

UNIVERSITE D'ALGER

Faculté de Médecine et de Médecine Dentaire ZIANIA (Château Neuf)

OUTILS DE BIOLOGIE MOLECULAIRE ET GENIE GENETIQUE

COURS DE GENETIQUE -2014-2015-

Introduction

- les méthodes de la biologie moléculaire sont essentiellement basées sur l'**hybridation** entre les bases puriques (A et G) et pyrimidiques (C, T et U)
- Grâce à ces **lois de complémentarité**, il est possible d'associer un brin d'acide nucléique avec **une sonde** et de **reconnaitre le gène** ou la séquence étudiée.
- Les sondes permettent de **détecter des séquences uniques** de génome.
- Il est ensuite possible **d'amplifier une séquence de gène** présente en un **nombre limité d'exemplaires** dans l'échantillon
- Les **enzymes de restriction** permettent de **couper l'ADN** dans des endroits précis
- l' **électrophorèse** permet **de séparer les segments** ADN obtenus en fonction de leurs **poids moléculaires**.

Introduction

La contribution de la biologie moléculaire est considérable.

- ✓ Connaissance de la **physiologie moléculaire** ; contenu de la cellule.
- ✓ Détermination des **séquences des gènes**;
- ✓ Connaissance sur les **mécanismes de régulation de l'expression des gènes** ;
- ✓ La **pathologie moléculaire** ;
- ✓ Diagnostic des **maladies héréditaires** ;
- ✓ Elle contribue au **conseil génétique** ;

Introduction

- ✓ Elle possède des applications en médecine légale comme :
 - La reconnaissance des personnes lors des grandes catastrophes :
 - La reconnaissance de paternité,
 - La destruction des individus en criminologie

mis en œuvre **l'empreinte génétique** permettant d'identifier sans erreur un individu à partir d'un échantillon de son ADN, Les matériaux qui sont typiquement recherchés sont le **sang**, les **poils** et **plumes**, la **salive**, les **excréments**, des échantillons de **peau** ou de **mucus** ainsi que d'autres **types de tissus**. La principale méthode utilisée pour analyser ces matériaux est **l'analyse ADN**.

Plan du cours

I- Les Enzymes

I-1 Enzymes de restriction

I.1.1 Les **exo**-nucléases

I.1.2 Les **endo**-nucleases

I-2 ADN polymerases

I-2-1 Fragment de
Klenow

I.2.2 Taq polymérase

I-3 Les ligases

II Les vecteurs

II-1 Vecteur de clonage

II-2 Vecteur d'expression

III Les sondes moléculaires

IV Les Techniques

IV-1 Technique d'électrophorèse
sur gel d'agarose

IV-2 Technique **PCR**

IV-3 Technique de **séquençage**

IV-4 Southern **blot**

V- Applications

V-1 Diagnostic génétique

V-2 Thérapie génique

V-3 Synthèse de molécules
thérapeutiques

I - Les Enzymes

I - 1 Enzymes de restriction

Molécules extraites à partir de microorganismes (généralement des bactéries) et qui coupent les liaisons phospho-diester au niveau des acides nucléiques.

I.1.1 Les **exo nucléases**:

Elles digèrent l'ADN à partir de l'extrémité 5' ou 3'.

I - Les Enzymes

I - 1 Enzymes de restriction

I.1.2 Les **endo nucléases**:

Elles coupent l'ADN à l'intérieur en cassant les liaisons phospho-diester. Elles 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**.

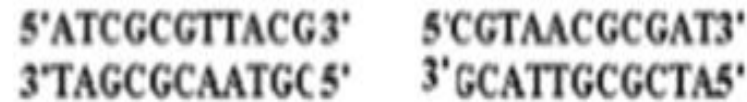


5' ATGCTAGATAGCAT 3'
3' TACGATCAATCGTA 5'

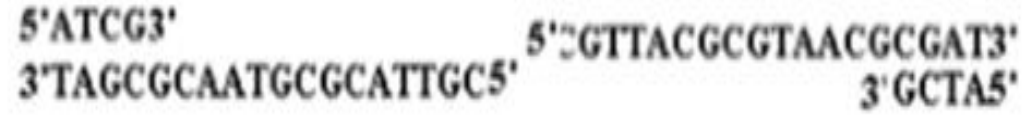
**Séquence
palindromique**

endo-nucléases

Il y a deux catégories d'endo-nucléases : celles qui donnent des **extrémités franches** et celles qui donnent **des extrémités cohésives**. d'où la possibilité de lier des fragments d'ADN d'origine différentes : c'est le phénomène de la recombinaison génétique.



Extrémités Franches



Extrémités cohésives

Figure 2 : les deux types d'endonucléases

Tableau 1: exemple de quelques
exo nucléase et leurs origines

Enzyme	microorganisme	SITE DE RESTRICTION
<i>EcoRI</i>	<i>Echerichia coli</i>	↓ GAATTC CTTAAG ↑
<i>EcoRII</i>	<i>Echerichia coli</i>	↓ GCCTGGC CGGACCG ↑
<i>PstI</i>	<i>Providentia stuartii</i>	↓ CTGCAG GACGTC ↑
<i>HindIII</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	↓ AAGCTT TTCGAA ↑

Il existe trois types d'enzymes de restriction.

Les enzymes de type I et III ne sont pas utilisées en pratique, car elles coupent l'ADN de façon aléatoire.

