

Génie Génétique

Contenu de la matière :

**Chapitre I. Enzymes de restriction et de modification
des acides nucléiques**

Chapitre II. Hôtes de clonage

Chapitre III. Vecteurs de clonage

Chapitre IV. Techniques de biologie moléculaire

Génie Génétique

Chapitre II. Hôtes de clonage

En biotechnologie, le génie génétique est utilisé à des fins commerciales comme pour la production de nouveaux vaccins, des grandes quantités de protéines valorisables, ou l'introduction de gènes spécifiques dans un organisme animal ou végétale.

Dans chaque cas, le choix de l'hôte est essentiel puisqu'il nous orientera vers un type de vecteur adapté.

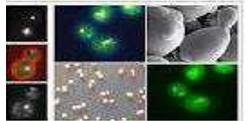
1.L'hôte idéal

Pour obtenir de grande quantité d'ADN cloné l'hôte idéal doit:

- Se développer rapidement dans un milieu de culture peu onéreux.
- Être non pathogène.
- être capable d'incorporer l'ADN.
- Être stable en culture
- Possède des enzymes appropriées pour la réplication du vecteur.

Les hôtes répondant à ces critères sont des microorganismes eucaryotes ou procaryotes dont les génomes sont bien connus car entièrement séquencés, génétiquement manipulables.

Tab.1: Hôtes de clonage moléculaire

<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Procaryotes		Eucaryotes
Bacille à Gram– 	Bacilles à Gram + Spore + 	Champignons 
Avantages		
<ul style="list-style-type: none"> - Génétiquement très bien connue. - Nombreuses souches disponibles - Procaryote le plus connu 	<ul style="list-style-type: none"> - Facilement transformable - Non pathogène - Protéines secrétés naturellement - Formation d'endospores facilitant les cultures. 	<ul style="list-style-type: none"> - Génétiquement très bien connue - Non pathogènes - Assure la maturation des ARNm et des protéines - Facile à cultiver.
Inconvénients		
<ul style="list-style-type: none"> - Potentiellement pathogènes -Périplasme piégeant les proteines 	<ul style="list-style-type: none"> - Génétiquement instable - Génétique moins connue qu' E coli 	<ul style="list-style-type: none"> - Plasmides instables -Pas de réplication pour la plupart des plasmides procaryotes

Il faut noter que *E. coli* est l'organisme le plus utilisé en clonage moléculaire.

Avec *Bacillus subtilis* l'inconvénient majeur reste la difficulté de maintenir la réplique plasmidique dans les sous cultures, ce qui engendre souvent la perte de l'ADN cloné.

Des vecteurs plasmidique et des YAC (Yeast Artificial Chromosome) ont été développés pour le clonage. L'avantage que présente cet hôte est qu'il possède les ARN et les systèmes post traductionnels complexes nécessaire à la synthèse de produits de gènes d'organismes supérieurs. Les processus post traductionnels peuvent être à l'origine de problème de clonage.

La culture de cellules de mammifères présente un coût élevé et des difficultés de production à grande échelle. En plus le niveau d'expression des gènes clonés est souvent faible (aussi pour les insectes, plantes, etc.).

On dit dans les cas des bactéries **transformation**, le processus d'intégration de l'ADN étranger, mais pour les eucaryotes on dit **la transfection**. 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.

2.Méthodes d'introduction de l'ADN à cloner dans la cellule hôte

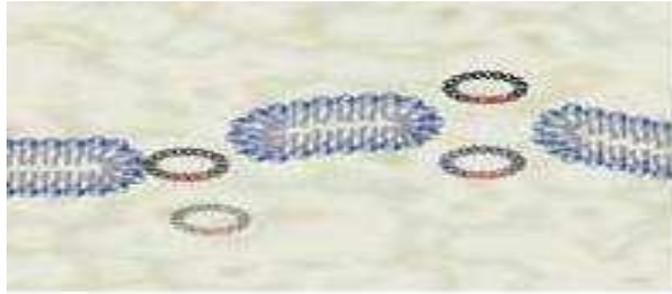
Il y'a plusieurs méthodes sont largement utilisées pour introduire l'ADN dans les cellules hôtes.

N.B. Chez les bactéries on peut transférer l'ADN à cloner par trois méthodes:

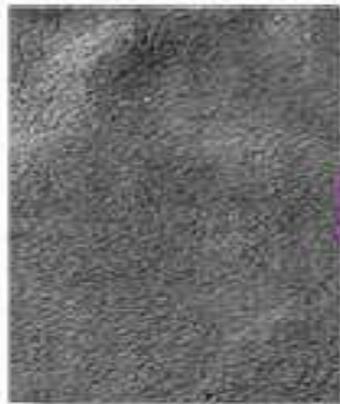
- ✓ la transformation,
- ✓ la transduction et
- ✓ la conjugaison.

2-1- Électroporation

Cette technique implique l'exposition de l'hôte à des décharges électriques afin d'ouvrir les pores (temporairement) dans la membrane par lesquels, l'ADN cloné, ajouté dans le milieu, peut pénétrer sans lyse des cellules (Fig. 1).

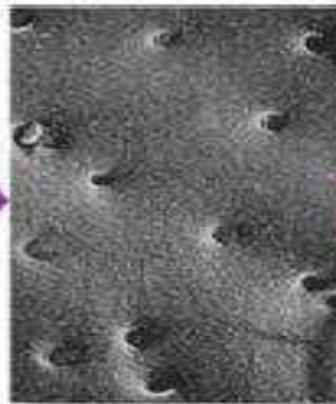


Électroporation



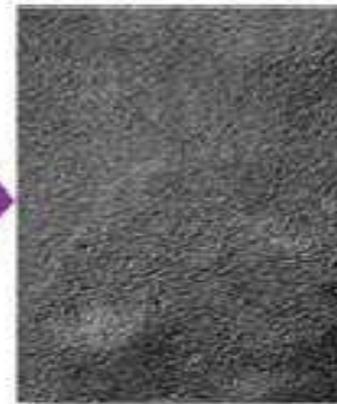
**Membrane
cellulaire**

avant exposition



**Membrane
cellulaire**

**durant
l'exposition**



**Membrane
cellulaire**

après l'exposition

Fig.1: Représentation graphique des plasmides en passant par les pores aqueux dans la membrane plasmique.
Phénomène d'électroporation.

2-2- Un canon à Particules

La transfection des cellules cibles se fait par **des billes métalliques** recouvertes d'acides nucléiques, en perçant parois et membranes plasmiques sans provoquer de lyse cellulaire.

Cette technique a été utilisée sur des levures, des algues, des cellules de plantes et même des mitochondries et chloroplastes. De plus contrairement à l'électroporation, cette technique peut être utilisée pour introduire de l'ADN dans des tissus intacts comme des graines de plantes.

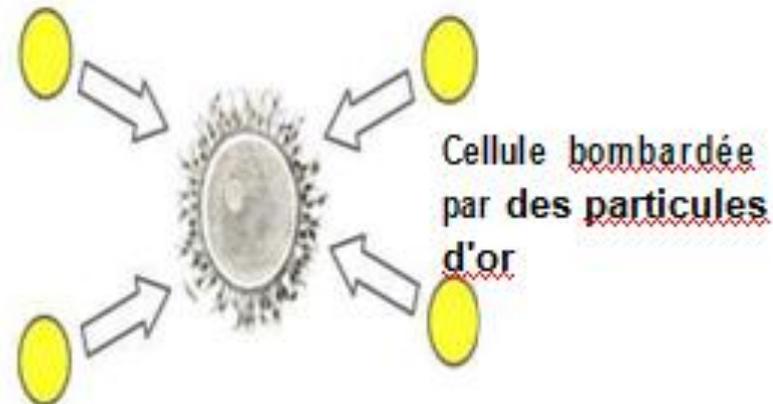
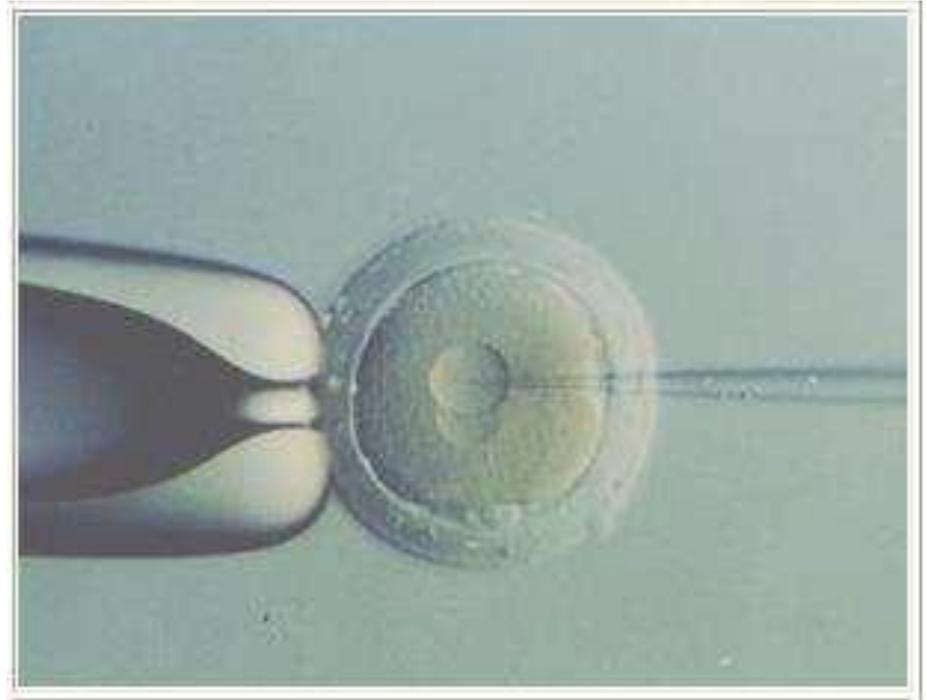


Fig.2:Canon à acides nucléique (*biolistics*) pour la transfection d'eucaryotes.

2-3-Microinjection

Dans les cellules animales, l'ADN peut être injecté dans le noyau par microinjection.

Fig.3:Microinjection des gènes de le pronucléus mâle d'un ovocyte de lapin



Génie Génétique

Chapitre III. Vecteurs de clonage

Un vecteur de clonage est un élément génétique à **réplication autonome**, utilisé **pour produire** de multitude de copie **du gène d'intérêt**. Ces vecteurs de clonage sont spécialement conçus pour permettre l'intégration de la portion d'ADN exogène dans **un site spécifique** sans que cela affecte sa **propre répllication**. Il existe plusieurs types de vecteurs pouvant introduire des molécules d'ADN recombinées dans les bactéries, les levures, les cellules végétales ou les cellules de mammifères et humaines.

