

Outils de génie génétique

1. TERMINOLOGIE ENZYMES UTILISÉS SONDES MOLECULAIRE ET HYBRIDATION MOLECULAIRE

Terminologie

ADN recombinant :

combinaison de deux molécules d'ADN appartenant à deux espèces différentes; ADN hybride obtenu *in vitro*

Vecteur :

ADN dans lequel on insère l'ADN à étudier et qui sert en fait de support.

L'ADN inséré dans le vecteur :

- **insert**
- **ADN exogène**
- **ADN étranger**

ADNc : est une copie d'ADN double brin à partir d'un ARNm.

Banques d'ADNc :

est une collection d'ADNc recombinants ayant une information génétique

Banques génomiques : obtenues par fragmentation d'ADN génomique.

Expression d'ADN recombinant ?

L'expression de la séquence d'ADN insert nécessite la présence de signaux de transcription en amont de cette séquence placés donc en général dans le vecteur.

Polylinker

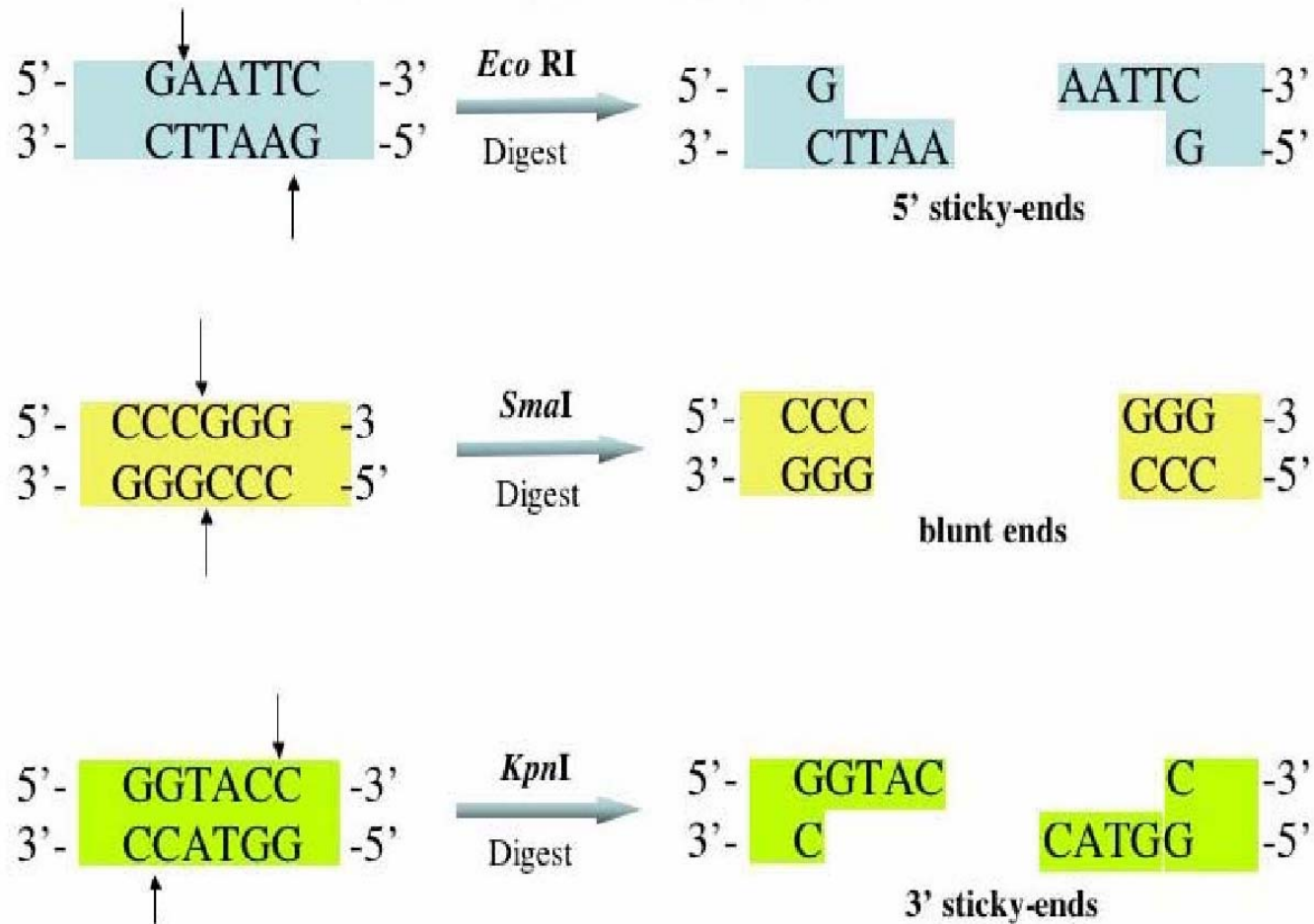
petit fragment nucléotidique double brin synthétisé chimiquement, introduit dans un vecteur afin d'offrir tout un choix de sites de restriction uniques.

Extrémités franches :

la coupure d'une molécule d'ADN peut se faire
au milieu du palindrome.

Extrémités adhésives/bouts collants : d'autres types d'enzymes agissent
en coupant de part et d'autre du centre de symétrie.

