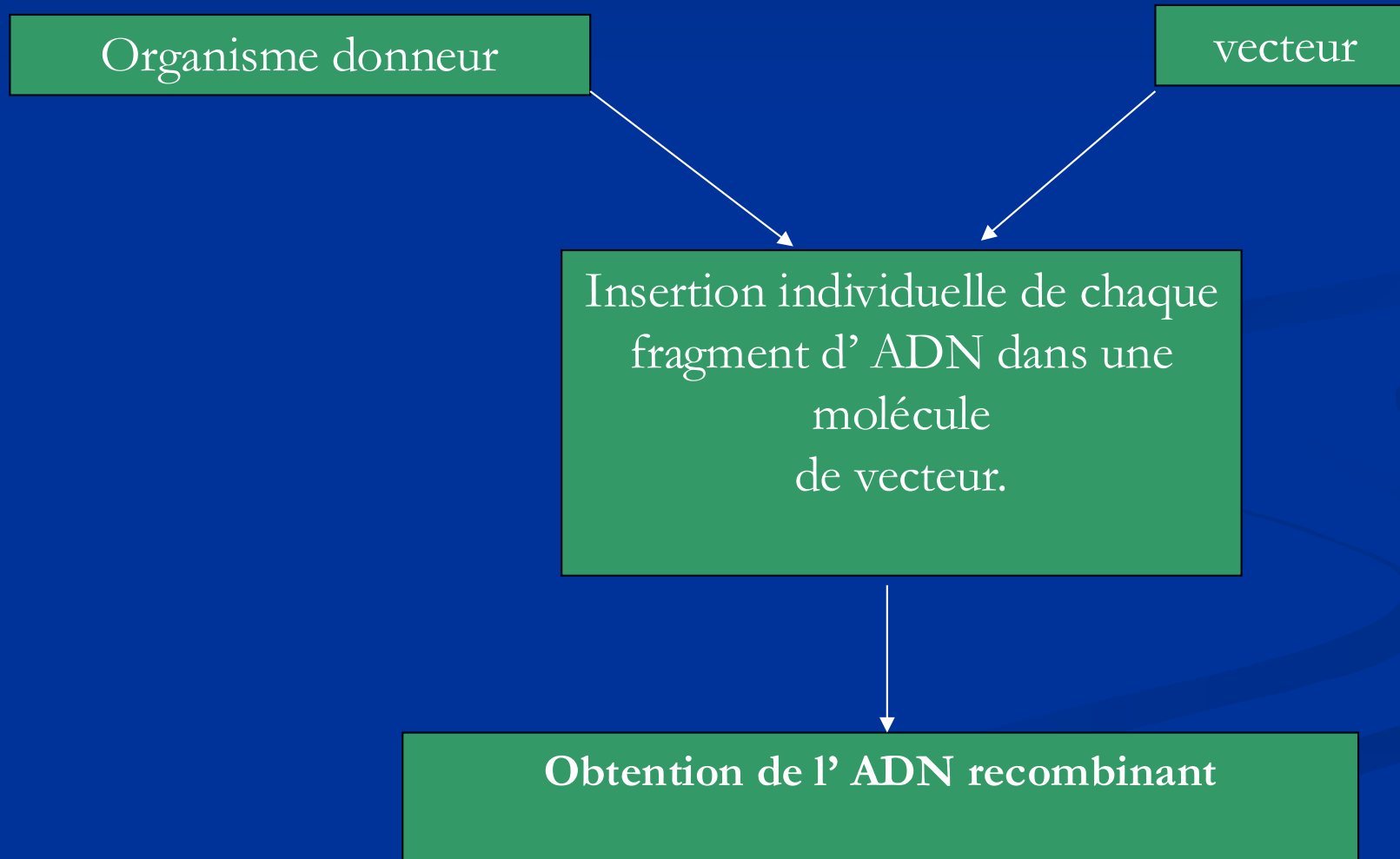
