

# Les Cours du professeur E. Coli

- spécial Material & Methods -

textes et dessins de Pellischi

**Avant-propos :**

**Ce livret est mis à disposition gratuite pour un usage privé ou éducatif.  
Toute utilisation commerciale est proscrite. Plus d'informations sur  
[pellichi.fr](http://pellichi.fr)**

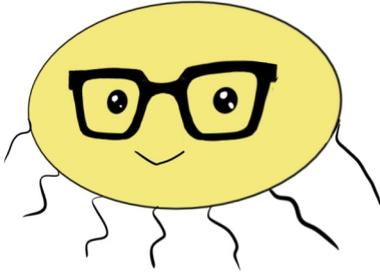
**Vous pouvez aussi soutenir mon travail sur  
[www.tipeee.com/material-methods](http://www.tipeee.com/material-methods)**

Les Cours du  
professeur E. Celi

- spécial Material & Methods -



## **A propos du professeur E. Coli (nom complet : *Escherichia Coli*)**



Habituellement dans votre intestin ou travaillant comme organisme modèle dans un laboratoire, cette bactérie s'est improvisée professeur sur le blog *Le Pelliscope*.

Légalement (beaucoup) imbu de lui-même, il aime vanter les mérites du monde microbien et expliquer le fonctionnement des cellules. Voici aujourd'hui sa première publication dans un livre. On espère qu'il n'en tirera pas trop d'orgueil et que son enseignement vous sera profitable.

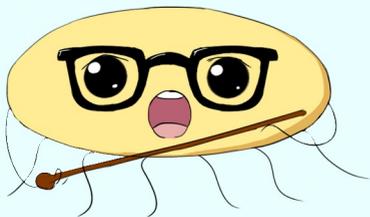
### **A propos de ce livret :**

Ce livret a été conçu pour accompagner le manga *Material & Methods* tome 1. Il explique les expériences qui y sont mentionnées, leur principe et comment les mettre en oeuvre. Il ne s'agit pas pour autant de protocoles précis. Le premier billet sur l'ADN a été initialement publié sur le *Pelliscope* en février 2015.

Retrouvez les autres cours du professeur E. coli sur le *Pelliscope* :  
<http://pellichi.fr>

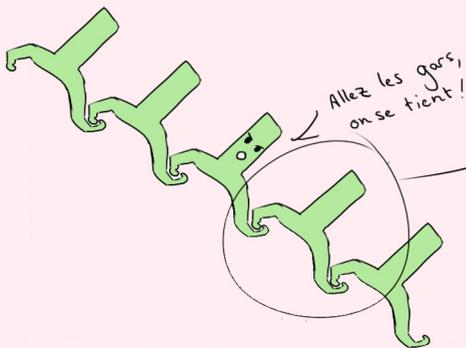


Commençons par aborder un point extrêmement important de la biologie...

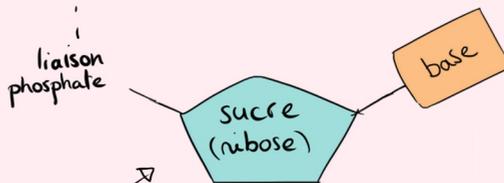


L'ADN et le dogme central de la biologie moléculaire

L'Acide Désoxyribonucléique (ou ADN) est un polymère, une espèce de grande chaîne...



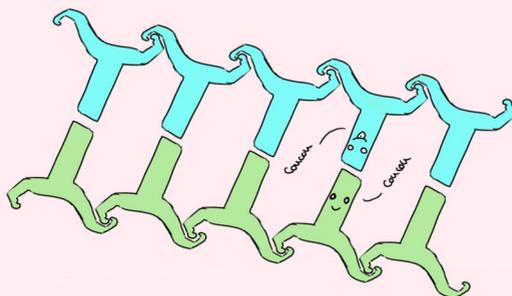
... dont les maillons sont des nucléotides



Ces nucléotides portent chacun une base qui peut être de 4 sortes, chacune désignée par une lettre :

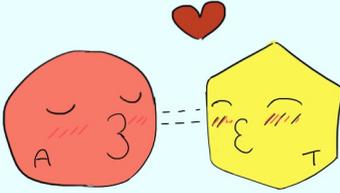
- Adénine (A)
- Thymine (T)
- Guanine (G)
- Cytosine (C)

Ces chaînes de nucléotides s'associent deux à deux, rendant l'ADN moins facile à dégrader.

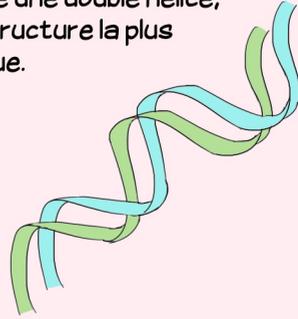


Cette association se fait de façon complémentaire...

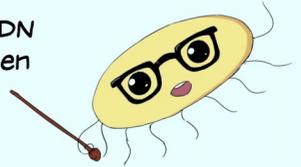
... le A s'apparie avec le T,  
et le G avec le C (et vice versa)



Associé en double brin, l'ADN  
forme une double hélice,  
sa structure la plus  
connue.

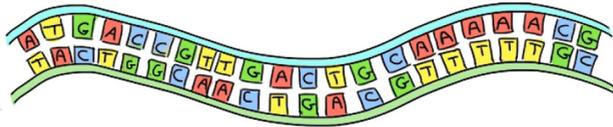


C'est l'enchaînement des bases (A, T, C, G) qui permet à l'ADN  
de contenir de l'information génétique, de la même façon qu'en  
informatique, l'information est codée en 0 et 1.  
C'est cette capacité codante qui rend l'ADN important.