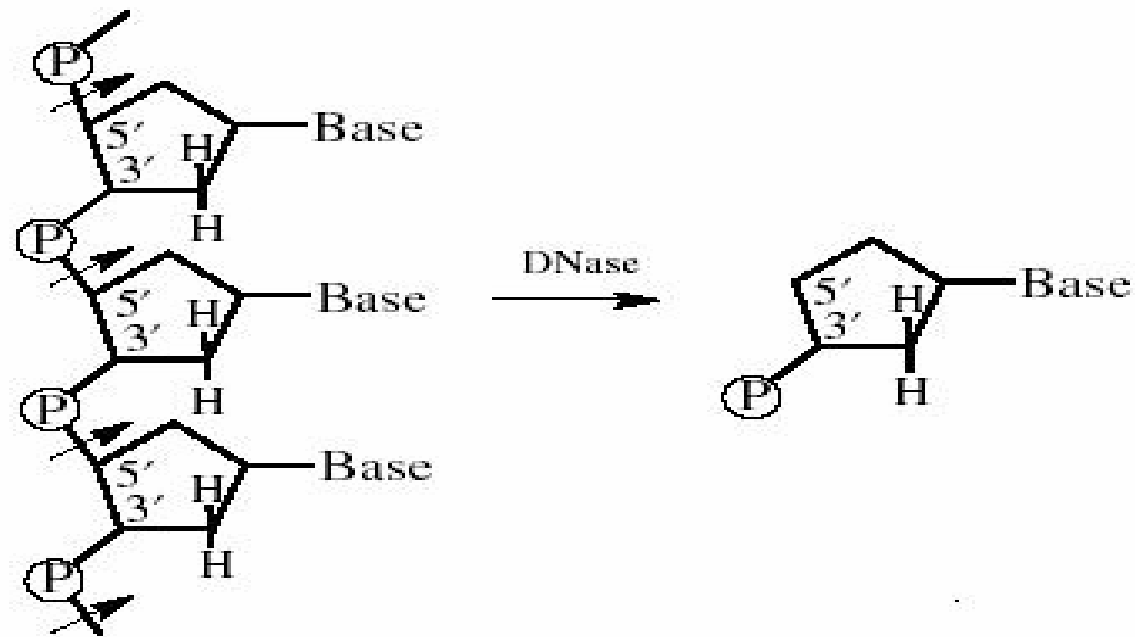
Restriction Endonucleases



La DNase :

C'est une endonucléase qui possède la propriété de couper une molécule d'ADN double brin au hasard, engendrant ainsi des fragments d'ADN double brin.

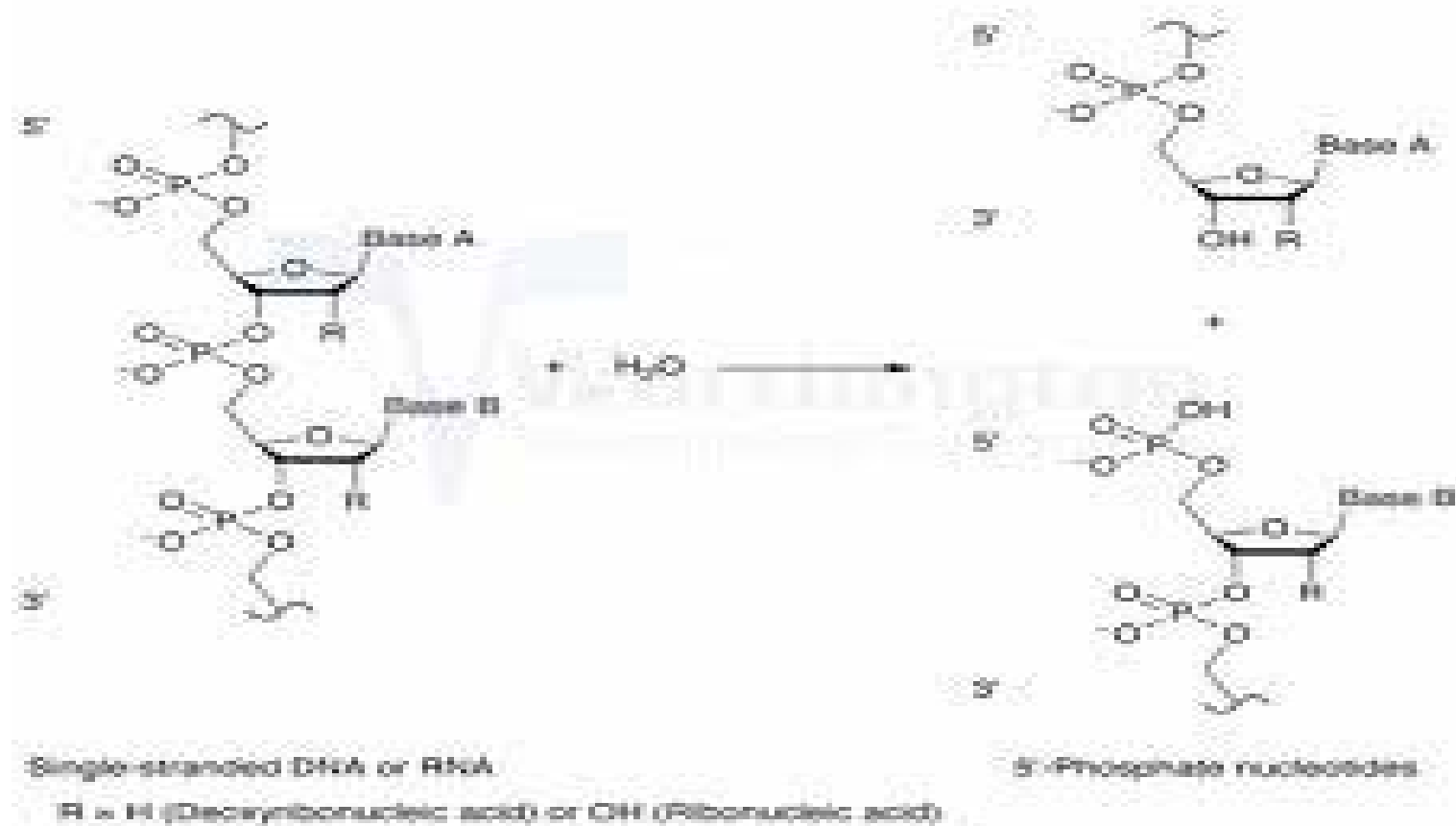
DNase



La nucléase S1 :

