

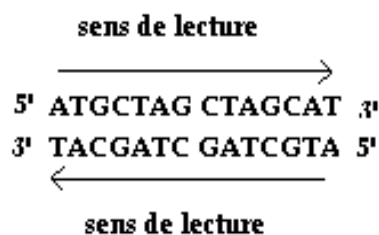
## Outils du génie génétique

**I-les Enzymes :**

**I-1 Enzymes de restriction :** molécules extraites à partir de microorganismes (généralement des bactéries) et qui coupent les liaisons phosphodiester au niveau des acides nucléiques.

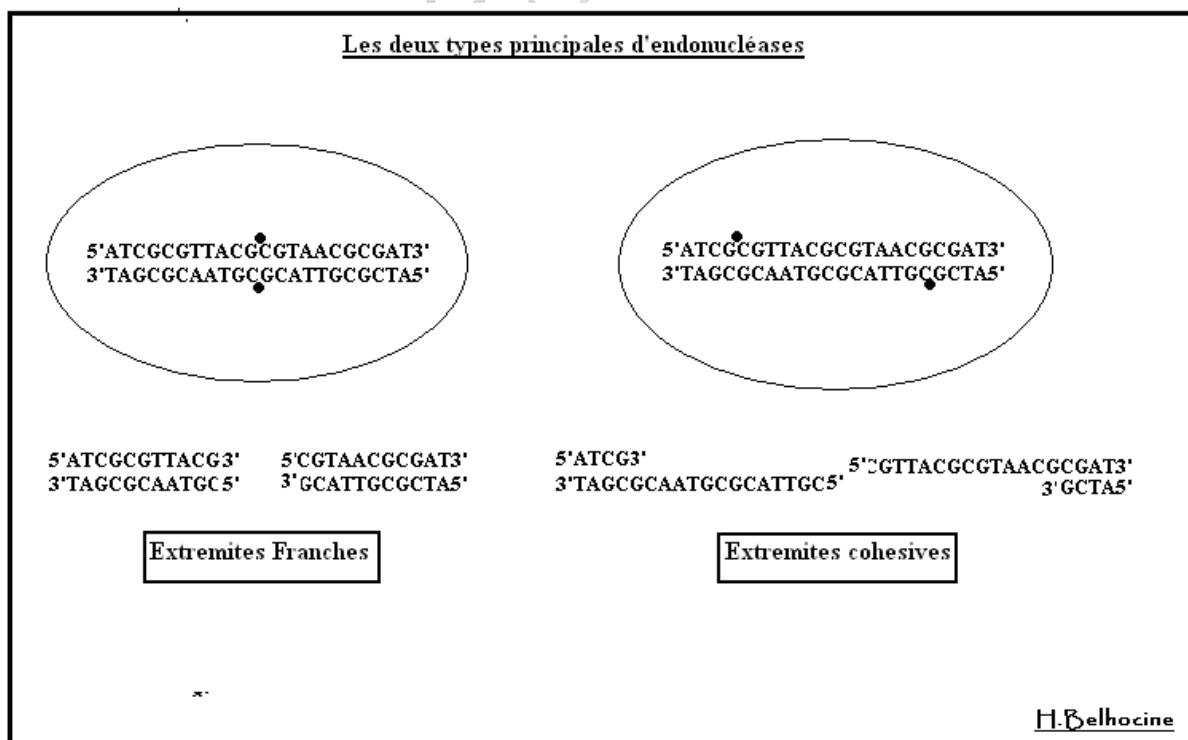
**I.1.1 Les exonucléases :** Elles **digèrent** l'ADN à partir de l'**extrémité** 5' ou 3'.

**I.1.2 Les endonucléases :** Elles **coupent** l'ADN à l'**intérieur** en cassant les liaisons phosphodiester. Les endonucléases coupent au niveau de sites spécifiques appelés « sites de restrictions », ces sites sont de nature palindromique, c'est-à-dire que la lecture des deux brins complémentaires dans des sens opposés donne la même séquence. (Fig.1)



**Figure 1 :** séquence palindromique

Il y a **deux catégories d'endonucléases** : celles qui donnent des **extrémités franches** et celles qui donnent des **extrémités cohésives**. (Fig.2). Le tableau 1 donne quelques exemples d'endonucléases, leurs sites de restriction et les espèces bactériennes d'où ils sont issus.



