

Polycopié du Cours

Matière : Techniques de Biologie Moléculaire et Cellulaire Moderne

Matière : Techniques et Instrumentation en Biologie Moléculaire et Cellulaire

Au profit des Etudiants des spécialités

M1 Biochimie Fondamentale

M1 Génétique Fondamentale et Appliquée

Chargée de la matière

Dr Debbache-Benaidia Nadjjet

COURS 1

Gène rapporteur et ses applications

Gène Rapporteur

Définition

Un gène rapporteur est un gène témoin, un marqueur codant pour une protéine d'activité connue et détectable utilisée pour étudier l'activité d'un autre gène.

Le **gène rapporteur** est fusionné à un gène d'intérêt dans une construction génétique afin de visualiser la protéine recombinante produite.

Les gènes rapporteurs peuvent être des gènes codant des protéines fluorescentes ou des enzymes dont l'action provoquera l'apparition d'un produit coloré.

1)Protéine

Fluorescentes: Green Fluorescent Protein (GFP), Red Fluorescent Protein and Yellow Fluorescent Protein

Luciférase, émettant une lumière jaune

2)Enzyme

Le Gène X-gal codant pour la bêta galactosidase

Le Gène GUS, codant une enzyme (la bêta-glucuronidase) qui colore en bleu les cellules où il est actif, mais il est létal

la chloramphénicol acétyl transférase (CAT)

3)Protéine radiomarquée

Exemples de gènes rapporteurs

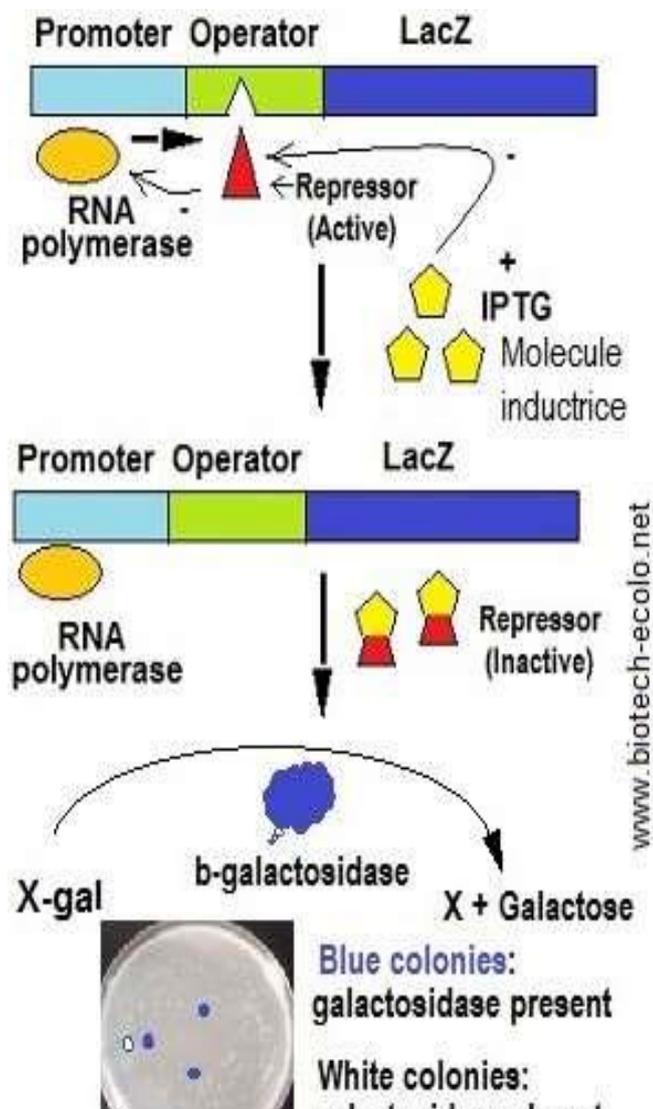
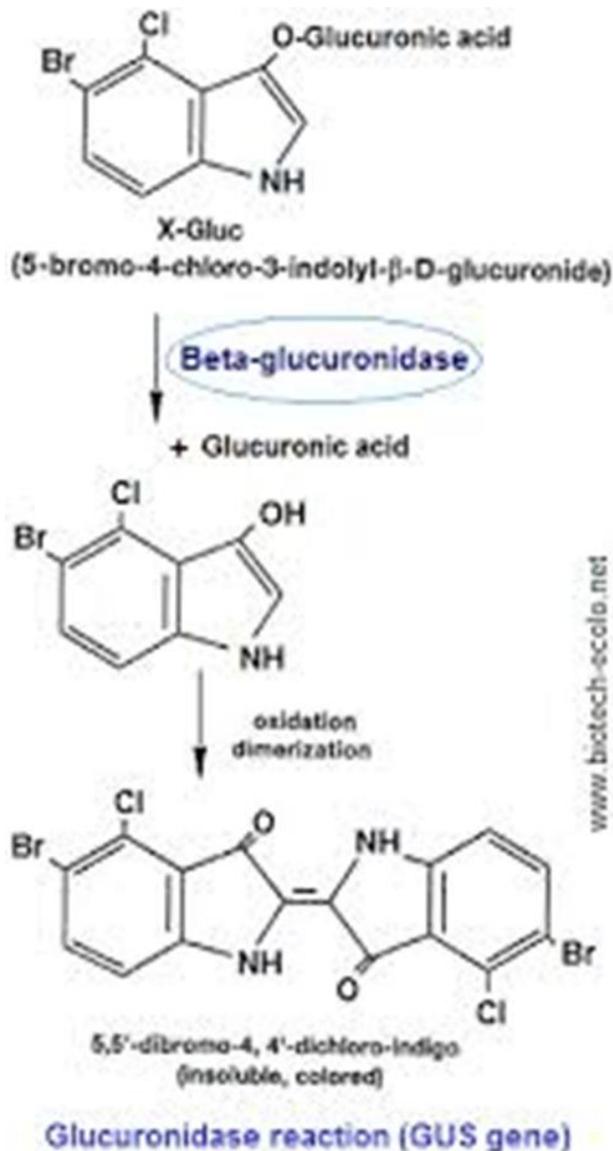
Protéine à activité enzymatique

