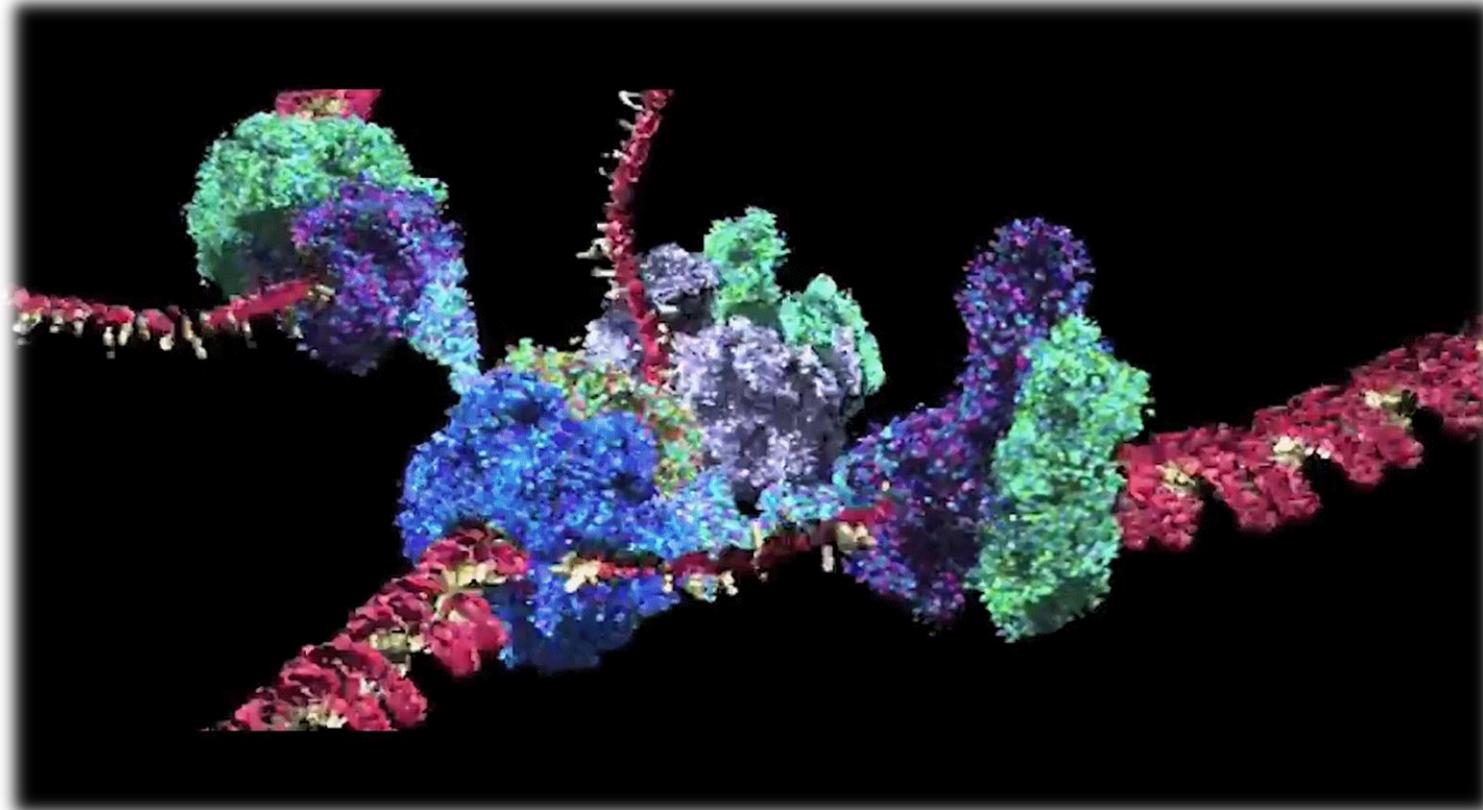


Chapitre 1 : Eléments de biotechnologie

1.1. Synthèse des protéines par génie génétique

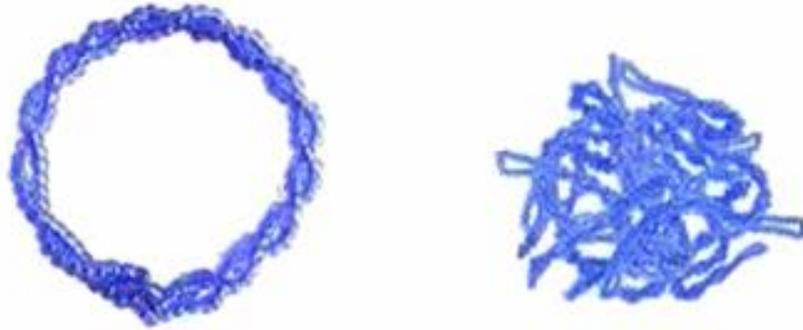


Définition du génie génétique ou technologie de l'ADN recombinant

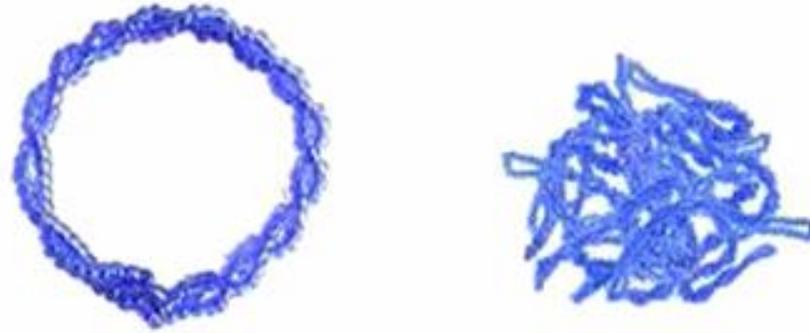
Recombinaison signifie introduire un gène additionnel dans un nano ADN c'est-à-dire dans un plasmide, tout d'abord le généticien a besoin du morceau d'ADN contenant le gène qu'il veut l'étudier.



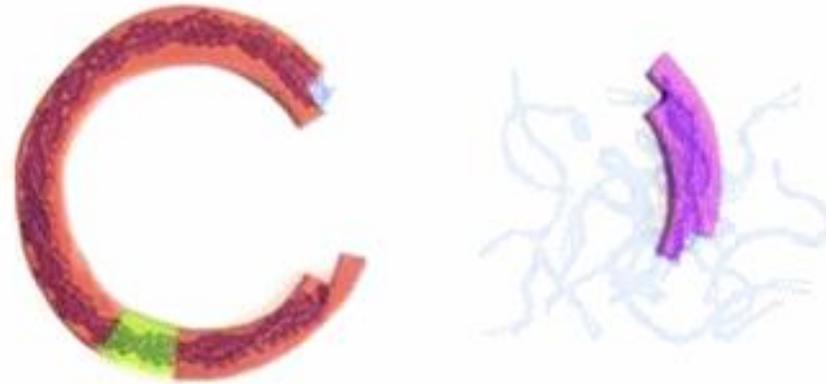
Il commence alors par isoler l'ADN à partir d'une cellule humaine, en
suit il extrait un nano d'ADN appelé plasmide d'une bactérie, le
plasmide comme le gène humain se compose d'ADN.



Tous deux doivent être coupés de manière à ce que le morceau d'ADN contenant le gène d'intérêt puisse être introduit dans le plasmide bactérien.

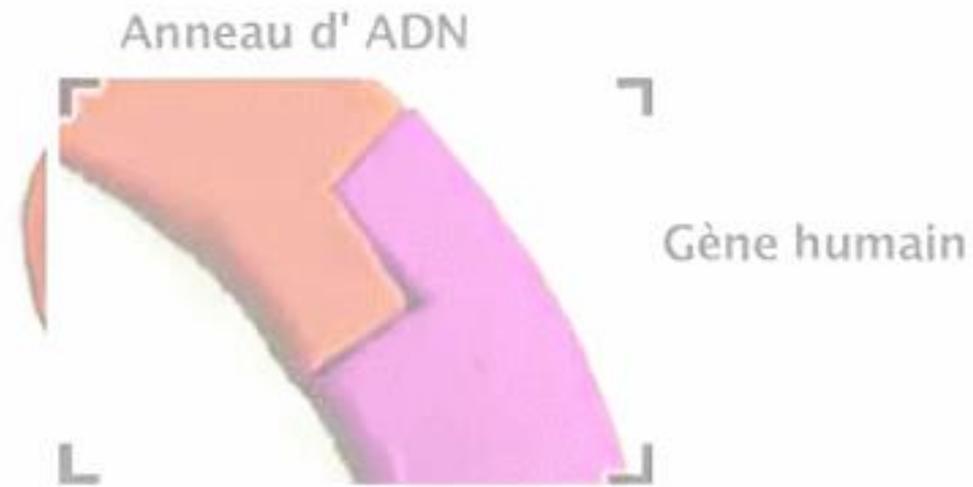


L'ADN humain est coupé en petits morceaux à l'aide des ciseaux (enzymes des restrictions), les mêmes enzymes coupent également le plasmide, le généticien isole le morceau d'ADN contenant le gène d'intérêt des autres morceaux d'ADN.

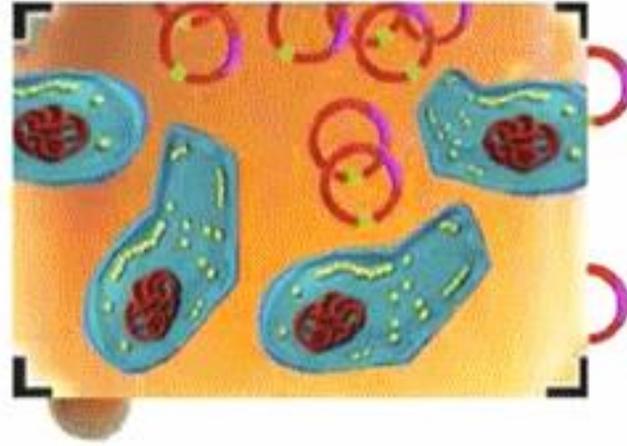


Les extrémités du gène humain ainsi que celle du plasmide ouvert se complimente étant donné qu'ils ont été coupé avec les mêmes ciseaux (enzymes de restrictions).

La colle à ADN (les ligases) joint les deux bouts d'ADN ensemble, c'est ainsi que le généticien obtient de l'ADN recombinant, un gène humain dans un plasmide bactérien.



Afin de pouvoir continuer a travaillé avec le gène maintenant intégré dans le plasmide bactérien, ce dernier doit être réintroduit dans une bactérie, le généticien place bactérie et plasmide dans un tube contenant une solution nutritive.

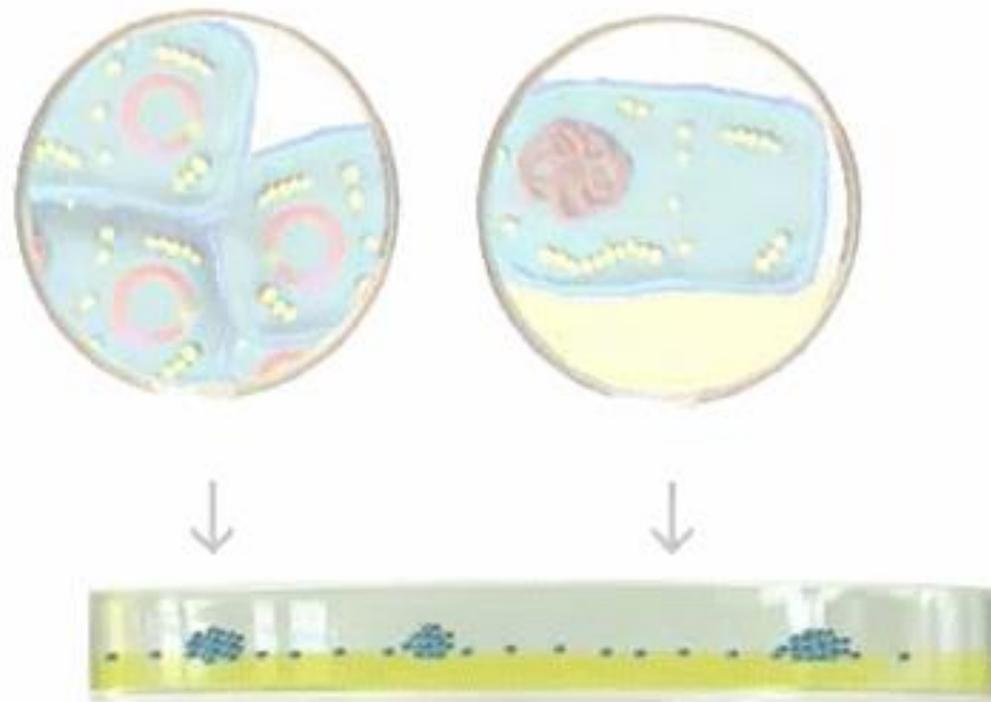


Les bactéries n'absorbent les plasmides que quand elles sont traitées avec de la chaleur, c'est pour quoi on plonge le tube pour un instant dans l'eau chaude, en raison de la chaleur les bactéries subissent un choc, de petits trous se forment au niveau de leurs paroi cellulaires à travers dès qu'elles le plasmide peut alors être absorbé.

Comment le généticien reconnaît-il les bactéries portant le plasmide de celles ne le portant pas ?

Le plasmide contient un gène protecteur, grâce à ce gène la bactérie produit une protéine lui permettant de se protéger d'un poison anti bactérien.

Le poison anti bactérien est déposé sur une boite de pétri recouvert de milieu de culture, les bactéries sont alorsensemencées sur cette boite, après quelques heures passées à 37°c seuls les bactéries possèdent le plasmide contenant le gène protecteur sont capable de se multiplier.

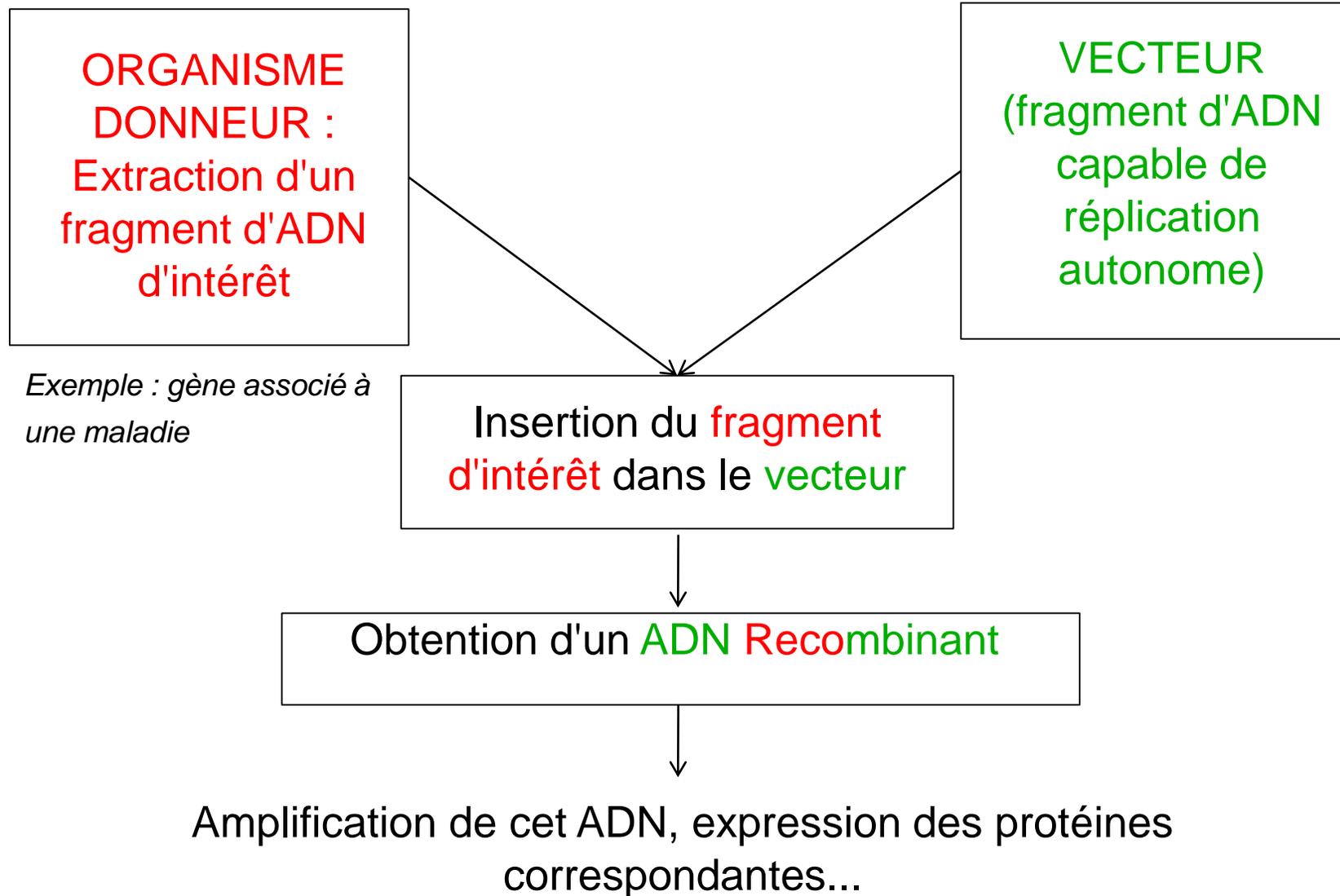


Sur le boite il ne reste donc que les bactéries qui portent un plasmide recombinant. Le généticien prélève une colonie et la place dans une solution nutritive pour plusieurs heures dans une couveuse (incubateur), les bactéries se multiplie.

Etant donné que les bactéries possèdent toute le plasmide recombinant contenant le gène humain, elles produisent la protéine correspondante, cette dernière peut en suit isoler des bactéries et être utiliser par exemple comme un médicament.

Technologie de l'ADN recombinant

Principe



Définitions

- **L'ADN recombinant provient d'une combinaison entre l'ADN d'un organisme donneur et celui d'un vecteur (qui peut être d'une espèce totalement différente).**

- **Génie Génétique ou technologie de l'ADN recombinant** : ensemble des techniques de construction d'un ADN recombinant et ses utilisations.

Les cellules modifiées (ayant intégré un ADN recombinant) peuvent exprimer la protéine recombinante (par exemple une protéine d'une espèce différente, une protéine modifiée (mutée, fusionnée à une étiquette...)).

- Le **clonage** désigne plusieurs choses :

- Une multiplication à l'identique (conservation parfaite de l'information génétique) : à l'échelle cellulaire (clonage cellulaire) ou à l'échelle de l'organisme entier (clonage reproductif).