**Figure 2 :** les deux types d'endonucléases

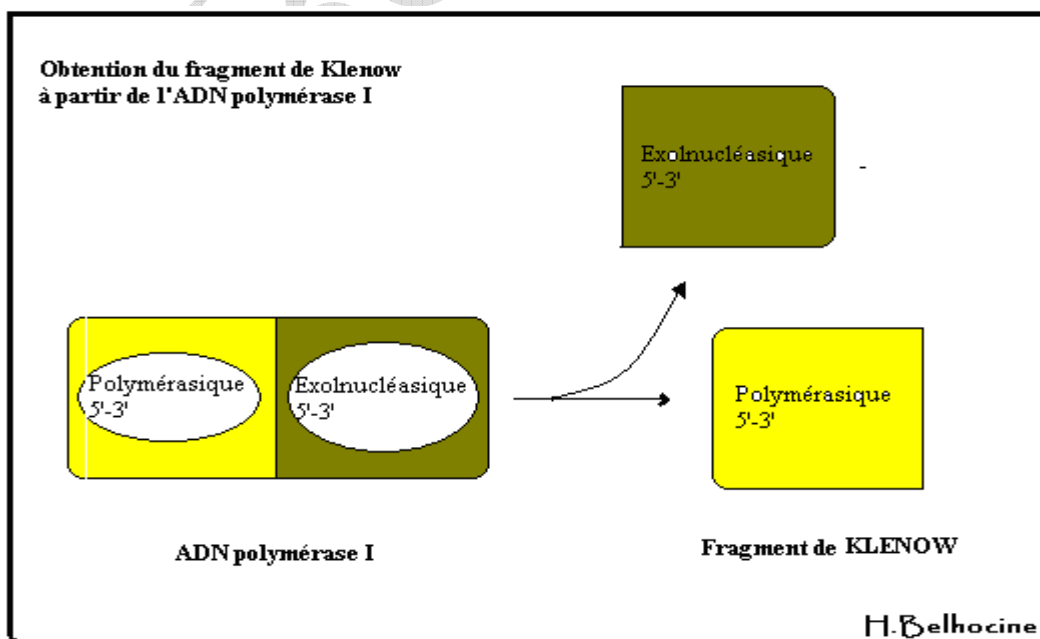
**Tableau 1 :** exemple de quelques exonucléases et leurs origines

Enzyme	microorganisme	SITE DE RESTRICTION
<i>EcoRI</i>	<i>Echerichia coli</i>	$\downarrow$ <b>GAATTC</b> <b>CTTAAG</b> $\uparrow$
<i>EcoRII</i>	<i>Echerichia coli</i>	$\downarrow$ <b>GCCTGGC</b> <b>CGGACCG</b> $\uparrow$
<i>PstI</i>	<i>Providentia stuartii</i>	$\downarrow$ <b>CTGCAG</b> <b>GACGTC</b> $\uparrow$
<i>HindIII</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	$\downarrow$ <b>AAGCTT</b> <b>TTCGAA</b> $\uparrow$

### I-2 ADN polymérase

Elles réalisent des liaisons phosphodiesters entre deux nucléotides adjacents.

I-2-1 **Fragment de Klenow** : extrait à partir de la bactérie *e.coli*, actif à 37°C, Permet de remplir les hiatus, utilisé pour marquer des molécules d'ADN (Nick translation).fig.3)



**Figure 3 :** fragment de Klenow

1.2.2 Taq polymérase : extraite à partir d'une bactérie *Thermus aquaticus*, Active à 70°C, utilisée dans la technique PCR, en vue d'une amplification de l'ADN in vitro.

### 1-3 Les ligases

Elles réalisent des liaisons phosphodiesteres, pour souder deux segments d'ADN. (Fig.4)

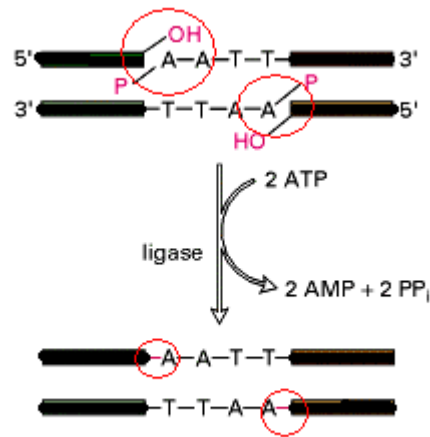


Figure 4 : réalisation de liaisons phosphodiesteres par la ligase

## II- Les vecteurs

Ce sont des molécules d'ADN construites à partir de plasmides ou de virus (cosmides), qui permettent le transfert de gènes entre cellules. Tous les vecteurs possèdent un polylinker refermant plusieurs sites de restriction, où on peut ouvrir le vecteur pour insérer une séquence d'ADN et un gène de résistance aux antibiotiques. Le gène de résistance permet de sélectionner les cellules qui ont reçu le vecteur après transfection.

