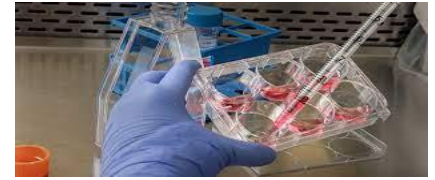




**Génétique Microbienne**  
**Génie Génétique**  
**Chapitre III :**  
Recombinaison in-vitro, clonage et  
manipulation génétique



## Les points clés:

- Le **clonage de l'ADN** est une technique de biologie moléculaire qui fabrique de nombreuses copies identiques d'un morceau d'ADN, tel qu'un gène.
- Dans une expérience typique de clonage, un gène d'intérêt est inséré dans un morceau d'ADN circulaire appelé un **plasmide**.
- Le plasmide est introduit dans les bactéries par un processus appelé la **transformation**, et les bactéries transportant le plasmide sont sélectionnées à l'aide d'antibiotiques.
- Les bactéries dotées du bon plasmide sont utilisées pour fabriquer davantage de ce plasmide ou, dans certains cas, pour induire l'expression du gène et produire des protéines.

## Le clonage :

Le clonage désigne principalement le processus de multiplication d'un organisme, d'une cellule souche ou d'un gène, en grand nombre d'exemplaires identiques (soit in vitro, soit in vivo).

Le terme clone est utilisé pour la première fois en 1903 par le botaniste H.J. Webber en désignant des plantes reproduites par multiplication asexuée. Ce mot sera ensuite réutilisé par J.B.S. Haldane.

Le clonage désigne principalement le processus de multiplication d'un organisme, d'une cellule souche ou d'un gène, en grand nombre d'exemplaires identiques. Depuis plus de vingt ans, le clonage, ou la reproduction exacte de gènes particuliers et de types individuels de cellules, est une technique employée en biotechnologie afin de produire des médicaments et des vaccins pour traiter plusieurs maladies (Cottier et Guerry, 2000). On nomme ces deux types de clonage :

- Le clonage cellulaire: On fait plusieurs exemplaires de la même cellule pour pouvoir faire des recherches médicales.
- Le clonage moléculaire le quel on développera particulièrement dans ce chapitre.

## Clonage moléculaire :

Le clonage de l'ADN est une technique puissante qui permet de séparer des séquences spécifiques d'ADN au sein d'autres séquences puis de les copier de sorte qu'on obtient des quantités importantes permettant une analyse détaillée ou des manipulations. Une importante utilisation du clonage de l'ADN est d'isoler de nouveaux gènes en leur permettant d'être explorés et caractérisés

### Tour d'horizon du clonage de séquences d'ADN :

Le **clonage d'ADN** est le processus de fabrication de multiples copies identiques d'un morceau particulier d'ADN. Dans une procédure classique de clonage de l'ADN, le gène ou un autre fragment d'ADN d'intérêt (peut-être un gène qui encode une protéine humaine d'intérêt médical) est d'abord inséré dans un morceau d'ADN circulaire appelé un **plasmide**. L'insertion est effectuée à l'aide d'enzymes qui "coupent et collent" l'ADN, ce qui produit une molécule d'**ADN recombinant**, ou d'ADN assemblé à partir de fragments de différentes sources.

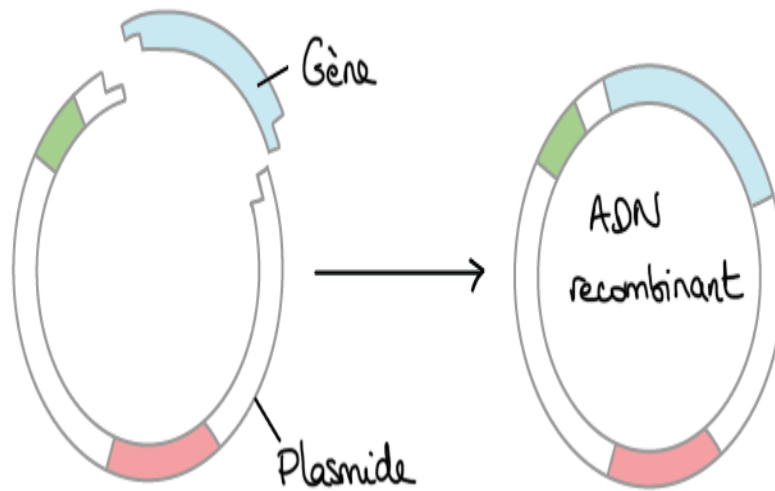


Schéma montrant la construction d'une molécule d'ADN recombinant. Un morceau d'ADN circulaire (ou plasmide) présente des extrémités qui correspondent à celles d'une portion de gène. Le plasmide et le gène sont réunis pour produire un plasmide contenant ce gène. Ce plasmide doté d'un gène d'intérêt constitue un exemple d'ADN recombinant, ou une molécule d'ADN assemblée à partir d'ADN issu de sources multiples.

