



Attestation de production pédagogique

Nous, Présidente du Comité Scientifique du Département des Sciences Biologiques,
attestons que l'enseignante :

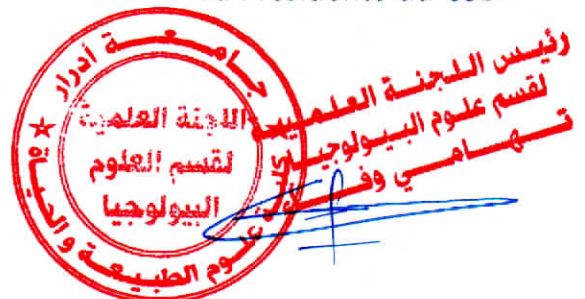
Dr. HADEF Khawla Zahra
Grade : Maître de Conférences Classe A

A élaboré un polycopié pédagogique intitulé « *Génie Génétique* ». Destiné aux étudiants du niveau : 3^{ème} année Licence Biochimie du département des Sciences Biologiques.

Le présent document a été soumis à une expertise sous l'égide du CSD du département, lequel a émis un avis favorable à son édition et à sa diffusion.

Fait à Adrar le 08/03/2026

La Présidente du CSD



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ahmed DRAIA, Adrar
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Biologiques



Polycopié pédagogique

Titre

Polycopié pédagogique de Génie génétique

Préparé par : *Dr. HADEF KH. Z.*

Cours destiné aux étudiants de

Licence (spécialité et niveau) : 3^{ème} année Licence de Biochimie

Année Universitaire : 2025/2026

AVANT-PROPOS

Le module de biologie moléculaire et de Génie génétique s'inscrit au cœur des sciences biomoléculaires modernes à l'Université et vise à inculquer aux étudiants une compréhension solide des outils et des techniques de manipulation du matériel génétique. Avec le développement des biotechnologies, la capacité à isoler, caractériser, modifier et transférer les gènes est essentielle pour la recherche fondamentale, industrielle et médicale. C'est un cours destiné aux étudiants de 3^{ème} année Licence de Biochimie, ce cours de 4 crédits conférant un coefficient de 2 propose un parcours durant lequel l'étudiant doit être en mesure de : maîtriser les outils enzymatiques, notamment les polymérase, les nucléases, les ligases et les enzymes de restriction modification ; comprendre le fonctionnement des système hôte/vecteur et les principes de base du clonage moléculaire; explorer les méthodes d'hybridation moléculaire, de marquage de l'ADN et d'analyse génomique; faire preuve d'application dans les techniques de l'amplification génique et de la production de protéine recombinant à des fins thérapeutiques; maîtriser les analyses de l'expression génique en termes de modification du matériel génétique; comprendre les possibilités biotechnologique de l'ADN recombinante dans divers domaines. Ce cours est basé sur les connaissances en biochimie et en génétique acquise en deuxième année licence. Ce module n'a pas pour objectif d'enseigner seulement les techniques expérimentales et analytiques du génie génétique, mais également de fournir aux étudiants les compétences nécessaires pour concevoir et interpréter des expériences en biologie moléculaire et apprécier la portée de ces études en vue de la recherche ou de l'application clinique. Pour ces raisons, il représente une étape importante dans la formation des biologistes et des biotechnologistes de demain.

Liste de figures

Figure 01. Différentes étapes en génie génétique	2
Figure 02. Digestion totale d'une population de molécules identiques d'ADN	3
Figure 03. Nomenclature de l'enzyme EcoRI	4
Figure 04. Couple <i>EcoRI</i> (enzyme de restriction de type II) / <i>EcoRI</i> méthylase	7
Figure 05. Détection des sites de liaison des protéines sur l'ADN par la technique de "foot printing"	9
Figure 06. Utilisation du nucléase S1 pour la détermination du site d'initiation de la transcription	10
Figure 07. Hydrolyse des extrémités 5' de l'ADN db par l'exonucléase de phage λ	10
Figure 08. Hydrolyse des extrémités 3' de l'ADN db par l'exonucléase III	11
Figure 09. Digestion de l'ARN simple brin par l'RNase	11
Figure 10. Ligation des extrémités cohésives des enzymes de restriction	12
Figure 11. A : Représentation graphique des plasmides en passant par les pores aqueux dans la membrane plasmique. B : Phénomène d'électroporation	18
Figure 12. Biolistique	19
Figure 13. Micro-injection d'ADN	19
Figure 14. Propriétés essentielles d'un bon vecteur	21
Figure 15. Vecteur de clonage et vecteur d'expression	21
Figure 16. Plasmide de première génération	22
Figure 17. Clonage d'un ADN coupé par <i>PstI</i> dans pBR322	22
Figure 18. Carte de restriction de plasmides de deuxième génération	23
Figure 19. Vecteurs d'expression du phage λ	24
Figure 20. Cycles lysogéniques et lytiques du phage λ	25
Figure 21. Clonage du bactériophage M13MP19	25
Figure 22. Exemple de phagémide pBlue script II	26
Figure 23. Présentation d'un cosmide	27
Figure 24. Exemple d'un vecteur navette YEplac195	27

Figure 25. Présentation d'un vecteur BAC	28
Figure 26. Présentation d'un vecteur YAC	29
Figure 27. Présentation d'un plasmide Ti	30
Figure 28. Transformation génétique végétale par plasmide Ti modifié d'Agrobacterium	31
Figure 29. Clonage non directionnel et directionnel	32
Figure 30. Clonage d'un gène dans le plasmide pBR322	33
Figure 31. Clonage d'un gène dans le vecteur pUC19	34
Figure 32. Southern Blot	39
Figure 33. Northern Blot	40
Figure 34. Hybridation sur chromosomes (FISH)	41
Figure 35. Construction des banques génomiques (A) et des banques d'ADNc (B)	43
Figure 36. Hybridation moléculaire de la sonde	45
Figure 37. Criblage d'une banque ADN	46
Figure 38. Extraction de l'ADN	49
Figure 39. Technique d'électrophorèse	50
Figure 40. Visualisation des bandes d'ADN	51
Figure 41. Étapes de la PCR	52
Figure 42. Réaction d'amplification d'ADN	53
Figure 43. Recherche d'un gène à partir de l'ADN génomique d'une plante par Southern blot	54
Figure 44. Principe de la technique de séquençage enzymatique de Sanger utilisant le ddNTP	56
Figure 45. Plantes transgéniques par Agrobacterium tumefaciens et plasmide Ti	59
Figure 46. Animaux transgéniques par transformation d'ovule fécondé	60

Liste de tableau

Tableau 01. Quelques enzymes de restriction	3
Tableau 02. Types de vecteurs en fonction des cellules hôtes	20

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

ARN : Acide Ribonucléique.

PCR : Polymerase Chain Reaction.

CRISPR-Cas9 : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats associated protein 9.

E. coli : *Escherichia coli*.

res- : résistant négatif ou absence de résistance à un antibiotique.

recA : gène recombination A.

F- : cellule sans plasmide F.

lac- : gène lactose négatif (mutation dans l'opéron lac).

lacZ : gène codant pour l'enzyme β -galactosidase.

ADNc : ADN complémentaire.

F/Hfr : High-frequency recombination, cellule contenant un plasmide F intégré dans le chromosome.

pb : paire de bases

TAE: Tris-Acetate-EDTA.

TBE : Tris-Borate-EDTA.

SB : Sodium Borate.

Sommaire

Préface	I
Liste des figures	II
Liste des tableaux	IV
Liste des abréviations	IV
Sommaire	V
Introduction	1
Chapitre I. Outils enzymatiques du génie génétique : Polymérase, nucléases, ligases, enzymes de restriction/ modification.	2
I.1. Enzymes de restriction	3
I.1.1. Classification des enzymes de restriction	4
I.1.2. Unité d'activité d'une enzyme	6
I.1.3. Système de restriction méthylation	6
I.1.4. Modes de coupure de l'ADN par les enzymes de restriction	7
I.2. Outils enzymatiques du génie génétique	8
I.2.1. Polymérase	8
I.2.2. Nucléases	9
I.2.2.1. Endonucléase de restriction	9
I.2.2.2. Types d'enzymes de restriction	9
I.2.2.3. Exonucléases	10
I.2.2.4. Ribonucléases RNAse	11

I.2.3. Ligases	11
I.2.3.1. T4 DNA ligase	12
I.2.3.2. Mécanisme en trois étapes	12
I.2.3.3. Conditionne l'efficacité des ligations	12
I.2.4. Systèmes de restriction/modification	12
I.2.4.1. Phosphatases	13
1.2.5. Bonnes pratiques et dépannage	13
Chapitre II. Les systèmes hôtes-vecteurs et clonage moléculaire	15
II.1. Cellule hôtes	15
II.1.1. Hôtes bactériens	15
II.1.2. Hôtes eucaryotes	16
II.1.2.1. Levures <i>Saccharomyces cerevisiae</i> et <i>Pichia pastoris</i>	16
II.1.2.2. Cellules d'insectes : <i>Sf9</i> / <i>Sf21</i> via baculovirus	16
II.1.2.3. Cellules de mammifères : HEK293, CHO	17
II.1.2.4. Systèmes acellulaires (sans cellules)	17
II.2. Méthodes physique d'introduction de l'ADN	17
II.2.1. Électroporation	18
II.2.2. Biolistique	18
II.2.3. Micro-injection	19
II.3. Vecteurs de clonage	19

II.3.1. Plasmides	21
II.3.1.1. Vecteur de première génération PBR322	22
II.3.1.2. Vecteurs de seconde génération pUC19	23
II.3.2. Phages	23
II.3.2.1. Phages lambda	23
II.3.2.2. Bactériophage M13	25
II.3.3. Phagémide	26
II.3.4. Cosmides	26
II.3.5. Vecteur navette	27
II.3.6. Vecteurs BAC	28
II.3.7. Vecteurs YAC	29
II.3.8. Vecteurs d'eucaryotes supérieurs	29
II.3.8.1. Rétrovirus	30
II.3.8.2. Plasmide pTi	30
II.4. Clonage moléculaire	31
Chapitre III. Hybridation moléculaire, sondes et marquage de l'ADN (radioactif et fluorescent)	35
III.1. Hybridation moléculaire	35
III.2. Sondes et marquage de l'ADN	35
III.2.1. Techniques de marquage des sondes nucléiques	36
III.2.1.1. Marquage radioactif	36

III.2.1.2. Marquage enzymatique	37
III.2.1.3. Marquage fluorescent	37
III.2.1.4. Choix de la méthode de marquage	37
III.3. Principales technique d'hybridations moléculaires	38
III.3.1.Southern Blot	38
III.3.2. Northern Blot	39
III.3.3. Hybridation <i>in situ</i> (HIS)	40
III.3.4 Hybridation sur colonies	41
Chapitre IV. Techniques d'analyse et de détermination du génome et de ses modifications, amplification génique : les banques génomique et d'ADNc, amplification sélective in vitro (PCR), production de protéines recombinantes intérêt thérapeutique (insuline, HB, interféron ...), puces ADN	42
IV.1. Banques génomique et d'ADN complémentaire	42
IV.1.1 Banques génomiques	42
IV.1.2. Banques d'ADNc	42
IV.1.3. Construction des banques génomiques	42
IV.1.4. Construction des banques d'ADNc	42
IV.2. Sondes	43
IV.2.1. Sondes qui reconnaissent les protéines : anticorps marqués	43
IV.2.2. Sondes qui reconnaissent les acides nucléiques	44
IV.3. Hybridation moléculaire de la sonde	44
IV.4. Criblage de la banque	45

Chapitre V. Techniques d'analyse de l'expression des gènes, modification du matériel génétique	47
V.1. Extraction et purification des acides nucléiques	47
V.1.1. Extraction de l'ADN à partir de sang	47
V.1.2. Dosage des acides nucléiques	49
V.2. Électrophorèse	49
V.2.1. Gel d'agarose	50
V.2.2. Gel de polyacrylamide	50
V.2.3. Tampons de migration	50
V.3. Amplification de séquences d'ADN	51
V.4. Southern blot	53
V.5. Séquençage	55
V.5.1. Théorie Frederick Sanger	55
V.5.2. Protocole	55
V.5.3. Séquençage automatisé	55
Chapitre VI. Applications biotechnologiques de l'ADN recombinant	57
VI.1. Santé humaine et animale	57
VI.1.1. Protéines thérapeutiques	57
VI.1.2. Vaccins recombinants	57
VI.1.3. Thérapie génique et médecine personnalisée	58
VI.2. Applications en agriculture	58

VI.2.1. Plantes transgéniques	58
VI.2.2. Amélioration animale	59
VI.3. Applications industrielles et environnementales	60
VI.3.1. Production des enzymes et biomolécules	60
VI.3.2. Dépollution et bioremédiation	61
VI.4. Applications en recherche fondamentale	61
VII. Conclusion	62
Travaux dirigés	63
TD1. Cartographie enzymatique et design de stratégie de clonage	64
TD2. RFLP et Southern: diagnostic d'une mutation de site de restriction	67
TD3. Design d'amorces et optimisation PCR	71
TD4. Banques génomiques et d'ADNc / Conception et criblage	73
TD5. Hybridation moléculaire : sondes, marquage et FISH	75
TD6. Contrôle/ validation de clonage recombinant	78
TD7. Protéine thérapeutique produite par voie recombinante	80
TD8. Puces ADN et analyse d'expression	82
Corrigé type des Travaux dirigés	84
Corrigé type TD1. Cartographie enzymatique et design de stratégie de clonage	85
Corrigé type TD2. RFLP et Southern: diagnostic d'une mutation de site de restriction	92
Corrigé type TD3. Design d'amorces et optimisation PCR	100

Corrigé type TD4. Banques génomiques et d'ADNc / Conception et criblage	105
Corrigé type TD5. Hybridation moléculaire : sondes, marquage et FISH	109
Corrigé type TD6. Contrôle/ validation de clonage recombinant	112
Corrigé type TD7. Protéine thérapeutique produite par voie recombinante	115
Corrigé type TD8. Puces ADN et analyse d'expression	118
Références	122

Introduction

L'objectif du génie génétique est d'employer des méthodes permettant de modifier l'ADN ou l'ARN afin de les transformer, les transférer ou d'en contrôler l'expression dans un système biologique différent (**Alberts *et al.*, 2022**). Par conséquent, ces disciplines visent principalement à comprendre la fonction des gènes, à synthétiser des protéines d'intérêt ou à modifier génétiquement des organismes, ces travaux sont généralement réalisés par des spécialistes en génétique (**Watson *et al.*, 2014**). Le développement de la génétique commence par la découverte de la structure de l'ADN par Watson et Crick, et développée à la fin de 1953, suivie de la création des fonds découpés à l'aide de la première enzyme de restriction 1970. Les spécialistes peuvent couper des morceaux d'ADN et coller dans des cellules cibles (**Watson *et al.*, 2014**). Ce premier exemple a rappelé une nouvelle période et un grand nombre de séquences génétiques utilisées. Les branches de la génétique aujourd'hui sont diverses, telles que la thérapie génique : vaccination, production d'insuline ; en agriculture : plantes transgéniques...etc (**James, 2018 ; Cyranoski, 2016**).

La manipulation de l'ADN nécessite des étapes clé :

- Matériel génétique recherché doit être isolé,
- Manipulation du matériel génétique par des enzymes : couper, coller.
- Transfert et répllication de gènes découverts dans les cellules porteuses appropriées.
- Expression et production des protéines prometteuses (**Lodish *et al.*, 2021**).

D'autres outils tels que la PCR, le séquençage et en particulier la technologie CRISPR-Cas9 sont de haute fiabilité. CRISPR-Cas9 est un système de "ciseaux moléculaires" qui permet de modifier l'ADN de manière précise et simple (**Addgene, 2024 ; Doudna & Charpentier, 2014**).

Chapitre I. Outils enzymatiques du génie génétique : Polymérase, nucléases, ligases, enzymes de restriction/ modification.

La connaissance de la nature chimique de l'ADN puis son organisation spatiale ont ouvert de nouvelles perspectives d'études très fines sur l'ADN qui s'inscrivent dans le domaine de la biologie moléculaire (Watson *et al.*, 2014). Le génie génétique désigne toutes les techniques et procédés qui se rapportent aux travaux de recombinaison de l'ADN (Griffiths *et al.*, 2015). Le génie génétique peut être substitué par le terme de manipulation génétique dont la caractérisation est la suivante :

*Formation de nouvelles combinaisons dans le matériel génétique, par insertion de molécules d'acides nucléiques sans système vectoriel quelconque permettant l'incorporation dans un hôte capable d'assumer sa propagation continue (Akh *et al.*, 2025).*

Au cours de la manipulation des gènes, il est nécessaire d'obtenir de l'ADN purifié et de construire une nouvelle molécule d'ADN recombinée par l'introduction d'une petite molécule d'ADN dans un vecteur. Pour cela, cette manipulation génétique nécessite des différentes étapes à entreprendre, ces étapes sont résumées comme suit :

- Isolement d'une séquence d'acide nucléique (un gène),
- Insertion de ce gène dans un vecteur (plasmide ou phage),
- Incorporation de ce vecteur dans un hôte (*E.coli*, cellule eucaryote...),
- Hôte ainsi transformé peut assurer la propagation du vecteur et son amplification ainsi on aboutit à la formation d'un clone (Griffiths *et al.*, 2015).

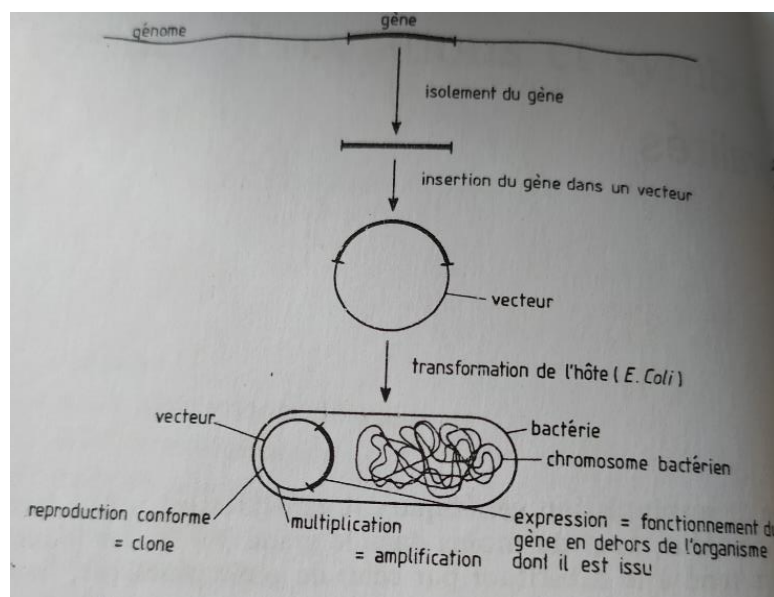


Figure 01. Différentes étapes en génie génétique (Maftah *et al.*, 2018)

Ces différentes manipulations sont effectuées avec des enzymes spécifiques.

I.1. Enzymes de restriction

Ce sont des endonucléases très spécifiques, capables d'identifier des séquences nucléotidiques uniques au sein de la molécule d'ADN et de provoquer une cassure double brin dans ou à proximité de ces sites de reconnaissance, générant ainsi des fragments d'ADN de tailles définies (figure 02).

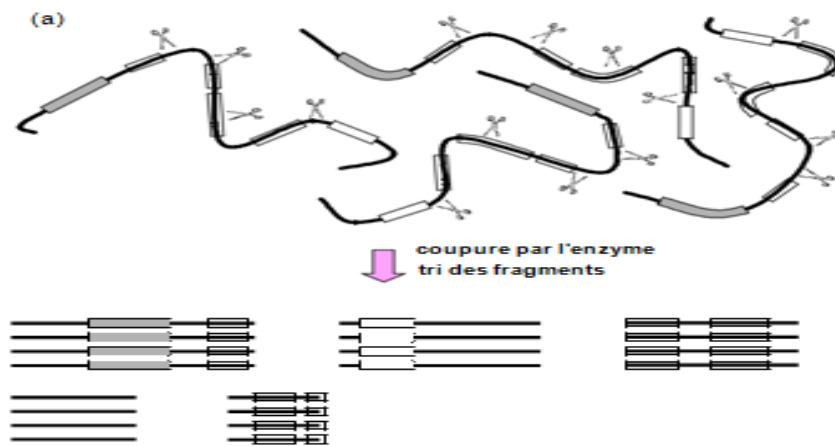


Figure 02. Digestion totale d'une population de molécules identiques d'ADN (Maftah *et al.*, 2018)

Plusieurs centaines d'enzymes de restriction sont actuellement connues ; on les retrouve naturellement dans un grand nombre d'espèces de Bactéries (une souche peut porter jusqu'à une dizaine d'enzymes de restriction).

Tableau 01. Quelques enzymes de restriction (Peycru *et al.* 20138)

Enzyme de restriction	Source bactérienne	Séquence de reconnaissance	Type de coupure
HpaI	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	5'GTT/AAC CAA/TTG5'	Franche
EcoRI	<i>E. coli</i>	5'G/AATTC CTTAA/G5'	Cohésive
BamHI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	5'G/GATCC CCTAG/G5'	Cohésive

HindIII	<i>Haemophilus influenzae</i>	5'A/AGCTT TTCGA/A5'	Cohésive
PstI	<i>Providencia stuarti</i>	5'CTGCA/G G/ACGT5'	Cohésive

➤ Nomenclature des enzymes de restriction

Le nom d'une enzyme est dérivé du nom de l'espèce ou de la souche dans laquelle elle a été découverte. Exemple : enzyme *Pvu* II a été isolé de *Proteus vulgaris*, *Sau* 3AI provient de *Staphylococcus aureus* 3A, etc..

La nomenclature des enzymes de restriction se fait comme expliqué dans la figure suivante, on prend comme exemple EcoRI :

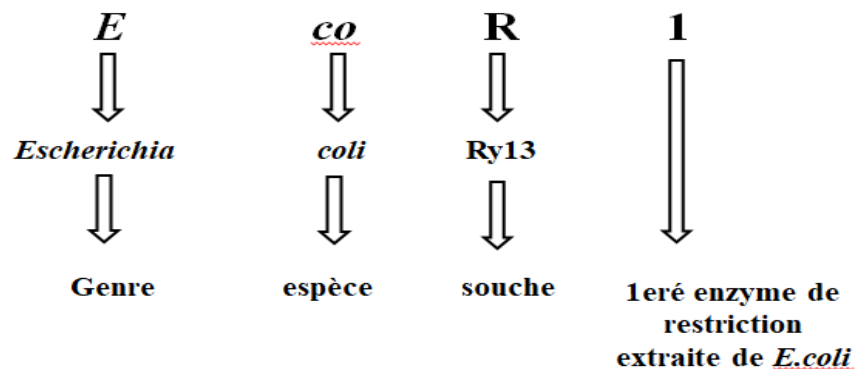


Figure 03. Nomenclature de l'enzyme EcoRI (Alberts *et al.*, 2015)

Le chiffre romain indique l'ordre de la caractérisation de l'enzyme chez la même souche.

I.1.1. Classification des enzymes de restriction

Les enzymes sont souvent des protéines présentant des propriétés de catalyse spécifique d'une réaction chimique. Elles sont réparties en 6 classes :

1. Oxydoréductases: catalysent les réactions redox.
2. Transférases: transfèrent d'un groupement fonctionnel.
3. Hydrolases: catalysent l'hydrolyse de différentes liaisons.
4. Lyases: Coupe des liaisons variées sans réaction d'hydrolyse ou de redox.

5. Isomérase: isomérisation au niveau de la même molécule.

6. Ligases: joins deux molécules par une liaison covalente (**Berg *et al.*, 2019**).

Il existe trois types d'enzymes (**Type I, II et III**) de restriction isolées des bactéries.

- Type I : l'enzyme reconnaît sa séquence puis se déplace sur l'ADN de manière aléatoire de 1000 à 5000 paires de nucléotides et coupe.
- Type II : une fois la séquence reconnue, l'enzyme coupe l'ADN au niveau de cette séquence.
- Type III : après reconnaissance de la séquence spécifique, cette enzyme coupe l'ADN une vingtaine de nucléotides plus loin (**Roberts *et al.*, 2015; Watson *et al.*, 2014**).

Ce sont les enzymes de type II qui sont couramment utilisées en biologie moléculaire, à cause des propriétés suivantes :

- La séquence reconnue à une distance définie du site.
- Les fonctions d'endonucléase et de méthylation sont dissociables, car portées par des protéines distinctes ; on peut purifier et utiliser les deux enzymes indépendamment.
- Les extrémités générées peuvent être cohésives ou franches ; la coupure de la liaison phosphodiester laisse une extrémité 3'-OH et une extrémité 5'-phosphate. Cette dernière propriété est importante pour la manipulation de gènes ; ces extrémités sont des substrats des ligases (**Roberts *et al.*, 2015**).

Deux enzymes qui reconnaissent la même séquence sont appelées isoschizomères.

- Elles peuvent couper au niveau des mêmes bases (ex. *MboI* (*GATC), *Sau3AI* (*GATC))
- au centre (GA*TC),
- ou non (ex. *MboI* (*GATC), *DpnI* (GA*TC)).

Des isochizomères peuvent avoir différentes sensibilités à la méthylation de leur substrat (ex. *Sau3AI* coupe la séquence G^mATC ; *MboI* ne la coupe pas).

Deux enzymes sont dites compatibles si elles laissent des extrémités identiques. Par exemple *Sau3AI* (*GATC), *BamHI* (G*GATCC), *BglIII* (A*GATCT), et *BclI* (T*GATCA)

laissent toutes des extrémités 5' sortant GATC : les extrémités laissées par des enzymes compatibles peuvent s'apparier. Les fragments peuvent alors être liés covalentement par l'action des ADN ligases (**Lodish *et al.*, 2021**).

I.1.2. Unité d'activité d'une enzyme

Une unité d'enzyme est la quantité minimale d'enzyme nécessaire pour digérer totalement tous les sites présents dans un microgramme (μg) d'un ADN, dans les conditions optimales de fonctionnement de l'enzyme (pH, sels, température...).

I.1.3. Système de restriction méthylation

L'ADN de la bactérie productrice d'une enzyme de restriction portera lui aussi des séquences de reconnaissance ; l'activité endonucléolytique sur le chromosome serait nuisible, voire fatale. Dès 1953, on avait observé que lorsque des molécules d'ADN provenant d'une souche d'*E.coli* sont introduites dans une autre souche, elles ne sont que très rarement exprimées. Pour s'en protéger, la bactérie synthétise l'enzyme de modification correspondante : cette enzyme reconnaît le même site que l'enzyme de restriction et lie covalentement un groupement méthyle aux résidus adénine ou cytosine de la séquence cible. La méthylation ne modifie pas les propriétés d'appariement des bases mais fait saillie dans l'un des sillons de l'hélice d'ADN empêchant ainsi l'enzyme de restriction de s'associer à l'ADN ; le chromosome devient résistant. Ce sont des systèmes de restriction / modification.

Ces enzymes reconnaissent de courtes séquences, souvent des palindromes, particulières à une enzyme donnée. En présence de Mg^{2+} elles effectuent une coupure (Elles hydrolysent la liaison phosphodiester) dans chacun des deux brins de la molécule d'ADN (**Lodish *et al.*, 2021 ; Roberts *et al.*, 2015**).

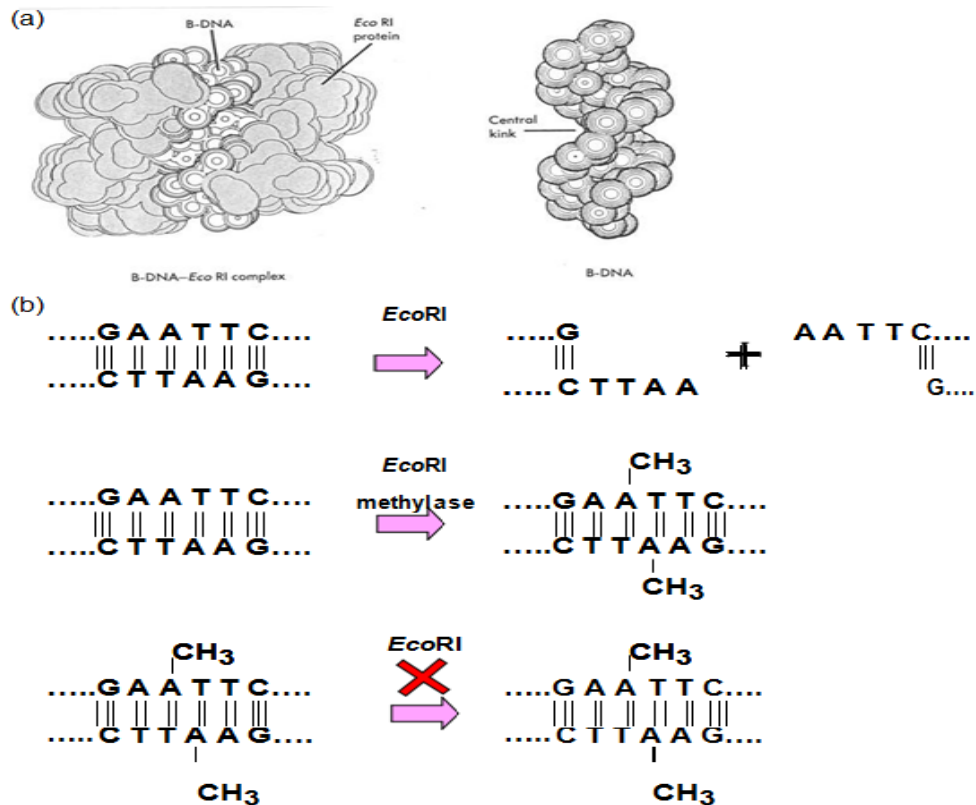


Figure 04. Couple *EcoRI* (enzyme de restriction de type II) / *EcoRI* méthylase. (Gailardin et Tinsley, 2007).

(a) Modèle d'un complexe entre un dimère de l'enzyme de restriction *EcoRI*, et l'ADN de séquence Le site, GAATTC, reconnu par l'enzyme est représenté en gras.



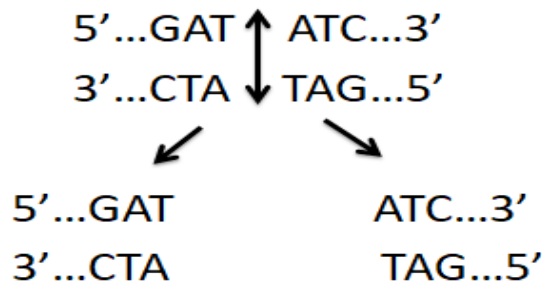
(b) Dans son hôte d'origine, l'activité de l'enzyme de restriction est bloquée par une enzyme de modification (souvent une méthylase) qui reconnaît le même site et modifie l'une des bases. L'exemple montre les effets des enzymes *EcoRI*, et *EcoRI* méthylase.

I.1.4. Modes de coupure de l'ADN par les enzymes de restriction

Les sites de restriction sont de petites séquences coupées par les enzymes de restriction provoquent ainsi deux types de coupure :

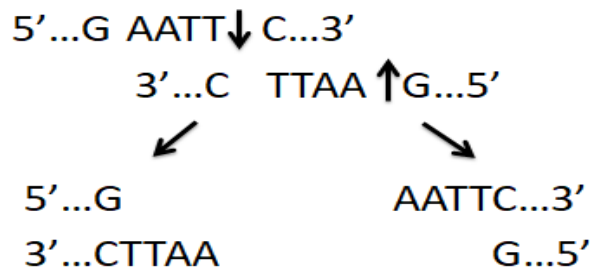
- **Coupages à bouts francs:** coupure au milieu du site de restriction pour donner deux fragments à extrémités franches.

Exemple : site de restriction de *EcoRV*



- **Coupages a bouts cohésifs (ou collants) :** coupure de part et d'autre du centre de symétrie du site de restriction pour donner deux fragments à extrémités cohésives. Grâce a ce type d'enzymes, deux ADN d'origine différente coupée par une même enzyme de restriction produisant des extrémités cohésives peuvent être mis bout a bout puis ligatures. C'est une propriété très utilisée dans les recombinaisons génétiques in vitro (Roberts *et al.*, 2015; Watson *et al.*, 2014).

Exemple : site de restriction de EcoRI



I.2. Outils enzymatiques du génie génétique

Il s'agit de polymérases telles que les enzymes qui synthétisent un brin nucléotidique complémentaire à partir d'un modèle qui intervienne dans la réplication, la réparation, la PCR, et de nombreuses préparations d'ADN/ARN en laboratoire (Gablo, 2024).

I.2.1. Polymérases

- Les exemples incluent le Pol I complet de l'ADN **polymérase I** d'*E. coli* et le fragment de Klenow : le Pol I dispose d'une activité polymérase 5'→3' et deux exonucléases (5'→3' et 3'→5') pour éliminer les amorces, combler les lacunes ; le fragment de Klenow conserve la polymérase et la relecture 3'→5' mais a perdu l'exonucléase 5'→3', ce qui le rend utile pour lisser/remplir des extrémités avant ligature, la synthèse de sondes et certaines étapes de préparation d'échantillons (Lodish *et al.*, 2021 ; Alberts *et al.*, 2015).