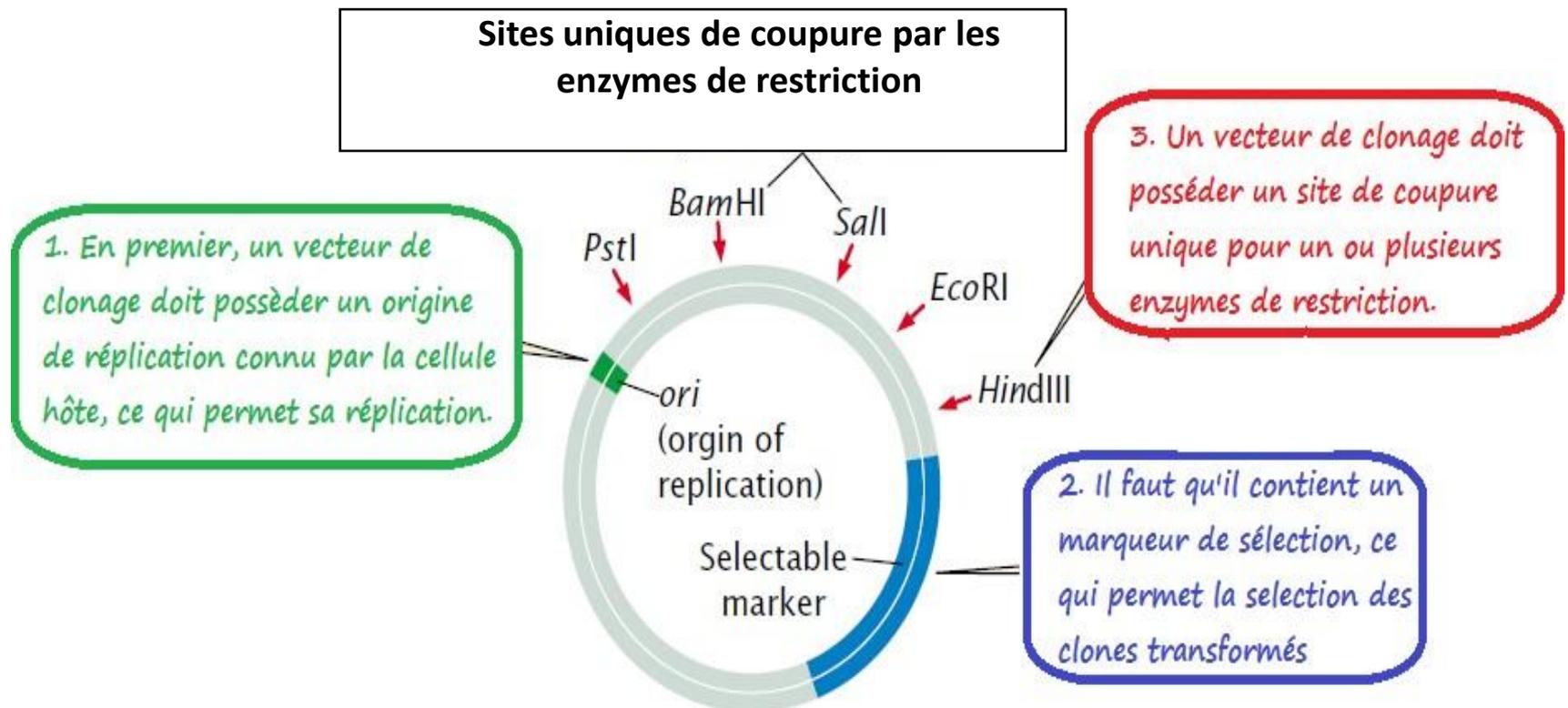


Fig.1: Les trois caractéristiques d'un vecteur de clonage idéal.

1- Vecteurs bactériens: La bactérie *E. coli* est la bactérie la plus utilisée en clonage moléculaire, l'ADN recombinant peut être introduit sous forme de plasmides, Phages, phagmides, cosmides, BAC etc.

1-1- Plasmides

Les plasmides sont des petits éléments génétiques extra-chromosomiques, doués de la **réplication autonome**, **d'ADN double brin**, **circulaires**, leur taille varie de **1 kb à deux ou trois centaines de kb**.

Ils contiennent des gènes codants souvent pour des protéines qui donnent un ou des avantage(s) à la cellule hôte. Comme par exemple : **Résistance aux antibiotiques**, Résistance aux métaux lourds, Dégradation de composés aromatiques, Production de toxines, Production d'antibiotiques, Induction des tumeurs chez les plantes

L'amplification de l'ADN plasmidique par réplication varie entre les différents plasmides: **Plasmides à petit nombre de copies et Plasmides à grand nombre de copies**.

Il faut noter que **des mutations** dans les plasmides peuvent affecter le nombre de copies du plasmide par cellule, surtout celles qui touchent **au répresseur**.

Les plasmides naturels possèdent dans leur génomes un locus nommé "*par*" qui fonctionne à la façon de centromère des chromosomes eucaryotes, ce locus contrôle la répartition précise des plasmides parmi les cellules filles lors de la division cellulaire.

Pour réduire la taille des plasmides qui servent de vecteurs de clonage, le locus "*par*" est très souvent éliminé. C'est notamment le cas du plasmide pBR322 et leurs dérivés. Les plasmides sont de bons vecteurs de clonage chez les bactéries parce qu'ils se multiplient en nombre de copies important et qu'ils sont aisément purifiables.

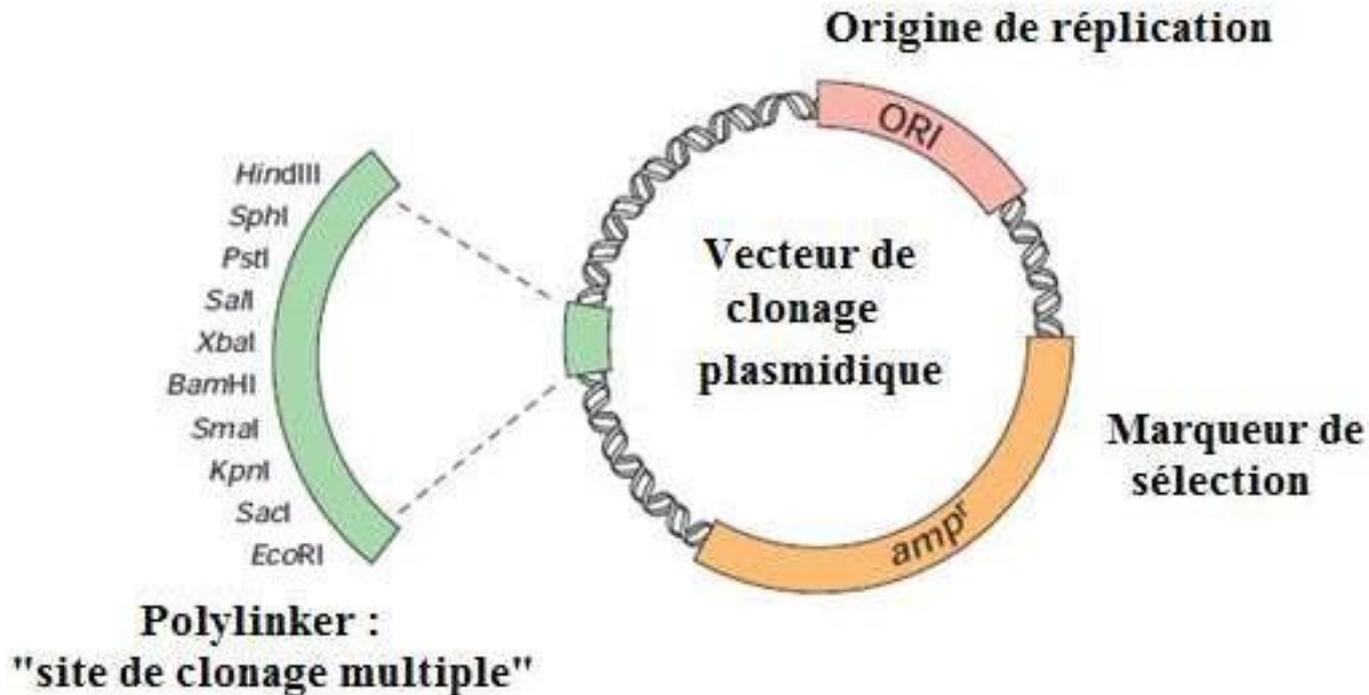


Fig.2: Composants basiques d'un vecteur plasmidique qui peut se répliquer chez *E. coli* (Lodish *et al.*, 2003).

1-1-1-Plasmide pBR322

Le pBR322 appartient à une série de vecteurs de clonage de première génération, partiellement construit par génie génétique. Qui fut construit sur la base d'une chimère rassemblant les éléments intéressants des plasmides naturels et en augmentant le nombre de sites uniques de coupure par les enzymes de restriction.

Caractéristiques du plasmide pBR322

pBR322 est un petit plasmide constitué de 4361 pb, 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.

Sa production peut être portée à plusieurs milliers de copies (1000 à 3000 copies par cellule)

lorsque l'on inhibe la synthèse protéique par l'addition de chloramphénicol dans la culture. Il est facilement purifiable sous la forme superenroulée par les techniques usuelles d'extraction et d'isolement.

Il est possible d'y insérer un fragment d'ADN de bonne dimension sans toutefois dépasser la taille de 10kpb sous peine de l'instabilité plasmidique.

Il possède deux gènes de résistances aux antibiotiques : l'un pour l'ampicilline, l'autre pour la tétracycline.

Il possède également vingt sites uniques pour des enzymes de restriction.

Il est facilement transférable par transformation ou par électroporation.