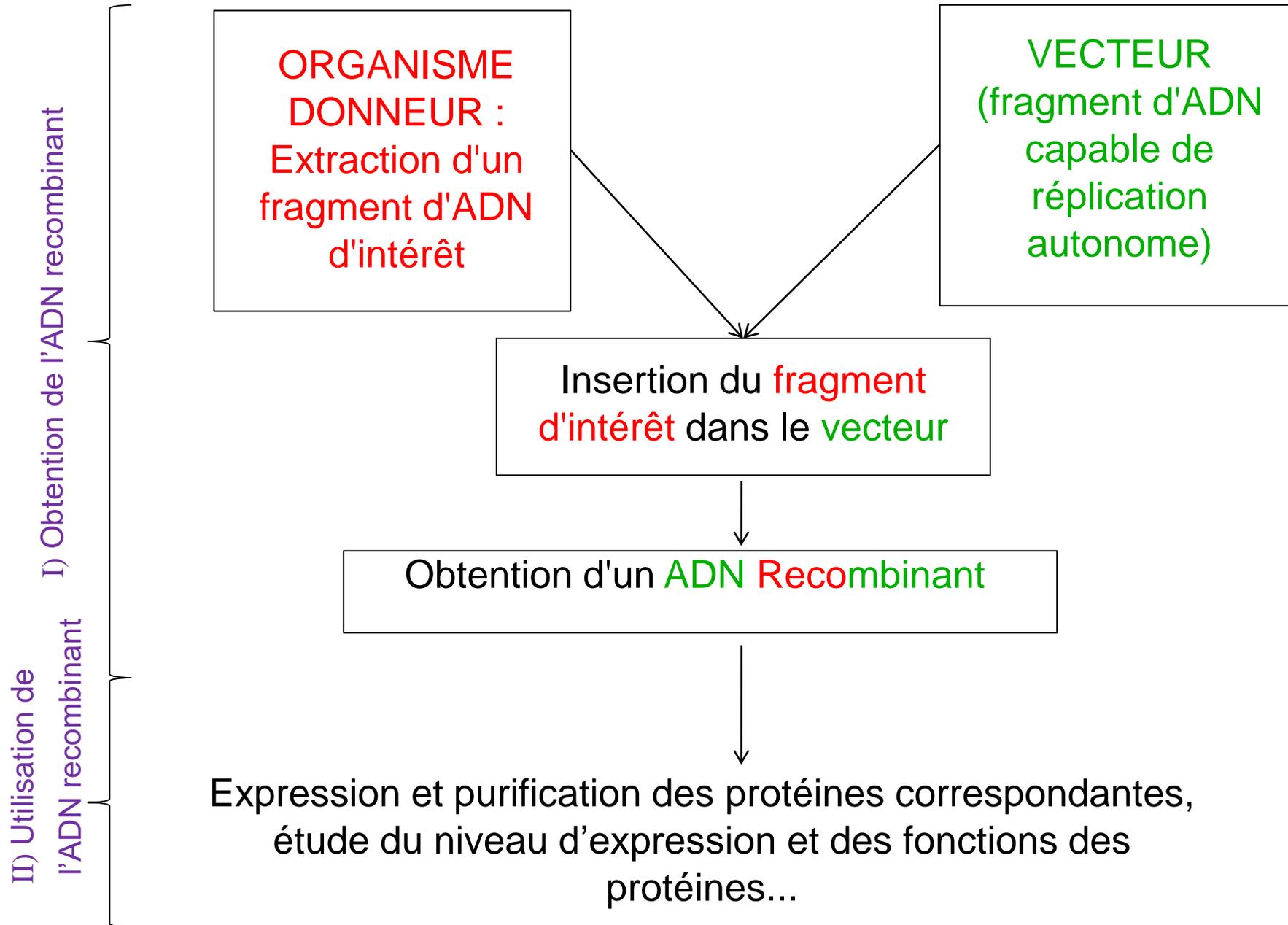
- L'amplification d'un fragment d'ADN par des micro-organismes après son insertion dans un vecteur

Plan

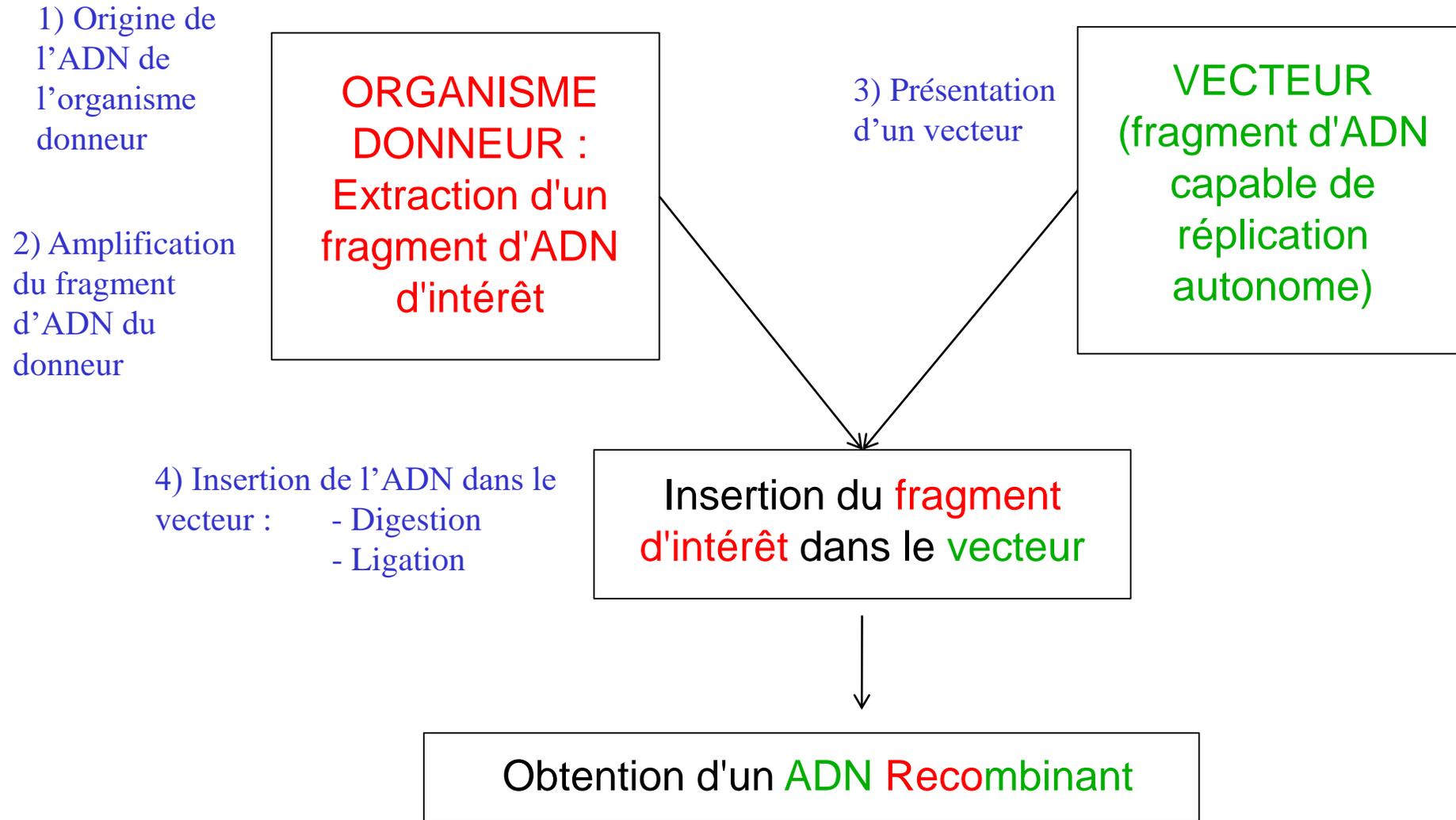
- A/ Les principales techniques du génie génétique
- B/ La diversité des techniques du génie génétique
- C/ Les applications de la technologie de l'ADN recombinant

A/ Les principales techniques du génie génétique

Principe de la technologie de l'ADN recombinant



I) Obtention de l'ADN recombinant



I) Obtention de l'ADN recombinant

ORGANISME
DONNEUR :
Extraction d'un
fragment d'ADN
d'intérêt

1) Origine de l'ADN de l'organisme donneur

1) Origine de l'ADN de l'organisme donneur

L'ADN de l'organisme donneur peut être :

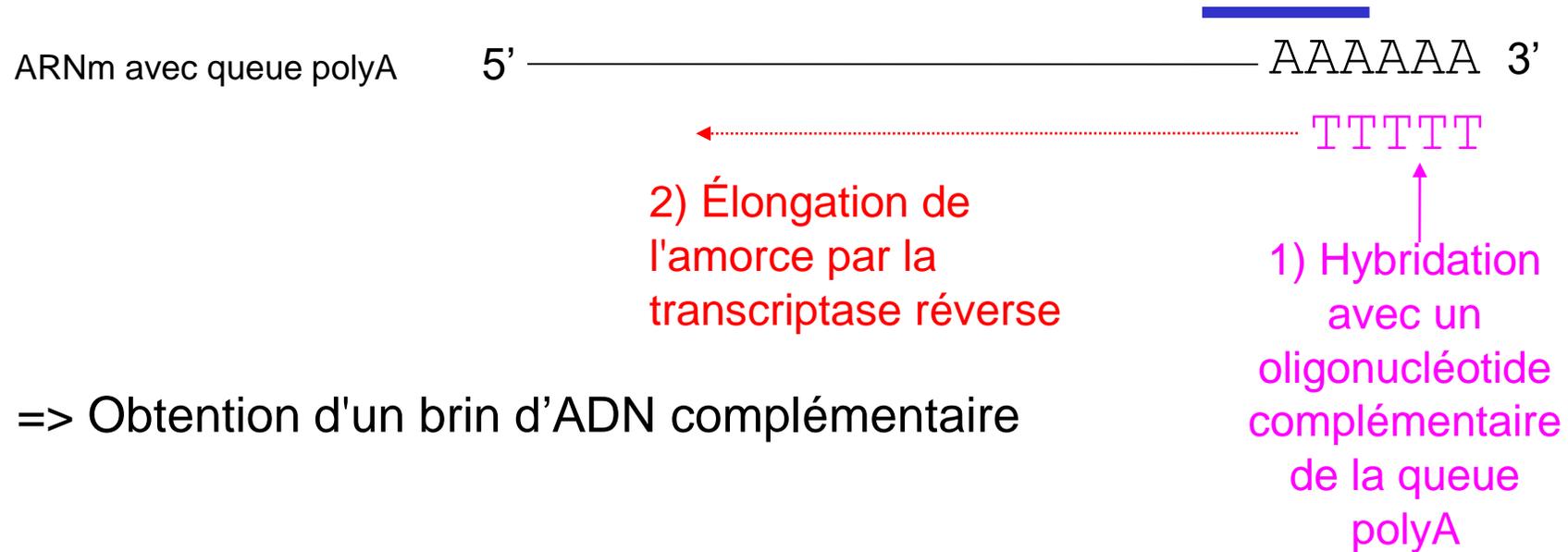
- de l'**ADN génomique** (extrait à partir d'une culture cellulaire...)

- de l'**ADN complémentaire** (ADNc) obtenu par **transcription réverse** sur des ARN messagers

(L'ADNc comporte une information sur les régions 5' et 3' non traduites, et ne contient pas d'introns)

1) Origine de l'ADN de l'organisme donneur

Principe de la transcription réverse



=> Obtention d'un brin d'ADN complémentaire

Pour obtenir le deuxième brin d'ADNc, une PCR est réalisée sur l'ADN obtenu avec une ADN polymérase (voir principe diapo 12). L'ARN peut être éliminé par un traitement à la RNase.

On peut obtenir une **banque d'ADNc** : clonage de tous les ADNc (cela dépend des ARNm exprimés par une cellule à un moment donné dans des conditions données)

On peut aussi cloner un ADNc spécifique en choisissant une **amorce à cheval sur la queue polyA et le 3' du transcrit**

I) Obtention de l'ADN recombinant

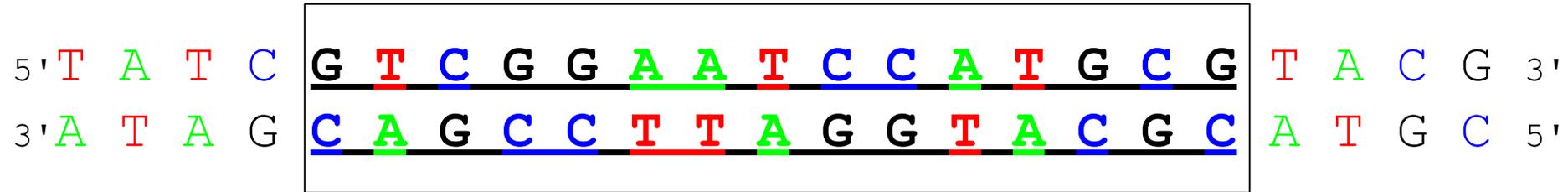
ORGANISME
DONNEUR :
Extraction d'un
fragment d'ADN
d'intérêt

- 1) Origine de l'ADN de l'organisme donneur
- 2) Amplification du fragment d'ADN d'intérêt

2) Amplification du fragment d'ADN d'intérêt : la PCR

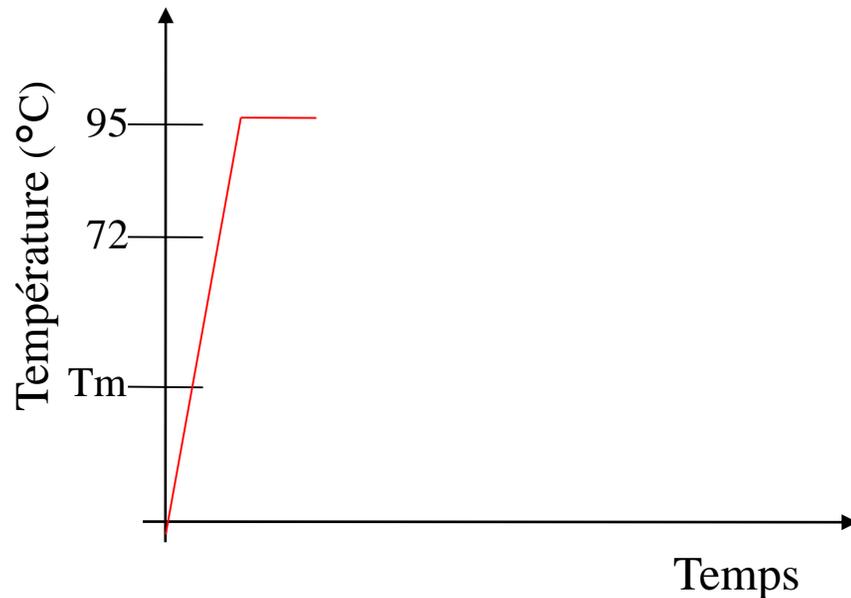
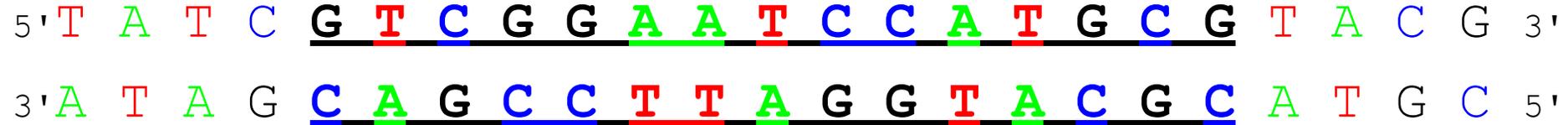
- Amplification du fragment d'ADN d'intérêt (gène entier ou tronqué) par **PCR** : *Polymerase Chain Reaction*
- La PCR est une réaction de polymérisation en chaîne à partir d'amorces spécifiques de l'ADN d'intérêt, grâce à l'action d'une enzyme, l'ADN polymérase dans un milieu contenant des nucléotides

2) Amplification du fragment d'ADN d'intérêt : la PCR



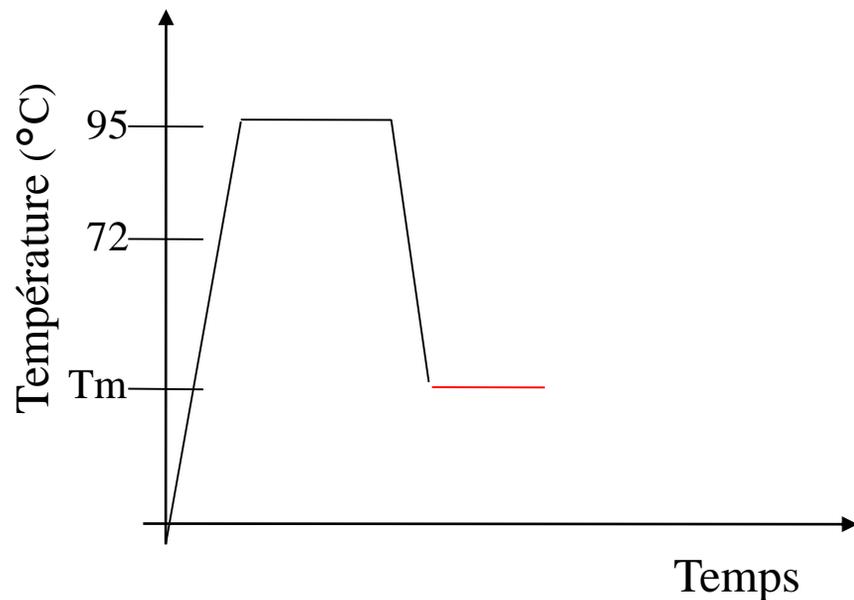
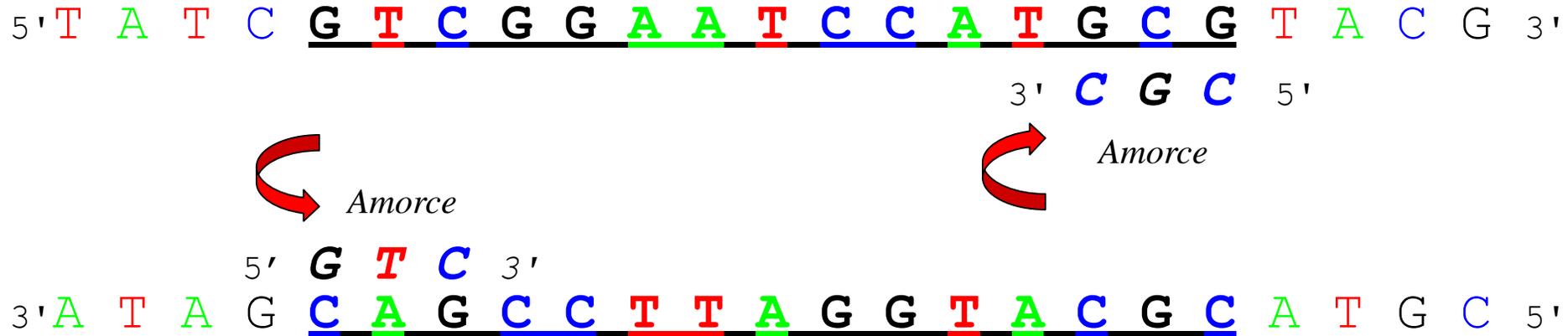
Séquence à amplifier

2) Amplification du fragment d'ADN : la PCR



1ère étape : **dénaturation**
de l'ADN à 95°C
(séparation des brins
complémentaires)

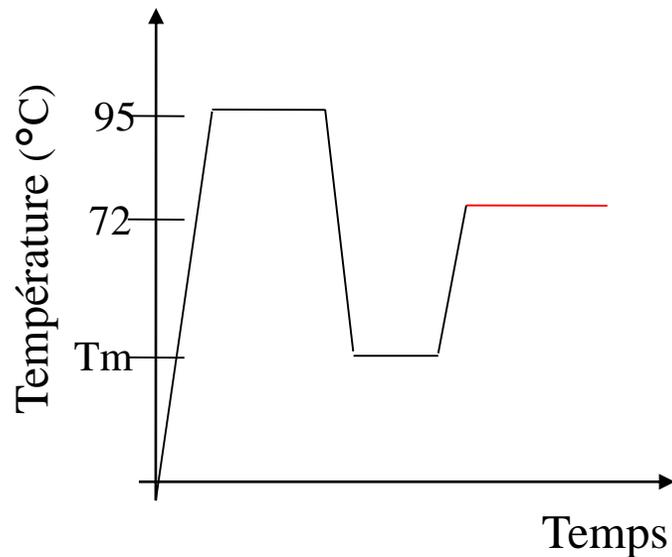
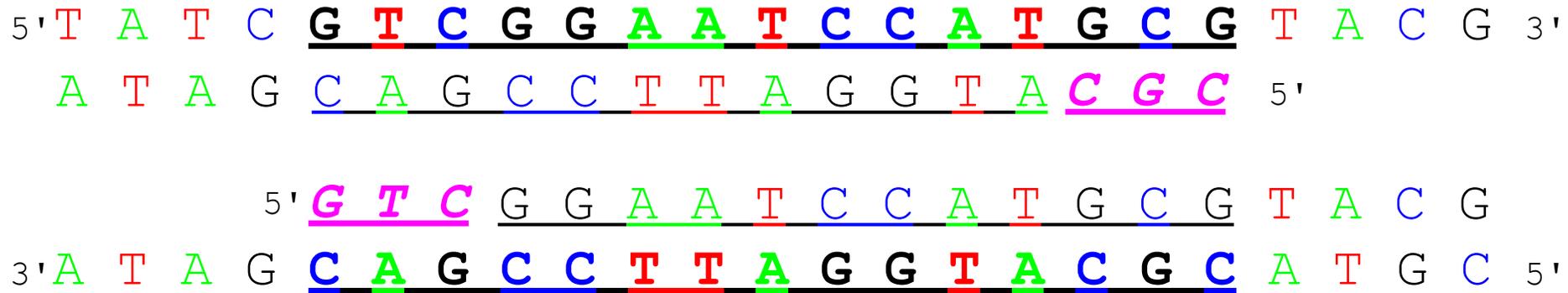
2) Amplification du fragment d'ADN : la PCR



2ème étape : **hybridation des amorces** (séquence de nucléotides complémentaires de l'extrémité de la région à amplifier) à une température T_m (spécifique de l'amorce)

(en général amorces de 15-25 nucléotides)

2) Amplification du fragment d'ADN : la PCR

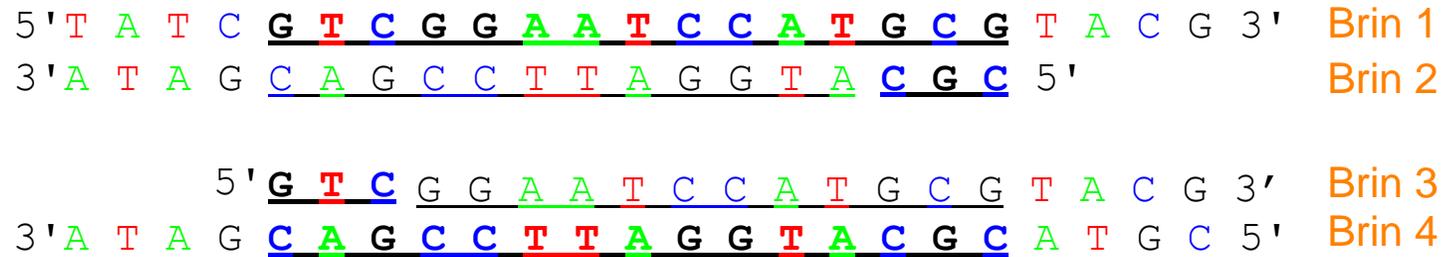


3ème étape : élongation (synthèse du brin complémentaire à partir des amorces grâce à l'enzyme *ADN polymérase* et aux *nucléotides* présents dans le milieu réactionnel).
Fonctionnement de l'enzyme à 72°C.