Il existe deux grandes catégories de vecteurs :

II-1 Vecteur de clonage : renferme une origine de réplication (Ori V), il permet de cloner un segment d'ADN ou un gène qui y est intégré. Schémas simplifiés (Figure 5)

II-2 Vecteur d'expression : Renferme un promoteur, il permet de faire exprimer un gène. Schéma simplifié (Figure 6)

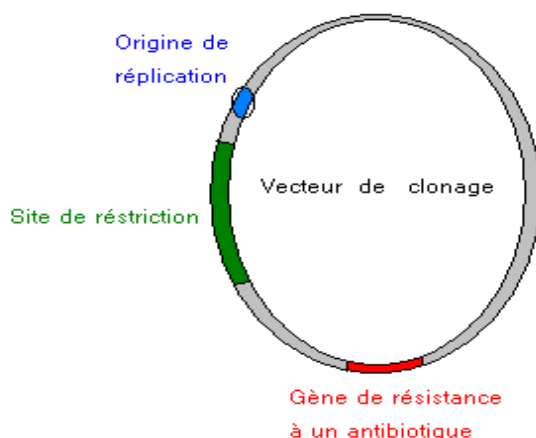


Figure 5 : vecteur de clonage

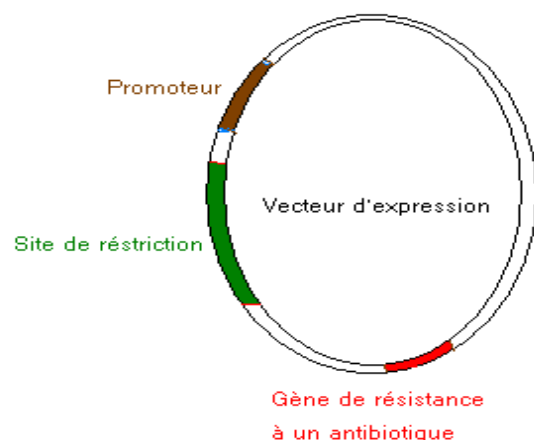


Figure 6 : vecteur d'expression

### III- Les sondes moléculaires

Séquence d'ADN monocaténaire, marquée, complémentaire du gène recherché, son rôle est la **détection de gènes, notamment en diagnostic génétique**. Le principe consiste à détecter la présence d'une mutation ponctuelle en réalisant l'hybridation moléculaire entre la séquence à tester et la sonde de l'allèle muté, L'utilisation d'une sonde spécifique de l'allèle normal et nécessaire pour réaliser un témoin négatif. Pour s'hybrider de façon spécifique à la séquence complémentaire, la sonde doit être courte. Les sondes sont marquées avec un élément radioactif ( $P_{32}$ ) ou chimioluminescent (digoxygénine) pour pouvoir les détecter après hybridation.

### IV- Les techniques

IV-1 Technique d'électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 7) L'ADN génomique est fragmenté par une enzyme de restriction. Le produit de la digestion est ensuite migré sur le gel d'agarose par électrophorèse afin de **séparer les fragments de restriction en fonction de leurs poids moléculaires**.