Les enzymes de restriction de type II, clivent spécifiquement les deux brins d'ADN au niveau d'une séquence bien définie. Elles ont la particularité de reconnaître et de couper des **séquences palindromiques**

I - Les Enzymes

I-2 ADN polymerases

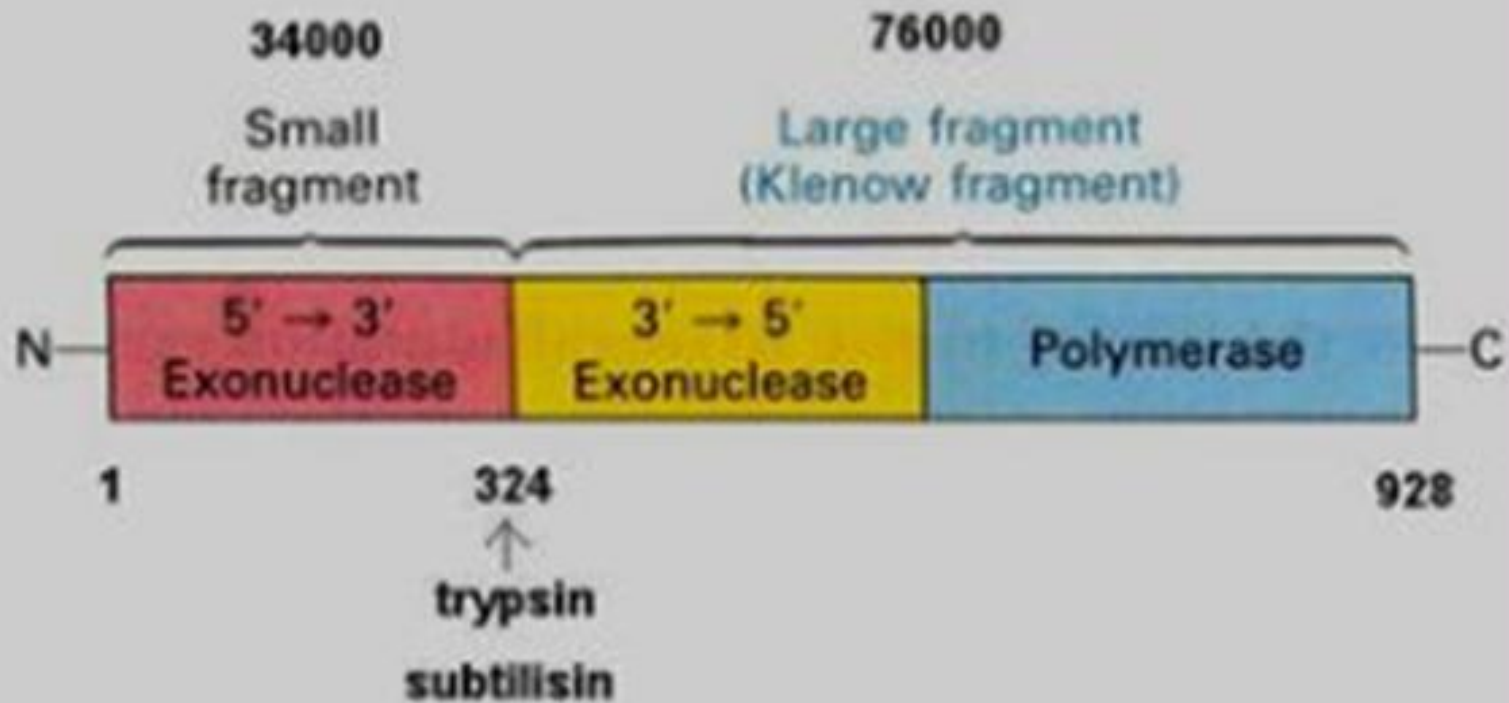
Elles réalisent des liaisons phospho-diester entre deux nucléotides adjacents.

I-2-1 Fragment de Klenow

il est obtenu par digestion enzymatique de la polymérase I d'E.coli.

ce fragment conserve l'activité polymérase et exo-nucléase $3' \rightarrow 5'$ et perd l'activité exo-nucléase $5' \rightarrow 3'$.

Le fragment de Klenow permet le séquençage de l'ADN , selon la méthode de Sanger : la synthèse de second brin d'un ADN complémentaire et le marquage isotopique au P^{32} de l'extrémité $3'$ de l'ADN par échange de nucléotides froids contre des nucléotides marqués au p^{32} .



- **I.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.

