



RONÉOS DFGSP2 2020 - 2021

UE PL2.7 : BMOL 7-8

Date : 13/10/2020

Plage horaire : 10h30-12h30

Enseignant : DUFOURCQ Pascale

N°ISBN : 978-2-37366-088-3

Ronéistes DORDE Léa – lea.dorde@hotmail.fr
HARIZI Selma – h-selma@live.fr

Modifications et manipulations du gène: la création de molécules d'ADN recombinant

Plan du cours :

I – ADN recombinant

- A) Définition
- B) Comment obtenir un ADN recombinant
- C) Application thérapeutiques et santé

II- Principe du clonage

- A) Obtention de l'ADN
- B) Les vecteurs
- C) Cellules hôtes

III – Les différentes étapes du clonage

- A) Coupure par des enzymes de restrictions
- B) Ligation
- C) Introduction dans l'hôte
- D) Amplification
- E) Vérification

I – ADN recombinant (ADNr)

A) Définition

L'ADN recombinant est une molécule **d'ADN artificielle**, constituée d'au moins deux séquences de gènes qui proviennent d'espèces différentes.

Comment on obtient ces ADN recombinants ?

On va parler de **clonage** ; cela désigne plusieurs choses :

- La multiplication à l'identique de quelque chose et au cours de cette multiplication il va falloir qu'il y ait une **conservation parfaite de l'information génétique** qui va se faire à l'échelle cellulaire (clonage cellulaire) ou à l'échelle d'un organisme entier (clonage reproductif).
- **L'amplification d'un fragment d'ADN** par des micro-organismes après une insertion dans un vecteur.

Vecteur : fournit l'information nécessaire à la propagation **in vivo** de l'ADN.

Insert : ADN d'intérêt inséré dans le vecteur

B) Comment obtenir un ADN recombinant

On obtient un **ADN recombinant** en insérant un fragment d'ADN qui nous intéresse dans un vecteur et ce dernier, une fois construit, va servir à propager cet ADN dans un hôte. L'hôte sera une bactérie mais peut aussi être des cellules animales.

C'est la **culture de l'hôte** qui va nous permettre une amplification, ensuite on va pouvoir **purifier** ce vecteur qui va permettre la production en **quantité illimitée** de l'ADN recombinant.

Donc le clonage sert à produire un ADN recombinant en très grande quantité et façon identique.

C) Applications thérapeutiques et santé

Les applications des techniques de génie génétique sont nombreuses et variées.

❖ En médecine/pharmacie :

● Les **biothérapies / nouvelles thérapies** :

- C'est la production à grande échelle des **protéines** ou des **molécules à activités biologiques ou thérapeutiques** = protéines recombinantes.

Exemple : l'insuline ou l'hormone de croissance sont produits par l'organisme mais sont également des médicaments. Actuellement, lorsque les patients sont traités avec ces médicaments, ces molécules proviennent du génie génétique et sont donc des protéines recombinantes.

On peut les produire par **culture cellulaire** mais on est aussi capable de faire des **animaux ou des plantes transgéniques** qui vont permettre de produire des protéines recombinantes qui vont être des médicaments.

- Les thérapies géniques et cellulaires permettent de guérir des **maladies génétiques et non génétiques**. On va aller remplacer un gène défectueux qui peut être responsable de maladie génétique mais aussi d'une maladie qui n'est pas du tout issue d'une mutation. Ici le but sera d'amener un gène normal pour faire une thérapie génique et qui peut être couplée à de la thérapie cellulaire.

● Aide au **diagnostic et pronostic thérapeutique**

Grâce à ces ADN recombinants on peut **identifier des mutations** notamment en synthétisant des **sondes spécifiques** pour détecter sur des chromosomes des séquences qui peuvent être mutées.

● **Recherche**

Le génie génétique est aussi très utilisé dans la recherche. Pour faire des **études de fonction de gènes et de protéines, définir de nouvelles cibles thérapeutiques**, etc... Les applications sont très nombreuses.

❖ Il existe d'autres applications qui sont hors du contexte de santé.

