

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique

Université Mohamed Cherif Messaâdia
- Souk Ahras -

Faculté des Science de la Nature et de la Vie

Vice Doyen Chargé des Études et les Questions

Liées aux Étudiants



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة محمد الشريف مساعديّة

- سوق أهراس -

كلية علوم الطبيعة والحياة

نيابة العمادة المكلفة بالدراسات

و المسائل المتعلقة بالطلبة

Polycopié de cours

Matière

Génie Génétique

Élaboré par: Dr BOURAFA Nadjette

Maître de conférences A



Destiné aux étudiants de 3^{ème} Année Licence Biochimie - Filière Sciences Biologiques

Année universitaire: 2023/2024

sommaire

Sommaire

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Préface	
Chapitre 1 : Outils enzymatiques du génie génétique	
1. Outils enzymatiques du génie génétique	1
1.1. Les polymérase	1
1.2. Les nucléases	1
1.2.1. Les exonucléases	1
1.2.2. Les endonucléases	2
1.3. Les ligases	2
1.4. Enzymes de restriction/modification	3
1.4.1. Enzymes de restriction	3
1.4.2. Enzymes de modification	12
Chapitre 2 : Les systèmes hôtes-vecteurs et clonage moléculaire	
2. Les systèmes hôtes-vecteurs et clonage moléculaire	15
2.1. Systèmes hôtes-vecteurs	15
2.1.1. Eléments de transgène	15
2.1.2. Vecteurs de clonage :	17
2.1.2.1. Vecteurs plasmidiques	17
2.1.2.2. Vecteurs phagiques	20
2.1.2.3. Les cosmides	24
2.1.2.4. Chromosomes artificiels	25
2.1.2.4.1 Chromosome artificiel bactérien	25
2.1.2.4.2. Chromosome artificiel de levure (YAC)	28

2.1.2.4.3. Les HAC (Human Artificial Chromosomes)	32
2.1.3. Vecteurs de clonage et vecteurs d'expression	33
2.1.3.1. Vecteurs de clonage	33
2.1.3.2. Vecteurs d'expression	33
2.1.3.2.1. Clonage moléculaire	34
2.1.3.2.1.1. Les étapes de clonage	34
2.1.3.2.1.1.1. Construction du transgène	34
2.1.3.2.1.1.2. Transfert de transgène dans la cellule hôte	35
2.1.3.2.1.1.3. Sélection des recombinants	39
2.1.3.2.1.1.4. Analyse des recombinants	39
Chapitre 3 : Hybridation moléculaire, sondes et marquage de l'ADN	
3.1. Hybridation moléculaire	43
3.2. Propriétés physico-chimiques de l'ADN	45
3.2.1. Dissociation et réassociation des brins d'ADN	45
3.2.2. Contenu en bases et température de fusion	45
2.2.3. Absorption de la lumière ultraviolette à 260 nm	47
3.3. Sondes et marquage de l'ADN	48
3.3.1. Marquage des sondes	48
3.3.2. Types de sondes	49
3.3.3. Applications de l'hybridation moléculaire	49
Chapitre 4 : Techniques d'analyse du génome et de ses modifications	
4. Techniques d'analyse du génome et de ses modifications	51
4.1. Banques génomiques et d'ADNc	51
4.1.1. Banque génomique	51
4.1.1.1. Méthodes de construction d'une banque d'ADN génomiques	51
4.1.1.2. Banque d'ADNc : ADNc (ADN complémentaire)	53

4.1.1.2.1. Méthodes de construction d'une banque d'ADNc	53
4.1.2. Technique d'électrophorèse sur gel d'agarose	61
4.2. PCR quantitative (ou qPCR ou PCR en temps réel)	63
Chapitre 5 : Détermination des séquences des acides nucléiques, banques d'ADN génomique et d'ADNc	
5.1. Séquençage	68
5.1.1. Méthode de Sanger	68
5.1.2. Méthode de Séquençage automatisé	73
5.2. Banques génomiques et d'ADNc	79
5.2.1. Banque génomique	79
5.2.1.1. Méthodes de construction d'une banque d'ADN génomiques	79
5.2.1.2. Banque d'ADNc : ADNc (ADN complémentaire)	81
5.2.1.2.1. Méthodes de construction d'une banque d'ADNc	82
Chapitre 6 : Techniques d'analyse de l'expression des gènes	
6.1. Techniques d'analyses de l'expression des gènes	88
6.1.1. Northern blot	88
6.1.2. RT-PCR (reverse transcriptase polymérase chaine réaction)	89
6.1.3. Gènes rapporteurs « gène reporter »	90
6.1.4. Technique de Run-on	91
6.1.5. Technique d'identification de la région régulatrice du promoteur	91
6.1.5.1. Technique de Retard sur gel	94
6.1.5.2. Empreinte à la DNase - foot-printing	94
Chapitre 7 : Applications biotechnologiques de l'ADN recombinant	
7. Applications biotechnologiques de l'ADN recombinant	99
7.1. Protéines recombinantes	99
7.2. La production de protéines thérapeutiques	99
7.3. Production de protéine recombinante par <i>E. coli</i>	100

7.4. Production de protéine recombinante par <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	103
7.5. Autres applications biotechnologiques de l'ADN recombinant	104
7.5.1 Améliorations agronomiques et environnementales	104
7.5.2. L'alimentation	105
7.5.3. L'industrie	106
7.6. Utilisation de la bactérie <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	107
Références bibliographiques	110

Liste des figures

N°	Titre	Page
1.1	Clivage d'un fragment d'ADN par une enzyme de restriction.	3
1.2	Les deux types d'endonucléases	5
1.3	Système de restriction	6
1.4	Système de méthylation	13
2.1	Eléments de transgène	15
2.2	Marqueurs de sélection des plasmides bactériens	19
2.3	Plages de lyse	24
2.4	Principales caractéristiques d'un chromosome artificiel bactérien (BAC)	26
2.5	Schéma général du Protocol d'intégration de l'insert dans un vecteur BAC	27
2.6	Carte d'un plasmide YAC	30
2.7	Procédure d'obtention de protoplastes	37
2.8	Micro-injection des gènes dans le pronucléus mâle d'un ovocyte de lapin	38
3.1	Hybridation des nucléotides	43
3.2	Principe de l'hybridation moléculaire	44
3.3	Représentation simplifiée de la dissociation-réassociation de l'ADN sous l'action d'agents dénaturants	45
3.4	Droite reliant teneur en G+C et Tm de divers organismes	46
3.5	Représentation simplifiée du processus de dissociation	47
4.1	Les principales étapes de clonage	52
4.2	Synthèse d'un ADN complémentaire à partir d'un ARNm polyadénylé	55
4.3	Addition d'adaptateurs à des fragments d'ADN à bords francs et production d'un ADN à bords décalés	56
4.4	Thermocycleur	59
4.5	Hybridation des amorces	60
4.6	Amplification sélective in vitro (PCR)	61
4.7	Électrophorèse sur gel d'agarose	62
4.8	Gel d'agarose des produits de PCR	63
4.9	PCR en temps réel	65
4.10	Courbe de la PCR en temps réel	65
5.1	Structure de dNTP et ddTTP	69
5.2	Formation de la liaison phosphodiester	69
5.3	Séquençage de l'ADN selon Sanger	70
5.4	Principe du séquençage de l'ADN selon la méthode de Sanger	72
5.5	Plaque de PCR 96 puits –Thermocycleur	75
5.6	Elongation de la chaîne d'ADN	76
5.7	Migration des fragments par l'électrophorèse capillaire de séquenceur automatisé	77
5.8	Résultat de séquençage	78
5.9	Les principales étapes de clonage	80
5.10	Synthèse d'un ADN complémentaire à partir d'un ARNm polyadénylé	83
5.11	Addition d'adaptateurs à des fragments d'ADN à bords francs et production d'un ADN à bords décalés.	84
6.1	Schéma de principe du Northern blot	89
6.2	Analyse par retard sur gel	93

6.3	Empreinte à la DNase - foot-printing	95
6.4	Détection des sites de liaison des protéines sur l'ADN par la technique de « foot printing »	96
6.5	Technique d'empreinte à la DNase « footprinting »	97
7.1	Molécule de Pro-insuline	100
7.2	Molécule d'insuline humaine	101

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
1.1	Exemple de quelques endo-nucléases et leurs origines	6
1.2	Sites de reconnaissance et de clivage de quelques enzymes de restriction	8
2.1	Vecteur de clonage	32
4.1	Composition du mélange réactionnel pour la PCR standard	58
4.2	Composition du mélange réactionnel pour PCR en temps réel	64
5.1	Composition du mélange réactionnel pour la PCR dyeterminator	74

Préface

Le génie génétique, une discipline fascinante située à l'intersection de la biologie et de la technologie, a révolutionné notre compréhension de la vie et ouvert de nouvelles perspectives pour les applications biotechnologiques. Cette science émergente repose sur des outils et des techniques puissants qui permettent la manipulation précise de l'ADN, le matériel génétique fondamental qui régit le fonctionnement des êtres vivants.

Le génie génétique est une transformation artificielle du patrimoine génétique, qui peut comprendre : les recombinaisons génétiques, le clonage, les fusions cellulaires, et l'induction ou la répression d'un ou des gènes. En effet, [l'universalité du code génétique](#) a rendu possible les transferts des gènes entre espèces différentes, voire entre règnes différents.

Le génie génétique peut s'appliquer aux végétaux, aux animaux et aux micro-organismes. L'organisme obtenu est qualifié de “ génétiquement modifié ” (OGM).

Ce polycopié de cours est conçu pour vous guider à travers les principaux aspects du génie génétique et vous présenter les outils et les techniques clés utilisés dans ce domaine. Nous explorerons les multiples facettes de cette discipline, des outils enzymatiques essentiels aux applications biotechnologiques de l'ADN recombinant.

Au cœur du génie génétique se trouvent les outils enzymatiques qui permettent de manipuler l'ADN de manière précise et ciblée. Les polymérases, les nucléases, les ligases et les enzymes de restriction/modification jouent des rôles essentiels dans la synthèse, la coupe, la ligature et la modification des séquences d'ADN. Leur compréhension et leur utilisation sont cruciales pour créer des constructions génétiques spécifiques et ouvrir de nouvelles perspectives de recherche.

Les systèmes hôtes-vecteurs et le clonage moléculaire sont des techniques

fondamentales en génie génétique. Ils permettent l'amplification de fragments d'ADN spécifiques et la création de banques génomiques et d'ADN complémentaire (ADNc). Ces banques sont des réservoirs précieux de matériel génétique qui peuvent être explorés pour étudier les gènes, les régions génomiques et les séquences régulatrices.

L'hybridation moléculaire, les sondes et le marquage de l'ADN sont des outils essentiels pour détecter et localiser des séquences spécifiques d'ADN. Qu'il s'agisse du marquage radioactif ou fluorescent, ces techniques permettent d'explorer la structure et la fonction des gènes et d'ouvrir de nouvelles perspectives pour l'analyse de l'ADN.

Les techniques d'analyse du génome et de ses modifications, telles que l'amplification génique par PCR et les puces à ADN, ont révolutionné notre capacité à étudier et à comprendre la complexité du génome. Ces techniques permettent de détecter les variations génomiques, d'amplifier sélectivement des séquences d'ADN spécifiques et d'analyser l'expression des gènes à grande échelle.

La détermination des séquences des acides nucléiques est devenue plus rapide et plus précise grâce aux avancées technologiques. Les banques d'ADN génomique et d'ADNc sont des ressources précieuses pour l'exploration de la diversité génétique et la compréhension des mécanismes génétiques sous-jacents à la santé et à la maladie.

Les techniques d'analyse de l'expression des gènes nous permettent de comprendre comment les gènes sont régulés et comment ils interagissent avec leur environnement. Des méthodes telles que le Northern-blot, le run-on, la RT-PCR et les gènes reporters offrent des outils puissants pour étudier l'expression des gènes et les mécanismes moléculaires qui les régulent.

Enfin, les applications biotechnologiques de l'ADN recombinant ouvrent des perspectives passionnantes dans de nombreux domaines. De la production de

protéines recombinantes à des fins thérapeutiques, telles que l'insuline, l'hormone de croissance et l'interféron, à l'utilisation de puces à ADN pour le diagnostic et le suivi des maladies, le génie génétique a un impact profond sur la médecine, l'agriculture et l'industrie.

Ce polycopié de cours vous guidera à travers ces différents aspects du génie génétique, vous fournissant une base solide de connaissances et vous inspirant à explorer les possibilités infinies de cette discipline en constante évolution.

Préparez-vous à plonger dans le monde fascinant du génie génétique et à découvrir comment la manipulation de l'ADN peut façonner l'avenir de la biotechnologie.

Chapitre 1

Outils enzymatiques du génie génétique

1. Outils enzymatiques du génie génétique

1.1. Les polymérases :

- ❑ **La Taq polymérase** : extraite à partir d'une bactérie *Thermus aquaticus*, active à 70°C, utilisée dans la technique de polymérisation en chaîne (PCR – Polymerase chain reaction), en vue d'une amplification de l'ADN in vitro.

NB :

- L'ADN polymérase intervient in vivo dans la réplication de l'ADN au cours du cycle cellulaire.
- ❑ **L'ARN polymérase** : transcrit l'un des deux brins de l'ADN en ARN.
- ❑ **La Transcriptase réverse** : transcrit l'ARN en ADN complémentaire (ADNc)

La transcriptase inverse (ou reverse) est une enzyme isolée des rétrovirus est capable de catalyser la synthèse d'une chaîne d'ADN à partir d'une matrice d'ARN

1.2. Les nucléases :

1.2.1. Les exonucléases

Les exonucléases digèrent l'ADN à partir de l'extrémité 5' ou 3'.

- **Nucléase S1** : la nucléase S1 d'*Aspergillus oryzae* dégrade principalement l'ADN simple brin et l'ARN. On l'utilise par exemple lorsqu'on veut réduire la taille d'un fragment d'ADN en l'attaquant par ses extrémités.
- **Exonucléase III** : l'exonucléase III d'*Escherichia coli* qui retire les nucléotides aux extrémités des duplex d'ADN.
- **Exonucléase du bacteriophage 1** : L'exonucléase du bacteriophage 1 permet, au contraire, une excision en 5'

1.2.2. Les endonucléases :

- **DNase I** : l'ADNase I est une endonucléase qui coupe l'ADN double ou simple brin. l'ADNase I du pancréas de boeuf, n'attaquent que l'ADN . Cette enzyme coupe l'ADN double brin par entaille simultanée des deux chaînes en donnant des bouts francs. On l'utilise par exemple lorsqu'on veut éliminer l'ADN d'une solution.
- **ARNase H** : l'ARNase H n'attaque que l'ARN(sert à éliminer la chaîne d'ARN après la synthèse du cDNA sous l'action de la transcriptase reverse).
- **DNase de restriction (ou enzyme de restriction)** : elles coupent l'ADN à l'intérieur en cassant les liaisons phosphodiester, certains types d'endonucléases de restriction coupent particulièrement au niveau de **sites spécifiques** appelés « sites de restrictions ».

1.3. Les ligases :

- Les ligases catalysent la liaison phosphodiester entre des extrémités 3' et 5' adjacentes
- Elles ont pour fonction de réparer les coupures dans les fragments d'ADN par l'établissement des liaisons phosphodiester covalentes entre les brins adjacents. C'est une enzyme capitale puisqu'elle permet la construction de molécules d'ADN recombinées

Les plus utilisées sont l'ADN ligase *d'Escherichia coli* et celle du bactériophage T4:

La ligase *d'Escherichia coli* ne soude avec efficacité que des doubles chaînes possédant un brin collant complémentaire et permet donc de lier les ADN coupés par une même enzyme telle que *Eco RI*, *Bam HI*, *Cla I*, *Bgl II* ou *Sal I*. Par contre, celle de T4 est utilisable pour la ligation de molécules à bouts francs obtenues avec des endonucléases de restriction qui cassent l'ADN sans donner des extrémités monobrins cohésives ou résultant d'une rupture mécanique (par simple agitation dans un mixeur).

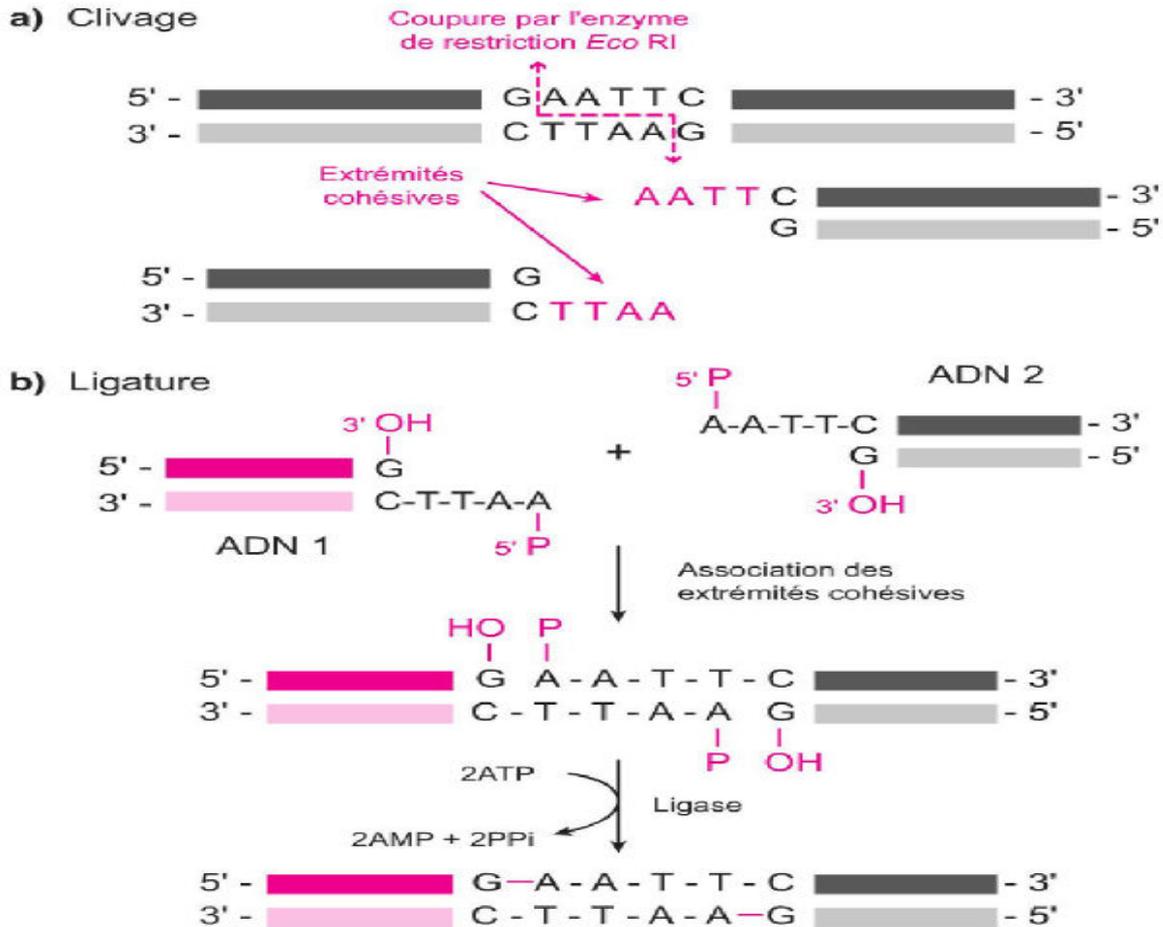


Figure 1.1. Clivage d'un fragment d'ADN par une enzyme de restriction.

Les extrémities monocaténares générées par le clivage (a) peuvent s'associer avec un autre fragment d'ADN (b) produit par la même enzyme de restriction, puis la ligase établit des liaisons covalentes entre les brins adjacents.

1.4. Enzymes de restriction/modification

1.4.1. Enzymes de restriction

Enzymes de restriction : molécules extraites à partir de microorganismes (généralement des bactéries) et qui coupent les liaisons phosphodiester.

Les enzymes de restriction sont des endonucléases permettent de couper l'ADN dans des endroits bien précis. Ces enzymes sont susceptibles de couper la molécule d'ADN à de multiples reprises.

Les **enzymes de restriction** protègent l'ADN de l'hôte en détruisant l'ADN de phages après sa pénétration.

Types d'enzymes de restriction :

Il existe trois types d'enzymes de restriction. Les enzymes de **type I et III** ne sont pas utilisées en pratique, car elles coupent l'ADN de façon aléatoire.

Les enzymes de restriction **de type II**, clivent spécifiquement les deux brins d'ADN au niveau d'une séquence bien définie. Elles ont la particularité de reconnaître et de couper des séquences palindromiques.

Séquences palindromiques

Les enzymes de restriction reconnaissent en général une séquence **palindromique** dont les **deux brins possèdent la même séquence** de 4, 6 ou 8 bases, **mais dans une orientation antiparallèle**. Le **clivage intervient entre des bases bien définies** de cette séquence.

Sens de lecture

5' ATGCTA.TAGCAT 3'

3' TACGAT.ATCGTA 5'

Sens de lecture

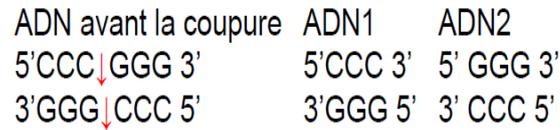
La séquence **palindromique** se lit de la même façon dans les deux sens par rapport à un point central soit sur le même brin (exemple : ATTGC.CGTTA), soit sur les deux brins

▣ Types des extrémités générées

Il y a deux catégories d'endonucléases : celles qui donnent des **extrémités franches** et celles qui donnent **des extrémités cohésives**

- **Extrémités franches** : la coupure d'une molécule d'ADN peut se faire au milieu du palindrome soit une coupure franche c'est-à-dire **au même niveau sur les deux brins** (bouts

francs : la coupure a lieu au milieu du site de restriction). Il ne peut pas y avoir de liaison spontanée entre les fragments qui ont résulté de cette coupure. Seule une **ligase** peut rétablir la ligation des deux brins d'ADN résultant de la coupure.



- **Extrémités cohésives (adhésives)/ bouts collants** : d'autres types d'enzymes agissent en coupant de part et d'autre du centre de symétrie, soit une coupure décalée sur les deux brins. On parlera alors d'extrémités cohésives; ce sont des bouts collants ou bouts cohésifs.

Les parties simples brins peuvent s'apparier, d'où la possibilité de lier des fragments d'ADN d'origine différentes : c'est le phénomène de la recombinaison génétique.

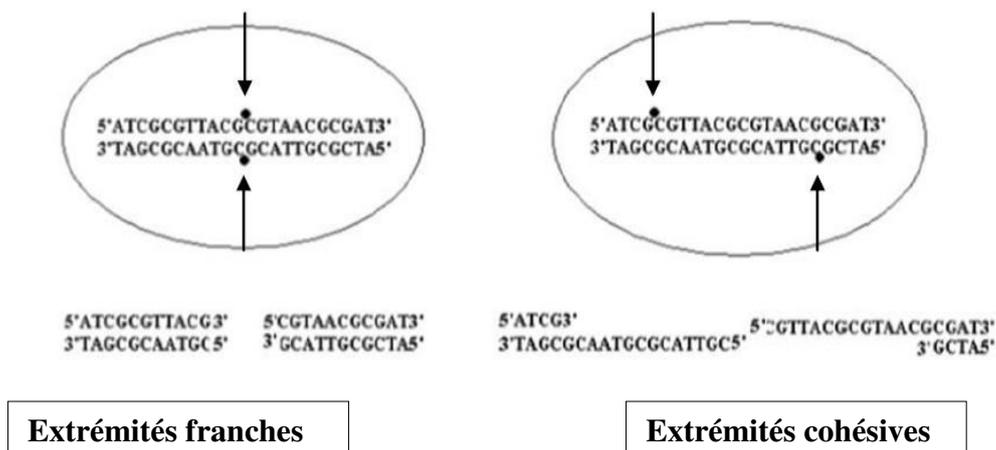


Figure 1.2. Les deux types d'endonucléases

Tableau 1.1 : Exemple de quelques endo-nucléases et leurs origines

Enzyme	microorganisme	SITE DE RESTRICTION
<i>EcoRI</i>	<i>Echerichia coli</i>	\downarrow GAATTC CTTAAG \uparrow
<i>EcoRII</i>	<i>Echerichia coli</i>	\downarrow GCCTGGC CGGACCG \uparrow
<i>PstI</i>	<i>Providentia stuartii</i>	\downarrow CTGCAG GACGTC \uparrow
<i>HindIII</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	\downarrow AAGCTT TTCGAA \uparrow

RESTRICTION

5' - GAATTC - 3'
3' - CTTAAG - 5'

EcoRI RESTRICTION
ENZYME CUTS DNA

Coupure

5' - G | AATTC - 3'
3' - CTTAA | G - 5'

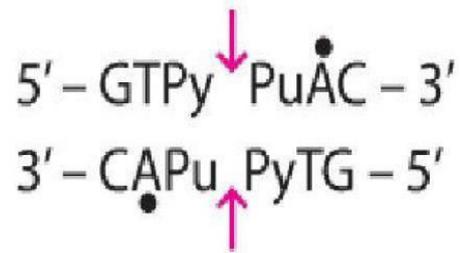
Figure 1.3. Système de restriction

Les enzymes de restriction de type II ont la particularité de reconnaître et de couper des séquences palindromiques.

Les séquences reconnues par les enzymes de restriction ont le plus souvent des palindromes de **quatre à huit nucléotides** à symétrie inversée ; c'est-à-dire que la séquence du premier brin (lue dans le sens 5'→3') **est la même que celle du** deuxième brin (toujours lue dans le sens 5'→3').

La première enzyme de restriction à site de coupure spécifique fut découverte par Hamilton Smith en 1970. Elle a été extraite de la bactérie *Haemophilus influenzae* et nommée HindII.

C'est une enzyme qui reconnaît la séquence :



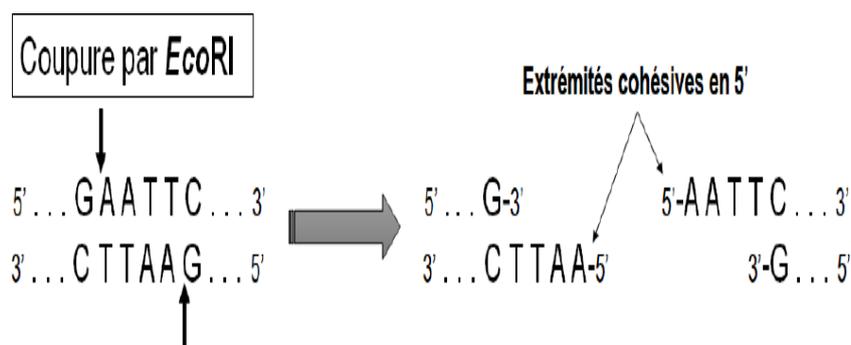
(Py : pyrimidine ; Pu : purine; • l'adénine est méthylée)

Elle coupe l'ADN aux sites indiqués par les flèches, produisant des extrémités à bords francs.

Extrémités cohésives en 5' et extrémités cohésives en 3'

▣ Extrémités cohésives en 5'

L'enzyme de restriction *EcoRI* reconnaît spécifiquement une séquence GAATTC et coupe l'ADN entre G et A. Ceci produit des fragments dans lesquels les extrémités 5' portent un prolongement monocaténaire, il s'agit d'**extrémités cohésives en 5'** :



Extrémités cohésives en 3'

De même, l'enzyme de restriction *Pst* I reconnaît spécifiquement une séquence CTGCAG et coupe l'ADN entre A et G. Cette fois-ci, les fragments générés portent un prolongement monocaténaire à leurs extrémités 3'. On parle alors d'*extrémités cohésives en 3'* :

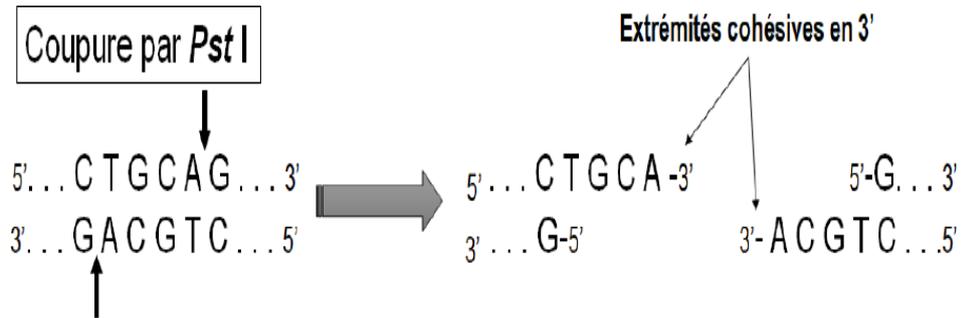


Tableau 1.2 : Sites de reconnaissance et de clivage de quelques enzymes de restriction

Enz.	Organisme d'origine	Site de restriction	Nature des extrémités	Taille du site (pb)
<i>Hae</i> III	<i>Haemophilus aegyptius</i>	$5' - \text{GG} \downarrow \text{CC} - 3'$ $3' - \text{CC} \uparrow \text{GG} - 5'$	Bouts francs	4
<i>Taq</i> I	<i>Thermus aquaticus</i>	$5' - \text{T} \downarrow \text{CGA} - 3'$ $3' - \text{AGC} \uparrow \text{T} - 5'$	Bouts cohésifs 5' monocaténaire	4
<i>Hha</i> I	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	$5' - \text{GCG} \downarrow \text{C} - 3'$ $3' - \text{C} \uparrow \text{GCG} - 5'$	Bouts cohésifs 3' monocaténaire	4
<i>Eco</i> RV	<i>Escherichia coli</i>	$5' - \text{GAT} \downarrow \text{ATC} - 3'$ $3' - \text{CTA} \uparrow \text{TAG} - 5'$	Bouts francs	6
<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	$5' - \text{G} \downarrow \text{GATCC} - 3'$ $3' - \text{CCTAG} \uparrow \text{G} - 5'$	Bouts cohésifs 5' monocaténaire	6
<i>Pst</i> I	<i>Providencia stuartii</i>	$5' - \text{CTGCA} \downarrow \text{G} - 3'$ $3' - \text{G} \uparrow \text{ACGTC} - 5'$	Bouts cohésifs 3' monocaténaire	6
<i>Eco</i> RII	<i>Escherichia coli</i>	$5' - \text{G} \downarrow \text{CCTGGC} - 3'$ $3' - \text{CGGACC} \uparrow \text{G} - 5'$	Bouts cohésifs 5' monocaténaire	7
<i>Not</i> I	<i>Nocardia otiditis cavarium</i>	$5' - \text{GC} \downarrow \text{GGCCGC} - 3'$ $3' - \text{CGCCGG} \uparrow \text{CG} - 5'$	Bouts cohésifs 5' monocaténaire	8

Nomenclature des enzymes de restriction

Cette nomenclature dépend de règles spécifiques qui tiennent compte de la bactérie dont a été isolée l'enzyme de restriction :

Exemple : **EcoRI**

- La première lettre, en majuscule, représente l'initiale du genre bactérien
- Les deux lettres, minuscules, qui suivent la première sont représentatives de l'espèce.
- La dernière lettre majuscule n'est pas obligatoire pour toutes les endonucléases de restriction. Elle est représentative de la souche de la bactérie d'où l'enzyme a été isolée.
- Le chiffre romain qui suit ces trois lettres est le numéro d'ordre de découverte de l'enzyme pour la même bactérie source (exemple : EcoRI, EcoRII...).

Les enzymes :

EcoR I : première enzyme isolée chez *Escherichia coli* Ry13.

EcoR V : cinquième enzyme isolée chez *Escherichia coli* Ry13.

Les isoschizomères

Les isoschizomères (du grec «iso»: égal, et «skhizein»: fendre ou couper) sont des enzymes de restriction qui proviennent de sources bactériennes différentes (et qui portent donc des noms différents), mais elles coupent l'ADN au niveau d'un même site de restriction.

Par exemple, *MboI* et *Sau3A* reconnaissent la même séquence de quatre nucléotides, 5'-GATC-3'. La séquence **est clivée sur les deux brins à la même position**, du côté 5' de G.

Les enzymes compatibles

BamHI n'est pas un isoschizomère de *Sau3A*. *BamHI* il reconnaît la séquence hexanucléotidique 5' GGATCC 3'. IL clive entre les deux G, produisant des extrémités 5' cohésives qui peuvent s'apparier avec les fragments produits par *Sau3A*.

On dit que *Bam*HI et *Sau*3A sont des **enzymes compatibles**, car bien que ne reconnaissant pas la même séquence palindromique, elles **gènèrent des fragments à extrémités cohésives complémentaires** :

Enzymes compatibles

Cartes de restriction:

Les enzymes de restriction constituent un outil très intéressant permettant de dresser des cartes de molécules d'ADN de plusieurs milliers de paires de bases. Ces enzymes n'agissent que sur leurs sites spécifiques et produisent une série de fragments individuellement distincts.

Les produits de restriction forment une collection particulière de fragments d'ADN de différentes tailles qu'il est possible de séparer par électrophorèse.

