

# Cours de génie génétique

Chapitres V, VI et VII



**L3 biochimie**

Par Dr. GUENDOUZE A.

1

## Chapitre V

### Détermination des séquences des acides nucléiques

2

## Détermination des séquences des acides nucléiques

- Le séquençage génétique de Sanger est un moyen de déterminer l'ordre des quatre nucléotides dans un brin d'ADN. Il est devenu indispensable dans les domaines de la recherche de base, de la biotechnologie, de la médecine légale et du diagnostic médical
- À la fin des années 1970, la biologie voit naître les deux premières méthodes de séquençage d'ADN. L'une de ces méthodes, le séquençage de Maxam-Gilbert, utilise des produits chimiques pour rompre l'ADN et déterminer sa séquence. Frederick Sanger met au point la seconde méthode, pour laquelle il reçoit, avec Maxam et Gilbert, le prix Nobel.

3

## La méthode de Sanger : Comment fonctionne-t-elle?

- Pour commencer, il vous faut un brin d'ADN à séquencer. Ensuite, vous ajoutez une séquence d'amorce, les quatre nucléotides (dNTP et ddNTP) et une enzyme appelé ADN polymérase qui incorpore de nouvelles bases de nucléotide, faisant un nouveau brin d'ADN conforme à l'original. Dans la méthode originale de Sanger, quatre différentes réactions de séquençage sont effectuées. Chaque réaction comprend un nucléotide modifié (**didésoxynucléotide**), qui, une fois incorporé, constitue la fin d'une chaîne d'ADN, ce qui permet d'identifier la base finale. Ces échantillons sont alors soumis à l'électrophorèse en gel, méthode qui permet de séparer les nouveaux brins d'ADN sur une base en gel à l'aide de courant électrique. Les brins d'ADN peuvent alors être vus à l'aide de rayons X ou de lumière ultraviolette. Pour lire le gel, vous commencez par le bas et regardez les bandes (tirets noirs) afin de déterminer le séquençage du fragment d'ADN. Chaque colonne de gel a une base différente à l'extrémité. Par conséquent, chaque colonne représente un brin d'ADN avec cette base à l'extrémité (Figure 1A)

4

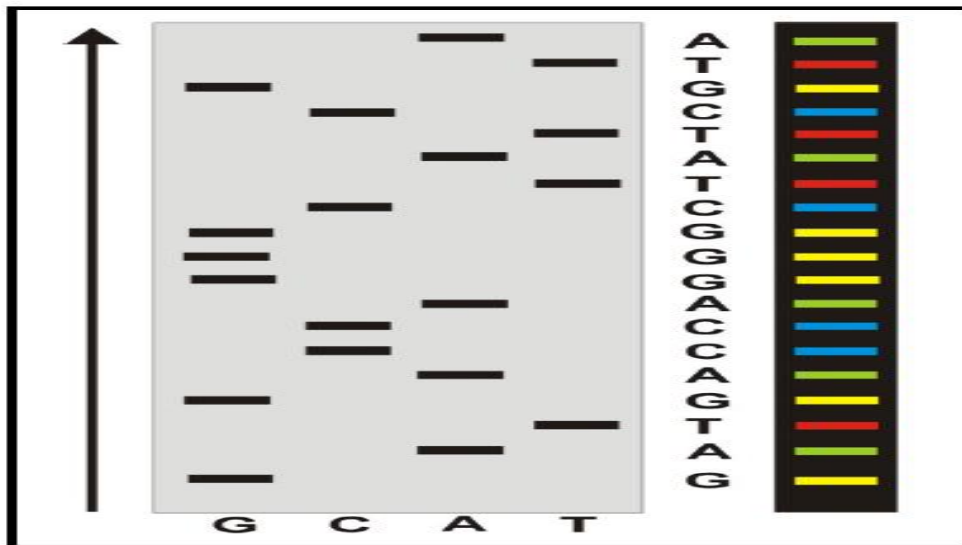
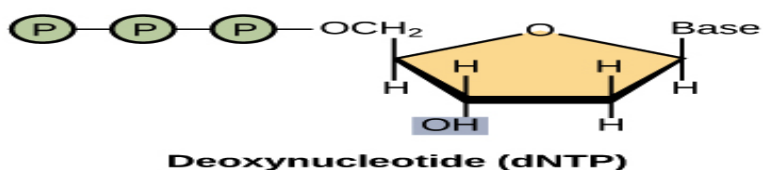
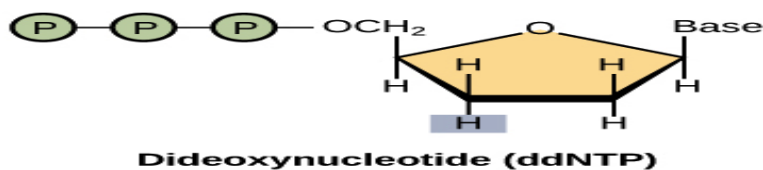