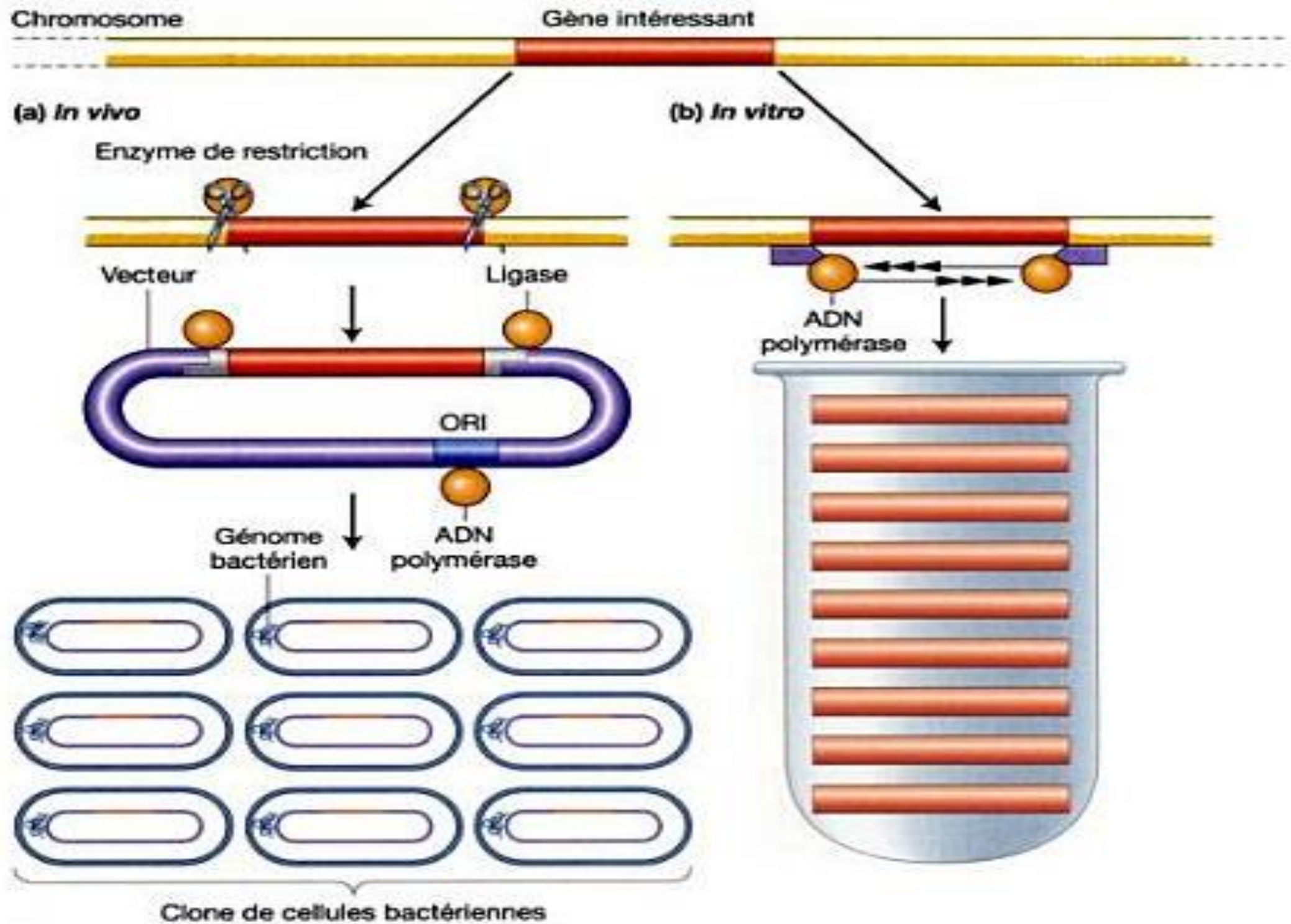


