

## CONSTRUCTION DE BANQUES D'ADN

Le génie génétique est un ensemble de techniques de biologie moléculaire permettant d'isoler des gènes spécifiques, de les reconstruire puis de les réinsérer dans des cellules ou des organismes. Ces techniques ont fourni à la médecine et à l'industrie un moyen efficace de produire en grandes quantités des protéines spécifiques, qui, auparavant, n'étaient disponibles (si elles l'étaient) qu'en quantité extrêmement faibles. Ces techniques ont permis également d'étudier la régulation de leur expression et ainsi de mieux comprendre le développement de maladies génétiques. Les différentes étapes passent par : la construction d'une banque d'ADN, le criblage de la banque et l'expression du gène.

### **I. Construction d'une banque d'ADN : clonage du gène.**

On peut distinguer 2 méthodes permettent de construire une banque d'ADN. La première consiste à fragmenter la molécule d'ADN à l'aide d'enzymes de restriction, la seconde consiste à purifier de l'ARN messager qui seront ensuite transcrit en ADN complémentaire (ADNc) par une transcriptase inverse.

#### **I.1. Préparation d'une banque d'ADN à l'aide d'enzymes de restriction : banque d'ADN génomique.**

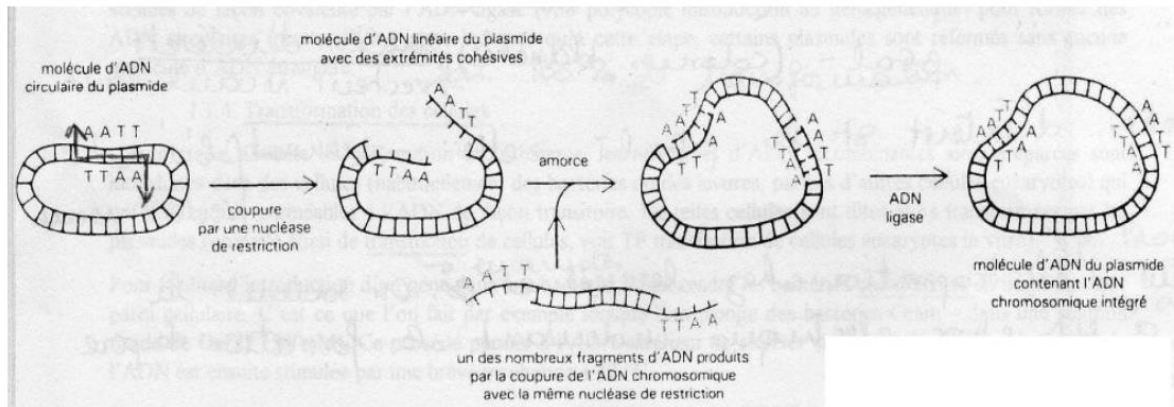
##### **1.1.1 .Préparation de l'ADN.**

Les enzymes de restriction sont des nucléases purifiées à partir de bactéries qui coupent l'ADN au niveau de séquences spécifiques de 4 à 8 nucléotides produisant des fragments d'ADN de tailles strictement définies, les fragments de restriction.

Les enzymes de restriction sont utilisées pour produire de petits fragments d'ADN renfermant un gène particulier.

Une autre propriété des enzymes de restriction, commode pour le clonage des gènes, est la capacité, pour beaucoup d'entre elles, de provoquer des coupures en « zig-zag » qui laissent de courtes extrémités monocaténares aux 2 extrémités du fragment d'ADN : les extrémités cohésives.

Ces extrémités peuvent former des paires de bases complémentaires avec n'importe quelle autre extrémité produite par la même enzyme. Ainsi, cela permet de relier 2 fragments d'ADN double hélice provenant de génome différents par appariement de bases complémentaires.



Les extrémités cohésives produites par de nombreux types de nucléases de restriction permettent de relier deux fragments d'ADN par des appariements de bases complémentaires. Les fragments d'ADN ainsi réunis peuvent être liés de façon covalente au cours d'une réaction très efficace catalysée par l'ADN ligase. Dans cet exemple, une molécule d'ADN recombinant de plasmide contenant une insertion d'ADN chromosomique est formée.

