

## VI. Localisation et clonage d'un gène de maladie

### 1. Introduction

Le clonage moléculaire est une des bases du génie génétique. Il consiste à insérer un fragment d'ADN (dénommé insert) dans un vecteur approprié comme un plasmide.

Rappel : Le **clonage de l'ADN** est une technique de biologie moléculaire qui fabrique de nombreuses copies identiques d'un morceau d'ADN, tel qu'un gène.

Dans une expérience typique de clonage, un gène d'intérêt est inséré dans un morceau d'ADN circulaire appelé un **plasmide**.

Le plasmide est introduit dans les bactéries par un processus appelé la **transformation**, et les bactéries transportant le plasmide sont sélectionnées à l'aide d'antibiotiques.

Les bactéries dotées du bon plasmide sont utilisées pour fabriquer davantage de ce plasmide ou, dans certains cas, pour induire l'expression du gène et produire des protéines.

Le premier clonage fut réalisé en 1972 par **Paul Berg** qui partagea le prix Nobel de chimie en 1980 avec **Walter Gilbert et Frederick Sanger**. En 1977, le premier gène humain, codant pour la somatostatine est cloné permettant aux bactéries de produire des protéines humaines. L'ère du génie génétique et des biotechnologies venait alors de démarrer.

## 2. Gènes et clonage moléculaire

Le clonage d'ADN est le processus de fabrication de multiples copies identiques d'un morceau particulier d'ADN. Dans une procédure classique de clonage de l'ADN, le gène ou un autre fragment d'ADN d'intérêt (peut-être un gène qui encode une protéine humaine d'intérêt médical) est d'abord inséré dans un morceau d'ADN circulaire appelé un plasmide. L'insertion est effectuée à l'aide d'enzymes qui "coupent et collent" l'ADN, ce qui produit une molécule d'ADN recombinant, ou d'ADN assemblé à partir de fragments de différentes sources.

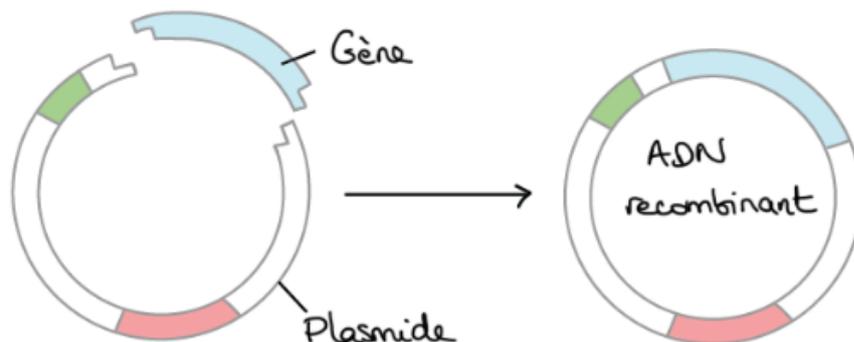


Figure 1 : clonage de séquences d'ADN

Les enzymes de restriction sont sélectionnées en fonction de leur capacité à couper l'ADN à des endroits spécifiques, ce qui permet aux chercheurs de sélectionner les fragments d'ADN qui les intéressent. Les fragments d'ADN sont ensuite reproduits en utilisant des techniques de biologie moléculaire, telles que la polymérase en chaîne (PCR) ou la recombinaison génétique.

Les **enzymes de restriction** sont des enzymes utilisées dans le clonage moléculaire pour couper des fragments d'ADN spécifiques.

### 2.1. Les différents types de clonage

Le clonage réplique la constitution génétique de l'animal dont la cellule a été prélevée pour générer une descendance clonée. Il s'agit en fait d'un être comparable à un jumeau, ou à une copie, doté d'une structure génétique identique.

On distinguera deux types différents de clonages :