- La **Taq polymérase** est issue de *Thermus aquaticus*, catalyse la synthèse 5'→3' d'une manière optimale autour de 72 °C et supporte les cycles thermiques de la PCR pour l'amplification rapide des fragments de quelques kb. Sa stabilité thermique signifie qu'on ne l'ajoute qu'au démarrage et qu'on ne l'épuise pas dans chaque cycle (**Lodish et al., 2021 ; Alberts et al., 2015**).

Note : Choisissez Taq pour PCR diagnostics rapides ; opter pour des polymérases haute fidélité pour le clonage de gènes et l'expression de protéines et utiliser Klenow comme lissage/remplissage d'extrémités en vue de ligature.

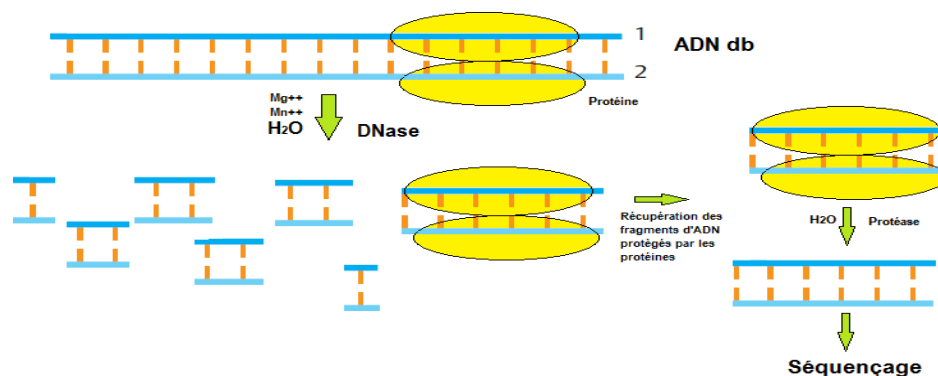


Figure 05. Détection des sites de liaison des protéines sur l'ADN par la technique de "foot printing" (**Aouf, 2016**)

I.2.2. Nucléases

Les nucléases coupent les liaisons phosphodiester de l'ADN; elles sont divisées en exonucléases qui dégradent depuis les extrémités et endonucléases qui coupent en sites internes (**Lodish et al., 2021**).

I.2.2.1. Endonucléase de restriction

Une enzyme bactérienne qui reconnaît des séquences spécifiques, souvent palindromiques, et les clivent; les plus utilisées pour la biologie moléculaire sont de Type II, car elles coupent globalement à l'intérieur ou proximité immédiate du site reconnu, générant des fragments reproductibles qui peuvent être soumis au clonage (**Sigma-Aldrich, 2006**).

I.2.2.2. Types d'enzymes de restriction

Type I et III coupent à des positions éloignées, Type II au site spécifique, et d'autres classes existent en fonction de cofacteurs et substrats reconnus.

Astuce pratique: combiner deux enzymes générant des extrémités cohésives mais non compatibles pour réduire l'auto-ligation et orienter le vecteur vers l'insert (Lodish *et al.*, 2021).

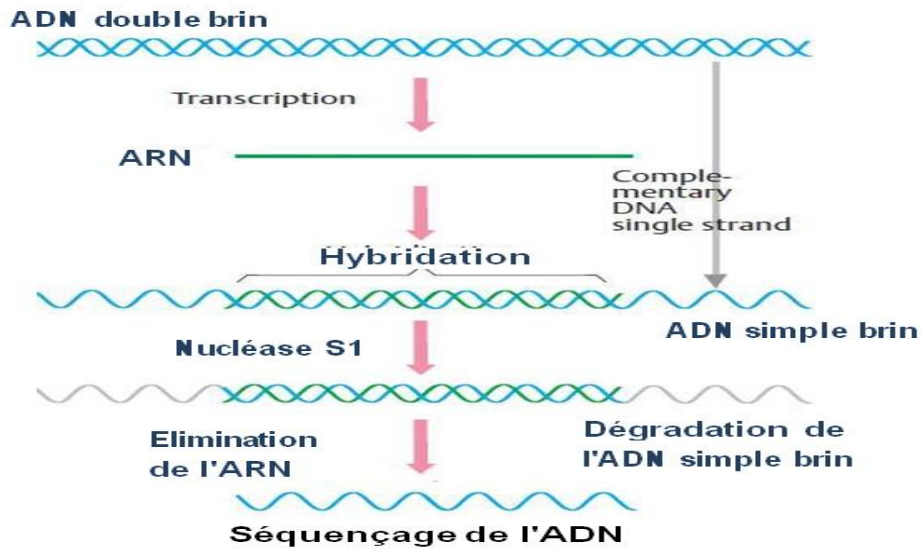


Figure 06. Utilisation du nucléase S1 pour la détermination du site d'initiation de la transcription (Aouf, 2016)

I.2.2.3. Exonucléases

L'exonucléases coupent les nucléotides un par un à partir d'une chaîne polynucléotidique avec une spécificité soit de l'extrémité 5' (coupure 5'--3'), soit de l'extrémité 3' (coupure 3'--5').

- a. **Exonucléase de phage λ** , elle est aussi rencontrée chez le T4 ou, ainsi que chez les animaux (DNase IV) hydrolyse de préférence les extrémités 5'-phosphate des DNA double brin en continuant vers le côté 3' (5' à 3' exonucléase). Elle produit des nucléosides 5'- phosphate. Cette enzyme est produite par les cellules bactériennes infectées par les phages.

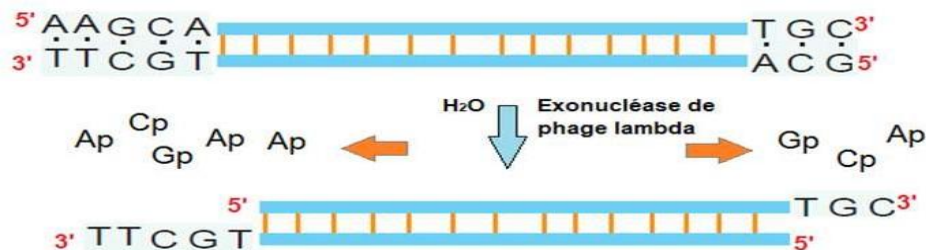


Figure 07. Hydrolyse des extrémités 5' de l'ADN db par l'exonucléase de phage λ (Aouf, 2016)

b. **Exonucléase III**, produite par *E. coli*, et aussi par *Haemophilus influenza*, au contraire de l'exonucléase de phage λ , hydrolyse de préférence les extrémités 3' des ADN doubles brin en remontant vers le coté 5' (3' à 5' exonucléase). Elle produit des nucléotides 5'-phosphate.

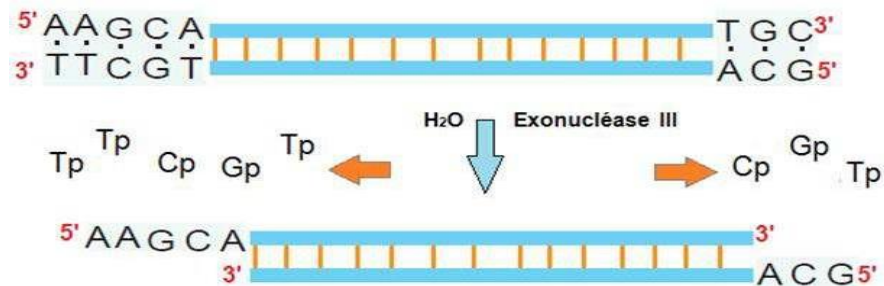


Figure 08. Hydrolyse des extrémités 3' de l'ADN db par l'exonucléase III
(Aouf, 2016)

I.2.2.4. Ribonucléases RNase

Cette hydrolase agit comme une endonucléase. Exemples : **RNase A** très spécifique et thermostable qui hydrolyse l'ARN simple brins après les pyrimidines (U, C) et la **RNase H** qui hydrolyse l'ARN dans les hybrides ARN/ADN (Lodish *et al.*, 2021).

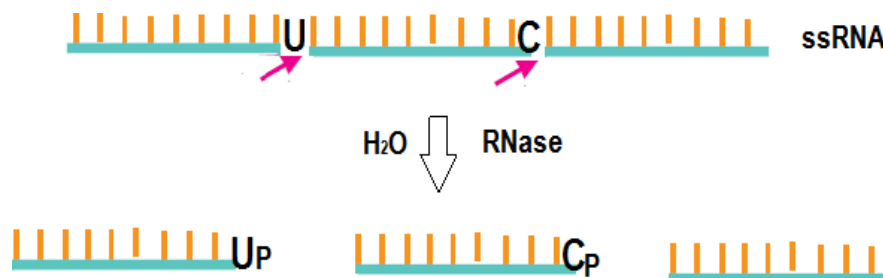


Figure 09. Digestion de l'ARN simple brin par l'RNase.
(Aouf, 2016)

I.2.3. Ligases

Scellage des brèches par formation de la liaison phosphodiester entre un 5'-phosphate et un 3'-OH adjacents.

I.2.3.1. T4 DNA ligase

Excellente ligase ATP-dépendante; relie les extrémités cohésives, les extrémités franches, répare les “nicks” dans des duplex ADN, ARN ou hybrides ADN/ARN ; fonctionne à basse température pour permettre l'appariement des extrémités cohésives.

I.2.3.2. Mécanisme en trois étapes

Formation d'un intermédiaire enzyme-AMP, transfert de l'AMP sur le 5'-phosphate de l'ADN, transestérification formant la liaison et libérant l'AMP ; cela est variable selon l'efficacité de la formation de complexes transitoires et stables de l'enzyme avec l'ADN qui, chez les extrémités franches,

I.2.3.3. Conditionne l'efficacité des ligations

Les ratios insert: vecteur ainsi que les températures et la durée d'incubation associés aux qualités des extrémités phosphorylées conditionnent le rendement en complexes recombinants ; des protocoles standardisés sont disponibles chez les fournisseurs (**Gajiwala et al., 2018**).

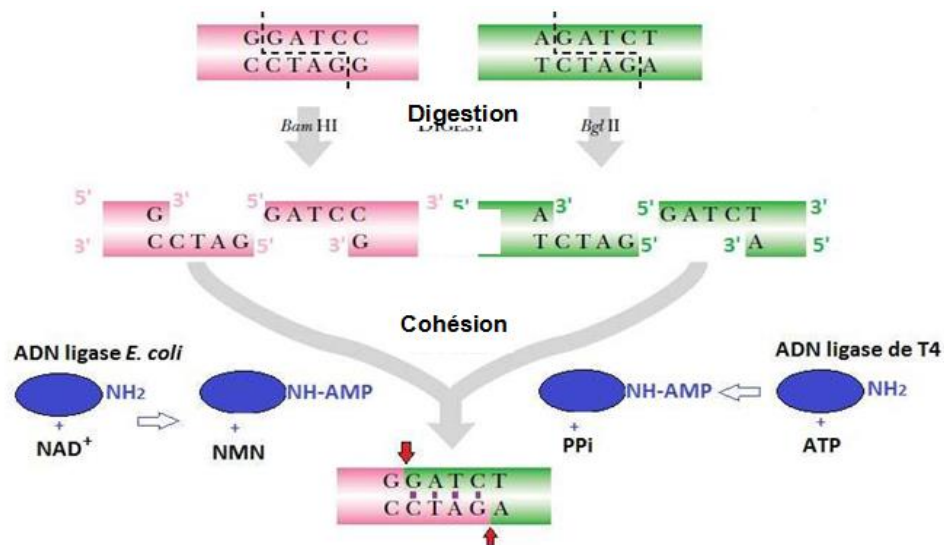


Figure 10. Ligation des extrémités cohésives des enzymes de restriction.

L'enzyme ligature les extrémités 3'-OH et 5'-phosphate (**Aouf, 2016**)

I.2.4. Systèmes de restriction/modification

Les systèmes bactériens associent des endonucléases de restriction à des méthyltransférases qui modifient l'ADN, le protégeant ainsi du clivage, tandis que l'ADN « étranger » non

méthylé est clivé. Ce principe est exploité lors du clonage à l'aide d'enzymes de restriction spécifiques.

- **Intérêt pratique** : choix de souches hôtes et d'enzymes compatibles avec les profils de méthylation, et anticipation de l'impact de la méthylation sur le clivage.

- **Intérêt pédagogique** : la notion de protection par méthylation explique la spécificité apparente des enzymes de restriction et justifie la planification de la digestion en fonction du contexte épigénétique du substrat.

- **Enzymes complémentaires** : Plusieurs autres fonctions enzymatiques accompagnent couramment le processus de clonage, d'expression et d'analyse.

I.2.4.1. Phosphatases

- ✓ La phosphatase alcaline déphosphoryle l'extrémité 5' du vecteur afin de réduire l'autoligation, augmentant ainsi la proportion de clones recombinants lors de la transformation et du criblage bleu/blanc.
- ✓ Les ligases/ligases d'ARN dérivées de T4, utiles pour la ligation d'adaptateurs lors de la préparation d'ARN/miARN et dans certaines méthodes de qPCR, illustrent la polyvalence de la chimie de ligation en ingénierie des acides nucléiques.
- ✓ Les nucléases programmables de nouvelle génération, comme CRISPR (Cas9), ne correspondent pas à la définition classique des enzymes de restriction, mais sont désormais des ciseaux génomiques essentiels, générant des coupures double brin de 3 à 4 nucléotides en amont pour l'édition de gènes (**Addgene, 2024 ; Doudna & Charpentier, 2014**).

1.2.5. Bonnes pratiques et dépannage

- Qualité des extrémités : attention aux phosphates 5' et aux extrémités cohésives ; polissage/remplissage si nécessaire ; traitement de Klenow pour caneler les extrémités avant la ligation.
- Sélection des enzymes : privilégier les enzymes de type II pour la précision, vérifier la sensibilité à la méthylation et sélectionner des tampons de double digestion compatibles pour une efficacité maximale.

Contrôles et criblage : inclure des contrôles de ligation sans insert et des criblages bleu/blanc pour estimer le bruit de fond et sélectionner efficacement les clones recombinants (**Byju's. 2022; Brown, 2016**).

Chapitre II. Systèmes hôtes-vecteurs et clonage moléculaire

Objectifs du chapitre est de définir un système hôte-vecteur et identifier ses composants essentiels. Comparer les principaux hôtes et vecteurs selon leur utilisation, leur portée et leur plateforme. Maîtriser les méthodes de clonage. Apprendre à transformer/transfecter, sélectionner et cribler les clones. Et éviter les erreurs de manipulation (stabilité des plasmides, toxicité des inserts, recircularisation, faux positifs) et adopter les bonnes pratiques.

II.1. Cellule hôtes

Pour se répliquer, un vecteur doit être incorporé dans une cellule hôte spécifique de chaque type de vecteur. Si le vecteur est un plasmide, la cellule hôte est une bactérie. La cellule hôte ne doit pas modifier ou détruire l'ADN recombiné qui y a été introduit. Pour obtenir de grande quantité d'ADN cloné l'hôte idéal doit :

- ✓ Se développer rapidement dans un milieu de culture peu onéreux.
- ✓ Être non pathogène.
- ✓ être capable d'incorporer l'ADN.
- ✓ Être stable en culture
- ✓ Possède des enzymes appropriées pour la réplication du vecteur (**Griffiths et al., 2015**).

Les hôtes répondant à ces critères sont des microorganismes eucaryotes ou procaryotes dont les génomes sont bien connus car entièrement séquencés, génétiquement manipulables. On distingue deux catégories d'hôtes :

II.1.1. Hôtes bactériens

Parmi ceux-ci, les bactéries, en particulier *Escherichia coli*, sont les hôtes les plus largement utilisés en génie génétique. Cela est dû à leur croissance rapide, leur faible coût d'entretien et leur facilité de manipulation. En tant que bons hôtes modèles, les souches d' *E. coli* destinées au génie génétique sont non pathogènes et génétiquement modifiées de sorte qu'elles ne puissent pas facilement se propager dans l'environnement. Une des principales exigences de la souche est qu'elle doit être res- marquer, ce qui signifie qu'elle ne doit pas produire d'enzymes de restriction qui pourraient dégrader l'ADN étranger. Il est également typique de bloquer recA, car la recombinaison entre l'ADN recombinant et l'ADN bactérien doit être évitée. En cas de besoin de protéines non réactives, un génotype F- marquage est

souhaitable, qui rend la souche ciblée de réception aucun donneur. Pour certaines applications, des souches Lac⁻ sont disponibles. *E. coli* reste l'hôte de choix pour le clonage et l'expression de protéines recombinantes, en raison de son haut rendement en plasmides et protéines. Cependant, l'absence de modifications post-traductionnelles eucaryotes et la formation possible de corps d'inclusion insolubles sont des limites. Elle est particulièrement utile pour le clonage standard, la construction de banques d'ADN/ADNc et l'expression de protéines simples (Terpe, 2006).

II.1.2. Hôtes eucaryotes

Lorsque les systèmes procaryotes ne suffisent pas, les cellules eucaryotes, en culture animale, levures ou plantes, sont en revanche employées, en tant qu'hôtes. Leur manipulation demeure toutefois compliquée et chère, limitant leur usage à des cas bien spécifiques : l'emploi de vecteurs à origine de répllication eucaryote, l'étude de la régulation in vivo d'un gène eucaryote, ou l'expression de protéines nécessitant des modifications post-traductionnelles impossibles à réaliser chez les bactéries, comme la glycosylation (Ahmad *et al.*, 2014).

II.1.2.1. Levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Pichia pastoris*

Parmi ces hôtes, les levures, en particulier *Saccharomyces cerevisiae* et *Pichia pastoris*, se rapprochent d'un parfait compromis entre les hôtes précédemment vus. Ce sont des systèmes procaryotes et eucaryotes à la fois, en androgénétique. Leur croissance rapide, leur manipulation simple, leurs capacités de modification post-traductionnelle et de sécrétion des protéines en font des hôtes très fréquents. Cependant, les levures, comme déjà vu, n'effectuent pas la glycosylation des protéines de la même manière que celle des mammifères, ce qui peut déstabiliser la protéine (Romanos *et al.*, 1992). Les levures sont, en définitive, employées pour la forte expression de gènes eucaryotes et le développement de systèmes YAC (*Yeast Artificial Chromosomes*).

II.1.2.2. Cellules d'insectes : *Sf9* / *Sf21* via baculovirus

Les systèmes baculovirus-insectes, tels que *Sf9* et *Sf21*, permettent une forte expression et une production élaborée de protéines complexes présentant des modifications post-traductionnelles proches de celles des mammifères (Kost *et al.*, 2005). Bien que plus difficiles

à mettre en œuvre que les systèmes bactériens ou de levure, ils constituent une plateforme robuste pour la production de protéines multi-sous-unités et d'enzymes eucaryotes (**Van Oers & Pijlman, 2012**).

II.1.2.3. Cellules de mammifères : HEK293, CHO

Les cellules de mammifères, en particulier les lignées HEK293 et CHO, sont le système de référence pour la production de protéines thérapeutiques, car la fidélité de leurs modifications post-traductionnelles et leur activité biologique native sont presque identiques à celles des protéines humaines (**Wurm, 2004**). Néanmoins, leur utilisation est pertinente, leur rendement est fréquemment faible en plus de la longue durée de culture par rapport aux autres systèmes (**Lai et al., 2013**). Ils sont largement utilisés pour la validation fonctionnelle et la bioproduction à des fins thérapeutiques.

II.1.2.4. Systèmes acellulaires (sans cellules)

Les systèmes acellulaires basés sur des extraits cellulaires dépourvus de membranes assurent la production rapide et limitée des protéines sans la contrainte de la viabilité cellulaire (**Gregorio et al., 2019**). Ces systèmes sont utiles pour le prototypage, la production de protéines toxiques et toute application nécessitant un contrôle rigoureux des paramètres de production (**Silverman et al., 2020**). Leur principal inconvénient est un coût élevé en plus de l'impossibilité de produire à grande échelle.

II.2. Méthodes physiques d'introduction de l'ADN

Il existe de nombreuses méthodes établies pour introduire l'ADN dans des cellules hôtes, qui peuvent être classées en fonction des méthodes de transfert physique ou biologique pouvant être utilisées pour de nombreux organismes. L'ADN peut être transféré par transformation de l'ADN libre, par transduction via des bactériophages, ou par conjugaison, impliquant un contact direct via un pilus et le facteur F/Hfr, chaque mécanisme conduisant à une recombinaison avec l'ADN du récepteur (**Sun, 2018**).

II.2.1. Électroporation

L'électroporation consiste à appliquer un champ électrique bref et contrôlé qui déstabilise la membrane plasmique pour créer des pores permettant à l'ADN extracellulaire d'entrer sans lyser la cellule. Cette méthode est utilisée chez les bactéries, telles que *E. coli*, les protoplastes végétaux et les cellules animales, y compris les zygotes, facilitant l'entrée d'acides nucléiques à travers la membrane dans le noyau (Potter, 1988).

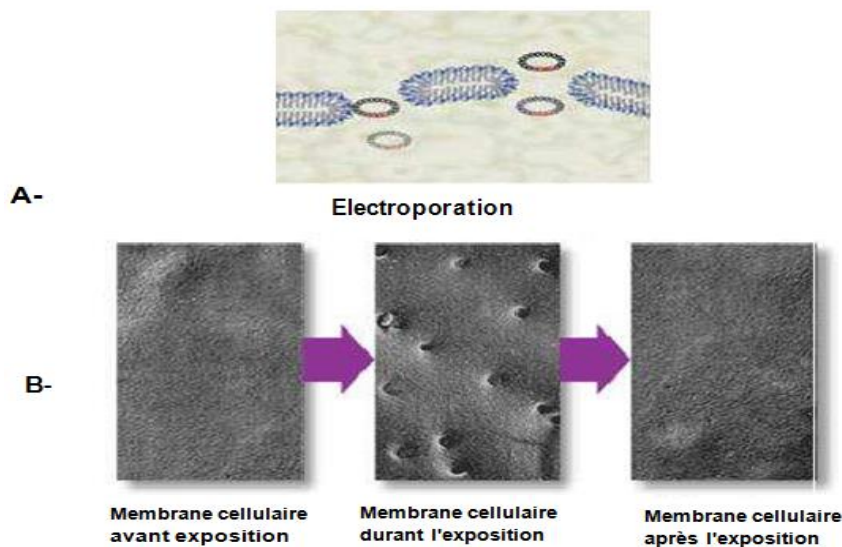


Figure 11. A : Représentation graphique des plasmides en passant par les pores aqueux dans la membrane plasmique. B : Phénomène d'électroporation (Aouf, 2016)

II.2.2. Biolistique

La biolistique, également connue sous le nom de bombardement de particules, utilise un canon à particules pour propulser des microbilles inertes, généralement composées d'or ou de tungstène, enveloppées d'ADN ou d'ARN ayant l'ADN, pour les transpercer localement les membranes à l'intérieur des cellules végétales. Après insertion et expression du transgène dans les cellules, une plante entière peut être régénérée par culture in vitro de tissus exprimant le gène d'intérêt (Christou, 1992).

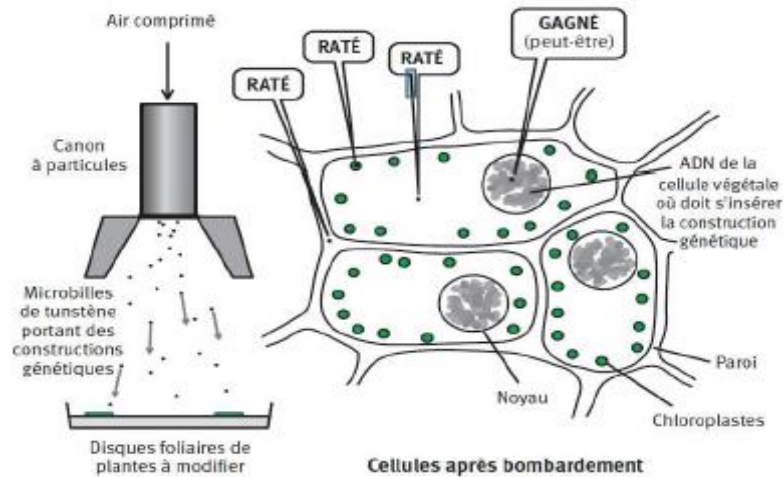


Figure 12. Biolistique (Aouf, 2016)

II.2.3. Micro-injection

La microinjection consiste à introduire de l'ADN directement dans le cytoplasme ou le noyau à l'aide d'une micropipette, contrôlant ainsi la dose et le compartiment. Cette approche est couramment utilisée chez les animaux, tels que l'injection pronucléaire ou le zygote, mais elle peut également être utilisée si un accès intracellulaire direct est nécessaire pour les protoplastes (Crossway *et al.*, 1986).

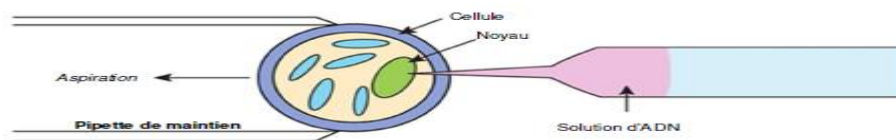


Figure 13. Micro-injection d'ADN. (NPTEL, 2015)

II.3. Vecteurs de clonage

Un vecteur de clonage est une petite molécule d'ADN capable de se répliquer de manière autonome. Il transporte un ADN étranger dans une cellule hôte pour sa réplification par cette dernière, le modifiant et produisant de nombreuses copies de la molécule en l'absence d'ADN (Sambrook & Russell, 2001). Ceci permet l'insertion et la multiplication d'un fragment d'ADN étranger sans altérer la répllication ni la stabilité du vecteur.

Tableau 02. Types de vecteurs en fonction des cellules hôtes (**Peycru, 2018**)

Cellule hôte	Types de vecteurs utilisés	Exemples/précisions
Bactéries	Plasmides, cosmides, phagemides, BAC, virus bactériens	pUC, pBR, λ (lambda), BAC
Levures	YAC, plasmides, ARS	YEp, YIp, YRp, YCp
Cellules animales	Plasmides, virus, cosmides	SV40, adénovirus, rétrovirus
Cellules de plantes	Plasmides, virus & Ti (Agrobacterium)	Ti, CaMV, plasmides, BAC
Cellules eucaryotes	Plasmides, vecteurs viraux, vecteurs intégratifs	Vecteurs d'expression eucaryote, lentivirus

Les vecteurs de clonage jouent un rôle central en génie génétique, car ils sont utilisés pour produire de multiples copies d'un gène d'intérêt dans différents hôtes : bactéries, levures, cellules végétales et animales (**Brown, 2016**). Les propriétés essentielles d'un bon vecteur sont :

- ✓ une origine de réplication (Ori) ; la réplication doit être stable et autonome.
- ✓ un site de clonage multiple (polylinkers ; MCS) est requis ; ce site doit contenir plusieurs sites de restriction uniques.
- ✓ des marqueurs de sélection sont également nécessaires ; l'ADN doit donc contenir des gènes de résistance aux antibiotiques.
- ✓ sa présence ne doit pas perturber la physiologie de cellule hôte et vice versa,
- ✓ facile à isoler sous forme purifiée (**Green & Sambrook, 2012**).

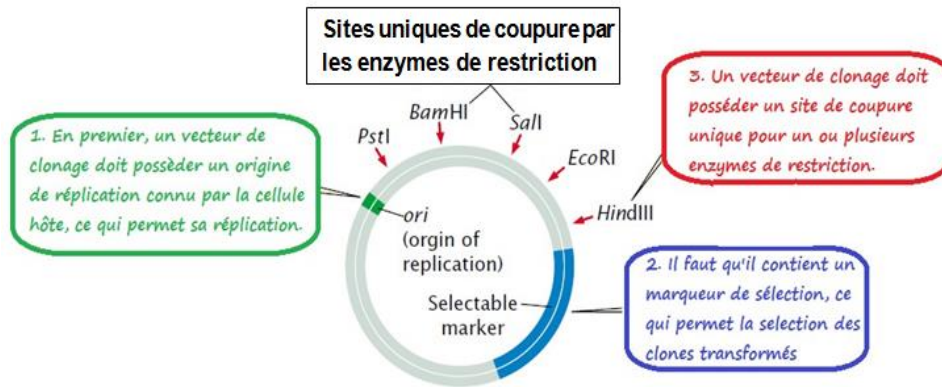


Figure 14. Propriétés essentielles d'un bon vecteur (Aouf, 2016)

Il existe deux grandes catégories de vecteurs de clonage :

-Vecteur de clonage : renferme une origine de répllication (Ori V), il permet de cloner un segment d'ADN ou un gène qui y est intégré.

-Vecteur d'expression : Renferme un promoteur, il permet de faire exprimer un gène (Aubel *et al.*, 2003).

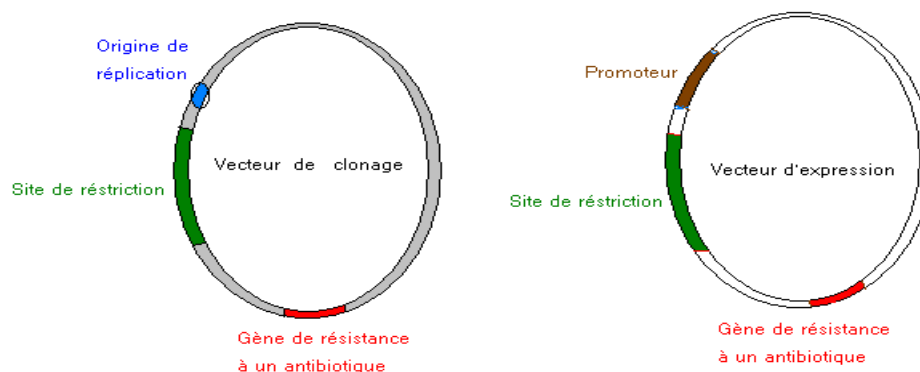


Figure 15. Vecteur de clonage et vecteur d'expression (Adjroud, 2020).

II.3.1. Plasmides

Les plasmides sont des molécules d'ADN double-brin circulaire, à répllication autonome, et d'origine bactérienne. Comme ils sont de petites tailles, stables et faciles d'utilisation in vivo, on les utilise en tant que vecteurs de clonage spécifiquement plasmidique. Après une coupure enzymatique du plasmide bactérien afin de s'y incorporer le gène d'intérêt, une ADN ligase scelle les deux brins. On crée souvent un plasmide recombinant

comportant un gène rapporteur, typiquement un gène d'antibiorésistance, qui confère, en milieu approprié, des moisissures compétentes, grâce à l'accroissement d'une résistance génétique via deux mutations et un vecteur plasmidique contenant le gène d'intérêt (Watson *et al.*, 2014).

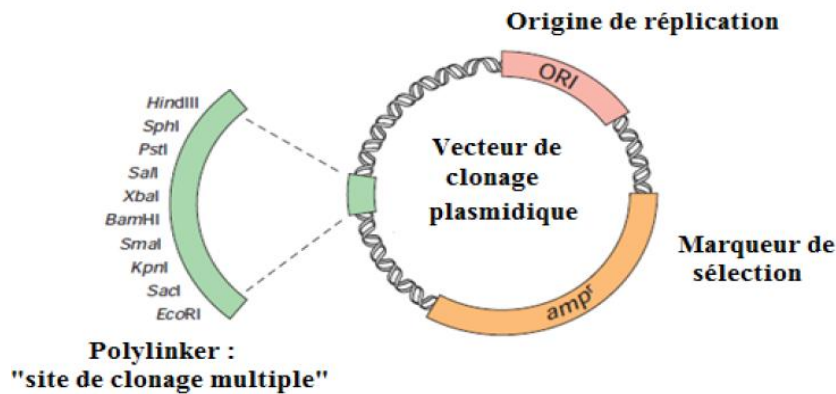


Figure 16. Plasmide de première génération (Lodish *et al.*, 2003).

II.3.1.1. Vecteur de première génération PBR322

C'est un plasmide artificiel utilisé comme vecteur de clonage. Il possède un gène de résistance à l'Ampicilline et tétracycline ; une origine de répllication et plusieurs sites de restriction ; des sites uniques de restriction tels que les sites EcoRI, BamHI, PstI.

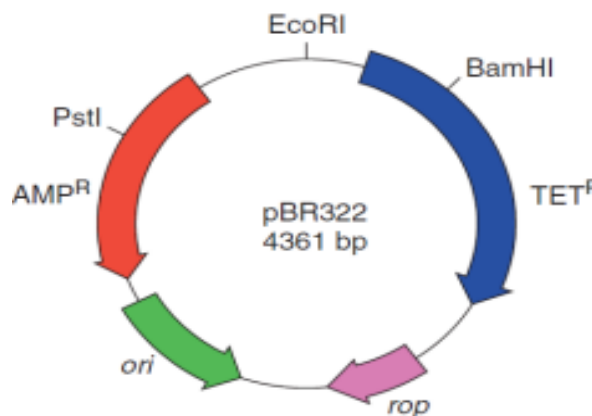


Figure 17. Clonage d'un ADN coupé par *PstI* dans pBR322 (Lodish *et al.*, 2003).

En effet, pBR322 a été le premier vecteur artificiel à clonage construit par Bolivar & Rodriguez en 1977 (Tabassum *et al.*, 2012). Il contient une Origine de répllication OriV, dérivée du plasmide ColEI. Double gène de résistance amp^R et tétracycline tet^R. Plusieurs sites

uniques de restriction (EcoRI, BamHI, PstI, HindIII ...). Ce vecteur a été un modèle pour les générations suivantes de vecteurs plus efficaces.