Ensuite, le plasmide recombinant est introduit dans des bactéries. Les bactéries qui transportent le plasmide sont sélectionnées et cultivées. Quand elles se reproduisent, les bactéries répliquent le plasmide et le transmettent à leur progéniture, ce qui produit des copies de l'ADN qu'il contient.

À quoi bon fabriquer de nombreuses copies d'une séquence d'ADN dans un plasmide ? Dans certains cas, on a besoin de beaucoup de copies d'ADN pour réaliser des expériences ou construire de nouveaux plasmides. Dans d'autres cas, le fragment d'ADN encode une protéine utile, et les bactéries sont utilisées comme "usines" pour fabriquer la protéine. Par exemple, le gène de l'insuline humaine est exprimé dans la bactérie *E coli* pour produire de l'insuline utilisée par les diabétiques.

## Les étapes du clonage d'ADN :

Le clonage de l'ADN a de nombreux usages. Par exemple, on va voir comment le clonage de l'ADN peut servir à synthétiser une protéine (comme l'insuline) dans des bactéries. Les étapes sont :

1. Ouvrir le plasmide et y "coller" le gène. Ce processus repose sur les enzymes de restriction (qui coupent l'ADN) et l'ADN ligase (qui assemble les morceaux d'ADN).
2. Insérer le plasmide dans les bactéries. Utiliser la sélection par antibiotiques pour identifier les bactéries qui ont incorporé le plasmide.
3. Faire pousser beaucoup de bactéries porteuses du plasmide et les utiliser comme "usines" de production de la protéine. Récolter les protéines produites par les bactéries et les purifier.

Examinons chaque étape.

### 1. Couper et coller l'ADN :

Comment joindre des morceaux d'ADN de différentes sources ? Une méthode commune utilise deux types d'enzymes : les **enzymes de restriction et l'ADN ligase**.

Une **enzyme de restriction** est une enzyme qui digère l'ADN. Elle reconnaît une séquence cible spécifique et coupe l'ADN en deux morceaux au niveau ou à proximité de ce site. De nombreuses enzymes de restriction génèrent des extrémités saillantes courtes d'ADN simple brin. Si deux molécules présentent des extrémités complémentaires, elles peuvent s'apparier et se coller ensemble. Mais, elles ne forment pas pour autant une molécule d'ADN ininterrompue, car elles sont jointes par l'**ADN ligase**, qui comble les vides dans le squelette d'ADN.

L'objectif du clonage est d'insérer un gène d'intérêt (par exemple, l'insuline humaine) dans un plasmide. En utilisant une enzyme de restriction soigneusement choisie, on digère :

- Le plasmide, qui possède un seul site de restriction.
- Le fragment d'ADN du gène d'intérêt, qui possède un site de restriction près de chacune de ses extrémités.

Ensuite, on combine les fragments à l'aide de l'ADN ligase, qui les lie pour produire un plasmide recombinant contenant le gène.