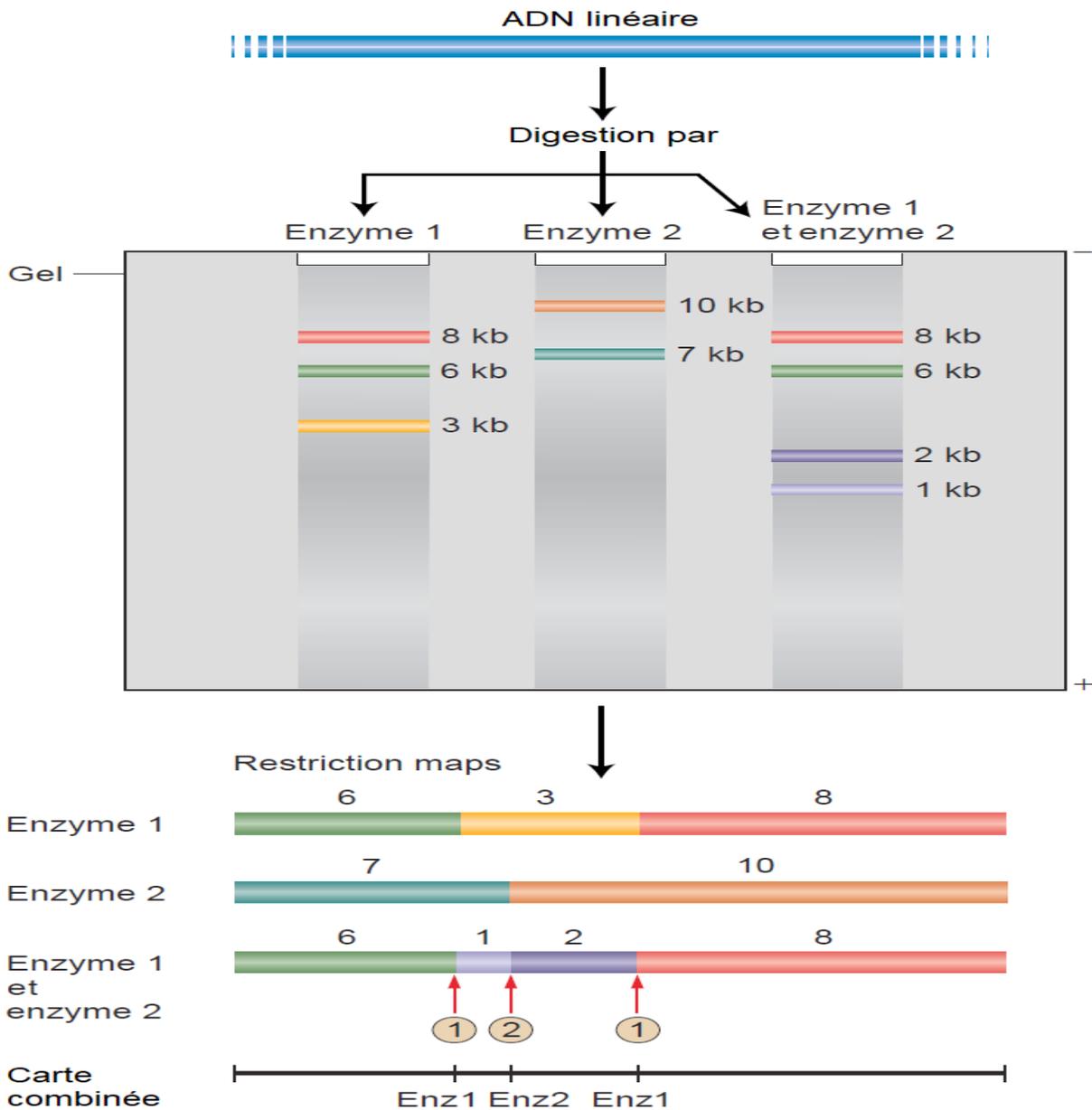
La taille des fragments produits par digestion avec une enzyme déterminée correspond exactement à la distance qui sépare les sites spécifiques de cette enzyme.

L'analyse par électrophorèse en gel d'agarose ou de polyacrylamide de fragments produits par plusieurs enzymes, utilisées séparément ou de façon combinée, permet de déterminer l'ordre des fragments dans la molécule originale.

En pratique, l'ADN à étudier est réparti en différentes fractions. Chaque fraction est traitée par une enzyme de restriction ou un couple d'enzymes de restriction

Ainsi dans l'illustration ci-dessous (électrophorèse en gel d'agarose):

Dans le puits 1, on dépose l'ADN digéré par l'enzyme 1 seule; dans le puits 2, on dépose l'ADN digéré par l'enzyme 2 seule et dans le puits 3, l'ADN digéré par les enzymes 1 et 2.



1.4.2. Enzymes de modification

Pour éviter une **autodestruction de leur propre ADN**, les bactéries se protègent contre leurs **propres enzymes de restriction** par une modification des sites de restriction correspondants.

Donc afin de protéger l'ADN bactérien de l'hydrolyse par les enzymes de restriction, une méthylase, codée par le gène de méthylation, va modifier les nucléotides de l'ADN bactérien en les méthylant pour qu'ils ne soient plus reconnus par l'enzyme de restriction.

Les méthylases bactériennes sont très spécifiques, ces enzymes reconnaissent les mêmes sites que les endonucléases de restriction.

Les ADN bactériens sont méthylés sur le C5 de certaines Cytosines et sur le N7 de quelques Adénines des sites de restriction.

La méthylation peut se réaliser sur une base ou sur plusieurs bases appartenant au site de restriction. La méthylation aboutit ainsi à une inactivation de l'enzyme de restriction correspondante.

Donc ces enzymes de méthylation participent à un mécanisme de défense des bactéries.

Nomenclature des enzymes de méthylation

La nomenclature des enzymes de méthylation ne diffère de celle des endonucléases de restriction que par l'ajout d'une lettre M au début du nom : M. EcoR I.

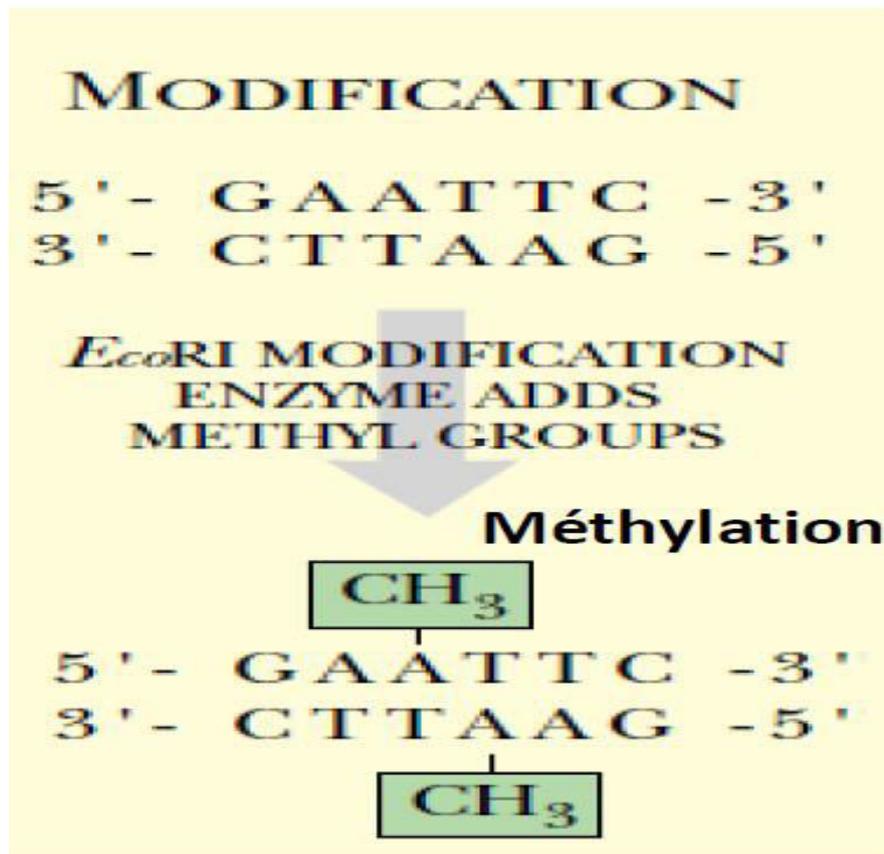


Figure 1.4. Système de méthylation

Chapitre 2

Les systèmes hôtes-vecteurs et clonage
moléculaire

2. Les systèmes hôtes-vecteurs et clonage moléculaire

2.1. Systèmes hôtes-vecteurs

Grâce au génie génétique il est possible de fournir à une cellule une information génétique totalement nouvelle qui n'appartient pas à l'espèce.

Le gène d'intérêt introduit dans la cellule receveuse est inclus dans une **construction génétique**, appelée "**transgène**", qui est formée de différents **éléments fonctionnels** (Figure 2.1). L'introduction de ce transgène dans la cellule receveuse est dénommée transgénèse ou clonage.

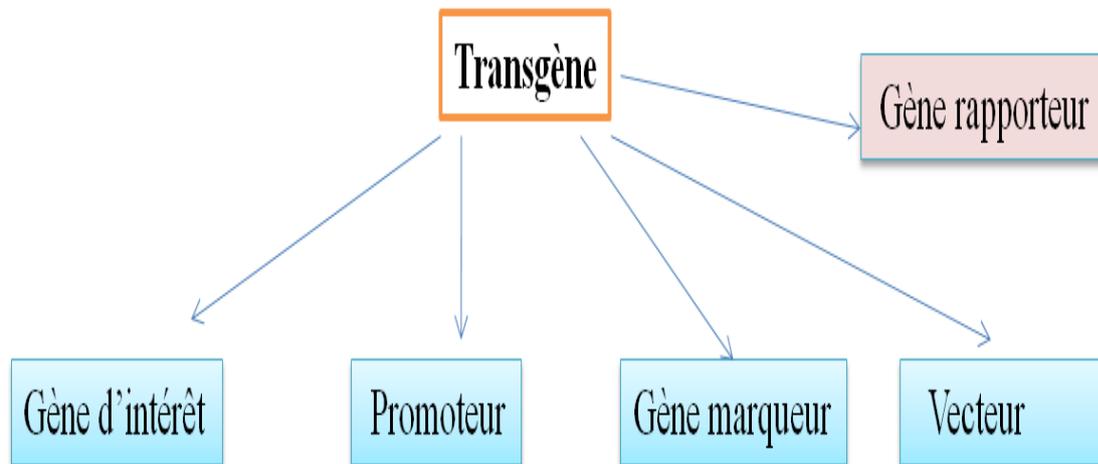


Figure 2.1. Eléments de transgène

2.1.1. Eléments de transgène

- Le **gène d'intérêt**, qui code pour le caractère qu'on cherche à donner à l'OGM (les gènes d'intérêt peuvent eux-mêmes être modifiés, voire synthétisés). Le gène d'intérêt est également dénommé insert.
- Un **promoteur**, c'est une séquence d'ADN situé en amont de la partie transcrite du gène, et qui permet l'initiation de la lecture de l'information porté par le ou les gènes d'intérêts.

Les promoteurs utilisés en génie génétique doivent être puissants. En effet, chaque cellule possède des promoteurs faibles de transcription de gènes codant pour des molécules requises en faible quantité par la cellule et des promoteurs forts pour des substances qui devront être produites en quantité importantes. Il est possible d'augmenter la puissance du promoteur par l'introduction de modifications dans la séquence promotrice. Il est possible alors d'obtenir dans certains cas une efficacité de transcription multipliée par un facteur de 10. Le gène de la protéine à exprimer doit donc être cloné de telle sorte que sa transcription soit sous la dépendance de ce promoteur (de grande capacité de transcription).

- un **gène marqueur** ou **gène de sélection**, qui est utilisé pour sélectionner les cellules cibles ayant intégré le transgène. L'utilisation d'un gène de résistance aux antibiotiques permet de sélectionner les cellules qui ont reçu le vecteur après transformation ou transfection.

Nb : Le processus d'intégration de l'ADN étranger est appelé **Transformation** dans le cas des bactéries et **Transfection** pour les eucaryotes, car la transformation des cellules de mammifère désigne habituellement la conversion en cellules malignes (tumoraux, cancéreuses). L'exemple le plus connu de l'application de cette caractéristique en biotechnologie est la production des anticorps monoclonaux.

- Un **vecteur** qui assure le transport et la réplique des gènes d'intérêt. Un vecteur de clonage est une petite molécule d'ADN qui possède les propriétés suivantes : pouvoir se répliquer dans une cellule hôte (généralement des bactéries), fortement amplifiable, possède des sites de restriction permettant d'introduire le fragment d'ADN à cloner, posséder un marqueur de sélection
- **Le gène rapporteur** : le gène rapporteur permet de visualiser l'expression du gène d'intérêt

2.1.2. Vecteurs de clonage :

On obtient l'ADN recombinant en insérant un fragment d'ADN étranger dans un vecteur de clonage. Un vecteur de clonage est indispensable pour assurer le **transport** et la **réplication** des gènes d'intérêt.

Un vecteur de clonage est constitué d'une molécule d'ADN capable de se répliquer de façon autonome. En règle générale, les vecteurs sont de petite taille, et se répliquent de façon efficace en produisant de nombreuses copies du fragment d'ADN inséré. Il existe de nombreux vecteurs de clonage, et le choix s'effectue selon la taille du fragment à cloner et la cellule dans laquelle il sera transféré. Les vecteurs les plus utilisés sont les plasmides, les bactériophages et leurs dérivés.

- **Un vecteur de clonage typique comporte :**

- ✓ une **origine de réplication** pour assurer la multiplication autonome du vecteur ;
- ✓ une petite région contenant de nombreux **sites uniques** de restriction, appelée région à **site multiple de clonage (SMC)** ou «polylinker» qui offre diverses possibilités de clivage par des enzymes de restriction et de clonage d'un fragment d'ADN étranger, sans affecter l'autoréplication du plasmide;
- ✓ un ou deux marqueurs de sélection : ce sont le plus souvent des gènes de résistance à des antibiotiques (Ampicilline, Streptomycine, Tétracycline.....) qui permettent la sélection des cellules transformées (les cellules transformées sont celle qui ont reçu le vecteur) ;

2.1.2.1. Vecteurs plasmidiques

- Les plasmides sont des fragments d'ADN bicaténaires extra chromosomiques circulaires, capables de s'autorépliquer indépendamment du chromosome bactérien, et peuvent se transférer d'une bactérie à l'autre surtout par conjugaison.
- Les plasmides diffèrent également par leur taille comprise entre 5 et 400 kpb. Ils **portent des gènes** qui ne sont pas habituellement présents sur le chromosome bactérien : **gènes de résistance aux antibiotiques, gènes codant des toxines (bactériocines, etc.)**.

- Les plasmides constituent le véhicule idéal pour introduire dans les bactéries des **gènes non bactériens** grâce aux techniques de clonage moléculaire. Les vecteurs plasmidiques les plus couramment utilisés dérivent de plasmides naturels, préalablement modifiés pour faciliter leur utilisation comme outils de clonage. Les plasmides peuvent insérer jusqu'au **10kb**

- Les plasmides sont facilement transférables par **transformation** ou par **électroporation**. L'**électroporation**, appelée aussi électroperméabilisation, est une technique microbiologique qui **consiste à appliquer un champ électrique sur les membranes cellulaires qui sont ainsi déstabilisées**, ce qui augmente la perméabilité membranaire.

- Il est très utile d'utiliser des **plasmides qui portent des gènes de résistance**. Par exemple le plasmide pBR322, possède deux gènes de résistances aux antibiotiques : l'un pour l'ampicilline, l'autre pour la tétracycline, l'expression de l'un de ces deux gènes facilite la sélection des clones recombinants. Ce plasmide constitué de 4361 paires de bases, dont la séquence nucléotidique est complètement connue. Il est maintenu de façon stable dans son hôte à un niveau voisin de 20 à 30 copies par cellule.

- Dans certains vecteurs (ex : pPBR322, Fig.5) **les gènes de résistance aux antibiotiques possèdent eux-mêmes un répertoire intéressant de sites de clonage** (sites de coupure par des endonucléases). L'interruption de la séquence du gène entraîne la perte de l'activité de la protéine conférant la résistance à l'antibiotique. La sélection des clones recombinants exploite les changements de sensibilité-résistance aux antibiotiques qui résultent du clonage.

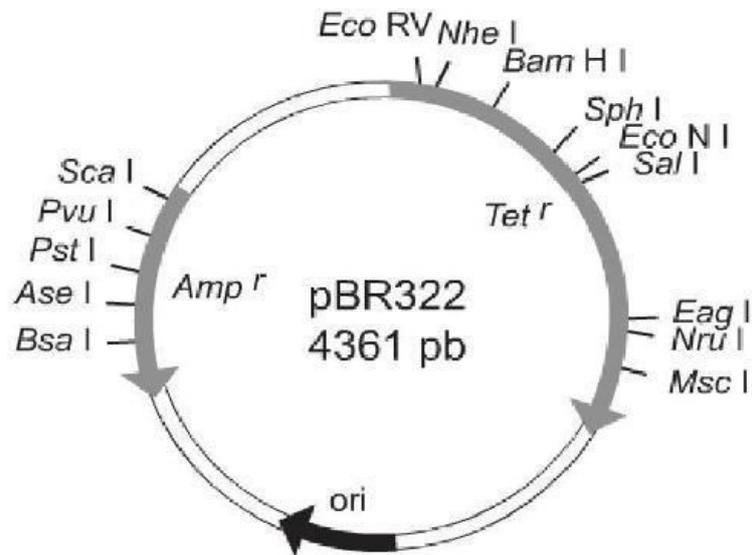
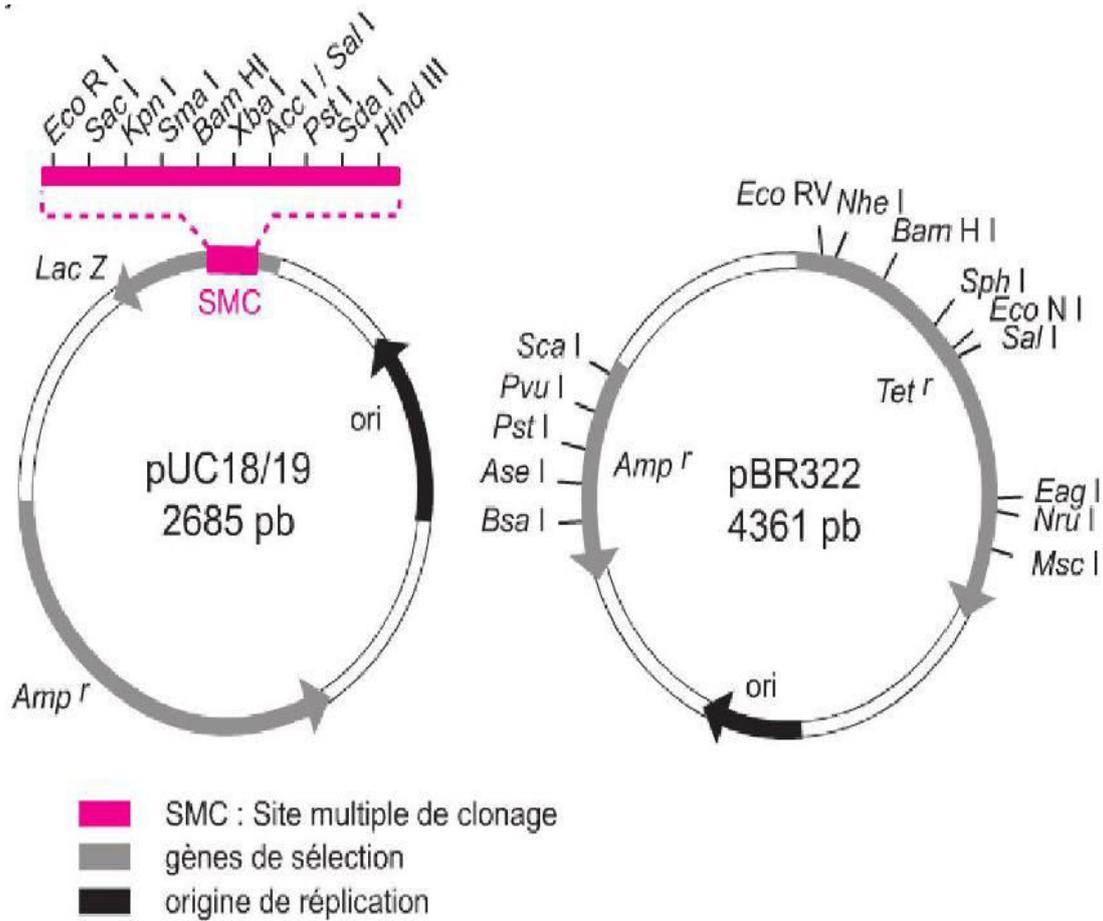


Figure 2.2. Marqueurs de sélection des plasmides bactériens.

Si un site de restriction présent dans la séquence des gènes Amp^r ou Tet^r est utilisé pour le clonage. Dans ce cas, la bactérie transformée sera sensible à l'ampicilline et résistante à la tétracycline ou l'inverse.

Exemples des plasmides bactériens :



Principales caractéristiques des plasmides bactériens. Le gène de résistance à l'ampicilline (Amp^r) permet de sélectionner les bactéries transformées par pUC18/19. C'est également le cas avec le plasmide pBR322, sauf si un site de restriction présent dans la séquence des gènes Amp^r ou Tet^r est utilisé pour le clonage. Dans ce cas, la bactérie transformée sera sensible à l'ampicilline et résistante à la tétracycline ou l'inverse.

2.1.2.2. Vecteurs phagiques

Les vecteurs phagiques présentent **deux avantages** essentiels vecteurs plasmidiques :

- **Taille de l'insert plus grande (15 Kb).**
- **Infection (pénétration de l'ADN) spontanée des cellules bactériennes.** Comme les virus **infectent les cellules avec une très grande efficacité**, **le gène cloné sera introduit avec une fréquence plus élevée** que celle observée par simple transformation.

Les vecteurs phagiques utilisés pour le clonage sont dérivés du phage λ .

Le bactériophage lambda est un virus qui infecte les souches d'*E. coli* et d'autres entérobactéries en s'adsorbant sur une porine de la membrane externe.

L'ADN du phage est une molécule linéaire de 48,5 Kpb compacté dans la capsid, il porte à ses extrémités des **séquences cohésives** de **12pb** dites **extrémités cos**. Après injection dans la cellule, cet ADN se recircularise sur lui spontanément par les extrémités cos.

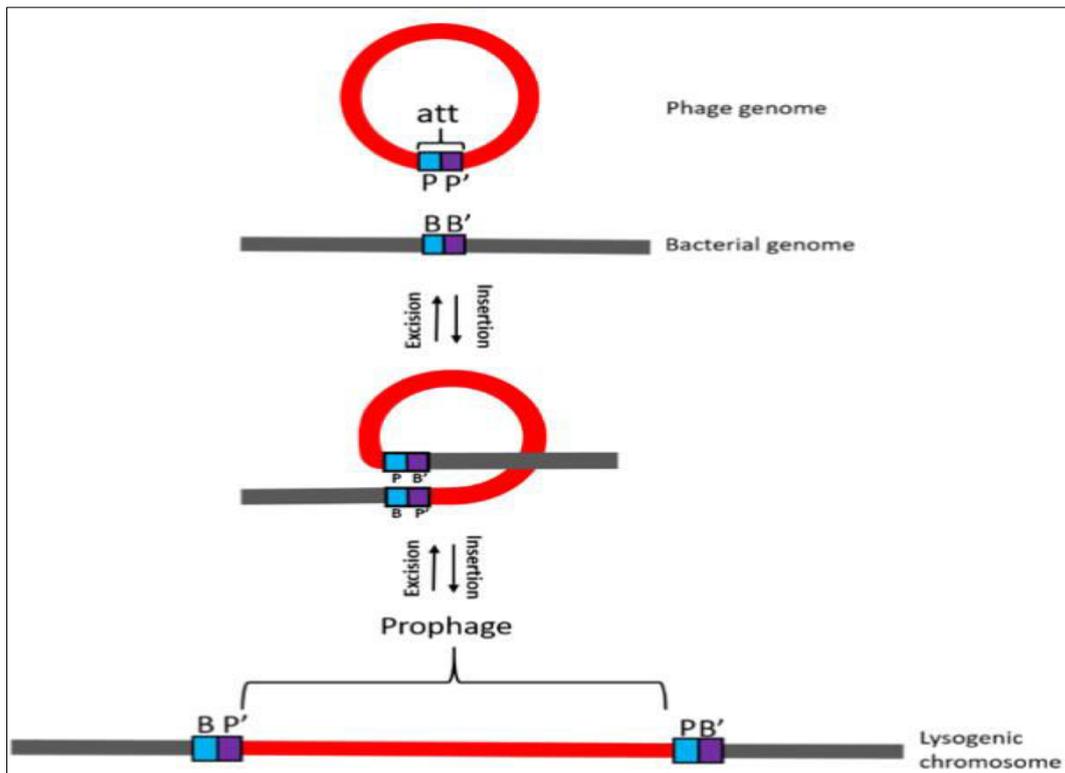
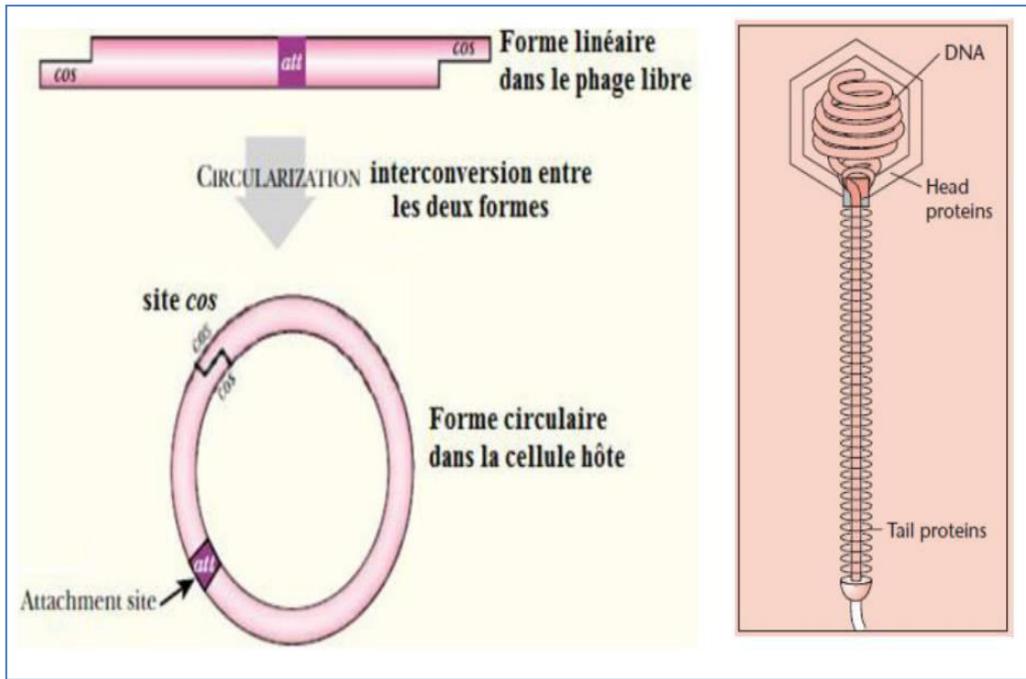
L'ADN du phage est une molécule linéaire de 48,5 Kpb compacté dans la capsid, il porte à ses extrémités des séquences cohésives de 12pb dites extrémités cos. Après injection dans la cellule, cet ADN se recircularise sur lui spontanément par les extrémités cos.

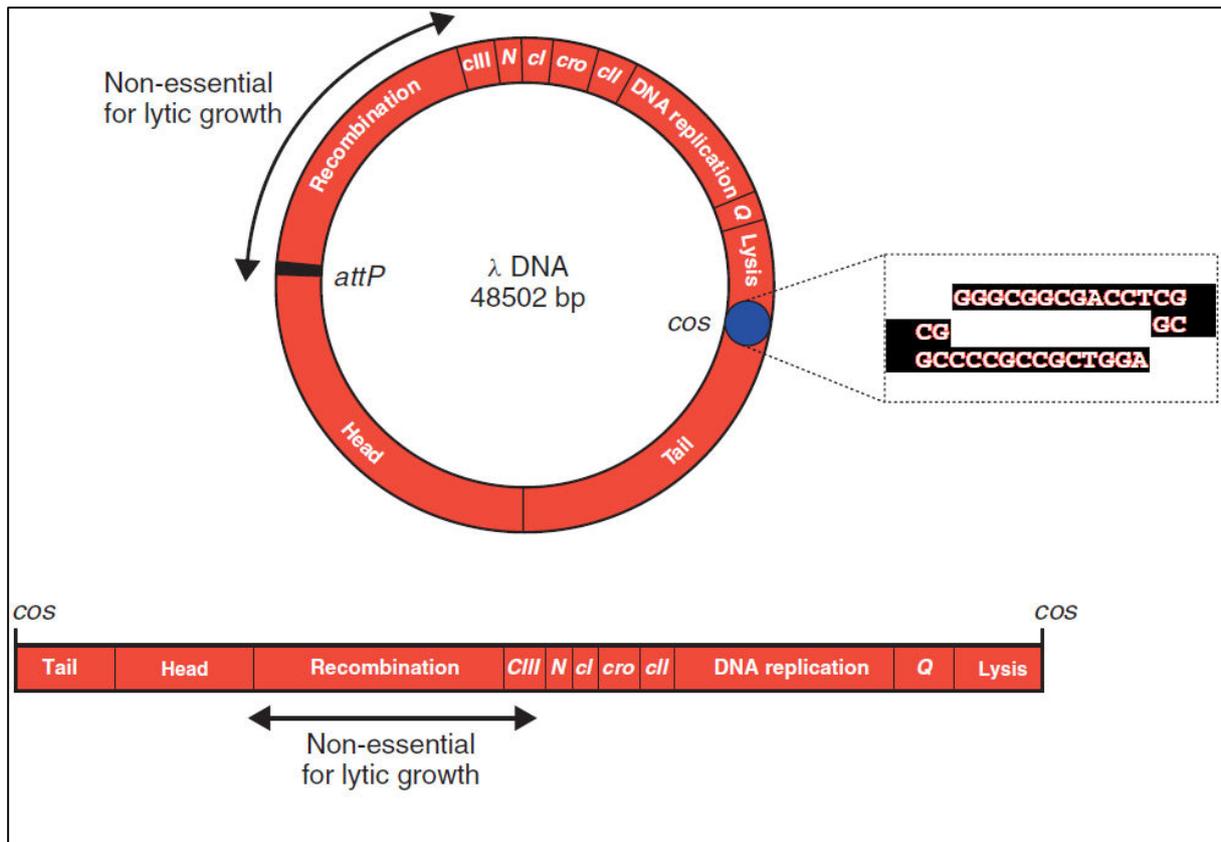
L'association de ces extrémités cohésives (bouts cohésifs) **naturelles** **forme le site cos** (cos: **les gènes important pour la réplication et l'encapsidation de bactériophage λ**).

Selon les conditions physiologiques qui prévalent dans la cellule infectée, le phage sauvage choisit alors entre deux voies

1- Soit il est virulent ; il se reproduit et la bactérie est lysée, c'est le **cycle lytique**.

2- Soit il est tempéré ; son ADN s'intègre au chromosome bactérien. La bactérie continue son cycle et se réplique normalement tout en répliquant l'ADN viral et le transmettant aux cellules filles. C'est le **cycle lysogène**





Tail (la queue) ; Head : la tête (la capside)

Pour faire le clonage

- Seuls les gènes de structure et de réplication du phage, regroupés aux extrémités de son génome, sont conservés.
- Les séquences médianes, non indispensables pour la réplication du phage, le gène d'intérêt est inséré à la place de la zone centrale de l'ADN phagique qui n'est pas essentielle à sa multiplication.

Les bactéries transformées ne présentent pas des colonies mais plutôt des plages de lyse.

