

Deuxième partie: Génie Génétique

Génie génétique : ensemble des outils et des techniques qui permettent de manipuler l'ADN et l'ARN *in vivo* ou *in vitro*.

- But : **identifier, isoler** et **étudier** les gènes
- En recherche fondamentale :
 - étude de la **structure** des gènes
 - étude de leur **expression**
 - étude de leur **fonction**
- Applications :
 - production de protéines recombinantes (vaccins, médicaments, etc)
 - production d'OGM
 - diagnostic de maladies
 - recherche de cibles thérapeutiques

Deuxième partie: Génie Génétique

Principales étapes du développement du génie génétique:

1953: **Watson et Crick** proposent le modèle double-hélice de l'ADN

1955: **A. Kornberg** découvre la DNA polymerase

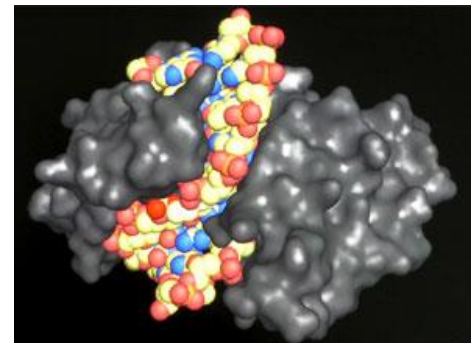
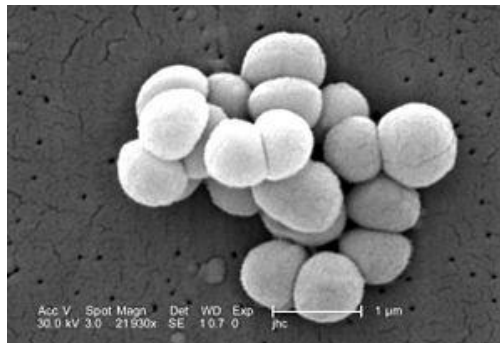
1962: **Arber** montre la première preuve de l'existence des endonucléases de restriction

1967: **Gellert** découvre la DNA ligase

1970: **Temin, Mitzutani, Baltimore** découvrent la transcriptase reverse

1970: **Smith et Nathan** utilisent les nucléases de restriction pour préparer de l'ADN recombinant (démarrage de la technologie de l'ADN recombinant)

*Micrococcus
varians*



Mva1

*Kaus-
Drobek et
al. 2007*

Deuxième partie: Génie Génétique

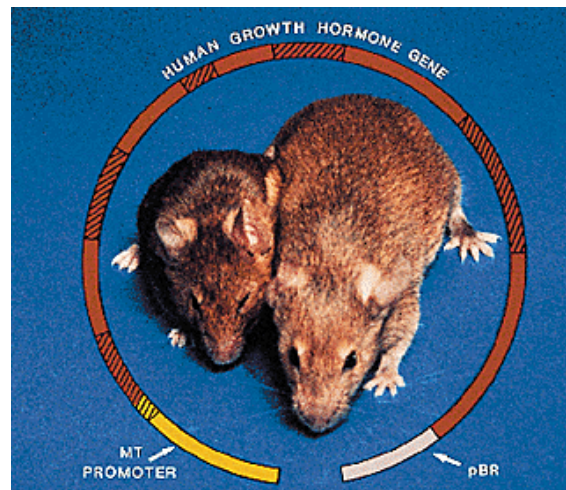
Principales étapes du développement du génie génétique (continuation):

1972-1973: **Boyer, Cohen, Berg** développent des techniques de clonage de l'ADN

1975-1977 **Sanger, Barrell, Maxam et Gilbert** développent des méthodes rapides de séquençage de l'ADN

1981-1982 **Palmiter et Brinster** produisent des souris transgéniques; **Spradling et Rubin** produisent des mouches du fruit (*Drosophila*) transgéniques

1985 **Mullis** et collaborateurs inventent la réaction en chaîne de la polymérase (PCR).

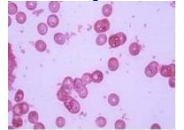


Deuxième partie: Génie Génétique

Principales étapes du développement du génie génétique (continuation):

1990 Le **US Department of Energy** et les **National Institutes of Health** lancent le Projet Génome Humain

1995 **Venter** et collègues séquencent le premier génome complet (*Haemophilus influenzae*)



1998 **Fire et Mello** découvrent le mécanisme d'interférence à l'ARN (RNAi)

2003 Un **consortium** de chercheurs publient la séquence du génome humain (fin du projet HGP)

2009-2011 **Programme 1000 génomes humains**

2004-présent: **Programme ENCODE (Encyclopedia of DNA elements)**.
Premiers résultats 2012



2000-présent: découverte et développement du système **CRISPR-Cas9**

2ème partie : Génie Génétique

1. Préparation de l'ARN et de l'ADN (**LE MATERIEL**)
2. Les outils du génie génétique (**LES OUTILS**)
3. L'amplification sélective d'ADN in vitro (PCR)
4. Le clonage des gènes
5. Etude de la structure d'un gène cloné
6. Etude de l'expression et fonction des gènes

LES TECHNIQUES

1. Préparation de l'ARN et de l'ADN (**LE MATERIEL**)

- ADN génomique et ARN
- ADN plasmidique
- Hybridation moléculaire

1. Préparation de l'ADN génomique et de l'ARN

1-Matériel de départ : Cellules ou organes

2-Homogénéisation en conditions dénaturantes

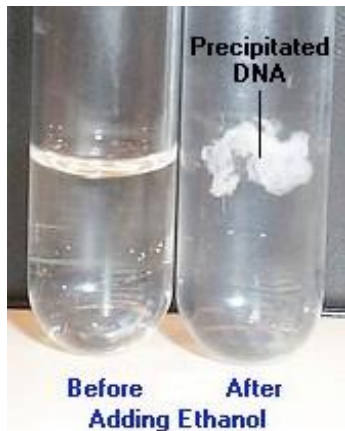
(lyse, broyage addition de
phenol/chloroforme)

3-Séparation

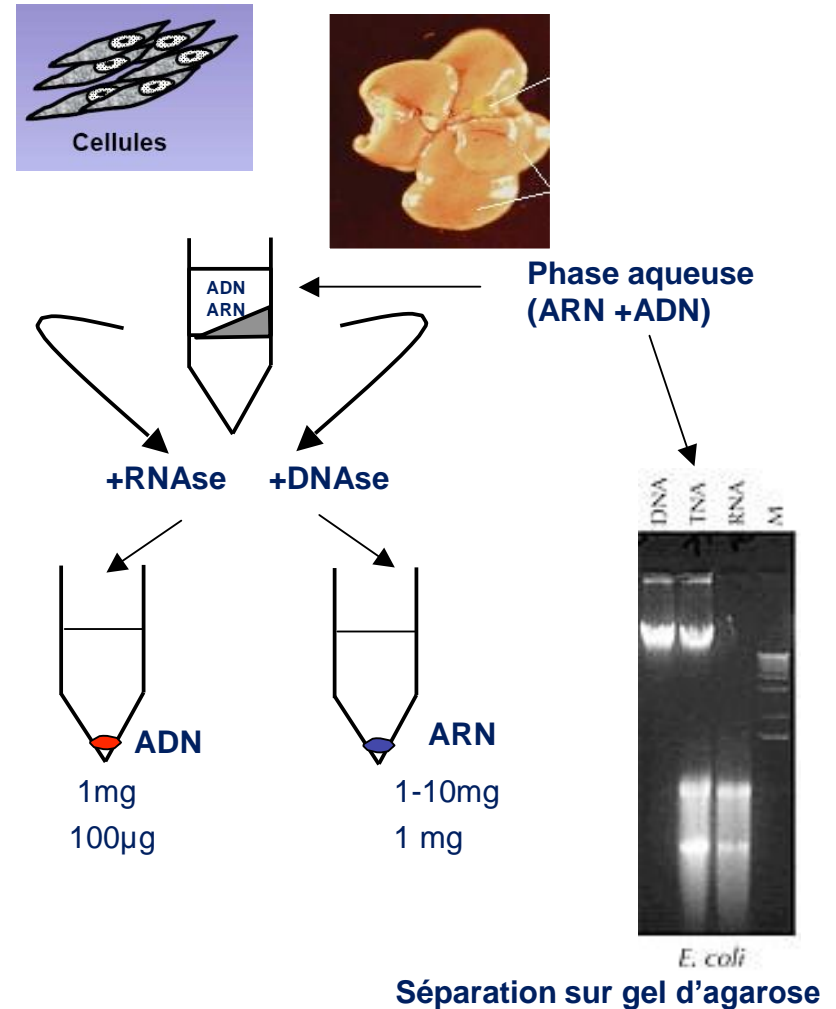
(centrifugation)
traitement DNase ou RNase

4-Collecte

précipitation par l'éthanol



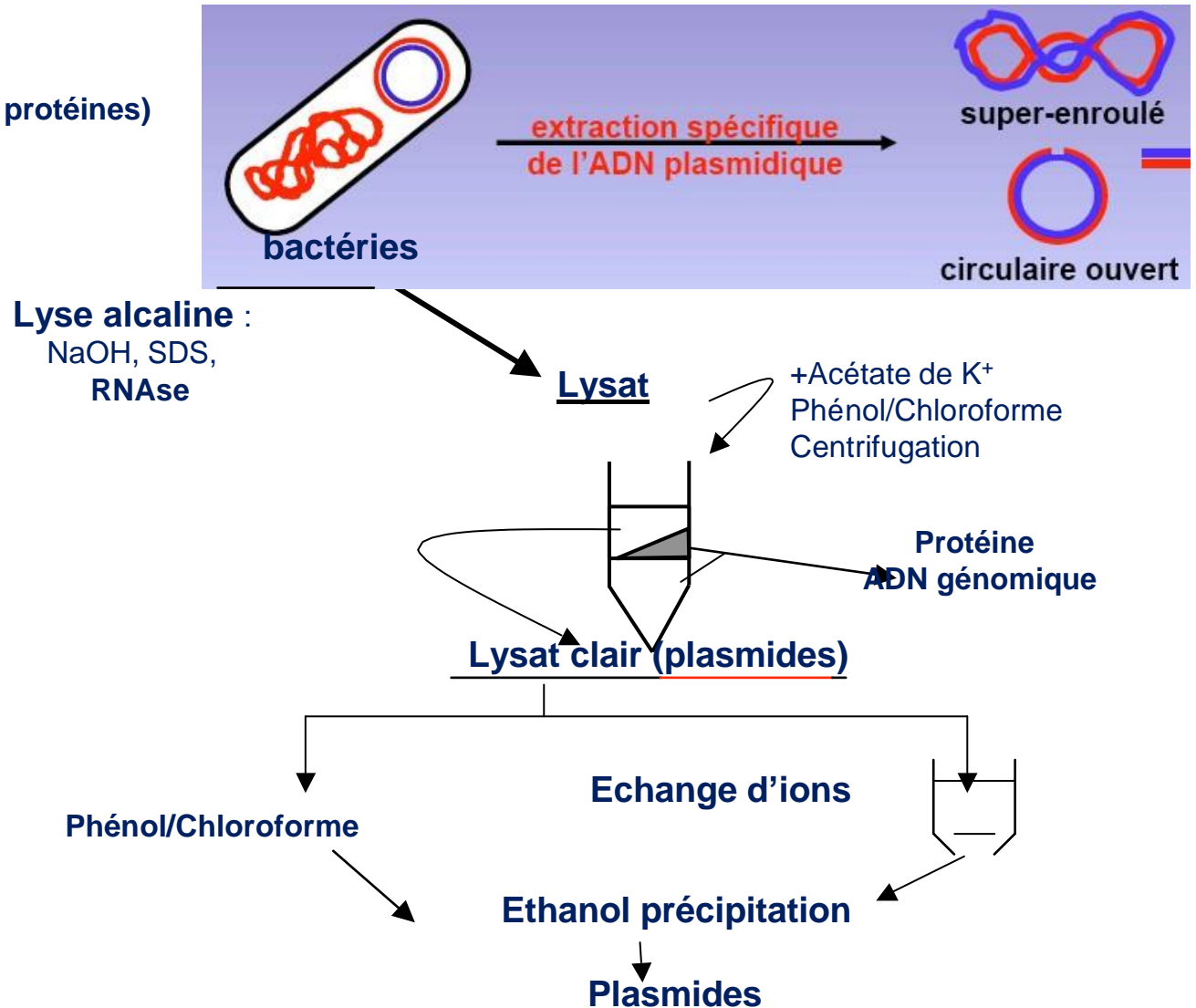
1gramme tissu
 10^7 cellules



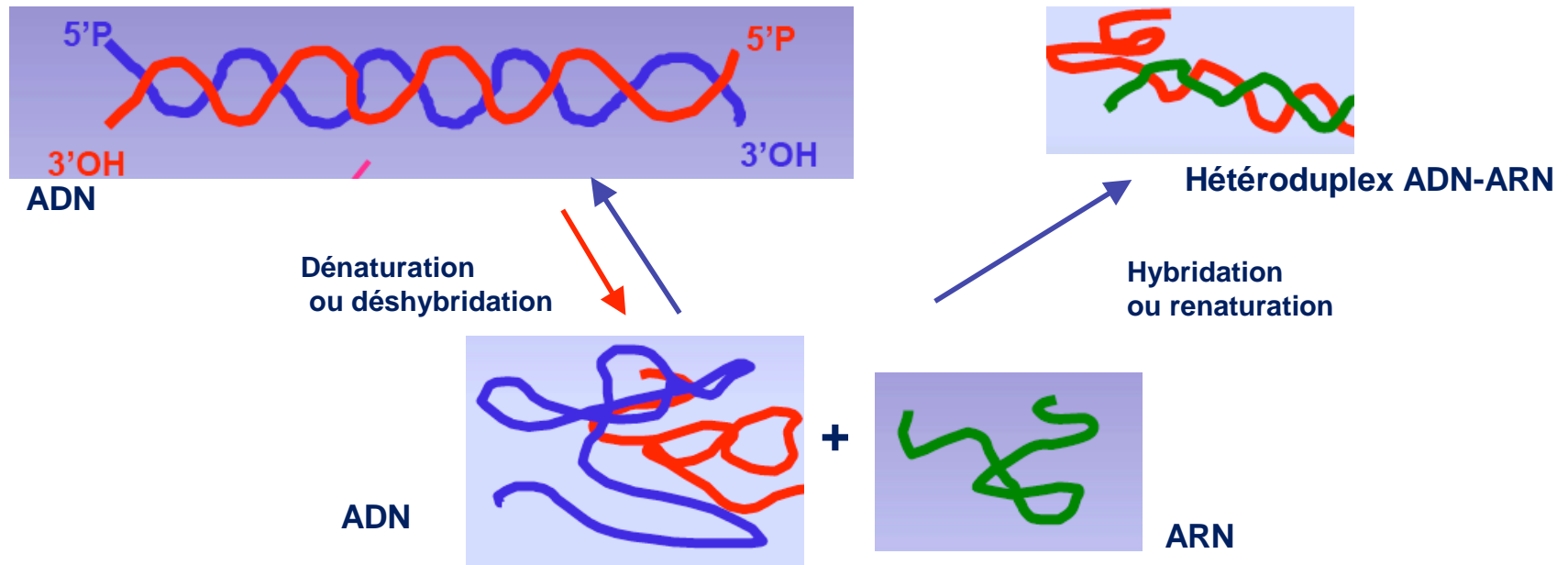
1. Préparation de l'ADN plasmidique

2 types d'ADN

génomique (associé à des protéines)
plasmidique (nu)



1. Hybridation moléculaire

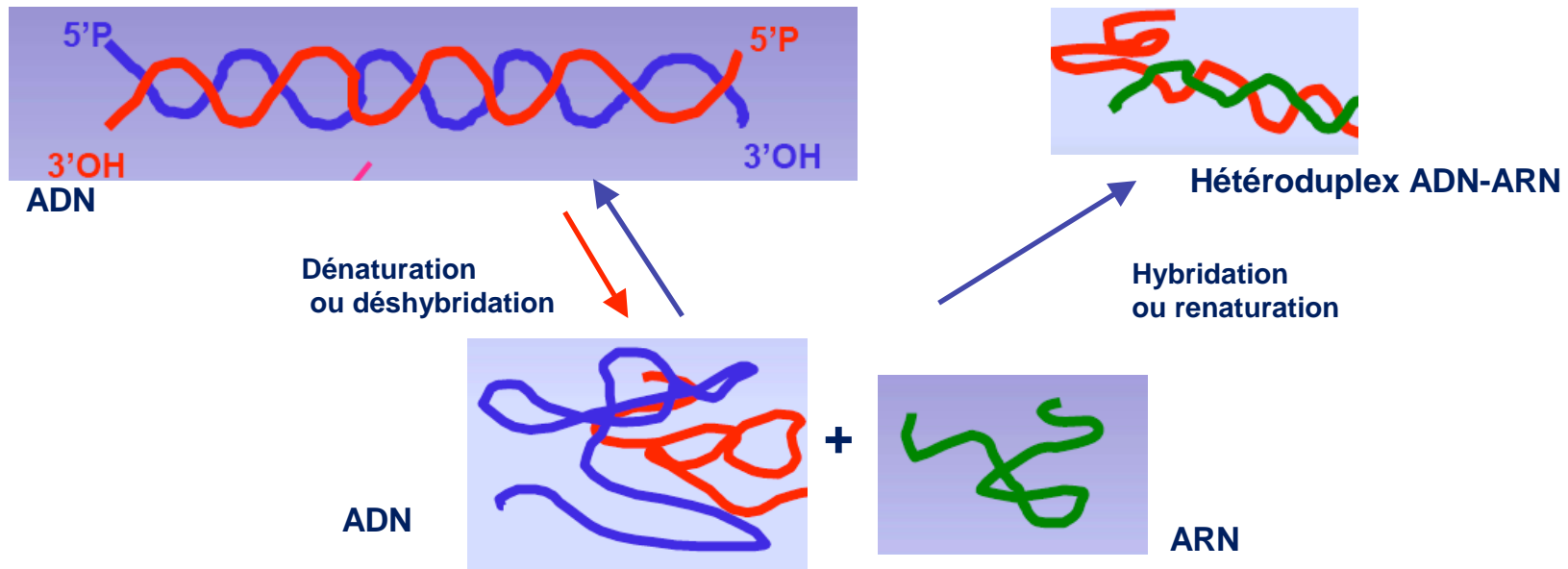


Hybridation moléculaire : Association de deux chaînes d'acides nucléiques (ARN ou ADN) par appariements de leurs bases complémentaires.

