

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira
Béjaïa

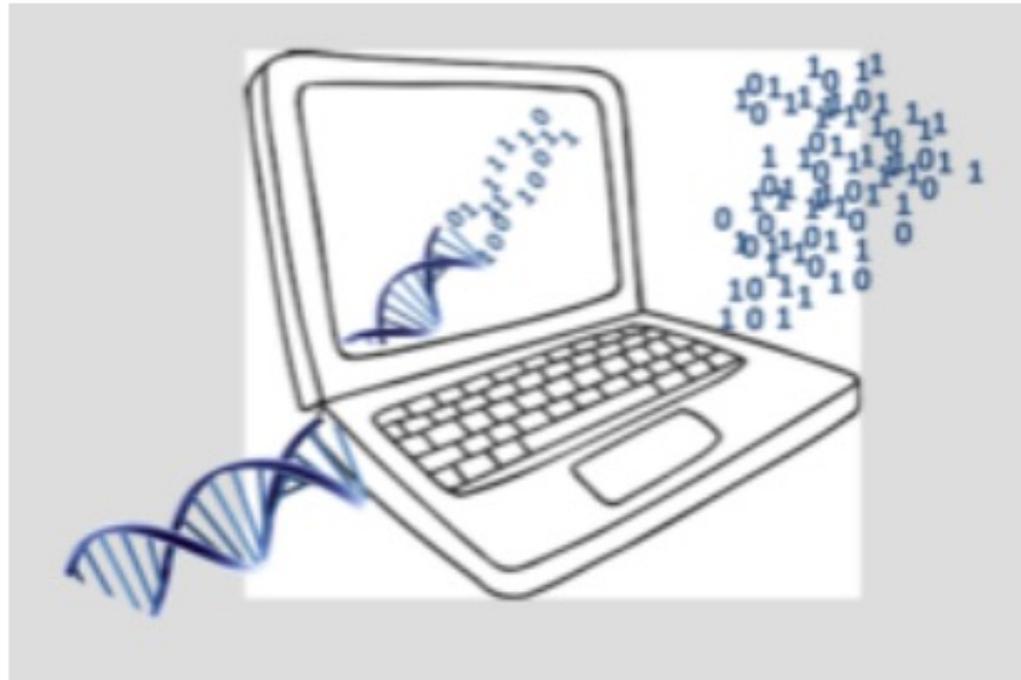


جامعة بجاية
Tasdawit n Bgayet
Université de Béjaïa

وزارة التعليم العالي
و البحث العلمي
جامعة عبد الرحمان ميرة
بجاية

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Bioinformatique appliquée



Un **plasmide** désigne en microbiologie ou en biologie moléculaire une molécule d'ADN distincte de l'ADN chromosomique, capable de réplication autonome. Le terme *plasmide* fut introduit par le biologiste moléculaire américain Joshua Lederberg en 1952. Les plasmides sont généralement circulaires. Ils se trouvent quasi-exclusivement dans les bactéries, à l'exception notable du plasmide 2Mu que l'on trouve hébergé par le microorganisme eucaryote *Saccharomyces cerevisiae* (*levure du boulanger*).

Une cellule bactérienne peut en contenir une copie, pour les grands plasmides, ou des centaines pour des plasmides artificiels (construits par génie génétique à des fins de clonage de gènes). Les bactéries en comportent généralement 5 à 30 copies, les levures entre 50 et 100 exemplaires par cellule.



Figure 1: Schéma représentant une bactérie contenant des plasmides.
1 ADN chromosomique (bactérien). 2 Plasmides.

Résistance aux antibiotiques

Les plasmides bactériens codent des fonctions généralement non-vitales pour le **micro-organisme** les hébergeant. Toutefois, ils contiennent souvent des gènes conférant un avantage sélectif à la **bactérie porteuse**, comme la propriété de rendre la bactérie résistante aux antibiotiques.

Réplication et transmission

Chaque plasmide contient au moins une séquence d'ADN qui sert d'origine de réplication, ou *ori* (un **point** de départ de réplication de l'ADN), permettant l'ADN plasmidique d'être dupliqué indépendamment du **chromosome** bactérien ou saccharomycien (Figure 2), en utilisant la " machinerie " de la cellule hôte. Les plasmides peuvent être circulaires, ou parfois linéaires, présentant une ressemblance superficielle avec les chromosomes eucaryotes.

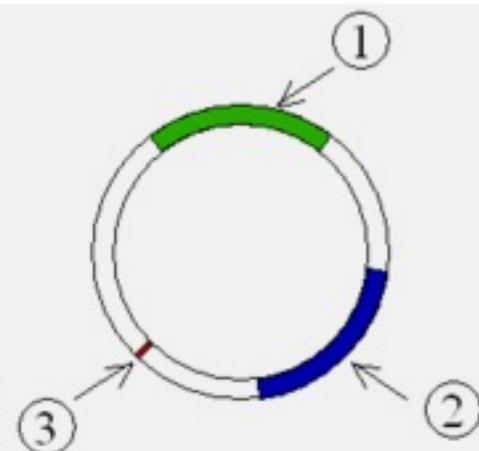


Figure 2: Schéma d'un plasmide codant la résistance à un **antibiotique** donné. **1 & 2** Gène(s) codant la (les) résistance(s). **3 Ori**.

Les plasmides

Les plasmides sont des petits fragments d'ADN circulaire présents dans la cellule bactérienne et indépendants du génome bactérien.

Propriétés générales des plasmides

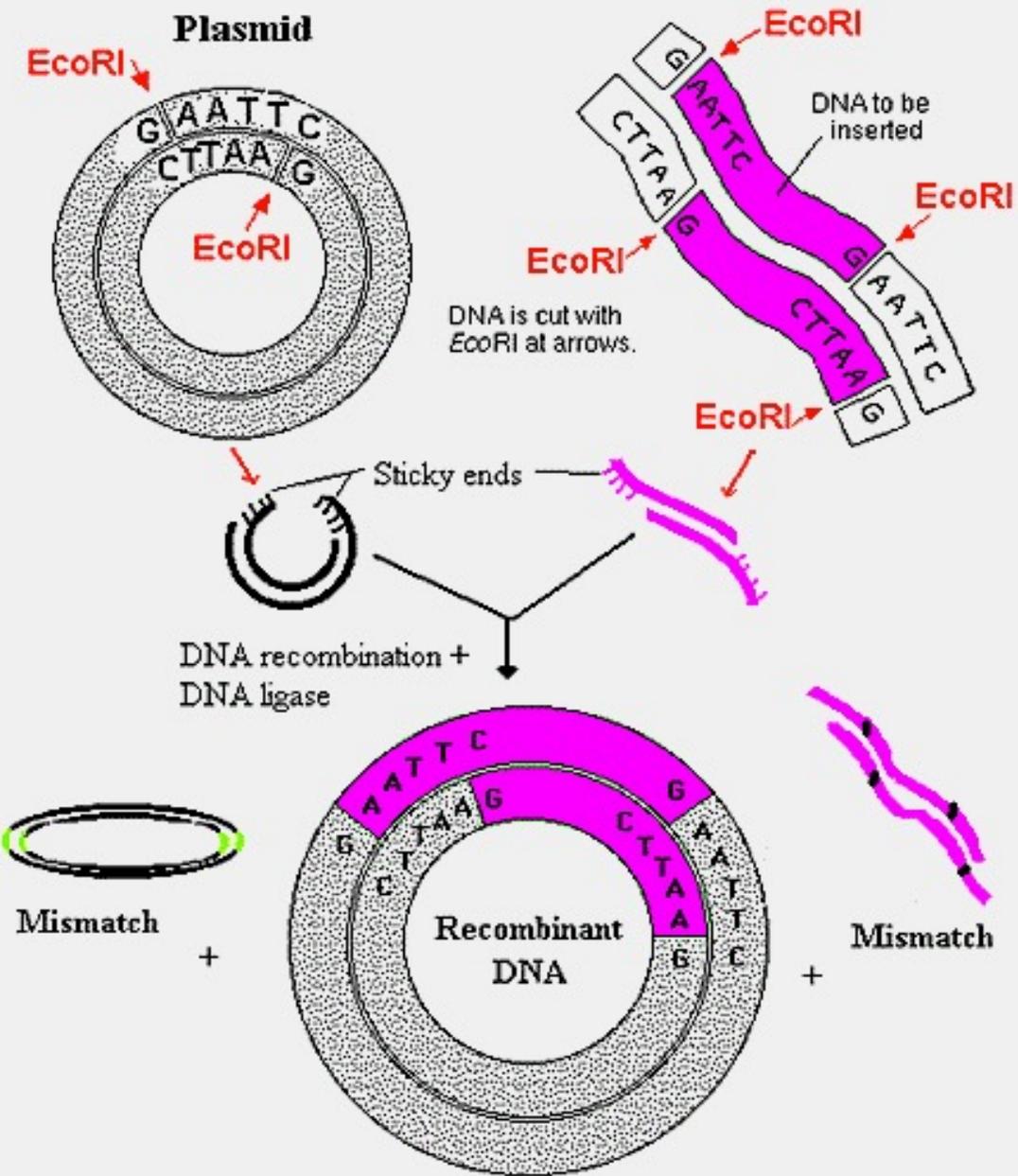
Les plasmides présentent les caractéristiques suivantes : Leur ADN est bicaténaire, circulaire avec un nombre de nucléotides inférieur à 10 kb (1 kilobase = kb = 1000 nucléotides).