Le gène lacZ codant la β -galactosidase (LacZ) qui métabolise le X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-beta-D-Galactoside) faisant apparaître une coloration bleue.

Pour pouvoir métaboliser le X-gal, la cellule doit être exposée à un inducteur **IPTG** = isopropyl-thio-galactoside.

La visualisation de la couleur nécessite la fixation des cellules.

Gene de la bêta glucuronidase L'abréviation GUS réfère au gène de la β -glucuronidase, qui provient de E.coli. Le substrat de GUS est le 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Glucuronic acid (X-Gluc). Le clivage de ce dernier sous l'action du GUS produit un précipité bleu et insoluble qui confère une coloration



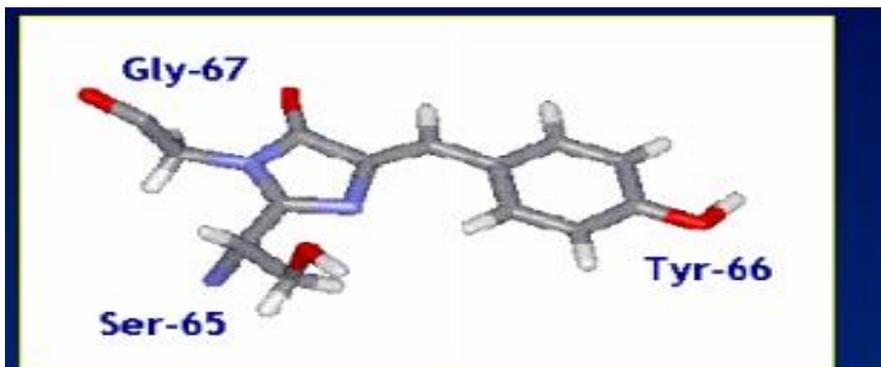
Protéines fluorescentes

Gène codant pour la GFP (green fluorescent protein) de la méduse *Aequora victoria* La GFP. Actuellement, la technique de microscopie de fluorescence utilisant des marqueurs GFP fait partie des méthodes les plus couramment utilisées en imagerie biologique. Il suffit de la soumettre à une radiation bleue ou UV pour observer une brillance verte.

La GFP ne nécessite pas la destruction de l'échantillon étudié;

Ce gène rapporteur, est donc particulièrement adapté pour suivre l'expression d'un transgène dans des cellules vivantes.

Le chromophore de la GFP est codé dans la séquence primaire de la protéine, constitué par les acides aminés Ser65, Tyr66 et glycine 67.