IV. Génie génétique

1. Clonage:

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.





- **Types d'ADN donneur:**

- ADN Génomique: chromosomique (coupure de gène d'intérêt);
- ADNc
- ADN obtenu par synthèse chimique

- **Enzymes de restriction:**

- Les enzymes de restriction sont d'origine bactérienne. Elles ont la particularité de couper les molécules d'ADN bicaténaire à des sites spécifiques de la séquence : ce sont des endonucléases.
- Le nom des enzymes de restriction provient du nom de genre et d'espèce de la bactérie de laquelle elles ont été isolées.

Il existe trois types d'enzymes de restriction:

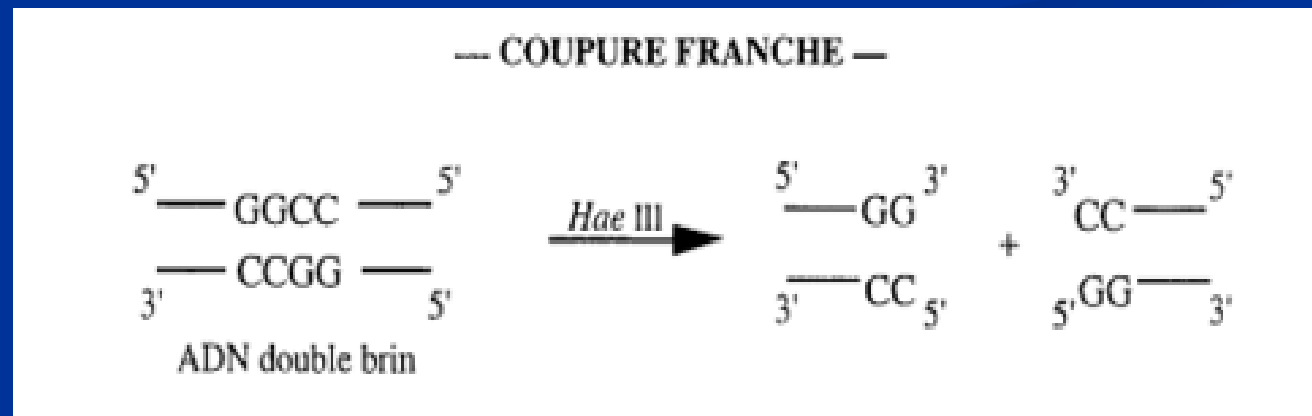
- Les types I et III: des protéines complexes coupant l'ADN double brin en dehors de leur site de reconnaissance.
- Type II: sont les outils indispensables au génie génétique. Elles reconnaissent une séquence spécifique de 4, 6 ou 8 pb et coupent à l'intérieur de cette séquence, appelée site de restriction.

Les enzymes de restriction coupent dans la séquence selon deux modes:

-coupure franche: sont obtenues des extrémités franches par coupure au même endroit sur les deux brins.

Exemple:

L'enzyme *Hae* III isolée de *Haemophilus aegyptius* coupe l'ADN double brin au niveau de la séquence GG/CC

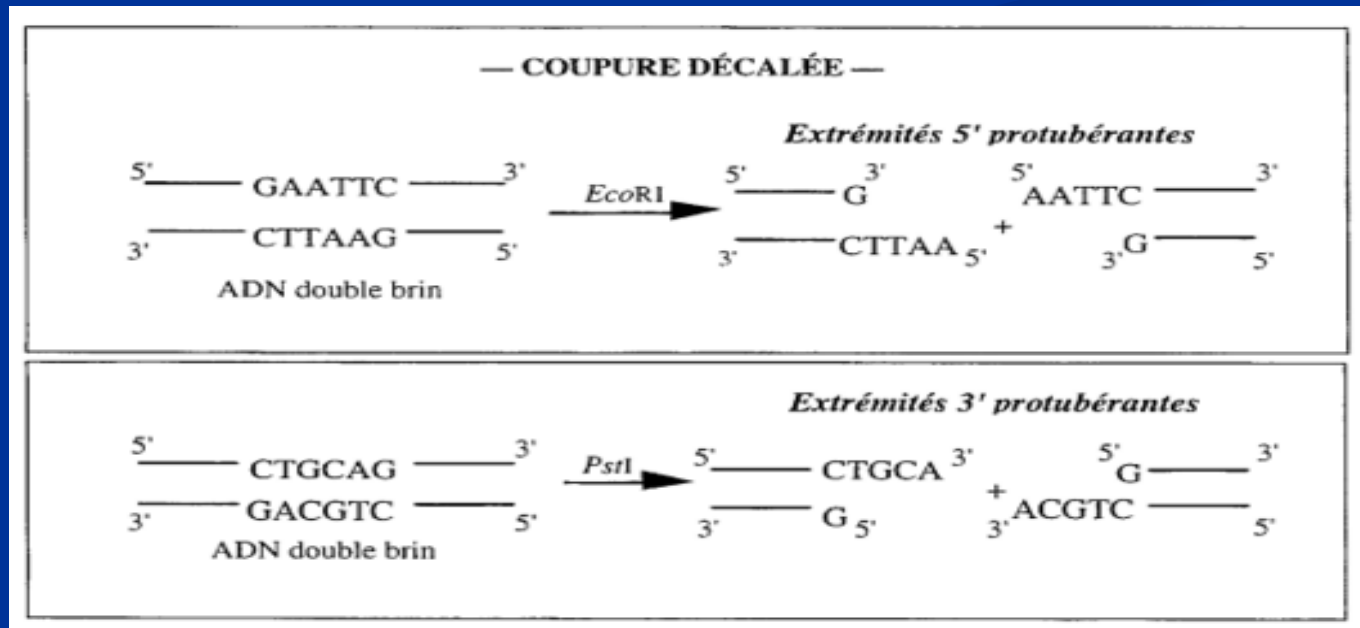


-Coupure décalée sur les deux brins: génère des extrémités monocaténares ayant des séquences complémentaires appelées extrémités cohésives ou bouts collants.

