

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*.

Le clonage de l'ADN

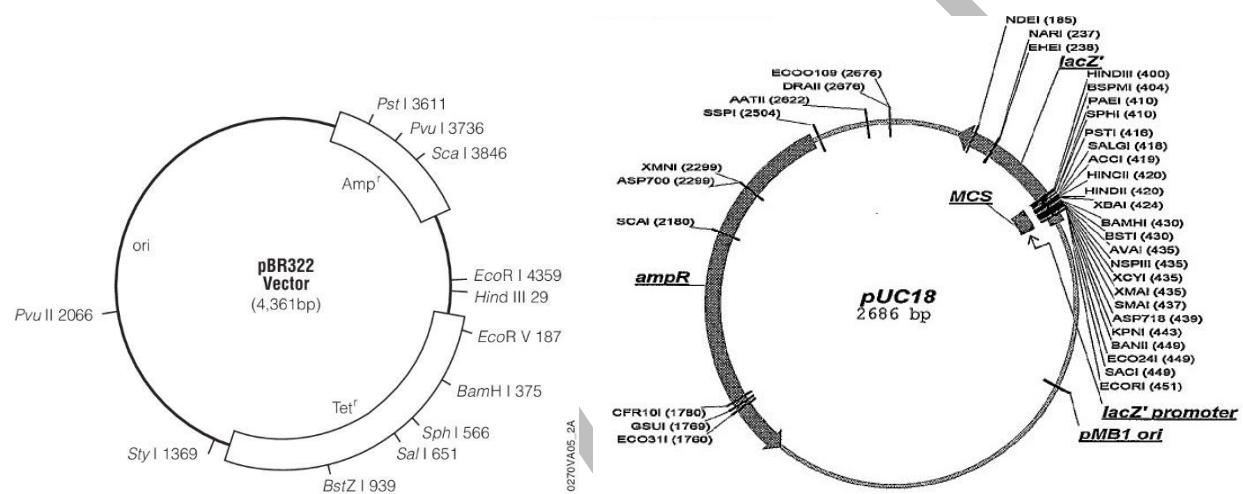
Les vecteurs de clonage

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 : MCS)
- une ou deux marqueurs de sélection (confèrent la résistance à des antibiotiques par exemple)

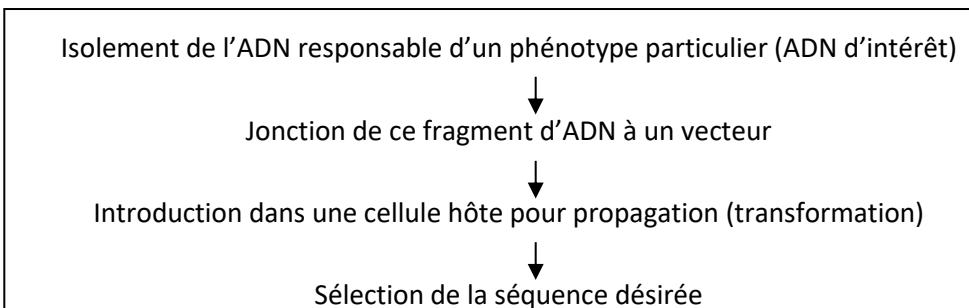


Les phages : les deux les plus utilisés sont des dérivés du phage λ et du phage M13, autorisent le clonage de fragments d'ADN très grands (environ de 20kb). Aux extrémités du phage λ , existent des séquences appelées site cos. L'association de ces extrémités cohésive donne une structure circulaire à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

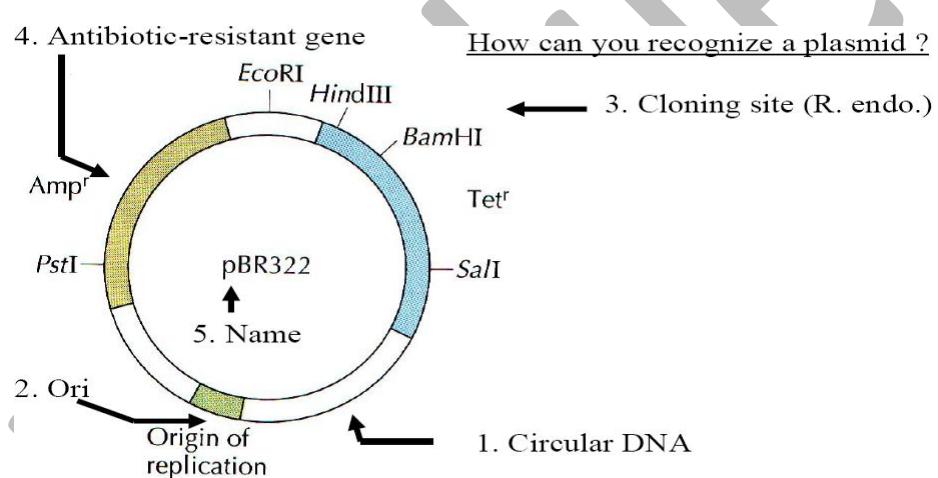
Les cosmides : des molécules d'ADN circulaires, possèdent une origine de réplication plasmidique, un ou plusieurs marqueurs de sélection, une région de sites multiples de clonage et un site cos (du phage). Ils permettent le clonage de fragment d'ADN de grande taille (environ de 50Kb). Ils sont empaquetés 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*.