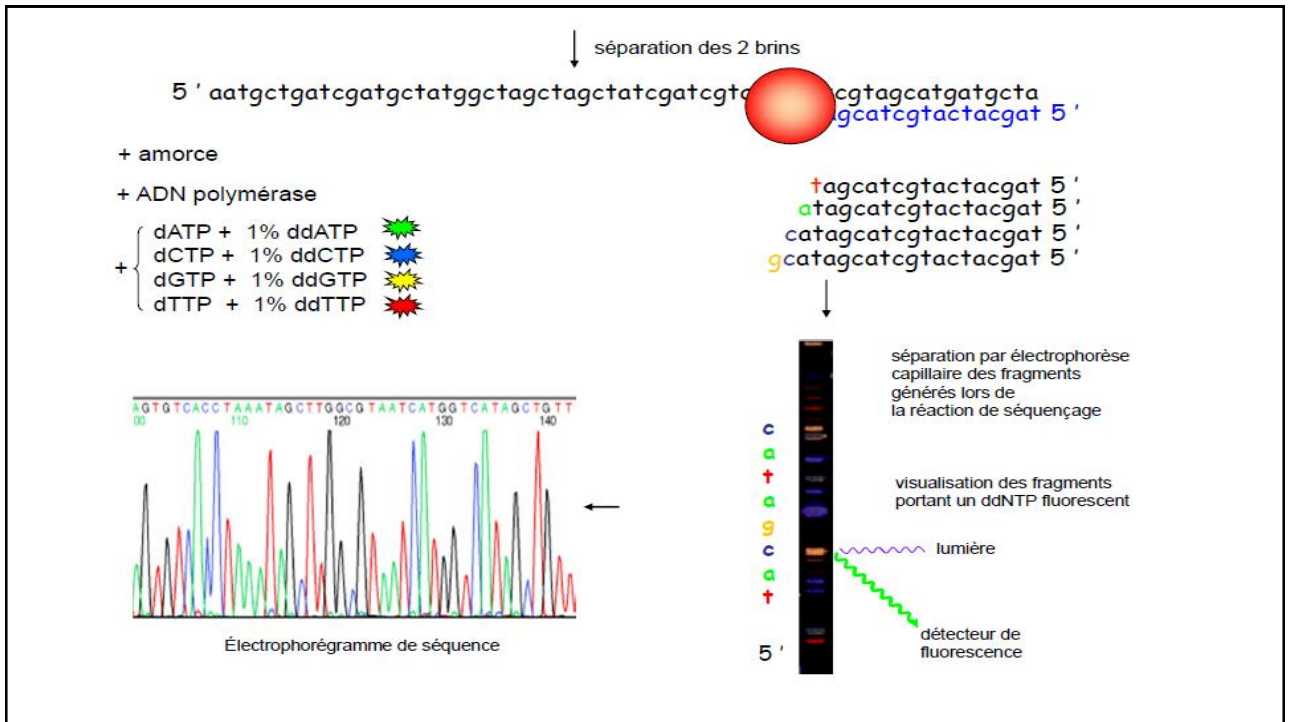
Figure 1A (gauche) : Électrophorèse en gel standard.  
 Figure 1B (droite) : Séquençage à l'aide de fluorophores.