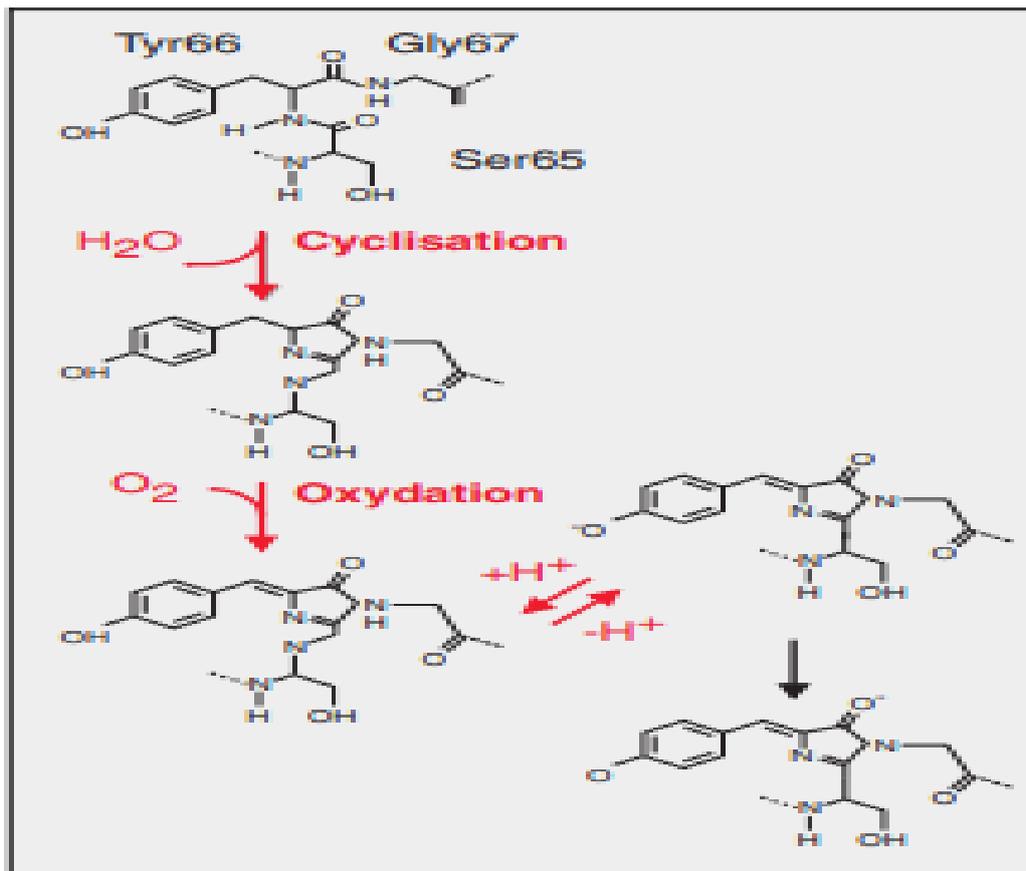
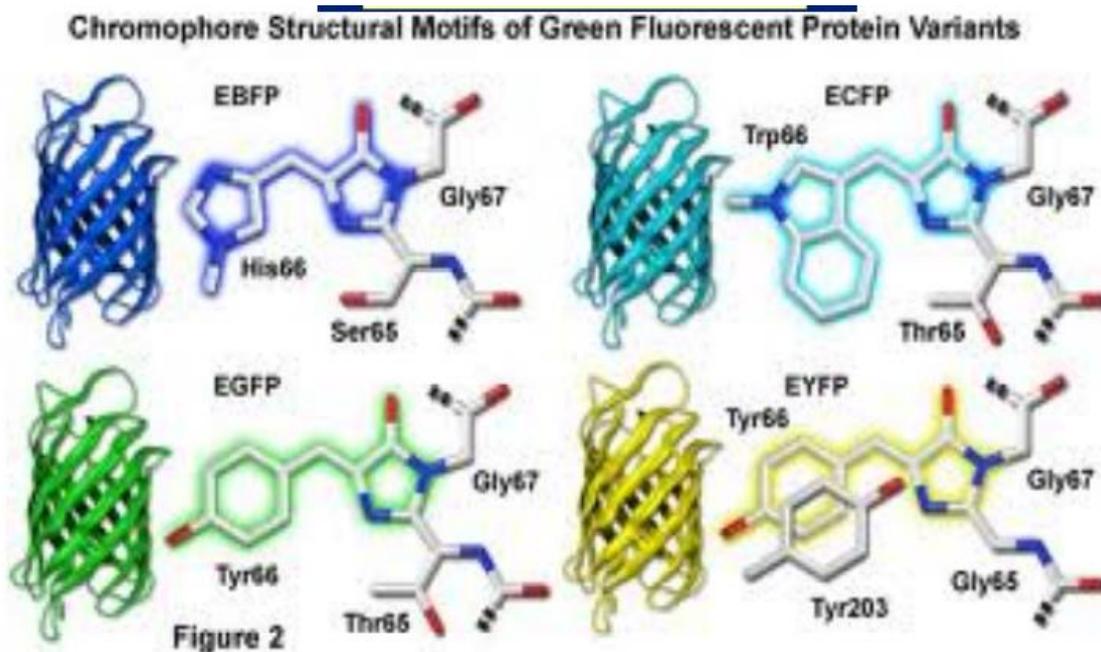


Figure Formation du chromophore de la GFP. Le chromophore de la GFP est constitué des trois acides aminés Ser-Tyr-Gly en position 65 à 67. Sa formation se produit après une cyclisation entre les acides aminés 65 et 67 puis une oxydation. Le chromophore *p*-hydroxybenzylidène-imidazolidinone est alors constitué. Il sera sous forme protoné ou déprotoné. C'est seulement après l'oxygénation que la GFP peut être fluorescente.

