

**Page facebook ; Domaine SNV : Biologie, Agronomie, Science Alimentaire, Ecologie**

# Les méthodes utilisées en biologie moléculaire : génie génétique

**[www.facebook.com/DomaineSNV/](http://www.facebook.com/DomaineSNV/)**

**Module : biologie moléculaire et génie génétique**

**Enseignante : Mme HAMDOUCHE**





## Plan:

### I- Préparation des acides nucléiques.

- extraction des acides nucléiques
- Les enzymes agissant sur les AN

### II- Séparation des acides nucléiques

- Electrophorèse



### III- Détection, caractérisation et identification des AN

- Marquage
- Hybridation moléculaire
- Southern blot

### IV- Amplification et sélection d'AN particuliers

- PCR
- Clonage
- ❖ les vecteurs

## QU'EST-CE QUE LE GÉNIE GÉNÉTIQUE?

Le génie génétique est le processus par lequel on identifie et isole l'ADN d'une cellule vivante ou morte pour l'introduire dans une autre cellule vivante. Comment les scientifiques peuvent-ils faire des manipulations génétiques? Ils utilisent la technologie de recombinaison de l'ADN.

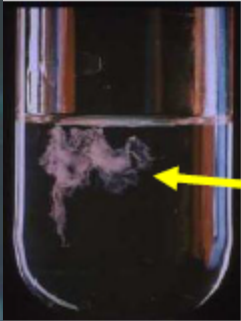
l'ensemble des outils et des techniques de la biologie moléculaire permettant, de manière contrôlée, l'étude de la modification des gènes : leur isolement, leur clonage, leur séquençage, leur découpage ...dans un but de recherche fondamentale ou appliquée

**TECHNOLOGIE DE RECOMBINAISON DE L'ADN** On appelle technologie de recombinaison de l'ADN les méthodes mises au point pour isoler, manipuler, amplifier, couper et épisser des séquences identifiables d'ADN.



# I- Préparation des acides nucléiques.

## 1-1 extraction de l'ADN



1. **Lyse** des cellules et dissociation des nucléosomes
2. **Extraction** par Phénol/Chloroforme (déprotéinisation)
3. **Précipitation** alcoolique (éthanol ou isopropanol)  
(ADN sous forme solide [pelote d 'ADN])
4. **Redissolution** de l'ADN ( $H_2O, \dots$ )  $\Rightarrow$  ADN pur et concentré
5. **Dosage et vérification de l'état** (= qualité)

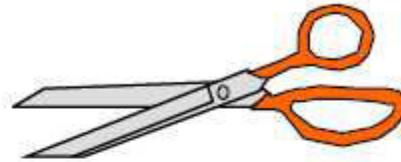
## B/ Autres techniques d'extraction

- Kits commercialisés
- FTA Card
- Automates
- .../...

## 2. Des outils enzymatiques pour étudier l'ADN



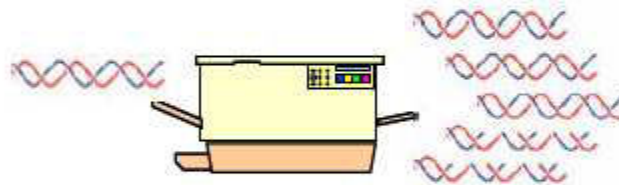
Cliquez sur Outils pour  
les fichiers au format



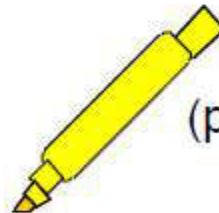
(endonucléases, DNAses...)



(ligases)



(polymérases...)



(polymérases, kinases...)



(polymérases...)



## 1. Les nucléases

**Définition :** les nucléases dégradent les molécules d'ADN en rompant les liaisons phosphodiester liant un nucléotide au suivant.

Il existe 2 types de nucléases :

### 1.1. Exonucléases

Ces enzymes éliminent des nucléotides un à un à partir d'une extrémité de l'ADN.

exemple :

- ✓ la Bal31 (obtenue de cultures d'*Alcaligenes eutrophus*) éliminant des nucléotides à partir des 2 extrémités des 2 brins,
- ✓ l'exonucléase 3 (obtenue à partir de cultures d'*E. coli*) catalysant l'hydrolyse séquentielle des nucléotides d'un ADN à partir d'une extrémité 3' libre.



## 1.2. Endonucléases

### a) a clivages non spécifiques

Ces enzymes sont capables de rompre des liaisons phosphodiester internes.

#### • Exemple:

➤ La DNase 1 extraite du pancréas, coupe préférentiellement après une base pyrimidique.


➤ La nucléase S1, extraite de culture d'*Aspergillus oryzae* dégrade seulement les acides nucléiques monocaténares.



## **b) a clivages spécifiques : enzymes de restriction**

- ❖ Elles coupent de manière définie et reproductible l'ADN bicentenaire.
- ❖ Ce sont des enzymes produites par de très nombreuses bactéries au moment des infections lysogeniques
- ❖ L'analyse de leurs coupures de l'ADN montre qu'elles se font en des sites spécifiques.
- ❖ Plus de 1200 différentes enzymes de restriction ont été caractérisées et elles sont classes en 3 types :





**Type I** : l'enzyme reconnaît sa séquence puis se déplace sur l'ADN et s'arrête de manière aléatoire 1000 à 5000 paires plus loin et libère quelques dizaines de nucléotides.

**Type II** : une fois la séquence reconnue, l'enzyme coupe l'ADN au niveau de cette séquence (les plus courante en biologie moléculaire).

**Type III** : après reconnaissance de la séquence spécifique, ces enzymes découpent l'ADN une vingtaine de nucléotides plus loin.



- 
- La longueur des séquences reconnue est comprise entre 4 et 8 bases. Elle est identique sur les 2 brins.

exemple ECO R1 reconnaît la séquence :

↓  
5' GAATTC 3'  
3' CTTAAG 5'

- ↑
- De telles séquences sont appelées **palindromiques**.



Les enzymes de restriction de type II provoquent 2 types de coupure :

- coupures a « bouts francs ». Les enzymes coupent exactement au même niveau les 2 brins d'ADN : exemple Pvu II qui coupe



- coupures a « bouts cohésifs ».

Dans ce cas, les coupures sont décalées l'une par rapport a l'autre.

-Les parties simple brin complémentaire peuvent s'apparier  
C'est une propriétés très utilisée dans les recombinaisons génétiques in vitro



## 2. Les polymérases et enzymes apparentées

Les polymérases d'acides nucléiques sont des enzymes qui synthétisent un nouveau brin d'ADN complémentaire à une matrice d'ADN ou ARN.

2 types de polymérases sont couramment utilisées en génie génétique :

### 2.1. ADN polymérase I

Extraite d'*Escherichia coli*, elle joue un rôle majeur dans la réparation de l'ADN. L'enzyme se fixe à une région monobrin et synthétise totalement le brin complémentaire. L'activité polymérasique s'effectue dans le sens 5' vers 3' à partir d'une amorce 3'OH.

### 2.2. Transcriptase réverse

Codée par les gènes Pol des rétrovirus, cette enzyme transcrit ARN en ADN complémentaire (cADN).

Comme toutes les polymérases, elle travaille dans le sens 5' vers 3'.



### 3. Enzymes modifiant l'ADN

De nombreuses enzymes modifient l'ADN par addition ou suppression de groupes chimiques spécifiques.

- **la phosphatase alcaline** : elle retire le phosphate en 5' sur l'ADN, l'ARN et les nucléotides libres. L'élimination des phosphates en 5' empêche toute action des ligases.
- **la T4 polynucleotide kinase** : elle transfère le phosphate d'un ATP sur le phosphate en 5' d'un polynucleotide.
- **les topoisomérases** : Les topo isomérases sont capables de changer la conformation de l'ADN.
- **Les méthylases** :



## 4. Ligases

Ce type d'enzyme permet de relier les 2 fragments d'ADN double brins

C'est une enzyme capitale puisqu'elle permet la construction de molécules d'ADN recombinées.

### 4.1. ADN ligase

L'enzyme n'agit que si les 2 ADN sont associés par des extrémités cohésives.

Cette ligase assure la formation des liaisons phosphodiester entre une extrémité 3'OH et une extrémité 5' phosphate.

### 4.2. T4 ADN ligase

Elle est capable d'effectuer des ligations entre 2 ADN a bouts francs.

A photograph of a gel electrophoresis apparatus. A transparent gel slab is visible, showing several lanes with distinct bands of DNA or RNA. The background is dark, and the gel is illuminated from below, highlighting the bands.