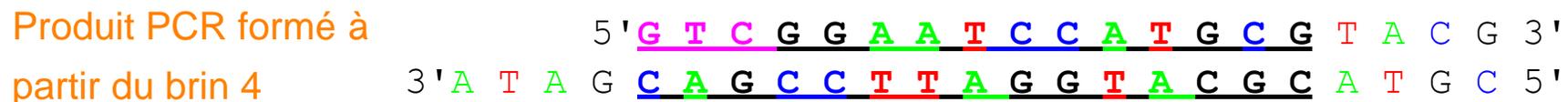
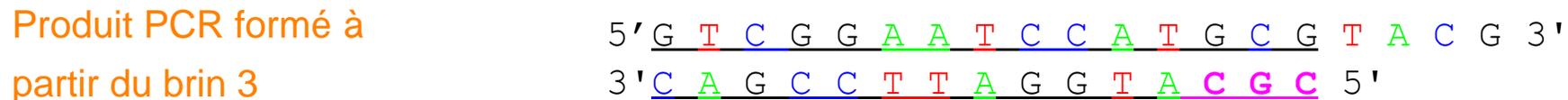
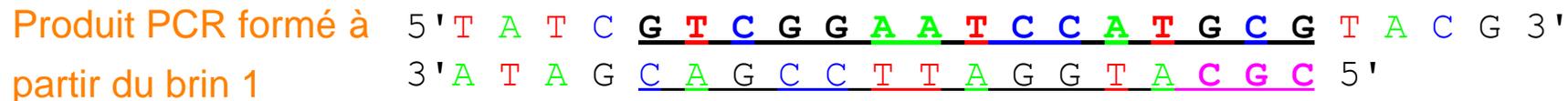
Fin du premier cycle de PCR : aucune molécule obtenue ne correspond au produit désiré (souligné). Un nouveau cycle de PCR (dénaturation-hybridation-élongation) commence.

2) Amplification du fragment d'ADN : la PCR

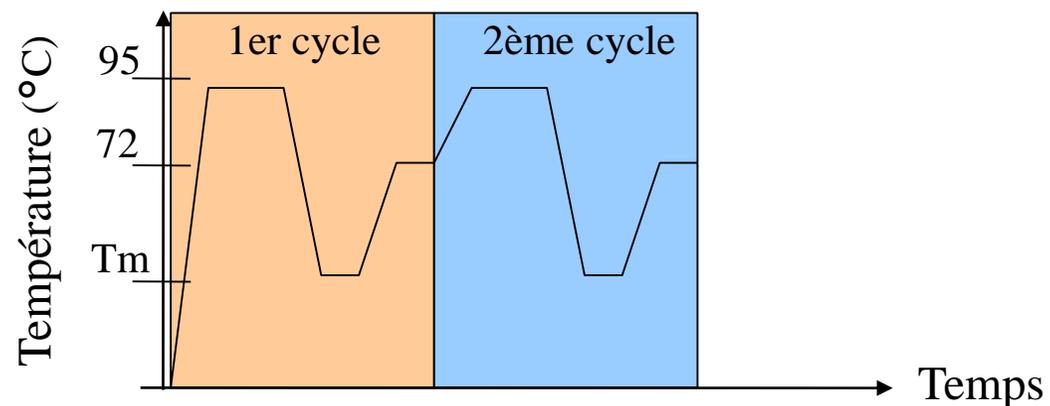
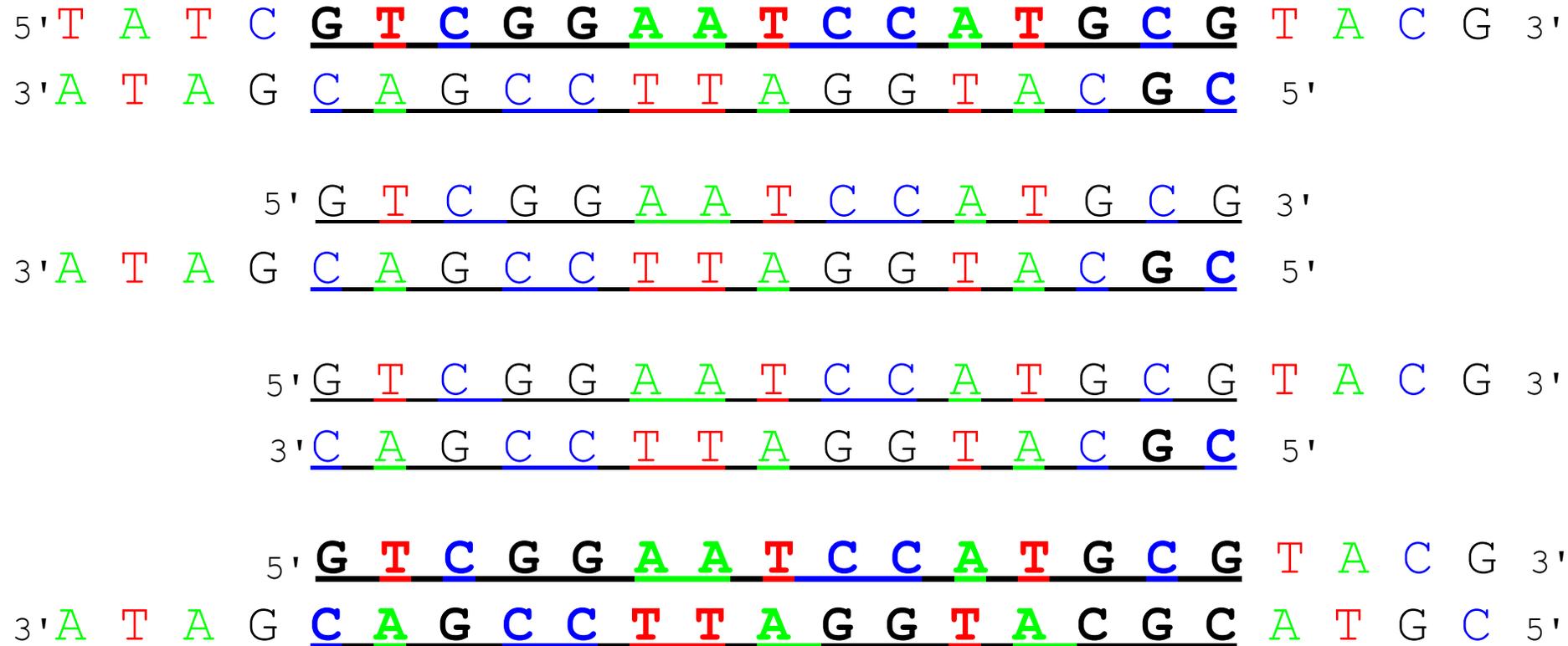
Produits du 1^{er} cycle de PCR :



Produits du 2^{ème} cycle de PCR : (les amorces sont en magenta)



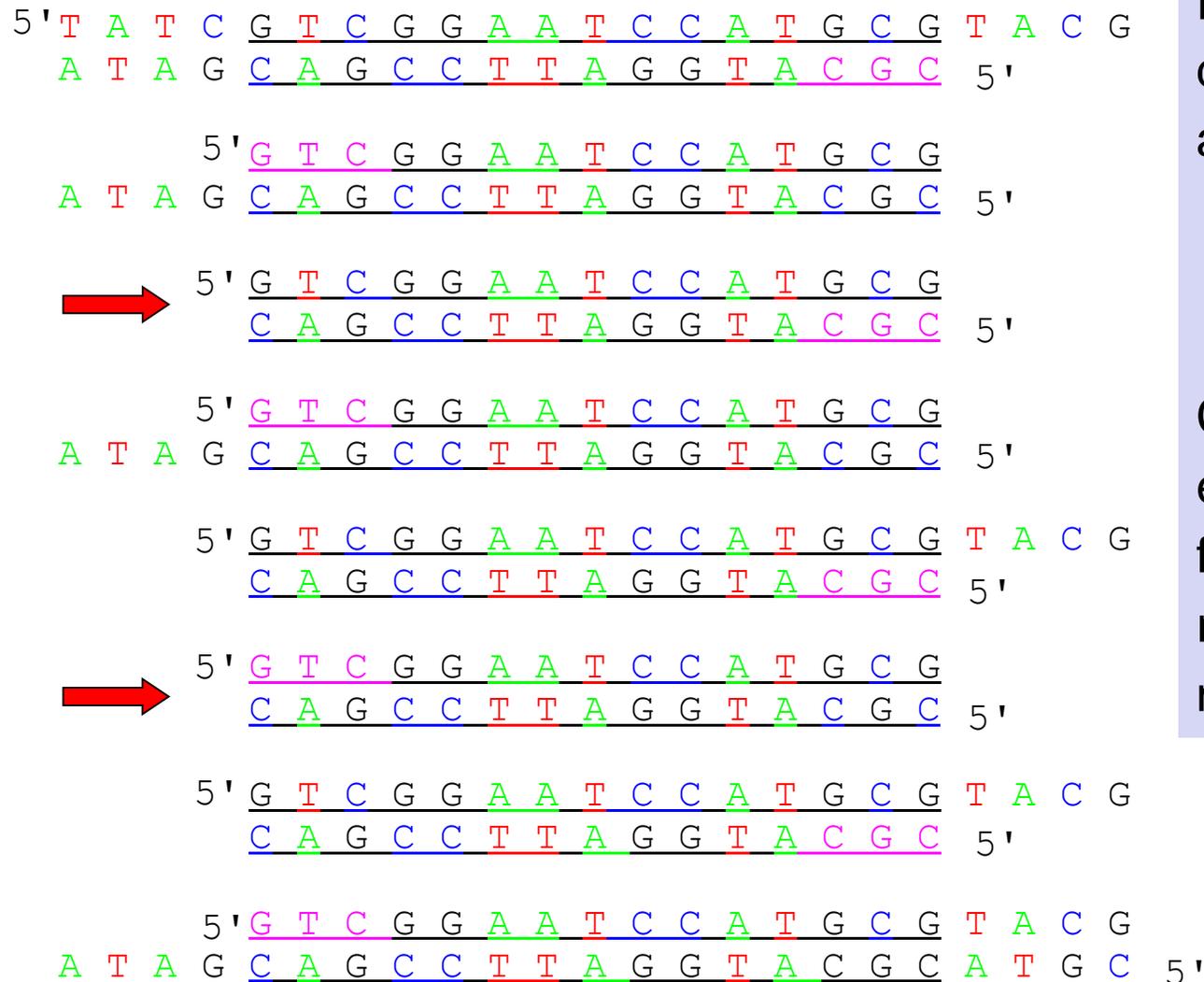
2) Amplification du fragment d'ADN : la PCR



Molécules obtenues à la fin du second cycle de PCR. Aucune ne représente le produit d'intérêt (souligné).

2) Amplification du fragment d'ADN : la PCR

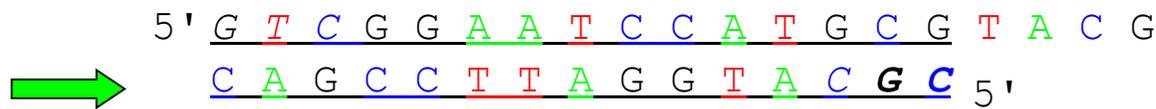
Molécules d'ADN obtenues à la fin du 3^{ème} cycle de PCR :



Fin du troisième cycle :
deux produits PCR
attendus apparaissent.

Ces produits vont
ensuite se multiplier de
façon exponentielle par
rapport aux produits
non souhaités.

2) Amplification du fragment d'ADN : la PCR



Les deux molécules d'intérêt
 obtenues au 3^{ème} cycle donnent
 chacune deux molécules d'ADN
 d'intérêt au 4^{ème} cycle.



4 fragments simple brin des
 autres molécules pourront donner
 un produit PCR souhaité au 4^{ème}
 cycle.

Quatrième cycle de
 PCR :

8 fragments d'ADN
 d'intérêt

Cinquième cycle de
 PCR :

22 fragments
 d'intérêt

2) Amplification du fragment d'ADN : la PCR

- Répétition des 3 étapes : dénaturation-hybridation-élongation (la machine à PCR fait des cycles de température) => Amplification du fragment d'intérêt de façon exponentielle à partir du troisième cycle
- L'enzyme ADN polymérase ne doit pas être dénaturée à 95°C : utilisation de l'ADN polymérase de bactéries thermophiles (par exemple la Taq polymérase provient de *Thermophilus aquaticus*, microorganisme vivant près des sources d'eaux chaudes (50 à 80°C) ; la Pfu polymérase provient de *Pyrococcus furiosus*)
- Différentes enzymes peuvent être utilisées selon le degré de fidélité souhaité pour l'amplification du fragment (la Pfu est beaucoup plus fidèle mais plus lente pour l'amplification par exemple)

I) Obtention de l'ADN recombinant

ORGANISME
DONNEUR :
Extraction d'un
fragment d'ADN
d'intérêt

VECTEUR
(fragment d'ADN
capable de
réplication
autonome)

Le clonage repose sur l'insertion d'un fragment d'ADN exogène dans un **vecteur**, ce qui permet ensuite d'exprimer l'ADN dans des cellules

3) Présentation d'un vecteur

3) Présentation d'un vecteur de clonage

- Grande diversité des vecteurs : (détaillée en B)
 - Cosmides
 - Bactériophages
 - Chromosomes artificiels de levure (YAC) et de bactérie (BAC)
 - **Plasmides : très souvent utilisés, réplication dans les bactéries (exemple choisi)**

- Les vecteurs utilisés en génie génétique ont souvent une origine naturelle (plasmides, bactériophages) mais ont été largement modifiés

3) Présentation d'un vecteur : Propriétés du vecteur

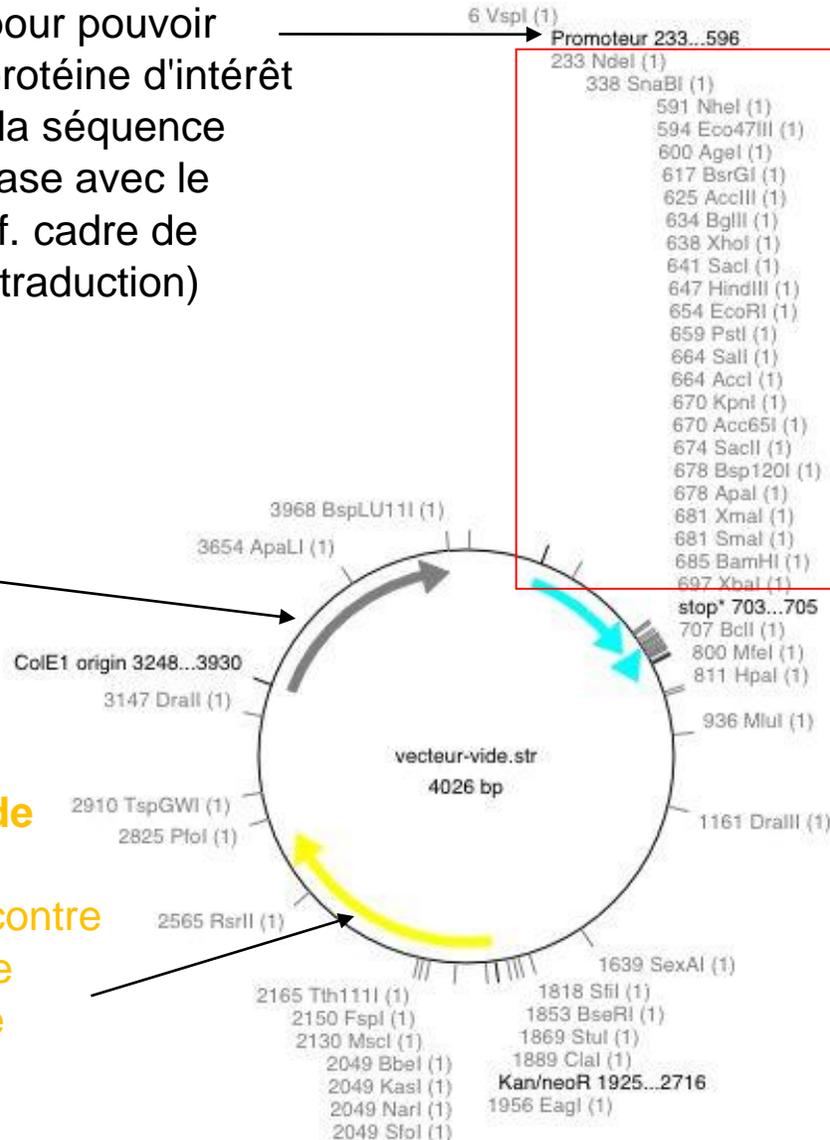
- Capacité de **réplication autonome** dans une cellule hôte donnée
- Possession d'un **site de clonage multiple** pour l'insertion du fragment d'ADN (correspond à différents sites uniques de restriction = des sites où le vecteur peut être ouvert, voir 4))
- **Insertion d'un fragment d'ADN** plus ou moins grand bien supportée
- Présence fréquente d'un marqueur **de sélection** (*gène de résistance à un antibiotique, marqueur de sélection métabolique*)

3) Présentation d'un vecteur : Exemple du plasmide

Promoteur (pour pouvoir exprimer la protéine d'intérêt il faut cloner la séquence d'ADN en phase avec le promoteur (cf. cadre de lecture de la traduction))

Origine de répllication dans la bactérie

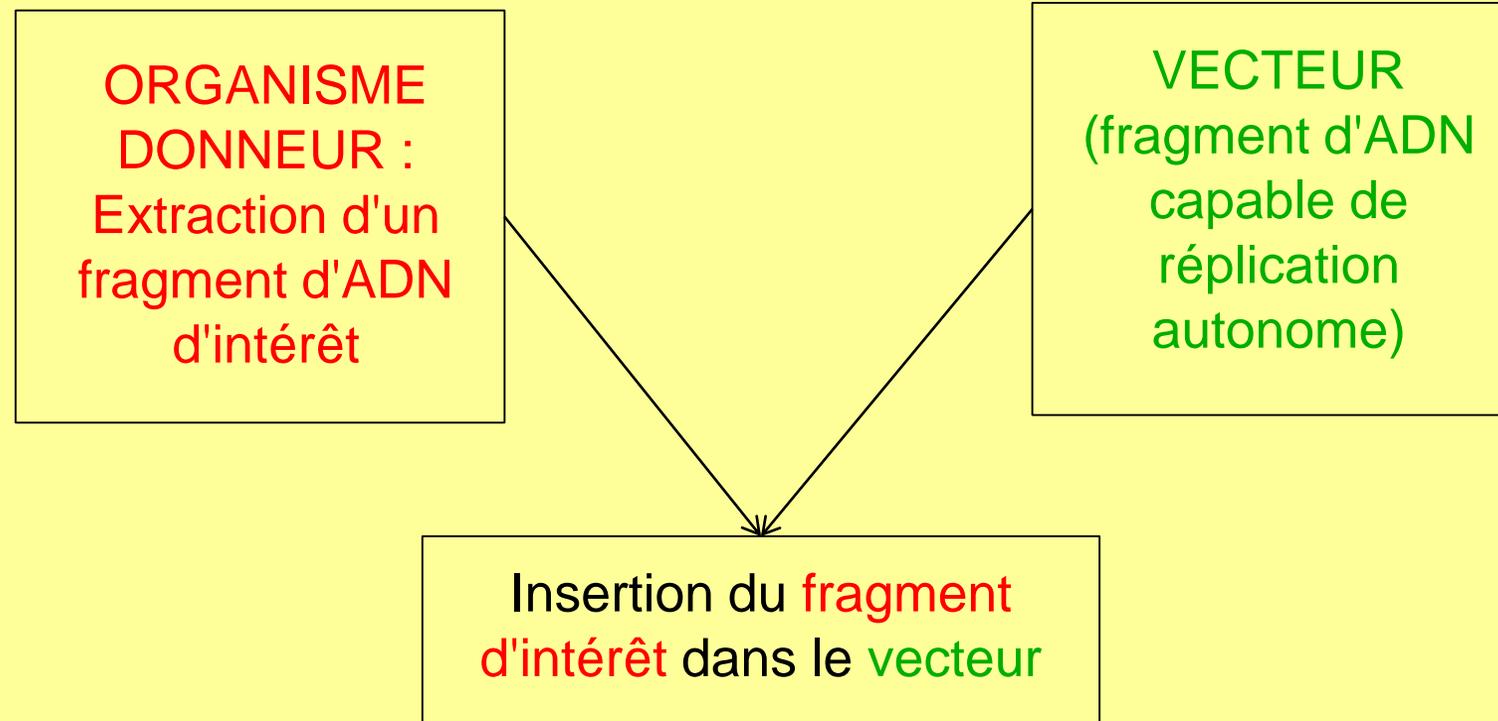
Marqueur de sélection : résistance contre l'antibiotique kanamycine



Site de clonage multiple : nombreux sites de restriction (voir 4)) uniques permettant l'insertion de l'ADN après le promoteur

Plasmide : petite molécule extrachromosomique, d'ADN double brin circulaire, de 3 à 10 kilobases. Capable de se répliquer indépendamment du chromosome bactérien et pouvant être transféré d'une cellule à une autre.