L'hybridation moléculaire repose sur :

- La complémentarité de bases
- La réversibilité du processus de séparation des deux brins (dénaturation/renaturation)

1. Hybridation moléculaire



Dénaturation obtenue en

- augmentant la température
- en changeant le milieu
 - diminuant la concentration en sels
 - ajoutant des agents dénaturants : urée, formamide, formaldéhyde

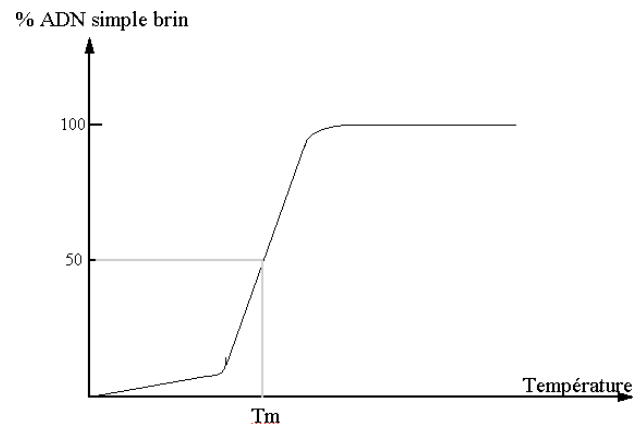
1. Hybridation moléculaire

Hybridation : association de deux brins (ADN ou ARN) par des liaisons hydrogènes entre leurs bases complémentaires.

Température de fusion de l'hybride (T_m) : Température à laquelle 50% des molécules passent de l'état double brin à l'état simple brin.

Cette température correspond au point d'inflexion de la courbe D.O. à 260 nm de l'ADN en solution en fonction de la température. La température de fusion dépend:

- de la taille de la séquence (n)
- du % de bases complémentaires (% homologie)
- de la composition en nucléotides (% G+C)
- de la concentration en sel (ex. Na^+)
- de la présence d'agents dénaturants (ex. formamide).



1. Hybridation moléculaire

Pour deux séquences ADN de **taille supérieure à 50 nucléotides** et 100% homologues le T_m peut être calculé par la formule :

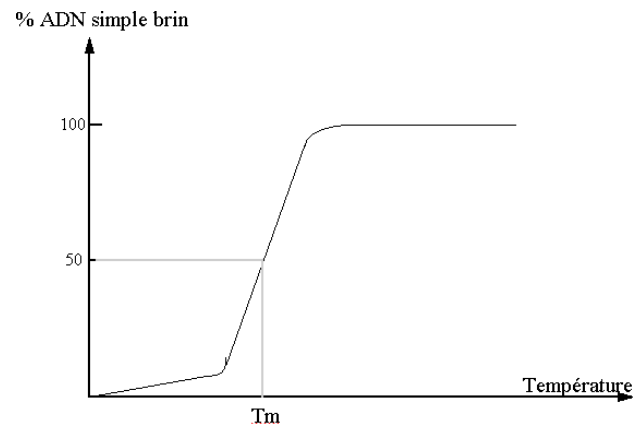
$$T_m = 81.5^{\circ}\text{C} + 16.6 (\log \text{Na}^+) + 0.41 (\% \text{ de G+C}) - 0.63 (\% \text{ Formamide}) - 600/n.$$

Dans le cas de séquences partiellement homologues, il faut enlever 1°C par % de divergence.

Si la taille est **inférieure à 14 nucléotides**, la taille et la composition en bases sont les facteurs déterminants; on utilise alors la formule simplifiée :

$$T_m = 4^{\circ}\text{C} (C+G) + 2^{\circ}\text{C} (A+T).$$

Cette formule donne aussi une bonne approximation du T_m **jusqu'à 25 nucléotides**. Entre 25 et 50 nucléotides d'autres formules sont utilisées.



1. Hybridation moléculaire

Stringence : degré d'empêchement des hybridations non spécifiques. Elle est définie par l'ensemble des conditions utilisées pour l'hybridation (température, concentration en sels, concentration en agents dénaturants)

A **forte stringence** (température proche du T_m) seules les séquences homologues sont appariées (hybridation spécifique).

A **faible stringence** (température inférieure au T_m) appariement de séquences qui sont seulement partiellement homologues (hybridation peu spécifique).

Réalisation d'une **hybridation**:

- en solution (ex: amorces PCR)
- sur membrane (Southern blot, Northern blot, Dot blot)
- sur coupe de tissus (hybridation in situ).

Deuxième partie: Génie Génétique

2. Les **outils** du génie génétique

- Les enzymes
 - Endonucléases de restriction
 - DNase pancréatique
 - Nucléase S1
 - RNase H
 - DNA polymérases
 - RNA polymérases
 - Autres
- Electrophorèse d'acides nucléiques
 - En gel non dénaturant
 - En gel dénaturant
- Le blotting
- Les sondes nucléotidiques
 - Marquage
 - Hybridation
- Les vecteurs de clonage
 - Plasmides
 - Phages

2. Les enzymes: endonucléases de restriction

ENDONUCLÉASES de RESTRICTION (origine bactérienne)

- Type 1 Coupure des 2 brins d 'ADN à **10 pb** de la séquence reconnue
- Type 2 Coupure des 2 brins d 'ADN à **l'intérieur** de la séquence reconnue
- Type 3 Coupure des 2 brins d 'ADN à **1 kb** de la séquence reconnue

CARACTÉRISTIQUES des MOTIFS RECONNUS par les ENZYMES de TYPE 2

Motif reconnu de **4 à 6 nucléotides**

La séquence du motif est **PALINDROMIQUE** (GAATTC, GGCC...)

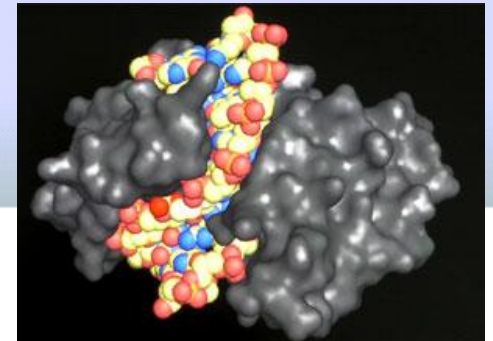
Motif est **spécifique d'une enzyme / d'une bactérie**

PAR BACTÉRIE: UN COUPLE ENDONUCLÉASE / MÉTHYLASE de RESTRICTION

Motif **commun** à la méthylase et à la nucléase

Motif est **méthylé sur une base** par la méthylase

Motif **méthylé est non coupé** par à la nucléase



2. Les enzymes: endonucléases de restriction

Types de coupures

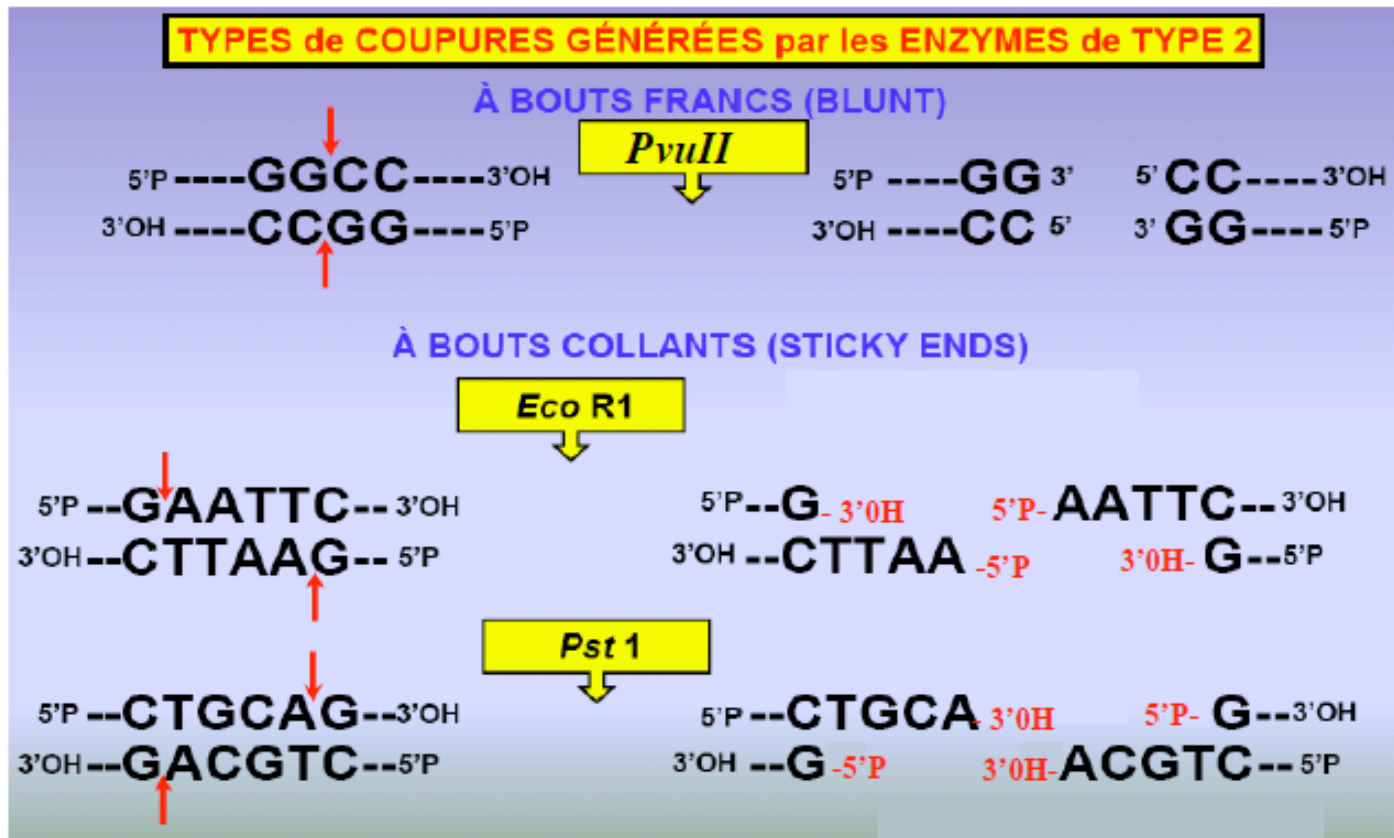
EcoRI : Extrémités **dépassantes** en 5' (à bouts collants)

PstI : Extrémités **dépassantes** en 3'

Les extrémités dépassantes générées par une enzyme de restriction sont complémentaires. Elles peuvent s'hybrider. On dit qu'elles sont **cohésives**

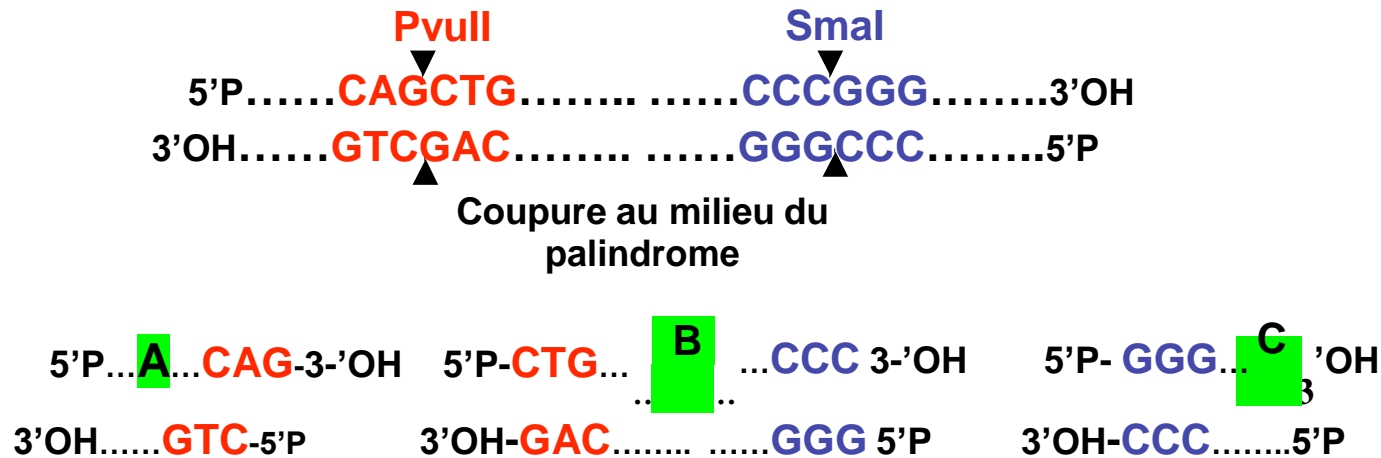
Pvu II : Extrémités **franches non cohésives** complémentaires.

Toutes sont 5'P et 3'OH peuvent être réassociées par une DNA ligase (liaison covalente stable): **compatibles**



2. Les enzymes: endonucléases de restriction

Coupures franches

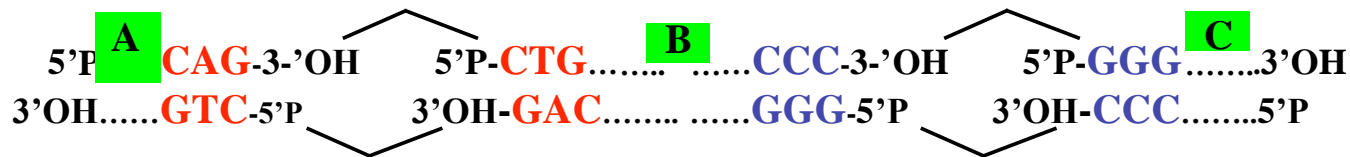


Génère 3 fragments A B C et des extrémités franches (non dépassantes) qui ne peuvent pas s'hybrider entre elles : Extrémités non cohésives

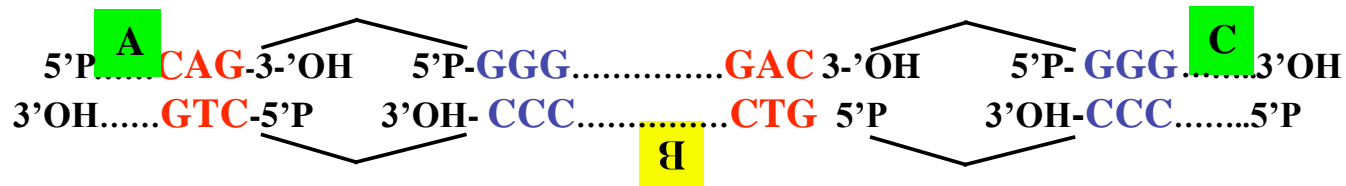
Ces extrémités peuvent-être associées entre elles par une DNA ligase (liaison phospho-ester) Elles sont compatibles

2. Les enzymes: endonucléases de restriction

Coupures franches



Réassociation des 3 fragments et reconstitution du fragment de départ avec les site Pvu II ou Sma I



Réassociation différente donnant un nouveau fragment d'ADN recombiné (B inversé) sans reformation des sites de restriction. D'autres combinaisons sont possibles car toutes les extrémités franches sont équivalentes pour la ligase

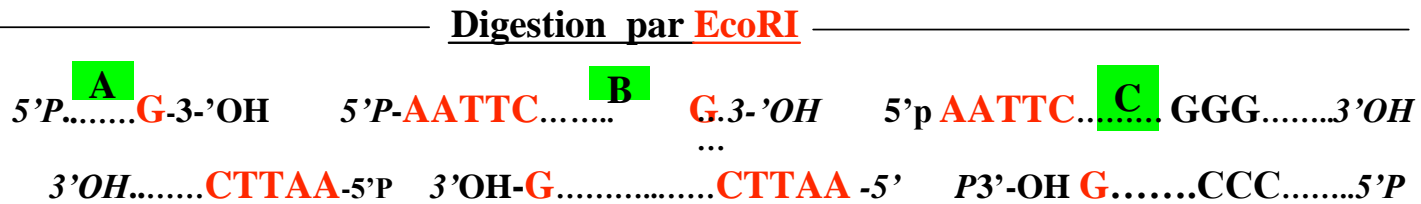
Toutes les extrémités franches sont compatibles : peuvent être associées par une liaison covalente par une ligase

2. Les enzymes: endonucléases de restriction

Coupures décalées (dépassantes, cohésives)



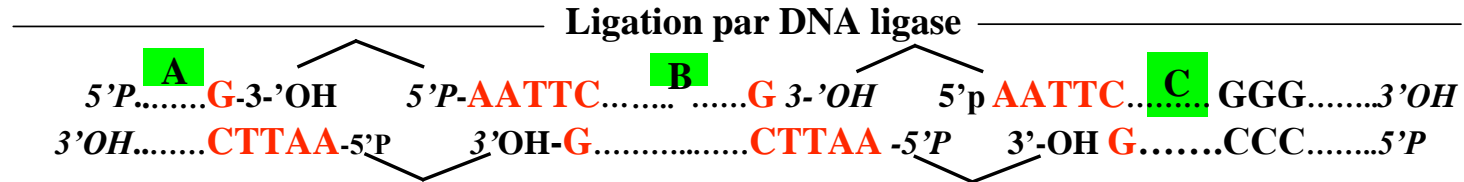
Coupures décalées (5'dépassantes ou 3' dépassantes) mais identiques sur les 2 brins



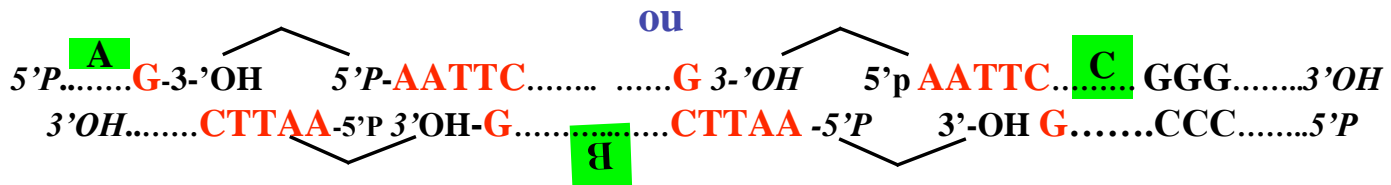
Génère 3 fragments A B C et des extrémités dépassantes en 5' qui peuvent se réhybrider entre elles Extrémités cohésives qui peuvent-être réassociées entre elles de façon stable par une DNA ligase (liaison phospho-ester covalente). Ces extrémités cohésives sont donc compatibles

2. Les enzymes: endonucléases de restriction

Coupures décalées



Réassociation des 3 fragments et reconstitution du fragment de départ
avec les sites EcoRI



Réassociation donnant un nouveau fragment d'ADN recombiné (B inversé)
avec reformation des sites de restriction.