## II- Séparation des acides nucléiques


➤ Electrophorèse

A photograph of two individuals wearing full-body white protective suits, hoods, and masks, working inside a biosafety cabinet. They are using pipettes to transfer liquid into small vials. The cabinet has a glass front and a window showing an outdoor view. The scene is brightly lit by the cabinet's internal lights.



## 2.Séparation des acides nucléiques

La technique la plus utilisée pour la séparation des acides nucléiques: **L'électrophorèse**



### Principe général:

Dans un milieu donné, la séparation des particules se fait en fonction de leur **charge électrique** et pour des charges identiques, en fonction de leur **taille**.



# ELECTROPHORESE DE L'ADN

= technique de biologie moléculaire → séparer des fragments d'ADN de différentes tailles en les faisant migrer dans un **gel** en les soumettant à un courant électrique.

► Le gel est constitué d'une matrice de polymère baignant dans un tampon conducteur.

► Deux principaux polymères sont utilisés : l'**agarose** et le **polyacrylamide**.

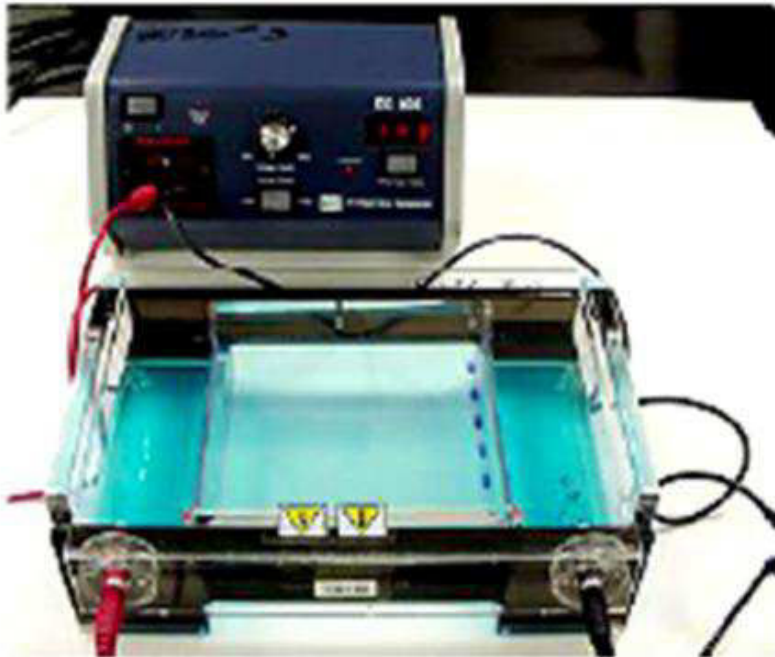
Cette technique est assez simple à mettre en œuvre si on dispose des bons outils et de quelques astuces.



## Principe:

basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement à pH 7~8, vers l'anode (+) sous l'effet d'un champ électrique. Cette séparation s'effectue à travers la matrice du gel en fonction de la taille des molécules.

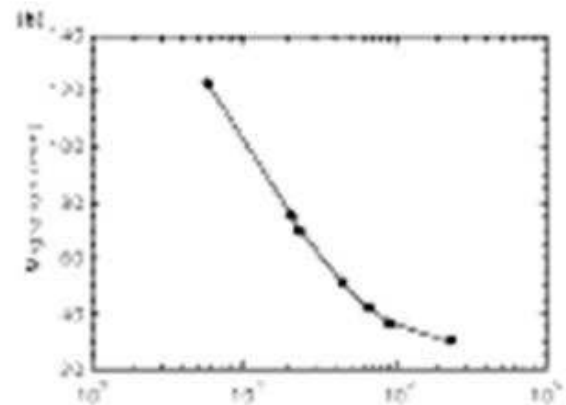




**L'ADN chargé (-) migre toujours vers le pôle + (anode)**

**L'ADN migre généralement en fonction de sa taille**

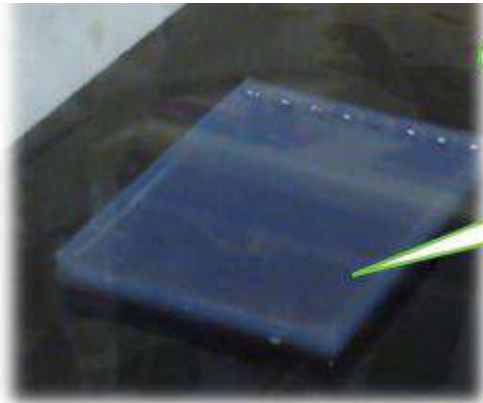
**Les pores du gel sont d'autant plus petit que le % en agarose ou en acrylamide est grand**





## Electrophorèse sur gel d'agarose

- ⌚ L'agarose = polymère à base d'agar purifié. Différentes puretés d'agarose sont disponibles. En général, d
- ⌚ L'agarose est utilisé à des concentrations de 0,5% à 2% (poids/volume) et permet de séparer des molécules de très grande taille, principalement de l'ADN ou de l'ARN ;

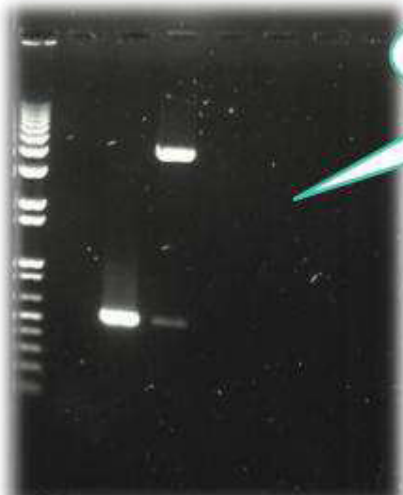


Un gel d'agarose avant éclairage sous ultraviolets

Le gel est exposé à des rayonnements ultraviolets, le BET colore l'ADN en une couleur rouge-orangée



Photographie du gel



Puits :

1. Echelle de marqueur de poids moléculaire (1kbplus)
2. vide,
3. Un produit de PCR d'une taille légèrement supérieure à 500 paires de bases
4. Fragment d'environ 4.5kb d'un Plasmide digéré par une enzyme de restriction



# Révélation de l'ADN

La méthode de détection de l'ADN dans les gels d'électrophorèse la plus utilisée est celle au Bromure d'éthidium.

Le bromure d'éthidium (EtBr) = à la fois un agent intercalant et un fluorochrome.

Structure aromatique plane → s'intercaler entre les paires de bases → détorsion de la double hélice et émission de lumière (fluorescence) dans le rouge-orange lorsque le complexe ADN-EtBr est excité en lumière ultraviolette.



Matériel nécessaire :  
 Tampon d'échantillon  
 Cuve  
 Support + scotch  
 Peigne  
 Erlen (chauffage de l'agarose)

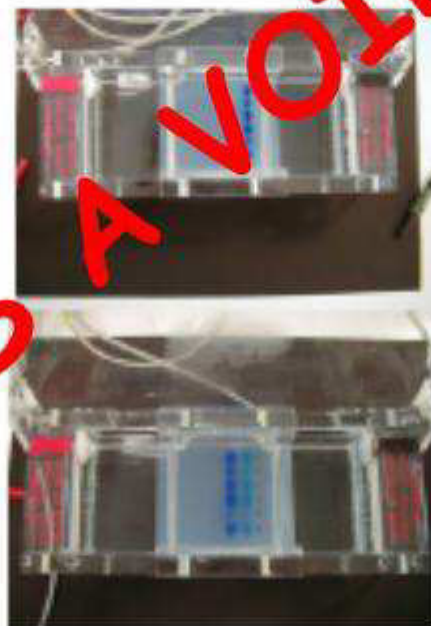


Dissolution de l'agarose à chaud  
 Laisser refroidir  
 Ajouter BET  
 Pas de bulles !  
 Cuve et agarose : mise en place du peigne.  
 Prise en main de l'agarose



Mise sous tension  
 Cathode (-) et anode (+)  
 Migration des molécules  
 chargées positivement (anion)  
 et négativement (anion).

ADN pol/ phosphate  
 donc pol/ anion donc du - au +



Migration  
 Bleu clair : Xylène Cyanol, ADN grande taille  
 Bleu foncé : Bleu de Bromophénol, ADN petite taille, front de migration  
 Variable selon % agar



Lecture sous UV : BET



# Facteurs affectant la migration

@La longueur de la molécule d'ADN : la séparation se fait en fonction du poids moléculaire et donc de la taille de l'ADN.

@La concentration du gel: l'augmentation de la concentration réduit la vitesse de migration et permet la séparation de fragment d'ADN de plus petite taille.