I) Obtention de l'ADN recombinant



4) Insertion de l'ADN dans le vecteur :

4) Insertion de l'ADN dans le vecteur

a) Digestion du fragment d'ADN et du vecteur :

Définition des enzymes de restriction

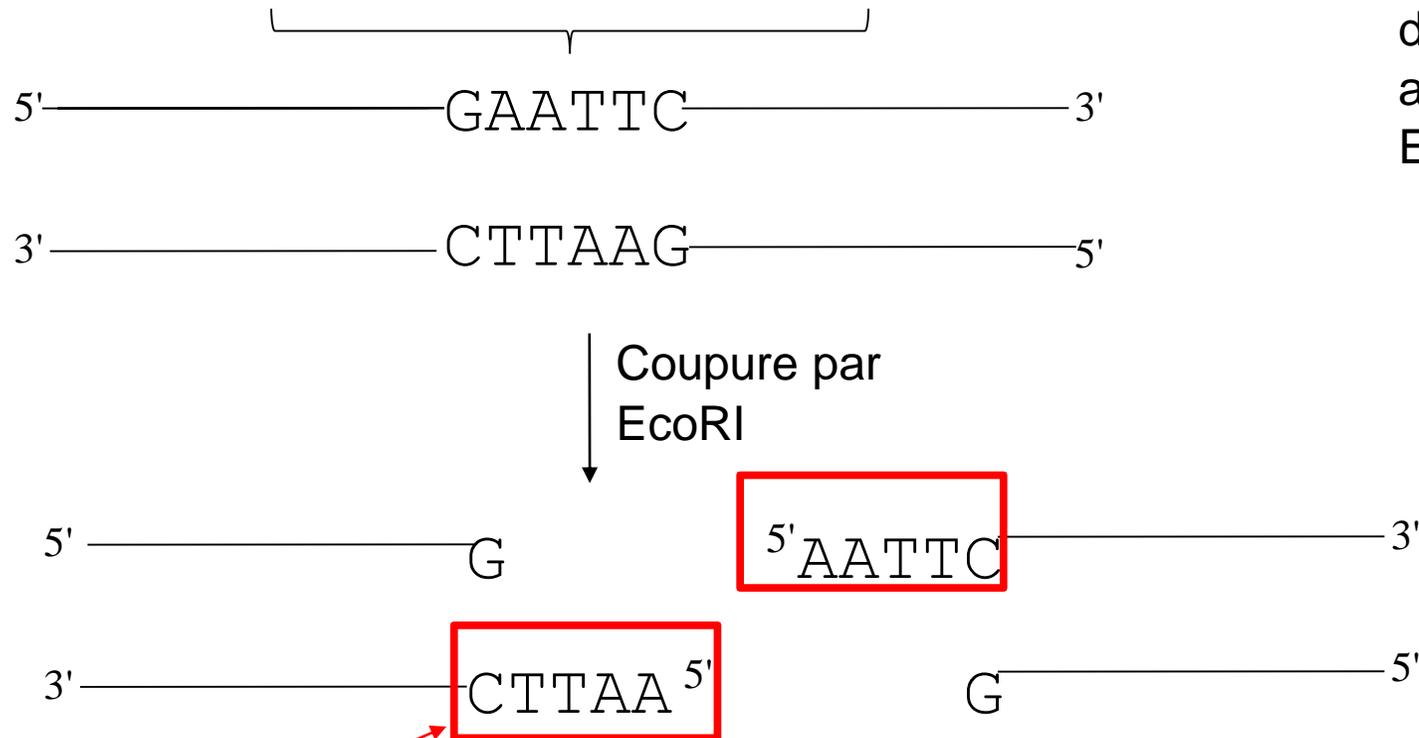
- Une **enzyme de restriction** est une protéine capable de couper un fragment d'ADN au niveau d'une séquence de nucléotides caractéristique appelée *site de restriction*. C'est une *endonucléase* (coupure à l'intérieur du brin d'ADN au niveau des liaisons phosphoesters).
- Plusieurs centaines d'enzymes de restriction sont actuellement connues, dont un grand nombre se retrouve naturellement chez la bactérie. En effet, les enzymes de restriction peuvent couper (et ainsi conduire à la destruction) de l'ADN étranger (notamment des virus). Cela limite les infections virales chez les bactéries, d'où le terme de restriction. L'ADN bactérien lui-même est protégé de la coupure par des modifications du type méthylation.

4) Insertion de l'ADN dans le vecteur

a) Digestion du fragment d'ADN et du vecteur :

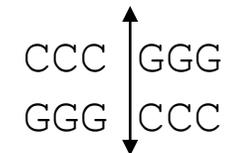
Exemple d'une enzyme de restriction

Exemple : site de restriction de l'enzyme EcoRI
(provenant de la bactérie *Escherichia coli*)



Formation d'extrémités dites **cohésives**, ou **bouts collants**

Rq : Certaines enzymes donnent des **bouts francs** après coupure.
Exemple : SmaI :

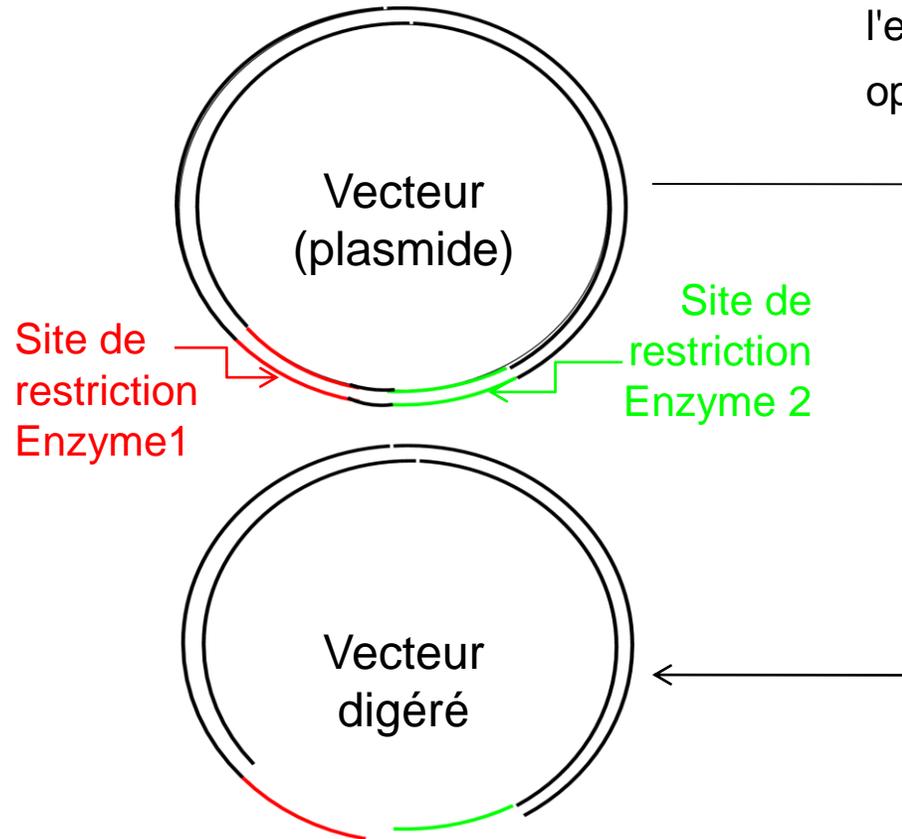


Rq : Certains sites de restriction sont des séquences palindromiques

4) Insertion de l'ADN dans le vecteur

a) Digestion du fragment d'ADN et du vecteur : Principe

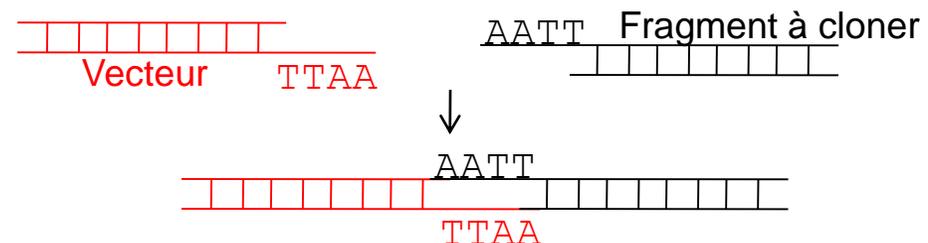
Digestion 1 heure dans le tampon adapté à l'enzyme (cf. quantité de sels...) à la température optimale de l'enzyme



Digestion par les enzymes 1 et 2
Création de 2 extrêmités cohésives (ou
franches) 1 et 2.

Si l'on digère le fragment d'ADN par les deux mêmes enzymes 1 et 2, donnant des bouts collants, on obtient des extrêmités cohésives complémentaires avec celles du vecteur. Ceci permet l'insertion du fragment d'ADN dans le vecteur.

+ 
Petit fragment d'ADN dégagé
lors de l'ouverture du plasmide

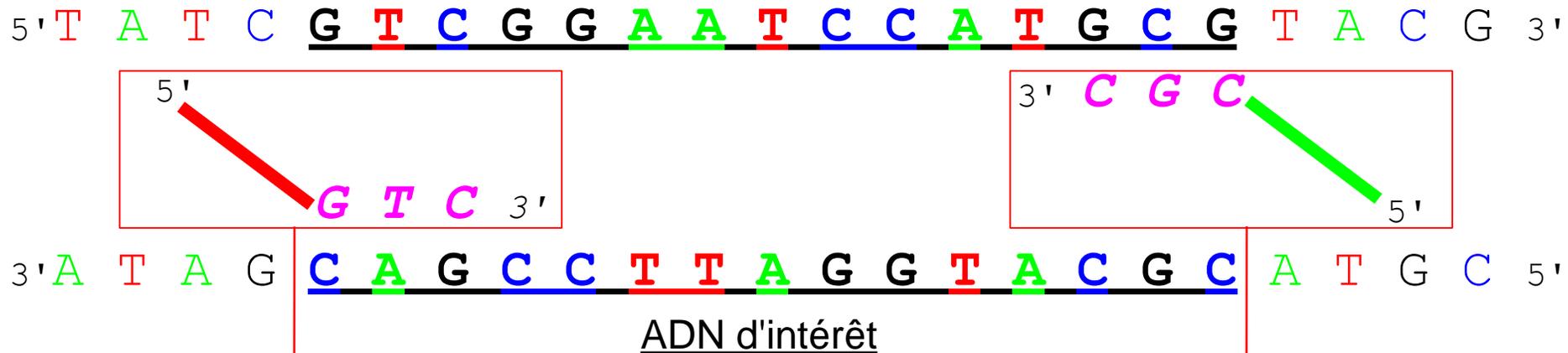


4) Insertion de l'ADN dans le vecteur

a) Digestion du fragment d'ADN et du vecteur :

Digestion du fragment d'ADN

Le fragment d'ADN d'intérêt ne contient pas forcément les bons sites de restriction. Comment peut-on les ajouter aux extrémités de l'ADN à cloner ? Cela se fait par PCR avec des amorces spéciales :



Amorce avec **une partie s'hybridant sur l'ADN à amplifier** et **une partie qui ne s'hybride pas comportant la séquence d'un site de restriction 1**

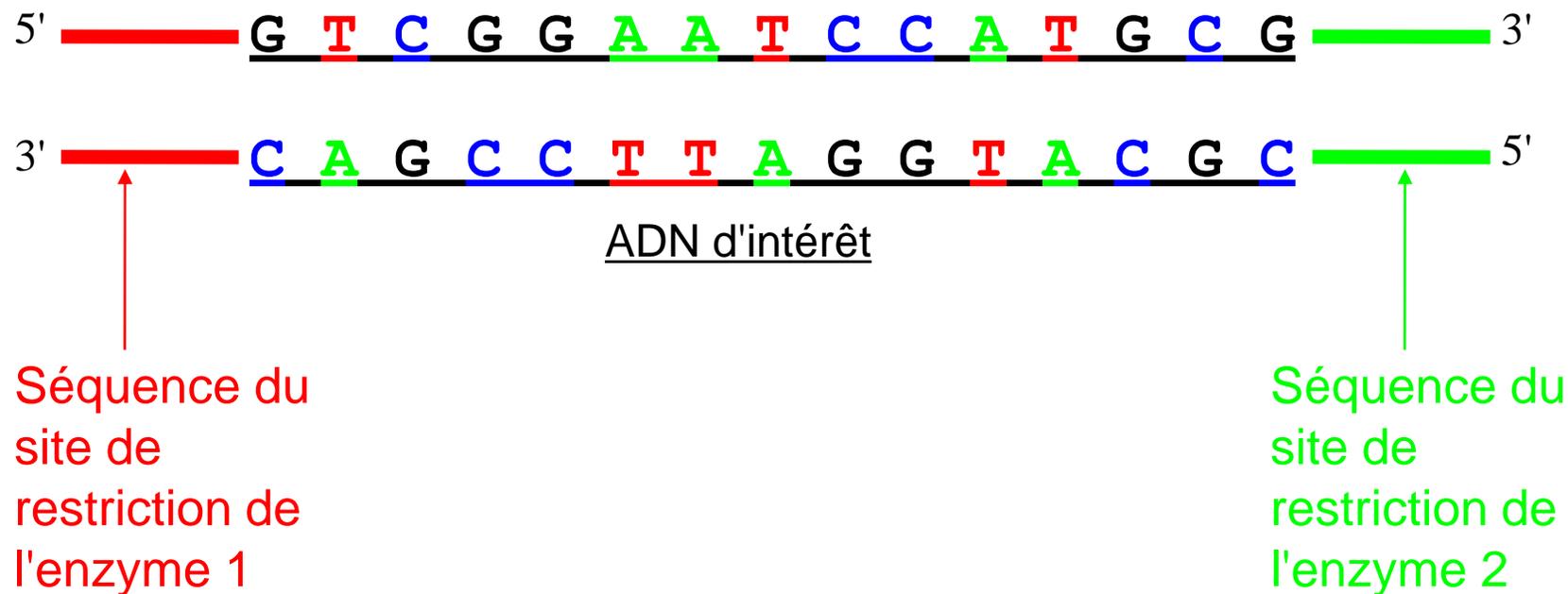
Amorce avec **une partie s'hybridant sur l'ADN à amplifier** et **une partie qui ne s'hybride pas comportant la séquence d'un site de restriction 2**

4) Insertion de l'ADN dans le vecteur

a) Digestion du fragment d'ADN et du vecteur :

Digestion du fragment d'ADN

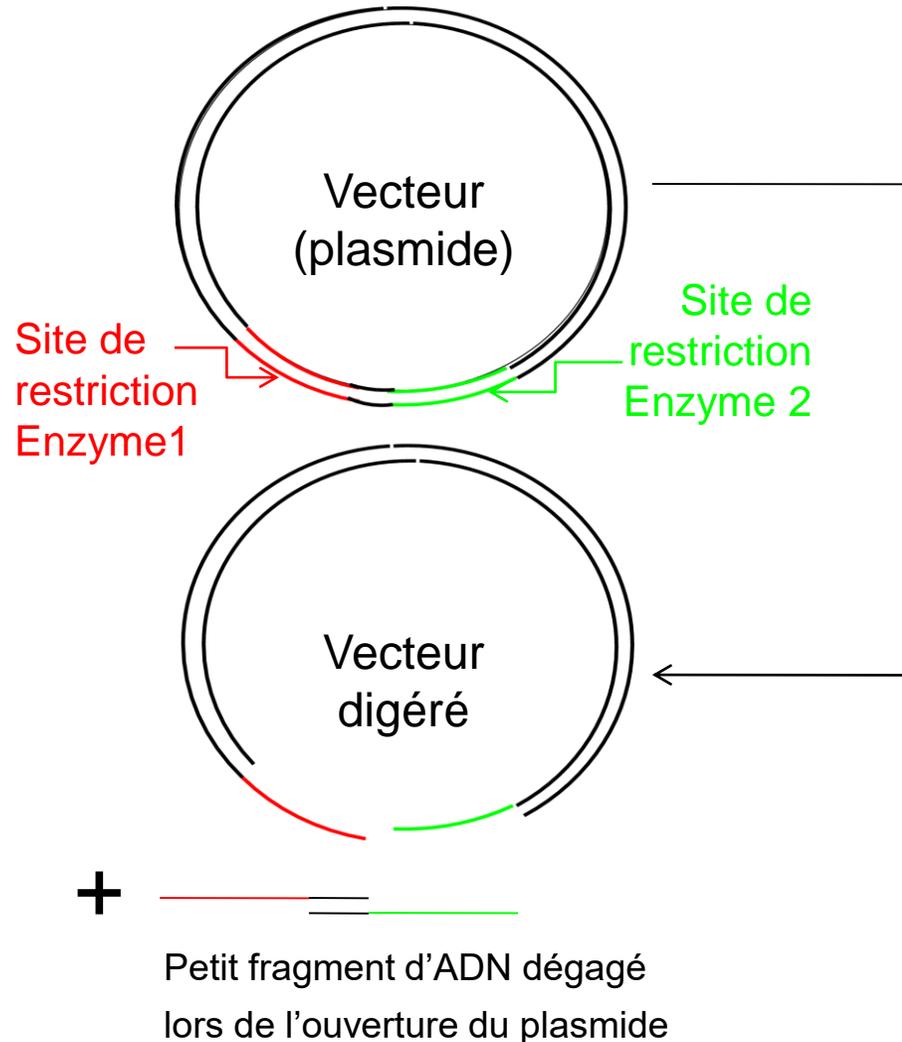
Voici l'ADN obtenu après PCR, avec les sites de restriction à ses extrémités. Il pourra être utilisé pour le clonage.



4) Insertion de l'ADN dans le vecteur

a) Digestion du fragment d'ADN et du vecteur :

Digestion du vecteur



Digestion par les enzymes 1 et 2
Création de 2 extrémités cohésives (ou franches)
1 et 2.

Le fragment d'ADN doit être cloné dans le vecteur digéré. Le petit fragment dégagé peut se réinsérer dans le vecteur digéré à la place du fragment d'ADN à cloner. Il est donc nécessaire de séparer les deux produits de la digestion du vecteur et de purifier le vecteur digéré pour la suite du clonage.

