

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE Batna 2
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT D'Ecologie et environnement

POLYCOPIE DE COURS 1

Chapitre 1 : ADN recombinant

MODULE

BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
MASTER I (EDP)

Présenté par

Mr. Ghedadba Nabil

Polycopie de cours (1) de Biologie moléculaire

Intitulé du Master : Ecophysiologie et développement des plantes

Semestre : 02

Intitulé de l'UE : UED1.

Intitulé de la matière : Biologie moléculaire

Crédits : 2

Coefficients : 2

Objectifs de l'enseignement : Initiation théorique et pratique aux techniques de la biologie moléculaire.

Connaissances préalables recommandées : Biologie moléculaire.

Contenu de la matière :

- i. Définition
 1. DNA recombinant, clonage,
 2. Expression,
 3. Banques Génomique
- ii. Les outils de la biologie moléculaire
 1. Enzymes de restriction
 2. Les ligases
 3. Phosphatases
 4. Kinases
 5. Les vecteurs de clonage
 - 5.1. Les plasmides
 - 5.2. Les phages
 - 5.3. Phagemides
 - 5.4. Les cosmides
 - 5.5. Autres vecteurs de clonage
 6. les cellules hôtes
 7. Les sondes nucléotidiques
- iii. Techniques de biologie moléculaire
 1. criblage de banques
 2. cDNA
 3. Purification des AN , analyse quantitative séquençage
 4. Technique de Southern blot et Northern blot
 5. PCR
 6. Applications : recherche d'un gène, transfert de gène

Mode d'évaluation : 50% Contrôle continu + 50% examen final

1- Quelques définitions

1-1- L'ADN recombinant (ou recombiné)

L'**ADN recombinant** (ADNr) désigne de façon générale, ce qui est obtenu par génie génétique. C'est un fragment de matériel génétique d'un organisme qui est introduit artificiellement dans l'ADN d'un autre organisme, généralement une **bactérie** ou un **virus** dans lequel il va s'intégrer.

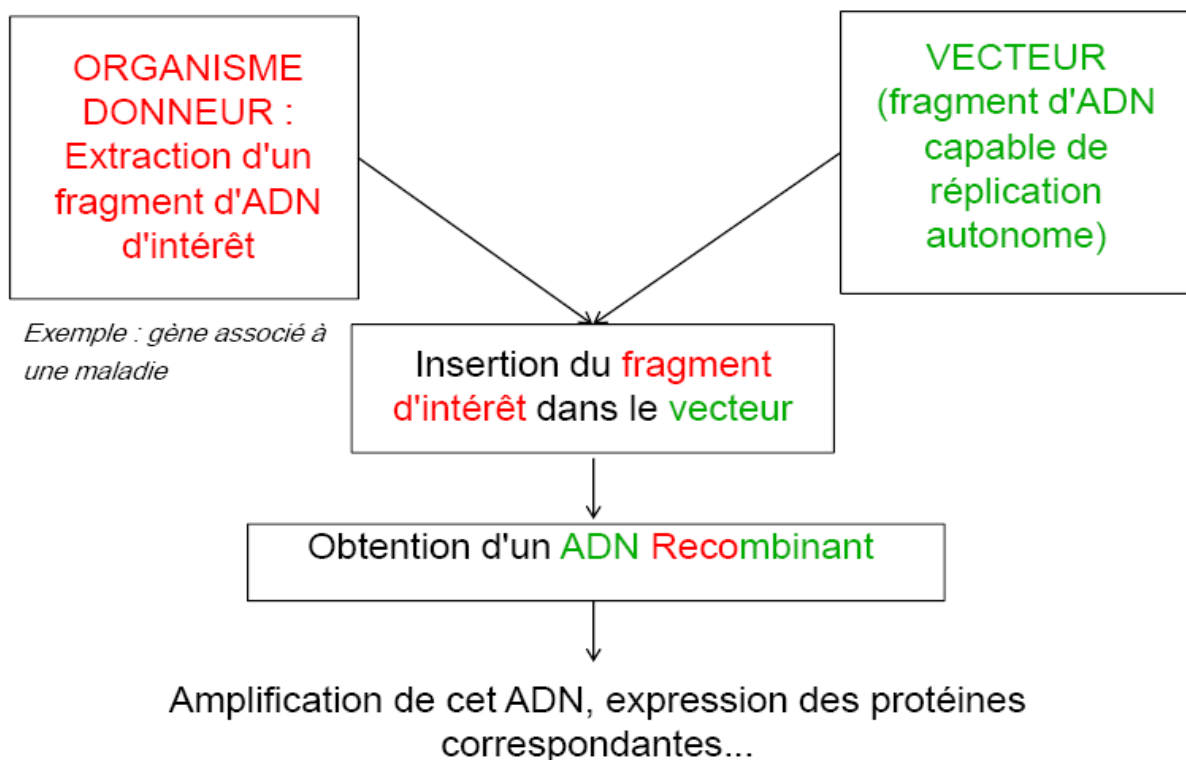
On appelle « ADN recombinant » un ADN hybride obtenu *in vitro* par combinaison de deux molécules d'ADN appartenant à deux espèces différentes. Par exemple un fragment d'ADN humain à étudier, dit ADN d'intérêt, est greffé sur un ADN viral.

