

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 (2)

MODULE

BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
MASTER I (EDP)

Présenté par

Mr. Ghedadba Nabil

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

2- Les principaux outils de la biologie moléculaire

2-1- Les vecteurs de clonage

On appelle « vecteur » l'ADN dans lequel on insère l'ADN à étudier et qui sert en fait de support.

Les vecteurs sont des petites molécules d'ADN dans lesquels on insère le fragment d'ADN à étudier. Ces petits ADN sont généralement des virus bactériens (bactériophages) ou des plasmides. Ils possèdent dans leur génome les signaux nécessaires pour leur réplication, mais ils ne savent pas se multiplier seuls. Ils doivent être introduits dans des cellules hôtes (bactéries par exemple).

2-1-1- Plasmides

Les plasmides sont des petits éléments génétiques extra-chromosomiques doués de la réplication autonome, ce sont typiquement des molécules d'ADN double brin, circulaires, leur taille varie de 1 kb à deux ou trois centaines de kb (< 5% de la taille du chromosome bactérien). 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

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. Les marqueurs de sélection (Ex. gènes de résistance aux antibiotiques) permettent l'identification des bactéries recombinantes (transformées) qu'ils les portent.

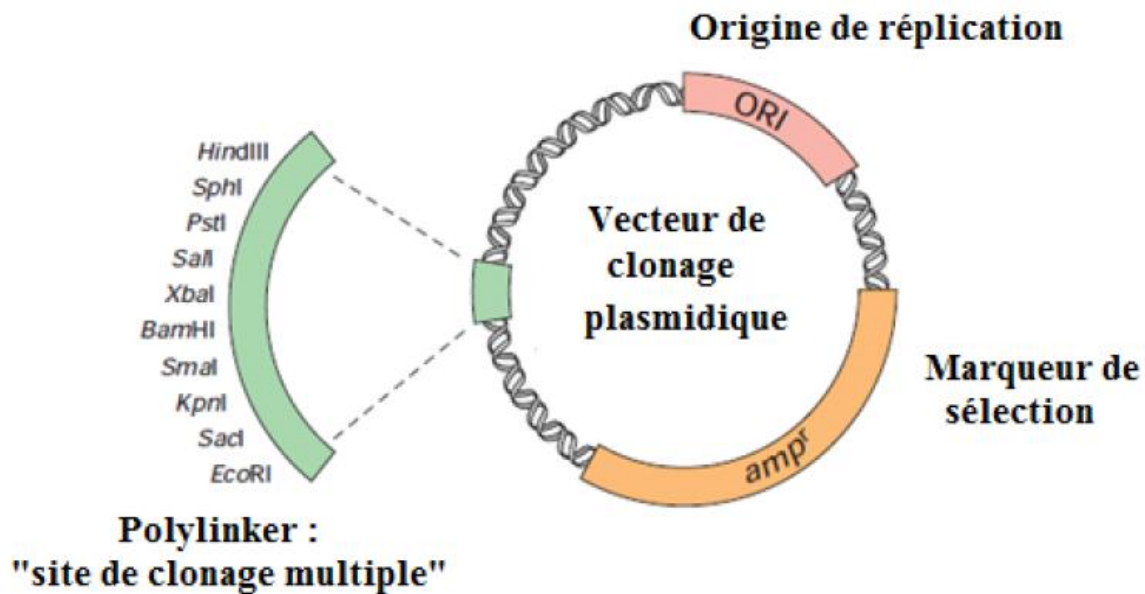


Figure 1. Composants basiques d'un vecteur plasmidique qui peut se répliquer chez *E. coli*

(Lodish *et al.*,2003).

➤ **Plasmide pBR322**

Le pBR322 appartient à une série de vecteurs de clonage de première génération, partiellement construit par génie génétique.

✓ **Caractéristiques du plasmide pBR322**

a- pBR322 est un petit plasmide constitué de 4361 paires de bases, dont la séquence nucléotidique est complètement connue.

b- 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.

c- Il possède deux gènes de résistances aux antibiotiques : l'un pour l'ampicilline (Amp^R), l'autre pour la tétracycline (Tc^R), l'expression de l'un de ces deux gènes facilite la sélection des clones recombinants.