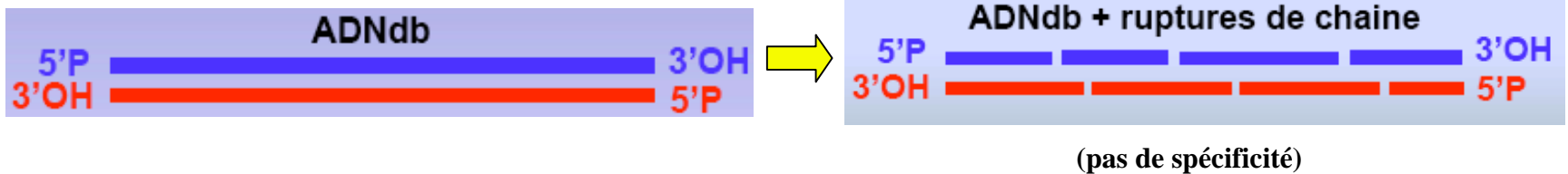
Toutes les extrémités cohésives générées par la même enzyme sont compatibles (ligase)

2. Les enzymes: endonucléases de restriction

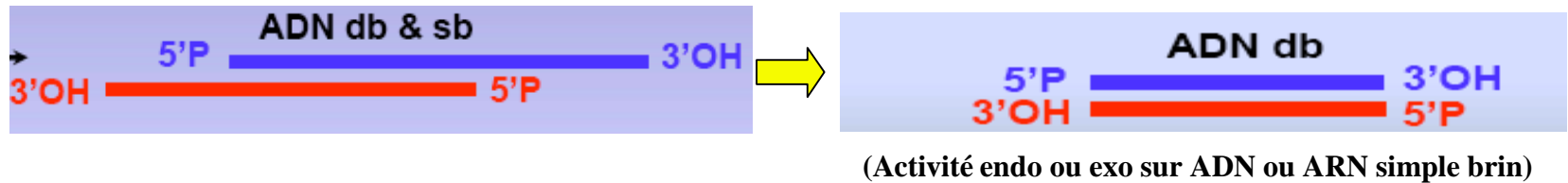
Autres nucléases

Autres ADN endonucléases

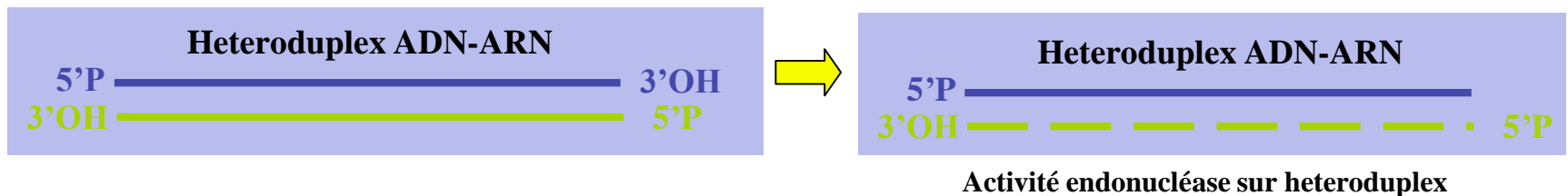
Ex : DNase I pancréatique



Nucléase S1



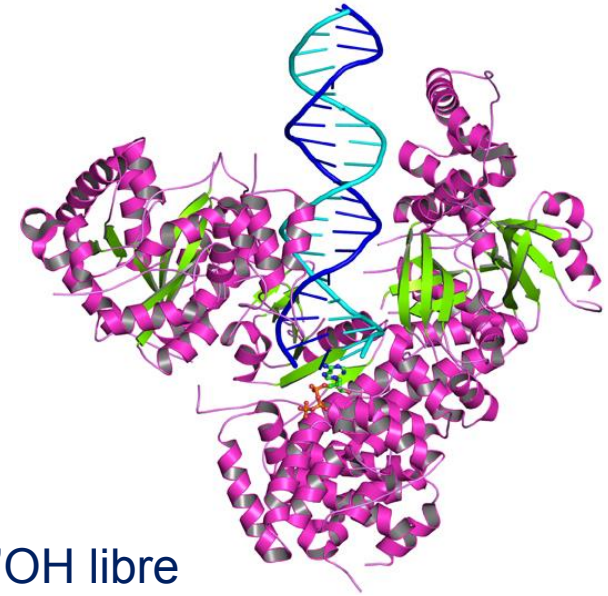
RNase H



2. Les enzymes: DNA polymérases

Pour **synthétiser de l'ADN** il faut

- une DNA Pol
- les 4 désoxyribonucléotides (dNTP)
- une matrice et
- une amorce (ADN ou ARN) qui a une extrémité 3'OH libre



DNA Pol III alpha subunit
J. Mol. Biol. 382, 859-869

L'activité 5'-3' polymérase est l'activité de synthèse

L'activité 3'-5' exonucléase permet une correction des nucléotides non appariés

L'activité 5'-3' exonucléase (présente seulement chez la Pol I bactérienne) catalyse une dégradation des extrémités 5'

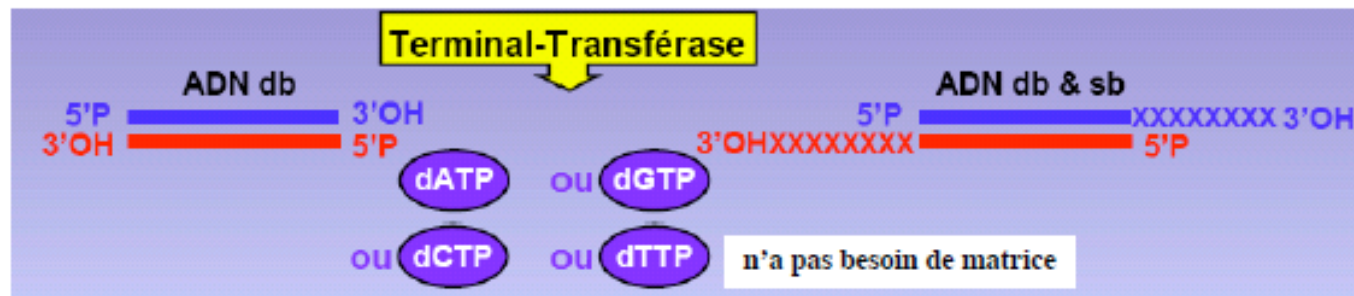
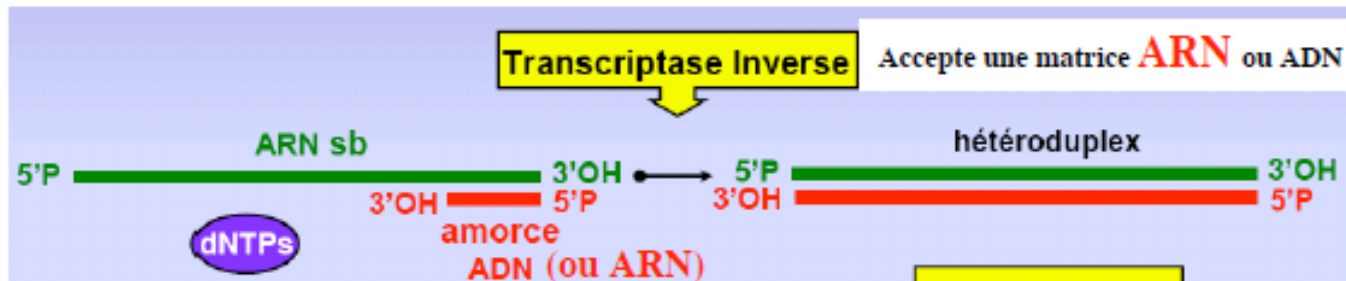
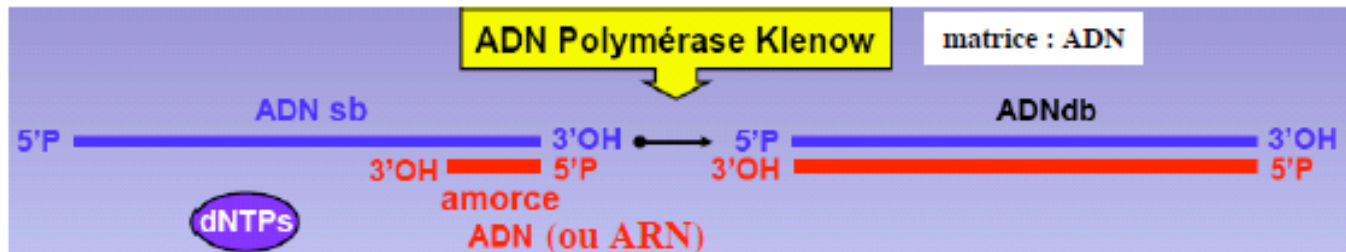
2. Les enzymes: DNA polymérases

Rappel : DNA polymérases in vivo

		Procaryotes			Eucaryotes			
		Pol I	Pol II	Pol III	Pol α	Pol β	Pol γ	Pol δ
Fonction		Réplication	Réparation	Réplication	Réplication	Réparation	Réplication	Réplication
Activité	5'-3'Pol	+	+	+	+	+	+	+
	3'-5'Exo	+	+	+	-	+	+	+
	5'-3'Exo	+	-	-	-	-	-	-

2. Les enzymes: DNA polymérases

Les DNA polymérases utilisées *in vitro*



ADN polymérases thermo-résistantes :

Taq DNA pol
Pfu DNA pol

2. Les enzymes: RNA polymérases

RNA polymérases utilisées in vitro

Rappel : Synthèse d'ARN : il faut une enzyme (ARN polymérase), un promoteur (ADN dbrin reconnu par l'ARN polymérase), des ribonucléotides triphosphates (NTP : ATP,UTP,GTP,CTP) mais pas d'amorce

Bactéries : ARN Polymérase I (5sous-unités)

Eucaryotes : ARN Polymérase I, II, III (plus de 12 sous-unités)

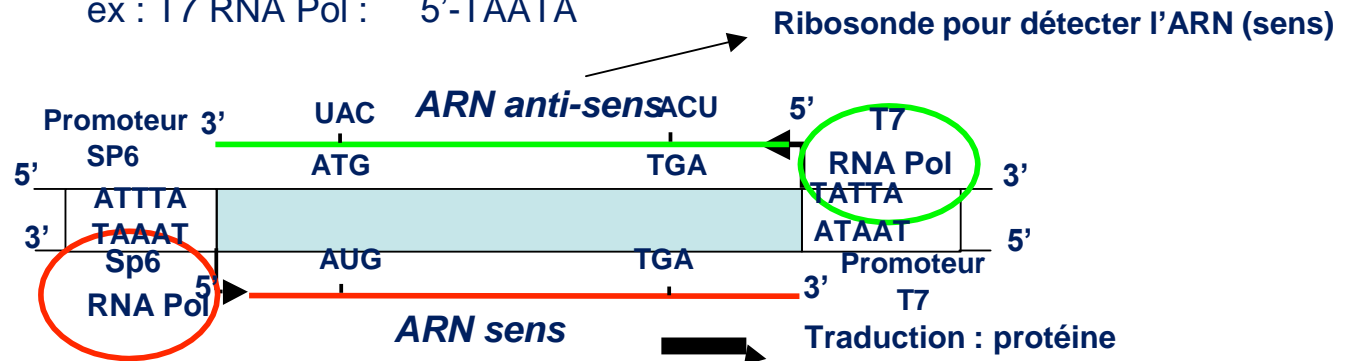
Génie génétique : RNA polymérases de bactériophages

plus simple : une seule unité à ajouter pour faire une transcription in vitro pas besoin de facteurs accessoires

plus spécifique: reconnaissent des séquences très précises (promoteurs)

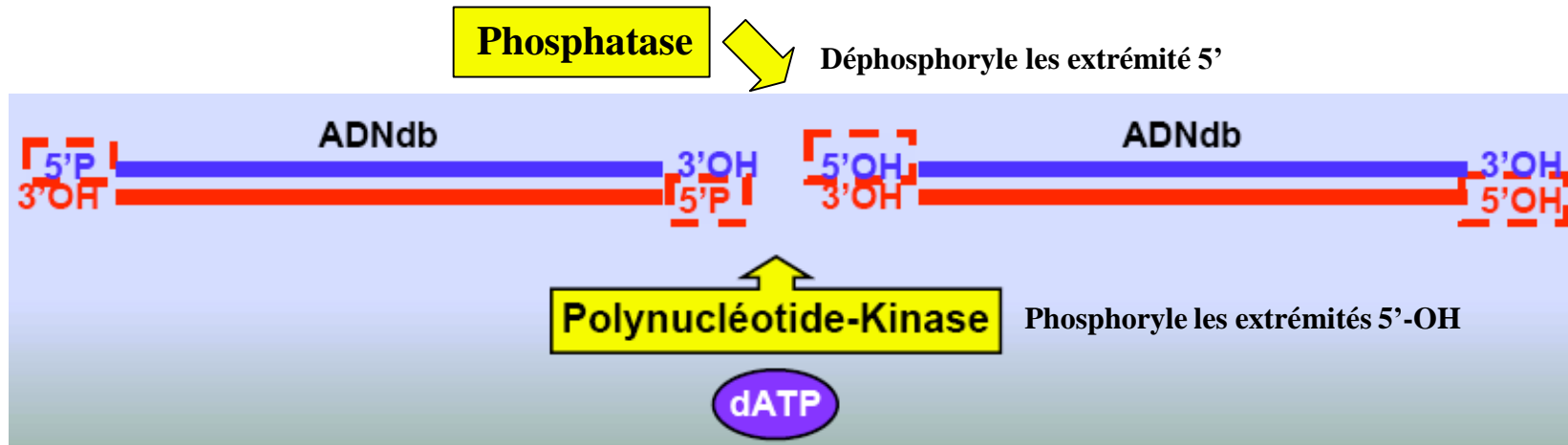
ex : SP6 RNA Pol : 5'-ATTTA

ex : T7 RNA Pol : 5'-TAATA

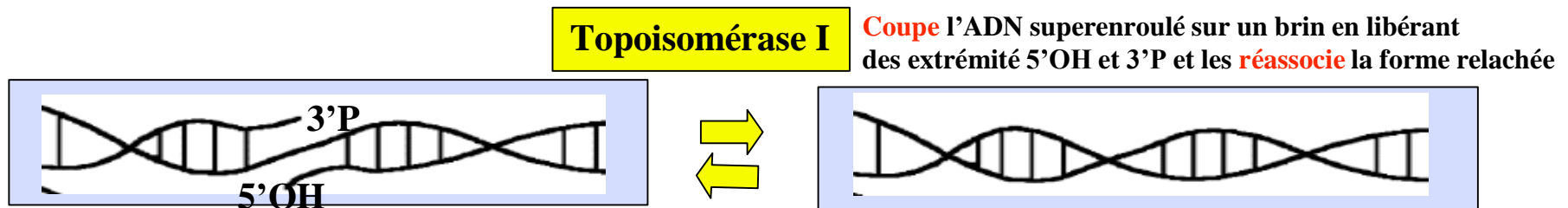
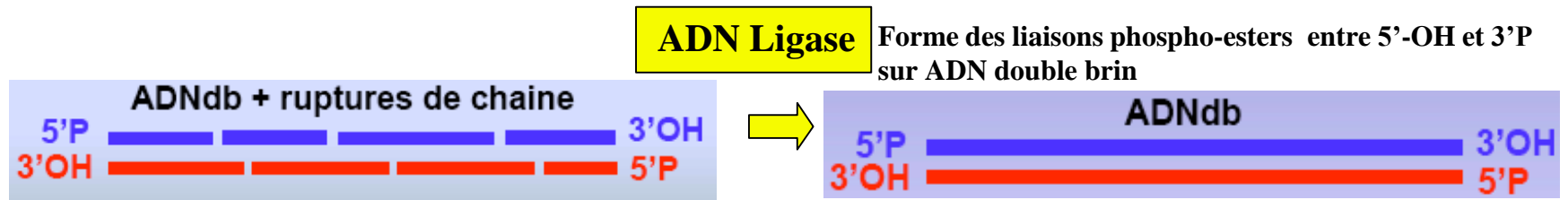


En plaçant un fragment d'ADN entre les promoteurs SP6 et T7, orientés pour avoir une transcription en sens opposés, on peut obtenir par transcription des ARN sens (ici en utilisant la RNA pol SP6) et des ARN anti-sens (ici en utilisant la RNA Pol T7).