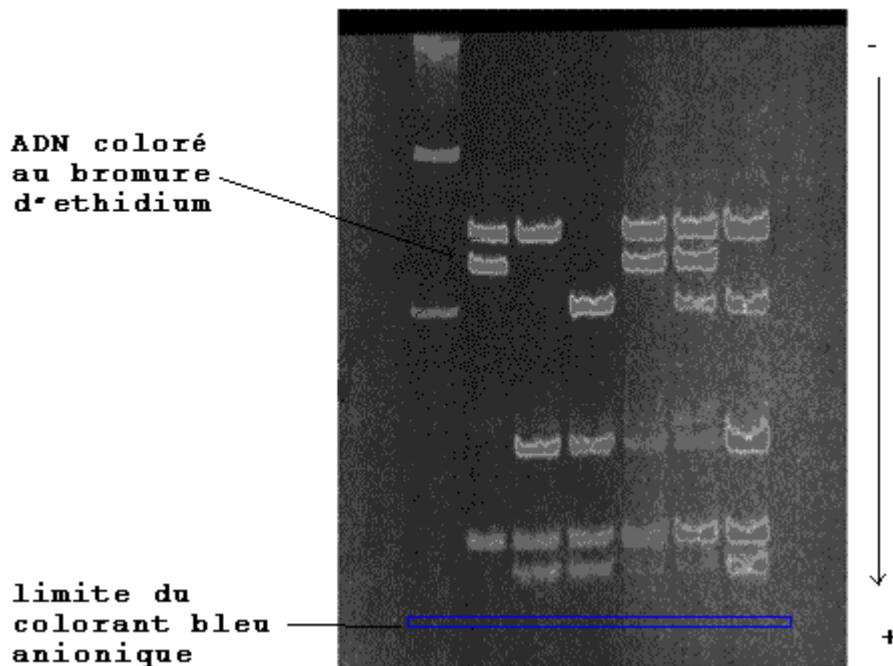


Fig.7 : Technique d'électrophorèse

IV-2 Technique PCR: Permet **d'amplifier de courtes séquences d'ADN (quelques kilobases) in vitro**, à partir d'une très petite quantité d'ADN même issue d'une seule cellule, par une série de cycles se déroulant en trois étapes : dénaturation, hybridation de l'amorce, réplication. Le nombre de molécule obtenu après  $n$  cycles est  $2^n$ . (Figure 8)

-*Dénaturation*: l'ADN à amplifier est dénaturé à la chaleur, les deux brins se séparent et servent de matrice.

-*Hybridation des amorces*: on baisse la température pour permettre à l'amorce de s'hybrider spécifiquement aux extrémités de la séquence cible à amplifier.

-Elongation ou polymérisation à 70°C: à cette température optimale de l'activité de l'enzyme Taq polymérase, l'amorce est allongée par complémentarité au brin matrice, ce qui produit deux nouvelles molécules d'ADN.