Par exemple, un fragment d'ADN contenant un gène humain peut être relié au chromosome d'un virus bactérien en tube à essai. La nouvelle molécule d'ADN recombinante peut ensuite être introduite dans une cellule bactérienne. Sachant que le mécanisme de réplication normal d'un virus peut engendrer plus de  $10^{12}$  molécules d'ADN viral identiques en moins d'un jour, l'ADN humain est ainsi considérablement amplifié. Le virus est appelé vecteur de clonage.

### I 1.2. Les vecteurs de clonage.

Un vecteur de clonage est une petite molécule d'ADN qui possède les propriétés suivantes : pouvoir se répliquer dans une bactérie fortement amplifiable posséder des sites de restriction permettant d'introduire le fragment d'ADN à cloner posséder 2 types de marqueurs : **marqueurs de transformation** qui permet de faire la distinction entre des bactéries transformées (ayant reçu le vecteur) et les autres **marqueurs de recombinaison** qui permet de faire la différence entre des bactéries ayant reçu le vecteur seul de celles ayant reçu le vecteur recombinant (c'est à dire avec l'ADN d'intérêt).

Il existe 3 types de vecteur de clonage : plasmidiques, viraux et cosmides (phage associés à des plasmides). Les-vecteurs plasmidiques de première génération sont dérivés du plasmide pBR322.

Actuellement, on utilise préférentiellement des vecteurs plasmidiques de seconde génération : le plasmide pUCIS et ses dérivés.

Parmi les vecteurs viraux, un des plus classiques est celui du bactériophage M13.

### **I 1.3. Insertion dans les vecteurs de clonage.**

Les principes fondamentaux des méthodes utilisées pour cloner des gènes sont les mêmes pour les différents types de vecteurs, bien que les détails techniques puissent être différents.

Pour simplifier, nous n'exposerons que les méthodes utilisées pour les vecteurs plasmidiques.

Quand on dispose de plasmide purifiés, les ADN circulaires de plasmides sont tout d'abord coupés par une nucléase de restriction afin de créer des molécules d'ADN linéaires.

Par ailleurs, l'ADN génomique utilisé pour constituer la banque est lui aussi coupé par la même nucléase et les fragments de restriction résultants sont alors ajoutés aux plasmides coupés et réassociés pour former des ADN circulaires recombinants. Ces molécules recombinantes contenant des insertions d'ADN étrangers sont ensuite scellées de façon covalente par l'ADN ligase pour former des ADN circulaires intacts.

Il faut alors indiquer qu'à cette étape, certains plasmides sont refermés sans aucune molécule d'ADN étrangère.

#### I. 1. 4. Transformation des cellules

Dans l'étape suivante de préparation de la banque, les molécules d'ADN recombinantes ainsi préparées sont introduites dans des cellules (habituellement des bactéries ou des levures, parfois d'autres cellules eucaryotes) qui ont été rendues perméables à l'ADN de façon transitoire. De telles cellules sont dites alors transformées par les plasmides (on parle aussi de transfection de cellules).

Pour faciliter l'introduction d'un gène dans une bactérie, il faut rendre les bactéries compétentes en fragilisant leur paroi cellulaire. C'est ce que l'on fait par exemple lorsque l'on plonge des bactéries Gram - dans une solution froide de  $\text{CaCl}_2$  (50 mM). Ce procédé permet à l'ADN extérieur de se fixer sur la paroi cellulaire. L'entrée de l'ADN est ensuite stimulée par une brève incubation à 42 °C.

Pour les cellules eucaryotes, on a recours à des molécules comme le DEAE-dextran ou le phosphate de calcium qui fragilise la membrane cellulaire et favorise la formation de pore par lesquels les vecteurs plasmidiques peuvent pénétrer .

Lorsque les cellules se divisent et se multiplient, les plasmides recombinants se répliquent également pour produire un très grand nombre de copies d'ADN renfermant l'ADN étranger.

#### I. 1.5. Sélections des cellules transformées

Les vecteurs utilisés portent des marqueurs de transformation. Dans le cas des plasmides, il s'agit de gènes de résistance aux antibiotiques. Ainsi, si des bactéries transformées avec ce

plasmide arrivent à cultiver sur un milieu contenant l'antibiotique, c'est que ces bactéries initialement sensible à l'antibiotique sont devenues résistantes. Seule l'intégration du plasmide porteur du gène de résistance peut expliquer l'apparition soudaine de cette résistance.

