



MODULE: BMGG

PARTIE: GÉNIE GÉNÉTIQUE

Enseignantes:

Firdawsse LAINCER

MORDJANE

Houa YAHIAOUI

LES CHAPITRES

- Les outils du génie génétique

- 1) Les enzymes de restriction
- 2) Les différentes sources d'ADN à cloner
- 3) Les différents vecteurs de clonage

- Les procédés de ligation et les différents modes de l'introduction de l'ADN recombinant dans les cellules hôtes



➤ Méthodes d'analyse du gène cloné

- 1) Hybridations moléculaires
- 2) Séquençage
- 3) Restriction (RFLP)

➤ Applications

- thérapie génique
- OGM
- Expression des protéines recombinantes

LES NUCLEASES

1 . Les nucléases

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

1 .1. Exonucléases Ces enzymes éliminent des nucléotides un à un à partir d'une extrémité de l'ADN

1 .2. Endonucléases

a) A clivages non spécifiques .Ces enzymes sont capables de rompre des liaisons phosphodiester internes. La DNase I extraite du pancréas ou DNase I pancréatique , coupe préférentiellement après une base pyrimidique .

b/ A clivage spécifique. Les enzymes de restriction.

Il existe 3types.

Type I : site de reconnaissance éloigné du site de clivage

LES ENZYMES DE RESTRICTION

. Type II : site de reconnaissance = site de clivage. l'enzyme reconnaît une séquence et clive au niveau de la séquence reconnue. Ce sont les enzymes utilisés en génie génétique (dans la technologie de l'ADN recombinant)

Type III : site de reconnaissance éloigné d' une vingtaine de nucléotides du site de clivage.

La longueur des séquences reconnue est comprise entre 4 et 8 pb. Elle est identique sur les 2 brins si on la lit de 5' vers 3'.

De telles séquences sont appelées palindromiques.

Les enzymes de restriction de type II provoquent 2 types de coupure : - coupures à bouts francs. Ou extrémités franches (blunt ends).

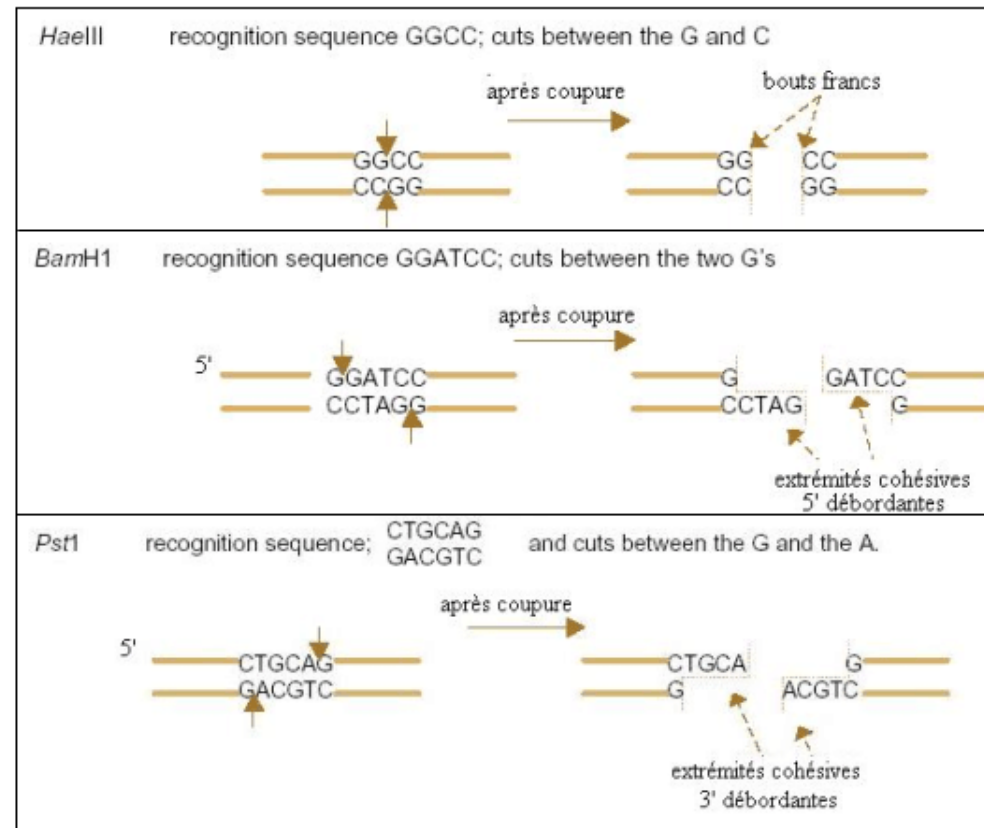
Coupures à extrémités cohésives ou bouts cohésifs : sticky ends ou cohesive ends.