Il existe plusieurs variantes de GFP utilisées en génie génétique



LES VARIANTS DE LA GFP ET LEURS CARACTÉRISTIQUES				
Nom	Mutations	Caractéristiques spectrométriques		Propriétés
		absorption (nm)	émission (nm)	
GFP		395 (et 477)	509	utile pour les approches de surfluorescence
GFP-S65T	S65T	488	510	fluorescence augmentée (six fois) plus résistante au photoblanchiment vitesse de cyclisation augmentée fluorescence diminuée à pH < 7
α -GFP	F100S/MIS4T/V164A			formation du chromophore à 37°C résistante à une large gamme de pH vitesse de cyclisation augmentée
E-GFP	F64L/S65T	488	507	formation du chromophore à 37°C vitesse de cyclisation augmentée idéale pour une étude en cellule vivante fluorescence diminuée à pH < 7
d2EGFP		488	507	forme déstabilisée de la GFP temps de demi-vie de 2 heures utile comme gène rapporteur
S65T/S147P	S65T/S147P			formation du chromophore à 37°C
BFP	Y66H ou Y66H/Y145F	381	445	fluorescence bleue
EBFP	F64L/Y66H	380	440	fluorescence bleue plus forte utile pour la colocalisation FRET
EYFP	S65G/S72A/T203Y/V68L	513	527	fluorescence jaune

De nombreux variants de la GFP dérivent de la GFP sauvage. Chacune de ces formes mutées de la GFP apportent de nouvelles propriétés de fluorescence et sont donc mieux adaptées pour certaines approches technologiques. Il n'y a donc pas une GFP idéale mais chacune présente des avantages et des inconvénients dont il faut tenir compte pour une utilisation efficace.

La luciférase

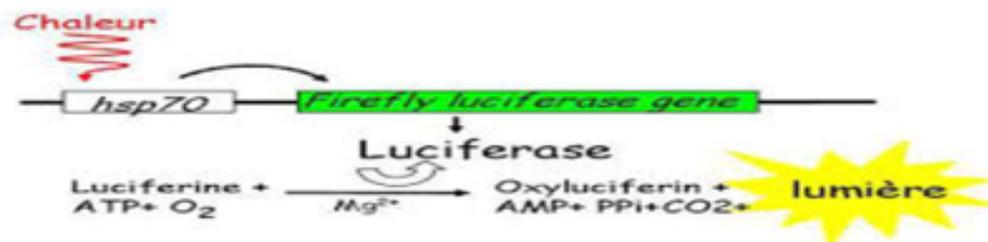
La luciférase catalyse la réaction de bioluminescence en oxydant la luciférine en oxyluciférine en présence d'oxygène, d'ATP et de Mg^{2+} . Ceci provoque alors l'émission d'un photon dont la lumière résultante est jaune-vert. Lors de cette réaction, l'ATP est hydrolysée en AMP. De plus, il est crucial que le substrat ait la bonne chiralité : D(-)-Luciférine pour que la réaction ait lieu^[2].

Équations de la réaction de bioluminescence

Eq. 1. Luciférase + D-Luciférine + ATP $\xrightarrow{\text{Luciférase}}$ D-Luciférine-AMP + PPI

Eq. 2. Luciférase: D-Luciférine-AMP + $O_2 \xrightarrow{\text{Luciférase}}$ Oxyluciférine* + AMP + CO_2

Eq. 3. Luciférase: Oxyluciférine* $\xrightarrow{\text{Luciférase}}$ Oxyluciférine + $h\nu$



