Les méthodes de génies génétiques permettent de :

* Faire synthétiser une enzyme par un autre organisme, par exemple, pour étudier ses effets.
* Réaliser des copies d’une séquence d’ADN.

Pour pouvoir étudier les effets d’une séquence d’ADN, il faut :

1. Isoler la séquence d’intérêt.
2. Créer un vecteur de clonage avec la séquence d’intérêt.
3. L’insérer dans un autre organisme.
4. Vérifier la présence de la séquence et sa réplication.

L’objectif du cours étant d’être capable d’élaborer un protocole pour étudier une séquence d’ADN particulière.

Banque introduction d’une multitude de fragments pour déterminer ultérieurement le gène d’intérêt.

Protéine de fusion combinaison de séquences de gènes pour former une protéine chimérique.

Les OGN sont interdits car il existe des risques probables pour la santé. Leur culture est interdite car les gènes d’OGN peuvent contaminer lors de fécondation avec des espèces non modifiées, par exemple lorsque les champs sont proches.

Attention les modifications post-traductionnelles des protéines eucaryotes ne sont pas réalisables dans les Bactéries.

### Type de vecteurs

Il existe des vecteurs différents optimisés en fonction du type de :

* Vecteur de clonage pour multiplier un vecteur dans des bactéries par exemple. (-T) optimisé pour un taq.
* Vecteur d’expression. Site

Taq laisse des adénines débordantes. Pas d’activité de vérification de la base incorporée.

## Fabrication d’un vecteur de clonage

Un vecteur (ou véhicule) de clonage est plasmide qui possède :

* un site d’origine de réplication qui permet la réplication autonome du vecteur càd indépendamment de la cellule.
* Un site de multiclonage (appelé aussi poly-linker ou MCS) est la zone d’intégration de la séquence d’intérêt. Elle contient plusieurs sites de restriction uniques. Une seule ouverture est possible par enzyme de restriction.

Très souvent, on ajoute :

* Un agent de sélection càd un caractère sélectif.
* Un promoteur en amont de MCS si on cherche à faire exprimer le gène.

Vecteur de clonage plasmide ayant reçu une séquence d’ADN extérieure.

Vecteur recombinant vecteur qui possède l’insert.

Caractère sélectif caractère exprimé par la cellule servant à identifier son génotype. Il s’agit souvent d’une résistance à un antibiotique.

Rmq : Chez les Bactéries, les plasmides confèrent un avantage mais ne sont pas indispensables à la survie.

NB : Le cours se limite à la présentation des plasmides. Ils sont capables d’accueillir des insertions ayant de maximum 10Kb

### Carte de restriction

Une carte de restriction permet de connaitre la structure du vecteur de clonage. Elle se présente sous la forme d’une cercle avec la position par rapport à une origine relative :

* Des sites de restriction des principales enzymes.
* De la séquence d’intérêt.

Pour la réaliser, il faut mesurer la taille et le nombre de fragments générés par chaque enzyme de restriction. Ces informations sont déterminées par électrophorèse.

L’analyse de l’hydrolyse du plasmide se fait par l’utilisation d’un contrôle par un plasmide non hydrolysé.

### Lier l’ADN

Une liaison entre deux extrémités d’ADN soit liée, il faut :

* Elles soient complémentaires.
* Utiliser une ligase, une enzyme qui fonctionne avec de l’ATP.

Pour que l’ADN ne se lie qu’entre les séquences désirées, il peut être utile de modifier les groupements phosphodiesters avec :

|  |  |
| --- | --- |
| Supprimer (phosphatase) | Ajouter (polynucléotide kinase) |

### Modifier les extrémités de l’ADN

L’extrémité cohésive de brins d’ADN peut être modifié par l’utilisation de :

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | Présence de dNTP | Absence de dNTP |
| ADN polymérase I | Complète 5’-3’ | Supprime 3’-5’ et 5’-3’ |
| Enzyme Klenow ou  ADN polymérase T4 | Complète 5’-3’ | Supprime 5’-3’ |

### Sens de l’insert dans le cas d’un clonage non orienté

Dans le cas de la ligation d’un insert non orienté. Il est possible de déterminer le sens d’insertion comparaison de résultats d’électrophorèse avec les tailles théoriques :

* Utilisant trois amorces dont deux s’hybridant avec l’insert à des endroits différents et une avec le vecteur pour réaliser une PCR. En fonction du sens d’insertion, l’analyse des résultats de PCR donneront. Sinon les deux amorces se situent sur le même brin et l’amplification ne peut pas avoir lieu.
* L’analyse de la taille des fragments d’une digestion avec des enzymes de restriction.