Ces bactéries contiennent la banque d'ADN.

Cependant, parmi ces bactéries transformées, certaines peuvent avoir reçues le plasmide sans ADN étranger, d'autres possèdent un plasmide recombinant et parmi ces dernières, seules une infime minorité peuvent posséder le plasmide recombinant qui contient le gène que l'on veut isoler. Il faut être capable d'identifier ces cellules afin de récupérer l'ADN intéressant

sous forme pure et en quantité suffisante.

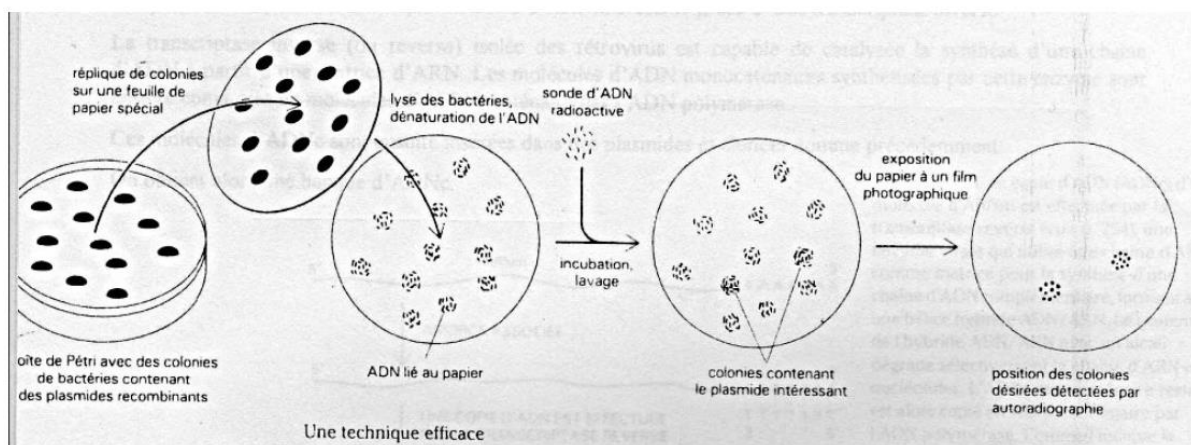
### I. 1.6. Sélection des clones intéressants dans une banque d'ADN

La sélection des rares colonies de la banque qui contiennent le fragment d'ADN intéressant est souvent la partie la plus délicate du clonage des gènes.

Une des techniques fréquemment utilisée est une forme d'hybridation in situ qui se sert de l'extrême spécificité des interactions d'appariement entre 2 molécules d'acide nucléique complémentaires.

Des boîtes de cultures contenant les colonies bactériennes en croissance sont transférées avec un morceau de papier filtre, auquel quelques bactéries de chaque colonie adhèrent. Ces bactéries sont ensuite traitées afin de faire éclater les cellules et de dénaturer l'ADN du plasmide puis hybridées avec une sonde radioactive contenant une partie de la séquence de l'ADN du gène d'intérêt.