I - Les Enzymes

-3 Les ligases

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

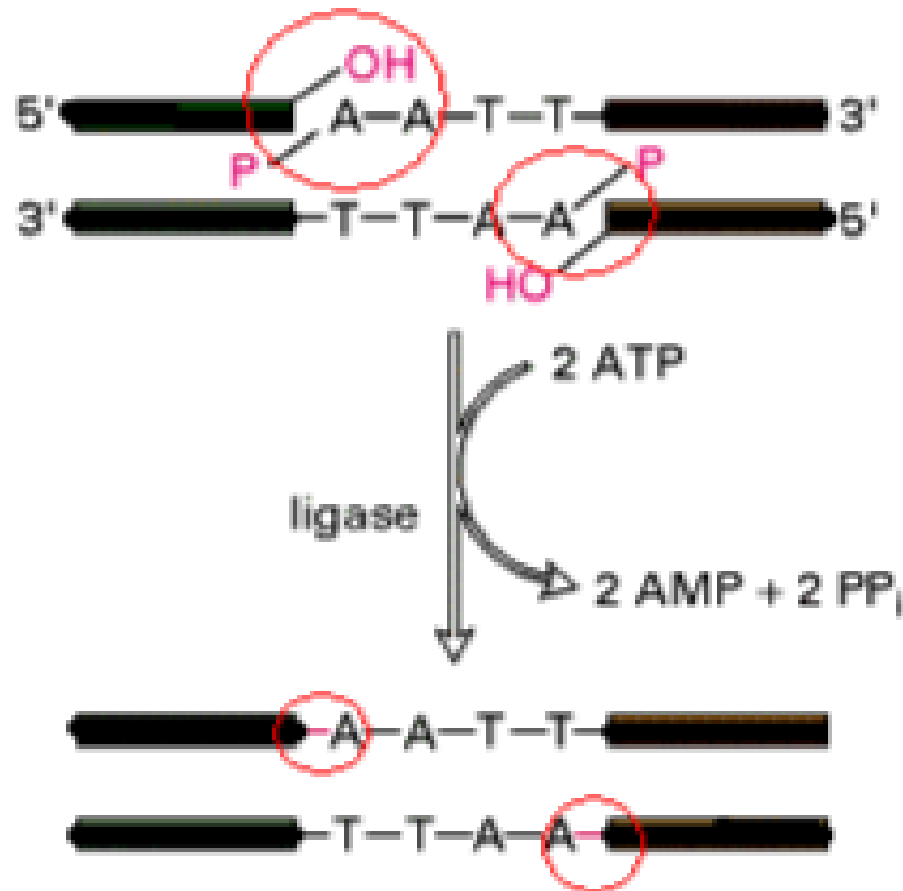


Figure 4 : réalisation de liaisons phosphodiester par la ligase

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 **poly-linker** 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 simplifié (Figure 5)

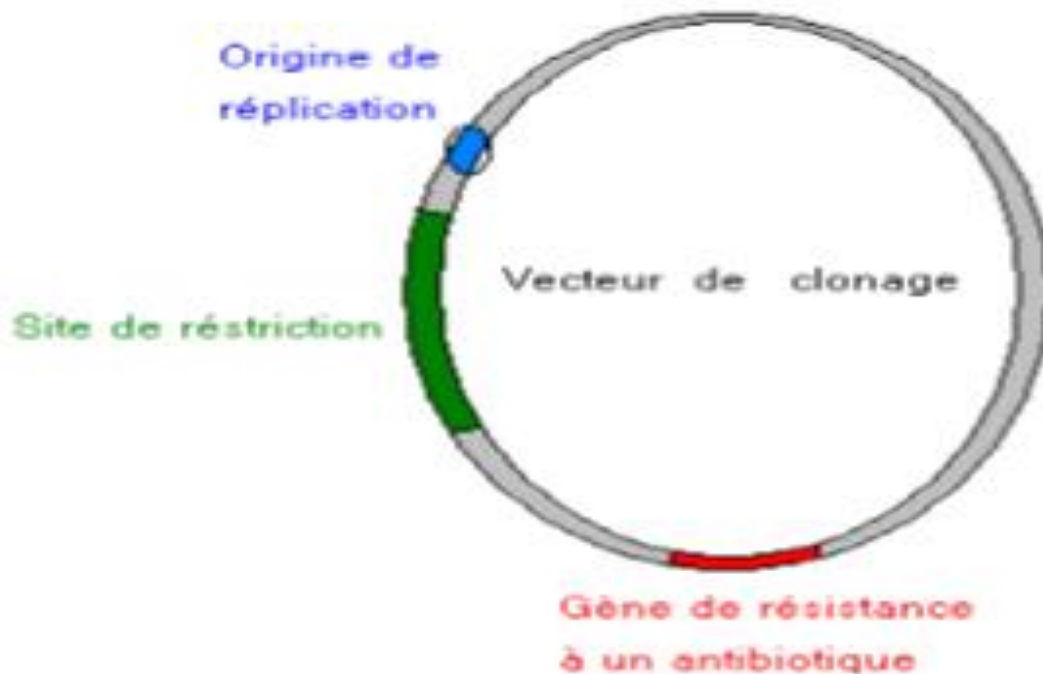


Figure 5 : vecteur de clonage

II-2 Vecteur d'expression :

- Renferme un promoteur, il permet de faire exprimer un gène Schéma simplifié (Figure 6)