Propriétés d'un gène rapporteur

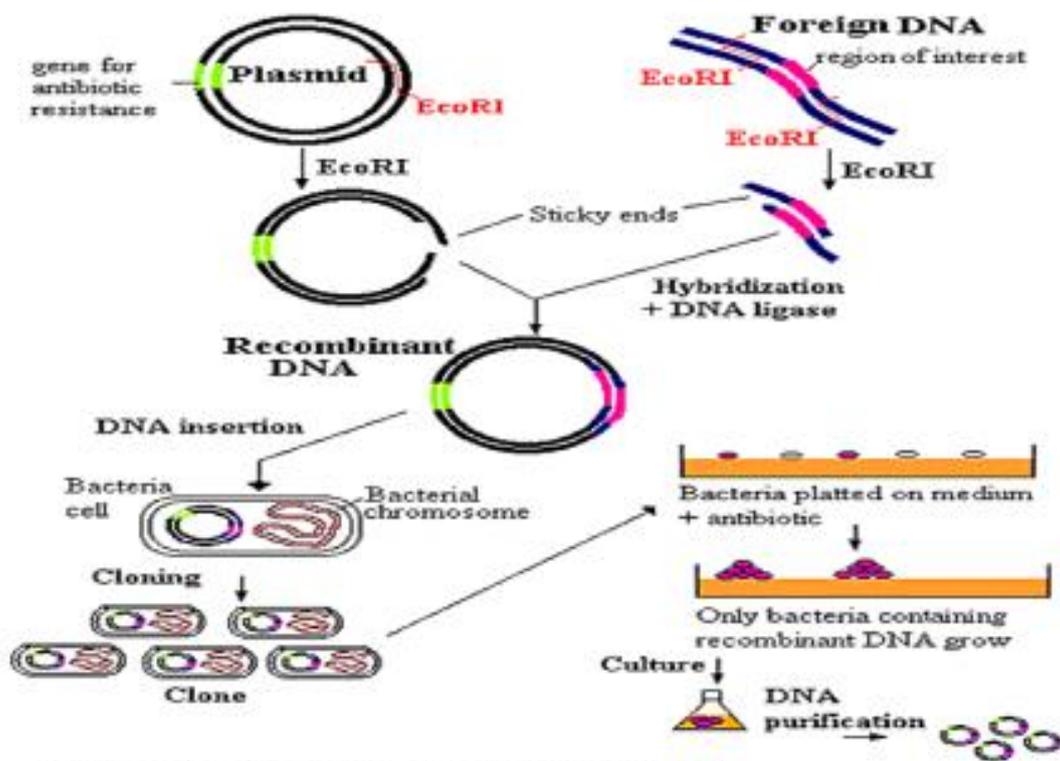
Les gènes marqueurs doivent obéir à 3 conditions :

- être étrangers au génôme de l'organisme modifié afin que leur produit n'intervienne pas dans le métabolisme
- leur produit doit permettre une visualisation rapide et précise afin de déterminer dans quel tissu agit le gène modifié (précipitation du produit dans son site de production)
- leur produit doit être quantifiable afin de mesurer l'activité du promoteur induisant la modification.

Le système de transfert de gènes représente un moyen crucial pour le génie génétique et ce concept est largement utilisé pour des fins agricoles, environnementales et pharmaceutiques.

La transformation génétique des végétaux est un outil fondamental pour l'analyse de l'expression des gènes, l'identification des séquences régulatrices de promoteur et pour illustrer beaucoup de processus enzymatiques, développementaux et cellulaires et tous les domaines du métabolome. De nombreuses plantes ont été transformées par transfert de gènes en utilisant des agrobactéries ou par transfert direct d'ADN.

Construction d'un système de gène rapporteur

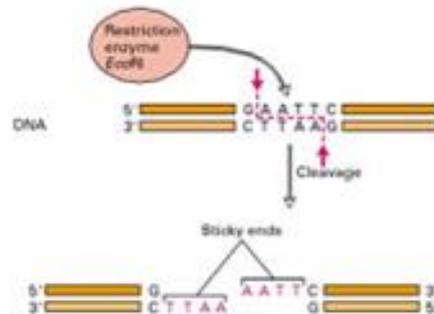


Cloning into a plasmid

Comment construire le système du gène rapporteur?

In vitro à partir de fragments d'ADN d'origines diverses découpés et assemblés par des enzymes

1. Les enzymes de restrictions pour couper l'ADN en des sites bien précis



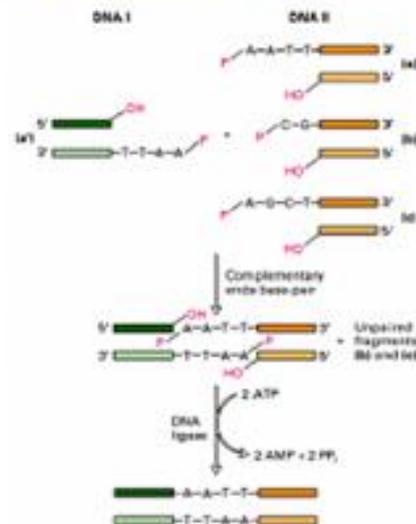
Les enzymes de restriction sont extraites des bactéries. L'enzyme prise en exemple, *EcoRI*, reconnaît une séquence précise (un palindrome de 6 paires de bases) puis coupe deux liaisons phosphodiester, de façon dissymétrique. Ce clivage génère deux fragments d'ADN terminés par deux séquences simple brin. Ces deux séquences simple brin étant de séquence inverse complémentaires, elles peuvent se reappairer. On appelle donc ces bouts des bouts collants.