5

- Des avancées ultérieures dans cette méthode ont incorporé l'utilisation de fluorophores, qui sont de petits composés chimiques dégageant des lumières colorées. En ajoutant un fluorophore coloré différent à chaque nucléotide, le séquençage peut être effectué en une seule réaction avec une seule colonne de gel pour représenter les brins d'ADN; la couleur de la bande indique la base située à l'extrémité du fragment d'ADN (Figure 1B)



6



## Chapitre VI

**Techniques d'analyse de l'expression  
des gènes, modification du matériel génétique**

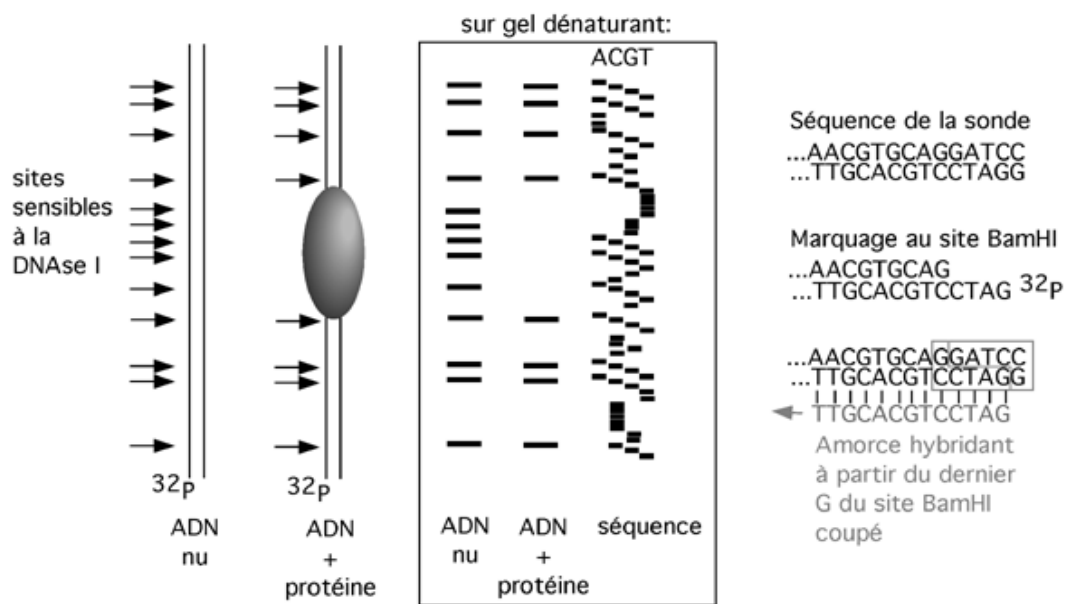
## 1. Empreinte à la DNase I

- Cette technique, utilise le fait qu'une protéine déposée sur l'ADN peut le protéger de l'activité de dégradation d'une nucléase. Dans ce cas précis, il s'agit de la DNase I qui ne coupe qu'un seul brin à la fois, aussi on marque un seul des brins au  $^{32}\text{P}$  pour suivre son comportement sur gel de séquence.

La dégradation partielle du fragment d'ADN protégé par la protéine générera une échelle de fragments de tailles différentes.

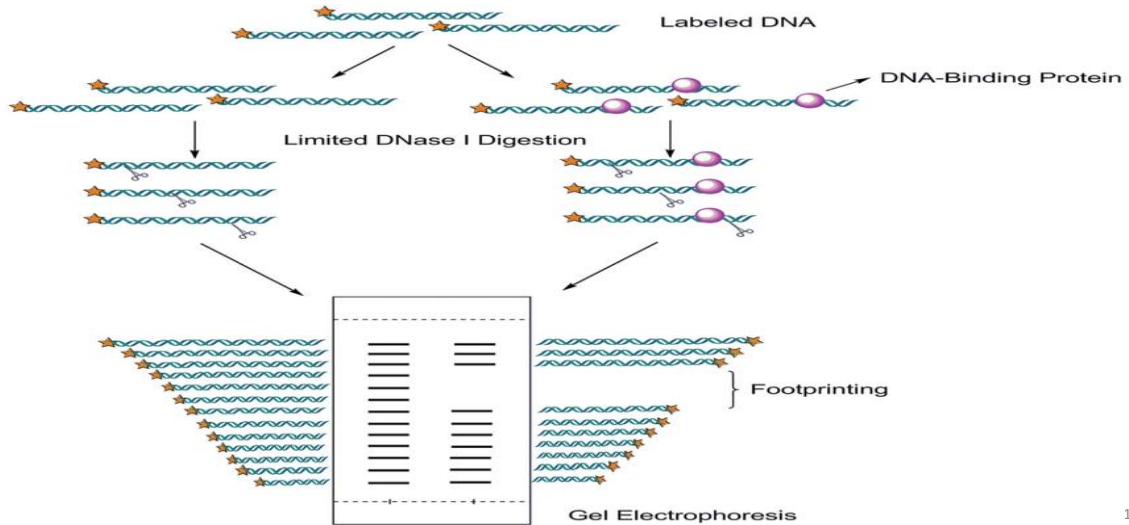
- En comparant l'échelle donnée par un ADN nu à celle donnée par un ADN protégé, on remarque que cette dernière présente un trou, ou une empreinte, correspondant aux sites rendus inaccessibles à l'enzyme par la protéine.