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

e- Il est facilement transférable par transformation ou par électroporation.

➤ **Plasmide PUC 19 (plasmid of University of California)**

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.

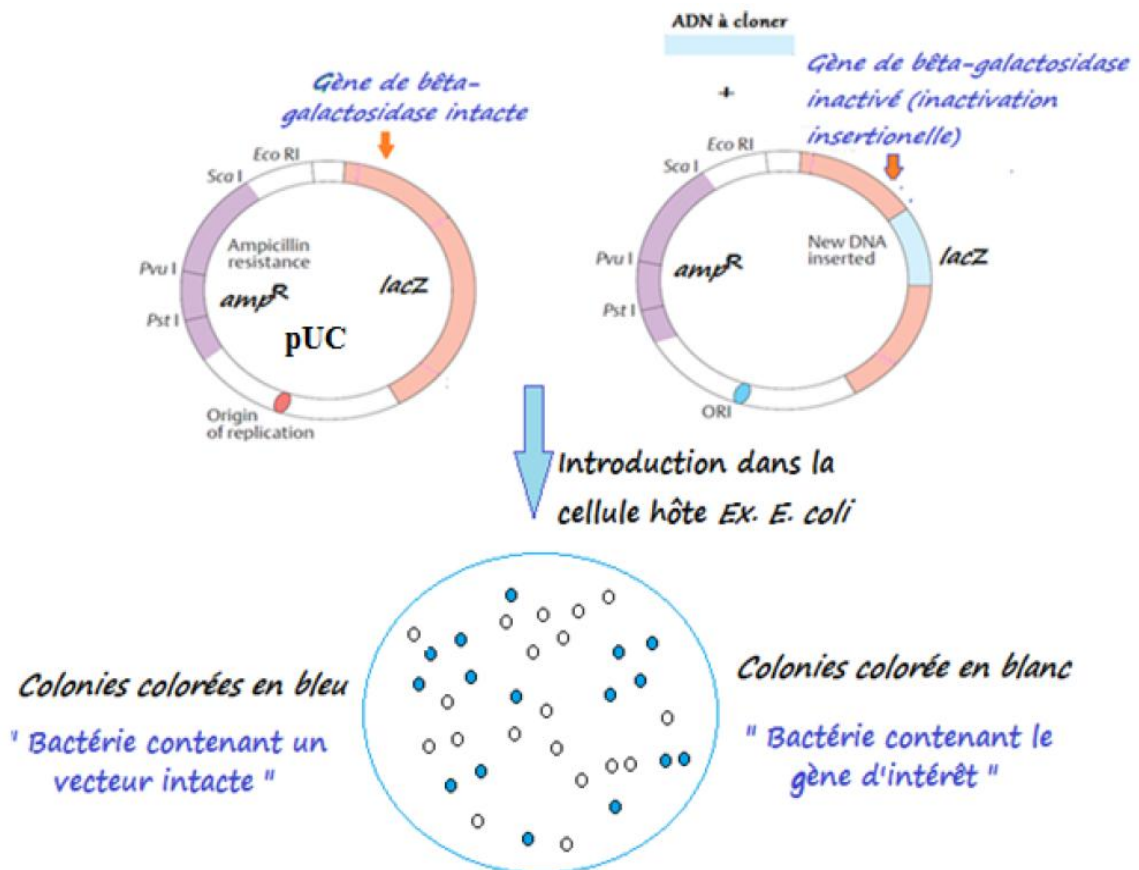


Figure 2. Insertion d'un fragment d'ADN (< 10 kb) dans un vecteur (type pUC). L'inactivation insertionnelle du gène *lacZ* permet de révéler facilement les colonies contenant le gène d'intérêt (sélection positive: colonies blanche). Le milieu de sélection est supplémenté par l'ampicilline.

➤ 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.