Comment construire le système du gène rapporteur?

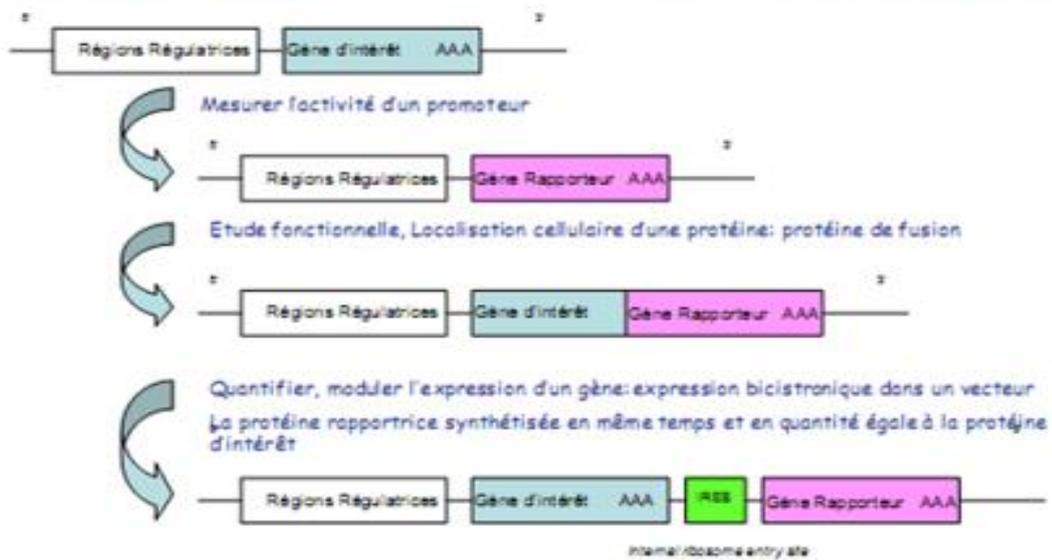
2. Des enzymes de modifications pour méthyler (méthylase), déphosphoryler (phosphatase), phosphoryler, (kinase) synthétiser (polymérase), lier deux molécules d'ADN (ligase), recombinaison site-spécifique (topoisomérases, recombinase)

Ligation de fragments de restriction à bouts collants.

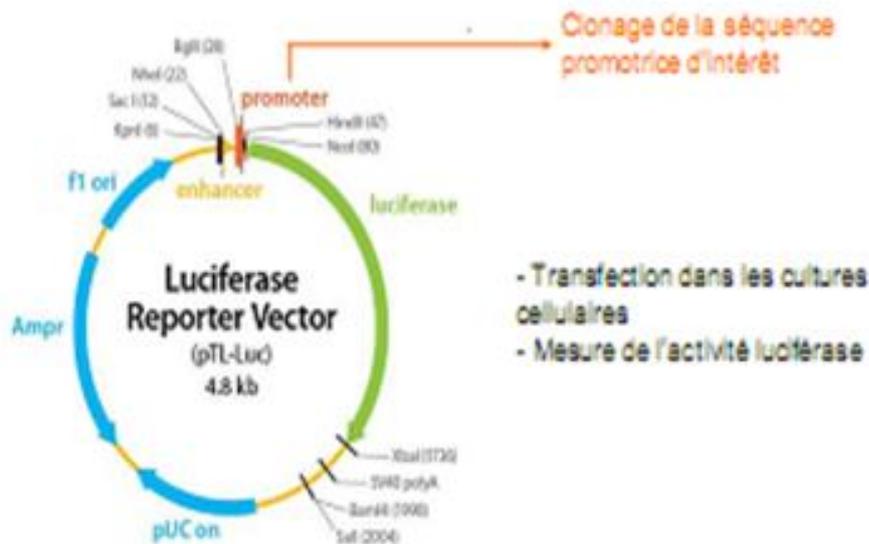
Dans cet exemple, les fragments de restriction de l'ADN I obtenus par digestion par l'enzyme *EcoRI* (a) sont mélangés avec différents fragments de restriction de l'ADN II obtenus par digestion par *EcoRI* (a), *TaqI* (b) et *HindIII* (c). Les bouts collants a' peuvent s'apparier avec a, mais pas avec b ou c. On ajoute dans la solution une ligase, une enzyme capable de créer une liaison covalente entre deux nucléotides, pour coller les deux fragments d'ADN. Cette technique permet donc de coller deux fragments d'ADN de façon orientée. La ligase peut aussi coller des extrémités franches, mais de façon moins efficace, et non orientée.