@Le voltage: plus le voltage est important, plus la vitesse de migration augmente. Toutefois le voltage est limité en intensité (5V/cm): un fort voltage → augmentation de température (fondre le gel).

@La conformation de l'ADN: l'ADN plasmidique, non digéré par une enzyme de restriction, migre à différentes vitesses (du plus lent au plus rapide) : ADN circulaire, ADN linéaire et ADN superenroulé.

### 3. Elaboration de Cartes de restrictions

#### Définitions:



La **carte de restriction** (= **physique**) est une représentation graphique de la localisation des sites reconnus par les principales enzymes de restriction sur une molécule d'ADN.

Grâce à une telle carte, il est facile de prévoir la taille des fragments produits par digestion par une seule ou plusieurs enzymes de restriction.



# Nomenclature



Enzyme	Organism from which derived	Target sequence (cut at *) 5' → 3'
<i>Ava</i> I	<i>Anabaena variabilis</i>	C* C/T C G A/G G
<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	G* G A T C C
<i>Bgl</i> II	<i>Bacillus globigii</i>	A* G A T C T
<i>Eco</i> RI	<i>Escherichia coli</i> RY 13	G* A A T T C
<i>Eco</i> RII	<i>Escherichia coli</i> R245	* C C A/T G G
<i>Hae</i> III	<i>Haemophilus aegyptius</i>	G G * C C
<i>Hha</i> I	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	G C G * C
<i>Hind</i> III	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	A* A G C T T
<i>Hpa</i> I	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	G T T * A A C
<i>Kpn</i> I	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	G G T A C * C
<i>Mbo</i> I	<i>Moraxella bovis</i>	*G A T C
<i>Pst</i> I	<i>Providencia stuartii</i>	C T G C A * G
<i>Sma</i> I	<i>Serratia marcescens</i>	C C C * G G G
<i>Sst</i> I	<i>Streptomyces stanford</i>	G A G C T * C
<i>Sal</i> I	<i>Streptomyces albus</i> G	G * T C G A C
<i>Taq</i> I	<i>Thermophilus aquaticus</i>	T * C G A
<i>Xma</i> I	<i>Xanthamonas malvacearum</i>	C * C C G G G



## Exercice 1

Soient les enzymes de restriction

BamHI, Pst I, XhoI et Mbo I dont les sites reconnus sont :

- BamHI : 5' G/GATCC 3' ;
- Pst I : 5' CTGCA/G 3' ;
- XhoI : 5' C/TCGAG 3' ;
- MboI : 5' /GATC 3'.

Recopier la séquence de l'ADN et encadrer les sites de restriction en indiquant la position des coupures.

5' ATACGGGATCCGAGCTCTCGATCGTCTGCAGAAATTCC 3'

3' TATGCCCTAGGCTCGAGAGCTAGCAGACGTCTTTAAGG 5'

## Exercice 2:

Un fragment d'ADN linéaire

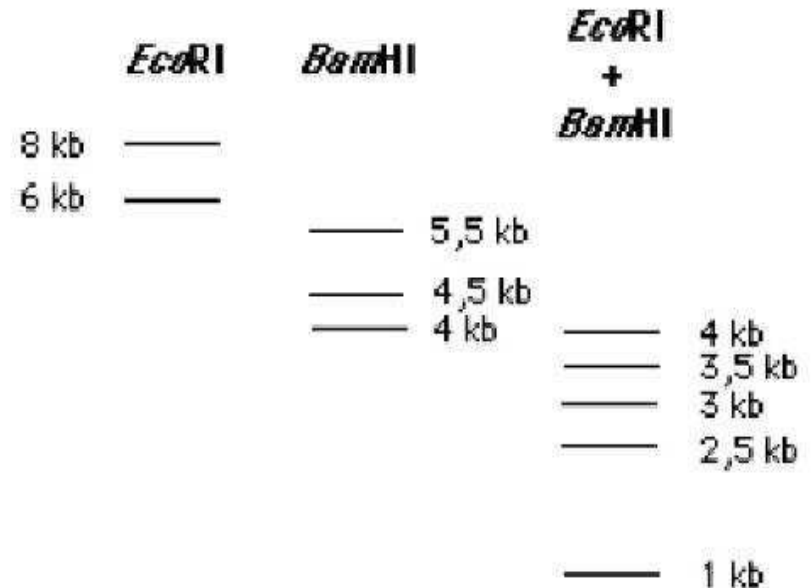
1. Coupé par l'enzyme EcoRI donne un fragment de 8Kb, un de 4 Kb et un de 3 Kb
2. coupé par l'enzyme SmaI donne un fragment de 9 Kb et un de 6 Kb.
3. Coupé par les deux enzymes EcoRI et SmaI produit un fragment de 6 Kb, un de 4 Kb, un de 3 Kb et un de 2Kb.



### Exercice 3:

Un plasmide recombinant contenant le gène M (appelé pBM1) est digéré par les enzymes de restriction Bam HI et Eco RI. Après migration et séparation des fragments d'ADN sur gel d'agarose puis coloration au bromure d'éthidium, on obtient

- Donnez la carte de restriction du plasmide recombinant pBM1.



### **III- Détection, caractérisation et identification des AN**

- **Marquage**
- **Hybridation moléculaire**
- **Southern blot**



- Certains types d'expériences (Southern, northern, hybridation in situ, ...) nécessitent de visualiser une hybridation. Pour cela, il est nécessaire de marquer un acide nucléique (ADN ou ARN simple brin) qui prendra le nom de sonde.

Une **sonde nucléique** = Séquence d'ADN ou d'ARN marquée (par un composé fluorescent, un radioisotope, ou une enzyme) que l'on utilise pour détecter des séquences homologues (complémentaires) par hybridation *in situ* ou *in vitro*.

# Les différents types de marquage

- Marquage radioactif dit chaud
- Marquage froid dit biochimique



# 1-Marquage radioactif

**L'atome ou le groupement incorporé est  
RADIOACTIF**

**(ajout d'un radio isotope tel que  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  
 $^3\text{H}$ ).**

**Marquage interne**

**Marquage externe**

## a- Marquage Interne :

### \* Nick translation ou déplacement de cassures

Utilisation de 2 enzymes :

- DNase I pour générer quelques coupures simple brin dans le fragment d'intérêt

- DNA pol I pour dégrader l'ADN dans sens 5'-3' au niveau de ces coupures et repolymériser en présence d'un nucléotide chaud.

L'ADN double brin traité par la DNase I est clivé au hasard. La réparation des coupures réalisées par la Dnase I nécessite l'action de l'ADN polymérase I en présence de désoxynucléosides triphosphates marqués au phosphore radioactif (32P).

## \*amorçage au hasard (Random Priming)

- un ou plusieurs des oligonucléotides s'hybrident avec la séquence en 5' du fragment d'intérêt (ADN simple brin) et servent d'amorces pour la synthèse d'un deuxième brin.



## B- Marquage externe

### ➤ marquage en 5'

T4 polynucléotide kinase ajoute un P32 en 5' (sonde peu radioactive)

### ➤ marquage en 3'

- ❖ avec une ADN polymérase: ADN Pol I ou T4, Taq pol (PCR) (sondes très radioactives)
- ❖ avec une exonucléase
- ❖ avec une terminal transférase



# Vecteurs et Clonage moléculaire





**Définition:**

**Cloner un fragment d'ADN consiste a:**

- **isoler physiquement ce fragment et l'insérer dans un vecteur pour augmenter leur nombre de copie**

**Un clone est un ensemble de cellules qui ont toutes le même génome et qui ont une origine commune**



**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.

# Principes

## ORGANISME DONNEUR

Extraction et coupure de l'ADN  
en fragment contenant de un à  
plusieurs fragments d'intérêt.

## VECTEUR

Ou transporteur d'ADN.  
C'est un fragment d'ADN  
capable de réplication autonome.

insertion individuelle de chaque  
**fragment d'ADN** dans une molécule  
de **vecteur**.

Obtention de l'**ADN recombinant**

Nouvelle combinaison de **l'ADN d'un génome donneur** (qui peut être de n'importe quel organisme) avec **l'ADN d'un vecteur** qui peut être d'origine complètement différente.