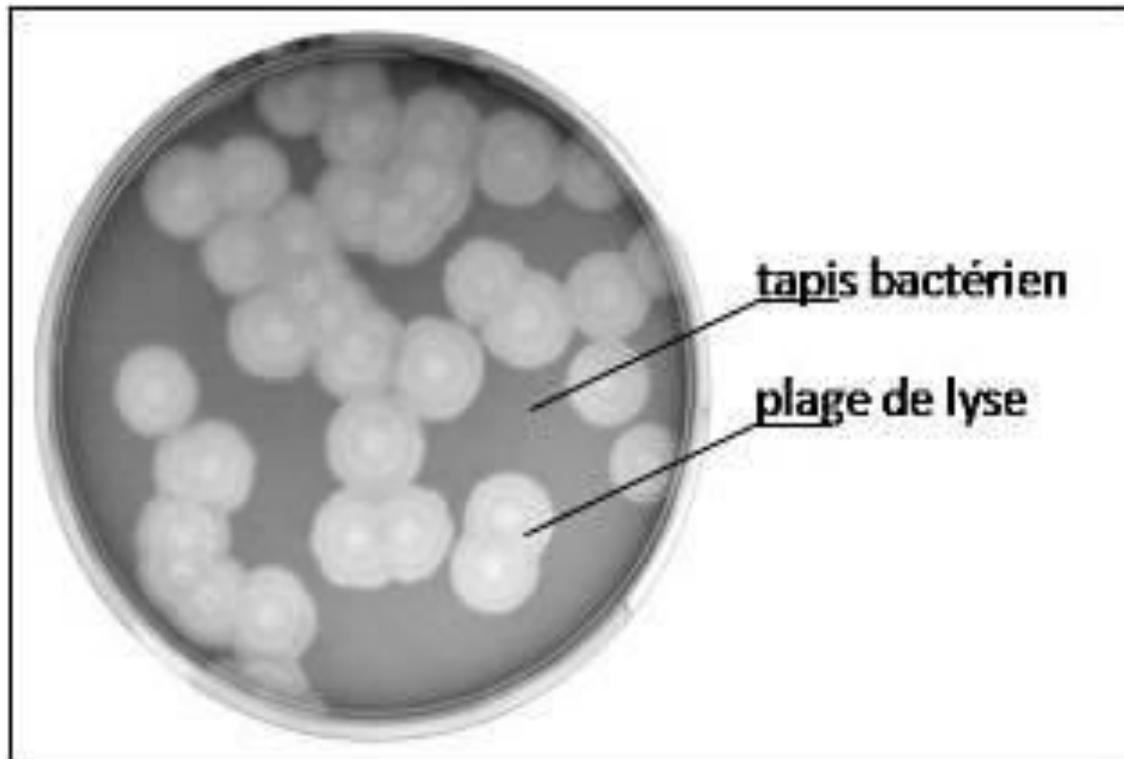


Figure 2.3. Plages de lyse

Types de vecteurs λ :

On distingue deux types de vecteurs λ :

a. Les vecteurs d'insertion : sont les phages dans lesquelles l'ADN étranger est inséré au niveau d'un site de restriction (taille des fragments insérés de 1 à 7 kb).

b. Les vecteurs de substitution : dans lesquelles les parties non essentielles de l'ADN du phage sont remplacées par l'ADN insert (taille de l'insert \approx 20kb).

2.1.2.3. Les cosmides :

Les cosmides sont des **molécules d'ADN circulaires hybrides** construites à partir des phages λ et des plasmides.

Ils possèdent comme les plasmides, **une origine de répllication plasmidique**, **un ou plusieurs marqueurs de sélection**, **un SMC**, et **un site cos** (d'où leur nom cosmides).

Les gènes responsables du cycle lytique sont éliminés (capside, la queue, la répllication et la lyse). Les gènes indispensables à l'infection et à la recombinaison sont gardés.

Ce vecteur peut porter des fragments d'ADN de **45 kpb**.

Le cosmide est ouvert par l'action d'une enzyme de restriction.

L'ADN à cloner est lui aussi fragmenté par une enzyme qui fournit **des extrémités compatibles**.

On obtient alors par ligatures successives le vecteur lié à des fragments d'ADN étranger. Le système d'encapsulation in vitro permet d'introduire dans les têtes des phages des fragments d'ADN à cloner.

Ces fragments d'ADN **sont introduits dans la bactérie par infection, ils s'y circularisent et se répliquent comme les plasmides**.

2.1.2.4. Chromosomes artificiels

2.1.2.4.1 Chromosome artificiel bactérien

Les «chromosomes artificiels bactériens » également appelés« BAC : Bacterial Artificial Chromosome » sont construits à partir du plasmide F d'*E. coli* qui est **capable d'intégrer de très grands fragments d'ADN**.

Le vecteur possède les gènes du facteur F impliqués dans la réplication et la régulation du nombre de copies du plasmide.

■ Constituants de vecteur Bac :

oriS est l'origine de réplication qui est issue de l'épisome sexuel F d'*E. coli*.

Les gènes parB et parA également de l'épisome servent à la répartition correcte du plasmide dans les cellules filles.

Le gène repE code l'enzyme de réplication spécifique de l'épisome.

CosN vient de bactériophage lamda.

CmR d'origine plasmidique code la résistance au chloramphénicol.

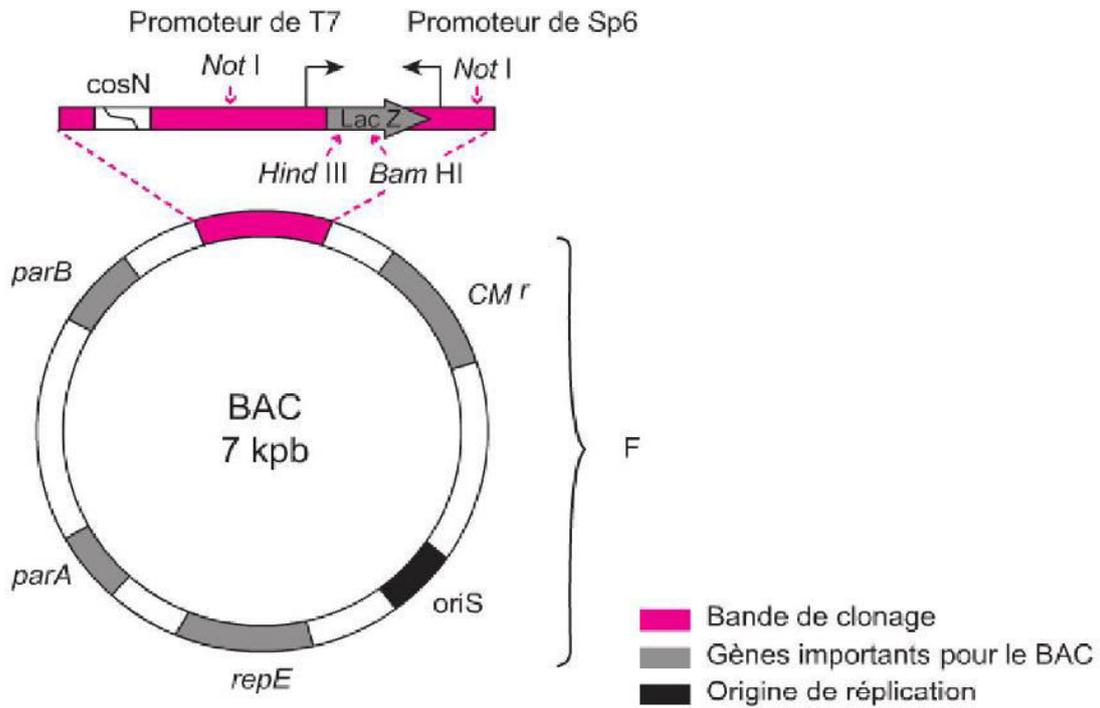


Figure 2.4. Principales caractéristiques d'un chromosome artificiel bactérien (BAC).
kpb: kilopaires de bases

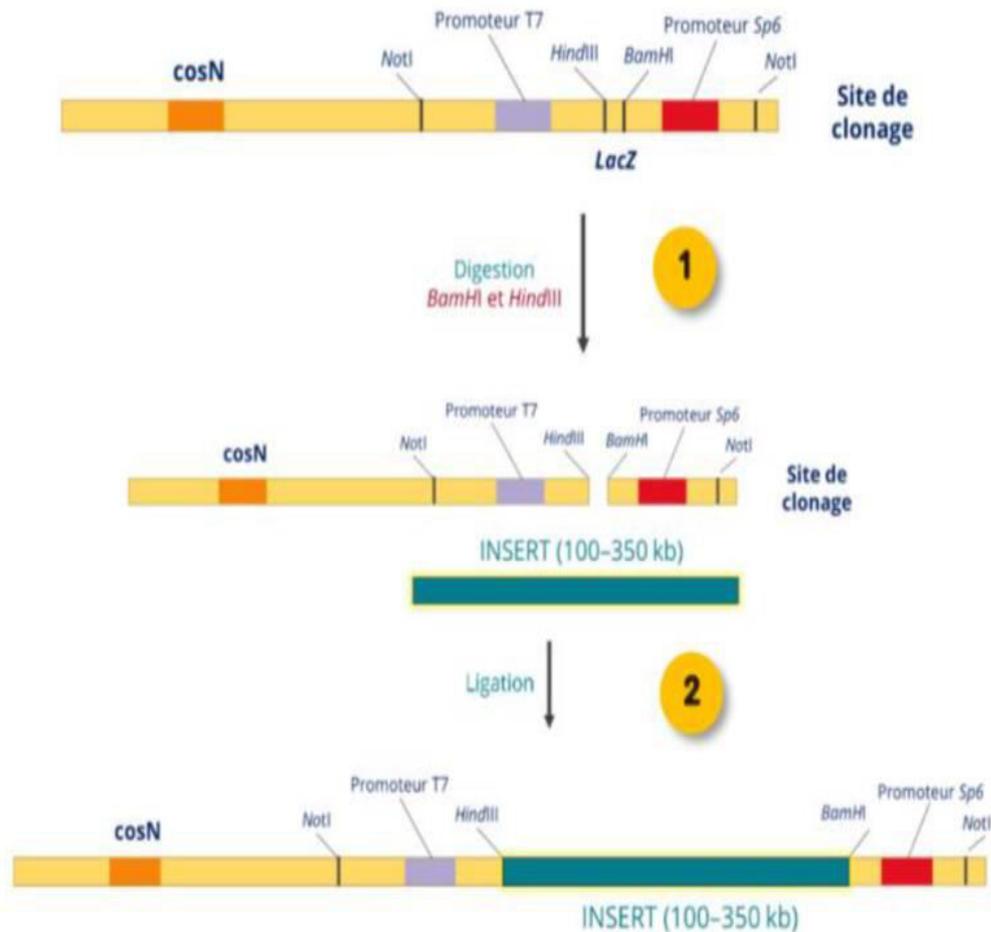


Figure 2.5. Schéma général du Protocole d'intégration de l'insert dans un vecteur BAC

- Site de clonage dans le gène *LacZ*

- Ils peuvent porter des inserts d'ADN étranger d'une taille proche de 300 kpb.
- Les BAC sont généralement introduits dans les bactéries par électroporation.

L'hôte typique d'un BAC est une souche mutante d'*E. coli*, cette souche ne dispose pas des systèmes de modification et de restriction de la souche sauvage, **pour empêcher la destruction du BAC**. Ainsi, elle a perdu les capacités de recombinaison normales (c'est dire l'intégration de plasmide dans le chromosome de la cellule hôte), cela interdit la recombinaison et les réarrangements de l'ADN cloné du BAC avec le chromosome de l'hôte.

2.1.2.4.2. Chromosome artificiel de levure (YAC)

Le chromosome artificiel de levure (YAC: Yeast Artificial chromosome) est un chromosome artificiel créé dans une cellule de levure et sont utilisés comme des vecteurs dans la technologie de l'ADN recombinant.

Les YAC se répartissent régulièrement lors des divisions, comme les chromosomes naturels

Les **chromosomes artificiels de levure** (YAC) sont des vecteurs navettes qui **peuvent être amplifiés dans les bactéries** et utilisés pour la clonage et manipulation de grands inserts d'acides désoxyribonucléiques (ADN) (**jusqu'à 3 Mb**) dans la **levure *Saccharomyces cerevisiae***.

Les chromosomes artificiels de levure peuvent donc se répliquer aussi bien dans une cellule de levure que dans une cellule bactérienne.

Constituants de vecteur YACs (Yeast Artificial Chromosomes)

- ▣ Les YACs et en tant que tels, ils ont les trois caractéristiques communes à tous les chromosomes eucaryotes, à savoir **deux télomères, un centromère et une ou plusieurs origines de réplication.**

Les télomères : Deux télomères, les structures aux extrémités d'un chromosome qui sont nécessaires pour que les extrémités soient correctement reproduites et qui empêchent également le chromosome d'être grignoté par les exonucléases;

Un centromère : le centromère, qui est nécessaire pour que le chromosome soit réparti correctement aux cellules filles pendant la division cellulaire (ségrégation lors de la mitose)

Origine de réplication : l'**origine bactérienne de réplication** (colE1) et **une origine de réplication chromosomique** Autonomous Replication Site (ARS)

- ☐ De plus, compte tenu de leur utilisation dans les technologies de l'ADN recombinant, les YAC **contiennent un ou plusieurs sites de restriction** grâce auxquels il est possible d'insérer l'ADN exogène à cloner.

- ☐ Marqueur de sélection

Le YAC comporte de l'ADN de deux origines

- ☐ de plasmide pBR 322, le YAC a reçu **l'origine bactérienne de réplication** (colE1) et le **gène de résistance à l'ampicilline**.

- ☐ des chromosomes de levure, le YAC a reçu **une origine de réplication chromosomique** : Autonomous Replication Site (ARS), qui assure la reproduction de l'ADN dans une cellule de levure ; **une région centromérique chromosomique** (CEN). Il a aussi **deux régions télomériques** d'origine chromosomique qui protégeront les extrémités du minichromosome après recombinaison.

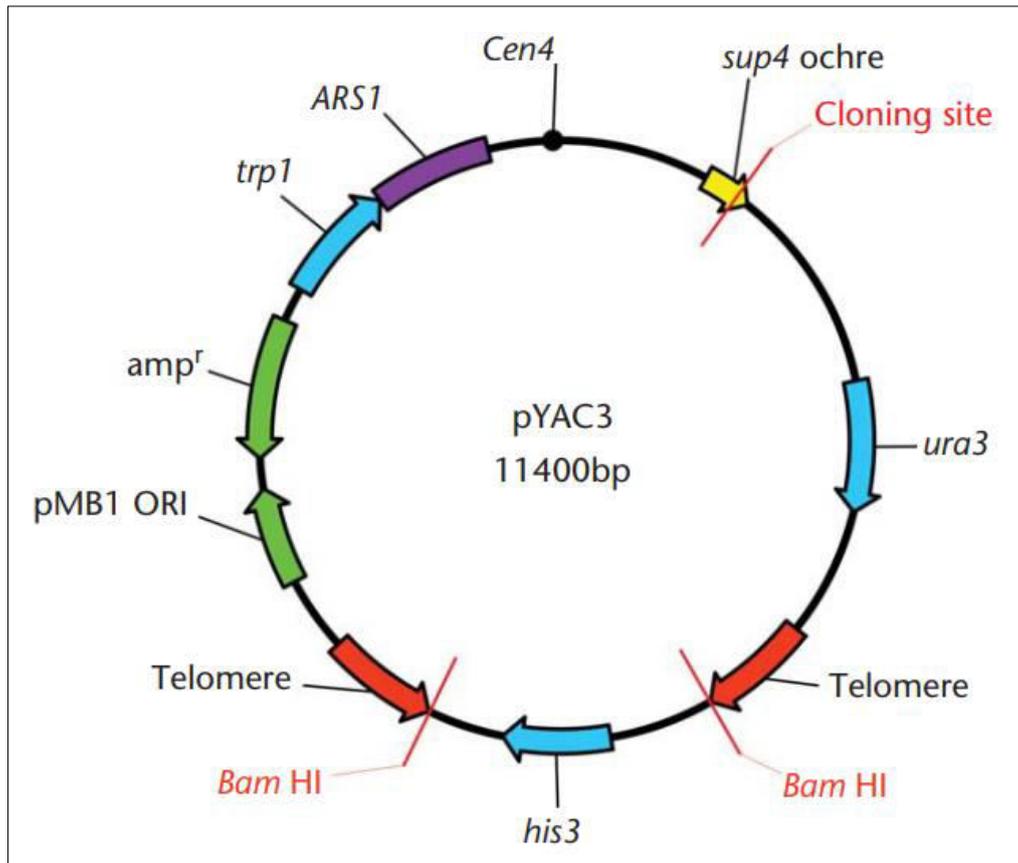
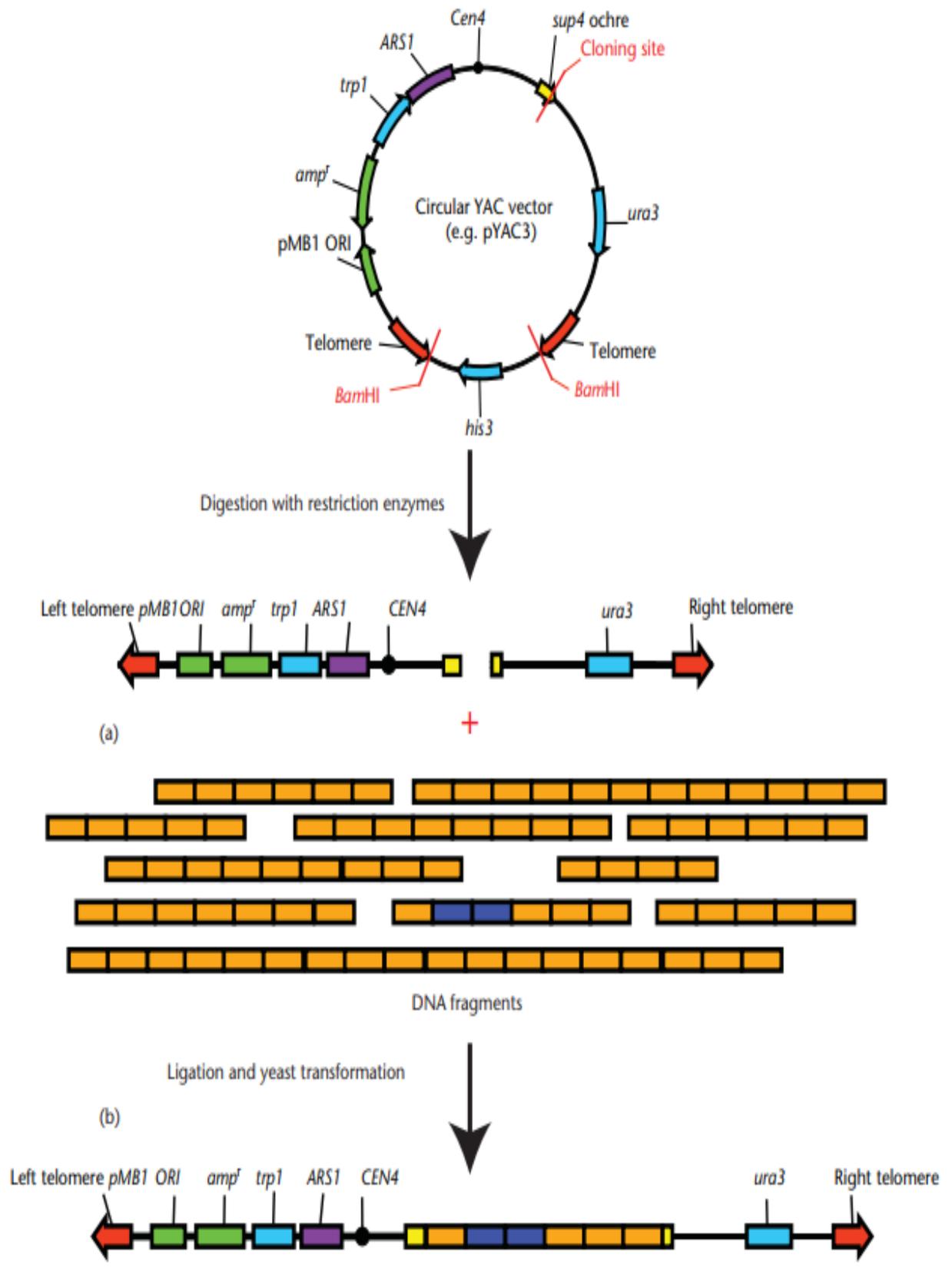


Figure 2.6. Carte d'un plasmide YAC

1. Un centromère de levure (CEN4) ;
2. Une séquence d'auto-réplication (ARS1) : il s'agit d'origines de répllication de levure ;
3. Des télomères (TEL) : nécessaires pour le maintien de l'intégrité du chromosome ;
4. Gènes de sélection des cellules transformées par les YAC : le vecteur porte un gène URA3 (nécessaire pour synthèse de l'uracile), un gène TRP1 (nécessaire pour synthèse du tryptophane). Les cellules hôtes portent des gènes URA et TRP mutés. Ceci permet la sélection des cellules transformées ;
5. Des origines de répllication (pMB1 ORI) et gènes de sélection bactériens (amp^r) : permettant leur propagation dans les bactéries



Avantages et inconvénients des vecteurs BAC et YAC :

L'avantage que présente l'hôte (la levure) est qu'il possède les ARN et les systèmes post transcriptionnels complexes nécessaire à la synthèse de produits de gènes d'organismes supérieurs. Néanmoins, les processus post-traductionnels peuvent être à l'origine de problème de clonage (Puisque c'est une nouvelle molécule synthétisée par ce microorganisme).

Bien que les YACs puissent porter de plus grand fragments (inserts) que les BAC, les problèmes de recombinaison et de réarrangement de l'ADN cloné (notamment lors des divisions cellulaires) sont plus importants avec la levure qu'avec *E. coli*. **Ce qui rend les BAC plus utilisés que les YAC en clonage génomique.**

En outre, les molécules d'ADN de grande taille sont fragiles et risquent de subir des cassures, par ailleurs, il y a un risque élevé de perte des YAC durant la mitose.

Tableau 2.1. Vecteur de clonage

VECTEURS	Taille maximum de fragment d'ADN cloné
Plasmides	10 Kb
Phage lambda	15 Kb
Cosmide	45 Kb
BAC (Bacterial Artificial Chromosome)	300 Kb
YAC (Yeast Artificial Chromosomes)	3 Mb

2.1.2.4.3. Les HAC (Human Artificial Chromosomes)

Sont des vecteurs utilisés pour introduire un ADN étranger dans des cellules humaines en culture. Ils contiennent des éléments qui assurent leur stabilité dans la cellule hôte (centromères, télomères, origines de réplication. Les télomères humains sont des séquences répétitives (5'-TTAGGG-3') qui diffèrent des télomères des levures, ce qui rend l'utilisation des YAC dans les cellules humaines impossible. Les HAC constitue un outil d'un grand potentiel, que ce soit pour la recherche fondamentale ou en thérapie.

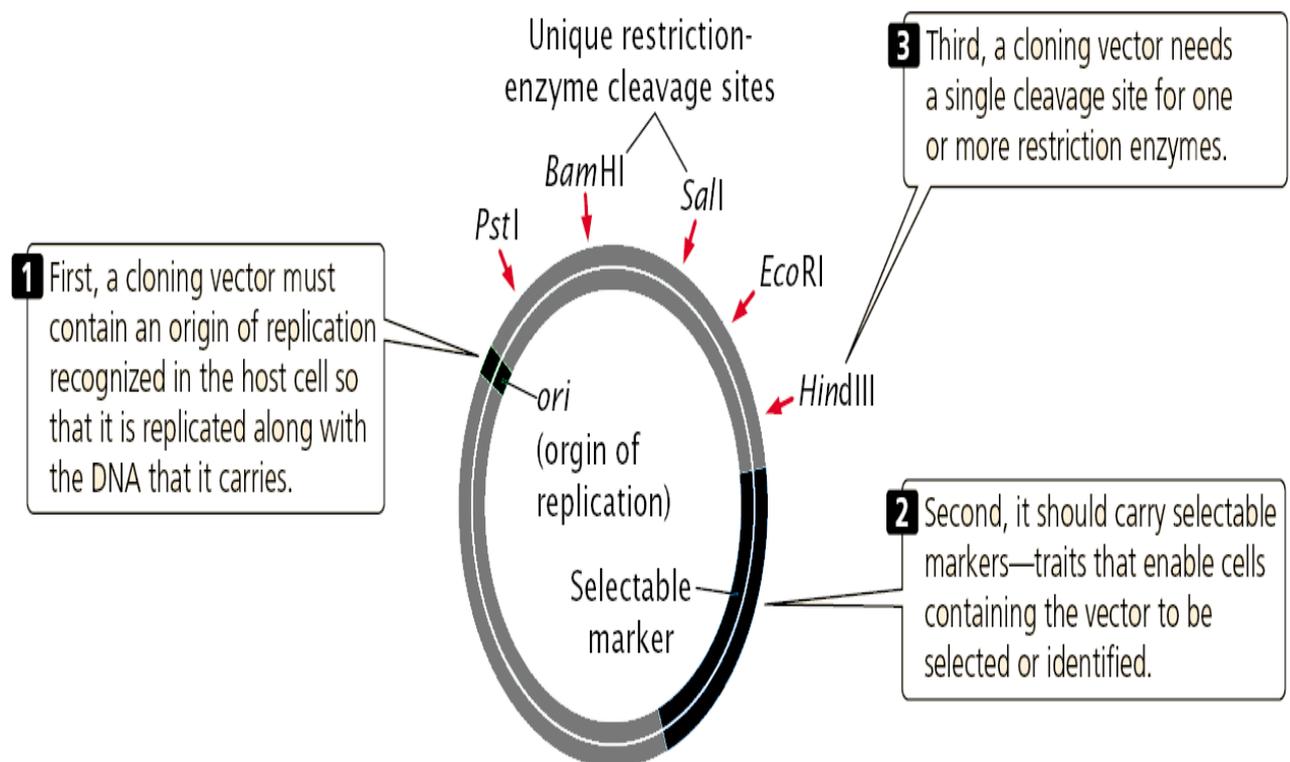
L'utilisation de ces vecteurs en thérapie génique est prometteuse et surmontent les inconvénients observés chez les vecteurs viraux.

2.1.3. Vecteurs de clonage et vecteurs d'expression :

Selon l'objectif d'insertion du gène d'intérêt, on peut distinguer les vecteurs de clonage et les vecteurs d'expression.

2.1.3.1. Vecteurs de clonage

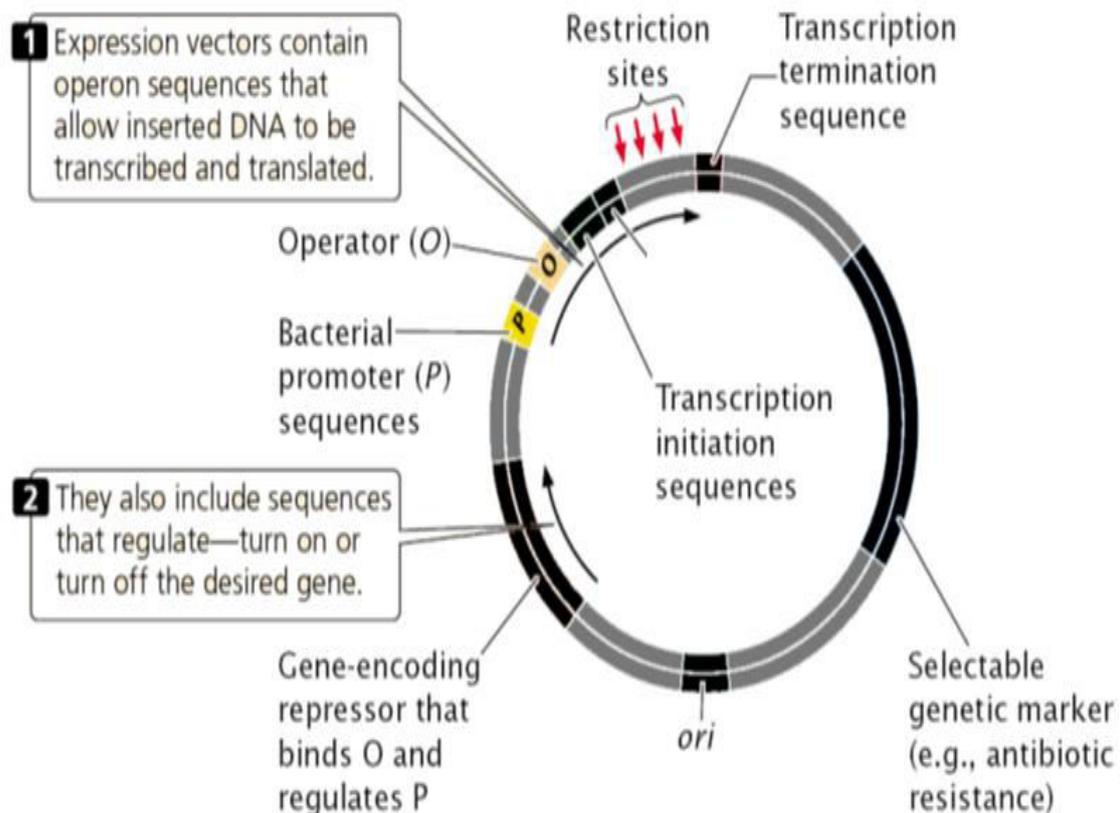
Les vecteurs utilisés pour reproduire un fragment d'ADN sont dits : *vecteurs de clonage*



2.1.3.2. Vecteurs d'expression

Les vecteurs utilisés pour exprimer un gène sont dits : *vecteurs d'expression*.

Pour assurer la transcription, **des régions promotrices et régulatrices** sont insérées au vecteur d'expression



2.1.3.2.1. Clonage moléculaire :

Le clonage moléculaire consiste à insérer un fragment précis d'ADN (issu du génome d'un organisme donné) dans un ADN vecteur à double brin (par exemple un plasmide bactérien ou un ADN viral), puis son introduction dans une cellule-hôte (généralement monocellulaire pro- ou eucaryote) en vue de sa réplication ou de son expression.

2.1.3.2.1.1. Les étapes de clonage

Le clonage moléculaire consiste à produire des molécules d'ADN recombinant et à les utiliser pour transformer un organisme hôte, dans lequel elles sont répliquées.

2.1.3.2.1.1.1. Construction du transgène

Afin de cloner un ADN, **on doit d'abord le purifier**, ensuite **le couper avec une enzyme de restriction**. Le **vecteur doit être également coupé** par la même enzyme de restriction ou une autre enzyme générant les mêmes extrémités.

Enfin, **une ADN ligase** est requise pour souder l'ADN insert au vecteur. Bien sûr **que les autres éléments de transgène sont également associés** (promoteur puissant, gène de sélection,...).

2.1.3.2.1.1.2. Transfert de transgène dans la cellule hôte :

Il y a plusieurs méthodes pour introduire un gène dans une cellule :

▣ **Cellule hôte : cas des bactéries (ou des levures)**

Les molécules d'ADN recombinants « les transgènes » ainsi préparées sont introduites dans des cellules (habituellement des bactéries ou des levures) qui doivent être rendues perméables à l'ADN de **façon transitoire**.

Pour faciliter l'introduction d'un gène dans une bactérie, il faut rendre les bactéries compétentes (capables d'intégrer des fragments d'ADN d'origine étrangère) en fragilisant leur paroi cellulaire par des procédés électriques, chimiques ou physiques.

L'introduction d'un gène d'intérêt peut se faire directement par infection dans le cas où un bactériophage a été utilisé comme vecteur de clonage (processus biologique).

▪ **Procédés électrique**

Par action d'un champ électrique (**électroporation**) : L'électroporation, appelée aussi électroperméabilisation, est une technique microbiologique qui consiste à appliquer un champ électrique sur les membranes cellulaires qui sont ainsi déstabilisées, ce qui augmente la perméabilité membranaire.

Sous l'effet d'un champ électrique, les membranes cellulaires des bactéries sont secouées et deviennent perméables. Les bactéries dont les membranes sont déstabilisées baignent dans une solution de plasmides. Ces derniers passent donc très facilement dans la cellule qui se trouve à son tour génétiquement modifiée.

Si le choc électrique n'est pas trop violent, la membrane bactérienne peut alors reprendre son état initial (l'ouverture des pores est réversible).

- **Procédés chimiques**

- Par action d'un agent chimique, par exemple, il suffit de plonger des bactéries Gram négatives dans une solution froide de CaCl₂. En effet, en présence d'une solution concentrée de CaCl₂ (50 mM) la structure des membranes cellulaire va être altérée et il y aura la création de plusieurs micro-perforations par lesquels l'ADN pourra pénétrer. Ce procédé permet à l'ADN extérieur de se fixer sur la paroi cellulaire. **Toutes les opérations s'effectuent à 4°C.** Pour les cellules eucaryotes, on a recours à des molécules comme le phosphate de calcium qui fragilise la membrane cellulaire et favorise la formation de pore par lesquels les vecteurs peuvent pénétrer.

- **Procédés physique**

L'entrée de l'ADN est stimulée par une **brève incubation à 42 °C**. Ce choc thermique induit un stress important qui fragilise la membrane et facilitera l'entrée de l'ADN plasmidique dans les cellules compétentes. Une fois cette étape terminée le tube est remis dans un milieu approprié à 37°C **afin de régénérer la membrane bactérienne.**

- **Procédé biologique**

Le procédé biologique par l'utilisation des bactériophages ou des cosmides comme vecteur de clonage.

- **Cellule hôte : cellule végétale**

- **Procédés mécaniques**

L'introduction du transgène dans le génome de la cellule peut se faire par l'utilisation **d'un canon à particule qui projette des microparticules enrobées d'ADN (sous forme des microparticules enrobées d'ADN)** dans la cellule hôte (particulièrement les plantes : paroi pectocellulosique des cellules végétales) sans leur infliger de dommages irréparables.

Certaines des micro-particules pénètrent dans les cellules, transportant avec elles l'ADN. Quand la bille atteint le noyau, elle permet à l'ADN qu'elle transporte de s'y intégrer.

La sélection et régénération de plantes entières à partir des cellules génétiquement modifiées. La sélection s'effectue grâce à un gène marqueur conférant la résistance à un antibiotique toxique (ou à un herbicide) pour la cellule végétale transformée.