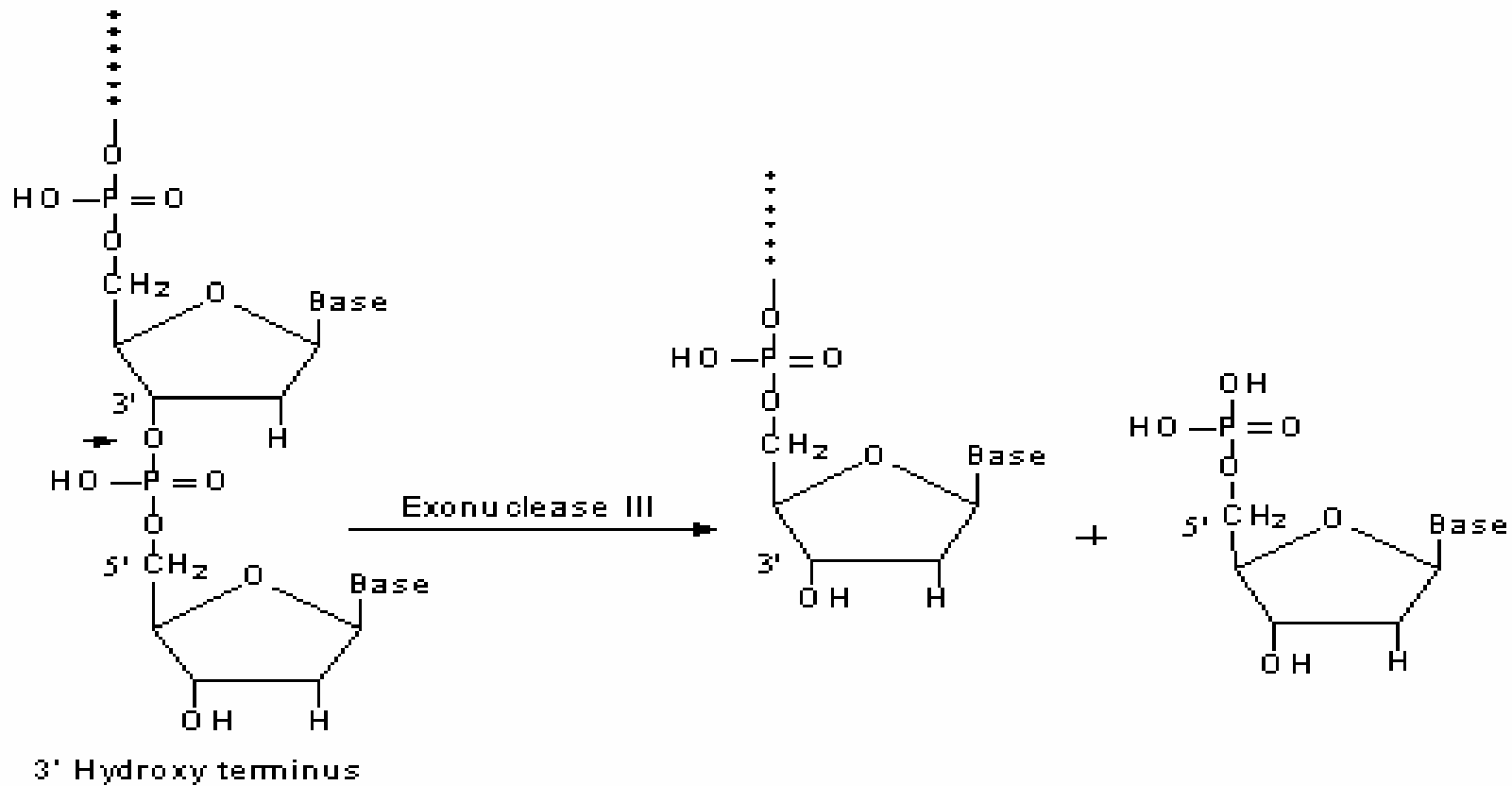
La nucléase S1 n'attaque que l'ADN simple brin.

Nuclease S1



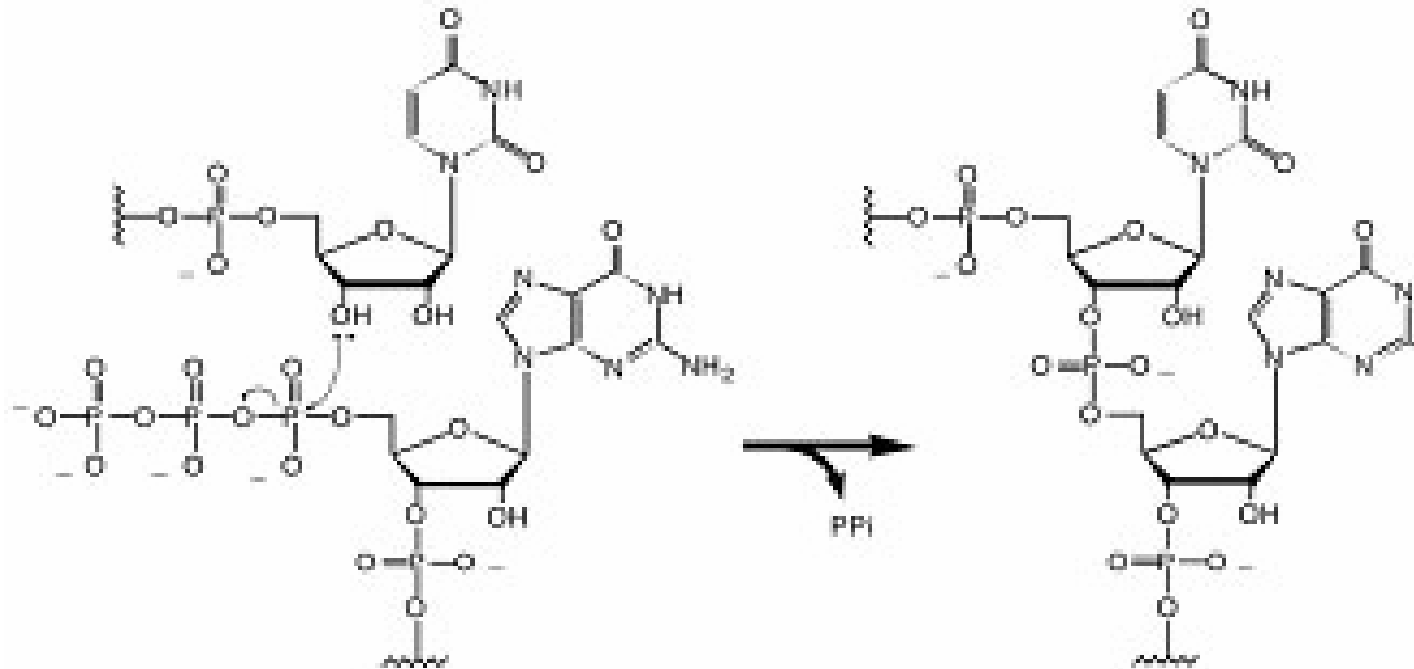
Les exonucléases :

