

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 - Thème2 : La hybridation moléculaire	4
1. Définition	4
2. Formules utilisées pour calculer la Th	5
3. Les sondes nucléotidiques	5
4. Facteurs influençant l'hybridation	6
5. Types d'hybridation	6
6. Exercice : Exercice	7

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 Thème2 : La hybridation moléculaire

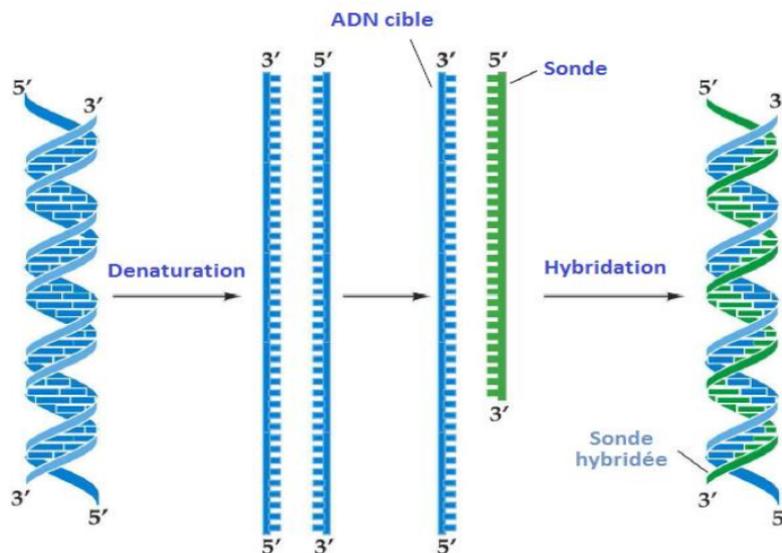
1. Définition

L'hybridation est une propriété fondamentale des acides nucléiques qui repose sur les règles de complémentarité. Il est possible d'apparier des brins d'ADN ou ARN avec des oligonucléotides qui reconnaissent spécifiquement des séquences sur les brins d'ADN de manière antiparallèle et complémentaire. Ces oligonucléotides sont appelés sondes nucléiques

. Cette association s'effectue par l'établissement de liaisons hydrogènes spécifiques : deux liaisons entre l'adénine (A) et la thymine (T) (ou l'uracile U) et trois entre la cytosine (C) et la guanine (G).

Pour le cas de deux brins complémentaires de la même molécule d'ADN (brins homologues) on parle de renaturation (hybridation à 100%). Chaque 1% de non homologie diminue la température d'hybridation (T_h).

L'hybridation moléculaire est utilisée surtout dans la détection de l'homologie entre les molécules d'ADN de sources différentes. La complémentarité dépendra de la spécificité et de la sensibilité.



Hybridation des acides nucléiques

La T_h est estimée en utilisant plusieurs formules, cela dépend de la:

- Longueur du fragment (nombre de nucléotides).
- Composition du milieu
- Mis-appariement

- Le contenu en C+G

2. Formules utilisées pour calculer la Th

Formule de Wallace: $T_m = 4(C+G) + 2(A+T)$; $T_h = T_m - 5$

La formule de Wallace permet de déduire la Th des petits oligonucléotides (Ex. Les amorces).

Pour les oligonucléotides avec $N < 100$ nucléotides on utilise la formule suivante en tenant compte la concentration du sel, les mésappariements et la concentration de formamide:

$$T_m = 16.6 \log[Na^+] + 0.41(\%(C+G)) + 81.5 - (675/N) - \%mismatch - 0.65\% \text{ de formamide}$$

Dans les conditions réactionnelles standards la T_m pour les longs séquences (>100):

$$T_m = 69.3 + 0.41(\%(C+G))$$

La formule globale:

$$T_m = 81.5 + 16.6 \log[\text{sel}] + 0.41[\%(C+G)] - \% \text{ mis-appariement} - (500/N) - 0.65\%(\text{formamide}).$$

3. Les sondes nucléotidiques

Définition : Définition

Une sonde nucléotidique est un segment de nucléotides qui permet de rechercher de manière spécifique un fragment d'acide nucléique que l'on désire étudier. Cette réaction sonde fragment correspond à une réaction d'hybridation moléculaire.

Fondamental : Caractéristiques générales

Une sonde nucléotidique peut être soit une séquence d'ADN ou d'ARN, mais obligatoirement monobrin. Sa taille est très variable: oligonucléotides de 20-30 nucléotides ou à l'opposé de plusieurs centaines de nucléotides. La sonde est complémentaire et antiparallèle du fragment recherché. Dans un mélange complexe où s'effectue l'hybridation moléculaire, la sonde doit être facilement repérable grâce à un marquage avec un radioisotope (marquage chaud), mais il existe également des sondes appelées sondes froides sans marquage par un radioisotope.