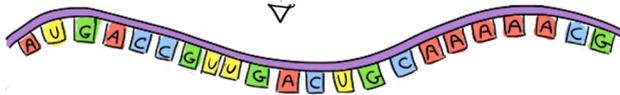
Dans les cellules, l'information que contient l'ADN permet avant tout la  
fabrication de protéines. Tout fragment d'ADN codant une protéine est un  
gène.

L'ADN



est transcrit en ...

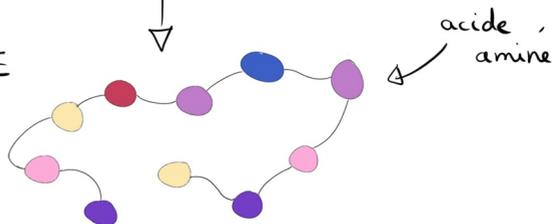
ARN  
messenger



(Acide Ribonucléique,  
une copie provisoire de  
l'ADN. Les Thymines (T)  
sont remplacées par de  
l'Uracile (U))

qui est traduit en ...

PROTEINE

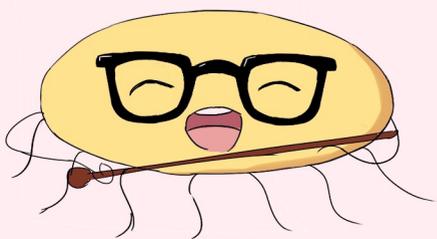


La traduction de l'information stockée dans l'ADN se fait grâce au code génétique. Il fait correspondre chaque triplet de nucléotides (ATT, ATG, ...) à un acide aminé, la brique de base des protéines. Les protéines ainsi fabriquées servent au fonctionnement des cellules.

triplet de nucléotides      acide aminé

|     |     |     |
|-----|-----|-----|
| AAG | Lys | AGG |
| GAT | Asp | GGT |
| GAC | Asp | GGC |
| GAA | Glu | GGA |
| GAG | Glu | GGG |

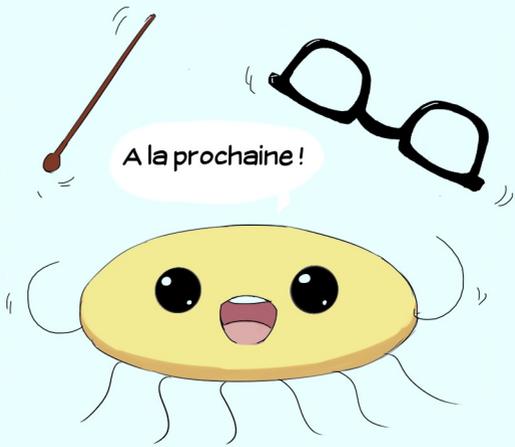
C'est ce que l'on appelle le dogme central de la biologie moléculaire, et c'est la base de la génétique !



Et ça, ça a été découvert chez moi (E. coli) !! Hé ouais, c'est ça la classe !



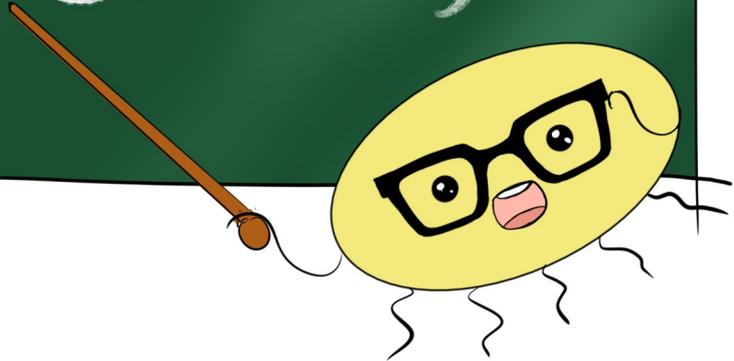
A la prochaine !



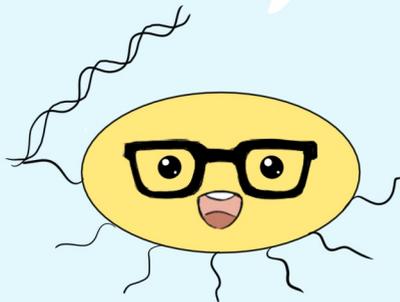




La PCR  
(Polymérase Chain  
Reaction)

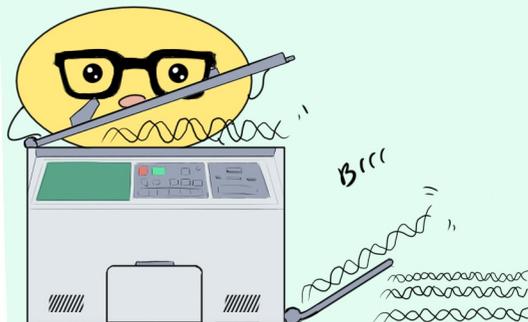


En biologie moléculaire, nous avons souvent besoin d'ADN en grande quantité, par exemple lorsqu'on étudie un gène.



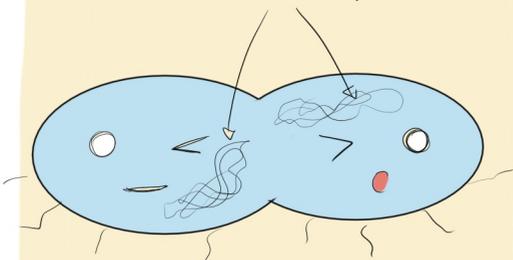
Et donc, ce n'est pas l'ADN entier qui nous intéresse, mais juste un fragment.

La solution la plus simple est donc de le recopier beaucoup de fois !