Les étapes du clonage



- L'ADN peut être coupé par des enzymes de restrictions. Les fragments qui en résultent sont soit séparés par électrophorèse, soit d'abord insérés dans des vecteurs et clonés.
- Après isolement, les fragments sont insérés dans un vecteur approprié (plasmide...) pour former une molécule recombinante qui peut se reproduire dans une cellule hôte.
- Le procédé le plus facile et le plus utilisé consiste à couper le plasmide et l'ADN avec la même enzyme de restriction afin de produire des bouts cohésifs identiques.
- Après appariement d'un fragment avec le plasmide par les bases complémentaires, les coupures sont fermées par l'ADN ligase.



- * Pour les fragments et les vecteurs dépourvus des bouts collants (cohésifs) on peut ajouter des séquences poly(dA) à l'extrémité 3' de l'ADN plasmidique et du poly(dT) aux extrémités 3' des fragments à insérer en employant la terminal transférase.
- * Les bouts francs peuvent être réunis par l'ADN ligase de T4.
- Les molécules recombinantes sont insérées dans les bactéries grâce à une transformation ou à une infection par phage.
- * la cellule hôte ne doit pas modifier ou détruire l'ADN recombiné qui y a été introduit. Comme la plupart des bactéries possèdent des enzymes de restriction pour leur propre défense naturelle, il faut utiliser des souches mutantes dépourvues de ces enzymes.

La transformation

Le transfert de l'ADN dans une cellule hôte désigne le processus de transformation. Cela n'est pas possible que lorsque les cellules sont rendues compétentes, c'est-à-dire aptes et capables d'intégrer le vecteur portant l'ADN étranger. La transformation peut s'opérer de plusieurs manières différentes.

La technique la plus commune pour les procaryotes est le choc thermique. Le vecteur est pour cela adsorbé sur la bactérie à la température de 4°C puis capturé par la cellule grâce à un choc thermique de courte durée (42°C pendant 90 secondes).

Il est possible d'introduire l'ADN par la technique d'électroporation. Il s'agit de soumettre les cellules à une charge électrique très brève en présence de l'ADN. La cellule devient alors transitoirement perméable et intègre l'ADN dans son cytoplasme.

D'autres techniques sont également pratiquées. Elles sont spécifiques pour les cellules eucaryotes.



La sélection

Après la transformation, les cellules sont ensuite étalées dans des boîtes contenant le milieu nutritif et un antibiotique (marqueur de sélection). Seules les bactéries ayant intégré le vecteur (seul ou recombinant) pourront se multiplier. Le taux de transformation des bactéries est généralement très faible. Trois populations de cellules hôtes existent :

- celles qui n'ont pas été infectées par le vecteur
- celles qui ont été infectées par un vecteur ne possédant pas d'ADN étranger.
- celles qui ont été infectées par un vecteur avec un ADN étranger.

Criblage des cellules recombinantes

Un premier criblage s'opère à l'issue de la transformation. Toutes les cellules n'ayant pas intégré le gène de sélection (le vecteur) vont mourir. Il s'agit ensuite de distinguer les cellules comportant le gène d'intérêt de celles ayant intégré le vecteur non recombinant.

On utilise pour cela une résistance à un second antibiotique. L'insertion du fragment d'ADN dans le vecteur doit inactiver le gène de résistance au deuxième antibiotique.

Les bactéries transformées par les vecteurs recombinants sont donc résistantes au premier antibiotique et sensible au deuxième antibiotique.