II.3.1.2. Vecteurs de seconde génération pUC19

Par ailleurs, pUC et Bluescript sont une étape d'évolution importante pour les vecteurs de clonage Kreis & Weissmann, 1988. pUC19 est un vecteur de seconde génération comprend par exemple un Ori dérivé du pMB1 aux nombreuses copies. LE gène lacZ concernant l'extrémité N-terminale de la bêta-galactosidase; un polylinker MCS; inséré dans lacZ' pour le clonage. Gène d'antibiorésistance à l'ampicilline ampR (Gaillardin & Tinsley, 2007).

Criblage bleu/blanc : les clones recombinants sont criblés sur un milieu sur lequel les colonies contiennent un plasmide recombinant sont blanches en condition répressive et bleues en présence d'IPTG et X-Gal (Adjroud, 2020).

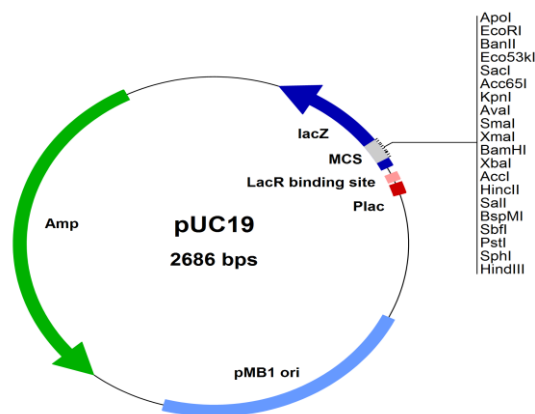


Figure 18. Carte de restriction de plasmides de deuxième génération (Gaillardin & Tinsley, 2007)

II.3.2. Phages

Les phages Les phages, virus bactériens, peuvent être utilisés en tant que vecteurs de clonage après modification. Les mieux connus sont le phage λ et le bactériophage M13.

II.3.2.1. Phages lambda

Phage λ Le phage λ est un virus à ADN bi-brin linéaire de 48,5 kb et possède des extrémités cohésives ou cos, nécessaires à l'encapsidation et la réplication. En supprimant certaines parties du génome non indispensables, des fragments d'une taille pouvant être intégré

se déplace alors jusqu'à 25 kb en remplaçant le gène lac Z. Il a une réplication lysogénique et lytique, et la dernière est utilisée en clonage (Abdi, 2020).

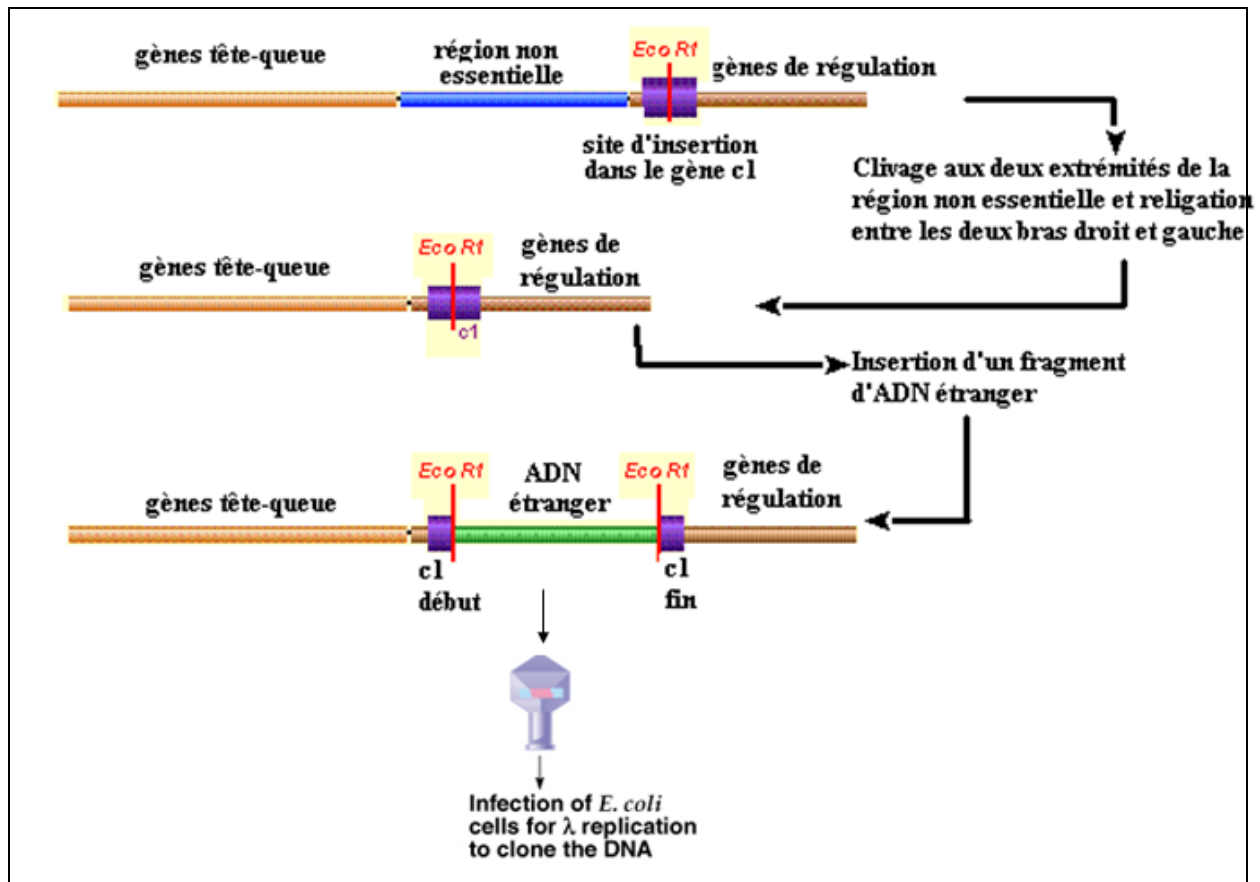


Figure 19. Vecteurs d'expression du phage λ (Aouf, 2016)

Ils peuvent se multiplier selon deux modes : soit un cycle lysogénique avec intégration de l'ADN du phage dans le génome soit un cycle lytique. C'est ce cycle lytique qui est utilisé dans les vecteurs puisqu'il entraîne la production d'un grand nombre de nouveaux phages qui vont à leur tour infecter d'autres bactéries et ainsi de suite (Abdi, 2020).

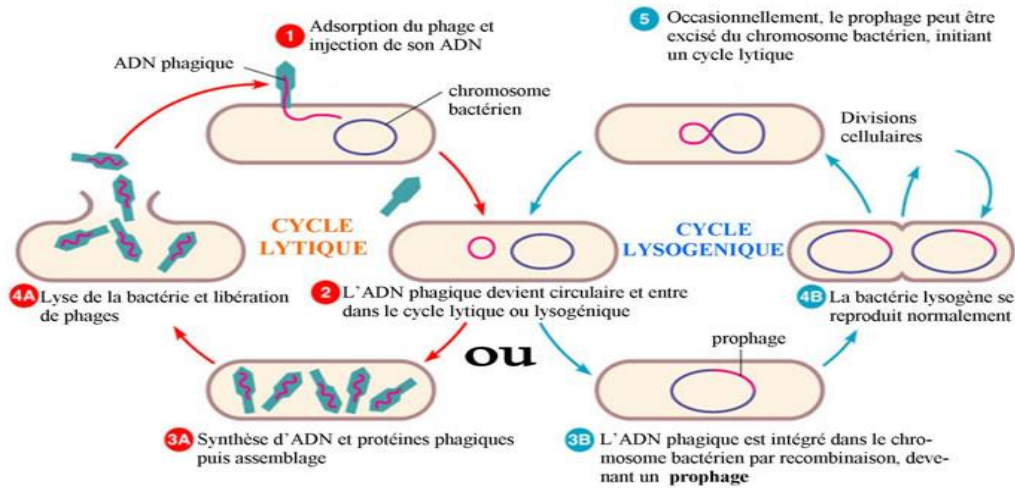


Figure 20. Cycles lysogéniques et lytiques du phage λ (Trottereau *et al.*, 2018)

II.3.2.2. Bactériophage M13

M13 est un phage à simple brin de 6,4 kb qui infecte *E. coli* à deux copies du facteur F. ce phage permet la synthèse d'ADN simple brin, utile pour la lecture et la mutagenèse dirigée (Messing & Vieira, 1982), pUC-M13 et M13mp ont un MCS, un fragment du lacZ a et un criblage bleu/blanc.

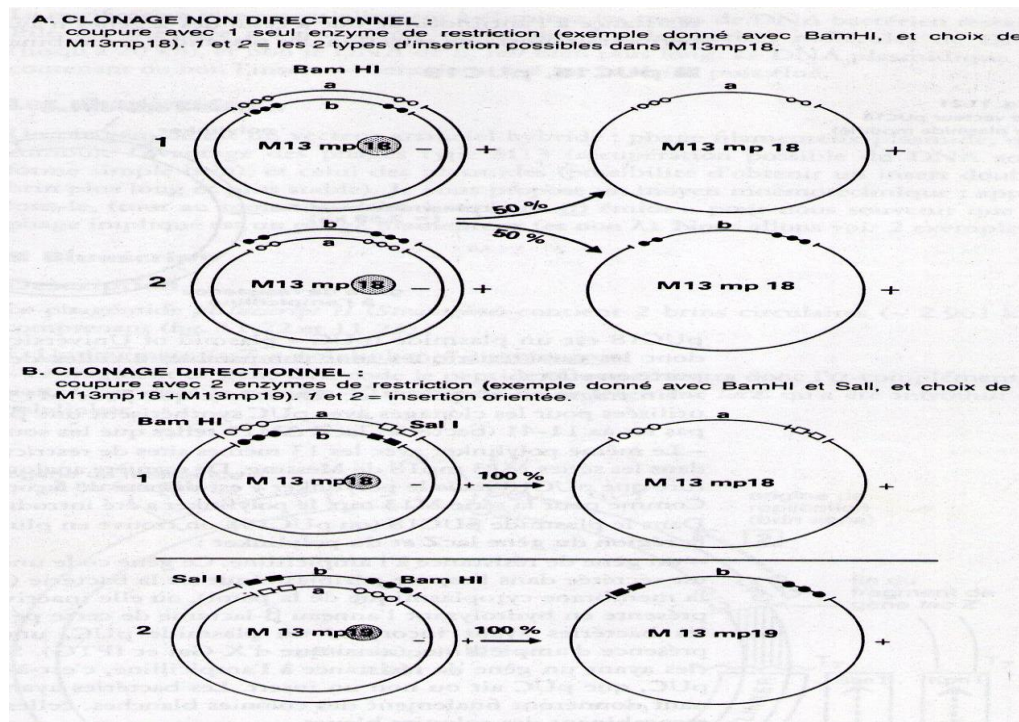


Figure 21. Clonage du bactériophage M13MP19 avec une enzyme de restriction (a) et deux enzymes de restriction (b) (Maftah *et al.*, 2018)

II.3.3. Phagémide

Les phagemides sont des vecteurs hybrides qui combinent les propriétés des supports plasmidiques et M13. Ils peuvent exister sous forme simple ou double brin après infection par un phage auxiliaire, offrant une grande flexibilité (**Dente *et al.*, 1983**). Exemples pBluescript II usités en mutagenèse, lecture et expression.

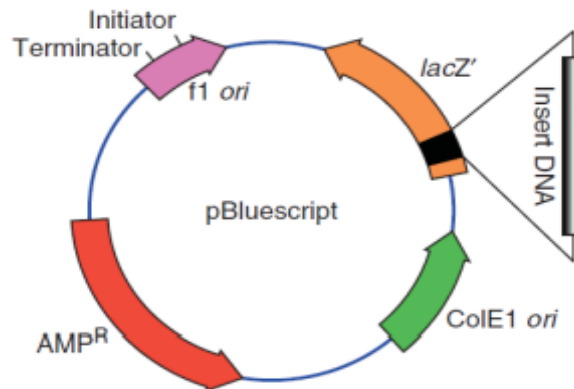


Figure 22. Exemple de phagémide pBlue script II (**Boudiaf, 2020**)

II.3.4. Cosmides

Les cosmides un vecteur artificiel ont une origine d'avoir un plasmide et des sites cos de phage λ , autorisant l'encapsidation *in vitro* et l'introduction de grands fragments d'ADN (jusqu'à 45 kb). Ils ont la grande capacité d'insertion du phage λ et la simplicité de manipulation des plasmides. Il a des avantages :

- L'efficacité de transformation.
- L'insertion de long fragment d'ADN environ 45kb (**Gaillardin & Tinsley, 2007**).

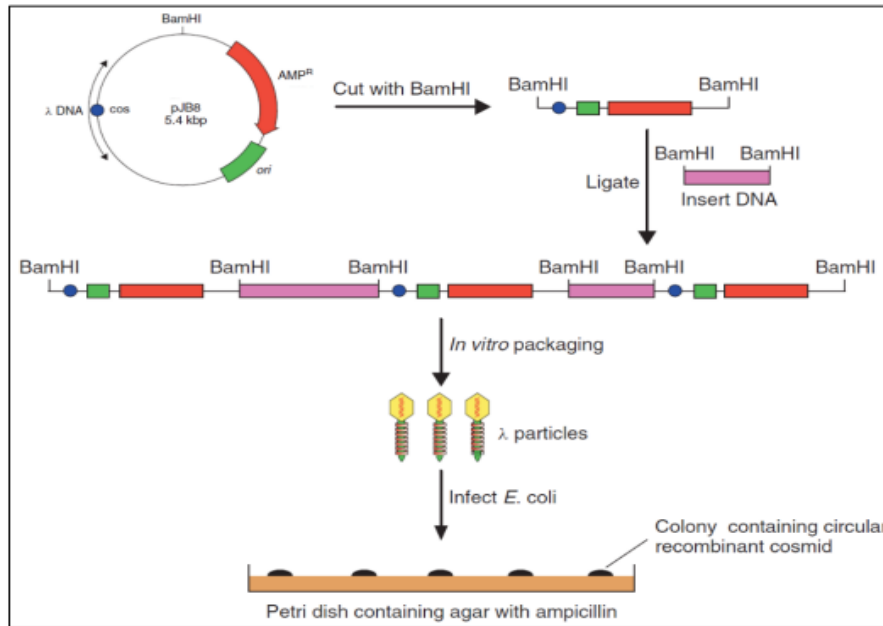


Figure 23. Présentation d'un cosmide (Boudiaf, 2020)

II.3.5. Vecteur navette

Les vecteurs de navette se répliquent dans deux systèmes cellulaires distincts : procaryote et eucaryote. Ils ont deux origines de répllication et 2 marqueurs de sélection distincts de chaque hôte : procaryote et eucaryote (Scutteri et al., 2025).

Exemple. Vecteur navette bactérie-levure, répliquant dans *E. coli* et *Saccharomyces cerevisiae*. Il possède aussi deux gènes de sélection : l'un est utilisé chez la bactérie (AmpR) et l'autre chez la levure (le marqueur de nutritionnel URA3; le milieu de sélection correspondant sera un milieu sans uracile). Un seul site de clonage multiple est nécessaire.

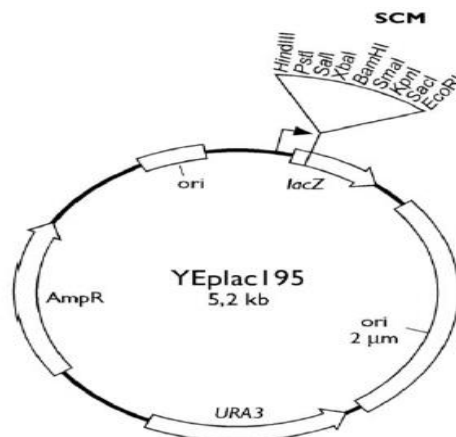


Figure 24. Exemple d'un vecteur navette YEplac195 (Gaillardin & Tinsley, 2007)

II.3.6. Vecteurs BAC

Les BAC (Bacteria artificial chromosome) proviennent du système F d'*E. coli* et caractérisent les fragments jusqu'à 300 kb. Les gènes *parB* et *parA* également du facteur F servent à la répartition correcte du plasmide dans les cellules filles. Le gène *repE* code l'enzyme de répllication spécifique du facteur. Les extrémités *CosN* vient du bactériophage lambda. Et le gène *Cm^R* d'origine plasmidique code la résistance au chloramphénicol (Gaillardin & Tinsley, 2007).

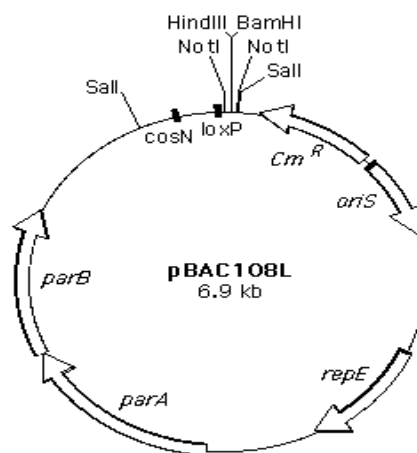


Figure 25. Présentation d'un vecteur BAC (Gaillardin & Tinsley, 2007)

II.3.7. Vecteurs YAC

Les YAC (yeast artificial chromosome) contiennent de très grands fragments dans la levure *S. cerevisiae* pour une efficacité de leur transformation est faible. Un YAC possède un Centromères (CEN), les télomères (TEL) et une séquence de répllication autonome (ARS) à la prolifération de la cellule hôte. *Amp^R* pour l'amplification sélective et des marqueurs tels que *TRP1* et *URA3* pour identifier les cellules contenant le vecteur YAC et des sites de reconnaissance d'enzymes de restriction (par exemple, *EcoRI* et *BamHI*) (Coradini *et al.*, 2023 ; Geiser, 2005).

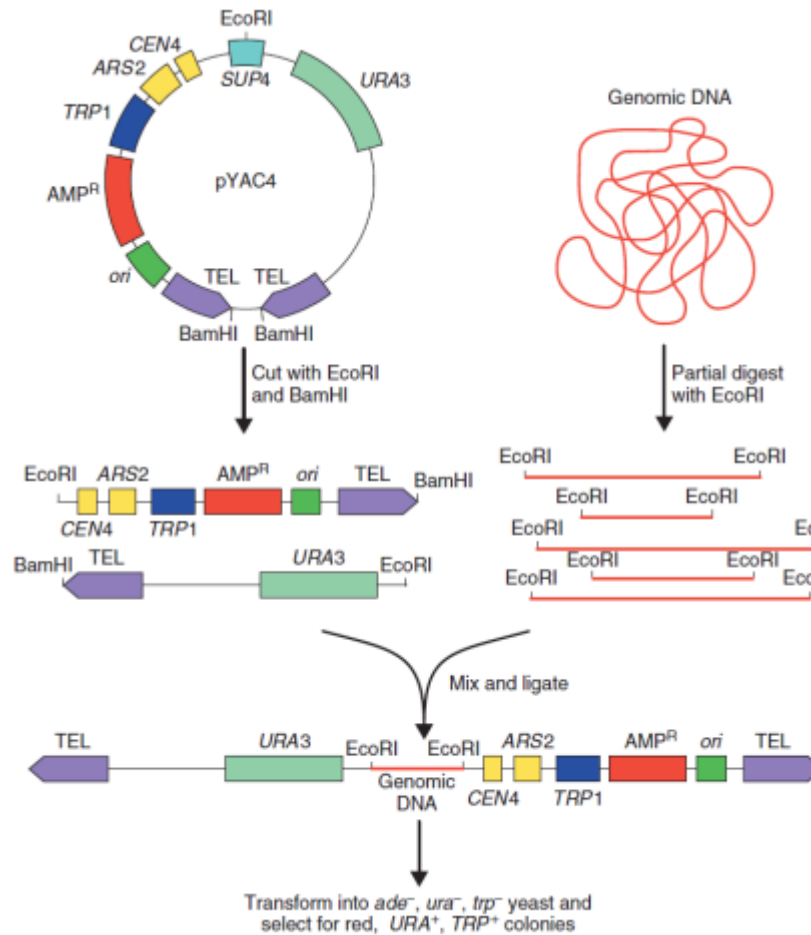


Figure 26. Présentation d'un vecteur YAC (Boudiaf, 2020)

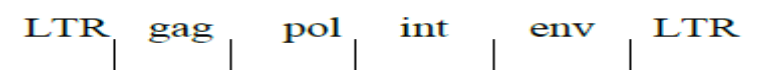
II.3.8. Vecteurs d'eucaryotes supérieurs

Comme son nom l'indique sont des vecteurs d'eucaryotes supérieurs (humains, animaux et végétaux). Sont des vecteurs d'utilisation plus complexe, l'ADN est transféré dans les cellules eucaryotes par des vecteurs viraux.

II.3.8.1. Rétrovirus

Ce sont des virus à ARN souvent utilisés dans le génie génétique. L'ARN viral est converti en ADN (rétro-transcription) par la RT (transcriptase inverse virale), puis est intégré dans le chromosome de la cellule hôte. Ces vecteurs sont largement utilisés en oncogènes.

Les gènes viraux « gag », « pol » et « env » peuvent être enlevés pour être remplacés par l'ADN à cloner qui sera donc intégré dans la cellule eucaryote hôte.



L'ARN du rétrovirus comporte à chaque extrémité de longues séquences répétées terminales LTR (long terminal repeat). La partie centrale contient une séquence gag qui code pour une glycoprotéine de structure, une séquence pol codant la transcriptase inverse, une séquence int responsable de la biosynthèse de l'intégrase qui intervient dans l'insertion de l'ADN viral dans l'ADN cellulaire et une séquence env qui code une protéine de l'enveloppe virale (Miller, 1988).

II.3.8.2. Plasmide pTi

Lorsque l'on parle d'*Agrobacterium tumefaciens*, il est important de parler de son grand plasmide Ti (Tumor inducing Plasmid), qui signifie tumor-inducing, qui est capable de transférer une région spécifique, le T-DNA, de son génome dans le génome des cellules végétales et qui conduit à la formation de tumeurs. Les manipulateurs de biotechnologie utilisent des souches dont les gènes de la virulence sont retirés et dont le Ti ADN a été remplacé par un gène d'intérêt et un gène rapporteur. Le gène d'intérêt est alors stablement intégré dans la plante, créant des plantes qui lui sont résistantes au gène entièrement (Raven et al., 2007).

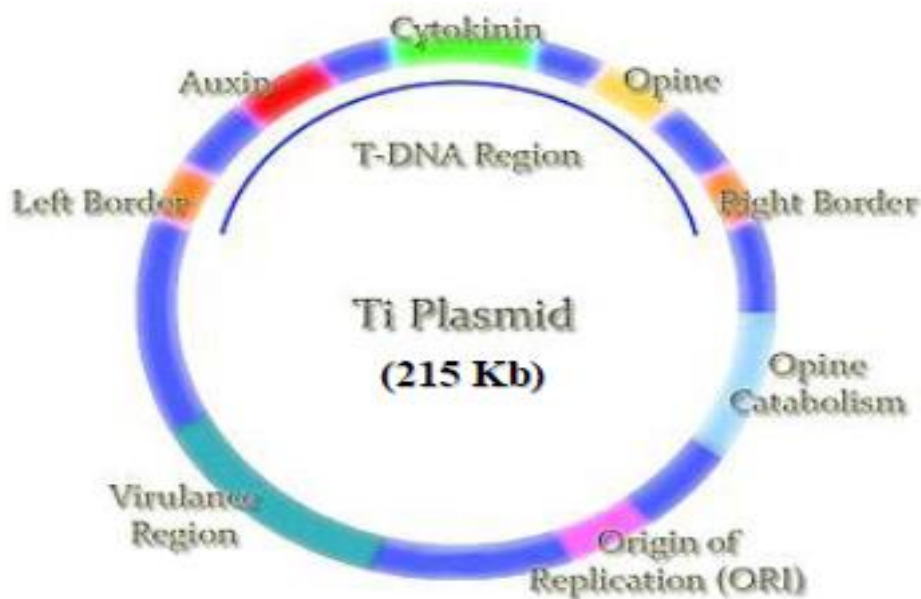
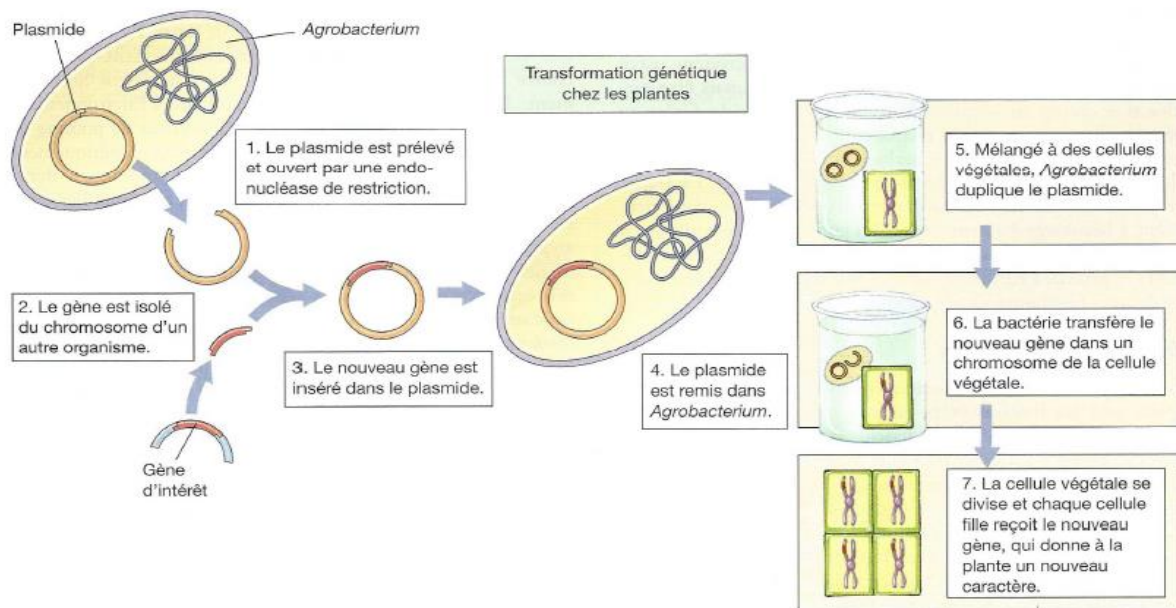


Figure 27. Présentation d'un plasmide Ti (Aouf, 2016)

Un **clone** est, au sens premier, un **ensemble de cellules génétiquement identiques**. Chez les organismes pluricellulaires, on peut parler de **clones** pour désigner des **individus porteurs du même patrimoine génétique**.



Le plasmide Ti. Ce plasmide d'*Agrobacterium tumefaciens* est utilisé pour les manipulations génétiques chez les plantes.

Figure 28. Transformation génétique végétale par plasmide Ti modifié d'*Agrobacterium*. (Raven *et al.*, 2007).

II.4. Clonage moléculaire

En insérant un fragment d'ADN ou un insert dans un vecteur ou dans une cellule hôte s'effectue le clonage moléculaire (Southern, 2006). Après transformation dans *E. coli* est isolé et purifié. Les étapes sont suivantes :

- ✓ Le clivage du vecteur et forme d'ADN provoquent la formation des extrémités simples de l'ADN par les mêmes enzymes de restriction.
- ✓ La ligature des fragments produits à l'aide de l'ADN ligase.
- ✓ La transformation est effectuée par certaines bactéries.
- ✓ La sélection des colonies recombinantes résulte à la résistance à l'antibiotique où se trouve le gène d'*ampR* et à la coloration des colonies, souvent, selon la contenance d'un plasmide.

Exemple 1. ADN pUC19 est distingué par la couleur sur le placage IPTG. Un groupe de colonies est Xgal coloré et un autre groupe est blanc.

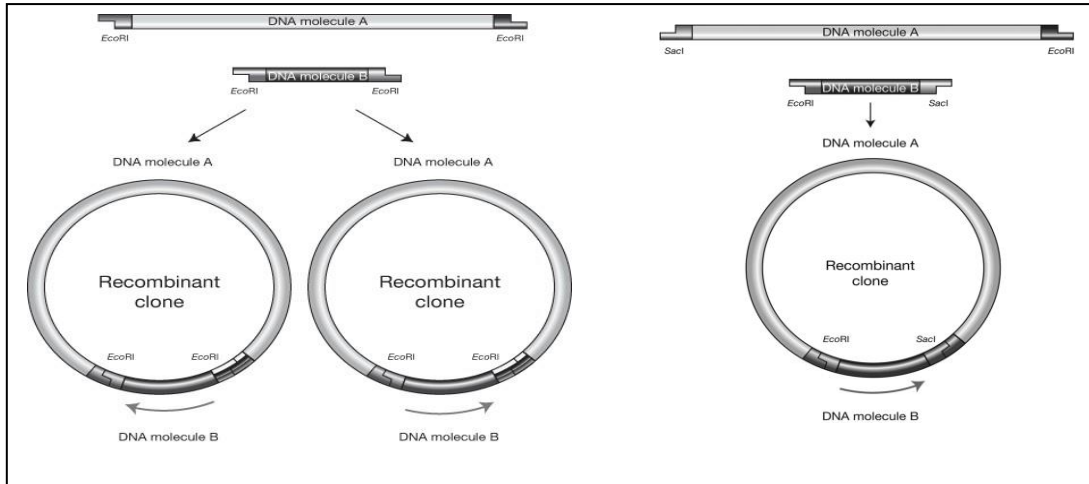


Figure 29. Clonage non directionnel et directionnel (Griffiths *et al.*, 2015)

Exemple 2. Plasmide pBR322.

Ce plasmide possède un gène de résistance à l'Amp et Tet, une Ori et un polylinker.

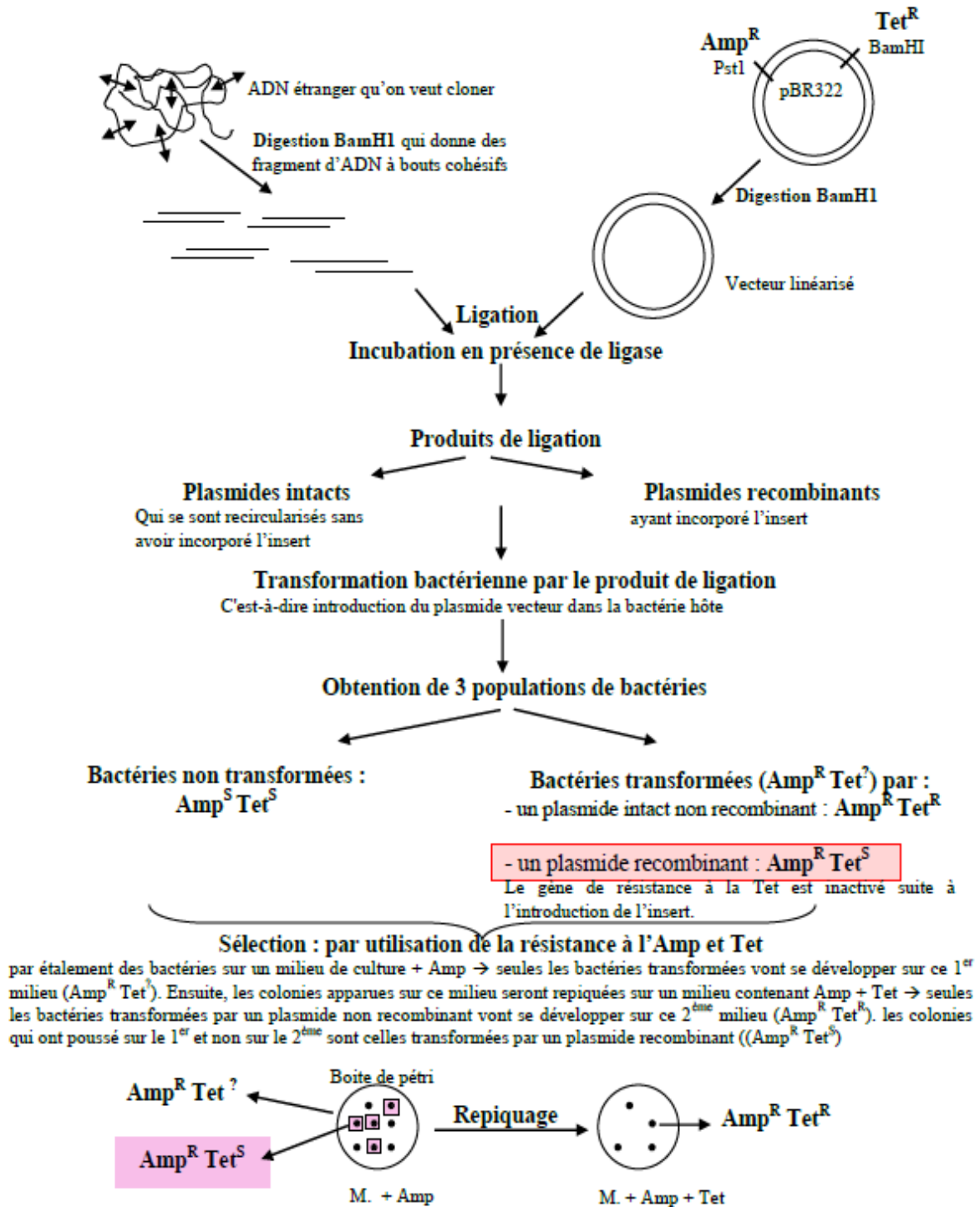


Figure 30. Clonage d'un gène dans le plasmide pBR322 (Aouf, 2016)

Exemple 3. pUC19

Ce plasmide comporte un gène de résistance à l'Amp, le gène lacZ (fragment de l'opéron lactose et qui code pour la B-galactosidase) contenant des sites polylinker.