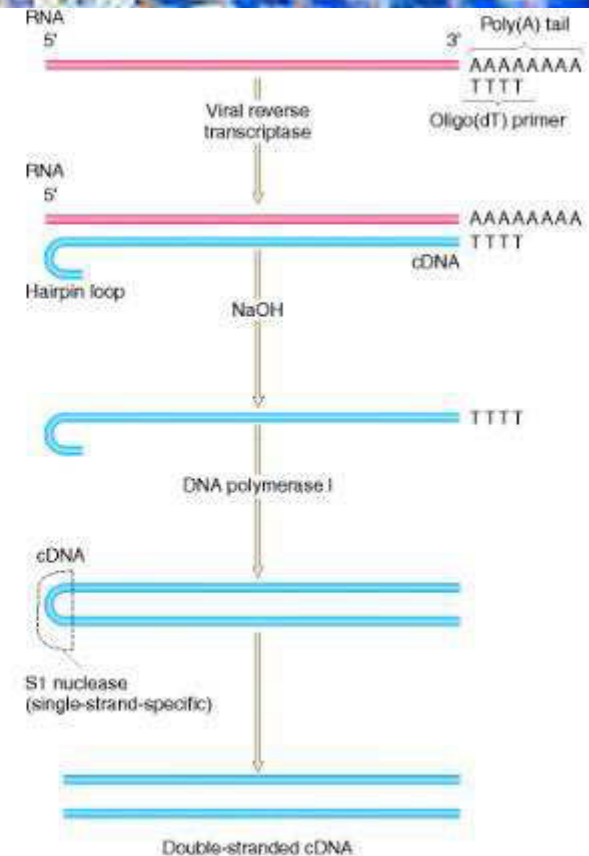
- 
- comment obtenir l'ADN de l'organisme donneur?
  - Qu'est ce qu'une enzyme de restriction?
  - Quels sont les vecteurs de clonage?
  - Comment l'ADN d'intérêt et le vecteur sont-ils liés?
  - Les cellules hôtes?
  - Comment l'ADN recombinant est introduit dans une cellule hôte?
  - Les intérêts du clonage?



➤ comment obtenir l'ADN de l'organisme donneur?

## A partir de l'ARN:

Principe de la reverse transcription:



Homo sapiens

Mammifère

23

3400 Mb

25000-30000

# Qu'est ce qu'une enzyme de restriction?

Enzyme	Organism from which derived	Target sequence (cut at *) 5' -->3'
Ava I	Anabaena variabilis	C* C/T C G A/G G
Bam HI	Bacillus amyloliquefaciens	G* G A T C C
Bgl II	Bacillus globigii	A* G A T C T
Eco RI	Escherichia coli RY 13	G* A A T T C
Eco RII	Escherichia coli R245	* C C A/T G G
Hae III	Haemophilus aegyptius	G G * C C
Hha I	Haemophilus haemolyticus	G C G * C
Hind III	Haemophilus influenzae Rd	A* A G C T T
Hpa I	Haemophilus parainfluenzae	G T T * A A C
Kpn I	Klebsiella pneumoniae	G G T A C * C
Mbo I	Moraxella bovis	*G A T C
Mbo I	Moraxella bovis	*G A T C
Pst I	Providencia stuartii	C T G C A * G
Sma I	Serratia marcescens	C C C * G G G
SstI	Streptomyces stanford	G A G C T * C
Sal I	Streptomyces albus G	G * T C G A C
Taq I	Thermophilus aquaticus	T * C G A
Xma I	Xanthomonas malvacearum	C * C C G G G



➤ Quels sont les vecteurs de clonage?







**Un vecteur est une séquence d'ADN permettant la propagation, la sélection d'une séquence d'ADN d'intérêt.**

# I - Propriétés des vecteurs de clonage

➤ capables de réplique autonome dans une cellule hôte donnée  
(origine de réplique de type procaryotique et/ou eucaryotique)

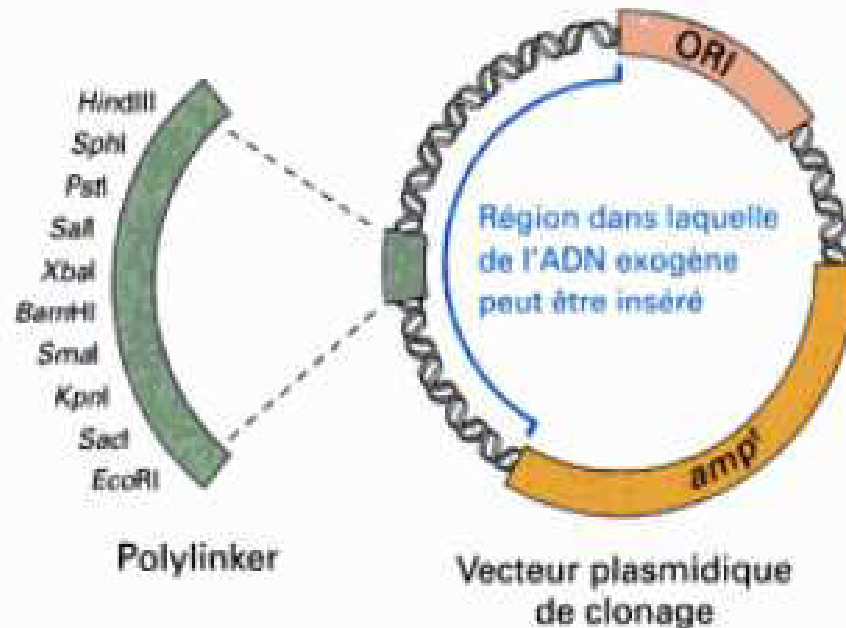
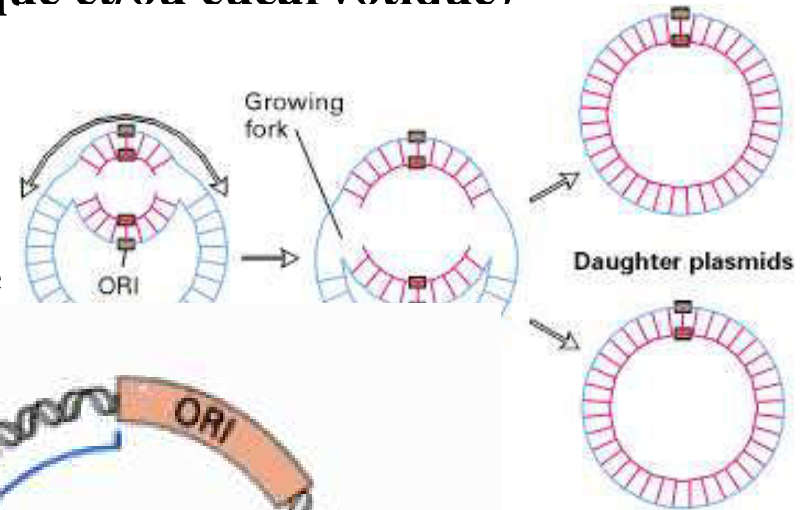
➤ il doit posséder au moins un site unique de restriction

➤ possèdent un polylinker ou site multiple de clonage

➤ Possèdent des sélections de la c

➤ supportent l'in

(a) Sequence of poly



and.



### 3. Différents vecteurs pour différentes utilisations

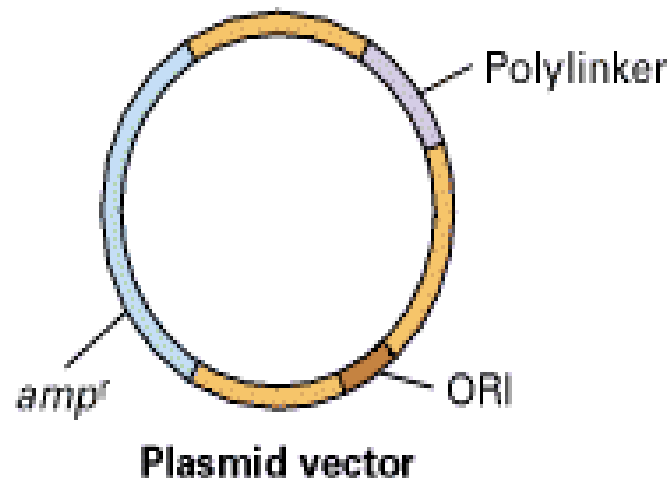
Taille maximum approximative du fragment d'ADN qui peut être cloné dans chaque vecteur

VECTEURS	HOTE	INSERT (Kb)
Plasmides	Bactérie	10
Phage lambda	Bactérie	25
Cosmide	Bactérie	45
Phage P1	Bactérie	100
BAC (bacterial artificial chromosome)	Bactérie	300
YAC (yeast artificial chromosome)	Levure	1000