- Le nombre de plasmides dans une cellule bactérienne peut être considérable (plusieurs centaines).
- Les plasmides portent normalement des gènes qui leur confèrent un avantage sélectif, par exemple une résistance à un antibiotique.
- Leur réplication est indépendante de celle du génome bactérien.

Préparation des plasmides

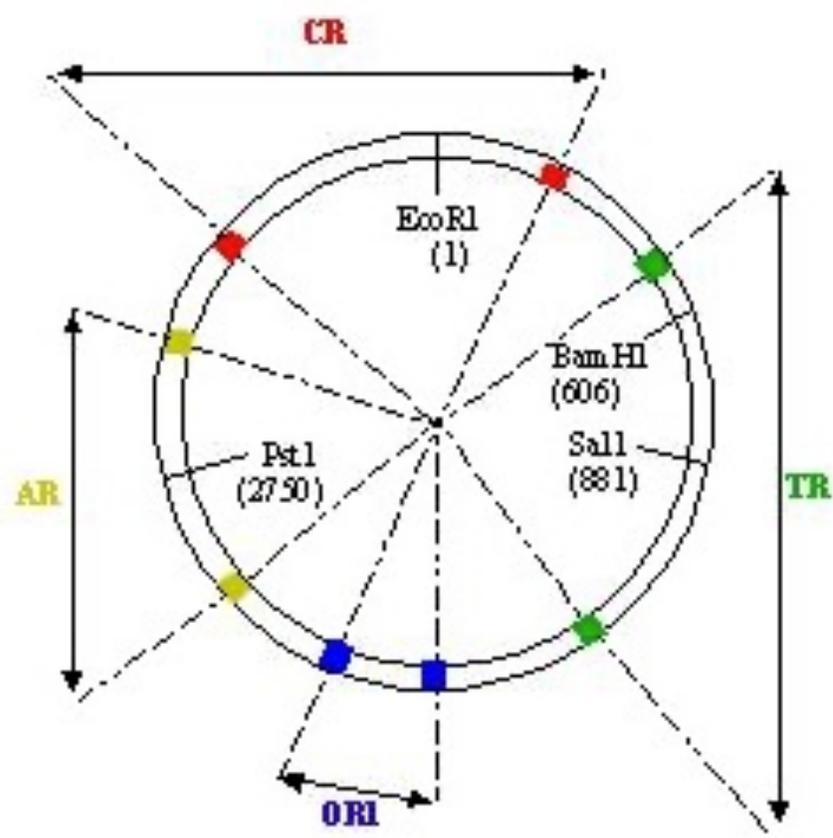
Les bactéries contenant les plasmides sont mises en culture dans un grand volume (jusqu'à 2 litres de milieu de culture). Quand la concentration bactérienne atteint une valeur suffisante, on traite par un antibiotique (comme le chloramphénicol) qui empêche la croissance bactérienne sans affecter la réplication des plasmides. On récupère les bactéries par centrifugation.

Puis, on perméabilise la paroi bactérienne par un traitement doux permettant d'obtenir un passage en solution des plasmides qui sont plus légers que l'ADN bactérien. La purification des plasmides peut être ensuite réalisée par chromatographie liquide à haute performance ou ultra-centrifugation en gradient de densité.



Inserting a DNA Sample into a Plasmid

Carte du plasmide pBR329
(4150 pb)