● **L'agriculture**

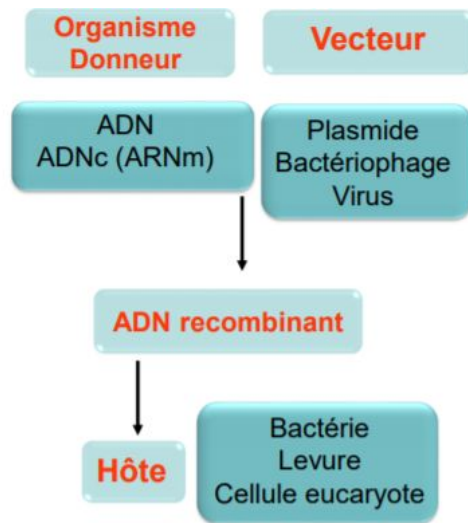
Dans certains pays on peut modifier des plantes ou des animaux par le génie génétique, c'est ce que l'on appelle des **OGM** (Organismes Génétiquement Modifiés), pour leur conférer des résistances à des produits phytosanitaires ou à certains insectes, virus, etc...

II - Principe du clonage

Le clonage c'est comment **amplifier indéfiniment** une séquence qui nous intéresse.

Pour faire un clonage il faut :

- **La séquence d'ADN ou ADNc** que l'on veut amplifier qui va provenir d'un organisme donneur.
- **Un vecteur** : plasmide, particules virales (adénovirus, rétrovirus), bactériophage.



L'ADNr on va ensuite l'intégrer/l'introduire dans un hôte. Il en existe plusieurs types selon ce qu'on veut faire. On a notamment la bactérie qui peut être utilisé pour faire le ménage, on peut aussi utiliser les levures ou alors des cellules eucaryotes.

A) Obtention de l'ADN

➤ **A partir de l'ADN génomique ou de l'ARN messager**

L'ADN génomique représente des **séquences codantes et non codantes** (introns, promoteurs, séquences régulatrices) et quel que soit le type de cellules dans un organisme, elles vont **toutes avoir le même génome**.

L'ARNm sont des **séquences uniquement transcrites**. On peut avoir, une expression spécifiques d'une protéine, une expression que dans certains types de cellules; on doit faire attention au choix de la cellule. Il faudra réaliser une transcription inverse afin d'obtenir un **ADNc**.

Exemple: on veut synthétiser de l'insuline;

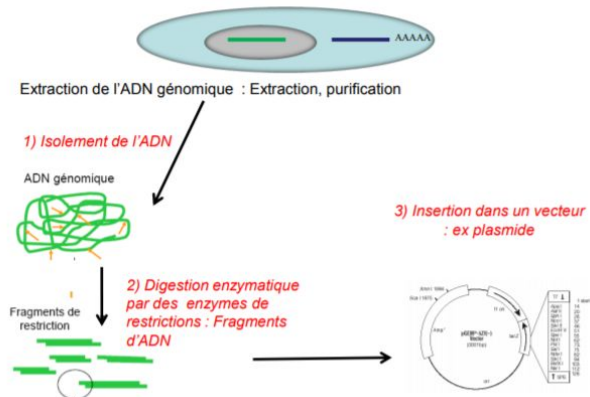
Avec les ARNm on va prendre préférentiellement des cellules de pancréatiques (car ce sont les cellules qui sont capable de le synthétiser) tant dis que pour l'ADN génomique, on peut prendre n'importe quelle cellule car elles contiennent toutes le gène codant.

Comment faire pour récupérer la séquence via l'ADNg?

On va prélever les cellules, on va extraire de l'ADNg et après extraction et purification on va avoir un ADN que l'on va digérer par différentes enzymes de restriction qui vont nous donner des fragments.

Ces **enzymes de restriction** vont générer plusieurs fragments d'ADN. Dans ces fragments d'ADN on va être capable d'aller sélectionner **le fragment qui nous intéresse**. A partir de ces fragments d'ADN on va sélectionner celui qui nous intéresse puis l'insérer dans un vecteur. Ce vecteur ici est un **plasmide**, il a été conçu par les biotechnologies.

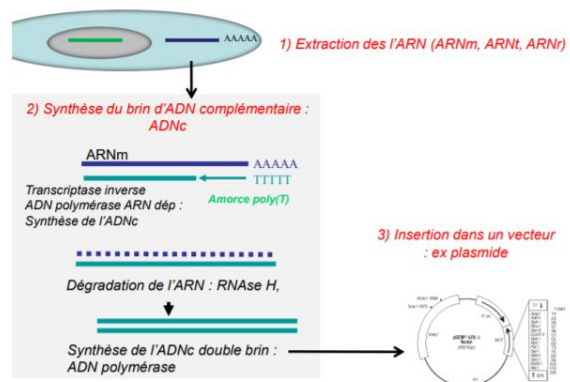
➤ A partir de l'ADN génomique :



Comment faire pour récupérer la séquence via un ARNm ?