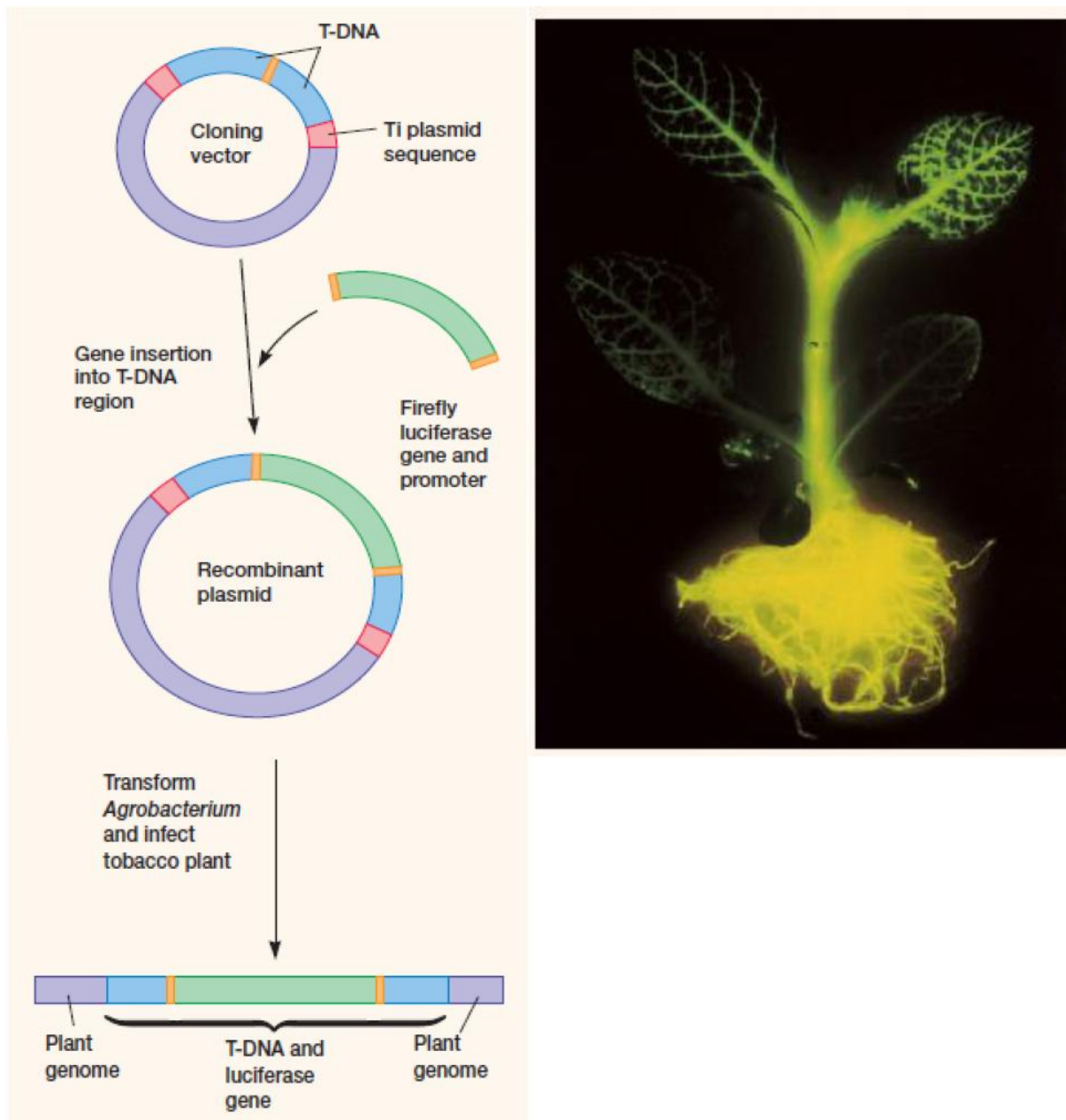


Figure 3. L'utilisation du vecteur Ti pour transformer la plante *Nicotiana tabacum* par le gène d'une luciférase. Le gène est introduit dans la région de l'ADN-T. Cette transformation rend les bactéries bioluminescentes (Prescott, 2002).

2-1-2- Les bactériophages

Deux phages ont été très utilisés comme vecteurs dans les premiers temps de la biologie moléculaire. Ce sont les phages λ (lambda) et le phage M13, ou plus exactement des dérivés de ces deux phages qui doivent en effet subir divers types de modifications pour pouvoir être utilisés comme vecteurs de clonage.