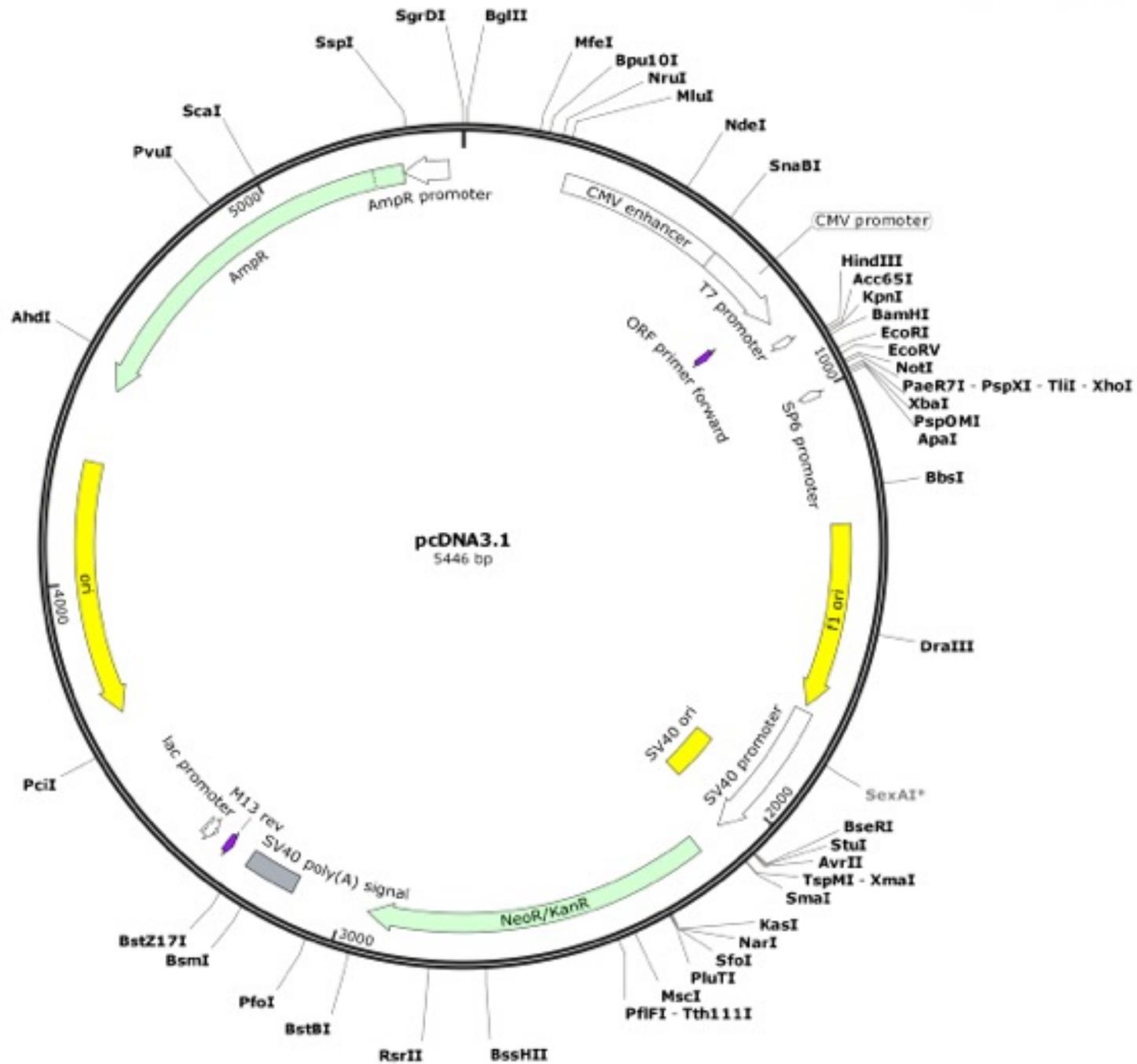
ORI : origine de réplication

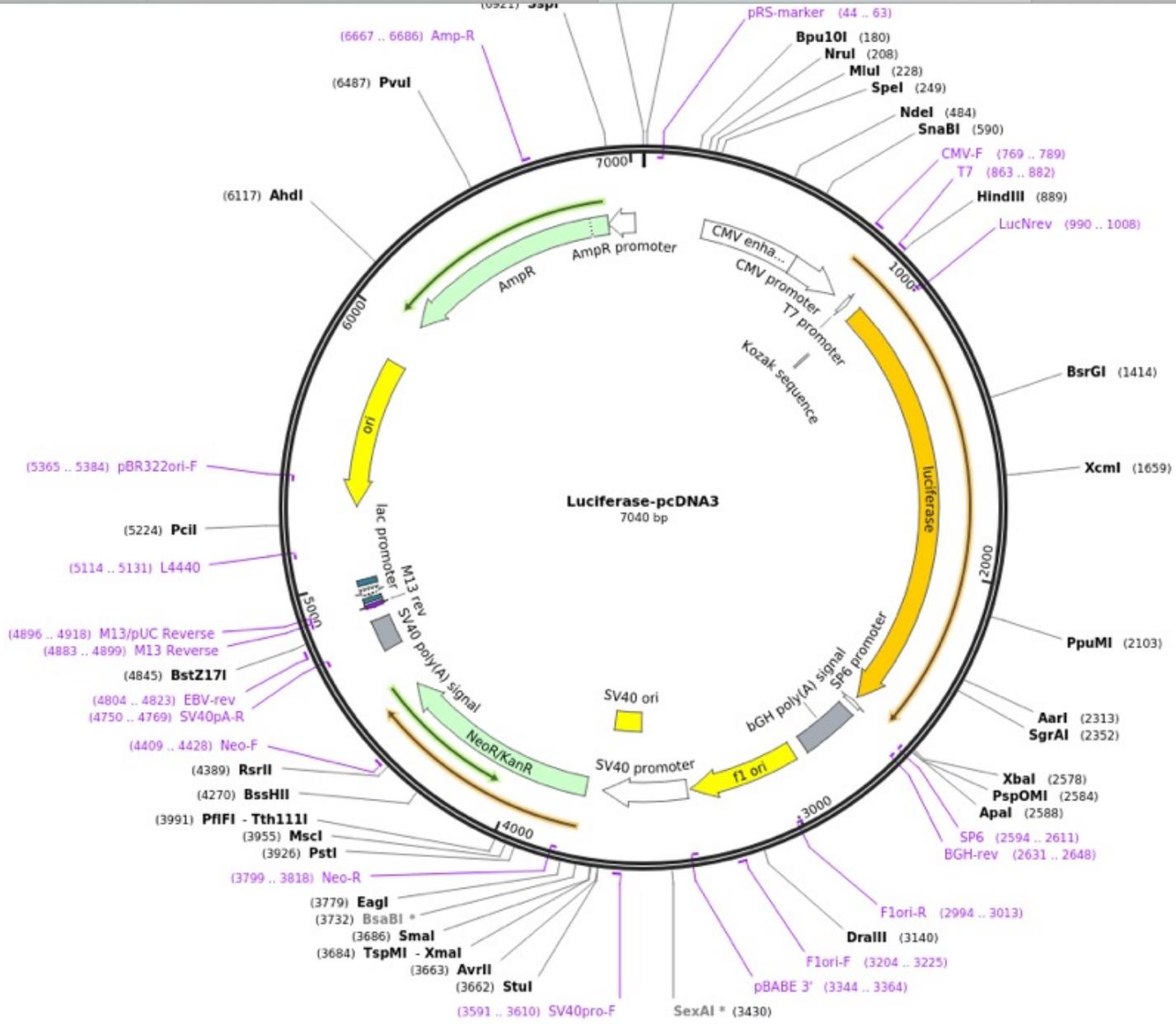
AR : gène de résistance à l'ampicilline

CR : gène de résistance au chloramphénicol

TR : gène de résistance à la tétracycline

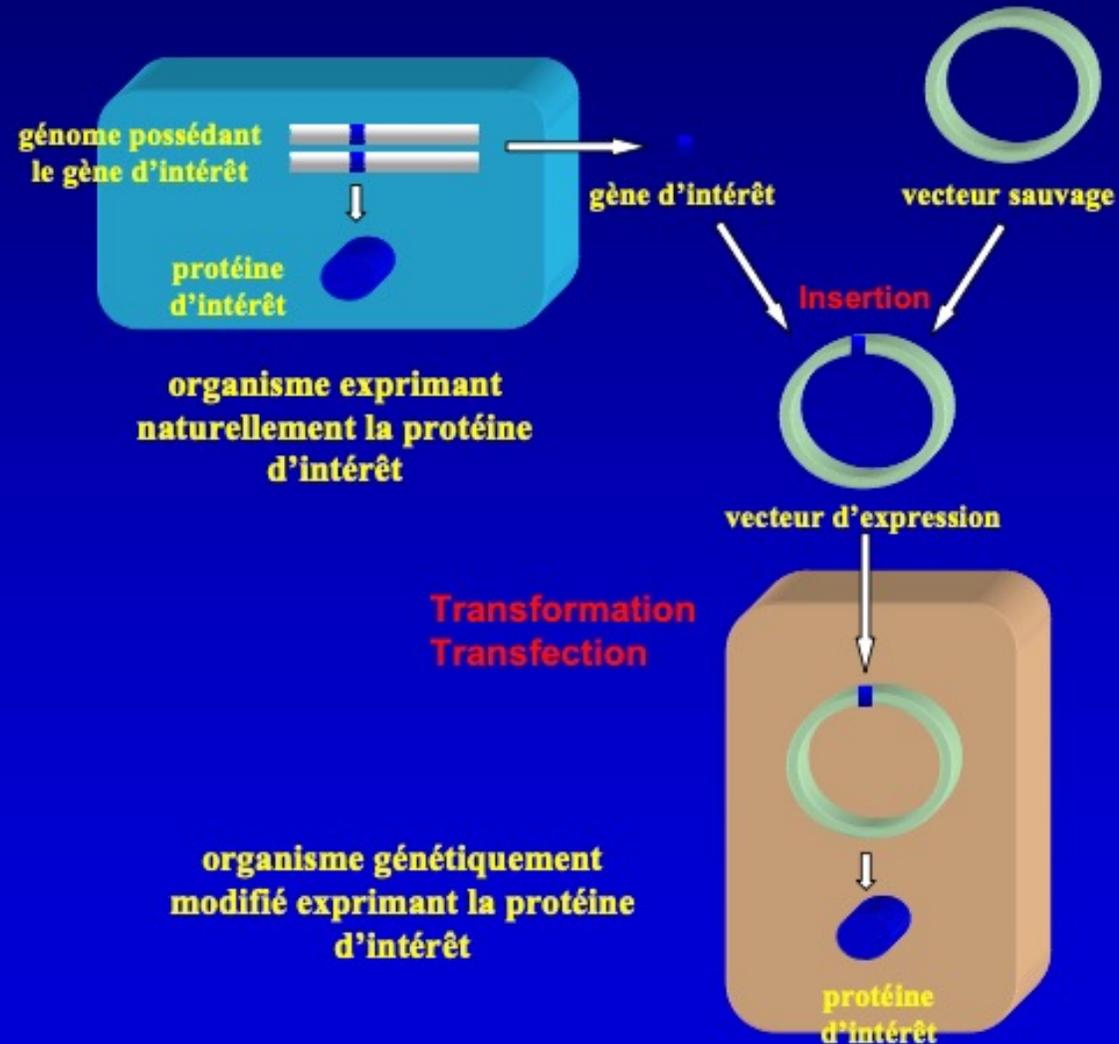
Endonucléases de restriction	Quelques sites uniques de restriction
PstI	(2750)CTCGAG
EcoRI	(1)GAATTC
BamHI	(606)GGATCC
Sall	(881)GTCGAC





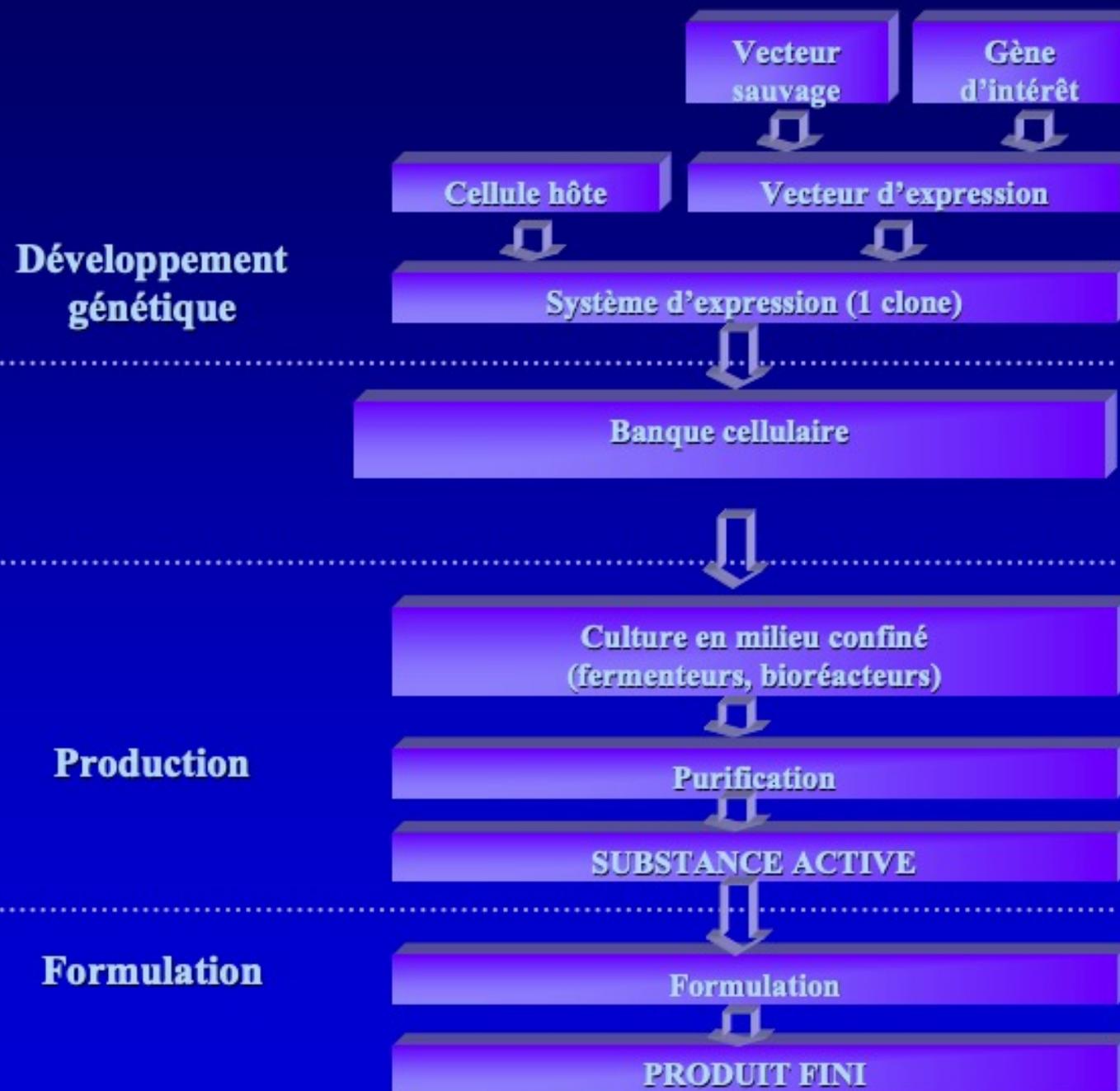
Help Center

Technologie des protéines recombinantes



- **Protéine recombinante: produite par des cellules dont l'ADN a été modifié par recombinaison génétique**

