

Le génie génétique

Dr. ZEGHIB Khaoula

Faculté des sciences de la
nature et de la vie

Université de El-oued

07 Avril

Table des matières

Objectifs	3
I - Thème1 : Les outils enzymatiques du génie génétique	4
1. Les polymérase	4
1.1. ADN polymérase I et fragment de Klenow	4
1.2. Taq polymérase	4
1.3. Transcriptase réverse	4
1.4. ARN polymérase	4
2. Les nucléases	5
2.1. Les exonucléases	5
2.2. Les endonucléases	5
2.3. REMARQUE	6
2.4. Exercice	7
2.5. Exercice	7
3. les Ligases	7
3.1. ADN ligase	8
3.2. T4 ADN ligase	8

Objectifs

- Traiter des notions théoriques de génie génétique en abordant les techniques d'analyse des acides nucléiques, des protéines et de leur expression.
- Assimiler l'utilité des outils et des techniques du Génie génétique dans le diagnostic et le traitement (thérapie génique) des maladies infectieuses et génétiques et dans le génotypage.
- Faire comprendre les multiples applications du génie génétique et leurs applications biotechnologiques.

I Thème1 : Les outils enzymatiques du génie génétique

1. Les polymérases

Les polymérases d'acides nucléiques sont des enzymes qui synthétisent un nouveau brin d'ADN complémentaire à une matrice d'ADN ou ARN.

La plupart des polymérases ne peuvent fonctionner que si la matrice d'ADN ou d'ARN possède une région double brin qui agit comme amorce pour l'initiation de la polymérisation. Quatre types de polymérases sont couramment utilisées en génie génétique :

1.1. ADN polymérase I et fragment de Klenow

Comme toutes les ADN polymérases, l'ADN polymérase I synthétise une chaîne d'ADN dans le sens 5'-3' à partir d'une matrice possède aussi deux activités exonucléasiques, l'une dans le sens 3' des erreurs), l'autre dans le sens 5' Klenow qui a perdu (par clivage protéolytique) l'activité exonucléasique 5' l'activité polymérasique ainsi que l'activité exonucléasique 3'

1.2. Taq polymérase

Il s'agit d'une ADN polymérase isolée de bactérie (*Thermus aquaticus*) dans les sources d'eau chaude. Son avantage réside en sa très grande thermostabilité (jusqu'à 95 °C) et son fonctionnement optimal à température élevée (70 °C). Cette enzyme ne possède que la fonction polymérase. Toutefois elle peut synthétiser en continue et à haute température sans être dénaturée.

1.3. Transcriptase réverse

Codée par les gènes pol des rétrovirus, cette enzyme transcrit ARN en ADN complémentaire (cADN). Comme toutes les polymérases, elle travaille dans le sens 5' vers 3'. Elle peut aussi utiliser l'ADN comme matrice.

1.4. ARN polymérase

Cet enzyme transcrit l'un des brins de l'ADN double brin en ARN. La synthèse s'effectue dans le sens 5'-3' en l'absence d'amorce. Par contre, chaque type d'ARN polymérase ne fonctionne qu'en présence de son promoteur,

c'est-à-dire qu'une séquence spécifique d'ADN reconnue par l'enzyme, sur laquelle ce dernier se fixe et initie la transcription.

2. Les nucléases

Les nucléases dégradent les molécules d'ADN en rompant les liaisons phosphodiester liant un nucléotide au suivant. Il existe 2 types de nucléases :

2.1. Les exonucléases

Ces enzymes éliminent des nucléotides un à un à partir d'une extrémité de l'ADN. Dans le sens 5' vers 3' ou l'inverse. Exemple: Exonucléase III catalyse l'hydrolyse séquentielle des nucléotides d'un ADN à partir d'une extrémité 3' libre (dans le sens 3' vers 5').

2.2. Les endonucléases

Ces enzymes sont capables de rompre des liaisons phosphodiester internes

2.2.1. LES ENZYMES DE RESTRICTION

Définition : Définition

Ce sont des enzymes, principalement d'origine bactérienne, capables de couper l'ADN double brin (et ce quel que soit son origine) à des endroits spécifiques (séquences nucléotidiques) appelés sites de restriction généralement de 4 à 6 paires de bases.