9



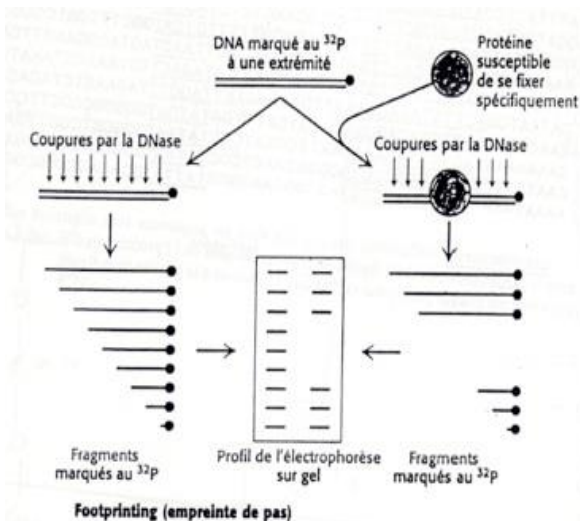
10

- Afin de déterminer précisément la position de cette empreinte, on fait souvent courir à côté des pistes de digestion à la DNase une réaction de séquence. Les empreintes à la DNase I ont tendance à être grandes et claires



1

## Exemple: Identification des promoteurs par footprinting :



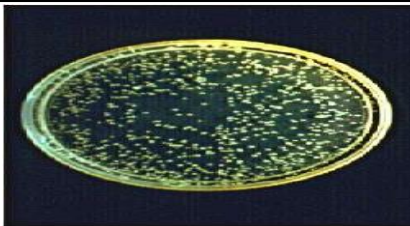
- On traite un ADN par 2 manières :
- Coupure par la DNase qui fait apparaître des fragments qu'on peut révéler par électrophorèse.
- On introduit une protéine se fixant sur les promoteurs, puis on coupe par la DNase. L'électrophorèse révèle des zones non coupées = zones de promoteurs de gènes.

12

## 2. Gène rapporteur

- Un gène rapporteur est un gène témoin, un marqueur codant pour une protéine d'activité connue et détectable, il est utilisé pour étudier l'activité d'un autre gène.
- Ainsi le gène rapporteur est rajouté 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.
- -exemple de protéines fluorescentes: la protéine fluorescente verte (GFP), et la luciférase qui émet une lumière jaune.
- -exemple de protéine à activité enzymatique: le gène GUS, codant une enzyme (la bêta- glucuronidase) qui colore en bleu les cellules où il est actif, mais il est létal. Le gène lac Z codant la  $\beta$ -galactosidase (Lac Z) qui métabolise le X-gal fait apparaître une coloration bleue.

13



de la bactérie bioluminescente *Vibrio fischeri* à la lumière du jour



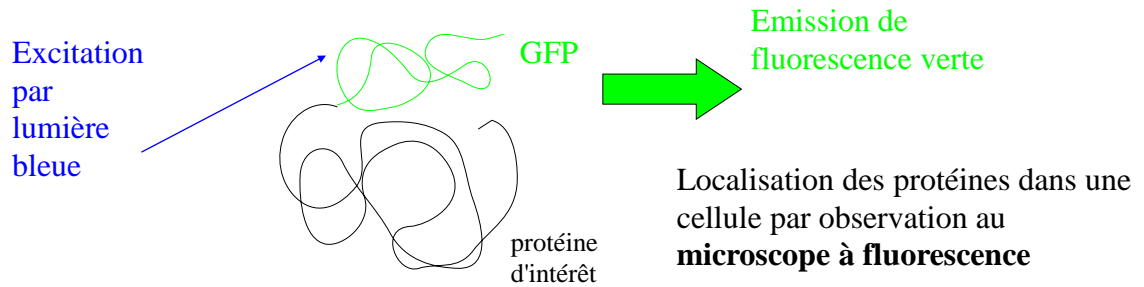
*Aequorea Victoria* qui produit la GFP  
( Green Fluorescent protein