Les plantes génétiquement modifiées acquièrent de nouvelles caractères, par exemple : les plantes sont rendues résistantes aux herbicides, résistantes à des ravageurs, tolèrent la salinité, la sécheresse,...ect

- **Transfert dans les protoplastes**

L'introduction d'ADN dans des protoplastes (protoplaste : cellule sans paroi, cellule végétale sans paroi pectocellulosique) nécessitant l'action d'un agent chimique (qui déstabilise de façon réversible les membranes plasmiques, permettant ainsi le transfert de l'ADN au travers de la membrane) ou d'un champ électrique (électroporation).

Cette technique longue est limitée aux plantes capables de se régénérer à partir de protoplastes.

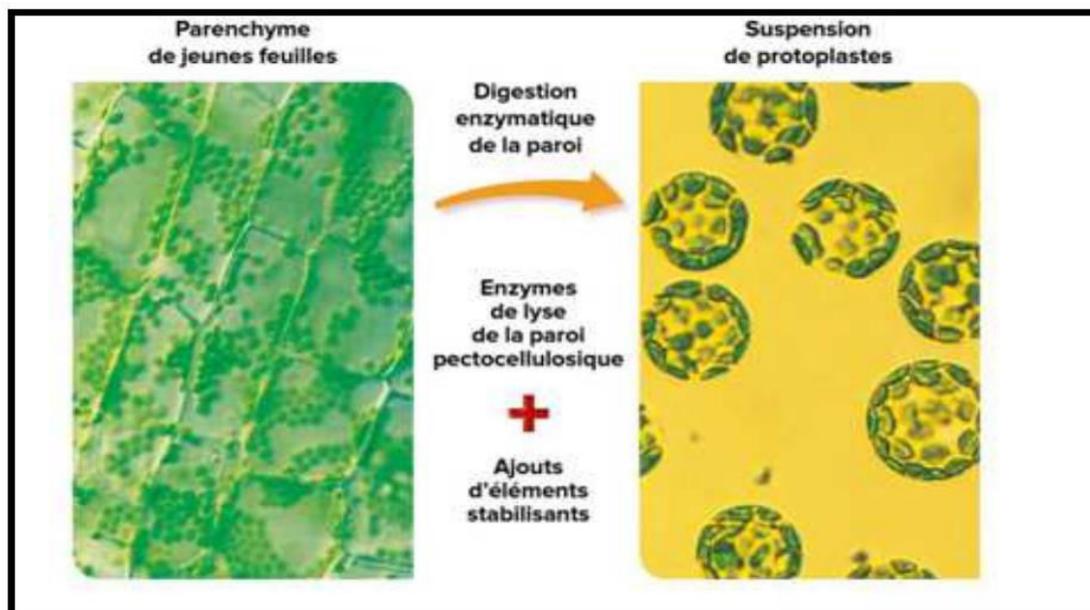


Figure 2.7. Procédure d'obtention de protoplastes

- **Procédés biologique**

Vecteur biologique (une bactérie, *Agrobacterium tumefaciens* pour obtenir des plantes transgéniques).

Le développement de la transgénèse végétale a connu son essor grâce à la découverte de bactéries telluriques. *Agrobacterium tumefaciens*, bactérie du sol, fréquemment utilisée dans le transfert biologique (rendue avirulente au préalable). Dans la nature, cette bactérie parasite des plantes et permet donc de réaliser naturellement la transformation génétique d'une plante.

❑ Cellule hôte : cellule végétale

La transgénèse animale est une manipulation différente du clonage qui permet de reproduire, à partir d'une seule cellule, plusieurs copies exactes du même animal.

La technique de la micro-injection d'ADN est la plus utilisée.

▪ **Micro-injection**

La technique la plus utilisée et celle qui obtient le plus de succès est la micro-injection d'ADN dans le noyau d'un ovule fraîchement fécondé (embryon). La micro-injection est une technique mécanique qui requiert l'utilisation de micro-instruments pour introduire le gène d'intérêt. Une fois modifiées génétiquement, les cellules de l'embryon GM poursuivent leur développement jusqu'à la formation complète de l'animal transgénique.

Comme la transgénèse animale est beaucoup plus coûteuse et complexe que la transgénèse microbienne ou végétale, les avancées dans ce domaine sont plus lentes.

Les applications de la transgénèse pour améliorer les productions des animaux d'élevage sont actuellement peu nombreuses

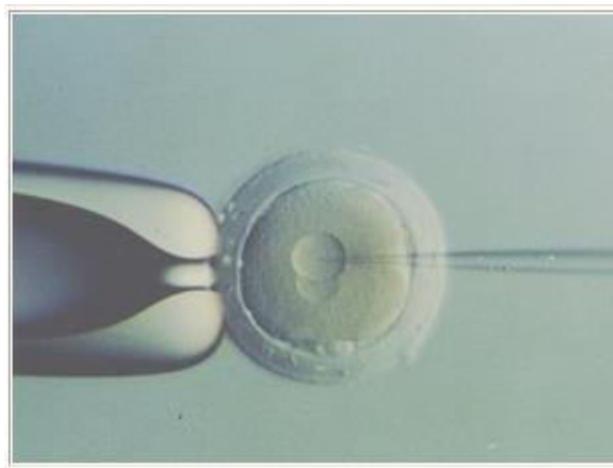


Figure 2.8. Micro-injection des gènes dans le pronucléus mâle d'un ovocyte de lapin

2.1.3.2.1.1.3. Sélection des recombinants :

La sélection des rares colonies qui contiennent le fragment d'ADN intéressant est souvent la partie la plus délicate du clonage des gènes. Les marqueurs de sélection les plus souvent utilisés sont des gènes de résistance aux antibiotiques (Ampicilline, Streptomycine, Tétracycline.....) ;

Dans certains vecteurs (ex : pPBR322, Fig. 6-Sa) les gènes de résistance aux antibiotiques possèdent eux-mêmes un répertoire intéressant de sites de clonage (sites de coupure par des endonucléases). L'interruption de la séquence du gène entraîne la perte de l'activité de la protéine conférant la résistance à l'antibiotique. La sélection des clones recombinants exploite les changements de sensibilité-résistance aux antibiotiques qui résultent du clonage.

2.1.3.2.1.1.4. Analyse des recombinants

De nombreuses techniques peuvent être utilisées pour **vérifier que le gène cloné dans un vecteur correspond à un gène d'intérêt.**

- Le **criblage du gène d'intérêt** est réalisé en utilisant une sonde spécifique qui trouvera et signalera le gène que l'on cherche à identifier.
- PCR standard et contrôle de taille par électrophorèse sur gel d'agarose, PCR quantitative
- Techniques d'hybridation ADN/ADN
- Visualiser l'expression du gène d'intérêt par l'intermédiaire du produit du gène rapporteur
- Ou on peut chercher la protéine produite, tester sa structure son activité...

Nb

Toutes les expériences de clonage se déroulent en cinq étapes : **(1)** l'isolement des fragments d'ADN à cloner, **(2)** construction de transgène **(3)** le transfert de la molécule d'ADN recombinant dans une cellule où il peut se répliquer ou être exprimé **(4)** la sélection/criblage des cellules contenant l'ADN recombinant d'intérêt, et enfin **(5)** l'analyse des recombinants.

Optimisation des étapes de clonages :**Principe générale de clonage moléculaire :**

Le clonage repose sur l'insertion d'un fragment d'ADN exogène dans un vecteur (plasmide, bactériophage, cosmide,...). Le vecteur de clonage (par exemple un plasmide) est coupé par une enzyme de restriction qui reconnaît un site unique généralement placé à un site appelé « site de polyclonage ».

Un site de polyclonage : est un endroit dans le vecteur où sont regroupées des séquences correspondant à des sites de restrictions pour plusieurs enzymes, ces sites n'étant tous représentés qu'une seule fois dans la séquence du vecteur. Ce site étant unique, le vecteur est donc **linéarisé** et possède à chaque extrémité une partie de la séquence d'ADN reconnue par l'enzyme de restriction.

L'ADN exogène de l'organisme donneur est **digère soit par la même enzyme de restriction** que celle utilisée pour la linéarisation du vecteur, soit par une autre enzyme de restriction qui génèrent des **extrémités compatibles**.

Lorsque le plasmide ouvert (linéarisé) et les fragments de l'ADN donneur sont confrontés, il y a **hybridation** (formation de liaisons hydrogène) des extrémités cohésives complémentaires, suivant les lois de complémentarité des bases (A/T, G/C).

Une enzyme (**ligase**) permettant la formation d'une liaison covalente entre ces fragments d'ADN hybrides, est alors ajoutée pour ligaturer le fragment d'ADN étranger au plasmide. L'action de la ligase est de créer des liaisons phosphodiester entre les extrémités 5'-P et 3'-OH rendues adjacentes par l'hybridation des extrémités cohésives du fragment et du plasmide.

Le plasmide obtenu, de nouveau circulaire, est dit **recombinant** s'il a intégré un insert.

Problématique :

Lors d'un clonage réalisé après coupure par une seule enzyme de restriction, deux événements de ligature peuvent se produire :

- ✓ La ligature d'une molécule de plasmide avec une molécule d'insert
- ou
- ✓ la recircularisation du plasmide sur lui-même, sans insert.

Cette dernière possibilité étant souvent majoritaire.

Après la transformation, on a donc des bactéries qui ont **un vecteur seul** et des bactéries qui ont le **plasmide recombinant**.

- Afin d'empêcher le vecteur linéarisé de se refermer sur lui-même, il est généralement conseillé de **déphosphoryler son extrémité 5'**.

La déphosphorylation peut être réalisée par l'enzyme **phosphatase alcaline**. On incube le plasmide coupé ("plasmide digéré") avec la phosphatase alcaline pendant 1h à 37°C. **Les groupements phosphate présents aux extrémités 5'-P du vecteur linéarisé sont éliminés empêchant ainsi la recircularisation du vecteur sur lui-même**

Les groupements phosphate de l'insert permettent la formation de liaisons phosphodiester entre les nucléotides voisins de l'insert et du vecteur. **L'absence des groupements phosphate sur le vecteur inhibe la formation de liaison phosphodiester**.

Ces **ruptures seront réparées** par **la machinerie de réparation de l'ADN de la bactérie** à la suite de la transformation. (Ces ruptures activent les mécanismes de réparation de l'ADN bactérien).

Chapitre 3

Hybridation moléculaire, sondes et marquage
de l'ADN

3.1. Hybridation moléculaire :

L'hybridation moléculaire désigne l'association qui peut avoir lieu entre deux acides nucléiques simples brins de séquences complémentaires et qui conduit à la formation d'un double brin ou duplex. Cette association s'effectue par l'établissement de liaisons hydrogènes spécifiques : deux liaisons entre l'adénine (A) et la thymine (T) et trois entre la cytosine (C) et la guanine (G).

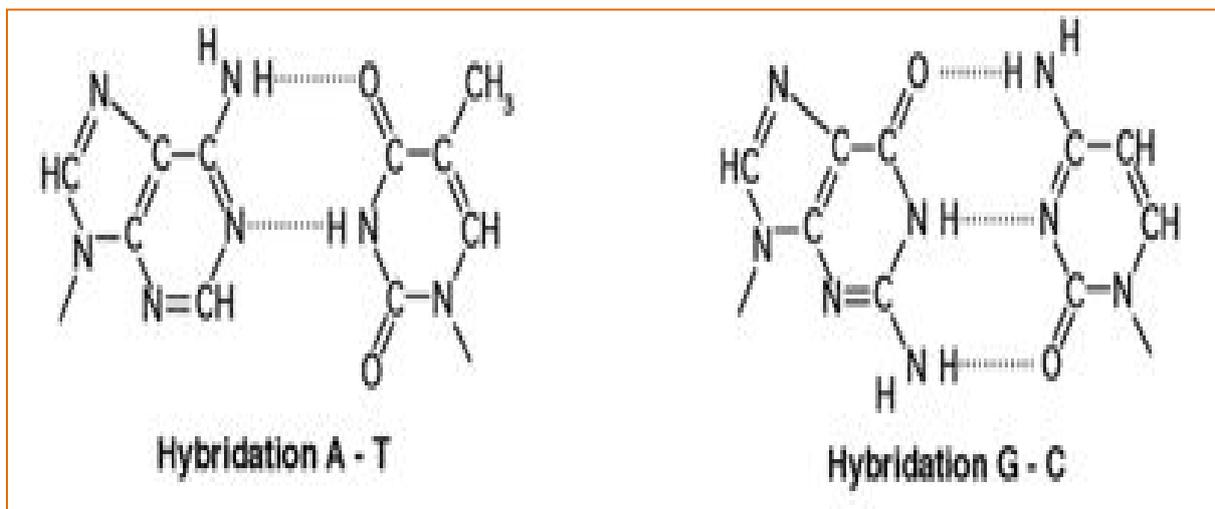


Figure 3.1. Hybridation des nucléotides

- ☐ L'hybridation est une **propriété fondamentale pour détecter la présence d'un gène donné**, en utilisant des **amorces** ou des **sondes** moléculaires.
 - Les amorces sont **des copies homologues des extrémités du gène à copier** permettant le démarrage de la réplication par l'ADN polymérase
 - Les sondes nucléiques sont **des fragments d'ADN monocaténares, marqués (selon la technique), complémentaires à un fragment du gène recherché.**
- ☐ L'hybridation permet également de **détecter l'homologie entre les molécules d'ADN de sources différentes.**

La fixation des amorces ou de sondes nucléiques au gène recherché constitue la base de nombreuses techniques de biologie moléculaire « la PCR « Polymerase Chain Reaction), Southern blot, Northern blot ».

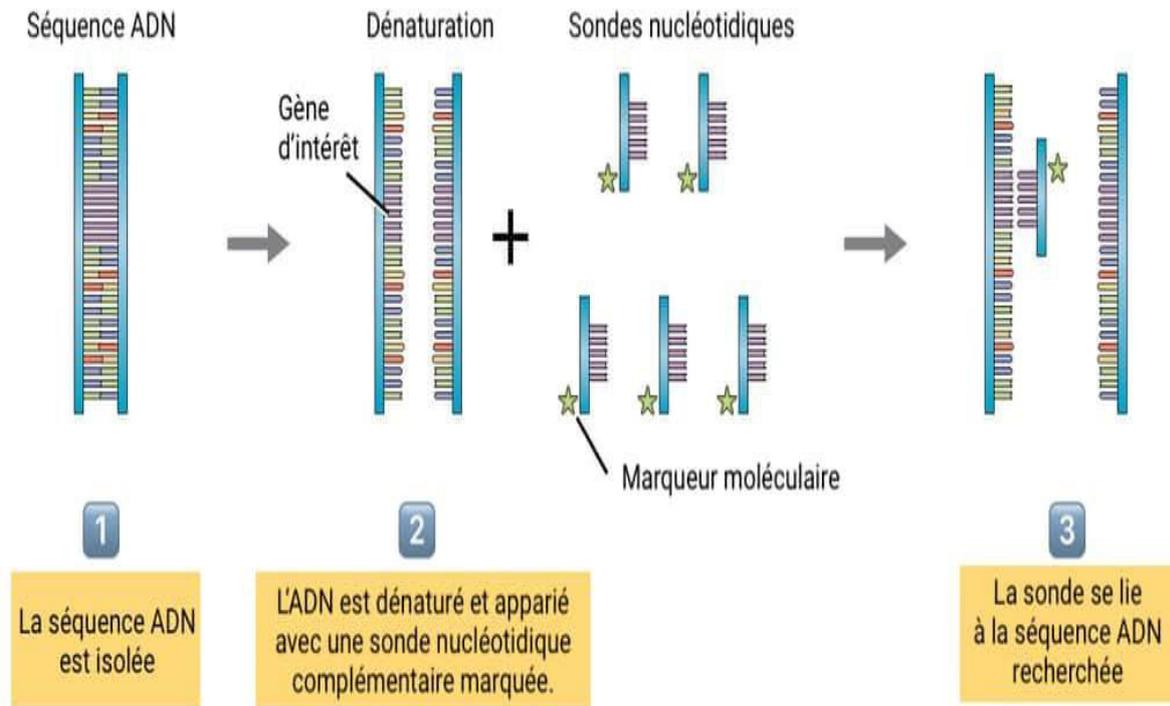


Figure 3.2. Principe de l'hybridation moléculaire

❑ **Facteurs influençant l'hybridation:** la concentration de l'ADN, le temps d'hybridation, la température d'hybridation et la force ionique.

La température d'hybridation : Sous l'effet de la chaleur les liaisons hydrogène de l'ADN double brin s'ouvrent et les deux brins se séparent. Si on réduit la température, la double hélice se reforme et la structure double brin de la molécule d'ADN est restaurée.

La température à laquelle 50% des molécules d'ADN sont séparées: température de fusion ou T_m (melting température).

La force ionique : la concentration en ions dans le milieu. Les sels chargés + vont stabiliser l'ADN chargé - (le duplex est stable).

3.2. Propriétés physico-chimiques de l'ADN

3.2.1. Dissociation et réassociation des brins d'ADN

En chauffant une solution d'ADN, l'agitation thermique d'ADN provoque la rupture des liaisons hydrogène et la dissociation (dénaturation) des deux brins, l'ADN se trouve ainsi sous une forme monocaténaire.

Dans certaines conditions expérimentales, les deux brins de ADN dissocié peuvent se réassocier (**renaturation**) et former à nouveau une double hélice. Le phénomène s'observe lors d'un refroidissement lent de la solution d'ADN préalablement chauffée.

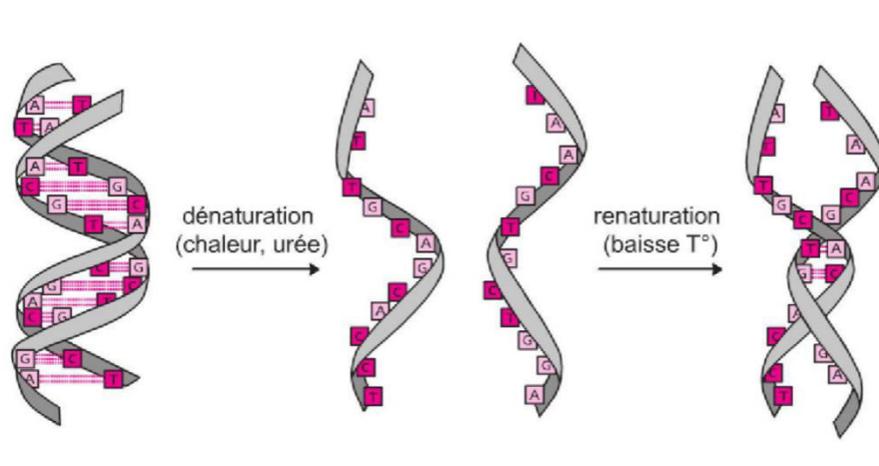


Figure 3.3. Représentation simplifiée de la dissociation-réassociation de l'ADN sous l'action d'agents dénaturants

La présence d'ions ou d'agents déstabilisants (urée ou formamide) peut modifier la T_m .

3.2.2. Contenu en bases et température de fusion

La température pour laquelle on observe **la dissociation de la moitié** des molécules d'ADN est dénommée **température de fusion** ou T_m (« melting Temperature »).

C'est une température, appelée également Température de demi dénaturation (T_m) qui correspond à l'ouverture ou au déroulement de 50% de la chaîne de l'ADN chauffé. C'est l'effet hyperchromique qui correspond à la rupture des liaisons hydrogènes (liaisons faibles) et la séparation des 2 chaînes entraîne une augmentation dans l'absorption d'U.V de 40% à 260 nm. La valeur de T_m des ADN est une fonction linéaire du pourcentage de (G + C) de l'ADN

Plus un ADN est riche en bases G et C qui sont appariées par des triples liaisons hydrogène, plus grande sera l'énergie nécessaire pour les rompre et plus élevée sera la **température de fusion**. À l'inverse, un ADN riche en bases A et T liées par seulement deux liaisons hydrogène, aura une température de fusion plus basse.

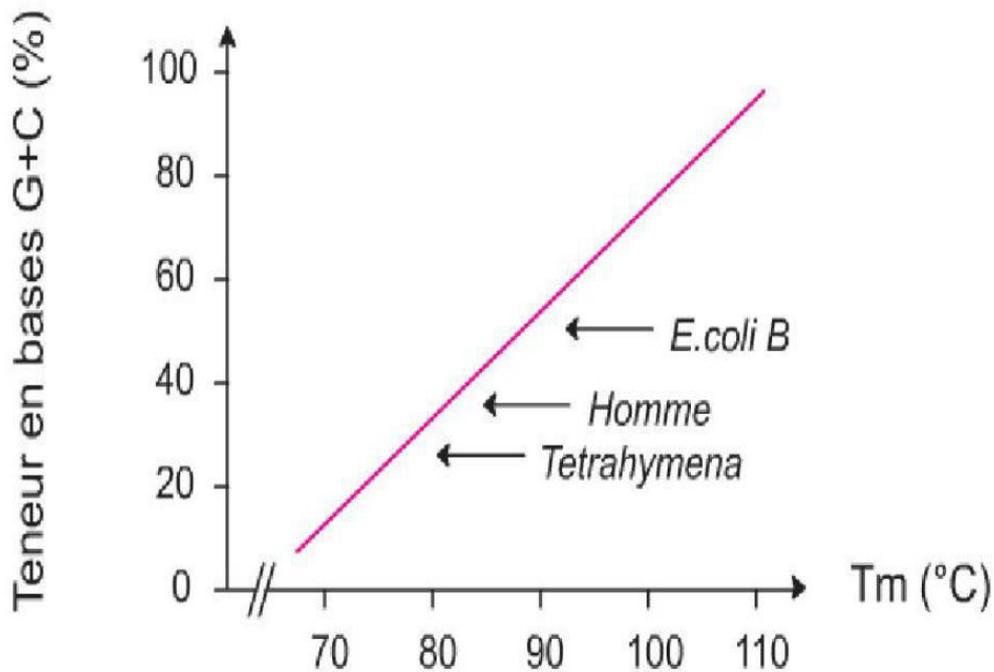


Figure 3.4. Droite reliant teneur en G+C et Tm de divers organismes

Cette courbe nous montre que l'absorbance varie avec la structure de l'acide nucléique (la quantité reste constante). Ainsi, une solution d'ADN simple brin absorbe plus les UV que la même solution d'ADN sous forme de double brin. Cette caractéristique est connue sous le terme d'hyperchromicité. Pour cette raison (comme nous l'avons vu dans la Fiche 6), à absorbance égale, il y aura plus d'ADN dans une solution de double brin que dans une solution d'ADN simple brin. Le point d'inflexion de la courbe correspond à la température à laquelle 50 % des molécules sont simple brin et 50 % sont simple brin. Cette température est appelée Tm (melting temperature), elle dépend directement du pourcentage de G + C (ou de A + T) de la molécule d'ADN. Plus le GC % est élevé et plus le Tm est élevé car la molécule est d'autant plus stable à l'augmentation de température (trois liaisons hydrogènes pour GC et deux liaisons pour AT)

2.2.3. Absorption de la lumière ultraviolette à 260 nm

Sous sa forme bicaténaire (en double hélice) l'ADN absorbe modérément la lumière UV. Sous l'action de la chaleur ou d'agents de dénaturation, les deux brins peuvent se dissocier.

Cette séparation est mise en évidence par la mesure de l'absorption de la lumière ultraviolette à 260 nm (longueur d'onde d'absorption maximale des bases puriques et pyrimidiques), dont le démasquage des bases provoque une absorption plus marquée de la lumière UV.

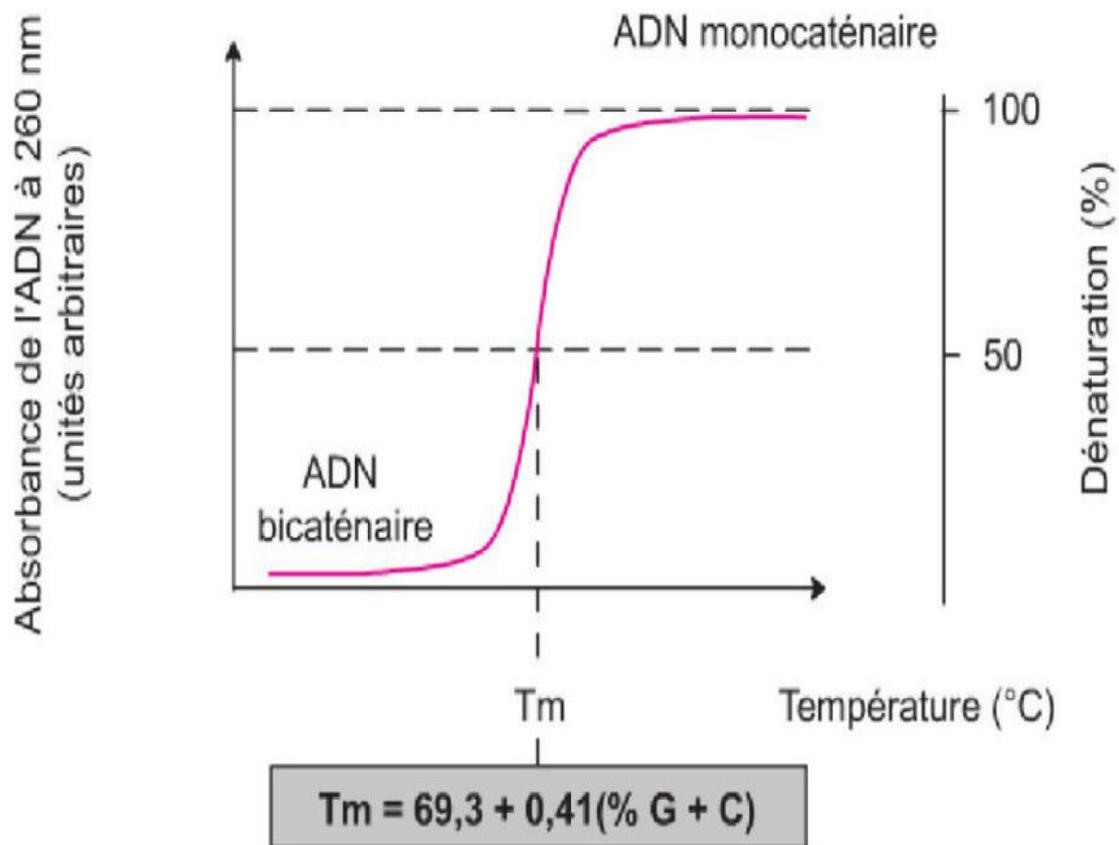


Figure 3.5. Représentation simplifiée du processus de dissociation.

La formule établit la relation entre la teneur en G+C de l'ADN et la température de fusion de l'ADN

3.3. Sondes et marquage de l'ADN :

Les sondes moléculaires sont des séquences d'ADN monocaténares, marquées (selon la technique), complémentaires à un fragment du gène recherché, leur rôle est la détection de gènes dans une réaction dite (hybridation moléculaire).

L'hybridation peut avoir lieu en solution ou sur support solide. Après lavage du milieu pour éliminer les oligonucléotides non-hybridés avec le matériel biologique, la présence du marqueur révèle les hybrides formés et permet de mettre en évidence la séquence reconnue par la sonde. En génie génétique, les sondes sont appliquées par exemple à des clones bactériens transformés par des vecteurs recombinés.

3.3.1. Marquage des sondes :

Les sondes sont marquées avec un **élément radioactif** (exp : P^{32}) ou **chimioluminescent** (exp : digoxygénine) pour **pouvoir les détecter après hybridation**.

- **Élément minéral radioactif** : Pour marquer l'ADN et l'ARN en même temps, il est possible d'utiliser le **phosphate radioactif**.

Exemple : il suffit de mettre dans le milieu du $^{32}PO_4^{3-}$. Il pénètre dans la cellule et est incorporé dans les différents précurseurs.

Le **bromure d'éthidium**, qui se fixe à l'ADN en s'intercalant entre les bases. Les bandes d'ADN (regroupent toute les molécules d'ADN de taille identique) obtenu par électrophorèse sont visualisées sous UV.

- **Élément chimique chimioluminescent** : Substance permettant de marquer des molécules ou des éléments cellulaires et de les rendre fluorescents et identifiables sous l'influence d'un rayonnement d'excitation. Un **fluorochrome** ou **fluorophore** est une substance chimique capable **d'émettre de la lumière de fluorescence** après excitation.

Remarque :

On peut effectuer un marquage soit au niveau des sondes synthétisées artificiellement, soit dans le matériel biologique à étudier.

3.3.2. Types de sondes :

Une sonde d'ADN génomique, une sonde d'ADNc (c : complémentaire à l'ARNm), et une sonde qui reconnaît les protéines si le produit spécifique d'un gène (protéine) a au préalable été isolé sous forme pure, permettant le développement d'anticorps.

3.3.3. Applications de l'hybridation moléculaire

L'hybridation est à la base de nombreuses techniques de biologie moléculaire, notamment l'amplification et le clonage d'ADN ou la fabrication de puces à ADN. Ces dernières sont utilisées pour mesurer l'expression des gènes, localiser des variations ponctuelles de séquences ADN dans le génome ou encore détecter des agents pathogènes (en introduisant un sonde correspondant à une partie du génome de l'organisme pathogène recherche).

Chapitre 4

Techniques d'analyse du génome et de ses
modifications

4. Techniques d'analyse du génome et de ses modifications

Pour l'identification et la caractérisation in vitro d'un ADN (qui cible une protéine donnée), des techniques conventionnelles telles que : la PCR standard, la PCR quantitative, l'hybridation sur puces et le Southern blot peuvent être utilisées.

L'extraction de l'ADN s'effectue par l'utilisation des Kit d'extraction.

4.1. Banques génomiques et d'ADNc :

4.1.1. Banque génomique :

Une collection de clones contenant tous les fragments d'ADN provenant d'une même source est appelée une banque d'ADN génomique. Nous pourrions, par exemple, isoler l'ADN génomique de cellules humaines, le fragmenter et cloner tous les fragments dans des cellules bactériennes ou dans des phages. La collection de plasmides, de cosmides, de cultures bactérienne ou de phages contenant ces fragments est une banque génomique, elle couvre en principe tout le génome humain.

Idéalement, une banque d'ADN génomique contient au moins une copie de toutes les séquences du génome d'un organisme.

Un tel ensemble de clones d'ADN, issus d'un seul individu, constitue une banque de clones.

Ces banques peuvent représenter un génome entier, un seul chromosome ou un ensemble de gènes exprimé dans un seul type cellulaire.

Les banques génomiques sont construites par des méthodes de clonage.

4.1.1.1. Méthodes de construction d'une banque d'ADN génomiques

Le clivage de l'ADN génomique par des enzymes de restriction génère de nombreux fragments. L'insertion de ces fragments dans des vecteurs permet de constituer des banques d'ADN génomique, et dans ce cas ces banques contiennent la totalité du gène et peuvent donc permettre l'isolement de fragments non codants. La banque génomique contient donc toutes les séquences géniques (les exons) et les fragments non codants (les introns).

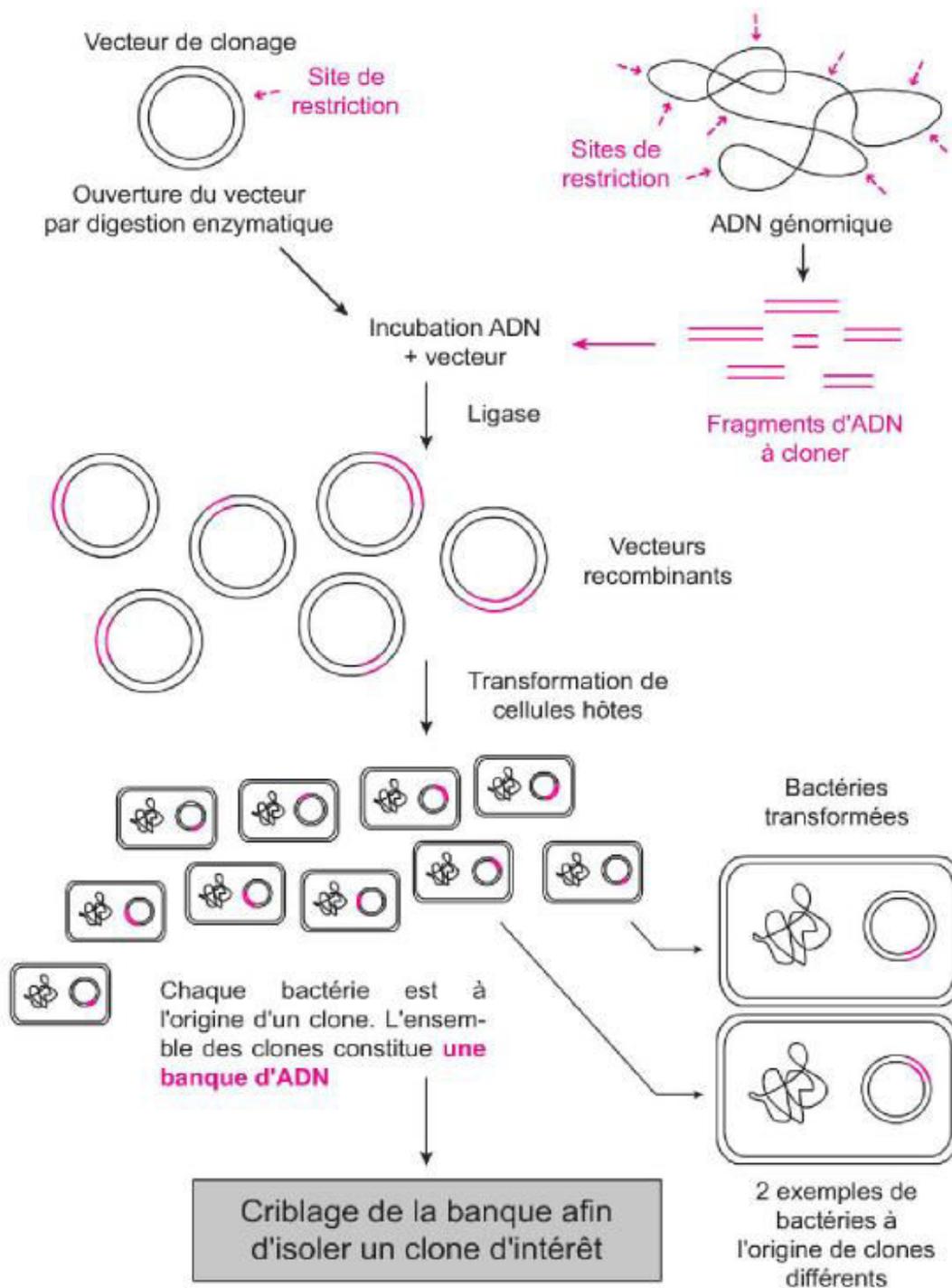


Figure 4.1. Les principales étapes de clonage.