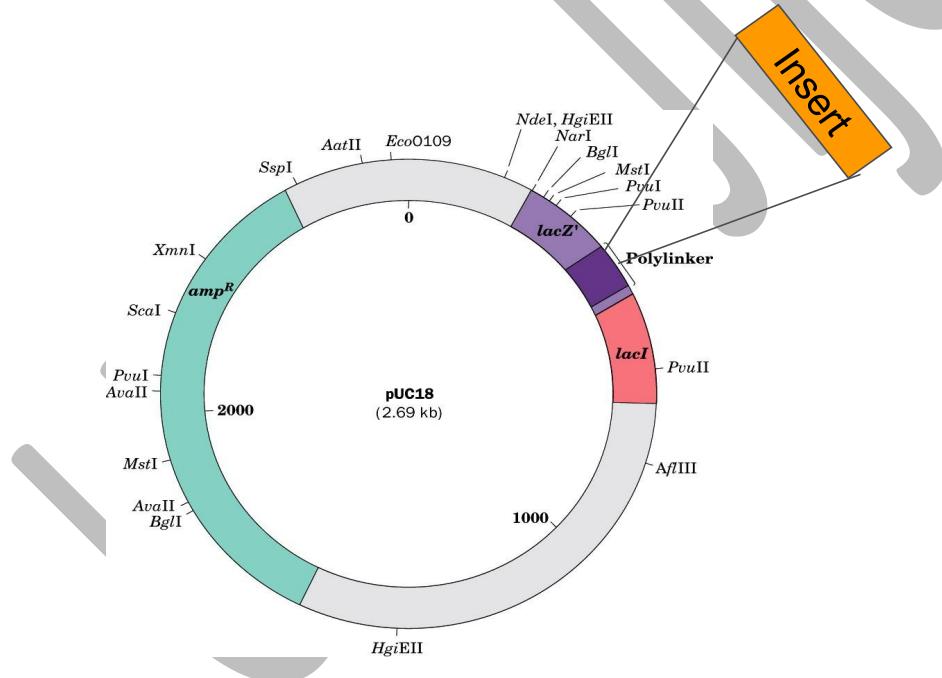
Il suffit donc de placer un échantillonnage de la colonie bactérienne sur un milieu de culture possédant ce second antibiotique pour détecter si cette colonie est transformée par des vecteur recombinants (auquel cas ces bactéries ne se développeront pas).

Criblage à l'aide du gène *lacZ*

Le gène *lacZ* code l'extrémité NH₂ (peptide α) de la β -galactosidase. Les cellules hôtes utilisées sont mutées dans ce gène et ne possèdent donc pas de β -galactosidase active. Le site multiple de clonage se trouve à l'intérieur du gène *lacZ*.

L'activité est restaurée quand la cellule est transformée avec un vecteur possédant *lacZ* intégrer. Cependant les cellules ayant intégré un vecteur recombinant perdront l'activité de la β -galactosidase et un test colorimétrique sur colonies permet directement de les identifier.

Il suffit d'étaler sur l'agar le substrat X-Gal (produit incolore). Les cellules qui se développent sur l'agar et qui possèdent une activité β -galactosidase libéreront le produit X de couleur bleu. Les colonies bleues correspondent ainsi aux cellules possédant un vecteur non recombinant (*lacZ* intégrer) alors que les colonies blanches possèdent un plasmide recombinant (gène *lacZ* interrompu)



L'insertion des gènes dans les cellules eucaryotes

Des gènes peuvent être introduits dans des cellules eucaryotes par des techniques telles que :

L'électroporation: est une technique efficace qui s'applique aux cellules mammifères et protoplastes des cellules végétales (si des cellules sont mélangées avec une préparation d'ADN puis exposées brièvement à des courants de haut voltage, elles capteront de l'ADN par des pores temporaires de la membrane plasmique).

La microinjection: L'approche la plus direct, le matériel génétique injecté directement dans des cellules animales telles que des œufs fécondées, et parfois incorporé de manière stable dans le génome de l'hôte pour produire un animal transgénique

Les fusils à gènes: Une des techniques les plus efficaces consiste à tirer sur les cellules végétales ou animales des microprojectiles couverts d'ADN, le fusil à gène, fonctionne en effet comme un fusil. Une explosion de gaz comprimé projette un nuage de microprojectiles métalliques enrobés d'ADN qui pénètrent les cellules. D'autres fusils emploient soit des charges électriques ou du gaz sous haute pression pour propulser les projectiles enrobés d'ADN

D'autres techniques sont disponibles

Expression des gènes dans les cellules procaryotes

Le plus souvent, l'hôte est une souche d'*E. coli*, dépourvue d'enzymes de restriction, en plus, elle recA⁻ pour réduire les chances de recombinaison entre l'ADN recombinant et le chromosome de l'hôte. *Bacillus subtilis* et la levure *Saccharomyces cerevisiae* peuvent également servir d'hôte.