Comment construire le système du gène rapporteur?



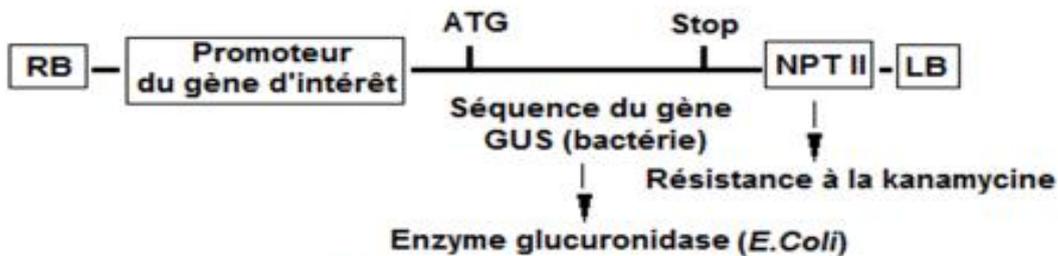
Les vecteurs rapporteurs



Les domaines d'application du gène rapporteur

En clonage

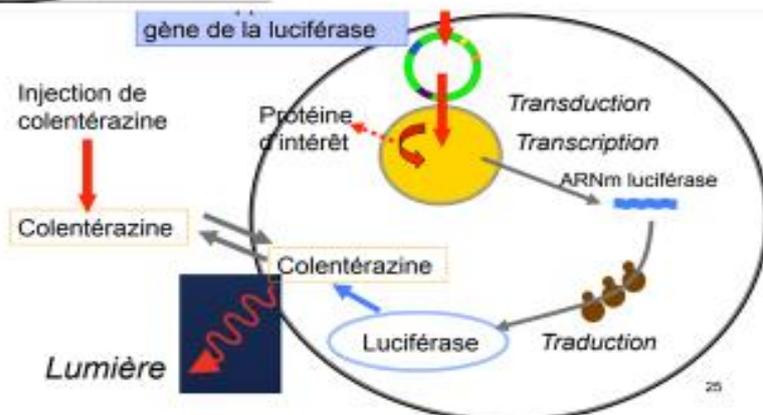
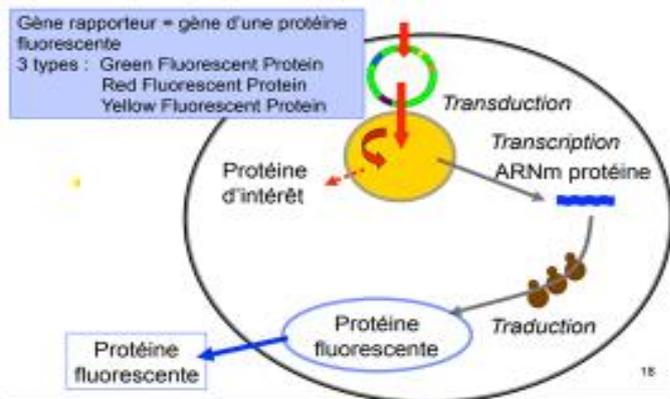
En clonage moléculaire, le gène rapporteur peut être couplé avec un gène d'intérêt afin de s'assurer de l'efficacité de l'insertion de ce dernier.