Les fragments d'ADN génomique après digestion par des enzymes de restriction sont insérés dans des vecteurs plasmidiques. Chaque bactérie transformée par un plasmide qui contient un fragment d'ADN est sélectionnée par culture sur un milieu contenant un antibiotique elle est à l'origine d'un clone bactérien.

4.1.1.2. Banque d'ADNc : ADNc (ADN complémentaire)

Un autre type de banque, **une banque d'ADNc**, ne contient que les séquences d'ADN qui sont exprimés dans un tissu donné ; c'est à dire qui sont transcrites en **ARNm**.

L'ADNc ou l'ADN complémentaire, est préparé à partir de l'ARNm qui est d'abord converti en ADN, puis cloné dans des bactéries.

L'ADN simple brin est artificiellement synthétisé à partir des ARNm, il est obtenu après une réaction de transcription inverse d'un ARN mûre et représente ainsi la copie de l'ARNm. Cette synthèse est assurée par une enzyme nommée « **la transcriptase réverse** ».

La transcriptase inverse (ou reverse) est une enzyme isolée des rétrovirus est capable de catalyser la synthèse d'une chaîne d'ADN à partir d'une matrice d'ARN. L'ADNc offre l'immense avantage d'être plus stable que la molécule d'ARNm et de pouvoir être copié et stocké. Les ADN complémentaires proviennent des ARNm et donc ne possèdent pas d'introns. Les ADNc insérés dans des vecteurs constituent une banque d'ADNc.

4.1.1.2.1. Méthodes de construction d'une banque d'ADNc

Préparation d'une banque d'ADNc à partir d'ARNm :

L'ADNc (ADN complémentaire) est une copie d'ADN double brin d'un ARNm.

Une banque d'ADNc est une collection d'ADNc recombinant (cloné dans des vecteurs), **cette collection contient toutes les séquences codantes des protéines exprimées dans un tissu donné.**

La méthode de construction d'une banque ADNc consiste à :

- Extraire l'ARNm à partir des cellules. Quand l'ARNm a une origine eucaryote, son extrémité 3'OH est généralement polyadénylée.
- Purifier l'ARN messager qui sera ensuite transcrit en ADN complémentaire (ADNc) par une transcriptase inverse.
- L'enzyme virale utilise une chaîne d'ARNm comme matrice pour la synthèse d'une chaîne d'ADN complémentaire, dont des amorces poly -T sont utilisées et qui s'hybrident à la queue poly -A qui se trouve à l'extrémité 3' de l'ARNm, l'élongation de la chaîne d'ADN forme ainsi un hybride ADN/ARN.
- Le traitement de l'hybride ADN/ARN avec une **ribonucléase spécifique (ARNase H)**
- **L'ARNase H crée des trous en digérant partiellement l'ARNm.** Les fragments d'ARN restant **servent d'amorce à l'ADN polymérase I.** (cette situation est similaire à la synthèse du brin retardé chez les procaryotes). L'ADN polymérase I synthétise le second brin d'ADN et élimine les amorces d'ARN, elle produit ainsi un ADNc double brin
- L'ajout de ligase
- Protection de cet ADNc contre les enzymes de restriction par méthylation des sites de restriction (comme cet ADNc peut comporter des sites de restriction).
- Dans certains cas, de courtes séquences, appelées **adaptateurs**, **possédant un site de restriction** sont ajoutées à chaque extrémité du fragment d'ADN, afin de **générer des extrémités cohésives permettant l'insertion dans le vecteur.**
- Introduction des vecteurs dans les cellules hôtes.

Les ADN complémentaires (ADNc) double brin insérés dans des vecteurs constituent ainsi une banque d'ADNc.

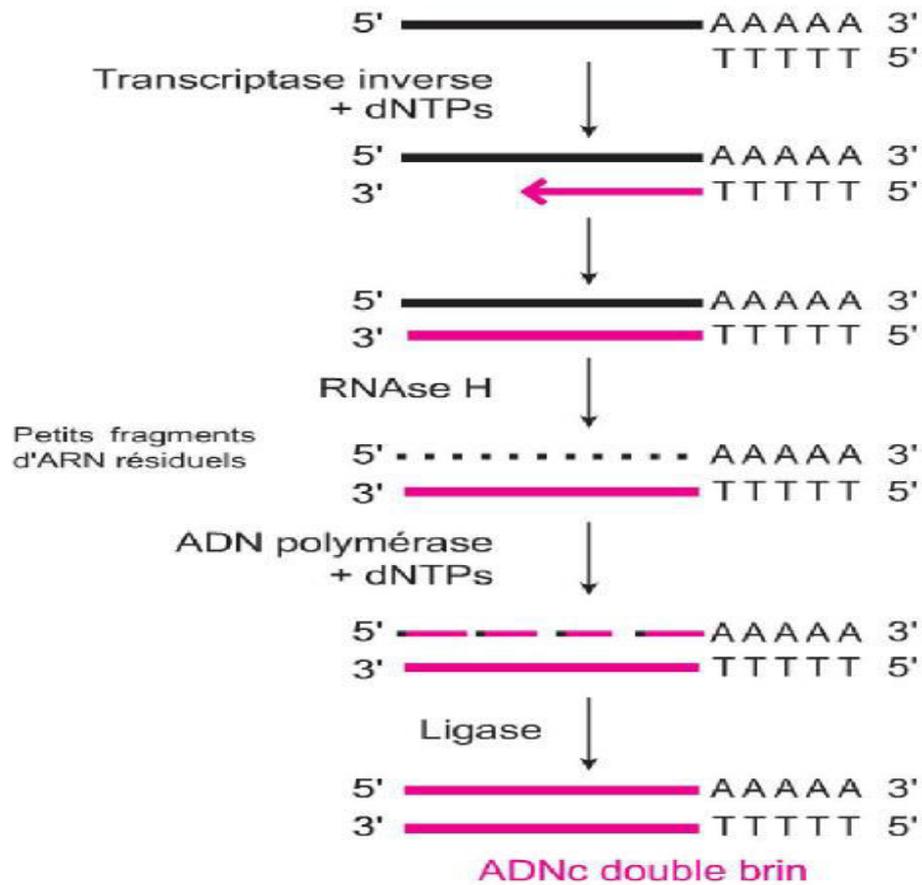


Figure 4.2. Synthèse d'un ADN complémentaire à partir d'un ARNm polyadénylé.

Noter le rôle de la RNase H qui dégrade l'ARN de l'hétéroduplex ADNARN.

La synthèse du 2 brin d'ADN peut s'effectuer à partir des petits fragments d'ARN résiduels. En noir l'ARNm, et en rose l'ADN.

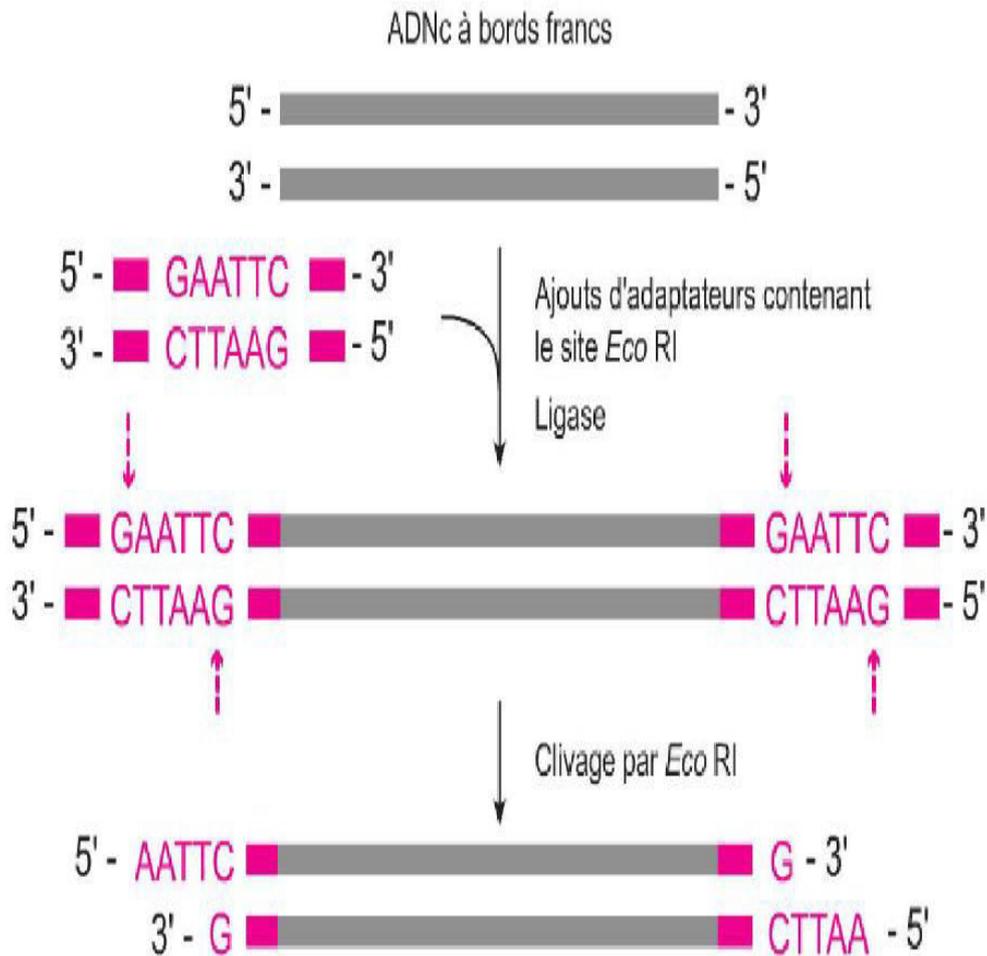
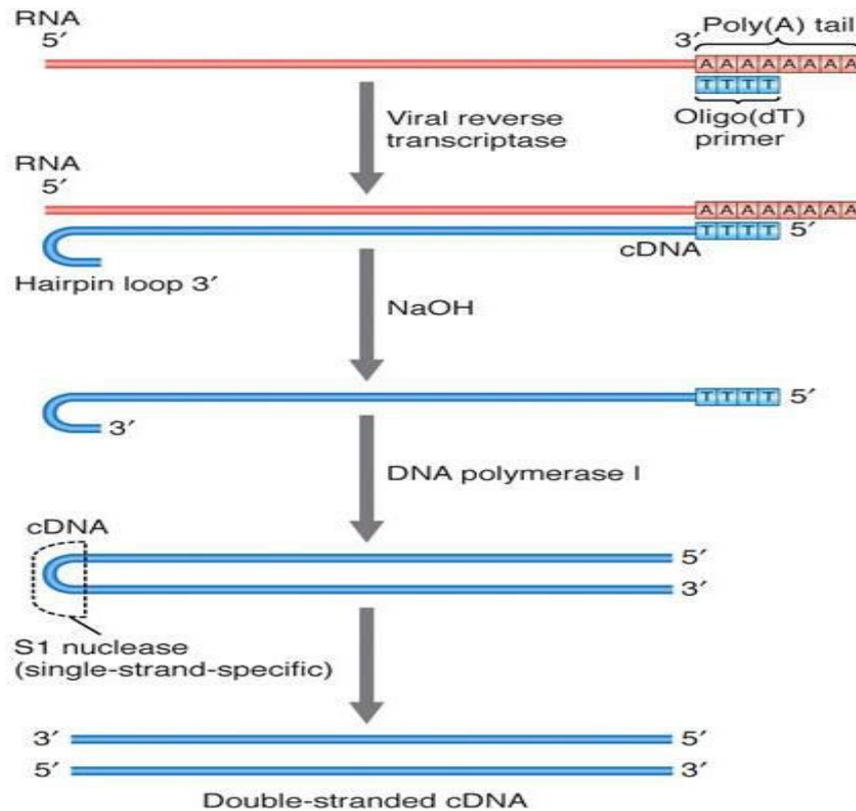


Figure 4.3. Addition d'adaptateurs à des fragments d'ADN à bords francs et production d'un ADN à bords décalés.

Des adaptateurs peuvent être ajoutés aux extrémités de l'ADNc pour faciliter le clonage d'extrémités cohésives.

Nb :

La matrice d'ARNm peut être détruite en milieu alcalin, l'épingle à cheveux du l'ADNc restant sert d'amorce à la synthèse d'un brin complémentaire par l'ADN polymérase I. La boucle est alors enlevée par une enzyme appelée **nucléase S1** pour produire une molécule bicaténaire d'ADNc



Hairpin loop 3' : Boucle en épingle à cheveux

Single-strand-specific : spécifique des simples brins

Double – stranded cDNA : ADNc bicaténaire

Le choix de **créer une banque d'ADN génomique ou d'ADNc** dépend des questions qui sont à résoudre. Pour la recherche de **la séquence codante d'un gène qui s'exprime spécifiquement dans un tissu**, il s'avérera judicieux **d'extraire les ARNm** de ce tissu et de fabriquer la banque d'ADNc correspondante. Si l'on veut par contre **connaître la structure complète du gène y compris les régions régulatrices non codantes**, il est indispensable de s'adresser à l'ADN génomique.

Technique de PCR conventionnelle : (Polymerase Chain Reaction)▪ **Principe de la technique :**

La réaction de polymérisation en chaîne ou la PCR « Polymerase chain reaction ») est une technique de réplique ciblée in vitro, consiste à **amplifier spécifiquement** un fragment d'ADN de **longueur définie** et permet d'obtenir une **quantité importante d'une séquence précise** d'ADN en utilisant un couple d'amorce **spécifique** (sens, anti sens).

○ **Amorce**

En biologie moléculaire, l'amorce est une courte séquence d'ADN (ou ARN), complémentaire du début d'une matrice, servant de point de départ à la synthèse du brin complémentaire de cette dernière matrice par une ADN polymérase. Les amorces sont des copies homologues des extrémités de la séquence à copier.

▪ **Protocole de la PCR standard :**

Préparer le mélange réactionnel pour la PCR **juste avant l'emploi**. Ce mélange contient les composants suivants (tableau N° 02) :

Tableau 4.1 : Composition du mélange réactionnel pour la PCR standard

Composants	Quantité
Quantitect Probe PCR Master Mix Qiagen	12.5µl
H ₂ O ultra pure	6.5 µl
Amorce sens	0.5 µl
Amorce antisens	0.5 µl
Volume total	20 µl

Puis en ajoutant 5 μ l de l'ADN (Volume total=25 μ l).

Le Quantitect Probe PCR Master Mix Qiagen comporte les éléments suivants: des désoxynucléotides triphosphates (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), une ADN polymérase thermorésistante (la Taq polymérase) et du magnésium (Mg^{++}).

La réaction se produit dans un petit appareil « thermocycleur » qui est capable de changer la température et de passer de 95°, température qui dissocie l'ADN, à 55 °C, température qui permet aux amorces de s'hybrider et enfin à 72 °C, température qui permet à la polymérase d'avoir son action optimale.



Figure 4.4. Thermocycleur

La PCR s'effectue par une série de cycles, entre 20 et 40 cycles, à la fin du premier cycle le nombre de brins obtenu est le **double** du nombre de brins initialement présents, un cycle se déroule en trois étapes : dénaturation, hybridation de l'amorce, réplication.

- **Dénaturation** : l'ADN à amplifier est dénaturé à la chaleur, les deux brins se séparent et servent de matrice.

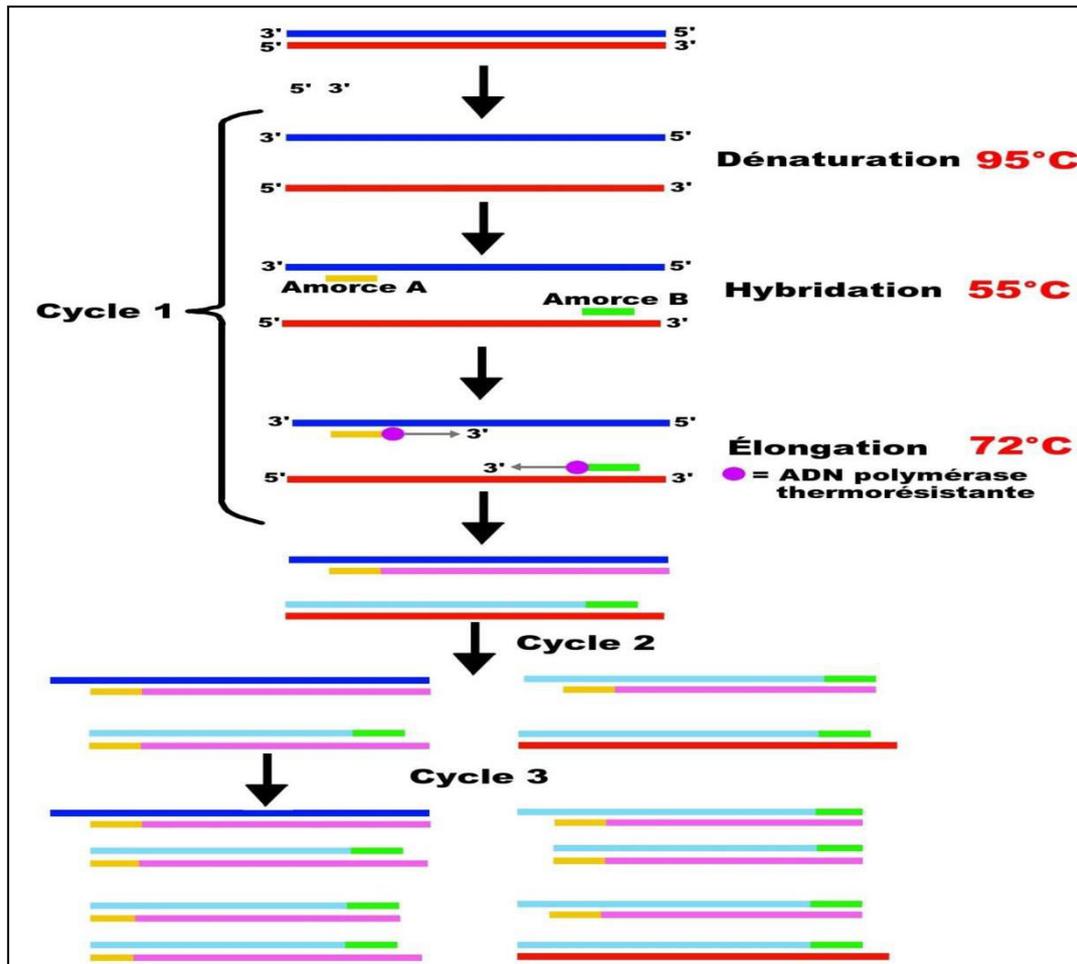


Figure 4.6. Amplification sélective in vitro (PCR)

4.1.2. Technique d'électrophorèse sur gel d'agarose:

Afin de vérifier la présence des gènes cibles, les produits de PCR obtenus sont examinés par électrophorèse sur gel d'agarose. Le gel d'agarose est une matrice qui permet de séparer les fragments d'ADN amplifiés selon leur taille, sous l'effet d'un champ électrique. Les petits fragments migrent plus vite que les grands, la concentration d'agarose est choisie en fonction du poids moléculaire des fragments à séparer.

La détection des bandes peut se faire à l'aide de bromure d'éthidium (composé organique fluorescent qui se lie aux acides nucléiques, c'est un produit toxique et mutagène utilisé comme marqueur moléculaire).

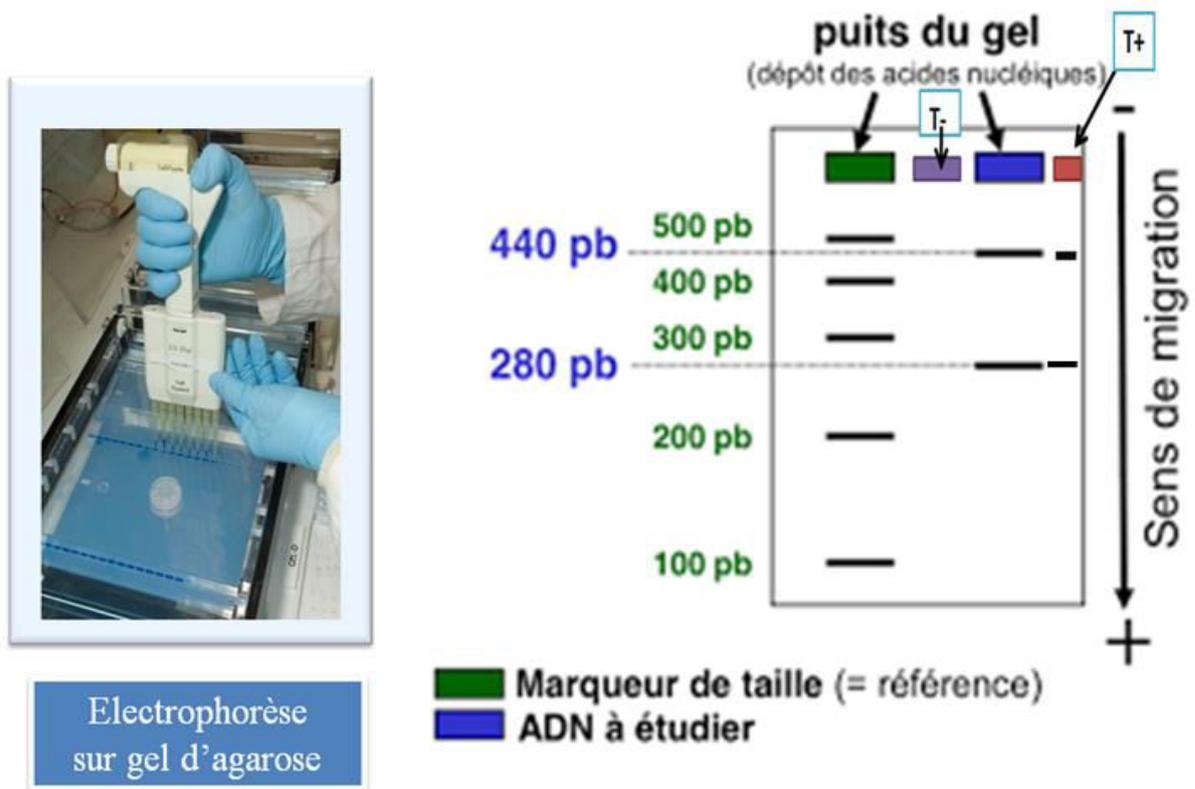


Figure 4.7. Électrophorèse sur gel d'agarose

Après la migration électro-phorétique, le gel est placé dans l'appareil d'imagerie à UV pour la visualisation des bandes. La présence de la bande correspond au segment d'ADN amplifié. La taille du fragment est comparée avec le marqueur de taille et avec le témoin positif.

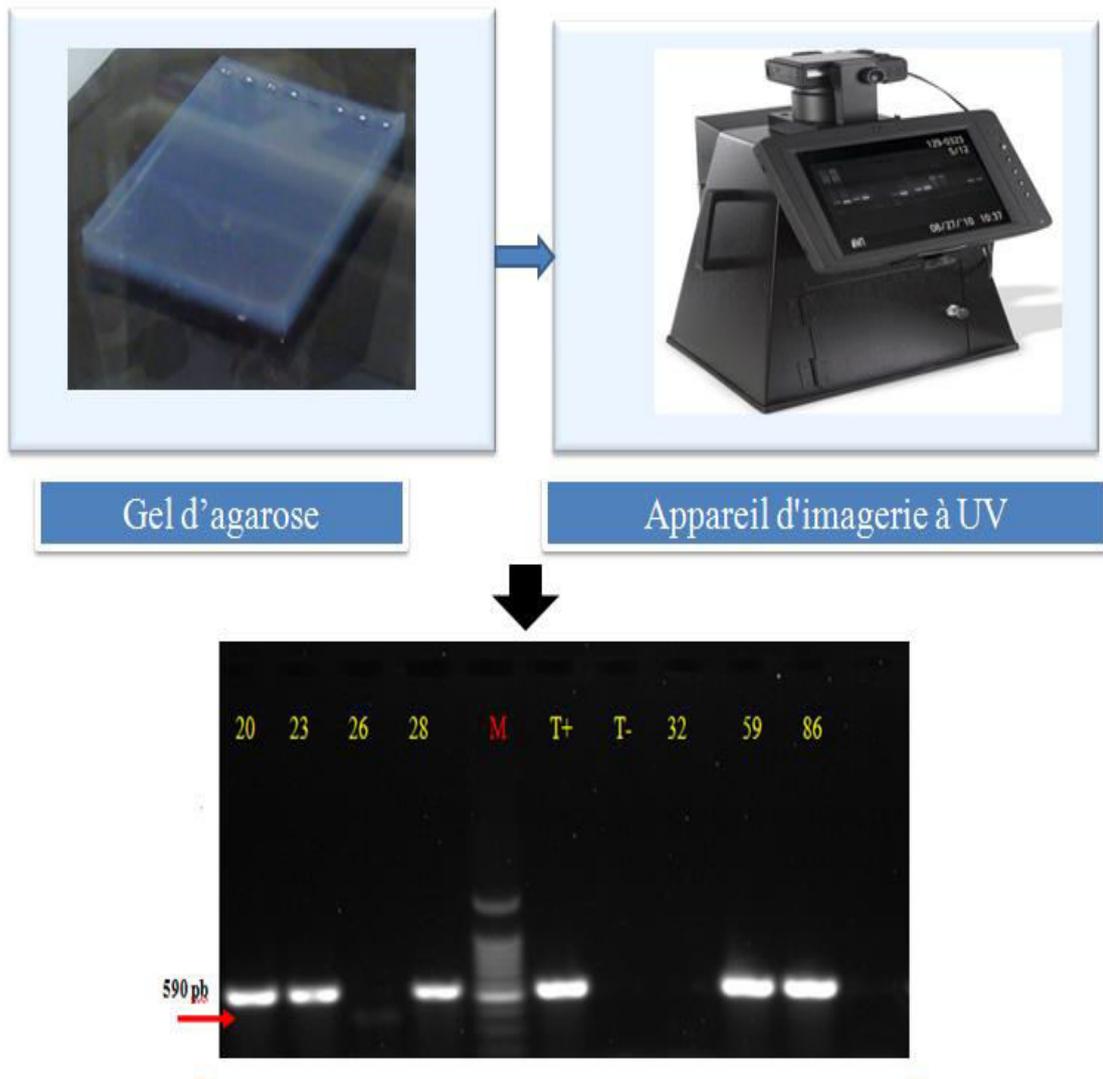


Figure 4.8. Gel d'agarose des produits de PCR

4.2. PCR quantitative (ou qPCR ou PCR en temps réel) :

La PCR en temps réel utilise le principe de base de la PCR classique (amplification cyclique d'un fragment d'ADN, basée sur une réaction enzymatique) avec pour différence une amplification détectée non à la fin de la réaction mais tout au long de la réaction, donc en temps réel.

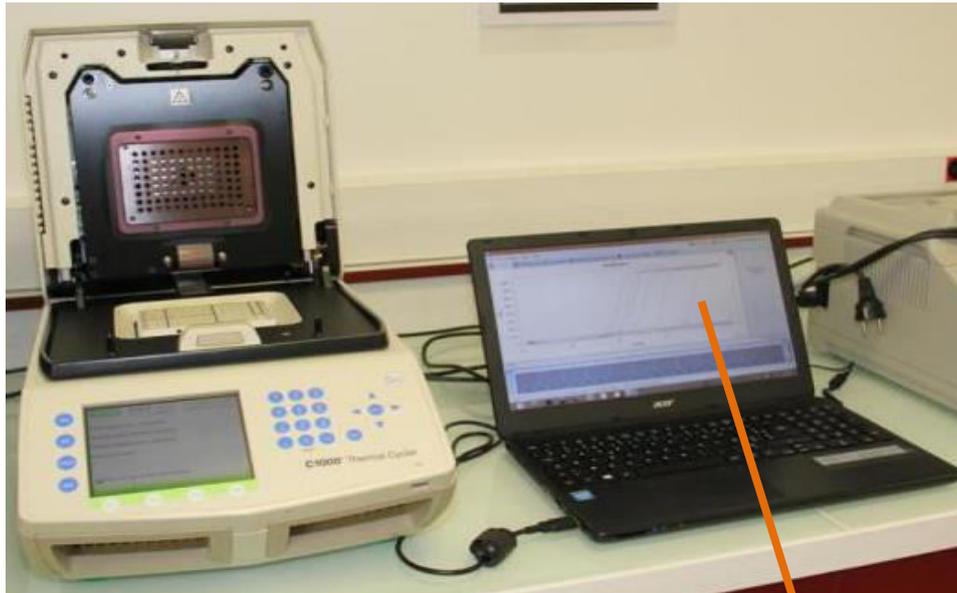
Le principe de la PCR en temps réel repose sur la possibilité de suivre la quantité d'ADN présente dans la réaction à tout instant (et non à la fin de la PCR ou au cycle $n < 40$), à l'opposé de la PCR conventionnelle où les amplicons ne sont détectés qu'à la toute fin du processus.

La PCR en temps réel (Real Time PCR, RT-PCR) permet donc de suivre en continu (« en temps réel ») le processus d'amplification PCR en détectant la fluorescence émise par les produits de PCR néo formés. L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR (Le nombre de produits amplifié double à chaque cycle).

Tableau 4.2 : Composition du mélange réactionnel pour PCR en temps réel

Composants	Quantité PCR en temps réel
Quantitect Probe PCR Master Mix	10 μ l
Amorce Forward	0.5 μ l
Amorce Reverse	0.5 μ l
Sonde★	0.5 μ l
ADN à amplifier	5 μ l
H2O UP	3,5 μ l
Volume total	20 μ l

La PCR en temps réel peut se faire dans un appareil particulier qui permet de visionner en temps réel la synthèse des fragments d'ADN. Pour cela, des molécules fluorescentes (sondes) qui se fixent sur l'ADN sont utilisées. Les sondes fluorescentes permettent la visualisation de l'amplicon.



L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR

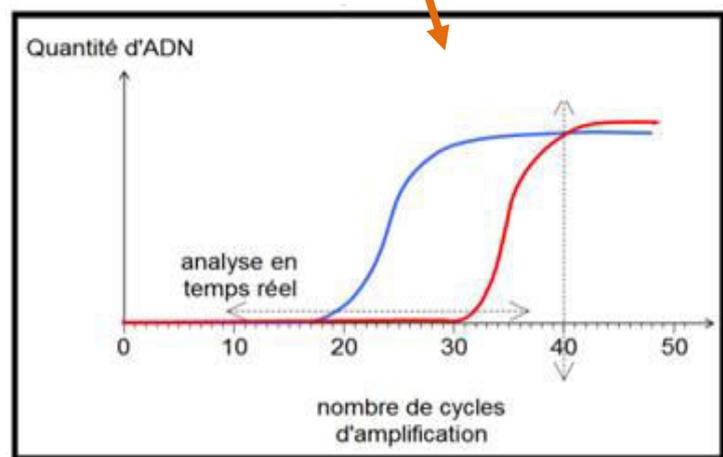


Figure 4.9. PCR en temps réel

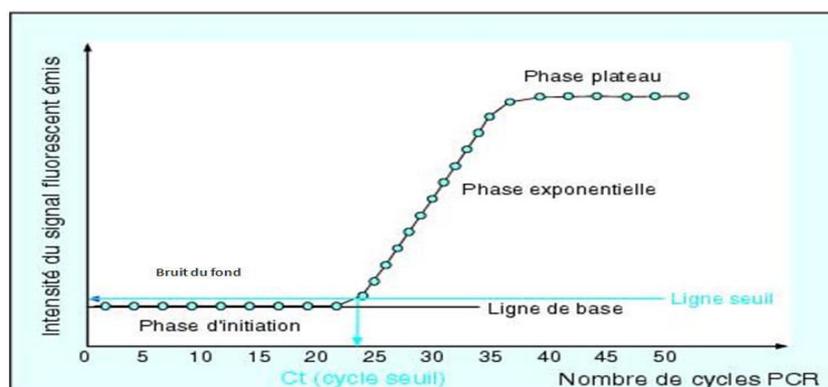


Figure 4.10. Courbe de la PCR en temps réel

L'émission de fluorescence est apparue directement en temps réel par un système de lecture intégré à l'appareil de PCR en temps réel qui permet de suivre l'augmentation de la quantité d'ADN amplifié durant la réaction.