➤ **Le phage λ (lambda)**

Plusieurs vecteurs sont dérivés du phage λ et peuvent être utilisés dans des constructions génétiques, essentiellement pour la constitution de banques d'ADNc ou génomiques.

On distingue deux parties dans le phage λ :

-la tête du phage qui renferme l'ADN ;

-la queue du phage qui permettra au virus de se fixer sur la cellule hôte bactérienne

Le phage λ est un phage à ADN double brin, linéaire, d'une longueur de 48,5 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* (figure 4) [*cos*: Des éléments important pour la réplication et l'encapsidation de bactériophage λ].

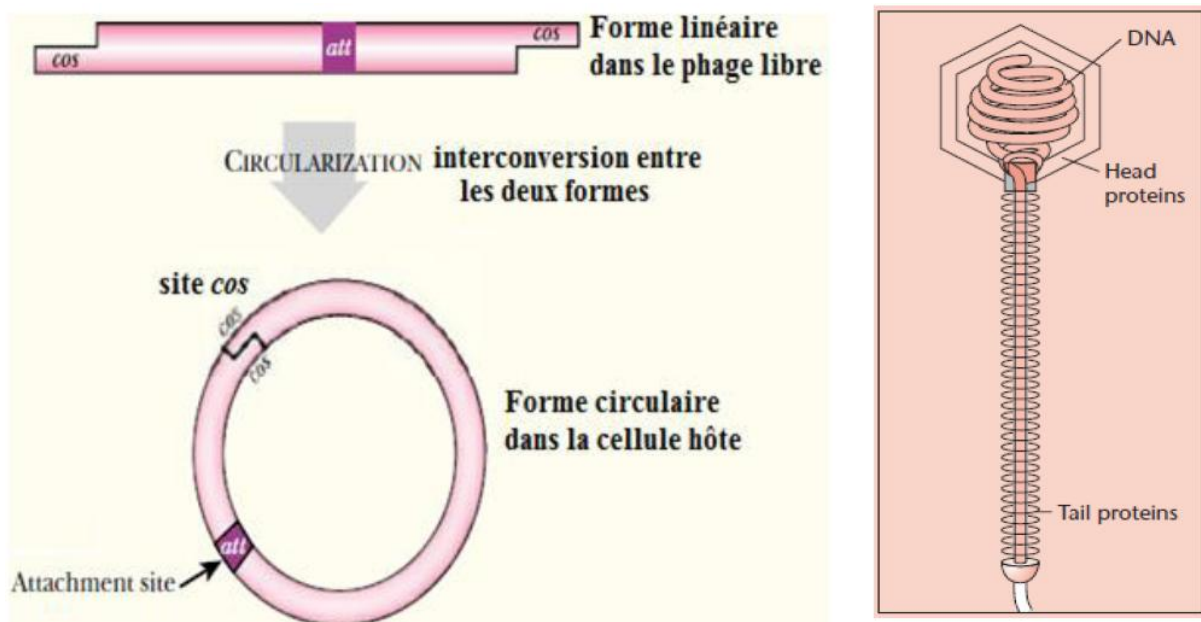


Figure 4. Différentes formes du génome du bactériophage λ , et sa structure (Primose *et al.*,2002).

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 (figure 5).
- 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.