Exemple:

-l'enzyme *EcoRI* isolée de *Escherichia coli*: coupe l'ADN double brin dans la séquence palindromique G/AATTC.

-l'enzyme *PstI* isolée de *Providencia stuarti* coupe l'ADN double brin dans la séquence palindromique CTGCA/G



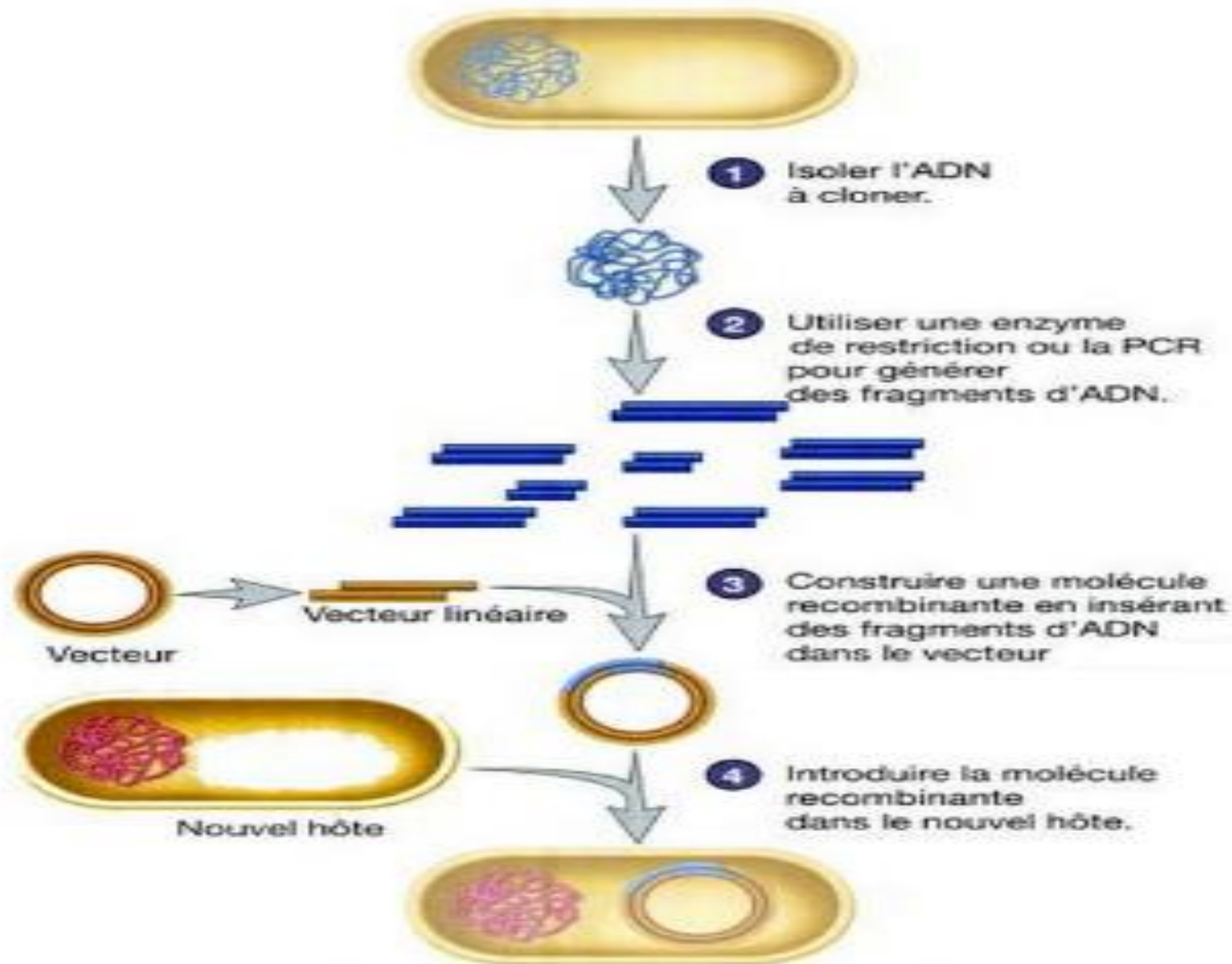
■ **ADN ligases:**