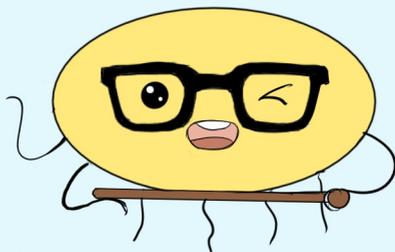
Et recopier de l'ADN, c'est quelque chose que les cellules (comme moi, qui suis un être unicellulaire) font couramment, avant de se diviser.

2 ADN identiques



Pour ça, on utilise des enzymes appelées ADN polymérases.

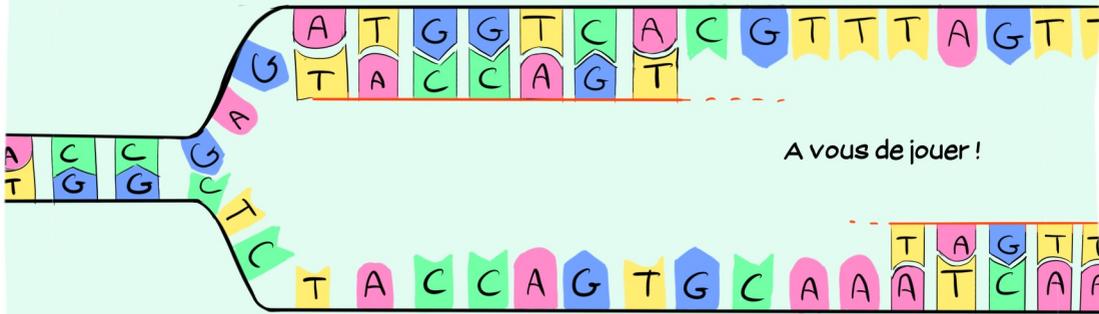
En utilisant ces enzymes en laboratoire, on peut produire l'ADN dont on a besoin en grande quantité. C'est le principe de la PCR (Polymérase Chain Reaction, Réaction en Chaîne de Polymérase).



# Comment ça marche ?



Quand l'ADN est dupliqué dans les cellules, il n'est pas recopié à proprement parler. Il s'agit plutôt de reconstruire un complémentaire à chaque brin en assemblant les nucléotides correspondants : le A avec le T, et le C avec le G.



Note : les 2 brins de l'ADN se lisent dans le sens opposé l'un de l'autre, et sont donc copiés aussi dans un sens opposé (l'un vers la gauche, l'autre vers la droite).

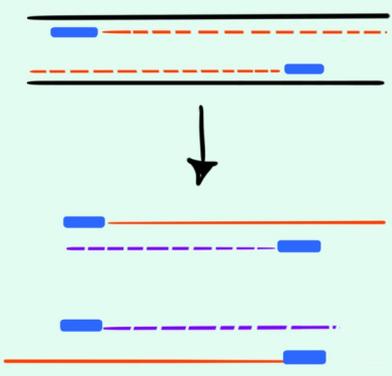
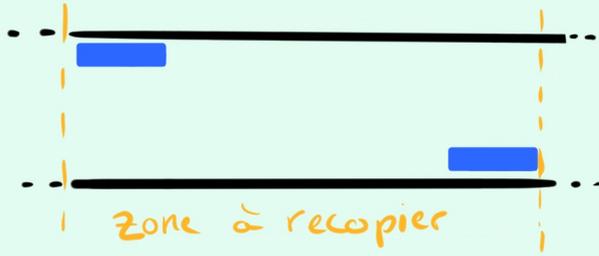
À la fin, on obtient 2 molécules d'ADN identiques qui comportent un brin "ancien" et un brin "nouveau".



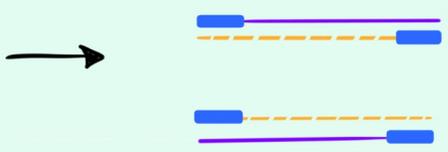
Cependant, les polymérases ne peuvent pas construire de l'ADN, à partir de rien. Elles ont besoin d'un fragment d'ADN existant qu'elles vont ensuite allonger.



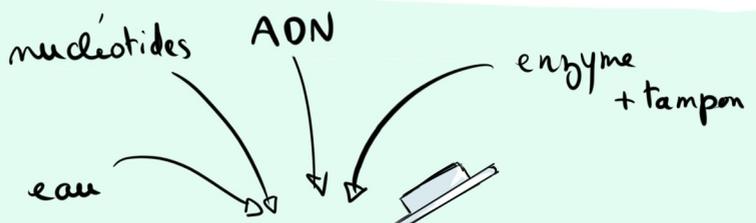
Pour commencer la copie, il faut donc utiliser des petits morceaux d'ADN, qu'on appelle amorces. On les choisit de telle sorte qu'ils se fixent aux extrémités de la zone que l'on veut recopier.



Dans un premier temps, l'ADN polymérase va allonger ces amorces tant qu'elle peut et créer une copie plus longue que la zone à recopier. Mais lorsque cette copie (en rouge) va elle même recopiée, le fragment obtenu sera bien délimité par les deux amorces.



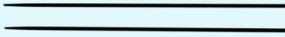
# Comment on fait ?



On met tous ces ingrédients dans un tube !

Le tampon d'une enzyme est une solution qui permet de créer un milieu idéal pour l'activité de l'enzyme !

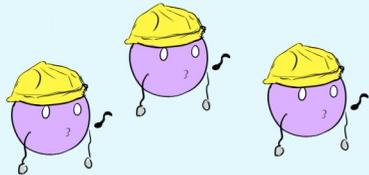
La copie se fait alors par cycles.  
Chaque étape de ce cycle est  
contrôlée par la température.



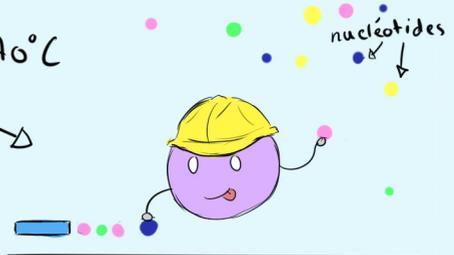
90°C ↓ On commence par séparer les brins  
en chauffant l'ADN à plus de 90°C.