2. Les enzymes: autres activités



■



2. Les enzymes: synthèse

POLYMERASES		
ADN Pol I	Pol 5'-3' Exo 3' 5' Exo 5' 3'	Synthèse d'ADN
Fragment de Klenow	Même que l'ADN Pol I Dépourvue d'Exo 5'-3'	Séquençage, synthèse de sondes
Taq polymérase	Pol 5'-3'	PCR
ARN Pol T3, T7, SP6	Synthétisent un brin d'ARN à partir d'un promoteur spécifique et d'une matrice d'ADN	Synthèse de ribosondes
Terminale transférase	Ajoute des nucléotides à l'extrémité 3' d'un monobrin	Sondes oligonucléotidiques
Reverse transcriptase	Synthétise un brin d'ADN à partir d'une matrice d'ARN	Préparation d'une banque d'ADNc
LIGASES		
T4 ADN ligase	3'OH-P5'	Liaisons phosphate au niveau de l'ADN (bouts francs ou cohésifs). Sous-clonage
T4 ARN ligase	3'OH-P5'	Idem au niveau de l'ARN
KINASE		
T4 polynucléotide kinase	OH5'----P5'	Marquage P terminal
PHOSPHATASE		
Phosphatase alcaline	P5'-----OH5'	Sous-clonage

2. Electrophorèse des acides nucléiques

Séparation des ARN et des ADN par migration dans un gel placé dans un champ électrique

2 types de gel : Agarose (polymère d'agarobiose)

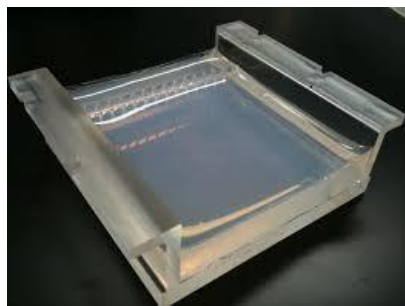
polymérisation par refroidissement

Séparation de molécules ou de fragments de 100 à 50 000 nucléotides

Polyacrylamide (polymère d'acrylamide)

polymérisation induite par des catalyseurs

Séparation de molécules ou de fragments de taille inférieure à 1000 nucléotides



Migrations : 2 Conditions possibles

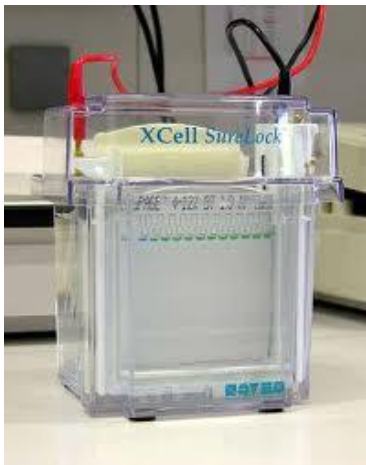
Conditions non dénaturantes

l'ADN migre sous la forme double brin et est linéaire

l'ARN, simple brin, a une structure non linéaire (auto-appariements)

Conditions dénaturantes

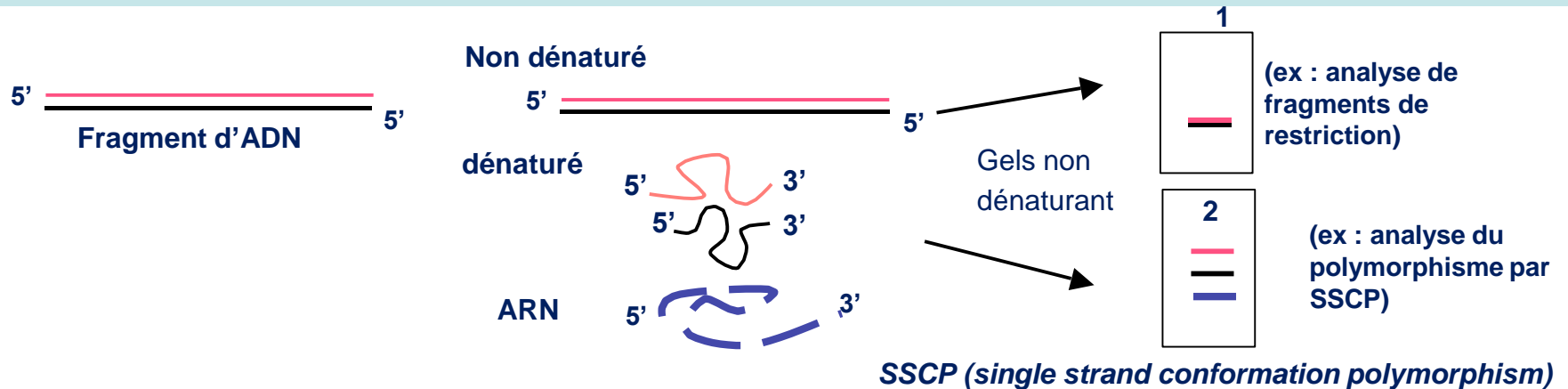
ARN et ADN migrent sous la forme « simple brin » linéaire



2. Electrophorèse des acides nucléiques

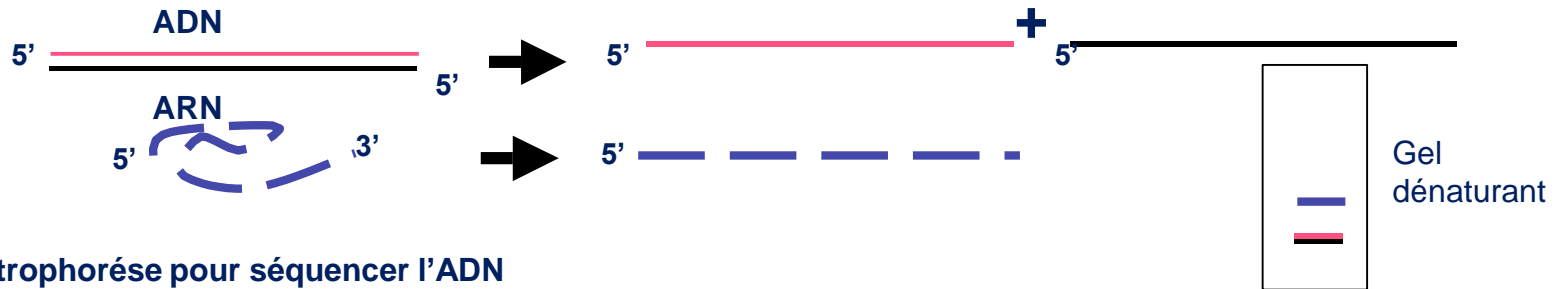
GEL non dénaturant :

- l'ADN double brin (non dénaturé) linéaire migre en fonction de sa taille (1)
 - l'ADN simple brin (dénaturé) et l'ARN migrent en fonction de leur taille et de leur conformation (2).
- Deux brins de même taille mais de séquence différente pourront être séparés



GEL dénaturant

- chacun des brins d'ADN ou chaque ARN migre en fonction de sa taille



Ex : -Electrophorèse pour séquencer l'ADN

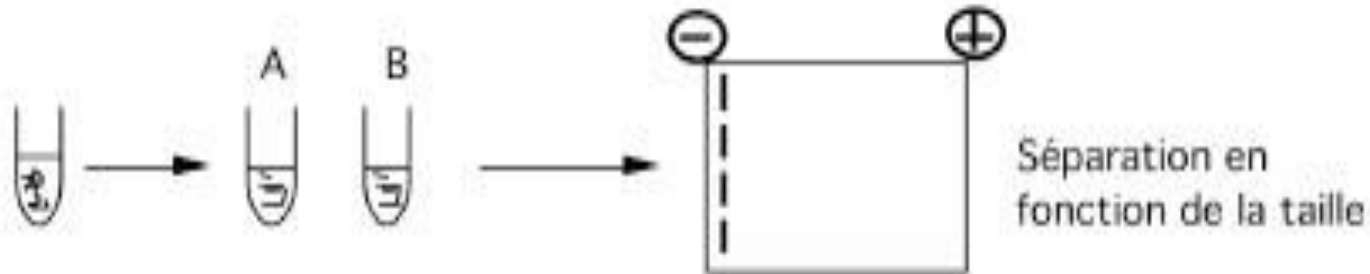
-Electrophorèse pour séparer les ARN en fonction de leur taille (northern blot)

2. Electrophorèse des acides nucléiques

Electrophorèse dans un gel non dénaturant

Ex : Analyse de la taille de fragments d'ADN

1- Digestion et migration (ex : Plasmide circulaire)

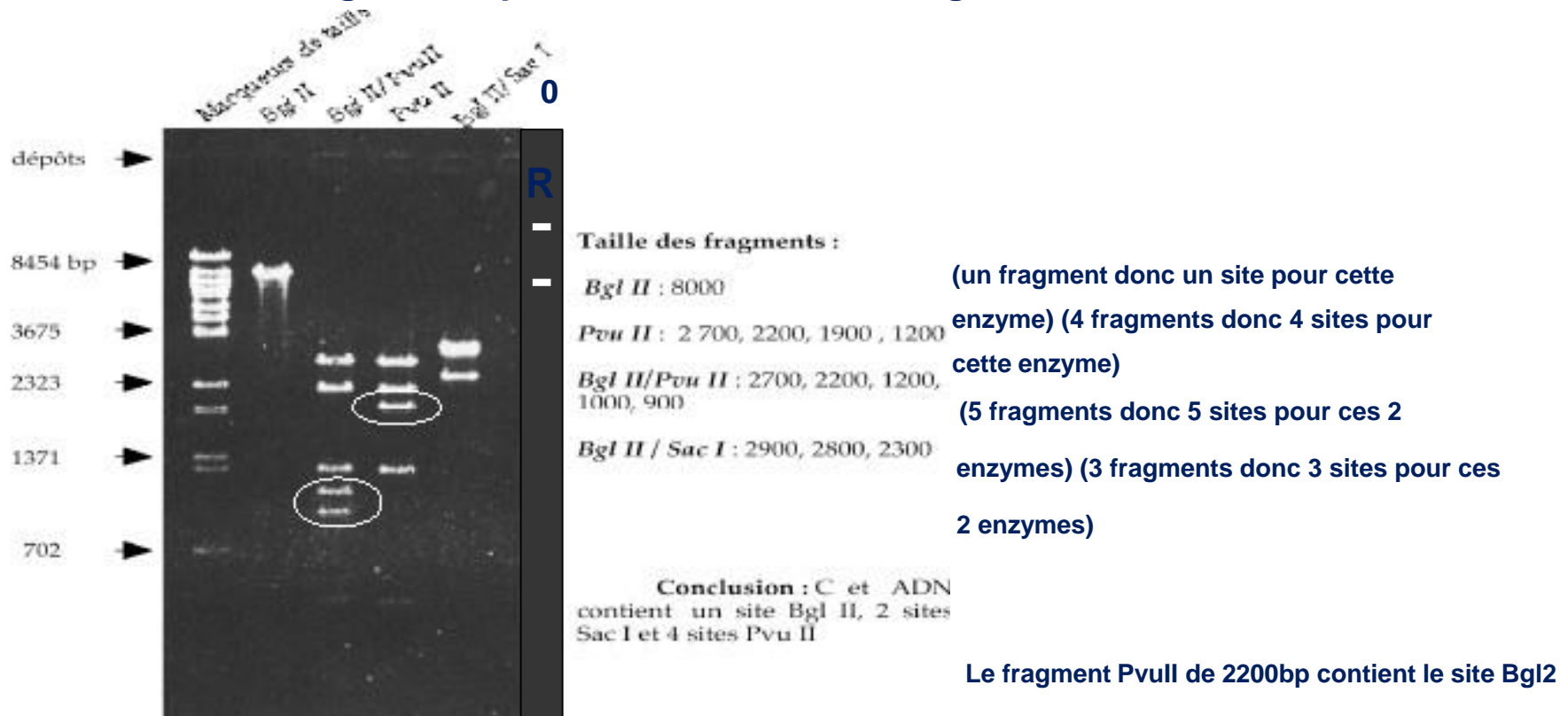


Une fraction aliquote des produits de digestion d'un ADN circulaire est déposée sur un gel d'agarose 1% avec des fragments d'ADN de taille connue (marqueurs de taille). Après migration le gel est coloré par le bromure d'éthidium et les fragments d'ADN fluorescents sont révélés par éclairage aux Ultra violets.

2. Electrophorèse des acides nucléiques

Electrophorèse dans un gel non dénaturant

2- Révélation des fragments après coloration avec un agent intercalant



2. Electrophorèse des acides nucléiques

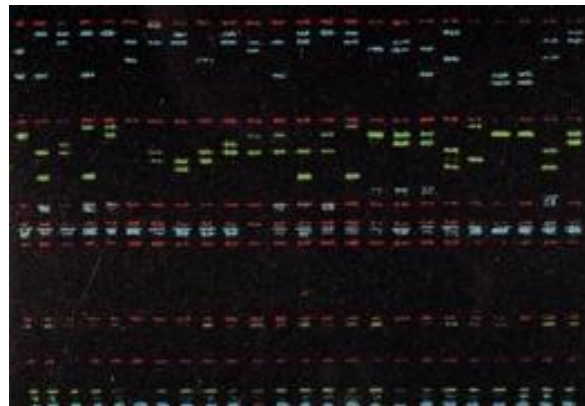
Electrophorèse dans un gel non dénaturant

En conditions non dénaturantes, **les fragments d'ADN double brin** linéaires migrent en fonction de leur taille.

Les **ADN circulaires** migrent en fonction de leur **taille et de leur conformation** (relâchée ou surenroulée) (voir témoin 0)

Applications :

- Carte de restriction : position des sites de restriction sur un fragment d'ADN
- Analyse du polymorphisme des séquences satellites (tailles différentes)
- Analyse de polymorphisme de conformation (SSCP)



2. Electrophorèse des acides nucléiques

Electrophorèse dans un gel non dénaturant

Calcul de la taille des fragments : établissement d'une carte de restriction (ADN non dénaturé)

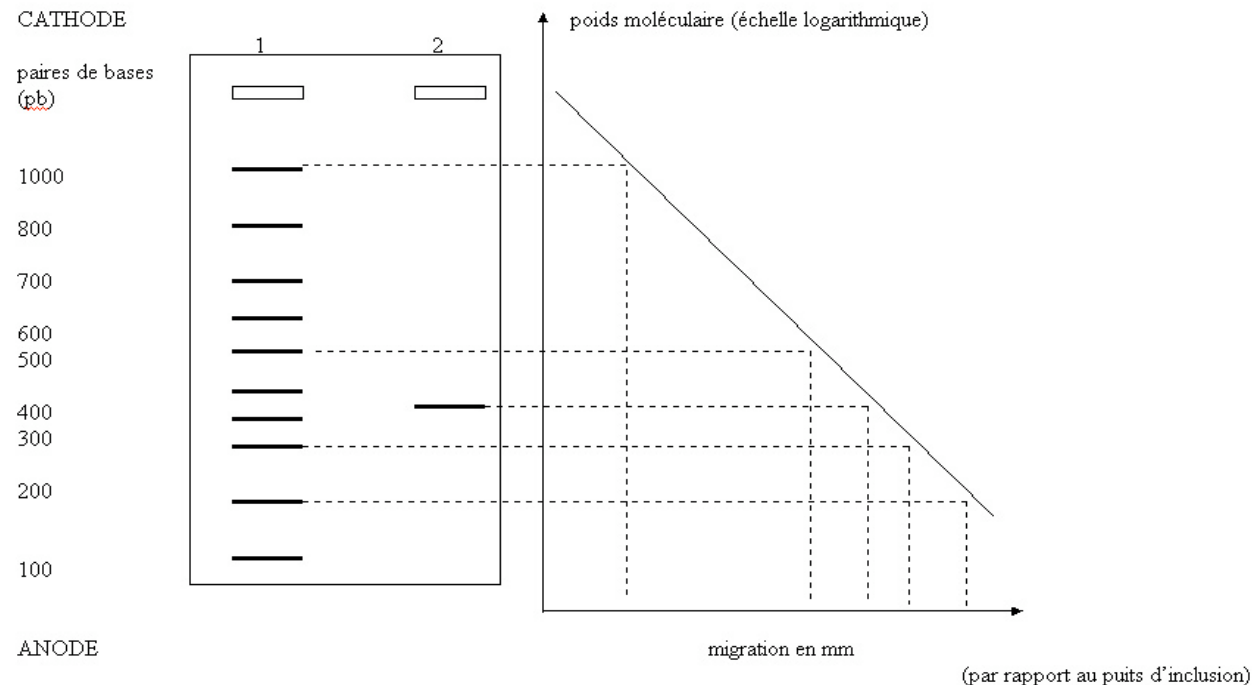


FIGURE DE GAUCHE:

- PISTE 1: Marqueurs de taille (en paires de bases).
- PISTE 2: Echantillon d'ADN dont la taille est à déterminer.