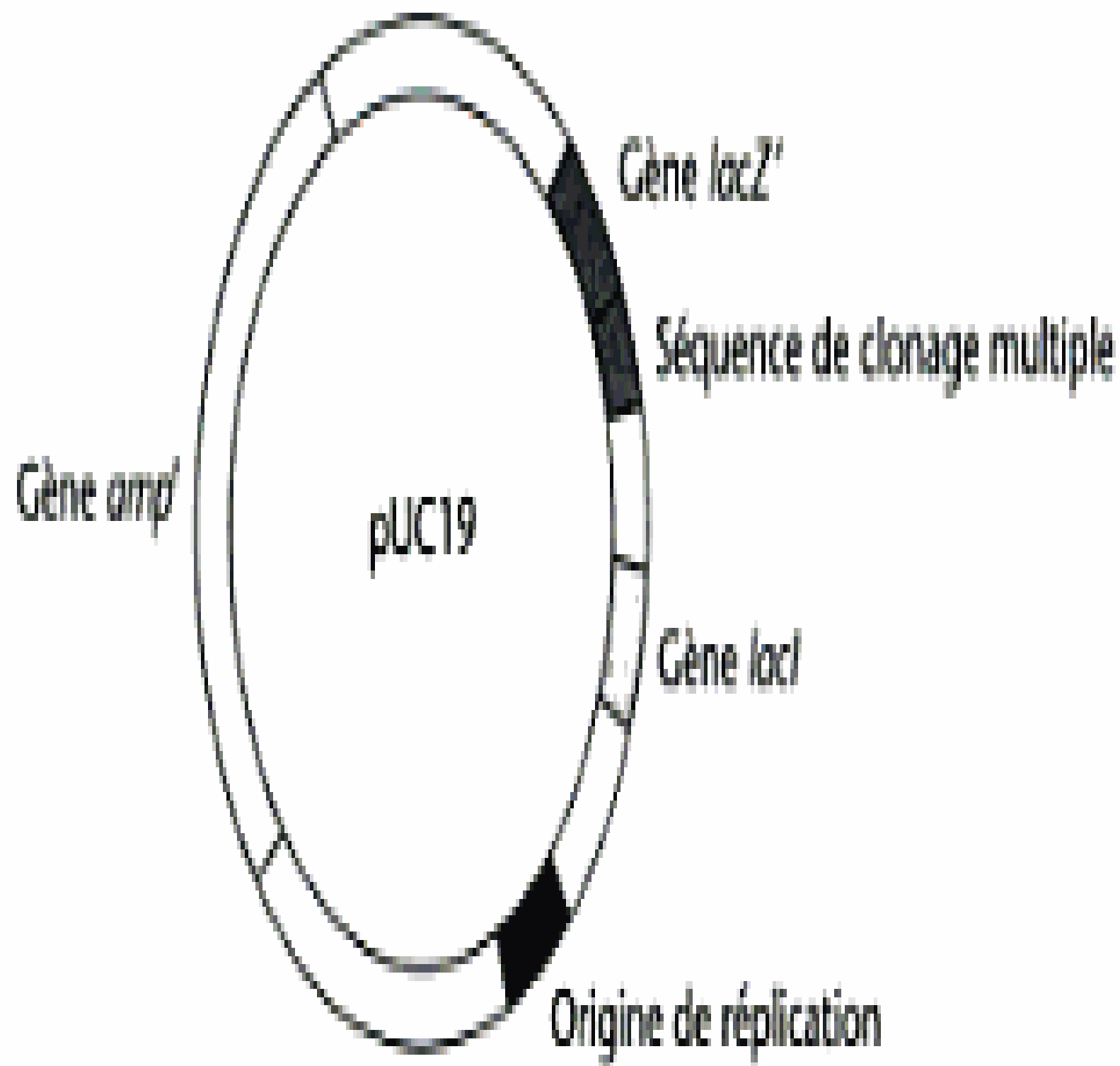
- Catalysent la formation d'une liaison phosphodiester entre deux segments d'ADN.
- La formation de la liaison phosphodiester nécessite un cofacteur: ATP.
- L'ADN ligase permet en particulier de suturer les fragments d'ADN produits par des enzymes de restriction.