Procédés de fabrication



Construction d'un vecteur d'expression:

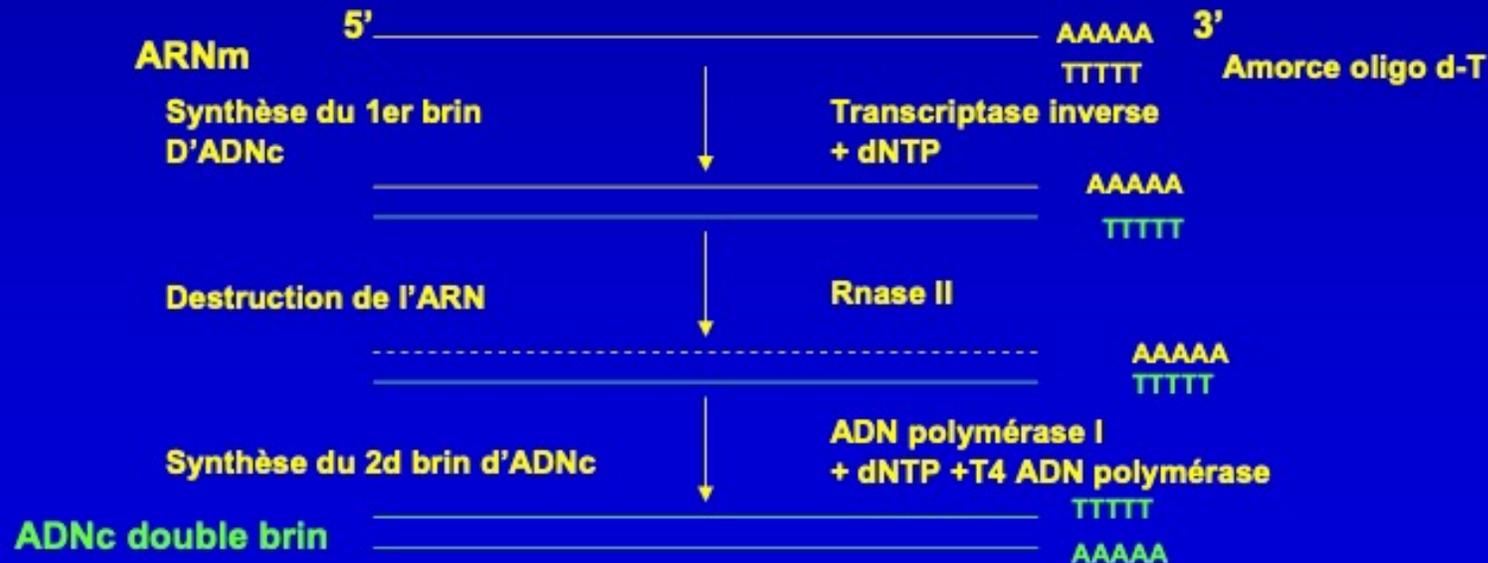
1. Isoler la séquence à exprimer = préparation d'un ADNc

Cellules ou tissu producteurs de la protéine d'intérêt

Extraction des ARN totaux

Purification des ARNm (1 à 2%): possèdent une queue polyA
chromatographie sur colonne oligo-dT
(cellulose/sépharose/billes magnétiques)

Synthèse d'un ensemble ADNc par transcription inverse:



Construction d'un vecteur d'expression:

1. Isoler la séquence à exprimer = préparation d'un ADNc

Cellules ou tissu producteurs de la protéine d'intérêt



Extraction des ARN totaux
Purification des ARNm (1 à 2%): possèdent une queue polyA
chromatographie sur colonne oligo-dT
(cellulose/sépharose/billes magnétiques)



Synthèse d'un ensemble ADNc par transcription inverse:



PCR d'amplification de l'ADNc ciblé: importance du choix des amorces

EcoR1- ATG ————— TGA-Xba1

Construction d'un vecteur d'expression:

2. Insertion dans le vecteur d'expression

Digestion de l'ADNc amplifié et du vecteur par une enzyme de restriction



Recombinaison chimique: ADN ligase → ADN recombinant

Contrôle qualité de l'ADN recombinant:

Transformation dans E. Coli
Sélection des clones recombinants
et extraction du vecteur d'expression (mini-prep)
Restriction du vecteur purifié

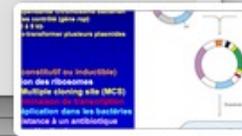
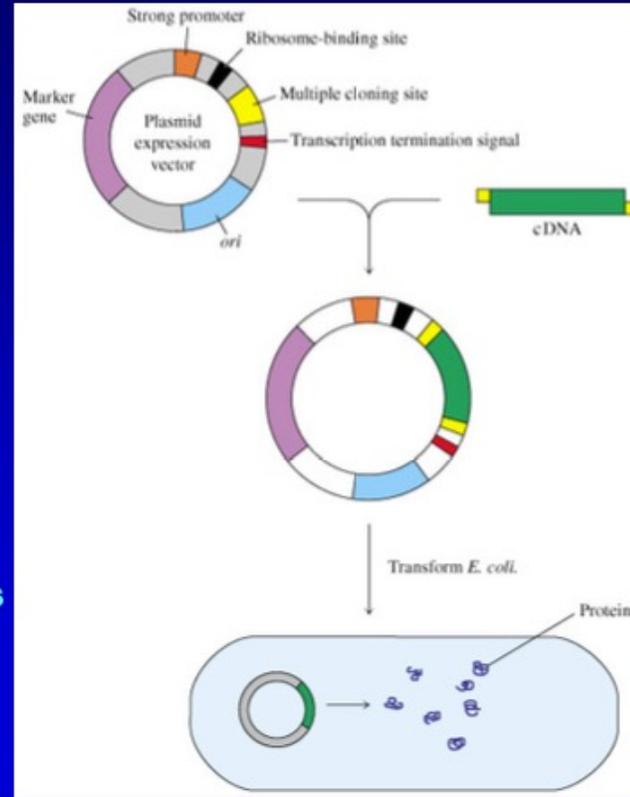
3. Préparation de grandes quantités de vecteur

Incorporation dans la cellule hôte

Vecteurs d'expression: les plasmides (1) Caractéristiques communes

- **ADN circulaire extra chromosomique (2 à 6 kb)**
- **Réplication indépendante/ chromosome bactérien**
- **Nombre de copies contrôlé (gène *rop*)**
- **ADN exogène: 8 à 9 kb**
- **Possibilité de co-transformer plusieurs plasmides différents**

- Promoteur (constitutif ou inductible)**
- Site de fixation des ribosomes**
- Polylinker / Multiple cloning site (MCS)**
- Signal de terminaison de transcription**
- Origine de réplication dans les bactéries**
- Gène de résistance à un antibiotique (marqueur de sélection)**



