

Biologie Moléculaire et Génie Génétique

Dr. SELKA SARRA

Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen

Faculté SNV-STU

Département de Biologie

Email: s.selka.sek@gmail.com

1.0



Table des matières

Introduction	3
I - Chapitre I: Les principaux outils de Génie génétique	4
1. LES ENZYMES	4
1.1. Les enzymes qui coupent l'ADN	4
1.2. Les enzymes qui ligaturent	5
1.3. Les enzymes qui déphosphorylent.....	5
1.4. Les enzymes qui phosphorylent.....	5
1.5. Les enzymes qui recopient un acide nucléique.....	5
2. Exercice	5
3. Exercice	6
4. LES VECTEURS	6
4.1. Les bactériophages	6
4.2. Les plasmides	6
4.3. Les phagémides.....	6
4.4. Les cosmides	6
4.5. Les vecteurs navette	6
4.6. Les banques YAC (yeast artificial chromosome).....	6
4.7. Les BAC (Chromosome Artificiel Bactérien).....	6
4.8. Le plasmide Ti d'Agrobacterium tumefaciens.....	7
4.9. Baculovirus.....	7
4.10. Les vecteurs viraux des mammifères	7
4.11. Transfert direct des gènes	7
5. LA CELLULE HOTE.....	7
6. Exercice	7
7. LES SONDAS NUCLEOTIDIQUES.....	7
8. Exercice	7

Introduction



La biologie moléculaire est une discipline scientifique au croisement de la génétique, de la biochimie et de la physique dont l'objet est la compréhension des mécanismes de fonctionnement de la cellule au niveau moléculaire qui permettent la conservation et la perpétuation de la structure vivante au niveau du génotype.

Elle désigne également l'ensemble des techniques de manipulation d'acides nucléiques (ADN, ARN), appelée aussi techniques de génie génétique.

Pour cela, les techniques d'étude et de modification des gènes et de leur expression font partie intégrante de la biologie moléculaire. La biologie moléculaire est une discipline scientifique qui décrit la manière dont l'information génétique est conservée, transmise et exprimée.

Le génie génétique est un « ensemble de techniques permettant d'identifier et d'isoler, de modifier et de transférer de façon contrôlée du matériel génétique ».

Le génie génétique est une science qui s'attache à l'étude du vivant ainsi que sont amélioration, il comprend l'ensemble des techniques et approches utilisés dans la modification et l'étude des gènes.

b) 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:

- La Dnase: ADN double brin et simple brin.^[3]
- La nucléase SI: ADN simple brin.^[3]^[3]

1.2. Les enzymes qui ligaturent

Il permet de relier les 2 fragments d'ADN double brins (enzyme capitale puisqu'elle permet la construction de molécules d'ADN recombinées).

ADN ligase: L'enzyme n'agit que si les 2 ADN sont associés par des extrémités cohésives, cette ligase assure la formation des liaisons phosphodiester

T4 ADN ligase: Elle est capable d'effectuer des ligations entre 2 ADN à bouts francs.^[3]^[3]

1.3. Les enzymes qui déphosphorylent

Les phosphatases alcalines

- Active pH alcalin
- Origine bactérienne ou bovine
- Elimination d'un groupement P en 5' d'une chaîne d'ADN.^[4]^[4]^[4]

1.4. Les enzymes qui phosphorylent

Les kinases

- Transfert d'un groupement P à partir d'une molécule d'ATP à l'extrémité 5' de l'ADN déphosphorylé
- Extraites de bactéries.^[4]^[4]^[4]

1.5. Les enzymes qui recopient un acide nucléique

- ADN ADN : ADN pol I , Klenow, Séquenase, La *Taq pol*
 - ARN ADN : La retrotranscriptase RT
 - ADN ARN: L'ARN pol.^[4]^[4]^[4]

2. Exercice

Les enzymes de restriction sont :

- Sont toutes des exonucléases
- Capables de couper des molécules d'ADN simple brin
- Endonucléases spécifiques

3. Exercice

Le nombre de site de restriction dans une carte de restriction :

- Dépend de la nature de l'ADN
- Dépend de la nature de l'enzyme
- Le nombre de site de restriction = nombre de fragments ADN obtenus, pour un ADN circulaire

4. LES VECTEURS

Le choix du vecteur dépend du type d'approche choisie lors de l'étude, un vecteur plasmidique sera préférentiellement utilisé pour le séquençage de petit fragments d'ADN (jusqu'à 2 kilo bases), alors que des vecteurs phagiques, YAC (Yeast Artificial Chromosome) ou BAC (Bacterial Artificial Chromosome) sont utilisés pour réaliser des banques d'ADN génomiques.



Fondamental

Il existe plusieurs types de vecteurs, on peut citer:

- Les vecteurs de clonage qui sont utilisés pour le stockage et la multiplication de fragments d'ADN (amplifier le nombre de copies).
- Les vecteurs d'expression Destine a transférer un gène et le faire exprimer dans une cellule hôte qui n'est pas sa cellule d'origine.

4.1. Les bactériophages

- Phage λ .
 - Phage M13.

4.2. Les plasmides

- pBR322.
 - pUC :pUC18, pUC19.

4.3. Les phagémides

Vecteur artificiel hybride :phage M13+plasmide, exp: pBluescript II.

4.4. Les cosmides

Vecteur artificiel hybride (Phage λ + plasmide).

4.5. Les vecteurs navette

Réplication dans une cellule Bactérienne et l'expression dans une cellule eucaryote.

4.6. Les banques YAC (yeast artificial chromosome)

Chromosome artificiel de la levure.

4.7. Les BAC (Chromosome Artificiel Bactérien)

Chromosome artificiel bactérien.

4.8. Le plasmide Ti d'Agrobacterium tumefaciens

Plasmide Ti: pTi (plasmid tumor inducing) de la bactérie Agrobacterium tumefaciens.

4.9. Baculovirus

Infecte les cellule des insectes.

4.10. Les vecteurs viraux des mammifères

Vecteurs basés sur des virus:

-SV40: virus simien40.

-Rétrovirus.

4.11. Transfert direct des gènes

•Transitoire: y'aura pas de transmission a la descendance car le plasmide ne peut pas se répliqué dans la cellule eucaryote.

•Permanente: liposome, micro injection, électroporation.

5. LA CELLULE HOTE

Pour se répliquer, un vecteur doit être incorporé dans une cellule hôte spécifique de chaque type de vecteur. Exemple : si le vecteur est un plasmide, la cellule hôte est une bactérie. On distingue 2 catégories d'hôtes :

1- Les hôtes bactériens: Ce sont les hôtes les plus utilisés car ils se multiplient rapidement et sont faciles à manipuler.

2- Les hôtes eucaryotes: Peuvent être des cellules animales en culture, des levures ou des plantes. Leur manipulation est complexe et coûteuse.[2]^[2]



La cellule hôte ne doit pas modifier ou détruire l'ADN recombiné qui y a été introduit.

6. Exercice

Les hôtes [] sont les hôtes les plus utilisés car ils se multiplient rapidement et sont faciles à manipuler.

7. LES SONDES NUCLEOTIDIQUES

- Segment d'ADN simple brin utilisé pour repérer le fragment recherché par hybridation moléculaire.
- Complémentaire et antiparallèle au fragment recherché qui doit être aussi simple brin.
 - Hybride entre ADN/ADN, ADN/ARN, ARN/ARN.[4]^[4]

8. Exercice

Les sondes nucléotidiques sont complémentaire et [] au fragment recherché qui doit être [] .