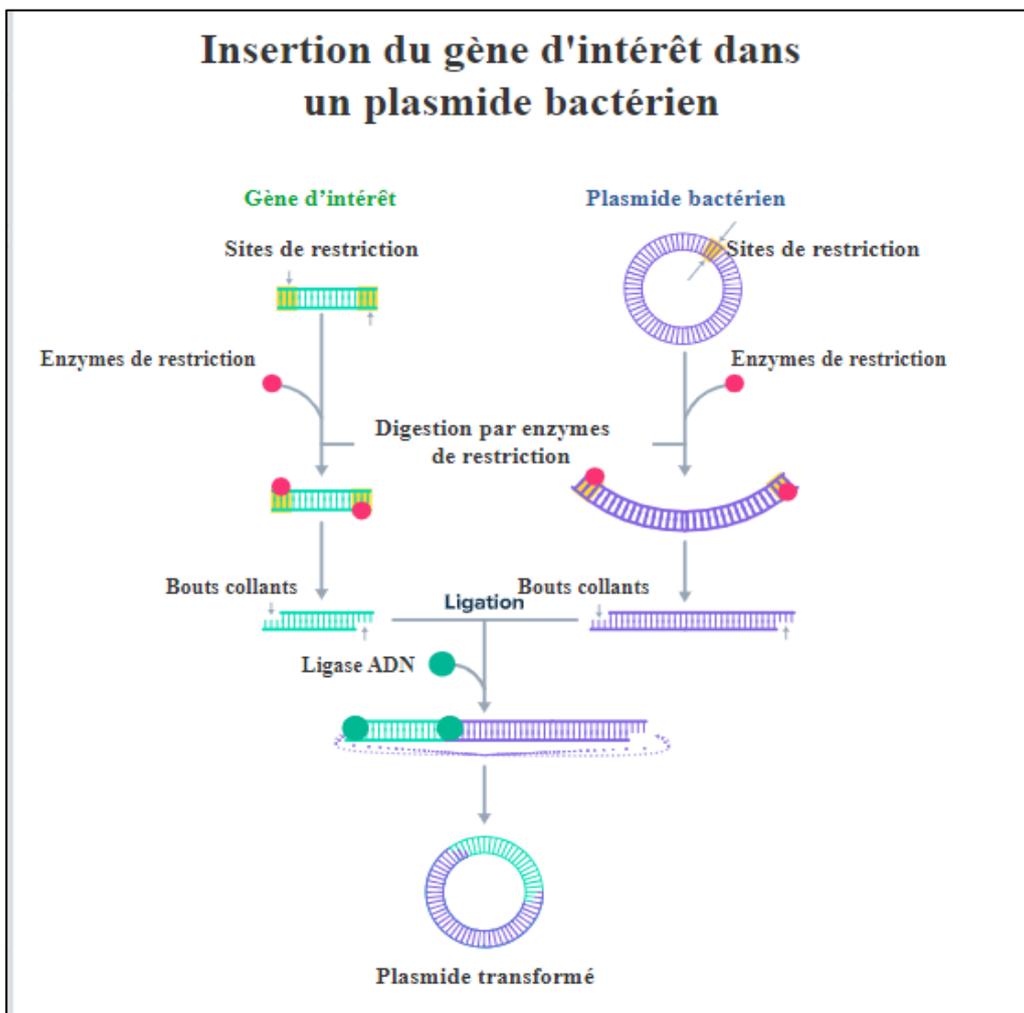
-**Le clonage reproductif** : son but est de créer entièrement un individu identique à la base à un autre individu, mais qui pourrait se développer de manière différente.

-**Le clonage thérapeutique** qui consiste à reproduire des cellules distinguées aux fonctions précises.

## 2.2. Les étapes de clonages

**Les étapes du clonage moléculaire incluent :**

1. l'extraction de l'ADN d'une source ;
2. la digestion de l'ADN avec des enzymes de restriction ;
3. la ligation de l'ADN à un vecteur d'insertion ;
4. la transformation de l'organisme hôte (comme une bactérie) avec le vecteur d'insertion
5. la sélection et la vérification de la présence de la séquence d'ADN clonée.



**Figure 1 :** Le vecteur d'insertion c'est le plasmide et le fragment d'ADN inséré code pour un gène particulier. La bactérie transformée exprimera ce gène.

Le clonage de l'ADN a de nombreux usages. Par exemple, on va voir comment le clonage de l'ADN peut servir à synthétiser une protéine (comme l'insuline) dans des bactéries. Les principales étapes sont :

1. Ouvrir le plasmide et y "coller" le gène. Ce processus repose sur les enzymes de restriction (qui coupent l'ADN) et l'ADN ligase (qui assemble les morceaux d'ADN).
2. Insérer le plasmide dans les bactéries. Utiliser la sélection par antibiotiques pour identifier les bactéries qui ont incorporé le plasmide.
3. Faire pousser beaucoup de bactéries porteuses du plasmide et les utiliser comme "usines" de production de la protéine. Récolter les protéines produites par les bactéries et les purifie

## 2. Transformation des bactéries et sélection

Des plasmides et d'autres formes d'ADN peuvent être introduits dans des bactéries, comme le *E. coli* communément utilisé en laboratoire, par un processus que l'on appelle transformation. Au cours de la transformation, des bactéries soumises au préalable à un traitement spécial reçoivent un choc (comme une forte température) qui les pousse à incorporer l'ADN étranger.

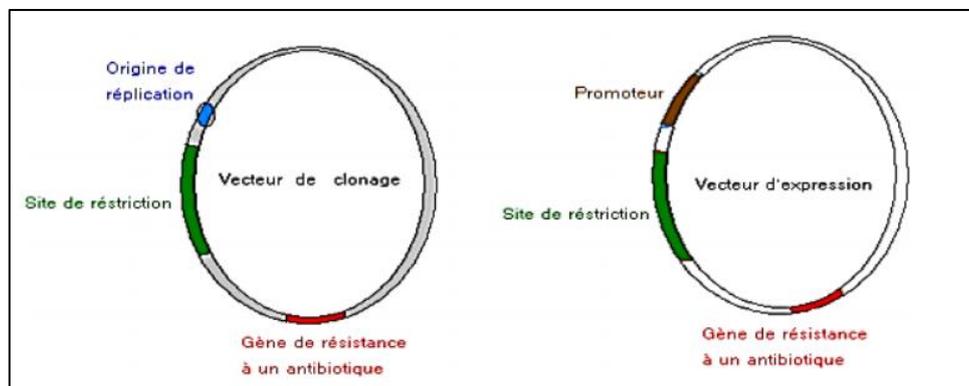
## 3. Catégories de vecteurs

**A. Vecteur de clonage** : renferme une origine de réplication et permet de cloner un segment d'ADN ou un gène qui y est intégré.

C'est un système permettant le transfert, l'expression et la réplication d'un ADN étranger dans les **cellules hôtes** en vue d'un clonage moléculaire.

• Couramment utilisés en vue de production de protéine recombinantes, pour le séquençage d'un gène, pour la sélection d'un gène dans une banque d'ADN, etc.

**B. Vecteur d'expression** : Renferme un promoteur et permet de faire exprimer un gène.



**Figure 2** : les catégories des vecteurs