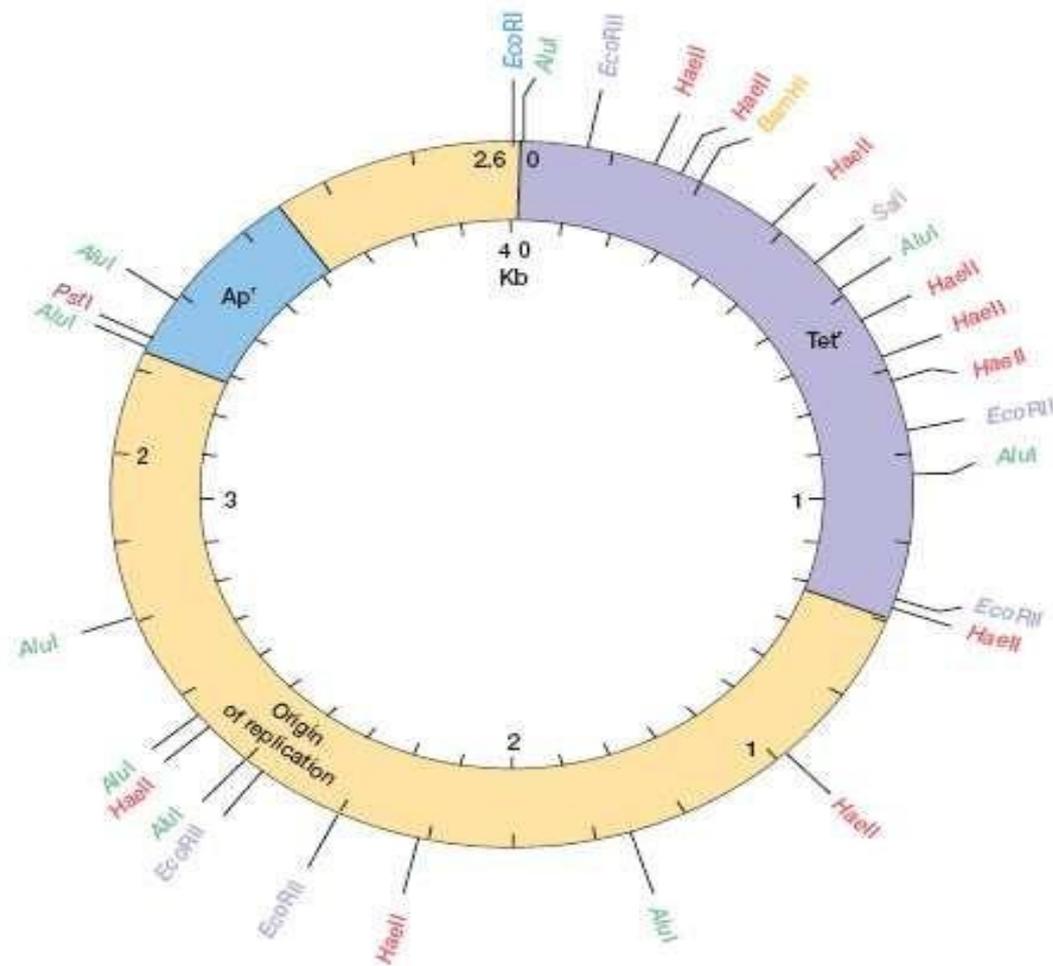


Fig.3: La carte du plasmide pBR322 d'*E. coli*.

La localisation des sites de coupure par certaines enzymes de restriction est montrée. Ce vecteur possède deux gènes de résistance (Ap^r: Résistance à l'ampicilline, Tet^r: Résistance à la tétracycline).

1-1-2-Vecteurs de seconde génération

De nouvelle génération de plasmides plus puissants ont été développés depuis pBR322 et ces dérivés. C'est le cas de la famille **pUC** appelés (les vecteurs de clonage de secondes génération).

Les vecteurs de clonage de seconde génération ce sont des petits **plasmides d'environ 2700pb**.

Le plasmide pUC19 contient le **gène de résistance à l'ampicilline de pBR322**, mais en plus il possède **une partie du gène *lacZ*** dans lequel a été introduit un site multiple de clonage (**Polylinker**), contenant toute **une série de sites de coupure unique**.

Le fait que ce polylinker soit inséré dans le gène *lacZ* qui intervient dans le catabolisme du lactose permet de révéler facilement l'intégration d'un insert par « **inactivation insertionnelle** ». L'utilisation d'un inducteur coloré comme le X-gal (5-bromo-4chloro-3-indonyl- β -D- galactoside), l'hydrolyse de ce dernier en dibromo-5,5-dichloro-4, 4-indigo (de couleur bleu), indique la production de β -galactosidase.

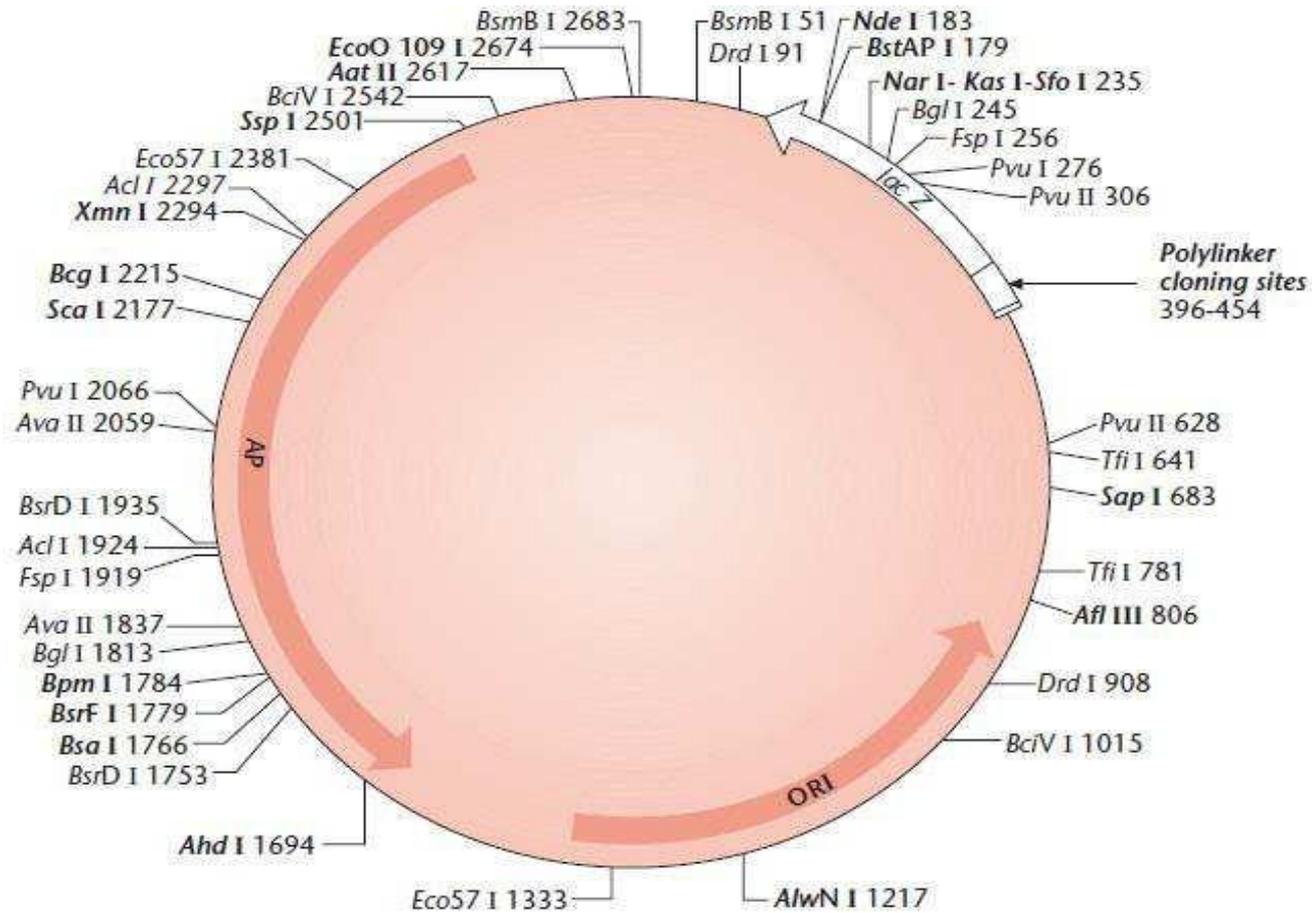


Fig.4: La carte génétique de certain vecteur de type pUC dérivés de pBR322, le site de clonage multiple (polylinker) est introduit dans le gène *lacZ*, sans interrompre la fonction du gène (Primose et *al.*,2002).

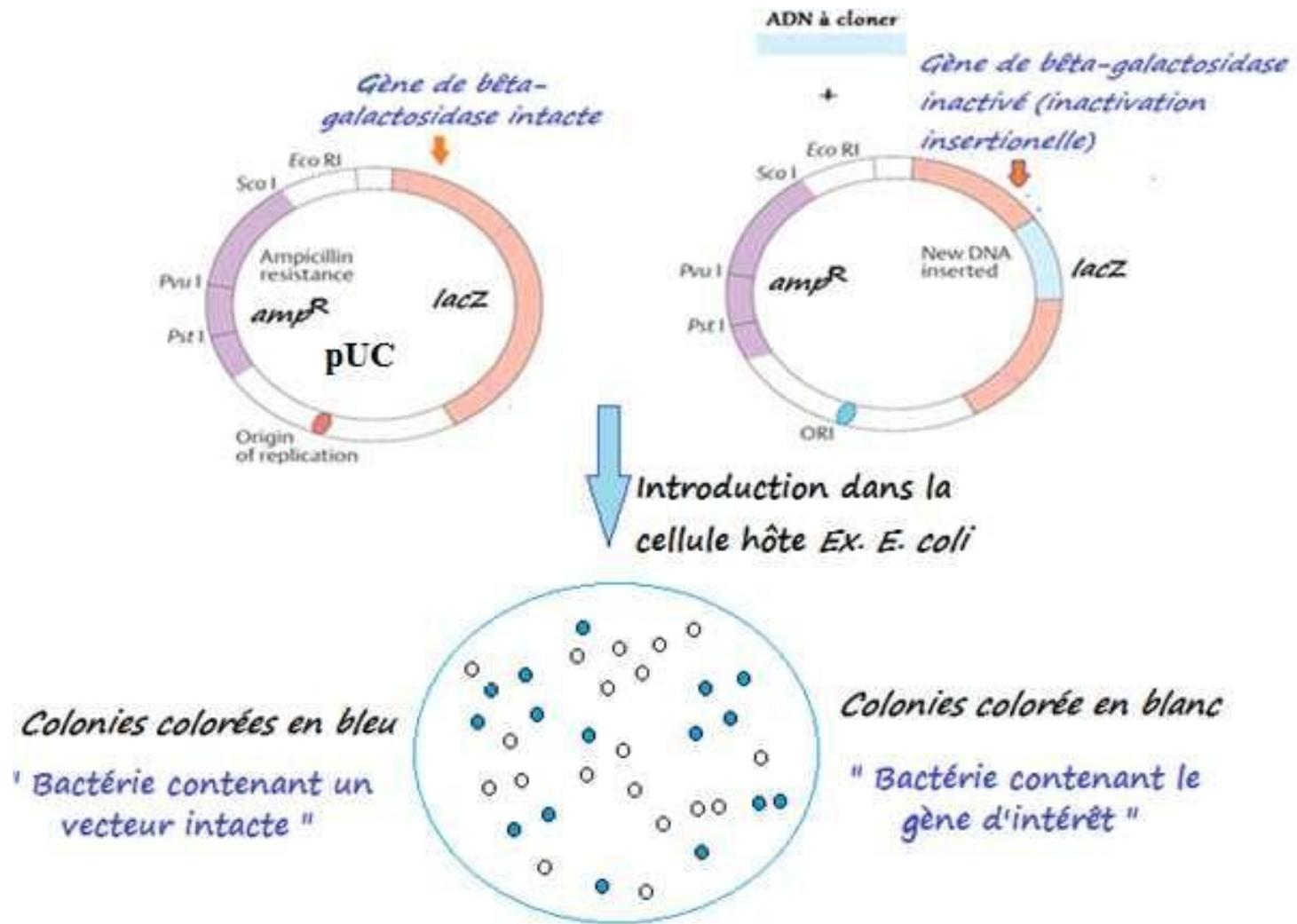


Fig.5: Insertion d'un fragment d'ADN (< 10 kb) dans un vecteur pUC
 L'inactivation insertionnelle du gène $lacZ$ permet de révéler facilement les colonies contenant le gène d'intérêt (sélection positive: colonies blanche). Le milieu de sélection est supplémenté par l'ampicilline.