Cette courbe montre le profil d'une réaction PCR quantitative qui peut se décomposer en 3 étapes :

- une première étape dite de bruit de fond : la quantité de fragment amplifié est insuffisante pour générer un signal fluorescent supérieur au bruit de fond. C'est à dire que la quantité de fragment amplifié est au dessous de la capacité de détection de l'appareil
- une seconde étape dite phase exponentielle d'amplification: la quantité de fragment amplifié génère un signal fluorescent supérieur au seuil de détection de l'appareil, dont le nombre de produits amplifié double à chaque cycle. Donc dans cette phase la quantité de fragment amplifié est suffisante pour génère un signal fluorescent détectable par l'appareil
- une dernière étape dite phase de plateau : les constituants présents dans le mélange réactionnel sont en quantité limitée. Il arrive donc un moment où il n'y a plus assez d'amorces et/ou plus assez de nucléotides (dNTPs), ou même de molécules de Taq disponibles pour que la réaction de synthèse d'ADN puisse continuer à se dérouler de manière exponentielle.
- Le Ct (en l'anglais Cycle Threshold pour « cycle du seuil ») correspond au point seuil pour lequel le signal de fluorescence est significativement supérieur au bruit de fond, c'est-à-dire correspond au nombre de cycles minimal pour lequel l'ADN amplifié est détectable.

Chapitre 5

Détermination des séquences des acides
nucléiques, banques d'ADN génomique et
d'ADNc

5.1. Détermination des séquences des acides nucléiques

La caractérisation fine d'un gène passe par son séquençage, c'est-à-dire par la connaissance du nombre, de la nature et de l'ordre des nucléotides qui le composent. Cet agencement permet de connaître par exemple l'emplacement des différents sites de restriction du gène afin de mieux le manipuler.

5.1.1. Méthode de Sanger :

La méthode de séquençage a été développée par Fred Sanger au milieu des années 70. Cette méthode **dite** des **terminateurs didésoxy**, qui est rapidement devenue la méthode standard de séquençage de fragments d'ADN purifiés.

Le séquençage consiste à déterminer les bases nucléotidiques et l'ordre d'enchaînement de ces nucléotides pour un fragment d'ADN donné. Il permet également de déterminer la taille de fragment d'ADN ciblé.

Principe de la méthode :

La méthode de Sanger consiste, dans son principe à synthétiser un fragment de l'ADN que l'on souhaite séquencer à partir d'une amorce dont une extrémité est marquée radioactivement (rouge) (voir figure ci-dessous) et à interrompre de façon aléatoire cette synthèse au moyen de ddTTP, ddATP, ddCTP et ddGTP marqués.

Cette méthode consiste à préparer quatre mélanges réactionnels. Chaque mélange réactionnel comporte : amorce marquée ; Taq polymérase ; les nucléotides et un des 4 ddntp marqués.

❑ Différence entre dNTP et ddNTP :

La différence entre dNTP et ddNTP réside au niveau de leur extrémité 3'. L'extrémité 3'OH des ddNTP est changée par une extrémité 3'H. Cette modification inhibe la formation de la liaison phosphodiester entre le ddNTP intégré dans la chaîne du brin néo-synthétisé et le nucléotide suivant, l'élongation de la chaîne est alors interrompue. L'introduction d'un ddNTP provoque donc l'arrêt de la synthèse.

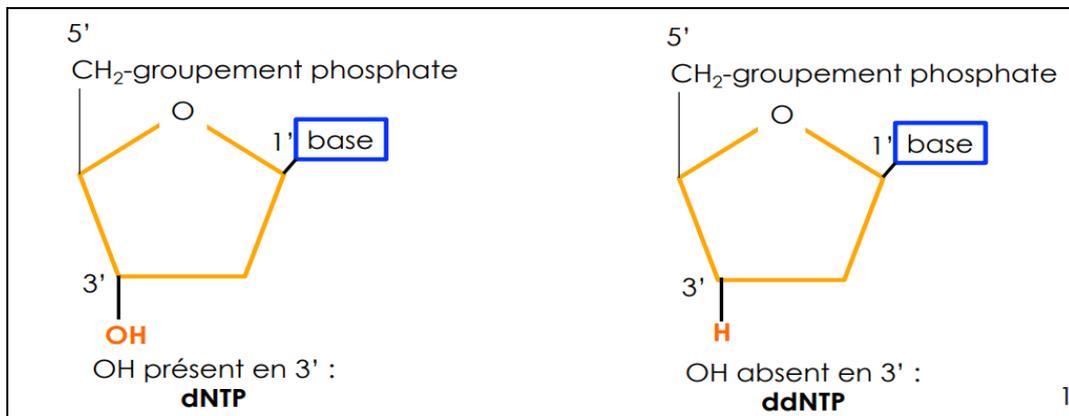
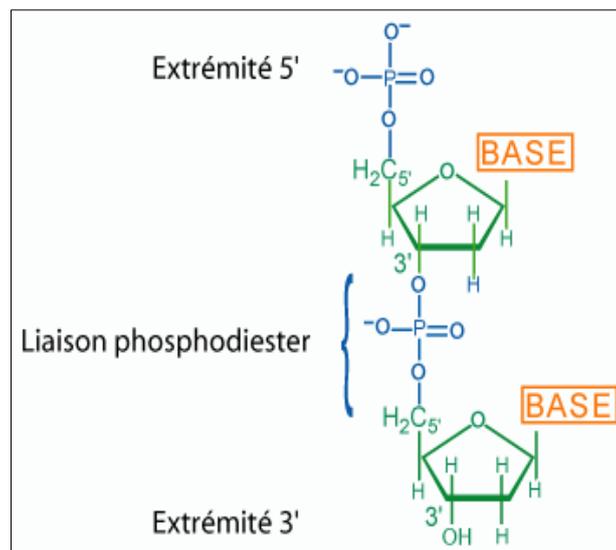


Figure 5.1. Structure de dNTP et ddNTP



Toutes les ADN polymérases synthétisent l'ADN dans le sens **5' → 3'**

Figure 5.2. Formation de la liaison phosphodiester

De simples électrophorèses permettront de lire la séquence comme indiqué dans la figure ci-dessous

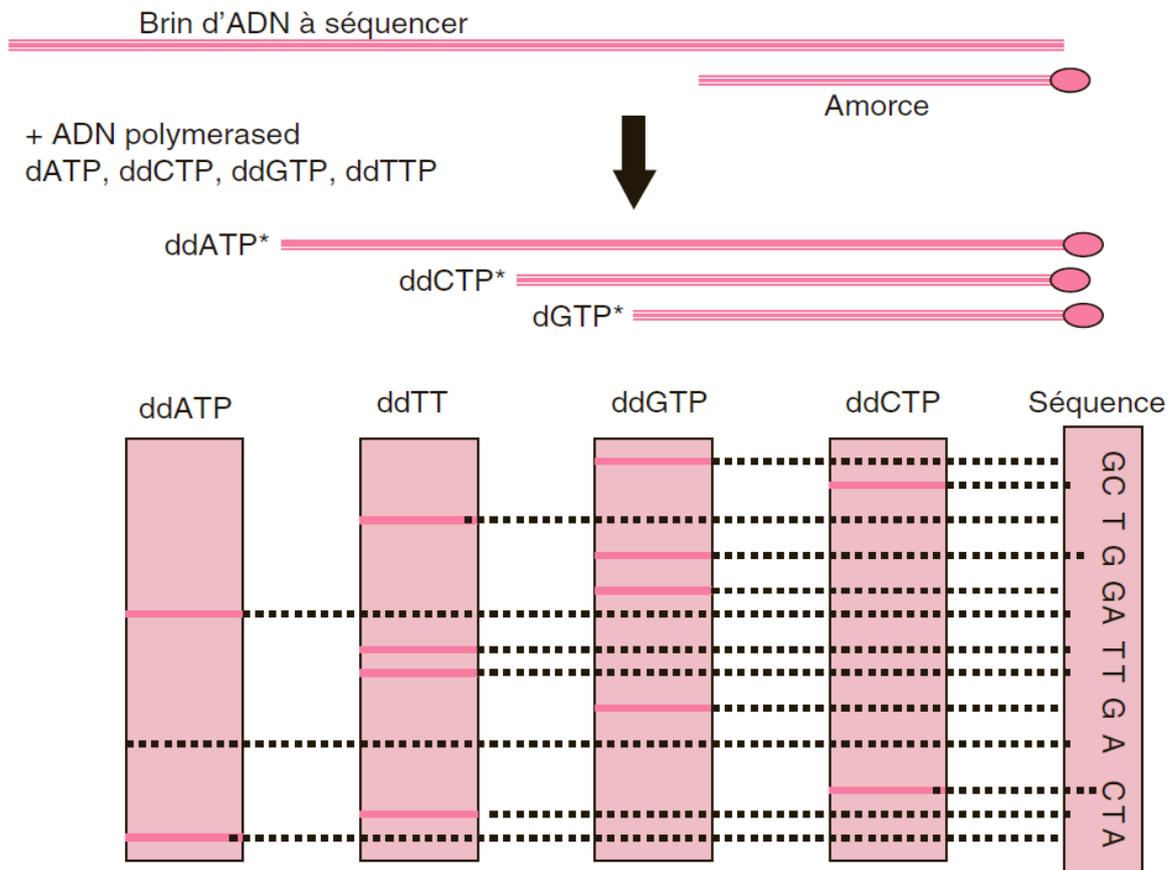


Figure 5.3. Séquençage de l'ADN selon Sanger

Principe du séquençage utilisant des didésoxynucléotides

(ddA, ddT, ddC, ddG)

▣ Protocol de la méthode de Sanger:

Bien que le séquençage d'une unique molécule d'ADN soit techniquement possible, la plupart des méthodes de séquençage courantes nécessitent une assez grande quantité d'ADN, et tout fragment à séquencer doit d'abord être amplifié par PCR ou par clonage dans une bactérie.

L'ADN purifié est réparti dans quatre tubes, dans lesquels on ajoute : une amorce marquée, l'ADN polymérase thermorésistante, les quatre dNTP qui sont les substrats

normaux de la synthèse d'ADN ; une petite quantité d'un des quatre ddNTP marqués suivants : ddATP, ddCTP, ddGTP ou ddTTP.

L'amorce (ou l'un des quatre dNTP) est radioactive ou marquée, pour permettre de détecter l'ADN nouvellement synthétisés dans le gel.

À la fin de la réaction de polymérisation, chaque tube contient des fragments d'ADN de taille variable, correspondant à l'arrêt de la synthèse pour chacun des sites d'incorporation du ddNTP spécifique du tube.

En séparant sur gel de polyacrylamide les fragments d'ADN de chaque réaction de polymérisation, il est possible de déduire la séquence du fragment d'ADN initial.

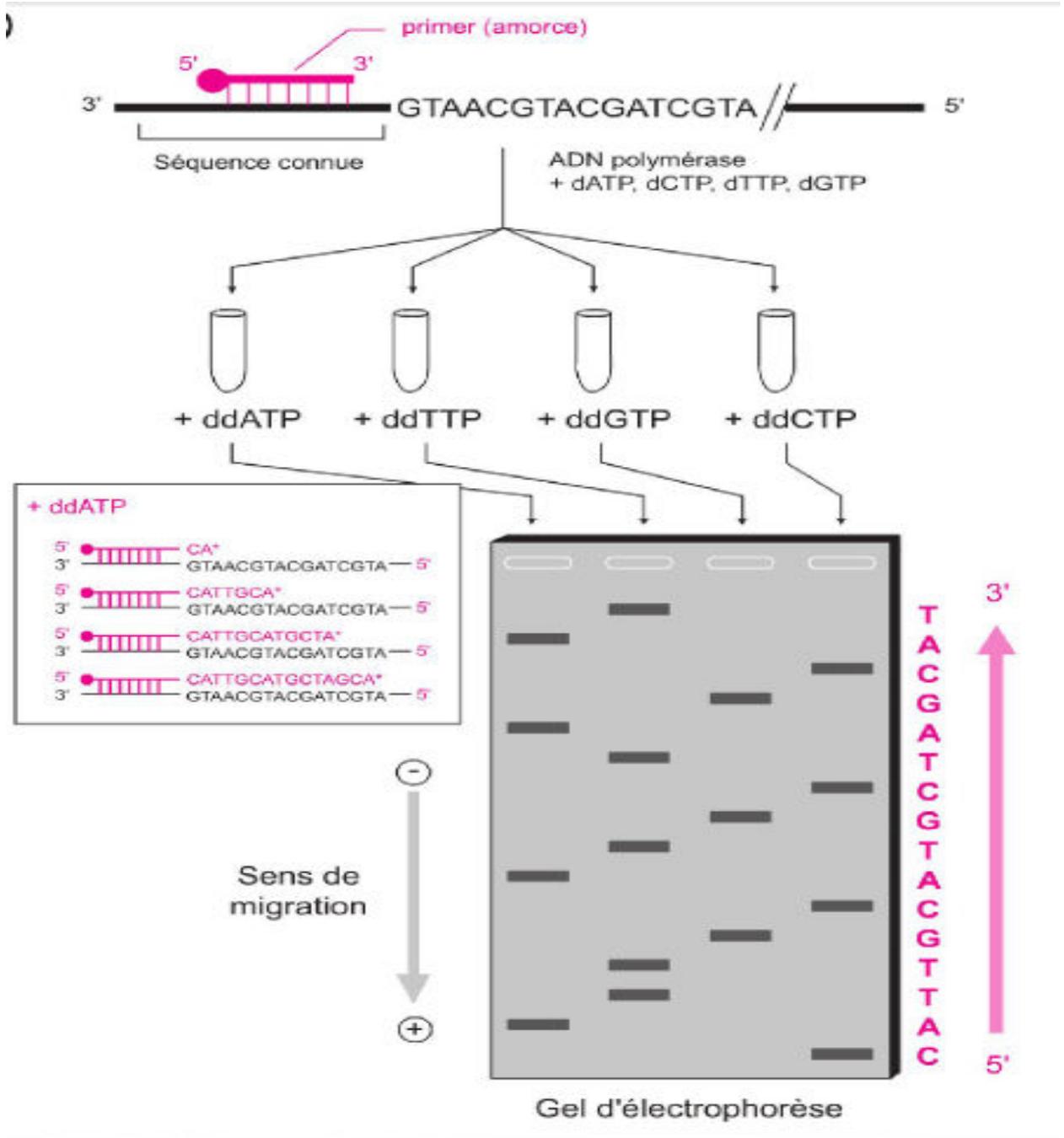


Figure 5.4. Principe du séquençage de l'ADN selon la méthode de Sanger en présence des 4 ddNTP

5.1.2. Méthode de Séquençage automatisé :

(Méthode de Sanger modifiée)

Pendant de nombreuses années, le séquençage s'est fait manuellement ; il s'agissait d'une opération laborieuse. Aujourd'hui, de **puissants séquenceurs automatiques** sont capables d'effectuer ce travail en routine. Ces séquenceurs automatisés utilisent un **marquage fluorescent** et de **scanner à laser** ; ils permettent de séquencer des milliers de paires de bases en quelques heures.

Le séquençage automatique est une adaptation de la technique de Sanger qui utilise la **fluorescence** à la place de la **radioactivité**.

Les séquenceurs automatisés déterminent la séquence nucléotidique d'un ADN inconnu par la séparation automatisée des divers fragments au sein d'un capillaire rempli de gel et la lecture directe, à l'aide d'un faisceau laser, des signaux de fluorescence émis par les différents ddNTP eux-mêmes.

Comme chaque type de ddNTP est marqué avec un colorant fluorescent différent, les quatre réactions peuvent avoir lieu dans un même tube.

Ce type de séquençage est dit à haut débit car de nombreuses séquences peuvent être réalisées dans le même temps. En effet, selon les modèles de séquenceurs, 1, 6, 12 voire 36 capillaires peuvent fonctionner en parallèle.

- **Protocol de séquençage :**

Le Protocol de réalisation de cette technique de séquençage repose sur les étapes suivantes :

1. **Réalisation d'une PCR conventionnelle** (Amplification sélective in vitro)
2. **Réalisation de l'électrophorèse sur gel d'agarose** : la présence des bandes indique la présence du gène recherché (Une quantité de produit de PCR est utilisée pour la révélation des bandes, et le reste de la quantité est nécessaire pour faire la **PCR terminateurs didésoxyfluoréscent** (**PCR dyeterminator** ou BigDye)
3. **Purification des produits de PCR standard** (c'est pour éliminer l'excès d'amorces, dNTP et d'ADN polymérase thermorésistant)
4. **Conserver les produits de PCR à une température de – 4 °C**

Procéder la PCR terminateurs didésoxyfluoréscent: Cette réaction consiste à amplifier le brin sens et anti-sens séparément pour pouvoir les séquencer par la suite. La Taq polymérase effectue l'élongation jusqu'à l'incorporation d'un didésoxynucléotide marqué par fluorescence.

Le mélange réactionnel de la PCR terminateurs didésoxyfluoréscent (**PCR dyeterminator**) pour chaque préparation sens ou anti-sens est composé des éléments suivants :

Tableau 5.1. Composition du mélange réactionnel pour la PCR dyeterminator

Composants	Quantité
Tampon	3 μ l
Mix	2 μ l
Amorce (sens ou anti-sens)	1 μ l
H ₂ O	10 μ l
Volume total	16 μ l

Deux mélanges réactionnels séparés doivent être préparés (un pour le brin sens et l'autre pour le brin anti-sens). Le mélange réactionnel de la PCR dyeterminator contient les éléments suivants : outre les tampons et l'ADN polymérase thermorésistant, des désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP: dATP, dCTP, dGTP, dTTP) mais aussi des didésoxynucléotides triphosphates fluoréscent (ddNTP: ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP).

Le mix de la PCR dyeterminator renferme donc quatre ddNTPs **didésoxynucléotidetriphosphates fluoréscent** (ddATP, ddCTP, ddGTP ou ddTTP) à **effet terminateur de chaîne**.

Un volume de 16 μ l du mélange réactionnel est mis dans chaque puits de la plaque de PCR, ajouter 4 μ l du produit PCR purifié, puis introduire la plaque dans le thermocycleur.

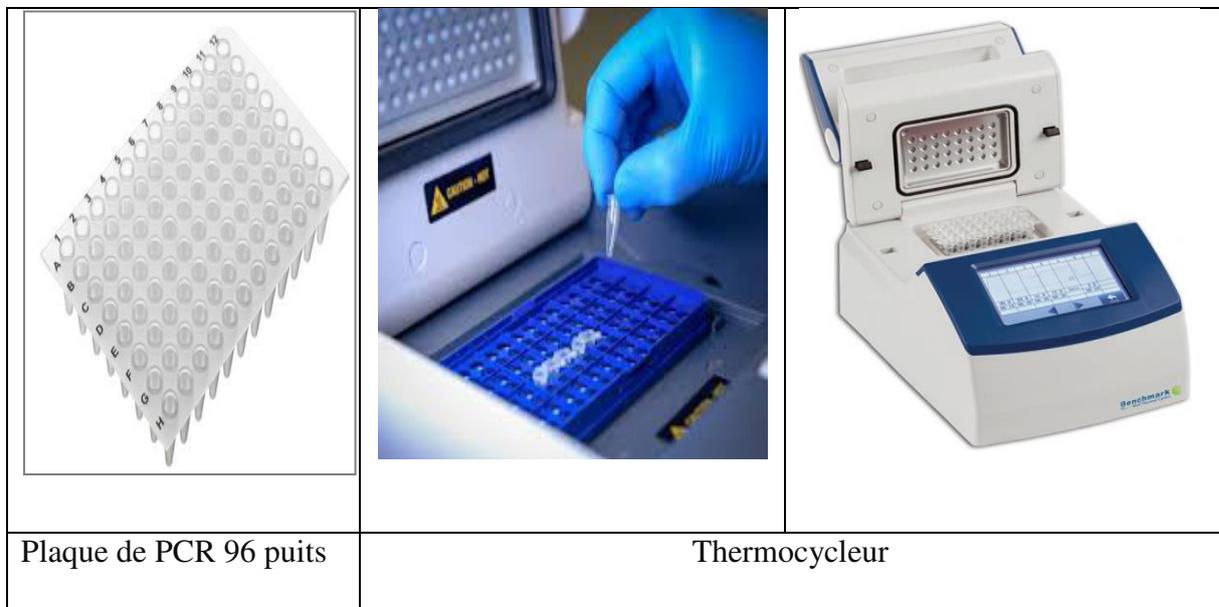


Figure 5.5. Plaque de PCR 96 puits –Thermocycleur

L'amplification pour la PCR terminateurs didésoxyfluoréscents est programmée en 25 cycles. Le programme est comme suit :

- Dénaturation initiale à 96°C pendant 5 minutes -
 - dénaturation à 95°C pendant 10 secondes,
 - Hybridation à 50°C pendant 5 secondes,
 - Elongation de l'ADN à 70°C pendant 3 minutes.
- } 25 cycles

La Taq polymérase commence l'élongation à partir de l'extrémité 3' de l'amorce hybridée. Elle ajoute des nucléotides complémentaires de ceux du brin de l'ADN qu'elle copie. Et comme les désoxynucléosides triphosphates normaux sont mélangés avec des faibles concentrations de didésoxynucléotidesfluoréscent dont l'extrémité 3'OH est changée par une extrémité 3'H. L'incorporation d'un ddNTP fluorescent (didésoxynucléotides triphosphates fluoréscent) empêche la synthèse de se poursuivre au-delà. C'est-à-dire que l'incorporation aléatoire d'un ddNTP à la place d'un dNTP ne permet plus la

polymérisation par l'ADN polymérase, l'extension s'arrête. Donc si une **base-stop** est insérée, la synthèse du fragment néo-synthétisé est interrompue.

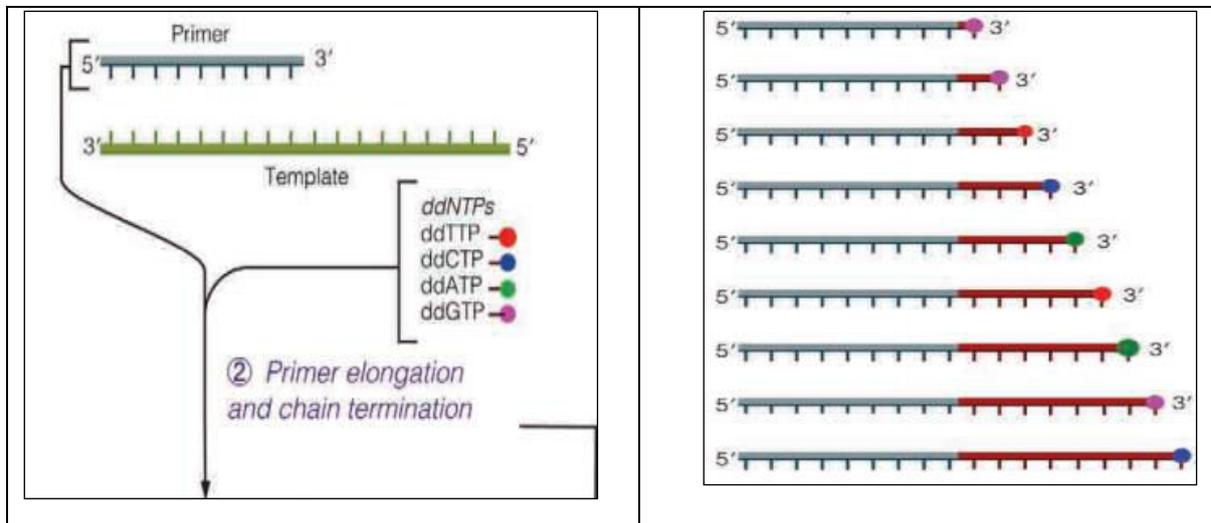


Figure 5.6. Elongation de la chaîne d'ADN

À la fin des cycles, le mélange contient donc des fragments de tailles différentes. Les didésoxynucléotides incorporés en dernier sont marqués spécifiquement par des molécules fluorescentes.

- **Purification des produits dePCR terminateurs didésoxyfluoréscents**
- **Séquençage et analyse des séquences :**

Placer la plaque de produit de PCR purifié dans le séquenceur automatisé. Les fragments de tailles différentes vont être séparés en fonction de leur taille **par une électrophorèse capillaire** comme dans le cas du gel dans la technique électrophorétique, **une suite de bases fluorescentes est alors obtenue** correspondre à l'ADN séquencé.

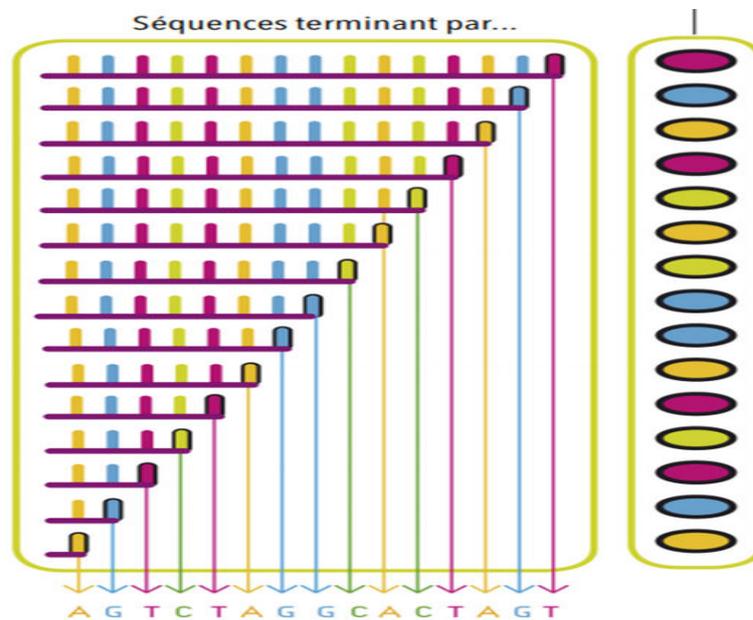


Figure 5.7. Migration des fragments par l'électrophorèse capillaire de séquenceur automatisé

Identification de la **base-stop** par détection de la fluorescence : si jaune, c'est un A, bleu c'est un G,...). Ces ddNTP marqués on les appelle des **terminateurs d'élongation** ou "BigDye Terminators"

Il est bien à noter que le séquenceur automatisé est équipé d'un système de révélation, ce système de révélation est conçu pour **détecter les derniers nucléotides pour chaque brin néo-synthétisé**. L'enregistrement et l'analyse spectrale de la fluorescence spécifique du ddNTP permettra alors d'assigner la base correspondante et de déterminer la séquence nucléotidique.

A la fin du séquençage on obtient des séquences nucléotidiques présentées sous forme d'un **chromatogramme** (Pic de couleur vert pour la base nucléotidique A, rouge pour T, bleu pour C et noir pour G).

Des logiciels bio-informatiques sont utilisés, tel que le logiciel codon code qui permet la correction des séquences ; dont il faut que chaque pic coloré correspond bien à la base identifiée en bas.

La séquence nucléotidique corrigée sera comparée par rapport à des séquences de références par blast au site de NCBI, les résultats sont ainsi exprimés en pourcentage d'homologie ou de similarité

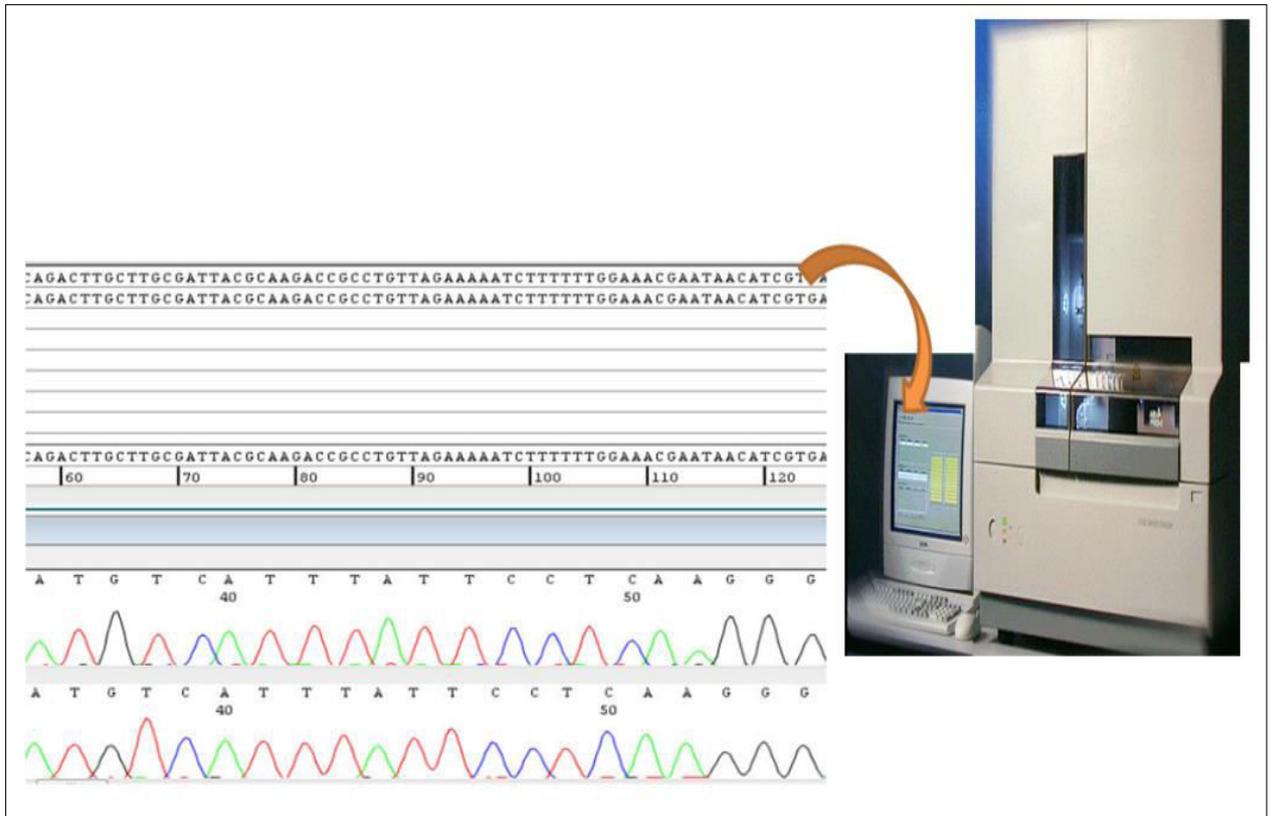


Figure 5.8. Résultat de séquençage

De nombreuses informations de séquence sont ainsi accumulées et cataloguées dans des banques de données informatiques, librement consultées par la communauté scientifique. Des comparaisons des séquences nucléotidiques permettent de déterminer si une séquence est déjà connue ou si, encore inconnue, elle appartient à une famille répertoriée.

5.2. Banques génomiques et d'ADNc :

5.2.1. Banque génomique :

Une collection de clones contenant tous les fragments d'ADN provenant d'une même source est appelée une banque d'ADN génomique. Nous pourrions, par exemple, isoler l'ADN génomique de cellules humaines, le fragmenter et cloner tous les fragments dans des cellules bactériennes ou dans des phages. La collection de plasmides, de cosmides, de cultures bactérienne ou de phages contenant ces fragments est une banque génomique, elle couvre en principe tout le génome humain.

Idéalement, une banque d'ADN génomique contient au moins une copie de toutes les séquences du génome d'un organisme. Les banques génomiques sont construites par des méthodes de clonage.

5.2.1.1. Méthodes de construction d'une banque d'ADN génomiques

Le clivage de l'ADN génomique par des enzymes de restriction génère de nombreux fragments. L'insertion de ces fragments dans des vecteurs permet de constituer des banques d'ADN génomique, et dans ce cas ces banques contiennent la totalité du gène et peuvent donc permettre l'isolement de fragments non codants. La banque génomique contient donc toutes les séquences géniques (**les exons**) et les fragments non codants (**les introns**).