Ces enzymes protègent les bactéries contre l'invasion par de l'ADN étranger qu'elles coupent en petits morceaux.

Les séquences de nucléotides reconnues par les enzymes de restriction sont habituellement des séquences dites palindromiques. Les séquences palindromiques sont des séquences où la succession des nucléotides lue dans le sens 5' - 3' (gauche-droite) pour le premier brin est identique à la séquence lue dans le sens droite-gauche pour le second brin (sens 5' - 3'). Ces séquences palindromiques sont le plus souvent constituées de 4 ou 6 paires de bases.
5' GAATTC 3' 3' CTTAAG 5'

Nomenclature des enzymes de restriction

- La première lettre, en majuscule, représente l'initiale du genre bactérien.
- Les deux lettres, minuscules, qui suivent la première sont représentatives de l'espèce.
- Le chiffre romain qui suit ces trois lettres est le numéro d'ordre de découverte de l'enzyme pour la même bactérie source.
- La dernière lettre majuscule n'est pas obligatoire pour toutes les endonucléases de restriction. Elle est représentative de la souche de la bactérie d'où l'enzyme a été isolée.

enzymes de type II

ce sont les plus nombreuses et les plus utilisées aux laboratoires de génie génétique. Leurs sites de restrictions de 4 à 8 paires de bases sont des séquences palindromiques (se lisent de droite à gauche et inversement, comme le mot radar et la phrase "esope reste ici et se repose"). Elles coupent au niveau de leurs sites de restriction.

enzymes de type III

L'enzyme reconnaît une séquence mais coupe à une vingtaine de paires de bases plus loin.

2.4. Exercice

Qu'est ce qu'une enzyme de restriction ?

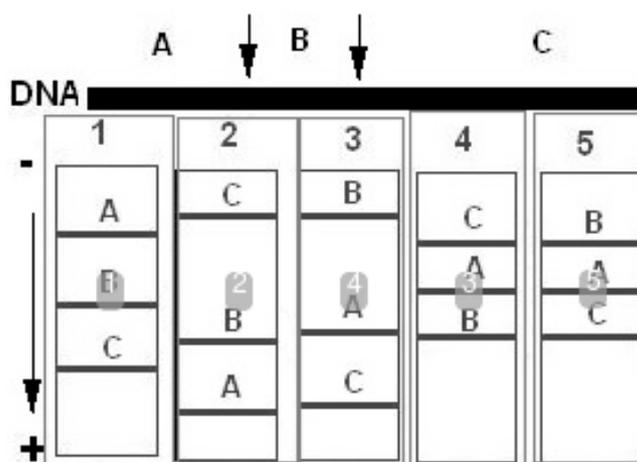
Une enzyme spécifique qui limite l'amplification du DNA par diminution du nombre des gènes qui peuvent être clonés

Une enzyme qui détruit une séquence de DNA par rupture de toutes les liaisons entre les nucléotides d'un brin de DNA.

Une enzyme spécifique qui fait la lecture des séquences nucléotidiques du DNA, reconnait des séquences spécifiques et coupe le DNA par rupture des liaisons entre les nucléotides d'un brin de DNA.

2.5. Exercice

La digestion d'un DNA par une enzyme de restriction a permis l'obtention de 3 fragments A, B et C de tailles différentes -voir figure-. Séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5%, le profile attendu correspondra à:



3. les Ligases

Elles assurent la formation d'une liaison phosphodiester entre une extrémité 3'-OH d'un fragment d'ADN et une extrémité 5'P d'un autre fragment adjacent. L'ADN ligase agit spécifiquement sur l'ADN double brin et l'ARN ligase sur l'ARN et l'ADN simple brin.

3.1. ADN ligase

L'enzyme n'agit que si les 2 ADN sont associés par des extrémités cohésives.

3.2. T4 ADN ligase

Elle est capable d'effectuer des ligations entre 2 ADN à bouts francs.