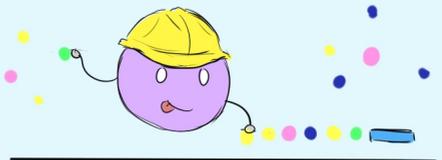
40 ~ 50°C ↓ Puis on redescend la température autour  
de 40°C pour que les amorces se fixent  
sur l'ADN à recopier.



65 ~ 70°C



Ensuite, la polymérase entre en jeu !  
Celle que l'on utilise est stable à la  
chaleur, et est préférentiellement  
active à environ 65°C.



90°C  
Il suffit de répéter un grand nombre  
de fois ce cycle pour obtenir de l'ADN  
à foison !



Ces changements de température sont faits par un thermocycleur.

OUAHHN



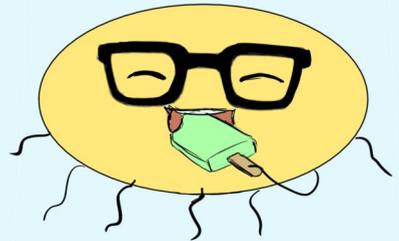
Quel appareil magique

Il suffit de le programmer avec les temps et températures souhaités et d'y placer les tubes. Au bout d'une ou deux heures, la réaction est terminée.

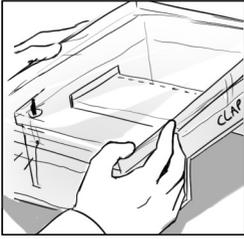


A table !! (Ah euh non)

L'ADN obtenu peut ensuite être utilisé directement (même si on préfère souvent le purifier avant, histoire d'enlever le reste d'amorces et de nucléotides non utilisés).



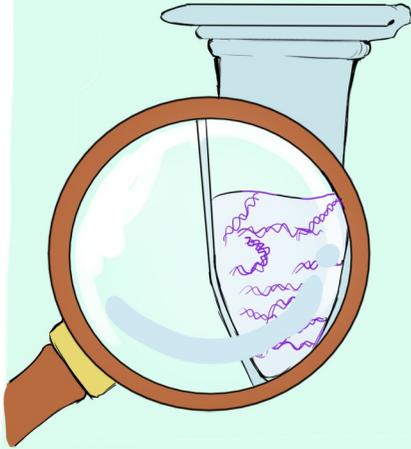
Sinon, il se conserve à  $-20^{\circ}\text{C}$  (comme les glaces miam!)



# Electrophorèse sur gel (d'agarose)



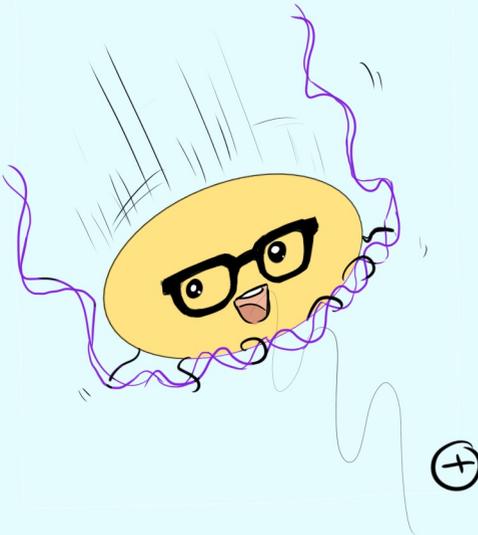
Lorsqu'on fait une PCR, il arrive que les amorces se positionnent au mauvais endroit, et que l'on produise d'autres fragments que ce qu'on voulait (ou même qu'on n'obtienne rien du tout !).



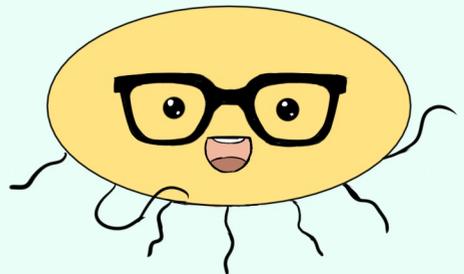
Comment faire pour voir s'il y a un seul ou plusieurs fragments ?



Les molécules d'ADN sont naturellement chargées électriquement. Elles peuvent donc se déplacer sous l'influence d'un champ électrique.



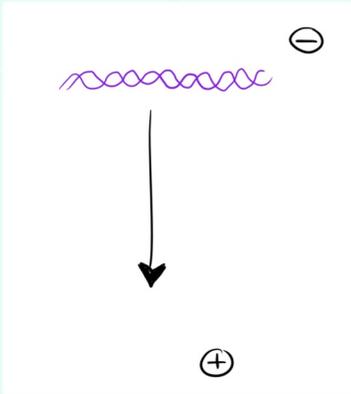
Dans l'électrophorèse sur gel, on met à profit cette propriété pour séparer les molécules d'ADN de tailles différentes.



# Comment ça marche ?

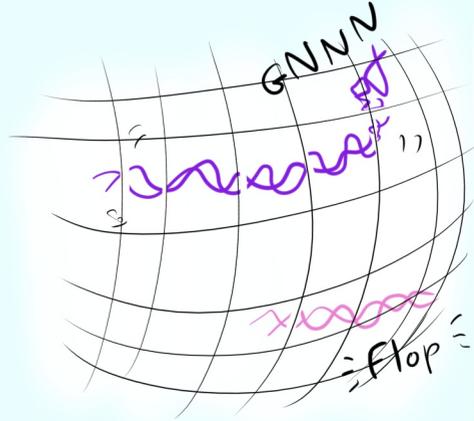


Le principe est de faire migrer l'ADN sous l'influence d'un courant électrique au travers d'un gel.