Les exonucléases grignotent les extrémités libres des molécules d'ADN en libérant des nucléotides



Les enzymes qui ligaturent les ligases :

Lorsqu'il existe une coupure (nick) d'un des deux brins d'une molécule d'ADN double brin, la ligase est capable d'effectuer une ligation entre les deux nucléotides adjacents séparés par une brèche.



Les enzymes qui déphosphorylent : les phosphatases

Les phosphatases catalysent l'élimination d'un groupement phosphate en 5' d'une chaîne d'ADN.

Les enzymes qui phosphorylent : les kinases

Les kinases permettent le transfert d'un groupement phosphate à partir d'une molécule d'ATP. Il sera transféré à l'extrémité 5' d'un ADN déphosphorylé.

Les enzymes qui « recopient » un acide nucléique

Recopier une chaîne d'acides nucléiques, qu'il s'agisse de synthétiser une chaîne d'ADN ou d'ARN, s'effectue de manière complémentaire et antiparallèle (l'addition des nouveaux nucléotides se faisant dans le sens 5'phosphate vers 3' OH).

Cas ADN-ADN

ADN polymérase I

une seule chaîne peptidique et possède trois activités enzymatiques :
activité de synthèse ADN polymérase 5'-3';
activité de dégradation exonucléase 3'-5' expliquant ses propriétés
d'enzyme
« à fonction d'édition » ;
activité de dégradation exonucléase 5'-3'.

Cas ADN-ADN

L'enzyme de Klenow est un enzyme obtenu à partir de l'ADN polymérase I d'où l'on a éliminé le petit fragment responsable de l'activité exonucléase 5'-3'.

Il ne reste donc plus que les activités polymérase 5'-3' et exonucléase 3'-5'.

Les ADN polymérases thermorésistantes

La Taq polymérase a été la première à être identifiée. C'est une ADN polymérase isolée des bactéries vivant dans les sources d'eau chaude. Elle agit à une température voisine de 65°C.

CAS ADN-ARN

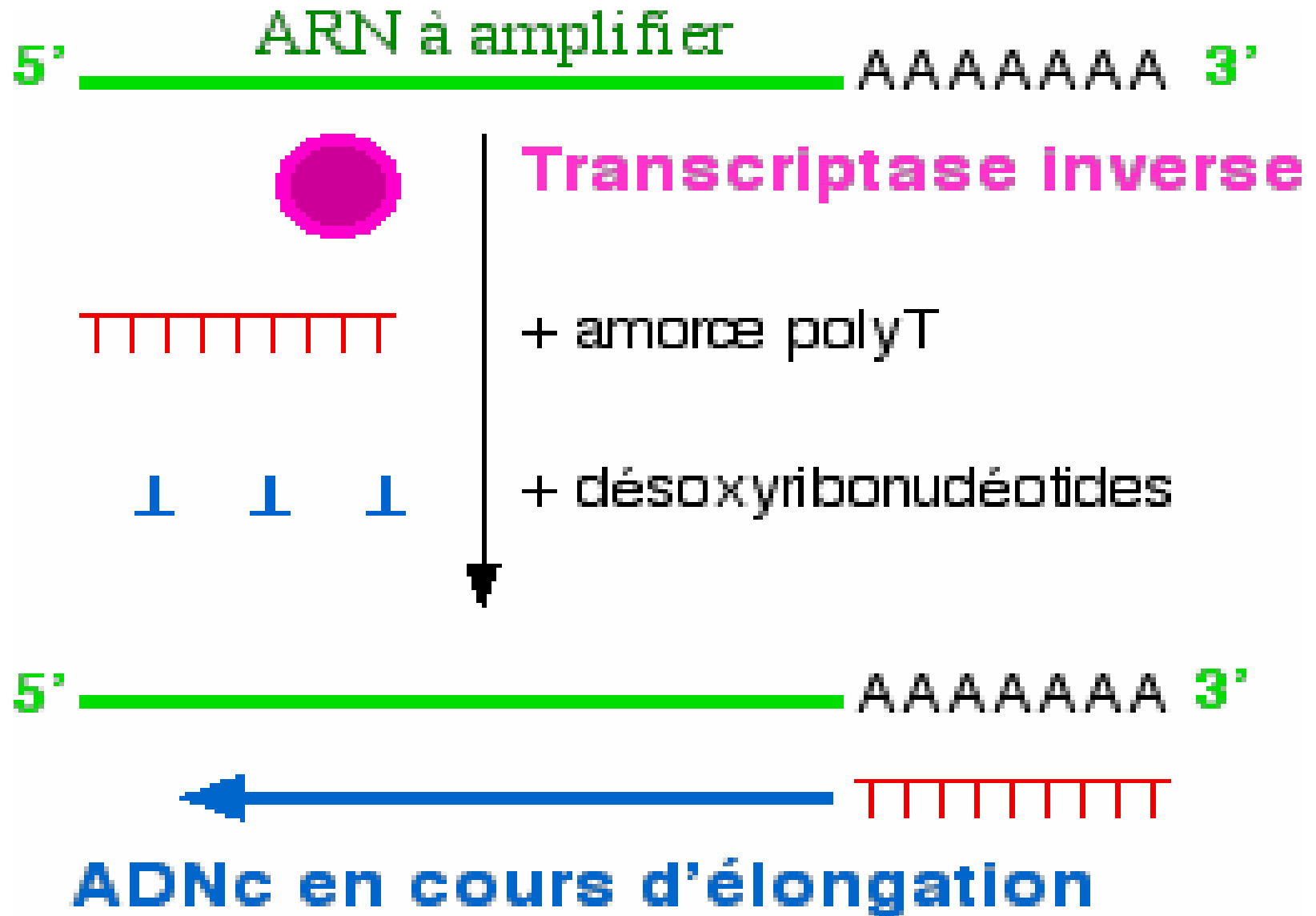
L'ARN polymérase : est utilisé pour effectuer des transcriptions *in vitro*. capable de commencer une chaîne.