Il va falloir faire attention au choix de la cellule car il faut qu'elle exprime l'**ARNm** que l'on souhaite. Quand on fait l'extraction à partir de cellule, on va extraire tous les ARN. Parmi les ARN on a : les ARNm, ARNt et ARNr. Donc à partir de tous ces ARN, on a celui qui nous intéresse et à partir de celui-ci on va **synthétiser l'ADNc par une transcriptase inverse**. Cette enzyme a une activité ADN polymérase ARN dépendante. Elle va donc, à partir de la séquence d'ARNm, synthétiser un brin qui sera complémentaire de l'ARNm.

➤ A partir de l' ARNm : par transcription inverse



La transcription inverse peut être réalisée grâce à une amorce poly T (car ARNm possède une queue poly A). L'amorce poly T va venir se fixer sur l'ARNm et à partir de cette amorce la transcriptase inverse va venir synthétiser ce brin d'ARNm.

On va ensuite dégrader l'ARN par une enzyme qui est l'RNase H puis on va resynthétiser un double brin, on aura donc la synthèse de notre ADNc. Cet ADNc va pouvoir être inséré dans un vecteur et notamment un plasmide.

B) Les vecteurs*

Comment cloner dans un vecteur ?

Le but est d'intégrer la séquence que l'on vient de choisir dans un vecteur.

C'est quoi un vecteur ?

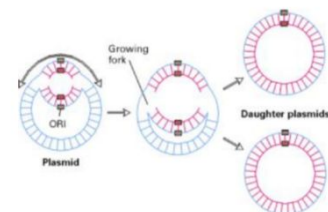
➤ **Caractéristiques communs aux différents vecteurs (plasmide ou virus)**

- Ces vecteurs sont des **fragments d'ADN** qui doivent comporter une origine de réplication que l'on appelle **le réplicon**. Celle-ci permet au vecteur de se répliquer à l'identique, de **manière indépendante des chromosomes de l'hôte**. C'est ce que l'on appelle **une réplication autonome dans une cellule hôte**.

Attention, on peut avoir différents hôtes : un système procaryote ou eucaryote. On n'aura pas les mêmes origines de réplication.

Chez les bactéries, le réplicon s'appelle **ORI**.

Chez les eucaryotes, c'est une origine du virus SV40 et on l'appellera **SV20**.



- On va retrouver dans ces vecteurs **des marqueurs de sélection** qui sont en général des gènes de sélection qui vont donner une résistance à un antibiotique et ceci va permettre d'identifier rapidement les cellules ou les bactéries qui ont ce vecteur.
- Un vecteur doit également avoir un **site de clonage multiple**, c'est une séquence qui va posséder plusieurs sites de reconnaissance pour des enzymes de restrictions. C'est dans ce site que notre séquence à cloner va s'insérer.
L'insertion du fragment peut être plus ou moins longue selon le vecteur choisi

Plusieurs types de vecteurs (plasmide, vecteurs viraux, phages)

- **Le plus utilisé est le plasmide**, notamment pour faire des biomédicaments. Ces plasmides sont des **ADN circulaires extra-chromosomiques** qui ont été identifiés d'abord dans les bactéries. Ces ADN circulaires sont des vecteurs de **petite taille** qui peuvent être utilisés pour produire des protéines recombinantes.
- **Des virus à ADN** : adénovirus.
- **Des virus à ARN** : rétrovirus, parmi eux les lentivirus qui sont très utilisés.
- **Les phages** sont des **ADN linéaires**, dérivés du bactériophage qui sont retrouvés dans les bactéries.

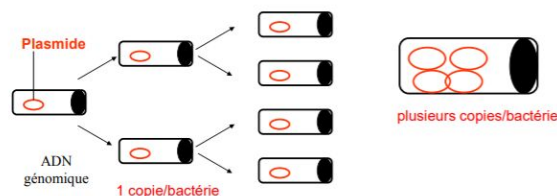
Les particules virales, lorsqu'elles sont utilisées, sont modifiées afin qu'elles ne soient plus pathogènes; on garde seulement l'enveloppe qui va servir de vecteur pour amener le gène qui nous intéresse.

Les plasmides :

Les plasmides sont des fragments d'ADN circulaire double brin, extra-chromosomique. Ils sont surtout utilisés pour faire du clonage dans les bactéries, ils ne s'intègrent pas à leur génome, ils restent cytoplasmique.