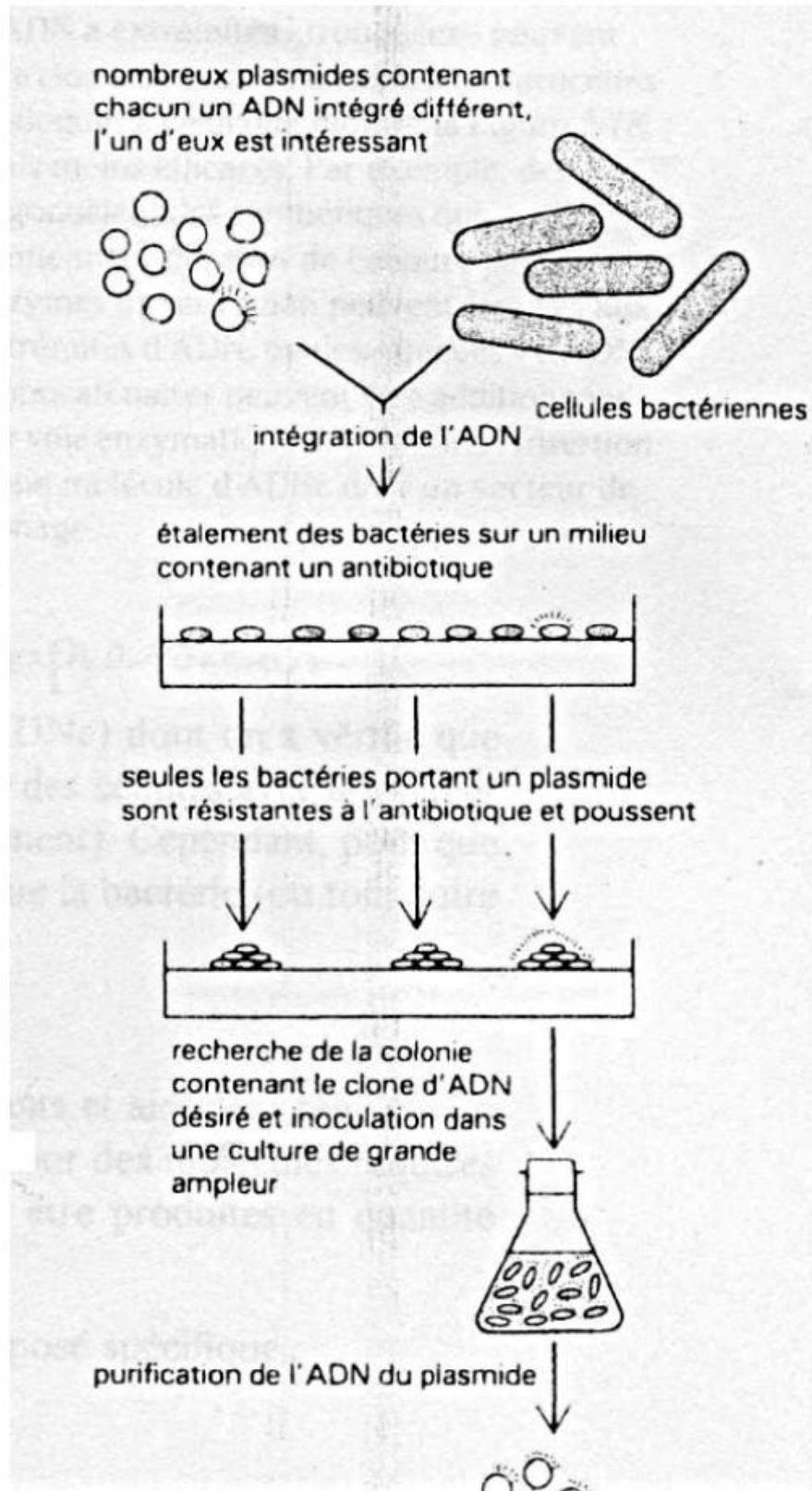
Les colonies bactériennes qui ont fixé la sonde sont identifiées par autoradiographie.



Une technique efficace couramment utilisée pour trouver une colonie bactérienne portant un clone d'ADN particulier. Chaque cellule portant un plasmide recombinant se développe en une colonie de cellules identiques, visible sous la forme d'un point blanc sur l'agar. Une

réplique de la culture est ensuite réalisée en appuyant un morceau de papier absorbant sur la surface. Cette réplique est traitée à l'alcali (afin de faire éclater les cellules adhérentes et de dénaturer l'ADN du plasmide) puis hybridée avec une sonde d'ADN très radioactive. Les colonies bactériennes qui ont fixé la sonde sont identifiées par autoradiographie.

Il est alors possible de reprendre la colonie bactérienne correspondante, de l'inoculer pour une culture de grande ampleur et de purifier les plasmide recombinant.



*Purification et amplification d'une séquence d'ADN spécifique par clonage de l'ADN dans une bactérie.*

Remarques : de nombreuses techniques peuvent être utilisées pour vérifier que le gène cloné dans un vecteur correspond à un gène d'intérêt : séquençage d'ADN, contrôle de taille par électrophorèse sur gel d'agarose, etc...