La sélection des clones contenant le gène d'intérêt par le **test x-gal**. Cette stratégie a également été largement employée dans le développement de vecteurs de clonage de type viraux.

Dans certains vecteurs le polylinker est introduit dans un gène qui lorsqu'il est exprimé, est létal pour la cellule.

Donc seules les cellules qui contiennent un plasmide dans lequel le gène létal **est inactivé** sont capables de se développer.

La nécessité de vecteur pour le clonage de grands fragments d'ADN et d'autres objectifs pour répondre à des besoins précis. Une collection de vecteurs très spécialisés s'est constituée.

1-2-Bactériophage λ

Le bactériophage λ a été découvert par **E.M. Lederberg** en 1950. C'est **un virus** d'*E. coli*, **l'ADN** de ce phage est **une molécule linéaire** d'ADN **double brin** de **48 kb**.

A chaque extrémité 5' se trouve une région monocaténaire de 12 nucléotides, l'une complémentaire de l'autre et leur association donne une structure circulaire à l'ADN dans la cellule hôte.

L'association de ces extrémités cohésive naturelles forme le site *cos* (fig.)

[*cos*: Des éléments important pour la réplication et l'encapsidation de bactériophage λ].

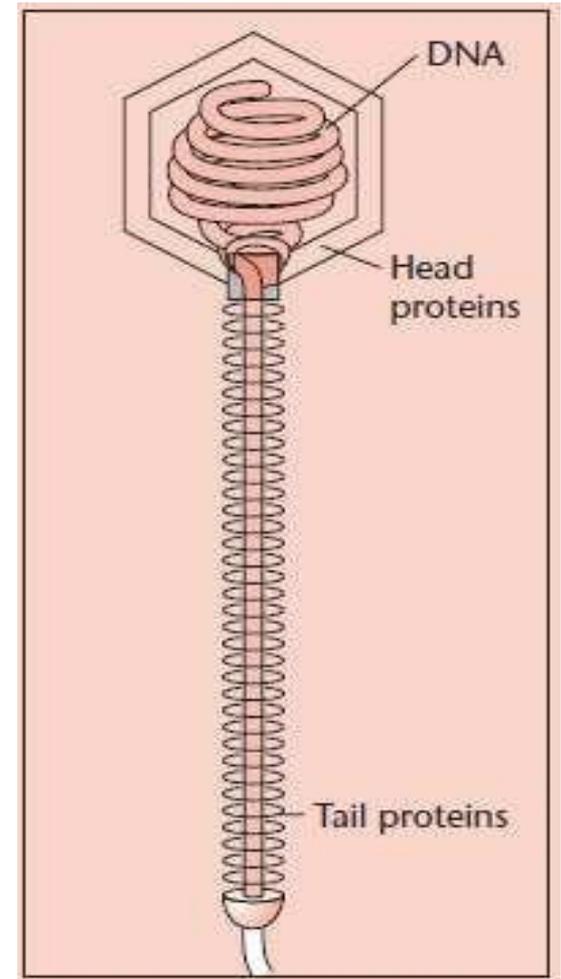
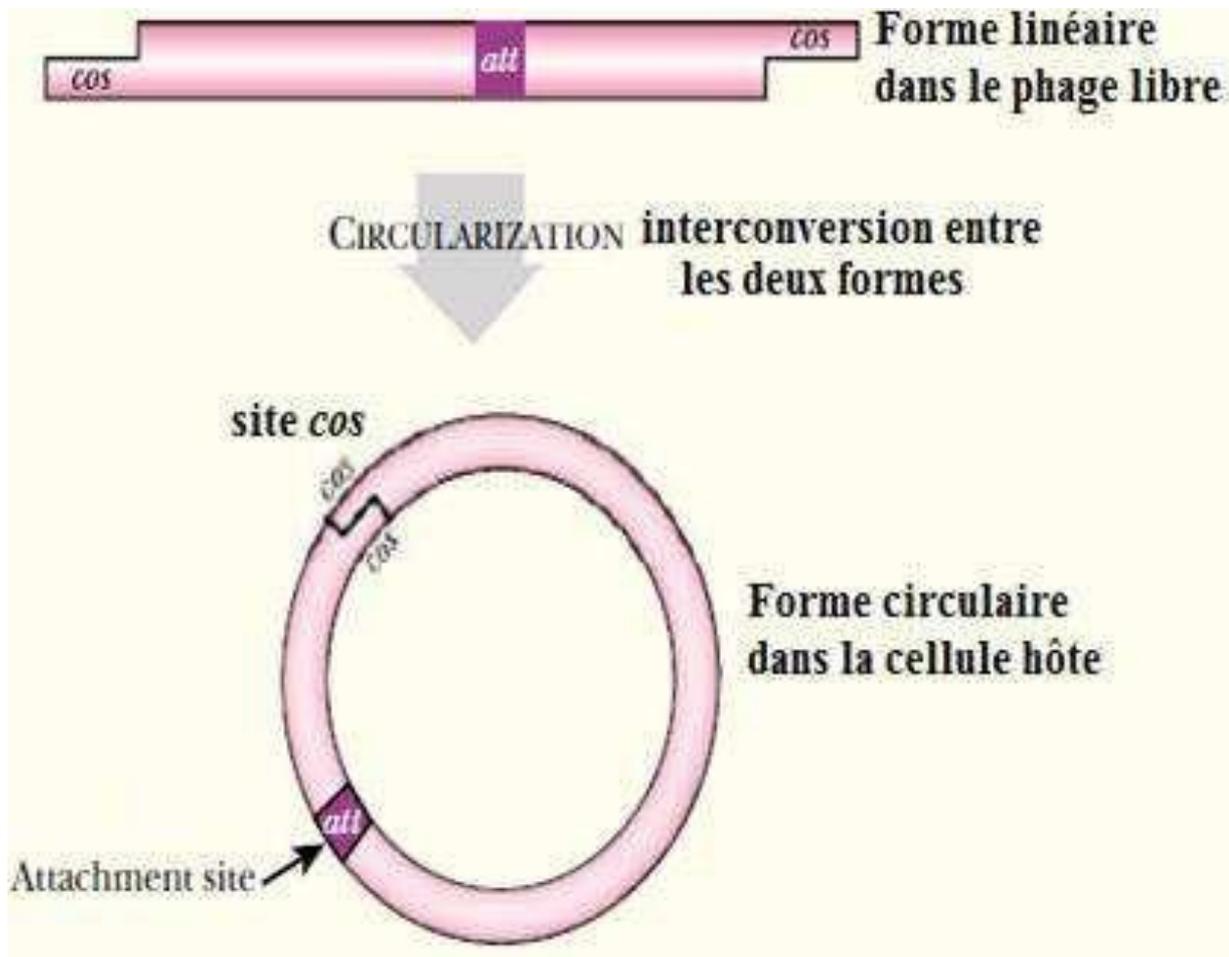


Fig.5: Différentes formes du génome du bactériophage λ , et sa structure (Primose *et al.*, 2002).

Le bactériophage λ a donné naissance aux premiers vecteurs de types phagiques car:

- Ça biologie est bien connue
- La quantité d'ADN qu'il peut intégrer est plus importante que celle véhiculée par les vecteurs plasmidiques. Il est possible d'insérer jusqu'au **22kb**, après élimination de la partie indispensable au cycle de vie du phage (fig. 6)
- La possibilité **d'empaqueter** *in vitro* l'ADN phagique nu recombinant dans les têtes de phage.
- Il a une capacité d'infection (**transfection**) de l'hôte très rapide.
- Le nombre de copies par cellule étant considérable.
- Le rendement de cette transfection est très supérieur à ce qui est obtenu lors de la transformation de la bactérie par les plasmides.

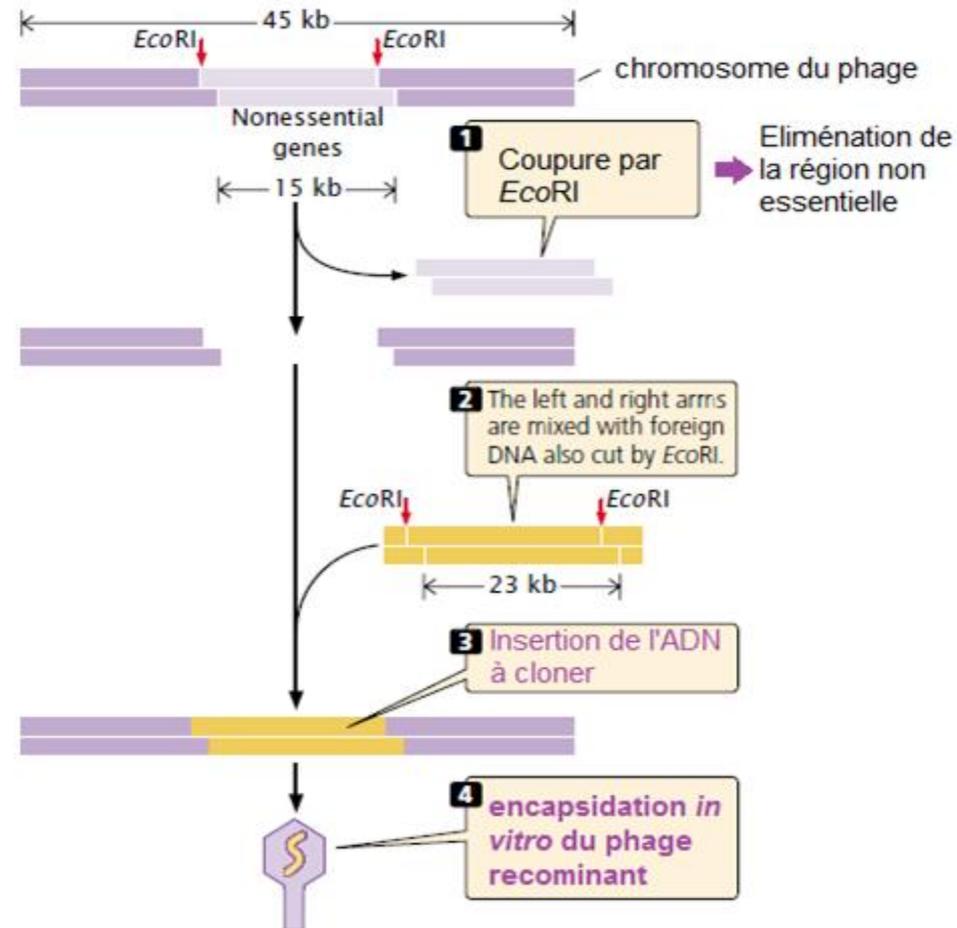
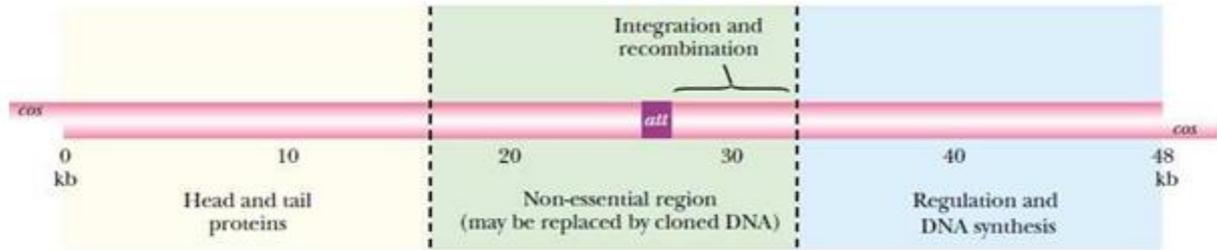


Fig.6: L'élimination de la partie indispensable (non essentielle) au cycle de vie du bactériophage λ augmente la capacité d'insertion de grand fragment (22kb) (Passarge, 2007).