Gènes rapporteurs doivent obéir à 3 conditions:

- être étrangers au génome 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 exp transformation du X-glu par l'enzyme GUS donnant un produit bleu dans le site).
- leur produit doit être quantifiable afin de mesurer l'activité du promoteur induisant la modification.

14

Exemple : fusion à la **GFP** (Green Fluorescent Protein). La GFP est une protéine issue d'une méduse *Aequorea victoria*, capable d'émettre une fluorescence verte après excitation par une lumière bleue.



15

## Chapitre VII

### **Applications biotechnologiques de l'ADN recombinant**

16



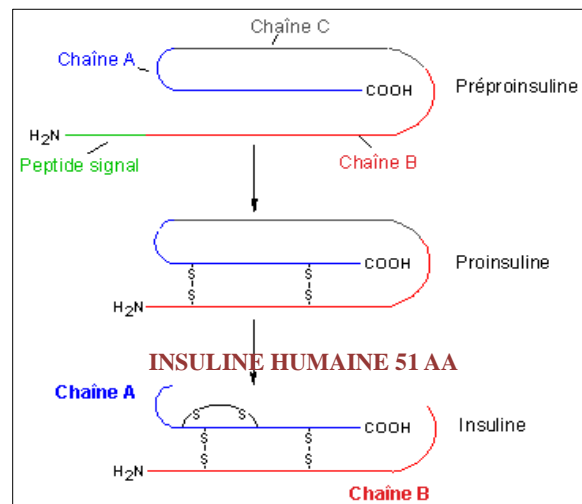
## Applications biotechnologiques de l'ADN recombinant

- Les protéines recombinantes synthétisées, grâce au génie génétique, sont représentées essentiellement par les hormones, divers facteurs de croissance et des anticorps monoclonaux.
- Ainsi, la cellule (bactéries, virus, levures, etc.) devient une usine de production de molécules complexes. Ce dispositif est largement utilisée aujourd'hui et dans certains cas depuis longtemps comme l'insuline dans le diabète, l'hormone de croissance (GH ou Growth Hormone) dans le nanisme (petite taille par arrêt de croissance), les anticorps monoclonaux dans le traitement de certains cancers, l'interféron bêta dans la sclérose en plaques, l'érythropoïétine dans le traitement des anémies, etc.

17

### Exemple: production de l'insuline

- L'insuline est synthétisée sous la forme d'un précurseur, la pré-pro-insuline dans les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans.
- Le peptide signal est clivé dans le réticulum endoplasmique.
- Après synthèse, la partie centrale (le polypeptide C) est hydrolysée, ce qui génère les polypeptides A et B. L'insuline mature est constituée de ces 2 polypeptides A et B reliés par des pont disulfure.



La pro-insuline précurseur biosynthétique de l'insuline.: 86 aa répartis en 3 chaînes: A (21 aa), B (30 aa) Et C (31 aa)

18

**Par génie génétique: Production séparée des chaînes A et B puis assemblage ou production de la pro-insuline puis élimination du peptide C.**

### A-Production de la Proinsuline

- La proinsuline se replie spontanément avec établissement des ponts disulfures

Protéase clivant le peptide → C Insuline finale + Peptide C: 35aa

- Production dans E. coli
- Avantages
  - une seule chaîne de fabrication
  - simplification des procédures, pas de protéine de fusion

19

### Procédure

#### 1) Isolement du gène de l'insuline

L'ARNm codant pour la proinsuline est isolé de cellules du pancréas. Par utilisation de la reverse transcriptase, on obtient de l'ADNc puis avec la polymérase, de l'ADNc bicaténaire.

#### 2) Vecteur

Le plasmide pBR322 portant les gènes de résistance à l'ampicilline et à la tétracycline est choisi comme vecteur de clonage. Le gène de résistance à la tétracycline contient un site de 6 bases reconnu par l'enzyme de restriction Bam HI. Il contient aussi un promoteur puissant (promoteur Tryp E).