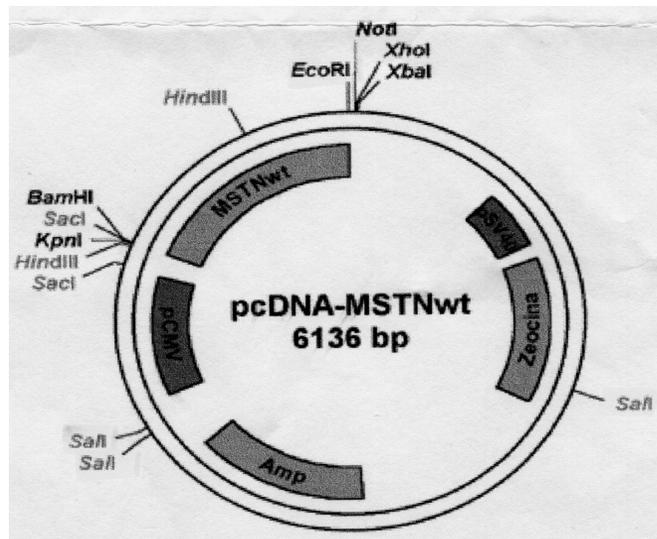


Espèce : Sprague-Dawley

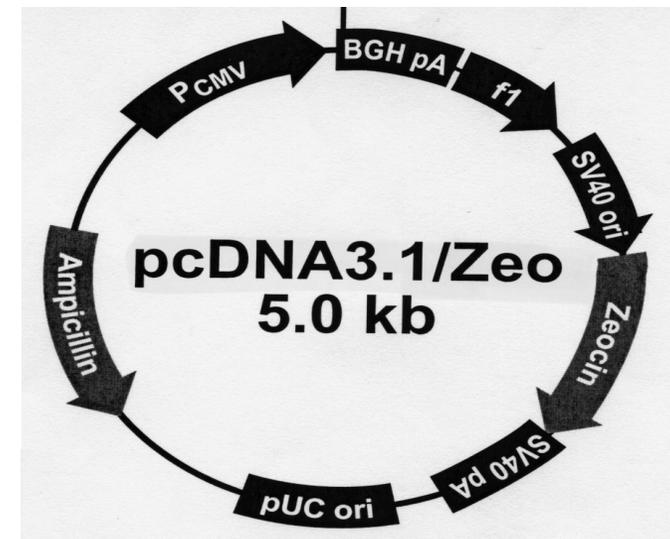
Rats : mâles

Effectif : 75

Poids : 290 ± 10 g



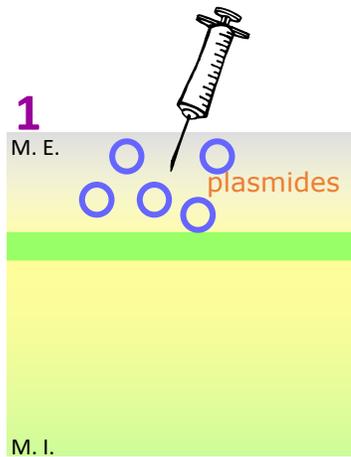
pcDNA3.1 Mstn



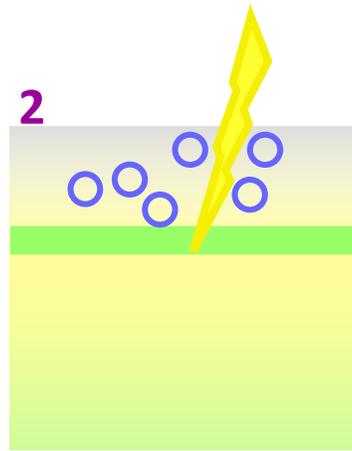
pcDNA3.1 Zéo



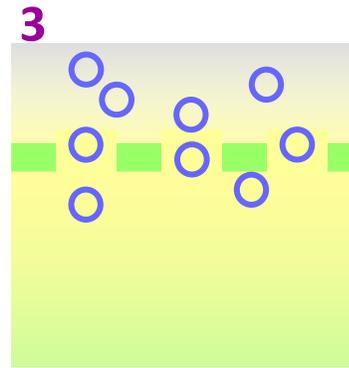
GET 42
(E.I.P., France)



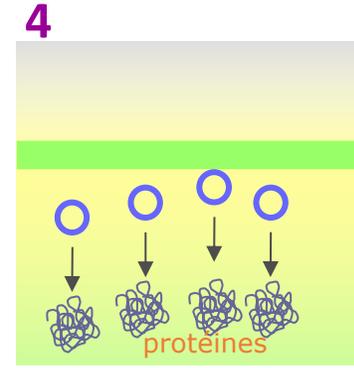
**Injection
intramusculaire
d'ADN nu**



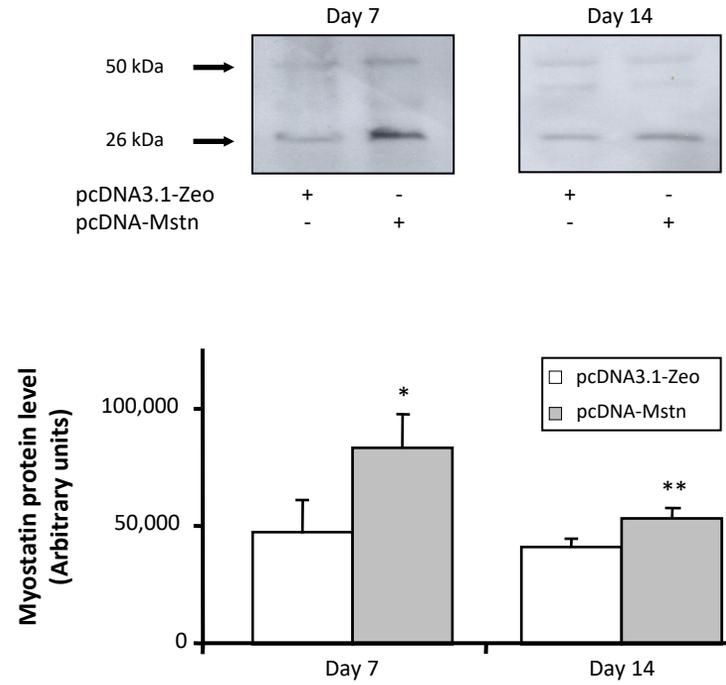
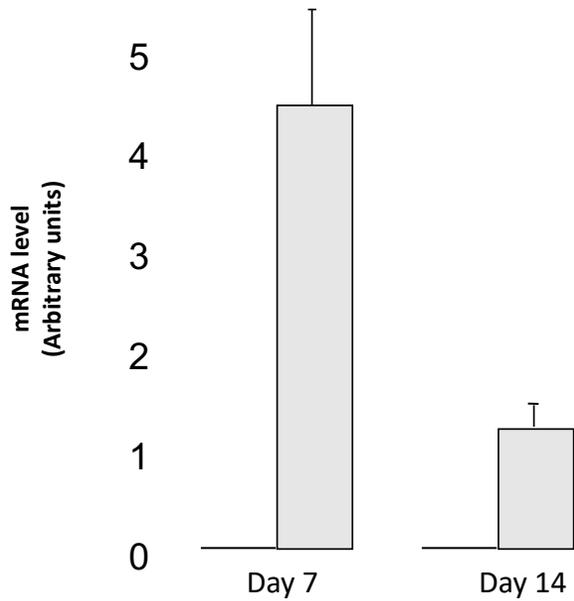
**Stimulation
électrique**