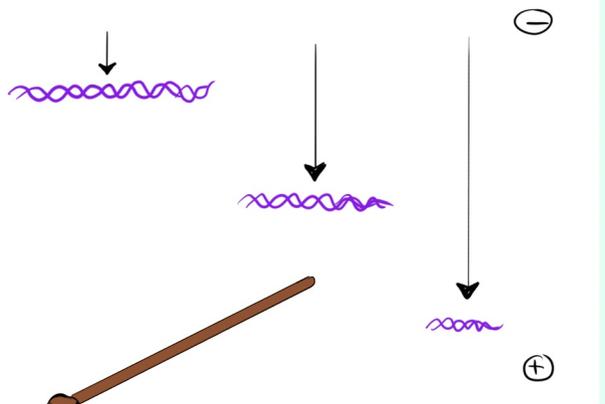
L'ADN étant chargé négativement il est attiré par le pôle + du générateur électrique.

Le gel agit comme un filet de mailles qui va ralentir la migration de l'ADN.



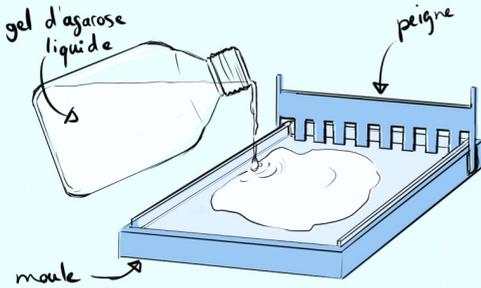
Les fragments de petite taille vont passer plus facilement et donc migrer plus loin.

Ainsi les différents fragments vont être séparés dans le gel et ordonnés selon leur taille.



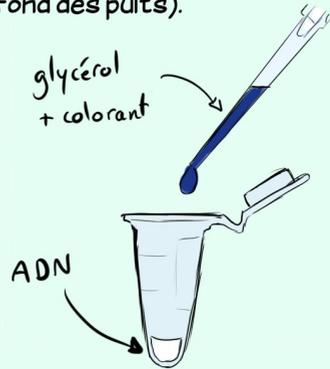
# Comment on fait ?

Il faut d'abord préparer le gel, selon le même principe que de la gélatine : on solubilise de l'agarose\* dans de l'eau en le chauffant, puis on le coule dans un moule. Le gel se fige en refroidissant.

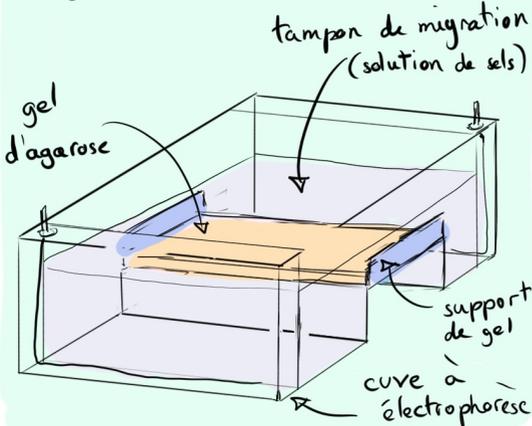


On prend soin de faire des puits dans ce gel avec un peigne, pour pouvoir y déposer l'ADN.

À côté, il faut préparer l'ADN que l'on va déposer. On lui rajoute un mélange de colorant (pour suivre la migration dans le gel) et de glycérol (pour le faire tomber au fond des puits).

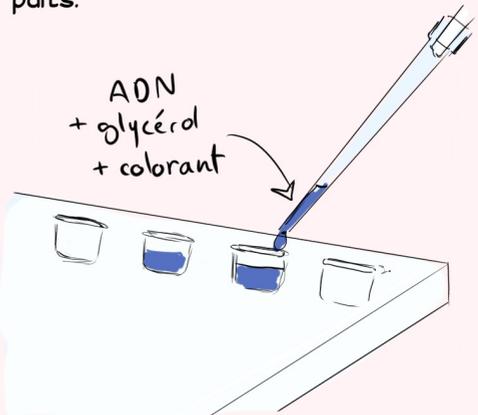


Ensuite on place le gel dans une cuve à électrophorèse. Celle-ci contient une solution de sels qui va permettre de faire passer le courant électrique à travers le gel.



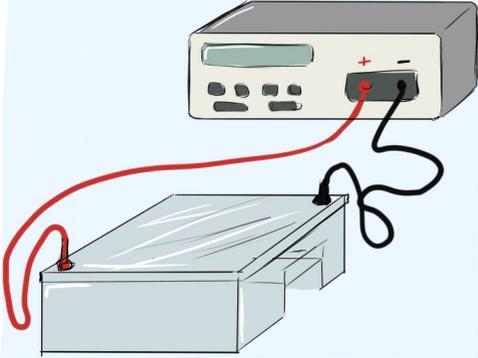
\*Note : il est possible de faire un gel en polyacrylamide (au lieu de l'agarose), plus adapté pour séparer des petits fragments d'ADN. Le mode de préparation du gel est alors différent.

On peut alors déposer l'ADN dans les puits.

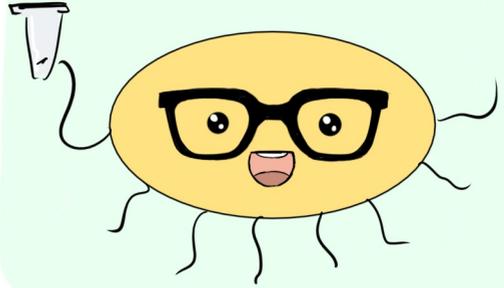


On rajoute dans un autre puits un marqueur de taille, contenant des fragments d'ADN de taille connue afin de créer un repère.