LES ENZYMES DE RESTRICTION DE TYPE II

Une enzyme de restriction est une endonucléase capable de couper un fragment d'ADN au niveau d'une séquence de nucléotides caractéristique appelée site de restriction. Ces séquences sont généralement des séquences palindromiques, présentant un axe de symétrie.

Naturellement présentes chez un grand nombre d'espèces de bactéries, ces enzymes sont devenues des outils importants en génie génétique.

MODE D'ACTION DES ENZYMES DE RESTRICTION



FRÉQUENCE DE COUPURE

Pour les séquences à 4pb, comme la séquence GATC de Sau3A, la fréquence de coupure est $(\frac{1}{4})^4$. La fréquence est donc $1/256$. Ce qui veut dire que , théoriquement cet enzyme coupe toutes les 256pb. Autrement dit, la taille des fragments engendrés serait de 256pb.

De même, pour les séquences à 6pb, la fréquence serait $(\frac{1}{4})^6$

CARTES DE RESTRICTION(TD)

Les enzymes de **restriction** peuvent être utilisées pour établir une **carte** physique (appelée « **carte de restriction** ») d'une molécule d'ADN. La **carte de restriction** donne l'ordre des sites de **restriction** le long de cette molécule, et la taille des fragments produits.

Elles servent aussi à établir les profils RFLP.

LES VECTEURS DE CLONAGE

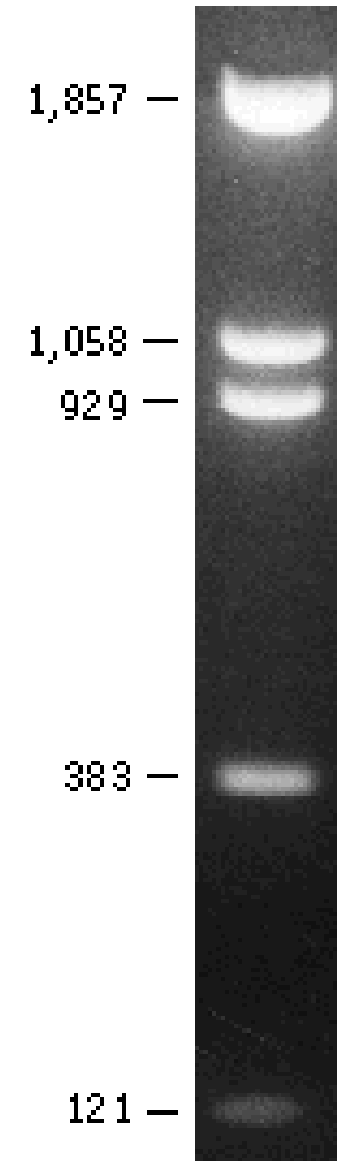
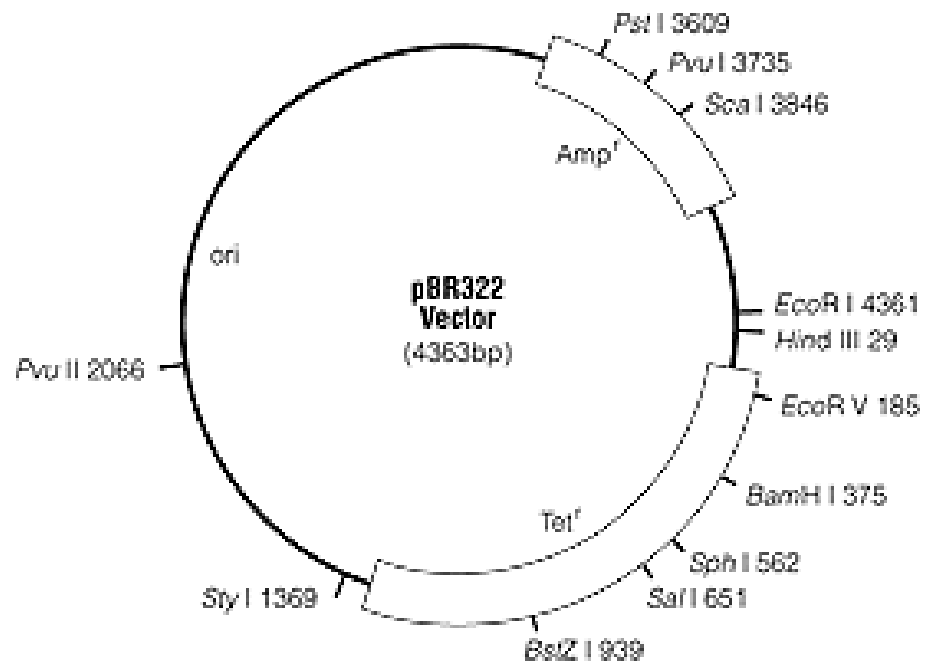
Caractéristiques

Origine de réplication.