CAS ARN-ADN

La rétrotranscriptase « RT » (ou transcriptase reverse)

La RT est un enzyme permet de fabriquer un ADNc à partir d'un ARNm.
La RT est une ADN polymérase 5'-3' ayant les caractéristiques suivantes :

ARN dépendante dépourvue d'activité exonucléase 3'-5' et est donc dénuée de fonction d'édition.



Les sondes nucléiques :

Les sondes nucléiques sont des segments d'acides nucléiques que l'on utilise pour repérer de manière spécifique, dans une réaction dite « d'hybridation moléculaire », le fragment d'acide nucléique auquel on s'intéresse.

C'est un segment d'acide nucléique (ADN ou ARN) n'ayant obligatoirement qu'un brin.

Elle est complémentaire et antiparallèle du segment d'acide nucléique à reconnaître

La sonde peut couvrir tout ou une partie du segment d'acide nucléique à reconnaître ;

Une sonde doit être repérable : des sondes radioactives sont le plus souvent utilisées ; il est ainsi facile de repérer l'emplacement de cette sonde et par conséquent le clone à identifier qui se sera hybridé avec cette sonde.

Obtention d'une sonde

Toute la difficulté consiste bien évidemment à obtenir une sonde spécifique de l'ADN à étudier.

Oligonucléotides de synthèse

Si la séquence de l'ADN n'est pas connue,
il faut purifier une petite quantité de la protéine correspondant au gène étudié, déterminer la séquence des acides aminés d'un court segment de cette protéine, on déduit d'après le code génétique la séquence de segment d'ADN correspondant et synthétiser alors de court sondes d'ADN.

Si la séquence d'une partie d'ADN à repérer est connue,
il devient alors beaucoup plus facile de synthétiser une sonde d'une vingtaine de nucléotides.



Outils de génie génétique

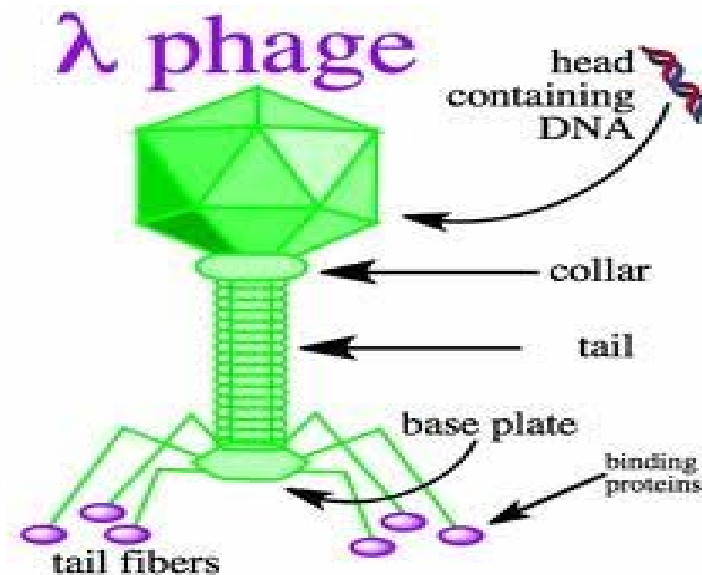
2. LES VECTEURS UTILISÉS

Les bactériophages

Le phage λ

Plusieurs vecteurs sont dérivés du phage λ et peuvent être utilisés pour la constitution de banques d'ADNc ou génomiques.

Le phage λ est un phage à ADN double brin, linéaire, d'une longueur de 48,5 Kb.