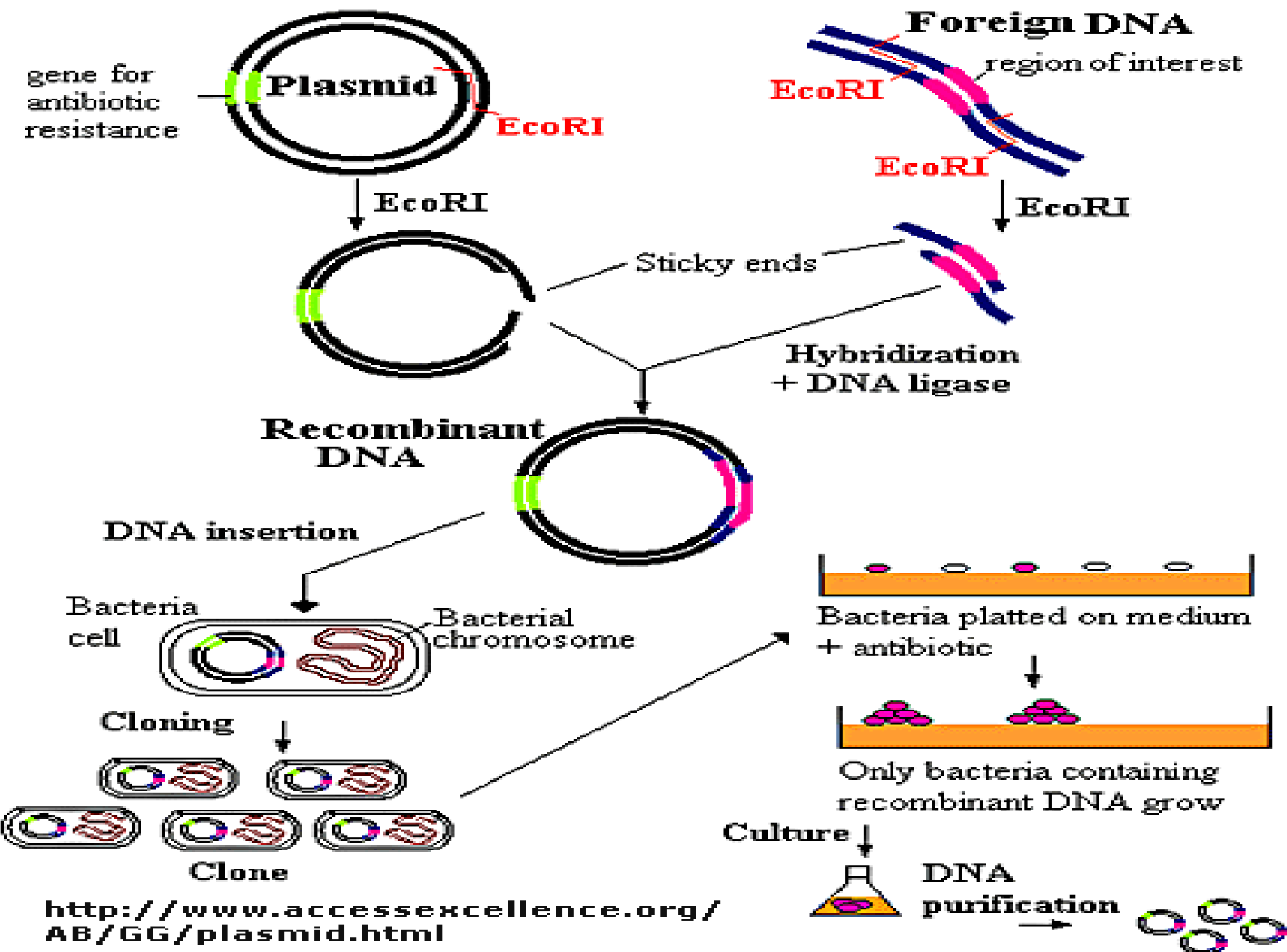
Préparation des plasmides

- Les bactéries contenant les plasmides sont mises en culture(jusqu'à 2 litres).
- Quand la concentration bactérienne atteint une valeur suffisante, on traite par un antibiotique.
- On récupère les bactéries par centrifugation.
- On perméabilise la paroi bactérienne par un traitement doux permettant d'obtenir un passage en solution des plasmides.
- La purification des plasmides peut être ensuite réalisée par CLHP ou ultracentrifugation en gradient de densité.

Recombinaison, Constitution de l'hybride et transformation bactérienne:







<http://www.accessexcellence.org/AB/GG/plasmid.html>

Cloning into a plasmid

➤ Bactériophages:

-bactériophage λ : ADN bicaténaire linéaire(50kb), présente des extrémités cohésives (séquence cos) lui permettant de se circulariser dans la bactérie infectée.

-Dans la pratique, les phages sont utilisées comme vecteurs de construction de banques d'ADNc ou génomiques: le phage lambda-GEM®-11 proposé par la société de biotechnologie Promega.