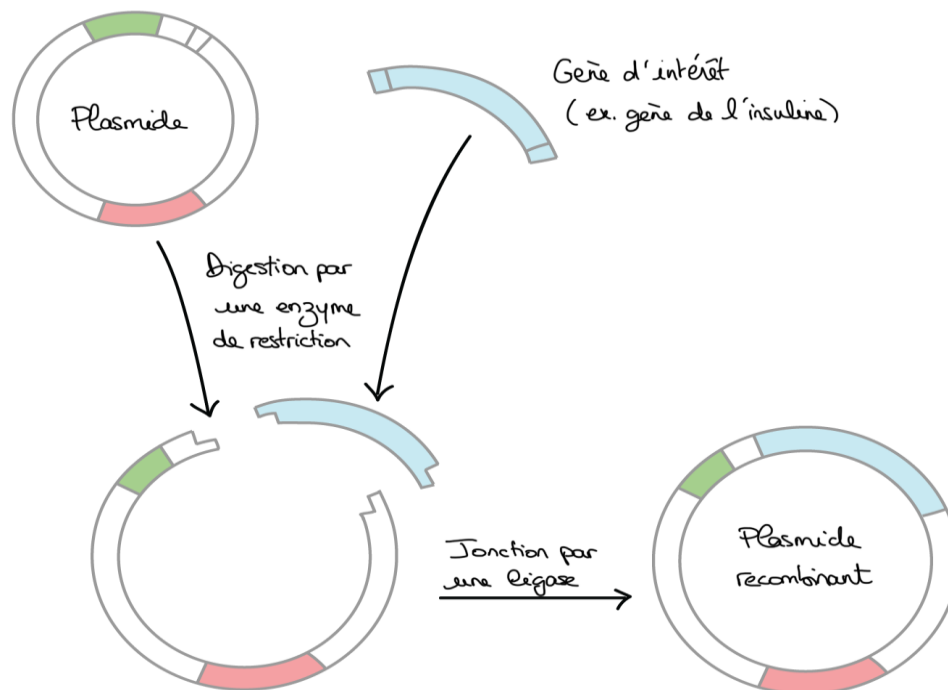


Schéma illustrant la digestion par des enzymes de restriction et la ligature d'une manière simplifiée.

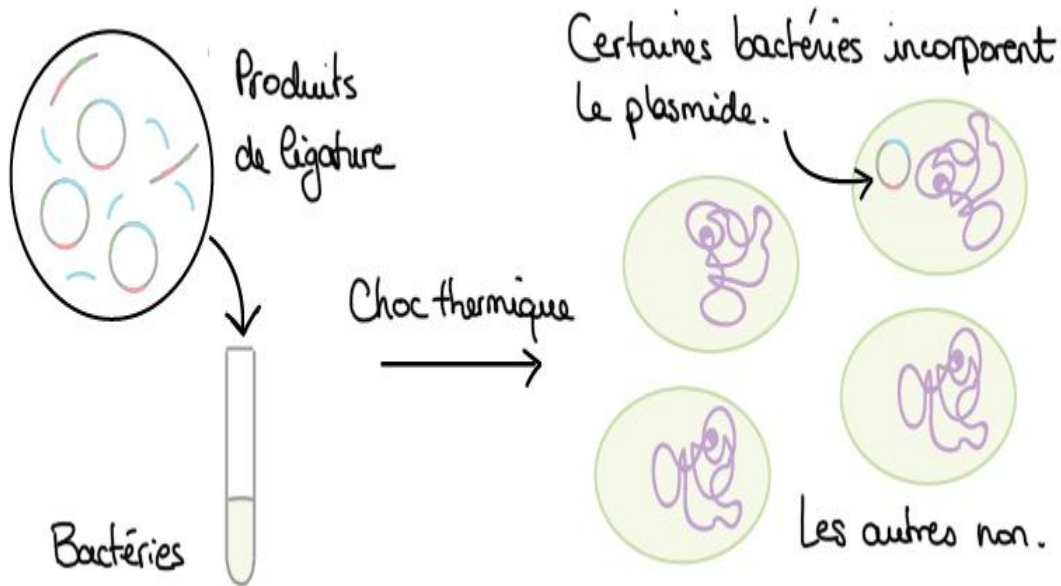
On débute avec un plasmide bactérien circulaire et un gène d'intérêt. Au niveau des deux extrémités du gène d'intérêt se trouvent les sites de restriction, ou les séquences d'ADN reconnues par une enzyme de restriction particulière. Dans le plasmide, il y a également un site de restriction reconnu par cette même enzyme, localisé juste après un promoteur qui régulera l'expression du gène chez les bactéries.

Le plasmide et le gène d'intérêt sont digérés (séparément) par l'enzyme de restriction. Les fragments sont purifiés et combinés. Ils présentent des "extrémités cohésives" complémentaires (des extrémités d'ADN simple brin), de sorte qu'elles peuvent se coller les unes aux autres.

L'enzyme ADN ligase réunit les fragments avec des extrémités complémentaires pour former une seule molécule complète d'ADN. On obtient ainsi un plasmide recombinant qui contient le gène d'intérêt.