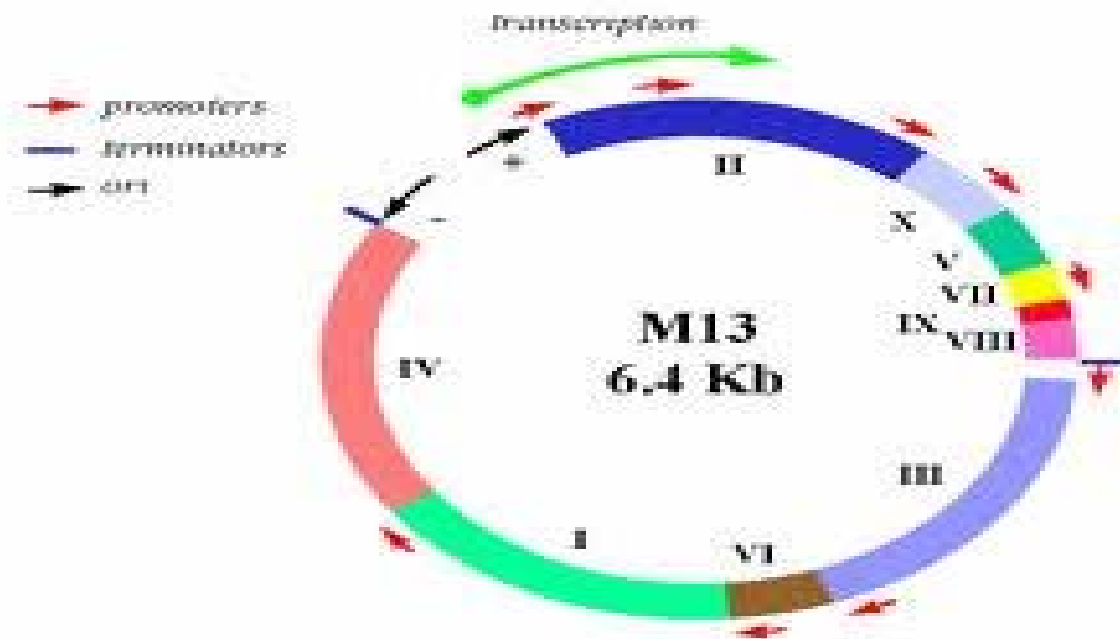


Le phage M13

M13 est un bactériophage spécifique d'*E.coli*, dont le génome, après avoir été modifié, a été très utilisé pour sous-cloner de petits fragments d'ADN.

M13 est constitué d'un **simple brin d'ADN circulaire**.

Pas de longueur limitée et les particules phagiques sont produites sans lysede la bactérie.



Les plasmides

Les plasmides représentent un autre type de vecteurs que les phages et sont également utilisés. Ils se répliquent grâce à des enzymes dans la bactérie.

pBR322

pBR322 est un plasmide qui possède deux gènes de résistance, l'un à l'ampicilline, l'autre à la tétracycline.

pUC

pUC est un plasmide de 2,69 Kb dont les caractéristiques sont comparables à celles de M13.

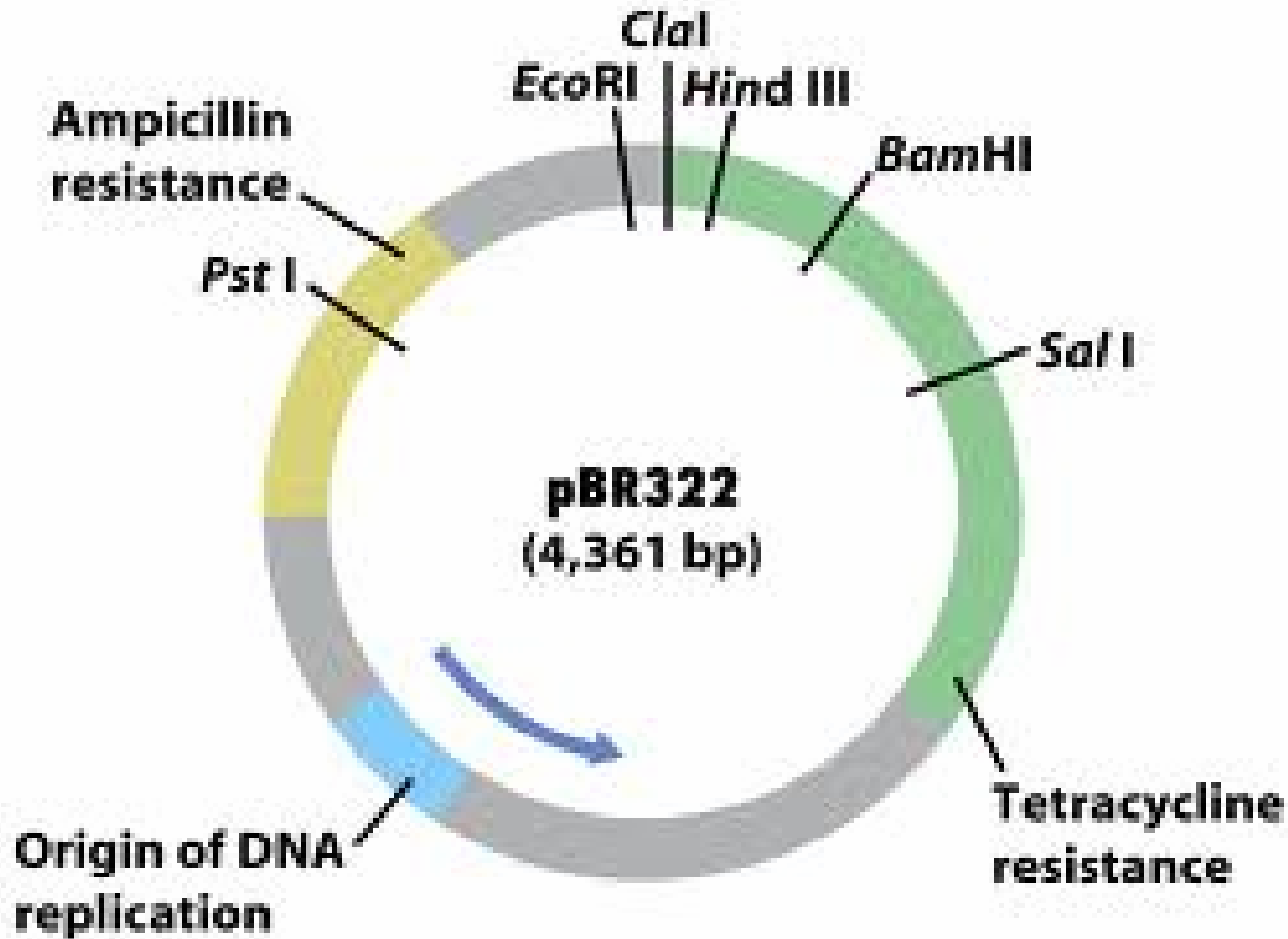


Figure 16 (M. Brock Biology of Microorganisms 11/e)
© 2004 Pearson Prentice Hall, Inc.