1-1-3-1-Principales étapes de la construction d'un vecteur phagique

Produire une grande quantité de phage, la purifier, puis en extraire son ADN génomique, qui sera digéré par une enzyme de restriction.

Hybrider les deux bras du phage avec le fragment d'ADN à cloner (ce dernier doit avoir une taille adéquate) puis souder par l'ADN ligase.

Procéder à l'encapsulation *in vitro* de l'ADN recombinant en ajoutant les protéines phagiques de tête et de la queue. Ces derniers ils vont s'auto assembler pour former les nouveaux virions recombinants infectieux.

Infecter des bactéries (cellules hôtes) et les étaler sur boîte de Pétri, chaque plaque de lyse correspond à un phage recombinant qui peut être récupéré.

Vérifier la présence d'un insert dans l'ADN recombinant par toute procédure appropriée (hybridation ADN-ADN, séquençage, test bleu-blanc etc.)

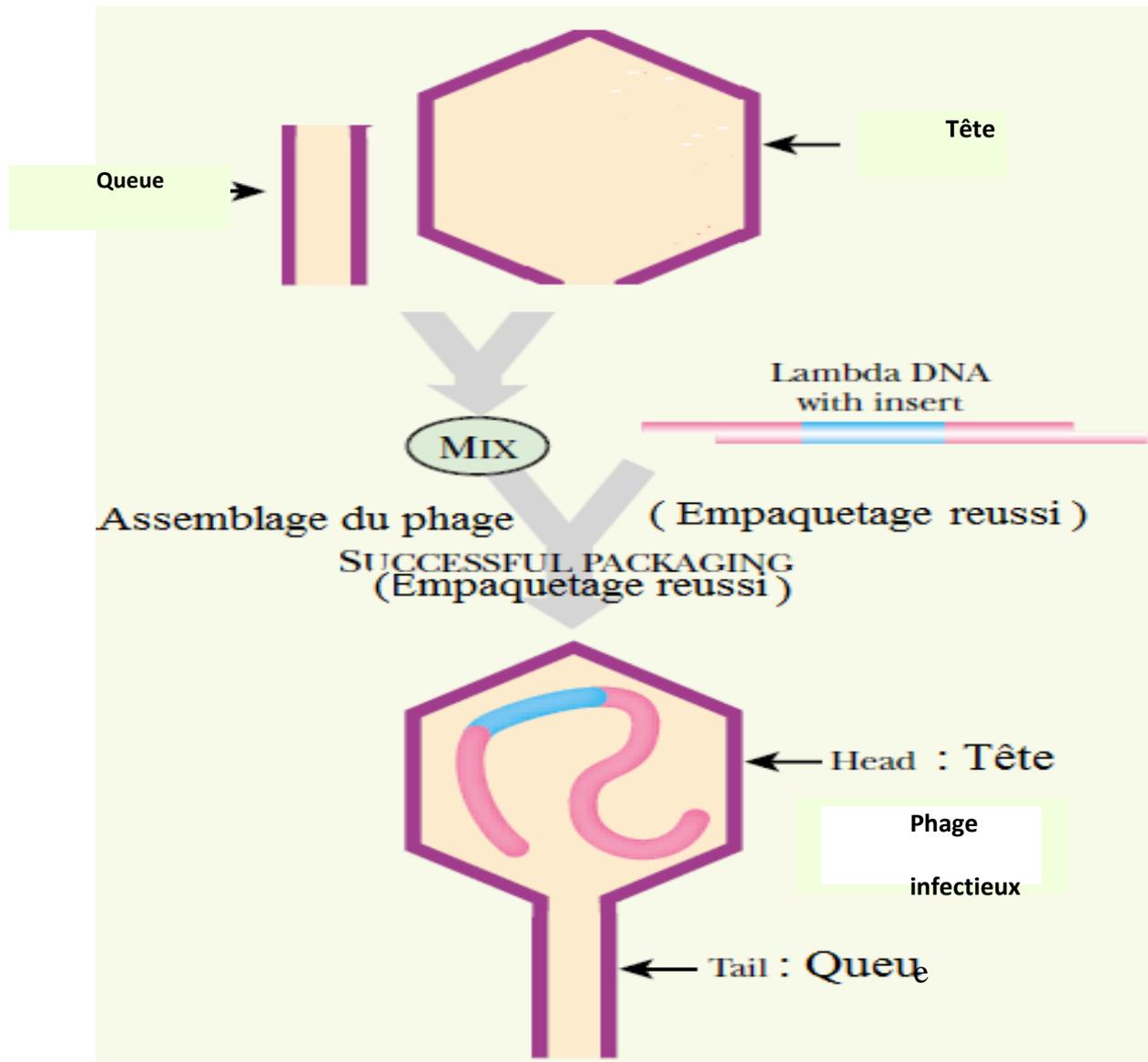


Fig.7: Encapsidation *in vitro*(Passarge, 2007).

1-3-Bactériophage M13

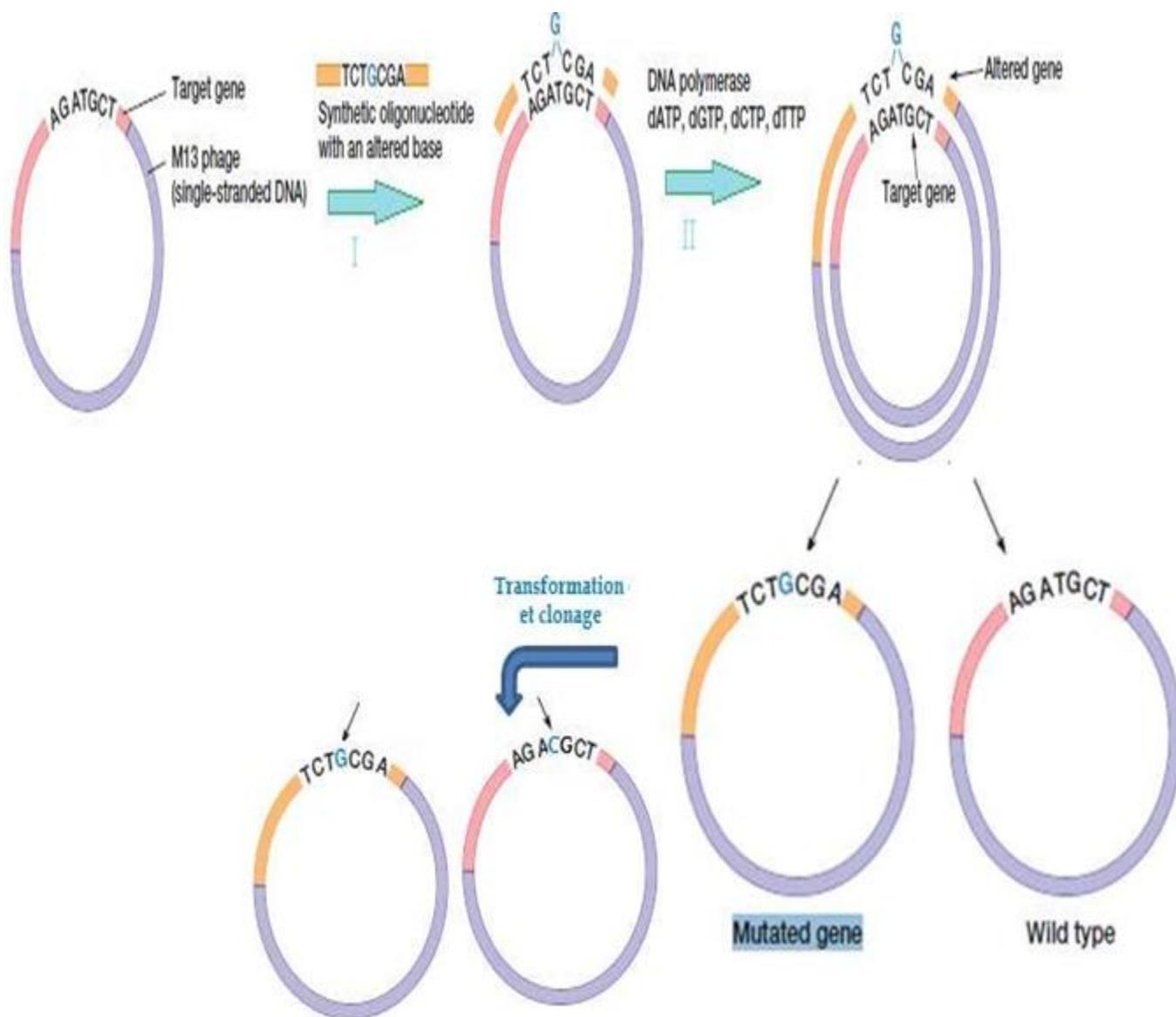
Comme le bactériophage λ , le M13 est un petit virus d'*E. coli* (6.407 kb). L'ADN de ce phage est sous **forme simple brin circulaire positif**.

Mais lors de la réplication un ADN négatif complémentaire est synthétisé, c'est la forme répliquative (replicative form) ou la forme intermédiaire. La forme répliquative présente toute **les qualités des vecteurs plasmidiques**. En plus cette forme sert de matrice à la synthèse d'ADN simple brin qui peut être encapsidé et par conséquent facilement isolable.

Le M13 a des dérivés contenant une partie **du gène *lacZ*** (peptide α), avec un polylinker (MCS: **multiple cloning site**) de 13 sites uniques de restriction (**54pb**). Ce qui permet d'insérer des fragments d'ADN dans ces sites, et la sélection des colonies blanches sur des boîtes contenant l'analogue **X-gal**.