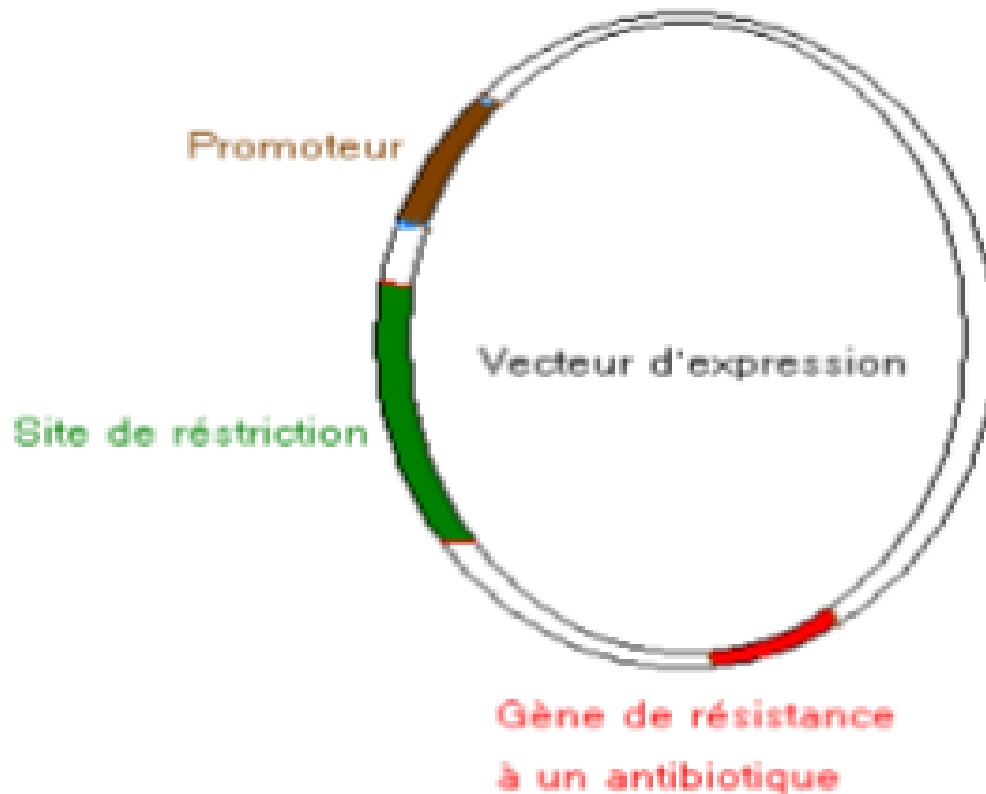


Figure 6 : vecteur d'expression

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 (P32) ou chimioluminescent (digoxygénine) pour pouvoir les détecter après hybridation.

IV Les Techniques

**IV-1 Technique d'électrophorèse
sur gel d'agarose**

IV-2 Technique PCR

**IV-3 Technique de séquençage-
sanger-**

IV-4 Southern blot

IV-1 Technique d'électrophorèse sur gel d'agarose

- 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.

ADN coloré
au bromure
d'ethidium

limite du
colorant bleu
anionique

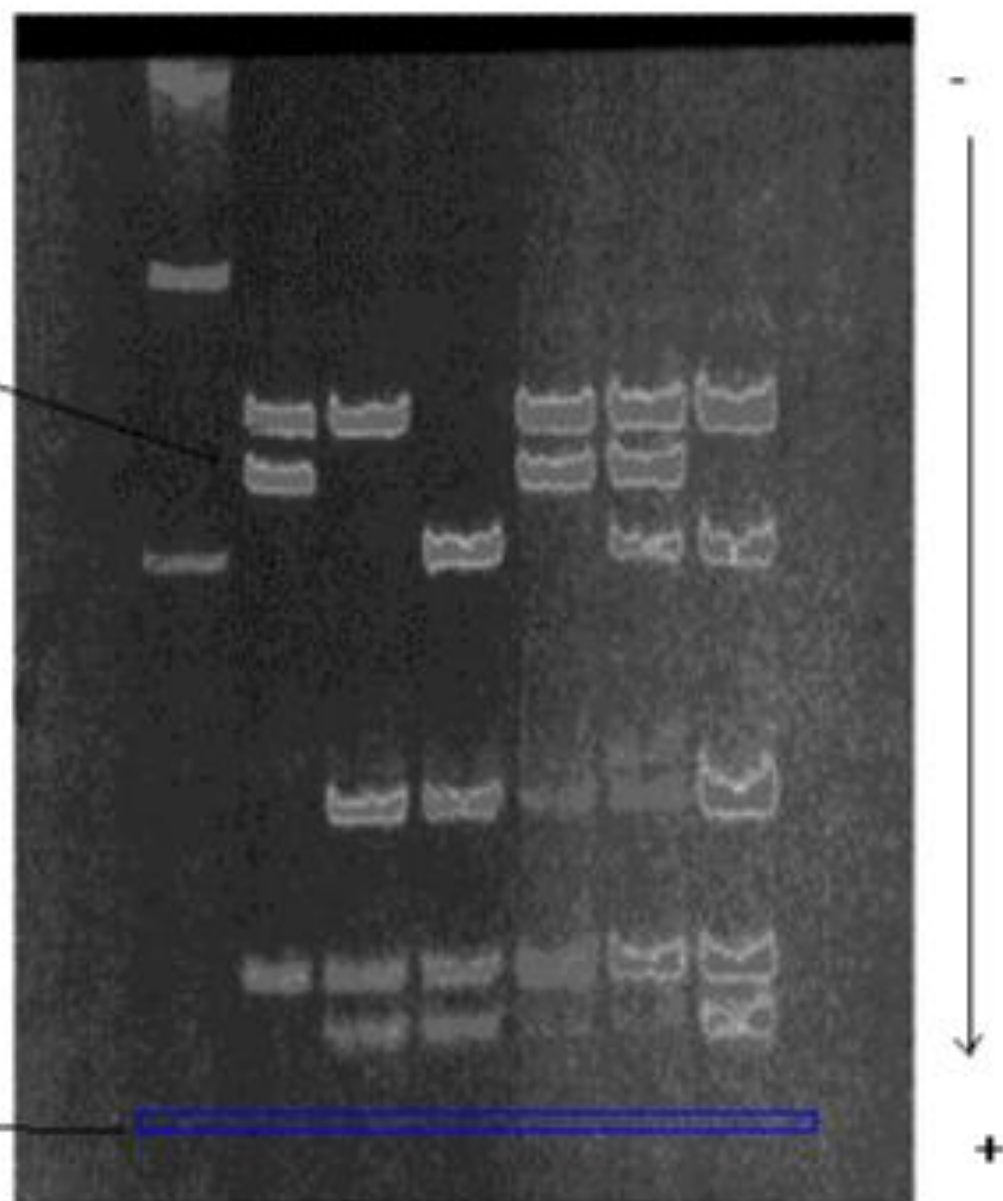


Fig.7 : Technique d'électrophorèse

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.