Il possède un système de sélection enzymatique : l'opéron lactose au lieu d'utiliser un second antibiotique. Si ce vecteur intègre un fragment ADN d'intérêt au niveau de la région MCS, il y aura interruption et donc l'inactivation de ce gène *lacZ* donc l'enzyme B-galactosidase ne sera donc plus fonctionnelle.

- Les cellules hôtes ayant intégré un plasmide recombinant perdent l'activité de la B-galactosidase. Les bactéries cultivées sur le milieu colorimétrique X-gal qui contient un inducteur l'IPTG (isopropylthio-b-D-galactoside) nécessaire pour métaboliser le substrat X-Galactose. Les colonies seront colorées en bleu.
- Par contre, quand les cellules hôtes intègrent un plasmide intact non recombinant, la B-galactosidase sera active. Les bactéries Amp^R se développent sur l'agar et qui sont transformées par les plasmides recombinants, se présentent sous forme de colonies blanchâtres car elles ont perdu la capacité de clivage du X-gal par la B-galactosidase (Adjroud, 2020).

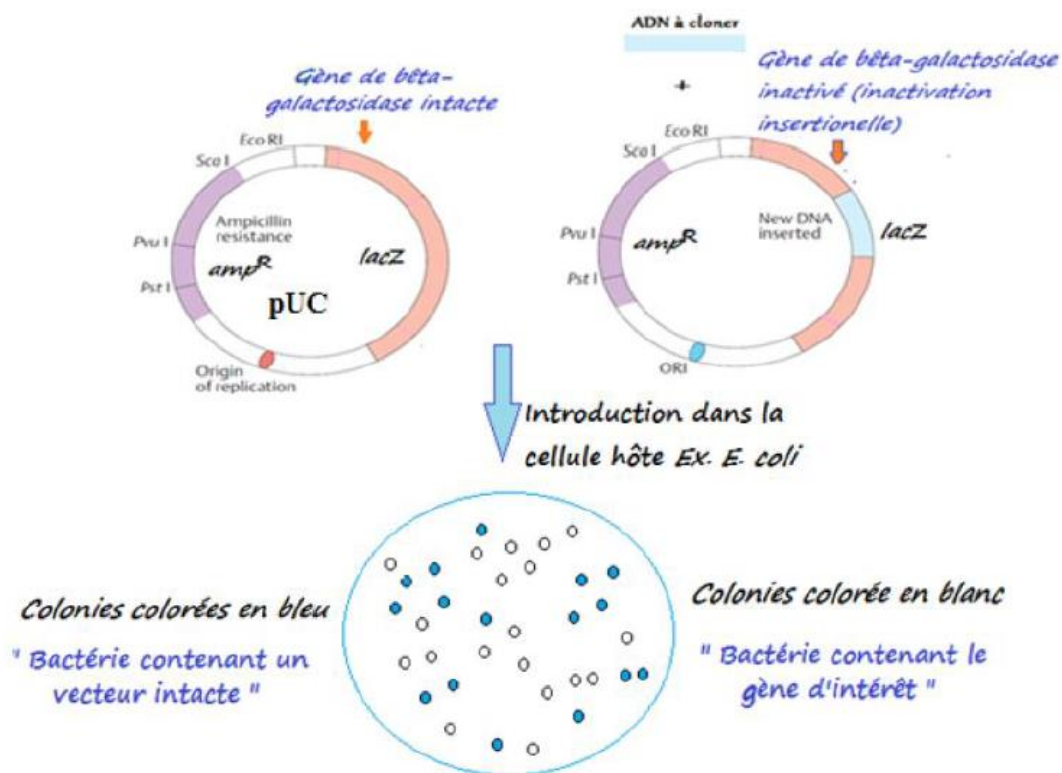


Figure 31. Clonage d'un gène dans le vecteur pUC19 (Adjroud, 2020)

Chapitre III. Hybridation moléculaire, sondes et marquage de l'ADN (radioactif et fluorscent)

III.1. Hybridation moléculaire

L'hybridation moléculaire est un processus fondamental en biologie moléculaire qui correspond à l'association spécifique de deux brins complémentaires d'acides nucléiques, ADN ou ARN, par formation de liaisons hydrogène entre les bases azotées complémentaires. Ce phénomène repose sur les règles de complémentarité d'après le modèle de Watson et Crick (**Watson *et al.*, 2014**).

Deux brins d'ADN peuvent former un homoduplex, alors qu'un brin simple d'ADN et d'ARN est appelé un hétéroduplex. Pour cela, on a besoin d'une sonde moléculaire, un fragment d'acide nucléique marqué qui est complémentaire de la cible. Cette sonde est marquée, pour permettre la détection de l'hybride formé, par radioactivité, fluorescence ou chimiluminescence. Sous l'effet de l'élévation de la température, les liaisons hydrogène entre les bases se rompent et les deux brins sont séparés par un processus appelé dénaturation. La température à laquelle 50 % des molécules d'ADN sont dénaturées est appelée température de fusion et dépend de la longueur du fragment, la composition en GC, et la force ionique. Cette technique est utilisée dans les analyses de Southern blot, Northern blot, le séquençage de l'ADN, et les PCR en temps réel (**Yang *et al.*, 2022 ; Alberts *et al.*, 2015; Brown, 2002**).

III.2. Sondes et marquage de l'ADN

Les sondes d'acides nucléiques sont des fragments courts d'ADN ou d'ARN à brin simple, généralement avec des longueurs allant de 15 à 30 nucléotides, qui sont complémentaires à une séquence cible spécifiquement située dans un mélange complexe d'acides nucléiques (**Alberts *et al.*, 2015**).

Lorsque l'ARN est ciblé, elles sont appelées ribo-oligonucléotides et désignées comme les sondes ribo. Chacune des sondes ne nécessite pas une longueur aussi importante que celle de la séquence cible. En fait, sa longueur optimale est affectée par divers facteurs tels que la nature de l'expérience, la complexité du génome de la cible et les conditions d'hybridation. La sonde doit présenter une spécificité de séquence élevée pour s'hybrider avec la région de la cible complémentaire, par les liaisons d'hydrogène, qui suit le modèle de complémentarité

(Watson *et al.*, 2014). Les sondes peuvent être préparées en utilisant différentes sources, telles que des fragments de gènes clonés dans des vecteurs plasmidiques, des oligonucléotides synthétisés chimiquement en laboratoire ou, de préférence, des ARN transcrits *in vitro* à partir d'un gène d'intérêt (Sambrook & Russell, 2001 ; Brown, 2002). Les sondes hybridées aux séquences cibles doivent être détectées en utilisant des méthodes de marquage. Les méthodes de marquage les plus courantes sont :

- **Le marquage radioisotopique utilisant des isotopes**, comme ^{32}P ou ^{35}S , pour un marquage nécessite des précautions particulières,
- **Le marquage enzymatique de sondes** dont les sondes sont couplées à des enzymes telles que la peroxydase de raifort ou la phosphatase alcaline et visualisée avec des substrats colorimétriques ou chimioluminescents,
- **Le marquage fluorescent** est basé sur l'incorporation de fluorophores, comme la fluorescéine/fluorescéine-12-dUTP, la rhodamine ou le Cy5, pour une détection rapide, sûr, quantitative et facile (Pandey *et al.*, 2024 ; Southern, 2006).

Aujourd'hui, les sondes marquées sont très utilisées dans plusieurs méthodes de biologie moléculaire, y compris la détermination avec Southern blot, le Northern blot pour l'ARN, les puces à ADN et la méthode de diagnostic moderne (Griffiths *et al.*, 2015).

III.2.1. Techniques de marquage des sondes nucléiques

Le marquage des sondes nucléiques est une étape majeure dans l'hybridation moléculaire, où il permet la visualisation et la quantification des hybrides créés entre la sonde et la séquence cible. Les méthodes de marquage peuvent être regroupées en trois catégories principales, soit radioactif, enzymatique et fluorescent selon la nature de l'application, qui peuvent être utilisées en fonction de l'avantage/inconvénient (Sambrook & Russell, 2001; Brown, 2002; Pandey *et al.*, 2024).

III.2.1.1. Marquage radioactif

D'abord le marquage radioactif, où il s'appuie sur l'incorporation d'isotopes radioactifs dans la sonde, ce qui permet ensuite d'identifier la sonde par autoradiographie. Les isotopes utilisés sont généralement le phosphore -32 (^{32}P), le soufre-35 (^{35}S) et le tritium (^3H).

En effet, le marquage peut se faire d'une manière terminale en ajoutant un nucléotide radioactif au bout de 5' du brin, ce qui peut être réalisé par une enzyme kinase ionique T4 kinase par exemple. Ce type peut être mixte où au moment de la génération d'hybride, on fixe avec le nucléotide dans le cas d'un marquage du type de substitution. Bien que ce type offre une haute sensibilité, il pose divers problèmes liés à la subtilité, la demi-vie de l'élément utilisé, à la manipulation de la matière radioactive (Southern, 2006).

III.2.1.2. Marquage enzymatique

Deuxièmement le marquage enzymatique, qui se réalise par le couplage de la sonde marquée à une enzyme qui permet de révéler le marquage après l'hybridation. Les enzymes utilisées sont la phosphatase alcaline recherchée par exemple par NBT/BCIP, et peroxydase de raifort et un réactif chromogène (DAB) ou un réactif chimiluniscente (ECL). En fait, Ce type de marquage présente l'avantage de ne pas être radioactif, d'être stable, et donc réutilisable, de détecter le signal pour la plupart du temps satisfaisant, utilisé dans les techniques Southern blot, Northern blot, dot blot, etc (Yang *et al.*, 2022; Alberts *et al.*, 2015).

III.2.1.3. Marquage fluorescent

La troisième source de marquage est le marquage fluorescent. Ici, la sonde marque par l'incorporation de la sonde de fluorophores permettant sa visualisation immédiate par la microscopie par fluorescence ou par une lecture optique. Les fluorophores les plus utilisés sont la fluorescéine soit la FITC, la rhodamine, le Cy3, le Cy5 et l'Alexa fluor. Cet avantage est d'abord considéré pour les puces ADN, pour la PCR quantitative, l'hybridation in situ parce qu'elle fournit un résultat quantitatif, rapide, multiparamétrique, sans danger radioactif (Griffiths *et al.*, 2015; Tyagi & Kramer, 1996).

III.2.1.4. Choix de la méthode de marquage

Enfin l'organisation de la méthode de marquage dépend de la sensibilité nécessaire, de la durée ou non stabilité du signal et de la disponibilité semble de matériel autoradiographique, fluorescence ou lumiomètre et des mesures de sécurité. De manière générale, les méthodes fluorescentes et enzymatiques reprennent les méthodes radioactives en raison de leur simplification de l'utilisation, de la sécurité et de l'adéquation avec les méthodes numériques actuelles conçue (Alberts *et al.*, 2015 ; Brown, 2002).

III.3. Principales technique d'hybridations moléculaires

Les techniques d'hybridation moléculaire visent à identifier, caractériser et localiser des séquences d'acides nucléiques spécifiques à l'aide de sondes marquées, complémentaires à ces séquences. Après séparation des fragments par électrophorèse, les sondes se lient spécifiquement à leurs cibles par appariement de bases, ce qui permet l'identification sélective de la séquence en question (Southern, 2006 ; Sambrook & Russell, 2001). Selon le type de molécule étudiée (ADN, ARN ou séquence in situ), plusieurs variantes ont été développées : le Southern blot, le Northern blot et l'hybridation in situ (Yang *et al.*, 2022).

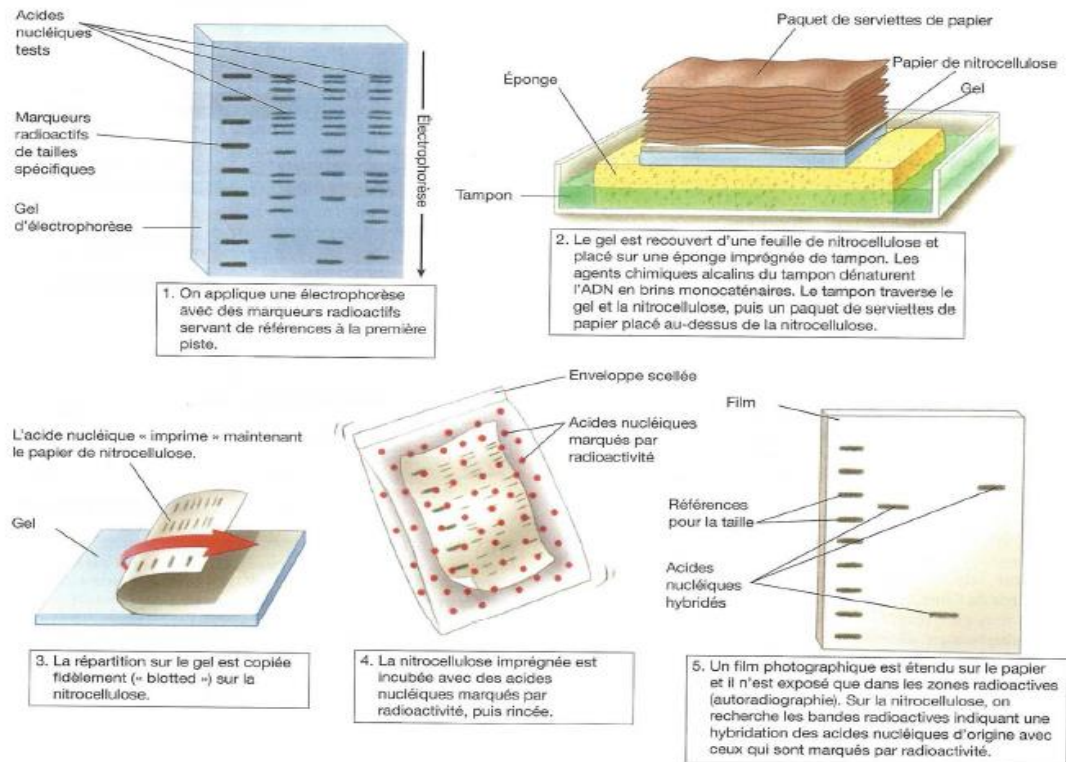
III.3.1.Southern Blot

Cette technique est basée sur la méthode d'analyse des séquences d'ADN et a été développée par E. M. Southern (1975). Elle permet l'analyse d'un fragment d'ADN spécifique dans un mélange complexe de fragments obtenus après hydrolyse enzymatique (Southern, 2006).

Les principales étapes de l'analyse sont :

- ✓ la séparation des fragments d'ADN sur gel d'agarose en fonction de leur taille par électrophorèse ;
- ✓ le transfert des fragments d'ADN du gel sur une membrane de nitrocellulose ou de nylon par capillarité ou pression électrique grâce à un tampon spécifique ;
- ✓ L'hybridation consiste en l'incubation de la membrane avec un brin complémentaire marqué (une sonde sous forme d'ADN ou d'ARN simple brin).
- ✓ La révélation, par marquage radioactif, enzymatique ou par fluoroscopie, indique la présence et la taille du fragment SPE recherché (Alberts *et al.*, 2015 ; Brown, 2002).

La méthode de Southern blot est utilisée pour établir des cartes génomiques, détecter des mutations et vérifier l'incorporation d'un transgène dans les cellules.



La méthode «Southern blot». E.M. Southern a mis au point cette méthode en 1975 pour mettre en évidence des fragments d'ADN d'intérêt dans un mélange complexe contenant de nombreux autres fragments de même taille. L'ADN est séparé sur un gel, puis transféré (« blotted ») sur un support solide comme du papier de nitrocellulose ou une membrane de nylon. Ce support est ensuite incubé avec une copie monocaténaire du gène d'intérêt qui s'hybride à la tache où se trouve un fragment possédant une séquence complémentaire. Les fragments d'intérêt sont identifiés sur le support par la position des bandes radioactives.

Figure 32. Southern Blot (Raven *et al.*, 2007)

III.3.2. Northern Blot

Cette a été développée par Alwine, Kemp et Stark (1977), est analogue à la méthode de Southern blot pour l'étude de l'ARN. Elle permet l'analyse de l'expression génique, en détectant la taille et l'abondance du produit du gène, l'ARN (Yang *et al.*, 2022). Le Principe de cette technique est basé sur :

- ✓ L'utilisation de gel d'électrophorèse pour ARN et sur des gels dénaturants au formamide.
- ✓ Ces fragments sont ensuite transférés sur une membrane et hybridés avec une sonde d'ADN ou d'ARN simple brin appropriée.
- ✓ La détection du signal fournit des informations à la fois qualitatives et quantitatives (scoop de l'expression) (Pandey *et al.*, 2024 ; Yang *et al.*, 2022).

C'est une méthode de référence pour vérifier les données de transcriptomique, bien qu'il existe des méthodes plus modernes aujourd'hui – telles que la RT-qPCR et le RNA-seq (Gablo, 2024 ; Alberts *et al.*, 2015).

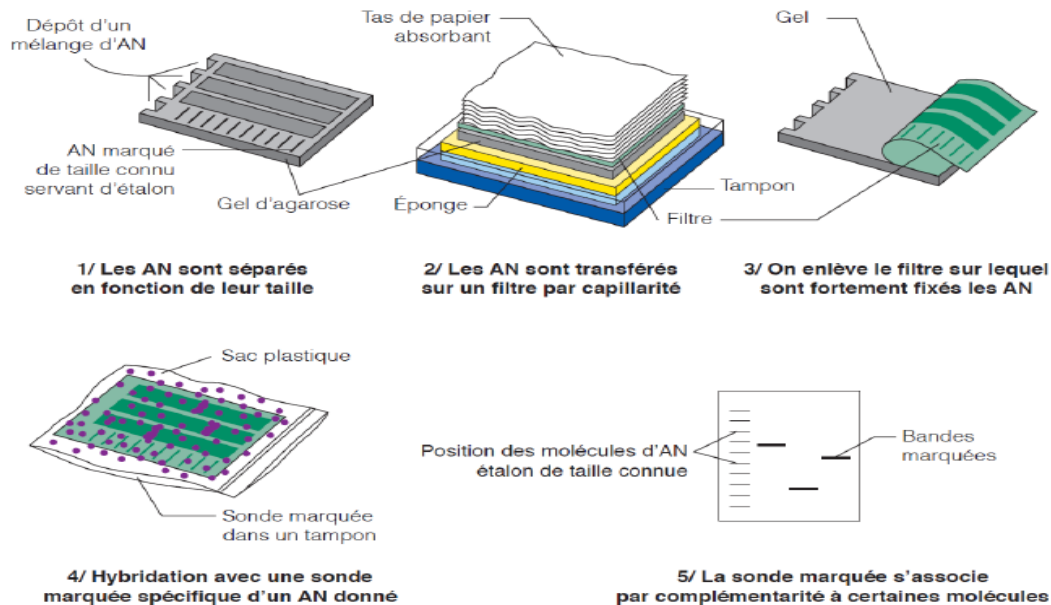


Figure 33. Northern Blot (Segarra *et al.*, 2014)

III.3.3. Hybridation *in situ* (HIS)

HIS a pour objectif de localiser des séquences d'acides nucléiques spécifiques dans des cellules ou des tissus en les identifiant dans leur contexte morphologique. Contrairement à cette méthode classique, qui est une hybridation de matériel d'extraction cellulaire, HIS est réalisé sur des coupes cryostatiques ou d'autre de cytopréparations histologiques et conserve ainsi l'organisation topographique des gènes exprimés (Levsky & Singer, 2003). Les sondes utilisées peuvent être :

- de l'ADN (simple ou double brin),
- des ARN-messagers (ribosondes),
- ou des oligonucléotides synthétiques de 20 à 50 bases.

Les marquages utilisés sont :

- radioactifs : utilisant le tritium (^3H), le phosphore-32 (^{32}P) ou le soufre-35 (^{35}S) ;

- non radioactifs : avec la biotine, la digoxigénine, ou des fluorochromes dans le cas de la FISH (Fluorescence in situ Hybridization).

La détection des résultats dépend de la méthode de marque : l'autoradiographie pour des sondes radioactives autoradiographie, microscopie à fluorescence pour FISH, et réactions enzymatiques colorées ou chimiluminescentes pour les sondes biotiny.. ou digoxigène. Elle est très largement utilisée en cartographie génétique, cytogénétique, cytogénétique moléculaire dans le diagnostic de certaines anomalies chromosomiques (Speicher & Carter, 2005 ; Alberts *et al.*, 2015).

III.3.4 Hybridation sur colonies

D'autres techniques ultérieures, telles que l'hybridation en colonies, ont également été développées : dans ce cas, les colonies bactériennes ou les zones de lyse sur la plaque de pétition sont simplement transférées directement sur une membrane.

L'hybridation avec des chromosomes FISH, c'est-à-dire l'hybridation avec des chromosomes en fluorescence in situ, est une variante précise de l'hybridation in situ des sondes fluorescentes sont utilisées. Après la dénaturation partielle de l'ADN des chromosomes, la sonde marquée de fluorochromes tels que Cy3, FITC, Texas Red, est hybridée à la séquence complémentaire. La détection se fait au microscope à fluorescence, permettant l'inspection d'une variété de séquences à la fois en raison de l'utilisation de sondes de couleurs différentes (Trask, 2002 ; Speicher & Carter, 2005).

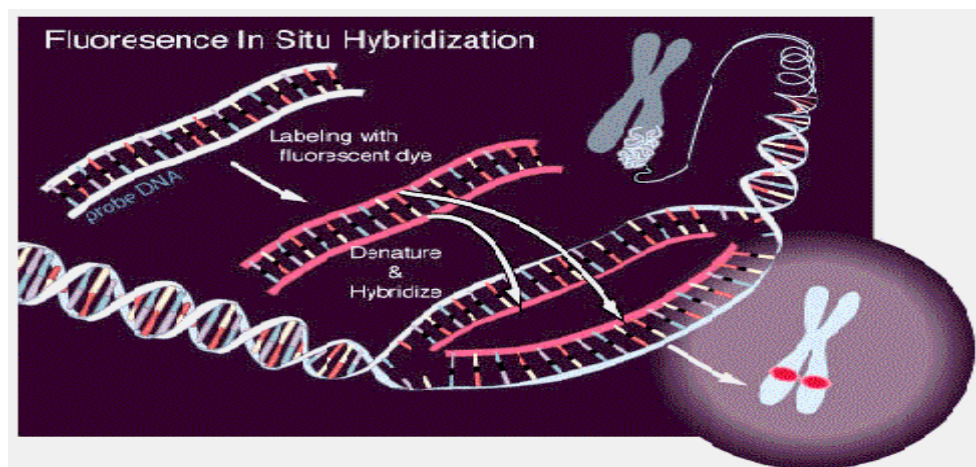


Figure 34. Hybridation sur chromosomes (FISH)
(Access Excellence, 1999)

Chapitre IV. Techniques d'analyse et de détermination du génome et de ses modifications, amplification génique : les banques génomique et d'ADNc, amplification sélective in vitro (PCR), production de protéines recombinantes intérêt thérapeutique (insuline, HB, interféron ...), puces ADN.

IV.1. Banques génomique et d'ADN complémentaire

Les banques d'ADN sont des collections formées d'un très grand nombre de clones différents, parmi lesquels on cherchera le clone que l'on veut étudier.

IV.1.1 Banques génomiques

Une banque génomique est fabriquée à partir de séquences géniques et intergéniques banque génomique donc c'est une collection de la totalité du génome, fragmenté et cloné dans des vecteurs. L'ADN cloné contient aussi bien les séquences codantes et les séquences non codantes (introniques ou intergéniques). Chaque partie du génome y est représentée au moins une fois.

IV.1.2. Banques d'ADNc

Une banque d'ADNc est fabriquée à partir des régions transcrites du génome est une copie d'ADN double brin d'un ARNm, l'ADNc ne contient donc pas d'introns. Donc c'est une collection d'ADNc recombinant (cloné dans des vecteurs), cette collection contient toutes les séquences codantes des protéines exprimées dans un tissu donné.

IV.1.3. Construction des banques génomiques

L'ADN génomique est fragmenté en utilisant des enzymes de restriction. Les fragments obtenus sont introduits dans le vecteur. Le vecteur recombinant est introduit par la suite dans la cellule hôte (Figure 35).

IV.1.4. Construction des banques d'ADNc

- Extraction des ARN totaux à partir d'un tissu.
- Sélection des ARN contenant des poly(A) (ARNm) sur une colonne de chromatographie sur laquelle des poly (T) sont fixés.
- Formation d'un ADNc double brin par la retro transcriptase

- Protection de cet AND contre les enzymes de restriction par méthylation des sites de restriction.
- Addition des lieurs (linkers) aux extrémités de cet ADNc, ces linkers contiennent des sites de restriction.
- Digestion avec les enzymes de restriction et génération d'extrémités cohésives permettant l'insertion dans le vecteur (phage λ ou plasmide adéquat).
- Introduction des vecteurs dans les cellules hôtes (Boudiaf, 2020).

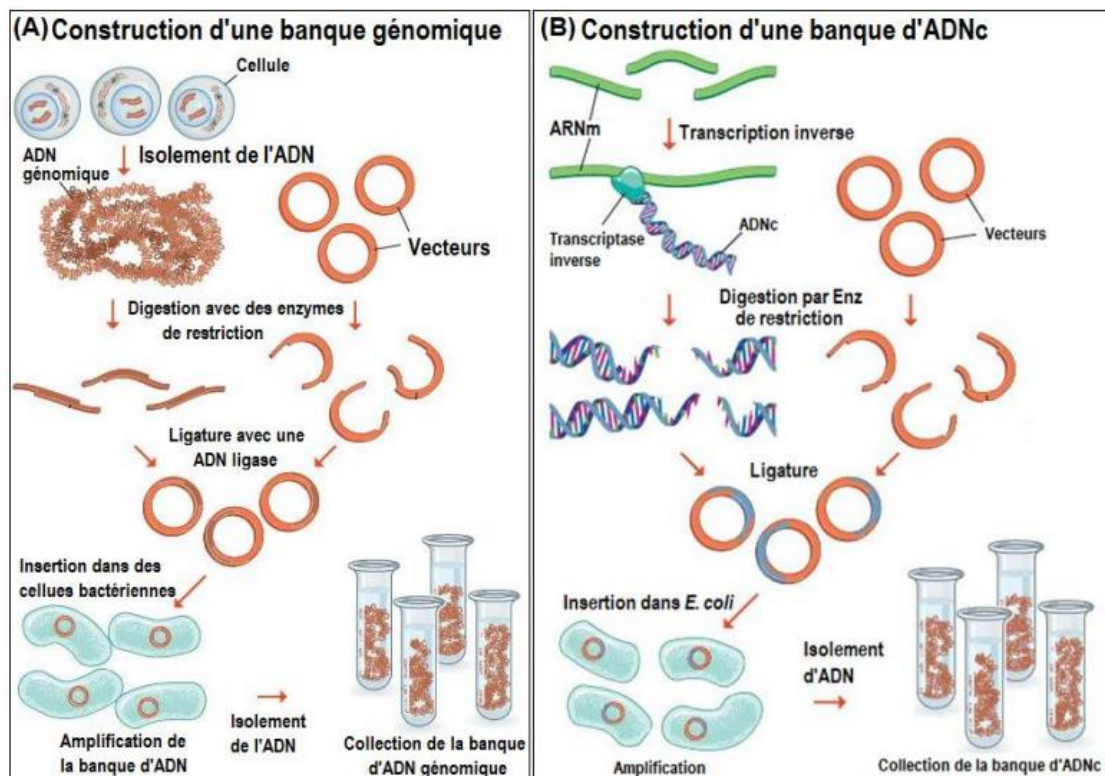


Figure 35. Construction des banques génomiques (A) et des banques d'ADNc (B).

(Boudiaf, 2020).

IV.2. Sondes

Il existe 2 types de sondes :

IV.2.1. Sondes qui reconnaissent les protéines : anticorps marqués

On a recours à cette technique lorsqu'on n'a aucune connaissance sur la séquence des acides aminés de la protéine. Dans ce cas, on purifie la protéine à partir de l'organe pour obtenir des anticorps dirigés contre le produit protéique du gène recherché. Les clones positifs seront révélés grâce au marquage (radioactif ou non radioactif) des anticorps. Donc en identi-

fiant la protéine, l'anticorps identifie le clone contenant le gène qui a dû synthétiser cette protéine.

IV.2.2. Sondes qui reconnaissent les acides nucléiques (ADN et ARN) : sondes nucléotidiques

C'est tout fragment d'acide nucléique simple brin (ADNc, fragment PCR, oligonucléotide, ARN) de taille très variable et qui possède une homologie de séquences avec l'ADNc ou le gène recherché.

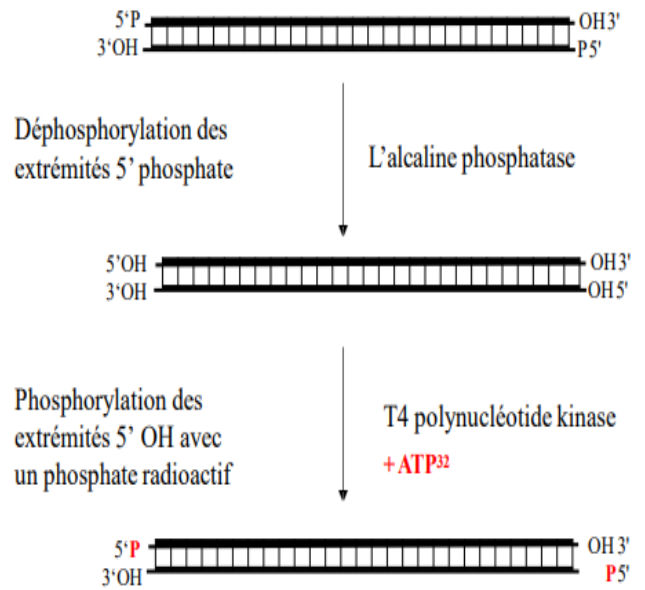
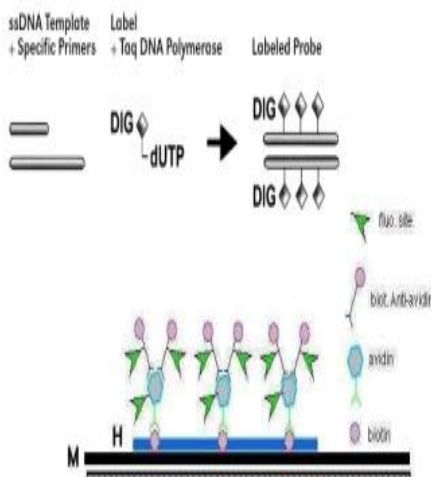
IV.3. Hybridation moléculaire de la sonde

La sonde permet de rechercher de manière spécifique un fragment d'acide nucléique que l'on désire étudier. Cette réaction sonde-fragment correspond à une réaction d'hybridation moléculaire. Celle-ci nécessite des conditions physico-chimiques parfaites (tampon, pH, T°C...etc) et dépend de la longueur de la sonde et de la complémentarité sonde-fragment avec possibilité de mésappariement. Pour repérer cette réaction d'hybridation sonde-ADN recherché, il faut réaliser un marquage de la sonde.

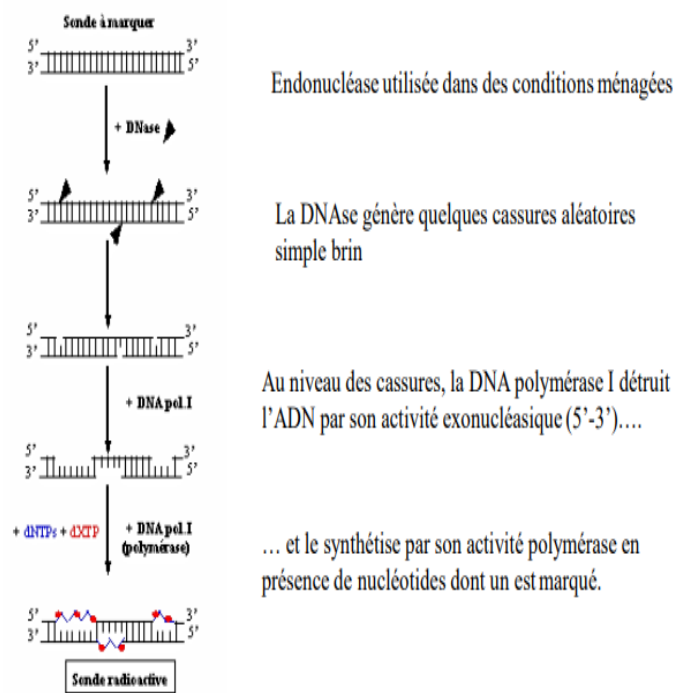
Dans un mélange complexe où s'effectue l'hybridation moléculaire, la sonde doit être facilement repérable grâce à un marquage. Il est réalisé soit avec un atome radioactif, radio-isotope : c'est le marquage radioactif à chaud et le clone positif (contenant le gène recherché) est révélé par une tache noire par autoradiographie; soit avec un colorant fluorescent c'est le marquage enzymatique ou fluorescent à froid non radioactif. Dans ce cas, le clone positif est révélé par une tâche fluorescente brillante. Globalement, le marquage se fait soit à l'extrémité soit à l'intérieur du fragment d'ADN :

- marquage aux extrémités
- marquage interne :
- Technique nick translation, coupure-réparation : Clivage au hasard de l'ADNdb par la Dnase I, puis réparation des coupures par l'ADN pol I en présence de dNTP $\alpha^{32}\text{P}$.
- Technique « random priming » (amorçage au hasard) : les 2 brins d'ADN de la sonde sont préalablement séparés par chauffage/refroidissement brutal. Puis on ajoute un mélange d'hexanucléotides de synthèse correspondant à toutes les combinaisons possibles ($4^6 = 4096$). Ces oligo vont s'hybrider avec la sonde par une partie d'entre eux.