Le plasmide se réplique de façon indépendante vis à vis de la bactérie. On peut avoir soit une seule copie du vecteur soit plusieurs copies dans une même bactérie. La division de la bactérie qui contient le plasmide, celui-ci va être répliqué. Plus il y a de copies plus l'amplification est efficace.

A partir de ces bactéries, on va pouvoir récupérer notre ADN recombinant, on aura fait un clonage.



Différents plasmides selon le but de l'hôte*

Il faut faire attention au choix du plasmide. On parle de plasmide de **clonage** ou de plasmide **d'expression**.

En effet, le **plasmide de clonage** ne sert que pour les **purifications et amplifications** d'un ADN en particulier. Pour le **plasmide d'expression**, on l'utilise pour **synthétiser une protéine recombinante à partir d'un vecteur**.

Exemple : on veut faire du diagnostic et synthétiser un fragment d'ADN qui va nous servir de sonde, on va utiliser un plasmide de clonage car on a juste besoin d'amplifier la séquence d'intérêt. Par contre si on veut synthétiser une protéine recombinante il nous faut un plasmide d'expression.

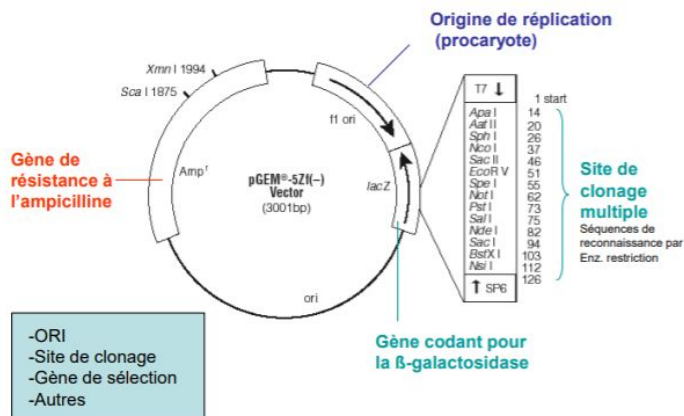
Le plasmide d'expression est un plasmide de clonage, plus il va contenir des séquences qui va permettre la transcription de notre gène et la traduction des produits.

Ils existent des milliers de plasmides qui sont vendus et qu'on achète selon les caractéristiques de notre gène que l'on veut cloner et en fonction de l'application qu'on souhaite faire derrière votre clonage.

Dans cet exemple, la taille du plasmide de clonage pGEM correspond à 3001 pb. C'est une séquence double brin où on retrouve les séquences dont on a précédemment parlé:

- **ORI:** l'origine de réplication utilisé dans le système procaryote (bactéries)
- **Le site de clonage multiple:** contient les différentes enzymes de restrictions utilisées pour le clonage (couper et ouvrir le plasmide). C'est là où on intègre l'insert.
- **Le gène de résistance AMP^R (Ampicillin Resistance):** la séquence qui code pour la résistance à un antibiotique (ici ampicilline)

Exemple d'un vecteur de clonage: plasmide destiné à l'amplification d'un gène (multiplication dans *E. coli*)

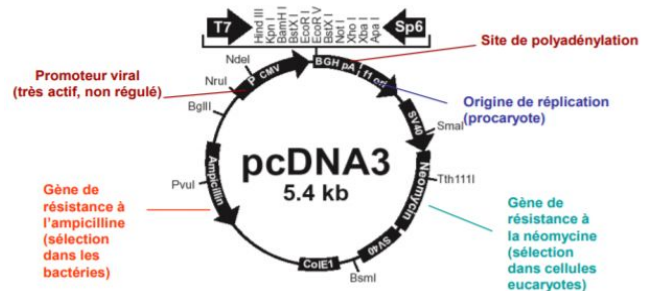


Exemple d'un plasmide d'expression : ici, pcDNA3 fait 5400 pbs.

Un vecteur d'expression comporte les mêmes séquences qu'un vecteur de clonage avec certaines en plus: on retrouve le gène de résistance à l'ampicilline (fréquent chez les bactéries), le site pour le clonage qui va insérer l'ADN et l'ORI. Ce **plasmide d'expression possède en plus un promoteur** (exprimer une protéine), un **site de polyadénylation** (on veut un ARN stable) et un **autre gène de résistance**.