Obtention d'une sonde

Il existe plusieurs possibilités pour obtenir une sonde nucléotidique:

- Une sonde oligonucléotidique peut être fabriquée par synthèse chimique, si la séquence de l'ADN à repérer est connue. Si elle est inconnue, on peut étudier la protéine correspondante et remonter grâce au code génétique à la séquence d'ADN. Dans ce dernier cas, le travail est particulièrement laborieux (nombre de codons élevé pour un même acide aminé).
- Une sonde peut être un ADNc. Une partie seulement de l'ADNc est utilisée (après action d'enzymes de restriction et clonage des fragments obtenus).
- Une sonde peut être théoriquement de l'ARNm.

4. Facteurs influençant l'hybridation

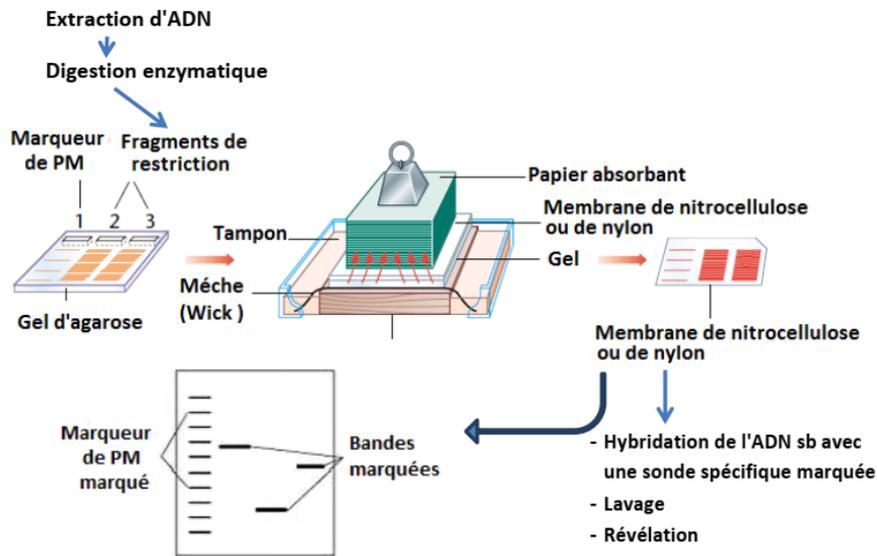
- La concentration de l'ADN et le temps d'hybridation
- La température d'hybridation
- La force ionique
- La complexité des séquences

5. Types d'hybridation

Hybridation d'ADN sur support solide : Southern blot

La procédure de ce type d'hybridation est résumée en sept étapes (fig. 6)

- 1- Extraction de l'ADN
- 2- Digestion enzymatique (par les enzymes de restriction)
- 3- Electrophorèse du produit de la digestion
- 4- Transfert sur membrane
- 5- Hybridation avec une sonde spécifique marquée.
- 6- Lavages
- 7- Révélation



Southern Blot

⊕ Complément : Hybridation in situ sur chromosome

Cette technique permet de déterminer sur quel chromosome et dans quelle région se trouve le gène d'intérêt. Les chromosomes fixés sur lame sont hybridés avec une sonde marquée (H3). L'examen microscopique révèle les signaux positifs sous forme de grains noirs disposés sur le chromosome. Comme exemple d'application est la détection des gènes viraux intégrés dans les chromosomes.

Remarque : Hybridation sur colonie de bactéries, sur plage de lyse

Ce type d'hybridation permet la détection parmi un grand nombre de bactéries ou de phages recombinants (plage de lyse) celle ou celui qui contient le fragment d'ADN cible. La réalisation de cette technique passe par les étapes suivantes:

- Culture pure sur boîte de Petri (colonies ou plage de lyse)
- Transfert sur membrane de nylon ou de nitrocellulose
- Lyse alcaline des bactéries et dénaturation de l'ADN
- Fixation par la chaleur ou les UV
- Hybridation avec une sonde marquée
- Lavage
- Autoradiographie
- Localisation des clones d'intérêt.

6. Exercice : Exercice

Voici la carte de restriction d'un fragment d'ADN que nous appelons « ADN X ». Vous effectuez un transfert de Southern ou « Southern blot », en utilisant la séquence de la sonde marquée. [L'ADN X est digéré par Eco RI; migré sur un gel; hybridé à sonde, détectée]

- 1- Dessinez les résultats du gel de l'électrophorèse.
- 2- Dessinez les résultats de l'autoradiographie de la membrane de nitrocellulose
- 3- Quels sont les facteurs pouvant influencer les résultats de « southern blot ».