FIGURE DE DROITE:

- Courbe d'étalonnage en abscisses, les distances par rapport au puits d'inclusion: et en ordonnées les poids moléculaires (échelle logarithmique).

2. Electrophorèse des acides nucléiques

Electrophorèse dans un gel non dénaturant

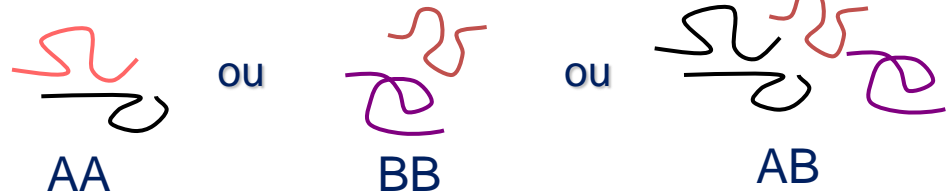
Ex : Recherche de polymorphisme allélique par SSCP

1-Echantillon d'ADN provenant d'un individu (2 allèles A? 2 allèles B ? ou 1 allèle A et un allèle B)?



2-Dénaturation de l'ADN

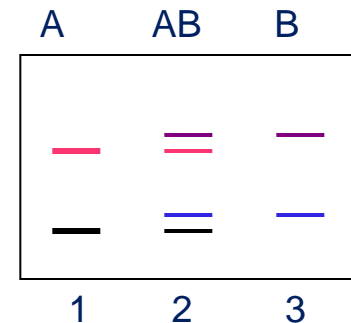
+ renaturation partielle



3-Migration sur un gel non dénaturant.

Chacun des brins des deux allèles migre suivant sa conformation qui est liée à sa séquence nucléotidique

(gel non dénaturant)



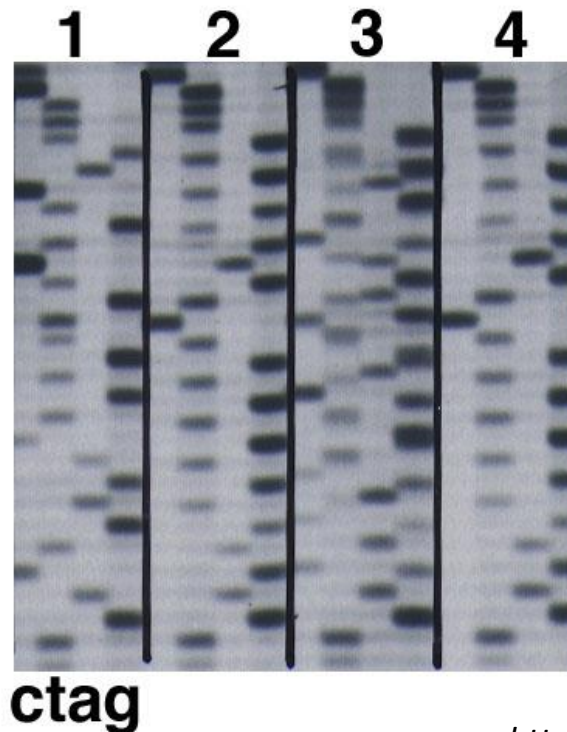
1 et 3 : 2 bandes donc 1 allèle
 individus homozygotes avec deux allèles différents
2 : 4 bandes donc deux allèles
 individu hétérozygote

2. Electrophorèse des acides nucléiques

Electrophorèse dans un gel dénaturant

Applications

- Recherche de polymorphisme de séquence entre deux allèles
DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)
- Séquençage de l'ADN
- Analyse des ARNs en fonction de leur taille (northern blot)



2. Blotting

Blotting: transfert du contenu du gel sur un support solide

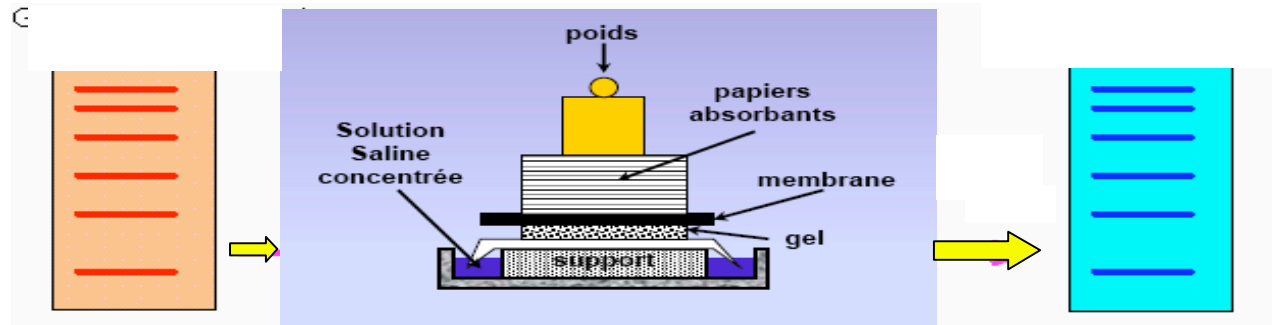
1. TRAITEMENT DE L'ADN DANS LE GEL D'AGAROSE

- Dépurination : HCl
 - Dénaturation : NaOH (+NaCl)
 - Neutralisation : Tris-HCl IM pH 7.8 (+NaCl)
- Pour l'ARN (simple brin) pas de traitement du gel



Sr Edwin Southern

2. TRANSFERT DE L'ADN SUR MEMBRANE DE NYLON (Southern blot)



2. Blotting

Blotting: transfert du contenu du gel sur un support solide

3. FIXATION DE L'ADN SUR LE NYLON

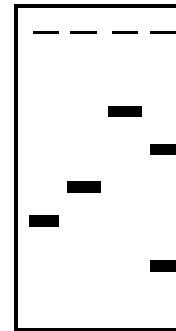
Ultra-violet, +80°C

4. REVELATION D'UNE SEQUENCE SPECIFIQUE

Hybridation à une sonde nucléique

Etapes de l'hybridation

- Préhybridation
- Hybridation
- Lavage
- Révélation

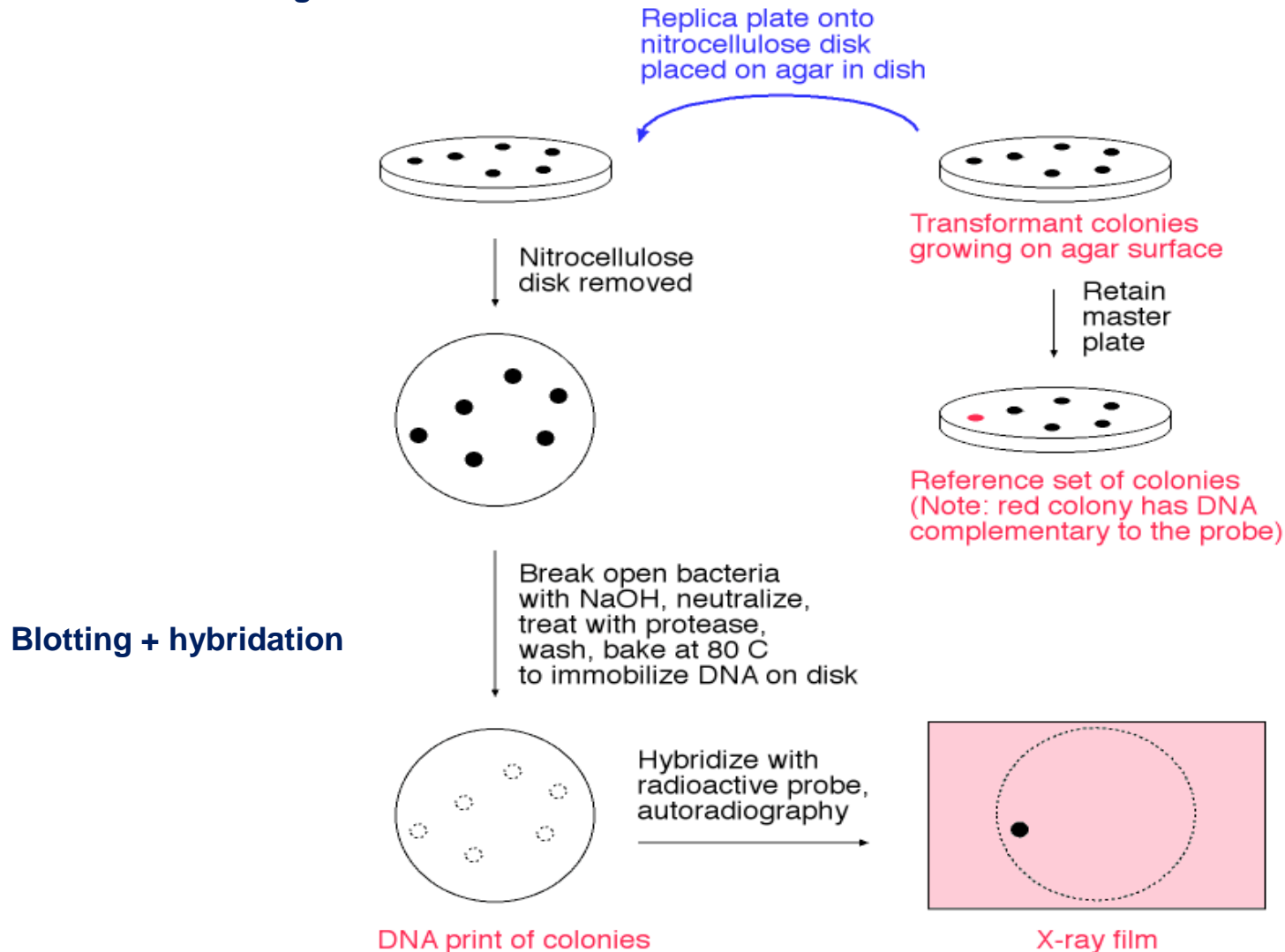


Applications et types du blotting:

- Identification de fragments d'ADN par hybridation (**Southern** blot ou Dot blot)
- Identification d'ARNm par hybridation (**Northern** blot)
- **Identification de colonies** bactériennes par hybridation de leur ADN
- Autres types de blotting: Western, Far Eastern

2. Blotting de colonies bactériennes (criblage de banque)

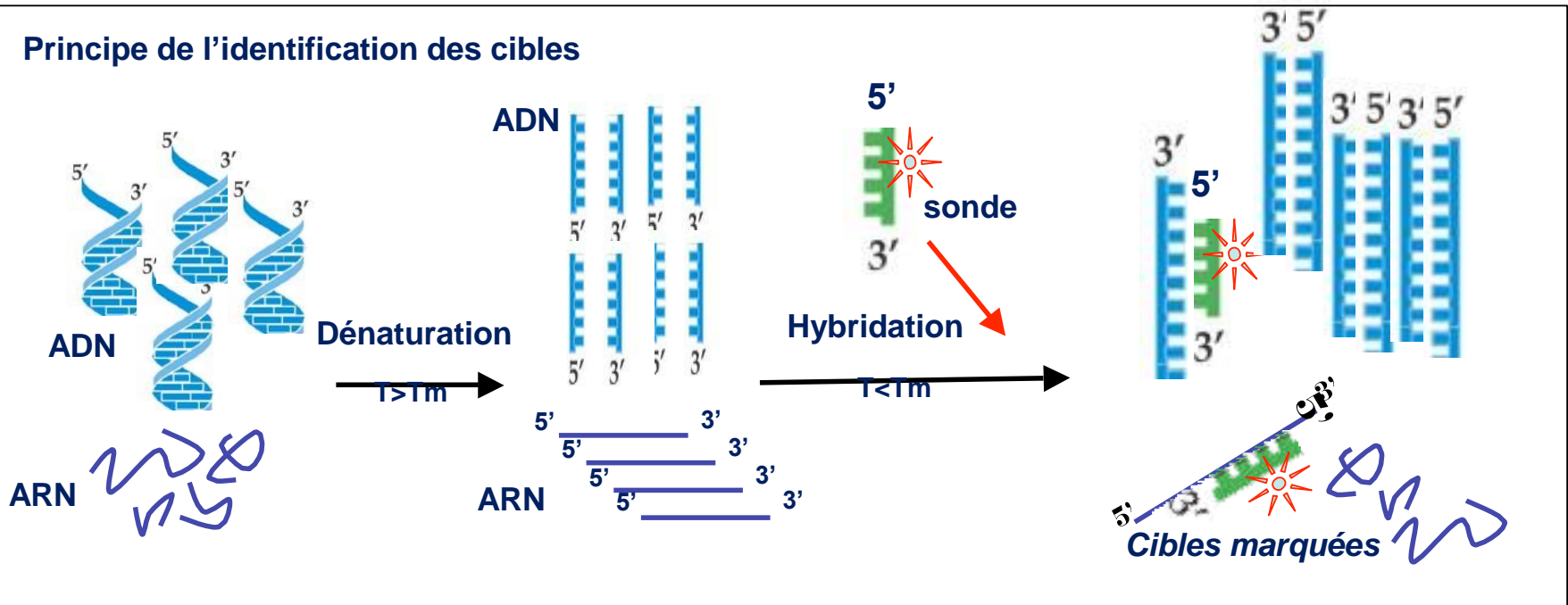
Comment identifier par blotting une colonie de bactéries ayant incorporé un ADN étranger



2. Sondes nucléotidiques

Sondes nucléotidiques : fragment d'ADN ou d'ARN **bien caractérisé** utilisé pour identifier par hybridation des fragments des molécules d'ARN ou d'ADN (**cibles**).

Principe de l'identification des cibles



Les différents types de sonde

- ADN : oligosondes : petits fragments ADN simple brin (15-30 nt) synthétiques. fragments d'ADN double-brin (100à 1000bp)
- ARN : ribosondes. ARN synthétisé in vitro par transcription d'un fragment d'ADN

2. Sondes nucléotidiques: marquage

Les marqueurs

- radioactifs : nucléotides radioactifs (^{32}P , ^{35}S , ^3H) en α ou en γ
- froids : ligand couplé sur la base d'un nucléotide biotine, digoxygénine, fluorochrome

Les techniques de marquage des sondes ADN

- Aux extrémités 5'

Transfert d'un phosphate R^* à un nucléotide ($\gamma\text{-NTP}$) par la T4 kinase

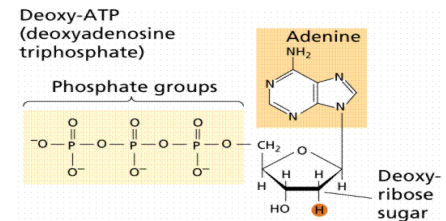
- Aux extrémités 3' de la sonde

Incorporation, par la T.Transférase (DNA pol), d'un nucléotide marqué
ex : dNTP marqué sur le PO_4 en α ou avec base couplée à un ligand

- Uniforme (multiamorçage aléatoire)

Incorporation, par une DNA polymérase, de nucléotides marqués

ex : dNTP marqué sur le PO_4 en α ou avec base couplée à un ligand



Les techniques de marquage des sondes ARN

- Uniforme : transcription in vitro d'un ARN à partir d'un fragment d'ADN

Synthèse d'un ARN par une RNA Pol avec incorporation de ribonucléotides marqués (sur le PO_4 en α ou base couplée à un ligand)

2. Sondes nucléotidiques

PREPARATION DES SONDES NUCLEIQUES

I- LES DIFFERENTS TYPES DE SONDE.

- **SONDE S ADN** : fragment d'adn cloné (Insert)
oligonucléotide obtenu par synthèse chimique
- **SONDE S ARN** : arn transcrit à partir d'un adn cloné dans un vecteur d'expression.

II- LES TECHNIQUES DE MARQUAGE.

- Marquage d'un fragment d'ADN par multi-amorçage aléatoire (Random-priming).