Exemple d'un vecteur d'expression : plasmide destiné à l'expression d'un gène (ex eucaryote)

MM séquences que le vecteur de clonage + séquences spécifiques



C) Cellules hôtes*

➤ Procaryotes :

Bactéries : la majorité des manipulations dans le clonage de l'ADN utilisent l'**Escherichia Coli** (bactérie modifiée pour être compétente pour le clonage) comme organisme hôte. Elle est très utilisée pour faire du clonage mais aussi pour produire des protéines recombinantes et certains médicaments qui sont synthétisés avec ce système bactérien.

➤ Eucaryotes :

• Eucaryotes inférieurs :

- **Levures** comme *Saccharomyces cerevisiae* (levure de bière, la plus utilisée)
- Des **végétaux** : (*Spodoptera frugiperda* ou *Trichoplusia*)

• Eucaryotes supérieurs : cellules de mammifères

- Lignées cellulaires :
→ **CHO** (chinese hamster ovaries): les plus utilisées car elles se développent très vite et se cultivent très facilement.

- Cellules humaines : cellules de foie, cellules endothéliales, neurones...

Le plus souvent ces hôtes sont utilisés pour la production de protéines recombinantes et non pour faire du clonage proprement dit.

III- Les différentes étapes de clonage*

Le clonage se fait sur **5 étapes** qui sont :

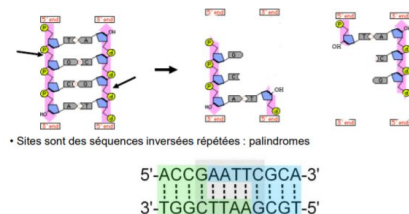
1. On coupe l'ADN donneur et le vecteur par les enzymes de restriction.
2. Ligation qui permet d'obtenir l'ADN recombinant.
3. La transformation : introduire l'ADN recombinant dans une cellule hôte (ici dans une bactérie).
4. Amplification : comment on cultive.
5. Vérification et purification de l'ADN recombinant.

A) Coupure par des enzymes de restrictions*

Les enzymes de restrictions clivent de manière spécifiques des liaisons phosphodiester entre les bases, elles vont reconnaître une séquence spécifique dites palindromiques. Quand elles reconnaissent ces séquences spécifiques, elles vont cliver de façon spécifique.

a) Coupure de l'ADN : utilisation **des enzymes de restriction**

- Enzymes bactériennes : reconnaissent des séquences spécifiques de 4 à 8 pb sur l'ADN
- Coupent au niveau des ponts phosphodiester



Les enzymes de restriction libèrent :

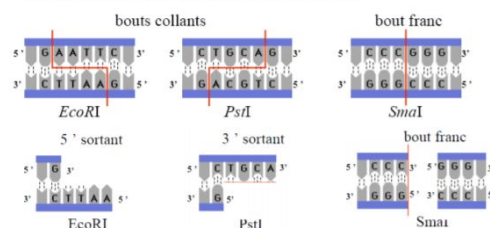
→ **des bouts collants** = sortants (cohésive) si on coupe à bouts sortants, la séquence ne peut s'intégrer qu'avec la séquence complémentaire. Plus spécifique.

→ **des bouts francs**, si on coupe l'ADN donneur et le vecteur par bouts francs, tout peut s'intégrer de façon non spécifique. C'est plus simple.

Le clivage du plasmide (circulaire) sert à **l'ouvrir et le linéariser**. Pour l'ADN donneur il est préférable qu'il soit coupé avec **la même enzyme de restriction** pour que les séquences correspondent. Il y a reconnaissance des bases par complémentarité. Mais ce n'est pas toujours possible d'utiliser la même enzyme de

a) Coupure de l'ADN : utilisation **des enzymes de restriction**

- Enzyme libère : bouts collants (cohésives) et bouts francs



restriction. Dans ce cas là il va falloir trouver avec différentes enzymes pour qu'on ait un assemblage complémentaire.