IV-2 Technique PCR :

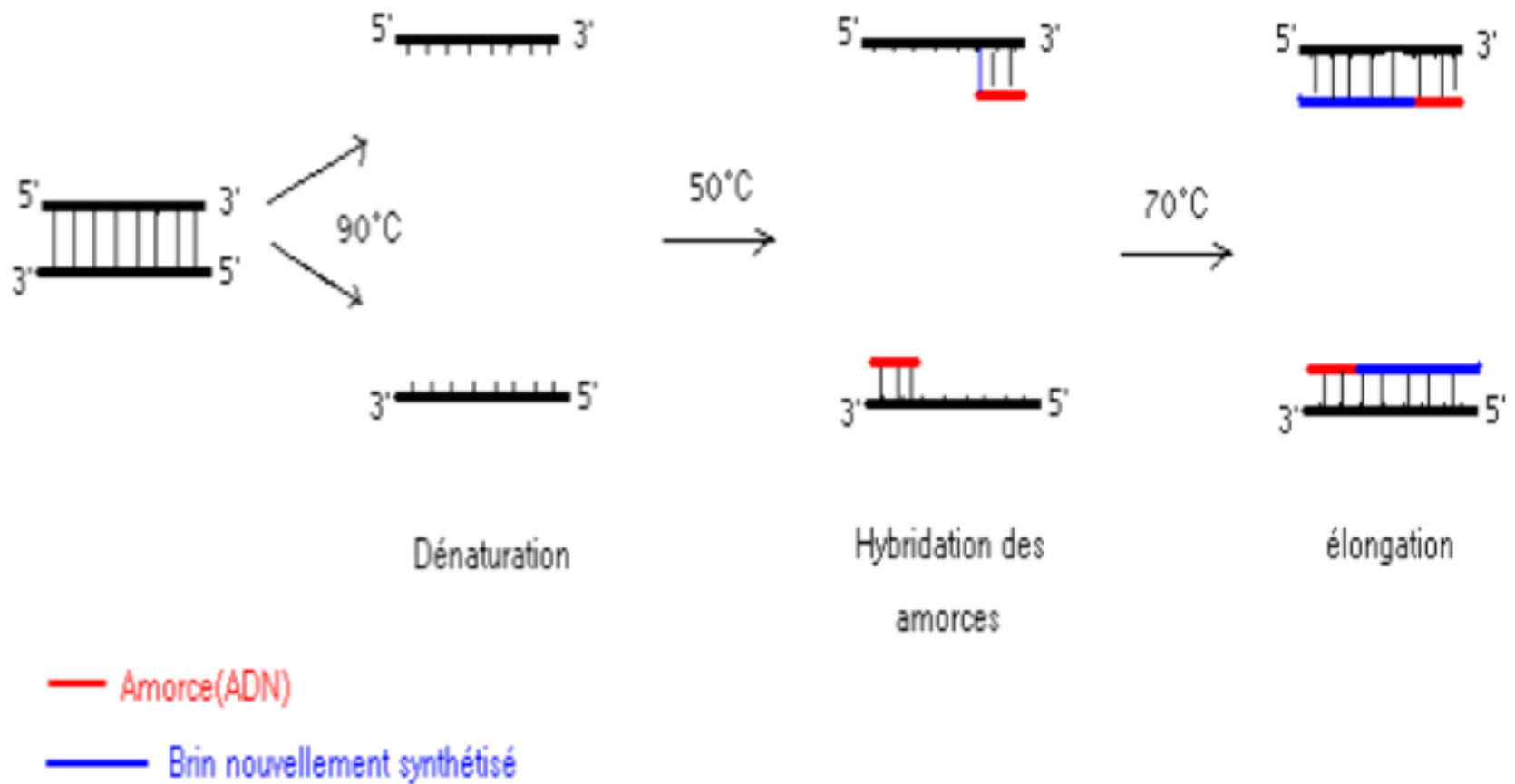


Figure 8 : représentation schématique des 3 étapes d'un cycle PCR.

IV-3 Technique de séquençage-Sanger-

permet de déterminer la séquence d'ADN en réalisant une **série de réplication**

il faut

- 4 synthèses du **brin complémentaire**
- des **amorces** d'où les synthèses débutent
 - Les **ADNs polymérase I** : catalyse la synthèse
 - Des **nucléosides triphosphate** (+ Mg^{2+}) : dATP , dCTP , dGTP et dTTP
 - Des **didésoyribonucléoside triphosphate marqué** (radioactivité) : dd ATP, ddCTP ddGTP, et ddTTP; ne possèdent pas de groupement OH en 2' ni en 3', Ils bloquent donc la synthèse lorsqu'ils sont incorporés au brin.