Au moins un marqueur de sélection.

Présence de sites de restriction uniques.

EXEMPLE DE VECTEUR PLASMIDIQUE



Les plasmides comme vecteurs de clonage (1)

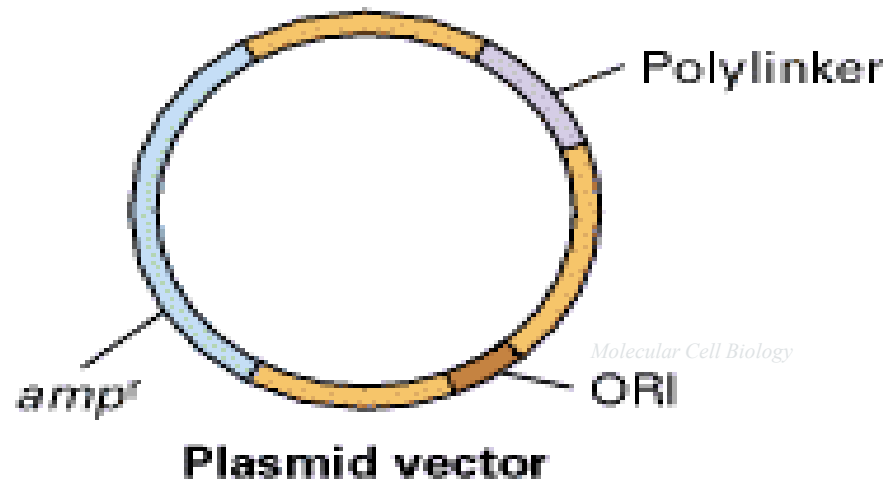
Molécule d'ADN de taille réduite, d'origine bactérienne

Molécule d'ADN circulaire – taille 2kb à 5kb

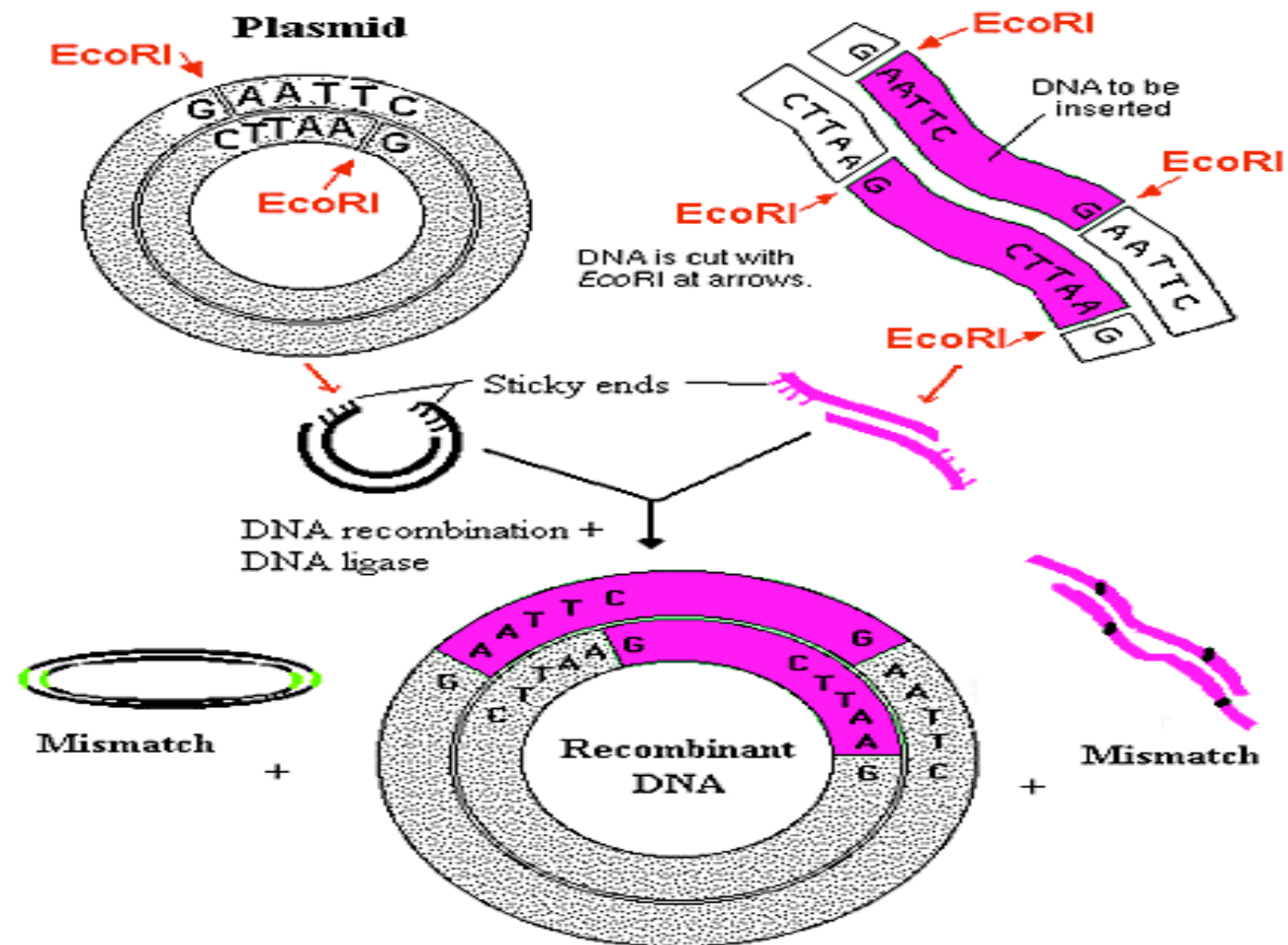
Peut accepter jusqu'à 10kb d'ADN exogène

