme :

- les sciences médico-légales
- dans les biotechnologies (la mutagenèse dirigée...)
- les études paléontologiques (fossiles : momies, plantes, animaux, ...etc.)
- le diagnostic microbiologique
- les produits de la PCR peuvent être utilisés pour le clonage et le séquençage, ou pour des études comparatives ou phylogénétiques.

F- Hybridation des acides nucléiques

Le terme "hybridation" désigne la formation de duplex (un double brin) entre deux séquences nucléotidiques simples brins, par appariement de bases. L'hybridation moléculaire ou l'hybridation des acides nucléiques est une technique largement répandue et elle est à la base d'un grand nombre de méthodologies utilisées dans tous les domaines de la biologie moléculaire moderne.

Les sondes

Une sonde nucléotidique est un segment de nucléotides monobrin (ADN ou ARN) identifié, utilisé pour rechercher de manière spécifique un fragment d'acide nucléique que l'on désire étudier. Sa taille est très variable : oligonucléotide de 20-30 nucléotides ou à l'opposé de plusieurs centaines de nucléotides. La reconnaissance repose sur l'hybridation entre les molécules, rendue possible par la similitude des séquences.

Dans un mélange complexe où s'effectue l'hybridation moléculaire, la sonde doit être facilement repérable grâce à un marquage avec un radio-isotope (marquage chaud), mais il existe également des sondes appelées sondes froides (molécules fluorescentes).

Marquage d'une sonde

Marquage aux extrémités : L'ADN peut être marqué à son extrémité 5' à l'aide d'une kinase (la T4 polynucléotide kinase). En présence d'ATP avec du ^{32}P , il est possible d'échanger le groupement 5'-phosphate présent sur l'ADN avec le phosphate radio-actif sur l'ATP. Les extrémités 5' sont préalablement déphosphorylées par une phosphatase alcaline.

Marquage interne : les nucléotides marqués sont à l'intérieur de la molécule d'ADN. Par exemple la technique de marquage par translation de coupure (Nick Translation)

Southern blot

Décrite par E. M. Southern en 1975. Elle consiste à détecter spécifiquement des fragments d'ADN transférés sur filtre par leur hybridation à des séquences complémentaires marquées par un radio-isotope. Les étapes de la technique :

1 - Extraction de l'ADN génomique

2-Digestion par des enzymes de restriction différentes du même ADN génomique : on obtient un très grand nombre de fragments, mais seuls quelques fragments correspondent à une partie ou à la totalité du gène étudié.

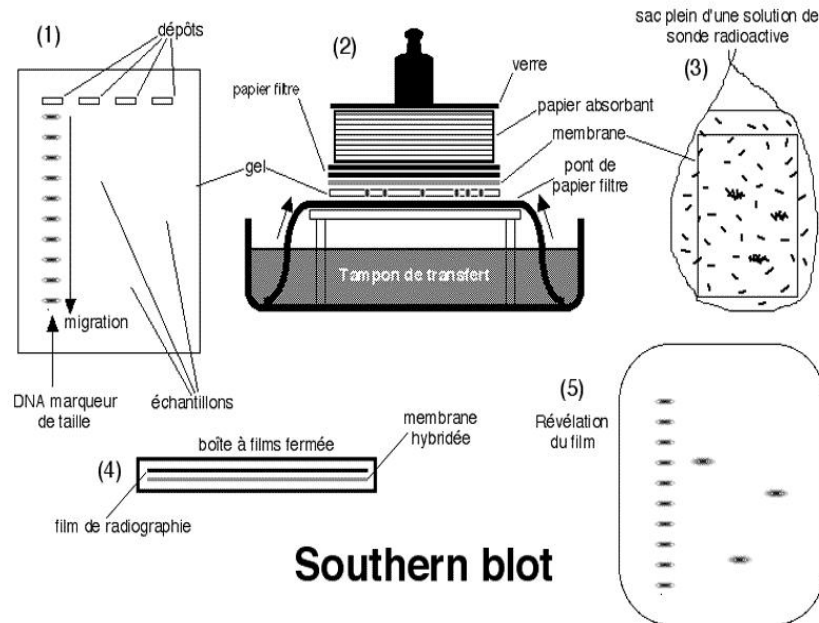
3-Séparation électrophorétique des fragments d'ADN par électrophorèse dans un gel d'agarose.

