**PARTIE 2 : génie génétique**

**Chapitre 2 : Les étapes du clonage :**

**2.1.Les étapes du clonage moléculaire**

Le clonage moléculaire est un processus qui permet d'isoler un gène d'intérêt, de l'insérer dans un vecteur (comme un plasmide), et de l'introduire dans une cellule hôte pour l'expression ou l'amplification :

**1. Isolement de l'ADN cible**

* **But :** Obtenir le gène ou la séquence d'ADN d'intérêt.
* **Méthodes possibles :**
  + **PCR :** Amplification spécifique du gène cible à partir de l'ADN génomique ou complémentaire (ADNc).
  + **Enzymes de restriction :** Découpage de fragments spécifiques à partir d'un génome.

**2. Préparation du vecteur**

* **But :** Préparer un support pour transporter et exprimer le gène cible dans une cellule hôte.
* **Vecteurs couramment utilisés :**
  + Plasmides (vecteurs circulaires pour *E. coli*).
  + Vecteurs viraux ou cosmides pour des insertions plus grandes.
* **Traitement :**
  + Coupure du vecteur à un site spécifique avec des enzymes de restriction.
  + Désactivation des extrémités libres (par exemple, par phosphatase alcaline) pour éviter la recircularisation.

**3. Insertion du gène cible dans le vecteur**

* **But :** Fusionner l'ADN cible et le vecteur pour former un ADN recombinant.
* **Méthodes :**
  + **Enzymes de restriction et ligation :**
    - L'ADN cible et le vecteur sont digérés par les mêmes enzymes de restriction pour créer des extrémités compatibles.
    - L'enzyme ADN ligase relie les fragments par une liaison phosphodiester.

**4. Transformation dans une cellule hôte**

* **But :** Introduire l'ADN recombinant dans une cellule vivante pour sa réplication et son expression.
* **Méthodes courantes :**
  + Transformation par choc thermique (*E. coli*).
  + Transformation par électroporation.

**5. Sélection des cellules transformées**

* **But :** Identifier les cellules ayant intégré le vecteur recombinant.
* **Moyens de sélection :**
  + **Marqueurs de résistance aux antibiotiques :** Les vecteurs contiennent souvent un gène de résistance (ex. résistance à l'ampicilline). Les cellules transformées survivent sur des milieux contenant cet antibiotique.
  + **Rapports de couleur :**
    - Système lacZ : Les colonies blanches (non bleues) indiquent une insertion réussie dans le vecteur.

**6. Analyse des clones**

* **But :** Vérifier que le gène d'intérêt a bien été inséré dans le vecteur et qu'il est fonctionnel.
* **Méthodes d’analyse :**
  + **PCR de vérification :** Amplification de la région clonée pour confirmer sa présence.
  + **Séquençage de l’ADN :** Vérification de la séquence pour éviter les mutations indésirables.
  + **Digestion enzymatique :** Coupure contrôlée pour observer les fragments sur gel d’électrophorèse.

**7. Expression et purification (si nécessaire)**

* **But :** Produire et purifier la protéine recombinante à partir des clones sélectionnés.
* **Étapes :**
  + Induction de l'expression du gène (par IPTG, galactose, etc.).
  + Culture des cellules hôtes en conditions optimales.
  + Extraction et purification de la protéine (lyse cellulaire, Chromatographie).

### 3.1. La transformation bactérienne et la production de protéines recombinantes

#### Introduction

La transformation bactérienne est une méthode clé en biotechnologie qui permet l'introduction d'ADN étranger dans une cellule bactérienne pour exprimer des protéines recombinantes. Les protéines recombinantes, produites en grande quantité grâce à des micro-organismes comme Escherichia coli et Saccharomyces cerevisiae, sont largement utilisées dans les industries pharmaceutiques, alimentaires, et de recherche.

#### ****I. Transformation bactérienne****

##### 1. Définition

La transformation bactérienne est l'introduction d'un plasmide ou d'un fragment d'ADN dans une cellule bactérienne, permettant l'expression d'un gène d'intérêt.

##### 2. Méthodes principales

**a) Par choc thermique**

* **Principe :**
  + Les cellules compétentes (préparées par traitement au chlorure de calcium) sont mélangées avec le plasmide d'intérêt.
  + L'exposition rapide à une température élevée (42 °C) favorise l'ouverture transitoire des pores membranaires, permettant l'entrée de l'ADN.
* **Étapes :**
  + Préparation des cellules compétentes.
  + Mélange des cellules et de l'ADN.
  + Incubation à 0 °C, puis choc thermique à 42 °C.
  + Retour à 0 °C et culture sur milieu sélectif.

**b) Par électroporation**

* **Principe :**
  + Une impulsion électrique crée des pores dans la membrane bactérienne, facilitant l'entrée de l'ADN.
* **Étapes :**
  + Préparation des cellules électrocompétentes (lavage pour éliminer les sels).
  + Mélange des cellules et de l'ADN dans une cuve à électroporation.
  + Application d'une impulsion (1.5-2.5 kV).
  + Incubation et culture sur milieu sélectif.
* **Avantages :** Plus efficace que le choc thermique pour les grands plasmides ou pour des organismes moins facilement transformables.