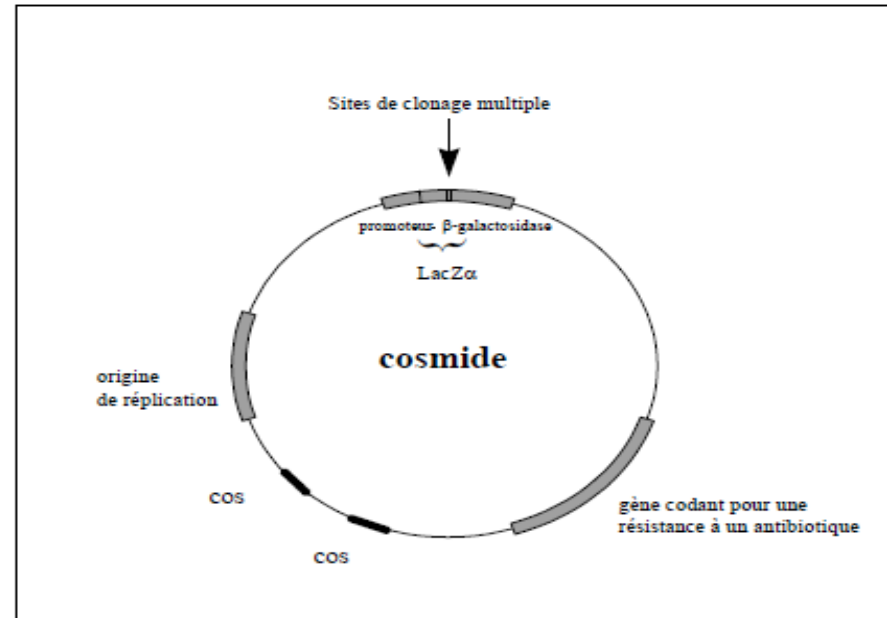
Les cosmides

Les cosmides sont des vecteurs artificiels hybrides : plasmide-phage λ .

L'avantage: cloner de plus grands fragments d'ADN étranger .

Ainsi un cosmide dont la taille est approximativement de 5 Kb peut recevoir un ADN étranger de 33 à 47 Kb. Donc, un cosmide :

- entre dans *E.coli* comme un phage λ ;
- s'y multiplie comme un plasmide.



Outils de génie génétique

3. QUELQUES MÉTHODES DE GG APPLIQUÉES EN MÉDECINE

Quelques techniques générales de biologie moléculaire

PCR

L'amplification en chaîne par polymérase ou réaction en chaîne par polymérase (PCR est l'abréviation anglaise de *polymerase chain reaction*)