4-Dénaturation des fragments d'ADN : par un traitement alcalin du gel d'électrophorèse. Ce traitement transforme les fragments d'ADN double brin en fragments d'ADN monobrin.

5-Transfert des fragments monocaténares du gel d'agarose à un support souple : Une membrane en nitrocellulose (ou nylon) est placée sur le gel. Une pression est appliquée au gel en plaçant une pile de serviettes de papier et par un poids sur la membrane et le gel, par exemple. Ceci va permettre le déplacement de l'ADN contenu dans le gel sur la membrane, où il va se fixer.

6-Fixation des fragments monocaténares d'ADN sur la membrane et hybridation avec la sonde marquée à un radioisotope.

7-Lavage et révélation (dans ce cas par autoradiographie)



Southern blot

Northern blot

Northern est une technique employée pour étudier l'expression de gènes. Elle dérive du Southern blot, sauf qu'au lieu d'étudier de l'ADN, on étudie de l'ARN. L'ARN va être analysé par électrophorèse et détecté par une sonde. Une différence du procédé par rapport à la technique de Southern est l'utilisation de formaldéhyde dans le gel d'électrophorèse comme dénaturant, parce que le traitement d'hydroxyde de sodium utilisé en Southern dégraderait l'ARN. La procédure :

- Extraction d'ARN
- électrophorèse
- transfert
- hybridation, lavage, révélation

Dot blot

Dot blot est une technique semblable à la Northern et à la Southern blot, la différence est celle dans un dot blot les nucléotides à détecter ne sont pas séparés par l'électrophorèse de gel. Au lieu de cela, un mélange contenant probablement la molécule à détecter est appliqué directement sur une membrane comme point et puis détecté par des sondes de nucléotide.

Cette méthode peut seulement confirmer la présence ou l'absence d'un biomolécule, parce que l'électrophorèse de gel n'est pas employée pour séparer les molécules avant la détection. Elle ne peut pas détecter le poids moléculaire relatif, ou la présence de plus d'une molécule d'intérêt.