## Insérer le vecteur de clonage dans une cellule

Insert séquence d’ADN d’intérêt.

Transfection introduction d’un plasmide dans une cellule eucaryote.

Transformation introduction d’un plasmide dans une cellule procaryote notamment dans les bactéries.

Pour qu’un vecteur de clonage puisse entrer dans une cellule, il faut que cette dernière soit dans un état particulier, appelé état de compétence. Il peut être obtenu :

* Par électroporation càd par l’application d’un champs électrique.
* En le bombardant avec le vecteur de clonage.
* Par l’utilisation d’un autre organisme (virus).
* En l’insérant par une aiguille.
* Un choc thermique.
* Des produits chimiques.
* L’utilisation d’un complexe qui permet l’endocytose.

NB : Dans le cas d’un choc thermique ou de l’utilisation de produits chimique un seul plasmide peut entrer par bactérie. Le mécanisme qui permet cela est encore inconnu.

Deux contrôles sont à réaliser :

* Positif uniquement le vecteur recombinant.
* Négatif uniquement avec le vecteur vide.

Transmutation application d’un choc thermique ou électrique pour rendre instable la membrane et permettre l’entrée du vecteur dans la bactérie.

Transduction processus de transfert de gènes dans une cellule eucaryotes en utilisant un virus. Par opposition à la transfection qui s’effectue sans.

# Déterminer les cellules ayant reçu le vecteur

À l’issue de l’insertion du vecteur de clonage, toutes les cellules ne possèdent pas le vecteur recombinant. Pour détecter celles qui l’ont reçu, on peut :

* Utiliser des anticorps dirigés contre la protéine synthétisée par l’insert.
* En vérifiant la présence de la séquence avec une sonde qui possède des atomes radioactifs ou fluorescents.

## Déterminer les Bactéries ayant reçu la vecteur de clonage

Pour faciliter, l’identification des Bactéries qui ont obtenus reçu le vecteur recombinant, on peut ajouter au vecteur :

* Un gène de résistance qui confère à la bactérie la capacité de résisté à une molécule normalement délétères (par exemple, à la pénicilline).
* Un caractère sélectif sous contrôle du promoteur de clonage. Le MCS se trouve à l’intérieur du caractère. Si le vecteur est recombinant, la protéine produite est alors non fonctionnelle.

Les bactéries transformées sont diluées suffisamment pour que lorsque la solution est étalée sur le gel milieu de gélose, les bactéries forment des colonies distinctes. Elles sont ensuite cultivées dans une boîte de pétrie.

Important Une fois la transfection réalisée, il est nécessaire d’incuber les bactéries un certain temps après une transfection pour permettre au gène de résistance de s’exprimer avant la mise en présence du milieu de sélection. L’expression du gène de résistance empêche la réplication du plasmide.

Les contrôles à réaliser sont :

* Négatif. Une culture de la souche bactérienne sans vecteur pour vérifier qu’elles ne sont pas résistantes.
* Positif. Une culture avec la souche bactérienne dont la présence du vecteur vide est certifiée qui doivent être résistantes.

*Exemple : Un vecteur qui possède :*

* *Un inducteur Lacz qui produit une protéine qui transforme le galactose en un produit de couleur bleu. Le caractère sélectif est sous contrôle du promoteur de clonage.*
* *Un caractère sélectif de résistance à la pénicilline.*

*Si les Bactéries sont :*

* *sans plasmide, elle meure car elle ne possède pas le gène de résistance.*
* *blanches si elles possèdent le vecteur recombinant.*
* *Bleues si elles possèdent le vecteur vide.*

### Caractère sélectif X-Gal

Dans le cas de la présence du caractère sélectif X-gal, l’expression de la protéine de l’insert en même temps que l’ADN codant pour la protéine de sélection (x-Gal). Le substrat agissant comme facteur de transcription càd que la transcription de n’a lieu qu’en présence de X-Gal.

Le fait que l’ARN soit polycistronique (régulation génétique)