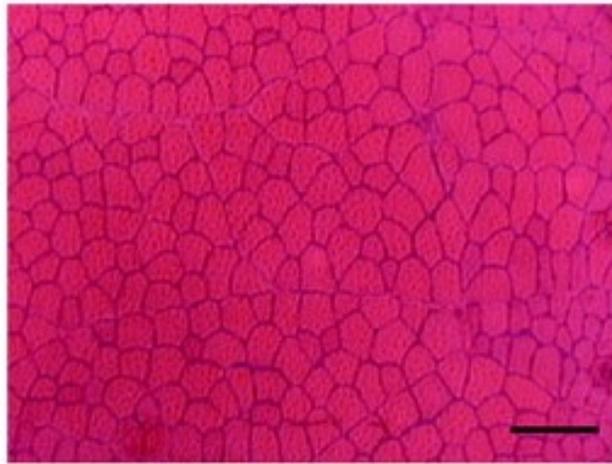
**Electroporation
réversible**



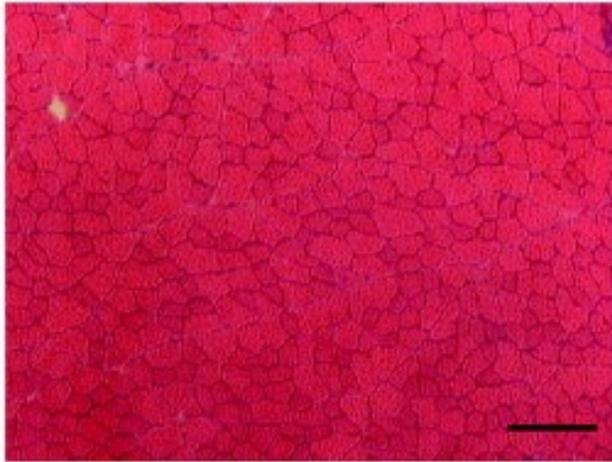
**Surexpression
de l'ADN plasmide**



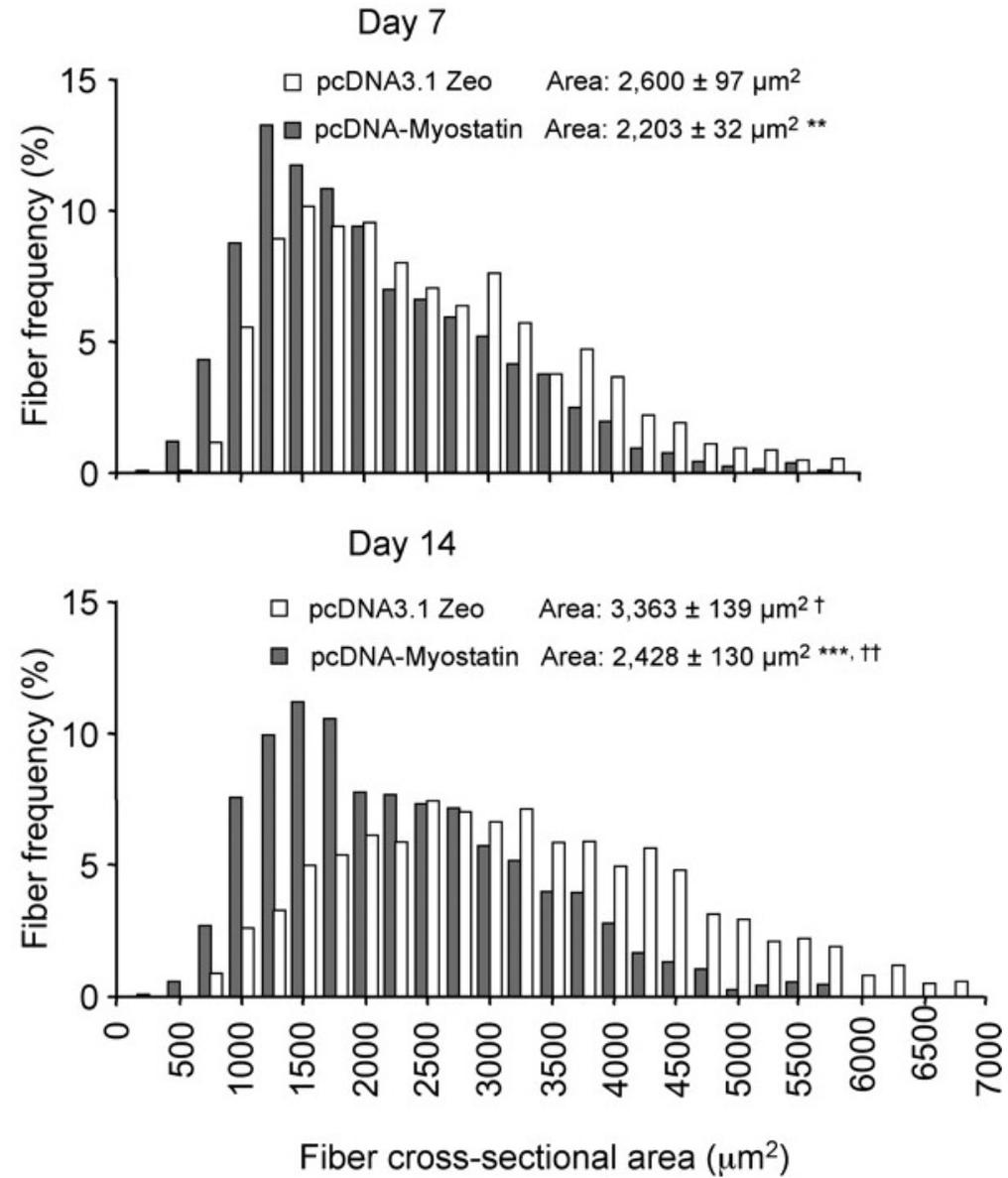
► L'électrotransfert du gène de la myostatine induit une augmentation de l'expression de la myostatine



pcDNA3.1 Zeo



pcDNA-Myostatin



► La surexpression de la myostatine induit une réduction de la surface de section transversale des fibres musculaires

Savoir-faire

Rechercher un motif dans une séquence à l'aide d'un outil numérique adapté.

Concepts

- Site de restriction.
- Amorces.
- Complémentarité

AT

 Repérage de sites d'enzymes de restriction sur un gène ou un plasmide.

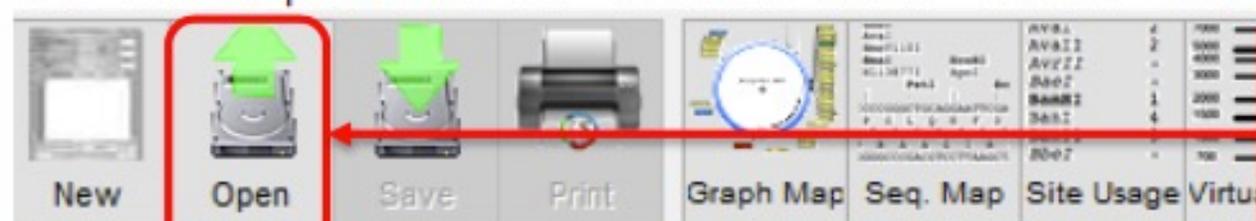
- Il existe de nombreux outils permettant d'établir une carte de restriction et de réaliser un profil de digestion *in silico*.
- L'outil présenté dans cette fiche est le logiciel gratuit **SerialCloner**, téléchargeable en [cliquant sur le lien suivant](#). Il suffit ensuite de l'installer sur le poste informatique.
- Serial cloner permet d'ouvrir également des fichiers générés avec d'autres logiciels comme ApE, pDRAW32, Vector NTI, MacVector ...

Carte de restriction, pourquoi faire ?

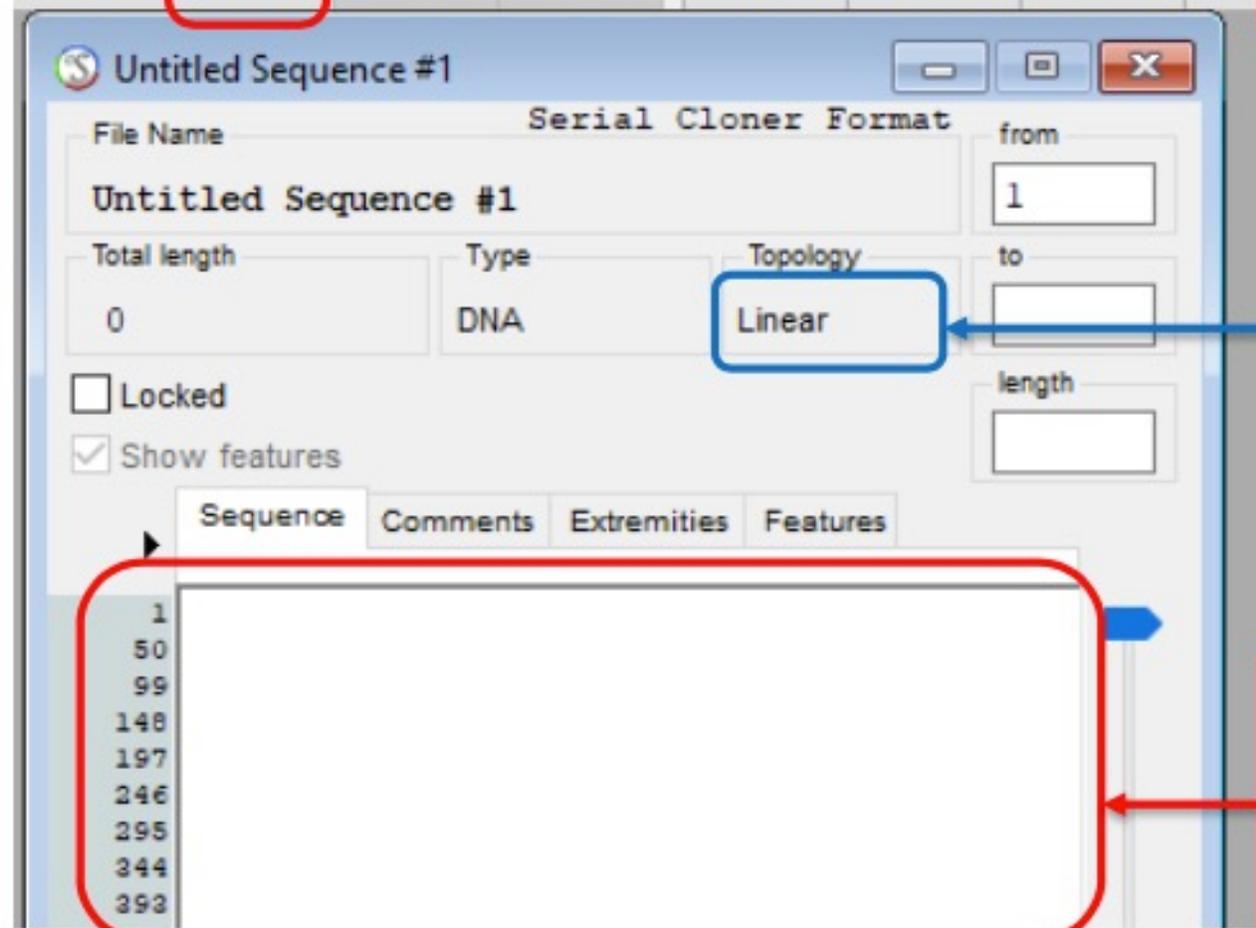
- Vérifier une construction après un clonage ou sous-clonage (par exemple plasmidique).
- Essayer de discriminer deux séquences d'un même fragment d'ADN (ex : deux allèles, une version mutée ou non lors d'un criblage d'amplicons de PCR ou d'un criblage de différents clones après réalisation de mutagenèse dirigée...).