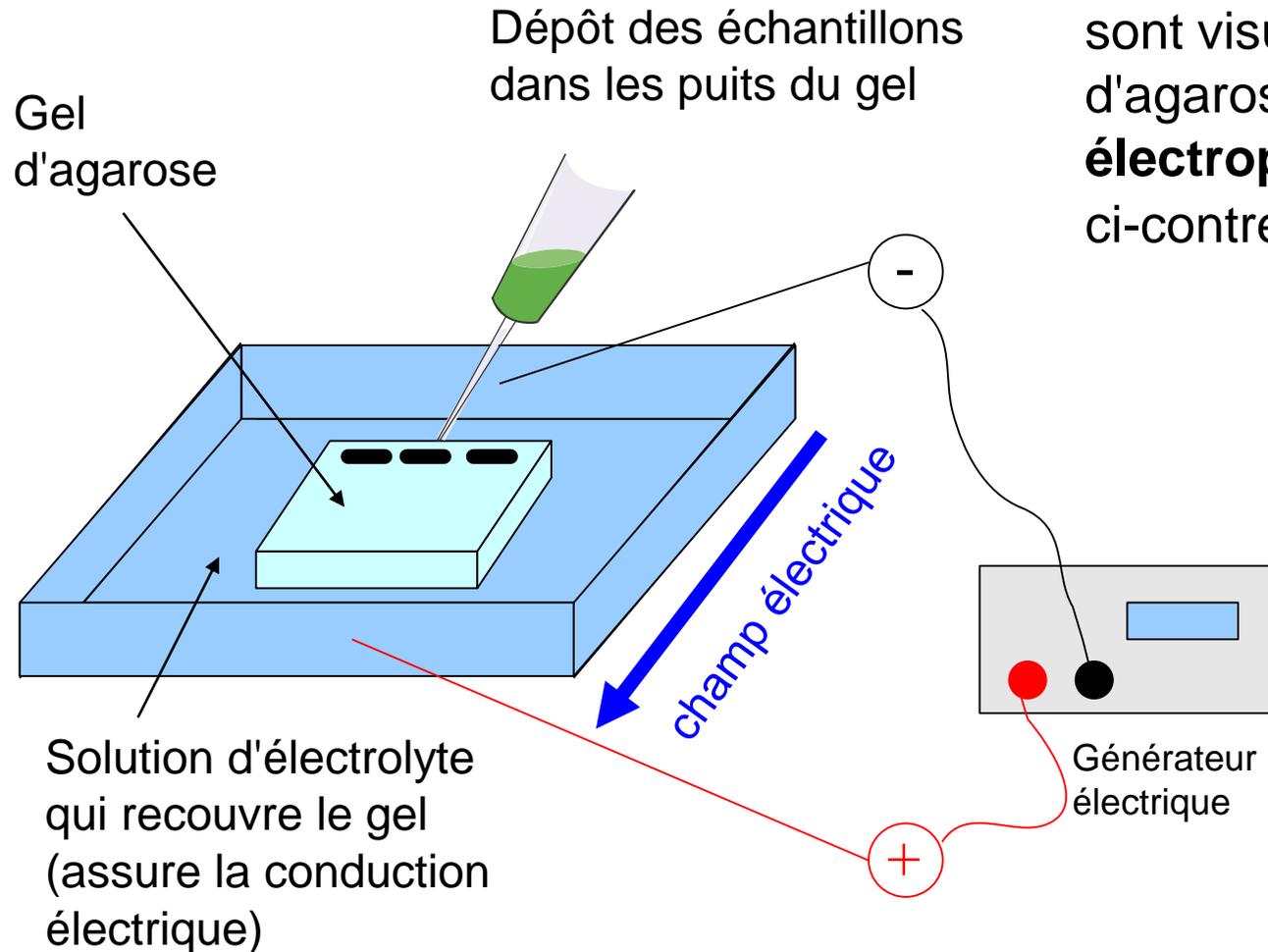
4) Insertion de l'ADN dans le vecteur

a) Digestion du fragment d'ADN et du vecteur : Purification du vecteur digéré

- L'**électrophorèse** est une méthode de séparation des particules chargées électriquement par migration différentielle sous l'action d'un champ électrique. Elle s'applique aux : protéines, peptides, acides aminés, acides nucléiques, nucléotides
- La migration dépend de la charge et de la géométrie des particules
- L'électrophorèse peut se faire en veine liquide ou sur un support homogène, poreux et relativement inerte (papier, gels...)

4) Insertion de l'ADN dans le vecteur

a) Digestion du fragment d'ADN et du vecteur : Purification du vecteur digéré : Electrophorèse sur gel d'agarose



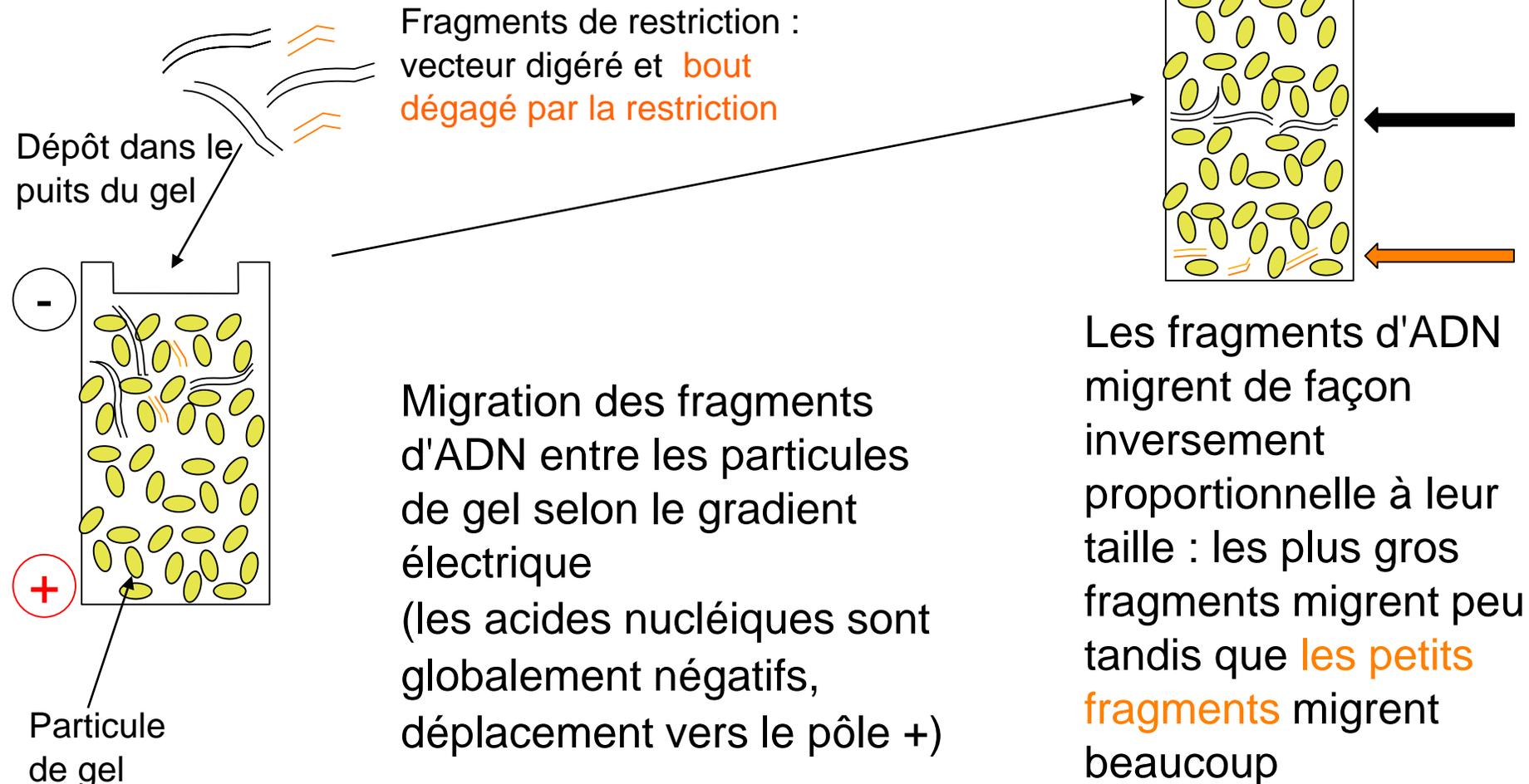
Les fragments de restriction sont visualisés sur gel d'agarose par **électrophorèse** :
ci-contre **le dispositif utilisé**

Principe :
migration des fragments d'ADN dans un champ électrique, séparation en fonction de leur taille

4) Insertion de l'ADN dans le vecteur

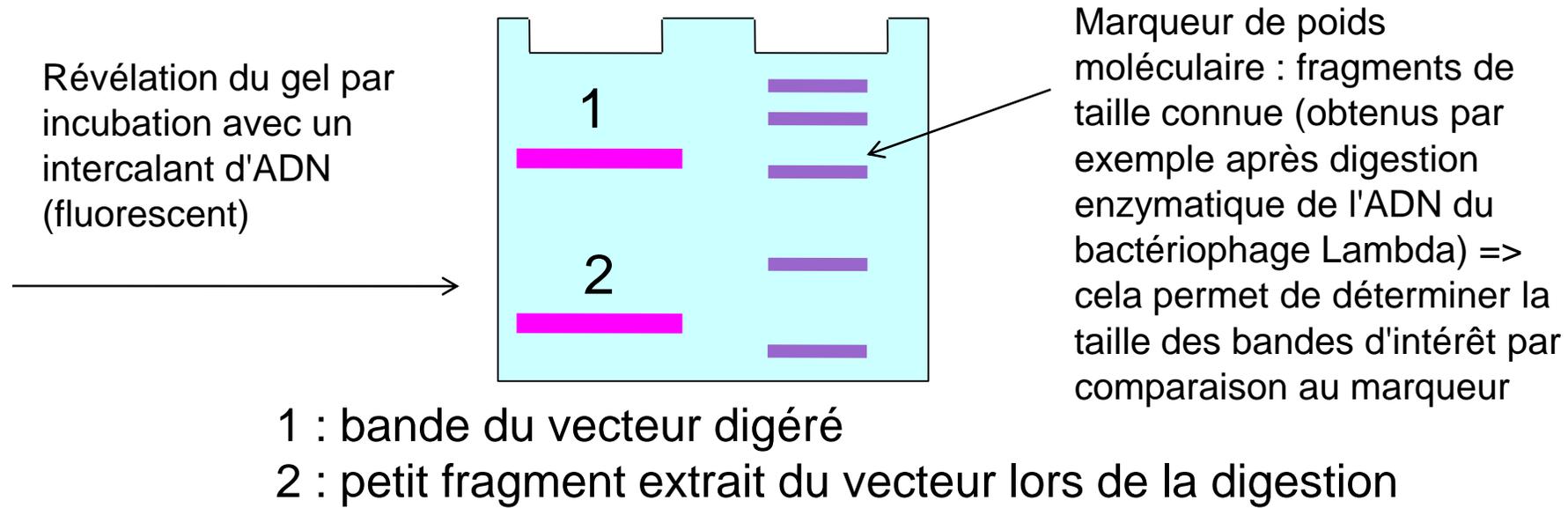
a) Digestion du fragment d'ADN et du vecteur : Purification du vecteur digéré : Electrophorèse sur gel d'agarose

Principe de l'électrophorèse :



4) Insertion de l'ADN dans le vecteur

a) Digestion du fragment d'ADN et du vecteur : Purification du vecteur digéré : Electrophorèse sur gel d'agarose

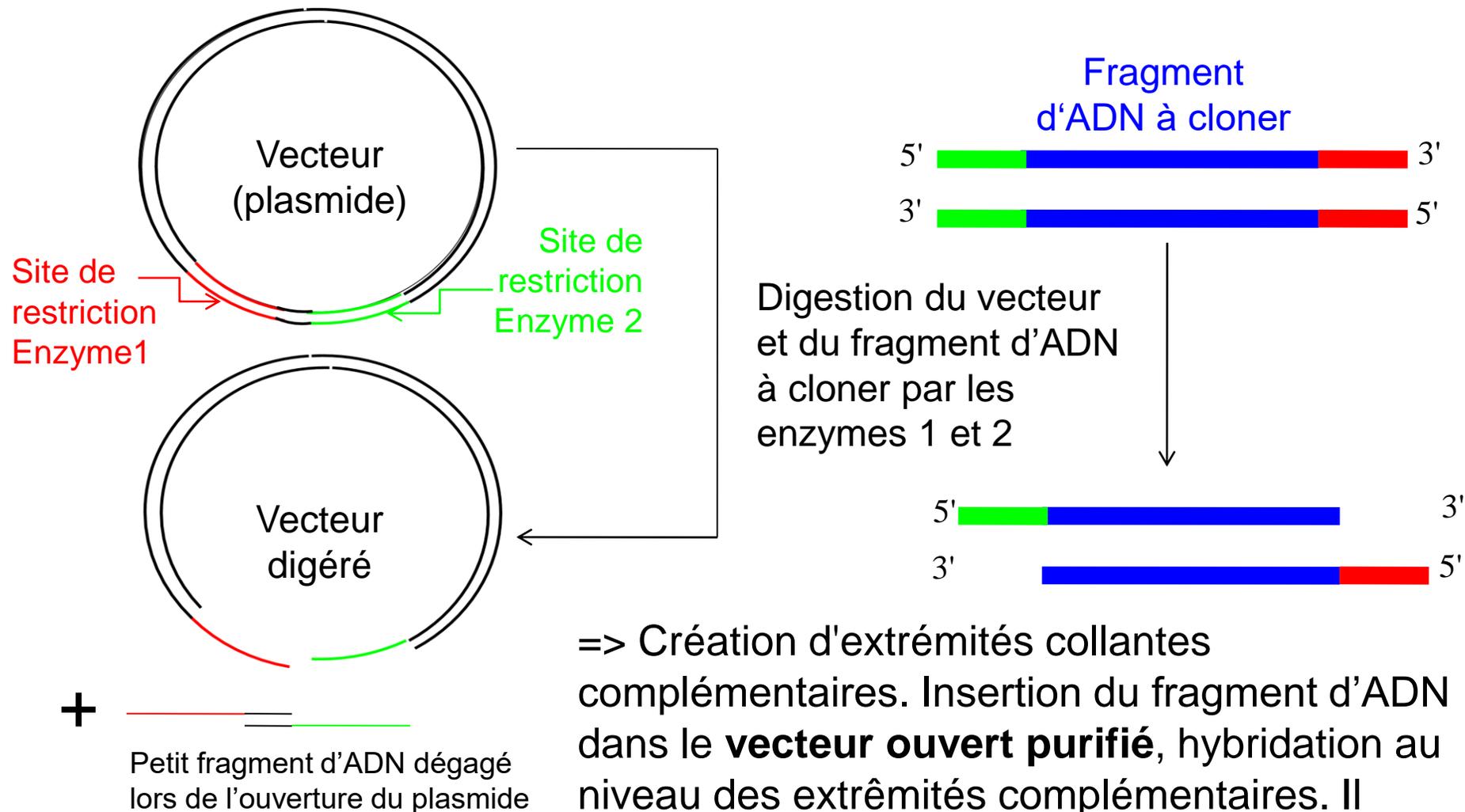


Il est possible de récupérer la bande 1 : on découpe la bande sur le gel, on extrait l'ADN de l'agarose et on le purifie sur une colonne (fixation de l'ADN sur la colonne, lavage, puis élution de l'ADN purifié) => on récupère ainsi l'ADN du vecteur digéré, utilisé pour le clonage.

Cette purification sur gel permet aussi d'éliminer en partie les traces de vecteur non digéré. Si le fragment d'ADN dégagé à éliminer est très petit, une purification sur colonne peut être suffisante.

4) Insertion de l'ADN dans le vecteur

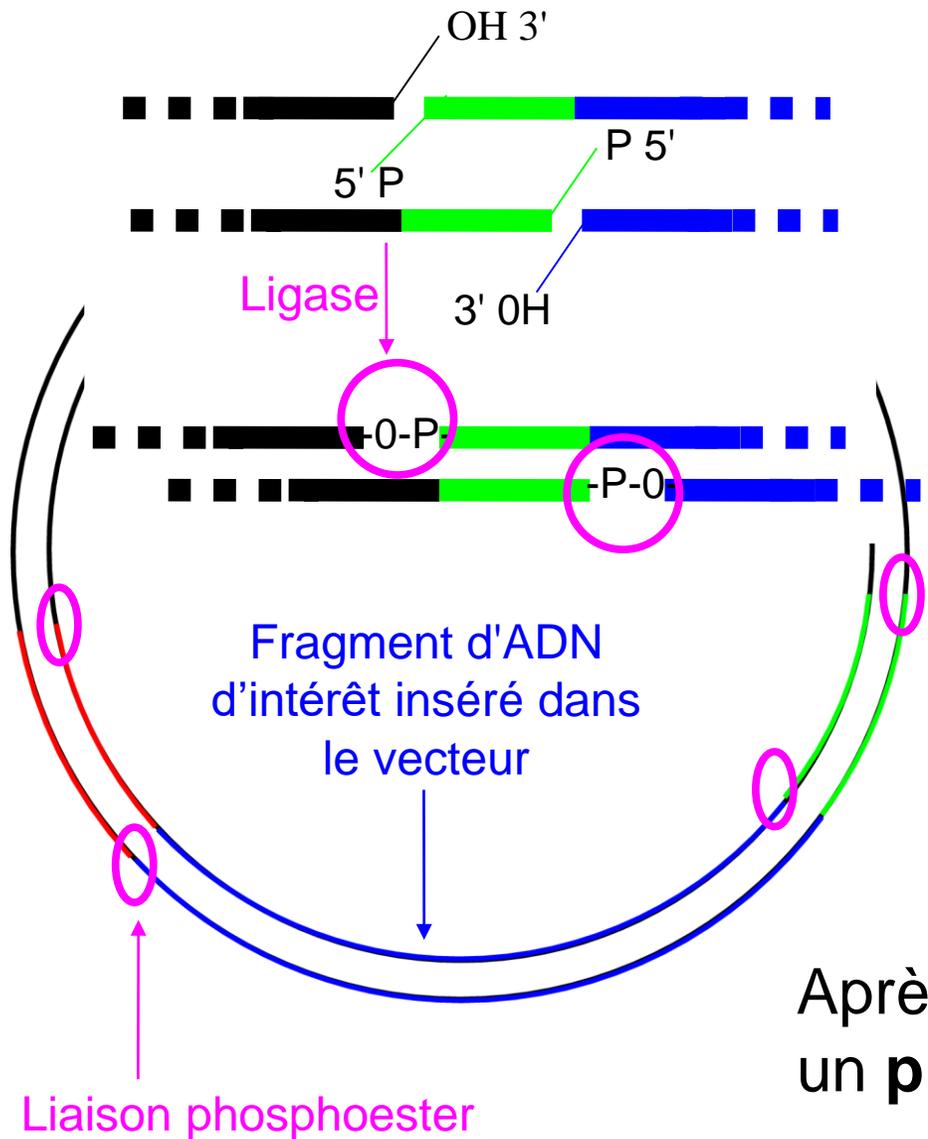
b) Ligation du fragment d'ADN dans le vecteur



=> Création d'extrémités collantes complémentaires. Insertion du fragment d'ADN dans le **vecteur ouvert purifié**, hybridation au niveau des extrémités complémentaires. Il reste à lier ces deux morceaux d'ADN de façon covalente.