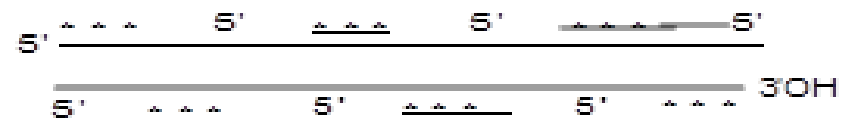
ADN linéarisé et dénaturé



Hybridation avec des hexamères



Extension des amorces



- Marquage d'un oligonucléotide

Terminal transférase

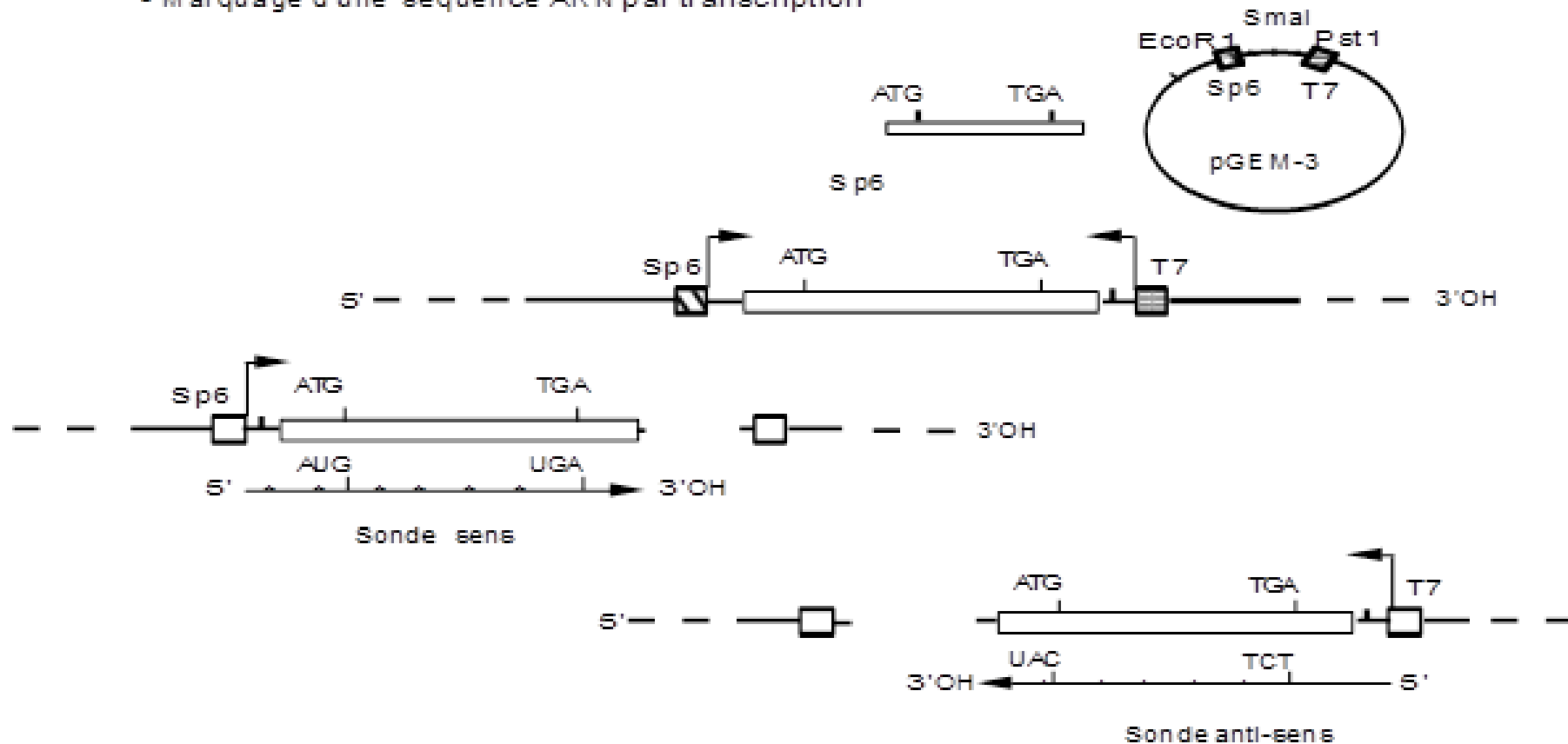


Polynucléotide kinase



2. Sondes nucléotidiques

- Marquage d'une séquence ARN par transcription



2. Sondes nucléotidiques: random priming

Marquage par random priming



2. Sondes nucléotidiques: étapes de l'hybridation

Le but : reconnaissance par la sonde de la séquence cible et que de la séquence cible

1- Préhybridation

Etape de saturation de sites de fixations non spécifiques par addition d'ADN de sperme de saumon dans le milieu de préhybridation

Température $15-20^{\circ}\text{C} < T_m$

2- Hybridation

Ajout de la sonde préalablement dénaturée (linéaire et simple brin) soit par chauffage soit par la soude (si ADN). Mêmes conditions de stringence que la préhybridation

3- Lavages

Éliminer les fixations non spécifiques de la sonde : augmenter la stringence

Deux paramètres : on augmente la température et/ou on diminue la concentration en sel

4-Révélation des hybrides

Dépendante du système de marquage et de l'objet hybridé

En général, pour un Southern blot ou Northern blot hybridé avec une sonde radioactive :

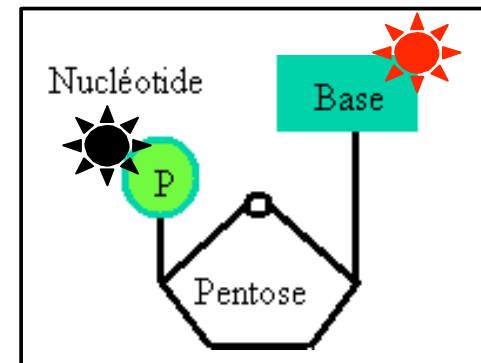
soit par autoradiographie , soit appareil de détection Storm)

2. Sondes nucléotidiques: révélation des hybrides

La révélation peut être **directe** ou **indirecte**

-Révélation directe

- Sondes radioactives : autoradiographie
- Sondes Fluorescentes : fluorimétrie



2. Sondes nucléotidiques: révélation des hybrides

-Révélation Indirecte :

-Sondes marquées à la digoxygénine

Anticorps -fluorescent

-couplé à une enzyme

-substrat S donne P

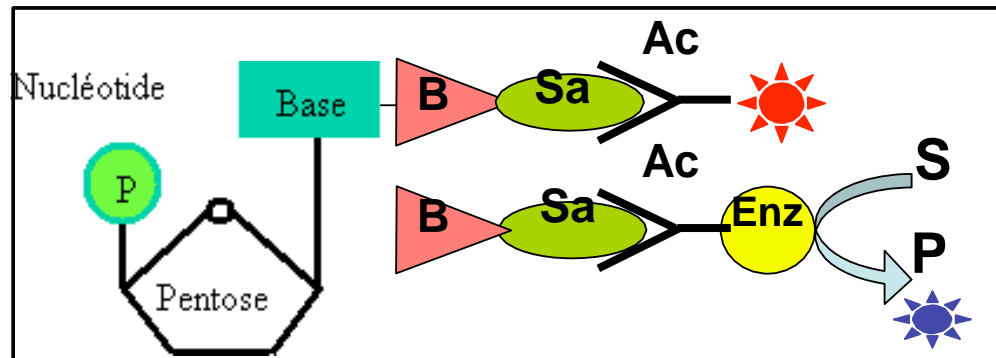
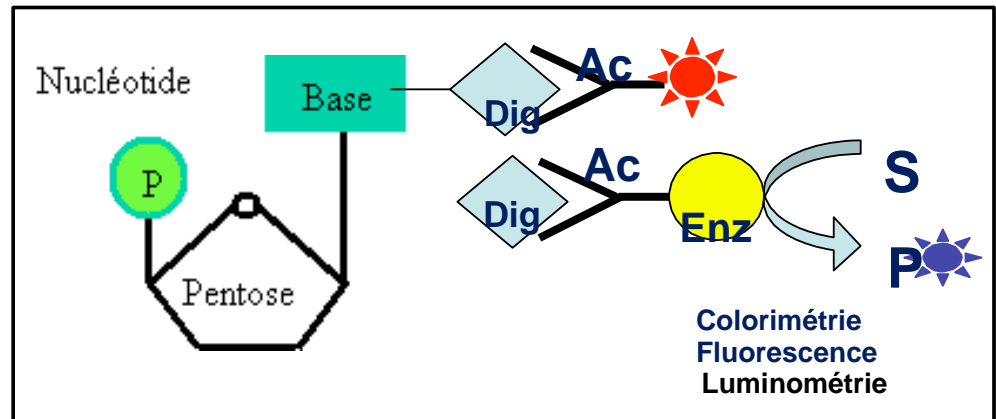
-dosage du produit P

-Sondes marquées à la biotine

Streptavidine -couplée à une enzyme

-substrat S donne P

-dosage du produit P



2. Sondes nucléotidiques: applications

Southern blot : carte de restriction, RFLP, identification de bandes

Northern blot : appréciation de la distribution d'un ARN dans un tissu, son abondance, sa taille, les intermédiaires d'épissage et de maturation

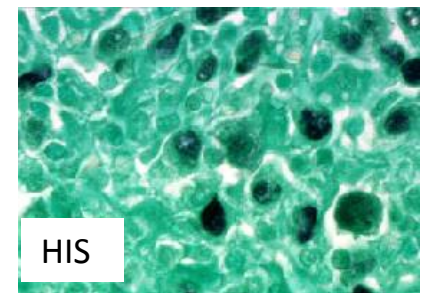
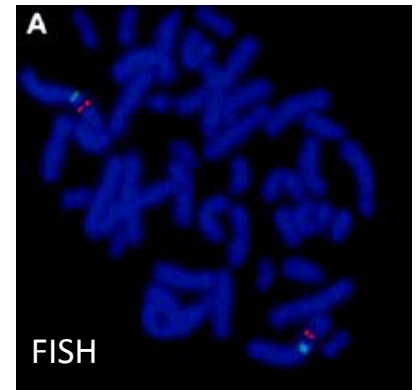
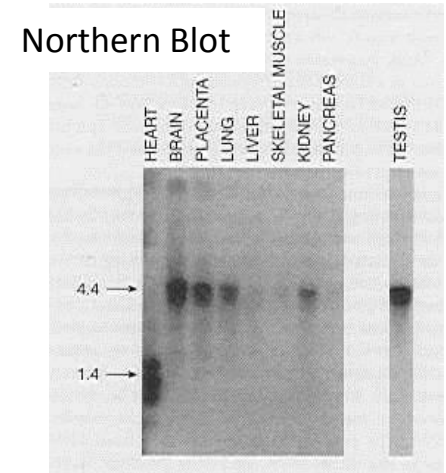
Dot blot : dépôt en dot d'ARN ou d'ADN , qualitatif

Criblage de banque : isolement d'un clone contenant la séquence recherchée

FISH : hybridation in situ en fluorescence, localisation d'un gène sur les chromosomes

HIS : hybridation in situ, localisation du site de synthèse de la protéine dans un tissu

Microarrays : analyse quantitative de l'expression d'un grand nombre de gènes. La sonde (séquence connue) est immobilisée sur un support et c'est la cible qui est marquée



2. Vecteurs de clonage

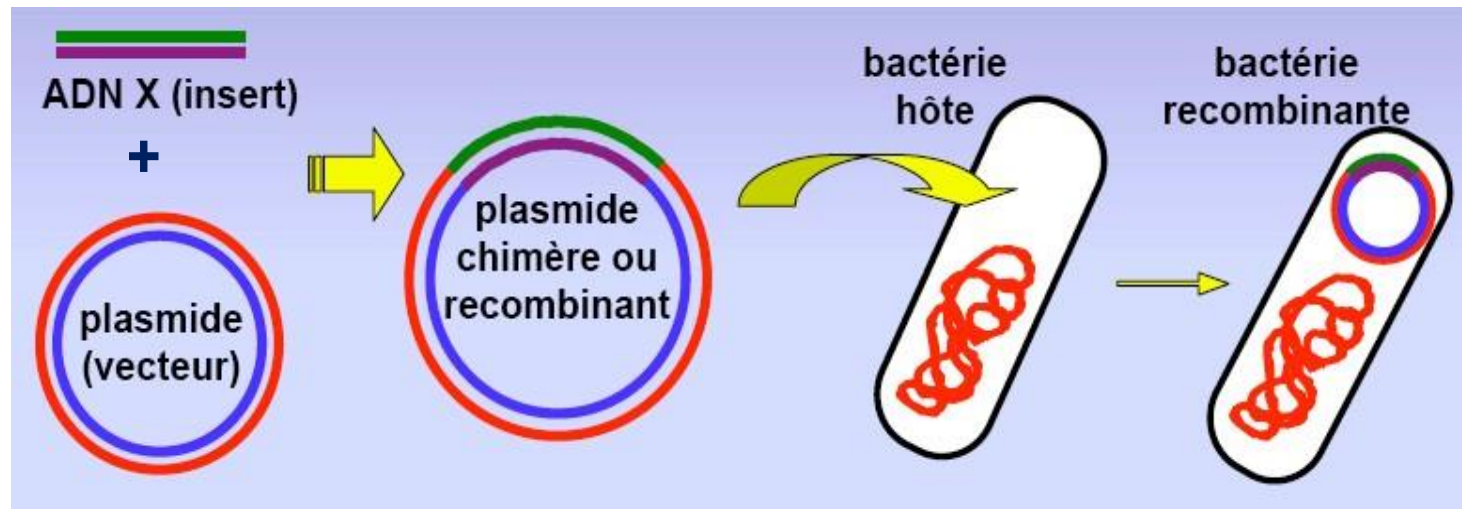
Vecteur : Molécule d'ADN capable de se répliquer utilisée pour transporter un fragment d'ADN

Taille maximum approximative du fragment d'ADN qui peut être cloné dans chaque vecteur

Type de vecteur	ADN cloné en kb
Plasmide	10
Phage lambda	25
Cosmide	45
Phage P1	100
BAC (bacterial artificial chromosome)	300
YAC (yeast artificial chromosome)	1000

(Plasmide avec des séquences cos pouvant être empaqueté pour former un bactériophage)

Ex : utilisation d'un plasmide pour introduire un ADN étranger dans une bactérie



2. Vecteurs de clonage: plasmides

Plasmide : ADN double brin circulaire pouvant se répliquer de façon autonome dans une bactérie et contenant un ou plusieurs gènes

Caractéristiques d'un plasmide utilisé comme vecteur de clonage

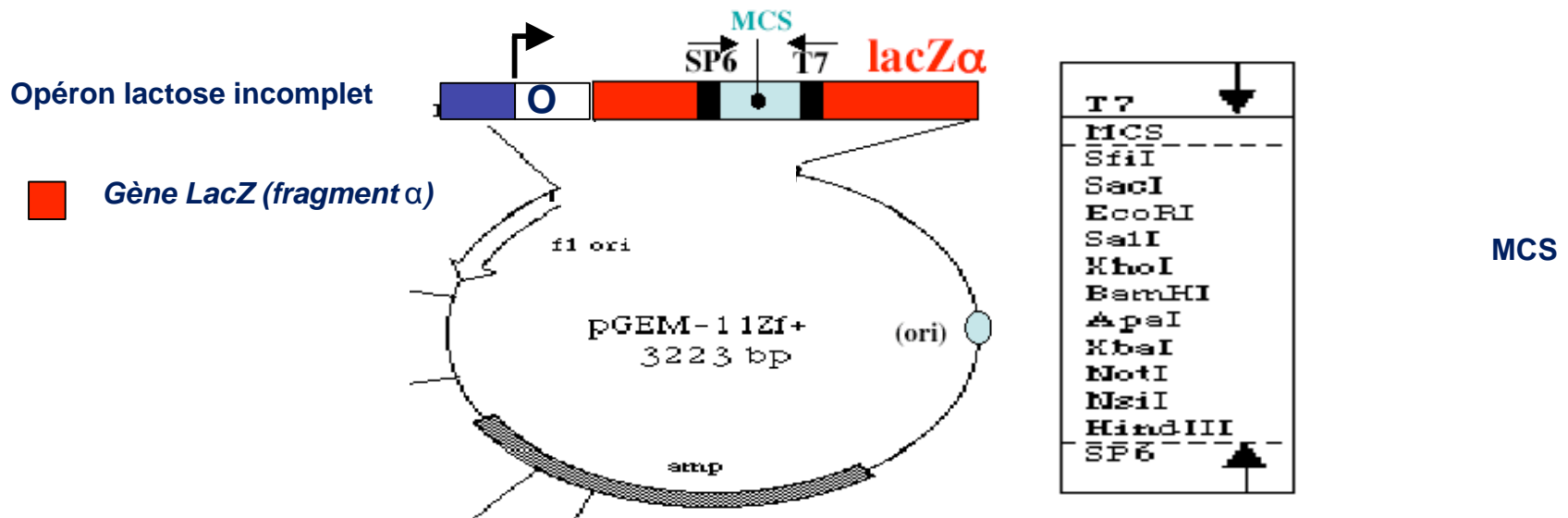
- Une origine de réplication (ori)
- Un site d'insertion pour l'ADN étranger : polylinker ou MCS (Multiple Cloning Site)
- Un gène de résistance aux antibiotiques pour sélectionner les bactéries avec le plasmide(ex : ampicilline : amp)
- Un gène d'identification interrompu par l'ADN étranger pour identifier les plasmides recombinants

2. Vecteurs de clonage: plasmides

Plasmide : ADN double brin circulaire pouvant se répliquer de façon autonome dans une bactérie et contenant un ou plusieurs gènes

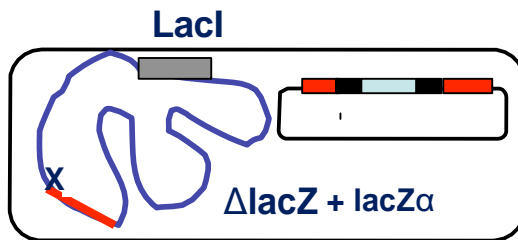
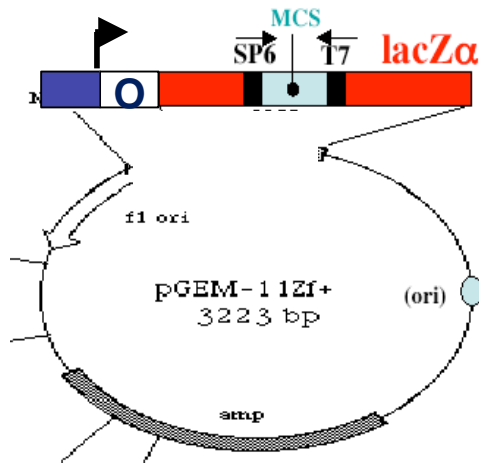
Caractéristiques spécifiques du plasmide pGEM

- - Gène de résistance à l'ampicilline
- - Gène d'identification des recombinants : une partie de l'opéron lactose (LacZ α) interrompu par le MCS
- - Un promoteur T7 et un promoteur Sp6 de part et d'autre du site de clonage

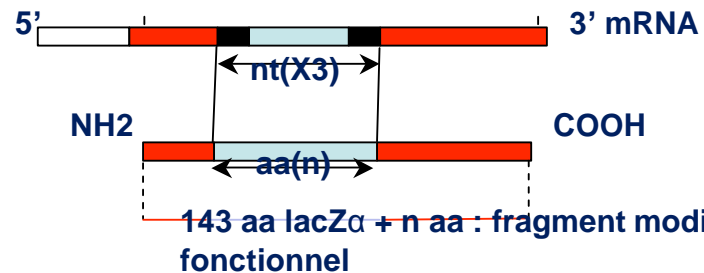


2. Vecteurs de clonage: plasmides

Identification des bactéries avec le plasmide pGEM sauvage



Transcription du promoteur donne un ARN contenant la séquence codant pour le fragment a



Bactérie transformée

Bactéries sans plasmide : gène Lac Z déficient, expriment une β -galactosidase inactive Δ LacZ. Elles sont sensibles à l'ampicilline et ne se multiplient pas

Bactéries avec plasmide sauvage : expriment la résistance à l'ampicilline (B-lactamase) et Δ lacZ + lacZ α (à partir du plasmide).