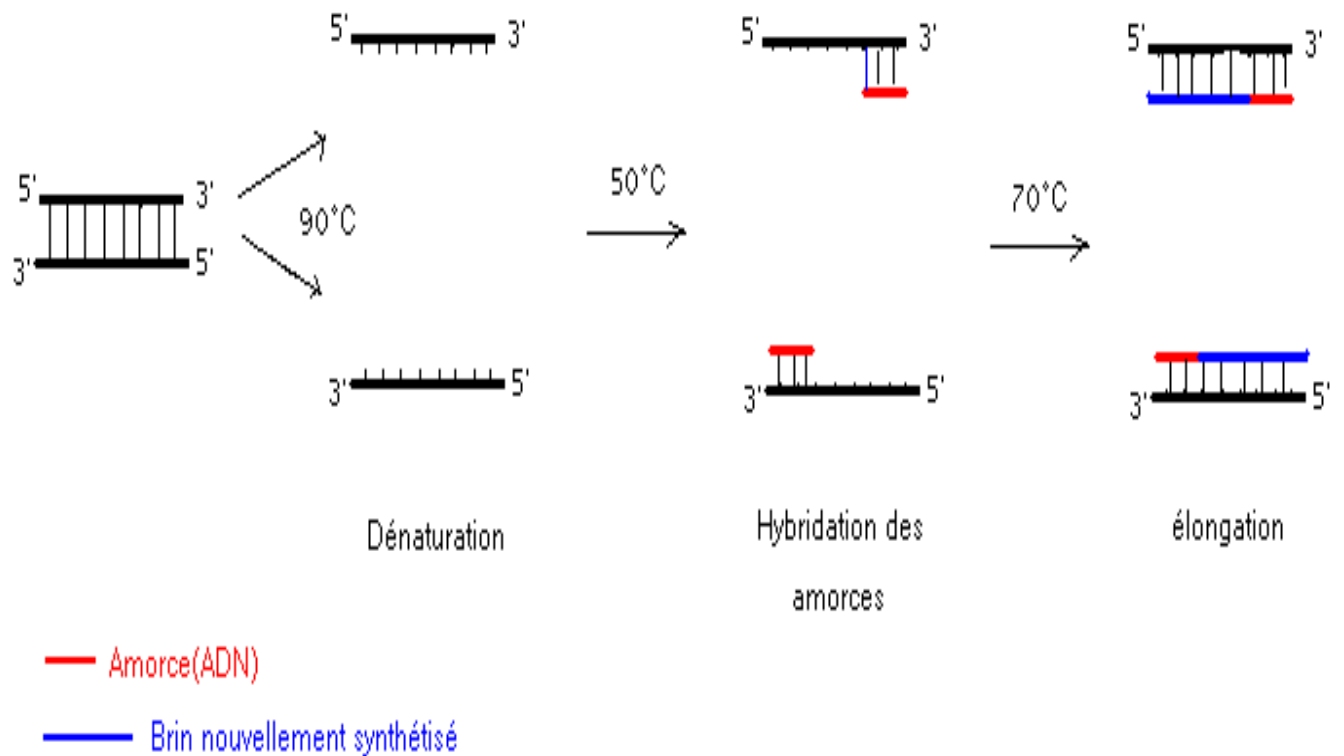


Figure 8 : représentation schématique des 3 étapes d'un cycle PCR

IV-3 Technique de séquençage : permet de **déterminer la séquence d'ADN** en réalisant une série de répliation en présence de didésoxynucléotides qui bloquent la répliation de l'ADN lorsqu'ils sont incorporés dans le nouveau brin. Ainsi on utilisant différents didésoxynucléotides (ddA, ddT, ddG, ddC) on obtient plusieurs fragments se terminant chacun par l'un des didésoxynucléotides. Après séparation des brins néosynthétisés et leur migration sur gel d'électrophorèse, chaque fragment indique la position d'une base au niveau du brin néosynthétisé (brin lu) dont l'ordre est donné par sa position sur le gèle d'électrophorèse (Figure 9).