### Chapitre 3: Technologie de l’ADN recombinant

#### ****II. Fabrication de protéines recombinantes****

##### 1. Étapes générales

**a) Construction du plasmide recombinant**

* Identification et clonage du gène d'intérêt.
* Insertion dans un plasmide (Vecteur d’expression) contenant :
  + Un promoteur fort (ex. T7 pour E. coli).

**b) Transformation de l’hôte**

* Introduction du plasmide dans la cellule hôte (E. coli ou S. cerevisiae).

**c) Culture et expression**

* Croissance en milieu liquide avec des conditions optimales pour l’organisme hôte.
* Induction de l’expression (par exemple, IPTG pour E. coli).

**d) Purification de la protéine**

* Rupture des cellules (lyse).
* Techniques de purification (chromatographie d'affinité, filtration).

##### 2. Cas d'Escherichia coli

**Avantages :**

* Croissance rapide et coût réduit.
* Haute production de protéines.

**Inconvénients :**

* Manque de modifications post-traductionnelles (glycosylation).
* Risque de formation d’inclusions protéiques.

##### 3. Cas de Saccharomyces cerevisiae

**Avantages :**

* Eucaryote simple, capable de modifications post-traductionnelles.
* Excellente sécrétion des protéines recombinantes dans le milieu de culture.

**Inconvénients :**

* Croissance plus lente.
* Difficultés dans le clonage des grandes constructions.

#### ****III. Comparaison entre**** E. coli ****et**** S. cerevisiae

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Critères** | **Escherichia coli** | **Saccharomyces cerevisiae** |
| Type de cellules | Procaryote | Eucaryote |
| Modifications post-traductionnelles | Non | Oui |
| Temps de culture | Court (< 24 h) | Plus long (> 48 h) |
| Milieu de culture | Économique | Plus coûteux |
| Utilisation industrielle | Protéines simples | Protéines complexes |

#### ****IV. Applications des protéines recombinantes****

* Production d’insuline humaine (E. coli).
* Vaccins recombinants (hépatite B via S. cerevisiae).
* Enzymes industrielles et produits alimentaires.

### Cas de la production d’insuline recombinante

La production d’insuline humaine par la technologie de l’ADN recombinant est l’un des succès majeurs de la biotechnologie moderne. Elle repose sur l'utilisation de l’ADNc de l’insuline et de vecteurs d’expression dans des systèmes hôtes, comme Escherichia coli.

#### ****I. Étapes de production de l’insuline recombinante****

##### **1. Isolement de l’ADNc codant l’insuline**

* L’ADNc de l’insuline est obtenu à partir de l’ARNm extrait des cellules bêta pancréatiques.
* Étapes :
  + Extraction de l’ARN total.
  + Synthèse de l’ADNc par **rétrotranscription** avec une transcriptase inverse.
  + Amplification du gène de l’insuline par **PCR spécifique**.

##### **2. Conception du vecteur d’expression**

* **Vecteur utilisé :** Plasmide compatible avec E. coli.
* Composants clés du vecteur :
  + **Promoteur fort :** Comme le promoteur T7, pour une expression élevée.
  + **Site multiclonage (MCS) :** Pour insérer le gène d’intérêt.
  + **Gène de résistance :** Par exemple, résistance à l’ampicilline, pour la sélection.
  + **Tag de purification (facultatif) :** Pour faciliter l’isolement de la protéine.

**3. Transformation et expression**

* Le plasmide contenant l’ADNc est introduit dans E. coli par **choc thermique** ou **électroporation**.
* Les bactéries transformées sont cultivées en milieu sélectif contenant de l’ampicilline.
* L’expression est induite, par exemple, avec **IPTG**, pour activer le promoteur T7.

##### **5. Extraction et purification de l’insuline**

* Les bactéries sont récoltées par centrifugation et lysées pour libérer la protéine recombinante.
* La purification est réalisée par :
  + **Chromatographie d'affinité** (si un tag de purification est utilisé).
  + **Chromatographie échangeuse d’ions** pour séparer les contaminants.
* Les ponts disulfures sont formés pour obtenir une insuline active.

**IV. Autres systèmes hôtes potentiels**

* Saccharomyces cerevisiae ou cellules de mammifères (comme les cellules CHO) sont parfois utilisées pour des protéines nécessitant des modifications post-traductionnelles.
* Cependant, E. coli reste largement privilégié pour la production d’insuline en raison de sa simplicité et de son faible coût.

#### ****V. Applications et impact****

La production recombinante d’insuline a remplacé les méthodes traditionnelles d’extraction à partir de pancréas animaux, permettant :

* Une meilleure compatibilité avec l’organisme humain.
* Une production massive pour répondre aux besoins mondiaux des patients diabétiques.

Cette technique illustre l’efficacité des vecteurs d’expression et des technologies de l’ADN recombinant dans la biotechnologie moderne.