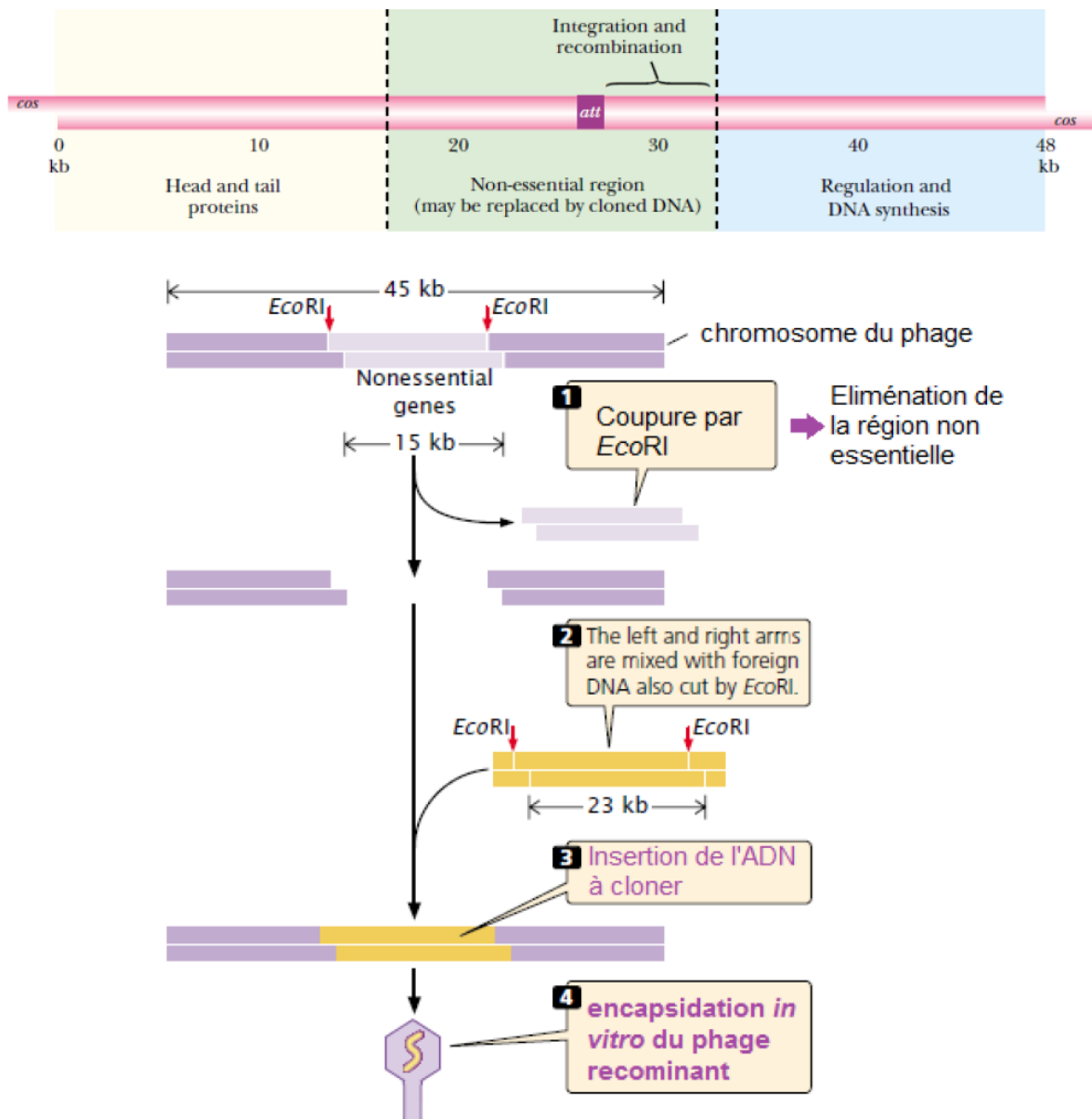


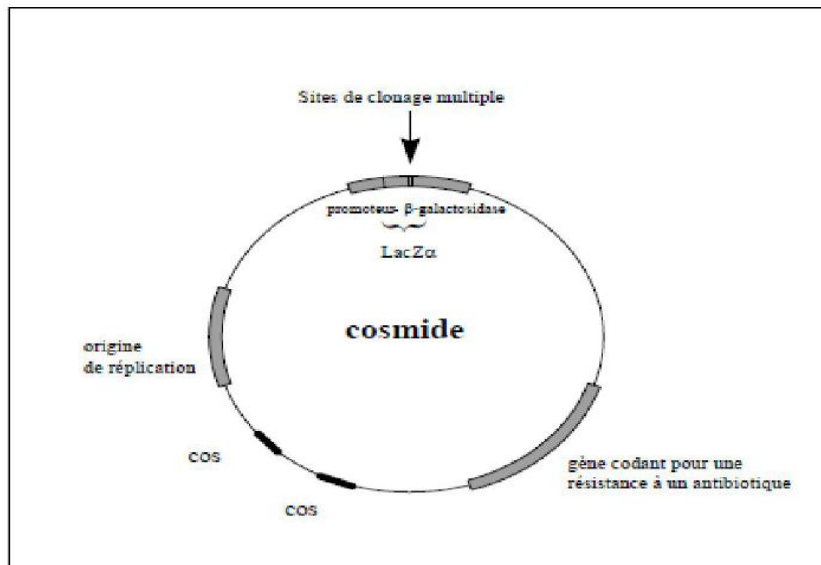
Figure 5: L'élimination de la partie indispensable (non essentielle) au cycle de vie du bactériophage λ augmente la capacité d'insertion de grand fragment (22kb) (Passarge, 2007).