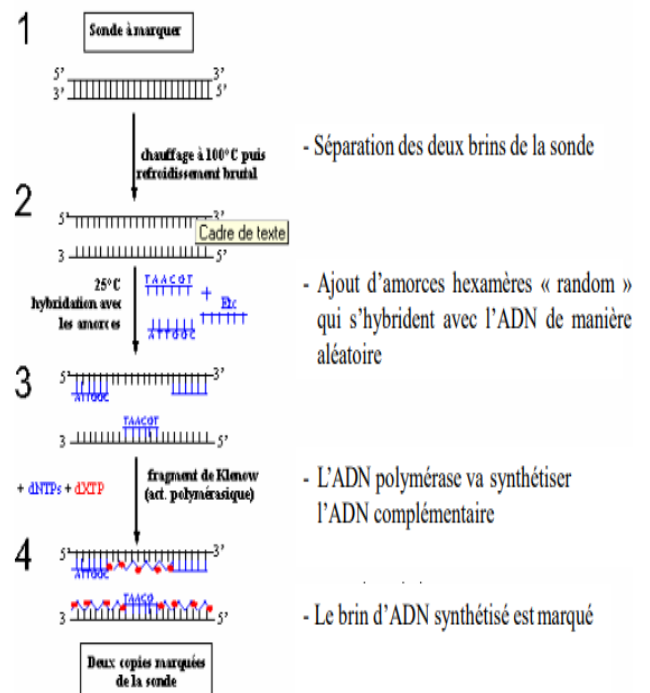
Donc on ne peut synthétiser une sonde nucléotidique que lorsqu'on connaît le produit protéique du gène recherché et sa séquence d'acides aminés.



a. Marquage indirecte par la biotine-streptavidine



b. Marquage des extrémités 5' de l'acide nucléique



c. Marquage par déplacement de brèche «nick translation»

d. Marquage par «amorçage au hasard» (Random-Priming)

Figure 36. Hybridation moléculaire de la sonde (Abdi, 2020)

IV.4. Criblage de la banque

Il consiste à la recherche du clone ayant inséré le fragment d'ADN qu'on désire étudier. Il nécessite la réplique de la banque. Le criblage de la banque par Hybridation moléculaire

avec une sonde marquée pour la recherche d'un gène particulier tel que le gène qui code pour la synthèse de l'hormone de croissance (HG).

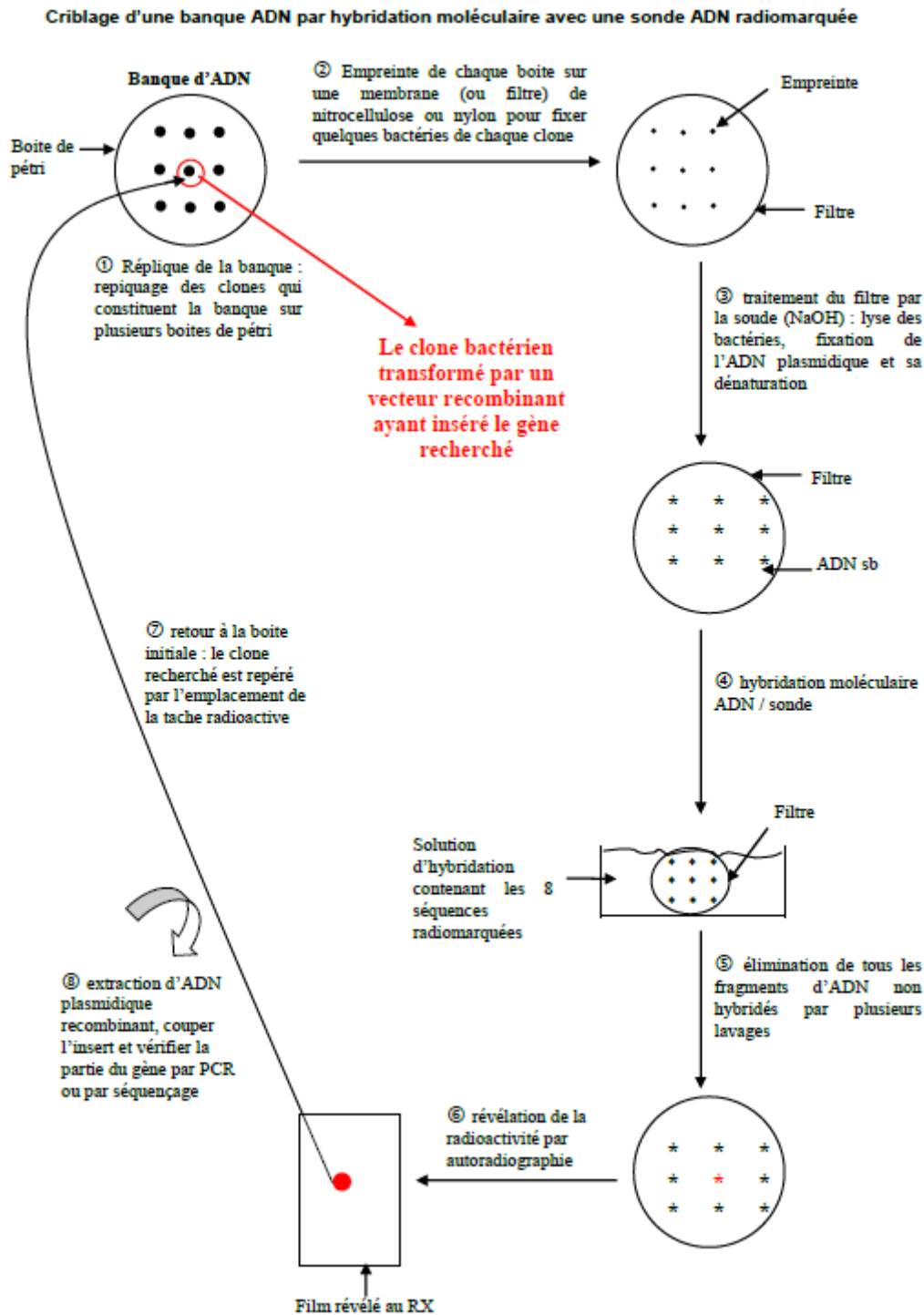


Figure 37. Criblage d'une banque ADN (Gaillardin & Tinsley, 2007)

Chapitre V. Techniques d'analyse de l'expression des gènes, modification du matériel génétique.

V.1. Extraction et purification des acides nucléiques

L'extraction et la purification des acides nucléiques sont une étape fondamentale dans la plupart des protocoles de biologie moléculaire. Ces procédures consistent à isoler l'ADN ou l'ARN à partir de divers types d'échantillons biologiques (sang, salive, tissu, etc.) tout en se débarrassant de tout contaminant, à savoir les protéines, lipides et polysaccharides qui, s'ils ne sont pas correctement éliminés, interféreront avec les étapes d'analyse ultérieures (**Sambrook & Russell, 2001 ; Green & Sambrook, 2012**).

V.1.1. Extraction de l'ADN à partir de sang

L'ADN génomique est obtenu à partir d'un échantillon de sang total recueilli en présence d'un anticoagulant, typiquement EDTA, les étapes du protocole de l'extraction sont :

- Prélèvement et échantillonnage : Le sang est recueilli dans un tube contenant un anticoagulant tel que l'EDTA pour empêcher la coagulation, un volume de 10 à 30mL de sang est suffisant pour une quantité d'ADN autour de 100 µg (**Miller et al., 1988**).
- Lyse des globules rouges : les hématies sont lysées par une solution hypotonique qui les fait éclater et facilite la récupération des leucocytes par centrifugation (**Wilson, 1997**).
- Récupération des globules blancs Après centrifugation, le culot de leucocytes est collecté, car il constitue la principale source d'ADN d'origine génomique (**Sambrook & Russell, 2001**).
- Lyse cellulaire : Les cellules sont lysées par une solution contenant un détergent comme le SDS ou le sarcosyl et la protéinase K, qui dénaturent les membranes plasmiques et lysent toutes les protéines liées à l'ADN (**Green & Sambrook, 2012**).
- Extraction au phénol : le lysat est travaillé au phénol pour dénaturer et extraire les protéines. Après centrifugation, l'ADN reste dans la phase aqueuse tandis que les protéines vont se trouver dans la phase organique (**Sambrook & Russell, 2001**).

- Extraction à l'éther ou au chloroforme : cette étape supplémentaire enlève des traces de phénol résiduel qui pourraient inhiber les enzymes utilisées par la suite, restriction, amplification, etc. (**Miller et al., 1988**).
- Précipitation d'ADN Pour concentrer et récupérer l'ADN, ces deux procédés sont utilisés:
 - ✓ Précipitation à l'éthanol : volumique en présence d'une haute concentration ionique. La précipitation est améliorée par une baisse de température les échantillons sont placés à -20 à -70°C)
 - ✓ Précipitation à l'isopropanol : volumique sans ajout de sel elle disperse toutes les molécules d'ADN de taille très petite, les supprimant du précipité (**Sambrook & Russell, 2001 ; Green & Sambrook, 2012**).
- Lavage du précipité : le culot précipité est lavé une fois à l'éthanol 70% pour enlever les sels et les molécules organiques en suspension avec centrifugation à **suivre (Ausubel et al., 2003)**.
- Séchage : l'éthanol résiduel est évaporé soit à température ambiante ou sous le flux d'une hotte (**Wilson, 1997**).
- Solubilisation de l'ADN : le culot d'ADN sec est remis en suspension dans une solution tampon Tris-edta 10mM, pH8,0 ou dans de l'eau sans nucléase (**Green & Sambrook, 2012**).

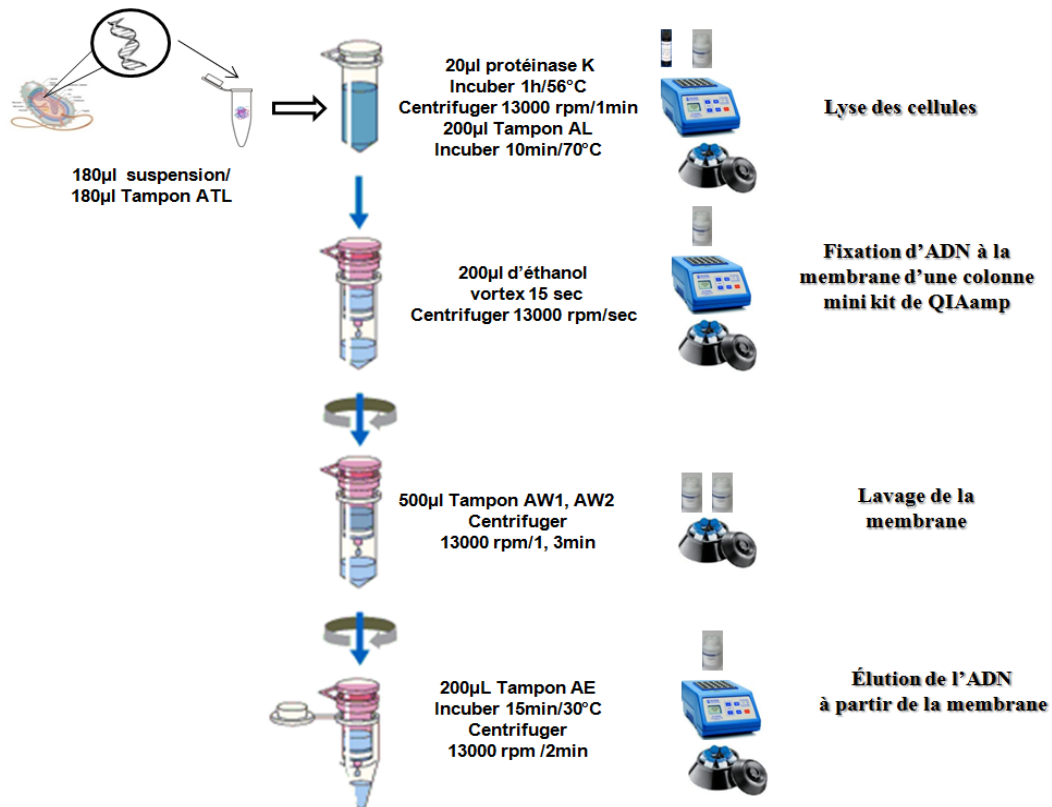


Figure 38. Extraction de l'ADN bactérien avec mini Kit QIAamp ADN (Qiagen, USA) (Hadeef *et al.*, 2015)

V.1.2. Dosage des acides nucléiques

Les bases puriques et pyrimidiques absorbent fortement les UV à 260 nm. Une unité de densité optique $DO_{260} = 1$ correspond à : 50 µg/mL d'ADN double brin 25 µg/mL d'ADN simple brin ou d'ARN. Le rapport d'absorbance A^{260}/A^{280} permet d'évaluer la pureté de l'échantillon : une valeur entre 1,7 et 2,0 indique un ADN pur (Wilfinger *et al.* 1997).

V.2. Électrophorèse

L'électrophorèse est une méthode de séparation des biomolécules chargées soumises à un champ électrique. Les acides nucléiques portent une charge négative due à leurs groupements phosphate et, ils migrent vers l'anode. Les matrices plus utilisées sont le gel d'agarose et le gel de polyacrylamide PAGE ((Pandey *et al.*, 2024 ; Southern, 2006).

V.2.1. Gel d'agarose

L'agarose, polysaccharide extrait d'algues rouges, forme un gel semi-solide à température ambiante. Les pores du gel agissent comme un tamis moléculaire. Ainsi, les fragments d'ADN de petite taille migrent plus rapidement que les gros. Le pourcentage du gel, c'est-à-dire 0,8-2%, dépend de la taille des fragments à séparer (**Pandey et al., 2024**).

V.2.2. Gel de polyacrylamide

Le gel de polyacrylamide permet de séparer des fragments d'ADN ou d'ARN de petite taille, jusqu'à 1000 pb, avec une meilleure résolution. Sa polymérisation nécessite l'ajout de TEMED et d'ammonium (**Raven et al., 2007**).

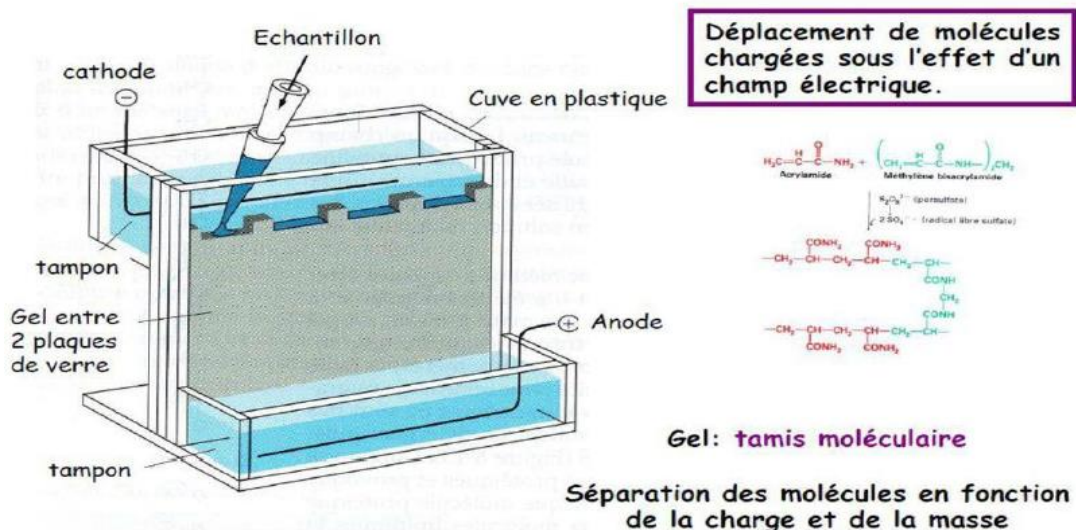


Figure 39. Technique d'électrophorèse (**Raven et al., 2007**)

V.2.3. Tampons de migration

Les tampons les plus utilisés sont :

- TAE (Tris-Acetate-EDTA) : bon pour les grands fragments (>10 kb).
- TBE (Tris-Borate-EDTA) : recommandé pour une meilleure résolution.
- SB (Sodium Borate) : faible conductivité, permet une migration rapide.

Les fragments sont visualisés par bromure d'éthidium ou des colorants non toxiques comme SYBR Safe sous UV (Gallagher, 1994).

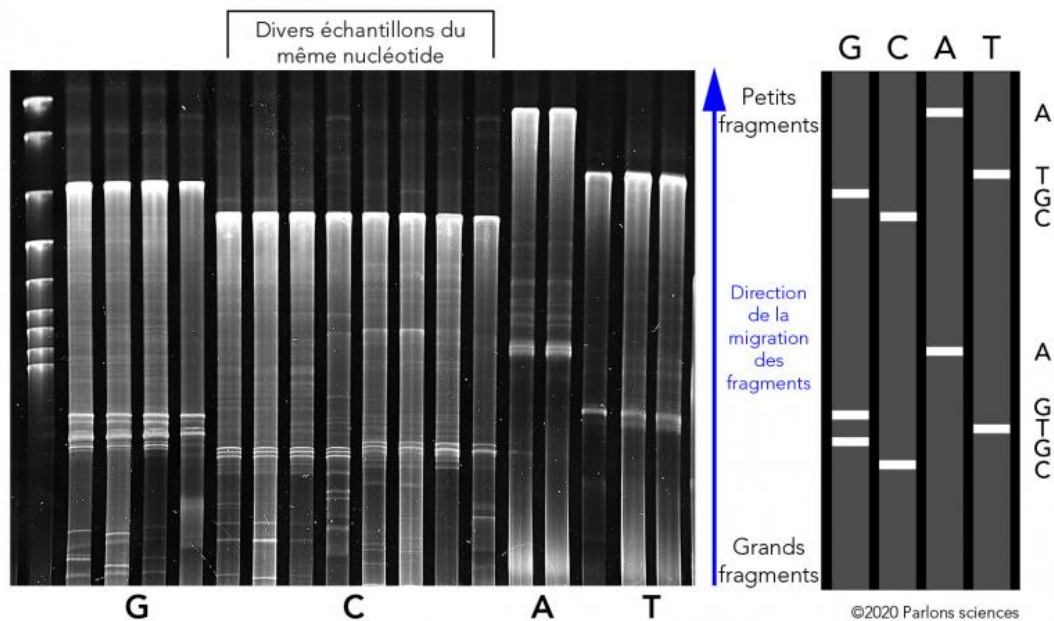


Figure 40. Visualisation des bandes d'ADN (Parlons, 2013)

V.3. Amplification de séquences d'ADN

Dès qu'un gène est identifié et isolé, il convient d'en produire une grande quantité de copies, ce qui est permis par la réaction en chaîne de la polymérase ou PCR (Polymerase Chain Reaction) développée par Kary Mullis (1985). Cette réaction repose sur des cycles (répétés de nombreuses fois) de dénaturation de l'ADN, fixation d'amorces sur les brins séparés et polymérisation d'ADN par une polymérase agissant à chaud (72 °C), la Taq polymérase (provenant d'une Eubactérie thermophile *Thermophilus aquaticus*) (Gablo, 2024).

Il existe aussi la RT PCR (reverse transcription PCR) qui permet d'amplifier une séquence d'ARN en ADN : avant le premier cycle, l'ARN est rétrotranscrit par une transcriptase inverse en ADNc (ADN complémentaire) puis la PCR a lieu sur cet ADNc (Higuchi *et al.*, 1993).

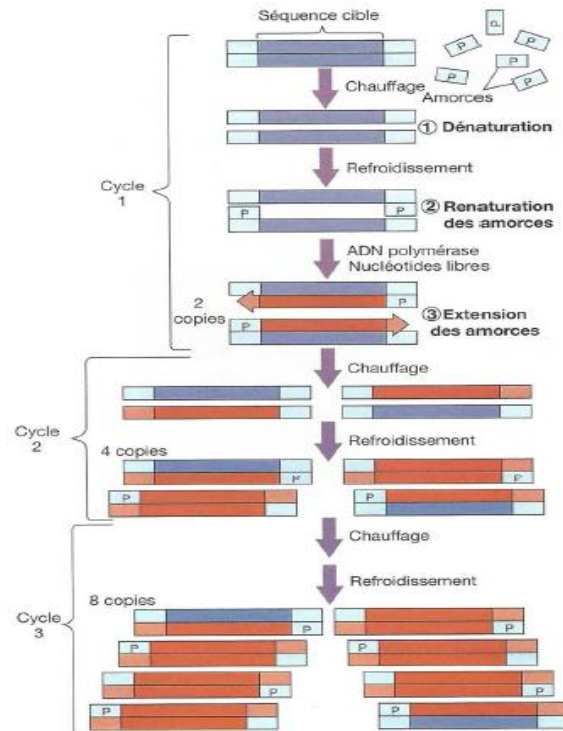
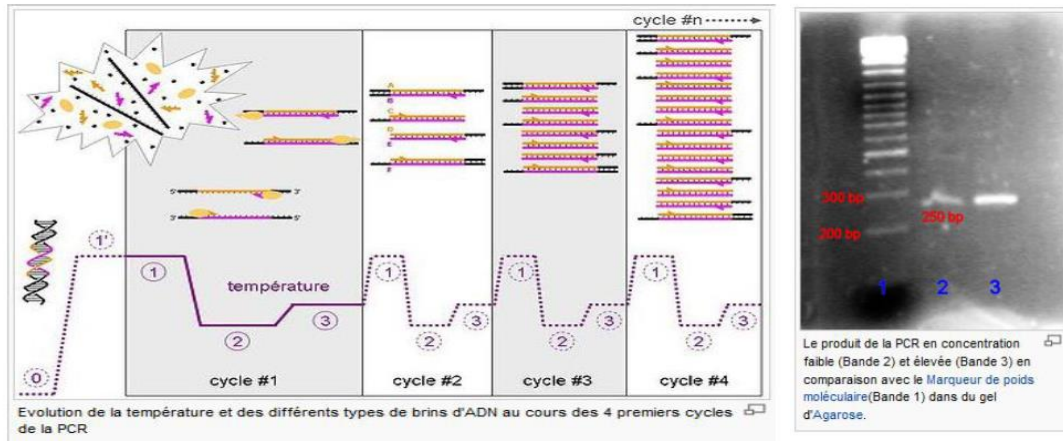


Figure 41. Étapes de la PCR (Raven *et al.*, 2007)

En résumé il y'a 3 étapes de la PCR :

- **Dénaturation** (autour de 95°C) : Sert à dénaturer l'ADN pour obtenir des matrices simple brin.
- **Hybridation** (autour de T_h 50-68°C): Lors du refroidissement du mélange, les amorces étant en excès, la plupart des brins d'ADN cibles se fixent à celles et non entre eux.
- **Élongation** (72°C) : L'ADN polymérase « prolonge les amorces : côté 3'-OH libre » en utilisant les brins cibles comme matrice.

Après 30 cycles, on obtient environ 10^6 à 10^9 copies de la séquence cible (Innis & Gelfand, 1990).



Cycle	1	2	3	4	5	6	-----n	n : nombre de cycle
Copies totale (N)	2	4	8	16	32	64	-----	$N=2^n$
Copies parasites	2	4	6	8	10	12	-----	$2n$
Copies cibles	0	0	2	8	22	52	-----	$2^n - 2n$

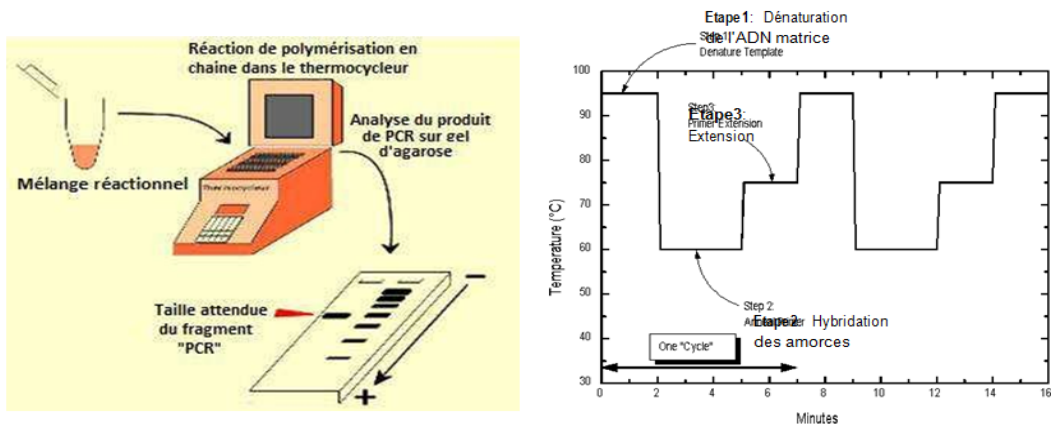


Figure 42. Réaction d'amplification d'ADN dans le thermocycleur et visualisation du produit de PCR par électrophorèse et Profile de cycles de la température de la PCR (Aouf, 2016)

V.4. Southern blot

C'est une technique d'hybridation moléculaire qui consiste à détecter spécifiquement des fragments d'ADN transférés sur filtre par leur hybridation à des séquences complémentaires (sonde) marquées par un radio-isotope (Lodish *et al.*, 2016).

Exemple : Recherche d'un gène (cloné et provenant d'une espèce de plante) à partir de l'ADN génomique d'une plante en utilisant la technique d'hybridation moléculaire par Southern blot.

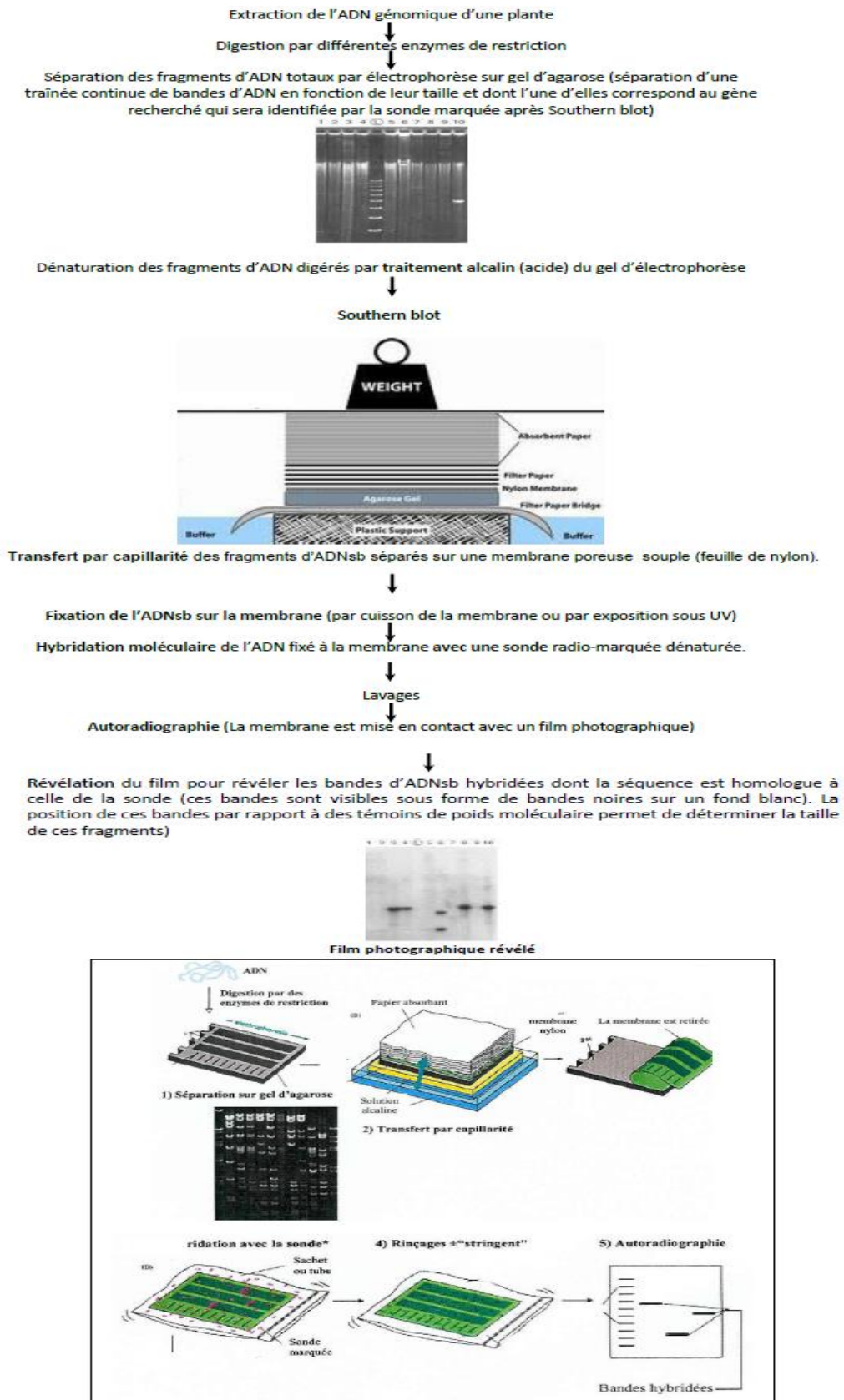


Figure 43. Recherche d'un gène à partir de l'ADN génomique d'une plante par Southern blot (Plombières-lès-Dijon *et al.*, 2019)

V.5. Séquençage

V.5.1. Théorie Frederick Sanger

Le biochimiste Frederick Sanger développa une méthode de séquençage qui repose sur l'incorporation d'un didésoxynucléotide triphosphate utilisé dans la synthèse du brin d'ADN arrêté (**Bentz et al., 2022**).

V.5.2. Protocole

Les ddATP, ddTTP, ddCTP et ddGTP sont dilués puis séparés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide. Chaque brin synthétisé dans les test-tubes est synthétisé à partir d'un nucléotide spécifique. Les fragments terminaux sont examinés par (**Bentz et al., 2022**).

V.5.3. Séquençage automatisé

Les modernes technologies d'utilisent des fluorochromes distincts pour chaque ddNTP. Laser comme détecteur est habitué, e la lecture automatique donne de l'électrophérogramme, où de chaque pic de couleur correspond à de chaque base (**Parlons, 2013**). Les moderne séquenceurs permettent à lire jusqu'à 1000 paires de bases par réactions avec une haute précision.