Ce vecteur et ces dérivés peuvent être utilisés :

- Pour **séquencer** des fragments d'ADN même de séquences inconnues par **la technique de Sanger**.
- Pour **le clonage des fragments d'ADN** de taille jusqu'à six fois plus grand que l'ADN viral.
- Pour **la transfection des cellules compétentes** d'*E. coli* par les deux formes (MC, BC [RF]).
- Dans **la mutagénèse dirigée** (Fig. 8).



Le T dans le type sauvage, devient un C après la répllication de type mutant (G).

1-4-Cosmides

Les cosmides sont des vecteurs artificiels ($\approx 5\text{kb}$) constitués d'un plasmide classique auquel ont été ajoutées les séquences *cos* du phage λ .

Ces vecteurs rassemble à la fois les propriétés intéressantes des plasmides comme :

- L'origine de réplication
- Gène de résistance à un antibiotique Et celles du bactériophage
- Encapsidation *in vitro* de grand fragment d'ADN.

N.B. Il faut insérer de **32 à 47 kb** d'ADN étranger dans un vecteur de type cosmide pour qu'il soit encapsidé.

Après l'encapsidation *in vitro*, la particule virale formée peut infecter une cellule hôte appropriée. L'ADN du cosmide recombinant injecté se circularise à l'intérieur de la cellule comme un ADN de phage. Mais il se réplique comme un plasmide, sans exprimer les fonctions du phage.

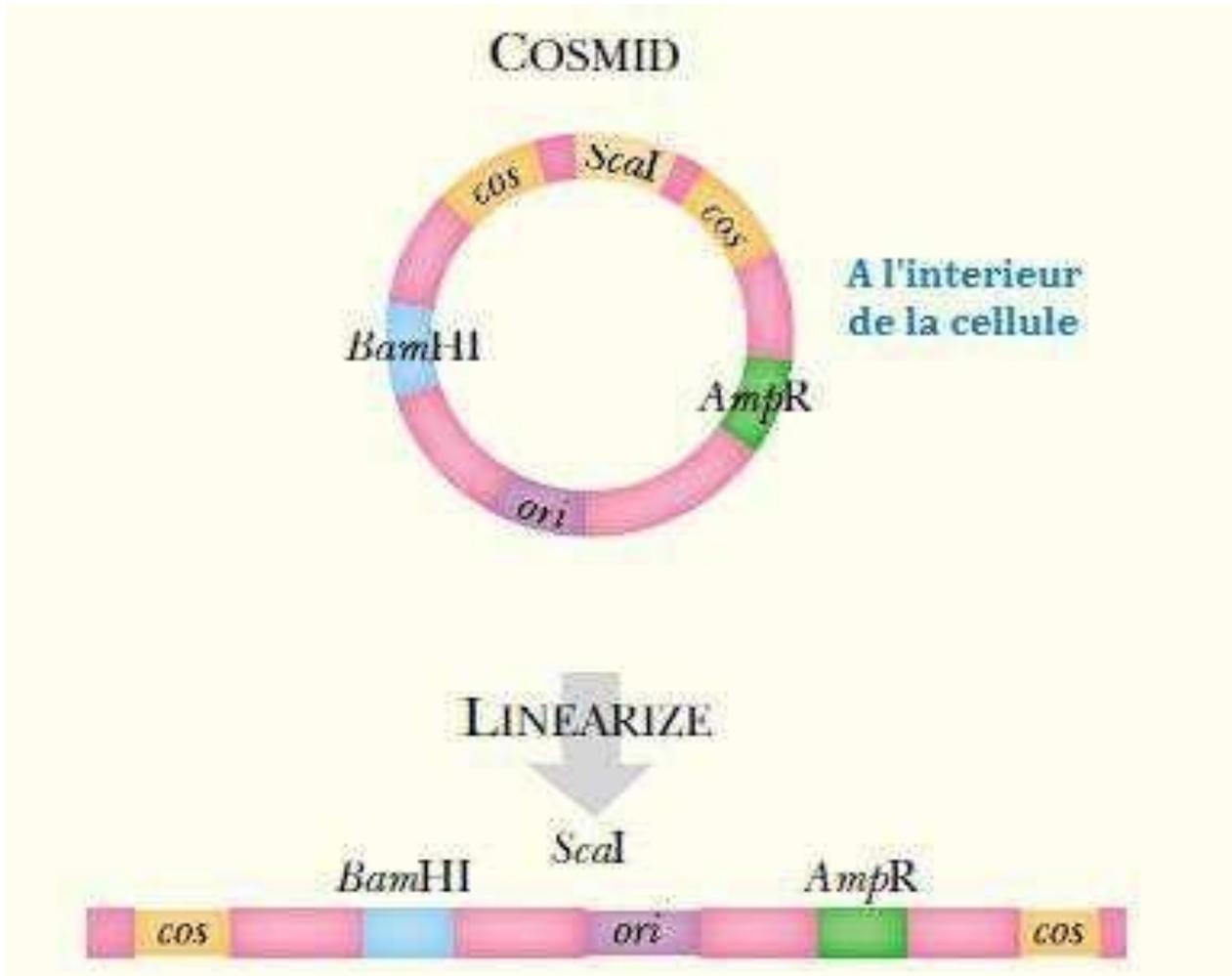


Fig.9: Les deux formes (linéaire et circulaire) d'un cosmide.

Les cellules transformées sont sélectionnées sur un milieu contenant de **l'antibiotique** (ampicilline). Comme conclusion les cosmides permettent :

L'encapsidation d'un plasmide modifié (recombinant) dans un virion.

D'obtenir des rendements d'intégration bien supérieurs à ceux que donne une transformation bactérienne par un plasmide.

Le clonage d'un fragment d'ADN plus grand (**de 32 à 47 kb**) que celle véhiculé par **un plasmide** (≈ 10 kb) ou par le **bactériophage λ** (≈ 22 kb).

Nécessite moins de clones pour créer une banque génomique.

Les cosmides sont plus stables que les plasmides.

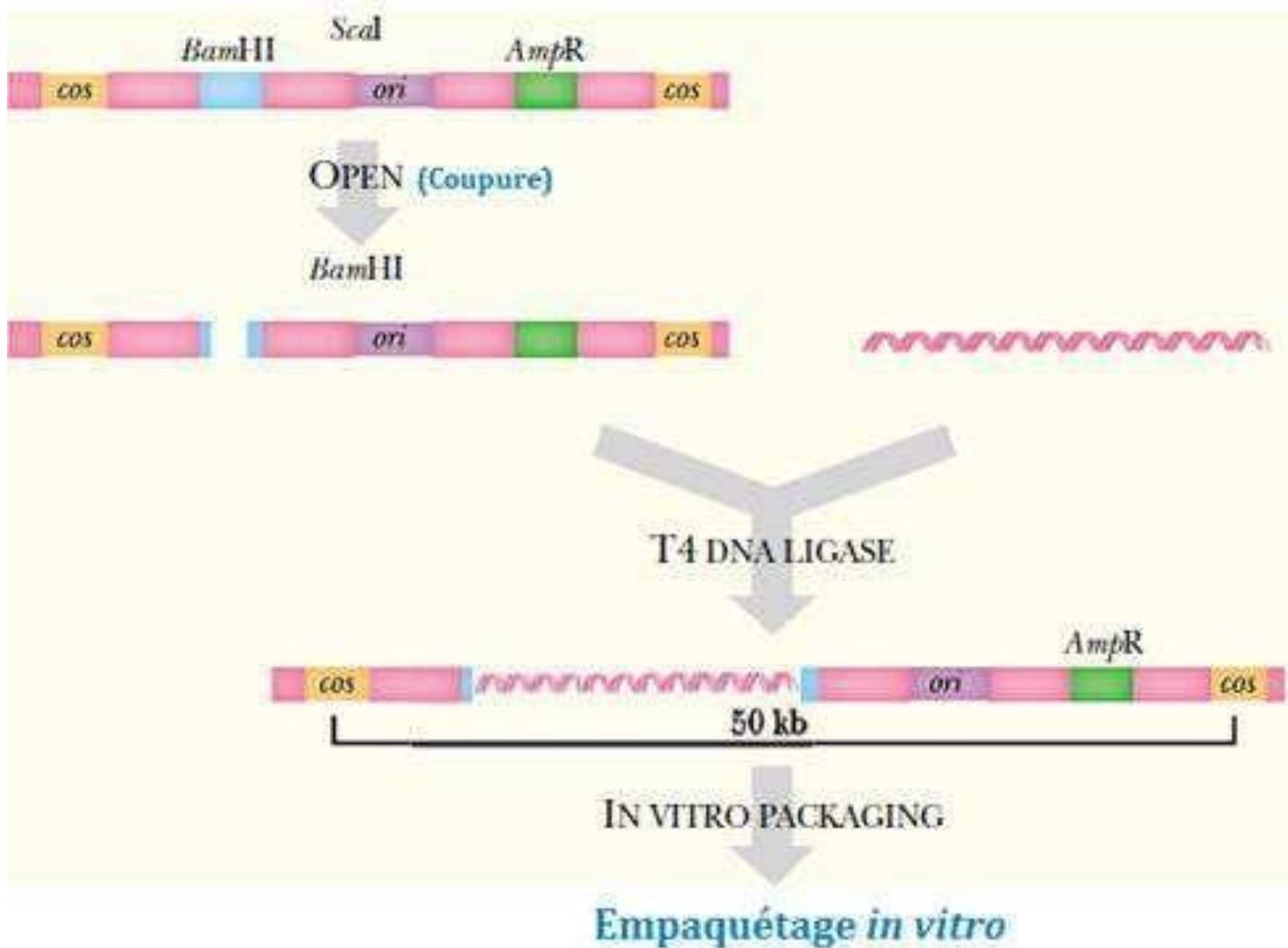


Fig.10: L'empaquetage *in vitro* d'un cosmide recombinant

1-5-Phagemides ou phasmides

Sont des vecteurs qui combinent des éléments **d'origine plasmidiques et phagiques**.

Le phagmide le plus utilisé est **pBlue scriptII KS**, c'est un dérivé du plasmide pUC19, il contient un **polylinker, interrompu par deux promoteurs (T3 et T7) se lus en sens opposés**, il contient aussi un **promoteur *lac*** inductible avec une partie du gène ***lacZ*** (blanc-bleu sélection).

Une **origine de réplication** dérivée de **M13** (phage filamenteux). Un ***ori ColEI*** pour permettre la réplication du phage comme un plasmide.

Ils sont utilisés pour cloner de grand fragment d'ADN et la manipulation des gènes.

1-6- Chromosomes artificiels bactériens "BAC"

Les BACs (Bacterial Artificial Chromosomes) sont construits à partir du plasmide F (99.2 kb) à cause de ces propriétés intéressantes (Ex. Phénotype Hfr: mobilisation du ou souvent d'une partie du chromosome bactérien d'une cellule donatrice à une cellule réceptrice, cela après l'intégration au chromosome).