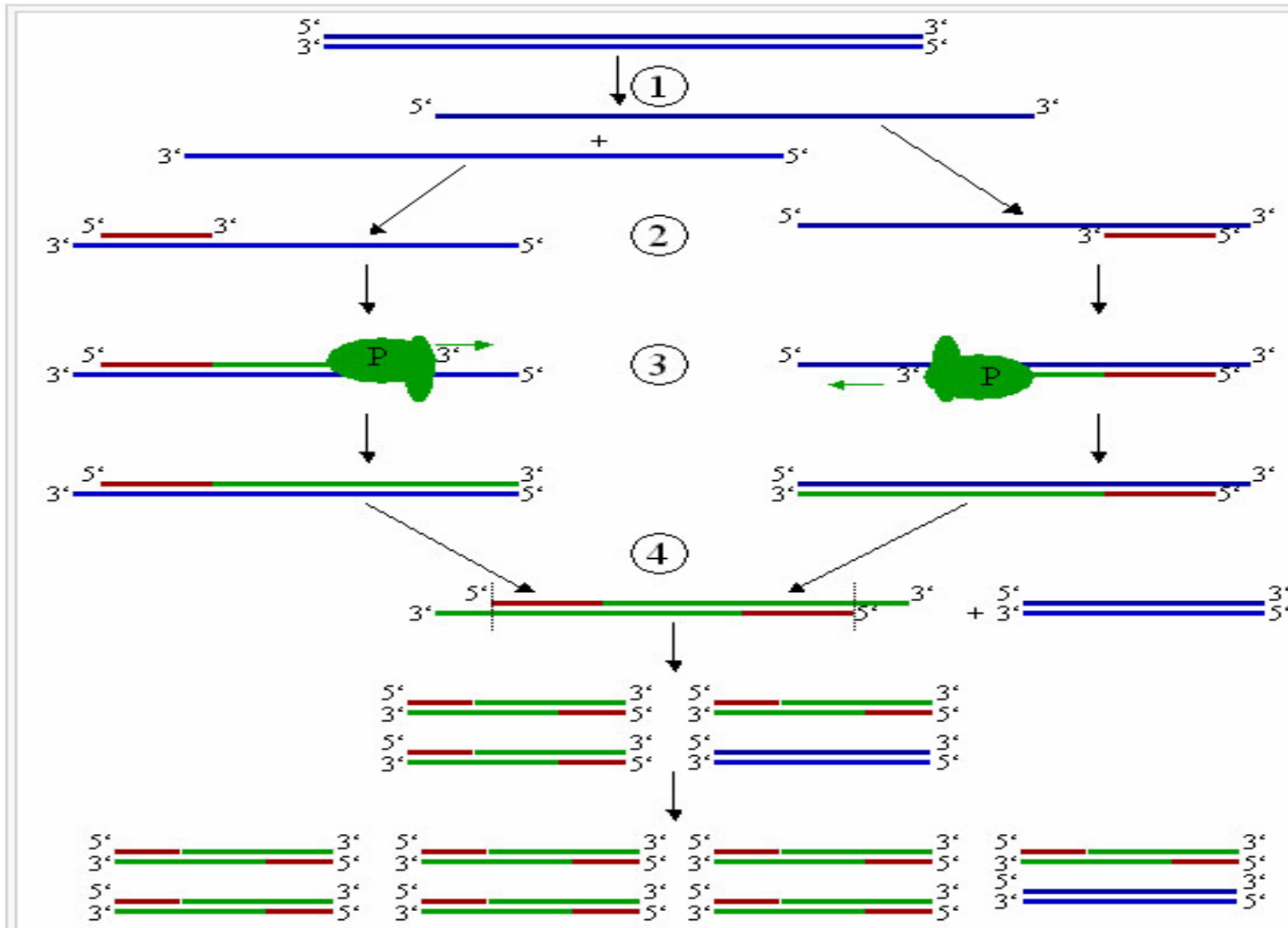
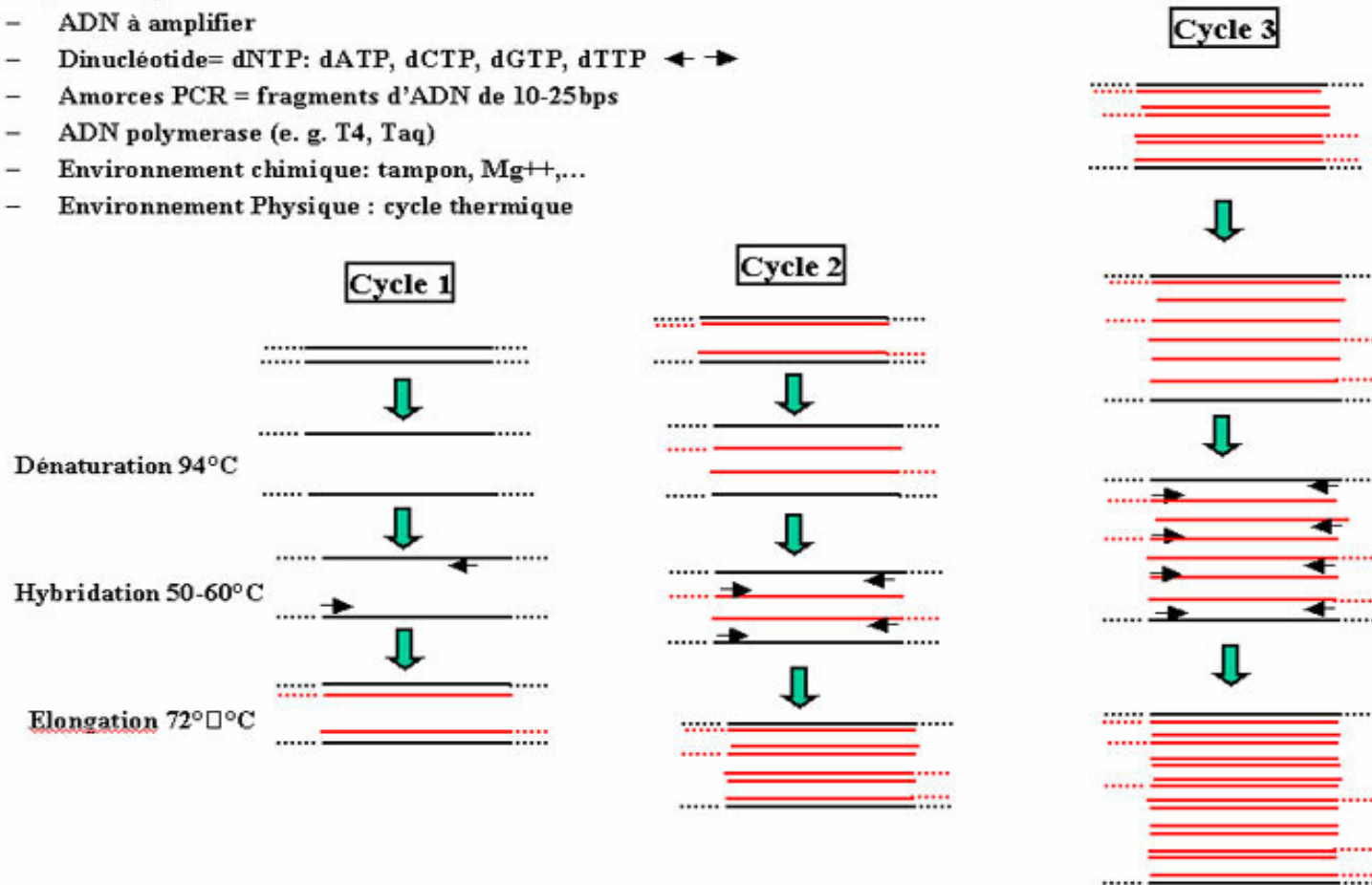


Figure 2: Schematic drawing of the PCR cycle. (1) Denaturing at 94-96°C. (2) Annealing at (eg) 68°C. (3) Elongation at 72°C (P=Polymerase). (4) The first cycle is complete. The two resulting DNA strands make up the template DNA for the next cycle, thus doubling the amount of DNA duplicated for each new cycle.

Principe de la PCR : amplification exponentielle d'un fragment d'ADN

Composants pour la réaction

- ADN à amplifier
- Dinucléotide= dNTP: dATP, dCTP, dGTP, dTTP ↔
- Amorces PCR = fragments d'ADN de 10-25bps
- ADN polymérase (e. g. T4, Taq)
- Environnement chimique: tampon, Mg⁺⁺,...
- Environnement Physique : cycle thermique



RFLP

Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (ou RFLP, de l'anglais *restriction fragment length polymorphism*) est utilisé dans deux sens :

Comme une caractéristique des molécules d'ADN permettant de les distinguer les unes des autres,
Comme la technique de laboratoire qui utilise cette caractéristique pour différencier ou comparer des molécules d'ADN. Cette technique est utilisée pour la réalisation d'empreintes génétiques et dans les tests de paternité.

L'ADN d'un individu ou d'une cellule est d'abord extrait et purifié.

L'ADN purifié peut être amplifié par PCR. L'ADN est ensuite coupé en fragments de restriction par une enzyme de restriction, cette dernière coupant l'ADN.

Au niveau d'une séquence qui lui est spécifique. Les fragments d'ADN ainsi obtenus, nommés fragments de restriction, sont ensuite séparés selon leur longueur par électrophorèse sur gel d'agarose. Le gel obtenu est ensuite analysé par Southern Blotting et révélé avec une ou plusieurs sondes.