2-1-3- Les cosmides

Les cosmides sont des vecteurs artificiels hybrides : plasmide-phage λ . L'avantage des cosmides est qu'il est possible de cloner de plus grands fragments d'ADN étranger (35 à 45 Kb) qu'avec les vecteurs dérivés du phage λ (23 Kb maximum). Ils servent à fabriquer des banques génomiques et sont utilisés plus spécialement lorsque le gène étudié s'étend par exemple sur une longueur de 30 à 40 Kb.

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.



2-1-4- Phagemides ou phasmides

Sont des vecteurs qui combinent des éléments d'origine plasmidiques et phagiques. Le phagmide le plus utilisé est **pBluescriptII 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 répllication dérivée de M13 (phage filamenteux). Un *ori ColEI* pour permettre la répllication du phage comme un plasmide. Ils sont utilisés pour cloner de grand fragment d'ADN et la manipulation des gènes.

2-1-5- Autres types de vecteurs

➤ Les banques YAC et BAC (*yeast or bacterial artificial chromosome*)

Il est maintenant possible de cloner de grands fragments d'ADN, longs de 200 à 500 Kb, voire plus, sous forme de chromosomes artificiels, dans la levure ou dans la bactérie.

Le principe de cette technique consiste à doter les grands fragments d'ADN à cloner des éléments nécessaires pour que la levure ou la bactérie les réplique comme s'il s'agissait de ses propres chromosomes.

Les YACs (Yeast Artificial Chromosomes) doivent avoir :

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

2-3- Les cellules-hôtes

La cellule-hôte destinée à recevoir le vecteur, phage ou plasmide (ou cosmide), doit répondre à certaines conditions :

➤ **Choix de la souche**

Une des premières conditions est que la souche d'E coli choisie ne soit pas pathogène pour l'homme. C'est le cas par exemple des souches E coli. K12. Ces souches ont la particularité de ne pas coloniser l'appareil digestif humain. Mais elles synthétisent l'enzyme de restriction EcoK (enzyme de type I qui reconnaît le site : AAC et GTGC). Il faut utiliser des souches dérivées ne synthétisant pas l'enzyme de restriction EcoK (ou qui modifient les sites EcoK) sinon tout ADN à étudier possédant un site EcoK serait clivé.

➤ **Croissance en milieu liquide**

Après une phase initiale de latence, la croissance d'E coli est exponentielle, le nombre de bactérie double toutes les 20 minutes. Lorsque le substrat et l'oxygène ne sont plus en conditions optimales, la croissance ralentit. Puis la culture entre en phase stationnaire, les bactéries meurent aussi vite qu'elles se divisent. Finalement c'est la mort cellulaire.

❖ **Distinction entre infection, transformation et transfection**

- **Infection**

Dans l'infection, la bactérie est mise en contact avec le virus.

L'infection par le phage λ en phase lytique se traduit par l'apparition de plages de lyse. L'infection par le phage M13 (ou par le virus λ en phase lysogénique) aboutira à des colonies bactériennes contenant ces virus.

- **Transformation**

La transformation consiste à mettre en contact un ADN double brin (plasmide) et les bactéries prétraitées (on dit compétentes). Dans ces conditions, l'ADN pénétrera dans les bactéries et pourra s'y répliquer.

- **Transfection**

La transfection, enfin, concerne essentiellement les cellules de mammifères et se rapproche de la transformation des bactéries. Elle consiste à faire entrer dans les cellules un ADN double brin, soit en fragilisant la membrane plasmique (électroporation, agents chimiques), soit en incluant l'ADN dans des gouttelettes lipidiques (liposomes) qui seront internalisées par les cellules (lipofection), soit encore en formant avec l'ADN un précipité de phosphate de calcium qui entrera dans les cellules.