B. Ligation

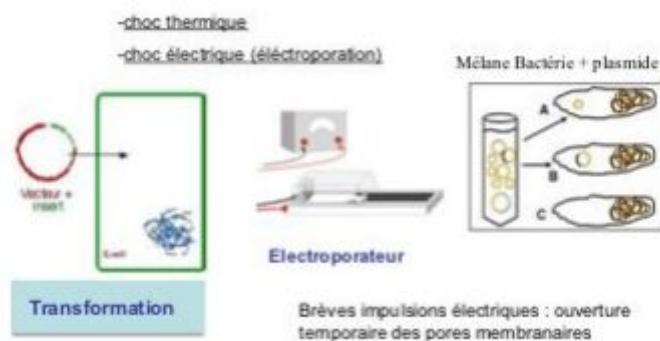
Pour recréer le double brin d'ADN, il va y avoir une ligation grâce à une **ligase** : la **T4 ADN ligase**. Elle permet de reconstituer des liaisons sur le simple brin. Grâce à de l'**ATP** on va pouvoir reconstituer les **liaisons esters** entre le groupement P en 5' et le groupement OH en 3'. Ce qui nous donne notre **ADN recombinant**.



C. Introduction dans l'hôte

L'objectif est de mettre ce vecteur dans la cellule hôte. Ici on utilise une bactérie (cas d'un clonage bactérien). Pour faire pénétrer le plasmide dans la bactérie, on fait soit un **choc thermique**, soit un **choc électrique**. Par conséquent, la membrane est fragilisée (pas détruite), création de **pores temporaires** au niveau de la membrane de la bactérie et passage de l'ADN.

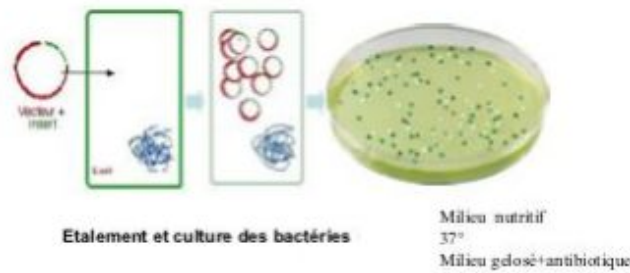
L'insertion du plasmide dans l'hôte s'appelle la **transformation**.



D. Amplification

On met le produit de notre électroporation sur un milieu gélosé contenant un **antibiotique** (37°). On laisse les bactéries se développer. Il faut reconnaître la bactérie qui possède l'insert, qui a intégré le plasmide recombinant (possédant donc le gène de résistance).

Un gène de résistance permet de cribler une bactérie qui a un plasmide.



Il y a 2 criblages à faire :

- 1^{er} criblage : cultiver et sélectionner les bactéries sur **antibiotique**. Donc les bactéries qui n'ont pas de gène de résistance vont mourir. On obtient alors 2 populations restantes : celles avec plasmide **recombinant** et celles avec plasmide **non recombinant**.
- 2^e criblage : sélectionner **uniquement** les bactéries qui ont le plasmide **recombinant**.

Soit criblage par PCR (profil de digestion ou utilisation de sondes spécifiques), soit par l'utilisation d'un plasmide qui permet directement dans la boîte de pétri de définir les bactéries positives.

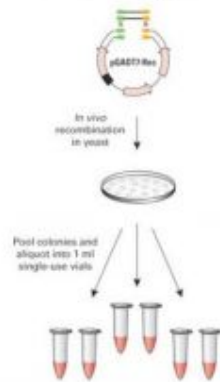
Lorsqu'on fait pousser des bactéries sur des boîtes de Petri, on a des petits clones, les bactéries vont pousser en colonies. Les bactéries ont soit un plasmide recombinant, soit un plasmide non recombinant. On va **piquer** le clone/colonie qui nous intéresse et le mettre dans un tube. Chaque clone (a son propre tube) pousse dans le milieu de bactérie, ce qui permet d'avoir un **clone amplifié**.

□ **Criblage des clones par PCR***** : A partir de ces clones, on va faire une extraction d'ADN et on met en évidence des séquences particulières, spécifiques du plasmide ou de l'insert. Ceci est fait grâce à des **amorces** qui encadrent une partie que l'on connaît, on fait une PCR pour amplifier spécifiquement le morceau qui nous intéresse.

Si on a choisi des amorces qui reconnaissent la séquence de l'insert, parmi 50 clones on en aura par exemple 4 positifs à l'insert, ces 4 clones nous intéresseront.

Les clones négatifs vont partir à la poubelle et les **positifs** seront mis à **amplifier**. Une nuit après on a des millions de bactéries, on purifie le plasmide qui sera le plasmide recombinant.