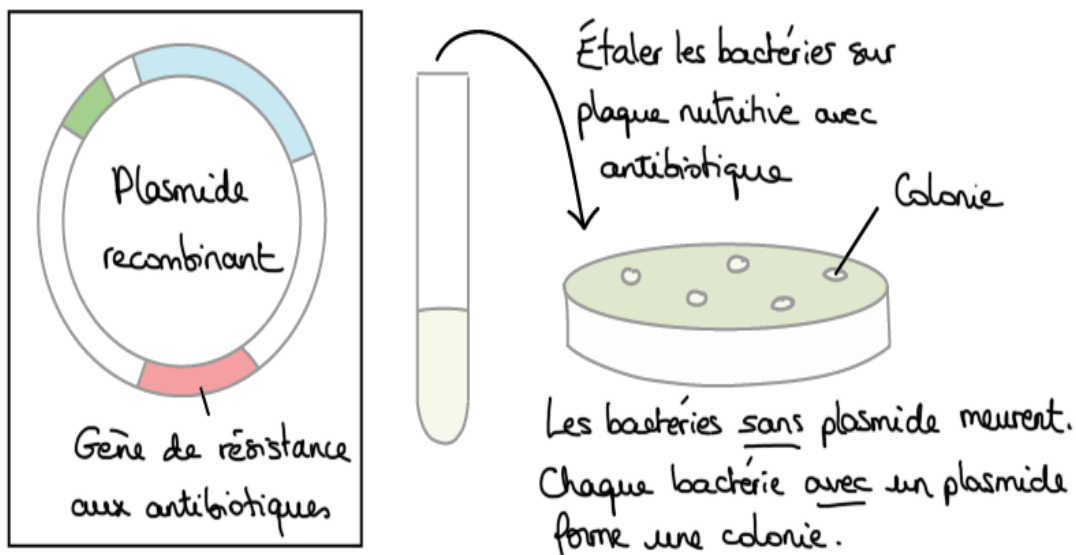
## 2. Transformation des bactéries et sélection :

Des plasmides et d'autres formes d'ADN peuvent être introduits dans des bactéries, comme le *E. coli* communément utilisé en laboratoire, par un processus que l'on appelle **transformation**. Au cours de la [transformation](#), des bactéries soumises au préalable à un traitement spécial reçoivent un choc (comme une forte température) qui les pousse à incorporer l'ADN étranger.



L'ADN produit par ligation (qui peut être un mélange de plasmides choisis, de plasmides secondaires et de morceaux d'ADN linéaire) est ajouté aux bactéries. Les bactéries subissent un choc thermique, ce qui les rend plus aptes à assimiler l'ADN par transformation. Toutefois, seule une infime minorité de bactéries parvient à incorporer un plasmide.

Un plasmide contient généralement un **gène de résistance aux antibiotiques**, qui permet aux bactéries de survivre en présence d'un antibiotique spécifique. Ainsi, les bactéries qui incorporent le plasmide peuvent être sélectionnées sur des plaques nutritives contenant l'antibiotique. Les bactéries sans plasmide meurent, tandis que les bactéries transportant un plasmide sont capables de vivre et de se reproduire. Chaque bactérie survivante donne naissance à un petit groupe, ou **colonie**, de bactéries identiques qui possèdent toutes le même plasmide.



Panneau de gauche : schéma d'un plasmide qui contient un gène de résistance aux antibiotiques.

Panneau de droite : toutes les bactéries issues de la transformation sont placées sur une plaque nutritive en présence d'antibiotique. Les bactéries sans plasmide meurent à cause de l'antibiotique. Chaque bactérie dotée

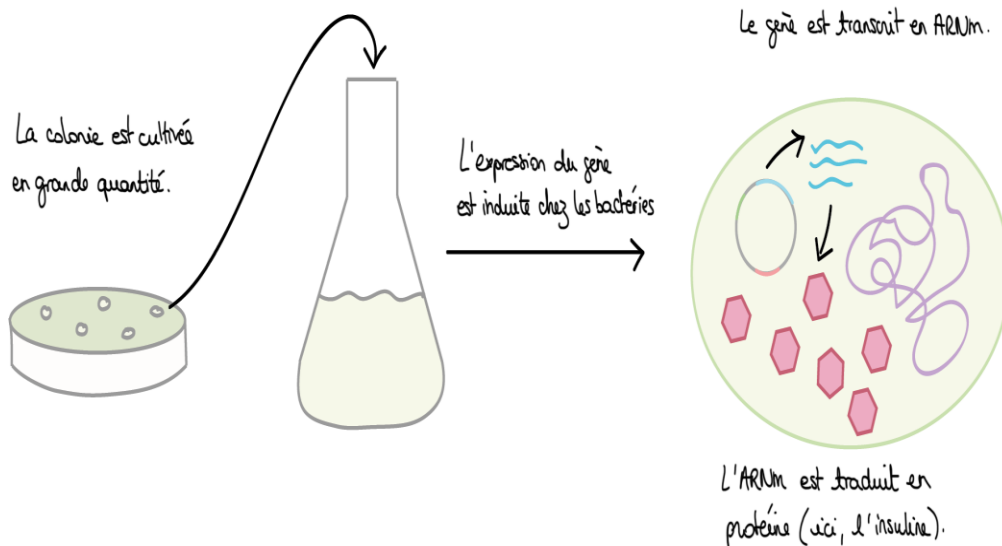
d'un plasmide forme une colonie, ou un groupe de clones bactériens qui contiennent tous le même plasmide. Une colonie ressemble classiquement à un petit point blanchâtre de la taille d'une tête d'épingle.