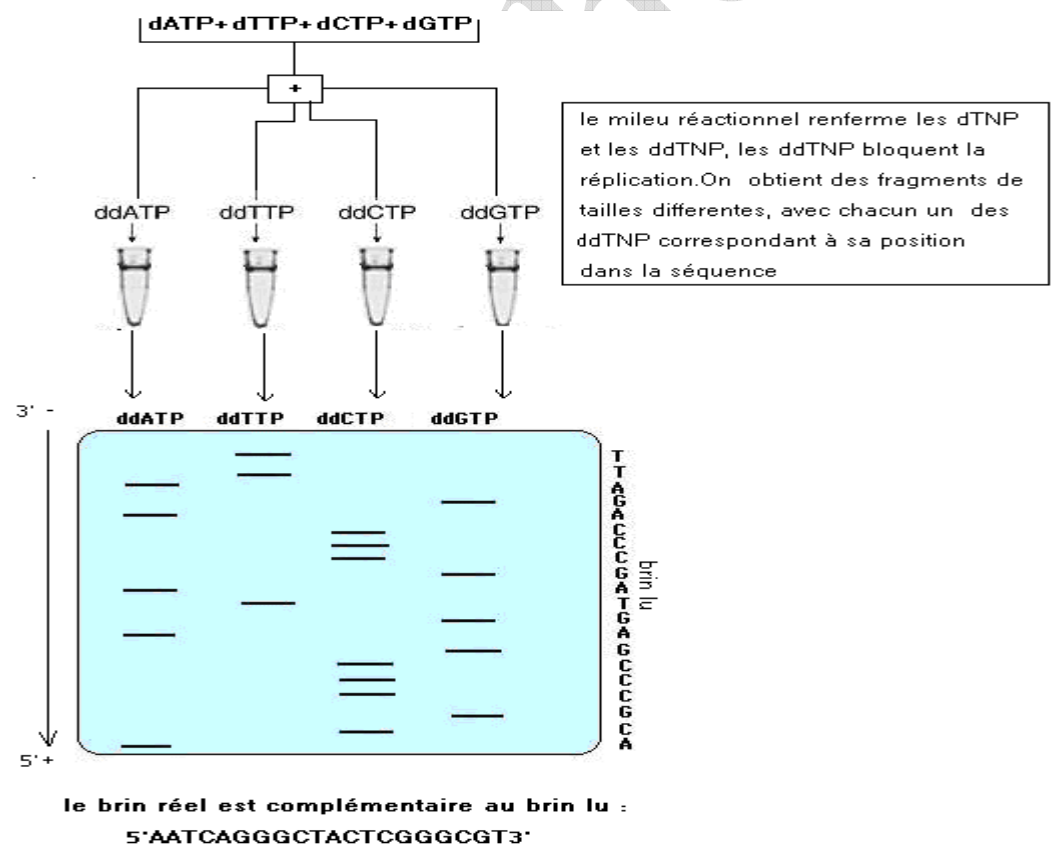
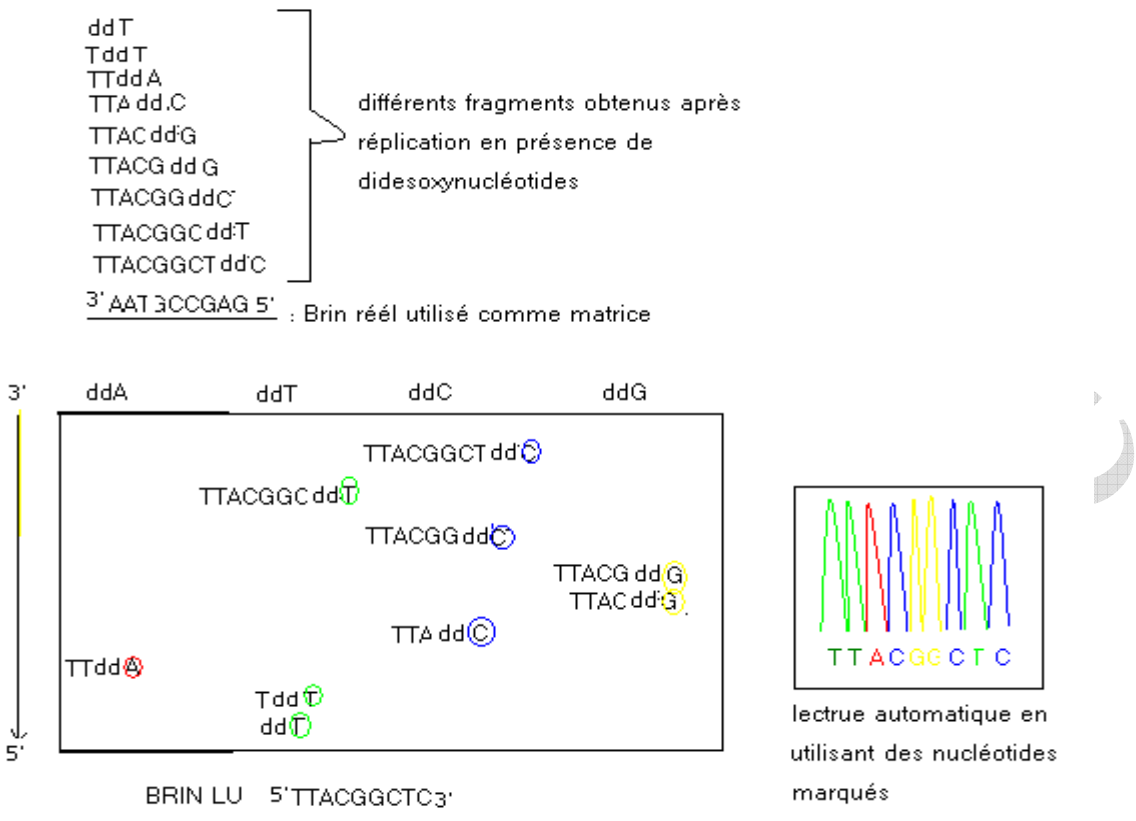
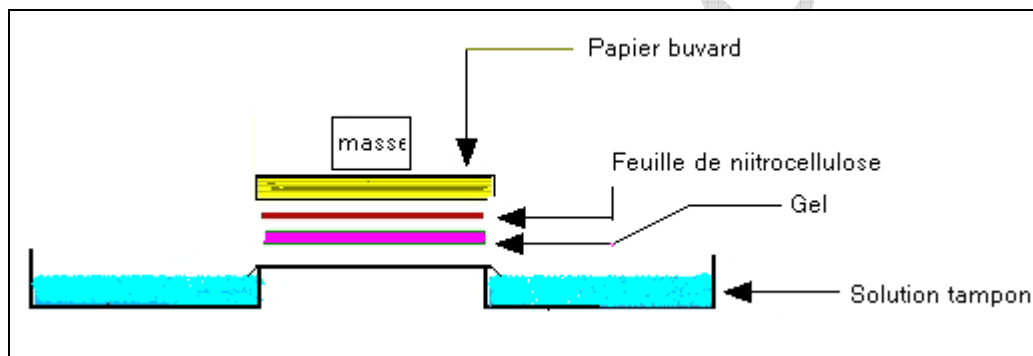


Figure 9 : technique de séquençage classique (Sanger)

#### IV-4 Southern blot :

Le but de la technique est le transfert de l'ADN du gel sur une feuille de nitrocellulose ou de nylon afin de visualiser des séquences précises par hybridation moléculaire avec une sonde marquée.