- Deux options : ouvrir le fichier contenant la séquence plasmidique d'intérêt ou coller la séquence dans la fenêtre prévue.

File Edit Sequence Features Restriction Protein Function Window



Cliquer sur « Open » pour ouvrir le fichier contenant la séquence du plasmide à étudier



Ne pas oublier de préciser si la séquence collée est **linéaire ou circulaire** (effectuer un « clic droit » et choisir la bonne

Coller dans cette fenêtre la séquence du plasmide à étudier. Voir fiche sur la « recherche de séquence » pour récupérer la séquence du plasmide.

Une fois la séquence chargée, on peut annoter la séquence en sélectionnant l'onglet « **Features** ». Si non, il suffit de sélectionner l'outil « **Graph Map** » pour obtenir le profil de restriction.

The screenshot shows the Serial Cloner software interface. The top toolbar contains buttons for 'New', 'Open', 'Save', 'Print', and 'Graph Map'. The 'Graph Map' button is highlighted with a red box and an arrow. Below the toolbar is a window titled 'Untitled Sequence #1'. The 'File Name' field is highlighted with a red box and contains 'Untitled Sequence #1'. The 'Total length' is 4361, 'Type' is DNA, and 'Topology' is Circular. The 'Features' tab is selected in the bottom panel. The DNA sequence is visible at the bottom.

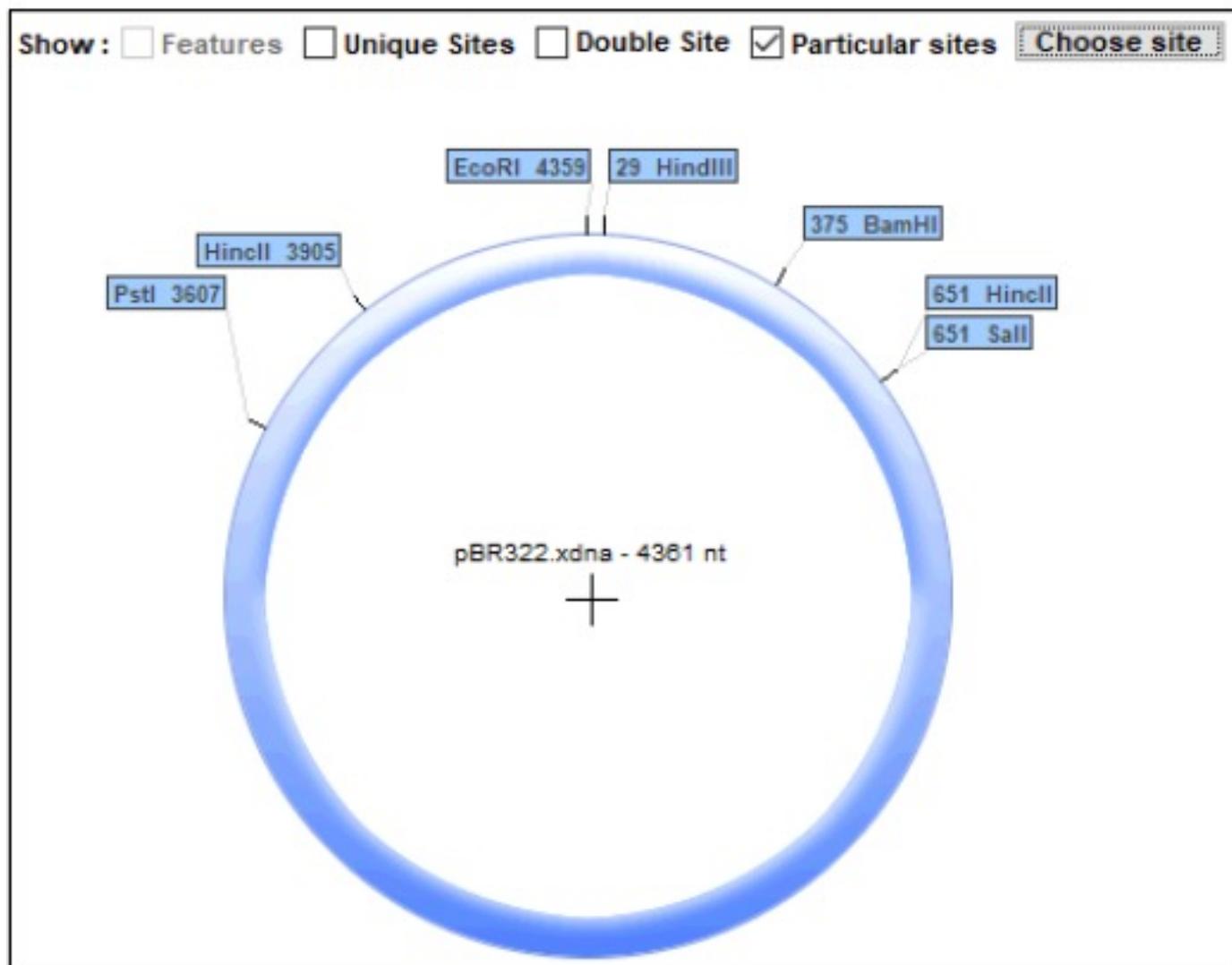
File Name	Serial Cloner Format	from	to	length
Untitled Sequence #1		815		0

```
785 GTCATTTTCGGCGAGGACCGCTTTCGCTGGAGCGCGACGATGATCGGCC
834 TGTTCGCTTGCGGTATTCGGAATCTTGCAACGCCCTCGCTCAAGCCTTCGT
883 CACTGGTCCC GCCACCAAACGTTTCGGCGAGAAGCAGGCCATTATCGCC
932 GGCATGGCGGCCGACCGCTGGGCTACGTCCTGCTGGCGTTCGCGACGC
981 GAGGCTGGATGGCCTTCCCCATTATGATTCTTCTCGCTTCCGGCGGCAT
1030 CGGGATGCCCGCGTTGCAGGCCATGCTGTCCAGGCAGGTAGATGACGAC
```

Ne pas oublier de nommer la séquence.
Dans notre cas, ce sera pBR322.

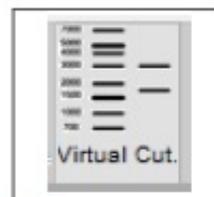
Attention : pour afficher les sites sélectionnés, il faut cliquer sur « **Particular sites** » et décocher « **Unique site** ».

Pour continuer, seuls les sites de restriction des enzymes **BamH I**, **EcoR I**, **Hind III**, **Hinc II**, **Sal I** et **Pst I** seront sélectionnés. Voici ce que l'on obtient :



2. Obtention du profil de restriction après digestion virtuelle

Il suffit de cliquer sur le bouton « Virtual cut » pour afficher la fenêtre de digestion virtuelle.



Il faut alors :

- **Sélectionner la séquence à digérer** et ne pas oublier de préciser si elle est **circulaire**.
- **Sélectionner les ER.**

The screenshot shows the Virtual Cut software interface. At the top, a dropdown menu displays 'pBR322.xdna' and a checked 'Circular' checkbox. Below this, the 'Selected enzymes' section lists 'BamHI, HindIII, HincII'. The main text area contains the following analysis results:

```
Restriction analysis of pBR322.xdna [Circular]
Incubated with BamHI + HindIII + HincII

4 fragments generated.

1: 3 254 bp - From HincII[651] To HincII[3905]
2: 485 bp - From HincII[3905] To HindIII[29]
3: 346 bp - From HindIII[29] To BamHI[375]
4: 276 bp - From BamHI[375] To HincII[651]
```

To the right of the text is a DNA ladder with markers at 20000, 10000, 7000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1000, 700, 500, 400, 300, 200, and 75 bp. A blue box highlights the text area and the ladder, with a blue arrow pointing to the ladder.

At the bottom, there are buttons for 'Print Report', 'Copy Text Report', 'Copy Graphic Report', 'Save Graphic Report', and a 'DNALadder' dropdown menu. The current ladder is set to 'GeneRuler 1kb Plus [Fermentas]'.

Le nombre et la taille des fragments obtenus, la position des sites de coupure ainsi que le profil de digestion apparaissent.

Options de sauvegarde ou d'export des résultats

Possibilité de changer le profil du marquer de taille



ApE

A plasmid Editor
by M. Wayne Davis



[Download](#)
OSX 10.11+



[Download](#)

Click the icons above to download the latest ApE (v3.0.8, October 13, 2021)
A [list](#) of updates and bug fixes.

[Slides](#) from a series of presentations describing some of the features of ApE

See the instructions below for installing open source programs on a Mac.

Some Windows systems will need to temporarily [disable Windows Defender](#) to install.

Click here  to make a voluntary donation in support of ApE. [Follow @ApEplasmid](#)

Important note for OSX users:

A short video of installing ApE on a Mac:



ApE - A plasmid Editor

Logiciel de visualisation, d'édition et d'analyse de séquences plasmidiques.



2

Libre

Windows

Mac

ApE est une application scientifique pour l'édition de plasmide.