Fusion transcriptionnelle



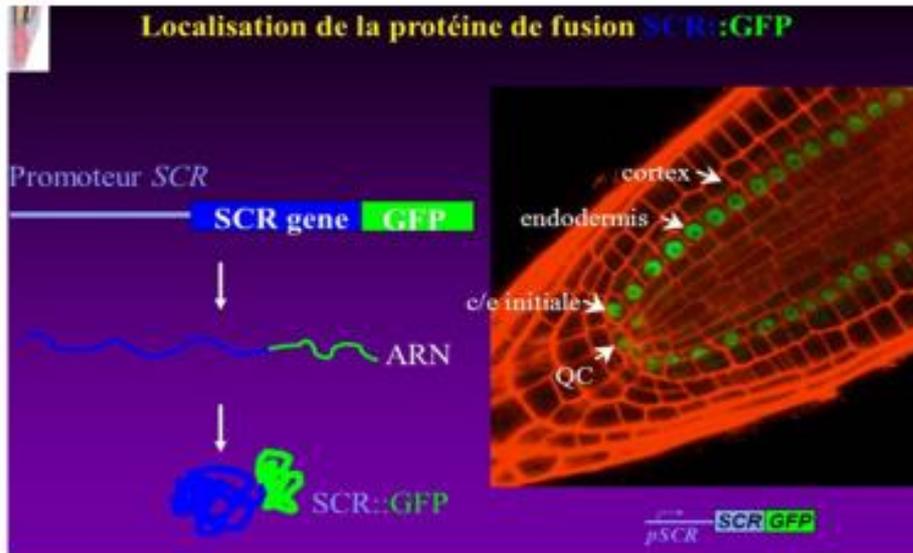
Fusion traductionnelle



Localisation d'une protéine d'intérêt

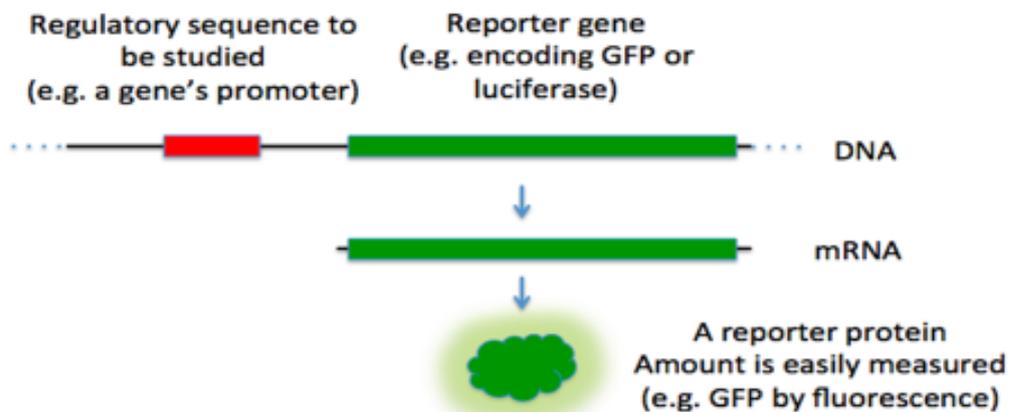
Fusion traductionnelle du gène de la SCR et la GFP

Etude de cas: Protéine SCR



Evaluation de l'activité d'un promoteur

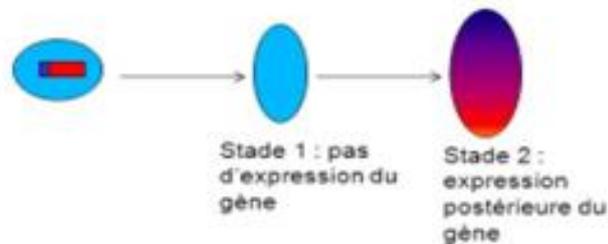
Le gène de la luciférase est mis sous le control du promoteur du gène d'interêt



Etude de l'expression des gènes

Il est possible d'obtenir des animaux transgéniques exprimant les séquences promotrices d'un gène étudié fusionné à un gène rapporteur.

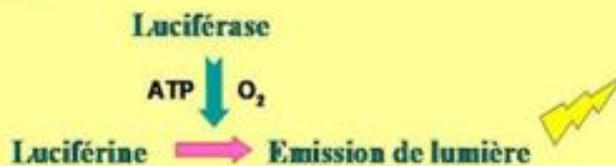
Exemple :



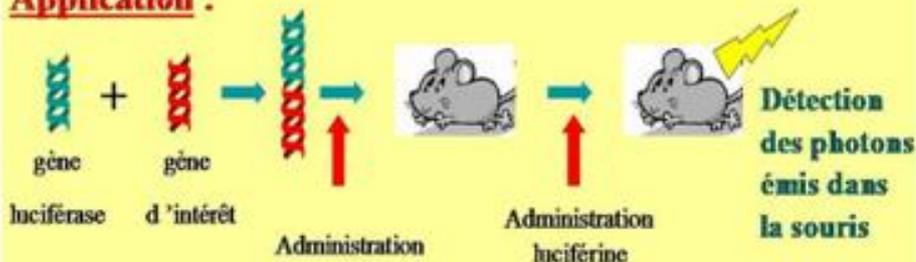
La révélation du produit du gène rapporteur sur des embryons à différents stades apporte des **informations spatiales et temporelles** sur l'expression du gène étudié.

Application in vivo

Principe :



Application :



Etude de cas

Travail à réaliser

- Trouvez un exemple de cas d'application d'un gène rapporteur. In vitro et in vivo (chez les plantes et les animaux tout en précisant l'intérêt de l'application).