Un gène cloné n'est pas toujours exprimé dans la cellule hôte sans modification additionnelles du vecteur. L'expression des gènes clonés est possible dans des vecteurs spéciaux appelés vecteurs d'expression. Ces vecteurs contiennent les signaux d'initiations nécessaires à la transcription et à la traduction.

Ils possèdent tous une origine de réplication, des marqueurs de sélections, une région dite site de clonage multiple et une région codant un site de fixation au ribosome reconnu par les enzymes de la cellule hôte. Pour être transcrit, le gène recombinant doit avoir un promoteur reconnu par l'ARN polymérase de l'hôte. Les promoteurs forts des vecteurs d'expressions sont dans la plupart des cas, issus des promoteurs naturels (trp E) ou phagiques (T7).

Expression des gènes dans les cellules eucaryotes

Parmi les systèmes eucaryotes de biosynthèse des protéines recombinantes, la levure est la première cellule hôte à avoir utilisée. La levure est capable d'assurer une maturation correcte des protéines hétérologues d'origine eucaryote. C'est aussi un système intéressant pour la sécrétion des protéines.

Pour les protéines nécessitant une glycosylation complète, l'expression dans des cellules eucaryotes supérieures s'avère nécessaire.

Baculovirus: permet le transfert et l'expression des gènes étrangers dans les cellules d'insectes

Les applications

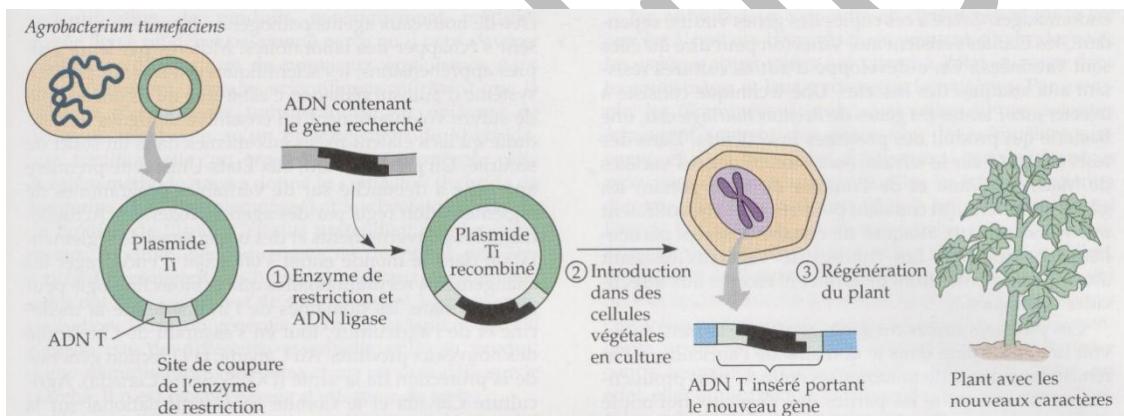
Les applications médicales

La production de protéines utiles en médecine comme l'insuline, l'hormone de croissance humaine (GH) et l'interféron sont d'une importance pratique considérable. Les techniques de l'ADN recombinant ont permis de produire de grandes quantités de protéines humaines qui n'étaient jusque-là disponibles qu'en très petites quantités.

- L'interleukine 2, le facteur coagulant VIII
- Vaccins contre les maladies infectieuses (hépatite B)
- Les sondes dans le diagnostic (recherche d'un gène muté chez un individu)

Les applications en agriculture

Le transfert des gènes est utilisé pour produire des plantes qui ont des caractéristiques modifiées. Le plasmid Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* provoque des tumeurs chez les plantes. La capacité qu'à une région d'ADN T du plasmide Ti s'intégrer aux chromosomes de la plante a permis de l'utiliser comme vecteur de clonage pour le transfert de gènes étrangers. On peut aussi transférer des gènes en formant des protoplastes de cellules végétales, ainsi devenus perméables à l'ADN désiré. L'invention des fusils à gènes aidera grandement à la production des végétaux transgéniques.



Les applications industrielles

L'amélioration des souches pour des procédés biologiques existants et le développement de nouvelles souches pour des procédés nouveaux.

- Bactéries recombinantes pour la production des enzymes coûteuses d'importance industrielles
- Développement des bactéries capable de dégrader le pétrole et d'autres produits toxiques
- D'autres applications dans les industries chimiques et alimentaires

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
- **Weinman S., Méhul P.** TOUTE LA BIOCHIMIE. Dunod, Paris, 2013
- **Swyngedauw 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
- **Ibarrondo F. , Camus G.** . La transcription chez les eucaryotes, *Auteurs : Document publié le : 12 décembre 2006.* <http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/transcription/transcription.htm>
- Site interne

Universität