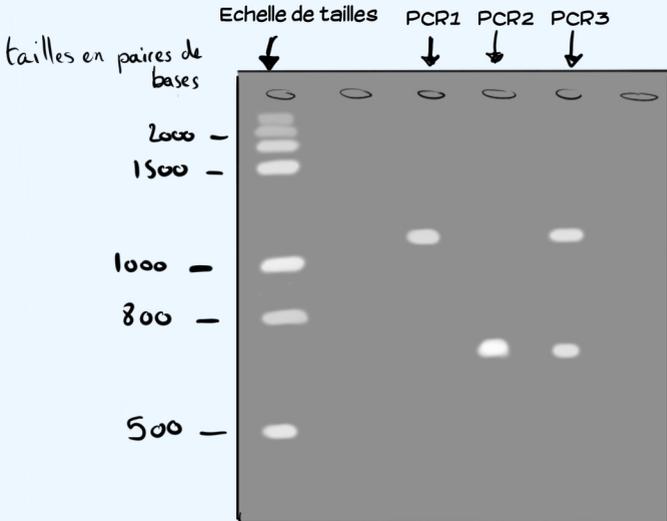
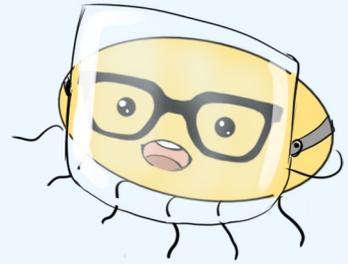
On branche ensuite la cuve à un générateur électrique pour faire passer du courant et faire migrer l'ADN.



Pour voir le résultat, il faut révéler l'ADN (car il n'est pas visible directement). Pour ça, on ajoute un autre colorant qui va se fixer à l'ADN et le rendre visible sous lumière UV. On peut le rajouter directement dans le gel pendant qu'on le coule ou après la migration.



L'ADN apparaît alors sous forme de bandes, plus ou moins loin dans le gel en fonction de sa taille, l'échelle permettant de l'estimer plus précisément.



← Ce fragment mesure entre 1000 et 1500 paires de bases.

← Ce fragment mesure entre 500 et 800 paires de bases.

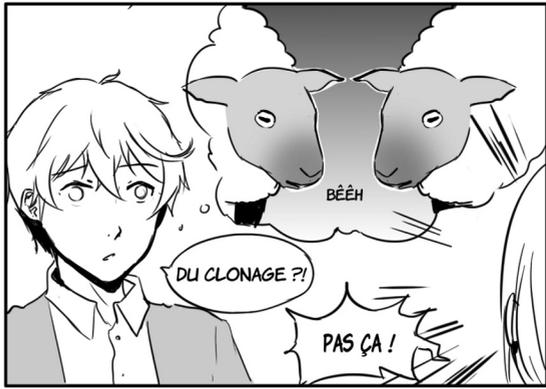
Ces échantillons contiennent 1 fragment d'ADN



Cet échantillon contient 2 fragments d'ADN de tailles différentes





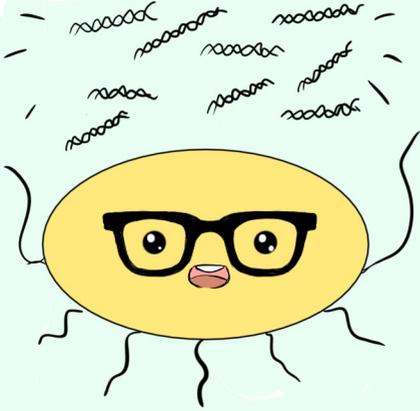


# Clonage moléculaire

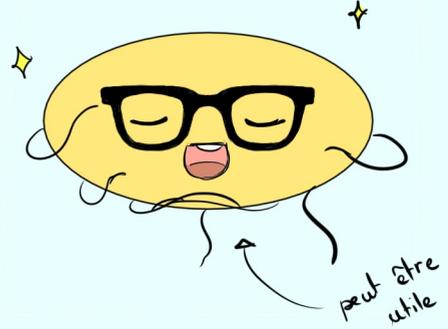
(via une bactérie...)



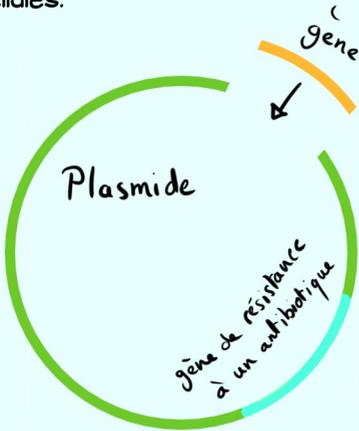
Cloner un gène consiste à le multiplier en un grand nombre d'exemplaires. Ainsi la PCR peut être une technique de clonage.



Une autre technique consiste à multiplier l'ADN via un organisme, comme une levure ou le plus souvent, une bactérie (comme moi!).

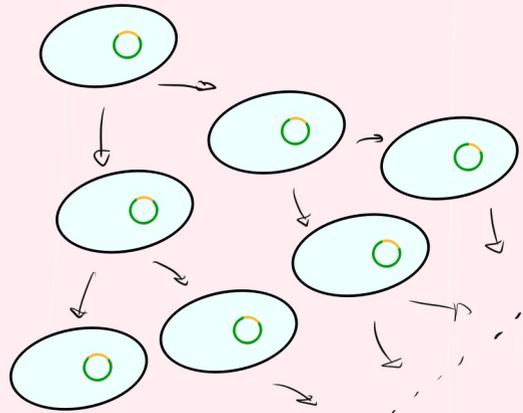


Pour ça, on va placer le gène que l'on veut cloner dans un plasmide, un fragment d'ADN circulaire qui peut être répliqué par les cellules.