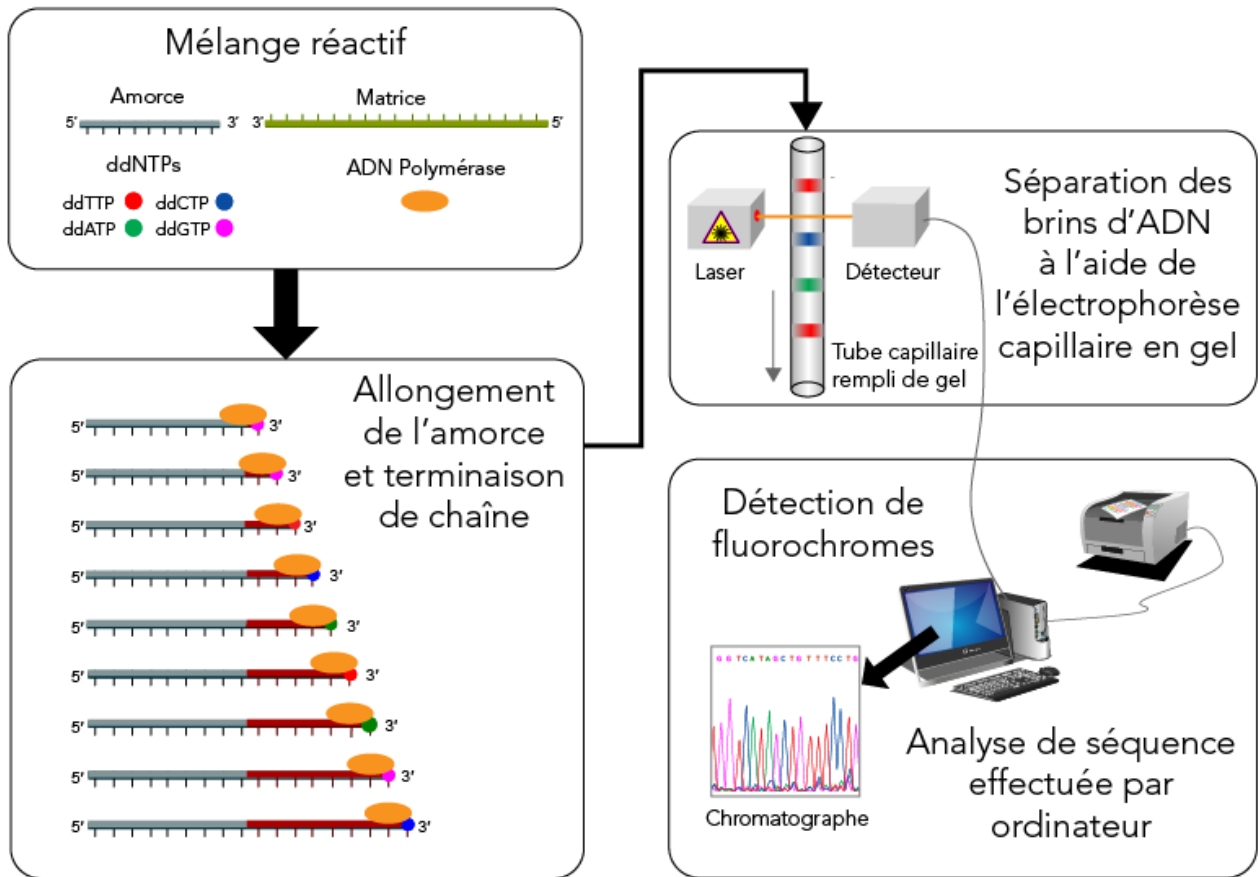


Figure 44. Principe de la technique de séquençage enzymatique de Sanger utilisant le ddNTP (Parlons, 2013)

Chapitre VI. Applications biotechnologiques de l'ADN recombinant

L'ADN recombinant, obtenu par les méthodes de génie génétique, est l'un des piliers fondamentaux des biotechnologies modernes. Il consiste à combiner des fragments d'ADN de différents organismes dans une nouvelle molécule stable et transmissible exprimant des gènes d'intérêt dans n'importe quel système biologique. Les champs d'application des technologies fondées sur l'ADN recombinant touchent la santé, l'agriculture, l'industrie, l'environnement et même la recherche fondamentale, contribuant au développement global scientifique et socio-économique (**Glick & Pasternak, 2010 ; Brown, 2016**).

VI.1. Santé humaine et animale

Les biotechnologies fondées sur l'ADN recombinant ont radicalement changé l'industrie médicale. Ces technologies permettent la production de protéines thérapeutiques, le développement de vaccins recombinants, le diagnostic moléculaire et la possibilité d'effectuer une thérapie génique.

VI.1.1. Protéines thérapeutiques

L'expression de gènes spécifiques à des protéines d'importance médicale insérés dans des vecteurs d'expression et produits en utilisant des organismes hôtes différents tels que *E. coli*, la levure *S. cerevisiae* ou des cellules de mammifère. Le premier médicament recombinant produit par génie génétique était l'insuline humaine recombinante Humulin®, approuvé en 1982. L'utilisation de cette technique a remplacé l'extraction de l'insuline animale, augmentant la pureté et réduisant le potentiel immunogène du produit (**Walsh, 2018**).

VI.1.2. Vaccins recombinants

La prochaine génération de vaccins a été produite grâce au premier vaccin recombinant hépatite B exprimé par la levure. Aujourd'hui, les vaccins à ARN messager et à ADN recombinant, tels que les vaccins contre le SRAS, démontrent la capacité de la biotechnologie à produire rapidement des vaccins jetables ayant le même résultat (**Pardi et al., 2018**).

VI.1.3. Thérapie génique et médecine personnalisée

La thérapie génique vise à guérir une mutation ou à introduire un gène fonctionnel dans les cellules d'un patient. Pour transmettre le gène thérapeutique, des vecteurs viraux recombinants adénovirus, lentivirus sont largement exploités (**Naldini, 2015**). En outre, les nouvelles approches d'édition génomique fondées sur le système CRISPR-Cas9 offrent une précision sans précédent dans l'édition du génome, offrant ainsi des avenues de traitement contre les maladies génétiques, telles que la drépanocytose ou la dystrophie musculaire (**Doudna & Charpentier, 2014 ; Porteus, 2019**).

VI.2. Applications en agriculture

Les commodités de la recombinaison de l'ADN ont radicalement modifié la génétique agricole et vivrière, permettant la création de cultures génétiquement modifiées cultures OGM et l'amélioration des rendements agricoles (**Plantlet, 2025**).

VI.2.1. Plantes transgéniques

L'introduction de gènes humains dans le génome des plantes a permis de créer des variétés résistantes aux insecticides, comme le maïs et le coton Bt, ou tolérantes aux herbicides, comme le soja Roundup Ready. Ces plantes contribuent à réduire l'usage des produits chimiques et à améliorer les rendements agricoles (**James, 2015**). En outre, les scientifiques peuvent refactoriser les plantes pour l'améliorant de leur contenu nutritionnelle, telles la riz doré qui est riche en provitamine A (**Ye et al., 2000**).

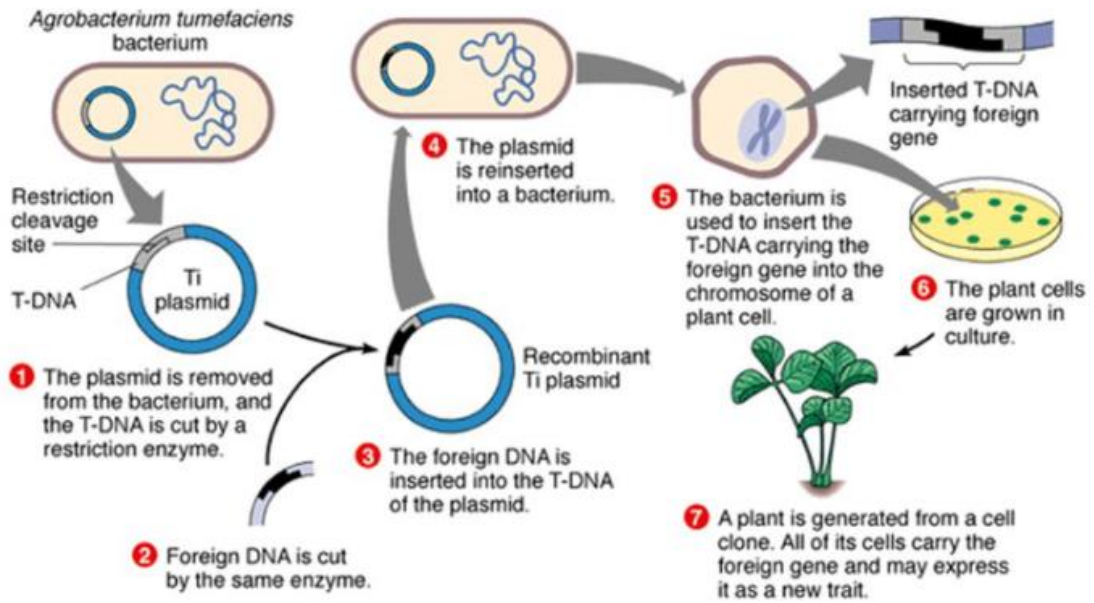


Figure 45. Plantes transgéniques par *Agrobacterium tumefaciens* et plasmide Ti (Plantlet, 2025)

VI.2.2. Amélioration animale

Chez les animaux, la transgénèse permet d'améliorer la croissance, la résistance animales ou la production des protéines pharmaceutiques du lait ligne production d'animaux bioreacteurs. Des vaches transgéniques constituent de l'AT recombinant humain dans leur lait, des coliques d'élévée croissance corrigée des perturbations (Echelard, 2006).

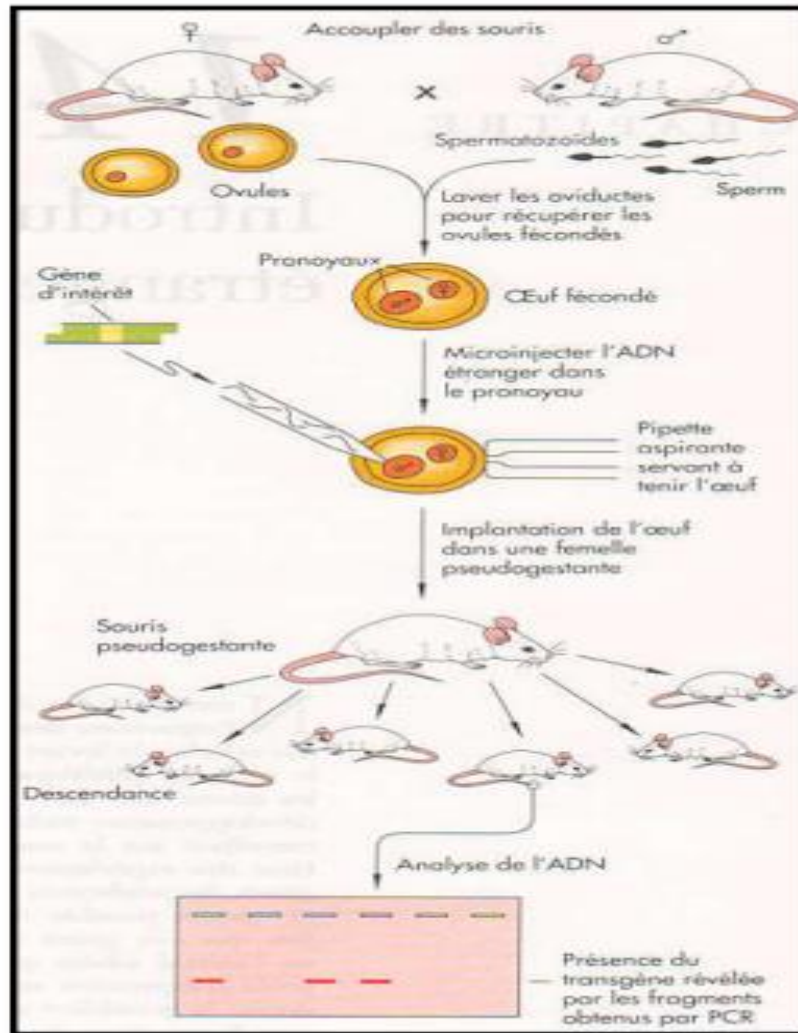


Figure 46. Animaux transgéniques par transformation d'ovule fécondé (Gaillardin & Tinsley, 2007)

VI.3. Applications industrielles et environnementales

VI.3.1. Production des enzymes et biomolécules

Les microorganismes recombinants sont répandus pour la production des enzymes industrielles amylase, lipase, protéase appliquent dans l'industrie vivrières, textile, papetière, ou pharmaceutique. L'ADN recombinant profite également la production des biopolymères (Demain & Vaishnav, 2009).

VI.3.2. Dépollution et bioremédiation

Les micro-organismes recombinants sont joints pour dépolluer des sols ou des eaux avec l'aide des pesticides, ou hydrocarbure à longue chaîne par dégradation des métaux lourds et aident à la gestion des déchets (**Sayler & Ripp, 2000**).

VI.4. Applications en recherche fondamentale

Les techniques de recombinaison de l'ADN ont révolutionné la recherche en biologie moléculaire et cellulaire. Elles permettent :

- Le clonage et la caractérisation de gènes ;
- L'étude de la régulation de l'expression génique ;
- La production de protéines recombinantes pour l'étude structurale et fonctionnelle ;
- La création de modèles animaux transgéniques pour la recherche biomédicale (**Capecchi, 2005**).

VII. Conclusion

Pour conclure le cours de Génie Génétique, on peut dire que le génie génétique est devenu un des piliers des sciences biologiques modernes. La capacité de manipuler le matériel génétique des organismes a permis non seulement de révéler les mécanismes de la vie, mais aussi, en fait, de créer de nouvelles applications dans des domaines tels que la médecine, l'agriculture, l'industrie et l'environnement. De la technologie du clonage, de la PCR, des banques d'ADN à l'expression recombinante et aux technologies d'édition génomique telles que CRISPR-Cas9. Les méthodes basées sur le génie génétique sont simplement devenues le droit des scientifiques à la survie en science et en révolution, cependant il y a beaucoup de questions tant éthiques, réglementaires que de biosécurité. Ces problèmes devraient être résolus dès que possible pour faire en sorte que tous les avantages du génie génétique soient les plus productifs et les moins dangereux possibles. Par conséquent, le génie génétique est un exemple frappant de l'unification des connaissances et de l'innovation scientifique en action.

Il est crucial de promouvoir un dialogue ouvert et constructif entre les scientifiques, les décideurs et le grand public. Un tel échange permettrait de mieux faire connaître les applications et les risques du génie génétique, tout en garantissant un développement éthique et responsable de ces technologies. L'avenir du génie génétique repose sur notre capacité collective à relever ses défis et à tirer parti de son potentiel au service de la société.

Travaux dirigés

TD1. Cartographie enzymatique et design de stratégie de clonage

Objectifs du TD :

- Revoir enzymes de restriction/modification, polymérase ligases,
- Construire une carte de restriction,
- Planifier un clonage insert/vecteur.

Exercice 1. Carte de restriction simple

La taille du plasmide pUC19 est de 2686 pb contient un site unique pour **EcoRI** à 1500 pb et un site unique pour **HindIII** à 2200 pb. Ce plasmide est digéré par les enzymes suivants : EcoRI seul ; HindIII seul ; EcoRI + HindIII.

1. Combien de fragments obtient-on pour chaque digestion ?
2. Quelles sont les tailles des fragments attendus dans le cas de la double digestion ?
3. Schématise la carte circulaire.

Exercice 2. Carte de restriction complète

Un autre plasmide de taille 5000 pb qui possède trois sites de restriction : EcoRI à 500 pb ; BamHI à 2000 pb ; HindIII à 3500 pb. La digestion de ce plasmide est réalisées par les enzymes suivants: EcoRI seul ; BamHI seul ; HindIII seul ; EcoRI + BamHI ; EcoRI + HindIII ; BamHI + HindIII. Répond aux question suivants :

1. Combien de fragments pour chaque digestion ?
2. Calcule la taille de chaque fragment obtenu dans chaque cas.
3. Dessine la carte complète du plasmide.

Exercice 3. Conception de stratégie de clonage

On dispose de ces deux vecteurs différents décrits comme suite :

- Un vecteur pBR322 (4361 pb) possédant un seule site EcoRI et un seule site PstI uniques,
- Un insert de 1,5 kb amplifié par PCR avec des extrémités EcoRI et PstI.

1. Propose une stratégie directionnelle de clonage en redonnant à ces questions : Quelles enzymes utiliser ? Quels tampons et températures ? Quelle ligase et conditions ?
2. Que se passe-t-il si tu digères ton insert avec seulement EcoRI ?
3. Que verras-tu sur un gel après digestion du plasmide recombinant avec EcoRI puis avec EcoRI + PstI ?
4. Pourquoi parle-t-on ici de clonage directionnel ?

Exercice 4. Orientation de l'insert

Dans cette expérience, on a cloné un fragment de 2 kb dans le vecteur pUC18 qui a une taille de 2,7 kb grâce à via deux sites EcoRI identiques (non directionnel). On récupères deux colonies différentes (A et B). On extrait le plasmide et fais une digestion EcoRI + BamHI.

Les résultats de gel sont décrit comme suite :

Colonie A → fragments : 2,7 kb et 2,0 kb

Colonie B → fragments : 3,5 kb et 1,2 kb

1. Pourquoi les tailles diffèrent entre A et B ?
2. Quelle est l'orientation de l'insert dans chaque cas ?
3. Quelle conclusion tires-tu sur l'efficacité du clonage non directionnel ?

Exercice 5. Remplissage des extrémités de Klenow

On veut insérer un fragment de taille 800 pb coupé par EcoRI dans un vecteur coupé par SmaI. On décide de traiter cet insert par Klenow fragment + dNTPs.

1. Quelle est la nature de l'extrémité produite, après traitement ?
2. Le site EcoRI sera-t-il conservé ?
3. Quel effet sur la directionnalité du clonage ?
4. Quelle enzyme aurais-tu pu utiliser à la place du Klenow ?

Exercice 6. Effet de la méthylation

On prépare de l'ADN plasmidique à partir d'une souche bactérienne $dam^+ dcm^+$. On veut digérer cet ADN avec les enzymes suivantes : EcoRI, ClaI, BclI, DpnI.

1. Lesquelles seront actives, lesquelles bloquées ?

2. Pourquoi DpnI ne coupe-t-il pas l'ADN amplifié par PCR ?
3. Que faut-il faire pour digérer efficacement un plasmide avec une enzyme sensible à la méthylation ?

Exercice 7. Calcul de ratio insert/vecteur

Vecteur linéarisé de taille 4,5 kb (50 nt utilisés). Insert de taille 1,0 kb. Avec un ratio molaire **3:1** (insert:vecteur). Calcule la masse (en ng) d'insert à ajouter.

Rappel : ratio molaire = (masse_insert / masse_vecteur) × (taille_vecteur / taille_insert)

Exercice 8. Interprétation de gel

Une digestion **EcoRI** de trois plasmides extraits de clones transformés est réalisée :

Clone 1 : bande unique à 4,3 kb

Clone 2 : bandes à 4,3 kb et 1,2 kb

Clone 3 : bande unique à 5,5 kb

1. Quel clone contient un insert ?
2. Quelle est la taille de l'insert ?
3. Pourquoi observe-t-on des différences de migration entre clone 2 et 3 ?

TD2. RFLP et Southern: diagnostic d'une mutation de site de restriction

Objectifs du TD :

- Appliquer RFLP sur un amplicon ciblant 4 sites;
- Interpréter un Southern blot de fragments EcoRI;
- Diagnostiquer la perte d'un site (mutation).

Exercice 1. Détection d'une mutation par RFLP

Nous avons un fragment d'ADN de 1100 pb qui contient 4 sites de restriction pour l'enzyme EcoRI, situés à :

- Site A : 200 pb
- Site B : 450 pb
- Site C : 750 pb
- Site D : 1000 pb

Chez l'individu P1 (sain), tous les sites sont présents. Chez P2 (muté), le site C est perdu à cause d'une mutation ponctuelle.

1. Indique les tailles des fragments obtenus après digestion complète chez P1.
2. Indique les tailles des fragments obtenus après digestion complète chez P2.
3. Dessine le profil attendu sur gel d'agarose 2 %.
4. Comment expliques-tu la différence de migration entre P1 et P2 ?
5. Quelle conséquence aurait une digestion incomplète ?

Exercice 2. Interprétation d'un gel RFLP

La réalisation d'une PCR est faite par un fragment de 900 pb. La digestion par **BamHI** donne :

- Individu AA : deux bandes 600 pb + 300 pb
- Individu BB : une seule bande 900 pb

- Individu AB : trois bandes 900 pb + 600 pb + 300 pb
- 1. Quelle mutation a modifié le site de restriction ?
- 2. Que représentent les génotypes AA, AB, BB ?
- 3. Quelle est la logique de ce test pour un diagnostic de porteur ?
- 4. Pourquoi le RFLP est considéré comme une méthode co-dominante ?

Exercice 3. Simulation de Southern blot

On digère l'ADN génomique (20 µg) de deux individus avec **EcoRI**, puis on fait une électrophorèse et un Southern blot. On utilise comme sonde un fragment de 400 pb correspondant à la région entre les sites B et C de l'exercice 1.

1. Quels fragments la sonde détectera-t-elle chez P1 ? Chez P2 ?
2. Quelle taille de bande(s) observeras-tu sur la membrane ?
3. Si tu coupes ton ADN avec une autre enzyme ne reconnaissant pas la mutation, que verras-tu ?
4. Que se passerait-il si ta sonde hybridait à plusieurs loci dans le génome ?

Exercice 4. Choix et marquage de la sonde

On veut concevoir une sonde pour détecter ton fragment cible de 1100 pb :

- Option 1 : sonde radioactive (^{32}P) de 300 pb
 - Option 2 : sonde fluorescente (DIG ou Cy3) de 300 pb
1. Quels sont les avantages et inconvénients de chaque méthode (sensibilité, sécurité, durée de conservation) ?
 2. Quel type de marquage choisirais-tu pour un laboratoire d'enseignement ? Pour un laboratoire de recherche médicale ?
 3. Pourquoi la taille de la sonde influence-t-elle la spécificité de l'hybridation ?

Exercice 5. Analyse des résultats

On observe sur un gel de Southern détecté par fluorescence :

- Individu P1 : deux bandes nettes à 300 pb et 350 pb
- Individu P2 : une seule bande à 650 pb

1. Quelle explication moléculaire lies-tu à cette différence ?
2. Comment confirmer qu'il s'agit bien d'une perte de site et non d'un polymorphisme ailleurs ?
3. Quelle vérification par PCR complémentaire pourrais-tu faire ?

Exercice 6. Contrôles expérimentaux

Lors du Southern blot précédent, On veut ajouter des contrôles pour valider le transfert et l'hybridation.

1. Quel contrôle positif placerais-tu ? (type d'échantillon ou fragment)
2. Quel contrôle négatif ?
3. Comment vérifier que le transfert sur la membrane s'est bien effectué ?
4. Comment confirmer que la sonde s'est hybridée spécifiquement ?

Exercice 7. Limites de la méthode PCR-RFLP

On a fait une comparaison entre les deux techniques PCR-RFLP et le séquençage Sanger pour détecter des mutations ponctuelles.

1. Quels types de mutations échappent à la PCR-RFLP ?
2. Pourquoi la PCR-RFLP ne détecte-t-elle pas les mutations silencieuses ou les délétions lointaines ?
3. Donne deux avantages du séquençage par rapport au RFLP, et deux avantages du RFLP par rapport au séquençage.

Exercice 8. Cas clinique simulé

On a observé qu'une mutation responsable d'une maladie génétique (ex. B-thalassémie) abolit un site *mstii* dans le gène β -globine. On réalise une PCR sur 500 pb de la région concernée et digères le produit par *mstii*.

On a observé ces résultats :

- Individu N (normal) : deux bandes 300 pb + 200 pb
- Individu M (muté) : une seule bande 500 pb
- Individu H (hétérozygote) : trois bandes 500 pb, 300 pb et 200 pb

1. Indiquer la signification génétique de chaque profil.
2. Comment représenter graphiquement ce diagnostic sur gel ?
3. Quelle méthode alternative confirmerait le résultat ?
4. Quelle serait la différence si tu faisais un Southern au lieu d'un RFLP PCR ?

TD3. Design d'amorces et optimisation PCR

Objectifs du TD

- Concevoir des amorces pour une amplification spécifique
- Calculer T_m et GC content
- Rechercher des structures secondaires possibles (hairpin, dimère)
- Trouver une longueur optimale de fragment en fonction de PCR conditions (Mg^{2+} , cycle)

Exercice 1. Calcul de paramètres d'amorce

Un fragment d'ADN cible est:

5'-ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCC-3'

1. Proposez deux amorces (Forward et Reverse) de 18-22pb.
2. Calculez pour chaque amorce : %GC, T_m de fusion (T_m) par la forme :
 $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$
3. Vérifiez s'ils peuvent former un hairpin (auto-complémentarité interne)
4. Vérifiez ils peuvent former un dimère (complémentarité entre F et R)

Exercice 2. Taille de produit attendu

Un gène d'intérêt est amplifié avec amorces.

Forward : position 120

Reverse: complémentaire à la position 785

1. Quelle est la size du fragment amplifié?
2. Si vous voulez un produit de 300bp, quelle position devriez-vous choisir pour la nouvelle amorce Reverse?

Exercice 3. Influence du Mg^{2+}

Un chercheur a observé les cas suivants :

bande faible à $[MgCl_2] = 1,5 \text{ mM}$

bande faible mais non spécifique à $[MgCl_2] = 3 \text{ mM}$

1. Explique l'effet de Mg^{2+} sur la spécificité et l'amplification
2. Quelle concentration proposeriez-vous pour améliorer la spécificité?

Exercice 4. Programme thermique

Pendant la manipulation, on a chauffé :

- Dénaturation: 94-30s
- Hybridation: 45-30s
- Extension: 72°C – 1 min.

Résultat obtenu : multiple bandes sur le gel

Quelle étape ajusteriez-vous pour améliorer la spécificité?

Quelle T° d'hybridation proposez-vous si les amorces ont T_m moyen de 60°C?

Exercice 5. Détection d'erreurs dans un design

Un technicien de biologie moléculaire a proposé:

F: 5'-GCGGCGGCGGCGGCGGCGG-3'

R: 5'-ATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'

1. Quelles erreurs trouvez-vous?
2. Comment peut-il corriger ses choix?

Exercice 6. Simulation de produit attendu

Nous voulons amplifier un gène de 1,2kb: 3 exons et 2 introns. Les amorces sont situées:

- F sur exon 1
- R sur exon 3

1. Quelle est la différence de taille entre ADN génomique et ADNc?
2. Comment pouvez-vous l'expliquer la double bande après PCR sur gel?

TD4. Banques génomiques et d'ADNc / Conception et criblage

Objectifs du TD :

- Identifier et définir les éléments essentiels d'un vecteur pour construire une banque génomique ou d'ADNc.
- Calculer la couverture nécessaire d'une banque pour représenter un génome ou un transcriptome.
- Comprendre et décrire un criblage par hybridation (ou PCR) pour identifier un clone d'intérêt.

Exercice 1. Analyse d'un vecteur pour banque génomique

On souhaite construire une banque génomique d'une bactérie dont le génome fait 4,2 Mb. Vous disposez d'un vecteur plasmidique de 10 kb pouvant accueillir un insert de 40 kb.

1. Listez les éléments essentiels que doit contenir le vecteur pour permettre :
 - L'insertion de fragments génomiques.
 - La réplication et le maintien dans l'hôte.
 - La sélection des clones recombinants.
2. Quelle est la taille moyenne des inserts que vous choisirez et pourquoi?
3. Estimez le nombre minimum de clones nécessaires pour obtenir une couverture de 99% du génome. Données : $N = \ln(1-P) / \ln\left(\frac{f_0}{G}\right) (1-f/G)$

Exercice 2. Conception d'une banque d'ADNc

Vous souhaitez construire une banque d'ADNc à partir d'ARN messager d'une cellule humaine.

1. Expliquez pourquoi on utilise l'ADNc et non l'ARNm directement.
2. Quels éléments spécifiques doit contenir le vecteur pour qu'il exprime correctement l'ADNc dans une cellule hôte eucaryote?
3. Quelle serait la différence principale dans le calcul de couverture par rapport à une banque génomique?

Exercice 3. Criblage par hybridation

Vous avez construit une banque génomique clonée dans des vecteurs bactériens. Vous voulez identifier un clone contenant un gène d'intérêt.

1. Décrivez les étapes d'un criblage par hybridation avec une sonde radiomarquée.
2. Quels facteurs influencent la spécificité et la sensibilité du criblage?
3. Comparez cette méthode avec un criblage par PCR : avantages et limites.

Exercice 4 : Cas pratique

Une banque génomique contient 50 000 clones avec des inserts moyens de 30 kb. Le génome ciblé fait 3 Mb.

1. Calculez la couverture effective de la banque.
2. Si vous voulez augmenter la probabilité de couvrir 99,9% du génome, combien de clones supplémentaires seraient nécessaires?

Exercice 5 : Discussion

Quels sont les avantages et inconvénients des banques génomiques versus banques d'ADNc?
Pour quel type de projet choisiriez-vous l'une ou l'autre?

TD5. Hybridation moléculaire : sondes, marquage et FISH

Objectifs du TD

- Comparer les différents types de sondes et de marquages.
- Réviser le protocole FISH (Fluorescence In Situ Hybridization).
- Relier le choix de sonde et de marquage à une application clinique spécifique.

Exercice 1. Comparaison des sondes et marquages

On veut détecter un gène mutant dans différentes cellules humaines. Trois types de sondes sont disponibles :

- Sonde ADN double brin (long fragment cDNA)
- Sonde oligonucléotide (20–30 bases, simple brin)
- Sonde ARN (riboprobe)

On utilise différents marquages : fluorescents (FITC, Cy3), radioactifs (^{32}P) ou chimiques (digoxigénine, biotine).

1. Comparez les avantages et limites de chaque type de sonde (spécificité, taille, sensibilité).
2. Quel type de marquage choisiriez-vous pour :
 - Observation microscopique directe
 - Haute sensibilité pour détection faible
 - Applications cliniques nécessitant sécurité et rapidité
3. Associer un type de sonde à un type de marquage pour chaque scénario.

Exercice 2. Protocole FISH simplifié

On veut détecter une amplification du gène HER2 dans des cellules mammaires. On dispose d'une sonde fluorescente ciblant HER2.

Protocole résumé :

- Fixation et perméabilisation des cellules sur lame.

- Dénaturation de l'ADN cellulaire.
- Hybridation de la sonde marquée à l'ADN cible.
- Lavage pour éliminer la sonde non fixée.
- Observation au microscope à fluorescence.

1. Pourquoi est-il nécessaire de dénaturer l'ADN avant hybridation ?
2. Quelles étapes assurent la spécificité de la détection ?
3. Que signifient les signaux fluorescents détectés sur les cellules ? Comment distinguer :
 - Nombre normal de copies du gène
 - Amplification du gène.

Exercice 3. Applications cliniques et choix de sonde

Réunissez le type de sonde et de marquage aux applications suivantes :

Application clinique	Choix de sonde	Choix de marquage	Justification
Détection de trisomie 21 dans cellules fœtales	?	?	?
Détection d'un microdélétion dans gène HBB (thalassémie)	?	?	?
Suivi de thérapie ciblée par amplification HER2	?	?	?

Exercice 4. Interprétation d'images FISH

On fournit trois images FISH :

- Cellule avec 2 signaux par chromosome (normal)
- Cellule avec 4 signaux (amplification)
- Cellule avec un signal absent (délétion)

1. Identifier chaque type de variation génomique.
2. Relier chaque variation à une pathologie potentielle.

3. Proposer des applications diagnostiques de FISH pour chaque cas.

Exercice 5. Conception de sonde

On veut concevoir une sonde oligonucléotide pour détecter un SNP responsable d'une maladie génétique rare.

1. Quelles contraintes faut-il considérer pour la séquence de la sonde ? (T_m , GC, spécificité)
2. Quel type de marquage serait le plus approprié pour un diagnostic rapide ?
3. Comment valider la sonde avant utilisation clinique ?

TD6. Contrôle/ validation de clonage recombinant

Objectifs du TD

- Valider un clonage par digestion enzymatique; PCR de colonie.
- Interpréter une carte plasmidique et prédire les résultats.
- Distinguer clones recombinants/non recombinants.

Exercice 1. Validation par digestion enzymatique

Un plasmide de 5 kb contient un site unique pour l'enzyme EcoRI dans son polylinker, dans lequel vous avez inséré un fragment d'ADN de 1,2 kb.

1. Dessinez la carte du plasmide avant et après l'insertion.
2. Quel résultat attendez-vous en digérant
 - A) le plasmide vide avec EcoRI
 - B) le plasmide recombinant avec EcoRI Et,
3. si vous digérez le plasmide recombinant avec deux enzymes (EcoRI et BamHI) sachant que le fragment inséré contient un site BamHI, quel sera le résultat sur le gel?

Exercice 2. PCR de colonie

Vous avez transformé des bactéries avec le plasmide recombinant. Pour identifier les colonies recombinants, vous utiliserez deux amorces flanquant le site d'insertion.

1. Quelles tailles de PCR attendez-vous pour
 - A) une colonie avec le plasmide vide
 - B) une colonie avec le plasmide recombinant avec le fragment de 1,2 kb
2. Dessinez le gel attendu pour 4 colonies testées dont 2 recombinantes et 2 non recombinantes.
3. Quels facteurs peuvent conduire à un faux négative ou faux positif dans ce genre de PCR?

Exercice 3. Validation combinée

On vous donne le plasmide pXYZ joint à la fiche carte et un fragment d'ADN à insérer. Le plasmide a 2 sites EcoRI et 1 site BamHI dans le polylinker, tandis que le fragment inséré contient un site EcoRI et un site HindIII. Ensuite,

1. dessinez le plasmide recombinant avec le fragment inséré.
2. Vous digérez le plasmide recombinant avec

- A) EcoRI seul
- B) EcoRI + HindIII
- C) BamHI + HindIII.

2. Pour chaque digestion, indiquez le nombre et la taille des fragments attendus.
3. Comment pouvez-vous différencier le plasmide vide

Exercice 4. Une analyse critique

Vous avez transformé *E. coli* et obtenu 12 colonies après la sélection.

- Une PCR de colonie : 7 colonies positives
 - Une digestion du plasmide extrait. 6 colonies correspondent au carte attendue
1. Comment pouvez-vous interpréter ces résultats?
 2. Quelles colonies choisir pour des expériences ultérieures, et pourquoi?
 3. Proposez une façon de confirmer la séquence du fragment inséré.

TD7. Protéine thérapeutique produite par voie recombinante

Objectifs du TD

- Choisir l'hôte approprié pour l'expression de l'insuline/Hb/interféron;
- Définir la cassette d'expression et de purification;
- Envisager la vérification.

Exercice 1 : Hôte d'expression

1. La protéine à produire est l'insuline humaine recombinante. Pour dissoudre lequel des hôtes de la liste ci-dessous est le plus approprié et pourquoi?

- *E. coli*
- *S. Cerevisiae*
- Cellules CHO (cellules de mammifère)

2. Pour l'interféron α humain, comment choisiriez-vous l'hôte pour l'expression (glycosylation, repliement, coût, rendement)?