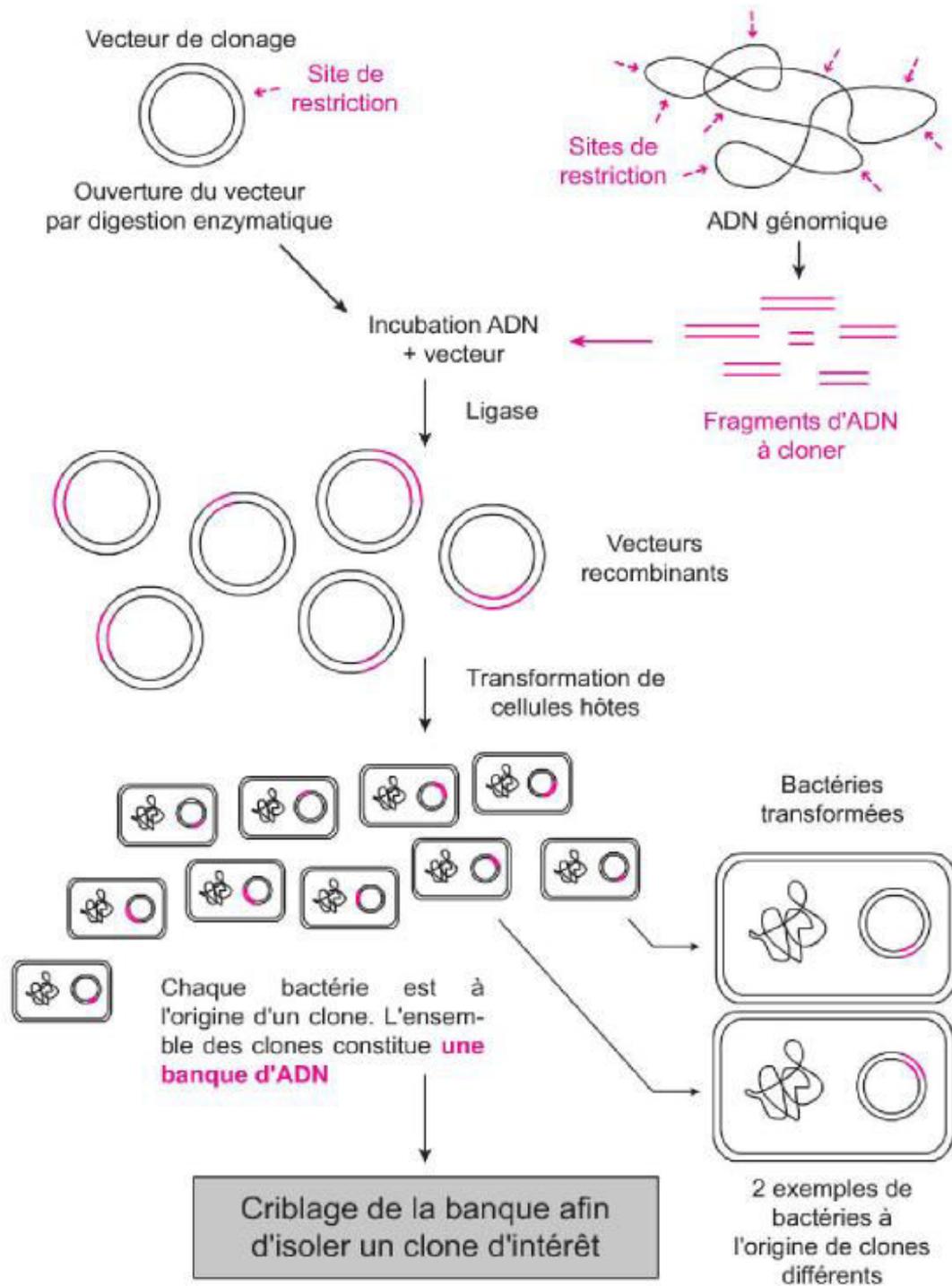
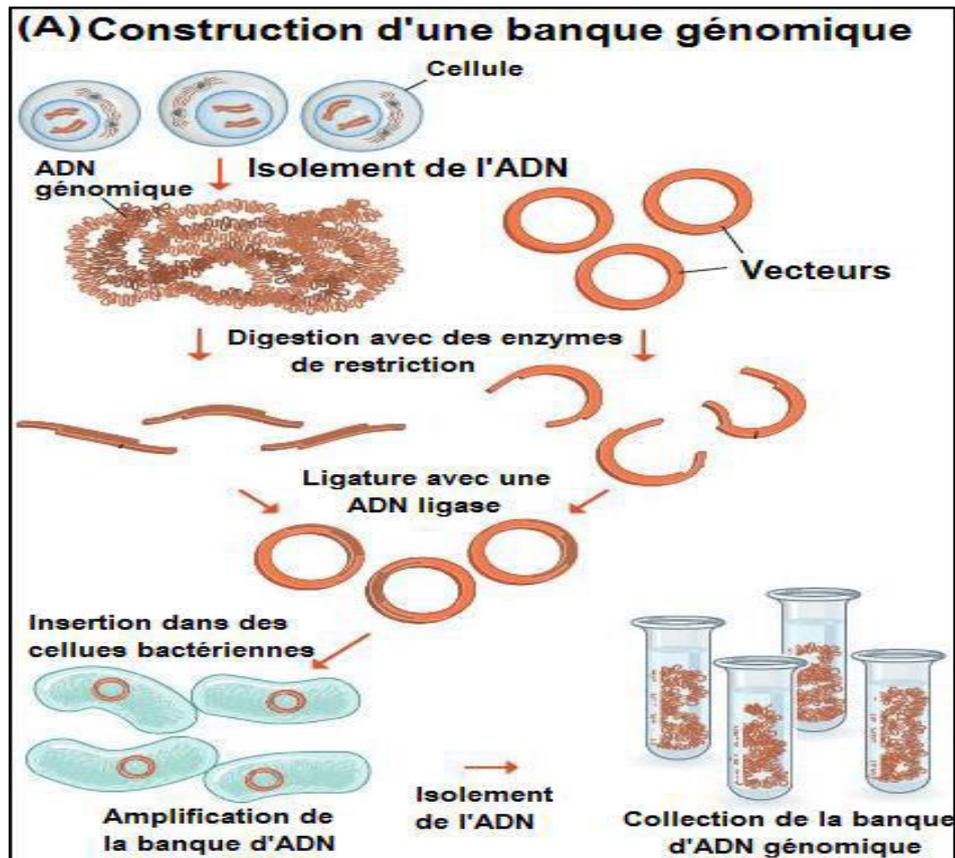


Figure 5.9. Les principales étapes de clonage.

Les fragments d'ADN génomique après digestion par des enzymes de restriction sont insérés dans des vecteurs plasmidiques. Chaque bactérie transformée par un plasmide qui contient un fragment d'ADN est sélectionnée par culture sur un milieu contenant un antibiotique elle est à l'origine d'un clone bactérien.



5.2.1.2. Banque d'ADNc : ADNc (ADN complémentaire)

Un autre type de banque, **une banque d'ADNc**, ne contient que les séquences d'ADN qui sont transcrites en **ARNm**. **L'ADNc ou l'ADN complémentaire, est préparé à partir de l'ARNm qui est d'abord converti ADN, puis cloné dans des bactéries.**

Les banques d'ADNc (**ADN complémentaire de l'ARNm**) elles ne représentent que l'ADN exprimé dans un tissu donné.

Une banque d'ADNc comprend un ensemble de clones représentant l'ensemble des ARNm d'un tissu déterminé après transcription inverse.

L'ADN simple brin est artificiellement synthétisé à partir des ARNm, il est obtenu après une réaction de transcription inverse d'un ARN mûre et représente ainsi la copie de l'ARNm. Cette synthèse est assurée par une enzyme nommée « **la transcriptase réverse** ».

La transcriptase inverse (ou reverse) est une enzyme isolée des rétrovirus est capable de catalyser la synthèse d'une chaîne d'ADN à partir d'une matrice d'ARN. L'ADNc offre l'immense avantage d'être plus stable que la molécule d'ARNm et de pouvoir être copié et stocké. Les ADN complémentaires proviennent des ARNm et donc ne possèdent pas d'introns. Les ADNc insérés dans des vecteurs constituent une banque d'ADNc.

5.2.1.2.1. Méthodes de construction d'une banque d'ADNc

✚ Préparation d'une banque d'ADNc à partir d'ARNm :

L'ADNc (ADN complémentaire) est une copie d'ADN double brin d'un ARNm.

Une banque d'ADNc est une collection d'ADNc recombinant (cloné dans des vecteurs), cette collection contient toutes les séquences codantes des protéines exprimées dans un tissu donné.

La méthode de construction d'une banque ADNc consiste à :

- Extraire l'ARNm à partir des cellules. Quand l'ARNm a une origine eucaryote, son extrémité 3'OH est généralement polyadénylée.
- Purifier l'ARN messager qui sera ensuite transcrit en ADN complémentaire (ADNc) par une transcriptase inverse.
- L'enzyme virale utilise une chaîne d'ARNm
- comme matrice pour la synthèse d'une chaîne d'ADN complémentaire, dont des amorces poly -T sont utilisées et qui s'hybrident à la queue poly -A qui se trouve à l'extrémité 3' de l'ARNm, l'élongation de la chaîne d'ADN forme ainsi un hybride ADN/ARN.
- Le traitement de l'hybride ADN/ARN avec une ribonucléase spécifique (ARNas H)

- L'ARNasH crée des trous en digérant partiellement l'ARNm. Les fragments d'ARN restant servent d'amorce à l'ADN polymérase I. (cette situation est similaire à la synthèse du brin retardé chez les procaryotes). L'ADN polymérase I synthétise le second brin d'ADN et élimine les amorces d'ARN, elle produit ainsi un ADNc Double brin
- Protection de cet ADN contre les enzymes de restriction par méthylation des sites de restriction (comme cet ADN peut comporter des sites de restriction).
- Dans certains cas, de courtes séquences, appelées adaptateurs, possédant un site de restriction sont ajoutées à chaque extrémité du fragment d'ADN, afin de générer des extrémités cohésives permettant l'insertion dans le vecteur.
- Introduction des vecteurs dans les cellules hôtes.

Les ADN complémentaires (ADNc) double brin insérés dans des vecteurs constituent ainsi une banque d'ADNc.

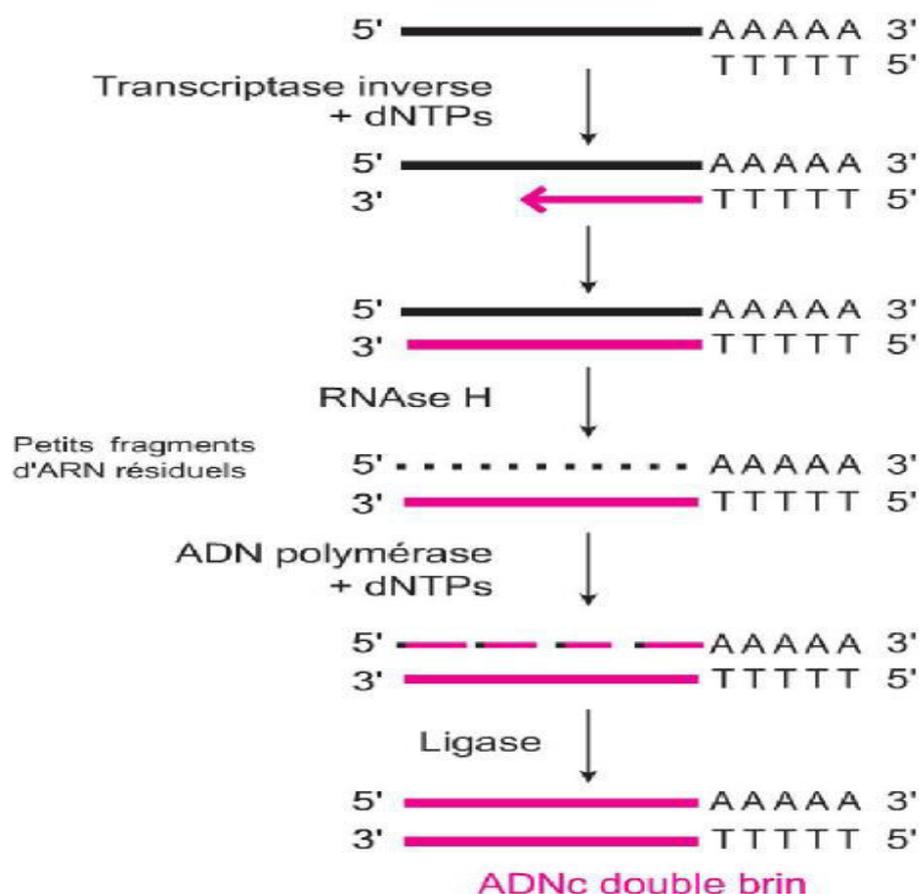


Figure 5.10. Synthèse d'un ADN complémentaire à partir d'un ARNm polyadénylé.

Noter le rôle de la RNase H qui dégrade l'ARN de l'hétéroduplex ADNARN.

La synthèse du 2^e brin d'ADN peut s'effectuer à partir des petits fragments d'ARN résiduels. En noir l'ARNm, et en rouge l'ADN.

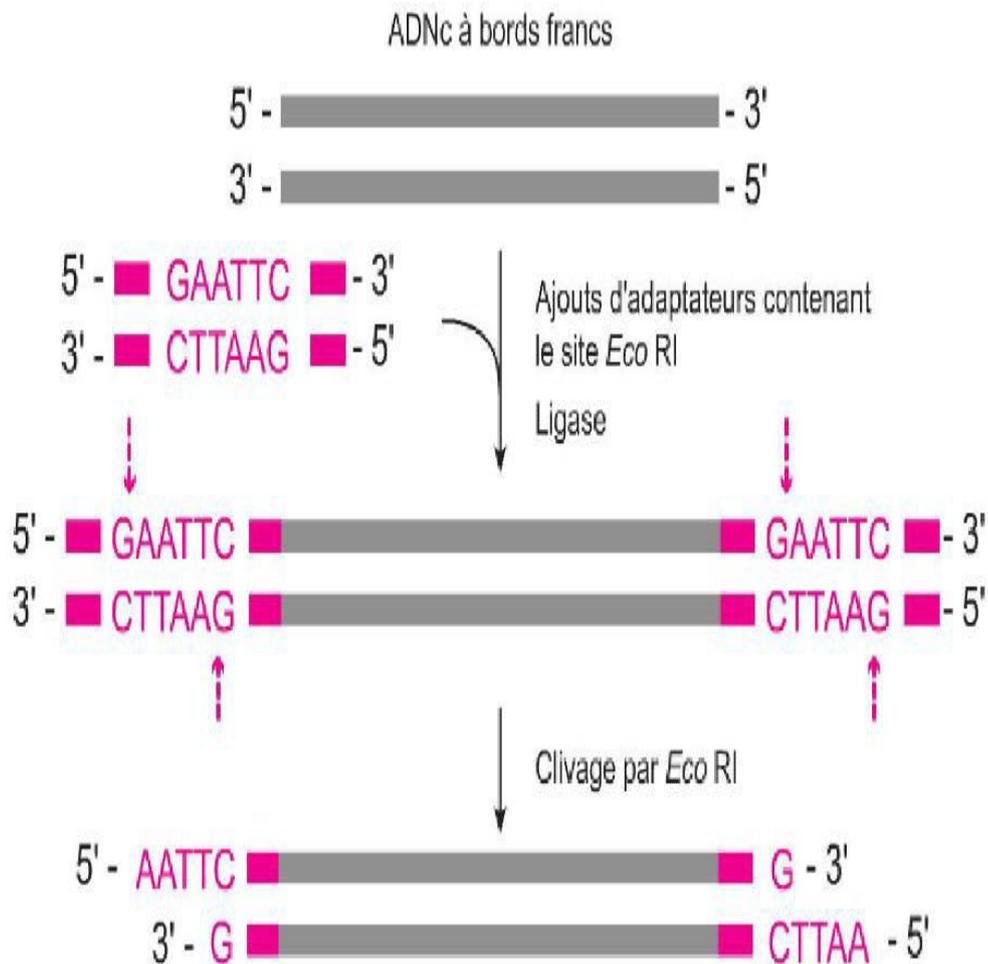
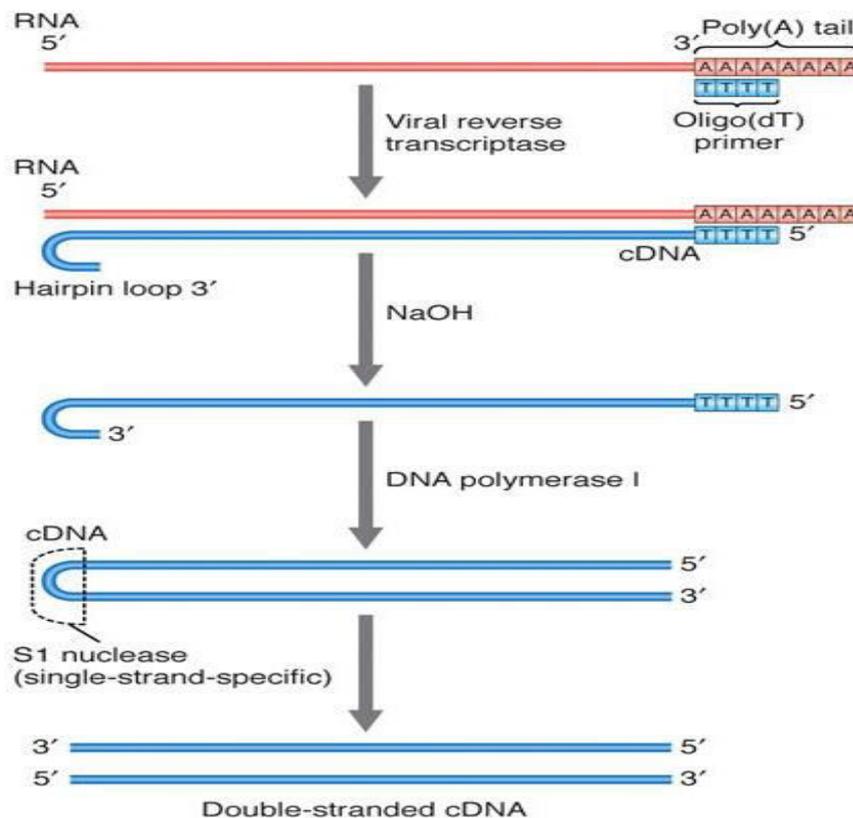


Figure 5.11. Addition d'adaptateurs à des fragments d'ADN à bords francs et production d'un ADN à bords décalés.

Des adaptateurs peuvent être ajoutés aux extrémités de l'ADNc pour faciliter le clonage d'extrémités cohésives.

Nb :

La matrice d'ARNm peut être détruite en milieu alcalin, l'épingle à cheveux du l'ADNc restant sert d'amorce à la synthèse d'un brin complémentaire par l'ADN polymérase I. La boucle est alors enlevée par une enzyme appelée **nucléase S1** pour produire une molécule bicaténaire d'ADNc



Hairpinloop 3' : Boucle en épingle à cheveux

Single-strand-specific : spécifique des simples brins

Double – strandedcDNA : ADNc bicaténaire

Le choix de créer une banque d'ADN génomique ou d'ADNc dépend des questions qui sont à résoudre. Pour la recherche de la séquence codante d'un gène qui s'exprime spécifiquement dans un tissu, il s'avérera judicieux d'extraire les ARNm de ce tissu et de fabriquer la banque d'ADNc correspondante. Si l'on veut par contre connaître la structure complète du gène y compris les régions régulatrices non codantes, il est indispensable de s'adresser à l'ADN génomique.

Un tel ensemble de clones d'ADN, issus d'un seul individu, constitue une banque de clones. **Ces banques peuvent représenter un génome entier, un seul chromosome ou un ensemble de gènes exprimé dans un seul type cellulaire.**

Chapitre 6

Techniques d'analyse de l'expression des
gènes

6.1. Techniques d'analyses de l'expression des gènes :

La modification du matériel génétique par transgénèse conduit à la production d'un organisme génétiquement modifié (OGM). Pour **vérifier l'expression des fragments des gènes clonés**, trois techniques peuvent être utilisées : la technique de Northern blot, RT-PCR (reverse transcriptase polymérase chaîne réaction) et la technique des gènes rapporteurs « gène reporter ».

6.1.1. Northern blot :

Ce terme est utilisé par opposition à « *Southern blot* », le Northern blot est la même technique que le Southern blot simplement ici on sépare des ARNm et on les hybrides à des sondes ADNc.

La séparation des ARNm (Après leurs extraction) se fait sur gel d'agarose contenant de formaldéhyde, afin de maintenir les ARNs simples brins sous formes dénaturées. La membrane est en nitrate de cellulose ou de nylon traité afin de rendre sa surface positivement chargée.

La mise en contact des ARNs fixés sur la membrane et les sondes d'ADNc permet l'établissement de la réaction d'hybridation ARN/ADNc (Bien sûr s'il ya une complémentarité).

Ce type d'hybridation permet :

- le repérage d'un type de molécule d'ARNm, donc **de vérifier l'expression d'un gène donné** (gène cloné)
 - d'évaluer le taux d'accumulation d'une population d'ARNm dans un tissu donné (feuille, racine, tige, ..)
 - de déterminer le moment d'expression du gène (donc le moment de sa transcription) ce qui permet de déterminer l'expression du gène en fonction : de phase de développement (différentes phases d'embryogenèse), sous l'effet d'un stress donné ou selon les conditions nutritionnelles ou physiologiques...ect
-
- Inconvénients de la méthode : elle est très sensible à la dégradation de l'ARN. Chaque coupure dans l'ARN entraîne une perte d'information.

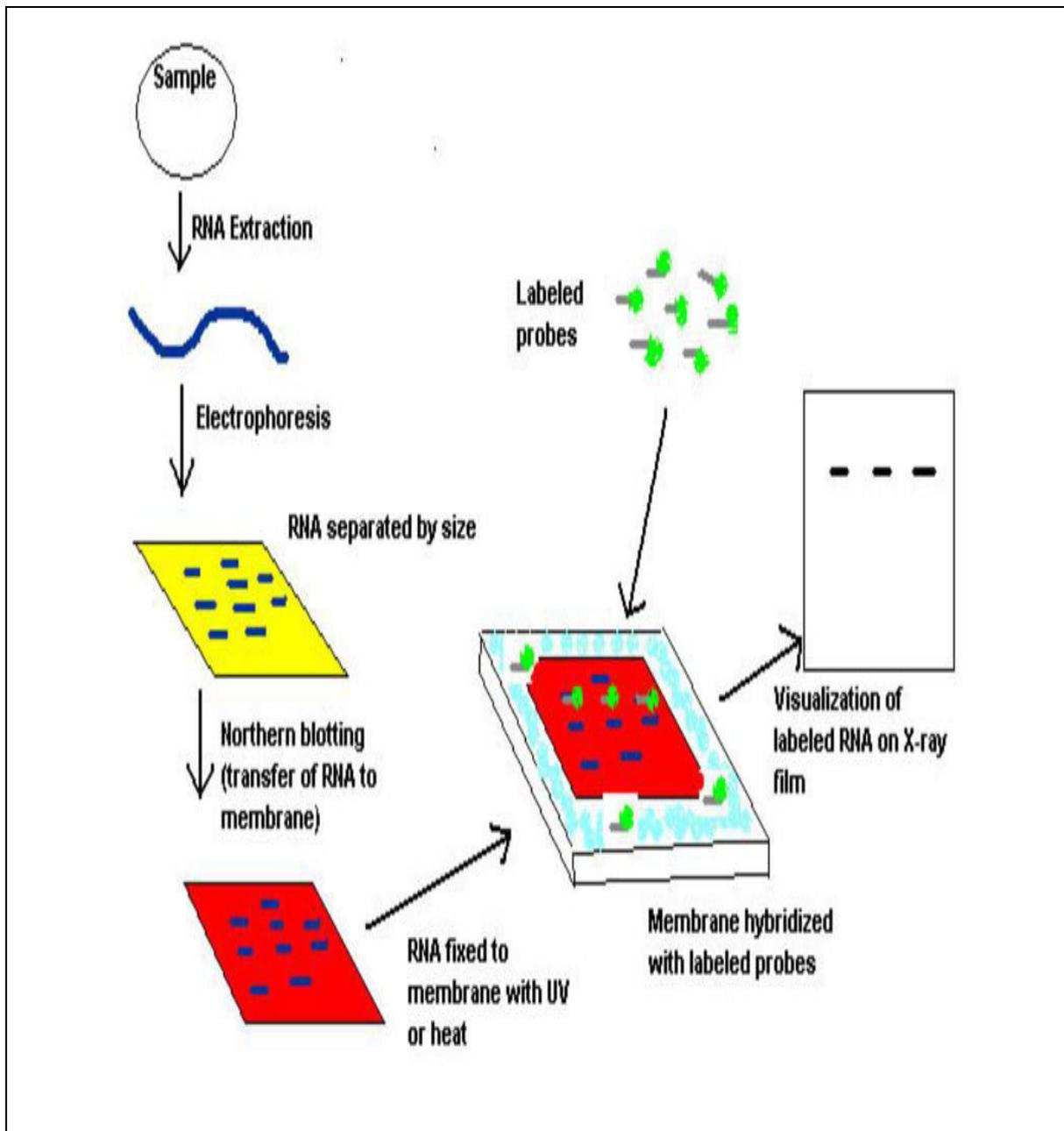


Figure 6.1. Schéma de principe du Northern blot

6.1.2. RT-PCR (reverse transcriptase polymérase chaîne réaction) :

Les hybridations moléculaires dites classiques (Southern blot et Northern blot) ne sont parfois pas assez sensibles pour détecter des quantités infimes d'ADN ou d'ARN cible. C'est notamment le cas de nombreux ARNm qui ne sont présents dans les cellules qu'en très petit nombre. L'usage de la PCR permet de travailler avec de toutes petites quantités d'acides nucléiques.

Une technique, appelée **RT-PCR**, a été développée pour permettre la détection et la mise en évidence de l'accumulation d'un ARNm rare dans un organe, un tissu ou une cellule.

La RT-PCR est une technique qui permet de faire une PCR (réaction en chaîne par polymérase) à partir d'un échantillon d'ARN. Le principe consiste à extraire les ARNs du tissu étudié et de les copier in vitro en ADNc monocaténaire (L'ARN est tout d'abord rétrotranscrit), grâce à l'action de la transcriptase reverse (La transcriptase inverse) ou rétrotranscriptase (en anglais reverse transcriptase ou encore RT). Ces séquences pourront être amplifiées par PCR.

L'association successive des deux techniques a pris le nom de RT-PCR.

Objectifs :

- Vérifier l'expression d'un gène cloné

- Permet de connaître le niveau d'expression d'un gène dans une condition donnée. Plus un gène est exprimé, plus le nombre de molécules d'ARNm synthétisées sera grand.

-Grâce à la RT-PCR, les chercheurs peuvent donc comparer le niveau d'expression d'un gène donné dans deux conditions différentes.

L'inconvénient : risque de contamination par l'ADN génomique. On peut traiter la solution par des désoxyribonucléases afin d'éliminer toute trace d'ADN.

6.1.3. Gènes rapporteurs « gène reporter » :

Les gènes rapporteurs peuvent être des gènes **codant des protéines fluorescentes** ou des **enzymes dont l'action provoquera l'apparition d'un produit coloré**. Les gènes rapporteurs sont utilisés pour permettre de visualiser ou mesurer l'expression d'un gène d'intérêt, pour cela le gène rapporteur peut être fusionné au gène étudié, ou mis sous le contrôle du promoteur de ce dernier.

Les gènes rapporteurs doivent obéir à 3 conditions :

- leur produit n'interfère pas avec le métabolisme de l'organisme modifié ni avec le gène d'intérêt
- leur produit doit permettre une visualisation rapide et précise
- leur produit doit être (de préférence) quantifiable afin de mesurer l'activité du promoteur

A la différence du gène marqueur de sélection qui possède leur propre promoteur, le gène rapporteur est soumis sous le contrôle du gène d'intérêt c à d il se transcrit avec le gène d'intérêt.

6.1.4. Technique de Run-on :

La technique de Run-on **permet l'élongation in vitro des transcrits initiés in vivo**. Run on est un test effectué pour **identifier les gènes qui sont en cours de transcription** à un certain moment (Identification des ARNm en cours de transcription dans des noyaux isolés).

Environ un million **de noyaux cellulaires sont isolés et incubés avec des nucléotides marqués**, et les gènes en cours de transcription sont détectés par hybridation de l'ARN extrait à des sondes non radioactive du gène d'intérêt. La ou **les sondes utilisées sont en général des ADNc** correspondant aux gènes dont on désire analyser la transcription. Ces ADNc sont déposés sur une membrane en quantité identique. La membrane est ensuite incubée avec tous les ARNm radioactifs, lavée et autoradiographiée.

Des analyses complémentaires d'expression et d'activité sont nécessaires pour en apporter la preuve définitive, comme par exemple l'isolement de la protéine d'intérêt et faire l'analyser, mesure de l'activité enzymatique....etc

6.1.5. Technique d'identification de la région régulatrice du promoteur

6.1.5.1. Technique de Retard sur gel :

Le retard sur gel est une technique de biologie moléculaire permettant de détecter une interaction entre une protéine et l'ADN. L'expression d'un gène dépend de la fixation sur la région promotrice de protéines dites de régulation.

Afin de délimiter les régions nucléotides de promoteur susceptibles d'intervenir dans la régulation de l'expression du gène, la technique retard sur gel est utilisée.

Le principe consiste à hybrider des protéines (extraites de noyaux) avec le fragment nucléotidique radioactif étudié.

Faire migrer par électrophorèse le fragment nucléotidique étudié sur une piste (puit du gel), et sur une autre le fragment mis en contact avec la protéine susceptible de se fixer dessus. Si la protéine se fixe effectivement sur le fragment, la migration de ce dernier sera plus lente, puisque ce complexe est plus gros et la bande correspondante aura migré moins loin sur le gel (elle est dite retardée). Sinon, les deux bandes seront au même niveau sur les deux pistes.

Le fragment d'ADN utilisé est habituellement marqué de façon radioactive pour permettre facilement sa détection.

Cette technique ne permet que la mise en évidence des complexes nucléoprotéiques formés entre des protéines nucléaires et un fragment d'ADN.

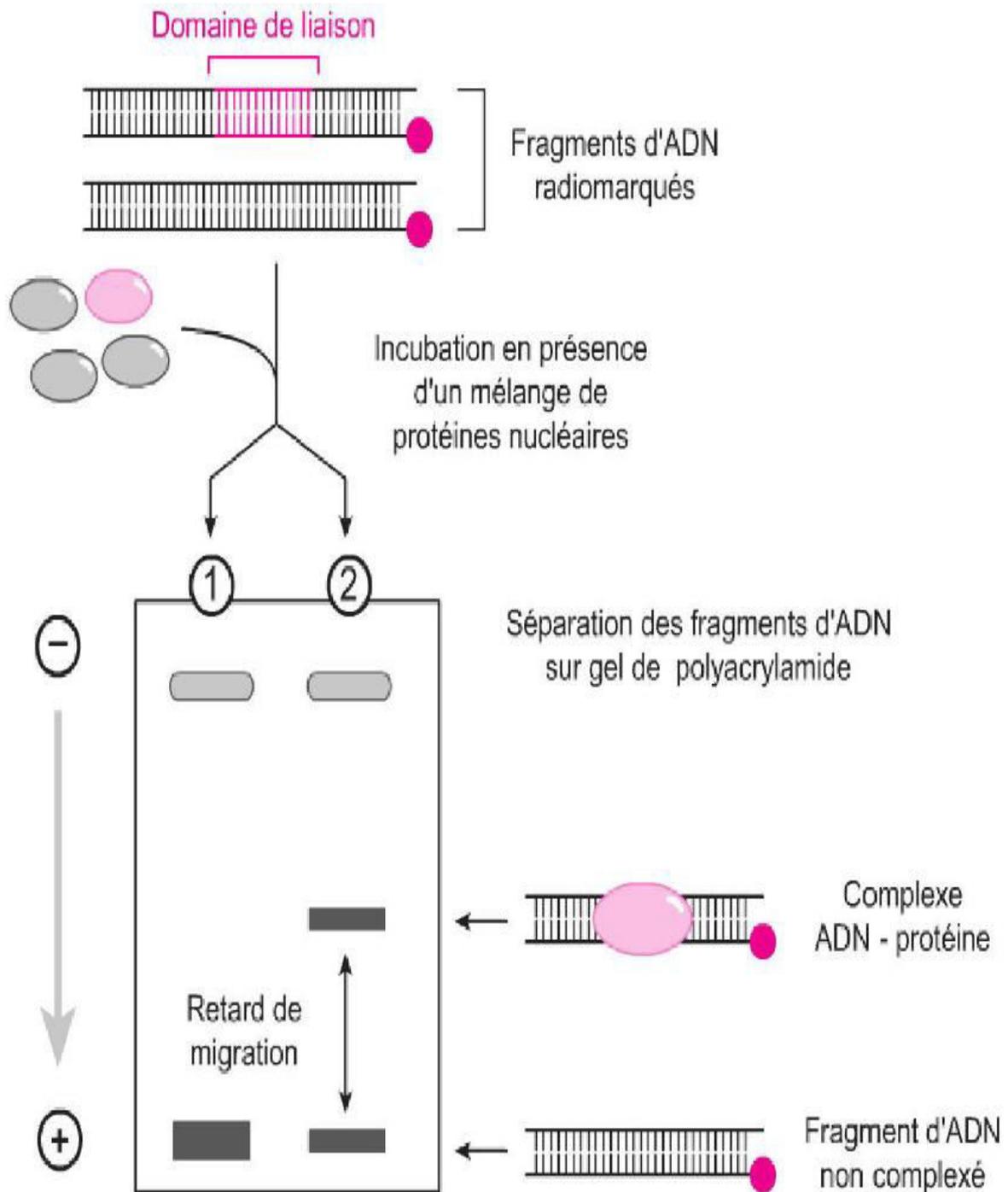


Figure 6.2. Analyse par retard sur gel

Un extrait de protéines nucléaires a été mélangé à des fragments d'ADN radiomarqués dont un est une cible potentielle d'une des protéines nucléaires. Le complexe formé de masse moléculaire supérieure à celle de l'ADN « nu » migre plus lentement (piste 2).