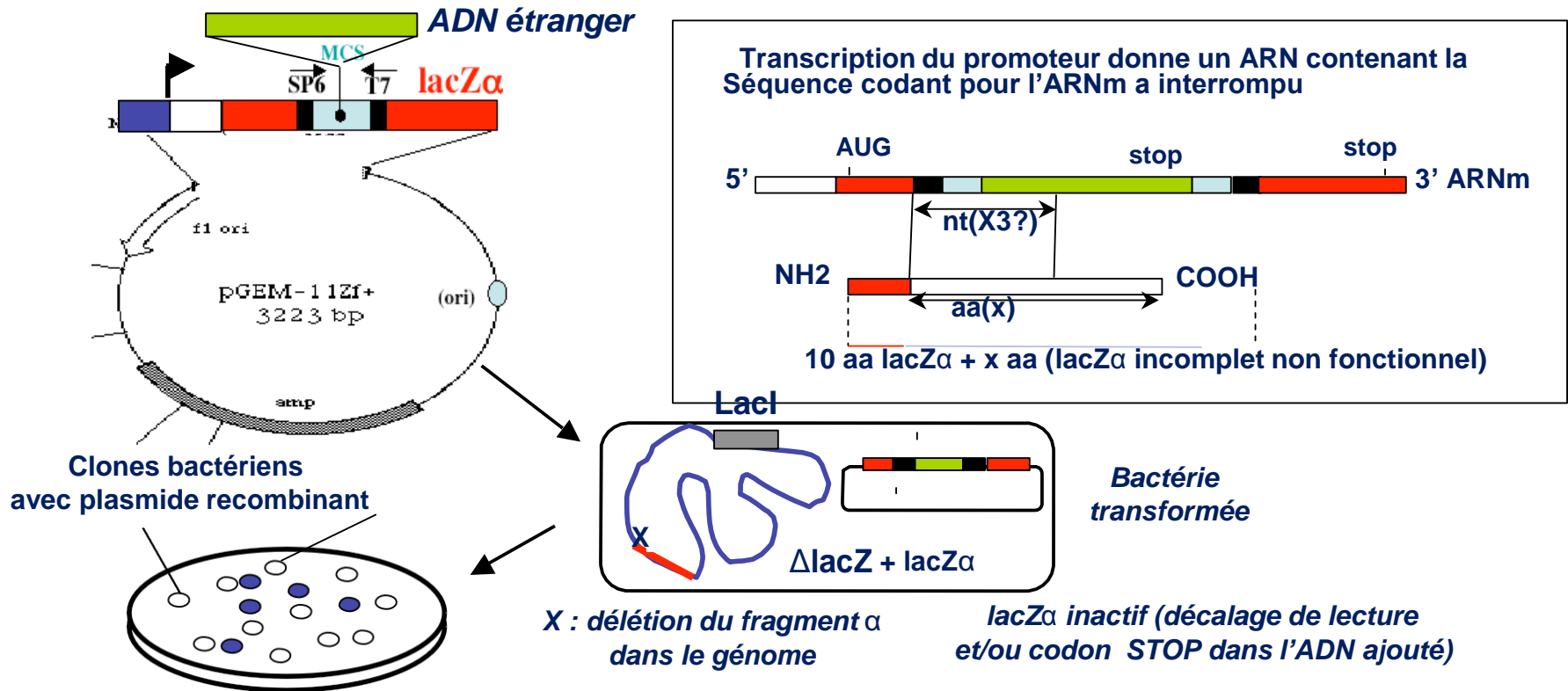
Complémentation : Activité β -galactosidase si l'inhibiteur lacI est bloqué par du lactose ou un analogue du lactose (IPTG)

Activité révélée par un substrat X-Gal transformé en X (coloré en bleu) et galactose.

Les bactéries, résistantes à l'ampicilline, sont bleues

2. Vecteurs de clonage: plasmides

Identification des bactéries avec le plasmide pGEM recombinant

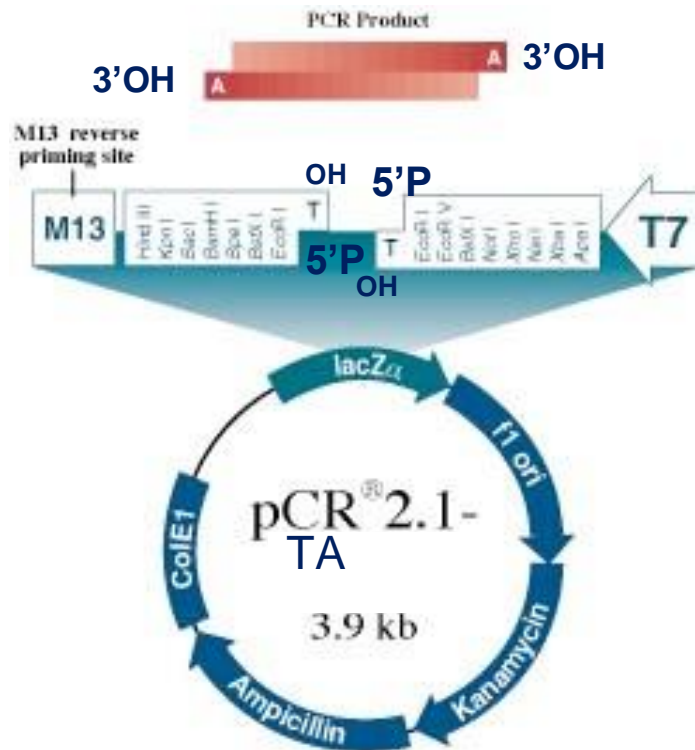


Bactéries avec plasmide recombinant : expriment la résistance à l'ampicilline (B-lactamase) et Δ lacZ + lacZα incomplet (à partir du plasmide).

Pas de Complémentation : Pas d'activité β -galactosidase même si l'inhibiteur lacI est bloqué. En présence du substrat X-Gal : les bactéries, résistantes à l'ampicilline, sont blanches (beta-gal négatives)

2. Vecteurs de clonage: plasmides

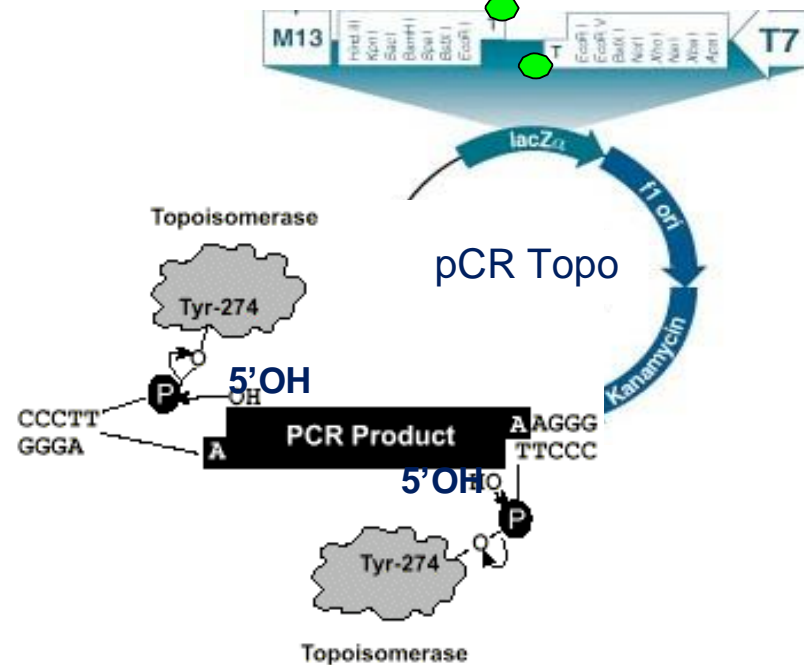
Les vecteurs de clonage TA



Particularité et intérêt :

1-extrémités 3'T dépassantes : ne peut pas se refermer sur lui-même; insertion efficace de produits de PCR (avec un A dépassant en 3') catalysée par la ligase. La ligase catalyse la formation d'une liaison covalente entre les extrémités 5'P du vecteur et les extrémités 3'OH du produit de PCR. Le vecteur est livré ouvert avec des extrémités 5'P et 3'OH.

Version Topo

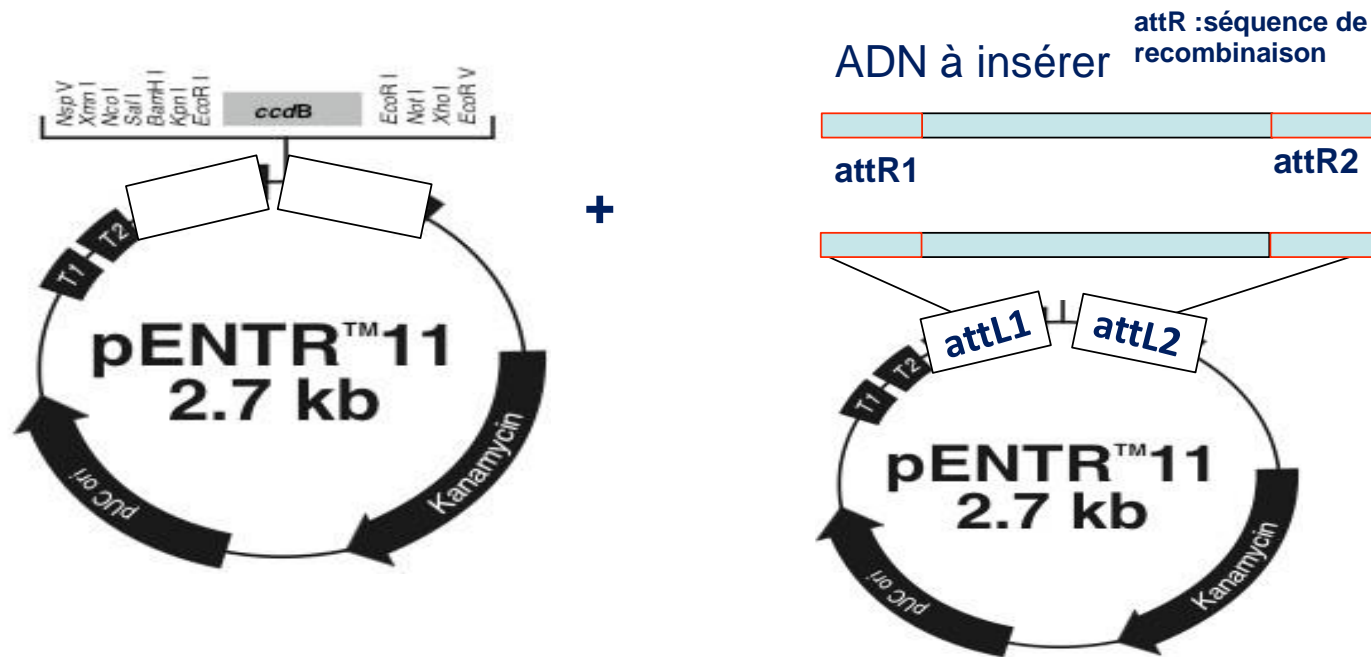


Particularité et intérêt:

1-extrémités 3'T dépassantes
2-La topoisomérase a été couplée à chaque T dépassant et phosphorylée, aux extrémités 3' du vecteur ouvert. La Topoisomérase est une autre enzyme qui peut former des liaisons phosphodiester. Quelques minutes suffisent pour catalyser la formation d'une liaison covalente entre les extrémités T 3'P du vecteur et les extrémités 5'OH du produit de PCR.

2. Vecteurs de clonage: plasmides

Le plasmide pENTER



Ce plasmide a deux caractéristiques spécifiques

- 2 séquences de recombinaison pour l'insertion de l'ADN étranger par recombinaison (recombinase)
- 1 gène d'identification des recombinants (**ccdB**) qui est un gène de toxicité

2. Vecteurs de clonage: plasmides

L'insertion de l'ADN étranger se fait par quatre mécanismes différents:

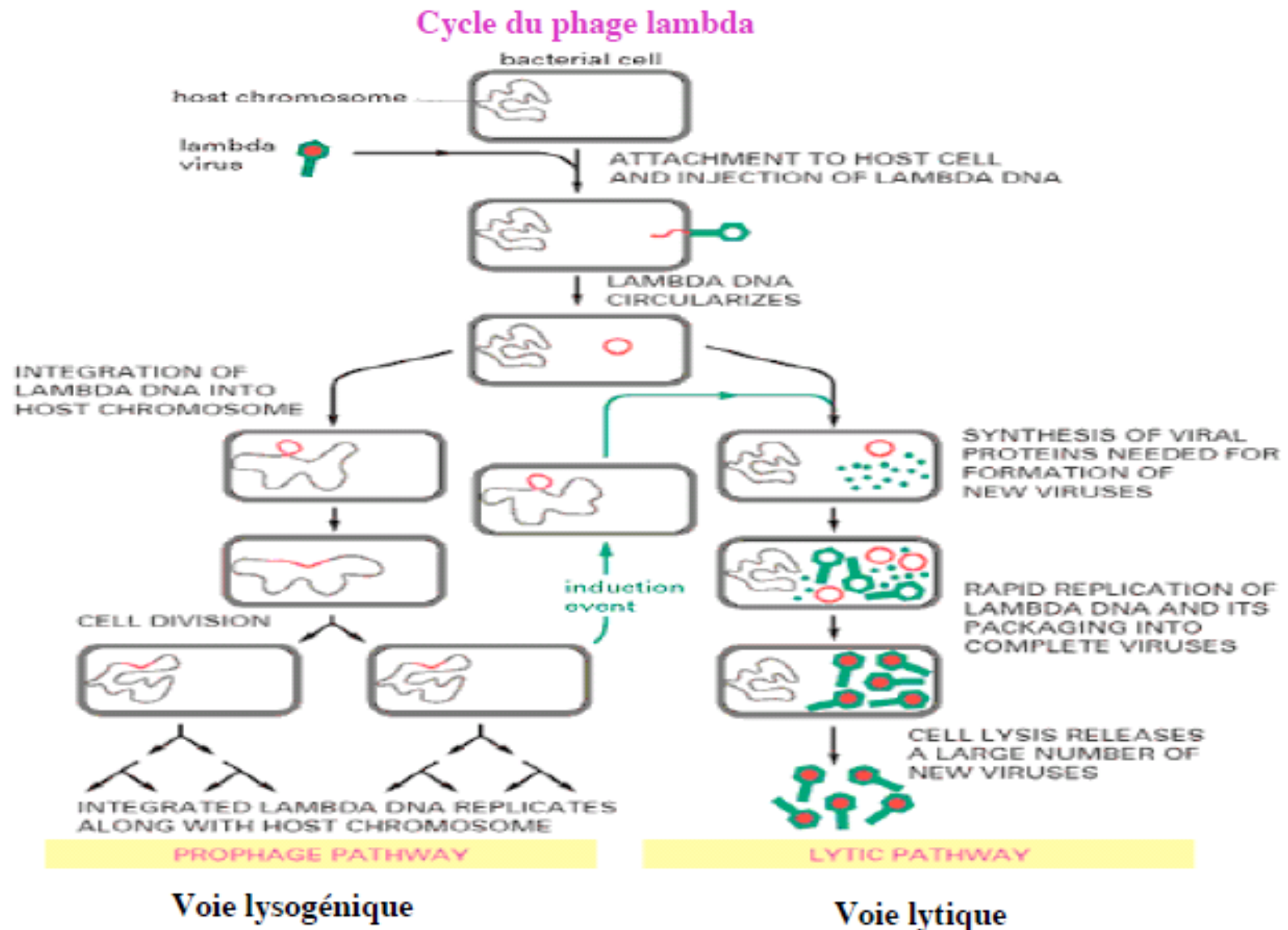
PGEM : ouverture par des enzymes de restriction et fermeture par une ligase

TA: insertion directe et recircularisation du plasmide. Fermeture par ligase.