#### 3) Insertion dans le vecteur

Le plasmide est ouvert au site Bam HI. L'ADNc codant pour la proinsuline est flanqué de 2 linkers (séquence d'ADN bicaténaire artificiellement ajouté) pour avoir la séquence de nucléotides appropriée à la ligation (compatibilité). La ligation des 2 molécules d'ADN (vecteurs et ADNc) se fait par une ligase.

20

#### 4) Hôte : cellule transformée

Le plasmide ainsi modifié est introduit dans une bactérie. La souche choisie est E coli K12 initialement sensible à la tétracycline et à l'ampicilline

#### 5) Sélection des clones

Le plasmide pBR322 apporte initialement les 2 résistances à l'ampicilline et à la tétracycline. Cependant, l'insertion du gène de la proinsuline au site Bam HI du plasmide ne lui permet pas d'apporter cette seconde résistance à la tétracycline. Ainsi, les colonies bactérienne capable de se développer sur un milieu contenant de l'ampicilline sont des bactéries ayant intégrées le plasmide. Par réplique (à l'aide d'un papier buvard) sur un milieu contenant de la tétracycline, on repère alors les colonies d'E. coli qui sont à la fois résistante à l'ampicilline et sensible à la tétracycline ; Ces dernières sont alors celles qui ont intégrées le plasmide transformé avec le gène de la proinsuline.

21

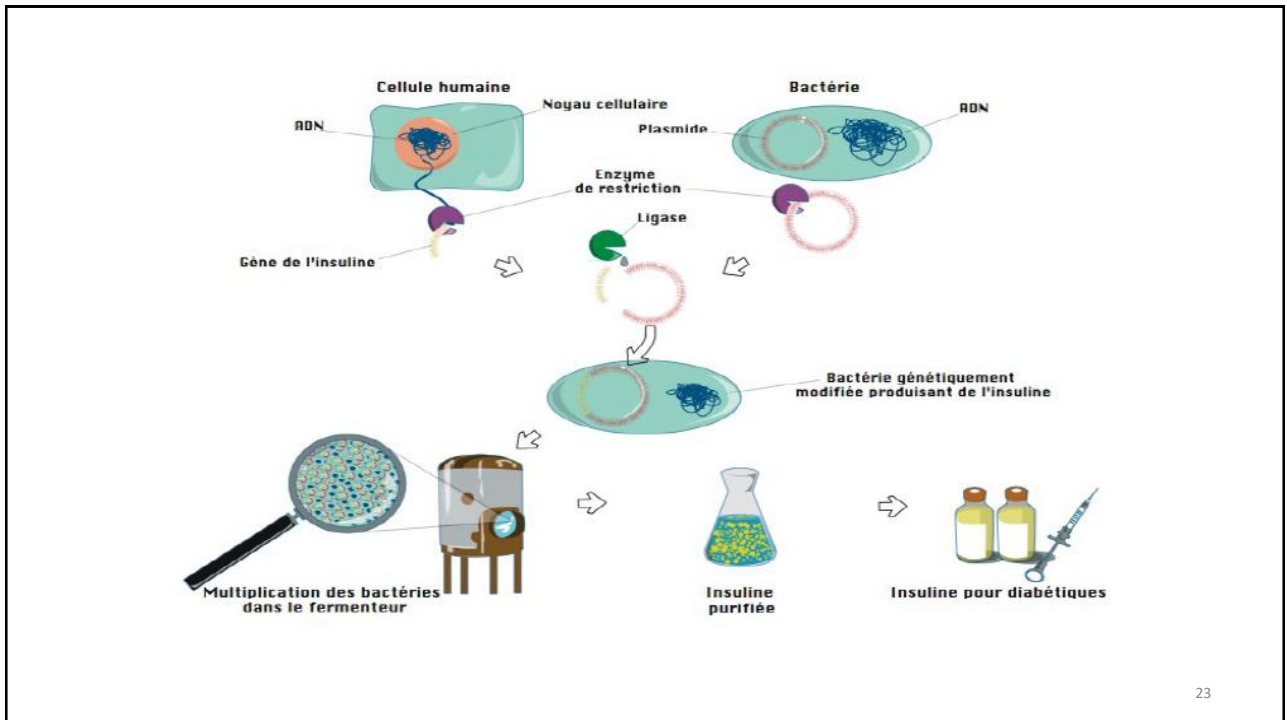
#### 6) Vérification de la production de proinsuline

Il faut ensuite vérifier que les colonies sélectionnées produisent bien de la proinsuline.