1. Fragmentation de l'ADN par une endonucléase
2. Séparation des fragments de restrictions en fonction du poids moléculaire (électrophorèse sur gel d'agarose)
3. Transfert des fragments du gel sur une feuille de nitrocellulose(ou membrane de nylon) (fig.10)
4. Dénaturation de l'ADN fixé sur la membrane.
5. Mise en contact de l'ADN et des sondes marquées en milieu liquide et sous agitation.
6. Lavage de la feuille pour éliminer les hybridations non spécifiques.
7. Visualisation des sondes fixées par autoradiographie.



**Figure 10 :** technique de Southern blot

**V- Applications :** Grace aux outils du génie génétique en particulier et à la biologie moléculaire en général, la médecine a connu une avancée importante dans le domaine du diagnostic et de la thérapie des maladies génétiques. Parmi les applications médicales, on site :

- diagnostic génétique (prés symptomatique, prés natal etc.)
- thérapie génique (correction d'un gène au niveau des cellules souches)
- synthèse de molécules thérapeutiques

#### Diagnostic génétique :

L'ADN du patient est extrait à partir du sang périphérique, il est fragmenté par une enzyme de restriction et les fragments ainsi obtenus sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (voir IV-1). L'ADN est ensuite transféré sur une feuille de nitrocellulose par la technique de Southern blot (voir IV-4). Cet ADN est dénaturé par chauffage pour permettre à la sonde d'agir par complémentarité au gène cible. La position de la sonde est

ensuite révélée par autoradiographie. Un résultat positif se traduit par une tache au niveau du papier photographique. (fig.II)

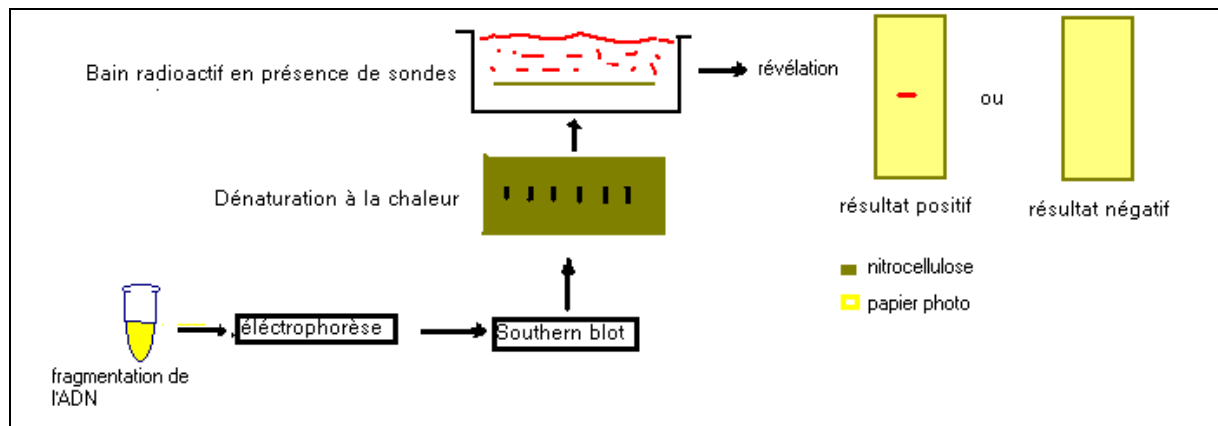


Figure II : diagnostic génétique

### Thérapie génique :

Le principe de la thérapie génique est simple, le gène malade est pris à partir des cellules de l'individu malade, la mutation est corrigée puis le gène normal est réintroduit dans la cellule par l'intermédiaire d'un vecteur. La cellule ainsi réparée est réimplantée chez le patient.