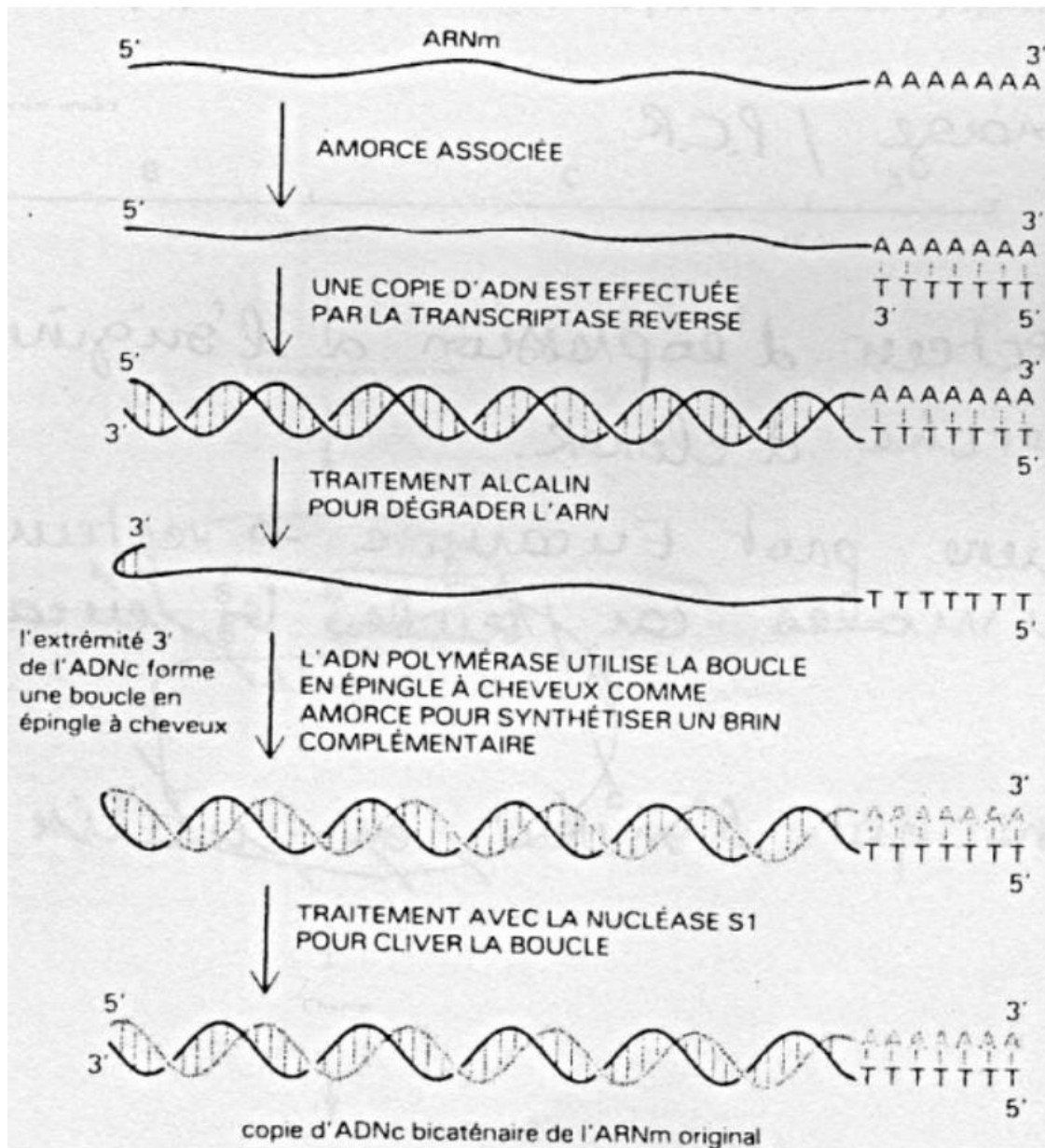
### **I.2. Préparation d'une banque d'ADN à partir d'ARNm : banque d'ADNc.**

Le clivage de la totalité du génome d'une cellule avec une nucléase de restriction spécifique pour le clonage d'un gène est parfois qualifié de pêche à la ligne. En effet, on obtient des millions de fragments d'ADN qui produisent des millions de colonies différentes de cellules transformées.

Une autre stratégie possible est de commencer le processus de clonage en sélectionnant les seules séquences d'ADN qui sont transcrites en ARN et qui sont donc supposées correspondre à des gènes : les ARN messagers.

Cette méthode consiste à extraire l'ARNm à partir des cellules et à faire ensuite une copie d'ADN complémentaire (ADNc) de chaque molécule d'ARNm présente grâce à une transcriptase inverse.