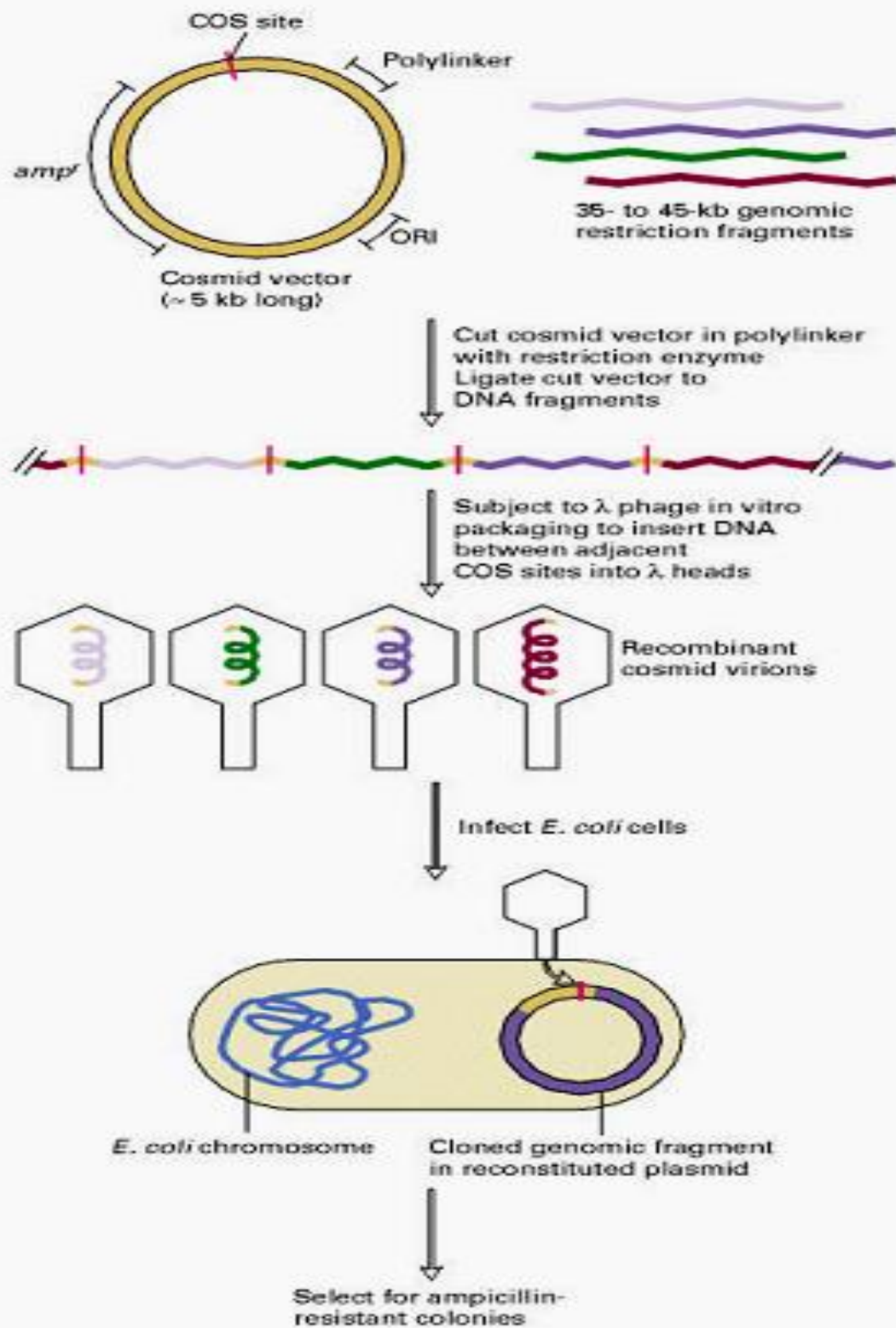
-Ce phage accepte des fragments d'ADN de 9 kb à 23 kb. Il possède des promoteurs pour la T7 ARN polymérase (extraite d'*E.coli*) et la SP6 ARN polymérase (extraite de *Salmonella typhimurium*). Qui permettent la synthèse de sondes ARN à partir d'une extrémité du fragment cloné.

- **Avantages:**

- La taille des fragments d'ADN insérables est supérieure à celle des plasmides (40-50 kb).
- La transformation des bactéries est plus efficace que pour les plasmides.

- **Désavantages:**

- Nombre de sites de restriction restreints dans le génome des phages.
- Obligation d'empaqueter l'ADN.
- Contraintes de taille pour l'ADN à insérer



➤ **Cosmides:**

- des vecteurs artificiels hybrides: phage lambda-plasmides.
- Ils renferment 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.