Criblage des clones par PCR



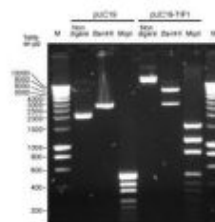
- Extraction ADN de chaque clone
- PCR avec des amorces spécifiques :
 - du plasmide
 - de l'insert

- **Criblage par profil de restriction ***:** Au lieu de faire une PCR, on fait un profil de restriction enzymatique. Sur les ADN qui proviennent de ces différents clones, on fait agir des **enzymes de restriction** qui vont couper à des endroits connus. Puis on fait **migrer** l'ADN sur un gel d'agarose. Ainsi selon la taille de la **bande** obtenue, on pourra en déduire la présence ou non de l'insert.

Criblage des clones enzymes de restriction

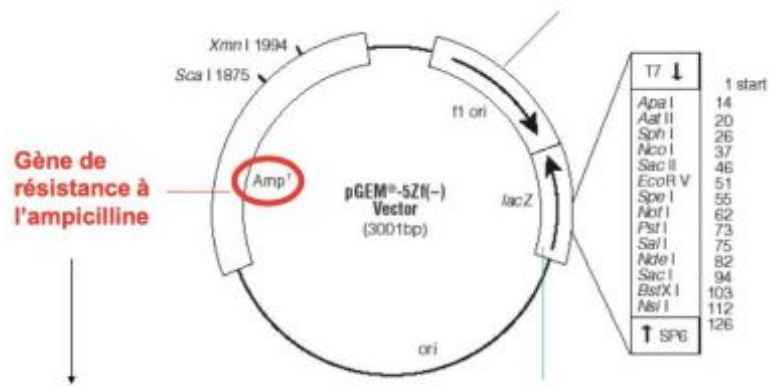


- Extraction ADN de chaque clone
- Profil de restriction :
 - Action d'enzymes de restriction
 - Migration sur gel Agarose
 - Etude du profil



- **Cas particulier de criblage des clones : utilisation de plasmides particuliers*** :**

Le plasmide le plus utilisé est celui qui contient **Ori** (origine de réplication bactérienne), un **gène d'amplification**, le **site de clonage** (dans lequel vient s'insérer l'insert). Et en plus la **séquence lacZ**. Celle-ci comporte au milieu de séquence le site de clonage et code pour l'expression d'une protéine qui est une enzyme : la **beta-galactosidase**.



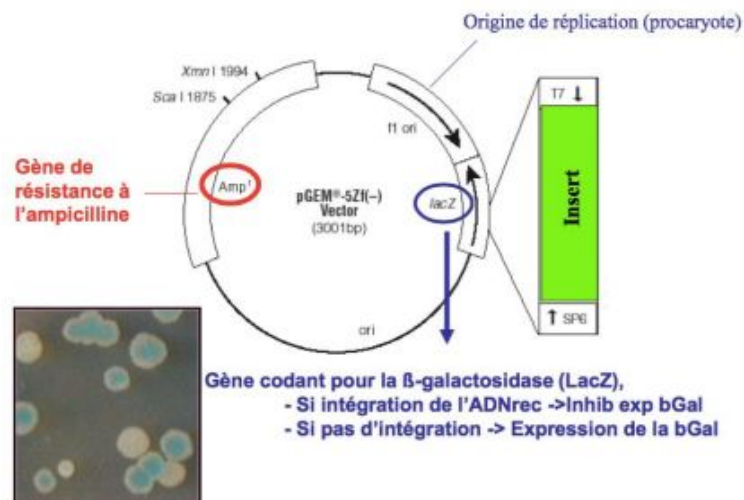
On cultive les bactéries en présence d'Ampicilline (ou autre antibiotique)
 -> sélection des bactéries qui ont intégré le vecteur

Cette enzyme a une **activité galactosidase** en culture, on peut avoir deux possibilités :

- Le clonage a fonctionné, on a un plasmide **recombinant**, l'insert se met sur le site de clonage et la séquence de lacZ est modifiée. On a plus expression de la protéine.
- Soit on a un plasmide non recombinant, l'insert n'y est pas, la séquence lacZ est intacte et on a expression par la bactérie de cette enzyme.

On a un système qui permet grâce à la présence ou l'absence de cette enzyme de reconnaître des bactéries : il y en a des blanches et des bleues.

Grâce à ce changement de couleur on peut sélectionner la "bonne bactérie" qui est la **bactérie n'exprimant pas l'enzyme**.