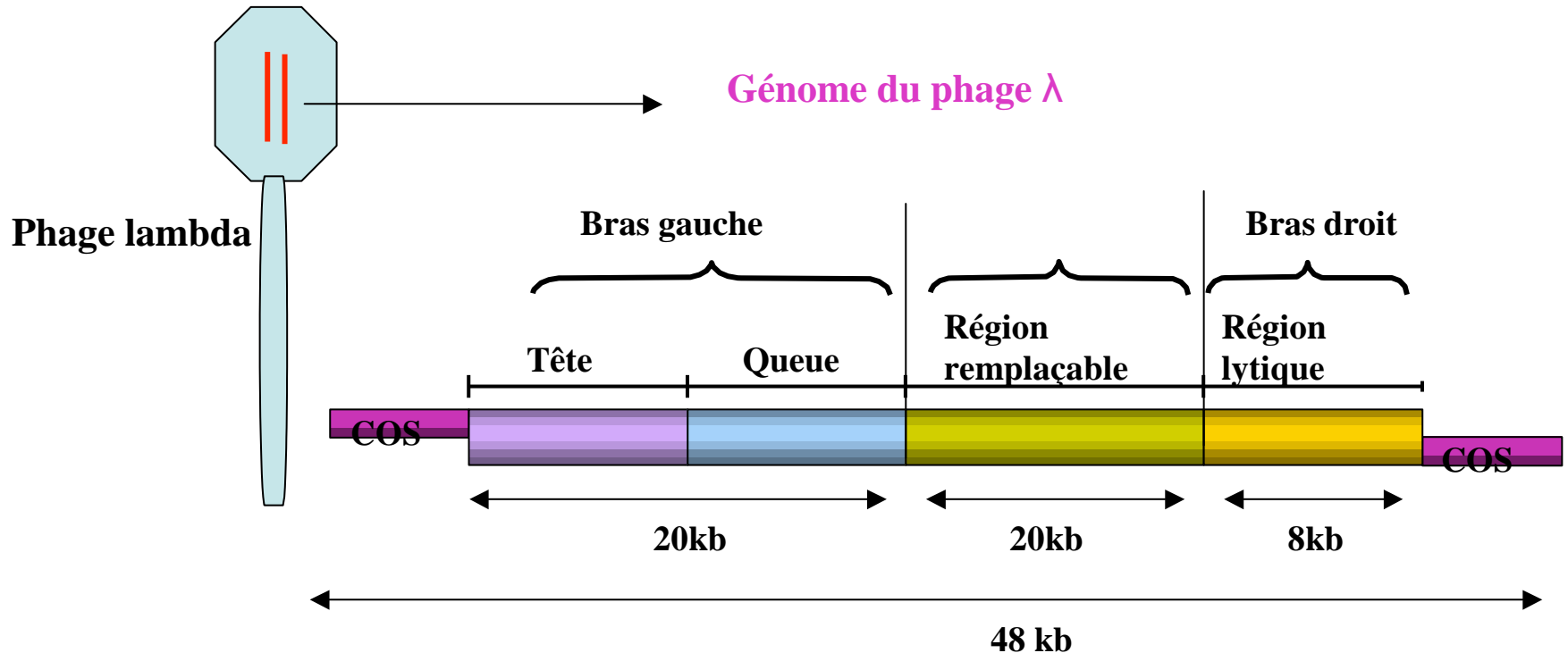
PCR-TOPO : Une topoisomérase est couplée aux extrémités 3'P du plasmide, elle va catalyser la formation de liaison entre les extrémités 3'P du vecteur et celles (5'-OH) de l'ADN

pENTR : Les séquences de recombinaisons attI1 et attI2 pourront recombiner avec les séquences de recombinaison attR1 et attR2 présentes aux extrémités de l'ADN à insérer. Cette réaction est catalysée par une ADN recombinase

2. Vecteurs de clonage: le phage lambda



2. Vecteurs de clonage: le phage lambda



- Les séquences cos : extrémités simples brins cohésives (12n)
- Le bras gauche contient les gènes indispensables de structure
- Le bras droit contient les gènes indispensables à la lyse des bactéries
- La région remplaçable contient les gènes nécessaires à la lysogénie, recombinaison et excision : région cible pour insérer un ADN étranger

Pour que l'ADN du phage soit « encapsidé » (dans la tête du phage), il faut une distance d'au moins 36 kbp et d'au plus 51 kbp entre les 2 COS.

2. Vecteurs de clonage: le phage lambda

- **Cycle lysogénique** : insertion dans le génome bactérien par recombinaison entre des séquences d'attachement (attP et attB)

L'Intégration est assurée par 2 protéines,

Intégrase (Int) produite par le phage et

IHF (facteur d'intégration de l'hôte)

catalysent l'insertion de l'ADN dans le chromosome bactérien par recombinaison spécifique entre des sites (att) du génome du phage et de l'hôte.

Cycle lytique: réplication et excision par recombinaison entre les séquences attL et attR.

L'excision est assurée par 3 protéines (**Xis, Int, IHF**). La présence de Xis contrôle le sens de la recombinaison.

Les protéines de recombinaison reconnaissent **4 types de séquences** de recombinaison

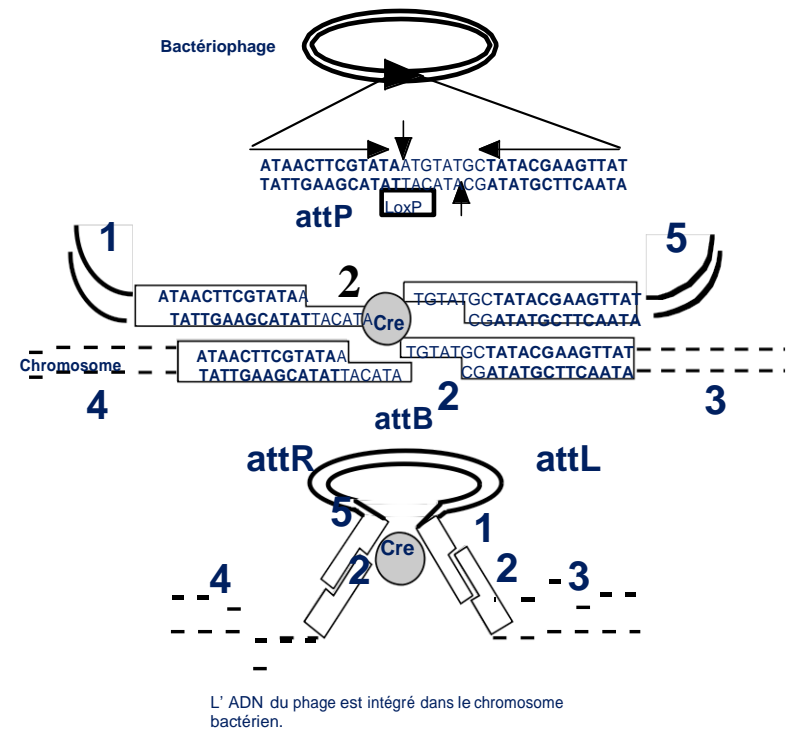
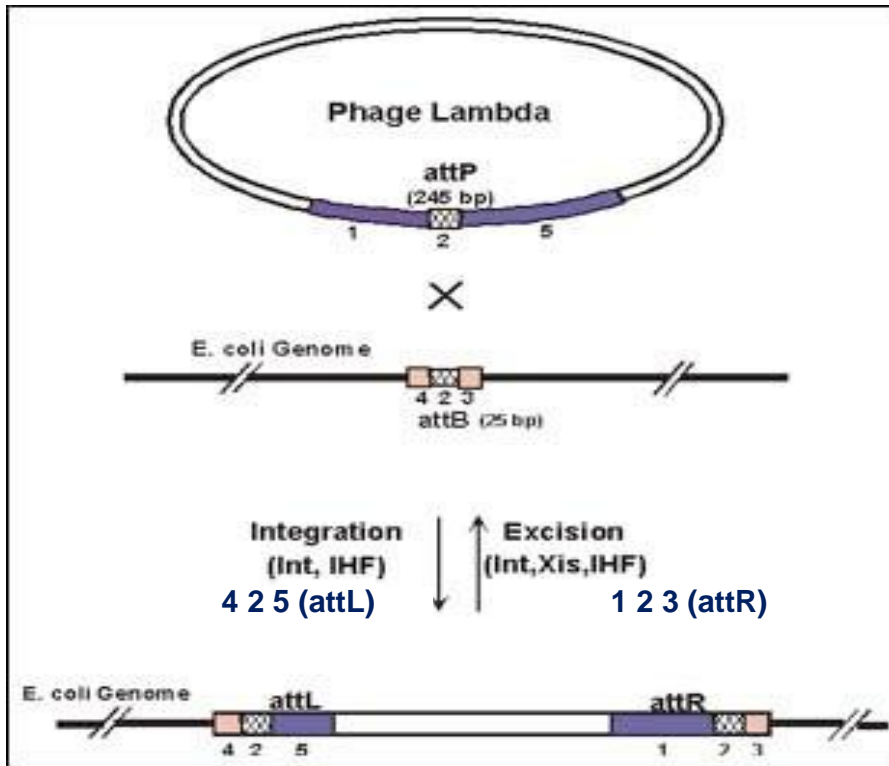
attB et **attP** pour l'insertion

attL et **attR** pour l'excision

La coupure se fait dans la partie centrale palindromique et identique pour les 4 sites

2. Vecteurs de clonage: le phage lambda

Schéma de recombinaison



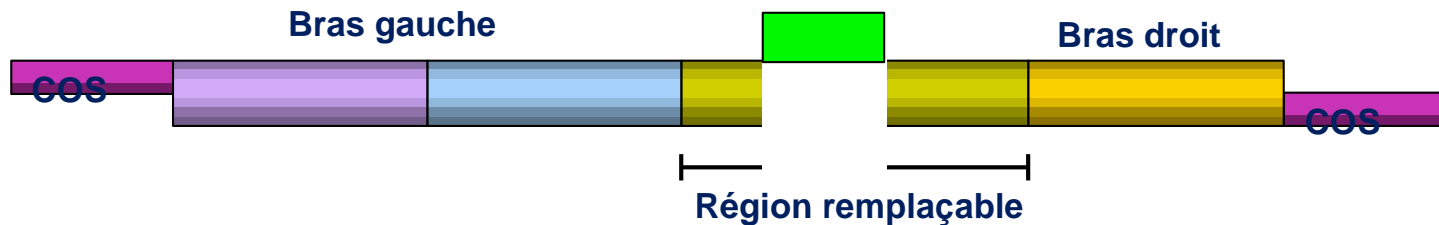
2. Vecteurs de clonage: le phage lambda

Vecteurs dérivés du phage λ

Phage d'insertion : ex : lambda GT10 (42 kbp)

Délétion de 8 kb dans la partie centrale

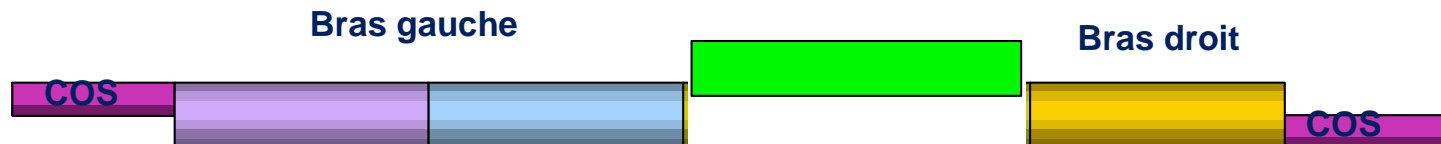
Insertion de l'ADN étranger (jusqu'à 9kb) dans la région remplaçable par ligation



Phage de remplacement : ex : EMBL (28 kbp)

Délétion de la partie centrale

Insertion de l'ADN étranger (jusqu'à 23 kb) dans la région remplaçable par ligation

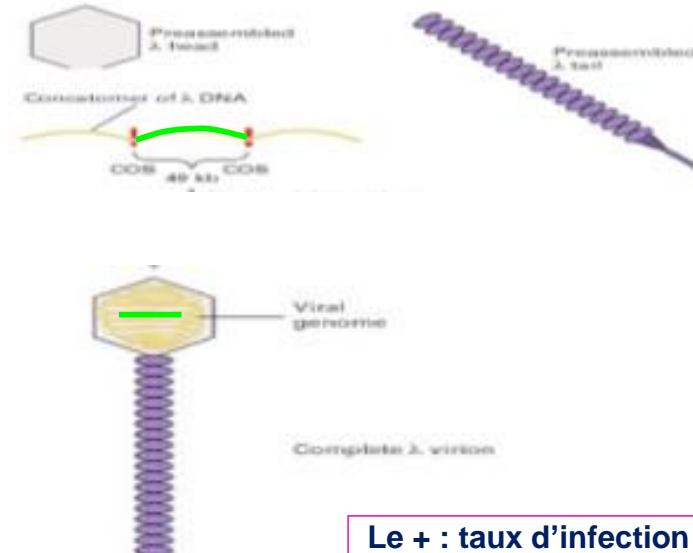


Génome du bactériophage recombiné

2. Vecteurs de clonage: le phage lambda

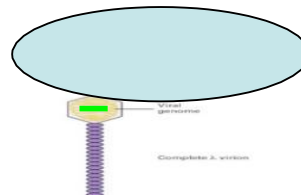
Encapsidation de l'ADN du phage et formation des particules virales

Bactériophage vide
+ ADN du phage recombinant



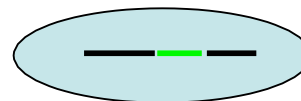
Bactériophage recombinant

Infection des bactéries

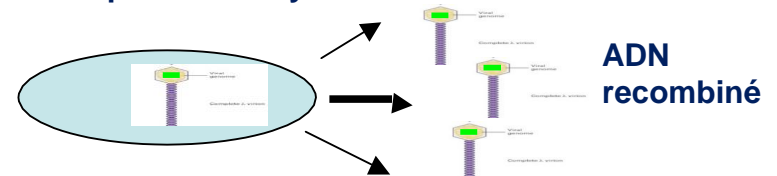


Le + : taux d'infection et la taille de l'insert
Le - : maniement complexe des phages

Production de bactériophages

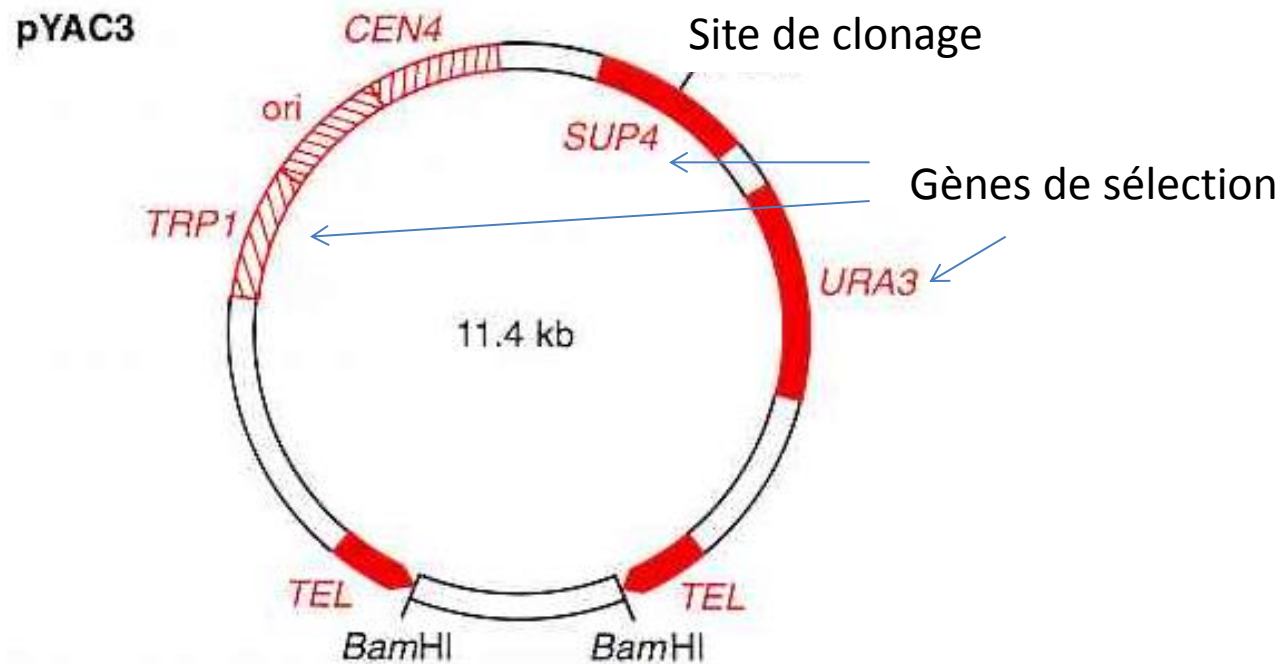


Multiplication et lyse



Pour que l'ADN du phage soit «encapsidé » (dans la tête du phage), il faut une distance d'au moins 36 kbp et d'au plus 51 kbp entre les 2 COS (sélection de recombinants)

2. Vecteurs de clonage: YAC



YAC: pour transformation de levures. Se comporte comme un chromosome eucaryote (>2000kpb)

BAC: pour transformation de bactéries se comporte comme un plasmide (300kpb)

Cosmide: plasmide avec des séquences cos. Il est encapsidé (45kpb)