Le fragment correspondant est donc retardé. Dans une expérience similaire non représentée ici, **la protéine est connue et repérée à l'aide d'un anticorps**. C'est le fragment d'ADN portant le site de liaison qui est recherché.

6.1.5.2. Empreinte à la DNase - foot-printing :

Les expériences d'empreinte à l'ADNase I font généralement suite aux expériences de « gel retard ». Elles permettent de définir avec précision les bases du promoteur qui interagissent physiquement avec un facteur protéique.

Les **séquences de nucléotides du promoteur** (**facteurs cis-régulateurs**) sont reconnues par une **classe de protéines spécifiques** (**facteurs trans-régulateurs**) dont la structure permet une **liaison avec le DNA** (*DNA binding proteins*).

Les facteurs trans-régulateurs ont des effets sur la vitesse de la transcription : **activateurs ou inhibiteurs**. Leur liaison avec l'ADN dépend le plus souvent de circonstances physiologiques qui induisent ou répriment l'expression du gène.

La DNase I est utilisée pour l'analyse des sites de liaison **protéines –ADN** par la technique de foot-printing. En effet, la protéine liée à l'ADN le protège de l'hydrolyse par cette enzyme. Cette enzyme est extraite du pancréas de boeuf. La DNase I est une endonucléase capable de couper de couper les liaisons phosphodiester à l'intérieur des chaînes d'ADN.

Les fragments d'ADN ont été digérés au hasard par la DNase I mais aucune coupure n'a pu se faire dans les séquences protégées de la DNase I par les protéines.

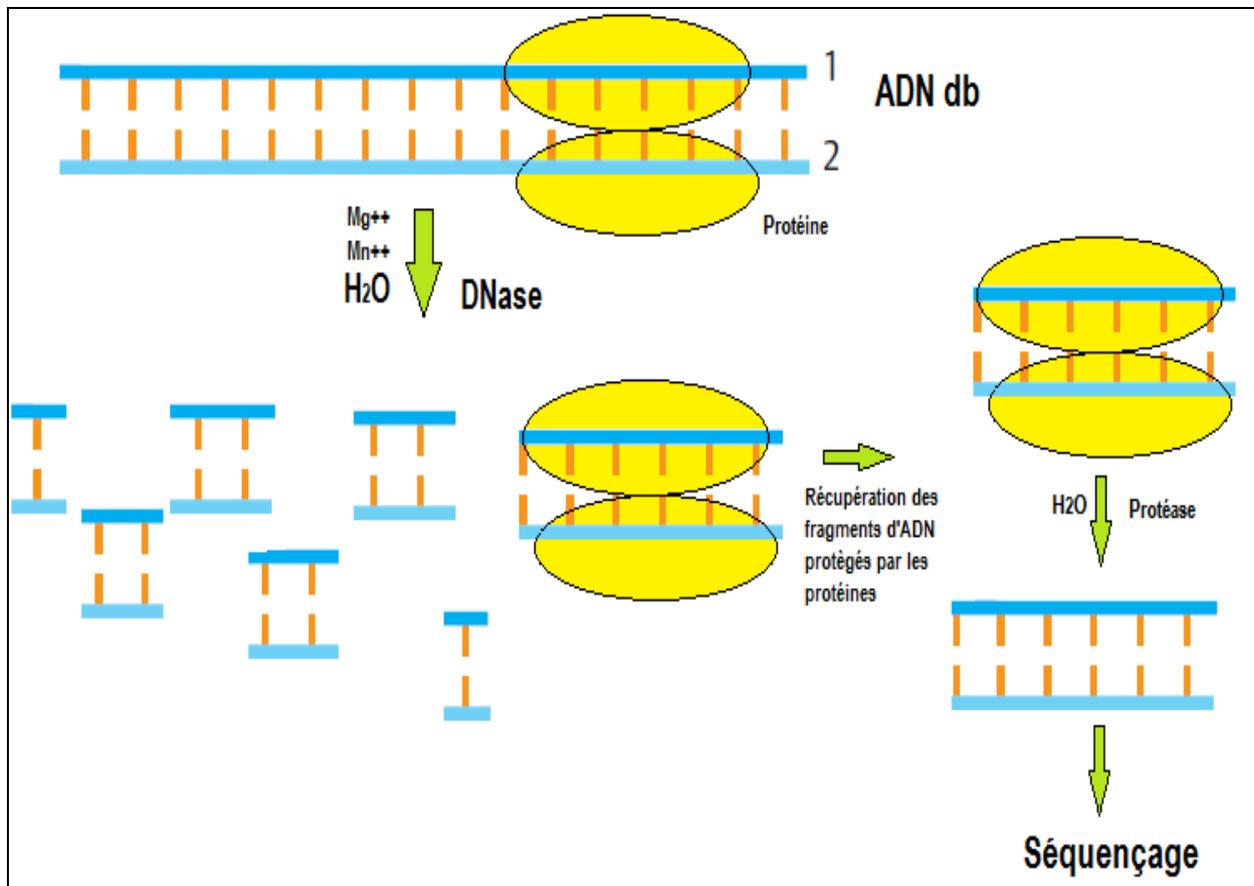


Figure 6.3. Empreinte à la DNase - foot-printing

Détection des sites de liaison des protéines sur l'ADN par la technique de « foot printing » :

Les produits de digestion sont alors séparés par électrophorèse sur un gel d'acrylamide à grand pouvoir séparateur, puis détectés par autoradiographie. La dégradation partielle du fragment d'ADN protégé par la protéine générera une échelle de fragments de tailles différentes. En comparant l'échelle donnée par un ADN nu à celle donnée par un ADN protégé, on remarque que cette dernière présente un trou, ou une empreinte, correspondant aux sites rendus inaccessibles à l'enzyme par la protéine. Sur l'image du gel des plages noires (traces de pas = *foot prints*) marqueront la partie de la séquence qui a fixé la protéine et est donc probablement cis-régulatrice.

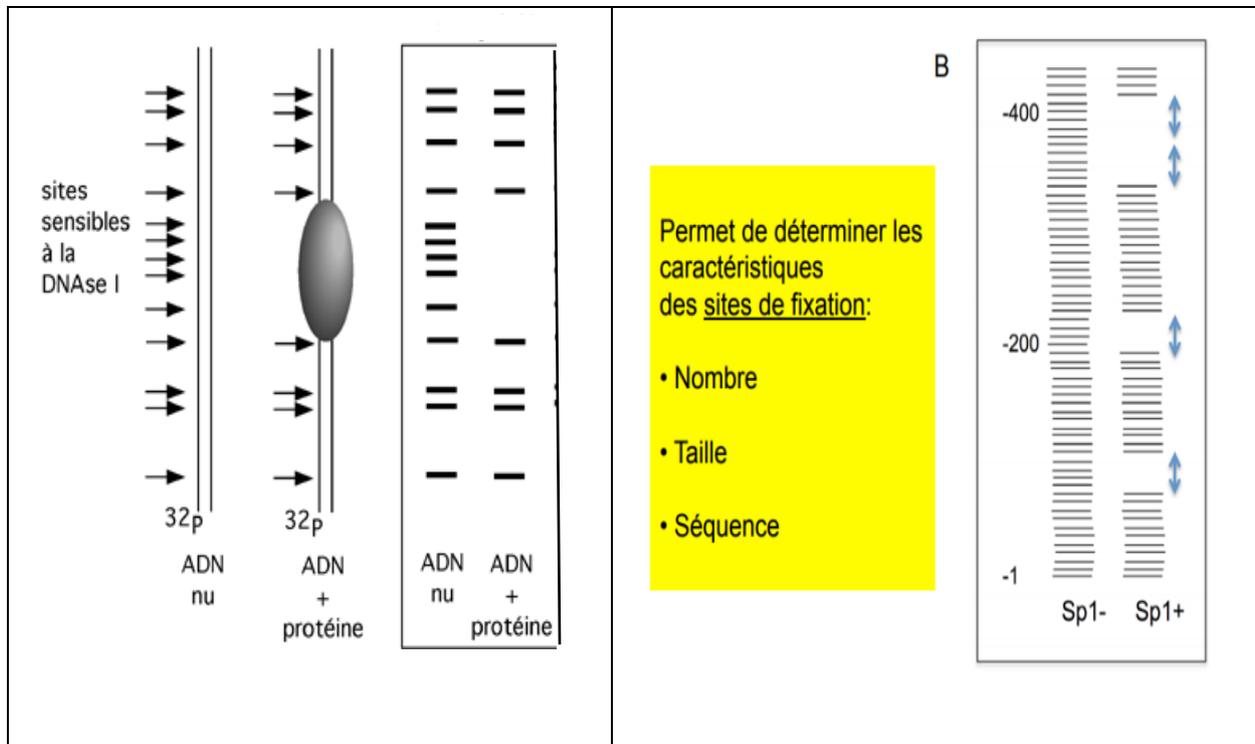


Figure 6.4. Détection des sites de liaison des protéines sur l'ADN par la technique de « foot printing »

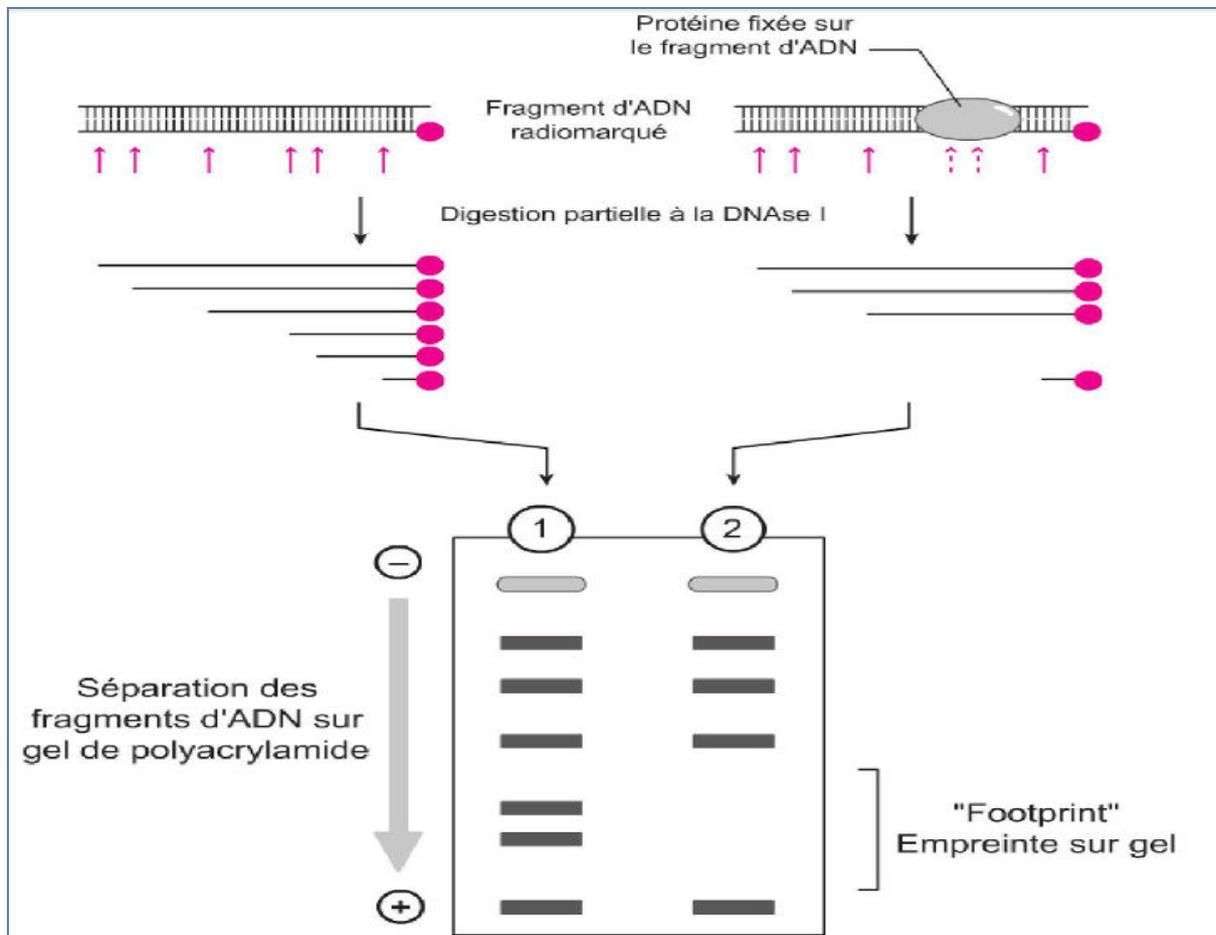


Figure 6.5. Technique d'empreinte à la DNase « footprinting »

Les fragments utilisés sont marqués à une seule de leurs extrémités. Le traitement à la DNase s'effectue en présence de sels de manganèse. Ainsi, elle clive au hasard (flèches verticales) les deux brins de molécule cible. La zone sans bande, « footprint » correspond à la position des sites protégés par la protéine de liaison à l'ADN.

Chapitre 7

Applications biotechnologiques de l'ADN
recombinant

7. Applications biotechnologiques de l'ADN recombinant

7.1. Protéines recombinantes :

Les protéines recombinantes sont ainsi qualifiées dans la mesure où elles **sont produites par des cellules dont l'ADN a été modifié par recombinaison génétique**. La protéine **synthétisée par une cellule différente de sa cellule d'origine**, est ainsi dite **hétérologue** ou **recombinante**.

7.2. La production de protéines thérapeutiques

À l'origine, les protéines d'intérêt thérapeutique étaient extraites de sources naturelles telles que le sang, le placenta, ou autres extraits de tissus humains ou animaux. Toutefois, les quantités restaient limitées, et les produits potentiellement dangereux pour les patients, du fait de risques de contamination par des virus - Sida, hépatite B notamment, comme ce fut le cas dans l'affaire du sang contaminé - ou des prions, qui furent notamment en cause dans le développement de la maladie de Creutzfeldt-Jakob chez des patients traités à l'hormone de croissance d'origine humaine.

L'essor de la génomique et des technologies de l'ADN recombinant dans les années 1970 a permis le développement de nouveaux procédés de production de protéines, mettant en œuvre divers systèmes d'expression. L'identification, puis le clonage des gènes gouvernant la synthèse des principales protéines humaines d'intérêt thérapeutique ont rendu possible la production de celles-ci par des organismes hétérologues, et ces protéines, dites recombinantes, ont constitué une alternative aux protéines d'extraction. Aujourd'hui, la quasi-totalité des protéines thérapeutiques produites sont des protéines recombinantes.

En moins de 30 ans, les technologies qui se sont développées depuis le début des années 1980 ont atteint une maturité industrielle et commerciale qui n'est aujourd'hui plus contestée. Toutes les grandes entreprises pharmaceutiques ont investi massivement dans ces technologies, qui ont prouvé leur capacité à produire à grande échelle des protéines thérapeutiques efficaces et sécuritaires pour les patients. Ces technologies de production sont donc promises à un bel avenir porté par un marché des protéines thérapeutiques en forte croissance. En revanche, les systèmes biologiques étant par nature beaucoup plus difficiles à

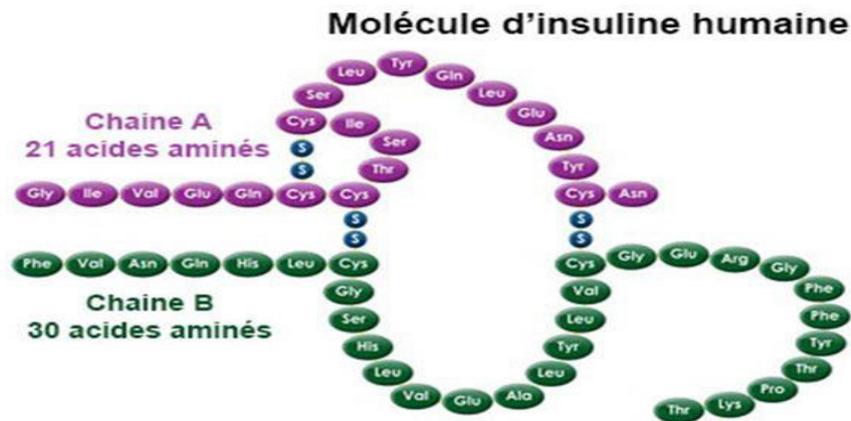
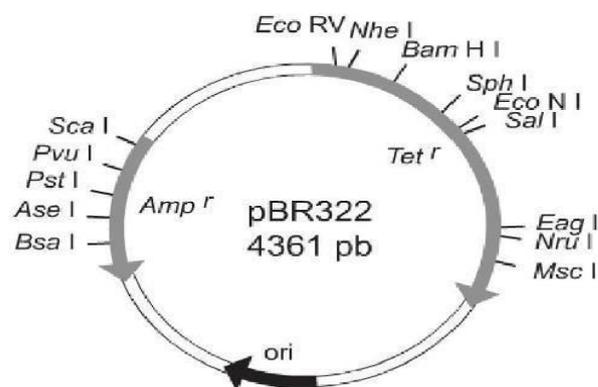


Figure 7.2. Molécule d'insuline humaine

Le génie génétique a permis de produire de l'insuline humaine à partir de l'espèce bactérienne *E. coli* (ou même à partir de levure) qui deviennent génétiquement modifiées.

La stratégie expérimentale suivante a été utilisée :

- **Synthèse du gène codant pour l'insuline (la Pro-insuline).**
- **Insertion dans le vecteur de clonage:** Le plasmide pBR322 portant les gènes de résistance à l'ampicilline et à la tétracycline est choisi comme vecteur de clonage.



Cependant, l'insertion du gène de la proinsuline au site Bam HI du plasmide ne lui permet pas d'apporter cette seconde résistance à la tétracycline.

- **Introduction dans l'organisme hôte:** Le plasmide ainsi modifié est introduit dans une bactérie. La souche choisie est *E. coli* K12 initialement sensible à la tétracycline et à l'ampicilline.
- **Sélection des clones :** les colonies bactériennes capables de se développer sur un milieu contenant de l'ampicilline sont des bactéries ayant intégrées le plasmide. Parmi ces colonies, celles qui sont sensibles à la tétracycline sont sélectionnées.
- **Confirmer le clonage du gène d'intérêt et vérifier son expression par des techniques moléculaires**
- **Vérification de la production de proinsuline :**
La proinsuline produite est piégée par des anticorps marqués qui sont capables de la reconnaître par analogie structurale.
- **Synthèse de l'insuline à partir de la proinsuline :**
Le produit obtenu est purifié puis convertie en insuline par un mélange de trypsine et de carboxypeptidase B. L'insuline est ensuite analysée par différents techniques biochimiques. Enfin, des tests de vérification de la toxicité du produit final doivent être effectués, ainsi que l'activité biologique sur animal en mêmes temps que des études pharmacologiques et cliniques.
- **Culture des organismes génétiquement modifiés :** les clones sélectionnés sont mis à cultiver à grande échelle.

B- Production des interférons par *E. coli* : les interférons sont impliqués dans la régulation du système immunitaire afin de combattre les **maladies virales**, tel l'hépatite B. Les

interférons exercent leurs activités cellulaires en se fixant à des récepteurs spécifiques de la membrane cellulaire des cellules infectées déclenchant des réactions intracellulaires complexes, notamment **l'induction de certaines enzymes**. Ces processus sont responsables de diverses réponses cellulaires, telles que **l'inhibition de la réplication virale** dans les cellules infectées par des virus, **la suppression de la prolifération cellulaire** et des activités immunomodulatrices. Les interférons utilisés en thérapeutique sont des protéines recombinantes humaines possèdent les mêmes propriétés que les interférons naturels, incluant l'activité anti-virale, antimitotique et immuno-modulatrice.

7.4. Production de protéine recombinante par *Saccharomyces cerevisiae*

Production de l'antigène HB par *Saccharomyces cerevisiae* :

Le virus de l'hépatite B (VHB) : virus à ADN bicaténaire circulaire.

Le virus de l'hépatite B se transmet par contact direct avec le sang ou d'autres liquides corporels des porteurs chroniques ou des sujets atteints d'infections aiguës.

La période d'incubation de l'hépatite B est longue. Six semaines à six mois peuvent s'écouler entre l'exposition au virus et l'apparition des premiers signes cliniques. La maladie débute généralement par une grande fatigue accompagnée d'anorexie. Des myalgies (myalgie désigne toute douleur musculaire) et des douleurs abdominales se manifestent également dans certains cas.

Une application thérapeutique majeure, la production **des vaccins commerciaux contre l'hépatite B (antigène HB) par *Saccharomyces cerevisiae***

L'antigène HB : **les antigènes de surface virale (de capsid)**.

L'antigène HB est la cible principale de la neutralisation virale par les anticorps anti-HBs induits naturellement ou par vaccination. Il suffit de produire des antigènes de surface virale et de les injecter comme vaccin pour induire l'immunisation (pour que l'organisme produit des anticorps dirigés contre ces antigènes).

7.5. Autres applications biotechnologiques de l'ADN recombinant

7.5.1 Améliorations agronomiques et environnementales :

- **La résistance des plantes à des insectes ravageurs :**

La lutte contre les ravageurs, notamment les insectes, est réalisée essentiellement par l'utilisation d'insecticides chimiques. La transgénèse offre aujourd'hui un outil supplémentaire aux agriculteurs pour limiter les traitements chimiques et protéger leurs récoltes contre les insectes et les maladies et ainsi réduire les pertes.

Pour rendre une plante résistante à un insecte, un gène codant une protéine toxique pour cet insecte a été introduit dans le génome de la plante. Jusqu'à présent, pour toutes les variétés mises sur le marché, les gènes introduits proviennent de la bactérie *Bacillus thuringiensis* (d'où l'abréviation Bt donnée aux plantes de ce type), bien connue depuis longtemps pour ses propriétés insecticides et largement utilisée en agriculture biologique, ainsi que par les exploitants forestiers et les jardiniers.

Cette bactérie constitue donc un véritable réservoir de gènes de résistance aux insectes. En effet, les différentes souches de cette bactérie du sol recèlent plusieurs protéines insecticides ayant différents modes d'action, et affectant uniquement certains insectes. Chacune de ces protéines est codée par un seul gène, c'est donc un caractère facilement transférable par génie génétique. Plusieurs équipes ont obtenu des tabacs, des pommes de terre, des cotons, des tomates, des maïs résistants à des insectes grâce à cette source de gènes.

- **La résistance à des maladies :** Les virus, les champignons et les bactéries sont responsables de pertes importantes en production végétale. Or, il n'existe aucune méthode de traitement des maladies dues à des virus chez les plantes cultivées. Par transgénèse, il est possible d'obtenir des plantes résistantes aux virus. Ces plantes transgéniques synthétisent des protéines qui bloquent la multiplication et le développement des virus. Ainsi, il a été possible d'obtenir des courgettes et des melons résistants au virus de la mosaïque du concombre. L'obtention de plantes résistantes aux champignons et aux bactéries est en cours de développement.

- **La résistance à des herbicides** : Le glufosinate (Basta ou Liberty) et le glyphosate (Roundup) sont des herbicides totaux qui détruisent aussi bien les mauvaises herbes que les plantes cultivées. Les gènes de résistance à l'herbicide introduits dans une plante empêchent la matière active d'agir sur celle-ci, transformant l'herbicide total en herbicide sélectif sur cette plante. Ainsi l'herbicide détruit toutes les mauvaises herbes présentes tout en respectant totalement la plante cultivée.

7.5.2. L'alimentation :

Il s'agit de modifier la composition d'une plante afin de lui apporter des avantages nutritionnels et gustatifs ou de lui conférer de nouvelles caractéristiques qui permettent de diversifier les débouchés.

- Les qualités nutritionnelles : En alimentation animale, les recherches vont dans le sens d'un développement de plantes permettant un meilleur rendement nutritionnel et évitant l'apport de compléments nutritifs. Ainsi, il est possible d'obtenir des plantes de maïs, colza, soja à teneurs élevées en acides aminés, notamment en méthionine et lysine, et des maïs enrichis en huile. Concernant l'alimentation humaine, des travaux sont menés pour diminuer les propriétés allergènes du riz et du soja. Pour obtenir ce résultat, on cherche à introduire dans la plante un transgène qui inhibe la synthèse de la protéine allergisante.
- **La maturation des fruits** : Ce sont les résultats les plus avancés concernant la qualité alimentaire. Sur le melon et la tomate, on a pu obtenir des variétés transgéniques à maturation retardée. Ces fruits peuvent être récoltés à un stade de maturation plus avancé, donc être plus savoureux. D'autre part, il en résulte une meilleure conservation et une aptitude au transport améliorée, réduisant les pertes. Le melon est le premier fruit génétiquement modifié obtenu par un laboratoire de recherche français. Un gène capable de bloquer la synthèse de l'éthylène a été introduit, ce qui ralentit la maturation. Le détachement du fruit est retardé et le melon maintenu sur pied continue d'accumuler des sucres

7.5.3. L'industrie :

Les biotechnologies ouvrent de nombreuses perspectives dans les domaines de l'industrie, en produisant des nouvelles molécules (Molecular Farming) et en améliorant les procédés industriels et la qualité des produits.

- Les pâtes à papier : Les lignines sont l'un des constituants majeurs du bois, mais elles gênent l'industrie papetière qui ne peut les valoriser et doit les éliminer par des méthodes coûteuses et polluantes. Des travaux conduits par la recherche publique française ont permis de connaître les gènes impliqués dans la synthèse des lignines et de développer des variétés de peupliers transgéniques, chez lesquels le taux de lignine est fortement réduit. Ceci facilite le blanchissement de la pâte à papier et donc réduit l'impact sur l'environnement. Le même type de travail a été réalisé sur l'eucalyptus.
- Les huiles industrielles : Elles sont synthétisées à partir de matières premières fossiles, dont les ressources sont limitées. Il est donc nécessaire de s'orienter vers d'autres ressources renouvelables. Parmi les nombreux programmes de recherche, on peut citer celui destiné à l'obtention d'un colza transgénique à haute teneur en acide gras érucique ou ricinoléique pour la production de lubrifiants, de matières plastiques, etc. Cette stratégie devrait favoriser le développement de lubrifiants et de plastiques biodégradables.
- Les colorants : Un exemple original est l'obtention de cotons transgéniques de couleur grâce à l'introduction d'un gène bactérien ou végétal codant pour un pigment. Ceci évitera l'utilisation de teintures chimiques difficilement recyclables.

7.6. Utilisation de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*:

Les méthodes de recombinants d'ADN utilisent différents vecteurs pour effectuer le transfert de gènes. Un vecteur est un intermédiaire dans le processus de transfert génétique dont le rôle est de produire le gène en quantité importante en se multipliant. Les principaux vecteurs utilisés sont des virus, des bactéries ou des particules métalliques de tungstène ou d'or.

Le choix du vecteur est spécifique à l'organisme hôte. L'emploi de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*, par exemple, fonctionne bien avec les plantes dicotylédones, mais n'est pas efficace avec les plantes monocotylédones.

Les plantes monocotylédones et dicotylédones figurent parmi les plus évoluées des végétaux, les angiospermes. Une angiosperme produit par ses ovules, protégées par un ovaire complètement clos, un fruit contenant la graine. La graine renferme un embryon qui contient, selon le type de plante, un ou deux cotylédons. Les cotylédons sont des lobes séminaux.

L'utilisation de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* est probablement la plus commune pour la production des aliments génétiquement modifiés. Cette méthode figure parmi les plus anciennes pour l'introduction de gènes dans les cellules eucaryotes des plantes dicotylédones.

Les cellules eucaryotes sont présentes dans tous les organismes pluricellulaires. Leur noyau est limité par une enveloppe et contient tout le matériel génétique de la cellule. Les bactéries sont des procaryotes, c'est-à-dire que leur ADN n'est pas contenu dans un noyau entouré d'une enveloppe.

La plupart des bactéries ont d'autres fragments d'ADN qui ne font pas partie de son génome. Ces fragments sont appelés plasmides et sont souvent responsables de la résistance aux antibiotiques. Les bactéries peuvent transférer ces plasmides à un autre organisme. La bactérie *Agrobacterium tumefaciens* abrite le plasmide Tumor inducing (Ti). Le plasmide Ti contient un gène induisant une tumeur à la plante.

La partie d'ADN transférée aux cellules végétales porte le nom d'ADN-T. L'ensemble de ces gènes code pour la transformation tumorale. Les cellules blessées sont plus susceptibles à l'infection par l'*Agrobacterium*. Le mécanisme de transfert utilise un ensemble de protéines qui sont codées à même l'ADN du plasmide Ti. Ces protéines s'appellent les vir-protéines. Les vir-protéines sont responsables du clivage des gènes. Le gène T est bordé par deux séquences de 25 paires de bases azotées.

Les virprotéines reconnaissent ces deux séquences et coupent le plasmide Ti à l'endroit du gène T. L'extrusion n'est faite que pour un seul brin d'ADN laissant le second brin dans le

plasmide. La bactérie synthétise le brin manquant à partir du brin restant complémentaire. Les cellules libèrent des substances qui activent à la fois la synthèse des vir-protéines et la virulence de la bactérie.

Le gène complet est reconstitué et il pourra ou non être exprimé dans la cellule réceptrice. La mutation est produite dans une cellule sexuelle ou dans l'une des cellules de la lignée germinale. Les cellules ont le potentiel de recréer une plante génétiquement nouvelle.

- Bernard Swynghedauw et Jean-Sébastien Silvestre. Aide-mémoire Biologie et génétique moléculaires. 3eme édition; 2008
- Berche P. Histoire de la biologie moléculaire.feuillets de Biologie/N° 333 - NOVEMBRE 2016
- Hacene Laouedj. Cours de Génétique. Université Echahid Hamma Lakhdar El Oued. 2023
- Jean-Louis Serr. GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS. Cours et exercices corrigé. Dunod, Paris, 2006
- Jérôme Goudet. Génétique des populations : une introduction. Biophore, UNIL-Sorge, CH-1015 Lausanne. Suisse. 2020
- Houali K. Lahcene S. Génétique.Tome 1. Office des publications universitaires.www.biologie.com. 2016
- Abderrahman Maftah, Jean-Michel Petit et Raymond Julien. Mini manuel de biologie moléculaire, 4e édition. DUNOD. 2018
- Jean-Louis Serre et Louise Blottièr. Maxi Fiches. Génétique.En 82 fiche; 2ème édition. 2017
- Jean-Louis Serre. Génétique.Rappels de cours, exercices et problèmes corrigés 3eme édition; 2006
- Jean-Michel Petit , Sébastien Arico et Raymond Julien. Mini Maniel de Génie génétique; 4e édition. 2015
- Ameur ameur Abdelkader . Génétique générale. Al-djazair, Alger, 2015
- Étienne Jacqueline, Clauser Éric, Housset Chantal, Roingeard Philippe . Biochimie génétique biologie moléculaire. Masson, 9éd, 2006
- Lynn B. Jorde , John C. Carey , Michael J. Bamshad , Raymond L. White . Génétique médicale. Elsevier, 4. 2004
- Nadine Hanna, Béatrice Parfait, Dominique Vidaud et Michel Vidaud. Mécanismes et conséquences des mutations. Volume 21, Number 11. Med Sci (Paris). 2005.
- Pasternak Jack J . Génétique moléculaire humaine, une introduction aux mécanismes des maladies héréditaires. Sciences médicales. De Boeck Supérieur. 2003

Rachel Vincent. Génétique moléculaire, deBoeck. 2007

Swynghedauw Bernard . Biologie Et Génétique Moléculaires - Aide-mémoire-Dunod, Paris. 2008

Tagu Denis, Stéphanie Jaubert-Possamai S J, Méreau A. Principes des techniques de biologie moléculaire et génomique, 3éd, éditions Quae. 2018

Watson J., Baker T., Bell S., Gann A., Levine M.,. Biologie moléculaire du gène. PEARSON Education, France. 2009

Souria Aissaoui et Hanaa Aissaoui. Le conseil génétique en pathologie humaine. Elsevier Masson.2017

COHEN P.La réplication de l'ADN.Biologie moléculaire. Tutorat Santé Lyon Sud. 2017

Corinne Grey, Vérane Sommermeyer, Valérie Borde et Bernard de Massy. Déterminants de la carte génétique Le rôle-clé de la spécification des sites de recombinaison méiotique. médecine/sciences 2011

Griffiths Wessler et Carroll Doebley
Introduction à l'analyse génétique. 6e édition. De boeck supérieur 2013

Peter Meier-Abt. La génétique dans la médecine au quotidien
Guide pratique. 2e édition, Édité par l'Académie Suisse des Sciences Médicales. 2011

Raymond Cunin. L'essentiel de la génétique.De Boeck Supérieur s.a., 2012

Martin Krahn et Damien Sanlaville. Génétique médicale.
Enseignement thématique.Elsevier Masson SAS. 2016

Philippe SILAR. Génétique : Concepts de Base et Notions Approfondies.Première édition . Creative Commons, 444 Castro Street, Suite 900, Mountain View, California, 94041, USA.2016

Jean-Louis Serr.Génétique Des Populations. Cours et exercices corrigé. Dunod, Paris, 2006

Fernandes J et al. Inborn Metabolic Diseases 4th Edition. Springer 2006