Toutes les colonies ne contiennent pas nécessairement le bon plasmide, car au cours de la ligature, les fragments d'ADN ne sont pas toujours "collés" exactement comme on le souhaite. En fait, on doit collecter l'ADN de plusieurs colonies et s'assurer que chacune contient le bon plasmide. On utilise couramment des méthodes telles que la [digestion par une enzyme de restriction](#) et la [PCR](#) pour vérifier les plasmides.

### 3. La production de protéines :

Une fois qu'on a trouvé une colonie bactérienne avec le bon plasmide, on cultive une grande quantité de bactéries porteuses du plasmide. Ensuite, on fournit aux bactéries un signal chimique qui leur ordonne de fabriquer la protéine d'intérêt.

Les bactéries sont utilisées comme des "usines" miniatures qui produisent de grandes quantités de protéines. Par exemple, si notre plasmide contient le gène de l'insuline humaine, la bactérie va commencer à transcrire le gène et à traduire l'ARNm pour produire de nombreuses molécules d'insuline humaine.



Une colonie sélectionnée est cultivée dans un grand volume de milieu nutritif (par exemple, dans un flacon d'un litre). Dans cette grande culture, on induit l'expression du gène porté par le plasmide dans les bactéries, ce qui entraîne la transcription du gène en ARNm et la traduction de l'ARNm en protéine. La protéine codée par le gène s'accumule à l'intérieur de la bactérie.

Une fois la protéine produite, les bactéries sont ouvertes pour la libérer. Il y a beaucoup d'autres protéines et de macromolécules qui flottent dans les bactéries en plus de la protéine d'intérêt (ici, l'insuline). Pour cette raison, la protéine d'intérêt doit être **purifiée**, ou séparée des autres constituants des cellules par des techniques biochimiques. La protéine purifiée peut être utilisée pour des expériences ou, dans le cas de l'insuline, administrée aux patients.

### Les usages du clonage de l'ADN :

Les molécules d'ADN élaborées grâce aux techniques de clonage sont exploitées à de nombreuses fins en biologie moléculaire et notamment dans les domaines suivants :

- **Biopharmaceutique.** Le clonage d'ADN sert à produire des protéines humaines pour des applications biomédicales, telles que l'insuline mentionnée ci-dessus. Parmi les autres exemples de protéines recombinantes, on peut citer l'hormone de croissance humaine, qui est administrée aux patients qui ne sont pas en mesure de la synthétiser, et l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA), qui est utilisé pour traiter les AVC et prévenir la formation de caillots sanguins. Les protéines recombinantes comme celles-ci sont souvent fabriquées dans des bactéries.
- **Thérapie génique.** Dans le cas de certaines maladies génétiques, les patients ne possèdent pas la forme fonctionnelle d'un gène donné. La thérapie génique tente d'apporter une copie normale du gène aux cellules du patient. Par exemple, le clonage de l'ADN permet de construire des plasmides contenant une version normale du gène dysfonctionnel chez les patients atteints de mucoviscidose. Lorsque les plasmides sont introduits dans les poumons des malades, la fonction pulmonaire se détériore moins rapidement
- .
- **Analyse génétique.** Dans les laboratoires de recherche fondamentale, les biologistes ont souvent recours au clonage d'ADN pour construire artificiellement des versions recombinantes de gènes. Ceci les aide à mieux comprendre le fonctionnement des gènes normaux dans un organisme.

Ce ne sont là que quelques exemples d'usages du clonage d'ADN en biologie aujourd'hui. Le clonage de l'ADN est une technique très courante qui présente une grande variété d'applications en biologie moléculaire.