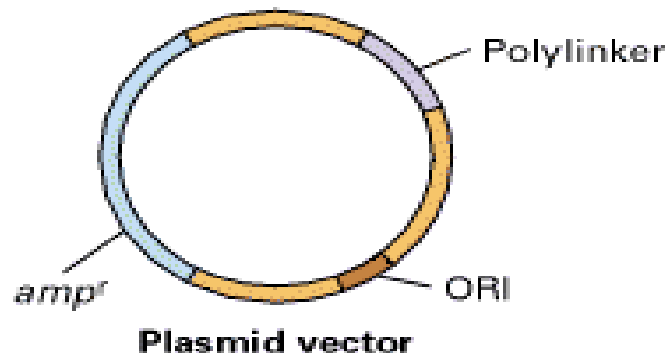
## 4. Les plasmides comme vecteurs de clonage

- Molécule d'ADN de taille réduite, d'origine bactérienne
- Molécule d'ADN circulaire – taille 2kb à 5kb
- Peut accepter jusqu'à 10kb d'ADN exogène
- Peut être considérée comme un minichromosome capable de réplication autonome
- Confère la résistance à un ou plusieurs antibiotiques= sélection



## 4. Les plasmides comme vecteurs de clonage

- Molécule d'ADN de taille réduite, d'origine bactérienne, extrachromosomique (épisode)
- Molécule d'ADN circulaire – taille 2kb à 5kb
- Peut accepter jusqu'à 10kb d'ADN exogène
- Peut être considérée comme un minichromosome capable de réplication autonome
- Confère la résistance à un ou plusieurs antibiotiques= sélection





## Les plasmides de première génération:

(exp: ColE1, Psc101, RSF2124) C'est avec ces plasmides qu'ont été effectués les 1<sup>er</sup> clonages (clonage génique). Ce sont des plasmides à l'état naturel, non modifiés au laboratoire. Mais ils avaient besoin d'être améliorés. •



## Plasmide de deuxième génération:

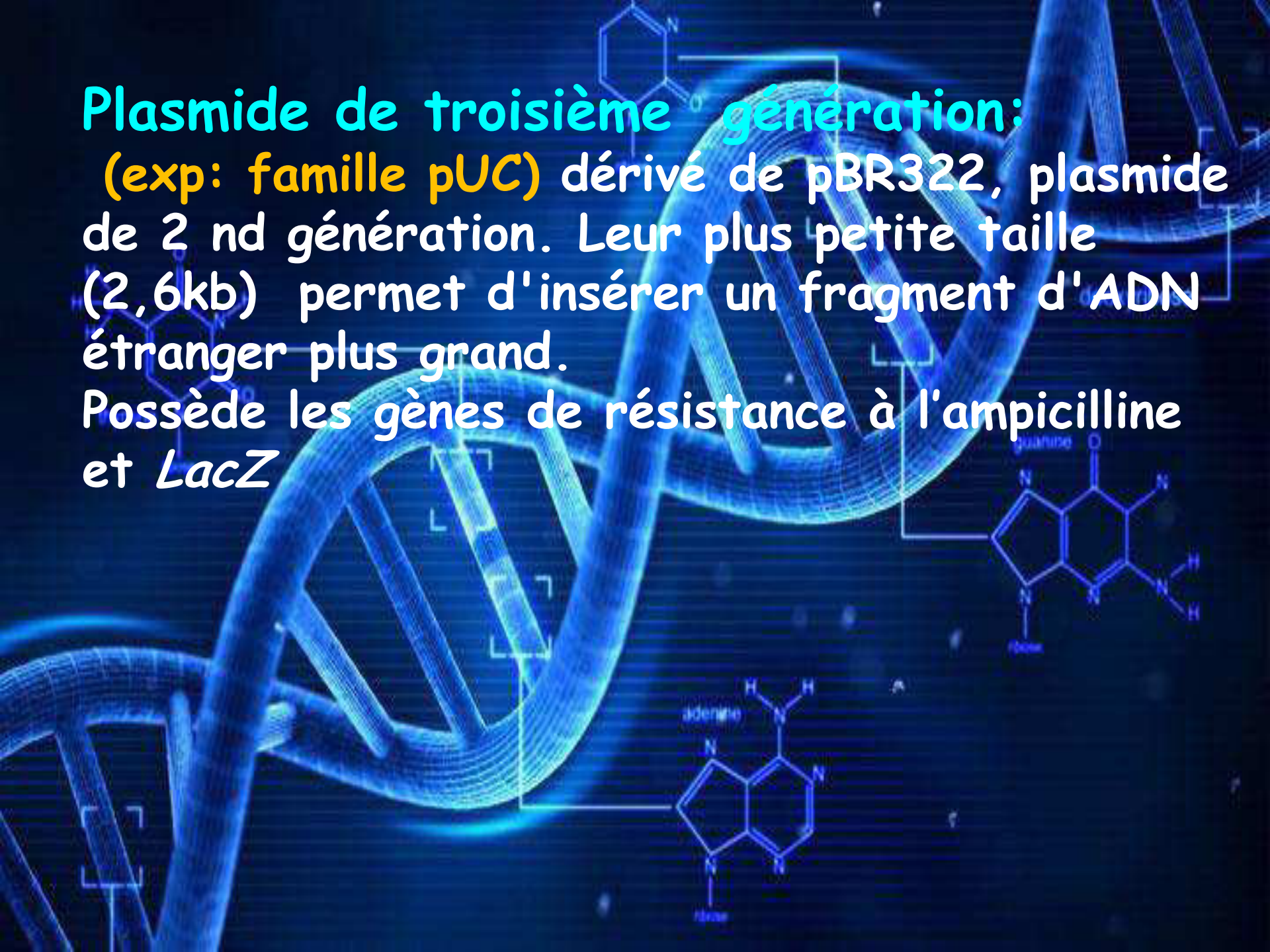
(exp: la serie pBR312 à pBR322) dérivé de plasmides naturels: plasmides artificiels  
Le plasmide pBR 322 est constitué de 4,4 kb et possède deux gènes de résistance : un pour la tétracycline (TcR), l'autre pour l'ampicilline (ApR) il possède, 20 sites uniques pour les endonucléases de restriction dont 11 localisés sur deux gènes de résistance.



## Plasmide de troisième génération:

(exp: famille pUC) dérivé de pBR322, plasmide de 2<sup>nd</sup> génération. Leur plus petite taille (2,6kb) permet d'insérer un fragment d'ADN étranger plus grand.

Possède les gènes de résistance à l'ampicilline et *LacZ*

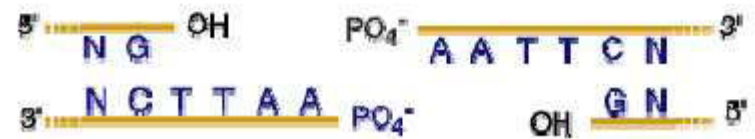
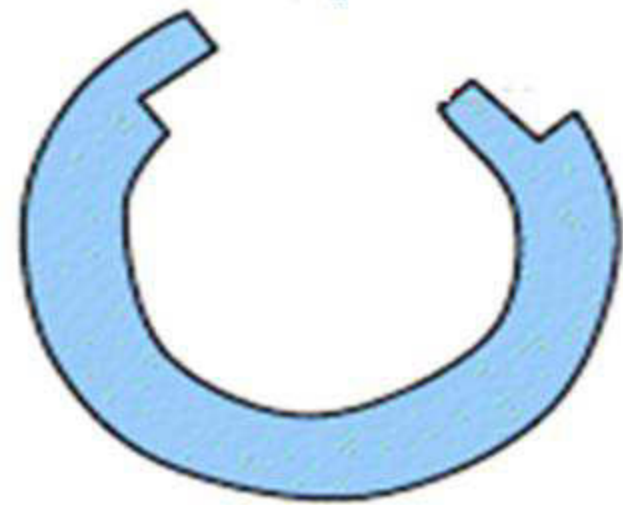
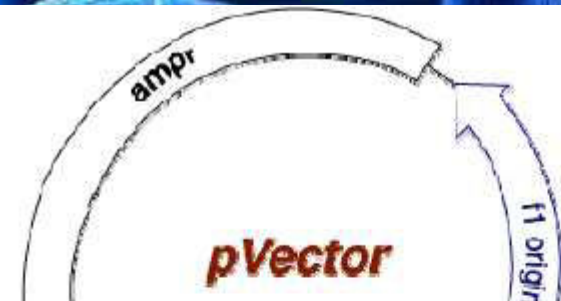
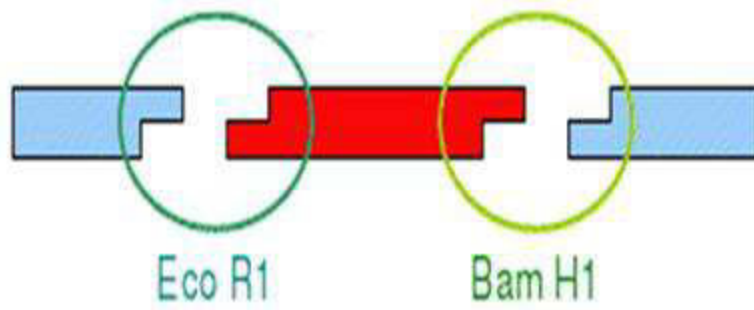


- Comment l'ADN d'intérêt et le vecteur sont -ils liés?
- Les cellules hôtes?
- Comment l'ADN recombinant est introduit dans une cellules hôtes?
- Les intérêts du clonage?