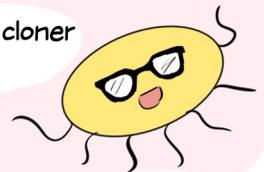


Ce plasmide porte aussi un facteur de sélection (souvent un gène de résistance à un antibiotique), et peut avoir d'autres propriétés, comme permettre l'expression du gène inséré...

Une fois le plasmide dans la cellule hôte, c'est elle qui va se charger de le répliquer, avec le gène qu'on y a rajouté.



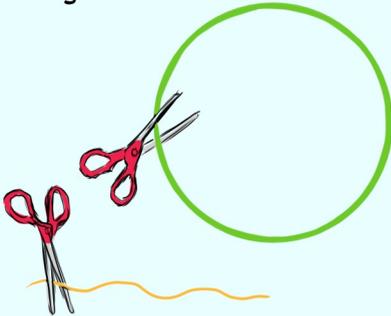
Voilà comment on peut cloner avec des bactéries.



# Comment ça marche ?

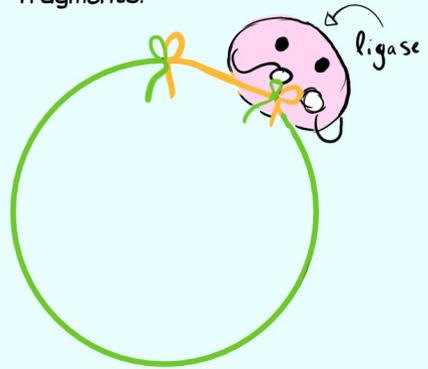


Il faut d'abord insérer le gène dans le plasmide par une petite opération de découpage et collage.



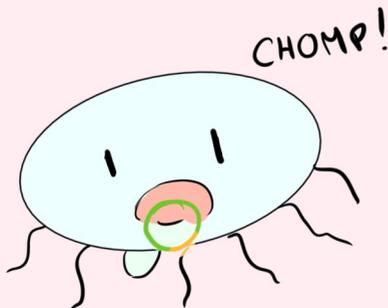
On utilise des enzymes de restriction pour découper l'ADN et le plasmide, et créer des extrémités qui pourront se lier entre elles.

Puis pour insérer le gène dans le plasmide, on utilise une autre enzyme, appelée ligase, qui va assembler les extrémités des fragments.

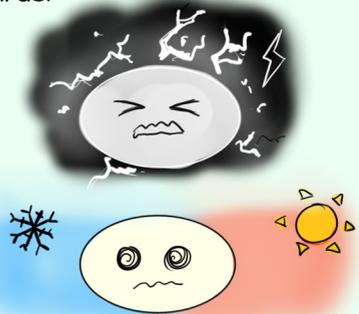


On peut pour cela utiliser au choix un choc électrique ou thermique, ou même un virus.

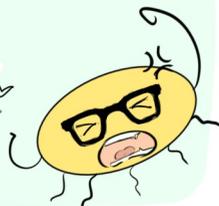
Ensuite il faut placer le plasmide dans la cellule hôte (ici une bactérie). C'est l'étape de transformation.



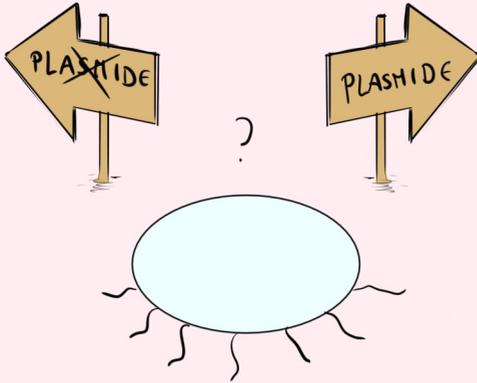
Il s'agit de faire passer le plasmide au travers de l'enveloppe bactérienne en y créant des pores par lesquelles il pourra rentrer.



Appelez la ligue de protection des bactéries !!!



Durant cette étape, toutes les cellules n'arrivent pas à prendre le plasmide. On sélectionne alors les cellules qui ont pris le plasmide en éliminant les autres. C'est là que le facteur de sélection entre en jeu.

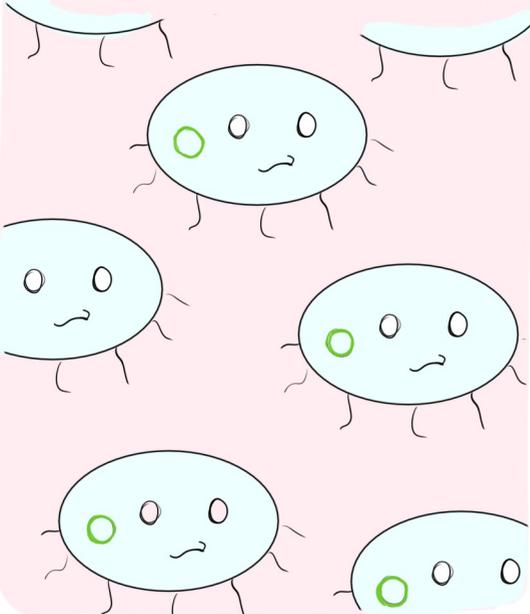


Si ce facteur est un gène de résistance à un antibiotique, il suffit de rajouter cet antibiotique à la culture pour éliminer toutes les cellules qui n'ont pas le plasmide.

Parmi les cellules résistantes, on en choisit une.