4) Insertion de l'ADN dans le vecteur

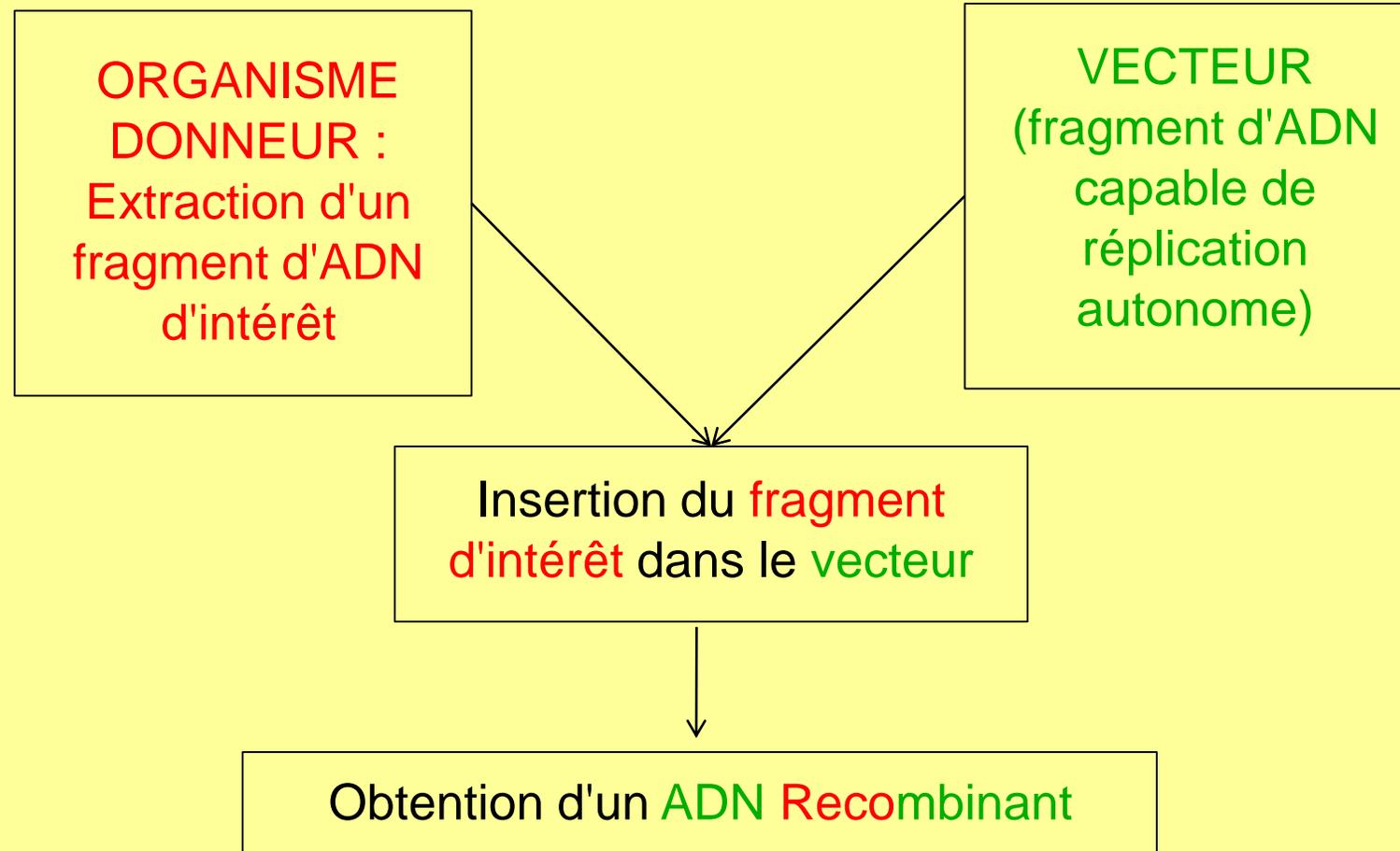
b) Ligation du fragment d'ADN dans le vecteur



- La **ligase** est une enzyme capable de former des **liaisons covalentes** (formation de liaisons *phosphoester*) entre deux molécules d'ADN (au niveau d'une zone d'hybridation des molécules d'ADN)
- Intérêt d'utiliser deux enzymes différentes lors de la digestion :
 - insertion orientée de l'ADN à cloner dans le vecteur
 - limitation de la religation du vecteur sur lui-même

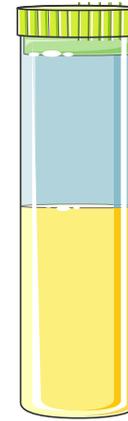
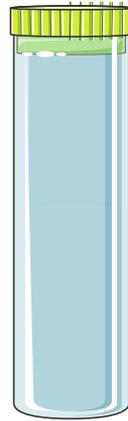
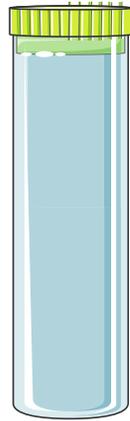
Après ligation, on obtient un **plasmide recombiné**

I) Obtention de l'ADN recombinant



5) Amplification de l'ADN recombinant obtenu

5) Amplification de l'ADN recombinant obtenu : Transformation des bactéries



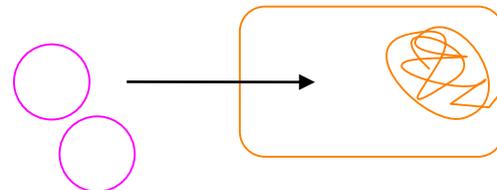
→ 4) Étalement sur boîte (pour la sélection)

1) Mélange de plasmides et de bactéries compétentes sur glace

(les **bactéries compétentes** ont été traitées pour faciliter l'entrée d'ADN : leur paroi a été fragilisée par un traitement au chlorure de calcium)

(utilisation de *Escherichia coli* en général : utilisation facile, croissance rapide)

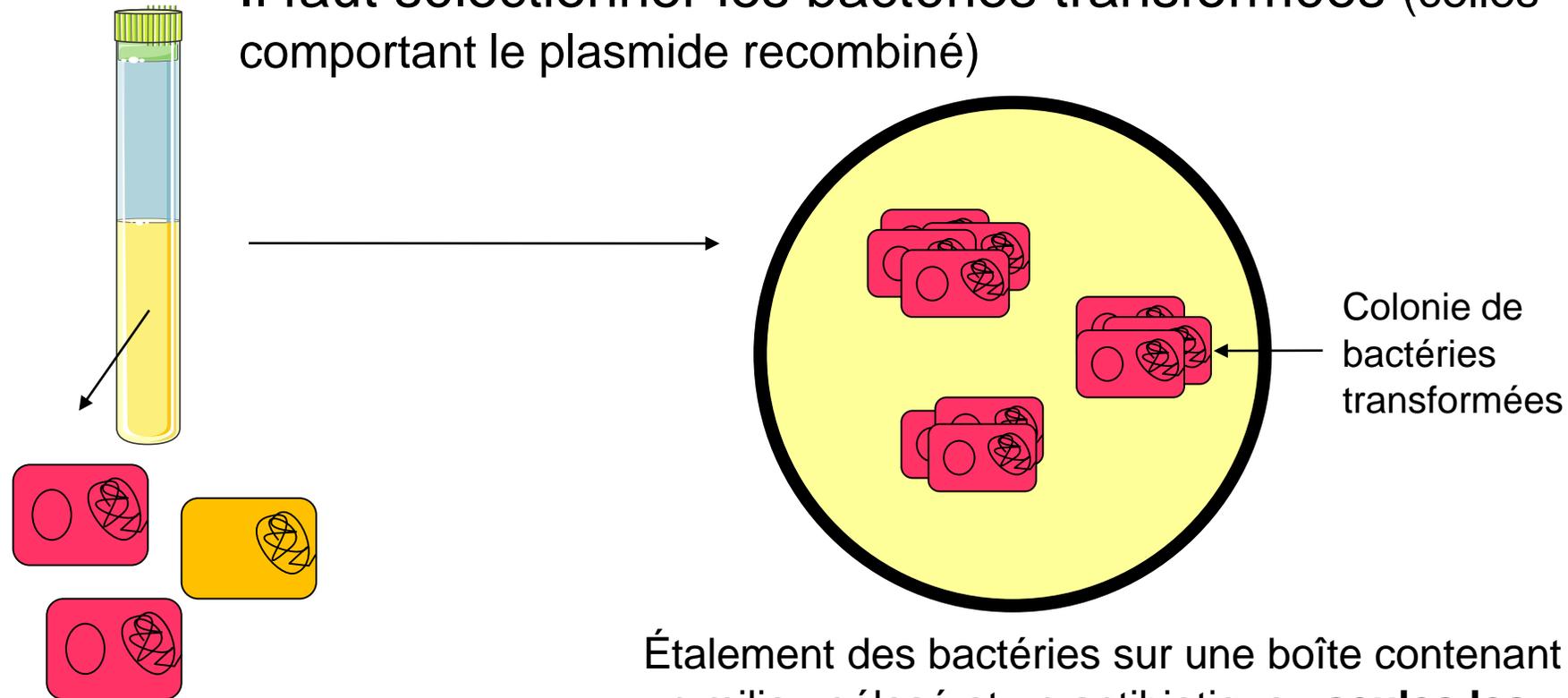
2) Choc thermique à 42°C : les **plasmides** vont pénétrer dans les **bactéries**



3) Ajout de milieu nutritif aux bactéries, croissance 1h à 37°C (cela permet l'expression des protéines de résistance aux antibiotiques pour la sélection ultérieure)

5) Amplification de l'ADN recombinant obtenu : Sélection des bactéries transformées

Il faut sélectionner les bactéries transformées (celles comportant le plasmide recombiné)



Mélange de **bactéries transformées** contenant le **plasmide d'intérêt** et de **bactéries non transformées**

Étalement des bactéries sur une boîte contenant un milieu gélosé et un antibiotique : **seules les bactéries transformées pourront se multiplier car le plasmide porte un gène de résistance contre l'antibiotique**

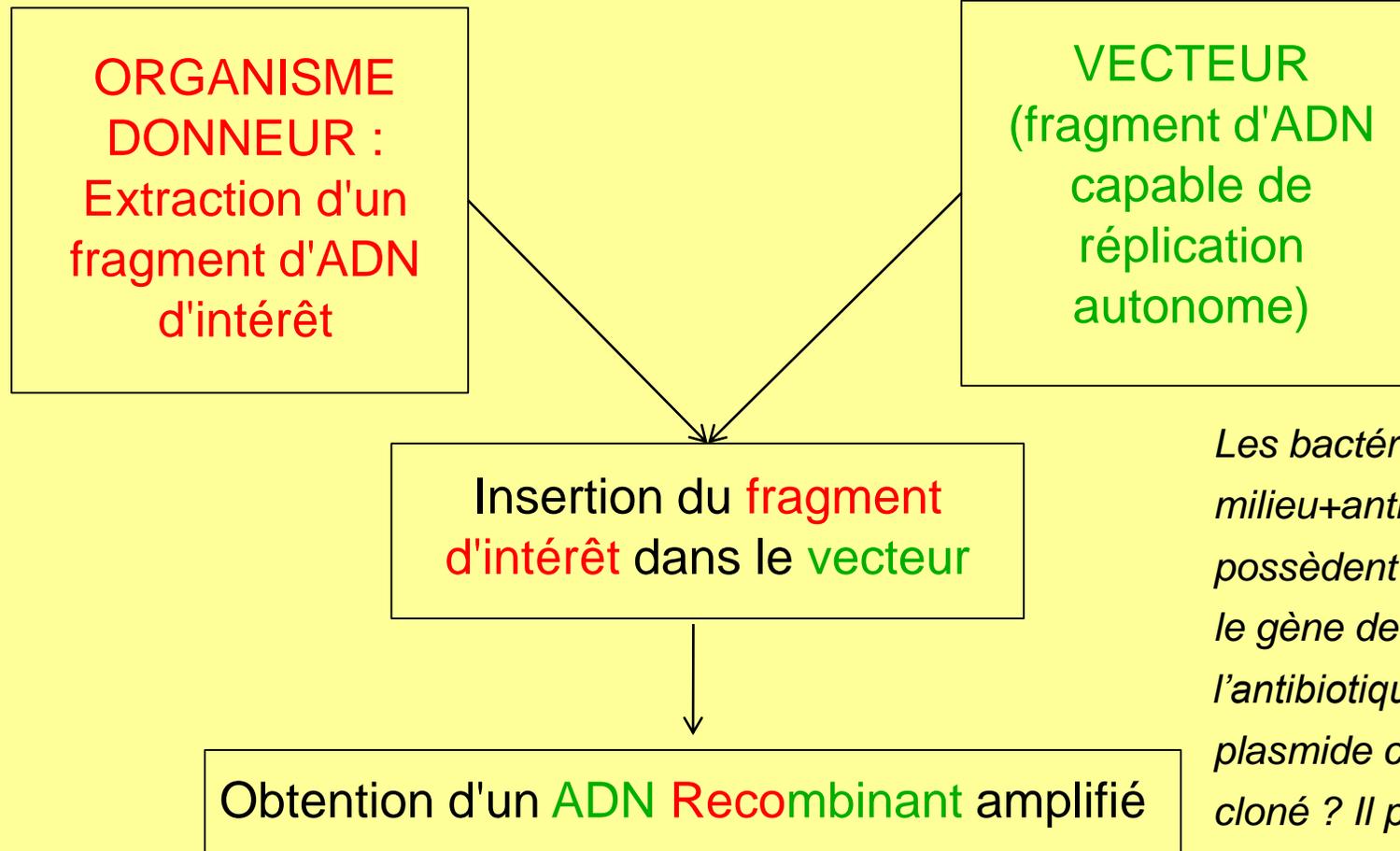
5) Amplification de l'ADN recombinant obtenu : Extraction du plasmide recombiné

- Ensemencement d'une colonie de bactéries transformées dans du milieu liquide + antibiotique une nuit à 37°C
- => Multiplication des bactéries et donc amplification du nombre de plasmides recombinés (cf. présence d'une origine de réplication bactérienne sur le plasmide, l'antibiotique assure une pression de sélection pour que les bactéries conservent le plasmide)
- Il faut ensuite récupérer le plasmide

5) Amplification de l'ADN recombinant obtenu : Extraction du plasmide recombiné

- Les bactéries sont lysées par un détergent en milieu alcalin afin de libérer l'ADN génomique et plasmidique. L'ADN génomique et les protéines sont précipités par de l'acétate de sodium. Le précipité est séparé par centrifugation, le surnageant contient l'ADN plasmidique.
- L'ADN plasmidique est alors précipité (volume double d'éthanol ou isopropanol), lavé puis redissous dans un tampon adéquat. Cette étape peut être réalisée avec des colonnes de purification d'ADN.

I) Obtention de l'ADN recombinant



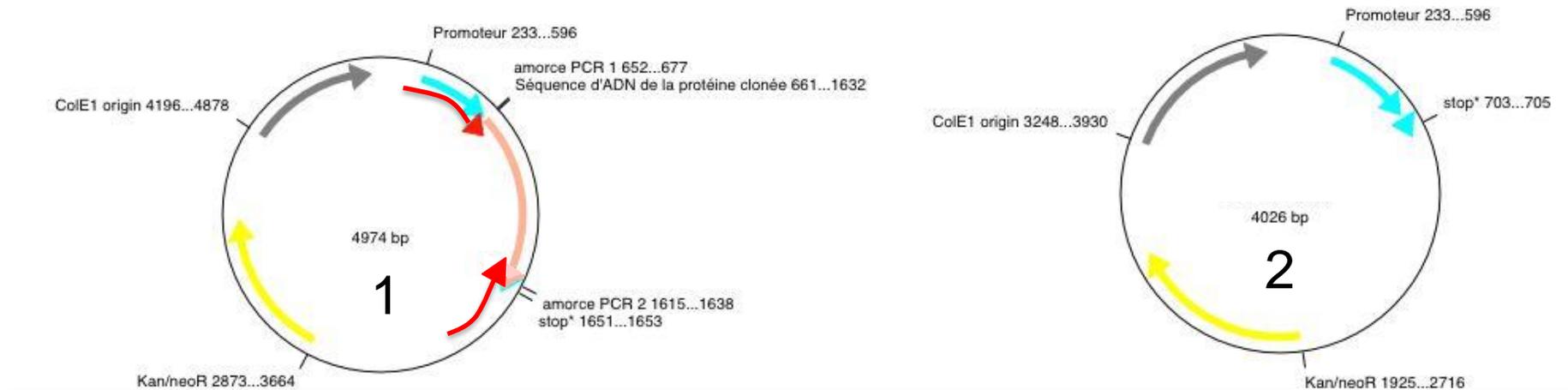
Les bactéries poussant sur le milieu+antibiotique possèdent un plasmide avec le gène de résistance à l'antibiotique. Mais ce plasmide contient-il l'insert cloné ? Il peut y avoir religation du vecteur sur lui-même. Nécessité d'un crible pour trouver les clones positifs ayant intégré l'ADN à cloner.

6) Vérification de la construction

6) Vérification de la construction

a) Vérification rapide par PCR

Les bactéries transformées peuvent contenir le **plasmide recombiné (contenant l'ADN qui nous intéresse)** (1) ou le vecteur refermé sur lui-même (2) => il faut distinguer ces deux populations



PCR avec les **amorces ayant servi à l'obtention de l'insert**, observation des produits formés sur gel d'agarose

1) Production de protéines recombinantes

c) Extraction des protéines

Les protéines sont dans le cytoplasme des bactéries, qui ont aussi une paroi.

Il est donc nécessaire de lyser les bactéries pour récupérer les protéines.

Etape de **sonication** (destruction mécanique par des ultrasons) et ajout d'un **détergent** (lyse chimique)

1) Production de protéines recombinantes

d) Vérification de l'expression des protéines : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS

Prélèvement d'un échantillon
de l'extrait bactérien, supposé
contenir nos protéines



Electrophorèse sur **gel de
polyacrylamide
dénaturant**

Le gel de polyacrylamide est une matrice inerte formant beaucoup de liaisons croisées à travers lesquelles migrent les protéines. Il joue le rôle d'un **tamis moléculaire**. La taille des pores peut être ajustée suivant la taille des protéines que l'on souhaite visualiser.

1) Production de protéines recombinantes

d) Vérification de l'expression des protéines : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS

Prélèvement d'un échantillon
de l'extrait bactérien, supposé
contenir nos protéines



**Dénaturation des
protéines par mélange
avec du tampon de
charge, et chauffage
5min à 95°C**



Electrophorèse sur gel de
polyacrylamide dénaturant

Le tampon de charge (Laemmli) contient
notamment :

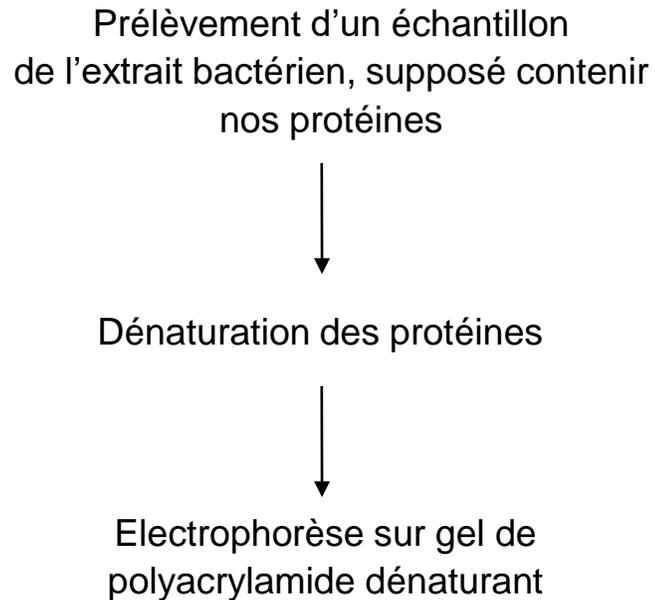
- du **glycérol** qui augmente la densité de l'échantillon et facilite son dépôt dans les puits du gel
- un **colorant**, qui facilite le suivi de la migration des échantillons sur gel

ET SURTOUT :

- des **agents réducteurs** : *destruction des ponts disulfures* des protéines,
- un **détergent anionique SDS (sodium dodécylsulfate)** : *fixation sur les régions hydrophobes de la protéine, cela provoque alors son dépliement => la protéine est soluble dans la solution de détergent*

1) Production de protéines recombinantes

d) Vérification de l'expression des protéines : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS

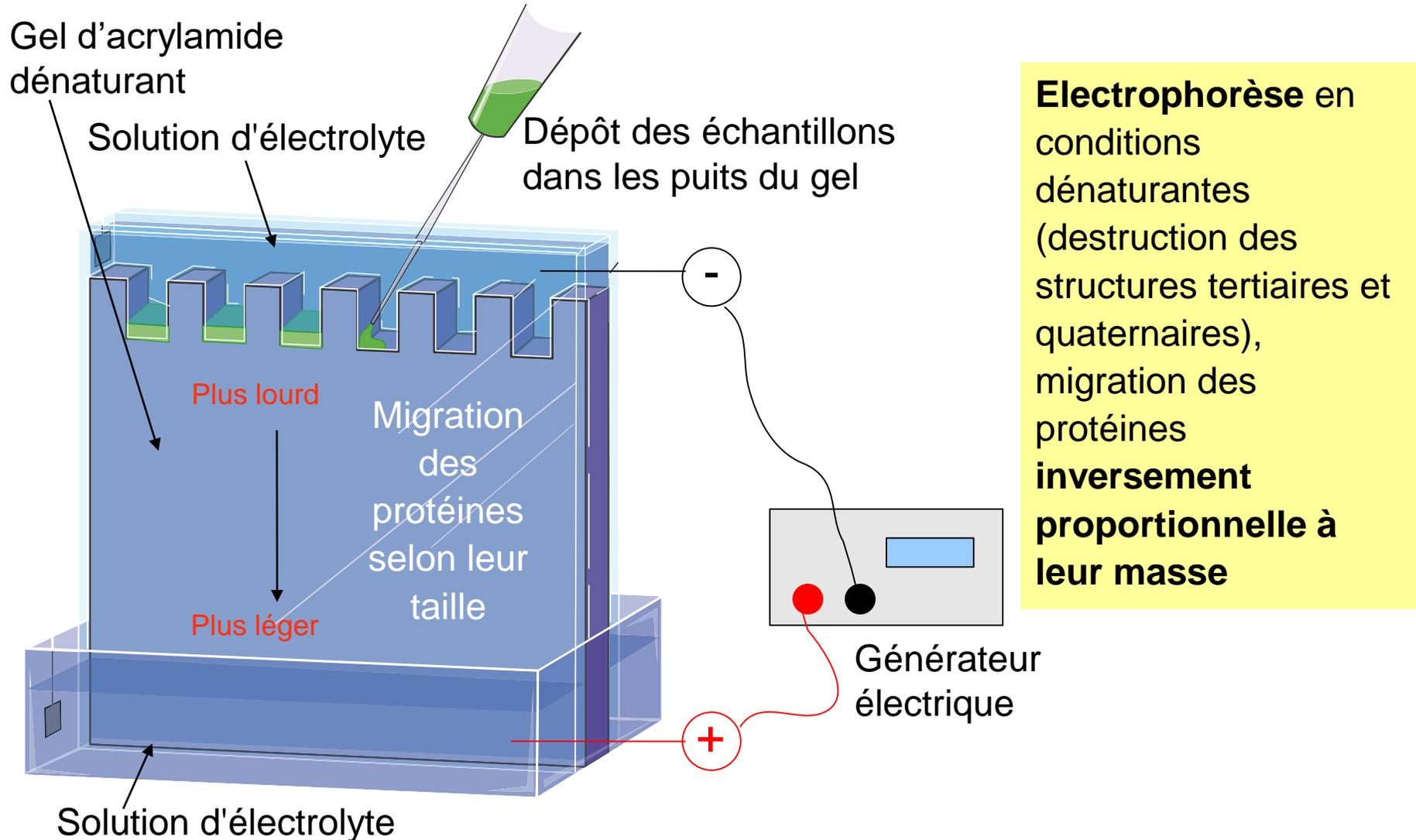


La charge intrinsèque de la protéine est masquée par les charges négatives du SDS. Les protéines vont donc migrer vers le pôle positif lors de l'application d'une tension. Les grandes protéines, quoi que plus chargées négativement migrent moins loin car elles sont davantage retenues par le maillage du gel. **Les protéines sont alors fractionnées selon leur masse moléculaire.**

Rq : Cette méthode est très puissante : elle permet d'analyser des protéines insolubles dans l'eau, protéines membranaires, protéines de gros agrégats... Elle apporte des informations sur la composition des sous-unités d'un complexe protéique.