Met en évidence les sites de restriction dans la fenêtre d'édition

Reflète avec précision le blocage des sites enzymatiques par Dam / Dcm

Met en évidence le texte à l'aide de bibliothèques de fonctions prédéfinies et personnalisées

Affiche la traduction, Tm, % GC, ORF de l'ADN sélectionné en temps réel

Lit les fichiers DNA Strider, Fasta, Genbank et EMBL

Enregistre les fichiers au format de fichier compatible DNA Strider ou Genbank

Met en évidence et dessine des cartes graphiques en utilisant les annotations de caractéristiques des

fichiers genbank et embl

Séquence BLAST directement sélectionnée au NCBI ou dans la base de travail



Liens vers les sites officiels de

 Site officiel

 Facebook

Mots clés

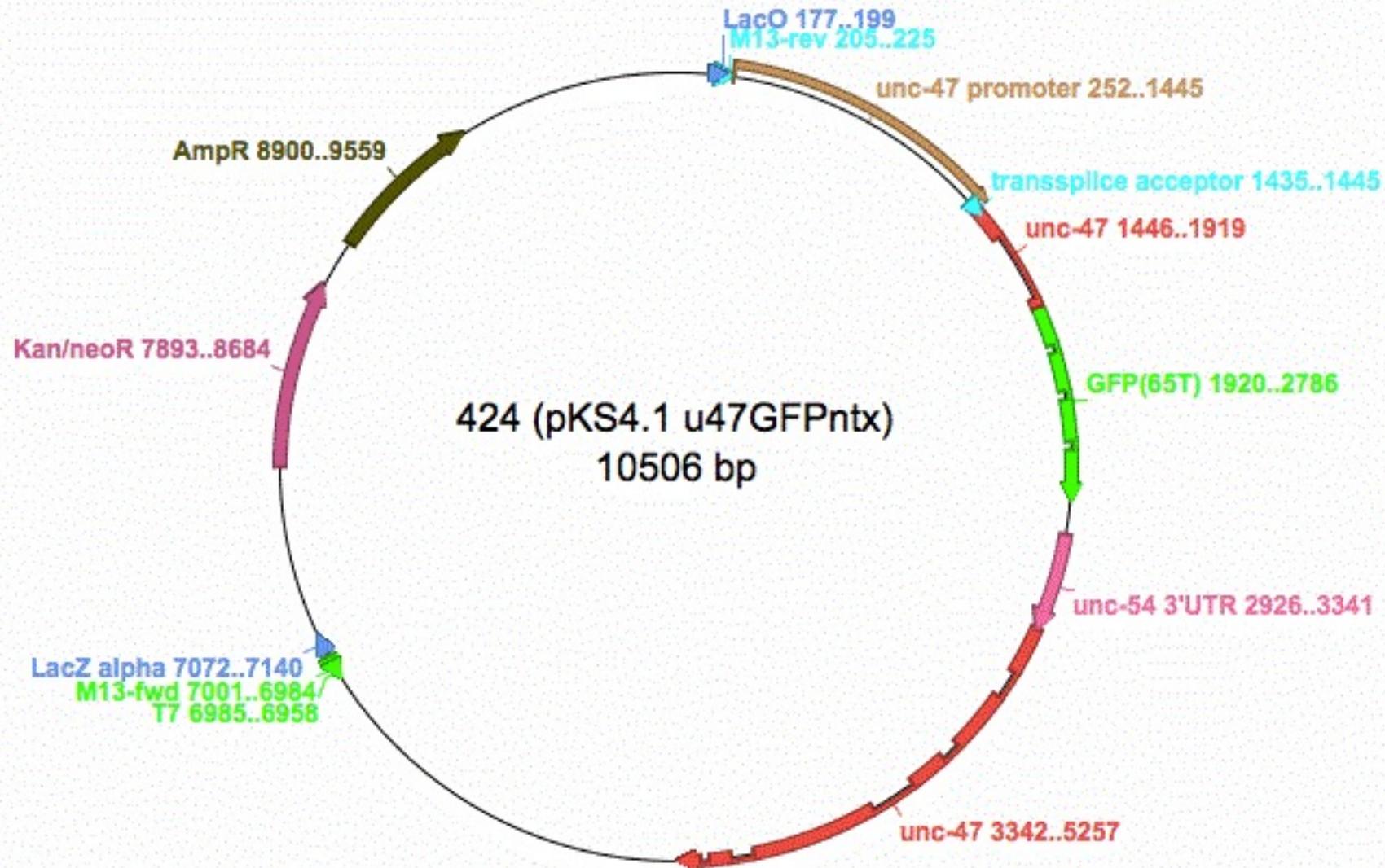
dna-sequences

dna-editor

plasmid

dna

biology



pDONR221.ape

Sequence insert@ 1482 4762 1<0> circular Dam/Dcm

CmR

* 10 * 20 * 30 * 40 * 50 * 60 * 70 * 80

```
1 TGTAAAACGACGGCCAGTCTTAAGCTCGGGCCCCAAATAATGATTTTTATTTTGACTGATAGTGACCTGTTTCGTTGCAACA
81 CATTGATGAGCAATGCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAAAGCTGAACGAGAAACGTAAAATGATATAAAATATCA
161 ATATATTAATTAGATTTTGCATAAAAAACAGACTACATAACTGTAAAACACAACATATCCAGTCACTATGAATCAAC
241 TACTTAGATGGTATTAGTGACCTGTAGTCTGACCGACAGCCTTCCAAATGTTCTTTCGGGTGATGCTGCCAACTTAGTCTGAC
321 CGACAGCCTTCCAAATGTTCTTCTCAAACGGAATCGTCGTATCCAGCCTACTCGCTATTGTCCTCAATGCCGTATTAAAT
401 CATAAAAAGAAATAAGAAAAAGAGGTGCGAGCCTCTTTTTTGTGTGACAAAATAAAAACATCTACCTATTCATATACGCT
481 AGTGTCATAGTCCTGAAAATCATCTGCATCAAGAACAATTTCACTACTTATACTTTTCTCTTACAAGTCGTTTCGGCTT
561 CATCTGGATTTTCAGCCTCTATACTTACTAAACGTGATAAAGTTTCTGTAATTTCTACTGTATCGACCTGCAGACTGGCT
641 GTGTATAAGGGAGCCTGACATTTATATTCCCCAGAACATCAGGTTAATGGCGTTTTTGGATGTCATTTTCGCGGTGGCTGA
721 GATCAGCCACTTCTTCCCCGATAACGGAGACCGGCACACTGGCCATATCGGTGGTCATCATGCGCCAGCTTTCATCCCCG
801 ATATGCACCACCGGGTAAAGTTCACGGGAGACTTTATCTGACAGCAGACGTGCACTGGCCAGGGGGATCACCATCCGTCG
881 CCCGGGCGTGTCAATAATCACTCTGTACATCCACAAACAGACGATAACGGCTCTCTCTTTTATAGGTGTAACCTTAA
961 ACTGCATTTCAACAGCCCTGTTCTCGTCAGCAAAAGAGCCGTTCAATTAATAAACCGGGCGACCTCAGCCATCCCTTC
1041 CTGATTTTCCGCTTTCCAGCGTTCGGCACGCAGACGACGGGCTTCATTCTGCATGGTTGTGCTTACCAGACCGGAGATAT
1121 TGACATCATATATGCCTTGAGCAACTGATAGCTGTCGCTGTCAACTGTAATACGCTGCTTCATAGCATACTCTCT
1201 TTTTGACATACTTCGGGTATACATATCAGTATATATTTCTTATAACCGCAAAAATCAGCGCGCAAATACGCATACTGTTATC
1281 TGGCTTTTAGTAAGCCGGATCCACGCGGGCTTTACGCCCCGCCCTGCCACTCATCGCAGTACTGTTGTAATTCATTAAGC
1361 ATTCTGCCGACATGGAAGCCATCACAGACGGCATGATGAACCTGAATCGCCAGCGGCATCAGCACCTTGTGCGCTTGGCT
1441 ATAATATTTGCCCATGGTGAACCGGGGGCGAAGAAGTTGTCCATATTGGCCACGTTTAAATCAAACTGGTGAACCTCA
1521 CCCAGGGATTGGCTGAGACGAAAAACATATTCTCAATAAACCTTTAGGGAAATAGGCCAGGTTTTCCCGTAACACGCC
1601 ACATCTTGCGAATATATGTGTAGAACTGCCGAAATCGTCGTGGTATTCCTCCAGAGCGATGAAAACGTTTCAGTTTG
1681 CTCATGGAAAACGGTGTAAACAAGGGTGAACACTATCCCATATCACCAGCTCACCCTTTTCATTGCCATACGGAATTCCG
1761 GATGAGCATTATCAGGCGGGCAAGAATGTGAATAAAGGCCGGATAAACTTGTGCTTATTTTTCTTTACGGTCTTTAAA
1841 AAGGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTTATAGGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAAATGTTCTTTACG
```

* 10 * 20 * 30 * 40 * 50 * 60 * 70 * 80

pDonr221 1-2 destination vector