L'ADN inséré est appelé « insert » ou « ADN exogène » ou « ADN étranger ».

L'ADN recombinant est préparé dans le but d'effectuer « un clonage », ce clonage peut être ou non accompagné d'une expression de protéines.

ADNr = Vecteur + insert (ADN d'intérêt)

Principe



1-2- Clonage de l'ADN recombinant

Un « clone » est, par définition, un grand nombre de cellules, ou de molécules identiques, provenant d'un seul ancêtre, que cet ancêtre soit une cellule ou une molécule.

L'ADN recombinant a le grand avantage de pouvoir se répliquer dans une bactérie comme l'aurait fait le bactériophage. C'est donc un moyen commode de produire une amplification du fragment d'ADN à étudier.

Une amplification d'ADN peut aussi être obtenue par voie enzymatique *in vitro*, avec la technique de **polymerase chain reaction** ou **PCR**.

Principe:

Le clonage consiste à:

- 1) insérer un fragment d'ADN étranger à cloner (insert) dans un vecteur de manière à obtenir un vecteur recombinant.
- 2) introduire le vecteur recombinant dans une cellule hôte.
- 3) amplifier le vecteur recombinant par division de la cellule hôte, afin d'obtenir un clone recombinant.

ex: si le vecteur est un plasmide:

- 1) création du plasmide recombinant.
- 2) faire pénétrer le plasmide recombinant dans une cellule d'E. coli (CaCl₂ ou Electroporèse).
- 3) division d'E. coli => clone recombinant.

1-3- Expression d'ADN recombinant

L'expression de la séquence d'ADN insert nécessite la présence de signaux de transcription en amont de cette séquence placés donc en général dans le vecteur. Ces signaux peuvent être spécifiques des machineries transcriptionnelles de bactéries, levures ou encore de cellules de mammifères, selon la cellule hôte choisie pour cette expression.