1) Production de protéines recombinantes

d) Vérification de l'expression des protéines : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS



1) Production de protéines recombinantes

d) Vérification de l'expression des protéines :

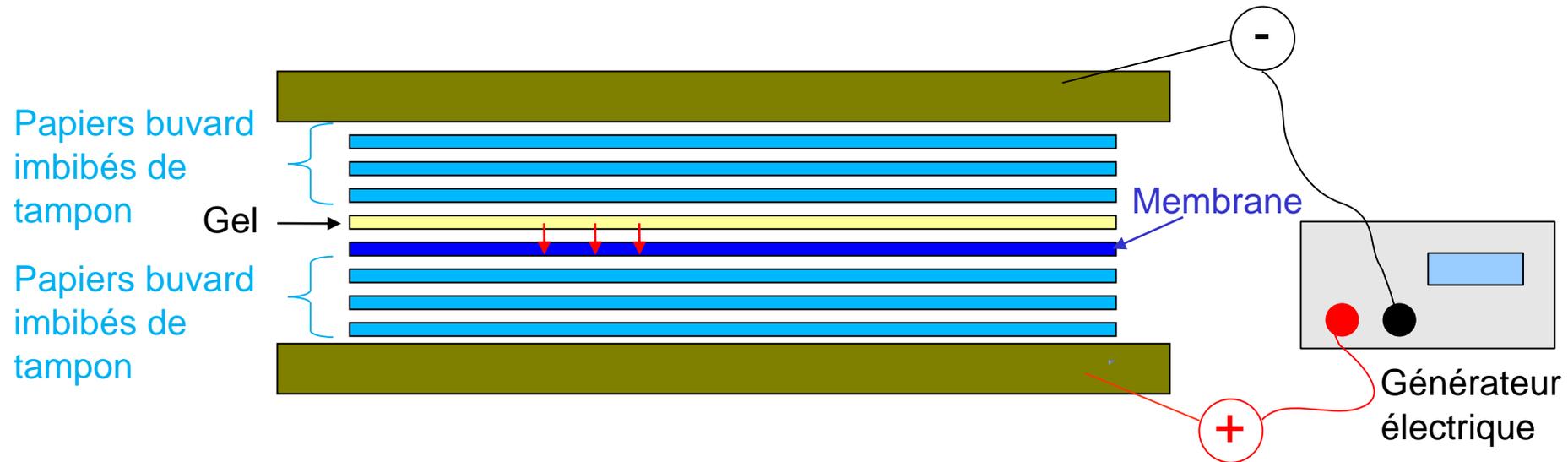
Coloration ou transfert sur membrane

- Toutes les protéines fortement exprimées peuvent être détectées par leur **coloration dans le gel** (au bleu de Coomassie ou avec du nitrate d'argent pour des protéines moins concentrées). C'est une **détection globale** de toutes les protéines fortement exprimées.
- Des protéines en plus faibles quantités peuvent être détectées par **Western Blot** après **transfert sur membrane** (ex : membrane de nitrocellulose). Cette détection est **spécifique**.

1) Production de protéines recombinantes

d) Vérification de l'expression des protéines : Transfert sur membrane

Principe du transfert sur membrane :



Les protéines se déplacent selon le champ électrique, elles passent du gel à la membrane. Le transfert se déroule pendant une à 2 heures.

Le même principe est utilisé pour le transfert des acides nucléiques (qui peuvent aussi être transférés en une nuit par capillarité, en absence de champ électrique)

1) Production de protéines recombinantes

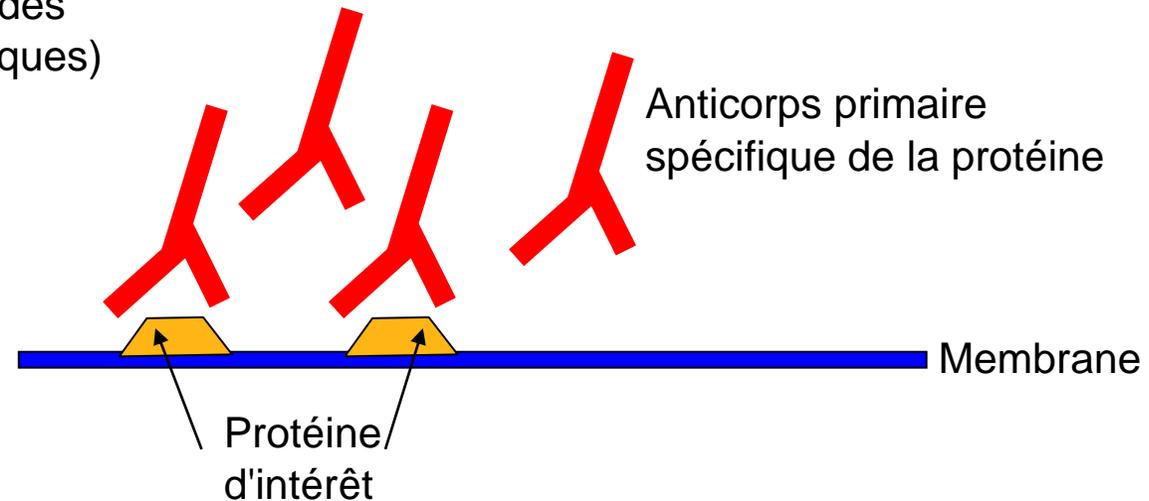
d) Vérification de l'expression des protéines : Détection des protéines par Western blot

Détection des protéines sur la membrane par **WESTERN BLOT** :
reconnaissance spécifique de la protéine qui nous intéresse à l'aide
d'un *anticorps dirigé contre cette protéine*.

1) **Saturation des sites non
spécifiques** par incubation avec du
lait (les protéines du lait vont se fixer sur la
membrane, ce qui limite la liaison des
anticorps sur des sites non spécifiques)



2) Incubation avec
l'**anticorps primaire
spécifique de la protéine** :
Reconnaissance de la
protéine par l'anticorps



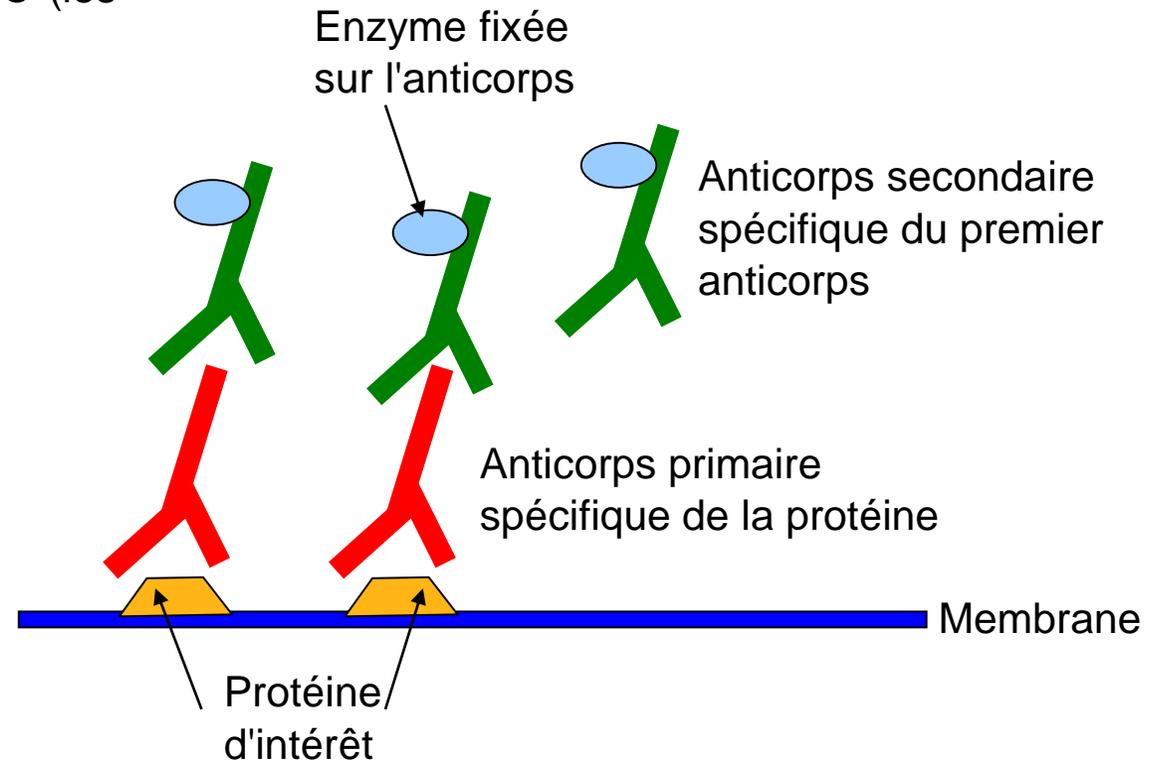
1) Production de protéines recombinantes

d) Vérification de l'expression des protéines : Détection des protéines par Western blot

3) **Lavages** de la membrane (les anticorps non fixés sont éliminés)



4) Incubation avec l'**anticorps secondaire**, qui reconnaît l'anticorps primaire. Une enzyme est fixée sur l'anticorps secondaire



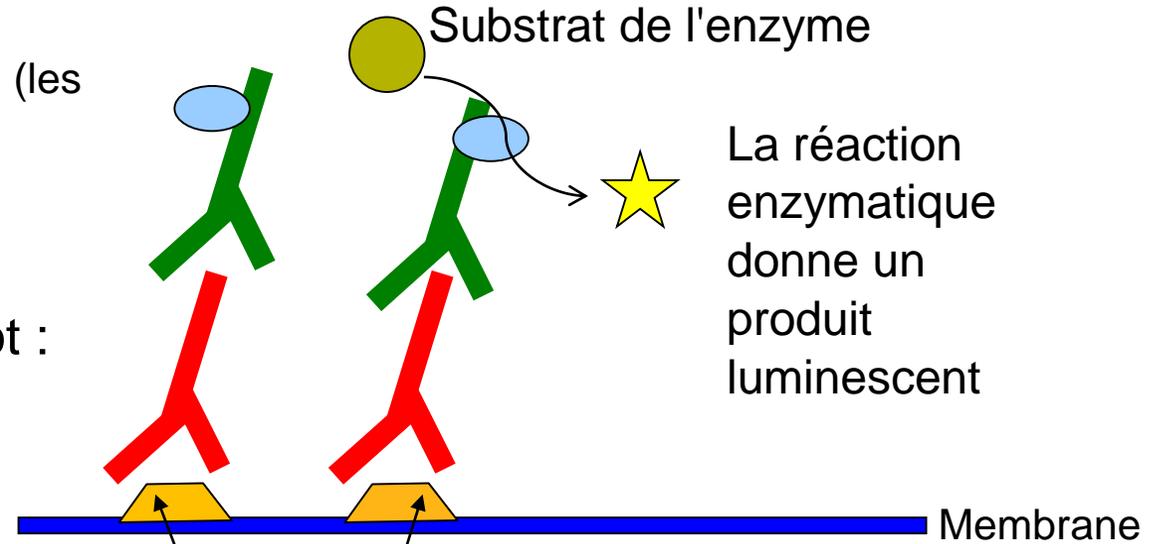
1) Production de protéines recombinantes

d) Vérification de l'expression des protéines : Détection des protéines par Western blot

5) **Lavages** de la membrane (les anticorps non fixés sont éliminés)

6) Révélation du Western Blot : le substrat de l'enzyme est ajouté. La réaction enzymatique transforme ce substrat en un **produit luminescent**

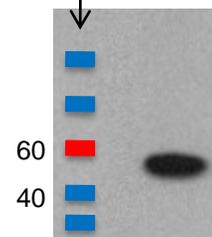
La lumière émise peut être détectée sur un film photosensible, ou par une caméra



Protéine d'intérêt

Marqueur de poids moléculaire (kDa)

Exemple d'image obtenue sur **film photosensible**



Signal de notre protéine

1) Production de protéines recombinantes

e) Détection des acides nucléiques

Les électrophorèses sur gel d'acrylamide sont aussi utilisées pour la séparation des acides nucléiques de petite taille ; pour des fragments plus grands, un gel d'agarose est utilisé. La révélation se fait après transfert sur membrane :

- **Pour les ADN** : on révèle les ADN sur la membrane à l'aide de sondes ADN complémentaires marquées radioactivement (ou chimiquement). On parle de **SOUTHERN BLOT**.

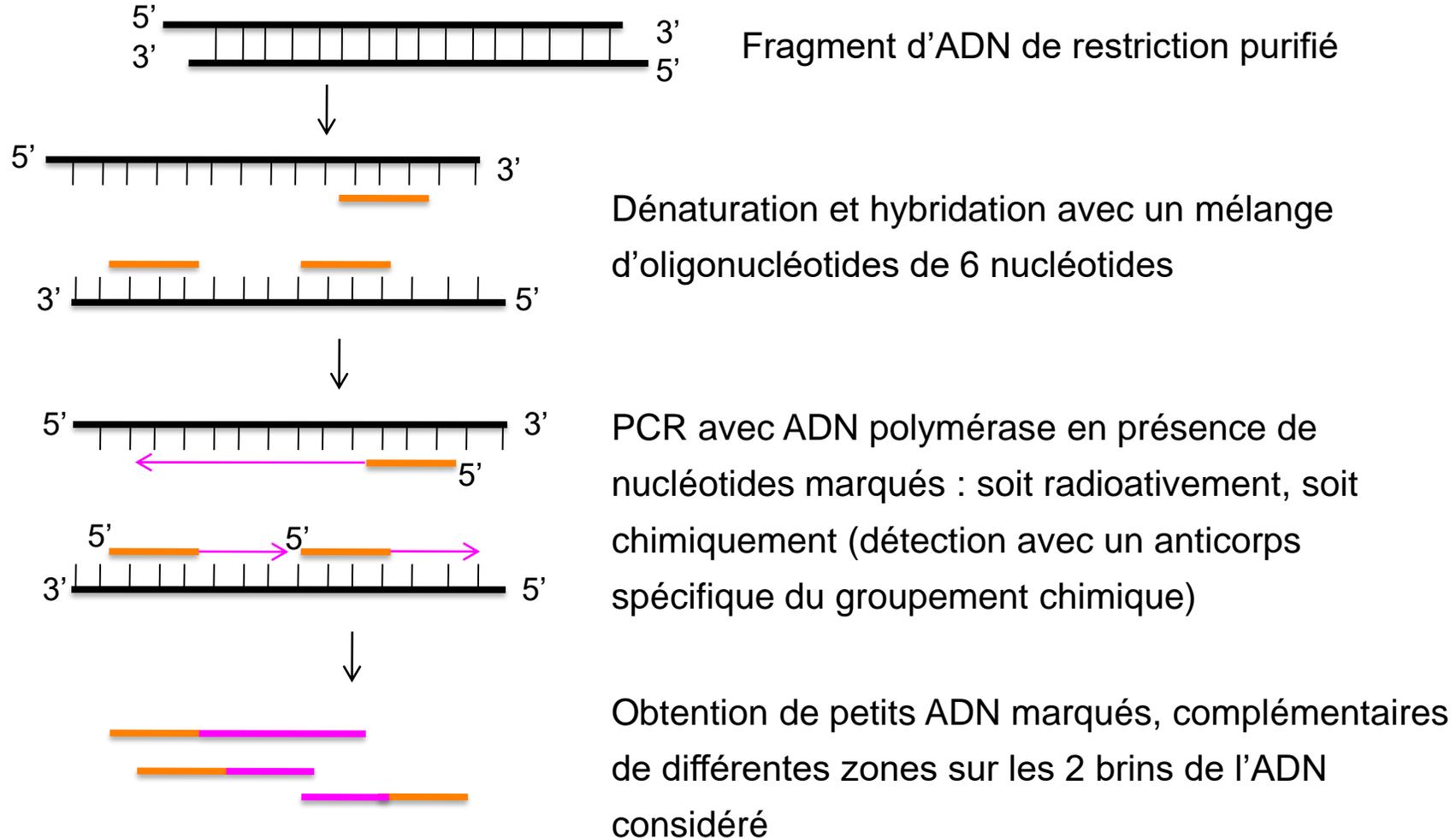
Le Southern Blot a été inventé par Edward M. Southern en 1975. Cette méthode a ensuite été appliquée à d'autres molécules que les ADN (Western Blot pour les protéines et Northern Blot pour les ARN)

- **Pour les ARN** : on révèle les ARN sur la membrane à l'aide de sondes ADN complémentaires de la séquence de l'ARN étudié, marquées radioactivement (ou chimiquement). On parle de **NORTHERN BLOT**.

1) Production de protéines recombinantes

e) Détection des acides nucléiques

Remarque : Comment marquer une molécule d'ADN pour obtenir une sonde ?