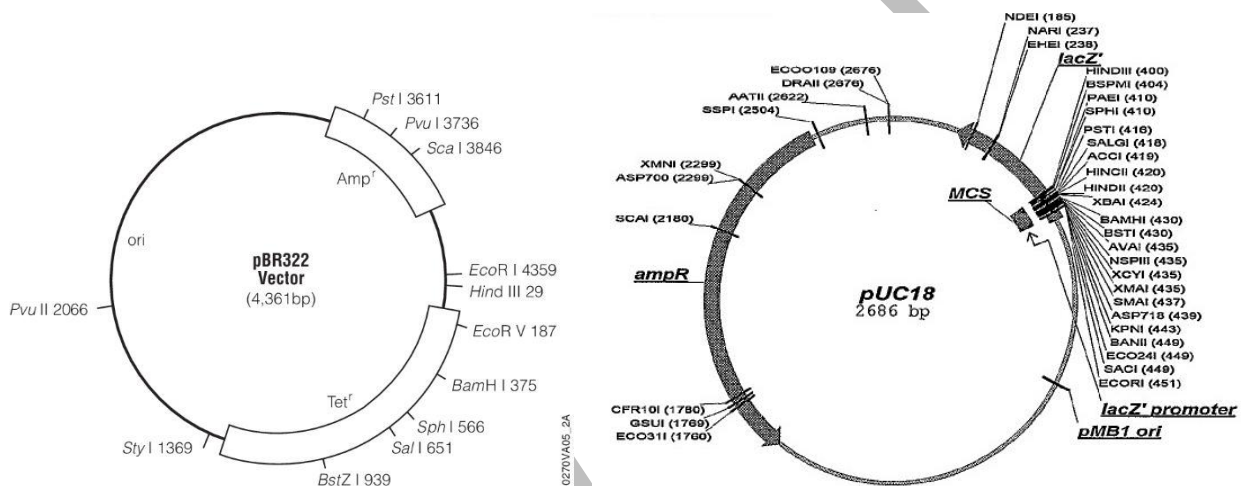
G- Les vecteurs de clonage

Le vecteur de clonage est une molécule qui peut intégrer un ADN étranger pour permettre son transfert dans une cellule hôte. Les vecteurs les plus utilisés sont :

Les plasmides : molécules d'ADN circulaires extra-chromosomiques, se multiplient de façon indépendante au sein des cellules hôtes. Ils codent des caractères généralement importants (gènes de résistances aux antibiotiques). Le plasmide pBR322 porte des gènes de résistance à l'ampicilline et à la tétracycline, ainsi que de nombreux sites de restriction.

La structure typique d'un vecteur de clonage comprend :

- une origine de réplication pour assurer la multiplication autonome du vecteur
- une série de sites de restriction (région à sites multiples de clonage : MSC)
- une ou deux marqueurs de sélection (confèrent la résistance à des antibiotiques par exemple)



Les phages : les deux les plus utilisés sont des dérivés du phage λ et du phage M13, autorisent le clonage de fragments d'ADN très grands (environ de 20kb). Aux extrémités du phage λ , existent des séquences appelées site cos. L'association de ces extrémités cohésive donne une structure circulaire à l'ADN dans la cellule hôte.

Les cosmides : des molécules d'ADN circulaires, possèdent une origine de réplication plasmidique, un ou plusieurs marqueurs de sélection, une région de sites multiples de clonage et un site cos (du phage). Ils permettent le clonage de fragment d'ADN de grande taille (environ de 50Kb). Ils sont empaquetés dans des capsides de lambda en vue d'une injection efficace dans les bactéries. Ensuite, ils se comporteront au sein de la bactérie hôte comme des plasmides.

Les chromosomes artificiels : ils peuvent véhiculer de grandes quantités de matériel génétique. Les YAC (yeast artificial chromosome) sont des segments d'ADN qui contiennent tous les éléments requis pour la propagation d'un chromosome chez la levure : une origine de réplication, le centromère (nécessaire à la ségrégation des chromatides dans les cellules) et deux télomères (pour marquer les extrémités du chromosome). Les BAC (bacterial artificial chromosome) sont des dérivés d'un plasmide, le facteur F d'*E. coli*.

Références

- **Beaumont S.**, Biologie Moléculaire. Cours, exercices, annales et QCM corrigés, Dunod, Paris, France, 2006
- **Brown T.A.** Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction. 6th edition. Blackwell Publishing, 2010
- **Clark, Pazdernik and McGehee**; . Molecular Biology, Third Edition(2019)
- **Lehninger**, Principles of Biochemistry, Fourth edition 2005
- **Lewin B.**, Gene, 8ème édition, 2005
- **Meftah A. et Julien R.**, Biologie moléculaire, 2eme edition, Dunod, Paris, France, 2003
- **Passarge E.** , Color Atlas of Genetics, Third edition, 2007, Thieme, Germany
- **Prescott et al.** Microbiologie 2003
- **Serge Weinman, Pierre Méhul.** TOUTE LA BIOCHIMIE. Dunod, Paris, 2013
- **Swynghedauw B., J-S Silvestre** , Biologie et Génétique Moléculaires Aide-Mémoire, 3e Edition, Dunod, Paris, 2008
- **Voet et al.** Fundamental of Biochemistry 1999 **Winter P.C., Hikey G.I. et Fletcher H.L.**, L'essentiel en génétique, Port royal Livres, Paris 2000
- Site internet
- La transcription chez les eucaryotes, *Auteurs : Françoise Ibarrondo, Gilles Camus*
Document publié le : 12 décembre 2006.
<http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/transcription/transcription.htm>