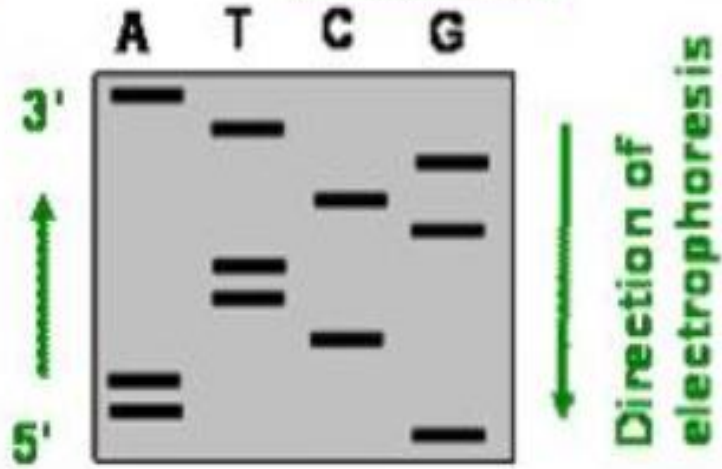
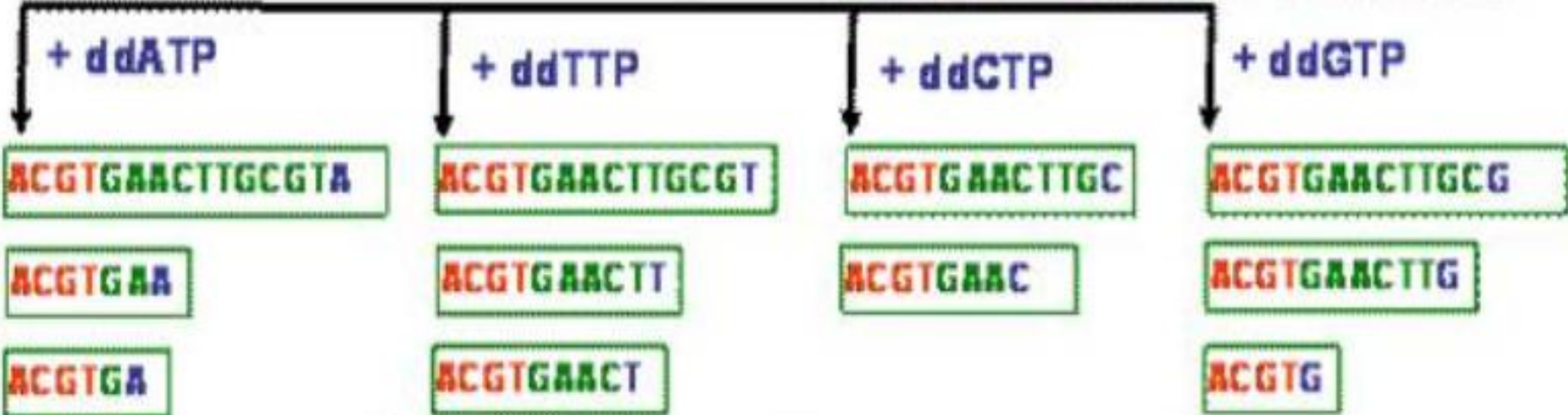
Ainsi on utilisant différents didésoxynucléotides (**ddA, ddT, ddG, ddC**) on obtient plusieurs fragments se terminant chacun par l'un des didésoxynucléotides.

Après **séparation des brins** néo synthétisés 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).



Single stranded DNA
 Labelled primer

+ DNA polymerase
 + excess of dATP, dTTP, dCTP, dGTP



Read sequence



Complementary sequence

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 **endonucleases**
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.**

IV-4 Southern blot :