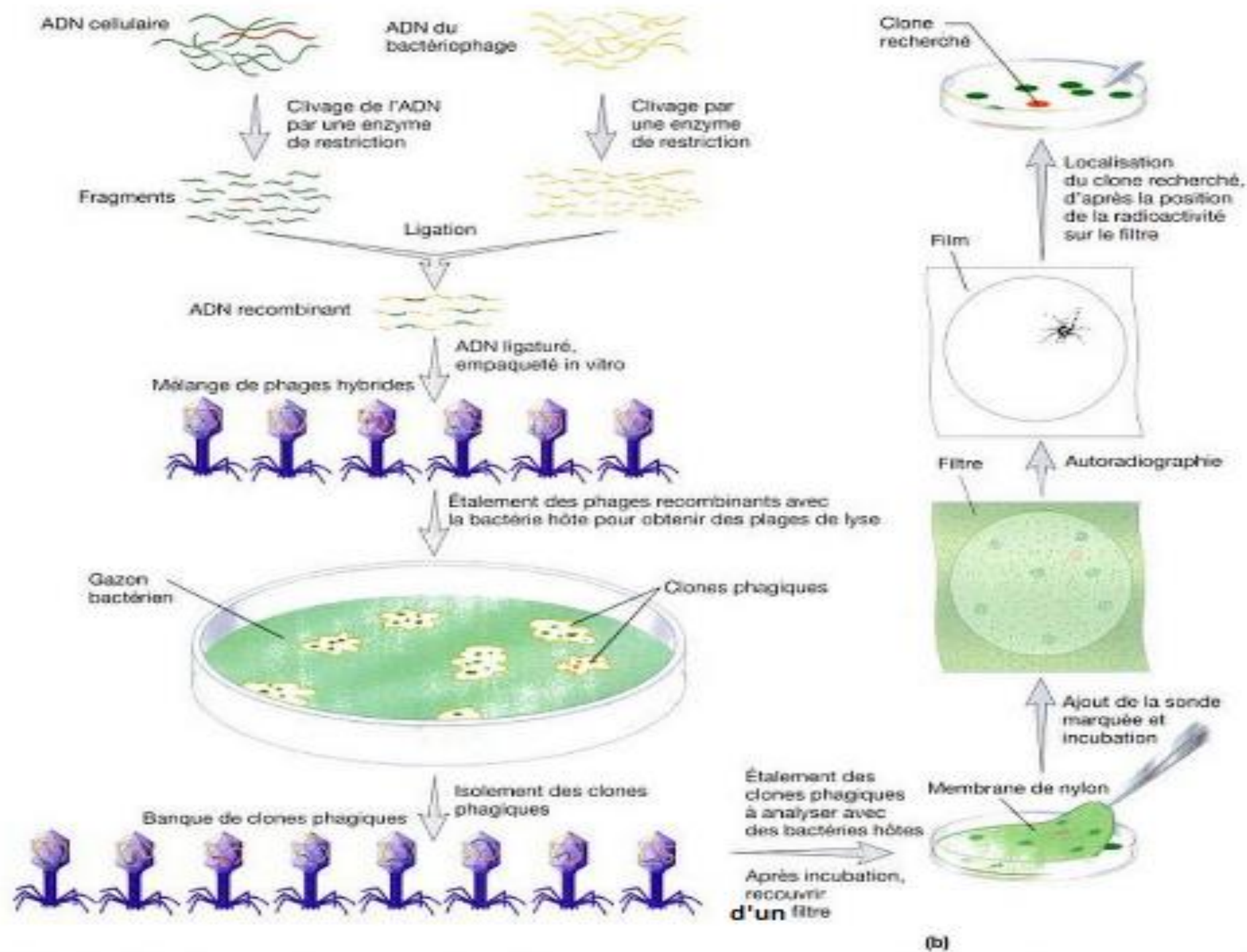
Désavantages:

Obligation d'empaqueter l'ADN.

- Exemple de production de protéine par *E. coli* et par *Saccharomyces cerevisiae*:
- *Escherichia coli*: elle fut et reste encore le premier hôte utilisé pour la fabrication de protéines recombinantes. Exemples de protéines recombinantes produites : hormone de croissance humaine, insuline, interféron α et interleukine -2..
- *Saccharomyces cerevisiae*: il s'agit de la levure de boulanger, utilisée depuis des millénaires dans l'alimentation humaine. Exemples de protéines recombinantes produites : antigène de surface du virus de l'hépatite B, insuline...

Une banque d'ADN génomique est un ensemble de vecteurs recombinants contenant chacun un morceau différent du génome de l'espèce étudiée.

Une banque d'ADNc est considérée comme une photographie instantanée des populations d'ARNm représentées dans un organe



(a)

(b)

Figure L'emploi du phage lambda comme vecteur. (a) La préparation d'une banque génomique. Chaque plage de lyse dans le gazon bactérien contient un clone recombinant portant un fragment d'ADN différent. (b) La détection et le clonage du phage recombinant recherché.