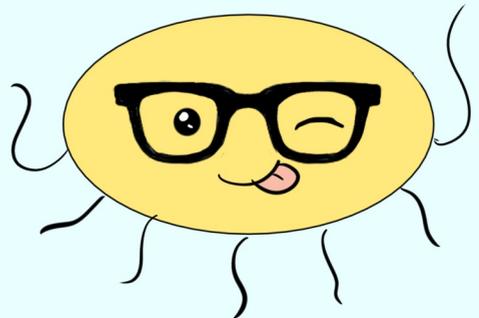


Celle-ci va se reproduire naturellement par division et former des clones, un ensemble de cellules génétiquement identiques, contenant toutes le plasmide!



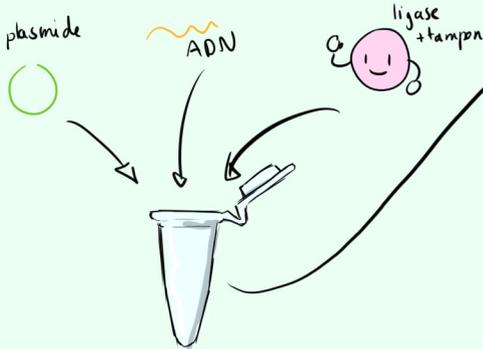
Dès qu'on a besoin du gène ou du plasmide, il suffit de remettre en culture notre clone pour qu'il se multiplie et copie le gène tout seul!

Pratique n'est-ce pas ?!



# Comment on fait ?

D'abord il faut insérer le gène dans le plasmide. Il suffit de mettre le gène et le plasmide (préalablement coupés) dans un tube avec la ligase et son tampon.



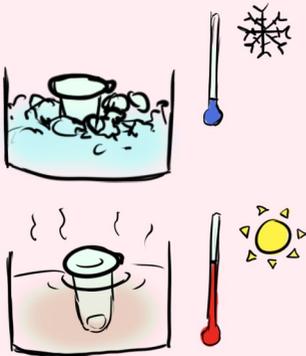
La réaction se fait en une dizaine de minutes (variable selon l'enzyme utilisée).

Une fois le plasmide et le gène liés, on les rajoute à une solution de bactéries.



Ces bactéries sont préparées au préalable, spécialement pour l'étape de transformation. On dit qu'elles sont "compétentes".

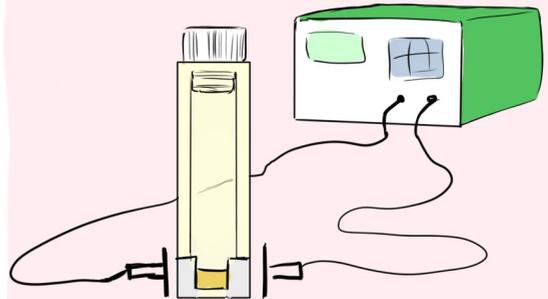
Pour la transformation, si on choisit la méthode du choc thermique, on commence par placer les cellules quelques minutes sur la glace.



Pour ensuite les plonger dans un bain à 42°C.

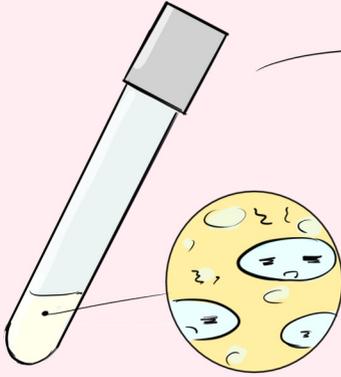
Vous le sentez là le choc thermique ?

Si vous préférez l'électroporation, il suffit de placer le mélange bactéries/plasmide dans une cuve prévue à cet effet.

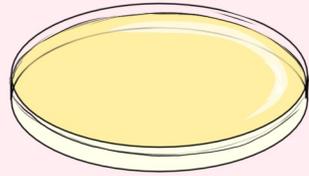


Et à l'aide d'un générateur, on y fait passer un fort courant l'espace de quelques millisecondes.

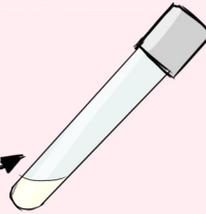
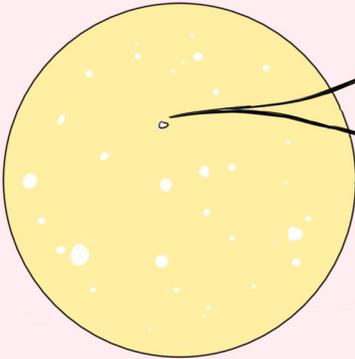
On laisse ensuite le temps aux cellules de se remettre de ce choc et d'exprimer le gène de résistance à l'antibiotique.



Puis on étale la culture sur un milieu contenant de l'antibiotique.



Au bout d'un jour, les cellules pouvant résister à l'antibiotique forment des colonies (les points blancs).

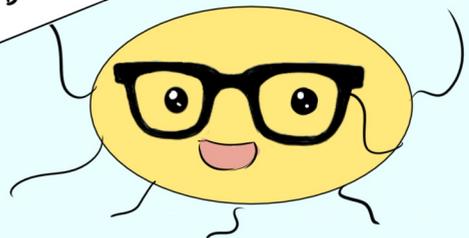


On prélève une colonie (un clone) que l'on peut directement remettre en culture et en extraire le plasmide en grande quantité.



Sinon, on peut aussi le conserver pour plus tard à  $-80^{\circ}\text{C}$  dans du glycérol.

Le clonage peut être réalisé grâce à un kit. Les étapes restent les mêmes, simplement, les cellules et le plasmides sont déjà préparés et prêts à l'emploi.





© Pelliscope Editions, Le Creusot  
Achévé d'imprimer en janvier 2018 en France  
par SAS Kalicommunication, Marquette Lez Lille, France  
I.S.B.N : 978-2-9562867-1-4

Dépôt légal : Janvier 2018





ISBN 978-2-9562867-1-4