3. Pour l'hémoglobine recombinante, mettez en œuvre un hôte et expliquez en termes de complexité post-traductionnelle et de rendement.

Exercice 2 : Lacune de la cassette d'expression

1. Pour produire une protéine thérapeutique dans *E. coli*, décrivez graphiquement la cassette d'expression, y compris :

- Promoteur
- RBS (ribosome binding site)
- ORF de la protéine
- Termineur
- Éventuelles séquences de fusion ou tag (His-tag)

2. Pourquoi certains peptides signal ou tags peuvent-ils être ajoutés et comment facilitent-ils la purification?

3. Pour l'expression ultérieure dans une cellule de mammifère, comment diffère le contenu de la cassette par rapport à *E. coli*?

Exercice 3. Vérification de l'expression

1. Listez et décrivez trois méthodes pour vérifier que la protéine recombinante est produite et forme correctement.

Méthode 1 :

Méthode 2 :

Méthode 3 :

2. Pour les protéines glycosylées telles que l'interféron, comment vérifiez-vous que la glycosylation est correcte?

3. Nous voyons que la protéine formée sous forme d'inclusion dans *E. coli*. Quelles stratégies pouvons-nous utiliser pour assurer la solubilité ou le repliement corrects?

Exercice 4 : Protéine recombinante purifiante

1. La protéine recombinante possède un marquage His-tag. Énumérer brièvement les étapes de purification recommandées.

2. Si la protéine est destinée à la thérapie humaine, comment planifier une pureté et une vérification structurale adéquates?

3. Quelles démarches supplémentaires sont généralement requises pour une protéine exprimée dans *S. cerevisiae* ou CHO cellule par rapport à une expression bactérienne?

Exercice 5. Étude de cas

Objectif : rapporter tous les concepts discutés dans TD à l'étude de cas. Convertissez l'insuline humaine recombinante.

- Choisissez l'hôte et justifiez.
- Proposez un schéma de cassette d'expression.
- Décrivez comment vous vérifieriez la présence et la qualité de la protéine.
- Décrivez la stratégie de purification et les contrôles finaux avant usage thérapeutique.

TD8. Puces ADN et analyse d'expression

Objectifs du TD

- Analyse d'expression des puces d'ADN

Exercice 1: Puces à ADN Protocole d'analyse

Nous voulons connaître les différences d'expression génique entre les cellules normales et les cellules cancéreuses. Cela vous a été demandé de procéder à une expérience sur la puce à ADN; microréseau.

- 1) décrivez les étapes clés d'une expérience de microréseau se traduisant par de l'ARN d'extraction de l'acquisition de données brutes. Quels sont les points qui pourraient être des problèmes à chaque étape?
- 2) l'hybridation spécifique qu'est-ce que c'est et pourquoi elle est essentielle, décrivez comment cela se fait sur la puce.

Exercice 2. Conception d'expériences d'expression différentielle

Vous voulez comparer l'expression de tous les gènes d'un tissu sain et d'un tissu pathologique.

1. Proposez un schéma expérimental avec au moins trois réplicats biologiques par condition. Choisissez le type de puce (oligonucléotide ou cDNA) et justifiez votre choix.
2. Discutez des contrôles expérimentaux nécessaires pour assurer la fiabilité des résultats pour exemple : gènes de ménage, contrôle d'hybridation.

Exercice 3 : Interprétation de résultats

Après avoir hybridé et lu votre microarray, vous avez obtenu des intensités pour 20000 gènes. Un logiciel vous a donné un joli tableau avec \log_2 fold change et p-value pour chaque gène. Au sens de l'expression différentielle, qu'est-ce que c'est que le \log_2 fold change et qu'est-ce que c'est que le p-value?

Quels gènes sont différemment exprimés de façon significative (les critères sont $|\log_2FC| > 1$ et $p < 0,05$)?

Au-dessus d'un volcano plot cruellement simplifié et expliquez pourquoi est-il simple de répondre à cette question avec une telle représentation?

Exercice 4 : Validation par qPCR

Vous voulez valider les résultats du microréseau pour trois gènes distingués par une forte ou une faible expression.

1. Décrivez le protocole de validation par qPCR (depuis l'ARN jusqu'à l'analyse relative).
2. Expliquez le rôle des amorces spécifiques et d'un gène de référence.
3. Comparez les résultats attendus avec ceux du microarray et discutez des raisons possibles d'éventuelles discordances.

Exercice 5. Analyse critique

Lors de votre expérience, vous observez que certains gènes de ménage montrent une variation importante entre les échantillons.

1. Quels problèmes cela peut-il indiquer dans votre expérience ?
2. Proposez des solutions pour corriger ou minimiser ce type d'erreur.
3. Discutez de l'importance de la normalisation des données dans l'analyse d'expression.

Corrigé type des Travaux dirigés

Corrigé type du TD1. Cartographie enzymatique et design de stratégie de clonage

Exercice 1. Carte de restriction simple

1. Nombre de fragments

- EcoRI seul → **1 fragment** (coupure unique → plasmide linéarisé).
- HindIII seul → **1 fragment** (même raison).
- EcoRI + HindIII → **2 fragments** (deux coupures donnent deux arcs).

2. Tailles des fragments (double digest)

Entre EcoRI (1500) et HindIII (2200) : $2200 - 1500 = 700 \text{ pb}$.

Autre fragment : $2686 - 700 = 1986 \text{ pb}$.

Donc on attend **700 pb** et **1986 pb**.

3. Schéma

Cercle de 2686 pb ; site EcoRI à 1500 ; HindIII à 2200 ; arc $1500 \rightarrow 2200 = 700 \text{ pb}$, arc $2200 \rightarrow 1500 = 1986 \text{ pb}$.

Exercice 2. Carte de restriction complète

1. Nombre de fragments

- EcoRI seul → 1 (linéarisé).
- BamHI seul → 1.
- HindIII seul → 1.
- EcoRI + BamHI → 2.
- EcoRI + HindIII → 2.
- BamHI + HindIII → 2.

2. Tailles (calculs)

Positions ordonnées : $500 \rightarrow 2000 \rightarrow 3500 \rightarrow$ (retour à 500).

Segments :

- $500 \rightarrow 2000 = 2000 - 500 = 1500 \text{ pb}$.
- $2000 \rightarrow 3500 = 1500 \text{ pb}$.
- $3500 \rightarrow 500$ (en passant par la fin) $= 5000 - 3500 + 500 = 2000 \text{ pb}$.

Double-digests :

- EcoRI + BamHI : coupures à 500 et 2000 \rightarrow fragments **1500 pb** et **3500 pb**.
- EcoRI + HindIII : coupures à 500 et 3500 \rightarrow fragments **3000 pb** (3500–500) et **2000 pb**.
- BamHI + HindIII : coupures à 2000 et 3500 \rightarrow fragments **1500 pb** et **3500 pb**.

3. Carte complète

- Trois arcs : 1500, 1500, 2000 (voir segments ci-dessus).

Exercice 3. Conception de stratégie de clonage

1. Stratégie directionnelle proposée

- Enzymes : **EcoRI** + **PstI** sur **vecteur** et **insert** (digérer les deux).
- Tampons/température : utiliser le **tampon** compatible double-digest recommandé par le fournisseur (ex. NEB) ; **37 °C**, 1 h (ou plus si nécessaire).
- Purifier fragments (gel ou colonne).
- Déphosphorylation non nécessaire si on veut limiter religation du vecteur (optionnel : déphosphoryler le vecteur si nécessaire).
- Ligation : **T4 DNA ligase** avec 1× ligation buffer (ATP), ratio molaire recommandé **3:1** (insert:vecteur) ou 1:1 selon test ; **16 °C overnight** (ou 2 h à RT pour ligation rapide).
- Contrôles : vecteur seul ligaturé, insert seul.

2. Si l'insert est digéré seulement par EcoRI

L'insert aura EcoRI à ses deux extrémités (si PCR initiale l'avait), mais le vecteur n'a qu'un EcoRI unique \rightarrow incompatibilité pour clonage directionnel ; insertion possible mais orienta-

tion aléatoire ou nécessite adaptation. De plus religation vecteur possible → faibles rendements.

3. Profils gel attendus

Taille plasmide recombinant totale = 4361 + 1500 = **5861 pb** (≈5.86 kb).

EcoRI seul (si plasmide recombinant contient maintenant 2 sites EcoRI ; un provenant du vecteur, un de l'insert) → **2 bandes : 1.5 kb (insert) + ~4.36 kb (backbone)**.

- ✓ Si EcoRI était unique sur le vecteur mais l'insert apporte également un site EcoRI, EcoRI simple coupe à deux endroits et libère l'insert.

EcoRI + PstI (double) → **2 bandes distinctes** : insert 1.5 kb + backbone 4.36 kb (aussi). (En pratique, la présence attendue d'une bande à 1.5 kb indique recombinant.)

4. Clonage directionnel

Parce que les extrémités d'insert et de vecteur (EcoRI vs PstI) ne sont pas compatibles entre elles : l'insert ne peut s'insérer que dans une seule orientation => orientation fixée.

Exercice 4. Orientation de l'insert

Données digest EcoRI + BamHI

- Colonie A → fragments 2,7 kb et 2,0 kb
- Colonie B → fragments 3,5 kb et 1,2 kb

1. Pourquoi tailles différentes ?

- L'insert peut s'insérer dans les deux orientations quand on utilise deux sites identiques (EcoRI/EcoRI). Selon l'orientation, les distances entre sites EcoRI et BamHI sur le plasmide recombiné changent, donc les tailles des fragments après EcoRI+BamHI diffèrent.

2. Orientation de l'insert

- Interprétation typique :

Colonie A : les fragments correspondent à backbone (2,7 kb) + insert (2,0 kb) séparés → insert inséré d'une façon qui place BamHI à une position qui produit ces tailles (orientation 1).

Colonie B : fragments 3,5 + 1,2 → la somme fait 4,7 kb (=2,7 + 2,0) ; ceci correspond à l'autre orientation (orientation 2).

En bref : A et B ont la même insertion mais **orientations opposées**.

3. Conclusion sur le clonage non directionnel

Il aboutit à **≈50%** d'inserts dans chaque orientation (si toutes choses égales), d'où nécessité de screening (PCR orientationnelle ou digest) pour identifier la bonne orientation.

Exercice 5. Remplissage des extrémités de Klenow

Contexte : insert 800 pb coupé par EcoRI ; vecteur coupé par SmaI (blunt). Insert traité par **Klenow + dNTPs**.

1. Nature de l'extrémité après traitement

Klenow **remplit** les overhangs 5' produits par EcoRI → produit **extrémités blunt** sur l'insert.

2. Le site EcoRI sera-t-il conservé ?

Non. Le remplissage des surplombs change la séquence du site EcoRI (GAATTC) : la reconnaissance de EcoRI est perturbée/détruite. On ne pourra plus diagnostiquer par EcoRI.

3. Effet sur la directionnalité

Les extrémités blunt sont **symétriques** → clonage **non directionnel** ; orientation aléatoire (≈50/50).

4. Alternative

T4 DNA polymerase (avec dNTPs pour fill-in ou sans dNTP pour enlever 3' surplombs selon protocole) peut aussi être utilisée. Klenow est correct mais lent ; T4 DNA pol est souvent préféré pour polissage.

Exercice 6. Effet de la méthylation

Rappels rapides

- **Dam** méthylase → méthyle l'adénine dans **GATC** (G^m6ATC).
- **Dcm** méthylase → méthyle la cytosine dans **CCWGG** (où W = A/T).

1. Quelles enzymes actives / bloquées ?

- **EcoRI (GAATTC)** : généralement pas affecté par dam ($GATC \neq GAATTC$) → **actif** sur ADN dam⁺.
- **ClaI** (site : ATCGAT) : ce site contient la séquence **TCG A T** — il y a un chevauchement possible avec GATC en orientation inverse selon le site exact ; **l'effet dépend** : si le site contient GATC (ou son complément) la méthylation dam peut **bloquer** ; sinon non. En pratique, **vérifie la sensibilité au dam/dcm dans la documentation fournisseur**.
- **BclI** (site : TGATCA) : contient **GATC** (positions 2–5 = GATC) → **peut être bloqué** par la méthylation dam (puisque la méthylation survient sur GATC). Donc BclI **risque d'être inactif** sur ADN dam⁺.
- **DpnI** : coupe **spécifiquement** l'ADN **méthylé** sur la séquence G^m6ATC → **DpnI coupera l'ADN provenant de la souche dam⁺** (plasmide extrait) mais **ne coupera pas l'ADN amplifié par PCR** (PCR produit non méthylé).

2. Pourquoi DpnI ne coupe pas l'ADN PCR ?

- Parce que DpnI reconnaît et coupe **uniquement** la forme **méthylée** G^m6ATC. L'ADN synthétisé par une polymérase in vitro **n'est pas méthylé**, donc **résistant** à DpnI.

3. Que faire pour digérer un plasmide avec une enzyme sensible à la méthylation ?

Solutions :

- ✓ Produire le plasmide dans une souche **dam⁻ / dcm⁻** (bactéries mutantes qui ne méthylent pas) avant extraction.
- ✓ Ou, si possible, utiliser une enzyme alternative **isocaudale** ou **un autre enzyme** non sensible à la méthylation.
- ✓ Toujours **vérifier la fiche technique** (suppl. = « dam sensitive? dcm sensitive? ») du fournisseur de l'enzyme.

Exercice 7. Calcul de ratio insert/vecteur

But : calculer la masse d'insert (en ng) à ajouter pour obtenir un **ratio molaire 3:1** (insert:vecteur).

Formule utilisée (courante) :

Rappel : ratio molaire = (masse_insert / masse_vecteur) × (taille_vecteur / taille_insert)

On effectue le calcul **chiffre par chiffre** :

- Taille_vecteur = **4 500 pb.**
- Taille_insert = **1 000 pb.**
- Ratio = **3.**
- ng_vecteur = **50 ng.**

1. Calcul du rapport taille_insert / taille_vecteur :

$1000/4500$

Divisons : $1000 \div 4500 = (\text{diviser par } 100) \rightarrow 10 \div 45 = 2 \div 9$.

$2/9 = 0,222222\dots$ (répétition de 2).

2. Multiplier ng_vecteur × ratio : $50 \times 3 = 150$; $150 \times 0,222222 = 33,3333$ (ng effectifs de vecteur pondérés).

3. Multiplier par le facteur $2/9$:
 $150 \times 2/9 = 300/9 = 33,3333$; Calcul exact : $300 \div 9 = 33,3333\dots$ ng.

Résultat : ≈ 33.3 ng d'insert.

En pratique on arrondit : ≈ 33 ng (ou 33–35 ng).

Exercice 8. Interprétation de gel

1. **Quel clone contient un insert ?**

Clone 2 contient un insert : on voit la bande d'insert à **1,2 kb** en plus du backbone à **4,3 kb**.

Clone 1 (4,3 kb) est très probablement **vecteur vide**.

2. **Quelle est la taille de l'insert ?**

D'après Clone 2 : **1,2 kb**.

3. **Pourquoi différences entre clone 2 et clone 3 ?**

Clone 2 : EcoRI a clivé **aux deux sites** (un dans le backbone et un sur l'insert), libérant l'insert de 1,2 kb → deux bandes 4,3 + 1,2.

Clone 3 : bande unique à **5,5 kb** (= 4,3 + 1,2) → cela signifie qu'après digestion EcoRI **il n'y a eu qu'une coupure** (ou aucune coupure libérant l'insert). Possible explication :

Le **site EcoRI dans l'insert est détruit** (par fill-in, mutation, ligation incompatible) — donc EcoRI ne libère pas l'insert ; EcoRI ne coupe qu'à un seul endroit donnant un fragment linéaire complet de **5,5 kb** ; ou

L'insert a été inséré de façon à **supprimer** le site EcoRI (par exemple par PCR avec fill-in) ; ou Problème de digestion incomplète pour ce clone (contrôler en refaisant digest + contrôle d'endonucléase).

En somme : clone 3 **contient un insert**, mais **le(s) site(s) EcoRI qui libéreraient l'insert ont été perdus/masqués** → on observe la bande complète 5,5 kb.

Corrigé type du TD2. RFLP et Southern: diagnostic d'une mutation de site de restriction

Exercice 1. Détection d'une mutation par RFLP

1) P1 (tous les sites présents)

L'amplicon linéaire est coupé à 4 positions → il produit **5 fragments** (nombre de fragments = nombre de coupures + 1). Tailles (ordre 5'→3') :

- Fragment 1 : 0 → A = **200 pb**
- Fragment 2 : A → B = 450 – 200 = **250 pb**
- Fragment 3 : B → C = 750 – 450 = **300 pb**
- Fragment 4 : C → D = 1000 – 750 = **250 pb**
- Fragment 5 : D → fin = 1100 – 1000 = **100 pb**

Vérification somme : 200 + 250 + 300 + 250 + 100 = **1100 pb**.

2) P2 (C perdu : coupures à A, B, D seulement)

C absent → on a 3 coupures → **4 fragments** :

- 0 → A = **200 pb**
- A → B = **250 pb**
- B → D = 1000 – 450 = **550 pb** (ici B→C + C→D fusionnent)
- D → fin = **100 pb**

Somme 200 + 250 + 550 + 100 = 1100 pb.

3) Profil attendu sur gel (agarose 2 % — bonne résolution pour 100–1000 pb)

En 2 % agarose on résout bien les petits fragments ; attente qualitative (plus net pour fragments >100 pb) :

P1 bandes (5) : 300, 250, 250, 200, 100 (ordre d'intensité proportionnel aux quantités — ici toutes en une copie → intensité similaire sauf petit 100 pb peut apparaître plus diffus).

P2 bandes (4) : 550, 250, 200, 100.

Texte / schéma simple (vertical = puce) :

P1: [300] [250] [250] [200] [100]

P2: [550] [250] [200] [100]

Ladder: 100 200 300 400 500 600 700 ...

Sur le gel tu remarques immédiatement la **bande 300 pb** présente en P1 mais absente en P2, et à la place P2 a une **bande 550 pb** (fusion des 300 + 250).

4) Pourquoi la différence ?

La **perte du site C** fait fusionner les deux fragments adjacents ($B \rightarrow C = 300$ pb et $C \rightarrow D = 250$ pb) en un seul fragment $B \rightarrow D = 550$ pb. Donc on perd la bande 300 et on obtient la 550.

5) Effet d'une digestion incomplète

- Digestion incomplète donne **bandes intermédiaires** : apparence de bandes correspondant à fragments non digérés (p.ex. un fragment plus grand qui correspond à "fusion" due à absence de coupure) → peut être confondu avec une mutation.
- Contrôle : inclure un contrôle connu (ADN témoin entièrement digéré) et conditions optimisées (suffisamment d'enzyme, temps, tampon, 37 °C) ; faire une digestion prolongée ou double-digestion pour s'assurer de la complétude.

Exercice 2. Interprétation d'un gel RFLP

1. **Mutation** : une mutation détruit le site de restriction BamHI dans l'allèle B.

2. **Génotypes** :

AA = homozygote pour l'allèle qui conserve le site (les deux allèles coupés → 600 + 300).

BB = homozygote mutant (aucun site → fragment intact 900).

AB = hétérozygote (on voit à la fois l'allèle coupé et non coupé → 900 + 600 + 300).

3. **Logique du test** : Un porteur (= hétérozygote) montre à la fois la bande non coupée (900) et les bandes coupées (600,300). On détecte donc porteurs facilement.

4. **Pourquoi co-dominant ?** Parce que les deux allèles sont détectables séparément (produits des deux allèles sont visibles en gel), contrairement à un marqueur dominant/récessif où l'un masque l'autre.

Exercice 3. Simulation de Southern blot

Rappel : la sonde correspond à la région entre B et C (dans l'exo. donné plus haut on avait $B \rightarrow C = 300$ bp ; ici exercice proposait 400 pb — on adapte : on suppose la sonde hybride à l'intérieur/recouvrant $B \rightarrow C$). L'idée reste la même : la sonde détecte tout fragment qui contient sa séquence.

1) Quels fragments la sonde détecte ?

Chez P1 : l'enzyme EcoRI coupe à B et C \rightarrow la sonde (entre B et C) hybridise au fragment **$B \rightarrow C$** (taille **300 pb** dans notre positions initiales).

Chez P2 (C perdu) : après digestion EcoRI le fragment qui contient la séquence de la sonde devient **$B \rightarrow D$** (taille **550 pb**). Donc la sonde détectera **550 pb**.

(En bref : P1 \rightarrow bande petite (300), P2 \rightarrow bande unique plus grande (550).)

2) Taille(s) observées sur membrane

P1 : **~300 pb** (ou taille de la région interrogée).

P2 : **~550 pb**.

3) Si on coupe avec une autre enzyme non affectée par la mutation

Si l'enzyme ne a pas de site polymorphe dans la région, la bande détectée **ne change pas entre P1 et P2** (les tailles dépendront de la position des sites de cette autre enzyme). Le polymorphisme spécifique au site C ne s'exprime que pour les digestions par l'enzyme reconnaissant ce site.

4) Si la sonde hybridait à plusieurs loci

Tu verrais **plusieurs bandes** (plusieurs tailles) sur le blot ; chaque locus où la sonde a homologie génomique donne une bande. Cela complique l'interprétation (nonspecificité). Pour éviter : choisir une sonde unique (séquence unique dans le génome) ou augmenter la stringence d'hybridation (température, salinité) pour réduire l'hybridation non spécifique.

Exercice 4. Choix et marquage de la sonde

^{32}P (radioactif)

Avantages : très **haute sensibilité**, bon pour détecter faibles copies. Exposition rapide.

Inconvénients : radioactivité (risques et réglementations), demi-vie (14.3 jours pour ^{32}P) → coût/gestion, déchets radioactifs, exigences de sécurité et d'équipement (cabinets, conteneurs, autorisations), autorisation pour transport/déchets. Pas idéal pour enseignement standard.

DIG / Biotine / Fluorescent / Chemiluminescent (non-radioactif)

Avantages : **sécurité**, stockage facile, manipulations simples, possibilité de réutiliser membranes (par stripping), méthodes modernes très sensibles (chemiluminescence) bien adaptées au labo d'enseignement.

Inconvénients : parfois **moins sensible** que ^{32}P (mais les systèmes DIG chemiluminescent sont très proches en sensibilité). Détection peut nécessiter caméra CCD ou film X-ray selon méthode.

Choix recommandé

Laboratoire d'enseignement : DIG ou fluorescent (sécurité, simplicité, pas d'autorisation radio).

Laboratoire clinique/haute sensibilité historique : ^{32}P a été la référence pour sensibilité, mais aujourd'hui beaucoup de labs cliniques préfèrent systèmes non-radioactifs hautement sensibles (chemiluminescent) pour raisons réglementaires.

Taille de la sonde et spécificité

- **Plus longue** → meilleure sensibilité (plus d'appariements), mais **risque d'homologies partielles** si la séquence n'est pas unique → possible non-spécificité.
- **Plus courte** → meilleure spécificité si on choisit une région unique, mais peut perdre en signal si très courte (< 100 pb).
- Bon compromis : **200–500 pb** pour sondes basées sur ADN génomique ; pour sondes oligonucléotidiques, utiliser plusieurs copies ou digoxigénine couplée, etc.

Exercice 5. Analyse des résultats

Données observées :

- P1 → deux bandes 300 pb et 350 pb

- P2 → une seule bande 650 pb

1) Interprétation moléculaire

C'est exactement le scénario d'une **perte d'un site de restriction situé entre ces deux fragments**. Chez P1 la région est divisée en 300 + 350 ; chez P2 la perte du site fait fusionner les deux en **650 pb**.

Conclusion : **perte du site** → fusion des fragments.

2) Comment confirmer que c'est bien une perte de site (et pas polymorphisme ailleurs) ?

- **Séquençage** du fragment PCR (Sanger) : donnera la mutation exacte et confirmera la disparition du site de restriction.
- **Digestion avec un autre enzyme** dont le site est proche (ou confirmant le motif) pour voir si le motif a été modifié.
- **PCR-spanning** puis digestion du produit PCR pour vérifier que le changement est liée à la séquence amplifiée (et non à un problème d'ADN génomique complet).

3) Vérification PCR complémentaire

Amplifier la région qui contient les sites A–D (ex. primers enflaquant). Puis :

- ✓ Faire une digestion du produit PCR avec EcoRI → comparer profils P1 vs P2 (doit reproduire le RFLP).
- ✓ Séquencer le produit PCR (Sanger) pour confirmer la mutation ponctuelle abrogeant le site.

Exercice 6. Contrôles expérimentaux

1) Contrôle positif

ADN témoin connu qui **contient** la séquence cible non mutée (p.ex. ADN d'un individu déjà genotypé P1). Ou un plasmide portant la séquence attendue. Le contrôle positif doit donner le patron attendu (p.ex. 300 + 250 etc.).

2) Contrôle négatif

ADN known **sans** la séquence (si possible) ou échantillon sans ADN (eau) pour contrôler contamination. Pour Southern, un ADN d'une espèce sans la séquence cible peut servir.

3) Vérifier le transfert sur membrane

Coloration de la membrane (méthylène bleu / Methylene blue) ou coloration du gel avant transfert pour vérifier que l'ADN est bien sorti du gel.

Vérifier la présence d'ADN sur membrane par hybridation avec une sonde universelle (p.ex. une sonde pour un gène de contrôle ou pour le marqueur d'ADN placé sur le gel).

4) Vérifier la spécificité d'hybridation

- Inclure des lavages à haute stringence (température élevée / faible salinité) : les hybridations non spécifiques se détachent.
- Contrôler par compétition (ajouter excès d'ADN non marqué spécifique vs non spécifique).
- Vérifier les tailles attendues vs bande non attendue et séquencer le fragment si ambiguïté.

Exercice 7. Limites de la méthode PCR-RFLP

1) Mutations échappant à PCR-RFLP

- Mutations **qui n'affectent pas** un site de restriction testé (p.ex. mutation silencieuse hors du motif).
- Mutations **en dehors** de la zone amplifiée.
- Petites indels loin d'un site de restriction (n'affectant pas le site), ou mutations créant sites dans des positions inattendues qui ne sont pas interrogées.

2) Pourquoi PCR-RFLP rate les mutations silencieuses ou délétions lointaines

PCR-RFLP ne « lit » que la **présence/absence** du site de restriction ; si un changement ne touche pas la séquence reconnue par l'enzyme, il restera invisible. De plus, RFLP n'indique pas la nature de la substitution.

3) Avantages du séquençage

Détection de toute substitution (connaissance de la mutation exacte).

Permet d'identifier mutations nouvelles/non prévues et petites indels.

– Plus coûteux / plus lent que RFLP (mais de moins en moins).

– Besoin d'analyse/interprétation des traces.

4) Avantages du RFLP

Bon marché, rapide, facile à mettre en place en labo d'enseignement.

Utile pour dépistage de mutations bien connues et fréquentes (tests de porteurs).

– Détecte uniquement mutations affectant un site d'endonucléase connu.

Exercice 8. Cas clinique simulé

Données (résultats déjà fournis) :

Normal (N) : 300 + 200 → homozygote non muté.

Muté (M) : 500 → homozygote mutant (site aboli).

Hétérozygote (H) : 500 + 300 + 200 → porte les deux allèles.

1) Signification génétique

N = deux allèles normaux (les deux sont coupés par MstII).

M = deux allèles mutants (aucun site → PCR non coupé).

H = un allèle normal, un allèle mutant (les trois bandes apparaissent).

2) Représentation graphique

Sur gel (largeur en pb) :

Lane N: [300] [200]

Lane H: [500] [300] [200]

Lane M: [500]

Ladder: 100 200 300 400 500 ...

3) Méthode alternative de confirmation

Séquençage Sanger de la PCR → identification de la mutation qui abolit le site.

Également, PCR-ARMS (allele-specific PCR) ou qPCR avec sonde spécifique pour la mutation, ou digestion avec enzyme alternative, ou Southern si variation plus large.

4) Différence si on faisait un Southern au lieu d'un RFLP PCR

Southern analyse fragments génomiques après digestion (non seulement produit PCR) ; la résolution dépendra de la densité des sites autour du gène et des sizes génomiques ; Southern détecte variations de taille plus grandes (délétions, insertions/rearrangements) et copies, mais requiert beaucoup plus d'ADN, travail plus long, et sondes. RFLP-PCR est rapide, sensible et adapté au diagnostic ciblé de petites mutations.

Corrigé type du TD3. Design d'amorces et optimisation PCR

Exercice 1. Calcul de paramètres d'amorce

Séquence cible (5'→3') :

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGG-
TCGAGCTGGACGGCGACGTAA

(longueur = 70 pb)

1. Proposition d'amorces (18–22 pb)

Forward (F) (20 pb, bases 1–20) :

5'-ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA-3'

Reverse (R) (20 pb, complémentaire des bases 51–70) :

Séquence des bases 51–70 (template, 5'→3') = CGAGCTGGACGGCGACGTAA

Reverse-complement (5'→3') = TTACGTCGCCGTCCAGCTCG

Donc **R** = 5'-TTACGTCGCCGTCCAGCTCG-3'

2. Calculs (digit-by-digit)

Pour F = ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA (20 nt)

Comptage base par base :

- A = 6
- T = 2
- G = 10
- C = 2
- (6 + 2 + 10 + 2 = 20)

$$\%GC = (G + C) / \text{longueur} = (10 + 2) / 20 = 12 / 20 = \mathbf{0.60} \rightarrow \mathbf{60\%}$$

$$T_m \text{ (Wallace)} = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C)$$

$$= 2 \times (6 + 2) + 4 \times (12)$$

$$= 2 \times 8 + 48$$

$$= 16 + 48 = \mathbf{64} \text{ } ^\circ\text{C}$$

3. Pour R = TTACGTCGCCGTCCAGCTCG (20 nt)

Comptage :

- A = 2
- T = 5
- G = 5
- C = 8

$$(2 + 5 + 5 + 8 = 20)$$

$$\%GC = (G + C) / 20 = (5 + 8) / 20 = 13 / 20 = \mathbf{65\%}$$

$$\begin{aligned} T_m &= 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C) \\ &= 2 \times (2 + 5) + 4 \times (13) \\ &= 2 \times 7 + 52 \\ &= 14 + 52 = \mathbf{66\text{ }^\circ\text{C}} \end{aligned}$$

Bilan T_m : 64 °C (F) vs 66 °C (R) → différence 2 °C → **acceptable** (idéal ≤ 5 °C, préférer ≤ 2–3 °C).

4. Vérification structures secondaires (principes et résultat rapide)

- **Hairpin (auto-complémentarité)** : rechercher trames de 4+ bases intramoléculaires inversées.

F : séquence relativement répartie, pas de longue séquence auto-complémentaire terminale ; **faible risque** de hairpin sévère.

R : riche en GC mais pas d'auto-complémentarité 3' critique apparente → **risque modéré** (à vérifier avec outil logiciel si besoin).

- **Dimères F–R (hétérodimères)** : surtout vérifier complémentarité au niveau des 3' (3'–3').

Comparatif 3' dernières bases : F termine par ...GGA (3' = A), R termine par ...TCG (3' = G) → **pas d'appariement 3' fort** → faible risque de dimère d'extension.

- **Homopolymères** : aucune des deux amorces n'a de queue de >4 mêmes bases → OK.

(Recommandation : utiliser un logiciel de design (Primer3, OligoAnalyzer) pour un scan complet des hairpins/dimères.)

Exercice 2. Taille de produit attendu

Positions : Forward en 120, Reverse complémentaire en 785.

Taille du produit = $785 - 120 + 1 = 666$ pb. (si on considère bornes incluses ; si on compte simplement $785 - 120 = 665$ pb selon convention ; préciser convention ; j'ai utilisé la formule inclusive pour être explicite : 666 pb).

Pour obtenir ≤ 300 pb, si Forward reste en 120, la Reverse doit se fixer $\approx 120 + 300 - 1 = \approx 419$ (position ~ 419).

Donc placer la nouvelle Reverse autour de la position $\sim 419-420$.

Exercice 3. Influence du Mg^{2+}

Observations :

- Bande faible à $[MgCl_2] = 1,5$ mM
- Bande multiple/non spécifique à $[MgCl_2] = 3$ mM

Rappel mécanistique :

- Mg^{2+} est cofacteur de la Taq polymérase ; il stabilise les appariements ADN-amorce.
- **Trop peu de Mg^{2+}** \rightarrow faible activité enzymatique \rightarrow produit faible ou absent.
- **Trop de Mg^{2+}** \rightarrow stabilisation d'appariements imparfaits \rightarrow amorces peuvent s'hybrider de façon non spécifique \rightarrow produits non spécifiques / smear.

Conseil pratique :

- Commencer une fenêtre d'optimisation autour de **1,5 mM \rightarrow 2,5 mM** (ex. 1.5, 1.75, 2.0, 2.25, 2.5 mM).
- Si à 1.5 mM le signal est faible et à 3.0 mM on a non spécifiques, souvent la meilleure marche est **$\sim 1.75-2.0$ mM**.

Exercice 4. Programme thermique

Protocole initial :

- Dénaturation 94 °C – 30 s
- Hybridation 45 °C – 30 s
- Extension 72 °C – 1 min

Résultat : bandes multiples.