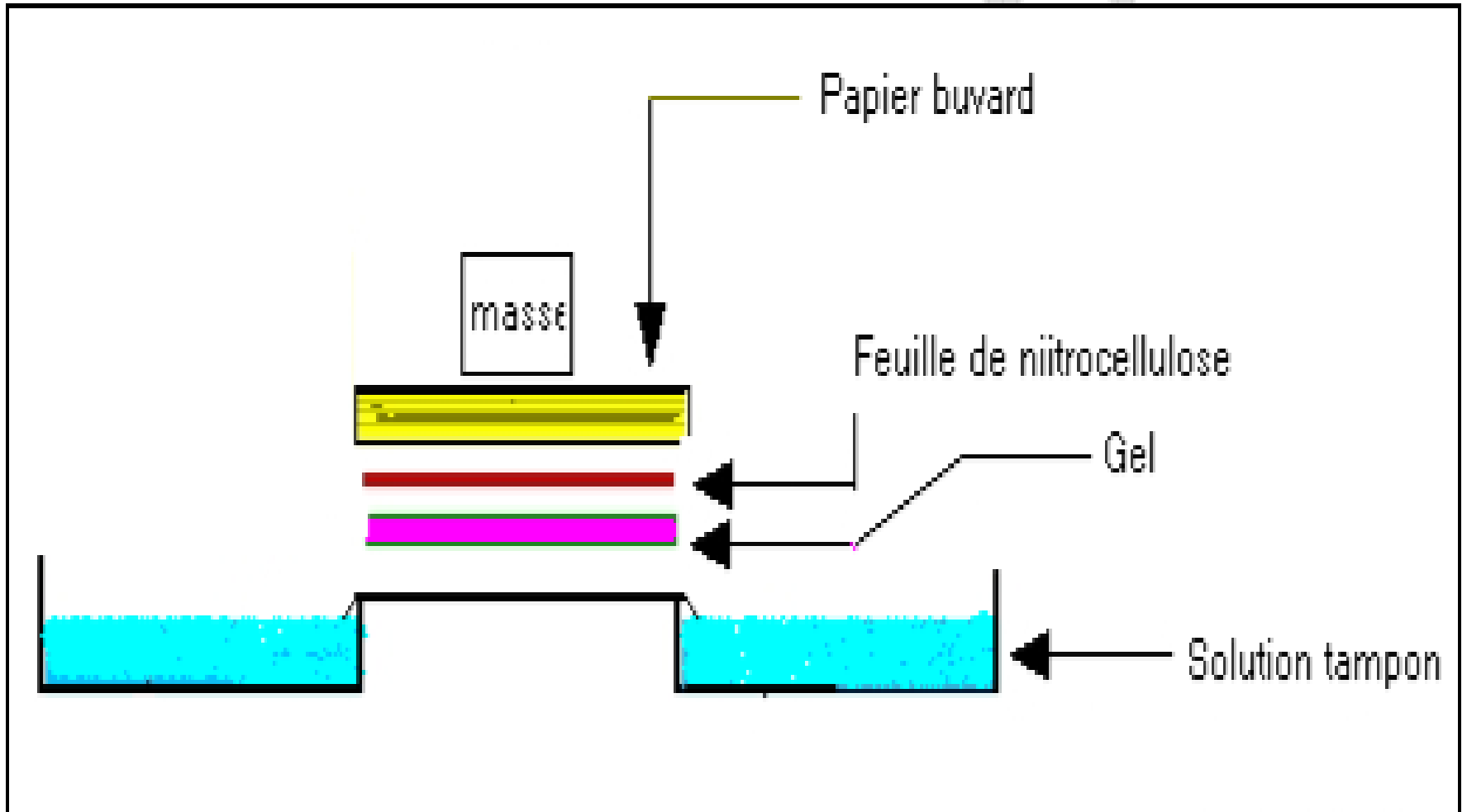


Figure 10 : technique de Southern blot

V-Applications

V-1 Diagnostic génétique

V-2 Thérapie génique

V-3 Synthèse de molécules thérapeutiques

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 cite :

V-1 Diagnostic génétique (pré-symptomatique, pré-natal etc.)

V-2 Thérapie génique (correction d'un gène au niveau des cellules souches)

V-3 Synthèse de molécules thérapeutiques

V-1 Diagnostic génétique-1-

- 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**. L'ADN est ensuite transféré sur une **feuille de nitrocellulose par la technique de Southern blot** .
- 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.11)