La transcriptase inverse (ou reverse) isolée des rétrovirus est capable de catalyser la synthèse d'une chaîne d'ADN à partir d'une matrice d'ARN. Les molécules d'ADN monocaténaire synthétisées par cette enzyme sont ensuite converties en molécules d'ADN bicaténaire par l'ADN polymérase. Ces molécules d'ADNc sont ensuite insérées dans des plasmides et clonées comme précédemment. On obtient alors une banque d'ADNc.



Une copie d'ADN (ADNc) d'une molécule d'ARNm est effectuée par la transcriptase reverse, une enzyme virale qui utilise une chaîne d'ARN comme matrice pour la synthèse d'une chaîne d'ADN complémentaire, formant ainsi une hélice hybride ADN/ARN. Le traitement de l'hybride ADN/ARN avec un alcali dégrade sélectivement la chaîne d'ARN en nucléotides. L'ADNc monocaténaire restant est alors copié en ADNc bicaténaire par l'ADN polymérase. Comme l'indique la figure, la transcriptase reverse et l'ADN polymérase requièrent toutes les deux une amorce pour commencer leur synthèse. Pour la transcriptase reverse, un petit oligonucléotide est utilisé ; dans cet exemple, l'oligo(dT) a été associé au poly A à l'extrémité 3' de la plupart des ARNm. Noter que la



molécule d'ADN bicaténaire produite ici ne possède pas d'extrémités cohésives ; de telles molécules d'ADN à extrémités « tronquées » peuvent être clonées par un seul ou plusieurs procédés analogues à celui que montre la Figure ci-dessus, mais moins efficaces. Par exemple, des oligonucléotides synthétiques qui contiennent des sites de coupure par les enzymes de restriction peuvent être liés aux extrémités d'ADN, ou des « queues » d'ADN monocaténaires peuvent être additionnées par voie enzymatique pour faciliter l'insertion d'une molécule d'ADNc dans un vecteur de clonage.

## **II. Expression des gènes clones dans les microorganismes.**

Quand on dispose d'une banque d'ADN d'intérêt (banque génomique ou banque d'ADNc) dont on a vérifié que le gène clone est celui que l'on veut faire exprimer, il faut alors transformer à nouveau des cellules avec le vecteur de clonage purifié (avec les mêmes techniques de transformation présentées précédemment) Cependant, pour que le gène s'exprime dans la cellule, celui-ci doit être entouré d'un ensemble de signaux que la bactérie (ou tout autre cellule transformée) devra reconnaître.

### **II. 1. Promoteurs de transcription.**

Les vecteurs d'expression possèdent un ou plusieurs promoteurs qui doivent être puissants et aisément régulés. En effet, chaque cellule possède des promoteurs faibles de transcription de gènes codant pour des molécules requises en faible quantité par la cellule et des promoteurs forts pour des substances devant être produites en quantité importantes.

De plus, l'expression d'un gène peut être induite ou réprimée par la présence d'un composé spécifique.

Un des promoteurs le plus couramment utilisé est le promoteur\_Lac qui est la séquence contrôlant la transcription du gène Lac Z codant pour la  $\beta$ galactosidase bactérienne. Ce promoteur est induit par l'IPTG .

Il est aussi possible d'utiliser d'autres promoteurs de transcription comme celui du gène de la tryptophane synthétase (Tryp E).

Il est possible d'augmenter la puissance du promoteur par des séries de mutations ou de délétions dans la séquence promotrice. On arrive alors dans certains cas à obtenir une efficacité de transcription multipliée par un facteur 10.

Le gène de la protéine à exprimer doit donc être clone de telle sorte que sa transcription soit sous la dépendance de ce promoteur et introduit dans la bonne phase de lecture.

Ensuite, l'expression peut être améliorée sous les conditions environnementales qui normalement activent le promoteur : c'est le cas par addition d'IPTG dans le cas du promoteur

Lac.

## II. 2. Termineurs.

La présence de termineurs de transcription à la fin des gènes clones est importante pour plusieurs raisons : la synthèse de longs transcrits non nécessaires va exiger de l'énergie et des structures secondaires indésirables peuvent se former dans le transcrit ce qui peut diminuer l'efficacité de la traduction du côté 5'.