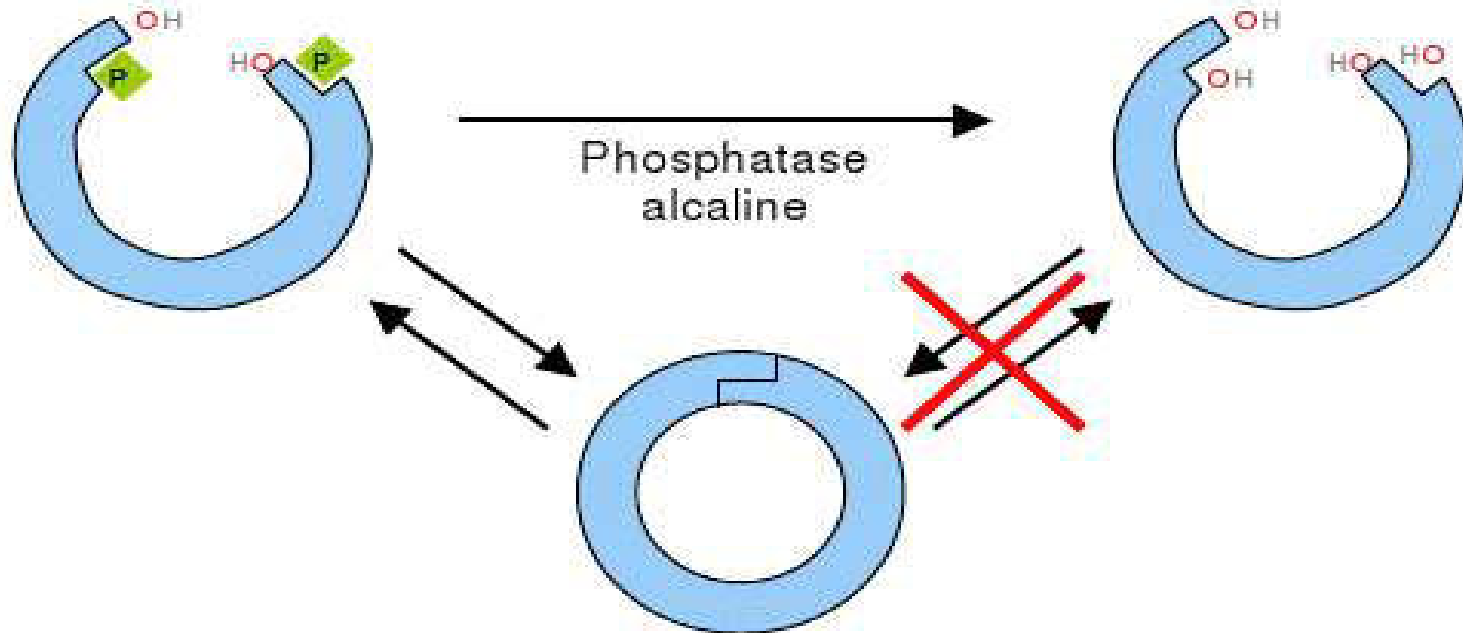


# Utilisation d'un vecteur

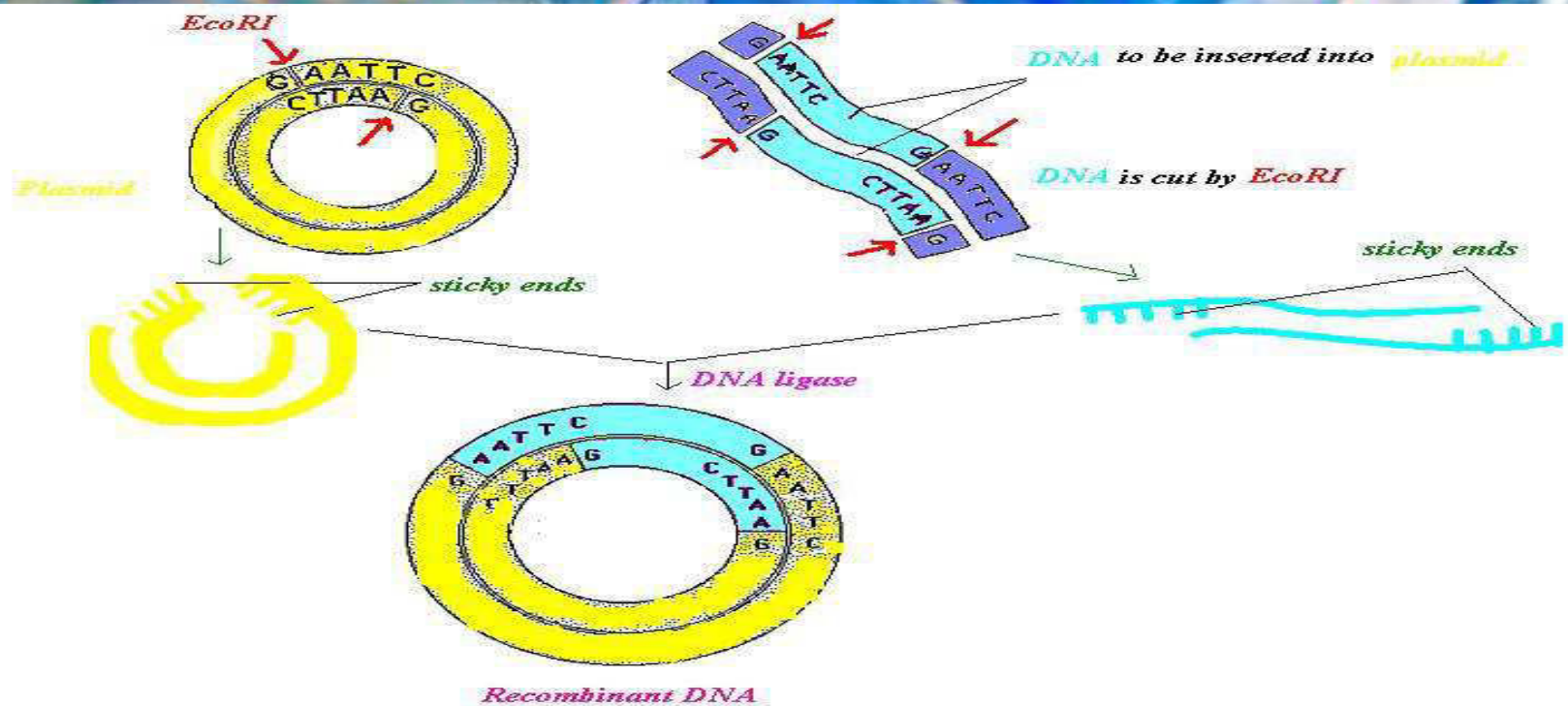
1-  
co  
l'e  
de  
à



## 2- traitement par phosphatase alcaline



### 3 - L'insertion du l'insert dans plasmide

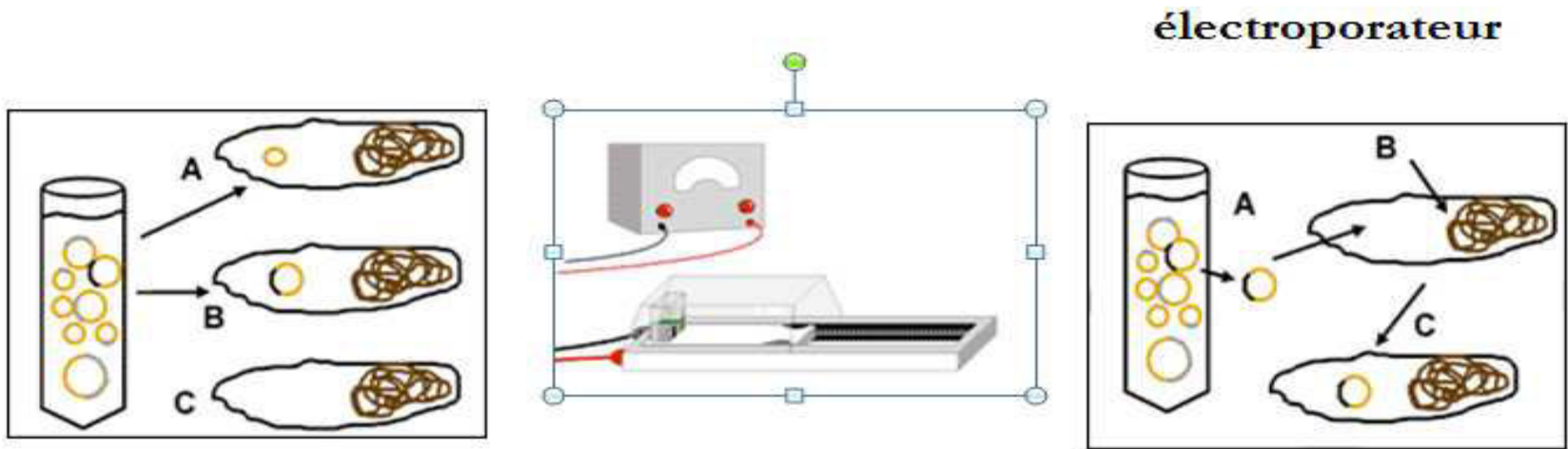




## 4- Introduction de l'ADN recombinant dans les cellules hôtes

De type procaryotique (bactéries):

**Cas d'un vecteur plasmidique:** l'ADN est introduit dans les bactéries traitées spécialement le plus souvent par **choc thermique** ou par **choc électrique**.





## 5 - la sélection des bactéries transformées:



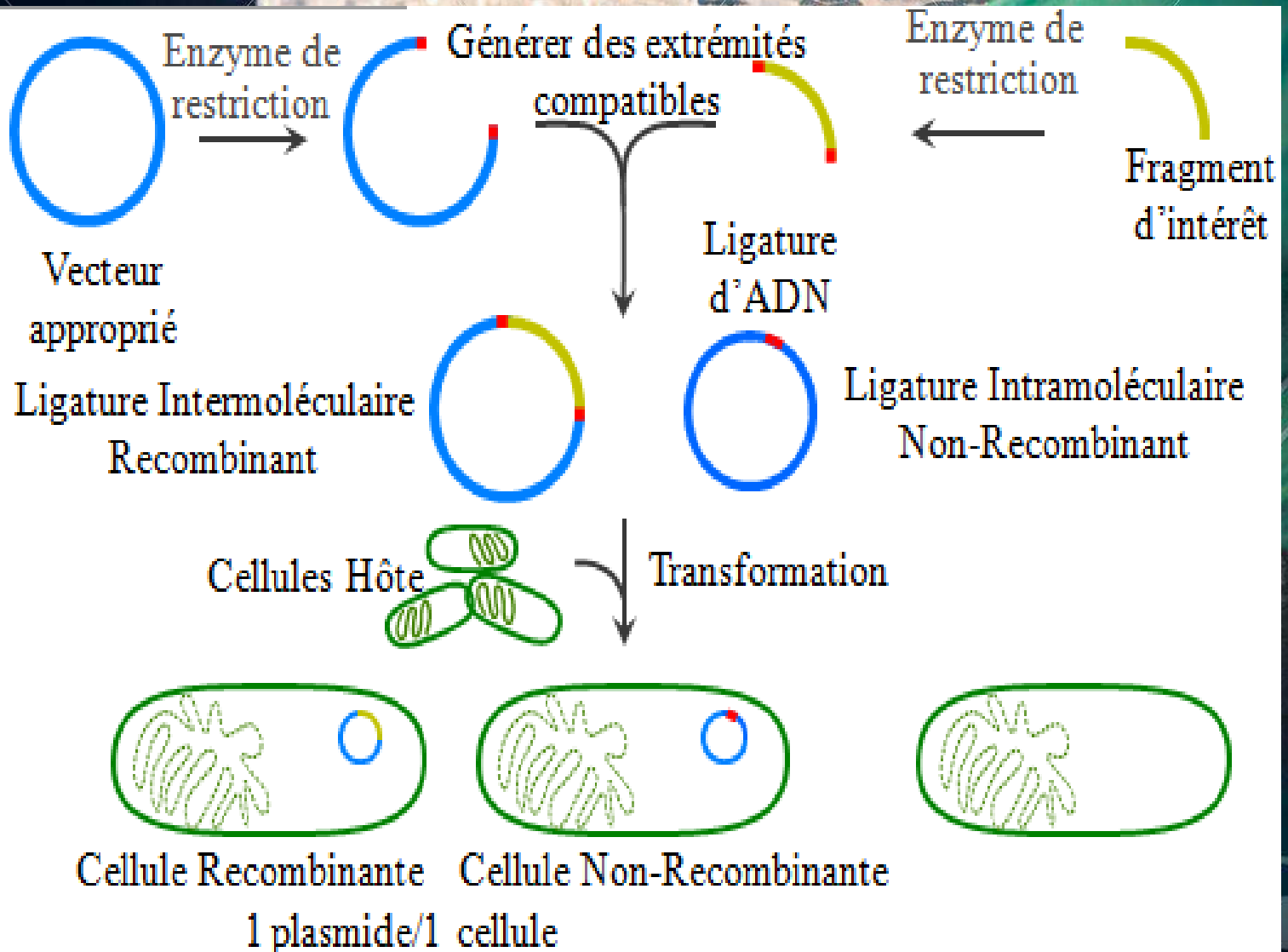