V-1 Diagnostic génétique-2-

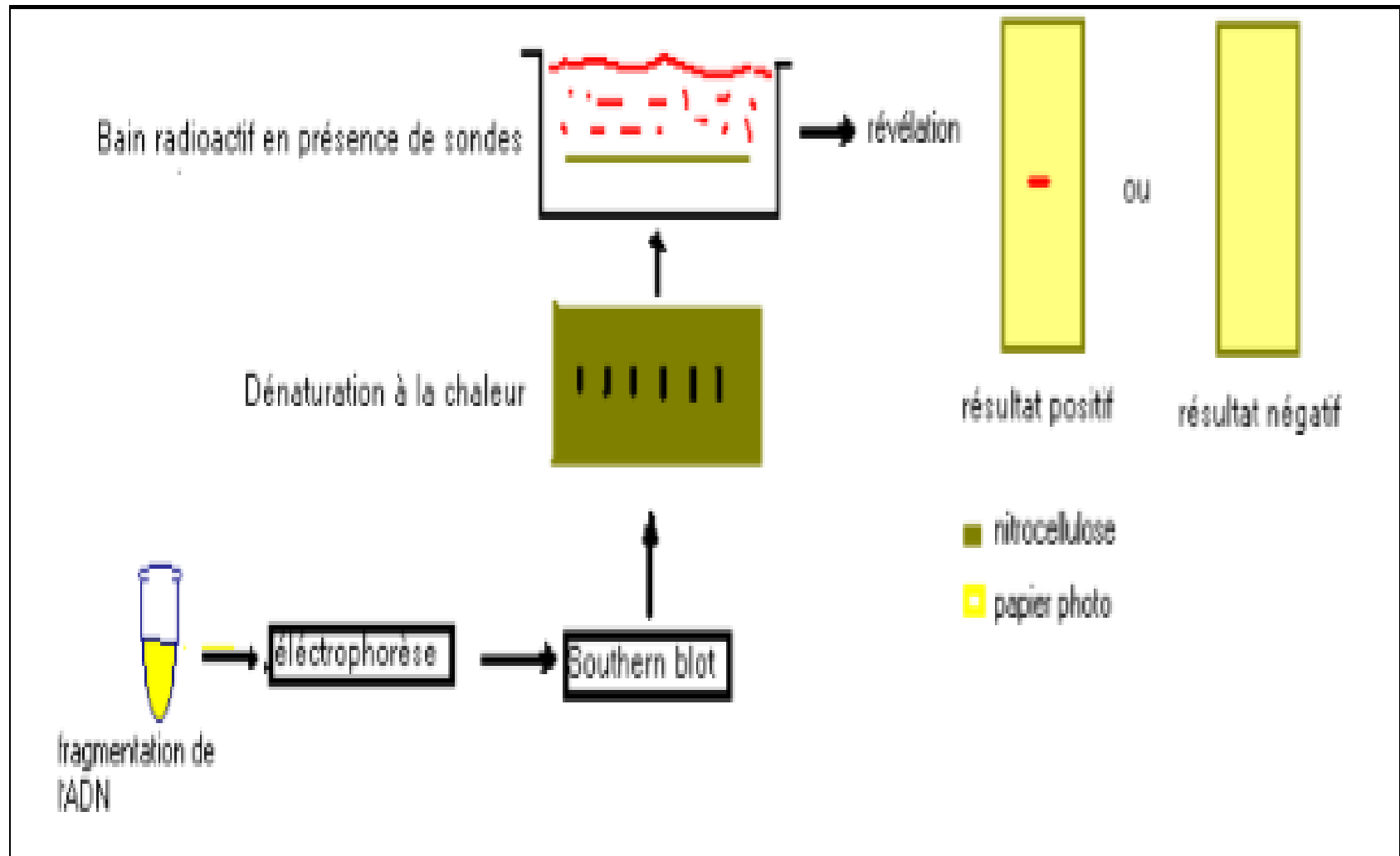


Figure II : diagnostic génétique

V-2 Thérapie génique-1-

- 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**

V-2 Thérapie génique-2-

- 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.

V-3 Synthèse de molécules thérapeutiques

la production de l'insuline destinée au traitement du diabète insulino-dépendant est aujourd'hui assurée par des bactéries dans lesquelles on a introduit le gène humain.

Le facteur de coagulation VIII, absent chez les hémophiles, peut être de la même manière.

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)

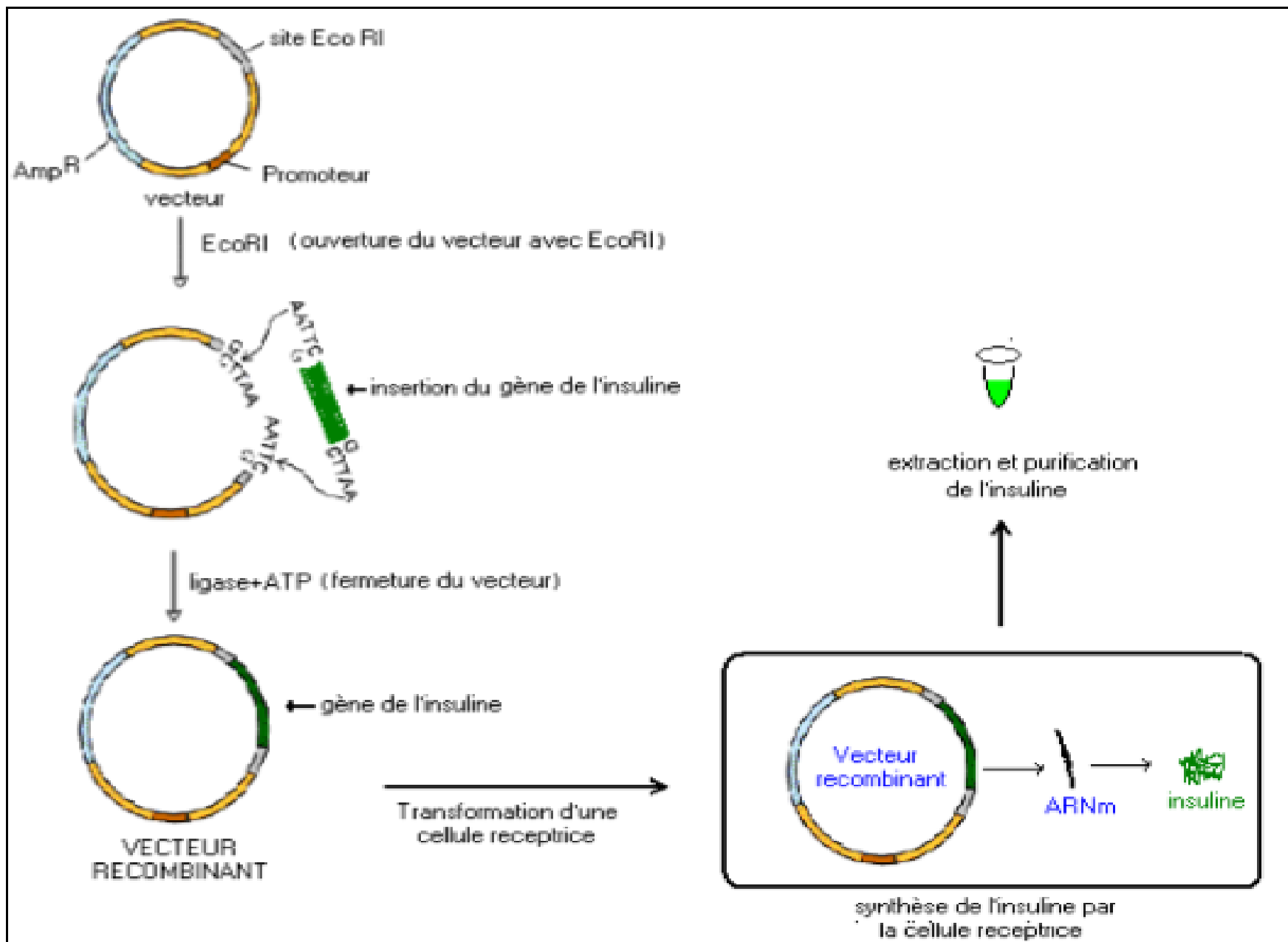


Figure 12 : stratégie de la synthèse de l'insuline par génie génétique