II) Utilisation de l'ADN recombinant

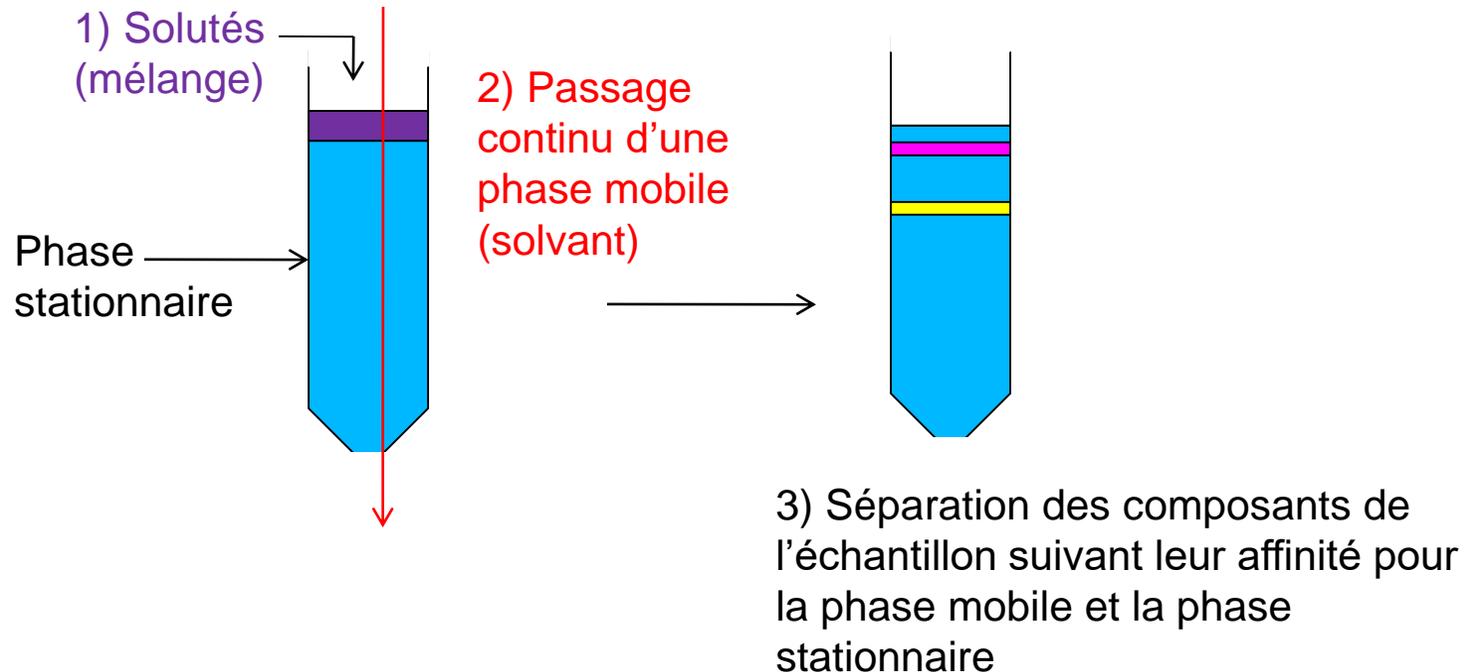
Les protéines recombinantes sont exprimées en grandes quantités, mais sont mélangées avec les protéines bactériennes. Il est donc nécessaire de purifier la protéine d'intérêt.

2) Purification des protéines

2) Purification des protéines

a) Chromatographie

Une technique de séparation des protéines est la **chromatographie**. Elle nécessite une phase stationnaire et une phase mobile, la séparation se fait en fonction de l'affinité des protéines pour chacune des phases. Exemple d'une chromatographie sur colonne :



2) Purification des protéines

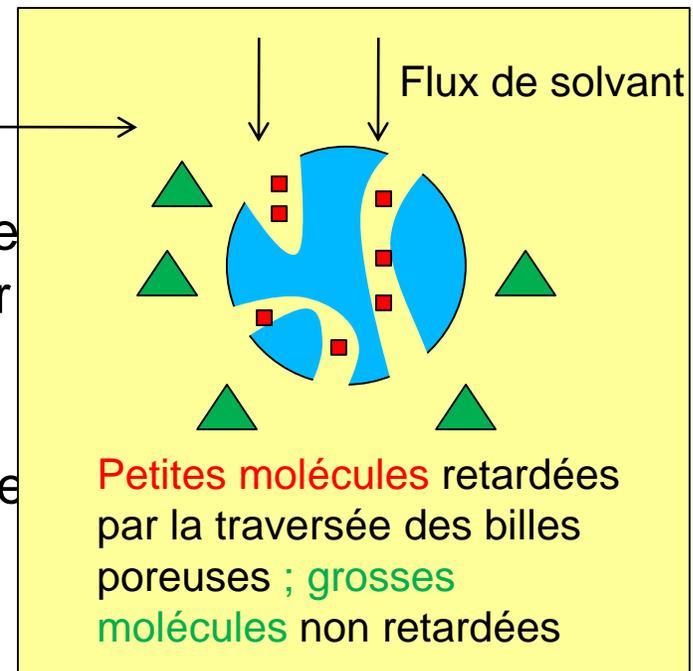
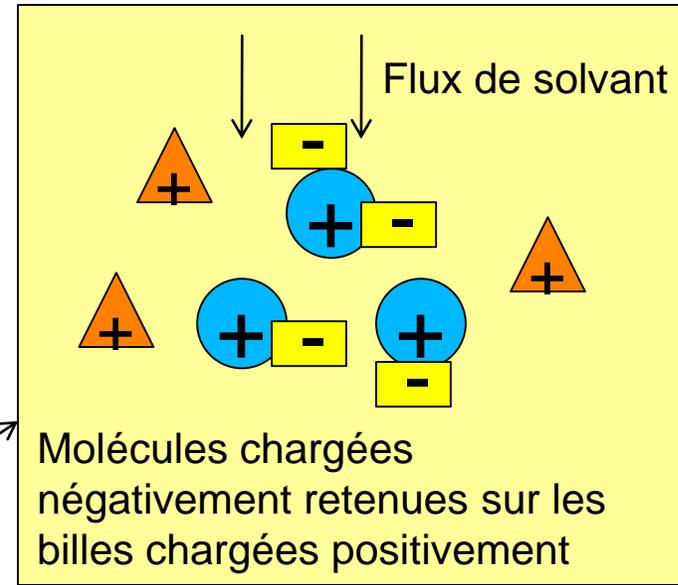
a) Chromatographie

- **Chromatographie de partage** (en phase inverse) : phase stationnaire apolaire et phase mobile polaire. Séparation selon le degré de *polarité* des composés.

- **Chromatographie d'échange d'ions** : phase stationnaire chargée positivement ou négativement. Séparation suivant la *charge* des composés.

- **Chromatographie d'exclusion** : support poreux. Séparation en fonction de la *taille* : les grosses molécules sortent très vite de la colonne tandis que les plus petites, qui peuvent traverser les pores sont retardées et sortent plus tard.

- **Chromatographie d'affinité** : séparation selon des propriétés de *forme*. C'est la technique la plus puissante car elle repose sur des *interactions spécifiques*.



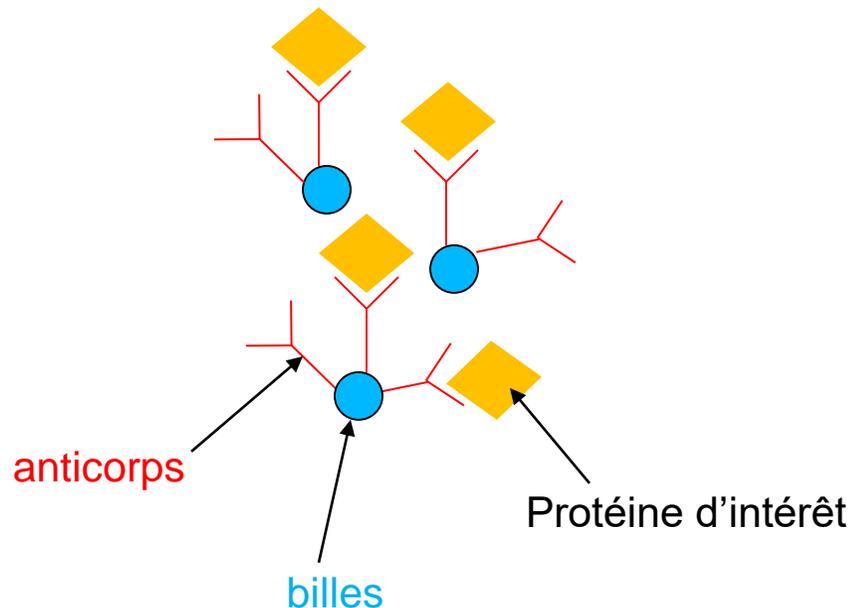
2) Purification des protéines

b) Chromatographie d'affinité

Chromatographie d'affinité :

- Immunopurification : utilisation de l'interaction Anticorps/Ligand

Cette technique est **spécifique de la protéine étudiée**. Des anticorps reconnaissant la protéine sont fixés à des billes (phase stationnaire).



Dépôt de l'extrait cellulaire sur la colonne (*phase d'accrochage sur les anticorps*)

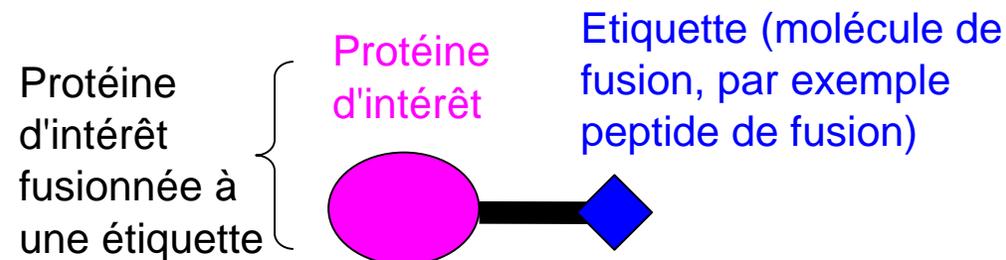
Après lavages (*élimination des molécules interagissant de façon peu spécifique*), les protéines d'intérêt peuvent être éluées (par exemple avec un *peptide compétiteur*).

2) Purification des protéines

b) Chromatographie d'affinité

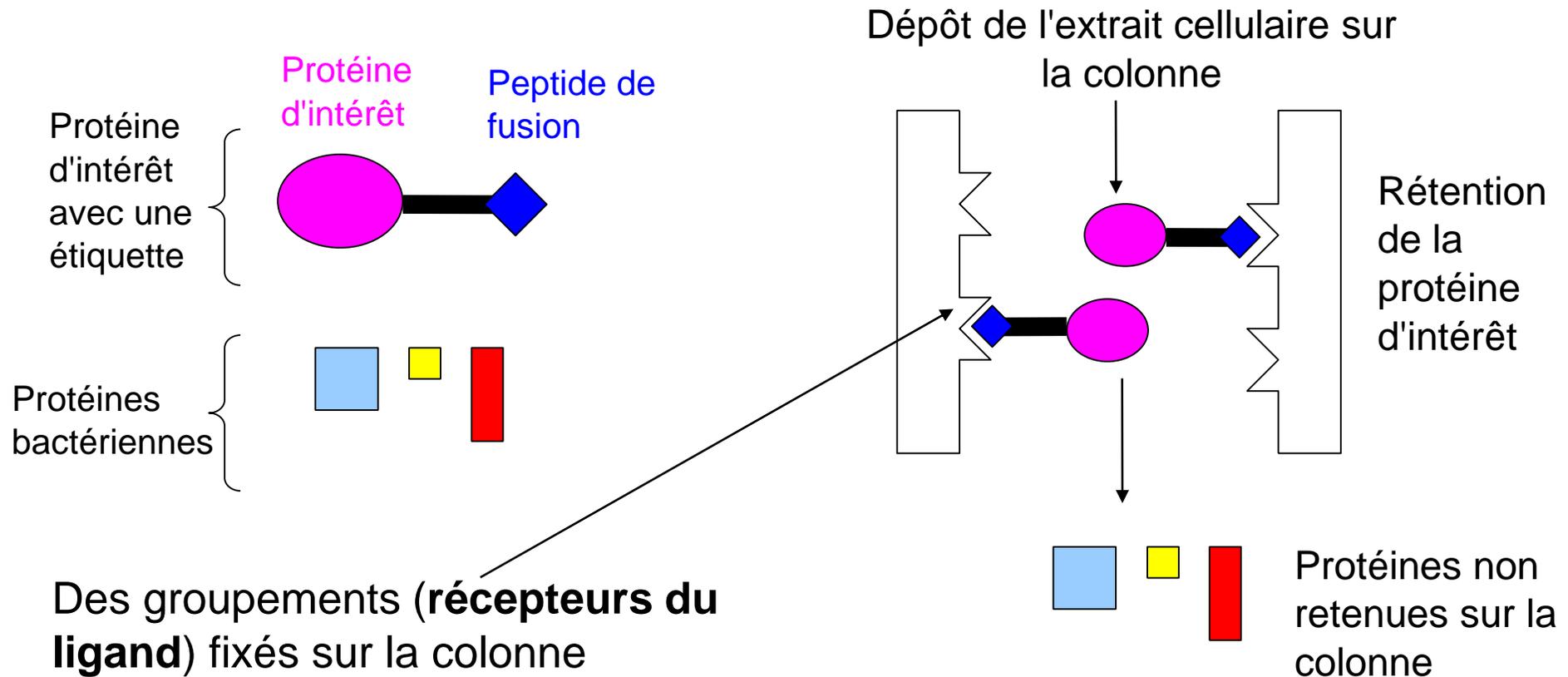
L'immunopurification permet de purifier une protéine spécifique, mais il faut disposer d'un anticorps suffisamment efficace et spécifique. De plus, on n'a pas toujours de systèmes d'élution efficaces.

On utilise aussi d'autres systèmes de chromatographie d'affinité reposant sur des interactions ligand/récepteur du ligand et l'utilisation d'une protéine recombinante fusionnée à une étiquette.



2) Purification des protéines

b) Chromatographie d'affinité



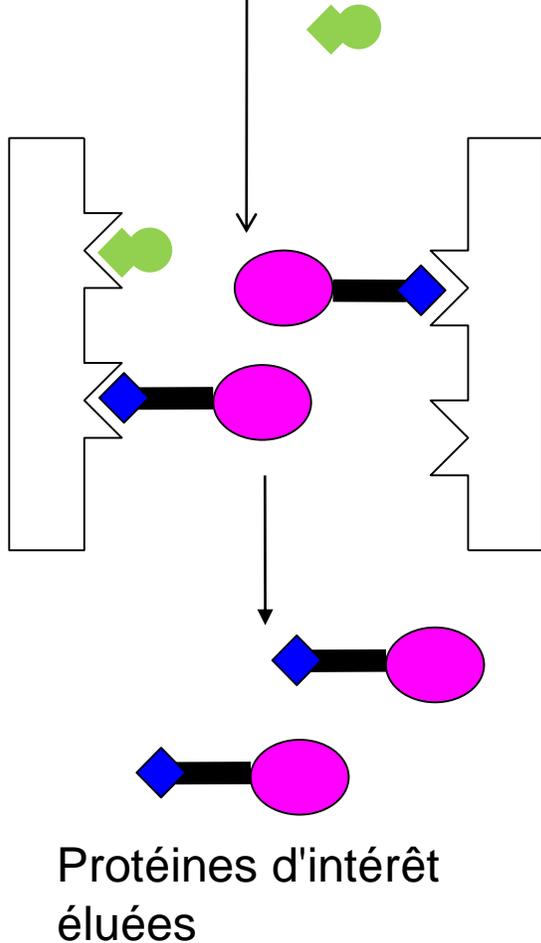
Des groupements (**récepteurs du ligand**) fixés sur la colonne interagissent avec le peptide de fusion. Toutes les autres protéines, non retenues sur la colonne sont éliminées.

Lavages pour éliminer les éventuels contaminants

2) Purification des protéines

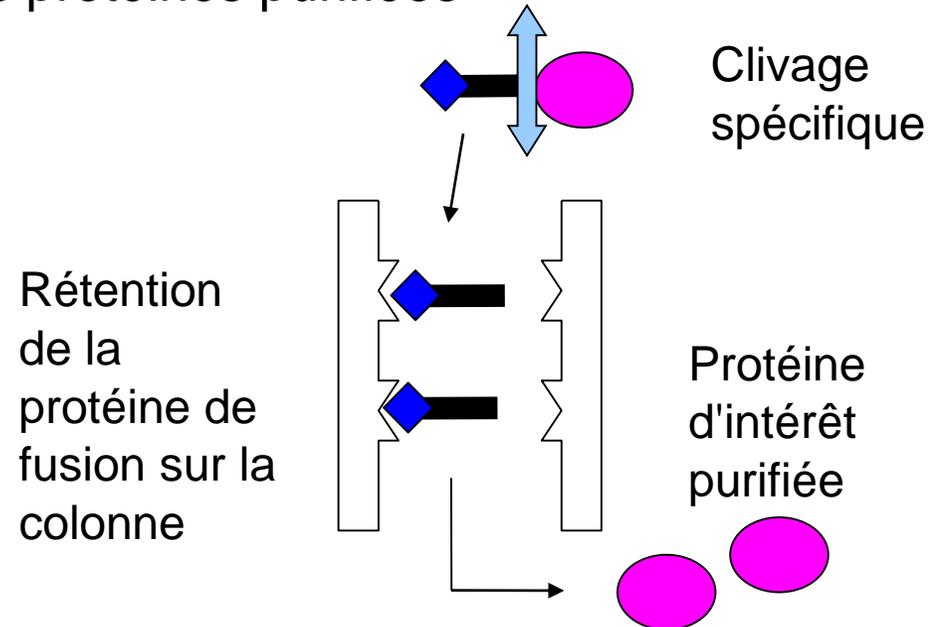
b) Chromatographie d'affinité

Ajout d'un agent permettant l'élution (un compétiteur)



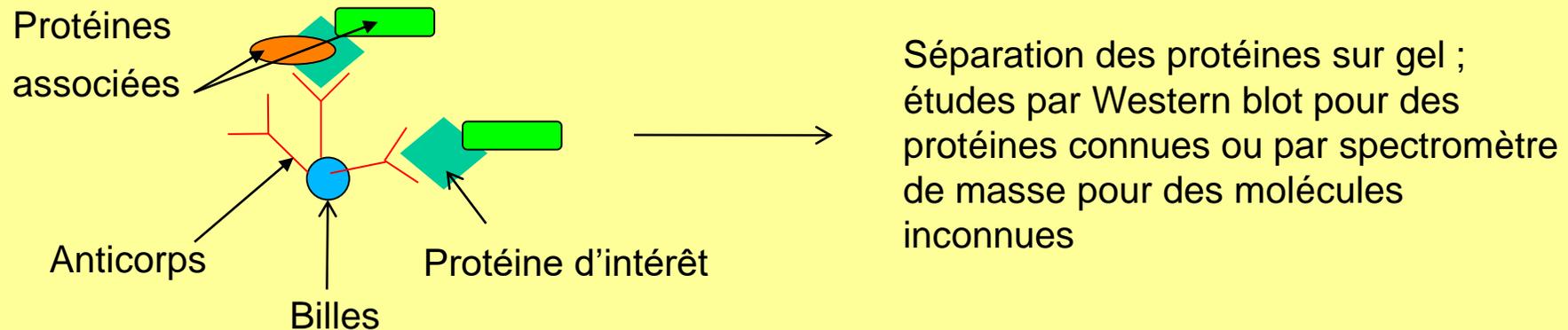
Après élution on obtient les protéines d'intérêt fusionnées.

Un clivage peut être effectué entre la protéine d'intérêt et le peptide de fusion. Un nouveau passage sur colonne d'affinité permet de retenir les peptides de fusion et de récupérer les protéines purifiées



Conclusion : Utilisation des protéines recombinantes :

- Avec de grandes quantités de protéine purifiée, possibilité d'analyser la structure 3D par **diffraction des rayons X** ; possibilité d'analyser les **modifications post-traductionnelles** de la protéine au spectromètre de masse
- Possibilité de **co-purifier des protéines associées** à la protéine étudiée si les lavages ne sont pas trop stringents



La protéine est digérée pour obtenir un ensemble de peptides. Dans le **spectromètre de masse**, les peptides sont fragmentés, et la masse des fragments obtenus est mesurée. L'ensemble des masses des différents fragments est caractéristique d'une molécule donnée. Cette technique permet d'identifier des molécules, mais aussi de détecter des modifications sur une protéine connue

II) Utilisation de l'ADN recombinant

Différents types cellulaires sont caractérisés par l'expression de protéines différentes.

L'expression différente des gènes (codant notamment pour des protéines homéotiques) dans un embryon joue un rôle clé dans la mise en place du plan d'organisation de l'organisme.

Suivant les conditions, les besoins en différentes protéines changent (exemple du stress).

Comment étudier l'expression des gènes, à la fois d'un point de vue quantitatif et qualitatif, et d'un point de vue spatial et temporel ?

3) Etude de l'expression des gènes

3) Etude de l'expression des gènes

a) Quantification des protéines dans un extrait cellulaire

- Par Western blot : pas de quantification absolue. On peut obtenir des données comparatives qualitatives entre différentes conditions. Un gène de ménage est souvent utilisé comme référence.
- Par dosage : méthodes spectroscopiques, immunologiques, enzymatiques
- Indirectement par Northern blot : information sur la quantité d'ARN messenger correspondant à la protéine (Rq : une augmentation des ARNm peut provenir d'une augmentation de la transcription ou d'une augmentation de la stabilité des ARNm). Le Northern blot fournit des informations plus quantitatives qu'un Western blot (moins de problème de saturation du signal)