Pour réaliser cette technique il faut maîtriser certaines contraintes :

- connaître la séquence du gène
- trouver le bon vecteur
- trouver le mode d'administration le plus approprié
- prolonger la durée de l'effet en utilisant des cellules- souches

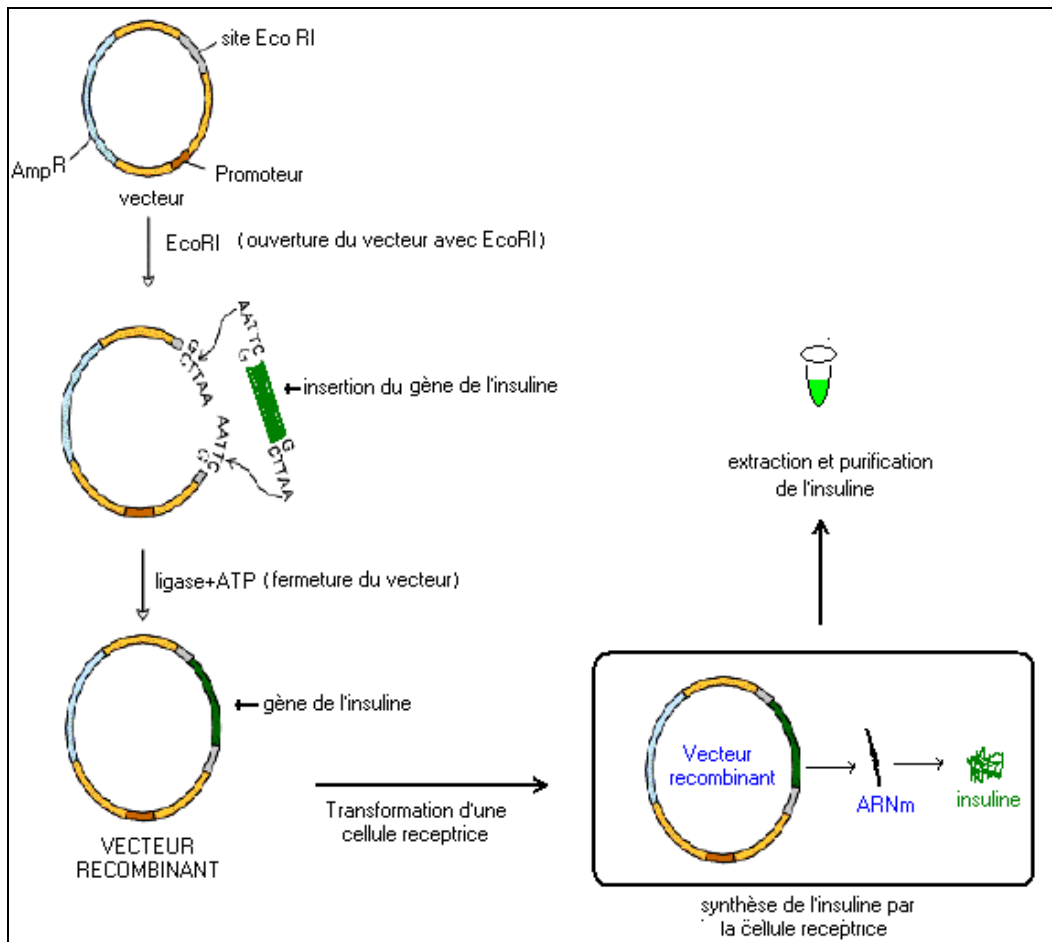
Le premier traitement par thérapie génique c'est produit en 2000 ; il s'agit de deux enfants atteints d'une immunodéficience sévère 'enfants bulle' due à la non-différenciation des lymphocytes. Cette anomalie est provoquée par une mutation des récepteurs gamma C cytokines, qui normalement captent les signaux de différenciation.

Pour ce traitement, le vecteur utilisé est un rétrovirus modifié renfermant une copie normale du gène codant pour le récepteur. Ce vecteur a été ensuite introduit dans des cellules prélevées chez les enfants. Une fois l'expression du gène confirmée, les cellules sont réimplantées chez les enfants. Un mois plus tard, des cellules lymphocytaires matures sont détectées chez les deux enfants.

### Synthèse de molécules thérapeutiques :

Le gène qui sera transcrit est inséré dans un vecteur d'expression, après ouverture de ce dernier par l'enzyme de restriction appropriée. Le vecteur recombinant ainsi obtenu servira à transformer une cellule réceptrice. L'insuline est alors produite par la cellule réceptrice dans des fermenteurs. Le produit final est ensuite extrait et purifié. (Fig. 12)





**Figure 12 :** stratégie de la synthèse de l'insuline par génie génétique