#### 7) Modification et caractérisation du produit

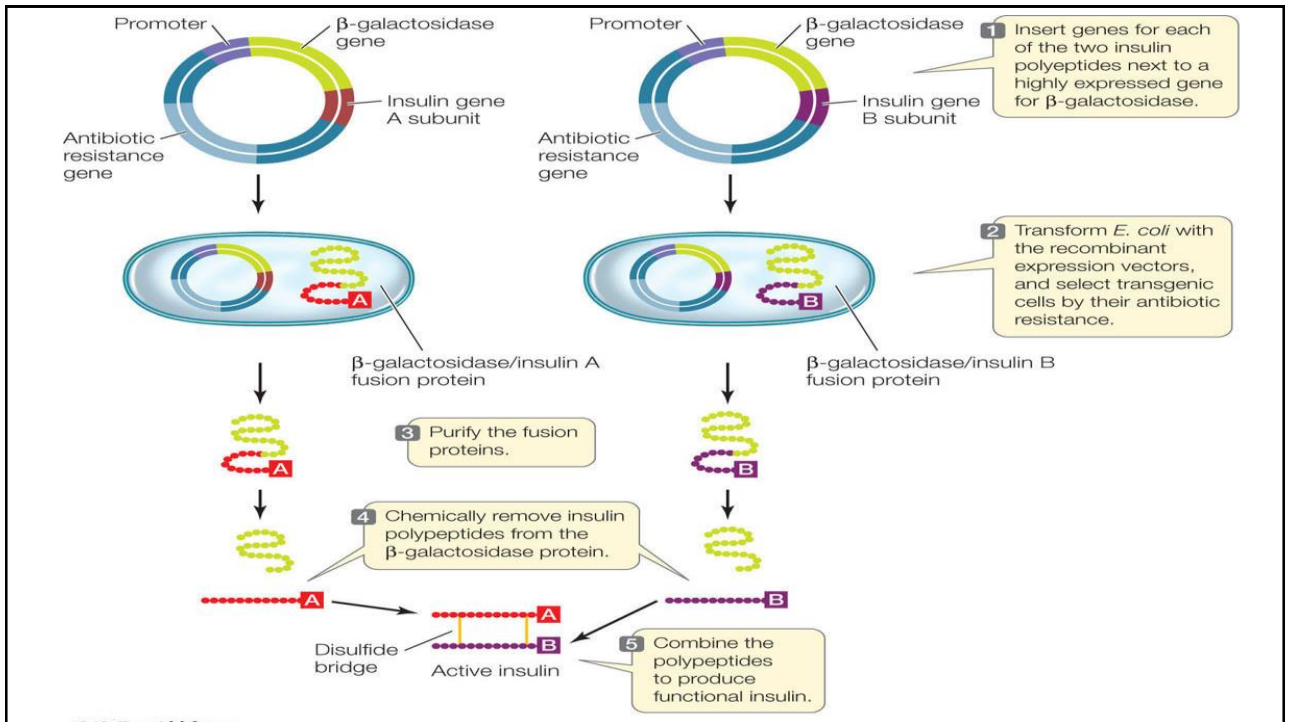
Les clones sélectionnés sont mis à cultiver à grande échelle. Le produit obtenu est purifié puis convertie en insuline par un mélange de trypsine et de carboxypeptidase B L'insuline est ensuite analysée par HPLC

22



## b. Production de 2 chaînes séparément dans *E. coli*

- Trop petit tel quel, donc production sous la forme d'une protéine de fusion:  $\beta$ -galactosidase-chaîne A et  $\beta$ -galactosidase-chaîne B
- Purification, puis clivage de la protéine liée à la  $\beta$ -galactosidase. Coupure au BrCN après la Met.
- Mélanger les deux chaînes A et B purifiées dans des conditions oxydatives pour favoriser la formation de ponts disulfure.



Fin de cours