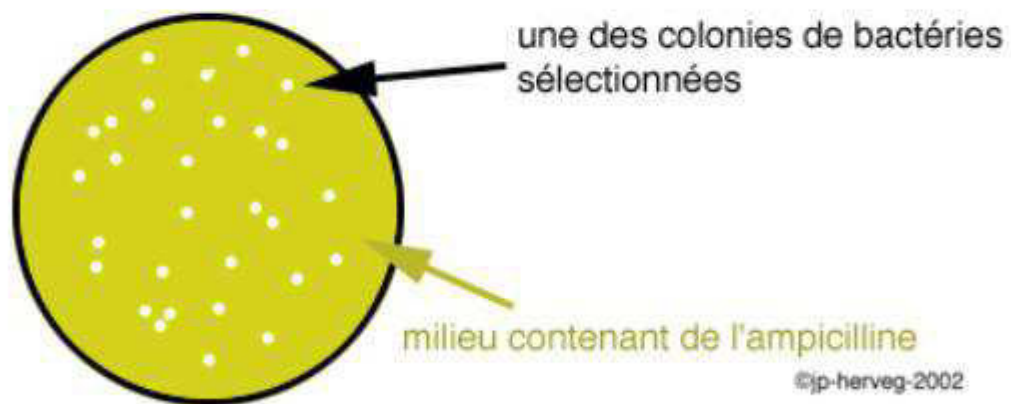
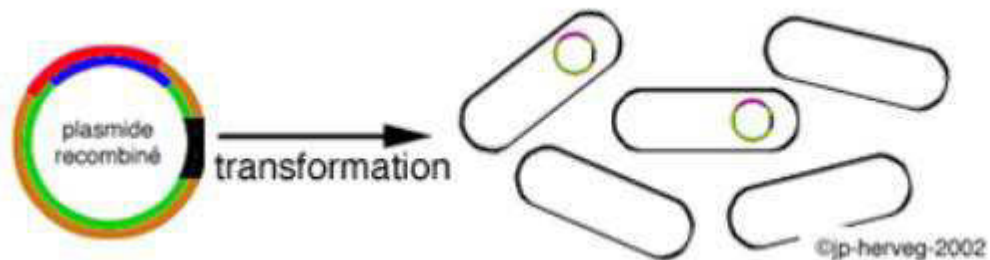
## 5 - la sélection des bactéries transformées:





## 5 - la sélection des bactéries transformés:







➤ Le taux de transformation des bactéries est généralement très faible.

➤ Si on utilise un gène de résistance dans plasmide on obtient une sélection séparer les bactéries comportant des plasmides et les bactéries sans plasmides car ces dernières sont tuées.

➤ cette méthode permet pas de distinguer les bactéries avec plasmides intacts des bactéries avec plasmides recombinants.