Analyse & corrections :

- **Hybridation 45 °C** est trop basse si les T_m des amorces sont ~ 60 °C \rightarrow favorise l'hybridation non spécifique.
- Règle pratique : $T_a \approx T_m_{\min} - 3$ °C (ou calculer par gradient). Pour $T_m \approx 60$ °C $\rightarrow T_a \approx 57$ °C.
- **Durée d'extension** : 1 min suffit pour ~ 1 kb ($T_{aq} \approx 1$ kb/min). Ajuster si produit plus petit $\rightarrow 30-45$ s ; si plus grand $\rightarrow 1.5-2$ min.
- **Nombre de cycles** : 25–30 pour matrice riche ; >35 favorise produits non spécifiques.

Programme proposé (point de départ) :

- Dénaturation initiale 95 °C – 2 min
- Cycles (25–30 cycles) :
 - 95 °C – 15–30 s
 - T_a 57 °C – 20–30 s (ou gradient 55–60 °C pour tester)
 - 72 °C – 30–60 s (selon taille du produit)
- Extension finale 72 °C – 5 min

Exercice 5. Détection d'erreurs dans un design

Amorces proposées par l'étudiant :

- F : GCGGCGGCGGCGGCGGCGG (très GC-rich, motifs répétés)
- R : ATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT (polydT)

Erreurs principales :

1. **F** : séquence trop riche en GC + motifs répétitifs → fort risque de structures secondaires (hairpins, dimères), d'opacités de polymérase, difficulté de dénaturation locale → **mauvaise amplification**.
2. **R** : queue homopolymère de T (20 T) → T_m très bas, mauvaise spécificité, risque d'appariements non spécifiques (polyA de matrices), faible stabilité.
3. Longueurs extrêmes et composition déséquilibrée → T_m très différent entre F et R → inefficacité.

Solutions :

- Redessiner les deux amorces pour **18–22 nt**, **GC 40–60%**, éviter homopolymères de >4 nt, éviter motifs répétitifs, privilégier 3' riches en G/C mais sans runs excessifs, éviter complémentarités 3'-3'.

Exercice 6. Simulation de produit attendu

Contexte : gène 1,2 kb avec 3 exons et 2 introns ; amorces F sur exon 1 et R sur exon 3.

1. Différence de taille attendue :

ADNc (cDNA) : produit couvrant exons 1→3 (introns excisés) → plus court.

ADN génomique : inclut les introns → **plus grand**.

Exemple : si introns cumulés = 800 pb → $ADNg = 1.2 \text{ kb} + 800 = 2.0 \text{ kb}$; $ADNc = 1.2 \text{ kb}$.

2. Double bande sur gel :

Si on observe deux bandes → probable amplification à partir de **deux matrices** (ADNc/cDNA et ADNg) ou **épissage alternatif** (isoformes d'ARN) ou amplification non spécifique.

Vérifier : RNase/DNase treat (traiter échantillon), faire contrôle sans RT (no-RT) pour s'assurer qu'il n'y a pas d'ADN génomique contaminant, ou faire dessin d'amorces qui chevauchent un exon–exon pour éviter amplification d'ADNg.

Corrigé type du TD4. Banques génomiques et d'ADNc / Conception et criblage

Exercice 1. Analyse d'un vecteur pour banque génomique

1. Éléments essentiels d'un vecteur :

- **Origine de répllication (ori)** : pour que le plasmide se réplique dans l'hôte.
- **Site de clonage multiple (MCS)** : permet l'insertion du fragment génomique par enzymes de restriction.
- **Gène de sélection (ex : résistance antibiotique)** : pour isoler les clones porteurs du plasmide.
- **Séquences de régulation facultatives** : selon le but (promoteur, terminateur).

2. Taille moyenne des inserts :

On choisit des fragments proches de la taille maximale supportée par le vecteur pour réduire le nombre de clones nécessaires.

Ici : 30–40 kb est optimal.

3. Calcul du nombre minimum de clones pour couverture de 99% :

Formule : $N = \ln(1-P) / \ln(1-f/G)$

Résultat : au moins **481 clones** sont nécessaires pour couvrir 99% du génome.

Exercice 2. Conception d'une banque d'ADNc

1. Pourquoi l'ADNc ?

- L'ADNc est une copie complémentaire de l'ARNm, plus stable et clonable dans un plasmide ou vecteur.
- L'ARNm est fragile et ne peut pas être directement cloné.

2. Éléments du vecteur pour expression eucaryote :

- **Promoteur eucaryote** (ex : CMV)

- **Terminaison et polyadénylation**
- **Ori adapté à l'hôte ou origine pour clonage dans *E. coli***
- **Gène de sélection** (résistance ou marqueur fluorescent)

3. Différence dans le calcul de couverture :

Pour une banque d'ADNc, on vise généralement **la diversité des transcrits**, pas la couverture du génome.

Les clones doivent représenter **les gènes exprimés**, souvent avec des transcrits de tailles très variables et des niveaux d'abondance différents.

Exercice 3. Criblage par hybridation

1. Étapes :

1. Plaquer les clones sur membrane (souvent nylon ou nitrocellulose).
2. Lysér les cellules et fixer l'ADN sur la membrane.
3. Préparer une sonde spécifique (souvent radiomarquée ou fluorescente).
4. Hybridation de la sonde avec les clones.
5. Lavage pour éliminer l'excès de sonde.
6. Détection du signal (autoradiographie ou fluorescence).

2. Facteurs influençant spécificité et sensibilité :

- Température d'hybridation
- Composition de la sonde (longueur, complémentarité)
- Stringence des lavages

3. Comparaison avec PCR :

Méthode	Avantages	Limites
Hybridation	Peut détecter des séquences partiellement similaires	Long et nécessite sonde spécifique
PCR	Très rapide et sensible	Nécessite des amorces spécifiques et ne dé-

Méthode	Avantages	Limites
		nécessite que des séquences connues

Exercice 4 : Cas pratique

1. Couverture effective

La couverture effective C d'une banque clonale se calcule par :

$$C = N \cdot L / G$$

Substituons les valeurs :

$$C = 50\,000 \times 30 / 3000 = 1\,500\,000 / 3000 = 500$$

Couverture effective : 500×

Cela signifie que chaque portion du génome est représentée en moyenne 500 fois dans la banque.

2. Nombre de clones nécessaires pour couvrir 99,9% du génome

La probabilité qu'un fragment ne soit **pas couvert** par un clone :

$$1 - f/G = 1 - 30/3000 = 0,991$$

La probabilité qu'un fragment **ne soit pas couvert par les N clones** :

$$P_{\text{non couvert}} = (1 - f/G)^N$$

On veut une probabilité de couverture de 99,9% :

$$P_{\text{couvert}} = 1 - (1 - f/G)^N = 0,999$$

$$(1 - f/G)^N = 1 - 0,999 = 0,001$$

$$N \ln(0,99) = \ln(0,001)$$

$$N = \ln(0,001) / \ln(0,99) \approx -6,908 / -0,01005 \approx 687 \text{ clones}$$

Conclusion :

- Couverture effective actuelle : 500×**
- Clones nécessaires pour 99,9% de probabilité de couverture : ~687 clones**

La banque actuelle de 50 000 clones est donc largement suffisante, et très peu de clones supplémentaires seraient nécessaires pour atteindre 99,9% de probabilité.

Exercice 5 : Discussion

- **Banques génomiques :**

Avantages : représentent tout le génome, y compris les gènes régulateurs.

Inconvénients : grande taille, contiennent de l'ADN non codant.

- **Banques d'ADNc :**

Avantages : ne contiennent que des gènes exprimés, utile pour expression protéique.

Inconvénients : ne représente que l'ARNm exprimé à un moment donné, nécessite souvent une amplification.

Corrigé type TD5. Hybridation moléculaire : sondes, marquage et FISH

Exercice 1. Comparaison des sondes et marquages

Type de sonde	Avantages	Limites	Exemple de marquage approprié
ADN double brin (long fragment cDNA)	Forte sensibilité, détecte régions longues, robuste	Moins spécifique si séquence répétée, dif- fusion lente	Radioactif (^{32}P) pour sen- sibilité, Fluorescent pour observation microscopique
Oligonucléotide (20–30 bases, simple brin)	Très spécifique, rapide, permet détecter SNPs	Sensibilité plus faible, nécessite amplification parfois	Fluorescent pour diagnostic rapide et sécurité, chimique (digoxigénine) pour détec- tion indirecte
ARN (riboprobe)	Très sensible, se fixe sur ADN ou ARN	Instable, nécessite manipulation précau- tionneuse	Radioactif pour hautes sensi- bilités, fluorescente pour imagerie

Marquages et applications :

Application	Type de sonde	Type de mar- quage	Justification
Observation microscopique directe	ADN ou oligonu- cléotide	Fluorescent	Permet visualisation directe au microscope
Haute sensibilité pour détection faible	ADN long ou ri- boprobe	Radioactif	Sensibilité maximale même pour faibles quantités
Clinique, sécurité et rapidité	Oligonucléotide	Fluorescent ou chimique	Sécurité, rapidité et reproduc- tibilité

Exercice 2. Protocole FISH simplifié

1. Pourquoi dénaturer l'ADN ?

Pour séparer les deux brins et permettre à la sonde simple brin de s'hybrider spécifiquement à sa séquence complémentaire.

2. Étapes assurant la spécificité :

Sélection de la sonde spécifique

Conditions d'hybridation (température, concentration)

Lavages pour éliminer les sondes non fixées ou liées de façon non spécifique

3. Interprétation des signaux fluorescents :

2 signaux par cellule : nombre normal de copies

2 signaux : amplification du gène

0 ou 1 signal : délétion ou perte d'une copie

Exercice 3. Applications cliniques et choix de sonde

Application clinique	Choix de sonde	Choix de marquage	Justification
Trisomie 21	Sonde ADN spécifique chromosome 21	Fluorescent (Cy3, FITC)	Détection directe de gain de chromosome dans cellules fœtales
Microdélétion HBB (thalassémie)	Oligonucléotide ou cDNA ciblant HBB	Fluorescent ou digoxigénine	Haute spécificité pour petite délétion
Suivi amplification HER2	Sonde cDNA ou BAC couvrant HER2	Fluorescent	Visualisation rapide de copies multiples dans les cellules tumorales

Exercice 4 : Interprétation d'images FISH

Image	Interprétation	Pathologie potentielle	Application FISH
2 signaux	Nombre normal	Cellule normale	Vérification chromosome / gène
4 signaux	Amplification du gène	Cancer HER2+	Détection de l'amplification pour traitement ciblé

Image	Interprétation	Pathologie potentielle	Application FISH
1 ou 0 signal	Délétion	Microdélétion, maladie génétique	Diagnostic de délétion dans un gène critique

Exercice 5 : Conception de sonde pour SNP

1. Contraintes de la séquence de la sonde :

T_m compatible avec hybridation

GC ~40–60% pour stabilité

Spécificité : éviter homologies avec autres séquences

2. Marquage le plus approprié :

Fluorescent pour diagnostic rapide et sécurité (évite radioactivité)

3. Validation de la sonde :

Test sur échantillons connus (contrôles positifs et négatifs)

Vérification de l'absence de signal non spécifique

Optimisation de conditions d'hybridation et de lavage

Corrigé type du TD6. Contrôle/ validation de clonage recombinant

Exercice 1. Validation par digestion enzymatique

1. Carte plasmide avant et après insertion :

Plasmide vide (5 kb) :

[---EcoRI---]

Plasmide recombinant (5 kb + 1,2 kb) :

[---EcoRI---Fragment 1,2 kb---]

2. Résultat attendu sur gel :

Plasmide	Enzyme	Fragments attendus
Vide	EcoRI	5 kb
Recombinant	EcoRI	5 kb + 1,2 kb → un seul fragment linéarisé de 6,2 kb si simple site ou deux fragments si double site EcoRI

3. Digestion EcoRI + BamHI (fragment contient site BamHI) :

- Plasmide recombinant linéarisé → fragments :
 - Fragment plasmide : 5 kb - position du site BamHI
 - Fragment inséré : découpé selon son site BamHI

Interprétation : plusieurs fragments distincts visibles sur gel, permettant de confirmer la présence du fragment inséré.

Exercice 2. PCR de colonie

Amorces : flanquant le site d'insertion

Colonies	Taille PCR attendue
Plasmide vide	300 pb (distance entre amorces)
Plasmide recombinant	300 pb + 1200 pb = 1500 pb

Gel attendu :

Colonies 1 2 3 4

300 pb | 1500 pb | 1500 pb | 300 pb

Sources de faux résultats :

- Faux négatif : inhibition de la PCR par des contaminants
- Faux positif : amplification d'un fragment non spécifique

Exercice 3. Validation combinée**Carte recombinant :**

[EcoRI]-[Fragment avec EcoRI + HindIII]-[BamHI]-[EcoRI]

Digestions attendues :

Digestion	Fragments attendus
EcoRI	Plasmide vide : 5 kb ; Recombinant : 5 kb + 1,2 kb = 6,2 kb (linéarisé ou deux fragments si double site)
EcoRI + HindIII	Fragment recombinant découpé → 2 à 3 fragments selon position sites
BamHI + HindIII	Identification du fragment inséré par taille spécifique (p.ex. 1,2 kb coupé à HindIII)

Comment distinguer recombinant / vide :

- Fragment supplémentaire correspondant à l'insert
- Différence de taille sur le gel

Exercice 4. Une analyse critique**Interprétation :**

PCR détecte présence de l'insert : 7/12 colonies semblent correctes

Digestion plus précise : 6/12 colonies ont la carte attendue → confirmation du clonage

Une PCR peut détecter insert partiel ou non-intact → digestion permet validation complète

Colonies à retenir :

Les 6 colonies confirmées par digestion

Éviter colonies PCR positives mais carte incorrecte

Méthode alternative :

Séquençage de l'insert et des jonctions plasmide-insert pour confirmer l'intégrité du clone

Corrigé type du TD7. Protéine thérapeutique produite par voie recombinante

Exercice 1 : Hôte d'expression

Protéine	Hôte approprié	Justification
Insuline humaine	<i>E. coli</i> ou levure (<i>S. cerevisiae</i>)	Insuline est petite, non glycosylée → <i>E. coli</i> permet un bon rendement et coût faible. Levure possible si repliement ou formation de ponts disulfure souhaitée.
Interféron α humain	Cellules de mammifère (CHO), parfois levure	Protéine glycosylée, nécessite repliement correct et modifications post-traductionnelles.
Hémoglobine recombinante	Levure ou cellules de mammifère	Complexité post-traductionnelle importante (hèmes, chaînes multiples) → bactéries limitées.

Critères de choix :

- Glycosylation et repliement : mammifère > levure > bactéries
- Rendement et coût : bactéries > levure > mammifère
- Usage thérapeutique humain : mammifère si modification post-traductionnelle critique

Exercice 2 : Lacune de la cassette d'expression

Schéma de cassette bactérienne

Promoteur fort (ex: T7) → RBS → ATG → ORF protéine thérapeutique → His-tag → Stop → Termineur

Notes :

- **Peptides signal** : orientent la protéine vers le periplasme ou la sécrétion.
- **His-tag** : facilite la purification par affinité (Ni-NTA).

Différences en cellules de mammifère

- Promoteur adapté (ex: CMV, EF1 α)

- Signal peptide pour sécrétion extracellulaire
- Codon optimisé pour mammifère
- Souvent pas de fusion His-tag pour usage thérapeutique direct (risque immunogène)

Exercice 3. Vérification de l'expression

Méthodes pour vérifier l'expression

1. **SDS-PAGE + Coomassie** : vérifie la taille et abondance de la protéine
2. **Western blot** : détecte spécifiquement la protéine via anticorps
3. **ELISA ou activité biologique** : confirme la fonction et la présence correcte

Pour glycosylation correcte :

- Lectine blotting ou test d'activité biologique
- Mass spectrometry ou HPLC

Protéine insoluble dans E. coli :

- Exprimer en fusion avec solubilisant (MBP, GST)
- Changer le promoteur / température d'expression
- Refolding in vitro après inclusion bodies

Exercice 4 : Protéine recombinante purifiante

Exemple avec His-tag :

1. Lyse des cellules → récupération du lysat
2. Passage sur colonne Ni-NTA → fixation de la protéine His-tag
3. Lavage → élimination des contaminants
4. Éluion avec imidazole
5. Dialyse ou ultrafiltration pour tampon final

Critères de pureté pour usage thérapeutique :

- 95% pureté (SDS-PAGE, HPLC)
- Test d'endotoxines (bactéries)

- Confirmation de repliement et activité

Pour levure / cellules mammifères :

- Étape de filtration, détection de protéines hôtes
- Élimination de glycoprotéines indésirables
- Validation de modification post-traductionnelle

Exercice 5. Étude de cas intégrative

Production d'insuline recombinante :

1. **Choix d'hôte :** *E. coli* (coût faible, haute productivité) ou levure si repliement amélioré
2. **Cassette d'expression :**

Promoteur T7 → RBS → Insuline ORF → His-tag → Stop → Terminateur

3. **Vérification :**
 - SDS-PAGE et Western blot pour expression et taille correcte
 - Test d'activité biologique pour confirmation
4. **Purification :**
 - Ni-NTA affinity chromatography pour His-tag
 - Dialyse pour éliminer imidazole
 - Tests finaux : pureté, absence d'endotoxines, confirmation de structure

Corrigé type du TD8. Puces ADN et analyse d'expression

Exercice 1: Puces à ADN Protocole d'analyse

1. Étapes principales d'une expérience de microarray :

1. Extraction d'ARN total :

Isolement des ARNm à partir des cellules/tissus d'intérêt.

Vérification de la qualité et de l'intégrité (ex : Bioanalyzer, spectrophotométrie).

2. Synthèse d'ADNc fluorescent :

Conversion de l'ARN en ADN complémentaire (ADNc).

Marquage fluorescent des échantillons (ex : Cy3 pour contrôle, Cy5 pour pathologique).

3. Hybridation sur la puce :

L'ADNc marqué est déposé sur la puce contenant des oligonucléotides ou cDNA fixés.

Incubation pour permettre une hybridation spécifique.

4. Lavages et lecture :

Retrait de l'ADNc non spécifiquement lié.

Scannage de la puce pour mesurer l'intensité de fluorescence.

5. Analyse des données :

Normalisation des intensités.

Identification des gènes différentiellement exprimés.

2. Points critiques :

Qualité de l'ARN (dégradation → résultats biaisés).

Marquage efficace et équilibré (faible incorporation → faible signal).

Conditions d'hybridation (température, salinité) → hybridation non spécifique si mal réglées.

Normalisation des données (pour corriger variation technique entre puces).

3. Hybridation spécifique :

Les sondes sur la puce sont complémentaires aux séquences cibles.

Seules les molécules parfaitement appariées restent fixées après les lavages.

Permet de mesurer spécifiquement l'abondance de chaque ARNm.

Exercice 2. Conception d'expériences d'expression différentielle

1. Schéma expérimental :

- 2 conditions : tissu sain vs tissu pathologique.
- 3 réplicats biologiques par condition → total 6 échantillons.
- Marquage avec fluorochromes différents ou utilisation de puces séparées.

2. Type de puce :

Oligonucléotides : haute spécificité et sensibilité, adaptés pour grands génomes.

cDNA : moins coûteux, mais moins spécifique, adapté si budget limité ou pour petits génomes.

3. Contrôles :

Gènes de ménage : vérifier stabilité de l'expression.

Contrôle d'hybridation : spots positifs et négatifs pour vérifier la qualité de la puce.

Réplicats techniques : détecter variabilité liée à la manipulation.

Exercice 3 : Interprétation de résultats

1. Définitions :

- **log₂ fold change (log₂FC)** : log₂ du ratio d'expression pathologique / sain.

0 → surexpression dans le pathologique

<0 → sous-expression

- **p-value** : probabilité que la différence observée soit due au hasard.

2. Identification des gènes significatifs :

- Critères : $|\log_2FC| > 1$ et $p < 0,05$.
- Exemple : gène A $\log_2FC = 2$, $p = 0,01$ → significatif

- Exemple : gène B $\log_2FC = 0,5$, $p = 0,03 \rightarrow$ non significatif

3. Volcano plot :

Axe X : \log_2FC

Axe Y : $-\log_{10}(p\text{-value})$

Gènes en haut à gauche (sous-exprimés) et en haut à droite (sur-exprimés) sont les plus significatifs.

Permet de visualiser rapidement les gènes d'intérêt parmi des milliers.

Exercice 4 : Validation par qPCR

1. Protocole :

1. Extraction d'ARN total.
2. Synthèse d'ADNc par transcriptase inverse.
3. qPCR avec amorces spécifiques des gènes à valider.
4. Quantification relative par méthode $\Delta\Delta Ct$.

2. Rôle des amorces et gène de référence :

Amorces spécifiques : ciblent uniquement le gène d'intérêt.

Gène de référence (housekeeping) : corrige la variation de quantité d'ADNc entre échantillons.

3. Comparaison avec microarray :

Les tendances de sur- ou sous-expression devraient être similaires.

Discordances possibles : faible expression du gène, spécificité des sondes, biais technique.

Exercice 5. Analyse critique

1. Signification des variations dans les gènes de ménage :

Indique un problème de normalisation, de qualité d'ARN ou d'hybridation.

2. Solutions :

- Vérifier l'intégrité des échantillons.
- Réaliser un nouveau marquage ou hybridation.
- Choisir d'autres gènes de référence stables.

3. Importance de la normalisation :

- Permet de corriger les variations techniques entre puces.
- Assure que les différences observées reflètent une vraie variation biologique.

Références

Références

1. Abdi, M. (2020). Génie génétique – Licence 3 Biochimie [Cours en ligne]. Clonage et vecteurs de clonage. Cours de Génie Génétique (L3 Biochimie), USTO-MB. PDF.
2. Académie en ligne. (2015). Biolistique. Ressource pédagogique en ligne, consultée en décembre 2015. Disponible sur : <https://www.academie-en-ligne.fr>
3. Access Excellence, The National Health Museum. (1999). Biotechnology and genetic engineering educational resources. The National Health Museum.
4. Addgene. (2024). Addgene: A better way to share science. Retrieved, from <https://www.addgene.org>
5. Adjroud M. (2020). Module : Génie génétique, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des Frères Mentouri. https://fac.umc.edu.dz/snv/faculte/bapp/2020/2019/Génie_génétique.pdf
6. Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., & Schwab, H. (2014). Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(12), 5301–5317.
7. Akh, L., Fajrial, A. K., Seelbinder, B., Xu, X., Tan, W., Slansky, J., Neu, C. P., & Ding, X. (2025). Vector-free DNA transfection by nuclear envelope mechanoporation. Preprint.
8. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015). *Molecular Biology of the Cell* (6th ed.). Garland Science.
9. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2022). *Molecular Biology of the Cell* (7th ed.). W.W. Norton & Company.
10. Aouf, A. (2016). Cours de biologie moléculaire et génie génétique. Université Ferhat Abbas Sétif 1, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département de Microbiologie.
11. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., & Struhl, K. (2003). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons.
12. Bentz, M. L., Clines, C., Padilla, J., Horn, C., Lee, J. & Sheth, M. (2025). High-throughput PacBio library preparation and sequencing techniques for genomic DNA and TNA *Frontiers in Genetics*, 16, 1587691.

13. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Gatto, G. J. (2019). *Biochemistry* (9^e éd.). New York: W. H. Freeman and Company.
14. Boudiaf Kaouthar. (2020). ADN I. Les vecteurs. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département de Microbiologie/Master 1. Université de Batna 2.(2020/2021). https://staff.univ-batna2.dz/sites/default/files/boudiaf-kaouthar/files/polycopie_cours_ndeg06_colnage_de_ladn_version2.pdf
15. Brown, T. A. (2002). *Genomes*. 2nd ed., Oxford: Wiley-Liss.
16. Brown, T. A. (2016). *Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction*. Wiley-Blackwell.
17. Capecchi, M. R. (2005). Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nature Reviews Genetics*, 6(6), 507–512.
18. Christou, P. (1992). Genetic transformation of crop plants using microprojectile bombardment. *Plant Journal*, 2(3), 275–281.
19. Coradini, A. L. V., Ne Ville, C., Krieger, Z. A., Roemer, J., Hull, C., Yang, S., Lusk, D. T., & Ehrenreich, I. M. (2023). Building synthetic chromosomes from natural DNA. *Nature Communications*, 14(1), 8337. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-44112-2>
20. Crossway, A., Oakes, J. V., Irvine, J. M., Ward, B., Knauf, V. C., & Shewmaker, C. K. (1986). Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts. *Molecular and General Genetics*, 202(2), 179–185.
21. Cyranoski, D. (2016). CRISPR gene-editing tested in a person for the first time. *Nature*, vol. 539, no. 7630, 2016, p. 479. doi:10.1038/nature.2016.20988.
22. Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, 27(3), 297–306.
23. Dente, L., Cesareni, G., & Cortese, R. (1983). pEMBL: A new family of single stranded plasmids. *Nucleic Acids Research*, 11(6), 1645–1655.
24. Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1258096.
25. Echelard, Y. (2006). Recombinant proteins from milk of transgenic animals. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(5), 485–489.

26. Gablo, N. (2024). Polymerase chain reaction: a powerful analytical tool in the field of food safety. MASO International – Journal of Food Science and Technology, 13(1), 15–23. <https://doi.org/10.2478/mjfst-2023-0002>
27. Gaillardin C., Tinsley C. R. (2007). Génétique moléculaire. Coursus ingénieur agronome- 1^{re} année, module de biologie. Septembre 2007.
28. Gallagher, S. R. (1994). Current Protocols in Molecular Biology. Wiley.
29. Geiser RJ. (2005). Recombinational cloning vectors for regulated expression in *Saccharomyces cerevisiae*. BioTechniques, 38:378-382.
30. Glick, B. R., & Pasternak, J. J. (2010). Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA (4th ed.). ASM Press.
31. Green, M. R., & Sambrook, J. (2012). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (4th ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
32. Gregorio, N. E., Levine, M. Z., & Oza, J. P. (2019). A user's guide to cell-free protein synthesis. Methods and Protocols, 2(1), 24.
33. Griffiths, A. J. F., Wessler, S. R., Carroll, S. B., & Doebley, J. (2015). Introduction to Genetic Analysis. 11th ed., W. H. Freeman and Company.
34. Hadeef, K. Z., Medjahdi, K., Benamar, I., & Boudjemaa, B. M. (2015). Safety characterization of *Yersinia enterocolitica* strains isolated from raw milk in Western Algeria. African Journal of Microbiological Research, 10(1), 15-22.
35. Higuchi, R., et al. (1993). PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification. Stockton Press.
36. Housset C et Raisonnier A. (2006). Biologie Moléculaire. Faculté de Médecine, Université Paris VI.
37. Innis, M. A., & Gelfand, D. H. (1990). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press.
38. James, C. (2015). Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2015. ISAAA Brief No. 51.
39. Kost, T. A., Condreay, J. P., & Jarvis, D. L. (2005). Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. Nature Biotechnology, 23(5), 567–575.

40. Lai, T., Yang, Y., & Ng, S. K. (2013). Advances in mammalian cell line development technologies for recombinant protein production. *Pharmaceutical Bioprocessing*, 1(4), 387–399.
41. Levsky, J. M., & Singer, R. H. (2003). Fluorescence in situ hybridization: Past, present and future. *Journal of Cell Science*, 116, 2833–2838.
42. Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (2003). *Molecular Cell Biology* (5^e éd.). New York, NY: W. H. Freeman and Company.
43. Lodish, H., et al. (2016). *Molecular Cell Biology* (8th ed.). W. H. Freeman.
44. Maftah A., Petit J.-M., Julien R. (2018). *Mini-manuel de biologie moléculaire : Cours + QCM + QROC* (4^e éd.). Paris : Dunod. ISBN 978-2-10-077368-8.
45. Miller, S. A., Dykes, D. D., & Polesky, H. F. (1988). *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*. *Nucleic Acids Research*, 16(3), 1215. <https://doi.org/10.1093/nar/16.3.1215>
46. Naldini, L. (2015). Gene therapy returns to centre stage. *Nature*, 526(7573), 351–360.
47. NPTEL. (2015). Micro-injection d'ADN. (s.d.). NPTEL – Biotechnology Module 3, Lecture 24. Retrieved December 2015, from <http://nptel.ac.in/courses/102103016/module3/lec24/3.html>
48. Pandey, A., Momeni, O., & Pandey, P. (2024). Quantitative analysis of genomic DNA degradation of *E. coli* using automated gel electrophoresis under various levels of microwave exposure. *Gels*, 10(4), 242. <https://doi.org/10.3390/gels10040242>
49. Pardi, N., Hogan, M. J., Porter, F. W., & Weissman, D. (2018). mRNA vaccines—a new era in vaccinology. *Nature Reviews Drug Discovery*, 17(4), 261–279.
50. Passarge, E. (2007). *Génétique – Manuel illustré*. 3^e édition. Éditions De Boeck Université, Bruxelles.
51. Parlons sciences. (2013). Séquençage de Sanger. <https://parlonssciences.ca/ressources-pedagogiques/documents-dinformation/sequencage-de-sanger>
52. Peycru, J. (2018). *Génie génétique : principes, techniques et applications*. Éditions De Boeck Supérieur, Bruxelles.
53. Plombières-lès-Dijon, E. D. Q., de Quetigny, S., de Serres, L. O. (2019). *Techniques de biologie moléculaire, génie génétique et biotechnologies*.

54. Porteus, M. H. (2019). A new class of medicines through DNA editing. *New England Journal of Medicine*, 380, 947–959.
55. Potter, H. (1988). Electroporation in biology: methods, applications, and instrumentation. *Analytical Biochemistry*, 174(2), 361–373.
56. Raven, P. H., Johnson, G. B., Losos, J. B., Mason, K. A., & Singer, S. R. (2007). *Biologie* (8^e édition). Bruxelles : De Boeck Supérieur.
57. Reich NO. (1992). EcoRI DNA methyltransferase-DNA interactions.” *Biochemistry*. 1992;31(42):10046-52.
58. Roberts, R. J., Vincze, T., Posfai, J., & Macelis, D. (2015). REBASE—a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D298–D299. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1046>
59. Romanos, M. A., Scorer, C. A., & Clare, J. J. (1992). Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*, 8(6), 423–488.
60. Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
61. Sayler, G. S., & Ripp, S. (2000). Field applications of genetically engineered microorganisms for bioremediation processes. *Current Opinion in Biotechnology*, 11(3), 286–289.
62. Scutteri, L., Barth, P., & Jamal Rahi, S. (2025). Minimal shuttle vectors for *Saccharomyces cerevisiae*. *Synthetic Biology*, 10(1), ysaf010. <https://doi.org/10.1093/synbio/ysaf010>
63. Segarra, P., Poy, R., López, R. & Moltó, J. (2014). Characterizing Carver and White’s BIS/BAS subscales using the Five-Factor Model of personality. *Personality and Individual Differences*, 61-62, 18-23. DOI 10.1016/j.paid.2013.12.027
64. Silverman, A. D., Karim, A. S., & Jewett, M. C. (2020). Cell-free gene expression: an expanded repertoire of applications. *Nature Reviews Genetics*, 21(3), 151–170.
65. Southern, E. M. (2006). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98(3), 503–517.
66. Speicher, M. R., & Carter, N. P. (2005). The new cytogenetics: Blurring the boundaries with molecular biology. *Nature Reviews Genetics*, 6(10), 782–792.
67. Sun, D. (2018). *Pull in and push out: Mechanisms of horizontal gene transfer in bacteria*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2154. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02154>.

68. Tabassum, T., Tabassum, T., Tabassum, N., Muntaka Maniha, S., & Noor, R. (2021). *Stability of plasmid pBR322 within Escherichia coli cells*. *MOJ Biology and Medicine*, 6(1), 17–19. <https://doi.org/10.15406/mojbm.2021.06.00123>
69. Trask, B. J. (2002). Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting. *Nature Reviews Genetics*, 3(10), 769–778.
70. Trotereau A., Kern J., Viardot A., Thiriet A. et Schouler C. (2018). Explorer le potentiel thérapeutique des coliphages : approche curative des infections causées par *Escherichia coli* chez les oiseaux. *Innovations Agronomiques* 66 : 9-17.
71. Tyagi, S., & Kramer, F. R. (1996). Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnology*, 14(3), 303–308.
72. Van Oers, M. M., & Pijlman, G. P. (2012). Thirty years of baculovirus–insect cell protein expression: from dark horse to mainstream technology. *Journal of General Virology*, 93(5), 1033–1050.
73. Walsh, G. (2018). *Biopharmaceuticals: Biochemistry and Biotechnology* (3rd ed.). Wiley.
74. Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M., & Losick, R. (2014). *Molecular Biology of the Gene* (7^e éd.). Pearson.
75. Wilfinger, W. W., Mackey, K., & Krug, D. E. (1997). Spectrophotometric and fluorometric methods for quantifying nucleic acids. *Biotechniques*, 22(3): 474–481.
76. Wilson, K. (1997). Preparation of genomic DNA from bacteria. In *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons.
77. Wurm, F. M. (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 22(11), 1393–1398.
78. Yang, T., Zhang, M., & Zhang, N. (2022). Modified Northern blot protocol for easy detection of mRNAs in total RNA using radiolabeled probes. *BMC Genomics*, 23, 66.
79. Ye, X., et al. (2000). Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science*, 287(5451), 303–305.