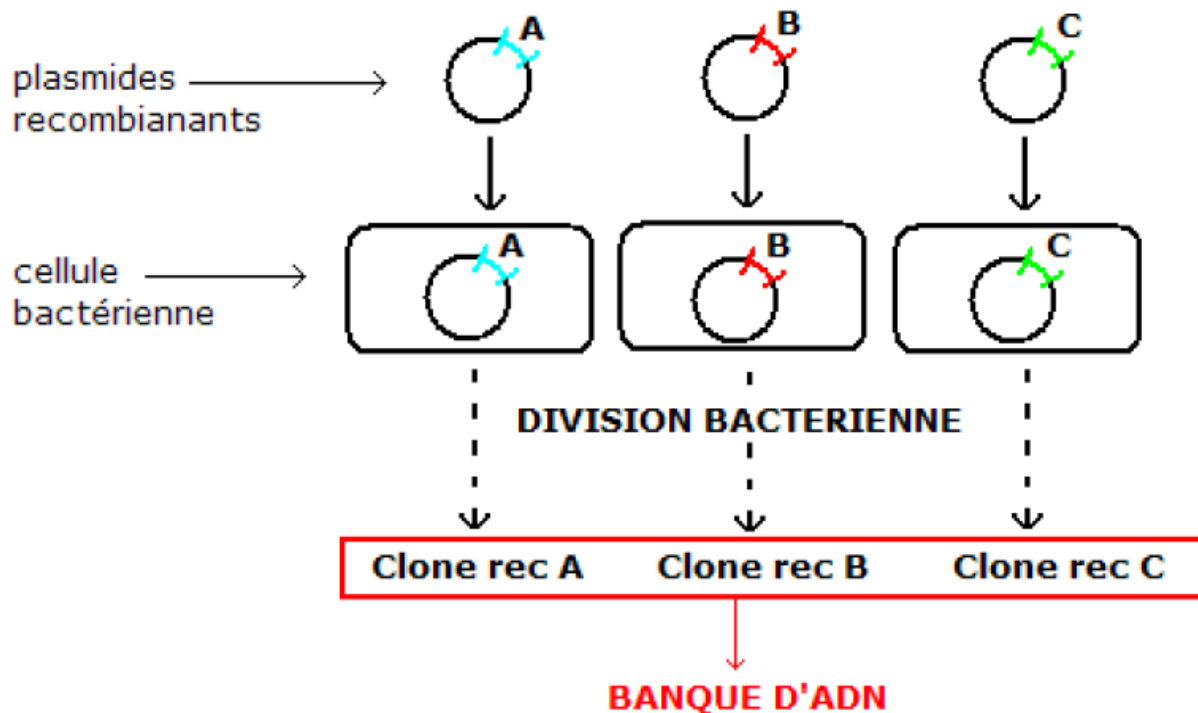
1-4- Notion de banque d'ADN

Une banque d'ADN (ou bibliothèque) est une collection de clones recombinants renfermant chacun un ADN étranger (insert) particulier.

✓ Banques d'ADNc

L'ADNc est une copie d'ADN double brin d'un ARNm, et ne possède donc pas d'introns. Une banque d'ADNc est une collection d'ADNc recombinants. Ainsi si on s'intéresse à une protéine X exprimée dans un tissu donné, on purifiera l'ARNm de ce tissu, et on fabriquera les ADNc correspondant à ces ARNm que l'on clonera dans un vecteur. Cette banque d'ADNc constituée représentera des séquences codant

pour les protéines de ce tissu. Cette information génétique se limitera donc aux gènes exprimés dans le tissu et aux séquences codant les protéines (pas d'introns).



✓ Banques génomiques

Une banque génomique s'oppose à une banque d'ADNc par le fait qu'elle représente la totalité du génome. Une telle banque est en effet obtenue par fragmentation d'ADN génomique.

Elle est constituée de toute une collection d'ADN recombinants correspondant aussi bien à des séquences codantes qu'à des séquences non codantes.

Chaque partie du génome y est théoriquement représentée au moins une fois. Pour connaître la structure d'un gène, il faut utiliser une banque génomique et non une banque d'ADNc. Il en est de même lorsqu'on s'intéresse à des régions d'ADN non transcrites.

D'autre part, quand on ne sait pas dans quelle cellule est synthétisée la protéine étudiée, un moyen infallible de trouver son gène est d'utiliser une banque génomique. Mais, il est plus difficile de travailler avec une banque génomique dont la taille est bien plus élevée que celle d'une banque d'ADNc. Elle contient en effet environ cent fois plus d'information de séquences d'ADN qu'une banque d'ADNc.