Peut être considérée comme un minichromosome capable de réplication autonome

Confère la résistance à un ou plusieurs antibiotiques= sélection

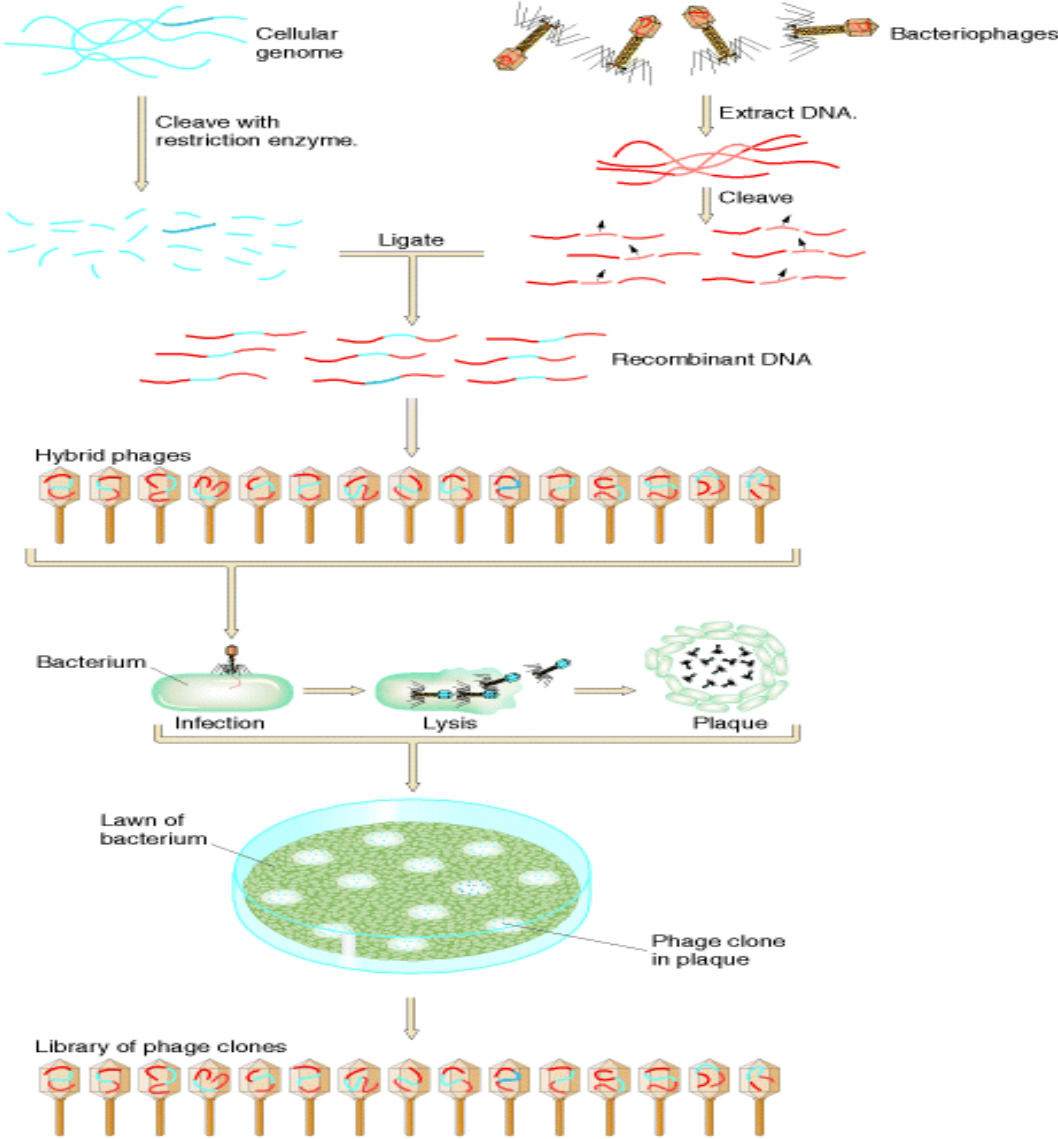


Les plasmides comme vecteur de clonage (2)



Inserting a DNA Sample into a Plasmid

Introduction de l'ADN recombinant dans les cellules hôtes

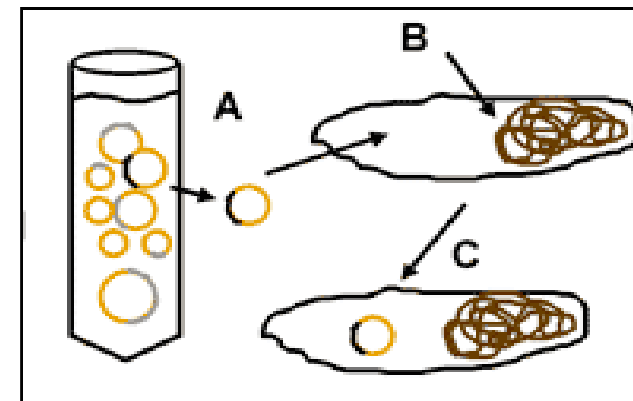
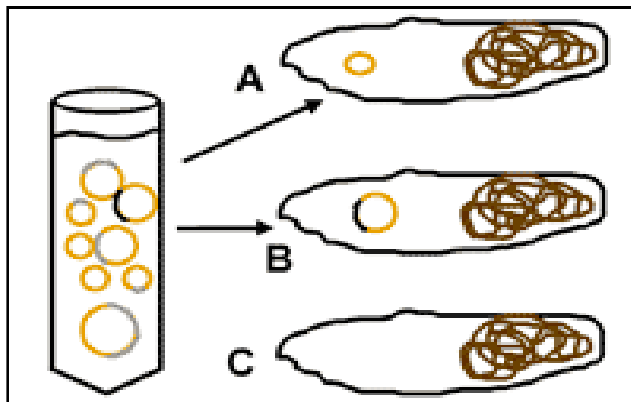
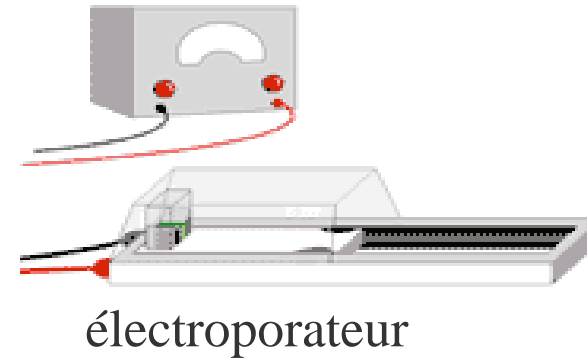


(a)

Introduction de l'ADN recombinant dans les cellules hôtes

De type procaryotique (bactéries):

Cas d'un vecteur plasmidique: l'ADN est introduit dans les bactéries traitées spécialement le plus souvent par choc thermique ou par choc électrique.



Identification des clones intéressants

Dans ce cas les bactéries transformées avec le vecteur ne possédant pas ou possédant l'insert sont sélectionnées --> un criblage est nécessaire