Il contient qu'une petite fraction du plasmide F, et comme les vecteurs plasmidiques, il possède un **polylinker**, **gène de résistance à un antibiotique** comme marqueur de sélection (*cat*: résistance au chloramphénicol). **Une origine de réplication et *rep E*** qui sont nécessaires à la réplication. **Des régulateurs de la réplication (*sop B*, *sop A*)** pour maintenir un faible nombre de copies, **sa taille est de 6.5 kb.**

L'hôte typique d'un BAC est **une souche mutante de *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, cela interdit la recombinaison et les réarrangements de l'ADN cloné du BAC avec le chromosome de l'hôte.

Le BAC a la capacité d'insérer jusqu'au **300 kb.**

2. Chromosomes artificiels des levures "YAC"

Les YACs (Yeast Artificial Chromosomes) doivent avoir :

- Une origine de réplication
- Des télomères pour la réplication de l'ADN aux extrémités du chromosome
- Un centromère (ségrégation lors de la mitose).
- Site de clonage multiple (MCS : multiple cloning site or polylinker)
- Marqueur de sélection.

Les YACs ont une taille d'environ **10kb**, mais ils peuvent recevoir de longues fragments d'ADN à cloner (**de 200 jusqu'au 2000 kb**). Malgré que les YAC puissent porter de plus grand fragments (inserts) que les BAC, les problèmes de recombinaison et de réarrangement de l'ADN cloné sont plus importants avec la levure qu'avec *E. coli*. Ce qui rend les BAC plus utilisés que les YAC en clonage génomique.

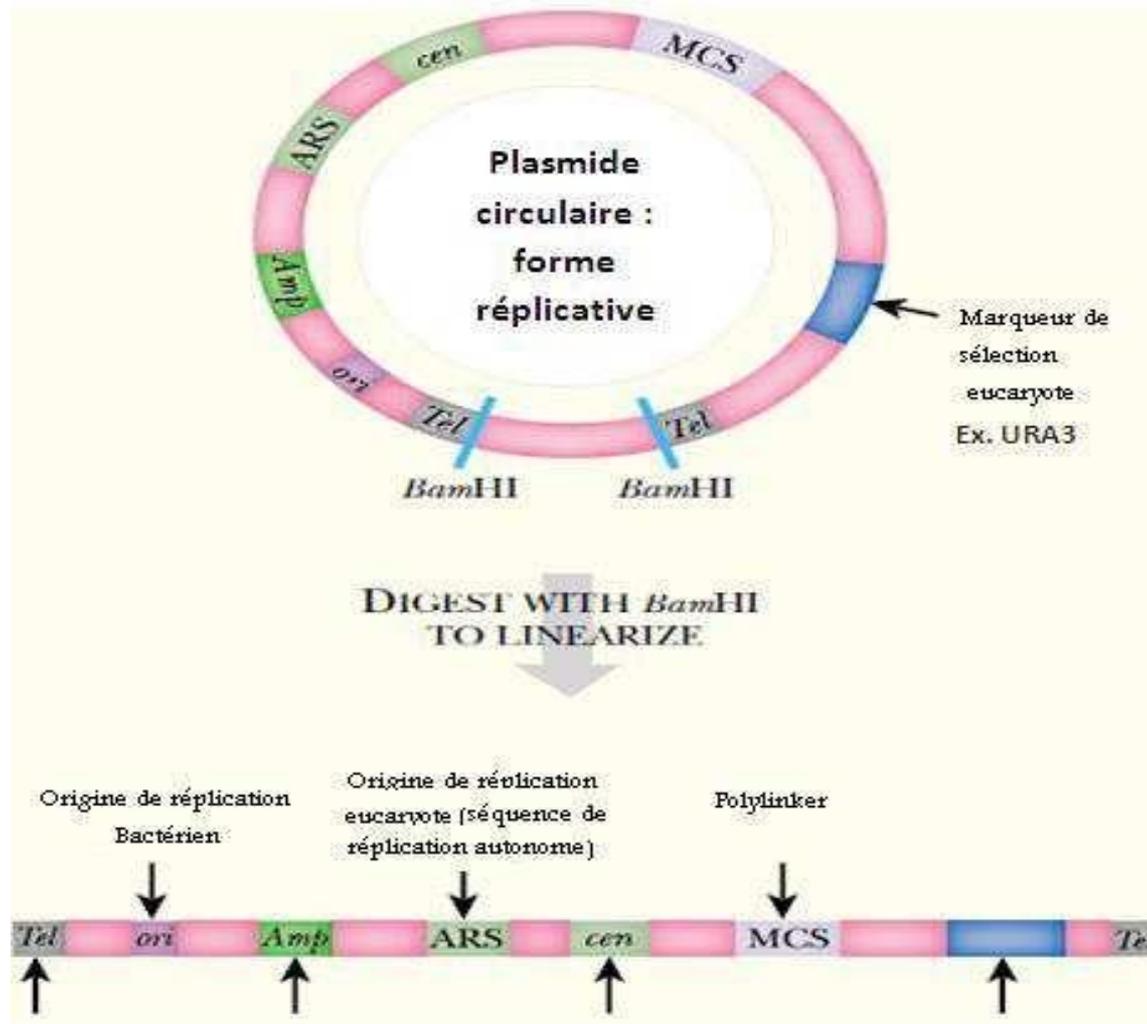


Fig.11: Diagramme d'un YAC contenant des éléments essentiels pour la répliquacion chez les bactéries (Ori, gène de résistance (*Amp*), forme circulaire), et chez les levures (forme linéaire obtenue après digestion par *Bam*HI) (Clark, 2005).

3. Chromosomes artificiels dérivé de P1 "PAC"

Ils sont construits par la combinaison des éléments du système P1, et du facteur F, les vecteurs PAC permettent de manipuler des inserts de 100 à 300 kb.

4. Plasmide Ti (Tumor inducing Plasmide)

La bactérie *Agrobacterium tumefaciens* renferme de grand plasmides (140 à 235 kb), mais les cellules de plante transformées intègrent seulement un petit fragment spécifique du plasmide d'une taille d'environ 23kb appelé l'ADN-t, ce fragment spécifie le type d'opine synthétisé dans le tissu végétal.

Des souches d'*A. tumefaciens* porteuse du plasmide Ti sont maintenant disponibles pour produire des plantes transgénique.

Exemple: l'obtention des plantes résistantes aux insectes (BT), aux herbicides, etc.

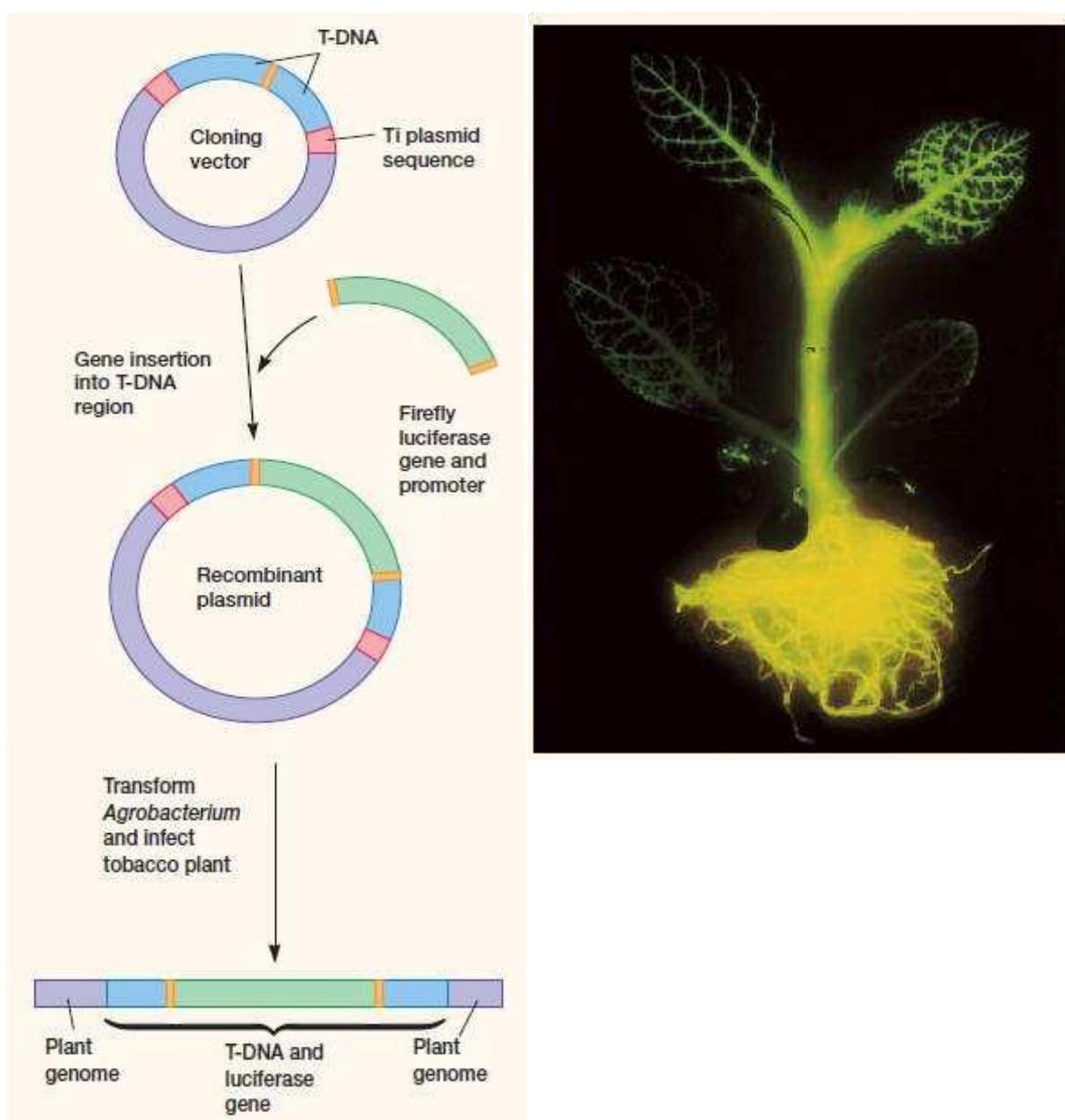


Fig.12: L'utilisation du vecteur Ti pour transformer la plante *Nicotiana tabacum* par le gène d'une luciférase. Le gène est introduit dans la région de l'ADN-T. Cette transformation rend les bactéries bioluminescentes (Prescott, 2002).

5-Vecteurs spécifiques

Pour répondre aux besoins de la biotechnologie, surtout si c'est le but du clonage est d'obtenir un niveau d'expression élevé d'un gène dans un hôte approprié, d'autres vecteurs spécialisés ont été produits.