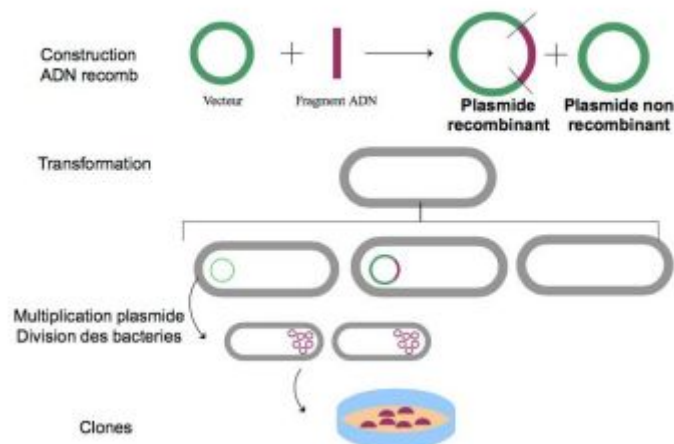


On teste l'activité de l'enzyme, pour cela on ajoute le substrat de l'enzyme : **X-gal** (5-bromo-4-chloro-3-hydroxyl-indol galactose) dans le milieu de culture.

Si on a l'enzyme elle **clive** le composé en galactose et va libérer le composé X qui a une couleur **bleue**. Si l'enzyme est présente les bactéries seront **bleues**. Si la beta-gal est absente, les bactéries seront blanches → on récupère donc les blanches qui ont donc le plasmide recombinant.

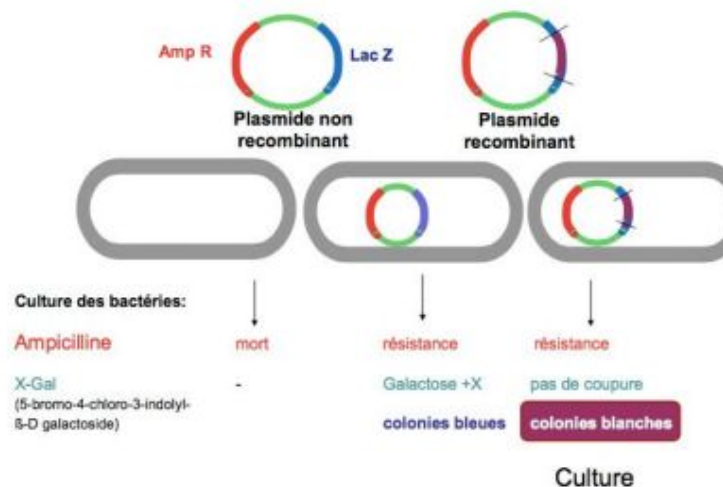
En résumé : pas de coupure de X gal donc on a des bactéries blanches donc insertion de l'insert dans la séquence lacZ.

Clonage : procédure complète



La procédure de clonage est exactement la même (attention le vecteur contient lacZ). Au début, on coupe le vecteur et le fragment d'ADN par des enzymes de restriction, on fait la ligation et le tout est mis en contact avec les bactéries. Mise en culture, on obtient 3 cas : un plasmide recombinant, un plasmide non recombinant et des bactéries vides. On pique la colonie blanche, on la met dans un bioréacteur, amplification des bactéries, lyse et récupération du plasmide.

Clonage : procédure complète, criblage



E. Vérification

Pour résumer, on vérifie qu'on a bien un ADN recombinant, en séquençant une partie d'un plasmide.

Autre possibilité, à partir des **lysats de ces bactéries** on fait un séquençage par PCR ou un profil de digestion enzymatique. Puis on vérifie donc qu'on a le bon profil de migration sur gel d'agarose.

Conclusion :

Le **clonage** est l'**obtention d'un ADN recombinant**, grâce à cette technique on obtient des millions de copies d'une séquence que l'on souhaite amplifier (on parle de mg d'ADN). On l'utilise pour faire des **protéines recombinantes** (attention il faudra avant avoir fait un vecteur d'expression), pour de la **thérapie génique**, **thérapie cellulaire**, pour faire des **sondes** et aussi pour faire des **banques** d'ADN génomique.

Cet ADN recombinant peut servir pour faire du **diagnostic** ou du **pronostic**. Mais aussi de la **biothérapie**.

Exemples d'utilisation comme sonde pour le diagnostic et pronostic de certaines maladies :
on a des patients qui peuvent être suivis par sondes nucléiques obtenues par clonage. On peut mettre en évidence l'apparition de mutations, translocations...

Ceci est issu du génie génétique et de l'obtention de l'ADN recombinant.

On a tout un tas de pathologies qu'on pourra reconnaître grâce à cette technique

Applications de l'ADN recombinant