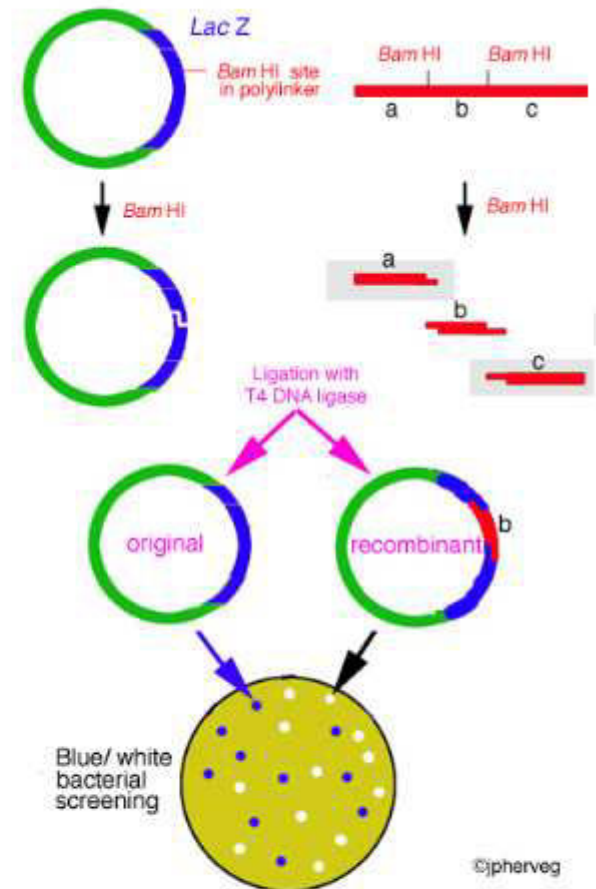
➤ On utilise pour cela une résistance à un second antibiotique , ou plasmide a un gène code (LacZ) pour un protéine  $\beta$  galactosidase.



## 5 - la sélection des bactéries transformés:

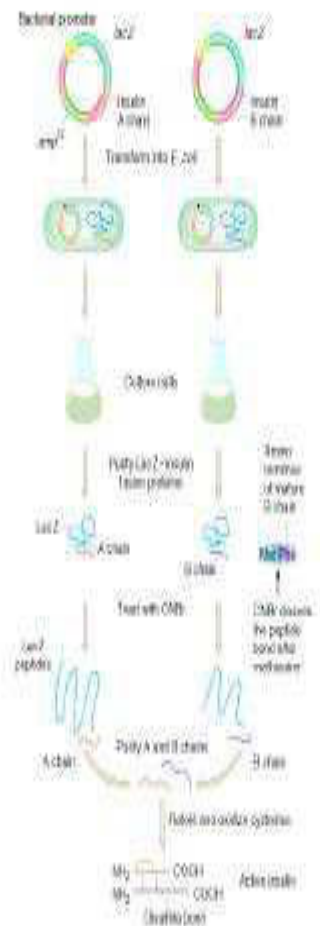
Le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D galactoside (X-Gal) est clivé par la  $\beta$  - galactosidase pour donner une substance bleue insoluble et en présence d'IPTG (colonies bleues)

Si on introduit un ADN étranger dans le polylinker, on détruit la grille de lecture: pas de  $\beta$ -galactosidase active (colonies blanches)

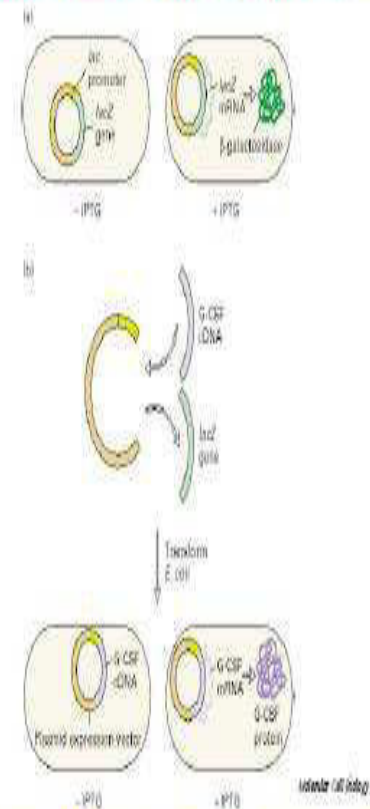


**Insertion dans la partie LacZa de l'opéron lactose**

## Exemple de l'insuline



## Production de protéines Utilisation de vecteur d'expression



Quelles types de protéines cherchiez vous à produire?

## Autres exemples

Levures et bactéries utilisées comme usines:  
production d'antibiotiques -pénicilline, tétracycline-,  
d'enzymes comme lipases -lessives-...





A laboratory setting with a multi-well plate containing yellow liquid, a pipette, and a gloved hand. The background is dark, and the foreground shows the plate and the hand. The text is overlaid on the left side of the image.

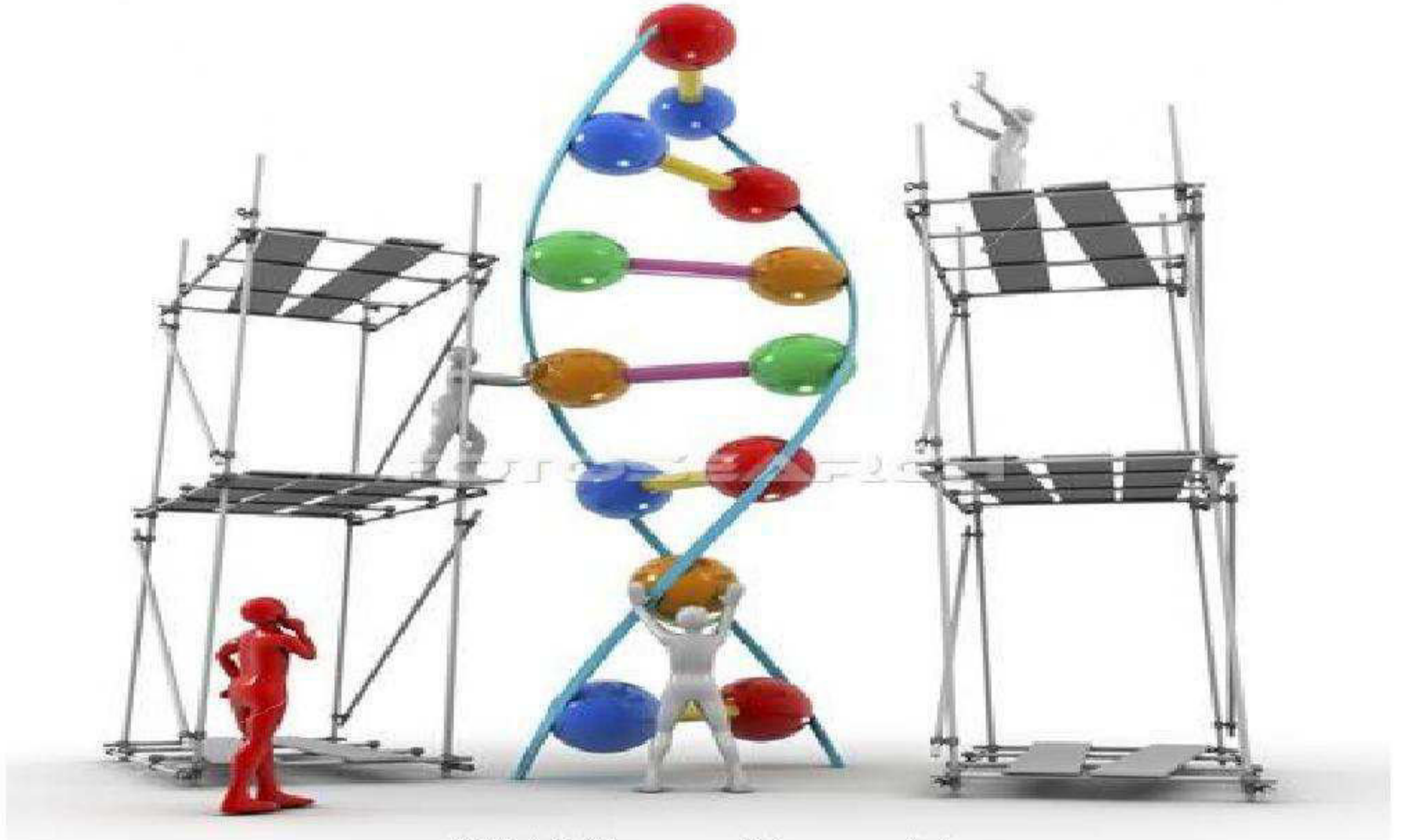
➤ En médecine:

- Production des hormones et des protéines :

- insuline → traitement de diabète.

- Interférons  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  agent antiviraux, anti-tumoraux et anti-inflammatoires.

- Streptokinase → anticoagulant (Prescott et la ; 2010).



u19139842 [www.fotosearch.fr](http://www.fotosearch.fr)