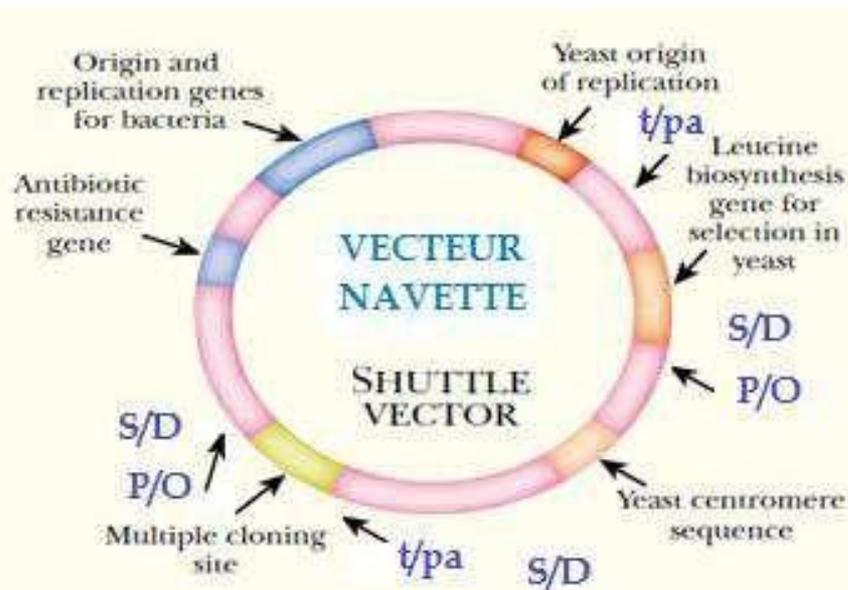
5-1- Vecteurs navettes et d'expression

Les vecteurs navettes peuvent transporter un ADN cloné entre deux organismes différents et se répliquer de manière stable dans chacun d'eux.

Exemple: Un vecteur se réplique chez *E. coli* et dans une levure (fig. 14), ou bien autre bactérie et même une cellule de mammifère.

Il faut noter que les organismes possèdent des systèmes de régulation complexe qui sont des obstacles à l'expression des gènes étrangers. Pour cette raison les vecteurs d'expression ont été élaborés.

Marqueur
de sélection
procaryote



Marqueur
de sélection
eucaryote

Fig. 13: Caractéristique d'un vecteur navette d'expression (shuttle expression vector). t/pa: signaux de terminaison de la transcription/ poly adénylation. T1, T2: terminateurs de la transcription. P/O : promoteur –Opérateur, S/D: séquence de Shine Dalgarno (Clark, 2005).

Un vecteur d'expression permet de cloner un gène, mais contient aussi les séquences de régulation nécessaire à son expression. Dans la plupart des cas on utilise avec le promoteur l'opérateur responsable sur sa contrôle. Comme sa on peut régler l'expression par l'ajout de l'inducteur ou du répresseur.

Exemples: I- Promoteur *lac* avec opérateur *lac*.

II- Promoteur *trp* avec opérateur *lac*.

On peut aussi contrôler l'expression des vecteurs par des éléments de bactériophage. Par exemple, le bactériophage T7, lorsqu'il infecte *E. coli*, il code sa propre ARN polymérase qui reconnaît uniquement les promoteurs de T7 et inhibe la transcription de l'hôte (gènes de l'hôte reste silencieux). Donc l'utilisation de gènes clonés sous contrôle d'un promoteur T7, limite la transcription uniquement aux gènes clonés. Cela n'est possible qu'en introduisant dans le plasmide un gène codant l'ARN polymérase T7 placé sous contrôle d'un système de régulation simple comme le système *lac*.

6-Régulation de la transcription des vecteurs d'expression

L'élément clés du vecteur d'expression est le mécanisme de contrôle **transcriptionnel**.

Une forte expression suppose la production de grandes quantités d'ARNm.

La région **-10 à -35** est une zone particulièrement importante du **promoteur**.

Le promoteur normalement associé au gène cloné risque d'être faiblement efficace dans un nouvelle hôte.

Exemple: Les promoteurs des eucaryotes ou même des autres procaryotes fonctionnent **peu ou pas** du tout chez *E. coli*.

Pour régler ce problème, des promoteurs d'*E. coli* ont été utilisés par la **construction des vecteurs d'expression** dont les promoteurs des **opérons** : *lac*, *trp*, *tac*, *trc* (hybrides synthétiques des promoteurs *lac* et *trp*). Et P_L λ (P_λ). Ce sont des **promoteurs forts** qui peuvent être spécifiquement régulés. Le promoteur doit être fonctionnel et correctement situé afin de permettre **la transcription** des gènes clonés.

Exemple: Pour la production d'une protéine toxique pour la cellule hôte, il faut pouvoir déclencher simultanément l'expression des gènes dans toutes les copies en **activant un mécanisme de régulation** après une phase avancée de la croissance (pour produire suffisamment de biomasse).

7-Traduction des gènes clonés

Pour traduire un gène cloné dans un hôte procaryote (Ex. *E. coli*), il faut qu'il y'a tout les éléments nécessaires pour la traduction:

Site de liaison au ribosome (S/D) : Shine Dalgarno sequence

Codon d'initiation sur l'ARNm à coté de S/D.

Les gènes eucaryotes n'ont pas le site S/D, qui doit être introduit dans un vecteur si un haut niveau d'expression est attendu.

L'usage des codons peut être un obstacle, car certains codons sont plus utilisés que d'autres Aussi, l'usage des codons diffère entre les organismes et donc la concentration des **ARNt est différente**.

Pour résoudre ce problème, **la mutagénèse dirigée** et l'ADN synthétique peuvent être utilisés **pour changer** des codons sélectionnés dans le gène, pour le rendre plus proche du mode d'usage des codons de l'hôte.

8-Expression de gène de mammifères chez les bactéries

Pour pouvoir **cloner et exprimer** des gènes de mammifères dans des cellules hôtes bactériennes

- **obstacles**: détection du bon clone, présence des introns.
- les protéines synthétisées dans un hôte procaryote peuvent être dégradées par des protéases intracellulaires avant de pouvoir les isoler.
- Certaines protéines issue des d'eucaryotes sont toxiques chez un hôte procaryote engendrant ainsi la mort de l'hôte avant la synthèse de quantités suffisantes du produit.

Pour résoudre le problème de présence des introns il faut utiliser **l'ARNm** pour synthétiser l'ADN à cloner (**ADNc**).

Par exemple lors de la synthèse du facteur de coagulation sanguin (Facteur VIII) dans *E. coli*. Le gène est récupéré par la technique de l'ADNc, puis l'ADNc est amplifié par PCR et inséré à côté d'un promoteur phagique.

9-Production d'insuline

La production des protéines humaines est le secteur des biotechnologies le plus rentable.

Question: Pourquoi l'utilisation des cultures microbiennes est préférée?

Dans les cellules de mammifères la quantité de protéine de grand intérêt pharmaceutique comme l'insuline est très faible. Ce qui rend leur extraction et purification extrêmement coûteuse (onéreuse). De plus, même si ces protéines peuvent être produites par des cultures cellulaires; c'est une voie beaucoup plus coûteuse et difficile que la production par une culture microbienne à fort rendement. En conséquence l'industrie de la biotechnologie a mis au point des microorganismes génétiquement modifiés pour produire ces protéines.

La forme active de l'insuline est composée de deux polypeptides (A et B) reliés par des ponts disulfures, ces parties sont codées par des parties séparées du gène de l'insuline.

Préproinsuline: Polypeptide contenant:

Une séquence signal impliquée dans l'excrétion de la protéine.

Les polypeptides A et B de l'insuline active.

Un polypeptide de connexion absent dans l'insuline active



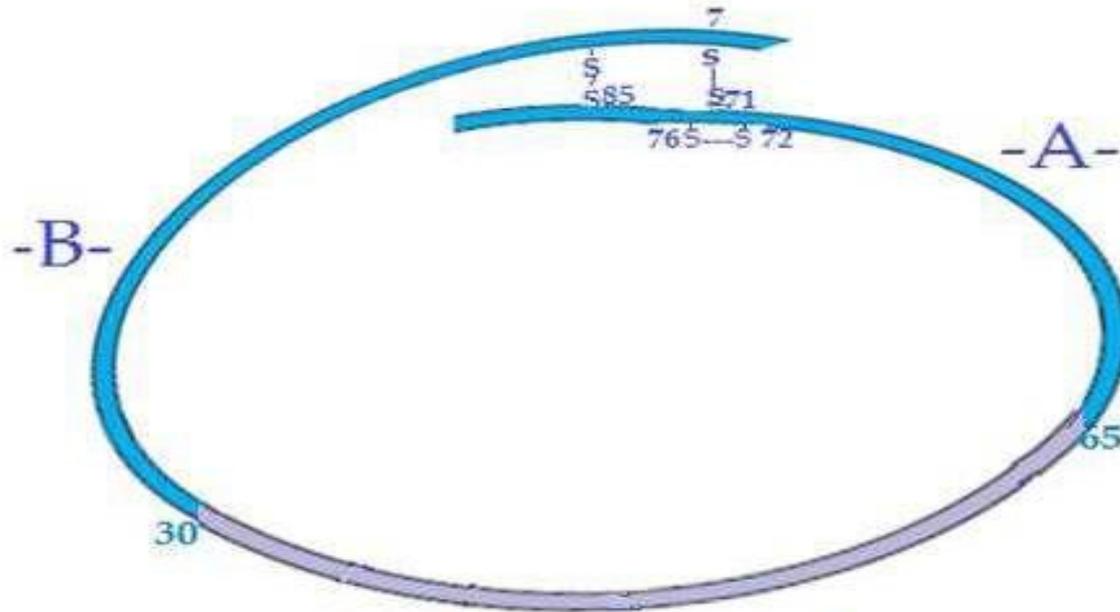
Pour produire l'insuline utilisant *E. coli* comme cellule hôte. Le gène entier a pu être synthétisée, car cette hormone est une protéine relativement petite.

Le gène obtenu est inséré **en aval d'un promoteur fort d'*E. coli*** de telle sorte que le fragment d'insuline soit synthétisé comme partie d'une protéine de fusion.

Pour séparer l'insuline de la protéine de fusion, le gène codant l'insuline est séparé à celui codant la protéine de fusion par **le codon ATG (MET)**, car l'insuline ne contient pas de méthionine. Cela permet de séparer les deux protéines utilisant le **bromure de cyanogène**, sans endommager la proinsuline.

L'insuline est obtenu a partir de **la proinsuline** par la formation des ponts disulfure. La proinsuline se replie naturellement en amenant face à face par la formation de ces ponts.

l'élimination du peptide de connexion par deux protéases (la trypsine et la carboxy peptidase B) n'ayant aucun effet sur le produit final.



Peptide de **connexion**
(la partie à enlever)

Fig.14: La proinsuline.

N.B. On peut utiliser *Saccharomyces cerevisiae* pour produire cette hormone.

Génie Génétique

Chapitre IV.

Techniques de biologie moléculaire